

JEDNODUCHÁ PRÍPRAVA A SEPARÁCIA MAGNETOLIPOZÓMOV

MELÁNIA BABINCOVÁ

Katedra biofyziky a chemickej fyziky, Matematicko-fyzikálna fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina F1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Došlo dňa 24.III. 1997

Úvod

Magnetické separácie predstavujú efektívny alternatívny spôsob, ako urýchliť niektoré štandardné separačné postupy a metódy¹. Ich princípom je adsorpcia zlúčeniny alebo dokonca celej bunky² na magnetickej častici s následným odstránením komplexu prostredníctvom vonkajšieho magnetického poľa, pomocou magnetických separátorov, väčšinou konstruovaných na báze permanentných magnetov. Veľkú cenu komerčných prístrojov sa podarilo nedávno prekonať návrhom jednoduchého separátora so schopnosťami porovnateľnými s komerčnými prístrojmi³. Ako magnetické nosiče sa používajú najčastejšie práškové oxidy železa. Magnetické nosiče rôznych druhov sú taktiež distribuované mnohými zahraničnými firmami a sú ziaľ tiež veľmi drahé. Magnetické častice je možné zabudovávať do štruktúry biopolymérov alebo syntetických polymérov, takto možno pripraviť napr. magnetický chitín⁴.

Cieľom tejto práce je študovať možnosť použitia nosičov na báze magnetolipozómov, ktoré rovnako ako bežné lipozómy, sú uzavreté sférické útvary, skladajúce sa z jednej alebo viacerých lamiel, tvorených lipidickou dvojvrstvou. V magnetolipozómoch sú navyše do tejto dvojvrstvy zabudované magnetitové Fe_3O_4 častice rozmerov ~ 10nm, vďaka čomu sú magnetolipozómy citlivé na magnetické pole, čo umožňuje ich využitie na rozne účely⁵, napr. ako prostriedok na cielečné zavádzanie liečiva do nádorov⁶⁻¹⁰.

Experimentálna časť

Chemikálie a prístroje

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NH_4OH , chloroform a metanol

všetky čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR), Fosfatidylcholín zo sojových bôbov (Sigma, USA), Spektrofotometer SPECOL 210 (Carl-Zeiss Jena, Germany), Vaničkový ultrazvukový dispergátor (Chirana, Stará Turá, SR), Ako magnetický separátor bol použit zliatinový permanentný magnet, priemeru 16 cm a hrúbky 3,8 cm, schopný udržať 1,5 kg železa.

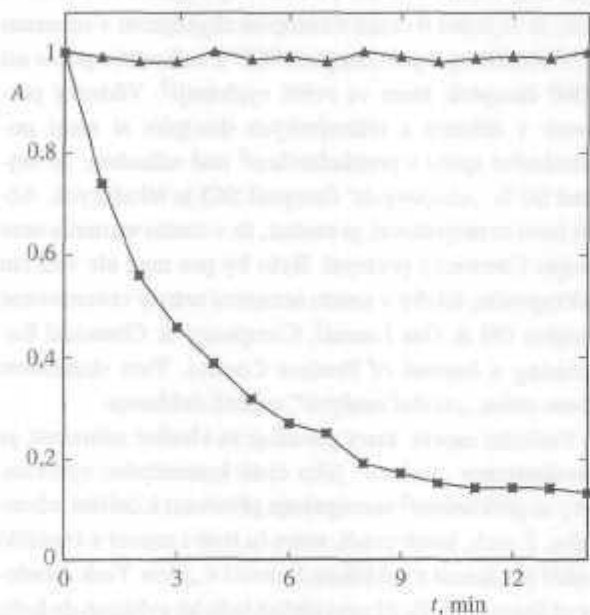
Príprava magnetolipozómov

Magnetitové častice boli pripravené^{11,12} zmiešaním 6 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (rozpustenom v 25 ml vody) a 12 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (taktiež rozpustenom v 25 ml vody). 25 ml 30 % NH_4OH bolo pomaly pridávaných do tejto reakčnej zmesi za stáleho miešania. Magnetitové častice vznikajú ako gelový precipitát. Tento vodný roztok niektorí autori doporučujú dispergovať ultrazvukom¹³. 100 mg fosfatidylcholínu bolo rozpustených v zmesi chloroform/metanol (2:1) a rozpúšťadlo bolo následne odparené, čím vznikol na stenách banky tenký lipidický film. Do banky bolo potom pridaných 50 mg čerstvo pripraveného a osušeného magnetitu, a zmes bola hydratovaná 50 ml vody a intenzívne ručne pretrepávaná a krátky čas (1 min) vystavená pôsobeniu ultrazvuku (20 kHz, 80 W), čím sa získali multilamelárne lipozómy so zabudovanými magnetitovými časticami (magnetolipozómy). Vzhľadom k tomu, že magnetitové častice sú veľmi nestabilné a rýchle oxidujú, po ich príprave sa musí k nim pridávať stabilizátor, najčastejšie dextrans¹⁴ alebo masné kyseliny⁵. V našom prípade nie je potrebné stabilizátor použiť, pretože magnetitové častice sú stabilizované uhlíkovodíkovými reťazcami lipidu, analogicky ako v prípade použitia masných kyselín. V prípade potreby je možné voľné magnetitové častice odstrániť centrifugáciou, ako to bolo robené vo farmaceutických aplikáciách⁷.

Výsledky a diskusia

Vplyv magnetického poľa na separáciu magnetolipozómov možno posúdiť na základe obr. 1. Banka s obsahom 50 ml vodnej suspenzie lipozómov bola uložená na povrch magnetu, pričom sa v pravidelných časových intervaloch odoberalo 0,5 ml vzorky zo vzdialenosti 2 cm nad dnom banky. Pretože absorbanca svetla je úmerná koncentrácii magnetolipozómov (ktoré majú rozmery ~ 1 μm), časová

závislosť poklesu absorpcie je mierou efektívnosti separácie pod vplyvom magnetického poľa. Ako možno vidieť, i použitím bežne dostupného permanentného magnetu sú magnetolipozómy veľmi rýchlo odstraňované z hornej vrstvy kvapaliny a sústredované v blízkosti magnetu. V neprítomnosti magnetu sa turbidita suspenzie prakticky nemení.



Obr. 1. Závislosť relatívnej absorpcie A suspenzie magnetolipozómov od času t , pri vlnovej dĺžke 600 nm, pod vplyvom a bez vplyvu magnetického poľa; • magnet, • bez magnetu

Prvou, už spomínanou výhodou magnetolipozómov je ich nízka cena a jednoduchá príprava. Druhou výhodou je to, že lipidická dvojvrstva predstavuje prirodzené prostredie pre bunkové receptory, ktoré sa ako integrálne proteíny do nej zabudovávajú spontánne, čo sa už veľa rokov využíva pri cieľnom prenose liečivami naplnených lipozómov ku konkrétnym, napr. rakovinovým bunkám¹⁵. Jednou z posledných aplikácií lipozómov bolo zabudovanie CD4 receptorov do ich dvojvrstiev s následným naviazaním na HIV vírusy a infikované bunky, čo po uvoľnení antivirálného liečiva viedlo k ich efektívnemu zničeniu¹⁶. Skúsenosti získané pri cieľnom prenose liečiv pomocou lipozómov môžu byť využité i pri možnej magnetickej separácii buniek, na ktoré sa magnetolipozómy so zabudovanými špecifickými bielkovinami môžu viazať.

LITERATÚRA

- Šafaříková M., Šafařík I.: Chem. Listy 89, 280 (1995).
- Šafařík I., Šafaříková M.: Chem. Listy 88, 464 (1994).
- Šafařík I., Šafaříková M.: Biotechnol. Tech. 9, 137 (1995).
- Šafařík I., Šafaříková M.: J. Biochem. Biophys. Methods 27, 327 (1993).
- De Cuyper M.: *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes* (Barenholz Y., ed.), str. 325. CRC Press, Boca Raton 1996.
- Babincová M.: Bioelectrochem. Bioenerg. 32, 187 (1993).
- Babincová M.: Pharmazie 50, 702 (1995).
- Babincová M., Babinec P.: Pharmazie 50, 828 (1995).
- Babincová M., Babinec P.: Cell. Mol. Biol. Lett. 2, 3 (1997).
- Viroonchatopan E., Ueno M., Sato H., Adachi I., Nagae H., Tazawa K., Horikoshi I.: Pharm. Res. 12, 1176 (1995).
- Reimers G. W., Khalafalla S. E.: U.S. patent 3843540 (1974)
- Mann S., Skarnulis A. J., Williams R. J. P.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 1067.
- Muzynčeková I., Kellnerová V., Koneracká M., Kopčanský P., Antalík M., Ďurišin J.: Czech. J. Phys. 45, 727 (1995).
- Bogdanov A. A., Martin C., Weissleder R., Brady T. J.: Biochim. Biophys. Acta. 1193, 212 (1994).
- New R. R. C.: *Liposomes-A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University, Oxford 1990.
- Slepishkin V. A., Salem I. I., Andreev S. M., Dazin P., Düzgünes N.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 227, 1827 (1996).

M. Babincová (Department of Biophysics and Chemical Physics, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic): **Simple Preparation and Separation of Magnetoliposomes**

Liposomes with incorporated magnetite (Fe_3O_4) particles of diameter ~ 10 nm (magnetoliposomes) were studied from the point of view of their applications as carriers in the magnetic separations. The magnetite particles were prepared by coprecipitation of FeCl_2 in the presence of an excess of ammonia and then incorporated into the lipid bilayers of formed liposomes. The influence of magnetic field on their separation was studied spectrophotometrically. As has been shown, magnetoliposomes represent a simple and cheap alternative to other commonly used but much more expensive commercial carriers.