



Doctoral Thesis

Cholatdialyseliposomen Herstellung und trypanozide Wirkung

Author(s):

Zumbühl, Othmar

Publication Date:

1981

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000235592> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 6919

CHOLATDIALYSELIPOSOMEN: HERSTELLUNG UND TRYPANOZIDE WIRKUNG

Abhandlung

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich

vorgelegt von
OTHMAR ZUMBÜHL
eidg. dipl. Apotheker
geboren am 6. Juni 1950
von Wolfenschiessen, Kanton Nidwalden

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. G. Weder, Referent
Prof. Dr. Th. Koller, Korreferent

Zürich 1981
Zentralstelle der Studentenschaft

7. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Herstellung unilamellarer Liposomen durch kontrollierte Dialyse wird die Liposomengrösse durch die Dialysekinetik des Cholats gesteuert. Eine Aenderung der Dialysekinetik während der eigentlichen Umwandlungsphase der gemischten Mizellen in Liposomen führt zu verschiedenen Grössenklassen der Liposomen.

Das molare Verhältnis EYL/Cholat beeinflusst Bildungszeit und Grösse der gemischten Mizellen. Oberhalb eines Verhältnisses von 1,3 entsteht keine klare Mizell-Lösung mehr. Bei konstantem EYL/Cholat-Verhältnis nimmt die Grösse der gemischten Mizellen mit zunehmender Lipidkonzentration ab. Gemischte EYL/Cholat-Mizellen mit einem molaren Verhältnis von 0,6-1,15 und einer Lipidkonzentration von 13 mg/ml können durch Verdünnen vergrössert werden.

Gemischte EYL/Cholat-Mizellen verschiedener Grösse mit einem molaren Verhältnis von 0,6-1,15 und einer Lipidkonzentration von 13 mg/ml führen zu direkt proportional verschieden grossen Detergentsdialyse-Liposomen von grosser Homogenität. Ihr Einschlussvolumen in Liter/Mol Lipid ist bis zu 9,6 mal grösser als dasjenige von beschallten Liposomen.

Gemischte Mizellen mit einem molaren EYL/Cholat-Verhältnis von 1,15, bzw. 0,72 und einer Lipidkonzentration von 13, bzw. 26 mg/ml können durch Verdünnung und anschliessende Dialyse in Liposomen übergeführt werden. Die so entstandenen Liposomen sind kleiner als Liposomen, welche ohne Verdünnung vor der Dialyse aus den entsprechenden Mizellen hergestellt werden.

Der quantitative Einbau von 30 mol% Cholesterol in Detergentsdialyse-Liposomen sowie deren Stabilität bezüglich des molaren Cholesterol/Lecithin-Verhältnisses während 20 Tagen konnte nachgewiesen werden. Eine klare Cholesterol/Lecithin/Cholat-Mizell-Lösung kann einzig durch Zugabe des Cholats in die or-

ganische Lösung der Lipide hergestellt werden.

Durch Ionenaustauschchromatographie kann der Einbau von 0,062 μmol Gangliosid/ μmol EYL in Detergensdialyse-Liposomen nachgewiesen werden. Dieses Glycolipid sowie Phosphatidylaethanolamin, - inositol, Lysolecithin und Cerebrosid in z.T. hohen molaren Anteilen dürften quantitativ in den Bilayer eingeschlossen werden.

Der Inulineinbau in Detergensdialyse-Liposomen kann durch Verhinderung des Abdialysierens der einzubauenden Substanz aus der Mizell-Lösung während der ersten zwei Stunden Dialyse um den Faktor 2,4 erhöht werden. Im Vergleich zu beschallten Liposomen kann die Einschlusskapazität in Liposomen mit der Detergensdialysemethode um den Faktor 25 erhöht werden. Innenvolumenbestimmungen mit dem wässrigen Marker Inulin beweisen die unilamellare Bilayerstruktur der Liposomen.

Der Einbau von Ferritin, Eisendextran und Eisensorbitcitrat in Cholatdialyseliposomen wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie bewiesen. Eisendextran und Eisensorbitcitrat werden aussen an der Liposomenmembran nicht gebunden. Mit diesen beiden Markern kann der unilamellare Aufbau der Liposomen nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopieaufnahmen zeigen ebenfalls die unilamellare Struktur sowie die grosse Homogenität der Liposomen.

Mit Elektronenmikroskopie, Lightscattering- und Ultrazentrifugationsmessungen kann keine Veränderung der Morphologie dialysierter, unilamellarer EYL-Liposomen durch Hitzesterilisation festgestellt werden. Demgegenüber werden die Diffusionseigenschaften der Liposomenmembran bei erhöhter Temperatur für waserlösliche Moleküle verändert.

Die Aufnahme von markiertem Lipid aus EYL- und EYL/Gangliosid-Liposomen durch Trypanosoma brucei und - congolense-Blutformen in vitro ist abhängig von der Liposomenkonzentration. Das Lipid wird beim Auswaschen der Erreger wieder kontinuierlich an

das Medium abgegeben.

Die EYL-Liposomen bewirken auf der Trypanosomenmembran in vitro eine Aggregation der Membranproteine, wie mit der Gefrierätztechnik im Elektronenmikroskop gezeigt werden konnte. EYL- und EYL/Gangliosid-Liposomen besitzen in vitro eine trypanozide Wirkung gegen T. brucei und T. congolense, welche vom Alter und von der Konzentration der Liposomen abhängig ist. Eine verminderte trypanozide Wirkung kann in vitro auch im vollen Blut beobachtet werden. Im in vivo-Experiment bei einer T. brucei-Infektion von Mäusen fehlt die trypanozide Wirkung vollständig, eventuell als Folge von Interaktionen zwischen den Liposomen und Blutbestandteilen, wie Plasma-High density lipoproteinen und andern Plasmaproteinen.

SUMMARY

Using the controlled dialysis method to prepare unilamellar liposomes, the liposomal size is determined by the dialysis kinetic of the cholate. Various liposomal size classes are obtained by changing the dialysis kinetic at the transformation point of mixed micelles to liposomes.

The time of formation and the size of the mixed micelles are influenced by the molar EYL/cholate ratio. No clear micelle solutions are obtained using a molar ratio above 1.3. For a fixed EYL/cholate ratio, the mixed micellar size decreases with an increasing lipid concentration. Mixed micelles with a molar ratio of 0.6-1.15 are enlarged in their size by diluting the system.

Very homogeneous liposomes of different corresponding size are obtained by dialysis starting from different sized mixed micelles. These micelles have a molar ratio between 0.6 and 1.15 and a lipid concentration of 13 mg/ml. The encapsulation volume of the liposomes in liter/mol lipid is up to 9.6 times increased compared with sonicated liposomes.

Liposomes can be prepared by dilution and subsequent dialysis of mixed EYL/cholate micelles with a molar ratio of 1.15 and 0.72 and a lipid concentration of 13 and 26 mg/ml respectively. Such liposomes are smaller in size than liposomes prepared by dialysis without dilution.

The quantitative incorporation of 30 mol% cholesterol into detergent dialysis liposomes could be proved. The molar cholesterol/lecithin ratio of such liposomes remained unchanged during twenty days. The addition of cholate to the organic lipid solution is essential for the formation of a clear micelle solution.

The incorporation of 0.062 μmol ganglioside/ μmol EYL in detergent dialysis liposomes could be proved by the ion exchange

chromatography. This glycolipid and phosphatidylaethanolamine, - inositol, lysolecithin and cerebroside, partly at high molar portion, may be incorporated quantitatively into the bilayer. The incorporation of inulin into detergent dialysis liposomes is 2.3 times greater, if during the first two hours of dialysis the removal of inulin from the mixed micellar solution is hindered. Detergent dialysis liposomes have a 25 times greater encapsulation efficiency than sonicated liposomes. Inulin serves as a water soluble marker to prove the unilamellar structure of liposomes.

The entrapment of ferritin, iron dextrane and iron sorbitol citrate in cholate dialysis liposomes can be proved by atomic absorption spectroscopy. Iron dextrane and iron sorbitol citrate are not adsorbed at the outer side of the liposomal membrane. The unilamellar structure of the liposomes can be proved with this two markers. The unilamellar structure and the great homogeneity of the liposomes could also be shown with electron microscopy.

Unilamellar liposomes prepared by dialysis are not affected in their morphology by a high temperature sterilization, as revealed electron microscopy pictures, light scattering and sedimentation measurements. Nevertheless, the diffusion properties of liposomal membranes for water soluble molecules are altered at higher temperatures.

Trypanosoma brucei and - congolense take up radioactively marked lipid from EYL- and EYL/ganglioside liposomes. The extent of uptake depends on the lipid concentration. The absorbed lipid is continuously released by washing out the cells. Freeze-fracture electron microscopy pictures revealed an aggregation of proteins on the trypanosomal membrane, caused by the interaction with the liposomes.

EYL- and EYL/ganglioside-liposomes show a trypanocidal activity against T. brucei and T. congolense in vitro. This activity

is dependent on the age and the concentration of the liposomes. A reduced trypanocidal activity can be seen in the whole blood in vitro. The liposomes are totally lacking in any trypanocidal activity against T. brucei in mice in vivo. Interactions between liposomes on the one hand and plasma high density lipoproteins and other plasma proteins on the other hand are considered to be the reason for the difference between the in vitro and the in vivo experiments.