



Politechnika Wroclawska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**MECHANIKA KOMPLEKSÓW MOLEKULARNYCH ORAZ
ICH ZNACZENIE BIOLOGICZNE**

MGR INŻ. JOANNA KIEC

PROMOTOR

PROF. DR HAB. INŻ. MAREK LANGNER

KATEDRA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

WYDZIAŁ PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI

WROCLAW 2023



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



Diamentowy
Grant

Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2018-2021 jako projekt badawczy w ramach programu „Diamentowy Grant” (nr projektu: 0120/DIA/2018/47).

Rozprawę doktorską przygotowano w formie zbioru czterech artykułów, w których skład wchodzi:

Praca 1: Joanna Doskocz, Marek Langner, *Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych jako element podniesienia jakości życia społeczeństwa*. W: *Jakość życia: środowiskowe aspekty życia / pod redakcją Jerzego Hanuzy*. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego, 2019. s. 85-102.

Wkład: praca nad koncepcją monografii, przeprowadzenie przeglądu literaturowego, opracowanie danych, przygotowanie manuskryptu oraz kontakt z wydawnictwem.

Praca 2: Joanna Doskocz, Dominik Drabik, Grzegorz Chodaczek, Magdalena Przybyło, Marek Langner, *Statistical analysis of bending rigidity coefficient determined using fluorescence-based flicker-noise spectroscopy*. *Journal of Membrane Biology*. 2018, vol. 251, nr 4, s. 601-608.

Wkład: praca nad koncepcją artykułu, przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu oraz kontakt z wydawnictwem.

Praca 3: Joanna Doskocz, Paulina Dałek, Aleksander Foryś, Barbara Trzebicka, Magdalena Przybyło, Luka Mesarec, Aleš Iglič, Marek Langner, *The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress*. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2020, vol. 1862, nr 9, art. 183361, s. 1-9.

Wkład: praca nad koncepcją artykułu, pozyskanie funduszy, zaplanowanie oraz przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu oraz kontakt z czasopismem.

Praca 4: Joanna Doskocz, Paulina Dałek, Magdalena Przybyło, Barbara Trzebicka, Aleksander Foryś, Anastasiia Kobylukh, Aleš Iglič, Marek Langner, *The elucidation of the molecular mechanism of the extrusion process*. *Materials*. 2021, vol. 14, nr 15, art. 4278, s. 1-20.

Wkład: praca nad koncepcją oraz metodologią artykułu, pozyskanie funduszy, zaplanowanie oraz przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu oraz kontakt z czasopismem.

Spis treści

Streszczenie	6
Lista symboli i skrótów	8
1. Cel i teza pracy	9
2. Opis pracy.....	10
2.1 Liposomy jako przykład kompleksów molekularnych: opis oraz zastosowanie (praca 1)....	10
2.2 Mechanika dwuwarstwy lipidowej oraz dostępne metody jej pomiaru (praca 2)	12
2.3 Pomiar siły ekstruzji jako nowa metoda określenia właściwości mechanicznych liposomów (prace 3 i 4)	17
2.4 Mechanika liposomów w procesie ekstruzji i jej wpływ na procesy biologiczne (prace 3 i 4)	22
3. Podsumowanie i perspektywy badań.....	28
Bibliografia.....	30
PRACA 1.....	36
PRACA 2.....	55
PRACA 3.....	69
PRACA 4.....	79

Streszczenie

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zastosowaniem liposomów w różnych gałęziach przemysłu, takich jak kierowane nośniki leków w farmacji, biosensory do monitorowania środowiska i diagnostyki medycznej czy systemy dostarczania substancji w kosmetologii lub projektowaniu żywności specjalnego przeznaczenia. Właściwości mechaniczne liposomów bezpośrednio wpływają na ich stabilność, wielkość oraz ilość i czas cyrkulacji przenoszonej substancji. Dodatkowo elastyczność liposomów wpływa na efektywność wyłapywania liposomów przenoszących substancje terapeutyczne przez komórki docelowe oraz efektywność ich akumulacji w tkankach docelowych.

Przedstawione wyniki sugerują, że sztywność liposomów jest parametrem, który jest krytycznie ważny dla efektywnego projektowania nowych liposomalnych preparatów. Mimo to, badania mechaniki dwuwarstwy lipidowej wykonuje się przede wszystkim po zastosowaniu liposomów o średnicy powyżej mikrometra, które nie mają zastosowania w przemyśle. Liposomy o rozmiarach submikronowych, powszechnie wykorzystane w wielu technologiach, rzadko są badane pod kątem właściwości mechanicznych. Dzieje się tak, ponieważ dostępna jest ograniczona liczba metod eksperymentalnych zdolnych do ilościowej oceny właściwości mechanicznych submikronowych liposomów, a dostępne techniki wymagają zastosowania skomplikowanych modeli oraz drogiej aparatury. Mechanika dwuwarstwy lipidowej w mikroskali jest badana przede wszystkim przy wykorzystaniu technik mikromanipulacyjnych lub spektroskopii drgań technicznych. Badania z wykorzystaniem mikroliposomów dostarczają danych przydatnych do zrozumienia układów biologicznych, ale nie udowodniono czy parametry uzyskane za pomocą takiego modelu eksperymentalnego można przełożyć na nanoskalę.

Pracę stanowi cykl czterech publikacji. W ramach pierwszej przeanalizowano zastosowania liposomów w przemyśle oraz potencjał nanocząsteczek lipidowych do podniesienia jakości życia społeczeństwa. W drugiej zebrano metody pomiaru właściwości mechanicznych wybranych nanocząstek lipidowych oraz zwrócono uwagę na nieścisłości pomiędzy wynikami otrzymanymi ze pomocą różnych technik. W kolejnej publikacji przedstawiono koncepcję nowej techniki pomiarowej przeznaczonej do wyznaczenia właściwości mechanicznych liposomów w submikronowej skali. W ostatnim artykule opisano kontynuację rozwoju nowej techniki pomiarowej. Dodatkowo w ramach pracy przeanalizowano wpływ właściwości mechanicznych liposomów na procesy biologiczne takie jak endocytoza oraz stabilność pod wpływem naprężeń mechanicznych.

Abstract

In recent years, there has been a growing interest of liposomes applications, such as targeted drug systems in pharmacy, medical diagnostics, cosmetology and food for special medical purpose design or biosensors for environmental monitoring. The mechanical properties of liposomes directly affect their stability, size as well as the amount and time of the substance transport. Additionally, liposomes mechanics affects the efficiency of cellular uptake of

liposomes carrying therapeutic substances and the efficiency of their accumulation in target tissues. The presented results suggest that liposome stiffness is a critical parameter for the new liposomal formulations design efficient. Nevertheless, the study of the lipid bilayer mechanics mainly focus on liposomes with a diameter greater than 1 micrometer, which are not applicable in industry. Sub-micron-sized liposomes, commonly used in many technologies, are rarely tested for mechanical properties. This is because there are a limited number of experimental methods available for quantifying the mechanical properties of submicron liposomes, and the available techniques require the use of complex models and expensive equipment. The lipid bilayer mechanics in the microscale is studied mainly using micromanipulation technique or flicker-noise spectroscopy method. Studies using microliposomes provide useful data for understanding biological systems, but it has not been proven whether the parameters obtained with such an experimental model can be translated into the nanoscale.

This work is an article thesis. It is collection of four publication. The first one analyzed the liposomes industrial applications and the potential of lipid nanoparticles to improve the quality of life in society. In the second article, methods of the lipid nanoparticles mechanical properties determination were collected and attention was drawn to the inconsistencies between the results obtained using various techniques. Another publication developed a new technique for measuring the liposomes mechanical properties on a submicron scale. In the last article, the development of the new measuring technique was continued. Additionally, the effect of the mechanical properties of liposomes on biological processes such as endocytosis and stability under mechanical stress was studied.

Lista symboli i skrótów

cryo-TEM - kriomikroskopia elektronowa (*ang. cryogenic electron microscopy*)

DLS – dynamiczne rozpraszanie światła (*ang. dynamic light scattering*)

DOPC - 1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina

DPPC - 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina

FRET – transfer energii rezonansu Förstera (*ang. Förster Resonance Energy Transfer*)

GUV – ogromne jednowarstwowe pęcherzyki (*ang. giant unilamellar vesicle*)

LUV - duże jednowarstwowe pęcherzyki (*ang. large unilamellar vesicle*)

MLV – wielowarstwowe pęcherzyki (*ang. multilamellar vesicle*)

MVV – wielopęcherzykowe pęcherzyki (*ang. multivesicular vesicle*)

NBD - Nitrobenzoksadiazol

PDI – współczynnik polidispersyjności (*ang. polydispersity index*)

POPC - 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina

Rh-B – Rodamina B

SUV – małe jednowarstwowe pęcherzyki (*ang. small unilamellar vesicle*)

κ – współczynnik sztywności na zginanie (*ang. bending rigidity coefficient*)

1. Cel i teza pracy

Nanocząsteczki przenoszące substancje biologicznie czynne lub preparaty kontrastujące są transportowane w krwioobiegu, a następnie dyfundują przez przestrzeń międzykomórkową i adhezują do powierzchni chorobowo zmienionych komórek, żeby zostać wchłonięte na drodze endocytozy. Z tego powodu skuteczność terapii oraz diagnostyki opartej o nanocząsteczki zależy od wydajności procesu endocytozy. Jednakże mechanizm wchłaniania nanocząsteczek przez komórki nie jest całkowicie zbadany, a jego znajomość jest konieczna dla projektowania preparatów diagnostycznych i terapeutycznych o większej skuteczności.

Obecnie główną strategią metod celowanych stosowanych w przypadku terapii lub diagnostyki jest chemocelowanie, czyli podejście oparte na założeniu, że komórki chorobowe charakteryzują specyficzne receptory. Jednak taka strategia jest możliwa tylko, jeśli receptory można zidentyfikować oraz ulegają one nadmiernej ekspresji w porównaniu do komórek zdrowych. Właściwości mechaniczne komórek nowotworowych różnią się od komórek zdrowych, co sugeruje nową strategię kierowania: mechanocelowanie.

Koncepcja ta jest oparta o przekonanie, że powstawanie endosomów, niezbędnych do zajścia endocytozy, jest zależne od właściwości mechanicznych wchłanianych nanocząsteczek. Zastosowanie tej techniki w kierowanym dostarczaniu leków pozwoliłoby na rozwój terapii o zwiększonej selektywności oraz zredukowanej toksyczności opartej o właściwości mechaniczne cząsteczek pełniących funkcje nośników substancji biologicznie czynnych [1]. Przedstawiona koncepcja wymaga precyzyjnego określenia właściwości mechanicznych zarówno komórki jak i nanocząstki. Jednakże właściwości mechaniczne liposomów są badane w przypadku cząstek o średnicy powyżej mikrometra (GUV), natomiast w nanomedycynie wykorzystywane są przede wszystkim liposomy w rozmiarach submikronowych (LUV lub SUV). Nie zostało do tej pory potwierdzone czy parametry mechaniczne zmierzone w mikroskali można bezpośrednio przełożyć na nanoskalę.

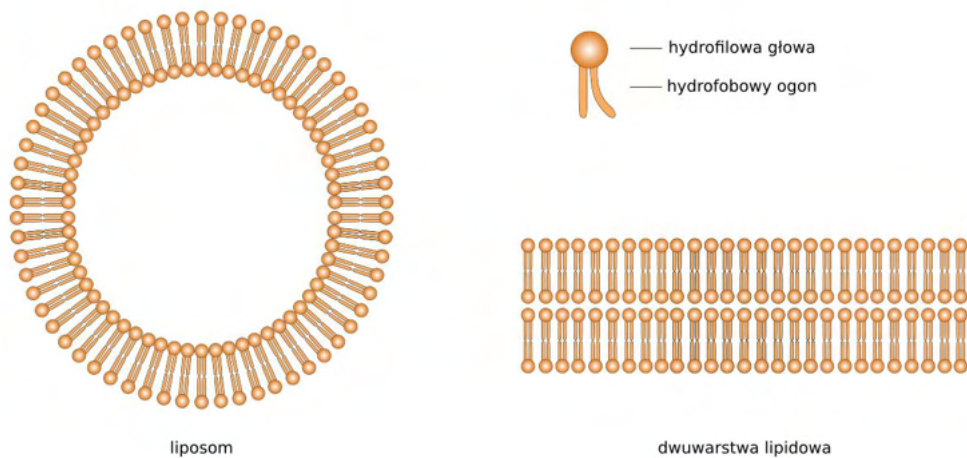
Praca miała na celu weryfikację następujących tez:

- 1) krzywizna dwuwarstwy lipidowej związana z rozmiarem liposomów wpływa na właściwości mechaniczne liposomów,
- 2) siła ekstruzji liposomów jest związana z właściwościami mechanicznymi badanych cząstek.

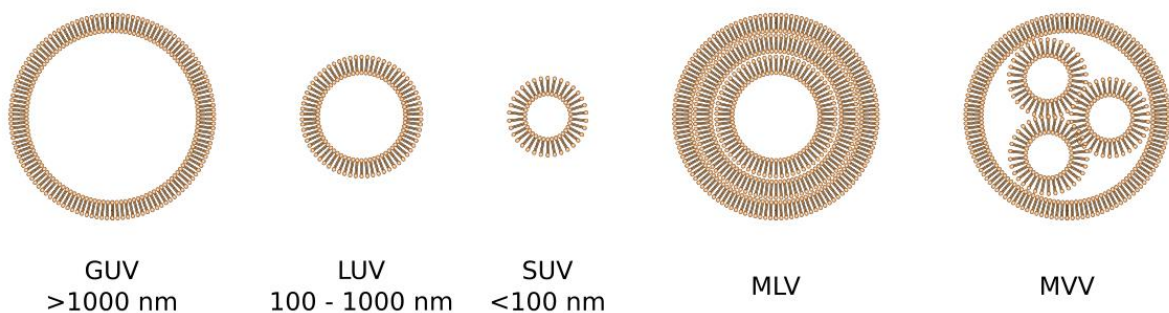
2. Opis pracy

2.1 Liposomy jako przykład kompleksów molekularnych: opis oraz zastosowanie (praca 1)

Liposomy to sferyczne, samoorganizujące się koloidalne powłoki o rozmiarach średnicy od 20 nm do 100 μm . Ich nazwa pochodzi od greckich słów: lipos – tłuszcz i soma – ciało [2]. Liposomy charakteryzuje podobieństwo do błon komórkowych zarówno pod kątem kompozycji lipidowej jak i budowy strukturalnej (Rysunek 1.). Sugeruje to zgodność metaboliczną, niską toksyczność, biokompatybilność oraz brak silnej odpowiedzi immunologicznej [3]. Z tego powodu są one powszechnie stosowane w wielu gałęziach przemysłu, ale przede wszystkim w medycynie oraz farmacji [2,4–6].



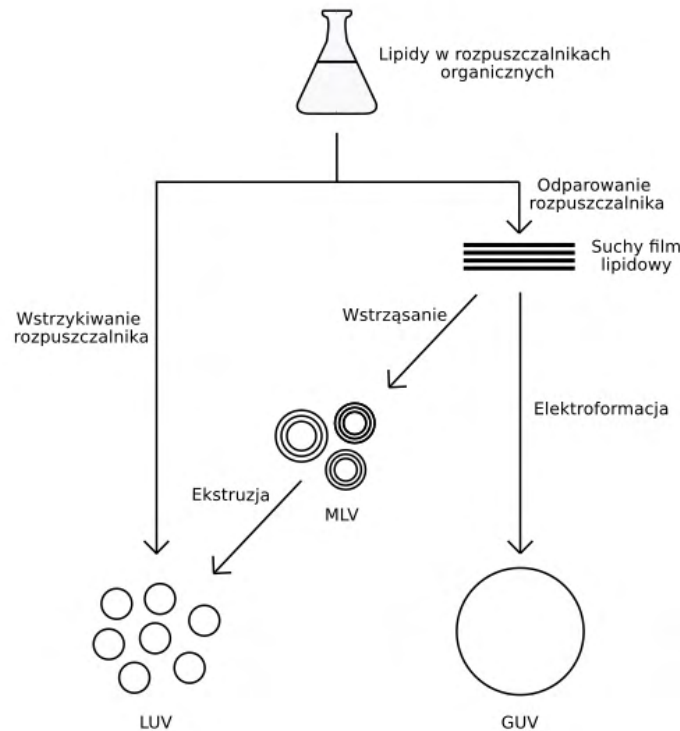
Rysunek 1. Porównanie struktury liposomu oraz dwuwarstwy lipidowej (przygotowano na podstawie rysunku z pracy [7])



Rysunek 2. Klasyfikacja liposomów ze względu na wielkość i budowę (wykonano na podstawie rysunku z pracy [8])

Liposomy klasyfikuje się ze względu na typ powłoki (jedno lub wielowarstwowe, Rysunek 2.). Liposomy jednowarstwowe zbudowane są tylko z jednej dwuwarstwy lipidowej. Dzielą się ze względu na wielkość średnicy na: małe (SUV) o średnicy mniejszej niż 100 nm, duże (LUV) o średnicy w przedziale: 100 nm - 1 μm oraz ogromne (GUV) – powyżej 1 μm . Z kolei liposomy wielowarstwowe (MLV) zawierają kilka koncentrycznych dwuwarstw lipidowych w układzie

„skórki cebuli”, a liposomy wielopęcherzykowe (MVV) zamykają w swoim wnętrzu mniejsze pęcherzyki lipidowe [9].



Rysunek 3. Wybrane metody formowania jednowarstwowych liposomów (przygotowano na podstawie rysunku z pracy [10])

Lipidy wykazują amfifilową naturę, więc w rozpuszczalnikach organicznych spontanicznie grupują się w struktury liposomów wielowarstwowych. Przy wykorzystaniu metod przedstawionych na Rysunku 3., można uzyskać z liposomów wielowarstwowych pęcherzyki jednowarstwowe, które są użyteczniejsze zarówno w przypadku mniejszych liposomów (LUV oraz SUV) podczas zastosowania ich jako nośniki leków, jak i w przypadku większych (GUV), które pełnią rolę modeli błony komórkowej [11].

Najpowszechniejszą metodą tworzenia jednowarstwowych liposomów jest ekstruzja, która pozwala na uzyskanie względnie homogenicznej (pod względem rozmiarów) średnicy populacji liposomów. Ponadto metoda ta jest powtarzalna oraz nie wymaga dużych nakładów czasowych [12]. Proces ekstruzji polega na tłoczeniu zawiesiny liposomów MLV przez filtr o określonych rozmiarach średnicy porów w wyniku czego powstaje populacja jednowarstwowych liposomów o średniej średnicy odzwierciedlającej rozmiar porów wykorzystanego filtra. Pomimo powszechnego zastosowania, wciąż istnieją niewyjaśnione zagadnienia związane z ekstruzją. Nadal brakuje spójnego modelu wyjaśniającego, w jaki sposób wielowarstwowe mikroliposomy o średnicach o rząd wielkości większych niż pory filtra, rozpadają się na mniejsze, jednowarstwowe pęcherzyki oraz dlaczego rozmiar liposomów uzyskanych metodą ekstruzji jest większy niż średnica filtra wykorzystanego w procesie [13,14].

Opisane wyżej nieścisłości są szczególnie istotne ze względu na to, że rozmiar liposomów decyduje o ich zastosowaniu. Liposomy o mniejszych średnicach wykorzystuje się głównie

jako nośniki leków ze względu na ich stabilność i korzystny stosunek powierzchni dwuwarstwy do objętości rozpuszczalnika zamkniętego w pęcherzyku. Tylko liposomy o średnicy od 50 do 150 nm są zdolne do uniknięcia fagocytozy, a także dostania się do naczyń krwionośnych w mikro-środowisku guza [15,16]. Dzięki zastosowaniu tego typu liposomów można uzyskać efekt EPR (zwiększonego przenikania i retencji substancji), pasywnego, kierowanego dostarczania leków opartego o różnice w strukturze zdrowych i patologicznych tkanek, takich jak np. występowanie zwiększonych rozmiarów porów komórek śródbłonna naczyń włosowatych w tkankach nowotworowych [4,17].

Z kolei liposomy o większej średnicy (GUV), ze względu na ich rozmiar porównywalny do wielkości komórki, stosowane są jako sztuczny model błony komórkowej. Ponadto średnica GUV, większa niż limit rozdzielczości optycznej (zdefiniowanej przy kryterium Rayleigha), pozwala w prosty sposób na obserwację uformowanych liposomów za pomocą mikroskopu świetlnego i umożliwiła rozwój wielu metod, gdzie ogromne liposomy wykorzystuje się jako model do wyznaczania parametrów mechanicznych i topologicznych błon lipidowych [18,19].

Praca 1. ma charakter przeglądowy, a więc opisuje zastosowania liposomów w przemyśle, a przede wszystkim w farmacji, produkcji żywności oraz kosmetologii. W artykule szczególnie zwrócono uwagę na fakt, że zastosowanie kierowanych nośników substancji czynnych, takich jak liposomy, może przyczynić się do poprawy stanu zdrowia społeczeństwa poprzez zwiększenie wydajności stosowanych terapii (chemioterapia [20–25], zakażenia grzybiczne [26]) lub zmniejszenie skutków ubocznych wynikających z ich stosowania (środki przeciwbólowe [27]). Ponadto nośniki te zapewniają poprawę jakości życia chorych (podawanie jelitowe insuliny [28]) czy zabieganie chorobom (prewencja wynikająca z efektywnej suplementacji witamin i minerałów, których niedobór jest związany z chorobami przewlekłymi [29–31]).

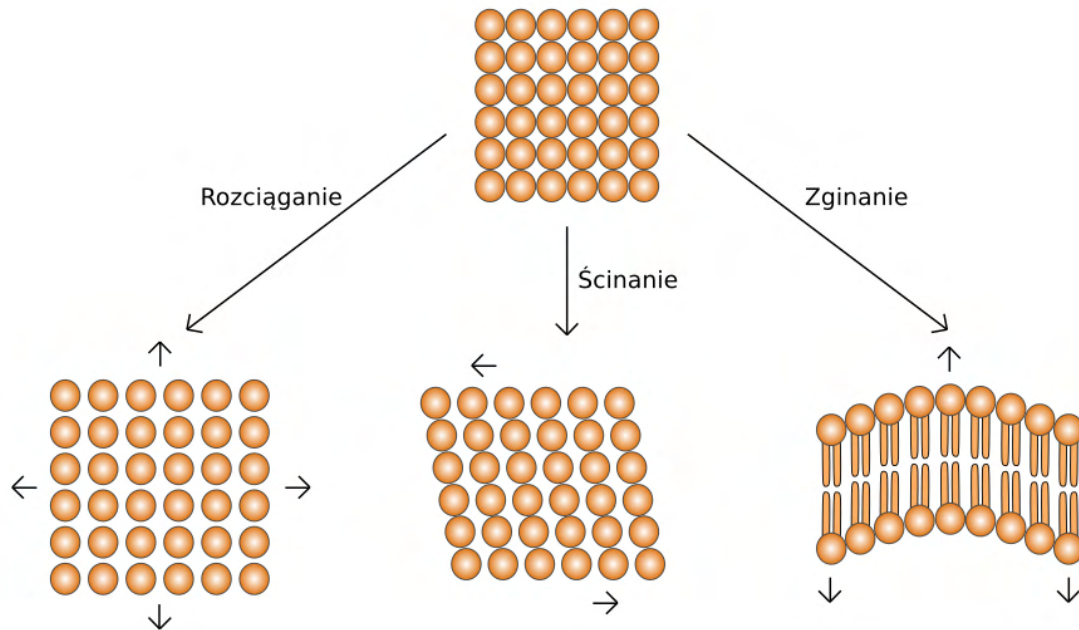
Kierowane nośniki mogą wpłynąć również na rozwój nowych terapii (np. genowej) oraz stworzyć narzędzia do walki z chorobami, wobec których współczesna medycyna pozwala jedynie na leczenie skutków, bez możliwości eliminacji ich przyczyny (cukrzyca, płasawica Huntingtona, celiakia czy choroba Parkinsona) [5,32].

2.2 Mechanika dwuwarstwy lipidowej oraz dostępne metody jej pomiaru (praca 2)

Liposomy GUV (służące jako model eksperymentalny błony biologicznej) oraz LUV (pełniące rolę nośnika leków) aby skutecznie spełniać swoje funkcje muszą charakteryzować się odpowiednimi właściwościami narzuconymi przez wartości fizjologiczne. Wykazano, że stabilność liposomów, organizacja lipidów w dwuwarstwie, przepuszczalność i właściwości mechaniczne zależą zarówno od czynników wewnętrznych (np. składu molekularnego czy stanu fizycznego) oraz zewnętrznych (np. temperatury) [33–36].

Podczas charakteryzowania przygotowanych liposomów często bada się organizację lipidów oraz właściwości elektrostatyczne powierzchni [37–39]. Rzadko brane są pod uwagę właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej. Dzieje się tak pomimo dowodów eksperymentalnych wykazujących, że kształt i sztywność cząstek wpływa na ich działanie

zarówno na poziomie komórkowym, jak i ogólnoustrojowym [40–48]. Prawdopodobnie jest to rezultat skomplikowanych metod pomiaru właściwości mechanicznych liposomów.



Rysunek 4. Trzy składowe deformacji błony (przygotowano na podstawie rysunku z pracy [49])

Właściwości mechaniczne błony biologicznej można ilościowo opisać jako odpowiedź błony na deformację. W przypadku dwuwarstwy lipidowej wyróżnia się deformacje rozciągające, ścinające i zginające, co schematycznie zaprezentowano na Rysunku 4. Ilościowa odpowiedź błony na wymienione deformacje jest odpowiednio opisana przez moduł sprężystości powierzchni K_a , moduł sprężystości ścinania μ , współczynnik sztywności zginania κ oraz moduł krzywizny Gaussa k_G [49].

W warunkach fizjologicznych błona biologiczna jest w stanie ciekło-krystalicznym, a więc nie jest ona poddawana siłom ścinającym ($\mu = 0$). W efekcie energia wypadkowego ruchu błony, zwana sprężystą wolną energią \mathcal{H} (3), jest jedynie sumą energii rozciągającej (1) oraz zginającej opisaną przez równanie Helfricha (2).

$$E_{exp} = \frac{1}{2} K_a \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (1)$$

gdzie:

E_{exp} – energia rozciągania sprężystego na jednostkę powierzchni [J],

K_a – moduł sprężystości powierzchni $\left[\frac{J}{m^2} \right]$,

$\Delta A = A - A_0$,

A – pole powierzchni pęcherzyka zdeformowanego [m^2],

A_0 – pole powierzchni pęcherzyka w równowadze [m^2].

$$E_{bend} = \frac{1}{2} \kappa (C_1 + C_2 - C_0)^2 + k_G \cdot C_1 C_2 \quad (2)$$

gdzie:

E_{bend} - energia deformacji zginającej na jednostkę powierzchni [J],

κ - współczynnik sztywności zginania [J],

k_G - moduł sztywności Gaussa [J],

C_0 - spontaniczna krzywizna błony wywołana np. asymetrycznym składem lipidowym [-],

C_1, C_2 – główne osie krzywizny membrany określone przez lokalne deformacje błony [-].

$$\mathcal{H} = \frac{A_0}{2} K_a \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 + \frac{1}{2} \kappa \int_A dA (C_1 + C_2 - C_0)^2 + k_G \int_A dA C_1 C_2 \quad (3)$$

Jeśli na liposomy nie działają siły rozciągające, a zmiany deformacyjne są wyłącznym efektem zmiany energii termicznej, w równaniu (3) pierwszy człon zostaje pominięty. Zmiany krzywizny Gaussa są niezmiennie podczas fluktuacji termicznej, a więc trzeci człon równania (3) również zostaje pominięty. Energię fluktuacji kształtu błony biologicznej, kiedy nie występują zewnętrzne siły, opisuje się za pomocą Hamiltonianu Canhama-Helfricha:

$$\mathcal{H} = \sigma A + \frac{1}{2} \kappa \int_A dA (C_1 + C_2 - C_0)^2 \quad (4)$$

gdzie:

σ – skuteczne napięcie powierzchniowe $\left[\frac{J}{m^2} \right]$.

Opracowano wiele metod pomiaru właściwości mechanicznych materiałów. Jednak dwuwarstwa lipidowa jest szczególnym przypadkiem, ponieważ jest to delikatna nanostruktura (jej grubość to w przybliżeniu długość dwóch cząsteczek lipidowych), więc zakres wartości parametrów mechanicznych jest bardzo mały i trudny do badania doświadczalnego [49].

Istniejące techniki, pozwalające na wyznaczenie właściwości mechanicznych błony, można podzielić na następujące kategorie [50]:

- spektroskopia drgań termicznych - technika bazująca na analizie obrazu pęcherzyków lipidowych, która wykorzystują zależność pomiędzy termicznymi fluktuacjami a sztywnością zginania dwuwarstwy lipidowej opisaną przez równanie (4), która opiera się na spontanicznych deformacjach kształtu GUV [51,52],
- metody oparte na deformacji błony indukowanej siłą zewnętrzną, w której właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej są obliczane na podstawie zależności pomiędzy przyłożoną siłą zewnętrzną a stopniem deformacji błony (np. aspiracja mikropipety, pęseta optyczna, formowanie elektrodowe i manipulacje mikroskopem sił atomowych (AFM)) [33,53–59],

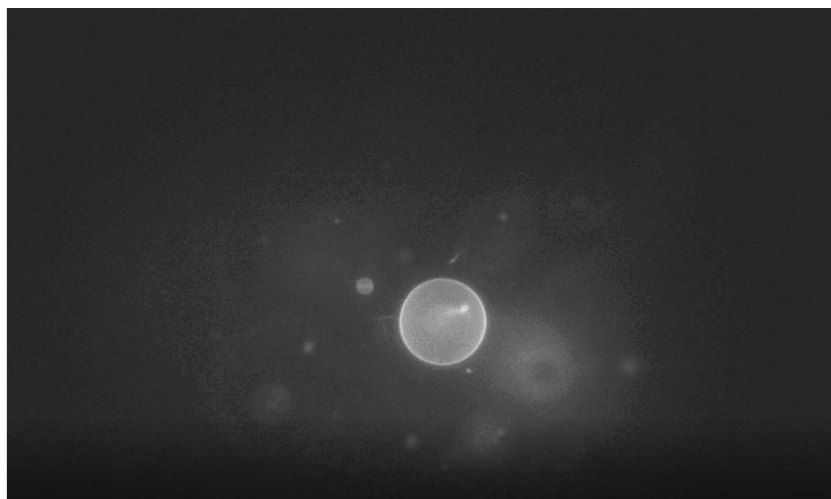
- techniki rozpraszania, gdzie wykorzystuje się korelację pomiędzy parametrami strukturalnymi dwuwarstwy lipidowej a właściwościami mechanicznymi, np. analiza dyfuzyjnego rozpraszania promieni rentgenowskich na dwuwarstwie lipidowej [36,60–62],
- symulacje metodą Monte Carlo [63] oraz dynamiki molekularnej [64,65], w których właściwości mechaniczne wyprowadzane są na podstawie symulacji małych fragmentów dwuwarstwy lipidowej,
- szacowanie właściwości mechanicznych metodami teoretycznymi fizyki materii miękkiej [66,67].

Każda z opisanych metod pozwala wyznaczyć współczynnik sztywności na zginanie (κ), który ilościowo opisuje właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej budującej liposomy. Współczynnik ten określa ilość energii potrzebnej do odkształcenia dwuwarstwy lipidowej [19]. Wszystkie przedstawione metody przeznaczone do opisu właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej wykorzystują quasi-płaską dwuwarstwę lipidową lub liposomy o średnicy powyżej 1 μm , ponieważ ich rozmiary umożliwiają obserwację agregatów za pomocą mikroskopu świetlnego.

Technika AFM wykorzystuje liposomy o średnicy ok. 100 nm, jednak ze względu na charakter pomiarów, liposomy silnie przylegają do podłoża oraz tracą swoją pierwotną krzywiznę. Z tego powodu trudno wnioskować o właściwościach mechanicznych mniejszych liposomów, w których efekt krzywizny ze względu na stosunek grubości dwuwarstwy do średnicy jest dużo większy. W jednej z prac [52] uwzględniono rozmiar liposomów, dla których został wyznaczony współczynnik κ . Jednak w tym przypadku nie wykazano zależności pomiędzy rozmiarem liposomów a wyznaczonym współczynnikiem κ . Doświadczenie jednak zostało przeprowadzone dla niewielkiej ilości agregatów (5).

Z tego powodu w pracy 2. podjęto próbę weryfikacji pierwszej hipotezy sprawdzającej czy krzywizna dwuwarstwy lipidowej związana z rozmiarem liposomów wpływa na właściwości mechaniczne liposomów. Istotnym problemem, który zauważono w pracy jest rozbieżność wyników literaturowych współczynnika. Otrzymane wartości różnią się w zależności od wykorzystanej metody. Przykładowo, κ wyznaczone metodą pułapki optycznej wynosi $3,3 \cdot 10^{-20}$ [J] [56], a metodą spektroskopii drgań termicznych - $22,3 \cdot 10^{-20}$ [J] [68].

Różnice mogą wynikać z powodu trudności w pomiarach, ponieważ próbka liposomów typu GUV charakteryzuje się dużą rozbieżnością rozmiarów oraz brakiem homogeniczności, w przypadku gdy liposomy zostały zbudowane z mieszaniny lipidów. Jednocześnie najczęściej podczas takich pomiarów wyznacza się κ dla wybranych 10 – 15 liposomów [49,69], a więc wybrana próba może nie być reprezentatywna. W ramach artykułu wyznaczono κ dla ogromnej ilości liposomów typu GUV (150) zbudowanych z lipidu POPC. Przeprowadzenie pomiarów dla dużej populacji pozwoliło po raz pierwszy wiarygodnie przeanalizować statystycznie otrzymane wartości.



Rysunek 5. Przykład obrazu serii monitorującej fluktuacje termiczne dwuwarstwy lipidowej oznaczonej sondą fluorescencyjną (obraz pokazano w pracy 2)

W badaniach wykorzystano technikę spektroskopii drgań termicznych. Technika polega na rejestracji serii konturów pęcherzyka, którego centrum znajduje się w płaszczyźnie ogniskowej mikroskopu optycznego. W przeprowadzanych pomiarach wykorzystano mikroskop fluorescencyjny uzyskując dwuwymiarowy obraz liposomów (Rysunek 5).

Pierwszym etapem analizy jest uzyskanie wartości numerycznej położenia konturu z zarejestrowanego obrazu fluktuacji przy jak najmniejszej utracie informacji (w skutek niezbędnej obróbki obrazowej). Następnym etapem jest pomiar amplitudy fluktuacji i powiązanie ich z parametrami mechanicznymi dwuwarstwy lipidowej. Analiza fluktuacji dwuwarstwy lipidowej w celu pozyskania współczynnika mechanicznego polega na określeniu położenia błony lipidowej pod danym kątem we współrzędnych biegunowych, a następnie analizie otrzymanych wartości położenia za pomocą funkcji autokorelacji kątowej, które kolejno są rozkładane transformatą Fouriera. Amplitudy otrzymanych funkcji cosinusowych zostają przekształcone w histogramy. Ostatecznie współczynnik zginania jest obliczony na podstawie dopasowania modelem nachylenia wykładniczych histogramów w funkcji modu [49].

W ramach pracy wyeliminowano wpływ obecności sondy fluorescencyjnej oraz warunków technicznych (pomiar przeprowadzono wykorzystując dwa różne mikroskopy). Mimo zbadania ogromnej ilości liposomów, nie zauważono istotnej korelacji pomiędzy współczynnikiem mechanicznym oraz rozmiarem liposomów, więc odrzucono hipotezę mówiącą o wpływie krzywizny dwuwarstwy lipidowej na właściwości mechaniczne badanych liposomów.

Opisane badania zostały przeprowadzone tylko dla liposomów o średnicy większej niż 1 μm . Zatem weryfikacja hipotezy w skali submikronowej była kontynuowana, co zostało opisane w kolejnym rozdziale. Dodatkowo, statystycznie przeanalizowano populację otrzymanych wartości. Zauważono, że rozkład otrzymanych wartości nie odpowiada rozkładowi normalnemu, a najlepiej odzwierciedlony jest przez rozkład asymetryczny. Nie znaleziono biofizycznego uzasadnienia tego zjawiska, więc uznano, że uzyskane wyniki obarczone są błędem technicznym, na który składają się m.in. artefakty związane z przygotowaniem próbek lub akwizycją obrazu. Wpływ na wartość błędu może mieć też obecność zanieczyszczeń, np.

resztek rozpuszczalnika organicznego lub oddziaływanie komór pomiarowych na próbkę, np. adhezja liposomów.

W przypadku pomiaru właściwości mechanicznych błony za pomocą techniki spektroskopii drgań termicznych zazwyczaj rejestruje się serię obrazów przedstawiających fluktuację termiczne około 15 liposomów. Następnie oblicza się średnią wartość z otrzymanych pomiarów. Jednakże miara średniej jest przeznaczona dla wartości pochodzących z jednorodnych zbiorowości o niewielkim stopniu zróżnicowania, ponieważ na wartość średniej silny wpływ mają wartości skrajne. Z tego powodu nie należy stosować tej miary w przypadku asymetrycznych rozkładów, dla których przeznaczone są inne wskaźniki statystyczne takie jak mediana czy dominanta.

W pracy zwrócono uwagę, że badany rozkład współczynnika κ opisuje asymetria prawostronna. W tej sytuacji wartość mediany jest mniejsza niż wartość średniej. Literaturowe wartości współczynnika κ są wyższe w przypadku zastosowania techniki spektroskopii drgań termicznych w porównaniu do innych technik. Powodem tej różnicy może być wykorzystanie nieprawidłowej statystyki w przypadku spektroskopii drgań termicznych, a więc zastąpienie średniej, medianą lub dominantą, wyeliminuje różnice wyznaczanego współczynnika sztywności w zależności od użytej techniki.

2.3 Pomiar siły ekstruzji jako nowa metoda określenia właściwości mechanicznych liposomów (prace 3 i 4)

Istnieje wiele metod pomiaru właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej. Mimo to, każda z nich charakteryzuje się istotnymi technicznymi ograniczeniami. Techniki wykorzystujące GUV (m.in. spektroskopia drgań mechanicznych, aspiracja za pomocą mikropipety) charakteryzują się wysokimi wymaganiami technicznymi (mikroskopy o wysokiej zdolności rozdzielczej, mikropipeta) oraz skomplikowaną analizą danych (co opisano w poprzednim rozdziale) [51,52,54–56]. Dodatkowo, zmierzonych wartości nie można wprost przełożyć na submikronową skalę. Symulacje dynamiki molekularnej, modelowanie teoretyczne i symulacje Monte Carlo nie mogą być stosowane samodzielnie, ponieważ wymagają eksperymentalnej walidacji uzyskanych wartości ilościowych [64,67,70]. Metoda oparta na technice rozpraszania wykorzystuje model typu *ang. supported lipid bilayer*, czyli dwuwarstwę lipidową umieszczoną na podłożu, a więc bezpośredni pomiar liposomów nie jest możliwy. Ponadto technika ta wymaga złożonego modelu teoretycznego, którego założenia są trudne do zweryfikowania [71].

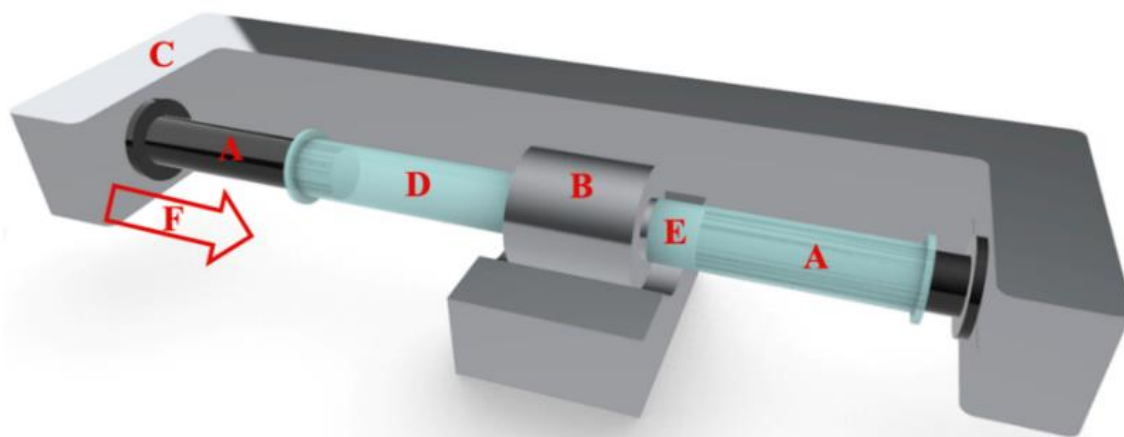
Z powyższych powodów, w ramach pracy 3. i pracy 4. podjęto próbę opracowania nowej metody charakteryzowania właściwości mechanicznych liposomów, która byłaby łatwa do wdrożenia w skali technologicznej. W takim zastosowaniu, metoda powinna charakteryzować się: prostotą, wiarygodnością, powtarzalnością oraz względnie niskimi kosztami. Powinna umożliwić pomiary w skali poniżej zdolności rozdzielczej, a więc nano-liposomów wykorzystywanych przede wszystkim w przemyśle [29,53,72–76]. Dodatkowo, podczas pomiaru byłyby wyznaczane właściwości mechaniczne całej populacji liposomów, co byłoby

istotną zaletą w stosunku do innych metod, gdzie bada się jedynie kilka obiektów z heterogenicznej populacji liposomów (co jest szczególnie istotne, kiedy liposomy są zróżnicowane pod kątem rozmiaru czy składu).

Nowa metoda opierałaby się na pomiarze siły ekstruzji. Ekstruzja to popularna metoda tworzenia homogenicznej populacji liposomów typu LUV. Polega na przetłoczeniu zawiesiny liposomów typu MLV przez cylindryczne pory filtra w celu uzyskania liposomów jednowarstwowych o średnicy odzwierciedlającej rozmiar porów wykorzystanego filtra [12]. Ekstruzję przeprowadza się manualnie lub automatycznie z wykorzystaniem urządzeń wywołujących nacisk na próbkę w celu przepchnięcia jej przez pory filtra [77,78]. W ramach pracy ekstruzja była przeprowadzona z wykorzystaniem uprzednio utworzonych jednowarstwowych liposomów. W tym przypadku homogeniczna populacja jednowarstwowych liposomów jest wystawiona na naprężenia mechaniczne podczas procesu ekstruzji – liposomy typu LUV są przeciskane przez pory filtra o istotnie mniejszej średnicy, zatem pomiar tej siły może zostać wykorzystany do pomiaru stabilności oraz podatności na odkształcenia liposomów [79].

W pierwszym etapie konieczne było zweryfikowanie hipotezy czy siła ekstruzji liposomów zależy od ich właściwości mechanicznych oraz określenie warunków pomiaru siły ekstruzji, ponieważ w literaturze znaleziono przesłanki, że właściwości mechaniczne dwuwarstwowej lipidowej wpływają na proces formowania liposomów [43,44,53,80–84], który następuje podczas procesu ekstruzji.

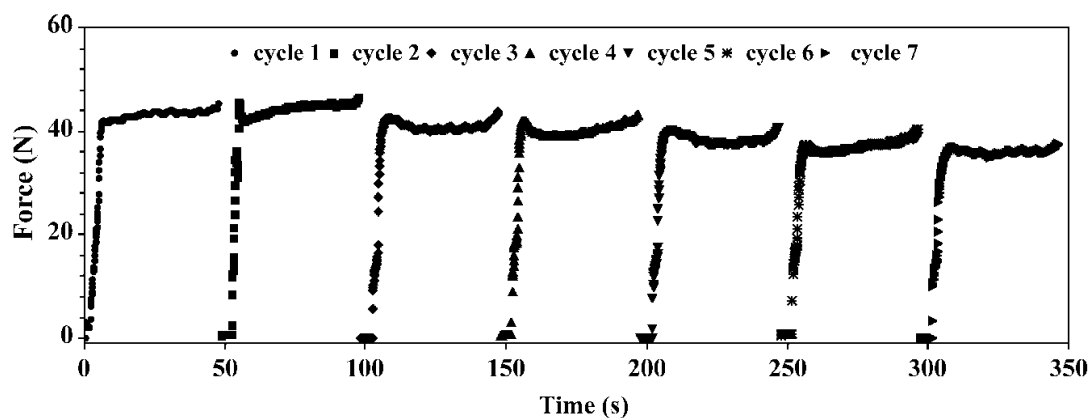
W celu zweryfikowania drugiej hipotezy rozprawy, czyli sprawdzenia czy siła ekstruzji jest związana z właściwościami mechanicznymi liposomów wykorzystano zależności literaturowe pomiędzy współczynnikiem mechanicznym oraz temperaturą [85] i stężeniem cholesterolu [50,86–89].



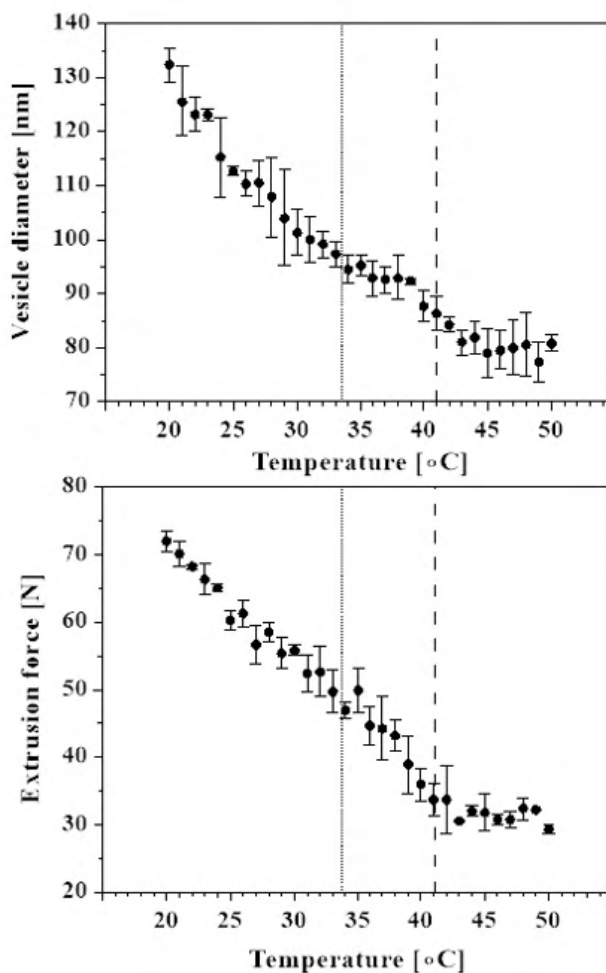
Rysunek 6. Model urządzenia służącego do pomiaru siły ekstruzji. Układ składa się z dwóch strzykawek Hamiltona (A), uchwytu na filtr (B) oraz ramienia napędzanego silnikiem krokowym (C). Zawiesinę liposomów przed (D) i po ekstruzji (E) oraz kierunek siły ekstruzji (F) zaznaczono na rysunku. Schemat pokazano w pracy 4.

Siła potrzebna do ekstruzji zawiesiny liposomowej przez filtr poliwęglanowy została zmierzona za pomocą dedykowanego ekstrudera automatycznego wyposażonego w termostat i tensometry. Konstrukcję urządzenia pokazano na Rysunku 6. Podczas ekstruzji temperatura próbki była mierzona w sposób ciągły, a objętościowe natężenie przepływu przez membranę zadano i utrzymywano podczas eksperymentu. Podczas procesu ekstruzji siła przyłożona do

strzykawki była stale mierzona, umożliwiając wyznaczenie krzywych zależności siły od czasu/odległości/objętościowego natężenia przepływu. Przykład danych eksperymentalnych przedstawiono na Rysunku 7.



Rysunek 7. Przykładowy wykres pomiaru siły ekstruzji. Proces został przeprowadzono w 7 cyklach. Wykres pokazano w pracy 4.



Rysunek 8. Wpływ temperatury ekstruzji na rozmiar uzyskanych liposomów oraz zmierzonej siły. Linia kropkowa oraz kreskowa przedstawiają odpowiednio temperaturę przed-przejścia oraz przejścia lipidu DPPC. Wykres pokazano w pracy 3.

W pracy 3. sprawdzono jak siła ekstruzji oraz rozmiar liposomów zależą od temperatury procesu ekstruzji oraz fazy lipidowej. W tym celu liposomy LUV o średnicy ok. 140 nm zostały prze-ekstrudowane przez filtry o średnicy porów 50 nm. Na podstawie uzyskanych rezultatów zauważono, że średni rozmiar liposomów oraz siła ekstruzji są silnie zależne od temperatury procesu (Rysunek 8). Średnica liposomów zwiększa się monotonicznie wraz ze zmniejszeniem temperatury pomiaru. Uzyskane wyniki wskazują, że stabilność liposomów na mechaniczne naprężenia jest ściśle zależna od fazy lipidowej. W fazie ciekło-krystalicznej, gdzie lepkość liposomów jest relatywnie niższa, pod wpływem naprężenia mechanicznego, membrana jest dezintegrowana oraz powstają mniejsze pęcherzyki lipidowe. W fazie żelowej, gdzie lepkość jest większa, naprężenia mechaniczne nie wywołują dezintegracji błony, więc rozmiar liposomów nie ulega zmniejszeniu.

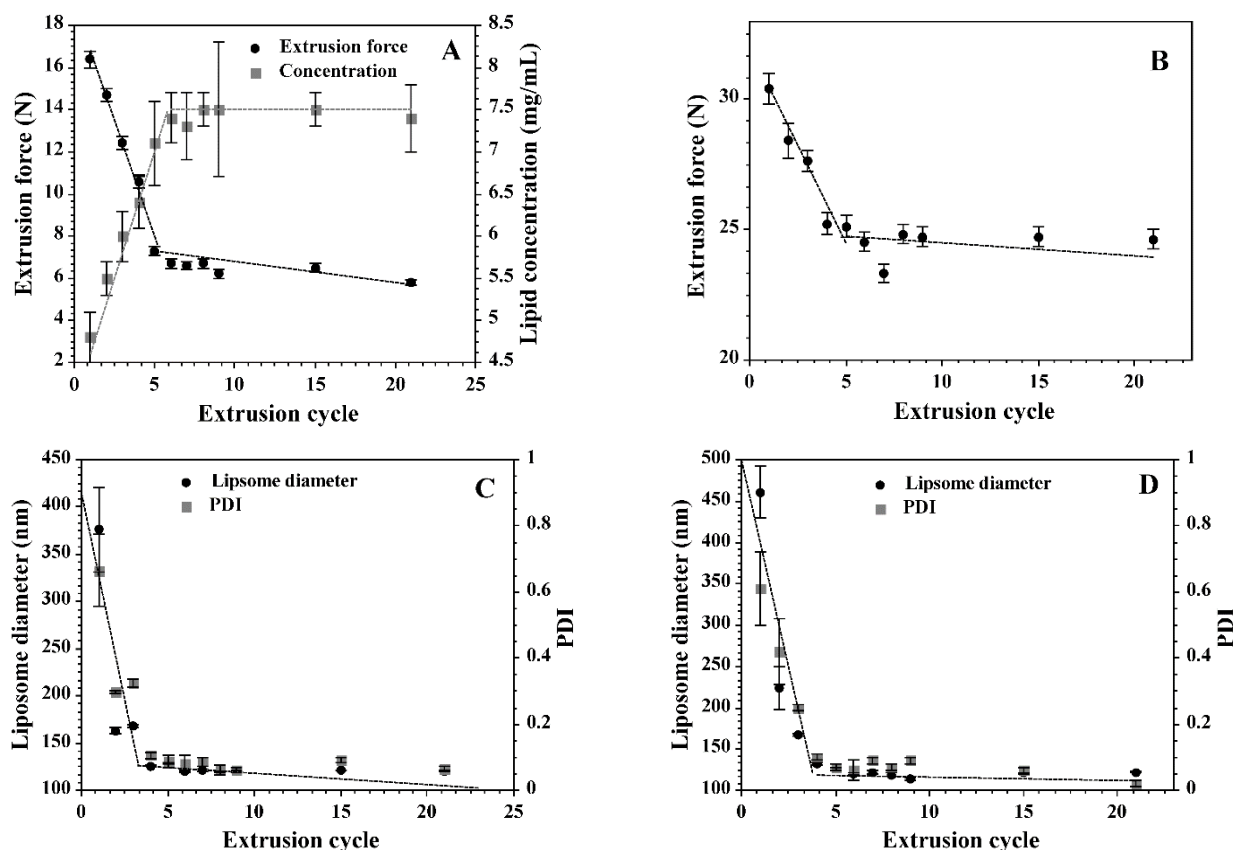
Otrzymane wyniki badań wskazują, że podczas pomiaru liposomy nie tylko się odkształcały, ale również dezintegrowały, ponieważ zmieniał się ich rozmiar. Nie udało się, więc uzyskać warunków pomiarów, w których dochodziłoby tylko od odkształcenia liposomów jak jest w przypadku pomiaru κ . Mimo to porównano zmierzoną siłę ekstruzji z literaturowym współczynnikiem mechanicznym [85] w celu zweryfikowaniu czy siła ekstruzji dobrze odzwierciedla właściwości mechaniczne liposomów. Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że siła ekstruzji, tak jak współczynnik mechaniczny, rośnie wraz ze zmniejszeniem temperatury, jednak charakter zależności jest nieco inny od literaturowego. W przypadku pomiaru współczynnika mechanicznego w stanie żelowym, wartość stabilizuje się i dalsze zmniejszenie temperatury pomiaru nie wpływa na otrzymaną liczbę. Jednak podczas pomiaru siły ekstruzji, nie uzyskano stabilizacji wyniku, a dalsze obniżenie temperatury powoduje ciągły wzrost wartości siły ekstruzji. Otrzymane wyniki są zgodne z zależnością uzyskaną przy pomiarze rozmiaru pęcherzyków, ponieważ w tym przypadku również pokazano, że dopiero przy ok. 20 °C rozmiar liposomów przestaje być zależny od temperatury.

Otrzymane zależności trudno zinterpretować jednoznacznie oraz zweryfikować tezę czy siła ekstruzji dobrze odzwierciedla właściwości mechaniczne. Mimo, że nie uzyskano zależności analogicznej do literaturowej, należy podkreślić, że znaleziono tylko jedną pracę, która przedstawiałaby zależność wpływu temperatury na współczynnik mechaniczny dwuwarstwy lipidowej zbudowanej z DPPC. Najczęściej współczynnik mechaniczny został wyznaczony jedynie dla maksymalnie 2 punktów temperaturowych [62,64,84,90,91], na podstawie, których nie można ocenić zależności w pełnym zakresie temperatur.

Z tego powodu, w kolejnym kroku w ramach pracy 4. wykorzystano najpopularniejszą literaturową zależność, czyli wpływ stężenia cholesterolu w dwuwarstwie lipidowej na jej właściwości mechaniczne. Dane literaturowe wskazują, że zależność pomiędzy współczynnikiem mechanicznym a stężeniem cholesterolu w dwuwarstwie lipidowej ma charakter liniowy [51]. Jednak zanim możliwe było zweryfikowanie, czy w przypadku siły ekstruzji również charakteryzuje taka zależność, konieczna była standaryzacja pomiarów ekstruzji.

Ekstruzję przeprowadza się w wielu cyklach. Każdy cykl ekstruzji wpływa na próbkę, więc po każdym etapie próbka charakteryzuje się innymi parametrami. W pracy 4. pokazano, że dopiero po 6. cyklach ekstruzji uzyskiwana jest maksymalna ilość lipidu (wcześniej

prawdopodobnie pewna ilość lipidu pozostaje na filtrze). Taka sama ilość powtórzeń ekstruzji jest potrzebna aby uzyskać ostateczny rozmiar liposomów o maksymalnym stopniu homogeniczności opisanym przez PDI. Po 6. cyklu stabilizuje się również siła ekstruzji, co wskazuje, że liposomy w próbce zostają uformowane (Rysunek 9.). Podobne wyniki uzyskano w innych pracach [12,13,92,93]. Z tego powodu uznano, że pomiary średniej siły 1. oraz 6. cyklu mogą być ilościową miarą dwóch procesów.



Rysunek 9. Wpływ ilości cykli ekstruzji na siłę ekstruzji oraz odzysku lipidowego liposomów zbudowanych z POPC (A) lub mieszaniny POPC i cholesterolu (70:30, mol:mol) (B). Rysunek C i D przedstawia kolejno wpływ ilości cykli ekstruzji na rozmiar liposomów oraz ich homogeniczność opisaną przez PDI. Wykres pokazano w pracy 3.

W pierwszym przypadku mierzona jest siła potrzebna do wepchnięcia liposomów typu MLV do porów filtra oraz pęknięcia liposomu co jest niezbędne do uformowania jednowarstwowego liposomu. Dodatkowo potrzebna jest siła do odkształcenia pęcherzyka lipidowego podczas przejścia przez por filtra.

W drugim przypadku, podczas pomiaru siły ekstruzji 6. cyklu, jednowarstwowe liposomy są już uformowane, więc mierzona siła odpowiada jedynie siłom deformującym podczas przechodzenia pęcherzyków przez pory. Podsumowując, siła 1. cyklu odpowiada siłom formującym i deformującym liposomy, a 6. cyklu tylko deformującym. W przypadku pomiarów κ potrzebne są warunki, w których dochodzi tylko do odkształceń deformujących, więc wybrano 6. cykl do opisu procesu ekstruzji.

Następnie w pracy 4. pokazano, że siła ekstruzji w funkcji stężenia cholesterolu wykazuje charakterystykę liniową. Ponadto porównano siłę ekstruzji z literaturowymi wartościami κ .

Uzyskane wyniki wskazują na wysoki stopień podobieństwa zależności pomiędzy siłą ekstruzją lub współczynnikiem mechanicznym a stężeniem cholesterolu. Otrzymane wartości pozwalają na potwierdzenie drugiej hipotezy rozprawy wskazującej, że siła ekstruzji dobrze odzwierciedla właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej.

Dodatkowo uzyskane wyniki pozwalają na pełną weryfikację pierwszej hipotezy mówiącej, że krzywizna dwuwarstwy lipidowej wpływa na właściwości mechaniczne liposomów. W pracy 2. odrzucono hipotezę, ale tylko w przypadku liposomów w mikroskali. W tym przypadku pomiary przeprowadzono dla mniejszych liposomów w submikronowej skali. Wyniki są zgodne z wartościami literaturowymi uzyskanymi dla liposomów typu GUV, czyli o rozmiarach większych niż mikrometr. Otrzymane rezultaty potwierdzają wystąpienie takich samych zależności w nano- i mikro skali, a więc wskazują, że krzywizna dwuwarstwy lipidowej nie wpływa na właściwości mechaniczne liposomów. Wyniki uzyskane w przywołanych trzech pracach pozwalają odrzucić hipotezę mówiącą, że krzywizna dwuwarstwy lipidowej wpływa na właściwości mechaniczne liposomów.

2.4 Mechanika liposomów w procesie ekstruzji i jej wpływ na procesy biologiczne (prace 3 i 4)

Właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej są istotnym parametrem z perspektywy procesów biologicznych z dwóch powodów. Dwuwarstwa lipidowa jest podstawową jednostką budującą liposomy, czyli nanocząstki służące do przenoszenia leków czy substancji kontrastujących. Udowodniono, że mechanika liposomów wpływa na zachowanie *in vivo* liposomów w krwioobiegu po podaniu pacjentowi. Właściwości mechaniczne liposomów wpływają na pojemność transportową liposomów jako nośnika, czyli określają ilość i czas przenoszonej substancji biologicznie czynnej [6,94–96].

Jednocześnie mechanika liposomów bezpośrednio wpływa na stopień endocytozy liposomów przez komórki, a więc determinuje ilość substancji zgromadzonej w miejscach docelowych, czyli ma istotne znaczenie dla efektywności terapii i diagnostyki [97,98]. Z drugiej strony badania nad mechaniką dwuwarstwy lipidowej z wykorzystaniem liposomów typu GUV o wielkości podobnej do rozmiaru komórek są niezwykle istotne dla zrozumienia oraz opisu procesów komórkowych obejmujących błonę biologiczną, która również jest zbudowana z dwuwarstwy lipidowej. Wykazano, że właściwości mechaniczne błony oraz ich zmiana odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu informacji w komórkach i tkankach, ruchliwości komórki, a także egzo- i endocytozie [99–105].

W pracy 3. pokazano, że stabilność liposomów jest ściśle zależna od fazy lipidowej. Liposomy w stanie ciekło-krystalicznym pod wpływem naprężenia mechanicznego jakim jest siła ekstruzji rozpadają się na mniejsze liposomy. W stanie żelowym, liposomy są mniej podatne na naprężenia, a stopień rozpadu zależy od temperatury. Zauważono, że w 20°C (temperatura przejścia przez filtr lipidu DPPC wykorzystanego w doświadczeniu to 41°C, a przed-przejściem – 33,5°C [106]) rozpad liposomów zachodzi tylko po wygenerowaniu większych naprężeń. Mechanika dwuwarstwy lipidowej ściśle zależy od fazy lipidowej

[62,64,84,85,90,106], a więc stabilność liposomów może zostać przewidziana na podstawie ich właściwości mechanicznych.

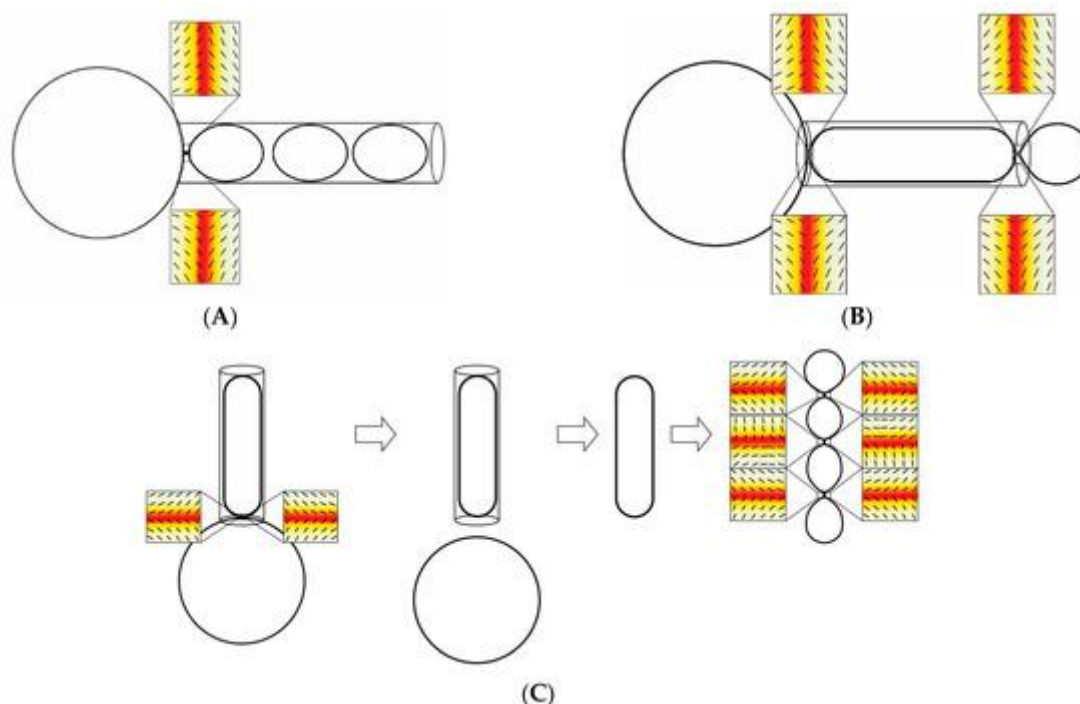
Dodatkowo w pracy wykazano, że mechanika dwuwarstwy lipidowej w stanie ciekłokrystalicznym jedynie nieznacznie zależy od temperatury. Z kolei w przypadku fazy żelowej, mechanika wyraźnie zmienia się w zależności od temperatury. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi [107], w których wykazano, że w fazie żelowej stan dwuwarstwy lipidowej charakteryzuje złożona funkcja temperaturowa.

W pracy 4. podjęto próbę analizy procesu ekstruzji oraz zbadanie wpływu właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej na parametry otrzymywanych liposomów. Do tej pory nie udało się jednocześnie wyjaśnić, dlaczego liposomy wielowarstwowe o niehomogenicznych rozmiarach po przejściu przez cylindryczne pory formują się w jednowarstwowe liposomy o rozmiarach zbliżonych do średnicy porów filtra [12,13].

Choć ekstruzja to działanie technologiczne, to zrozumienie przejścia liposomów przez pory ze zmianą ich topologii może pomóc zrozumieć procesy komórkowe takie jak egzo- czy endocytoza, gdzie dochodzi do fuzji błony i powstania nowych pęcherzyków.

Proces ekstruzji podzielono na 4 etapy:

- 1) akumulacja lipidu na wejściu do pora filtra,
- 2) wejście liposomu do pora,
- 3) przejście liposomu przez por,
- 4) opuszczenie poru przez liposom.



Rysunek 10. Schematyczne modele wyjaśniające przebieg ekstruzji. Na rysunku pokazano prawdopodobne położenie antydefektów dwuwarstwy lipidowej, w której dochodzi do rozpadu dwuwarstwy lipidowej za pomocą kwadratów, w których zobrazowano orientacyjne profile uporządkowania molekularnego lipidów. Ciemnoczerwony i biały kolor oznaczają odpowiednio minimalną (izotropię) i maksymalną (anizotropię) wartość porządku orientacji. Obraz pokazano w pracy 4.

W pracy zaproponowano 3 scenariusze, które mogą wyjaśnić jak pory filtra wpływają na topologię liposomów (Rysunek 10):

- A) liposomy tworzone są na wejściu do pora poprzez rozpad większego liposomu na mniejsze, a kolejne etapy ekstruzji nie wpływają na uformowane już pęcherzyki,
- B) w porze powstaje cylindryczny pęcherzyk jednowarstwowy z fuzji liposomów zakumulowanych na wejściu pora; pęcherzyk opuszczając por rozpada się na mniejsze liposomy o rozmiarze odpowiadającym średnicy pora (model zaproponowano w pracy [108] oraz taki scenariusz przeanalizowano także w pracy 3.),
- C) w porze powstaje cylindryczny pęcherzyk jednowarstwowy z fuzji liposomów zakumulowanych na wejściu pora, a następnie w wyniku pączkowania spowodowanego defektami dwuwarstwy lipidowej powstają ostateczne liposomy (model zaproponowany w pracy [70]).

W ramach pracy podjęto próbę weryfikacji zaproponowanych scenariuszy. Uznano, że mechanizm tworzenia liposomów podczas procesu ekstruzji można określić na podstawie analizy rozmiaru utworzonych pęcherzyków oraz pomiaru stabilności pęcherzyków pod względem ich składu lipidowego. Scenariusz A zakłada, że liposomy powstają na wejściu pora poprzez rozpad większego liposomu na mniejsze, kiedy naprężenie wynikające z siły ekstruzji przekracza wytrzymałość na rozciąganie dwuwarstwy lipidowej. W tym przypadku nie powstaje jeden cylindryczny pęcherzyk w porze filtra jak w przypadku scenariusza B i C, gdzie występuje fuzja liposomów i wymiana lipidów między liposomami.

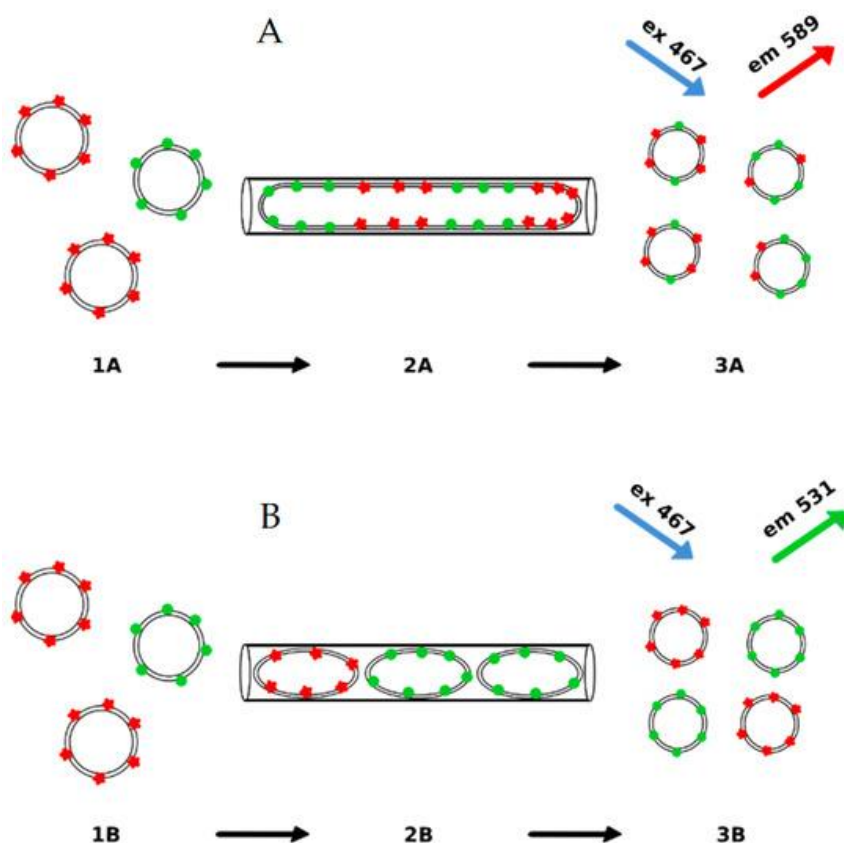
W scenariuszu B liposomy powstają na wyjściu pora pod wpływem fluktuacji termicznej dwuwarstwy lipidowej. Z kolei scenariusz C zakłada, że liposomy formują się na skutek powstania defektów w dwuwarstwie lipidowej w wyniku naprężeń wywołanych przez oddziaływanie porów. W pracy założono, że potwierdzenie lub odrzucenie hipotezy o powstawaniu cylindrycznego pęcherzyka w porze filtra podczas ekstruzji pozwoli wskazać na prawdziwość scenariusza A lub B/C. W doświadczeniu wykorzystano fakt, że pęcherzyk powstaje z fuzji wielu liposomów. Wystąpienie fuzji można potwierdzić, jeśli uda się zaobserwować wymianę lipidów pomiędzy liposomami biorących udział w ekstruzji.

Drugi warunek pozwalający zweryfikować prawdziwość scenariusza jest związany z rozmiarem otrzymywanych liposomów. Jeśli w wyniku ekstruzji zostaną otrzymane liposomy o homogenicznej populacji rozmiaru, to oznacza, że liposomy powstają z jednego ogromnego, cylindrycznego pęcherzyka w środku lub na wyjściu z pora (scenariusz C lub B). Ich rozmiar jest związany przede wszystkim z rozmiarem pora, a nie wielkością liposomów, które poddaje się procesowi ekstruzji.

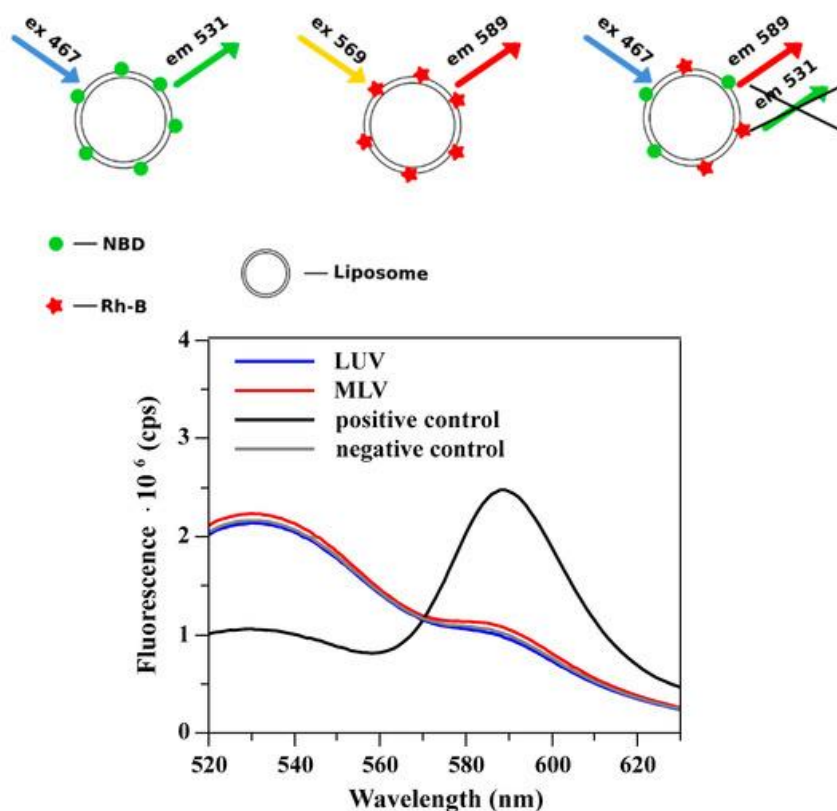
Z drugiej strony, jeżeli w pomiarach zostaną otrzymane liposomy o heterogennej populacji rozmiarów, będzie to dowód na wystąpienie scenariusza A. W tym przypadku mniejsze liposomy powstają na skutek rozpadu większego liposomu, więc pierwszy powstały liposom będzie miał rozmiar związany ze średnicą pora, a reszta utworzonych pęcherzyków będzie miała wielkość ograniczoną przez ilość pozostałego lipidu z rozpadu „pierwotnego liposomu”. Założenia eksperymentu zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1. Podsumowanie założeń zaproponowanych scenariuszy powstania liposomów w procesie ekstruzji

	Scenariusz A	Scenariusz B	Scenariusz C
Powstawanie cylindrycznego pęcherzyka w trakcie ekstruzji	Nie występuje	Występuje	Występuje
Miejsce powstawania liposomów	Na wejściu pora	Na wyjściu pora	W porze
Czynnik powodujący powstawanie liposomów	Naprężenie związane z siłą ekstruzji przekracza wytrzymałość dwuwarstwy	Fluktuacje termiczne	Defekty w dwuwarstwie wywołane oddziaływaniem poru
Mieszanie lipidów pomiędzy liposomami w trakcie ekstruzji	Nie występuje	Występuje	Występuje
Rozmiar uzyskanych liposomów w ekstruzji	Populacja heterogenna	Populacja homogeniczna	Populacja homogeniczna



Rysunek 11. Dwa modele wyjaśniające powstawanie liposomów w trakcie ekstruzji służące do sprawdzenia powstawania cylindrycznego pęcherzyka z fuzji mniejszych liposomów. Jeśli zajdzie fuzja liposomów, dojdzie do wymieszania lipidów oraz sond fluorescencyjnych co zostanie zaobserwowane na podstawie zjawiska FRET. Model A odpowiada scenariuszowi B i C, a model B – scenariuszowi A. Obraz pokazano w pracy 4.



Rysunek 12. Koncepcja metody pomiarowej opartej o zjawisko FRET pomiędzy sondami NBD i Rh-B (górną). Otrzymane spektra fluorescencyjne próbek pomiarowych oraz kontroli pozytywnej i negatywnej (dół). Obraz pokazano w pracy 4.

W celu weryfikacji prawdziwości scenariusza wykonano dwa typy pomiarów: fuzji liposomów podczas ekstruzji oraz rozmiaru uzyskanych liposomów w procesie. Do sprawdzenia wystąpienia fuzji liposomów podczas ekstruzji wykorzystano popularną metodę opartą o zjawisko FRET oraz sond fluorescencyjnych NBD oraz Rh-B [109,110] (Rysunek 11). Doświadczenie polegało na przygotowaniu dwóch próbek MLV oznaczonych jedną z sond: Rh-B lub NBD, które następnie wymieszano oraz przekekstrudowano. Eksperyment powtórzono z liposomami typu LUV. Za każdym razem nie zaobserwowano zjawiska FRET (Rysunek 12). Otrzymane wyniki wskazują, że podczas ekstruzji nie doszło do wymiany lipidu pomiędzy liposomami, czyli również fuzji liposomów potrzebnej do powstania cylindrycznego pęcherzyka. Uzyskane rezultaty wskazują na prawdziwość scenariusza A.

W kolejnym kroku zbadano drugi parametr pozwalający wskazać prawdopodobny scenariusz powstawania liposomów podczas ekstruzji – rozmiar liposomów wykorzystanych oraz uzyskanych procesie. W tym przypadku zastosowano jednowarstwowe liposomy o średnicy ok. 130 i 180 nm, które następnie poddano ekstruzji z wykorzystaniem filtrów o średnicy 100, 80 lub 50 nm. Rozmiar liposomów wyznaczono metodą DLS oraz obrazowania cryo-TEM.

Na podstawie uzyskanych wyników pokazano, że liposomy wykorzystane w doświadczeniu charakteryzował wysoki stopień homogeniczności. Poddanie liposomów ekstruzji z wykorzystaniem filtrów o średnicy mniejszej niż ich rozmiar spowodowało uformowanie liposomów o bimodalnej populacji rozmiarów. Otrzymane wyniki wskazują na poprawność scenariusza A, ponieważ w tym przypadku z większego liposomu powstają mniejsze. Rozmiar pierwszego jest związany z rozmiarem filtra, a wielkość kolejnych jest ograniczona przez ilość

pozostałego lipidu. W przypadku scenariusza B i C liposomy powinny odzwierciedlać jedynie rozmiar porów filtra.

Podsumowując, w ramach pracy udowodniono, że podczas ekstruzji liposomów nie zachodzi zjawisko fuzji liposomów oraz nie zostaje utworzony cylindryczny pęcherzyk, z którego powstają nowe cząstki. Dodatkowo, uzyskane liposomy nie charakteryzuje jednorodna populacja rozmiarów. W doświadczeniu uzyskano dwa dowody na to, że podczas ekstruzji liposomy powstają na wejściu pora filtra w wyniku „rozbicia” większego liposomu na mniejsze jednowarstwowe. Otrzymane wyniki nie są zgodne z modelami proponowanymi w literaturze [13,70,108,111,112].

3. Podsumowanie i perspektywy badań

Głównym tematem pracy jest analiza wpływu właściwości mechanicznych kompleksów molekularnych na przebieg procesów biologicznych. W ramach badań skupiono się na nanocząstkach zbudowanych z dwuwarstwy lipidowej – liposomów. Z technicznego punktu widzenia, praca miała na celu opracowanie nowej metody pomiarowej umożliwiającej wyznaczenie właściwości mechanicznych liposomów typu LUV, które przede wszystkim stosuje się jako nośnik leków czy substancji kontrastujących. W stanie wolnym są one trudne w podażu. Przykładem takich substancji są te o wysokim stopniu toksyczności w stosunku do komórek zdrowych (np. chemostatyki), silnie hydrofobowe lub o niskiej stabilności, np. podatne na degradację enzymatyczną podczas podania dojelitowego [15].

Dane literaturowe wskazują, że właściwości mechaniczne liposomów bada się przede wszystkim z wykorzystaniem liposomów typu GUV [91,113], czyli o znacznie większych rozmiarach niż LUV. Do tej pory nie potwierdzono czy właściwości mechaniczne liposomów wyznaczone w mikroskali można przełożyć na nanoskalę. Dodatkowo, obecne metody pozwalające na określenie mechaniki liposomów są czasochłonne oraz wymagają specjalistycznych urządzeń [49,50]. Z tego powodu główną motywacją pracy było opracowanie nowej metody pomiarowej, która umożliwiłaby określenie właściwości mechanicznych liposomów typu LUV oraz byłaby prosta w aplikacji.

Pracę rozpoczęto od postawienia dwóch hipotez, które stanowiły punkt wyjściowy prowadzonych działań:

- 1) krzywizna dwuwarstwy lipidowej związana z rozmiarem liposomów wpływa na właściwości mechaniczne liposomów,
- 2) siła ekstruzji liposomów jest związana z właściwościami mechanicznymi badanych cząstek.

Pierwsza hipoteza pozwoliła rozstrzygnąć czy wartości określone przy wykorzystaniu modelu eksperymentalnego jakim są liposomy typu GUV można przełożyć na liposomy typu LUV, które są powszechnie stosowane w medycynie. Potwierdzenie drugiej hipotezy było kluczowe do opracowania nowej metody wyznaczającej właściwości mechaniczne liposomów na podstawie pomiaru siły ekstruzji. Nowa metoda pomiarowa została również wykorzystana do zbadania wpływu mechaniki liposomów na procesy biologiczne co jest tematem przewodnim pracy.

W pierwszym etapie przeprowadzono przegląd literaturowy zastosowania liposomów w medycynie, który zaprezentowano w pracy 1. Wyjaśniono również motywację pracy nad liposomami jako przedmiotem badań oraz wskazano ogromne znaczenie aplikacji liposomów dla prowadzenia efektywnych terapii farmaceutycznych.

W kolejnym kroku zweryfikowano hipotezę mówiącą, że rozmiar liposomów (tj. krzywizna dwuwarstwy lipidowej) wpływa na ich właściwości mechaniczne. W pracy 2. nie wykazano istotnych różnic właściwości mechanicznych w mikroskali w zależności od rozmiaru liposomów. Dodatkowo w pracy 4. pokazano, że właściwości mechaniczne określone w mikro-

i nanoskali wykazują takie same zależności. Otrzymane wyniki pozwoliły odrzucić opisywaną hipotezę.

Następnie w ramach badań zaprezentowanych w pracy 3. i pracy 4. potwierdzono drugą hipotezę wskazującą, że siła ekstruzji liposomów odzwierciedla ich właściwości mechaniczne. Otrzymane zależności są bazą do opracowania nowej metody pomiarowej określającej właściwości mechaniczne liposomów na podstawie wartości siły ekstruzji.

W ostatnim etapie, przeanalizowano wpływ mechaniki liposomów na przebieg procesów biologicznych, w których biorą one udział. W pracy 3. wykazano jak mechanika liposomów wpływa na ich stabilność, która jest szczególnie istotna dla zachowania cząstek w farmakoterapii. Następnie podjęto próbę analizy zjawiska ekstruzji w celu wyjaśnienia w jaki sposób przepchnięcie liposomów przez pory filtra umożliwi otrzymanie zawiesiny liposomów jednowarstwowych o homogenicznej populacji rozmiarów. Dodatkowo, przeanalizowano jakie siły determinują powstawanie liposomów w trakcie ekstruzji. Uzyskane rezultaty zaprezentowano w pracy 4. Otrzymane wyniki są istotne dla efektywnego planowania procesów produkcyjnych liposomów, ale również mogą posłużyć w analizie procesów biologicznych, w których istotne jest powstawanie nowych pęcherzyków z błony biologicznej czy fuzja błony (tj. egzo- i endocytoza).

Na zakończenie chciałabym podkreślić, że rozpoczętą pracę należy kontynuować w celu kompletnego opracowania nowej metody pomiarowej określającej właściwości mechaniczne liposomów typu LUV na podstawie siły ekstruzji. Do tej pory, udało się wykazać, że siła ekstruzji może być miarą właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej. Dodatkowo wskazano czynniki, które istotnie wpływają na pomiar siły ekstruzji, a więc w kolejnym kroku należy ustandaryzować warunki pomiaru siły ekstruzji, aby mierzona siła była niezależna od dodatkowych czynników.

W następnym etapie należałoby również opracować model empiryczny lub teoretyczny łączący siłę ekstruzji z właściwościami mechanicznymi określonymi przez współczynnik κ . Poprawność modeli jest możliwa do zweryfikowania poprzez wyznaczenie κ liposomów w obecności roztworu soli lub surfaktantów oraz porównanie otrzymanych wartości z wielkościami literaturowymi [114–116]. Wykonanie opisanych prac pozwoli potwierdzić opisane w rozprawie relacje pomiędzy siłą ekstruzji a wartościami mechanicznymi liposomów, oraz wskazać ograniczenia metody opartej o pomiar siły ekstruzji.

Bibliografia

- [1] S. Zhang, H. Gao, G. Bao, Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis, *ACS Nano*, 9 (2015) 8655–8671.
- [2] P. Nakhaei, R. Margiana, D.O. Bokov, W.K. Abdelbasset, M.A. Jadidi Kouhbanani, R.S. Varma, F. Marofi, M. Jarahian, N. Beheshtkhou, Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9 (2021).
- [3] M.C. Woodle, Sterically stabilized liposome therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 16 (1995) 249–265.
- [4] P. Liu, G. Chen, J. Zhang, A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives, *Mol.* 2022, Vol. 27, Page 1372, 27 (2022) 1372.
- [5] C. Hernandez, S. Shukla, Liposome based drug delivery as a potential treatment option for Alzheimer's disease, *Neural Regen. Res.*, 17 (2022) 1190.
- [6] L. van der Koog, T.B. Gandek, A. Nagelkerke, Liposomes and Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems: A Comparison of Composition, Pharmacokinetics, and Functionalization, *Adv. Healthc. Mater.*, 11 (2022) 2100639.
- [7] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, J. Ciccolini, Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept, *ISRN Pharm.*, 2012 (2012) 1–11.
- [8] D. Van Swayy, A. Demello, Microfluidic methods for forming liposomes, *Lab Chip*, 13 (2013) 752–767.
- [9] M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int. J. Nanomedicine*, 1 (2006).
- [10] L. Bagatolli, P.B. Sunil Kumar, Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques, *Soft Matter*, 5 (2009) 3234–3248.
- [11] L. Bagatolli, P.B. Sunil Kumar, Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques, *Soft Matter*, 5 (2009).
- [12] S.G.M. Ong, M. Chitneni, K.S. Lee, L.C. Ming, K.H. Yuen, Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes, *Pharmaceutics*, 8 (2016).
- [13] D.G. Hunter, B.J. Frisken, Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles, *Biophys. J.*, 74 (1998) 2996–3002.
- [14] M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis, Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *BBA - Biomembr.*, 812 (1985) 55–65.
- [15] T.O.B. Olusanya, R.R.H. Ahmad, D.M. Ibegbu, J.R. Smith, A.A. Elkordy, Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs, *Mol.* 2018, Vol. 23, Page 907, 23 (2018) 907.
- [16] J. Bourquin, A. Milosevic, D. Hauser, R. Lehner, F. Blank, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials, *Adv. Mater.*, 30 (2018) 1704307.
- [17] M.P. Nikolova, E.M. Kumar, M.S. Chavali, Updates on Responsive Drug Delivery Based on Liposome Vehicles for Cancer Treatment, *Pharm.* 2022, Vol. 14, Page 2195, 14 (2022) 2195.
- [18] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.*, 8 (2013) 102.
- [19] H. Bouvrais, Bending Rigidities of Lipid Bilayers, in: *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, 2012: pp. 1–75.
- [20] H. Bien, G. Mackenzie, M. Choi, Liposomal Irinotecan in the Treatment of Refractory Pancreatic Cancer, *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, 11 (2016) 376–383.
- [21] K. Klein, G.L. Kaspers, A Review of Liposomal Daunorubicin in the Treatment of Acute Leukemia, *Oncol. Hematol. Rev.*, 09 (2013) 142.
- [22] D.D. Lasic, Doxorubicin in sterically stabilized liposomes, *Nature*, 380 (1996) 561–562.
- [23] C.L. Messerer, E.C. Ramsay, D. Waterhouse, R. Ng, E.M. Simms, N. Harasym, P. Tardi, L.D. Mayer, M.B. Bally, Liposomal irinotecan: Formulation development and therapeutic assessment in murine xenograft models of colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.*, 10 (2004) 6638–6649.

- [24] J.A. Silverman, S.R. Deitcher, Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71 (2013) 555.
- [25] G.P. Stathopoulos, D. Antoniou, J. Dimitroulis, J. Stathopoulos, K. Marosis, P. Michalopoulou, Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 68 (2011) 945.
- [26] H.I. Chang, M.K. Yeh, Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy, *Int. J. Nanomedicine*, 7 (2012) 49–60.
- [27] M.S. Angst, D.R. Drover, Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam™: A sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology, *Clin. Pharmacokinet.*, 45 (2006) 1153–1176.
- [28] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, 1 (2012) 147–168.
- [29] J.L. Davis, H.L. Paris, J.W. Beals, S.E. Binns, G.R. Giordano, R.L. Scalzo, M.M. Schweder, E. Blair, C. Bell, Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect against Ischemia–Reperfusion Injury, *Nutr. Metab. Insights*, 9 (2016) NMI.S39764.
- [30] M.R. Mozafari, Nanoliposomes: preparation and analysis, *Methods Mol. Biol.*, 605 (2010) 29–50.
- [31] N. Wilson, N.P. Shah, Microencapsulation of vitamins, *Int. Food Res. J.*, 14 (2007) 1–14.
- [32] N. Nayerossadat, P. Ali, T. Maedeh, Viral and nonviral delivery systems for gene delivery, *Adv. Biomed. Res.*, 1 (2012) 27.
- [33] W. Rawicz, B.A. Smith, T.J. McIntosh, S.A. Simon, E. Evans, Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids, *Biophys. J.*, 94 (2008) 4725–4736.
- [34] S. Garcia-manyes, L. Redondo-morata, G. Oncins, Supporting Information for : Nanomechanics of lipid bilayers : Heads or tails ?, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 12874–12886.
- [35] P.S. Niemelä, M.T. Hyvönen, I. Vattulainen, Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers, *Biophys. J.*, (2006).
- [36] N. Kučerka, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains, *J. Membr. Biol.*, (2006).
- [37] D. Lombardo, P. Calandra, D. Barreca, S. Magazù, M. Kiselev, Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery, *Nanomaterials*, 6 (2016) 125.
- [38] H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, W. Wu, Adapting liposomes for oral drug delivery, *Acta Pharm. Sin. B*, 9 (2019) 36–48.
- [39] J. Wang, J. Gong, Z. Wei, Strategies for Liposome Drug Delivery Systems to Improve Tumor Treatment Efficacy, *AAPS PharmSciTech* 2021 231, 23 (2021) 1–14.
- [40] J.X.J. Zhang, K. Hoshino, *Molecular Sensors and Nanodevices: Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering*, 2013.
- [41] X. Yi, X. Shi, H. Gao, Cellular uptake of elastic nanoparticles, *Phys. Rev. Lett.*, 107 (2011).
- [42] R. Lipowsky, Remodeling of membrane compartments: Some consequences of membrane fluidity, *Biol. Chem.*, 395 (2014) 253–274.
- [43] M.P. Neubauer, M. Poehlmann, A. Fery, Microcapsule mechanics: From stability to function, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 207 (2014) 65–80.
- [44] J. Sitterberg, A. Özçetin, C. Ehrhardt, U. Bakowsky, Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 74 (2010) 2–13.
- [45] P. Guo, D. Liu, K. Subramanyam, B. Wang, J. Yang, J. Huang, D.T. Auguste, M.A. Moses, Nanoparticle elasticity directs tumor uptake, *Nat. Commun.* 2018 91, 9 (2018) 1–9.
- [46] S.L. Tao, T.A. Desai, Micromachined devices: The impact of controlled geometry from cell-targeting to bioavailability, *J. Control. Release*, 109 (2005) 127–138.
- [47] K.A. Beningo, Y.L. Wang, Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target, *J. Cell Sci.*, 115 (2002) 849–856.
- [48] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotechnol.* 2007 24, 2

- (2007) 249–255.
- [49] H. Bouvrais, Bending Rigidities of Lipid Bilayers Their Determination and Main Inputs in Biophysical Studies, in: *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, 2012: pp. 1–75.
- [50] R. Dimova, Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 208 (2014) 225–234.
- [51] J. Henriksen, A.C. Rowat, J.H. Ipsen, Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity, *Eur. Biophys. J.*, 33 (2004) 732–741.
- [52] G. Niggemann, M. Kummrow, W. Helfrich, The Bending Rigidity of Phosphatidylcholine Bilayers: Dependences on Experimental Method, Sample Cell Sealing and Temperature, *J. Phys. II*, 5 (1995) 413–425.
- [53] O. Et-Thakafy, N. Delorme, C. Gaillard, C. Mériadec, F. Artzner, C. Lopez, F. Guyomarch, Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy, *Langmuir*, 33 (2017) 5117–5126.
- [54] J. Henriksen, A.C. Rowat, E. Brief, Y.W. Hsueh, J.L. Thewalt, M.J. Zuckermann, J.H. Ipsen, Universal behavior of membranes with sterols, *Biophys. J.*, 90 (2006) 1639–1649.
- [55] M. Kocun, A. Janshoff, Pulling tethers from pore-spanning bilayers: Towards simultaneous determination of local bending modulus and lateral tension of membranes, *Small*, 8 (2012) 847–851.
- [56] M.E. Solmaz, R. Biswas, S. Sankhagowit, J.R. Thompson, C.A. Mejia, N. Malmstadt, M.L. Povinelli, Optical stretching of giant unilamellar vesicles with an integrated dual-beam optical trap, *Biomed. Opt. Express*, 3 (2012) 2419.
- [57] M.E. Solmaz, S. Sankhagowit, R. Biswas, C.A. Mejia, M.L. Povinelli, N. Malmstadt, Optical stretching as a tool to investigate the mechanical properties of lipid bilayers, *RSC Adv.*, (2013).
- [58] M. Kummrow, W. Helfrich, Deformation of giant lipid vesicles by electric fields, *Phys. Rev. A*, (1991).
- [59] A. Tian, B.R. Capraro, C. Esposito, T. Baumgart, Bending stiffness depends on curvature of ternary lipid mixture tubular membranes, *Biophys. J.*, 97 (2009) 1636–1646.
- [60] J.F. Nagle, Experimentally determined tilt and bending moduli of single-component lipid bilayers, *Chem. Phys. Lipids*, 205 (2017) 18–24.
- [61] M.S. Jablin, K. Akabori, J.F. Nagle, Experimental support for tilt-dependent theory of biomembrane mechanics, *Phys. Rev. Lett.*, (2014).
- [62] S.D. Guler, D.D. Ghosh, J. Pan, J.C. Mathai, M.L. Zeidel, J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle, Effects of ether vs ester linkage on lipid bilayer structure and water permeability, *Chem. Phys. Lipids*, 160 (2009) 33–44.
- [63] S. Penič, A. Iglič, I. Bivas, M. Fošnarič, Bending elasticity of vesicle membranes studied by Monte Carlo simulations of vesicle thermal shape fluctuations, *Soft Matter*, 11 (2015) 5004–5009.
- [64] Z.A. Levine, R.M. Venable, M.C. Watson, M.G. Lerner, J.E. Shea, R.W. Pastor, F.L.H. Brown, Determination of biomembrane bending moduli in fully atomistic simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 136 (2014) 13582–13585.
- [65] R.M. Venable, F.L.H. Brown, R.W. Pastor, Mechanical properties of lipid bilayers from molecular dynamics simulation, *Chem. Phys. Lipids*, 192 (2015) 60–74.
- [66] M. Fošnarič, A. Iglič, S. May, Influence of rigid inclusions on the bending elasticity of a lipid membrane, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 74 (2006).
- [67] M. Fošnarič, K. Bohinc, D.R. Gauger, A. Iglič, V. Kralj-Iglič, S. May, The influence of anisotropic membrane inclusions on curvature elastic properties of lipid membranes, in: *J. Chem. Inf. Model.*, 2005.
- [68] D. Drabik, M. Przybyło, G. Chodaczek, A. Iglič, M. Langner, The modified fluorescence based vesicle fluctuation spectroscopy technique for determination of lipid bilayer bending properties, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1858 (2016) 244–252.
- [69] P. Méléard, T. Pott, H. Bouvrais, J.H. Ipsen, Advantages of statistical analysis of giant vesicle flickering for bending elasticity measurements, *Eur. Phys. J. E*, 34 (2011) 116.
- [70] S. Penič, L. Mesarec, M. Fošnarič, L. Mrówczyńska, H. Hägerstrand, V. Kralj-Iglič, A. Iglič, Budding and Fission of Membrane Vesicles: A Mini Review, *Front. Phys.*, 8 (2020).
- [71] G. Pabst, F.A. Heberle, J. Katsaras, X-Ray Scattering from Lipid Membranes, in: *Encycl.*

- Biophys., 2018: pp. 1–8.
- [72] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, 1 (2012) 147–168.
- [73] C. Zylberberg, S. Matosevic, Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape, *Drug Deliv.*, 23 (2016) 3319–3329.
- [74] C.G. Siontorou, G.P. Nikoleli, D.P. Nikolelis, S.K. Karapetis, Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future, *Membranes (Basel)*, 7 (2017).
- [75] Y. Murakami, Z. Zhang, T. Taniguchi, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda, A High-Sensitive Detection of Several Tens of nM of Amyloid-Beta by Cantilever-Type Biosensor Immobilized DPPC Liposome Incorporated with Cholesterol, *Procedia Eng.*, 168 (2016) 565–568.
- [76] Z. Zhang, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda, Real-time characterization of fibrillization process of amyloid-beta on phospholipid membrane using a new label-free detection technique based on a cantilever-based liposome biosensor, *Sensors Actuators, B Chem.*, 236 (2016) 893–899.
- [77] R. Liu, *Water-Insoluble Drug Formulation*, 2000.
- [78] R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.P.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L. rong Hu, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *BBA - Biomembr.*, 1061 (1991) 297–303.
- [79] A. Hinna, F. Steiniger, S. Hupfeld, P. Stein, J. Kuntsche, M. Brandl, Filter-extruded liposomes revisited: A study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters, *J. Liposome Res.*, (2016).
- [80] R. Lipowsky, Remodeling of membrane compartments: Some consequences of membrane fluidity, *Biol. Chem.*, (2014).
- [81] M.L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 5 (2015) 231–242.
- [82] S. Duangjit, B. Pamornpathomkul, P. Opanasopit, T. Rojanarata, Y. Obata, K. Takayama, T. Ngawhirunpat, Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes, *Int. J. Nanomedicine*, 9 (2014) 2005–2017.
- [83] B. Maherani, E. Arab-Tehrany, A. Kheirloomoom, F. Cleymand, M. Linder, Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine, *Food Chem.*, 134 (2012) 632–640.
- [84] Y. Tokudome, R. Uchida, T. Yokote, H. Todo, N. Hada, T. Kon, J. Yasuda, H. Hayashi, F. Hashimoto, K. Sugibayashi, Effect of topically applied sphingomyelin-based liposomes on the ceramide level in a three-dimensional cultured human skin model, *J. Liposome Res.*, 00 (2009) 090625050232094–6.
- [85] C.H. Lee, W.C. Lin, J. Wang, All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions, *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 64 (2001) 4.
- [86] M. Ohno, T. Hamada, K. Takiguchi, M. Homma, Dynamic behavior of giant liposomes at desired osmotic pressures, *Langmuir*, 25 (2009) 11680–11685.
- [87] R.S. Gracià, N. Bezlyepkina, R.L. Knorr, R. Lipowsky, R. Dimova, Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: Fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles, *Soft Matter*, 6 (2010) 1472–1482.
- [88] L.R. Arriaga, R. Rodríguez-García, L.H. Moleiro, S. Prévost, I. López-Montero, T. Hellweg, F. Monroy, Dissipative dynamics of fluid lipid membranes enriched in cholesterol, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 247 (2017) 514–520.
- [89] M. Ibarguren, A. Alonso, B.G. Tenchov, F.M. Goñi, Quantitation of cholesterol incorporation into extruded lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1798 (2010) 1735–1738.
- [90] L. Fernandez-Puente, I. Bivas, M.D. Mitov, P. Méléard, Temperature and chain length effects on bending elasticity of phosphatidylcholine bilayers, *EPL*, (1994).
- [91] M.A.S. Karal, N.A. Mokta, V. Levadny, M. Belaya, M. Ahmed, M.K. Ahamed, S. Ahammed, Effects of cholesterol on the size distribution and bending modulus of lipid vesicles, *PLoS One*, 17 (2022) e0263119.
- [92] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion

- procedure, *BBA - Biomembr.*, 858 (1986) 161–168.
- [93] H. Jousma, H. Talsma, F. Spies, J.G.H. Joosten, H.E. Junginger, D.J.A. Crommelin, Characterization of liposomes The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers, *Int. J. Pharm.*, 35 (1987) 263–274.
- [94] A. Askarizadeh, A.E. Butler, A. Badiie, A. Sahebkar, Liposomal nanocarriers for statins: A pharmacokinetic and pharmacodynamics appraisal, *J. Cell. Physiol.*, 234 (2019) 1219–1229.
- [95] R. Trivedi, M. Umekar, N. Kotagale, S. Bonde, J. Taksande, Design, evaluation and in vivo pharmacokinetic study of a cationic flexible liposomes for enhanced transdermal delivery of pramipexole, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 61 (2021) 102313.
- [96] D. Vorselen, M.C. Piontek, W.H. Roos, G.J.L. Wuite, Mechanical Characterization of Liposomes and Extracellular Vesicles, a Protocol, *Front. Mol. Biosci.*, 7 (2020) 139.
- [97] A. Hussain, S. Singh, D. Sharma, T.J. Webster, K. Shafaat, A. Faruk, Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery, *Int. J. Nanomedicine*, 12 (2017) 5087.
- [98] Z. Dai, M. Yu, X. Yi, Z. Wu, F. Tian, Y. Miao, W. Song, S. He, E. Ahmad, S. Guo, C. Zhu, X. Zhang, Y. Li, X. Shi, R. Wang, Y. Gan, Chain-Length- and Saturation-Tuned Mechanics of Fluid Nanovesicles Direct Tumor Delivery, *ACS Nano*, (2019).
- [99] N.C. Gauthier, M.A. Fardin, P. Roca-Cusachs, M.P. Sheetz, Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 (2011) 14467–14472.
- [100] A.R. Houk, A. Jilkine, C.O. Mejean, R. Boltyanskiy, E.R. Dufresne, S.B. Angenent, S.J. Altschuler, L.F. Wu, O.D. Weiner, Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration, *Cell*, 148 (2012) 175–188.
- [101] A. Janshoff, C. Steinem, Mechanics of lipid bilayers: What do we learn from pore-spanning membranes?, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1853 (2015) 2977–2983.
- [102] J. Kim, Probing nanomechanical responses of cell membranes, *Sci. Reports* 2020 101, 10 (2020) 1–11.
- [103] M. Staykova, D.P. Holmes, C. Read, H.A. Stone, Mechanics of surface area regulation in cells examined with confined lipid membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 (2011) 9084–9088.
- [104] T. Ursell, J. Kondev, D. Reeves, P.A. Wiggins, R. RobPhillips, Role of Lipid Bilayer Mechanics in Mechanosensation, *Mechanosensitive Ion Channels*, (2008) 37–70.
- [105] H. Alimohamadi, P. Rangamani, Modeling Membrane Curvature Generation due to Membrane-Protein Interactions, *Biomolecules*, 8 (2018).
- [106] K.A. Riske, R.P. Barroso, C.C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V.B. Henriques, M.T. Lamy, Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1788 (2009) 954–963.
- [107] M. Langner, H. Pruchnik, K. Kubica, The effect of the lipid bilayer state on fluorescence intensity of fluorescein-PE in a saturated lipid bilayer, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, 55 (2000) 418–424.
- [108] S.G. Clerc, T.E. Thompson, A possible mechanism for vesicle formation by extrusion, *Biophys. J.*, (1994).
- [109] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2006.
- [110] P. Mattjus, J.G. Molotkovsky, J.M. Smaby, R.E. Brown, A fluorescence resonance energy transfer approach for monitoring protein-mediated glycolipid transfer between vesicle membranes, *Anal. Biochem.*, 268 (1999) 297–304.
- [111] R. Bruinsma, Rheology and shape transitions of vesicles under capillary flow, *Phys. A Stat. Mech. Its Appl.*, (1996).
- [112] D. Jesenek, Š. Perutková, W. Gózdź, V. Kralj-Iglič, A. Iglič, S. Kralj, Vesiculation of biological membrane driven by curvature induced frustrations in membrane orientational ordering, *Int. J. Nanomedicine*, 8 (2013) 677–687.
- [113] C.H. Lee, W.C. Lin, J. Wang, Measuring the bending rigidity of giant unilamellar liposomes with differential confocal microscopy, *Pacific Rim Conf. Lasers Electro-Optics, CLEO - Tech. Dig.*, (2000) 592–593.
- [114] H. Bouvrais, L. Duelund, J.H. Ipsen, Buffers affect the bending rigidity of model lipid

- membranes, *Langmuir*, 30 (2014) 13–16.
- [115] H.A. Faizi, S.L. Frey, J. Steinkühler, R. Dimova, P.M. Vlahovska, Bending rigidity of charged lipid bilayer membranes, *Soft Matter*, 15 (2019) 6006–6013.
- [116] S. Purushothaman, P. Cicuta, O. Ces, N.J. Brooks, Influence of High Pressure on the Bending Rigidity of Model Membranes, *J. Phys. Chem. B*, 119 (2015) 9805–9810.

PRACA 1

Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych jako element podniesienia jakości życia społeczeństwa

Joanna Doskocz, Marek Langner

Politechnika Wroclawska
Lipid Systems sp. z o.o., Wroclaw

KIEROWANE NOŚNIKI SUBSTANCJI BIOLOGICZNIE CZYNNYCH JAKO ELEMENT PODNIESIENIA JAKOŚCI ŻYCIA SPOŁECZEŃSTWA

1. Wstęp

Kierowane nośniki substancji czynnych to narzędzie do dostarczania środków farmakologicznych oraz składników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wbudowanie substancji biologicznie czynnej w strukturę nośnika pozwala na modyfikację jej właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Pierwszym środkiem farmakologicznym opartym na koncepcji kierowanych nośników, zaakceptowanym przez *Food and Drug Administration* w 1995 r., była liposomowa postać dokсорubicyny o komercyjnej nazwie *Doxil* lub *Caelyx* wykorzystywana w chemioterapii nowotworów jajnika, szpiczaka mnogiego czy mięsaka Kaposiego. Zastosowanie liposomowej wersji cytostatyka pozwoliło na zwiększenie skuteczności chemioterapii poprzez wydłużenie czasu cyrkulacji substancji czynnej w krwiobiegu, co w połączeniu z jej specyficzną akumulacją w nowotworze pozwoliło na zminimalizowanie skutków ubocznych, takich jak kardiotoxycznosc. Ze względu na możliwość zwiększenia efektywności stosowanych terapii poprzez wykorzystanie kierowanych nośników znalazły one zastosowanie również w przypadku innych substancji farmakologicznych, suplementów diety, żywności dodatkowo wzbogacanej czy preparatów dermatologicznych. Nowe technologie kierowanych nośników nie tylko umożliwiają poprawę wydajności dotychczas stosowanych terapii, ale również pozwalają na rozwój nowych, np. terapii genowej, która jest obiecującym narzędziem w walce z takimi chorobami, jak cukrzyca, nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne.

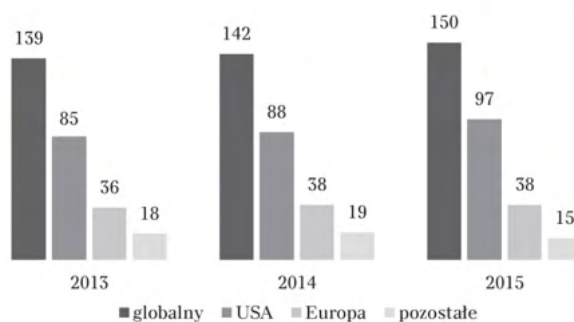
W obliczu rosnącego zapotrzebowania na środki farmakologiczne oraz substancje wspomagające wykorzystywane w walce z chorobami cywilizacyjnymi oraz w podtrzymywaniu stanu zdrowia w starzejącym się społeczeństwie kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych są obiecującym

rozwiązaniem poprawy wydajności stosowanych terapii oraz medycyny prewencyjnej związanej z suplementacją niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania, ale trudnych w podażu substancji (hydrofobowych, peptydowych lub toksycznych). Poprawa wydajności stosowanych terapii oraz rozszerzenie możliwości medycyny prewencyjnej pozwoliłyby nie tylko obniżyć rosnące koszty leczenia, ale również podwyższyć jakość życia osób chorych, starszych oraz tych o szczególnych potrzebach żywieniowych.

2. Substancje oparte na koncepcjach kierowanych nośników

2.1. Preparaty farmakologiczne

Pierwszym zatwierdzonym przez *Food and Drug Administration* środkiem farmakologicznym zamkniętym w kierowanym nośniku była doksorubicyna umieszczona w liposomach pokrytych glikolem polietylenowym w celu wydłużenia czasu cyrkulacji w krwiobiegu. Substancja do dziś jest podawana przede wszystkim w przypadku nowotworów jajników oraz szpiczaka mnogiego. Sprzedawana jest pod komercyjną nazwą *Doxil* (USA) lub *Caelyx* (Europa) i co rok generuje przychody o wartości 500 mln dolarów [Zylberberg, Matosevic 2016]. Ze względu na korzyści wynikające ze stosowania kierowanych nośników wykorzystuje się je również w przypadku innych leków, a globalny rynek kierowanych nośników leków szacuje się dziś na 150,3 mld dolarów (rys. 1) [<http://drugdelivery.pharmaceuticalconferences.com>].



Rys. 1. Wartość globalnego rynku kierowanych nośników leków (w mld dol.)

Źródło: BCC research [<http://drugdelivery.pharmaceuticalconferences.com>].

- Kierowane nośniki leków stosuje się obecnie w trzech przypadkach:
- terapii celowanej, żeby zmniejszyć skutki uboczne wynikające z podawania substancji toksycznych,
 - zapewnienia stabilności preparatom biologicznym i ochrony przed degradacją enzymatyczną w przypadku preparatów przeznaczonych do podaży doustnej,
 - zwiększenia rozpuszczalności substancji hydrofobowych.

W tab.1 zebrano dostępne komercyjne rozwiązania kierowanych nośników leków zaakceptowane przez *Food and Drug Administration*. Spośród przedstawionych preparatów tylko dwa są refundowane przez Narodowy Fundusz Zdrowia [*Leki refundowane*]. Jest to *Caelyx*, czyli *Doxil* dostępny na europejskim rynku, oraz *Myocet* (liposomowa, niepeligowana postać doksorubicyny). Lasic pokazał, że zastąpienie wolnej doksorubicyny jej odpowiednikiem liposomowym zmniejszyło występowanie kardiotoxyczności 4,5-krotnie, a jednocześnie znacznie zredukowało masę nowotworu płaskonabłonkowego płuc [Lasic 1996].

W przypadku pozostałych cytostatyków zamkniętych w kierowanych nośnikach także uzyskano zwiększenie wydajności chemioterapii, a to głównie ze względu na możliwość podania większej ilości preparatu i jednocześnie zmniejszenia efektów ubocznych. Efekt ten pokazano dla daunorubicyny w leczeniu białaczki [Klein, Kaspers 2013], irynotekanu w leczeniu nowotworu trzustki [Bien i in. 2016; Messerer i in. 2004], cisplatyny w leczeniu nowotworu płuc [Stathopoulos i in. 2011] oraz winkrystyny w leczeniu białaczki i chłoniaków [Silverman, Deitcher 2013]. Poprawa właściwości farmakokinetycznych substancji przeciwbólowych poprzez zastosowanie strategii kierowanych nośników leków pozwoliła na zmniejszenie wywoływanych przez nie skutków ubocznych. Na przykład liposomowa morfina obniża ryzyko niewydolności oddechowej oraz skutecznie redukuje ból przez ok. 48 godzin, co uniezależnia pacjentów od stacjonarnych cewników [Angst, Drover 2006].

Kierowane nośniki leków, oprócz minimalizowania skutków ubocznych wynikających z podawania substancji toksycznych, pozwalają również dostarczać związki amfifilowe i silnie hydrofobowe. Dzięki temu możliwa jest podaż takich leków, jak werteroporfina stosowana w przypadku zwyrodnienia płamki żółtej związanego z wiekiem [Chang, Yeh 2012] czy amfoterycyna B zwalczająca ciężkie zakażenia grzybicze [Laouini i in. 2012]. Kierowane nośniki pozwoliły również stworzyć szczepionkę zapobiegającą wirusowemu zapaleniu wątroby typu A o takiej samej skuteczności, ale pozbawionej neurotoksycznego glinu [Bovier 2008]. W tym ostatnim przypadku powierzchnia liposomów posłużyła do prezentacji antygeny.

Ze względu na korzyści wynikające z zastosowania kierowanych nośników leków prowadzone są liczne badania nad nowymi preparatami farmako-

Tabela 1. Preparaty farmakologiczne oparte na koncepcjach kierowanych nośników zaakceptowane przez FDA (zaznaczono preparaty refundowane przez NFZ)

Nazwa produktu	Środek biologicznie czynny	Choroba
DOXIL (CAELYX) MYOCET LIPODOX	dokсорubicyna	nowotwory jajnika, szpiczak mnogi, mięsak Kaposiego
DAUNOXOME	daunorubicyna	ostra białaczka szpikowa, limfoblastyczna
ONIVYDE	irynotekan	nowotwór trzustki
Lipoplatin	cisplatyna	nowotwory nabłonkowe (płuc, pęcherza moczowego)
MARQIBO	winkrystyna	chłoniaki niezziarnicze
Visudyne	werteporfiryna	starcze zwyrodnienie plamki żółtej
EPAXAL	dezaktywowany wirus zapalenia wątroby typu A	prewencja przed zapaleniem wątroby typu A
DepoCyt	arabinozyd cytozyny	zapalenie opon mózgowych
DepoDur	morfina	przeciwbólowo
LMX4 LMX5	lidokaina	przeciwbólowo
AMBISOME Abelcet	amfoterycyna B	ciężkie zakażenia grzybicze

Źródło: [Zylberberg, Matosevic 2016; Laouini i in. 2012].

logicznymi, a wiele innych jest w trakcie badań klinicznych. Badania prowadzone nad formułacjami cytostatyków (cytarabina, irinocetan, winorbelina) mają na celu głównie poprawę wydajności chemioterapii [Kumari 2015]. Odmierna grupa preparatów, nad którymi prowadzone są badania, ma za zadanie poprawić jakość życia chorych. Przykładem jest liposomowa insulina o podaży jelitowej, która mogłaby wyeliminować uciążliwą i inwazyjną podaż do krwiobiegu. Nośniki w tym przypadku miałyby za zadanie zapewnić ochronę insuliny przed enzymatyczną degradacją oraz odseparować od zmiennych czynników panujących w układzie pokarmowym. Kolejną substancją, która dzięki kierowanym nośnikom mogłaby być podawana doustnie, a obecnie jest podawana w formie zastrzyków, jest globulina antyfilowa (AHG) zapobiegająca śmiertelnym krwawieniom towarzyszącym hemofilii A [Laouini i in. 2012].

Ważnym narzędziem w walce z coraz powszechniejszymi chorobami cywilizacyjnymi jest terapia genowa, która wykorzystuje modyfikacje samego materiału genetycznego lub poziomu jego ekspresji w celu wygenerowania pożądanego fenotypu, co przekłada się na zmniejszenie objawów lub nawet zupełne wyleczenie z chorób takich jak cukrzyca, celiakia, nowotwory czy

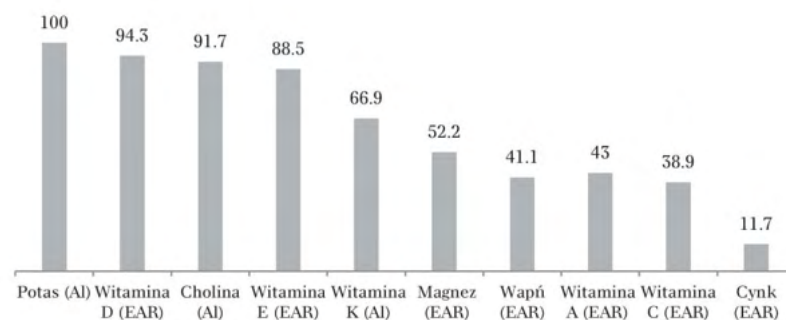
schorzenia neurodegeneracyjne (np. pląsawica Huntingtona czy choroba Parkinsona). Krytycznie ważne dla rozwoju terapii genowej jest znalezienie odpowiedniego nośnika materiału genetycznego, który pozwoli na wprowadzenie go do wnętrza komórki, i odpowiedni poziom jego ekspresji. Dziś badania są prowadzone nad nośnikami wirusowymi oraz niewirusowymi – analogicznymi do używanych w przypadku kierowanych nośników leków (polimery syntetyczne i naturalne, liposomy, dendrometry oraz lipidy kationowe) [Nayerossadat i in. 2012].

2.2 Suplementy diety

Mikroelementy takie jak witaminy i składniki mineralne są konieczne do prawidłowej homeostazy i poprawnego funkcjonowania całego organizmu. Powszechnie występujący ich niedobór nie jest związany jedynie z niedożywieniem, jak to ma miejsce w słabo rozwiniętych regionach świata. Deficyt niezbędnych mikroelementów jest powszechnym zjawiskiem również w krajach wysoko rozwiniętych. Badania pokazują, że ponad 90% Amerykanów ma niedobór przynajmniej jednego składnika mineralnego lub witaminy. Deficyt niezbędnych składników jest przede wszystkim wynikiem nieprzyjmowania wystarczającej ich ilości z pożywieniem, co wiąże się z powszechnym niehigienicznym trybem życia i korzystaniem z wysoko przetworzonej żywności. Jednak niektóre z niedoborów występują niezależnie od ilości witamin czy składników mineralnych przyjmowanej z pożywieniem, a są wynikiem przewlekłych chorób, otyłości czy podeszłego wieku [Blumberg i in. 2016].

Powszechność występowania deficytu mikroelementów w krajach wysoko rozwiniętych potwierdzają także badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych w latach 2007-2010, które wykazały, że niedobór witamin D i E występuje u odpowiednio 94 i 89% osób powyżej 4. roku życia, a jeszcze częstszy deficyt zaobserwowano w przypadku choliny (92%) i potasu (100%). Dane zostały wyznaczone względem współczynnika EAR (średnie zapotrzebowanie dla grupy konsumentów – ilość substancji, która pokrywa zapotrzebowanie 50% zdrowych przedstawicieli grupy) lub AL (zalecany średni poziom spożycia) [Blumberg i in. 2016].

Głównym narzędziem w walce z deficytem witamin i minerałów są suplementy diety, czyli środki spożywcze zapewniające uzupełnienie diety. Są skoncentrowanym źródłem witamin i składników mineralnych lub innych substancji biologicznie czynnych ważnych z punktu widzenia homeostazy organizmu [Wallace i in. 2014]. Suplementy diety różnią się od leków dostępnych bez recepty tym, że nie wykazują właściwości leczenia określonych chorób czy dolegliwości, w związku z tym nie mają zdefiniowanych wskazań do ich przyjmowania, a także nie podlegają nadzorowi Urzędu Rejestracji



Rys. 2. Powszechność występowania niedoborów wybranych witamin i składników mineralnych u niesuplementujących mieszkańców USA (w %)

Źródło: [Blumberg i in. 2016].

Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (UPRL). W przeciwieństwie do środków leczniczych nie są również monitorowane przez inspekcję farmaceutyczną. Rejestracja suplementów diety nie wymaga wykazania skuteczności czy bezpieczeństwa, potrzebne jest jedynie pisemne powiadomienie Głównego Inspektora Sanitarnego. Z kolei suplementy diety od środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego (ŚSSPŻ) różnią się przede wszystkim tym, że stanowią tylko uzupełnienie diety. ŚSSPŻ mogą stanowić jedyne źródło pożywienia dla osób o specjalnych potrzebach żywieniowych, np. niemowląt czy diabetyków [Ustawa z dnia 6 września 2001 r.].

W ostatnich latach sprzedaż suplementów diety w Polsce i na świecie rośnie (dynamikę wzrostu ocenia się na 30-40%). Jest to przede wszystkim wynik szybkiego wzrostu gospodarczego oraz mody związanej ze zdrowym trybem życia. Coraz więcej konsumentów jest świadomych wagi prewencji dla zachowania zdrowia w związku z rosnącymi kosztami leczenia, a także problemów strukturalnych polskiej służby zdrowia. Wzrost sprzedaży suplementów diety jest również związany ze starzeniem się społeczeństwa, a także z rosnącym wykorzystaniem mediów przez przemysł farmaceutyczny do celów reklamowych. Tylko suplementy diety mogą być reklamowane praktycznie bez ograniczeń. Dziś globalny rynek suplementów diety szacuje się na 132,8 mld dolarów, a najpopularniejszym sprzedawanym składnikiem suplementów diety są witaminy (42%) [Zion Market Research]. W przypadku rynku w Polsce suplementy diety stanowią dziś 17% wszystkich sprzedawanych w naszym kraju preparatów bez recepty (OTC). Wartość sprzedaży w Polsce szacuje się na 3,33 mld złotych (rys. 3) [Kotynia i in. 2017].

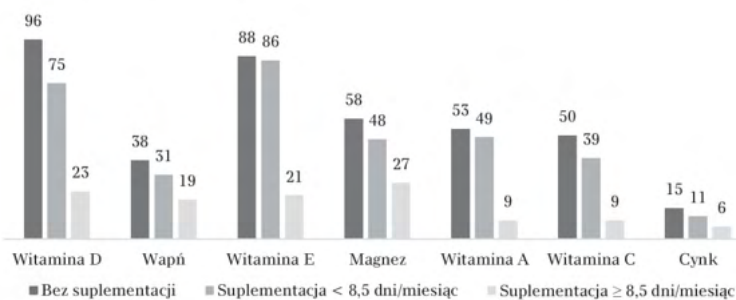
Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych jako element podniesienia...



Rys. 3. Wartość rynku suplementów diety w Polsce w ostatnich latach oraz prognoza PMR (w mld zł, p oznacza prognozę)

Źródło: [Kotynia i in. 2017].

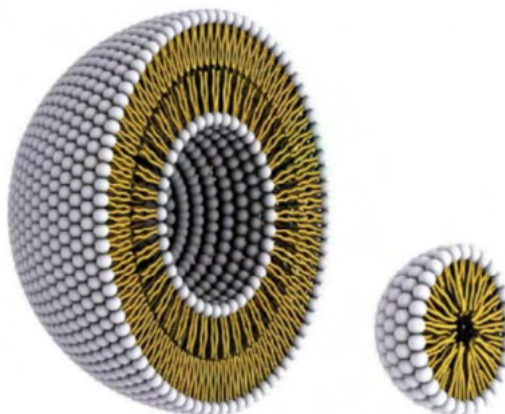
Porównanie skali deficytu witamin i minerałów w przypadku osób bez i z suplementacją przedstawiono na rysunku 4. Na podstawie przedstawionych wyników widać, że suplementacja znacznie obniża występowanie niedoborów witamin i mikroelementów, ale w niektórych przypadkach, jak np. witaminy D czy E, mimo częstej suplementacji nadal u znacznej części populacji pozostaje powszechny ich niedobór. Oznacza to, że w walce z niedoborami witamin i minerałów konieczne są bardziej efektywne sposoby podaży. Jednym z nowych podejść wydajniejszej suplementacji są formułacje mikroelementów oparte o koncepcje kierowanych nośników substancji biologicznie czynnych [Blumberg i in. 2017].



Rys. 4. Wpływ suplementacji na występowanie niedoborów wybranych witamin i mikroelementów wśród osób dorosłych (powyżej 19 roku życia) mieszkających w USA

Źródło: [Blumberg i in. 2016].

W przypadku suplementów diety zastosowanie kierowanych nośników daje możliwość przede wszystkim dostarczenia substancji hydrofobowych oraz ochrony przed degradacją enzymatyczną w układzie pokarmowym. Jako kierowane nośniki suplementów diety najczęściej stosuje się micelle oraz liposomy uformowane z fosfolipidów (rys. 5), które budują również błonę komórek. Z tego powodu materiał matrycowy nośników także jest suplementem, ponieważ może również być wykorzystany do regeneracji tkanek. Ponadto materiał matrycowy zbudowany z fosfolipidów jest doskonałym źródłem choliny, której niedobór występuje u ponad 90% badanych osób (rys. 2). Cholina jest konieczna do prawidłowego rozwoju układu nerwowego płodu, a także dla późniejszego poprawnego funkcjonowania organizmu. Wykazano, że przyjmowanie odpowiedniej ilości choliny zmniejsza otyłość u osób w podeszłym wieku oraz poprawia procesy myślowe. Kolejną z zalet zastosowania jako materiał matrycowy lipidów jest możliwość ich produkcji z bezpiecznych i powszechnie dostępnych źródeł, takich jak mleko, soja czy jaja, co dodatkowo ułatwia dopuszczenie ich do obrotu [Reza Mozafari i in. 2008].



Rys. 5. Schemat budowy liposomu (po lewej) oraz miceli (po prawej) uformowanych z fosfolipidów w roztworze wodnym

Źródło: [Bitounis i in. 2012].

W Polsce od 2007 r. Główny Inspektor Sanitarny przyznał 6 produktom zawierającym witaminy lub minerały w postaci kierowanych nośników status suplementów diety, dopuszczając je do obrotu (tab. 2). Ponadto 90 takich produktów jest w trakcie procesu rozpatrywania. Dopuszczone suplementy diety zawierają glutation, kwas gamma-aminomasłowy (GABA), L-kwas

Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych jako element podniesienia...

askorbinowy (witamina C) oraz koenzym Q10. Trwające postępowania dotyczą preparatów zawierających także witaminy B12 i D, kurkuminę, rezweratol, kwasy omega 3, magnez, kwercetynę, chrom oraz kwas alfa-liponowy (dane na dzień 23.03.2017, Rejestr Produktów Głównego Inspektora Sanitarnego).

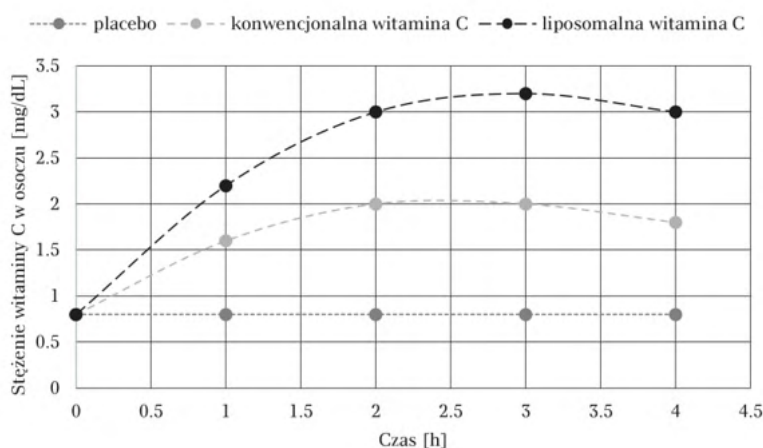
Tabela 2. Komercyjne suplementy diety oparte na koncepcjach kierowanych nośników (suplementy diety zarejestrowane i dopuszczone do obrotu przez Generalny Inspektorat Sanitarny w Polsce)

Nazwa produktu	Środek biologicznie czynny	Działania opisane przez producenta
ETHERIC DELIVERY GLUTATHIONE (Quicksilver Scientific)	glutation	detoksykacja, recykling witaminy E i C, transport aminokwasów, produkcja koenzymów
ETHERIC DELIVERY GABA (Quicksilver Scientific)	kwas gamma-aminomasłowy	uspokaja, ułatwia zasypianie, łagodzi negatywne skutki stresu
ETHERIC DELIVERY Vitamin C with R-lipoic Acid (Quicksilver Scientific) WITAMINA C Liposomalna (dr Mercola) Altrient C Liposomalna Witamina C (VITALLABS)	L-kwas askorbinowy	wsparcie systemu odpornościowego, wspomaganie syntezy kolagenu, zwiększenie wchłaniania żelaza
Qgel Liquid Drops (Tishcon Corporation)	koenzym Q10	wsparcie systemu odpornościowego, ujędrnienie skóry, zwiększenie wydolności mięśnia sercowego

Źródło: Rejestr produktów objętych powiadomieniem o pierwszym wprowadzeniu do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej prowadzony przez Głównego Inspektora Sanitarnego (dane na 23.03.2017 r.).

Zastosowanie kierowanych nośników może zwiększyć wchłanianie witamin i minerałów. W pracy [Davis i in. 2016] wykazano, że podanie liposomowej witaminy C wywołuje większe jej stężenie w osoczu w porównaniu z konwencjonalnym preparatem (rys. 6). Różnice wynikają prawdopodobnie ze zwiększenia jej stabilności. Trwałość wolnej witaminy C zależy od poziomu uwodnienia, pH oraz obecności jonów metali. Liposomy zapewniają stałe warunki poprzez odseparowanie witaminy C od czynników zewnętrznych obniżających jej stabilność. Zastosowanie kierowanych nośników w tej roli może podnieść efektywność suplementacji witaminą C. Utrzymanie odpowiedniego stężenia witaminy C w osoczu jest konieczne do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego [Douglas i in. 2007]. Witamina C wspomaga wchłanianie żelaza oraz jest niezbędna w erytropoezie, wpływając tym samym na efektywność leczenia anemii [Gershoff 1993]. Witamina C uczestniczy również w syntezie kolagenu, składnika tkanki łącznej, a więc za-

pewnia funkcjonalność skóry oraz wspomaga procesy związane z gojeniem się ran [Jacob, Sotoudeh 2002]. W wielu pracach wskazuje się na to, że odpowiednie stężenie witaminy C zapobiega powstawaniu nowotworów, może wspomagać proces ich leczenia oraz obniża ryzyko przerzutów. Ostatnio pojawiły się także doniesienia naukowe wskazujące na to, że witamina C obniża ryzyko chorób sercowo-naczyniowych w wyniku zapobiegania utlenianiu lipoprotein o małej gęstości (LDL) oraz zmniejszenia niestabilności blaszki miażdżycowej. Prowadzone są także badania dotyczące wpływu suplementacji dużą ilością witaminy C na obniżenie ryzyka zachorowania na zaćmę lub zwyrodnienie plamki żółtej – dwie główne przyczyny utraty wzroku u osób starszych [Li, Schellhorn 2007]. Badania dotyczące korelacji pomiędzy witaminą C oraz nowotworami, chorobami sercowo-naczyniowymi czy okulistycznymi nie dają jednoznacznych wyników, dlatego potrzeba więcej badań, żeby określić znaczenie suplementacji witaminą C w rozwoju i przebiegu tych schorzeń [Gershoff 1993].



Rys. 6. Stężenie witaminy C w surowicy krwi uzyskane po podaży doustnej w postaci wolnej oraz liposomalnej

Źródło: [Davis i in. 2016].

W przypadku suplementacji substancji hydrofobowych, czyli witamin A i E, stosuje się przede wszystkim ich syntetyczne pochodne, które rozpuszczają się w wodzie. Wykorzystanie kierowanych nośników umożliwia bezpośrednie podawanie nierozpuszczalnych w wodzie witamin, co zwiększa ich biodostępność i skuteczność [Wilson, Shah 2007]. Zwiększenie wydajności

przyswajania witamin E i A jest o tyle ważne, że niedobory tych substancji występują powszechnie (witamina E – 21%, witamina A – 9%) i to pomimo przyjmowania suplementów (rys. 4). Przewlekły niedobór tych witamin może powodować niewielki, ale kumulatywny wpływ na stan organizmu. Wynikiem deficytu witaminy E może być uszkodzenie tkanki nerwowej, kruchość krwinek czerwonych oraz zmęczenie mięśni, a witaminy A – ślepota nocna i inne zaburzenia widzenia oraz obniżenie skuteczności działania układu odpornościowego [Blumberg i in. 2016]. Podobnie jak witamina C, witaminy A i E pełnią funkcję przeciwutleniaczy, czyli chronią komórki przed wolnymi rodnikami. Pojawiają się także doniesienia w literaturze naukowej wskazujące na to, że witaminy wpływają na rozwój i przebieg chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych oraz zwyrodnienie plamki żółtej [Verhagen i in. 2006].

Inny z dostępnych suplementów opartych na koncepcjach kierowanych nośników leków zawiera glutation (silny przeciwutleniacz), który naturalnie jest produkowany przez wszystkie organizmy. Glutation jest czynnikiem detoksykującym (wiąże substancje toksyczne), ale również wspomaga syntezę białka, ponieważ uczestniczy w transporcie aminokwasów oraz recyklingu witamin A i C. Wspomaga również układ odpornościowy oraz obniża poziom kortyzolu we krwi [Glutathion...]. Poziom glutationu spada wraz z wiekiem, co może być konsekwencją nadużywania leków [Lang i in. 1992]. Niski poziom glutationu może prowadzić do nieskutecznej eliminacji wolnych rodników. Zaobserwowano, że wśród osób starszych wyższe stężenie glutationu wiązało się z mniejszą liczbą chorób, wyższym poziomem samooceny i lepszemu samopoczuciu oraz korelowało z niższym poziomem cholesterolu, ciśnieniem krwi oraz wskaźnikiem masy ciała [Julius i in. 1994]. Dodatkowo wykazano, że osoby, które chorowały na zapalenie stawów, cukrzycę czy choroby sercowo-naczyniowe zawsze miały obniżony poziom glutationu. Pokazano także, że obniżony poziom glutationu nie jest związany wyłącznie z wiekiem, stanem chorobowym bowiem, niezależnie od wieku, także towarzyszy obniżony poziom formy zredukowanej glutationu, podczas gdy poziom formy utlenionej utrzymuje się na stałym poziomie [Lang i in. 2000]. Skuteczna suplementacja glutationu mogłaby poprawić jakość życia osób starszych, zapewniając im wyższą sprawność psychiczną i fizyczną. Jednak glutation podawany doustnie jest rozkładany w wyniku działania enzymów trawiennych. Z tego powodu można go podawać efektywnie jedynie pozajelitowo poprzez podaż dożylną. Zastosowanie kierowanych nośników może stanowić ochronę glutationu przed degradacją enzymatyczną i umożliwić bardziej komfortowe dostarczanie poprzez podaż doustną.

2.3 Kosmetyki

Nigdy wcześniej konsumenci na całym świecie nie byli tak bardzo skupieni na dbaniu o zdrowie, dobre samopoczucie oraz wygląd. Z tego powodu rynek kosmetyków stale rośnie. W 2016 roku wartość europejskiego rynku kosmetyków oszacowano na 77 miliardów euro [Cosmetics...]. Główne trendy wzrostu zauważa się w sektorze kosmetyków „anti-aging”, co jest naturalną konsekwencją starzenia się społeczeństwa. Jednak w ostatnich latach wzrosło również zainteresowanie tzw. kosmetykami organicznymi, co zwiększyło zapotrzebowanie na preparaty ze składnikami naturalnymi. Jednak przeskórne dostarczenie takich składników do komórek skóry właściwej jest trudne z powodu bariery, jaką stanowi warstwa rogowa naskórka. Z tego powodu pojawia się ogromne zapotrzebowanie na nośniki substancji, które umożliwiłyby efektywne dostarczanie substancji aktywnych do komórek docelowych. W kosmetyce spośród wszystkich kierowanych nośników najpowszechniej używane są liposomy oraz pęcherzyki i matryce silikonowe [Patravale, Mandawgade 2008].

Tabela 5. Wybrane kosmetyki oparte na koncepcjach kierowanych nośników leków dostępne na rynku (dane o substancji czynnej produktu na podstawie informacji producentów)

Nazwa produktu	Substancja biologicznie czynna
C-VIT Liposomal Serum	etylowy kwas askorbinowy
HIDRADERM HYAL SERUM LIPOSOMOWE	kwas hialuronowy, retinol i retinaldehyd
Clarena Microcollagen&Peptide P3	kolagen
Krem liposomowy Clarena Acid Line	kwas salicylowy, pirogronowy, azelainowy
Resveraderm Sesderma Serum	rezweratol, koenzym Q10, retinol, witaminy C i E
Sesderma Azelac RU Liposomal Serum	retinol, kwas azelainowy, niacynamid
Retinol contra Cellulite	retinol, witaminy C i E
Clarena Certus Collagen	kolagen
Regime Daily Ultra Defence	beta-endorfiny, witaminy A, B, C, E, kwas hialuronowy
Regima Sensorial Daily Protector	beta-endorfinowy, witamina C
Farmona Hydra Quest	kolagen morski, elastyna, kwas hialuronowy, witamina E
Lipogaine	minoksydyl

Źródło: samodzielny przegląd dostępnych kosmetyków opartych na koncepcji kierowanych nośników (26.05.2017).

Preparaty kosmetyczne oparte na koncepcjach kierowanych nośników najczęściej zawierają przeciwutleniacze (witaminy A, C, E), kwasy hydroksylowe (np. salicylowy), substancje depigmentujące oraz peptydy (kolagen, ela-

styna). Podobnie jak w przypadku suplementów diety, zastosowanie kierowanych nośników umożliwia zapewnienie stabilności takim substancjom, jak witamina C, która chroni komórki skóry przed wolnymi rodnikami powstałymi podczas oddziaływania promieniowania UV oraz stymuluje produkcję kolagenu, który jest konieczny do zachowania odpowiedniej gęstości oraz jędrności skóry. Kierowane nośniki pozwalają również dostarczać substancje hydrofobowe, takie jak witaminy A oraz E, które tak jak witamina C pełnią rolę przeciwutleniaczy. Witamina A uczestniczy także w regeneracji komórek nabłonkowych oraz przyspiesza proces rogowacenia naskórka, co w efekcie zwiększa jego grubość. Naskórek z wiekiem staje się coraz cieńszy, co objawia się powstawaniem zmarszczek oraz zmniejszeniem jędrności skóry. Witamina A jest pomocna również w usuwaniu przebarwień, zwłaszcza tych powstałych na skutek działania promieniowania ultrafioletowego [Apartajita, Ravikumar 2014].

Oprócz zastosowań kosmetycznych kierowane nośniki wykorzystywane są do podaży substancji czynnych przezskórnie. Przykładem są produkty przeciwtrądzikowe. Trądzik pospolity dotyka 85% nastolatków. Typowy preparat przeciwtrądzikowy zawiera retinoidy zamknięte w liposomach. Taka formuła pozwala na kontrolowane uwalnianie leku, dzięki czemu uzyskuje się mniej skoncentrowaną dawkę substancji czynnej i unika lokalnych podrażnień, które najczęściej pojawiały w początkowych etapach leczenia trądziku [Vyas i in. 2014]. Dodatkowo liposomowa postać preparatu przeciwtrądzikowego pozwala na uzyskanie lepszych efektów terapii w porównaniu z konwencjonalnymi produktami [Yang i in. 2009]. Podobny rezultat uzyskuje się w przypadku preparatów przeciwko wypadaniu włosów. W konwencjonalnych preparatach wykorzystuje się minoksydyl w glikolu propylenowym, który po odparowaniu powoduje podrażnienia oraz pieczenie skóry. Zamknięcie minoksydylu w liposomach pozwala na głębsze wnikanie preparatu oraz kontrolowane uwalnianie substancji czynnej, dzięki czemu nie ma już konieczności częstego stosowania preparatu, unika się też uciążliwych skutków ubocznych [Mura i in. 2007].

3. Kierowane nośniki a jakość życia

Ocena jakości życia to zadanie niezwykle złożone, które łączy wiele dyscyplin naukowych, takich jak psychologia, socjologia, filozofia oraz statystyka i ekonomia. Z tego powodu pojawia się wiele nieścisłości i różnic w definicjach jakości życia w zależności od zastosowanych metod badawczych. Na przykład podejście socjologiczne skupia się na zaspokajaniu potrzeb materialnych, psychologiczne – na sensie życia i dobrostanie, a ekonomiczne – na możliwościach spełnienia oczekiwań. Niejednoznaczność oraz złożoność problemu

opisu jakości życia sprawia, że jej pomiar jest trudny i często niejednoznaczny. Metody oceny jakości życia ogólnie dzieli się na obiektywne oraz subiektywne. Metody obiektywne dotyczą ilościowego pomiaru zjawisk, a subiektywne – satysfakcji z obecności tych zjawisk. Metody obiektywne oceniają np. dochody czy opiekę medyczną, a subiektywne poczucie zadowolenia z pracy czy ze stanu zdrowia. Jednak niezależnie od tego, czy do oceny jakości życia wykorzystuje się metody obiektywne, czy subiektywne, a także czy zastosowany model opiera się na podejściu socjologicznym, psychologicznym, czy ekonomicznym, dwa spośród wszystkich czynników wpływających na ocenę jakości życia stosuje się najczęściej. Są to: dobrobyt (dochód, oszczędności, stan posiadania, satysfakcja z osiągnięć czy pracy) oraz zdrowie (opieka medyczna, zdrowie fizyczne i psychiczne, średnia długość życia oraz zadowolenie ze stanu zdrowia). Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych mogą poprawić jakość życia, ponieważ mają wpływ zarówno na dobrobyt, jak i na zdrowie [Machin, Fayers 2007; Felce, Perry 1995].

W pracy przedstawiono przykłady na to, że kierowane nośniki substancji czynnych mają wpływ na poprawę stanu zdrowia społeczeństwa poprzez poprawę wydajności stosowanych terapii (chemioterapia, zakażenia grzybiczne), zmniejszenie skutków ubocznych wynikających z zastosowanych terapii (środki przeciwbólowe), poprawę jakości życia chorych (podawanie jelitowe insuliny) czy zabieganie chorobom (prewencja wynikająca z efektywnej suplementacji witamin i minerałów, których niedobór jest związany z chorobami przewlekłymi). Kierowane nośniki mogą wpłynąć również na rozwój nowych terapii (np. genowej) i stworzyć narzędzia do walki z chorobami, wobec których współczesna medycyna pozwala tylko na leczenie skutków, bez możliwości eliminacji ich przyczyny (cukrzyca, płasawica Huntingtona, celiakia czy choroba Parkinsona). Dodatkowo kierowane nośniki umożliwiają również poprawę sytuacji ekonomicznej poprzez oferowanie atrakcyjnych miejsc pracy w nowoczesnym przemyśle nakierowanym na utrzymanie stanu zdrowia społeczeństwa. Nie do pominięcia jest także fakt, że podtrzymanie stanu zdrowia jest z ekonomicznego punktu widzenia bardziej racjonalne niż ograniczanie się wyłącznie do działań w momencie utraty zdrowia.

Polska jest 6. rynkiem farmaceutycznym w Europie oraz największym w Europie Wschodniej. Zapotrzebowanie na leki oraz suplementy diety stale rośnie, co jest wynikiem głównie starzenia się społeczeństwa, chorób cywilizacyjnych, wynikających ze wzrostu gospodarczego, degradacji środowiska i zmiany sposobu odżywiania oraz świadomości społeczeństwa. Dziś na rynku farmaceutycznym główny udział mają leki importowane (w ujęciu wartościowym w 2010 r. stanowiły one 75,7% całkowitych nakładów) oraz generyczne (66% pod względem wartościowym), i to mimo że różnica między ceną leków innowacyjnych a generycznych jest jedną z najniższych w Europie [Wkład innowacyjnego... 2011].

Polski rynek farmaceutyczny może być atrakcyjny dla rodzimych inwestorów ze względu na wielkość, jednak ma on pewne ograniczenia. Koszt wprowadzenia na rynek leku innowacyjnego szacuje się dziś na ponad 1 mld euro, a cały proces może trwać nawet 13 lat. Polskie firmy nie posiadają wystarczająco dużego kapitału, aby podjąć się takiego zadania. Z drugiej jednak strony, na rynku utrzymuje się duża konkurencja leków generycznych, która jest wynikiem wygasania ochrony patentowej popularnych leków, co skutkuje presją na obniżanie cen produktów oraz zmniejsza ich rentowność. Duża konkurencja panuje również na rynku suplementów diety. Liczbę producentów suplementów ocenia się na 314. W odpowiedzi na dużą konkurencję rozwiązaniem może być wprowadzanie leków oraz suplementów opartych na koncepcjach kierowanych nośników substancji czynnych. Wprowadzenie na rynek znanego leku, ale w innej postaci, np. zamkniętego w kierowanym nośniku, jest znacznie mniej kosztowne niż zarejestrowanie nowego specyfiku. Sprzyja temu także fakt, że w ustawie o Prawie farmaceutycznym przewidziano możliwość składania dokumentacji dla produktów hybrydowych, co pozwala na złożenie wniosku zawierającego zarówno wyniki badań, jak i dane literaturowe. Wprowadzenie na rynek suplementów diety zamkniętych w nośnikach jest również atrakcyjnym rozwiązaniem z racji tego, że zazwyczaj są one zbudowane ze związków, które naturalnie występują w pożywieniu, jak np. lipidy. Nie do pominięcia jest fakt, że rozwój branży kierowanych nośników wymaga wykwalifikowanych pracowników, posiadających odpowiednią wiedzę do rozwijania unikatowych technologii oraz zapewnienia wysokich standardów jakości. Wszystko to powoduje, że przemysł rozwijający kierowane nośniki zalicza się do bardzo innowacyjnych i technologicznie zaawansowanych. Opierając się na istniejących możliwościach produkcyjnych suplementów diety i leków generycznych, które spełniają wszystkie wymagania jakościowe, można prawdopodobnie uzyskać znaczącą pozycję na rynkach światowych. Nie bez znaczenia w tym przypadku jest także centralne położenie Polski w Europie, co sprzyja możliwości ekspansji na rynki krajów ościennych [*Wkład innowacyjnego...* 2011].

Rozwój nowej gałęzi branży farmaceutycznej na rodzimym rynku stworzyłby nowe atrakcyjne miejsca pracy oraz zwiększył wpływy do budżetu państwa, co z kolei poprawiłoby sytuację ekonomiczną kraju, a co za tym idzie – jakość życia społeczeństwa polskiego.

4. Podsumowanie

Kierowane nośniki substancji czynnych to dziś jedna z kluczowych strategii poprawy wydajności stosowanych terapii farmakologicznych, która zakłada wykorzystanie znanych substancji, ale zamkniętych w materiale matryco-

wym poprawiającym właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. To z kolei pozwala na uzyskanie lepszych rezultatów stosowanych terapii. Kierowane nośniki mogą zwiększyć wydajność terapii, zmniejszyć efekty uboczne, poprawić komfort życia chorych, a także zapobiegać chorobom, które są związane z niedoborem witamin i minerałów. Ponadto kierowane nośniki mogą być skutecznym bodźcem rozwoju rynku farmaceutycznego w Polsce, ponieważ nie wymagają kosztownego procesu badawczo-rozwojowego, jak to ma miejsce w przypadku nowych specyfików. Strategia ta mogłaby być skutecznym narzędziem w walce z konkurencją na rynku leków generycznych i suplementów diety. Uwzględniając aspekt ekonomiczny oraz możliwość poprawy i zapewnienia zdrowia społeczeństwu, kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych mogą się stać skutecznym narzędziem podniesienia jakości życia w Polsce.

Literatura

- Angst M., Drover D., 2006, *Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: A sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology*, *Clinical Pharmacokinetics*, 45(12), s. 1155-1176.
- Apartajita V., Ravikumar P., 2014, *Liposomes as carriers in skin ageing*, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 6(5), s. 1-7.
- Bien H., Mackenzie G., Choi M., 2016, *Liposomal irinotecan in the treatment of refractory pancreatic cancer*, *Recent Anticancer Drug Discover*, 11(4), s. 376-385.
- Bitounis D., Fanciullino R., Iliadis A., Ciccolini J., 2012, *Optimizing druggability through liposomal formulations: New approaches to an old concept*, *ISRN Pharmaceutics*.
- Blumberg J., Frei B., Fulgoni V., Weaver C., Zeisel S., 2016, *Vitamin and mineral intake is inadequate for most Americans: What should we advise patients about supplements?*, *Journal of Family Practice*, 65(9 Suppl), s. S1-S8.
- Blumberg J., Frei B., Fulgoni V., Weaver C., Zeisel S., 2017, *Impact of frequency of vitamin and mineral supplement consumption on micronutrient intakes and biomarkers of nutrient and health status in the United States*, *Nutrients*, 9(8), s. 849-864.
- Bovier P., 2008, *Epaxal®: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection*, *Journal Expert Review of Vaccines*, 7(8), s. 1141-1150.
- Cosmetics and personal care industry overview*, <https://www.cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/> (dostęp: 10.10.2018).
- Chang H.I., Yeh M.K., 2012, *Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy*, *International Journal Nanomedicine*, 7, s. 49-60.
- Davis J., Paris H., Beals J., Binns S., Giordano G., Scalzo R., Schweder M., Blair E., Bell C., 2016, *Liposomal-encapsulated ascorbic acid: Influence on vitamin C bioavailability and capacity to protect against ischemia-reperfusion Injury*, *Nutrition and Metabolic Insights*, 20(9), s. 25-30.
- Douglas R., Hemilä H., Chalker E., Treacy B., 2007, *Vitamin C for preventing and treating the common cold*, *Cochrane Database Systematic Reviews*, 18(5).
- Felce D., Perry J., 1995, *Quality of life: Its definition and measurement*, *Research in Developmental Disabilities*, 16(1), s. 51-74.
- Gershoff S., 1993, *Vitamin C (ascorbic acid): New roles, new requirements?*, *Nutrition Reviews*, 51, s. 313-326.
- Glutation – informacje o substancji aktywnej*, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00145> (dostęp: 23.05.2017).

- <http://drugdelivery.pharmaceuticalconferences.com> (dostęp: 23.03.2017).
- Jacob R., Sotoudeh G., 2002, *Vitamin C function and status in chronic disease*, Nutrition in Clinical Care, 5, s. 66-74.
- Julius M., Lang C., Gleiberman L., Harburg E., DiFrancesco W., Schork A., 1994, *Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly*, Journal of Clinical Epidemiology, 47(9), s. 1021-1026.
- Klein K., Kaspers G., 2015, *A review of liposomal daunorubicin in the treatment of acute leukemia*, Oncology & Hematology Review, 9(2), s. 142-148.
- Kotyńia Z., Szewczyk P., Tuzikiewicz-Gnitecka G., 2017, *Bezpieczeństwo stosowania suplementów diety – dopuszczanie do obrotu w Polsce*, Kontrola Państwowa, 62.4(575), s. 49-61.
- Kumari P., 2015, *Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery*, Journal of Drug Targeting, 24(5), s. 1-15.
- Lang C., Mills B., Mastropaolo W., 2000, *Blood glutathione decreases in chronic diseases*, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 135(5), s. 402-405.
- Lang C., Naryshkin S., Schneider D., Mills B., Lindeman R., 1992, *Low glutathione levels in healthy aging adult*, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 120(5), s. 720-725.
- Laouini A., Jaafar-Maalej C., Limayem-Blouza I., Sfar S., Charcosset C., Fessil H., 2012, *Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art*, Journal of Colloid Science and Biotechnology, 1, s. 147-168.
- Lasic D.D., 1996, *Doxorubicin in sterically stabilized liposomes*, Nature, 380(6674), s. 561-562.
- Leki refundowane*, Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 23 lutego 2017.
- Li Y., Schellhorn H., 2007, *New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C*, Nutrition, 137, s. 2171-2184.
- Machin D., Fayers P.M., 2007, *Quality of Life: The Assessment, Analysis and Interpretation of Patient*, John Wiley & Sons, s. 1-42.
- Messerer C., Ramsay E., Waterhouse D., Ng R., Simms E., Harasym N., Tardi P., Mayer L., Bally M., 2004, *Liposomal irinotecan: Formulation development and therapeutic assessment in murine xenograft models of colorectal cancer*, Clinical Cancer Research, 10(19), s. 6658-6649.
- Mura S., Pirot F., Manconi M., Falson F., Fadda A.M., 2007, *Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil*, Journal of Drug Targeting, 15(2), s. 101-108.
- Nayerossadat N., Maedeh T., Abas Ali P., 2012, *Viral and nonviral delivery systems for gene delivery*, Advanced Biomedical Research, 1, 27.
- Patravale V.B., Mandawgade S.D., 2008, *Novel cosmetic delivery systems: An application update*, International Journal of Cosmetic Science, 30(1), s. 19-33.
- Rejestr produktów objętych powiadomieniem o pierwszym wprowadzeniu do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej prowadzony przez Głównego Inspektora Sanitarnego (dane na 23.03.2017 r.).
- Reza Mozafari M., Johnson C., Hatziantoniou S., Demetzos C., 2008, *Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology*, Journal of Liposome Research, 18, s. 309-327.
- Silverman J., Deitcher S., 2015, *Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine*, Cancer Chemotherapy Pharmacol, 71(5), s. 555-564.
- Stathopoulos G., Antoniou D., Dimitroulis J., Stathopoulos J., Marosis K., Michalopoulou P., 2011, *Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer*, Cancer Chemotherapy Pharmacol, 8, s. 945-950.
- Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne, art. 2 (DzU 2001, nr 126, poz. 1381).
- Verhagen H., Buijsse B., Jansen E., Bueno-de-Mesquita B., 2006, *The state of antioxidant affairs*, Nutrition Today, 41, s. 244-250.
- Vyas A., Kumar Sonker A., Gidwani B., 2014, *Carrier-based drug delivery system for treatment of acne*, Scientific World Journal, s. 201-215.

Joanna Doscocz, Marek Langner

- Wallace T., McBurney M., Fulgoni V., 2014, *Multivitamin/mineral supplement contribution to micronutrient intakes in the United States, 2007-2010*, *Journal of the American College of Nutrition*, 33(2), s. 94-102.
- Wilson N., Shah N.P. 2007, *Microencapsulation of vitamin*, *ASEAN Food Journal*, 14(1), s. 1-14.
- Wkład innowacyjnego przemysłu farmaceutycznego w rozwój polskiej gospodarki, PWC 2011, https://www.pwc.pl/pl/publikacje/pwc_wklad_innowacyjnego_przemyslu_farmaceutycznego_w_rozwoj_polskiej_gospodarki.pdf (dostęp: 23.05.2017).
- Yang D., Pornpattananangkul D., Nakatsuji T., 2009, *The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against Propionibacterium acnes*, *Biomaterials*, 30(30), s. 6035-6040.
- Zion Market Research, <https://www.zionmarketresearch.com/market-analysis/dietary-supplements-market> (dostęp: 23.05.2017).
- Zylberberg C., Matosevic S., 2016, *Pharmaceutical liposomal drug delivery: A review of new delivery systems and a look at a regulatory lanscape*, *Drug Delivery*, 25(9), s. 3519-3529.

PRACA 2

*Statistical analysis of bending rigidity coefficient determined using
fluorescence-based flicker-noise spectroscopy*



Statistical Analysis of Bending Rigidity Coefficient Determined Using Fluorescence-Based Flicker-Noise Spectroscopy

Joanna Daskocz¹ · Dominik Drabik¹ · Grzegorz Chodaczek² · Magdalena Przybyło^{1,3} · Marek Langner^{1,3}

Received: 18 August 2017 / Accepted: 29 May 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Bending rigidity coefficient describes propensity of a lipid bilayer to deform. In order to measure the parameter experimentally using flickering noise spectroscopy, the microscopic imaging is required, which necessitates the application of giant unilamellar vesicles (GUV) lipid bilayer model. The major difficulty associated with the application of the model is the statistical character of GUV population with respect to their size and the homogeneity of lipid bilayer composition, if a mixture of lipids is used. In the paper, the bending rigidity coefficient was measured using the fluorescence-enhanced flicker-noise spectroscopy. In the paper, the bending rigidity coefficient was determined for large populations of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine vesicles. The quantity of obtained experimental data allows to perform statistical analysis aiming at the identification of the distribution, which is the most appropriate for the calculation of the value of the membrane bending rigidity coefficient. It has been demonstrated that the bending rigidity coefficient is characterized by an asymmetrical distribution, which is well approximated with the gamma distribution. Since there are no biophysical reasons for that we propose to use the difference between normal and gamma fits as a measure of the homogeneity of vesicle population. In addition, the effect of a fluorescent label and types of instrumental setups on determined values has been tested. Obtained results show that the value of the bending rigidity coefficient does not depend on the type of a fluorescent label nor on the type of microscope used.

Keywords Membrane mechanics · Vesicle fluctuation analysis · Lipid bilayer

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00232-018-0037-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Joanna Daskocz
Joanna.Daskocz@student.pwr.edu.pl
Dominik Drabik
Dominik.Drabik@pwr.edu.pl
Grzegorz Chodaczek
Grzegorz.Chodaczek@citplus.pl
Magdalena Przybyło
Magdalena.Przybylo@pwr.edu.pl
Marek Langner
Marek.Langner@pwr.edu.pl

¹ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Science and Technology, Pl. Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław, Poland

² Wrocław Research Centre EIT+, ul. Stabłowicka 147, 54-066 Wrocław, Poland

³ Lipid Systems sp. z o.o., ul. Krzemieniecka 48C, 54-613 Wrocław, Poland

Introduction

In order to describe cellular processes mechanically, it is necessary to account for mechanical properties of cellular components including biological membranes. Biological membrane performs multitude of functions, which require transformation of its topology partly regulated by its mechanical state (Bustamante et al. 2004). Mechanical properties of biological membranes depend on the extrinsic (i.e. protein scaffolds) and intrinsic (i.e. protein/lipid ratio or lipid composition) factors (Drabik et al. 2016). The lipid bilayer is a necessary element of a biological membrane, which provides the hydrophobic barrier separating various cellular compartments and serves as a spatial scaffold for proteins. For that reasons lipid bilayer frequently serves as an experimental model in membrane studies (Wang et al. 2014). One of the methods used for experimental determination of the lipid bilayer mechanical properties is the flicker-noise spectroscopy, where thermal fluctuations of a membrane are modeled and bending rigidity coefficient (further

referred to as κ) is determined (Kozlov et al. 2014). The method requires an appropriate experimental model usually in the form of giant unilamellar vesicles (GUVs). The GUV preparation procedure produces population of vesicles with diameter ranging from 5 to 50 μm . In the model, the membrane can be treated as an infinitely thin surface, for which κ can be measured directly from thermal fluctuations. Thermal fluctuation analysis, also known as the flicker-noise spectroscopy, became one of the primary techniques to determine κ of lipid membranes (Bouvrais 2012, Brochard and Lennon 1975). This technique is based on the vesicle contour image analysis of the lipid bilayer in time followed by the Helfrich model analysis. This in turn gives information on the bilayer spontaneous fluctuations, described by κ , which is calculated with advanced image analysis. Most frequently, phase contrast microscopy has been used to visualize vesicles, thanks to the phase shift of light caused by the 5-nm lipid bilayer. When vesicles are made of a single lipid type, this method works quite well; however, optical properties of the system do not allow for studies of mixed lipid membrane due to insufficient contrast for the determination of composition inhomogeneity. Later, this approach was improved by imaging of fluorescently labeled vesicles (Drabik et al. 2016, Loftus et al. 2013). This modification enhanced the quality of images with better contrast for contour analysis, allowing more accurate determination of the membrane κ . It also helps to determine the homogeneity of the membrane when mixtures of lipids are used. Regardless of the vesicle visualization technique used, there is always a risk that a vesicle population is heterogeneous. The uniformity of the GUVs in suspension varies depending on the preparation protocol and the lipid composition. For that reason, there are differences in values of κ find the literature, even when determined for the same lipid system. For instance, values of κ determined for DOPC membrane range from 9.47×10^{-20} to 17.5×10^{-20} J (Dimova 2014). These differences may result from various vesicle size distributions due to details of preparation protocols and/or different conditions of image acquisition conditions. There have been several approaches to determine the population characteristic of vesicle suspension but results were inconclusive (Duwe and Sackmann 1990, Faucon et al. 1989). Typically, when the thermal fluctuation technique is used for the determination of κ , typically between 10 and 15 lipid vesicles are analyzed preventing reliable statistical analysis. Determined values of κ are presented assuming their normal distribution (Bouvrais et al. 2013, Meleard et al. 2011). In the paper, we present values of κ determined for the statistically relevant number of vesicles. Next, the character of the statistical distribution was determined. Since the value of κ depends on the type of distribution used, various scenarios were tested and evaluated. Based on these analyses, the methodology for calculation of κ , along with the estimation of the uncertainty of the

derived quantitative value, when the sample size is small, is proposed. In the course of this study, the effect of the type of fluorescent probe used for membrane labeling and experimental setup was also evaluated.

Materials and Methods

Materials

Lipids: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), as well as fluorescent probes: NBD-PC (1-acyl-2-(6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine), Fluorescein-PE (*N*-(5-fluoresceinethiobarbamoyl)dipalmitoyl-L- α -phosphatidylethanolamine), and Rhodamine PE (18:1 Liss Rhod PE 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl)) were purchased from Avanti Polar Lipids (USA), β -Bodipy FL (4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid), and Laurdan (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene) from Molecular Probes (USA) and Atto 488 DHPE from Atto-Tech (Germany). Concentrations of fluorophores were determined with UV-Vis spectroscopy using the excitation wavelengths and the extinction coefficients indicated in probe's specification sheets. Glass cover slips were purchased from VWR (Poland). The 18 M Ω deionized water was used in all experiments (ELGA system, Poland).

Preparation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs)

A modified electroformation method, originally developed by Angelova and Dimitrov (1988), was used for the formation of model lipid membranes. Specifically, 10 μl of POPC or DOPC in chloroform (1 mM) was deposited in small quantities onto parallel platinum electrodes. The electrodes were kept for 1 h under reduced pressure to remove traces of organic solvents. This was followed by hydration of the electrodes in water when applying the AC electric field, with the frequency equal to 1 Hz, in a polytetrafluoroethylene (PTFE) electroformation chambers for 24 h while increasing voltage from 1 to 4 V. After electroformation, the chambers were left for 1 h before vesicle removal, with the electrical field turned off, ensuring the formation of uniform vesicle suspension.

Acquisition and Assessment of Microscopic Images

Images were collected using Leica TCS SPE microscope in fluorescence mode equipped with 63 \times /1.30 ACS APO oil-immersion objective (Leica, Germany). 1392 \times 1040 pixel images were recorded with Leica DFC310 FX camera using 0.102 μm pixel size. Samples were illuminated with

EL6000 illuminator and fluorescence emission was detected using appropriate cut-off filters: N2.1 (Rhodamine) and I3 (Atto 488, β -BODIPY FL, Fluorescein-PE, NBD-PC and Laurdan). All GUVs vesicles were labelled with a fluorescent probe at 1 mol% concentration. Series of images were collected for 5 min with the acquisition speed equals 11.2 frames per second (fps) at a fixed location producing in total 3360 frames, which were then subjected to image analysis procedure. Measurements were performed at 24 °C.

Images of DOPC vesicles were collected using both Leica TCS SPE microscope and Zeiss Cell Observer SD spinning-disk confocal microscope equipped with α Plan-Apochromat 100 \times /1.46 oil immersion objective (Zeiss, Germany). 512 \times 512 pixel images were recorded with an EMCCD camera (QImaging Rolera EM-C2, Canada) using 2 \times 2 binning with 0.133 μ m pixel size at a rate of 33 fps with a video integration time of 30 ms. Samples were illuminated with 488 nm laser and emitted light was passed through 527/54 filter.

Flicker-Noise Spectroscopy

The flicker noise spectroscopy technique is based on the analysis of a vesicle shape fluctuations in time. Extraction of the membrane fluctuation spectrum requires determination of the membrane contour location. First, images were converted to grayscale and had their intensity normalized. This was followed by smoothing with a mean filter matrix of size 5 and binarizing using the Otsu algorithm (Drabik et al. 2016). The approximate position of the vesicle contour was determined with the procedure based on the algorithm described previously. Threshold and contour determinations were performed using a software written in C++ with OpenCV (Bradski 2000). A circle was fitted to predetermined initial vesicle contour using an algebraic procedure based on the Taubin method for determination of the vesicle centre location (Taubin 1991). Next, using the initial, radial intensity profiles of non-smoothed image (typically 300) were collected and distances between the contour and the vesicle centre were calculated using the Bresenham algorithm. Specifically, the intensity maximum along the radius of the circle was identified and the Lorentzian function was fitted to the pixel intensity values around the intensity maximum. The fit was performed using the Levenberg–Marquardt algorithm. In order to remove occasional local deviation in contour detection polynomial approximation was used (to eliminate observation points significantly distant from adjacent localizations) (Drabik et al. 2016). To calculate κ from a set of time-lapsed images a correlation between the two-dimensional images and three-dimensional membrane elasticity model had to be established. This was achieved by calculating angular

autocorrelation function $\xi(\gamma, t)$ defined by Eq. (1). Cross-sectional radius $\rho(\Phi, t)$ is the position of vesicle bilayer at a given angle Φ and time t ; $\rho(t)$ is an averaged vesicle radius of a given image recorded at time t using Eq. (2). $R = \langle \rho(t) \rangle$ is the vesicle radius.

$$\xi(\gamma, t) = \frac{1}{2\pi^2 R^2} \int_0^{2\pi} [\rho(\phi + \gamma, t) - \rho(t)] \times [\rho(\phi, t) - \rho(t)] d\phi \quad (1)$$

$$\rho(t) = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=1}^N (\rho_i + \rho_{i+1}) \times (\phi_{i+1} - \phi_i). \quad (2)$$

κ was determined using the statistical approach (Mélédard et al. 2011). In this approach, autocorrelation curves are decomposed into Fourier series, in which sine components were omitted (curves are even functions). Amplitudes of cosine functions for each frame of a given mode m , $\chi^m(t)$ were histogrammed and fitted by mono-exponential distributions $\Gamma^m(\chi^m)$ according to Eq. (3).

$$\Gamma^m = a \times \exp\left(-R^m \left(\frac{\kappa}{kT}, \bar{\sigma}\right) \times \frac{\chi^m}{2}\right) \quad (3)$$

The mono-exponential character of the distribution indicates that model adequately describes the thermal fluctuations of the membrane. To determine κ value from distributions, decays were fitted using mono-exponential function for Γ^m ranging from 0.6 to 0.08. Higher values are omitted due to the low probability of the occurrence while lower values were omitted due to being too close to the resolution limit. The uncertainty of Γ^m value was calculated according to Eq. (4).

$$\Delta\Gamma^m = \frac{R^m}{\sqrt{N}} \times \sqrt{\sum_i \left(\ln \left[\Gamma^m \left(\frac{\chi_i^m}{2} \right) \right] - \ln(a) + R^m \times \frac{\chi_i^m}{2} \right)^2} \quad (4)$$

The value of κ can be determined by fitting the Eq. (5) to experimentally determined R^m values, where σ_{wh} relates to a white noise generated by the limited optical resolution of the microscope and the electronic noise of the video camera. P_n^m is normalized Legendre polynomial and $\lambda_n(\bar{\sigma})$ is the function related to reduced membrane tension defined by Eq. (6).

$$R^m \left(\frac{\kappa}{kT}, \bar{\sigma}, \sigma_{wh} \right) = \frac{1}{\frac{\kappa}{kT} \left(\sum_{n \geq m}^{n_{max}} \frac{[P_n^m(0)]^2}{\lambda_n(\bar{\sigma})} \right) + \sigma_{wh}^2} \quad (5)$$

$$\lambda_n(\bar{\sigma}) = (n+1)(n+2)[\bar{\sigma} + n(n+1)]. \quad (6)$$

The data extraction from a microscope image is presented on a selected example in the Supplementary Information.

Statistical Analysis

Histograms of κ , as determined with the flicker-noise technique, were fitted with normal, exponential, gamma or log-normal distribution. Each distribution was quantitated using its characteristic parameters. Normal and lognormal distributions were evaluated using the mean (μ) and the standard deviation (σ) values, the exponential distribution using the parameter λ_c and gamma distribution using the shape value α and the scale parameter β . Each fitted distribution was scaled by a δ value, which is related to the number of empirical observations. The concurrence of theoretical and experimental distributions was tested using the Kolmogorov–Smirnov test (Massey 1951). Numerical values of κ , determined for over three hundred vesicles, were used for an analysis. In the first step, outliers were identified and rejected using interquartile range method. The Kolmogorov–Smirnov test was calculated at the confidence level equals to $\alpha=0.05$. A histogram was created from measured values of the κ for each population of vesicles. The number of categories k was calculated based on the number of samples n using Eq. (7). Compliance of the distribution of empirical data was checked for the normal, exponential, gamma or lognormal distributions. Calculated value of λ_{KS} , defined by Eq. (8), was compared with λ_α values from the Kolmogorov table using the null hypothesis. The λ_{KS} parameter is proportional to the difference between distributions. Furthermore, its inverse value is a quantitative compliance measure of the distributions. In Eq. (9), parameter d defines the greatest modulus of a difference between cumulative distributions of theoretical distribution $F(\alpha'_i)$ and normalized empirical distribution $K(\alpha'_i)$.

$$k = \sqrt{n} \quad (7)$$

$$\lambda_{KS} = \sqrt{n} \times d \quad (8)$$

$$d = \sup\left(\left|F(\alpha'_i) - K(\alpha'_i)\right|\right) \quad (9)$$

To evaluate the asymmetry of distributions of κ the asymmetry coefficient A_s of distribution was calculated according to Eq. (10), where Q_1 , Q_2 and Q_3 were the first, second (median) and third quartile, respectively.

$$A_s = \frac{Q_3 + Q_1 - 2Q_2}{2(Q_3 - Q_1)}, \quad (10)$$

The calculations were performed using StatSoft STATISTICA 13.

Results and Discussion

The Effect of Fluorescent Probe on Bending Rigidity Coefficient

The flicker-noise spectroscopy performed using the phase contrast microscopy demonstrated that a fluorescent probe present in the membrane at concentrations up to 2 mol% does not affect measured values of κ (Méléard et al. 2011). The prolonged exposure of a sample to an intense illumination in a confocal microscope may lead to progressive loss of the fluorescence signal. This effect can be reduced by the selection of the appropriate fluorescence probe (Drabik et al. 2016). The fluorescence emission is sensitive to a variety of factors such as photobleaching, polarity of the immediate vicinity of the fluorescent moiety or properties and composition of the adjacent aqueous phase. All these factors may affect the probe brightness and/or location interfering with the accurate detection of the membrane location during the extended image acquisition time (Behera et al. 1999). To this end, several fluorescent probes, namely Atto 488 DOPE, Rhodamine-PE, β -Bodipy FL DHPE, NBD-PC and Laurdan, were evaluated. Two criteria were used to evaluate a fluorescent probe: calculated value of κ and its standard deviation. It has been assumed that the higher the value of the standard deviation, the less reliable the fluorescent probe is. All tested fluorophores were covalently attached to the lipid molecules albeit at different locations with respect to the membrane surface. Specifically, β -BODIPY and NBD moieties are located within the interface of the lipid bilayer (Šachl et al. 2010; Huster et al. 2001). Hydrophobic Atto moiety is located in the membrane hydrophobic core (Tabarin et al. 2012), whereas hydrophilic rhodamine and Laurdan are located within the hydrated region of the membrane (Kyrychenko 2010, De Vequi-Suplicy et al. 2006). Determined values of κ as presented in Fig. 1 show that the values of κ do not depend on the fluorescent probe used. However, there are large differences in the standard deviations between different probes. The largest standard deviation was measured using vesicles labelled with NBD-PC. The smallest standard deviation was obtained for vesicles labelled with Rhodamine-PE. For that reason, Rhodamine-PE labeled vesicles were selected for subsequent statistical analysis.

Statistical Analysis of Experimentally Determined Bending Rigidity Coefficient for a Population of POPC Vesicles

The histogram of determined values of κ for a population of POPC vesicles, along with theoretical distributions, is presented in Fig. 2. The concurrence of the empirical

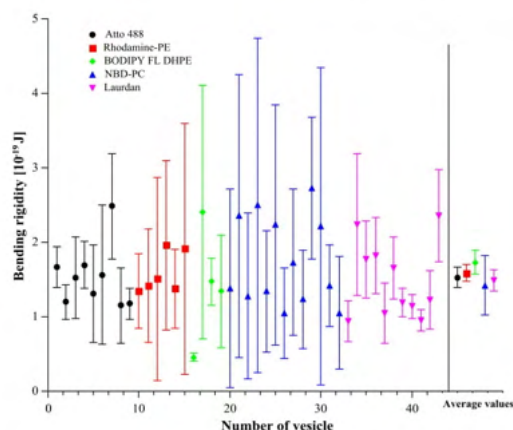


Fig. 1 Values of κ measured for POPC vesicles labelled with Atto (filled circles), Rhodamine (filled squares), β -BODIPY (filled diamonds), NBD-PC (filled triangles) and Laurdan (filled inverted triangles) fluorescent probes. The left part of plot shows examples of results obtained for single vesicles, whereas right part shows the average values determined for indicated number of vesicles. Error bars represent standard error of fitting in the case of individual vesicles and standard deviation of mean values

and theoretical distributions was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. Results of the test are presented in Table 1. The comparison of calculated value λ_{KS} with Kolmogorov table of λ_{α} values shows that distribution of κ is not well represented by normal distribution. The null hypothesis was rejected for exponential, gamma and lognormal distributions, suggesting that they are compatible with experimentally obtained values. Based on values of λ_{KS} , it has been concluded that best compatibility is obtained for the gamma distribution (the smallest difference between experimental and theoretical distributions).

Because each of the consistent theoretical distributions is not symmetrical, the distribution of experimental values was tested for its asymmetry (Table 2). Distribution asymmetry coefficient A_s is equal to 0.11 for population of POPC vesicles.

Presented results show that the median value of κ for POPC vesicles equals to $(12.1 \pm 8.4) \times 10^{-20}$ J; the mean value of the κ equals to $(15.1 \pm 11.9) \times 10^{-20}$ J and the maximal value of κ (for gamma distribution) equals to $(4.7 \pm 3.3) \times 10^{-20}$ J. Presented values were calculated without outliers. The value of κ , calculated as the weighted mean value, with a relative weight as an inverse of the uncertainty for each method, equals to $(8.2 \pm 5.9) \times 10^{-20}$ J.

Presented data show that the experimental values of biophysical parameter of vesicle population in aqueous phase are better described by asymmetric than normal distribution. This may result from sample handling or image acquisition

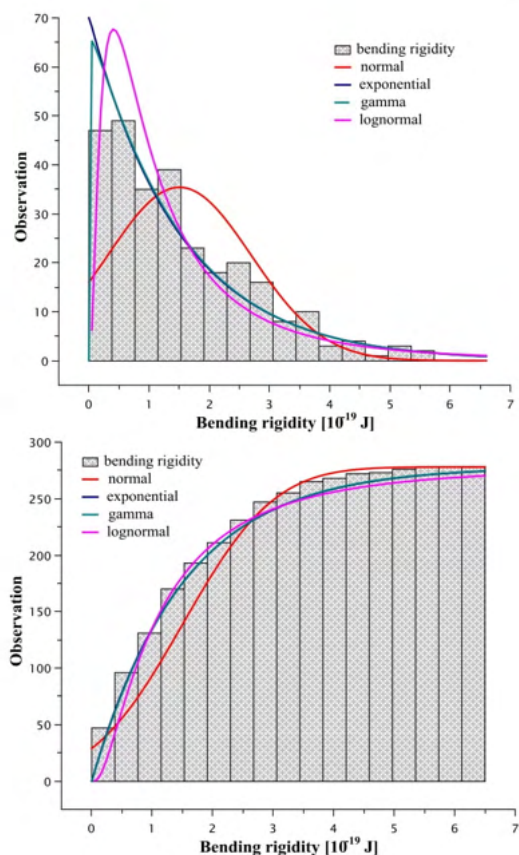


Fig. 2 Density probability (top panel) and cumulative distributions (bottom panel) of κ values determined for POPC vesicles. The experimental data were fitted with normal, exponential, gamma and lognormal distributions

Table 1 Parameters of the Kolmogorov–Smirnov test for distribution compatibility between theoretical and experimentally determined values of κ for population of POPC vesicles

Distribution	n	d	λ_{KS}	λd	Hypothesis
Normal	279	0.12	2.01	1.36	H1
Exponential		0.07	1.17		H0
Gamma		0.04	0.67		H0
Lognormal		0.08	1.33		H0

artefacts. This may include impurities (residual quantity of organic solvents or oxidized lipids) or different geometries of vesicle formation chambers (three different chambers have been used). The other interference may occur during the transfer of a vesicle suspension to the observation chamber

Table 2 Averaged values of distribution coefficients fitted to the experimental data obtained for POPC vesicles

Experimental		Standardize	Normal		Exponential	Gamma		Lognormal	
Mean (10^{-19} J)	Median (10^{-19} J)	δ (-)	μ (10^{-19} J)	σ (10^{-19} J)	λ_c (10^{-19} J) $^{-1}$	α (-)	β (10^{-19} J) $^{-1}$	μ (10^{-19} J)	σ (10^{-19} J)
1.51 ± 1.19	1.21 ± 0.84	106	1.51	1.19	0.67	1.47	1.02	0.96	0.03

or variation in vesicle adhesion to observations chamber surfaces. Therefore, the greater the interferences, the larger the difference between normal and gamma distributions. Since there are no fundamental reasons for deviation from the normal distribution, therefore the deviation between normal and gamma distributions may serve as an indication of the vesicle population quality. The measure might be very useful for the evaluation of a vesicle population uniformity when mixtures of lipids are used and vesicle heterogeneity, with respect to lipid composition, is likely.

In order to estimate the number of measurements, required to measure values of κ for lipid vesicles with reasonable accuracy, the following test has been performed. The randomly selected data sets consisting of four measurements ($n=5, 10$ and 15) have been constructed followed by the calculation of the average and median values of κ . Then differences between mean and dominant values were calculated. The procedure has been repeated 500 times to ensure relevant statistics. Based on the test, it has been concluded that when $n=5$ the errors of mean and median were equal to $(244 \pm 27)\%$ and $(199 \pm 32)\%$, respectively. When n was increased to 10 or 15 the errors of mean and median values did not change significantly. The result shows that increased number of measurements does not improve the accuracy of κ determination; therefore, the dominant values determined from gamma distribution should be used. This conclusion is supported by higher closeness of dominant values over median or mean values to the following data from the literature. The κ for POPC equals to $(13.2 \pm 0.4) \times 10^{-20}$ J, when measured using molecular dynamics simulations (Venable et al. 2015), $(15.8 \pm 0.3) \times 10^{-20}$ J when measured using micropipette aspirations (Henriksen et al. 2006), $(6.7 \pm 1.9) \times 10^{-20}$ J when measured using atomic force microscopy (Kocun and Janshoff 2012), $(10.1 \pm 1.1) \times 10^{-20}$ J when measured using X-Ray scattering technique (Nagle 2017), $(5.9 \pm 1.2) \times 10^{-20}$ J when measured using electrodeformation (Niggemann et al. 1995), $(3.3 \pm 0.2) \times 10^{-20}$ J when using dual-beam optical trap (Solmaz et al. 2012) and $(22.3 \pm 4.2) \times 10^{-20}$ J when measured using thermal fluctuation analysis (Drabik et al. 2016). The value of κ has the highest value when thermal fluctuation analysis is used. Based on our calculations using the thermal fluctuation analysis, the value of κ is also consistently higher than values obtained with other techniques (except molecular dynamic simulations and other thermal analysis studies) and equals to $(15.1 \pm 11.9) \times 10^{-20}$ J.

Determination of the Bending Rigidity Coefficient Using Spinning-Disk Microscope

In order to establish the effect of image acquisition method on the measured κ two imaging set-ups were used: wide-field fluorescence and spinning-disk confocal microscopes. The two microscopes have different parameters of the excitation beam, frequency of image acquisition as well as optical pathways. The comparison has been performed on the suspension of vesicles formed from DOPC. When wide-field microscope was used, the obtained median and dominant values of the κ were equal to $(14.8 \pm 2.5) \times 10^{-20}$ J and $(11.1 \pm 0.8) \times 10^{-20}$ J, respectively (28 vesicles). When spinning-disk microscopy was used the determined median and dominant values of the κ were equal to $(11.1 \pm 1.6) \times 10^{-20}$ J and $(10.7 \pm 1.2) \times 10^{-20}$ J (31 vesicles), respectively. The obtained distributions of κ are shown in Fig. 3 along with the theoretical distribution. In both cases, gamma distribution provided the best fit. The calculated value of λ_{KS} for gamma distribution was equal to 0.46 and 0.58 for the wide-field fluorescence and spinning-disk microscopes, respectively. The presented data show that the determined value of the κ of DOPC bilayer is independent on the microscope setup and is similar to values presented in literature (Levine et al. 2014, Shitamichi et al. 2009). Given the fact that discrepancies were much higher for POPC, it seems that type of lipid influences the errors.

Conclusions

In this paper, three issues have been addressed: the effect of the type of fluorescent probe used for membrane labeling, the dependence of the calculated values of the κ on the image acquisition method and the effect of the statistical analysis used to quantitate the population of vesicles. It has been demonstrated that there are no dependences of the determined κ values on the type of fluorescent probe used for membrane labeling. However, when rhodamine-PE was used for membrane labeling it gave results with the smallest deviation of determined values; therefore, the probe is recommended when limited number of vesicle (membranes) is available. There is no difference between character of distributions of measured values of the κ determined with the two different microscope setups (wide-field fluorescence and spinning-disk microscopes).

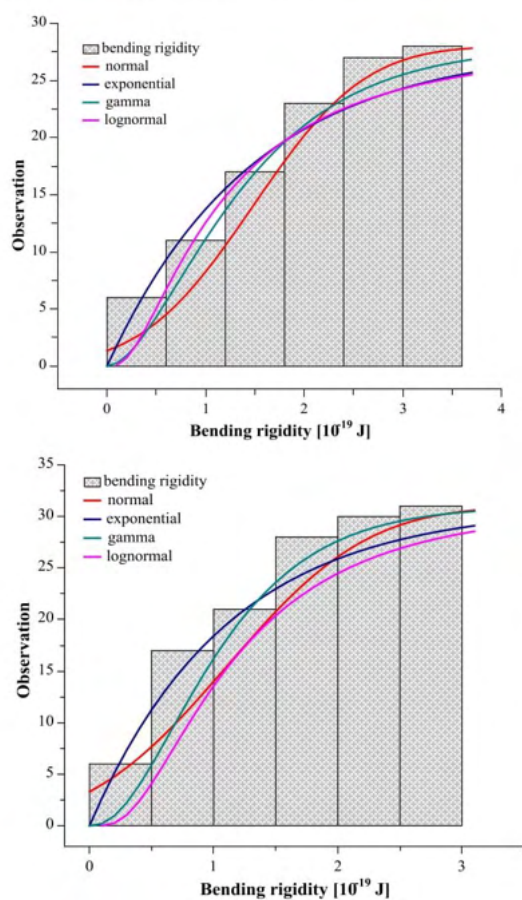


Fig. 3 Cumulative distributions of experimental values of the κ determined for DOPC vesicles using the wide-field fluorescence (top panel) and the spinning-disk (bottom panel) microscopes. The experimental data were fitted with normal, exponential, gamma and lognormal distributions

Finally, it has been demonstrated that the gamma distribution of measured values of κ fits the vesicle population best. Since there are no fundamental reasons for that we propose to use the difference between the normal and gamma fits as a measure of heterogeneity of vesicle population. The smaller the difference, the more homogeneous is the vesicle suspension.

Acknowledgements This work was supported by the statutory fund of Department of Biomedical Engineering, Wrocław University of Science and Technology, a Grant POIR.04.01.04-00-0050/15 to MP and ML by the National Centre for Research and Development (NCBiR) and Grant 2016/21/N/NZ1/02767 to DD by the National Science Centre. We would like to acknowledge the great contribution of reviewers to the final version of the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Angelova M, Dimitrov DS (1988) A mechanism of liposome electroformation. *Trends in colloid and interface science II*. Steinkopff, Darmstadt, pp 59–67
- Behera GB, Mishra BK, Behera PK, Panda M (1999) Fluorescent probes for structural and distance effect studies in micelles, reversed micelles and microemulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 82(1):1–42
- Bouvrais H (2012) Bending rigidities of lipid bilayers: their determination and main inputs in biophysical studies. In: Igljic A (ed) *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, 15th edn. Elsevier Inc, Oxford, UK, pp 2–7
- Bouvrais H, Holmstrup M, Westh P, Ipsen JH (2013) Analysis of the shape fluctuations of reconstituted membranes using GUVs made from lipid extracts of invertebrates. *Biol Open* 2(4):373–378
- Bradski G (2000) The OpenCV library. *Dr Dobb's J: Softw Tools Prof Program* 25(11):120–123
- Brochard F, Lennon JF (1975) Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J Phys* 36(11):1035–1047
- Bustamante C, Chemla YR, Forde NR, Izhaky D (2004) Mechanical processes in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 73(1):705–748
- De Veuille-Suplicy CC, Benatti CR, Lamy MT (2006) Laurdan in fluid bilayers: position and structural sensitivity. *J Fluoresc* 16(3):431–439
- Dimova R (2014) Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv Colloid Interface Sci* 208:225–234
- Drabik D, Przybylo M, Chodaczek G, Igljic A, Langner M (2016) The modified fluorescence based vesicle fluctuation spectroscopy technique for determination of lipid bilayer bending properties. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr* 1858(2):244–252
- Duwe HD, Sackmann E (1990) Bending elasticity and thermal excitations of lipid bilayer vesicles: modulation by solutes. *Phys A* 163(1):410–428
- Faucon JF, Mitov MD, Méléard P, Bivas I, Bothorel P (1989) Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements. *J Phys* 50(17):2389–2414
- Henriksen J, Rowat AC, Brief E, Hsueh YW, Thewalt JL, Zuckermann MJ, Ipsen JH (2006) Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys J* 90(5):1639–1649
- Huster D, Müller P, Arnold K, Herrmann A (2001) Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine. *Biophys J* 80(2):822–831
- Kocun M, Janshoff A (2012) Pulling tethers from pore-spanning bilayers: towards simultaneous determination of local bending modulus and lateral tension of membranes. *Small* 8(6):847–851
- Kozlov MM, Campelo F, Liska N, Chernomordik LV, Marrink SJ, McMahon HT (2014) Mechanisms shaping cell membranes. *Curr Opin Cell Biol* 29:53–60
- Kyrychenko A (2010) A molecular dynamics model of rhodamine-labeled phospholipid incorporated into a lipid bilayer. *Chem Phys Lett* 485(1):95–99

- Levine ZA, Venable RM, Watson MC, Lerner MG, Shea JE, Pastor RW, Brown FL (2014) Determination of biomembrane bending moduli in fully atomistic simulations. *J Am Chem Soc* 136(39):13582–13585
- Loftus AF, Noreng S, Hsieh VL, Parthasarathy R (2013) Robust measurement of membrane bending moduli using light sheet fluorescence imaging of vesicle fluctuations. *Langmuir* 29(47):14588–14594
- Massey FJ Jr (1951) The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *J Am Stat Assoc* 46(253):68–78
- Méléard P, Pott T, Bouvrais H, Ipsen JH (2011) Advantages of statistical analysis of giant vesicle flickering for bending elasticity measurements. *Eur Phys J E: Soft Matter Biol Phys* 34(10):1–14
- Nagle JF (2017) Experimentally determined tilt and bending moduli of single-component lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 205: 18–24
- Niggemann G, Kummrow M, Helfrich W (1995) The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers: dependences on experimental method, sample cell sealing and temperature. *J Phys II* 5(3):413–425
- Šachl R, Boldyrev I, Johansson LB (2010) Localisation of BODIPY-labelled phosphatidylcholines in lipid bilayers. *Phys Chem Chem Phys* 12(23):6027–6034
- Shitamichi Y, Ichikawa M, Kimura Y (2009) Mechanical properties of a giant liposome studied using optical tweezers. *Chem Phys Lett* 479(4):274–278
- Solmaz ME, Biswas R, Sankhagowit S, Thompson JR, Mejia CA, Malmstadt N, Povinelli ML (2012) Optical stretching of giant unilamellar vesicles with an integrated dual-beam optical trap. *Biomed Opt Express* 3(10):2419–2427
- Tabarin T, Martin A, Forster RJ, Keyes TE (2012) Poly-ethylene glycol induced super-diffusivity in lipid bilayer membranes. *Soft Matter* 8(33):8743–8751
- Taubin G (1991) Estimation of planar curves, surfaces, and nonplanar space curves defined by implicit equations with applications to edge and range image segmentation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 11:1115–1138
- Wang J, Lü D, Mao D, Long M (2014) Mechanomics: an emerging field between biology and biomechanics. *Protein Cell* 5(7):518–531
- Venable RM, Brown FLH, Pastor RW (2015) Mechanical properties of lipid bilayers from molecular dynamics simulation. *Chem Phys Lipids* 192:60–74

Supplementary information

Statistical analysis of bending rigidity coefficient determined using fluorescence-based flicker-noise spectroscopy.

Joanna Doscocz^{1*} · Dominik Drabik¹ · Grzegorz Chodaczek² · Magdalena Przybyło^{1,3} · Marek Langner^{1,3}

The sequence of the data processing steps used for the bending rigidity determination as described in Materials and Methods.

Series of images of vesicle (Figure 1) were acquired in a time sequence (5000 images). The set of images was numerically processed and used for the membrane bending rigidity coefficient determination.

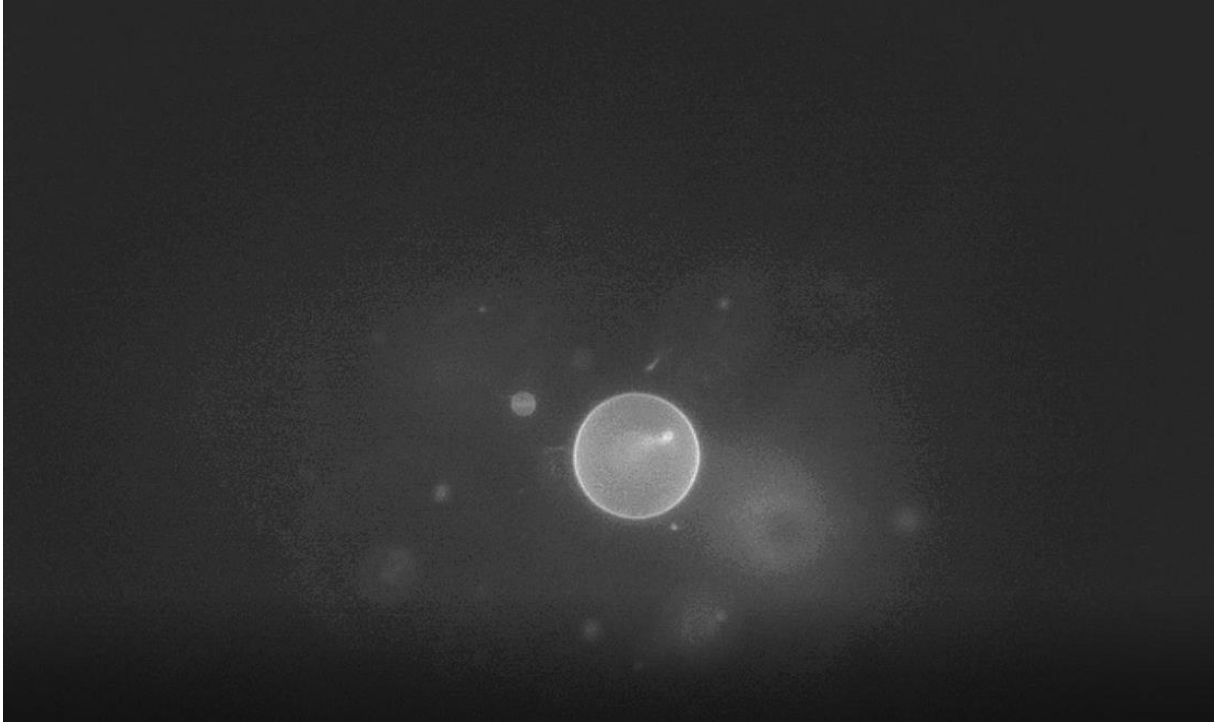


Figure S1 Example of an image of a lipid vesicle labeled with a fluorescence dye.

Image processing: The vesicle contour is located using the image thresholding. Next, the center of vesicle is calculated by geometrically (using Taubin method) fitting circle to the contour (Figure S2). This is followed by leading straight lines from circle center at given angle to obtain radial intensity spectra. Such spectra are then fitted with Gaussian function in order to determine the location of the membrane at a given angle. Below are presented polar plots of vesicle with and without axis adjustments.

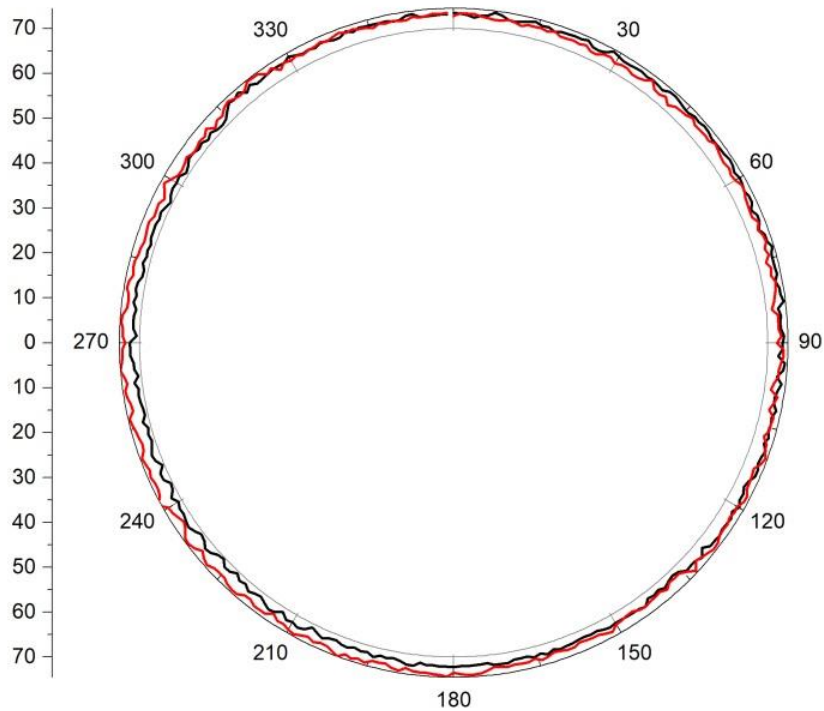


Figure S2 Examples of the membrane positioning used for the localization of the circle center for two selected images. The circle center location was identified based on the fitting of a circle to the vesicle contour.

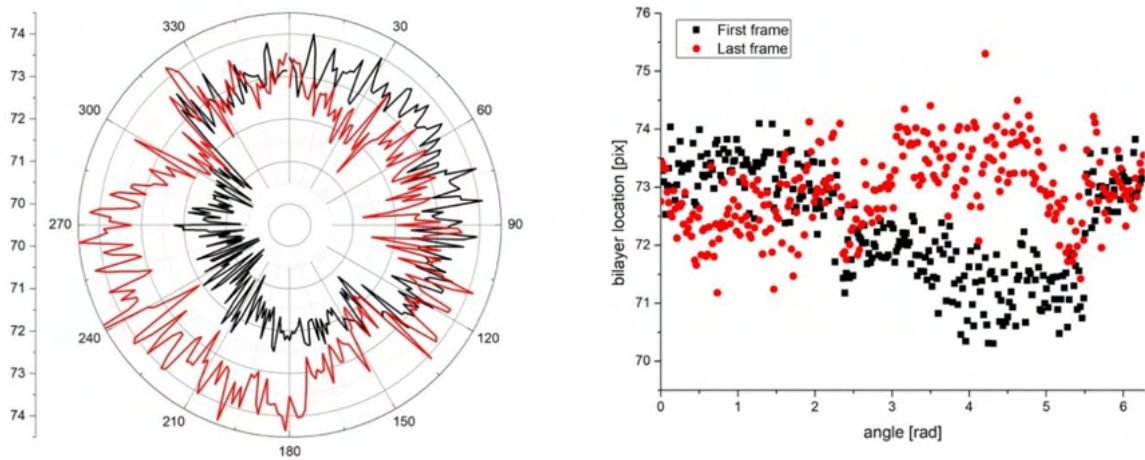


Figure S3. The presentation of membrane displacement from the fitted circle as a function of an angle in two different representations.

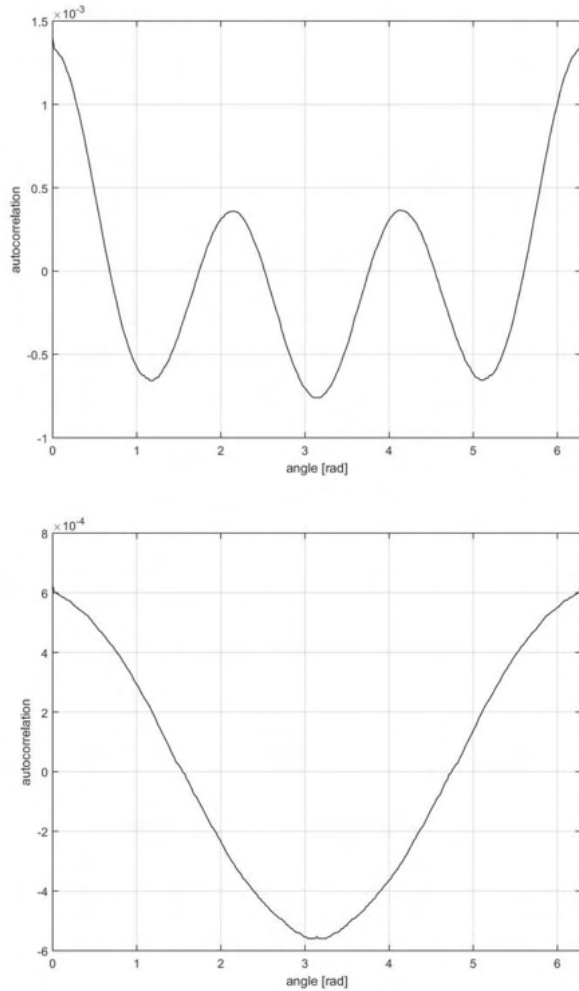


Figure S4 examples of autocorrelation curves for two different images of a vesicle. Each contour is used to calculate autocorrelation curve Figure S4, which is decomposed either to Legendre functions or Fourier series, depending on an approach used. Based on the decomposed autocorrelation function a plot (Figure S5 and Figure S6) is constructed, which is used for the model fitting. Figure S5 shows the fitting using the average-based approach, whereas Figure S6 shows the fitting using the Statistical approach.

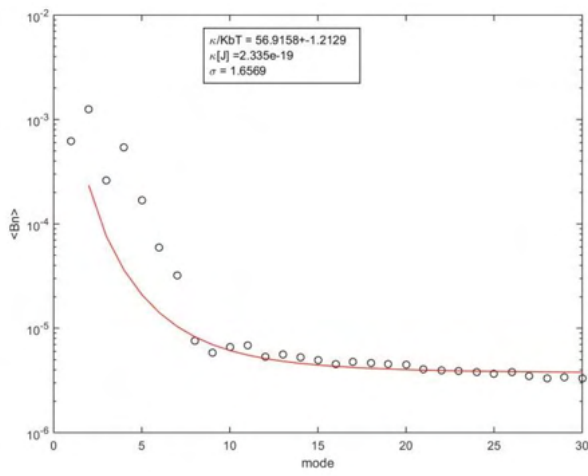
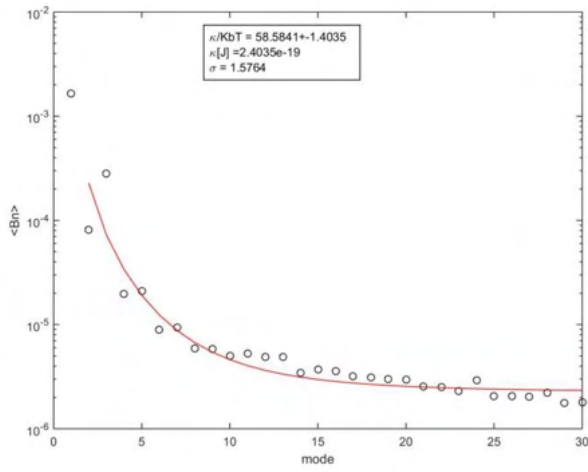


Figure S5 Examples of the model fitting for two vesicle images using the average-based approach.

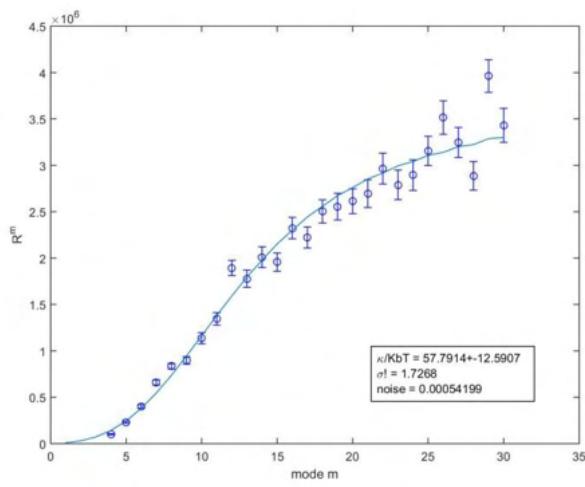
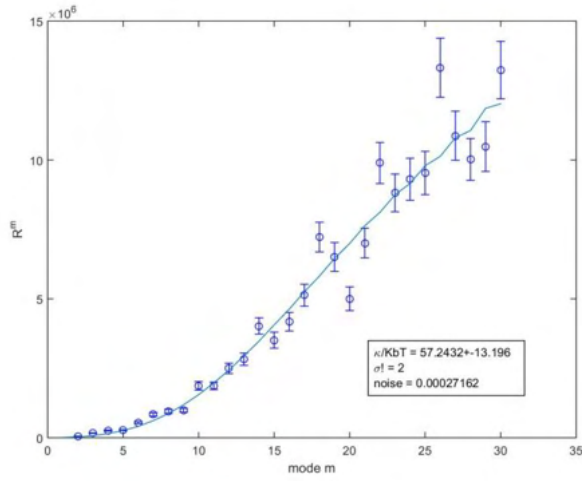


Figure S6 Examples of the model fitting for two vesicle images using the statistical approach.

PRACA 3

The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress



The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress



Joanna Dosek^{a,*,1}, Paulina Dałek^{a,b,1}, Aleksander Foryś^c, Barbara Trzebicka^c,
Magdalena Przybyło^b, Luka Mesarec^d, Aleš Iglič^{d,e}, Marek Langner^b

^a Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Science and Technology, 50-377, Wrocław, pl. Grunwaldzki, 13, Poland

^b Lipid Systems sp. z o.o., 54-613 Wrocław, ul. Krzemieniecka 48C, Poland.

^c Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, 41-819 Zabrze, ul. M. Curie-Skłodowskiej 34, Poland.

^d Laboratory of Physics, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Tržaška 25, Slovenia.

^e Laboratory of Mass Spectrometry and Proteomics, Institute of Biosciences and BioResources, National Research Council, 80131 Napoli, Pietro Castellino 111, Italy.

ARTICLE INFO

Keywords:
Liposomes
Membrane mechanics
Lipid phase transition
Extrusion

ABSTRACT

Mechanical properties of a lipid bilayer are parameters determined mainly for giant unilamellar vesicles (GUVs). It is not clear if values obtained on the GUV model can be directly translated to submicron large unilamellar vesicles (LUVs). This ambiguity is a major obstacle in exploring the effect of lipid bilayer mechanics on membrane associated processes and effectiveness of liposome-based targeted drug delivery systems. In presented work extrusion, which is a common method to prepare LUVs, was used to study liposomes preparation and stability upon exposure to mechanical stress. The effect of parameters of the extrusion process (temperature, membrane pore size, extrusion force and volumetric flux) on the properties of liposome suspension (average liposome size, polydispersity index and lipid recovery ratio) was determined for model liposomes composed of DPPC lipid. The state of the DPPC lipid bilayer depends on temperature, therefore, the effect of lipid bilayer mechanics on the extrusion process can be quantitated without altering membrane composition. The extrusion process was carried out with the automated extruder delivering quantitative data on the extrusion force and volumetric flux. Obtained results have been interpreted in terms of mechanical properties of the lipid bilayer. Determined mechanical properties of the lipid bilayer and its dependence on temperature are in good agreement with the literature results determined for GUVs. This shows that mechanical properties of the lipid bilayer does not depend on the liposome size in the range from 100 nm to hundreds of microns.

1. Introduction

Liposomes are self-assembled lipid vesicles with diameters ranging from 50 nm to 250 µm [1] and can be formed from a large variety of amphiphilic compounds, among which phospholipids have a special place due to their biocompatibility [2]. Size, properties of aqueous phase and molecular composition of liposomes are major factors affecting their attributes including: lateral and transmembrane molecular organization, permeability, mechanical resilience and surface properties, such as propensity for hydrogen bond formation, electrostatics or steric barrier formed by surface decorations [3–6]. Consequently, a variety of liposomes can be constructed for basic research and a variety of applications [7]. Vesicles with a diameter > 1 µm are used as a convenient model of biological membrane for the determination of

mechanical or topological properties [8]. Smaller liposomes with a diameter between 100 and 1000 nm have much broader applications. They are used as experimental model systems, biosensors or as a scaffold for nano-pharmaceuticals [7]. The design of a successful experimental model or effective drug delivery system requires that the selected properties of a lipid bilayer can be tuned to the required physiological values. It has been demonstrated that liposome stability, organization of lipids in the bilayer, permeability and mechanical properties depend on their molecular composition and physical state [9–12]. Whereas lipid organization and surface electrostatics are frequently studied [13,14], the effect of lipid bilayer mechanics is rarely considered, despite experimental evidences demonstrating that shape and stiffness of particulates affect their performance on both cellular and physiological levels [15,16]. This is because a limited number of

* Corresponding author.

E-mail address: Joanna.Dosek@pwr.edu.pl (J. Dosek).

¹ Authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183361>

Received 6 September 2019; Received in revised form 25 March 2020; Accepted 11 May 2020

Available online 15 May 2020

0005-2736/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

technically demanding experimental methodologies, capable to quantify membrane mechanical properties, are available [17,18]. Mechanics of biological membranes and microscale artificial bilayers are studied using image analysis of strained or freely-fluctuating membrane [8,19,20]. Whereas studies using macrovesicles and biological membranes as experimental models provide data useful for understanding biological systems, there are limited number of values for evaluation of liposomes in submicron scale. Mechanical properties of such objects can be evaluated using methods relying on the measurement of a mechanical wave propagation through aqueous vesicle suspension. However, these method provides quantitative values, which are heavily dependent on theoretical model used [21]. The other approach relies on the atomic force microscopy technique, where the local, atomic level, deformations of membrane are measured [18,22,23]. In this case, the vesicle immobilisation method and the interaction of liposome with the measuring tip are sources of serious uncertainties. In the paper, we present the new experimental technique, which can deliver data on mechanical properties of liposomes in suspension with sizes below the resolution limit of optical microscopy. To demonstrate the method viability a well-characterized experimental system, whose mechanical properties change with temperature, has been used. Liposomes formed from 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) have the main phase transition at about 41 °C [24]. Above the main phase transition temperature, the lipid bilayer is in the fluid phase where alkyl chains are disordered. The bending rigidity of the lipid bilayer is low and has been determined to be equal to about 10^{-19} J [25]. When the temperature is below the main phase transition, the alkyl chains are stabilized by van der Waals interactions making lipid bilayer mechanically resilient [24,26]. At temperatures between 33.5 °C and 41 °C lipid bilayer is at the ripple phase characterized by corrugations of the membrane surface with well-defined periodicity with an axis parallel to the mean bilayer plane [27]. Below 33.5 °C the lipid bilayer enters the gel state [24,28]. It has been shown previously that properties of the DPPC lipid bilayer such as area per lipid molecule, bilayer thickness or bending rigidity are temperature dependent [25,29]. In the presented research, the liposome propensity for deformation has been qualitatively and quantitatively evaluated by measuring the force needed to push preformed uniform liposomes through well-defined pores, which sizes are smaller than vesicles diameter. For that purpose, the dedicated automatic mechanical extruder, equipped with strain gauges and temperature control, was used. The liposome size and topology were monitored using the Dynamic Light Scattering technique and Cryogenic Transmission Electron Microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Materials

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Chloroform was obtained from VWR (USA). Ferric chloride hexahydrate and ammonium thiocyanate was purchased from Chempur (Poland). In all experiments 18 mΩ deionized water was used (PolWater, Poland).

2.2. Preparation and characterization of liposomes

The sample preparation procedure was divided into steps to clarify the design of the experiment. A schematic presentation of experimental design is visualised in Fig. 1.

2.2.1. MLVs preparation

Multilamellar DPPC vesicles (MLVs) were prepared by the dry film method [30]. First, lipid was dissolved in chloroform. The organic solvent was removed by the stream of argon and the residues of chloroform were eliminated under low-pressure storage. The resulting dry lipid film was hydrated overnight in deionized water at 60 °C [31]

followed by vortexing. The final concentration of lipid in the sample equalled to 10 mg/mL.

2.2.2. LUVs preparation

MLVs suspension with lipid concentration equals to 1 mg/mL was extruded through polycarbonate membrane with 50 nm pores (NucleporeCorp., USA). The sample was passed through the filter once, at temperature in the range from 20 °C to 50 °C, for the characterization of the extrusion process.

2.2.3. LUVs recalibration

In the first step, the suspension of MLVs was extruded through a 100 nm polycarbonate membrane (NucleporeCorp., USA) at 50 °C. 7 cycles of extrusion (passages through the filter) were used to obtain uniform population of LUVs on the trans-side of the extrusion membrane. The measuring device contains two syringes (Fig. 2), the syringe where the MLV vesicles are loaded is called the cis-side, whereas the other syringe is called the trans-side. The diluted (1 mg/mL of lipid) LUVs suspension was extruded seven times through a 50 nm polycarbonate filter. The number of extrusion cycles was experimentally determined. Three extrusion cycles are sufficient to produce vesicles suspension characterized by the size distribution and polydispersity index, which are little altered by subsequent extrusion cycles. Similar conclusions were presented elsewhere [32]. The recalibration procedures were performed at temperatures ranging from 20 °C to 50 °C.

The extrusion and recalibration were carried out using home-made automated mechanical extruder (Lipid Systems Ltd., Wrocław, Poland). Sizes and polydispersity indexes of extruded LUV vesicles were determined using the Dynamic Light Scattering method (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). For that purpose, samples were diluted 50 times with deionized water. The deionized water was filtered through the cellulose membrane with 0.2 μm pores (VWR, USA).

2.3. The determination of lipid concentration

The concentration of DPPC was determined with the Stewart method [33]. The method is based on the formation of a colour complex between phospholipids and ammonium ferrothiocyanate. The lipid quantity is then determined by measuring the absorbance at 470 nm. Specifically, 40 μL solution containing lipids was mixed with 2 mL of chloroform and the 2 mL of aqueous solution containing 0.4 M ammonium ferrothiocyanate and 0.1 M ferric chloride hexahydrate. Mixtures were vortexed for 1 min followed by incubation for 15 min. The lower chloroform phase was transferred to quartz cuvettes (Hellma, Germany) and its absorbance was measured using spectrophotometer (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Germany). The concentration of DPPC was determined based on the calibration curve.

2.4. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging

Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM) images were obtained using a Tecnai F20 X TWIN microscope (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) equipped with field emission gun, operating at an acceleration voltage of 200 kV. Images were recorded on the Eagle 4 k HS camera (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) and processed with TIA software (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA). Specimen preparation was done by vitrification of the aqueous solutions on grids with holey carbon film (Quantifoil R 2/2; Quantifoil Micro Tools GmbH, Großlobbichau, Germany). Prior to use, the grids were activated for 15 s in oxygen plasma using a Femto plasma cleaner (Diener Electronic, Ebhausen, Germany). Cryo-samples were prepared by applying a droplet (3 μL) of the suspension to the grid, blotting with filter paper and immediate freezing in liquid ethane using a fully automated blotting device Vitrobot Mark IV (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA). After preparation, the vitrified specimens were kept under liquid nitrogen until they were inserted into a cryo-TEM-holder Gatan 626

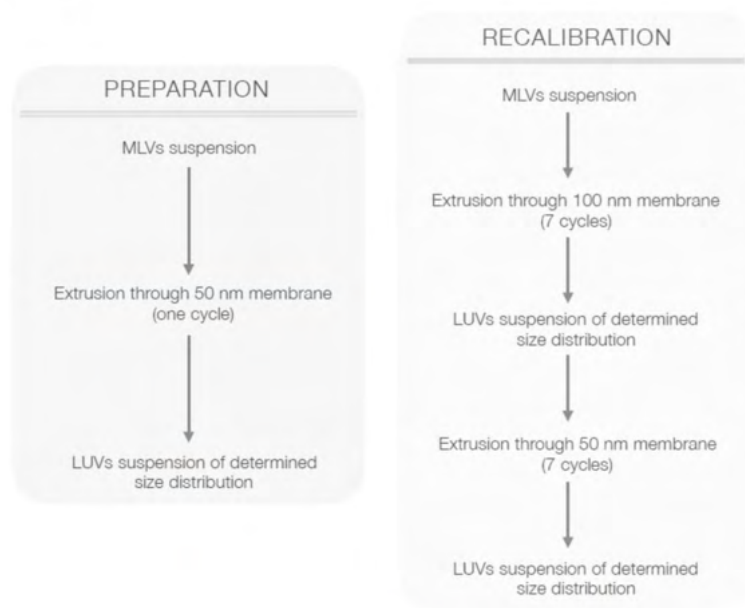


Fig. 1. The overview of two experimental protocols used in the paper. The left panel presents procedure used for the characterization of the extrusion process, where the suspension of multilamellar vesicles is transformed to the suspension of unilamellar liposomes on the trans side of the filter. Right panel shows procedure employed for the characterization of membrane stability and mechanical resilience. The uniform suspension of unilamellar vesicles is produced on the trans side of the filter, following repetitive extrusion at the temperature above the lipid main phase transition. The uniform liposome suspension is then recalibrated through the filter with pores (50 nm) smaller than the dimension of liposomes (140 nm).

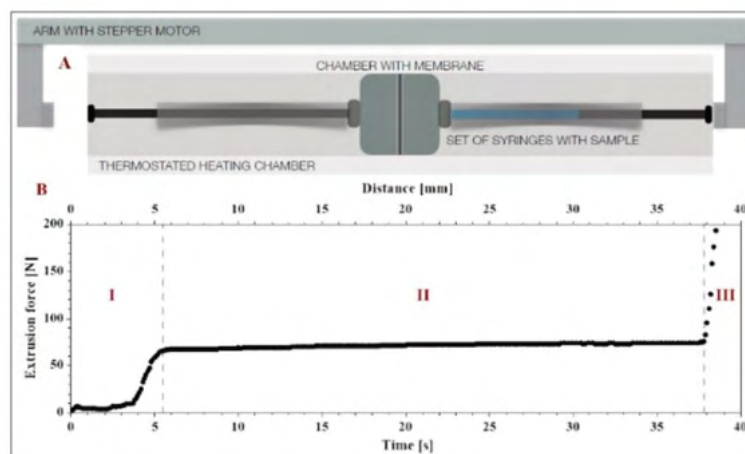


Fig. 2. The schematic diagram showing the automated extrusion device (A) and an example of the dependence of the extrusion force on time (B). The extrusion process is arbitrarily divided into three stages. The “extrusion force” is defined as the average value of forces in the second stage of the process. The extrusion process was carried out in isothermal conditions and at a constant volumetric flux.

(Gatan Inc., Pleasanton, USA) and analyzed in the TEM at $-178\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5. Experimental design

The force required to push liposome suspension through the polycarbonate filter was measured using dedicated home-made automated extruder (Lipid Systems Ltd., Wrocław, Poland). The design of the device is schematically illustrated in Fig. 2A. During extrusion, the temperature of the sample was tightly controlled ($\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) and the volumetric flow rate (dV/dt) through the extrusion membrane was set in advance and maintained during the experiment with the precision motor. During the extrusion process, the force applied to a syringe was continuously measured, allowing for the construction of curves demonstrating the dependence of the force on time/distance/volumetric flux. To prevent the destruction of glass syringes an upper limit was imposed on the applied force (190 N). An example of the raw

experimental data is presented in Fig. 2B. The dependence of the force on time/distance/volumetric flux can be arbitrarily divided into three stages; the rapid force increase, the steady-state stage and final force rise due to the completion of the sample transfer. The term “extrusion force”, used throughout the paper, equals to the average force value of the second stage of the experimental curve. The volumetric flux (J_V) across the polycarbonate filter, the instrumental parameter, was determined from the following dependence:

$$J_V = \frac{D_s^2 \cdot v_p}{D_f^2} \left[\frac{\text{mL}}{\text{min} \cdot \text{cm}^2} \right] \quad (1)$$

where D_F and D_S indicate the filter and syringe diameters, respectively. The velocity of the piston in the syringe is labeled as v_p and is set in advance before each experiment.

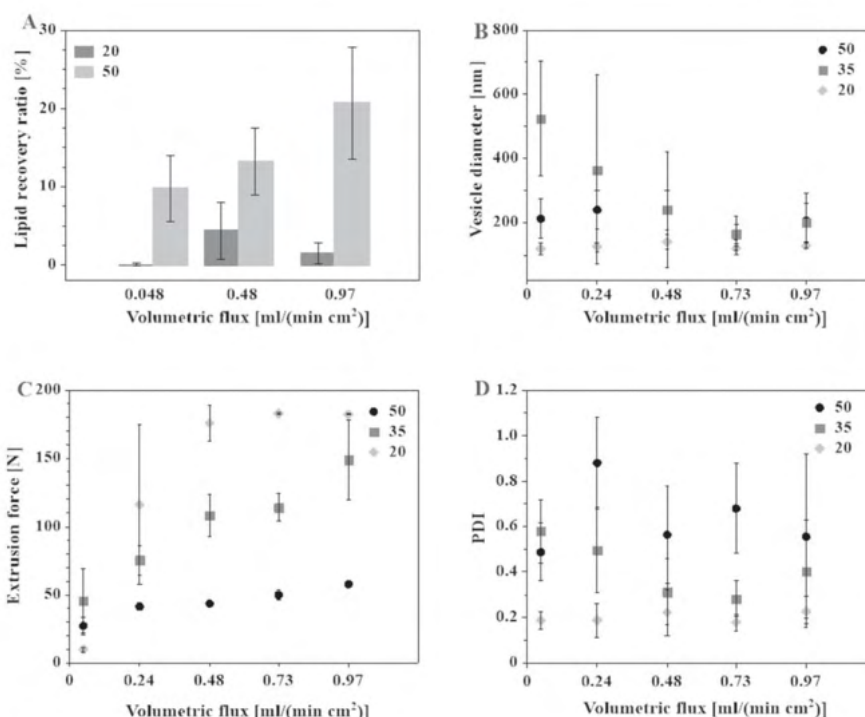


Fig. 3. The effect of temperature and volumetric flux on properties determined for a suspension of DPPC vesicles after a single extrusion cycle. MLVs were extruded once through 50 nm membrane at temperatures indicated. Panel A shows the dependence of the quantity of lipid transferred across the polycarbonate filter after a single passage as a function of volumetric flux for two temperatures (20 °C and 50 °C, labelled as dark and light gray, respectively). Panel B shows the average size of lipid vesicle as a function of volumetric flux and temperature. Panel C presents the “extrusion force” as a function of volumetric flux, and panel D the dependence of the polydispersity index of liposome suspension on the volumetric flux for three temperatures (20 °C, 35 °C and 50 °C, labelled as rhombuses, squares and circles, respectively).

3. Results and discussion

3.1. The effect of extrusion parameters on the liposome formation process

The formation of unilamellar liposomes from multilamellar structures using extrusion method is still not well understood. The process likely depends on lipid membrane elasticity, cohesion and ability to accommodate the water flow. The efficient extrusion of liposomes requires lipids to be in the fluid phase. In addition, in order to form a uniform liposome suspension, the process needs to be repeated several times [34]. Using the quantitative extrusion device, the effect of temperature and volumetric flux on the single extrusion process was investigated (Fig. 1A). Temperatures were selected so DPPC vesicles were in liquid, ripple or gel phases (50 °C, 35 °C and 20 °C). The liposome formation process was quantitated with the extrusion force, lipid recovery ratio, the average liposome size and the homogeneity of liposome population (the polydispersity index). Fig. 3A shows that following the first passage the quantity of lipids in the trans syringe does not exceed 20% of the initial lipid quantity. As expected, the lipid recovery ratio (the ratio of lipid quantity on the trans side of the filter to the total lipid quantity in the sample), when liposomes are in the fluid state, is an order of magnitude higher than that in the gel phase. There is no significant difference in the average size of liposomes as a function of a volumetric flux when lipid is in the gel or fluid phase (Fig. 3B).

Only when lipid is in the ripple phase (35 °C), the size of vesicles increases from 200 nm up to about 500 nm for small volumetric fluxes. The force required to maintain the constant volumetric flux depends

both on the extrusion temperature and the preset value of the volumetric flux. As shown in Fig. 3C, when lipid is in the fluid phase, the extrusion force is the smallest and change little with the volumetric flux. When lipid is in the gel phase, the force reaches the limiting value when the volumetric flux equals 0.48 [mL·min⁻¹·cm⁻²]. When the extrusion process is carried out at temperature where the lipid bilayer is in the ripple phase (35 °C) the extrusion force increases monotonically with rising volumetric flux. Presented data show, in agreement with previous observations [35], that to ensure the efficient liposome formation the suspension of MLVs should be at temperature, where lipid is in the fluid phase (41 °C or above for DPPC). Below the temperature of the main phase transition the lipid recovery ratio decreases dramatically and the extrusion force increases above the preset limiting value (Fig. 3A). In addition, the extrusion process of lipid in the gel or the ripple phases depends on the volumetric flux, whereas when lipid is in the fluid phase the extrusion parameters (except the lipid recovery ratio) do not depend on the volumetric flux much. In summary, the evaluation of the liposome formation process using extruder capable to provide quantitative parameters of the process agrees with previous observations that the liposome formation, when lipid is in the gel phase, is very inefficient. Less than few percent of lipid are found in the trans side of the membrane, when lipid is in the gel phase. The unexpected outcome of these experiments is that, when lipid is in the fluid phase, the lipid quantity in the trans side of the membrane, after a single pass, increases with rising volumetric flux without sacrificing the quality of liposome suspension, as evaluated with the average vesicle size and the polydispersity index.

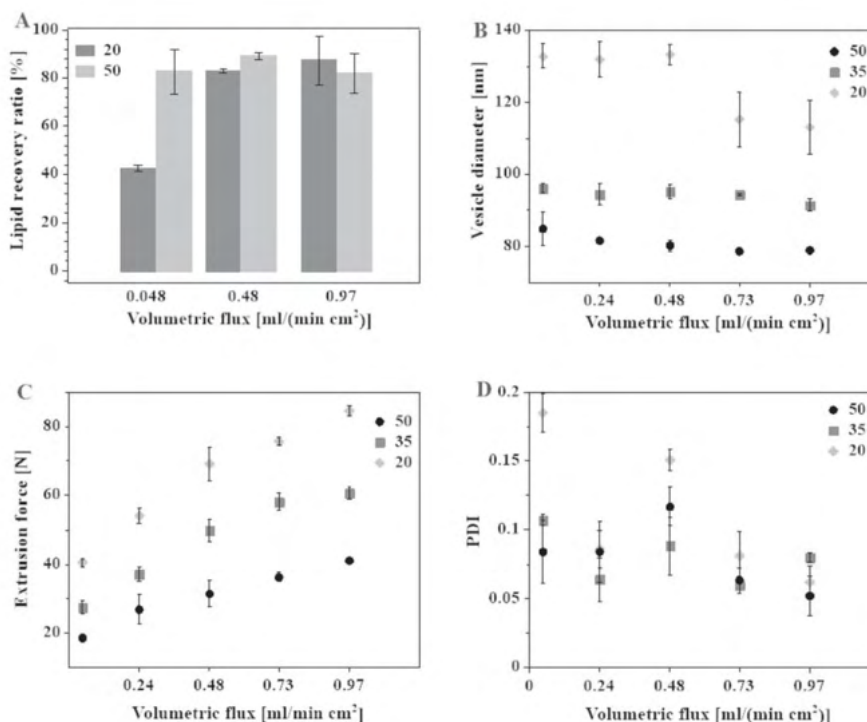


Fig. 4. Recalibration of DPPC vesicles. Preformed LUVs with average diameter equal to 138 nm were pushed 7 times through the filter with 50 nm pore size. Panel A shows the dependence of the quantity of lipid transferred across the polycarbonate filter in a single passage as a function of volumetric flux for two temperatures (20 °C and 50 °C), labelled as dark and light gray, respectively. Panel B shows the dependence of the average size of vesicles on the volumetric flux at three temperatures and panel D the polydispersity index of liposomes in suspension extruded at different volumetric fluxes and temperatures (20 °C, 35 °C and 50 °C, labelled as rhombuses, squares and circles, respectively).

3.2. The deformability and stability of DPPC liposomes

When a homogenous population of liposomes is exposed to mechanical stress during the recalibration process (LUVs are forced through pores of significantly smaller sizes [36]) their stability and deformability can be evaluated. First, the effect of recalibration conditions (temperature and volumetric flux) on parameters of liposome suspension, such as extrusion force, lipid recovery ratio, liposome average size and polydispersity index, was measured.

Fig. 4A shows that the lipid recovery ratio during recalibration is little affected by temperature. Only when liposomes are in the gel phase and the volumetric flux is lowest (0.048 mL/min·cm²) the lipid recovery decreases. Interestingly, the average size of liposomes after recalibration (Fig. 4B) depends on temperature. When lipid is in the fluid (50 °C) or ripple (35 °C) phases the size of liposomes is reduced from about 140 nm down to about 80 nm and 95 nm, respectively. At the two temperatures, there is a little effect of the volumetric flux on the liposomes size. When lipid is in the gel phase the outcome is different. After recalibration, the average size of liposomes decreases slightly from 140 nm down to about 110 nm, but only for high volumetric fluxes. When volumetric flux is smaller than 0.48 [mL·min⁻¹·cm⁻²] the recalibration of liposomes in the gel phase does not change their sizes at all.

The slight decrease of vesicle diameters with increasing volumetric flux at temperatures 35 °C and 50 °C (Fig. 4B) might be affected by so-called lift force which pushes the vesicles away from the inner wall of the pore [37] and induces the formation of lubrication layer between the inner wall of the pore and the vesicle. The thickness of lubrication

layer increases with increasing velocity of the vesicles [38], therefore it is expected that the diameter of the moving vesicles in the extrusion pore decreases with increasing velocity of the vesicles [39], i.e. with increasing volumetric flux. When the extrusion force is measured (Fig. 4C) its value decreases with decreasing volumetric flux at all three temperatures. At the same value of the extrusion force, the volumetric flux is larger at higher temperatures (Fig. 4C).

Experimental results presented in Fig. 4C can be qualitatively well-understood in terms of the Poiseuille-Hagen law. Since the diameter of the syringe (D_s) is much larger than the diameter of the pore (D_p), the fluidic resistance of the pore is much larger than the fluidic resistance of the syringe. Therefore, the fluidic resistance of the syringe can be neglected. When the flow of vesicle suspension through the extrusion pore/filter of the length L and constant radius $R_p = D_p/2$ is laminar the volumetric flux ($\phi_V = dV/dt$) through the extrusion pore can be described with Poiseuille-Hagen law

$$J_V = \frac{\phi_V}{\pi R_p^2} = \langle v \rangle = \frac{\Delta p R_p^2}{8\eta L} \quad (2)$$

where $\phi_V = dV/dt$ is the rate of the volumetric flux, η is the effective viscosity, $\langle v \rangle$ is the average velocity of the suspension of vesicles which equals to the half of the maximal velocity at the middle of the cylindrical pore (v_0), i.e. $\langle v \rangle = v_0/2$. Assuming that extrusion force equals $F_{ext} = \Delta p \pi R_p^2$, it follows from Eq. (2) that

$$F_{ext} = [8\pi\eta L] J_V \quad (3)$$

The linear relation between extrusion force F_{ext} and the volumetric flux J_V , as given by Eq. (3) can be observed in the Fig. 4C.

Table 1
Calculated value of the effective viscosity ($L = 15 \mu\text{m}$).

	Temperature [°C]	Effective viscosity $\eta \cdot 10^8 \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}\cdot\text{s}} \right]$
Preparation	20	27.6
	35	16.7
	50	4.78
Recalibration	20	7.51
	35	6.00
	50	3.72

Slopes of experimental dependencies of F_{ext} on J_V in Fig. 4C are proportional to the effective viscosity of the vesicle suspension. Assuming the validity of the Eq. (3) we can therefore conclude from Fig. 4C that the effective viscosity of the vesicle suspension decreases with rising temperature (Table 1), which is an expected result. The slight deviations from linearity in experimental dependencies of F_{ext} on flux J_V (Fig. 4C) appear only at lower temperatures (20 °C and 35 °C) and higher values of the volumetric flux J_V , where the influence of vesicle on the effective viscosity of vesicle suspension is expected to become more important. Presented experimental results indicate that the mechanical stress imposed on vesicles during recalibration affects considerably the average liposome size.

To explore the dependence of the LUVs preparation and recalibration processes on temperature in greater details the volumetric flux was fixed at $0.48 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ and the vesicles average sizes and extrusion force were measured as a function of temperature. Fig. 5A shows that the average diameter of extruded vesicles changes with temperature. When lipid is in the gel phase (below 34 °C) liposome sizes match the size of pores in the membrane. The liposome population is very uniform and variations between different preparations are also

small. It has to be remembered, however, that the lipid recovery ratio in this case is very low, as shown in Fig. 3A. When the temperature of the extrusion process increases above the pretransition temperature the sizes of extruded vesicles increase by a factor of two together with rise in variations between samples. The PDI of vesicle population extruded at gel phase is smaller than 0.25, whereas when liposomes are extruded at the ripple phase their PDI increases dramatically (> 0.5). When the extrusion force is measured (Fig. 5C) its dependence on temperature follows the general intuition. The lower the temperature the larger the extrusion force is required. When the liposome formation process was carried out at temperatures above the main phase transition the lipid recovery rate is much higher but the quality of the liposome population is very poor. In order to obtain uniform liposome population (average size and PDI equal 138 nm and 0.18, respectively) the extrusion process needs to be repeated several times. At the same time, the recovery ratio increases above 90%. These results are in good agreement with observations presented by others, showing for example that mechanically resilient liposomes (such as these containing cholesterol) are not able to pass the filter unaltered (with the anticipated level of cholesterol) [32,40]. The dependence of liposome properties (lipid recovery ratio, liposome size and PDI) on extrusion conditions (the volumetric flux, extrusion force and temperature), when determined for lipid, which properties strongly depend on temperature (DPPC), shows that the state of the lipid has a significant effect on the extrusion process indicating that it depends on the balance of two mechanical properties of the lipid bilayer: a propensity for deformation and cohesiveness. When lipid is in the fluid phase the bilayer can be deformed easily but its cohesiveness, which depends mainly on short-range van der Waals forces between hydrocarbon chains, is very weak allowing liposome recalibration. When lipid is in the gel phase the situation is different, the lipid bilayer mechanical resilience for deformation increases sharply at the main

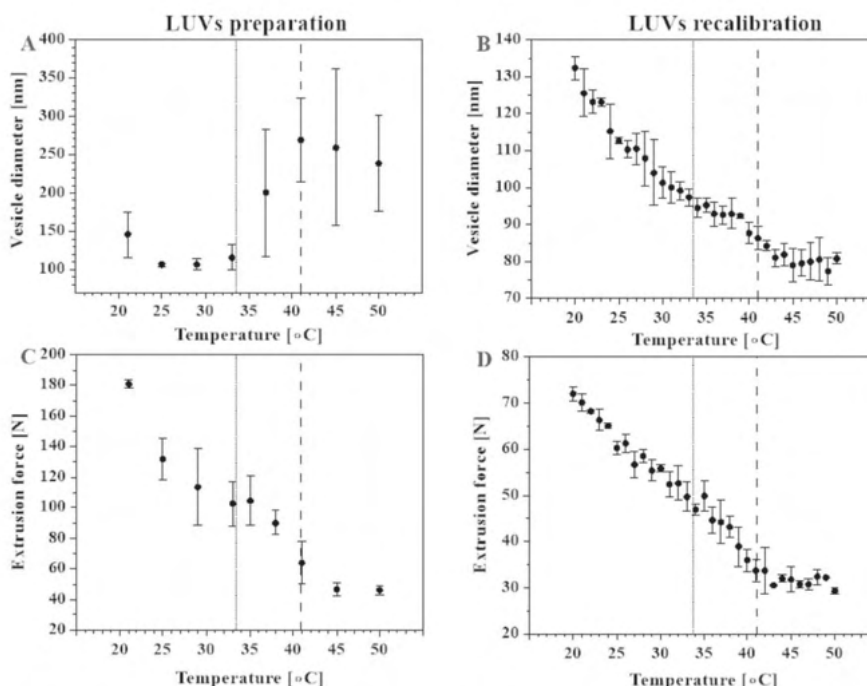


Fig. 5. The effect of the extrusion temperature on the DPPC liposome average size and the extrusion force after LUVs preparation (A, C) and LUVs recalibration (B, D) processes. The extrusion was carried out once at the volumetric flux equals to $0.48 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Solid and dotted lines indicate the pretransition and the main phase transition temperatures, respectively. Error bars were calculated as a standard deviation from the average of the three samples.

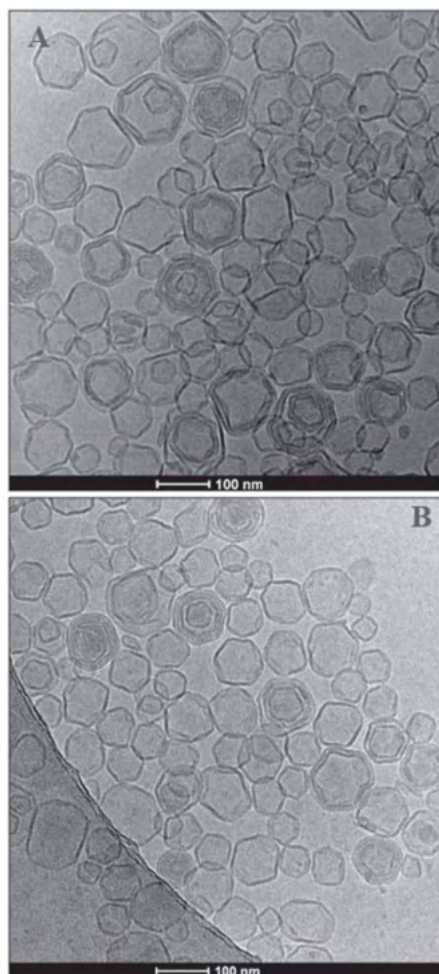


Fig. 6. Cryo-TEM images of DPPC vesicles prior (image A) and after (image B) the recalibration process of 140 nm liposomes through membrane with 50 nm pores performed at 20 °C.

phase transition but does not change further with falling temperature [19]. At the same time the cohesive forces increase continuously with decreasing temperature. To study the dependence of the lipid state on the liposome recalibration processes different experiments had been designed. During the experiment, the pre-calibrated liposomes (140 nm in size) were recalibrated through the filter with 50 nm pores. Measured extrusion forces, average sizes and PDI of resulting liposomes are presented in Fig. 5B and D. Presented data show that the extrusion force and the average liposome size depend on the extrusion temperature. The average size of recalibrated liposomes increases monotonically with decreasing temperature reaching, at about 20 °C, the initial value of 140 nm. Cryo-TEM images (Fig. 6) shows that DPPC vesicles were almost uniformly unilamellar, had similar sizes and topology characteristic for liposomes in the gel phase. Fig. 6A and B show images of 140 nm liposomes prior and after recalibration through 50 nm pores at 20 °C (gel phase), respectively. The comparison of the two images shows that neither topology nor size of liposomes were altered.

As already showed by Hope et al. [41] the extrusion of large lipid

vesicles through 100-nm pores resulted in an average vesicle size of 140 nm. This outcome can be explained by assuming that, when entering the extrusion pore, lipid forms elongated tubular structure. The elongated tubular vesicle in extrusion pore [38,39] changes its shape into undulated necklace-like topology (Fig. 7). When leaving the extrusion pore, on the trans side, the necklace-like structures are transformed into separated spherical vesicles [42]. The ratio of the sphere and tube diameters during vesicles shape transformations shown in Fig. 7 had been calculated to be equal 1.37, 1.42 and 1.44 for reduced volumes equal $2^{-1/2}$, $3^{-1/2}$ and $4^{-1/2}$, respectively. The ratio increases for the lower reduced volume v , i.e. longer tubular vesicles. The predicted ratio of 1.4, from theoretically derived shapes (Fig. 7), may thus explain why vesicles extruded through 100 nm pore have the average diameter around 140 nm. Consequently, the mechanism of vesicle recalibration process can be described in terms of vesicle topological transformations, when entering and leaving the extrusion pore (Fig. 7). Specifically, elongated vesicles flow through the extrusion pore followed by the release of the undulated necklace-like structures on the extrusion pore trans side (Fig. 7), which finally transforms into separated spherical vesicles. Prior to this process, the lipid vesicles deform at some energy cost [39], when entering much smaller extrusion cylindrical pore. The lipid bilayer would not rupture when entering the extrusion pore only if the reduced volume of the large vesicle is smaller than 1.0. When inside the extrusion pore without the external force absent, the vesicle (membrane fragment) is undulated (necklace-like shape). At the presence of the extrusion force the vesicle (membrane fragment) is cylindrical (see also [43]). The elongated vesicle (membrane fragment) flow through the extrusion pore is governed by the viscous shear force and the value of the membrane free energy minimum [38,39]. The remaining part of the vesicle, which did not enter the extrusion pore, has elevated value of the relative volume (close to 1.0) and can participate in the next extrusion cycles only if its reduced volume decreases as a result of the tension induced transient membrane pore formation [44]. The elongated lipid vesicle inside the cylindrical extrusion pore aligns along the main symmetry axis of the pore and attains axisymmetric shape with the axis of symmetry parallel to the axis of the pore [37]. The reduced volume of the elongated vesicle, which is moving through the pore decreases slightly due to elastic stretching of its membrane in the field of the viscous shear force inside the extrusion pore [37]. When elongated tubular vesicles reach the end of the pore they adopt the undulated (necklace-like) shape with increased bending energy (Fig. 7), which is gained from the released membrane lateral stretching energy caused by the disappearance of the viscous shear force outside the pore. Finally, necklace-like structures outside the pore transform into separated spherical vesicles, process powered by the curvature induced frustration in the necks of the undulated necklace-like vesicle [42]. Note that the theoretically predicted shape transformations between the elongated tubular vesicles in the extrusion pore (left column in Fig. 7) and the necklace-like vesicles on the trans side of the pore (right column in Fig. 7) did not account for the effect of viscous forces on the shape of a vesicle flowing inside the extrusion pore [45].

The minimal pressure, generated on the cis side of the membrane as required for the sustainable volumetric flux, will depend predominantly on liposome reorganization at the pore entrance and visco-elastic properties of the medium inside the extrusion pore. If the viscosity of the liposome suspension in the pore can be neglected and the recalibration process does not change the size of the vesicle, the estimated bending rigidity of the membrane in gel phase equals to about 10^{-18} J, the value similar to that presented by others using macrovesicles as the model system ($1.35 \cdot 10^{-18}$ J [28]; $1.55 \cdot 10^{-18}$ J [21]). There are no reliable experimental evidences showing that the mechanical properties of a lipid bilayer can be translated from the microscale down to the submicron scale other than result presented in the paper. Experimental results presented in the paper can be interpreted in terms of the membrane bending rigidity and the cohesion of the lipid bilayer. The

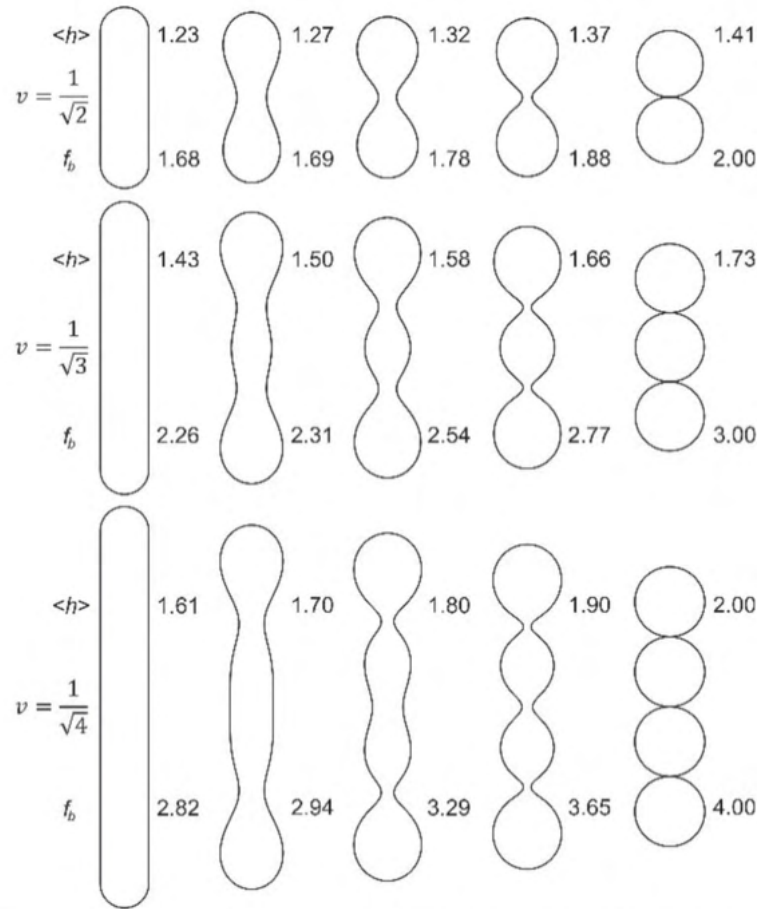


Fig. 7. The axisymmetric prolate vesicle shapes corresponding to the minimal local bending energy calculated for different values of reduced average mean curvatures $\langle h \rangle = 1/A \int (C_1 + C_2)dA$ and three values of the reduced volume v . The values of reduced local bending energy $f_b = F_b/8\pi k_c$ are also given for each shape, where F_b is the local bending energy of the vesicle and k_c is the bending constant (rigidity) of the bilayer membrane. Reduced volume is defined as $v = V/(4\pi R^3/3)$, where $R = \sqrt{A/4\pi}$ and A the vesicle surface area. The numerical calculation of the shapes corresponding to the minimal local bending energy was performed similarly as described in [48,57].

membrane cohesion affects its mechanics to such an extent that 140 nm vesicle in the gel phase passes unchanged through the 50 nm pore, whereas the same size vesicles in the fluid phase are recalibrated down to 80 nm. The entry of the vesicle into and flow through the extrusion pore can be related to the decrease of the reduced vesicle volume enforced by the tension induced transient membrane lipid pore formation (see also Karatekin et al. [44] and references therein). It is expected, that lipid pores in the membrane of tubular structure will reseal while it moves through the cylindrical extrusion pore. The dependences of the extrusion force and liposome size on temperature demonstrate that, when in the fluid phase membrane mechanics change little with temperature, in the gel phase the effect of temperature is different and depends on the system distance from the main phase transition. Previous experiments, using surface topology-sensitive fluorescent probe (fluorescein-PE), also demonstrated that the state of the lipid bilayer in the “gel phase” is a complex function of temperature [46].

4. Conclusion

Lipid bilayer mechanics attracts growing interest since its role in

many cellular processes such as endocytosis, formation and stabilization of tubular membrane structures in the Golgi, change in the topology of nuclear envelope or membrane invagination in caveolae have been indicated [47–52]. The lipid bilayer mechanics is also an important property of liposome-based targeted drug delivery systems. The vesicle internalization by competent and/or targeted cells depends on their mechanics and shape [53]. The lipid bilayer state influences the corona formation affecting the liposome fate inside the body as well as triggering cargo release [54–56]. The lipid bilayer mechanics is an important factor in the designing of liposomes production processes, which require application of mechanical force as is the case in extrusion or homogenization techniques [34]. Mechanics of the lipid bilayer have been studied previously almost exclusively using micro-vesicles. It was not clear however, if parameters derived using such an experiment model can be translated to the nanoscale. The new experimental approach presented in the paper shows that there are no significant differences between the two experimental models when the bending rigidity coefficient of a lipid bilayer is evaluated. In addition, the presented experimental method, when combined with the conceptual model of vesicle formation, allows for the extraction a new quantitative

parameter (effective viscosity), which cannot be measured with other technique.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Declaration of competing interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This study received financial support by Polish National Budget Funds for Science as a research project under the "Diamond Grant" program (Grant No. 0120/DIA/2018/47) to JD and a Grant POIR.04.01.04-00-0159/17-00 to MP, ML, PD, AF and BT by the National Centre for Research and Development (NCBiR). LM and AI the financial support from the Grants No. P2-0232 from the Slovenian Research Agency (ARRS). AI also acknowledge the funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme VES4US No. 801338.

AI and LM are grateful to W. Gózdź for computer program for calculation of equilibrium vesicles shapes.

References




- [1] D. Van Swaay, A. Demello, *Lab Chip* 13 (2013) 752–767.
- [2] C. Caddeo, L. Pucci, M. Gabriele, C. Carbone, X. Fernández-Busquets, D. Valenti, R. Pons, A. Vassallo, A.M. Fadda, M. Manconi, *Int. J. Pharm.* 538 (2018) 40–47.
- [3] N. Shimokawa, M. Nagata, M. Takagi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 20882–20888.
- [4] J.C. Mathai, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, M.L. Zeidel, *J. Gen. Physiol.* 131 (2008) 69–76.
- [5] R. Dimova, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 208 (2014) 225–234.
- [6] K. Makino, A. Shibata, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes* 4 (2006) 49–77.
- [7] M. Przybylo, T. Borowik, M. Langner, *Liposomes Anal. Methodol.* (2016) 345–383.
- [8] H. Bouvrans, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes* 15 (2012) 1–75.
- [9] W. Rawicz, K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, E.A. Evans, *Biophys. J.* 79 (2000) 328–339.
- [10] S. Garcia-manyes, L. Redondo-morata, G. Oncins, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12874–12886.
- [11] P.S. Niemelä, M.T. Hyvönen, I. Vattulainen, *Biophys. J.* 90 (2006) 851–863.
- [12] N. Kučerka, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, *J. Membr. Biol.* 208 (2006) 193–202.
- [13] H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, W. Wu, *Acta Pharm. Sin.* B 9 (2019) 36–48.
- [14] D. Lombardo, P. Calandra, D. Barreca, S. Magazù, M. Kiselev, *Nanomaterials* 6 (2016) 125.
- [15] S. Zhang, H. Gao, G. Bao, *ACS Nano* 9 (2015) 8655–8671.
- [16] X. Yi, X. Shi, H. Gao, *Phys. Rev. Lett.* 107 (2011).
- [17] K.J. Van Vliet, G. Bao, S. Suresh, *Acta Mater.* 51 (2003) 5881–5905.
- [18] L. Scheffer, A. Bitler, E. Ben-Jacob, R. Korenstein, *Eur. Biophys. J.* 30 (2001) 83–90.
- [19] A.F. Loftus, S. Noreng, V.L. Hsieh, R. Parthasarathy, *Langmuir* 29 (2013) 14588–14594.
- [20] L.A. Bagatolli, D. Needham, *Chem. Phys. Lipids* 181 (2014) 99–120.
- [21] O. Et-Thakafy, N. Delorme, C. Gaillard, C. Mériaud, F. Artzner, C. Lopez, F. Guyomarch, *Langmuir* 33 (2017) 5117–5126.
- [22] C.M. Franz, P.-H. Puech, *Cell. Mol. Bioeng.* 1 (2008) 289–300.
- [23] B.R. Brückner, A. Janshoff, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 3075–3082.
- [24] K.A. Riske, R.P. Barroso, C.C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V.B. Henriques, M.T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1788 (2009) 954–963.
- [25] C.H. Lee, W.C. Lin, J. Wang, *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* 64 (2001) 4.
- [26] N. Michel, A.S. Fabiano, A. Polidori, R. Jack, B. Pucci, *Chem. Phys. Lipids* 139 (2006) 11–19.
- [27] T. Kaasgaard, C. Leidy, J.H. Crowe, O.G. Mouritsen, K. Jørgensen, *Biophys. J.* 85 (2003) 350–360.
- [28] R.M. Venable, F.L.H. Brown, R.W. Pastor, *Chem. Phys. Lipids* 192 (2015) 60–74.
- [29] J. Pan, S. Tristram-Nagle, N. Kučerka, J.F. Nagle, *Biophys. J.* 94 (2008) 117–124.
- [30] A.D. Bangham, J. De Gier, G.D. Greville, *Chem. Phys. Lipids* 1 (1967) 225–246.
- [31] F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos, *BBA - Biomembr* 557 (1979) 9–23.
- [32] S.G.M. Ong, M. Chitneni, K.S. Lee, L.C. Ming, K.H. Yuen, *Pharmaceutics* 8 (2016).
- [33] J.C.M. Stewart, *Anal. Biochem.* 104 (1980) 10–14.
- [34] P. Guo, J. Huang, Y. Zhao, C.R. Martin, R.N. Zare, M.A. Moses, *Small* 14 (2018).
- [35] R. Nayar, M.J. Hope, P.R. Cullis, *BBA - Biomembr* 986 (1989) 200–206.
- [36] A. Hinna, F. Steinger, S. Hupfeld, P. Stein, J. Kuntsche, M. Brandl, *J. Liposome Res.* 26 (2016) 11–20.
- [37] V. Vitkova, M. Mader, T. Podgorski, *Europhys. Lett.* 68 (2004) 398–404.
- [38] R. Bruinsma, *Phys. A Stat. Mech. Its Appl.* 234 (1996) 249–270.
- [39] D.G. Hunter, B.J. Frisken, *Biophys. J.* 74 (1998) 2996–3002.
- [40] M. Ibarguren, A. Alonso, B.G. Tenchov, F.M. Goñi, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1798 (2010) 1735–1738.
- [41] M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis, *BBA - Biomembr* 812 (1985) 55–65.
- [42] D. Jesenek, Š. Perutková, W. Gózdź, V. Kralj-Iglič, A. Igljč, S. Kralj, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 677–687.
- [43] L. Mesarec, W. Gózdź, S. Kralj, M. Fošnaric, S. Penič, V. Kralj-Iglič, A. Igljč, *Eur. Biophys. J.* 46 (2017) 705–718.
- [44] E. Karatekin, O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P.H. Puech, F. Brochard-Wyart, *Biophys. J.* 84 (2003) 1734–1749.
- [45] D. Abreu, M. Levant, V. Steinberg, U. Seifert, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 208 (2014) 129–141.
- [46] M. Langner, H. Pruchnik, K. Kubica, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 55 (2000) 418–424.
- [47] H. Alimohamadi, P. Rangamani, *Biomolecules* 8 (2018).
- [48] J.E. Hassinger, G. Oster, D.G. Drubin, P. Rangamani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E1118–E1127.
- [49] N. Bobrovska, W. Gózdź, V. Kralj-Iglič, A. Igljč, *PLoS One* 8 (2013).
- [50] M. Torbati, T.P. Lele, A. Agrawal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 11094–11099.
- [51] X. Liang, Y. Zu, Y.P. Cao, C. Yang, *Soft Matter* 9 (2013) 7981–7987.
- [52] J.C. Stachowiak, F.M. Brodsky, E.A. Miller, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 1019–1027.
- [53] B. Yameen, W. Il Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, O.C. Farokhzad, *J. Control. Release* 190 (2014) 485–499.
- [54] C. Corbo, R. Molinaro, M. Tabatabaei, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 378–387.
- [55] N. Bertrand, P. Grenier, M. Mahmoudi, E.M. Lima, E.A. Appel, F. Dormont, J.M. Lim, R. Karnik, R. Langer, O.C. Farokhzad, *Nat. Commun.* 8 (2017).
- [56] U. Kauscher, M.N. Holme, M. Björnalm, M.M. Stevens, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 138 (2019) 259–275.
- [57] W.T. Gózdź, *Langmuir* 20 (2004) 7385–7391.

PRACA 4

The elucidation of the molecular mechanism of the extrusion proces

Article

The Elucidation of the Molecular Mechanism of the Extrusion Process

Joanna Doscocz^{1,2,*}, Paulina Dalek^{1,2}, Magdalena Przybyło^{1,2}, Barbara Trzebicka³ , Aleksander Foryś³ , Anastasiia Kobylukh³, Aleš Igljič^{4,5} and Marek Langner^{1,2} 

¹ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology Wrocław, University of Science and Technology, pl. Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław, Poland; paulina.dalek@pwr.edu.pl (P.D.); magdalena.przybylo@pwr.edu.pl (M.P.); marek.langner@pwr.edu.pl (M.L.)

² Lipid Systems sp. z o.o., ul. Krzemieniecka 48C, 54-613 Wrocław, Poland

³ Centre of Polymers and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, ul. M. Curie-Skłodowskiej, 41-819 Zabrze, Poland; btrzebicka@cmpw-pan.edu.pl (B.T.); aforys@cmpw-pan.edu.pl (A.F.); akobylukh@cmpw-pan.edu.pl (A.K.)

⁴ Laboratory of Physics, Department of Fundamentals of Electrical Engineering, Mathematics and Physics, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; ales.iglic@fe.uni-lj.si

⁵ Laboratory of Clinical Biophysics, Department of Orthopedics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška 9, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

* Correspondence: joanna.doscocz@pwr.edu.pl



Citation: Doscocz, J.; Dalek, P.; Przybyło, M.; Trzebicka, B.; Foryś, A.; Kobylukh, A.; Igljič, A.; Langner, M. The Elucidation of the Molecular Mechanism of the Extrusion Process. *Materials* **2021**, *14*, 4278. <https://doi.org/10.3390/ma14154278>

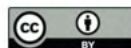
Academic Editors: Abdelwahab Omri and Daniela Iannazzo

Received: 11 June 2021

Accepted: 27 July 2021

Published: 30 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Extrusion is a popular method for producing homogenous population of unilamellar liposomes. The technique relies on forcing a lipid suspension through cylindrical pores in a polycarbonate membrane. The quantification of the extrusion and/or recalibration processes make possible the acquisition of experimental data, which can be correlated with the mechanical properties of the lipid bilayer. In this work, the force needed for the extrusion process was correlated with the mechanical properties of a lipid bilayer derived from other experiments. Measurements were performed using a home-made dedicated device capable of maintaining a stable volumetric flux of a liposome suspension through well-defined pores and to continuously measure the extrusion force. Based on the obtained results, the correlation between the lipid bilayer bending rigidity and extrusion force was derived. Specifically, it was found that the bending rigidity of liposomes formed from well-defined lipid mixtures agrees with data obtained by others using flicker-noise spectroscopy or micromanipulation. The other issue addressed in the presented studies was the identification of molecular mechanisms leading to the formation of unilamellar vesicles in the extrusion process. Finally, it was demonstrated that during the extrusion, lipids are not exchanged between vesicles, i.e., vesicles can divide but no membrane fusion or lipid exchange between bilayers was detected.

Keywords: liposomes; extrusion; lipid bilayer; membrane mechanics; bending rigidity

1. Introduction

The mechanics of the lipid bilayer are one of the central issues of contemporary biology and a critical element for the development of liposome-based drug delivery systems [1,2] and other supramolecular nanodevices such as biosensors for environmental monitoring and medical diagnostics [3–9] or cargo capsules for cosmetics, nutraceuticals, and food additives [10–14]. Polar lipids are convenient materials for the construction of drug delivery systems in the form of liposomes (a closed spherical lipid bilayer) [15]. In order to be used as effective nanodevices, liposomes, as well as their production processes, need to be parametrized so the resulting pharmacological or medical products can pass the scrutiny of rigorous formal approval processes [16]. Whereas some parameters, such as liposome size distribution or encapsulation efficiency, can be reliably quantitated, others, such as mechanical properties, are rarely measured. However, based on theoretical and

experimental studies, it was demonstrated that elasticity affects the rate of nanoparticles internalization by cells and accumulation in the tissues [17–22]. The mechanics of a lipid bilayer will also affect the formation protocols of liposomes [10,23–29]. The scientific and technological importance of liposome mechanics is unmatched by the development of reliable and quantitative experimental methods.

Bending rigidity (κ) and bilayer tensile strength (γ) are parameters that quantitate the mechanical properties of the lipid bilayer, which is the building structure of liposomes. The bending rigidity determines the amount of energy that must be applied to bend a lipid bilayer [30]. It depends on the lipid bilayer intrinsic properties, as well as environmental conditions [30–37]. Currently available techniques, used to evaluate lipid bilayer rigidity, can be classified into the following qualitatively different categories [38]:

- i. Fluctuation spectroscopy, which is based on shape deformations of giant unilamellar vesicles (GUVs) [32,39–42],
- ii. Methods based on membrane deformation induced by an external force, where the lipid bilayer elastic properties are calculated using the relation between the force and the extent of membrane deformation (e.g., micropipette aspiration, optical tweezer, electrodeformation, and Atomic Force Microscopy (AFM) manipulations) [10,31,43–48],
- iii. Scattering techniques [49–52], where structural parameters of supported lipid bilayers are correlated with mechanical properties,
- iv. Molecular dynamics simulation [53,54], where mechanical properties are derived from the simulation of small lipid bilayer fragments,
- v. Estimation of the mechanical properties using theoretical methods of soft matter physics [55,56],
- vi. Monte Carlo simulations [57].

The technological application of either of those methods for the evaluation of liposomes is impractical due to the inconvenient experimental models, complex experimental infrastructure, or assumption-limited theoretical models used. Fluctuation spectroscopy and the aspiration technique use a difficult-to-validate experimental model, i.e., liposomes with a diameter greater than 1 μm (GUV). In addition, methods based on GUVs are technically demanding and cannot be easily adopted to complex lipid mixtures, due to the potentially heterogeneous vesicle population. Critically, the measured values cannot be easily translated to the submicron scale. Molecular dynamic simulations, theoretical modeling, and Monte Carlo simulations cannot be used alone; hence, they require experimental validation of the derived quantitative values. The method based on the scattering technique uses stacks of supported lipid bilayers as an experimental model system, so direct liposome measurement is not possible. In addition, the technique requires a complex theoretical model, the assumptions of which are difficult to verify [58]. Consequently, the effective development of liposome-based drug delivery systems is easy to implement, effective, reliable, and capable of providing quantitative measures of the final version of liposomes intended for pharmacological applications.

The lipid bilayer tensile strength can be measured by applying a pressure difference across the lipid bilayer [59]. The pressure difference may result from osmotic imbalance [60] or a hydrostatic pressure difference may be generated between aqueous compartments of GUV [59,61,62].

Recently, we have introduced a measuring technique, easy to implement into industrial settings, for the determination of the mechanical properties of a lipid bilayer [63]. The method is based on the measurement of the force needed to support the predetermined volumetric flow through the nanopores of the extrusion membrane. Extrusion is one of the most common methods for producing a homogenous unilamellar liposome suspension (LUV) [64]. Typically, a multilamellar liposome suspension (MLV) is passed through a membrane filter to obtain liposomes with a mean diameter correlated with the diameter of pores in the filter [65]. The extrusion is carried out manually or using a high-pressure difference to force the liposome suspension through the filter [65–67]. In our work, an automated extruder was used (Figure 1). The device consists of a step-motor and strain

gauges, so the piston is capable of maintaining a constant volumetric flux of liposome suspension through the membrane pores when continuously monitoring the required temporal extrusion force. The mechanism of unilamellar vesicles creation using the extrusion technique is not well understood. There is still a lack of a consistent model explaining how large, multilamellar liposomes with diameters orders of magnitude larger than pores break up into smaller, unilamellar vesicles during the extrusion process [68]. It has been observed that the average size of liposomes obtained by the extrusion method is, in some cases, greater than the diameter of pores in the filter, indicating the liposome shape alteration when inside the pore (if the filter with a pore diameter smaller than 200 nm is used) [68,69]. Numerous experimental and theoretical studies aiming at the correlation between properties of the lipid bilayer and parameters of the extrusion process have been reported, but no mechanistic description of the process has been offered [68,70–74]. In the present work, liposome formation and/or recalibration processes (preformed LUVs are forced through pores of significantly smaller sizes [75]) were used to evaluate the mechanical properties of a lipid bilayer, i.e., membrane bending rigidity and tensile strength. The liposome formation process involves the transformation of heterogeneous multilamellar vesicle suspensions into a homogenous suspension of unilamellar vesicles by forcing them through the filter with a specific pore size. The “recalibration” is understood here as a process when a homogenous unilamellar liposome suspension is forced through the filter with a pore size smaller than the average size of liposomes in the suspension. Depending on the properties of a lipid bilayer, the outcome of the procedure may vary. Finally, the molecular mechanism of the extrusion process is proposed.

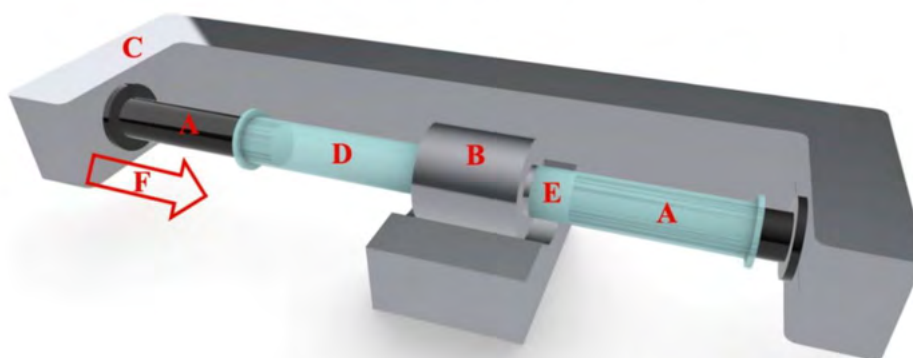


Figure 1. Schematic diagram of an automated extrusion device. The system consists of two Hamilton Syringes (A), a holder for the filter (B), and an arm powered by a stepper motor (C). Liposome suspension before (D) and after extrusion (E) and Extrusion force (F) are indicated in the drawing.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Lipids: POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), cholesterol, and fluorescent probes, namely, NBD (1-acyl-2-(6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine) and Rh-B (18:1 Liss Rhod PE 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) ammonium salt), were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Chloroform and sodium chloride were obtained from VWR sp. z o.o. (Gdańsk, Poland). Ferric chloride hexahydrate and ammonium thiocyanate were purchased from Chempur (Łódź, Poland). Polycarbonate membranes (Nuclepore Corp., Pleasanton, CA, USA) and 2.5 mL syringes (Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Switzerland) were used for the extrusion process, and 18 M Ω of deionized water was used in all experiments (PolWater, Kraków, Poland).

2.2. Quantitative Method for the Evaluation of the Liposome Extrusion

Multilamellar liposomes (MLVs) were prepared by the dry film method [76]. First, lipids were dissolved in chloroform (with a fluorescent probe in the amount of 0.5 mol%, if applicable). Then, the organic solvent was evaporated under a stream of argon (AirProducts sp. z o.o., Warszawa, Poland) and the remaining chloroform was removed under vacuum (Vacuum pump Rocker 410, Rocker, Kaohsiung City, Taiwan). Next, the dry lipid film was hydrated with water or a saline solution followed by vortexing (Vortex MX-S Chemland, Stargard, Poland) and hydration overnight. The obtained MLV suspension was extruded using an automated mechanical extruder (Lipid Systems Ltd., Wrocław, Poland) to produce a population of the unilamellar vesicles (Figure 1) [77]. As described elsewhere, the extrusion process was performed using the device capable of maintaining a constant value of the volumetric flow of the liposome suspension through the filter and continuously monitoring the extrusion force [63]. The volumetric flux (J_V) across the polycarbonate filter was calculated according to the formula:

$$J_V = \frac{R_s^2 \cdot v_p}{R_f^2} \quad (1)$$

where v_p is the velocity of the piston in the syringe, which was set before each measurement, whereas R_s and R_f stand for the syringe and filter radii, respectively.

In previous work [63], it has been shown that the extrusion force depends on measurement conditions such as the volumetric flux of the liposome suspension through pores, temperature, pore diameter, and concentration of lipids in the suspension. In order to determine the effect of lipid composition of the lipid bilayer or test the proposed mechanisms of the liposome formation process, the experimental conditions had been fixed, specifically, the lipid concentration was set to 10 mg/mL, the volumetric flux was maintained at 0.48 (mL·min⁻¹·cm⁻²), and pores in the filter had diameters equal to 0.1 μm if not stated otherwise.

2.3. Liposome Suspension Characterization

Liposomes size distributions and polydispersity indexes (PDI) were measured with the dynamic light scattering method (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) after samples were diluted 50 times with the deionized water or buffer (Chempur, Łódź, Poland). All solutions before use were filtered through the cellulose membrane with 0.2 μm pores (VWR, Gdańsk, Poland).

The lipid concentration in the liposome suspension, before and after the extrusion process, was determined by the Stewart method [78]. Specifically, 40 μL of liposome suspension was added to 2 mL of chloroform, 2 mL of 0.4 M of ammonium ferrioxalate, and 0.1 M of ferric chloride hexahydrate solution. Then, the samples were vortexed and set aside for 15 min. The lipid concentration was calculated based on the determined value of absorbance (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) and the calibration curve. The liposomes fluorescence was measured using a Fluoromax-4 Spectrofluorometer (Horiba, Tokyo, Japan). In the first step, the excitation and emission spectra of fluorophores, when in the lipid bilayer, were collected, and the wavelengths of maximum fluorescence intensities were determined. For NBD and Rh-B, the maximum fluorescence intensity was measured when the excitation/emission wavelength was equal to 467/531 and 569/589 nm, respectively. In experiments where the fluorescence resonance energy transfer between the two probes was evaluated, the excitation wavelength was set at 467 nm and emission spectra were acquired in the wavelength range from 520 to 630 nm.

3. Results and Discussion

Quantitative Description of the Extrusion Process

The extrusion process can be arbitrarily divided into the following stages: accumulation of lipid aggregates at the entrance of the pore (1), liposomes enter pores (2), passage of

the vesicles through pores (3), and the release of liposomes on the other side of the extrusion membrane (4). Phase (1) can be neglected, as extrusion pores will be rapidly sealed by the multilamellar vesicles, as demonstrated by the dependence of the extrusion force on lipid concentration in the vesicle suspension [40]. The vesicle formation in the extrusion process depends on the intrinsic properties of lipids and the geometry of the extrusion system. Similar to the approach used in the GUV aspiration technique, the geometry of the liposome formation system can be reduced to the pore diameter [68,79]. The quantitative parameters characteristic for the lipid bilayer such as bending rigidity, rupture tension, and water permeability will also affect the final liposome topology [79,80]. Consequently, the average vesicle size will predominantly be affected by the extrusion pore diameter and the lipid composition. The dependence of liposome size on the lipid composition raises the issue of the mechanism of the liposome formation process. In this paper, the membrane cis and trans sides address surfaces where liposomes enter and leave the pore, respectively. Three scenarios can be proposed for the formation of liposomes (Figure 2).

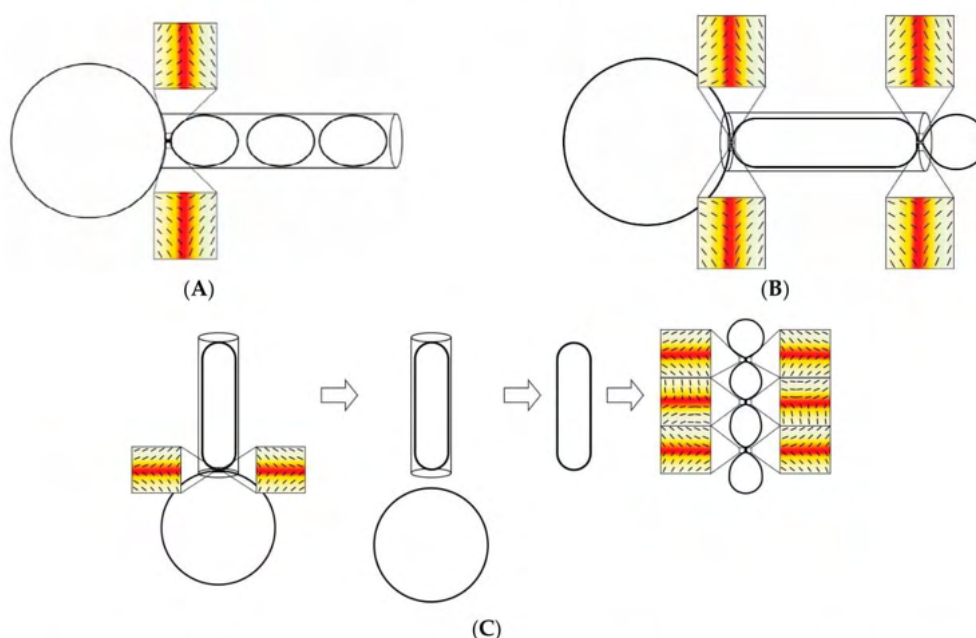


Figure 2. The schematic presentation of possible scenarios describing the liposome formation during the extrusion. Scheme (A)—unilamellar liposomes are formed at the pore opening and remain unaffected by subsequent steps. Scheme (B)—unilamellar liposomes are formed at the pore opening from the elongated lipid structure formed from fused liposomes. Scheme (C)—during the extrusion process, the elongated lipid structure is pulled from the multilamellar liposome and final unilamellar liposomes are a result of the budding process caused by the topological alterations inside the pore caused by defects in the lipid bilayer. The hypothetical orientational molecular ordering profiles in neck-like buds/endovesicles show that topological anti-defects are accumulated in the necks. Consequently, the shape with prominent thin necks in scheme (C) may be transformed into distinct membranes as a result of the neck rupture. Positions of anti-defects are indicated by small squares. Orientational molecular ordering profiles with the superimposed nematic director fields in the vicinity of topological anti-defects are shown in magnifications. The color scale represents the degree of orientational order of the lipid bilayer. Dark red and white colors indicate the minimum (isotropy) and maximum (anisotropy) values of the orientational order, respectively. Figure was adapted from [81].

1. The spheroidal liposome is formed at the pore (on the cis side) opening and remains intact through the remaining stages of the extrusion process.

2. The tubular liposome is formed at the pore opening (on the cis side) and the final vesicle is formed at the exit of the pore [63,82].
3. The tubular liposome is formed at the pore opening, but the stringed condition inside the pore forces the tubular structure to rearrange into unilamellar vesicles inside the pore [63].

All three scenarios account for the dependence of the final vesicle topology on the properties of the lipid bilayer and pore diameter. In the first scenario, the bending rigidity and the tensile strength of the lipid bilayer are factors affecting the final liposome size. The vesicle is formed when the resistance of the multilamellar vesicle at the surface of the extrusion membrane exceeds the tensile strength of the lipid bilayer. After that, the size of vesicles remains unchanged throughout the remaining stages of the extrusion process. This scenario has quantitative consequences for the recalibration process when the size of the unilamellar vesicle is altered due to the passage through the pore with smaller diameter. In this case, a unilamellar liposome breaks at the pore opening and a liposome with smaller size is formed. The remaining lipids can form liposomes on their own or fuse with other lipids present at the membrane surface. Each event will produce different experimental outcomes. The first possibility will produce two populations of liposomes and there would be no lipid mixing. In the second possibility, a single liposome population will form and lipids will mix in the process. In the second scenario, the elongated lipid structure forms at the pore opening. Liposomes are formed at the trans side of the membrane and the resulting unilamellar liposomes' size will depend on the pore diameter mechanics of the lipid bilayer and thermal fluctuations of the liposome wall at the pore opening [63,81]. In this case, the sizes of liposomes will likely exceed the pore diameter. In this scenario, the recalibration will produce liposomes similar to those in the first scenario. In the third scenario, liposomes will form from the tubular structure inside the pore as a result of stringed conditions imposed by the pore wall generating spontaneous defects in the lipid bilayer, finally leading to vesicle formation. In this case, the size of the resulting liposomes will not exceed pore diameter.

Therefore, the determination of the liposome formation and recalibration mechanisms can be determined based on the populational analysis of produced vesicles and by measuring the stability of vesicles with respect to their lipid composition.

Recently, the quantitative extrusion device has been introduced (Figure 1). The device is equipped with several features, which are useful in quantitative characterization of the liposome formation process, such as mechanics of a lipid bilayer. In recently presented studies, the molecular mechanism of the liposome formation process in the extrusion pores has been proposed along with the method of the bending rigidity determination [63]. The bending rigidity is a parameter used to quantitate lipid bilayer propensity for deformation. The main advantage of the method is that the measured values are averaged over a large population of vesicles, contrary to other approaches, where the bending rigidity is determined for a set of vesicles arbitrarily selected for the measurement from a large and frequently heterogeneous population [63]. The device is capable of measuring the force required to support a predetermined volumetric flow of liposome suspension through the extrusion membrane. In extrusion, the energy is dissipated due to the friction between liposomes and the pore wall, the bulk viscosity within the experimental systems, and rearrangements of lipid aggregates. The intrinsic energy dissipation of the device itself can be easily determined by the dedicated control experiment when no lipid is present. The energy-consuming liposome formation processes are: the deformation of lipid bilayers, pressure-driven water flow across a lipid bilayer, elongation, breaking the membrane, and flow vesicles through the pore. Finally, a vesicle leaving the pore recovers its specific topology, which depends mainly on temperature and membrane-intrinsic properties [80]. The typical dependence of extrusion force on time, when the volumetric flow is fixed, is presented in Figure 3. The extrusion force increases rapidly followed by a period when it stabilizes for the duration of the extrusion process.

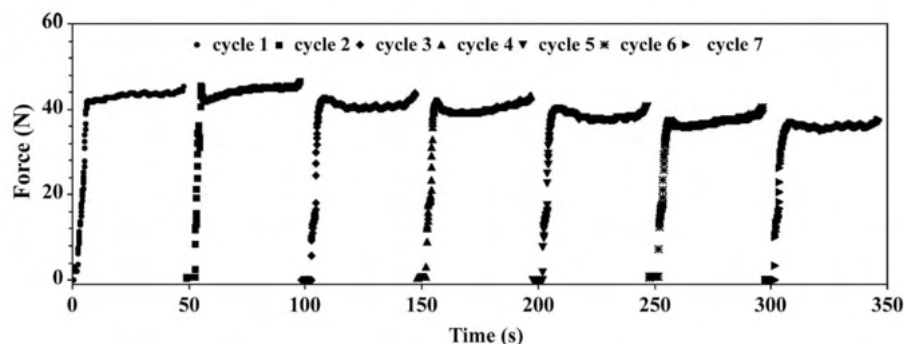


Figure 3. Example of raw data obtained during 7 cycles of the extrusion process of liposomes formed from POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). The measurements were performed at room temperature, with the volumetric flow and filter pore diameter equal to $0.48 \text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ and $0.08 \mu\text{m}$, respectively.

In order to demonstrate the method reliability, the dependence of the extrusion force, needed to maintain the constant volumetric flow of liposome suspension, on the lipid composition was measured. For that purpose, the extensively studied and well-characterized cholesterol-phosphatidylcholine mixtures were selected [38,41,83,84].

When designing the experimental protocol, we have taken advantage of the fact that the extrusion process consists of a series of cycles. Each cycle is performed upon a slightly different sample. The difference results from the growing fraction of unilamellar liposomes in the suspension. Figure 4A, in addition to the extrusion force, shows that the quantity of lipid on the trans side of the extrusion membrane increases when the number of extrusion cycles reaches saturation after approximately the sixth cycle. At the same time, the diameter of liposomes approaches the size of the membrane pores and the liposome population becomes homogeneous, as demonstrated by decreasing PDI values (Figure 4B). Similar observations have been reported by others [65,68,77,85]. The character of the dependence of liposome quality on the number of extrusion cycles is invariant with respect to the lipid composition used. Figure 4A,C show that the character of the dependence remains unchanged for liposomes formed from POPC or from the mixture of POPC and cholesterol. However, the force required to extrude vesicles is much higher when POPC/cholesterol is pushed through the membrane. The observed difference can be assigned to the difference in the lipid bilayer mechanics, in agreement with observations reported by others [78]. In addition, Figure 4 demonstrates that two qualitatively different vesicle suspensions can be defined: multilamellar vesicles in cycle one and unilamellar vesicles in cycle six and later. Consequently, the extrusion force in cycles 1 and 6 can be used to measure two different processes characterized by different properties of a lipid bilayer: the force required to push a multilamellar vesicle across the filter membrane will result in both rupture of the lipid bilayer, as required for the unilamellar vesicle formation, and lipid bilayer deformation upon entering the pore of the extrusion membrane. In the sixth cycle, on the other hand, only the lipid bilayer deformation is required. Consequently, the extrusion force in cycles 1 and 6 can be used to evaluate two different parameters, the tensile strength and bending rigidity, respectively. The cycle differentiation has been confirmed with an ANOVA test. For practical purposes, the tensile strength can be defined in terms of the membrane stretching resistance:

$$E_{exp} = \frac{1}{2}K_A \left(\frac{A - A_0}{A_0} \right)^2 \quad (2)$$

where the stretching elastic energy per unit area E_{exp} depends on the change in the relative area (A_0 and A are surface areas of the relaxed and stressed membrane, respectively) and material parameter (membrane compression modulus K_A), whereas the bending deformation can be described in terms of Helfrich's model, where the bilayers are characterized

by two principal local curvatures C_1 and C_2 and three phenomenological parameters, the bending rigidity (κ_b), the Gaussian elastic modulus (κ_G), and the spontaneous curvature (C_0) [86]:

$$E_{bend} = \frac{1}{2}\kappa_b(C_1 + C_2 - C_0)^2 + \kappa_G C_1 C_2 \quad (3)$$

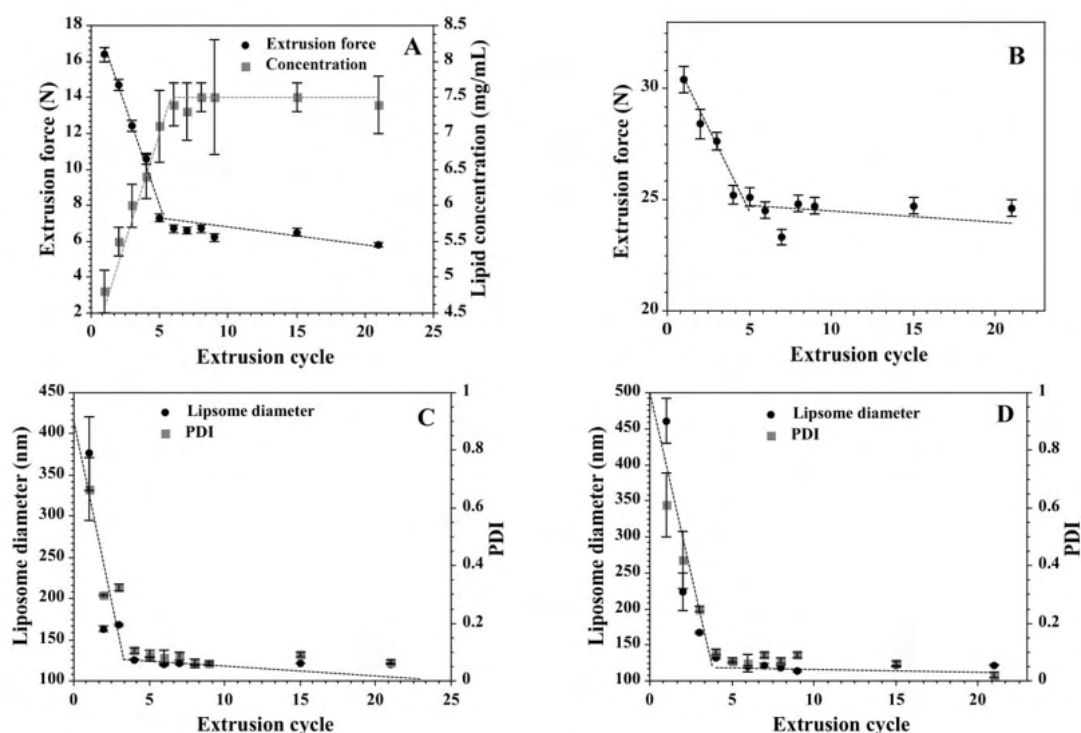


Figure 4. The dependence of the extrusion force on the cycle number when the liposomes are formed from POPC (A) or a mixture of POPC and cholesterol (70:30, mol:mol) (B). Panel A also shows the quantity of lipids crossing the membrane during each cycle. Panels (C,D) show the average size and PDI (Polydispersity Index) as evaluated using the dynamic light scattering method. The value of the extrusion force was corrected for the intrinsic resistance of the instrument. The measurements were performed at room temperature and the volumetric flow was equal to $0.48 \text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$.

As shown in Figure 4A, the average extrusion force for POPC vesicles monotonically decreases from the value of 16.4 N in the first cycle down to 6.7 N in the sixth cycle, showing that irreversible processes (liposome formation) contribute around 10 N to the force required to sustain the constant volumetric flow (Figure 4A). The remaining 6.7 N originates from the resistance of the device and reversible process (deformation of the lipid bilayer). Experimental results regarding topological alterations of the lipid bilayer driven by a hydrostatic pressure difference, as in the extrusion process, depend on the lipid bilayer-intrinsic properties such as mechanics, water permeability, as well as instrumental settings (temperature or volumetric flow) [79,87]. In light of the presented data, the irreversible process (liposome formation) will depend on lipid bilayer deformation upon entering the membrane pore and water fluxes, so adequate aqueous volumes would facilitate protrusion formation followed by the unilamellar vesicle budding from multilamellar structures. The relative contribution of these factors to the vesicle formation process [68,88] justify the assumption that the hydrostatic pressure difference needed for the constant flow of the liposome suspension across the extrusion membrane depends predominantly on the lipid

bilayer tensile strength and bending rigidity. It has been assumed that the two processes are additive. The tensile strength can be described by the following equation [68]:

$$\Delta P \approx 2\sigma_m \frac{1}{R_p} \quad (4)$$

where ΔP stands (approximately) for the hydrostatic pressure difference across the extrusion membrane, R_p stands for the radius of the extrusion pore, and the effective lateral tension (σ_m) includes surface tensions from both surfaces and the contribution from the stretching of the membrane.

The hydrostatic pressure difference needed for the liposome formation can be extracted from the dependence of the extrusion force on time in the first cycle (Figure 3), where the hydrostatic pressure difference, after rapid increase, stabilizes for the duration of sample extrusion. The constant volumetric flow reflects the rate of unilamellar liposomes formation when lipid aggregates, before entering the extrusion membrane, are in the form of large multilamellar structures. In subsequent passages, the growing fraction of lipids form unilamellar vesicles, as reflected by the decreasing hydrostatic pressure difference needed to maintain the constant volumetric flow (Figure 4A). Interestingly, the dependence of the extrusion force on the number of passages through the membrane is composed of two phases, a rapid decrease in the extrusion force followed by a slower decline (Figure 4A,C). The first process correlates with the quantity of lipids on the “trans” side of the membrane (Figure 4A). The slower process can be assigned to the improvement of the liposome homogeneity.

To demonstrate that experimental data obtained using the extrusion method reflect the lipid bilayer mechanics, the well-characterized experimental models, namely liposomes formed from various mixtures of POPC and cholesterol, were used. It has been established by others that the addition of cholesterol changes significantly the lipid bilayer properties. Specifically, the bending rigidity and tensile strength are elevated, whereas the water permeability decreases [32,79,89,90].

It was observed (Figure 5) that the dependence of extrusion forces during the first and sixth cycles on cholesterol membrane content are linear. This indicates that the bending rigidity and the tensile strength are both a linear function of the cholesterol content in the membrane. This qualitatively agrees with data presented by others [32,89]. Figure 6 shows the correlation between the extrusion forces of tensile strength and bending rigidity of membranes differing in the cholesterol content.

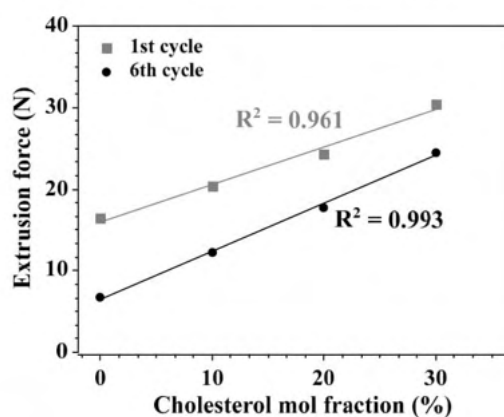


Figure 5. The dependence of the extrusion force in 1st and 6th cycles on the quantity of cholesterol in the lipid bilayer. The measurements were performed at room temperature and the volumetric flow was equal to 0.48 mL/(min·cm²). R indicates the coefficient of determination of the linear regression model.

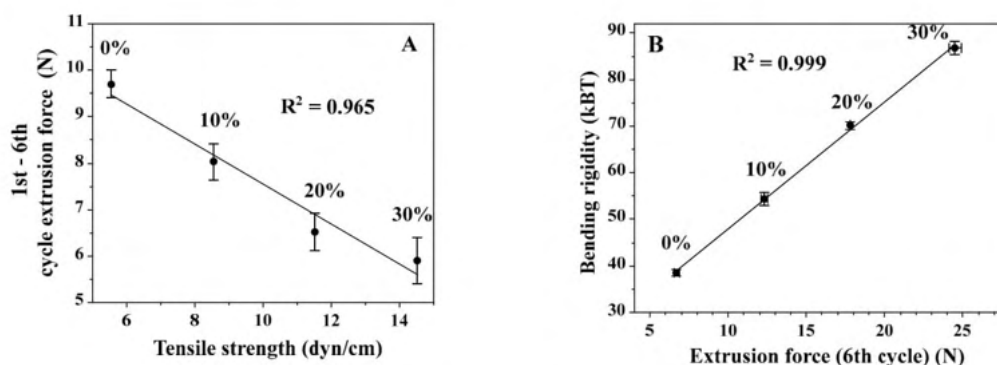


Figure 6. Correlations between extrusion forces and tensile strength (A) and bending rigidity (B). Panel A shows the correlation between tensile strength and extrusion force in the 1st cycle determined for the membrane with different contents of cholesterol [89]. The right panel shows the dependence of the bending rigidity on the cholesterol content in the membrane, as well as the correlation between the extrusion force measured and the tensile strength derived from the literature [32]. The measurements were performed at room temperature and the volumetric flow was equal to $0.48 \text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$.

As stated before, the extrusion force in the first cycle reflects the resilience of the lipid bilayer to both deformation and rupture [89], whereas the extrusion force in the sixth cycle reflects mainly the pressure difference needed to deform vesicles and push them through the pore; therefore, it can be correlated with the bending rigidity coefficient (Figure 6). The dependence of the bending rigidity coefficient on the extrusion force in the sixth cycle for various membranes differing with respect to the cholesterol content is linear. The numerical values of the bending rigidity were borrowed from the literature [32]. The difference between extrusion forces in the first and sixth cycles is expected to correlate with the tensile strength. The correlation between values of the extrusion force and the tensile strength determined by others, for membranes differing with respect to the cholesterol content, is also linear (Figure 6A) [89]. However, in this case, when the cholesterol content in the membrane rises, the corrected extrusion force (the difference between cycles 6 and 1) decreases. This is an unexpected result as it has been observed, using GUV, as an experimental model, that the tensile strength increases with the cholesterol content [89]. It is well established that the presence of cholesterol in the lipid bilayer changes its properties, including decreased permeability, increased bending rigidity coefficient, and a change in the organization of hydrocarbon chains, as demonstrated by the modification of the main phase transition. The effect of cholesterol on membrane mechanics is complex and varies depending on the model used, lipid composition of the bilayer, and properties selected for analysis (for example, bending rigidity versus friction between monolayers) [81,89,90]. During extrusion, no single property but their combination is relevant, including the permeability to water, bending rigidity, and resistance to lateral and bending stresses [91]. The unexpected reduction in the tensile strength by rising the cholesterol content in the membrane, as measured with the extrusion method, can be rationalized by considering the water flux accompanying the liposome formation process. Cholesterol, by reducing the water flow across the lipid bilayer, changes the dynamics of the liposome formation process. The insufficient amount of water available for vesicle formation at the pore opening may result with the premature rupture of the membrane in the extrusion pore. The deficiency of the extrusion method with respect to the measure of the tensile strength requires further experimental clarification.

When cholesterol is present in the lipid bilayer, the extrusion force is significantly higher when liposomes are extruded through the membrane with small pores. When membrane pores are small, the difference in values of the first-cycle extrusion force between the vesicle with and without cholesterol is negligible (Figure 7). When the dependence of the extrusion force on lipid concentration is evaluated, it can be seen that for POPC

vesicles, the extrusion force is invariant on lipid concentration, whereas when cholesterol is present, the extrusion force increases monotonically in lipid concentration, showing that, in addition to the extrusion process, other processes occurring on the cis surface of the extrusion membrane may affect the measured extrusion force value. Comparing the dependence of the extrusion forces in the first and sixth cycles, it can be observed that for POPC vesicles, the extrusion force is higher for smaller pores and is smaller for the sixth cycle. Extrusion forces for POPC vesicles do not depend on the lipid concentration and their values are greater in the first cycle. When cholesterol is present, in the membrane, the extrusion force in all cases is higher than that for POPC alone. However, for small membrane pores, the extrusion force in the first cycle is similar to that when the vesicle does not contain cholesterol. No such effect is observed when the extrusion force during the sixth cycle is compared (Figure 7). Again, this result can be rationalized by the alteration of the lipid bilayer permeability to water by the presence of cholesterol, which will change the liposome formation dynamics.

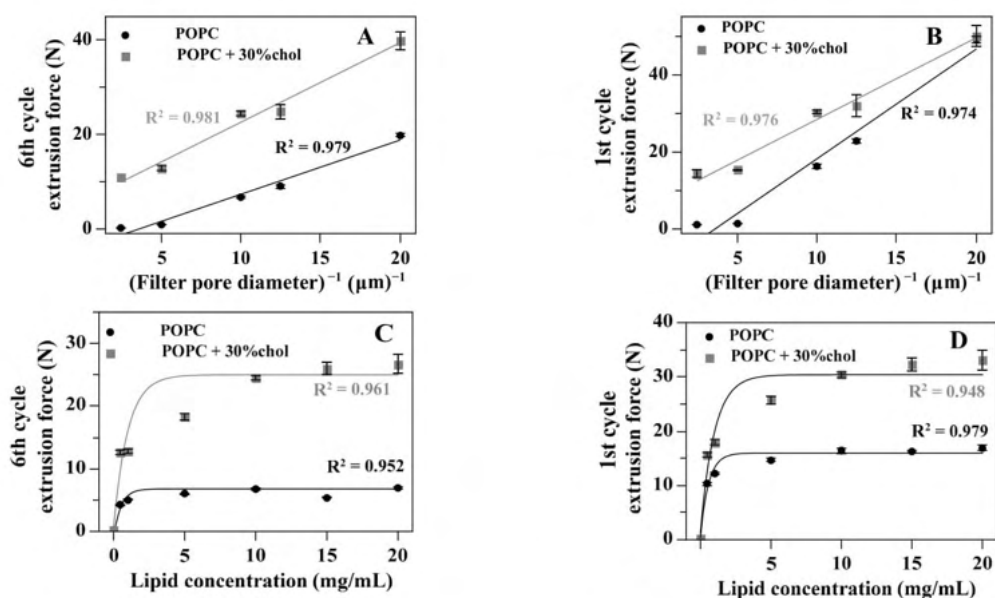


Figure 7. The effect of cholesterol on the dependence of the extrusion force on the extrusion pore size (sixth cycle (A) and first cycle (B)) and lipid concentration (sixth cycle (C) and first cycle (D)).

4. Lipid Mixing in the Extrusion Process

As described earlier, the formation of unilamellar vesicles in the extrusion process requires massive molecular rearrangements [63,72,91,92]. There are two points in the experimental system where final vesicles may form: at the entry (cis side) and at the exit (trans side) of the pore. It has been postulated before that lipid molecules originating from MLVs on the cis side of the membrane are forced into the cylindrical pore of the extrusion membrane. The pore dimensions are: 0.1 and about 10 μm, for pore diameter and length, respectively. During extrusion, elongated lipid structures or final liposomes flow through the pore powered by the hydrostatic pressure difference. At the pore exit, the elongated vesicle breaks down into smaller, unilamellar spherical liposomes with a diameter corresponding to the pore size [82]. The possible topological alterations, which may occur during the extrusion, are schematically presented in Figure 2.

The molecular mechanism of topological alterations upon imposed or released external forces has been correlated with the occurrence of local defects induced by the altered topology of the lipid bilayer [81].

Assuming that molecular processes during liposome recalibration do not differ significantly from those when unilamellar liposomes are formed from multilamellar vesicles, one can predict the outcome of the recalibration process. When a uniform population of unilamellar liposomes is forced through the extrusion membrane with pores of smaller sizes, it is expected that the liposome population is altered with respect to liposome size distribution. In addition, the exchange of lipids between vesicles may take place. Each scenario of the extrusion process will result in different outcomes regarding liposome size distribution and/or lipid mixing. When vesicles are formed from elongated lipid structures at the exit of the extrusion pore (Figure 2B), the resulting liposome population is expected to be homogenous, and there should be an extensive lipid mixing. When liposomes are formed at the entrance of the pore and there is no vesicle fusion at any point (Figure 2A), the outcome should be different. Liposomes will be recalibrated at the pore entrance and will pass the pore in the final form. As a result, there will be no lipid mixing between vesicles, and the resulting liposome suspension should consist of two liposomes populations: one that will correspond to the pore diameter of the membrane used for the recalibration, and the other population formed from the “left-over” lipids.

Lipid mixing and uniformity of the liposome population can be experimentally tested. The possible lipid mixing upon formation of the elongated lipid structure inside the membrane pore can be quantitated using the well-established fluorescence method [93]. In short, vesicles are decorated with two fluorescently labeled lipids. The fluorescence dyes (NBD and Rhodamine) are a well-established combination for detecting the lipid mixing [94]. In order to perform the experiment, three populations of vesicles were prepared, as schematically presented in Figure 8. The method is described in detail in Supplementary Materials. The fluorescence resonance energy transfer (FRET) was used as a quantitative measure of the extent of lipid mixing. In the experiment, two populations of multilamellar or unilamellar liposomes labeled with NBD or Rhodamine were extruded together, and the resulting fluorescence was measured. The outcome of the experiment, as predicted by the liposome formation mechanisms in its final stage, is schematically presented in Figure 9. The vesicles fusion-driven formation of the elongated lipid structure inside the pore should result in lipid mixing, as illustrated in Figure 9A. When the sample is exposed to the excitation light with the wavelength specific to NBD dye (467 nm), the emission spectrum should reflect the energy transfer to rhodamine dye, as shown in Figure 8. When liposomes are formed at the entrance of the pore, the expected outcome of the fluorescent experiment is schematically shown in Figure 9B. The two possible mechanisms of the liposome formation process, when two populations of vesicles labeled with different dyes are extruded together after mixing, will result in different outcomes (Figures 8 and 9).

The experiment has shown that when a mixture of two differently labeled populations of multilamellar liposomes was extruded, no energy transfer between the two dyes was detected (Figures S1–S4, Table S1, Supplementary Material). This indicates that unilamellar liposomes formed during the extrusion process originate from a single multilamellar structure, and no lipid mixing is taking place. A similar result was obtained when two populations of 130 nm unilamellar liposomes were pushed through the extrusion membrane with smaller pores (50 or 80 nm). Here, again, no detectable lipid exchange was measured. The fluorescence experiment points to the scenario when liposomes are formed at the pore entrance, and there is no lipid mixing during the recalibration process. Results of the fluorescence experiments indicate that in the recalibration process, there are two liposome populations differing with respect to the average sizes. In order to test the prediction, quantitative analysis of the electron microscopy images and dynamic light scattering measurements were performed. Figure 10 and Table 1 show results of the examination

of the liposome population when unilamellar liposomes with well-defined sizes (137 or 187 nm) are pushed through membranes with similar or smaller pores (50 or 80 nm).

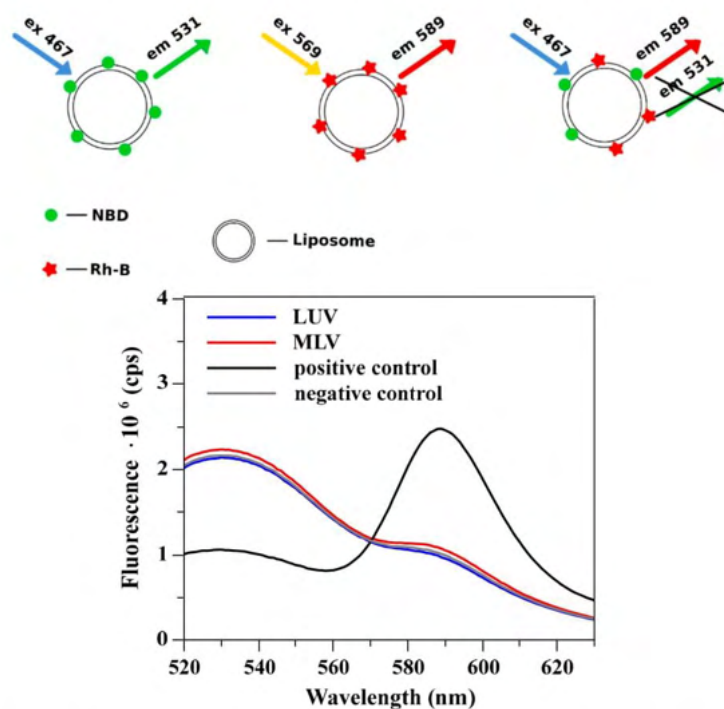


Figure 8. The upper panel shows the liposome labeling method. Liposomes were labeled with a single fluorescent dye or with both of them. Each liposome population has a different fluorescence fingerprint (lower panel). When liposomes were labeled with both dyes, an extensive energy transfer was observed (positive control). For comparison, the fluorescence of liposomes labeled with a single dye (large unilamellar vesicles (LUVs) labeled with either NBD (1-acyl-2-(6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine) or Rh-B (18:1 Liss Rhod PE 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) ammonium salt) fluorescent probe) was mixed and the resulting emission spectrum is presented (negative control-labeled vesicles are mixed without fusing). When LUVs or MLVs (multilamellar vesicles) labeled with a single fluorescent dye were mixed and extruded together, the emission spectrum was similar to that of the negative control. The spontaneous exchange of labeled lipids or other membrane components was excluded due to their high logP (octanol-water partition coefficient) values [95,96].

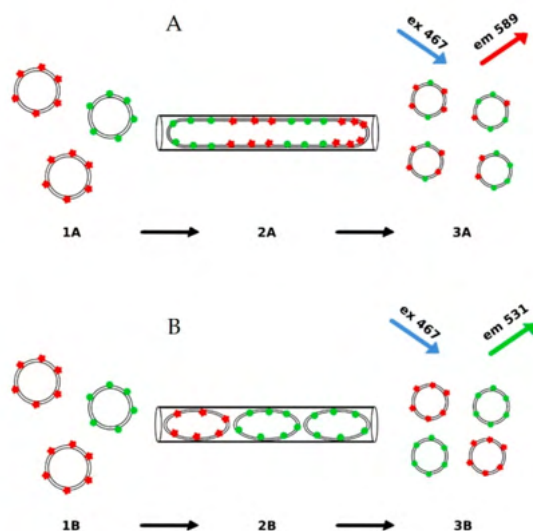


Figure 9. The effect of the liposome formation mechanism on the outcome of the fluorescence experiment when two populations of liposomes, each labeled with different fluorescence dyes, are mixed and extruded. (A) presents the scenario when an elongated lipid structure (2A) forms from large or multilamellar liposomes (1A). When leaving the pore liposomes bud at the pore exit from the elongated lipid aggregate (3A). In this case a significant energy transfer is expected. In the second scenario (B). LUV liposomes are formed at the pore entrance from multilamellar or large liposomes (1B), remain unchanged when passing (2B) and finally leaving (3B) the pore. In this case, the extrusion of the differently labeled liposomes would produce vesicles without lipid mixing. Therefore, no energy transfer between the two labels is expected.

Table 1. The liposomes size determined by two techniques: DLS (Dynamic Light Scattering) and cryo-TEM (Cryogenic electron microscopy). Polydispersity index (PDI) was also shown in the table.

Liposome Suspension	Average Size Determined by DLS Technique (nm) [97] (PDI)	Average Size Determined by cryo-TEM Technique (nm) [97]
LUV100 (liposomes prepared by extrusion through a 100 nm pore/filter)	137 (0.11)	133
LUV200 (liposomes prepared by extrusion through a 200 nm pore/filter)	187 (0.15)	176
R100-50 (extrusion of LUV100 liposomes through a 50 nm pore/filter)	88 (0.05)	62
R100-80 (extrusion of LUV100 liposomes through a 80 nm pore/filter)	118 (0.07)	74
R200-50 (extrusion of LUV200 liposomes through a 50 nm pore/filter)	88 (0.04)	63
R200-80 (extrusion of LUV200 liposomes through a 80 nm pore/filter)	116 (0.06)	80
R200-100 (extrusion of LUV200 liposomes through a 100 nm pore/filter)	132 (0.11)	86

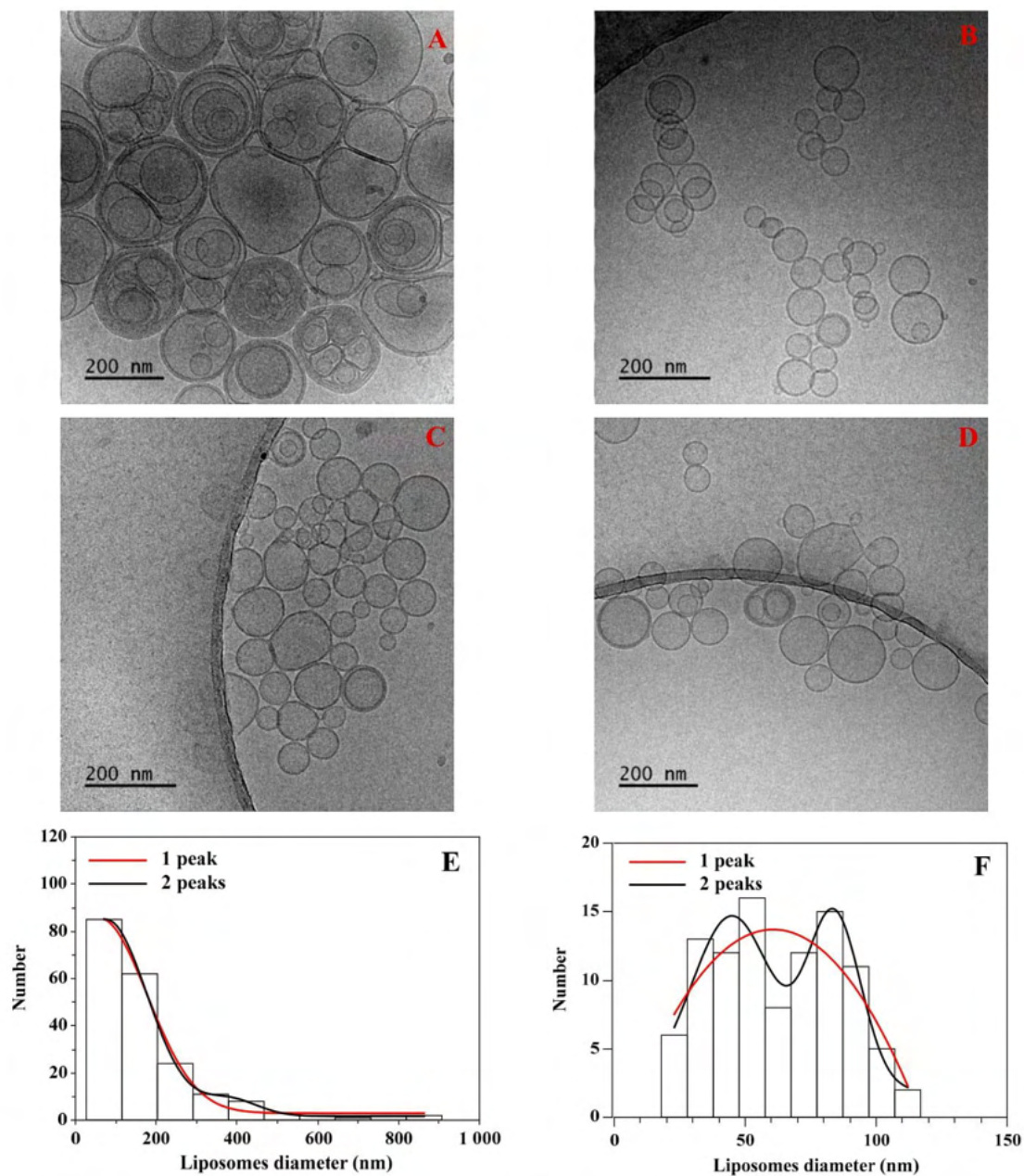


Figure 10. Examples of TEM (Transmission electron microscopy) images (Tecnai F20 X TWIN microscope, FEI Company, Hillsboro, OR, USA) collected for two liposome samples: (A) homogeneously extruded vesicles (200 nm pores), followed by images when liposomes were recalibrated through 50 nm (B), 80 nm (C) and 100 nm (D) membranes. Lower panels show examples of histograms constructed from TEM images for liposomes extruded through 200 nm pores (E) followed by extrusion through 50 nm pores (F). Histograms were fitted with 1 or 2 Gaussian distributions.

Table 1 shows that the average liposome size determined with the two experimental techniques agrees only when the liposome suspension was recalibrated through a mem-

brane with pore sizes equal to those used during the extrusion process (100 or 200 nm). Interestingly, there are large discrepancies between average sizes determined using DLS and TEM techniques. These results show that the scenario when liposomes are formed at the pore opening is most likely. According to the scenario, homogenous populations of liposomes recalibrated through the membrane with smaller pore sizes become heterogeneous, as demonstrated by cryo-TEM images. In the cryo-TEM technique, the liposome size distribution was derived from obtained images. Next, the size distribution was fitted with the single or two population models, and the quality of fitting was used as a method for the differentiation between a homogeneous and heterogeneous vesicle population. The liposome population was quantitatively evaluated using the quality of fitting with a single or two Gaussian distributions. The result of the analysis is presented in Table 2.

Table 2. The correlation coefficient (R^2) for the approximation of the liposome size distribution with one or two Gaussian distributions.

Probe	Single-Gaussian Fitting	Two-Gaussian Fitting
LUV100	0.999	0.995
LUV200	0.998	0.989
R100-50	0.336	0.891
R100-80	0.951	0.973
R200-50	0.377	0.884
R200-80	0.813	0.955
R200-100	0.891	0.962

Analysis of the TEM images obtained for vesicles produced using the extrusion and recalibration processes showed that liposome population is homogeneous, when produced using a single extrusion procedure. When the preformed homogenous unilamellar vesicle population is recalibrated using the membrane with smaller pores, the liposome population becomes heterogeneous, as demonstrated in Figure 10 and Table 2. The effect is especially pronounced when liposome suspensions extruded through 100 or 200 nm pores are recalibrated through a 50 nm filter.

5. Conclusions

The extrusion process, despite its application for liposome formation for decades, is still not well understood. In the paper, a new experimental method for the quantification of the extrusion process was introduced and its effectiveness and reliability demonstrated. The method is based on the measurement of the extrusion forces necessary to ensure the constant volumetric flow through the extrusion filter. The device made it possible to develop the experimental procedure for the quantitative evaluation of mechanical properties of a lipid bilayer, a task difficult to achieve via other means. The linear correlation between bending rigidity, tensile strength, and extrusion forces was demonstrated. Next, the method was used to elaborate on the molecular mechanisms leading to the vesicle formation during the extrusion process. Using the fluorescence energy transfer method, it was demonstrated that there is no liposome fusion and/or lipid mixing inside the extrusion pore, indicating that liposomes following formation remain unchanged even when exposed to mechanical stress. The observation shows that the liposome recalibration process is a result of their fractionation resulting from the degraded homogeneity of the liposome suspension. These findings are relevant for the development and/or application of the liposome formation process using the extrusion method, both for basic science, as a means to produce experimental models, or for applied sciences, where liposomes are intended for pharmacological applications.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ma14154278/s1>, Figure S1. (A)–The fluorescence emission spectra of liposomes labeled with NBD or Rh-B when excited at 467 or 569 nm, respectively. (B)–The fluorescence emission spectra

of liposomes labeled with NBD or Rh-B or with both probes when excited at 467 nm, Figure S2. Panel (A)—Liposomes labelled with NBD or Rh-B were mixed and the fluorescence emission spectra were measured (excitation wavelength equals to 467 nm) after 1 and 72 h. In either case no energy transfer was detected. The mix of liposomes labeled with different fluorescent probes where no energy transfer was detected was used as the negative control. Panel (B)—200 nm LUVs labeled with the NBD or Rh-B probe were prepared. Then the samples were mixed and extruded through filters with a pore diameter of 100, 80 or 50 nm, Figure S3. (A)—The fluorescence emission spectra of sample containing from 0 to 100% liposomes with intrinsic FRET effect. (B)—Effect of number of liposomes with the intrinsic FRET effect on the ratio of fluorescence intensities at 589 and 531 nm when excited at 467 nm, Figure S4. (A)—The fluorescence emission spectra of samples containing liposomes with the Rh-B which concentration equals from 0 to 0.5 mol% (each sample contains 0.5 mol% NBD). (B)—The effect of the Rh-B concentration on the ration of fluorescence intensities at 589 and 531 nm, when excited at 467 nm, Table S1. The quantitative analysis of FRET was determined by the ratio of the fluorescence intensity at 589 nm (Rh-B emission) to 531 nm (NBD emission) after excitation at 467 nm.

Author Contributions: Conceptualization, J.D. and M.L.; methodology, J.D., M.P. and M.L.; formal analysis, J.D., M.L. and A.I.; investigation, J.D., A.F. and A.K.; resources, J.D., M.P., M.L. and B.T.; data curation, J.D., P.D., A.F. and A.K.; writing—original draft preparation, J.D., M.L. and A.I.; writing—review and editing, J.D., P.D., M.L., A.I. and B.T.; visualization, J.D., M.L. and A.I.; supervision, M.L.; funding acquisition, J.D., M.L. and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study received financial support by the Polish National Budget Funds for Science as a research project under the “Diamond Grant” program (Grant No. 0120/DIA/2018/47), a Grant POIR.04.01.04-00-0159/17-00 by the National Centre for Research and Development (NCBiR), and the statutory fund of the Department of Biomedical Engineering, Wrocław University of Science and Technology.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1*, 147–168. [\[CrossRef\]](#)
2. Zylberberg, C.; Matosevic, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: A review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 3319–3329. [\[CrossRef\]](#)
3. Siontorou, C.G.; Nikoleli, G.P.; Nikolelis, D.P.; Karapetis, S.K. Artificial lipid membranes: Past, present, and future. *Membranes* **2017**, *7*, 38. [\[CrossRef\]](#)
4. Murakami, Y.; Zhang, Z.; Taniguchi, T.; Sohgwawa, M.; Yamashita, K.; Noda, M. A high-sensitive detection of several tens of nM of Amyloid-Beta by cantilever-type biosensor immobilized DPPC liposome incorporated with cholesterol. *Procedia Eng.* **2016**, *168*, 565–568. [\[CrossRef\]](#)
5. Zhang, Z.; Sohgwawa, M.; Yamashita, K.; Noda, M. Real-time characterization of fibrillization process of amyloid-beta on phospholipid membrane using a new label-free detection technique based on a cantilever-based liposome biosensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *236*, 893–899. [\[CrossRef\]](#)
6. Weingart, O.G.; Loessner, M.J. Nerve cell-mimicking liposomes as biosensor for botulinum neurotoxin complete physiological activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *313*, 16–23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Chen, H.; Zheng, Y.; Jiang, J.H.; Wu, H.L.; Shen, G.L.; Yu, R.Q. An ultrasensitive chemiluminescence biosensor for cholera toxin based on ganglioside-functionalized supported lipid membrane and liposome. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 684–689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Graça, J.S.; de Oliveira, R.F.; de Moraes, M.L.; Ferreira, M. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome-encapsulated glucose oxidase. *Bioelectrochemistry* **2014**, *96*, 37–42. [\[CrossRef\]](#)
9. Luna, D.M.N.; Oliveira, M.D.L.; Nogueira, M.L.; Andrade, C.A.S. Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *180*, 7–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

10. Et-Thakafy, O.; Delorme, N.; Gaillard, C.; Mériadec, C.; Artzner, F.; Lopez, C.; Guyomarc'h, F. Mechanical properties of membranes composed of gel-phase or fluid-phase phospholipids probed on liposomes by atomic force spectroscopy. *Langmuir* **2017**, *33*, 5117–5126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lasic, D.D. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 307–321. [[CrossRef](#)]
12. Mura, S.; Pirot, F.; Manconi, M.; Falson, F.; Fadda, A.M. Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil. *J. Drug Target.* **2007**, *15*, 101–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Patravale, V.B.; Mandawgade, S.D. Novel cosmetic delivery systems: An application update. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2008**, *30*, 19–33. [[CrossRef](#)]
14. Davis, J.L.; Paris, H.L.; Beals, J.W.; Binns, S.E.; Giordano, G.R.; Scalzo, R.L.; Schweder, M.M.; Blair, E.; Bell, C. Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect against Ischemia–Reperfusion Injury. *Nutr. Metab. Insights* **2016**, *9*, NMI–S39764. [[CrossRef](#)]
15. Langner, M. Effect of liposome molecular composition on its ability to carry drugs. *Pol. J. Pharmacol.* **2000**, *52*, 3–14.
16. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Guo, P.; Liu, D.; Subramanyam, K.; Wang, B.; Yang, J.; Huang, J.; Auguste, D.T.; Moses, M.A. Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 130. [[CrossRef](#)]
18. Yi, X.; Shi, X.; Gao, H. Cellular uptake of elastic nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 098101. [[CrossRef](#)]
19. Tao, S.L.; Desai, T.A. Micromachined devices: The impact of controlled geometry from cell-targeting to bioavailability. *J. Control. Release* **2005**, *109*, 127–138. [[CrossRef](#)]
20. Swanson, J.A.; Hoppe, A.D. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *76*, 1093–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Beningo, K.A.; Wang, Y.L. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 849–856. [[CrossRef](#)]
22. Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D.E. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lipowsky, R. Remodeling of membrane compartments: Some consequences of membrane fluidity. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 253–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Neubauer, M.P.; Poehlmann, M.; Fery, A. Microcapsule mechanics: From stability to function. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *207*, 65–80. [[CrossRef](#)]
25. Sitterberg, J.; Özçetin, A.; Ehrhardt, C.; Bakowsky, U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Briuglia, M.L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D.A. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, *5*, 231–242. [[CrossRef](#)]
27. Duangjit, S.; Pamornpathomkul, B.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Obata, Y.; Takayama, K.; Ngawhirunpat, T. Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2005–2017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Maherani, B.; Arab-Tehrany, E.; Kheirloomoom, A.; Cleymand, F.; Linder, M. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. *Food Chem.* **2012**, *134*, 632–640. [[CrossRef](#)]
29. Tokudome, Y.; Uchida, R.; Yokote, T.; Todo, H.; Hada, N.; Kon, T.; Yasuda, J.; Hayashi, H.; Hashimoto, F.; Sugibayashi, K. Effect of topically applied sphingomyelin-based liposomes on the ceramide level in a three-dimensional cultured human skin model. *J. Liposome Res.* **2010**, *20*, 49–54. [[CrossRef](#)]
30. Bouvrais, H. Bending Rigidities of Lipid Bilayers Their Determination and Main Inputs in Biophysical Studies. *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes* **2012**, *15*, 1–75.
31. Henriksen, J.; Rowat, A.C.; Brief, E.; Hsueh, Y.W.; Thewalt, J.L.; Zuckermann, M.J.; Ipsen, J.H. Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1639–1649. [[CrossRef](#)]
32. Henriksen, J.; Rowat, A.C.; Ipsen, J.H. Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *Eur. Biophys. J.* **2004**, *33*, 732–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Doktorova, M.; Harries, D.; Khelashvili, G. Determination of bending rigidity and tilt modulus of lipid membranes from real-space fluctuation analysis of molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 16808–16816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vitkova, V.; Genova, J.; Finogenova, O.; Ermakov, Y.; Mitov, M.D.; Bivas, I. Surface charge effect on the lipid bilayer elasticity. *CR Acad. Bulg. Sci.* **2004**, *57*, 25–30.
35. Faizi, H.A.; Frey, S.L.; Steinkühler, J.; Dimova, R.; Vlahovska, P.M. Bending rigidity of charged lipid bilayer membranes. *Soft Matter* **2019**, *15*, 6006–6013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, C.H.; Lin, W.C.; Wang, J. All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions. *Phys. Rev. E* **2001**, *64*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bouvrais, H.; Duelund, L.; Ipsen, J.H. Buffers affect the bending rigidity of model lipid membranes. *Langmuir* **2014**, *30*, 13–16. [[CrossRef](#)]
38. Dimova, R. Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *208*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Niggemann, G.; Kummrow, M.; Helfrich, W. The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers: Dependences on experimental method, Sample Cell Sealing and Temperature. *J. Phys. II* **1995**, *5*, 413–425. [[CrossRef](#)]
40. Doscoczek, J.; Drabik, D.; Chodaczek, G.; Przybyło, M.; Langner, M. Statistical analysis of bending rigidity coefficient determined using fluorescence-based flicker-noise spectroscopy. *J. Membr. Biol.* **2018**, *251*, 601–608. [[CrossRef](#)]
41. Gracià, R.S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R.L.; Lipowsky, R.; Dimova, R. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: Fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* **2010**, *6*, 1472–1482. [[CrossRef](#)]
42. Fernandez-Puente, L.; Bivas, I.; Mitov, M.D.; Méléard, P. Temperature and chain length effects on bending elasticity of phosphatidylcholine bilayers. *EPL* **1994**, *28*, 181–186. [[CrossRef](#)]
43. Kocun, M.; Janshoff, A. Pulling tethers from pore-spanning bilayers: Towards simultaneous determination of local bending modulus and lateral tension of membranes. *Small* **2012**, *8*, 847–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Solmaz, M.E.; Sankhagowit, S.; Biswas, R.; Mejia, C.A.; Povinelli, M.L.; Malmstadt, N. Optical stretching as a tool to investigate the mechanical properties of lipid bilayers. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 16632–16638. [[CrossRef](#)]
45. Solmaz, M.E.; Biswas, R.; Sankhagowit, S.; Thompson, J.R.; Mejia, C.A.; Malmstadt, N.; Povinelli, M.L. Optical stretching of giant unilamellar vesicles with an integrated dual-beam optical trap. *Biomed. Opt. Express* **2012**, *3*, 2419. [[CrossRef](#)]
46. Kummrow, M.; Helfrich, W. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A* **1991**, *44*, 8356–8360. [[CrossRef](#)]
47. Rawicz, W.; Olbrich, K.C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E.A. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 328–339. [[CrossRef](#)]
48. Tian, A.; Capraro, B.R.; Esposito, C.; Baumgart, T. Bending stiffness depends on curvature of ternary lipid mixture tubular membranes. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 1636–1646. [[CrossRef](#)]
49. Kučerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J.F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* **2006**, *208*, 193–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Nagle, J.F. Experimentally determined tilt and bending moduli of single-component lipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *205*, 18–24. [[CrossRef](#)]
51. Jablin, M.S.; Akabori, K.; Nagle, J.F. Experimental support for tilt-dependent theory of biomembrane mechanics. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113*, 248102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Guler, S.D.; Ghosh, D.D.; Pan, J.; Mathai, J.C.; Zeidel, M.L.; Nagle, J.F.; Tristram-Nagle, S. Effects of ether vs ester linkage on lipid bilayer structure and water permeability. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *160*, 33–44. [[CrossRef](#)]
53. Levine, Z.A.; Venable, R.M.; Watson, M.C.; Lerner, M.G.; Shea, J.E.; Pastor, R.W.; Brown, F.L.H. Determination of biomembrane bending moduli in fully atomistic simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13582–13585. [[CrossRef](#)]
54. Venable, R.M.; Brown, F.L.H.; Pastor, R.W. Mechanical properties of lipid bilayers from molecular dynamics simulation. *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *192*, 60–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fošnarič, M.; Iglič, A.; May, S. Influence of rigid inclusions on the bending elasticity of a lipid membrane. *Phys. Rev. E Stat. Nonlinear. Soft Matter Phys.* **2006**, *74*, 051503. [[CrossRef](#)]
56. Fošnarič, M.; Bohinc, K.; Gauger, D.R.; Iglič, A.; Kralj-Iglič, V.; May, S. The influence of anisotropic membrane inclusions on curvature elastic properties of lipid membranes. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 1652–1661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Penič, S.; Iglič, A.; Bivas, I.; Fošnarič, M. Bending elasticity of vesicle membranes studied by Monte Carlo simulations of vesicle thermal shape fluctuations. *Soft Matter* **2015**, *11*, 5004–5009. [[CrossRef](#)]
58. Pabst, G.; Heberle, F.A.; Katsaras, J. X-Ray Scattering from Lipid Membranes. *Encycl. Biophys.* **2018**, 1–8. [[CrossRef](#)]
59. Evans, E.A.; Skalak, R. *Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes*; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1980.
60. Cyprych, K.; Procek, J.; Langner, M.; Przybyło, M. Improved method to evaluate the ability of compounds to destabilize the cellular plasma membrane. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 276–282. [[CrossRef](#)]
61. Allhoff, F. *Nanoethics: The Ethical and Social Implications of Nanotechnology*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, USA, 2007.
62. Akioka, K.; Kawaguchi, H.; Kitajima, S.; Miura, N.; Noguchi, M.; Horiuchi, M.; Miyoshi, N.; Tanimoto, A. Investigation of necessity of sodium cholate and minimal required amount of cholesterol for dietary induction of Atherosclerosis in microminipigs. *In Vivo* **2014**, *28*, 81–90.
63. Doscoczek, J.; Dalek, P.; Foryś, A.; Trzebicka, B.; Przybyło, M.; Mesarec, L.; Iglič, A.; Langner, M. The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2020**, *1862*, 183361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lapinski, M.M.; Castro-Forero, A.; Greiner, A.J.; Ofoli, R.Y.; Blanchard, G.J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir* **2007**, *23*, 11677–11683. [[CrossRef](#)]
65. Ong, S.G.M.; Chitneni, M.; Lee, K.S.; Ming, L.C.; Yuen, K.H. Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics* **2016**, *8*, 36. [[CrossRef](#)]
66. Liu, R. *Water-Insoluble Drug Formulation*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2000.
67. MacDonald, R.C.; MacDonald, R.L.; Menco, B.P.M.; Takeshita, K.; Subbarao, N.K.; Hu, L.R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *BBA Biomembr.* **1991**, *1061*, 297–303. [[CrossRef](#)]
68. Hunter, D.G.; Frisken, B.J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2996–3002. [[CrossRef](#)]

69. Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G.; Cullis, P.R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *BBA Biomembr.* **1985**, *812*, 55–65. [[CrossRef](#)]
70. Bruinsma, R. Rheology and shape transitions of vesicles under capillary flow. *Phys. A Stat. Mech. Appl.* **1996**, *234*, 249–270. [[CrossRef](#)]
71. Gompper, G.; Kroll, D.M. Driven transport of fluid vesicles through narrow pores. *Phys. Rev. E* **1995**, *52*, 4198–4208. [[CrossRef](#)]
72. Frisken, B.J.; Asman, C.; Patty, P.J. Studies of vesicle extrusion. *Langmuir* **2000**, *16*, 928–933. [[CrossRef](#)]
73. Rossier, O.; Cuvelier, D.; Borghi, N.; Puech, P.H.; Derényi, I.; Buguin, A.; Nassoy, P.; Brochard-Wyart, F. Giant vesicles under flows: Extrusion and retraction of tubes. *Langmuir* **2003**, *19*, 575–584. [[CrossRef](#)]
74. Patty, P.J.; Frisken, B.J. The pressure-dependence of the size of extruded vesicles. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 996–1004. [[CrossRef](#)]
75. Hinna, A.; Steiniger, F.; Hupfeld, S.; Stein, P.; Kuntsche, J.; Brandl, M. Filter-extruded liposomes revisited: A study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. *J. Liposome Res.* **2016**, *26*, 11–20. [[CrossRef](#)]
76. Bangham, A.D.; de Gier, J.; Greville, G.D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chem. Phys. Lipids* **1967**, *1*, 225–246. [[CrossRef](#)]
77. Mayer, L.D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *BBA Biomembr.* **1986**, *858*, 161–168. [[CrossRef](#)]
78. Stewart, J.C.M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 10–14. [[CrossRef](#)]
79. Olbrich, K.; Rawicz, W.; Needham, D.; Evans, E. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 321–327. [[CrossRef](#)]
80. Mui, B.L.; Cullis, P.R.; Evans, E.A.; Madden, T.D. Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 443–453. [[CrossRef](#)]
81. Penič, S.; Mesarec, L.; Fošnarič, M.; Mrówczyńska, L.; Hägerstrand, H.; Kralj-Iglič, V.; Iglič, A. Budding and fission of membrane vesicles: A mini review. *Front. Phys.* **2020**, *8*, 342. [[CrossRef](#)]
82. Clerc, S.G.; Thompson, T.E. A possible mechanism for vesicle formation by extrusion. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 475–476. [[CrossRef](#)]
83. Arriaga, L.R.; Rodríguez-García, R.; Moleiro, L.H.; Prévost, S.; López-Montero, I.; Hellweg, T.; Monroy, F. Dissipative dynamics of fluid lipid membranes enriched in cholesterol. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *247*, 514–520. [[CrossRef](#)]
84. Ibgare, M.; Alonso, A.; Tenchov, B.G.; Goñi, F.M. Quantitation of cholesterol incorporation into extruded lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 1735–1738. [[CrossRef](#)]
85. Jousma, H.; Talsma, H.; Spies, F.; Joosten, J.G.H.; Junginger, H.E.; Crommelin, D.J.A. Characterization of liposomes The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *Int. J. Pharm.* **1987**, *35*, 263–274. [[CrossRef](#)]
86. Boal, D.; Boal, D.H. *Mechanics of the Cell*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2012.
87. Rawicz, W.; Smith, B.A.; McIntosh, T.J.; Simon, S.A.; Evans, E. Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4725–4736. [[CrossRef](#)]
88. Duwe, H.P.; Kaes, J.; Sackmann, E. Bending elastic moduli of lipid bilayers: Modulation by solutes. *J. Phys.* **1990**, *51*, 945–961. [[CrossRef](#)]
89. Needham, D.; Nunn, R.S. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.* **1990**, *58*, 997–1009. [[CrossRef](#)]
90. Pan, J.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J.F. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys. Rev. E* **2009**, *80*, 021931. [[CrossRef](#)]
91. Parthasarathy, T.A.; Rao, S.I.; Dimiduk, D.M.; Uchic, M.D.; Trinkle, D.R. Contribution to size effect of yield strength from the stochastics of dislocation source lengths in finite samples. *Scr. Mater.* **2007**, *56*, 313–316. [[CrossRef](#)]
92. Scott, H.L.; Skinkle, A.; Kelley, E.G.; Waxham, M.N.; Levental, I.; Heberle, F.A. On the mechanism of bilayer separation by extrusion, or why your LUVs are not really unilamellar. *Biophys. J.* **2019**, *117*, 1381–1386. [[CrossRef](#)]
93. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science & Business Media: Berlin, Germany, 2006.
94. Mattijus, P.; Molotkovsky, J.G.; Smaby, J.M.; Brown, R.E. A fluorescence resonance energy transfer approach for monitoring protein-mediated glycolipid transfer between vesicle membranes. *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 297–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Breton, M.; Leblond, J.; Tranchant, I.; Scherman, D.; Bessodes, M.; Herscovici, J.; Mignet, N. Lipothioureas as lipids for gene transfection: A review. *Pharmaceuticals* **2011**, *4*, 1381–1399. [[CrossRef](#)]
96. Box, K.J.; Comer, J.E.A. Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. *Curr. Drug Metab.* **2008**, *9*, 869–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Kauscher, U.; Stuart, M.C.; Drücker, P.; Galla, H.J.; Ravoo, B.J. Incorporation of amphiphilic cyclodextrins into liposomes as artificial receptor units. *Langmuir* **2013**, *29*, 7377–7383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Material

The Elucidation of the Molecular Mechanism of the Extrusion Process

Joanna Doskocz ^{1,2,*}, Paulina Dalek ^{1,2}, Magdalena Przybyło ^{1,2}, Barbara Trzebicka ³, Aleksander Forys ³, Anastasiia Kobylukh ³, Aleš Iglič ^{4,5} and Marek Langner ^{1,2}

¹ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology Wrocław, University of Science and Technology, pl. Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław, Poland; paulina.dalek@pwr.edu.pl (P.D.); magdalena.przybylo@pwr.edu.pl (M.P.); marek.langner@pwr.edu.pl (M.L.)

² Lipid Systems sp. z o.o., ul. Krzemieniecka 48C, 54-613 Wrocław, Poland

³ Centre of Polymers and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, ul. M. Curie-Skłodowskiej, 41-819 Zabrze, Poland; btrzebicka@cmpw-pan.edu.pl (B.T.); aforys@cmpw-pan.edu.pl (A.F.); akobyliukh@cmpw-pan.edu.pl (A.K.)

⁴ Laboratory of Physics, Department of Fundamentals of Electrical Engineering, Mathematics and Physics, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; ales.iglic@fe.uni-lj.si

⁵ Laboratory of Clinical Biophysics, Department of Orthopedics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška 9, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

* Correspondence: joanna.doskocz@pwr.edu.pl

The mechanism of liposome extrusion process based on the fusion of liposomes and formation of elongated lipid structures inside the membrane pore during the extrusion process were verified using the lipid mixing assay. Specifically, two populations of liposomes containing different fluorescently labelled lipids were extruded together. The extend of resonance energy transfer (FRET) was used as a quantitative measure of the lipid mixing. For that purpose two fluorophores has been used; NBD and Rh-B probes.

The fluorescence of LUV labelled by NBD or Rh-B is shown in Figure S1A. For NBD and Rh-B the maximum fluorescence intensity was measured when excitation/emission wavelength equals 467/531 and 569/589 nm, respectively. The fluorescence emission when liposomes were labelled with both probes is shown in Figure S1B. The obtained emission spectra show the efficient FRET effect between NBD and Rh-B probes. Liposomes labelled with both fluorescent probes will be considered as the positive control.

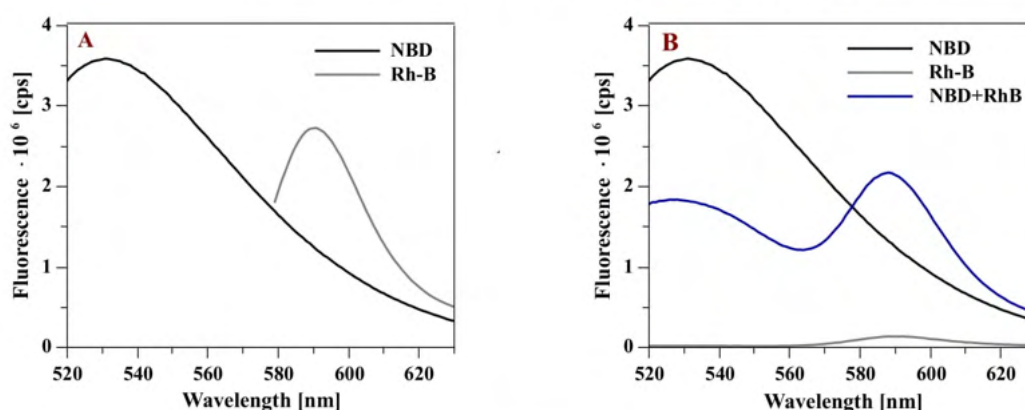


Figure S1. (A)–The fluorescence emission spectra of liposomes labeled with NBD or Rh-B when excited at 467 or 569 nm, respectively. (B)–The fluorescence emission spectra of liposomes labeled with NBD or Rh-B or with both probes when excited at 467 nm.

The negative control, when no lipid mixing take place, consists of mixture of liposomes labeled with a single fluorescence probe. In this case no energy transfer was detected as shown in Figure S2B. The result did not change after incubation of liposome mixture for 72 h indicating that there are no spontaneous liposome fusion.

When mixture of LUVs or MLVs labelled with NBD or Rh-B probes were recalibrated or extruded there were no detectable energy transfer (Figure 8). The collected spectra were similar to that obtained for the negative control. The effect of the filter pore diameter on the efficiency of FRET was also checked. For this purpose, LUVs labelled by the NBD or Rh-B probe were prepared using membrane with 200 nm pores. Then the samples were mixed and extruded through filters with a pore diameter of 100, 80 or 50 nm. The obtained results are shown in Figure 2SB. The quantitative analysis of the FRET effect was quantitated using the ratio of the fluorescence intensity at 589 nm (Rh-B emission) to 531 nm (NBD emission) after excitation with 467 nm. The obtained result is shown in Table S1.

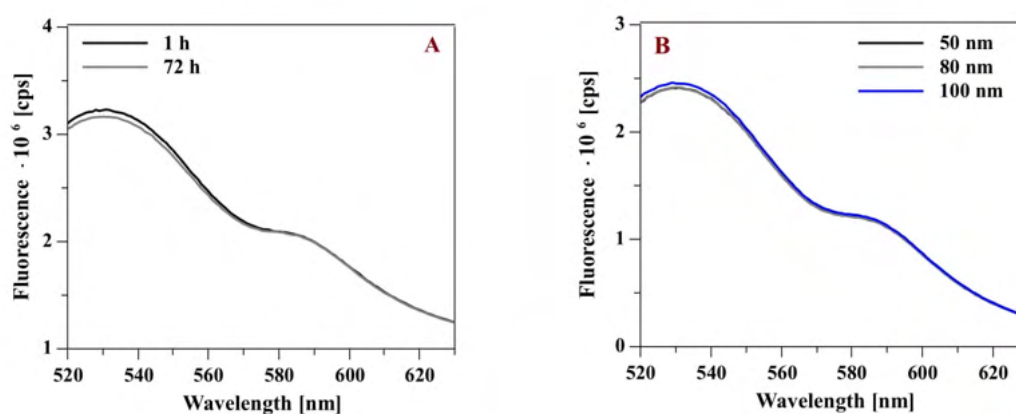


Figure S2. Panel (A)—Liposomes labelled with NBD or Rh-B were mixed and the fluorescence emission spectra were measured (excitation wavelength equals to 467 nm) after 1 and 72 h. In either case no energy transfer was detected. The mix of liposomes labeled with different fluorescent probes where no energy transfer was detected was used as the negative control. Panel (B)—200 nm LUVs labeled with the NBD or Rh-B probe were prepared. Then the samples were mixed and extruded through filters with a pore diameter of 100, 80 or 50 nm.

Table S1. The quantitative analysis of FRET was determined by the the ratio of the fluorescence intensity at 589 nm (Rh-B emission) to 531 nm (NBD emission) after excitation at 467 nm.

Probes	F ₅₈₉ /F ₅₃₁ (-)
Positive control (liposomes labeled with two probes, Figure S1B)	1.10 ± 0.14
Negative control (mixed liposomes labeled with one of two probes, Figure S2A)	
After 1 h	0.45 ± 0.03
After 72 h	0.47 ± 0.03
Mixed liposomes labeled with different probes and then extruded (Figure 8)	
LUV	0.45 ± 0.02
MLV	0.48 ± 0.03
Mixed liposomes labeled with one probe and then extruded using filter pore with different size (Figure S2B)	
100 nm	0.47 ± 0.01
80 nm	0.47 ± 0.02
50 nm	0.47 ± 0.02

In order to determine the detection limit of the FRET-based method (the minimum level of lipid mixing detectable with the FRET effect). For this purpose, liposomes labelled with NBD and Rh-B (the positive control) were mixed with Rh- or NBD-labeled liposomes (not FRET probes—negative control). As a result, samples containing from 0 to 100% liposomes with the maximum FRET effect were obtained. Then the fluorescence emission spectra were measured (Figure S3A) and the ratio of fluorescence intensities at 589 and 531 nm was determined (Figure S3B). The dependence of the ratio determined for liposome mixtures on the fraction of liposomes with intrinsic FRET effect is a linear function.

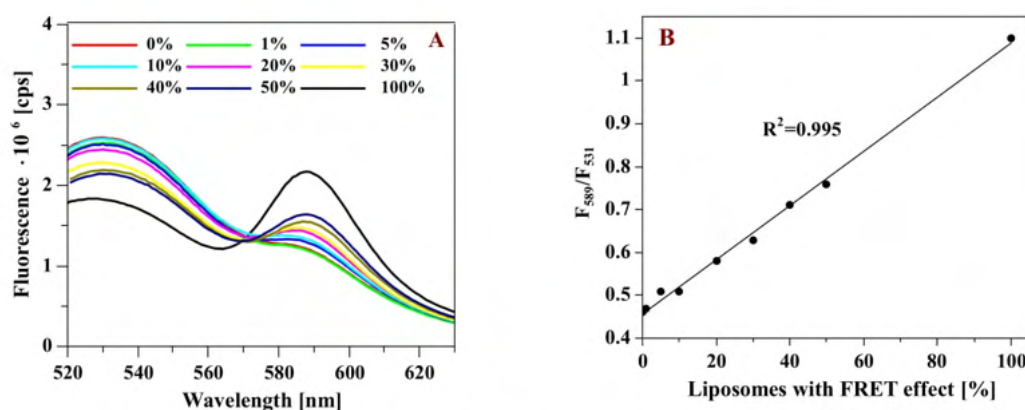


Figure S3. (A)—The fluorescence emission spectra of sample containing from 0 to 100% liposomes with intrinsic FRET effect. (B)—Effect of number of liposomes with the intrinsic FRET effect on the ratio of fluorescence intensities at 589 and 531 nm when excited at 467 nm.

Additionally, the minimum amount of Rh-B probe on the liposomes to observe the FRET effect was determined. For that purpose, liposomes labeled with NBD (constant value) and Rh-B (variable value) were prepared. Each sample contains the same number of liposomes. The NBD concentration equals 0.5 mol% and Rh-B concentration equals between 0 to 0.5 mol%. Then the sample fluorescence emission spectra were measured (Figure S4A) and the ratio of fluorescence intensities at 589 and 531 nm, when excited at 467 nm was determined (Figure S4B). Obtained data show that the dependence of the ration of the fraction of the acceptor (Rh-B) in the lipid bilayer can be approximated with the linear function.

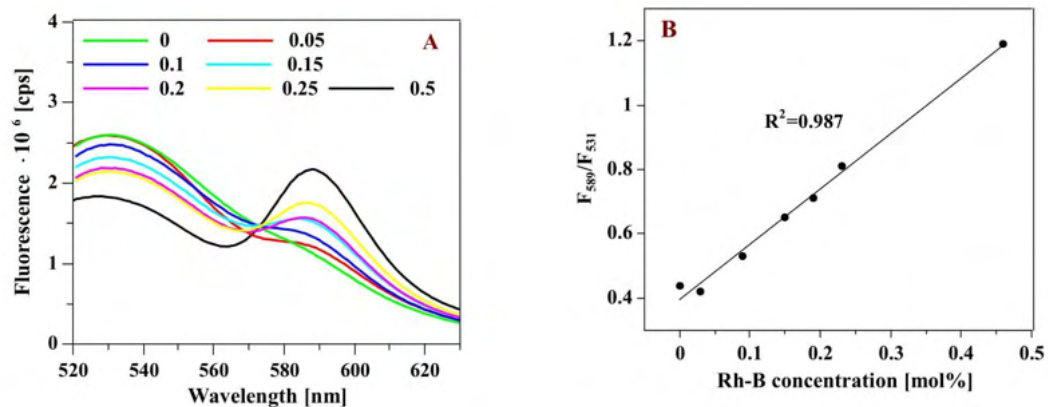


Figure S4. (A)—The fluorescence emission spectra of samples containing liposomes with the Rh-B which concentration equals from 0 to 0.5 mol% (each sample contains 0.5 mol% NBD). (B)—The effect of the Rh-B concentration on the ration of fluorescence intensities at 589 and 531 nm, when excited at 467 nm.

The method detection limit (*LOD*) was calculated based on equation:

$$LOD = \frac{3 \times sd}{a} \quad (1)$$

where *sd* and *a* indicate a standard deviation and the slope of the calibration curve, respectively.

Received results indicate that FRET effect is recorded if the sample contains at least 2.8% of liposomes labelled with Rh-B and NBD together. Additionally, the detection of FRET effect requires at least 0.06 mol% Rh-B in liposomes.