

Kohleát nanorészecskék biofizikai jellemzése

Doktori tézisek

Dr. Bozó Tamás

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós S. Z., DSc.,
egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Budai Livia, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Kunsági-Máté Sándor, PhD.,
egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ludányi Krisztina, PhD., egyetemi docens
Dr. Grama László, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

A kohleátok spirálisan feltekeredő foszfolipid kettősrétegekből álló, Ca^{2+} -ionok által stabilizált membrántekercsek. Méretük a mikro-nano mérettartományba esik, jellemzően néhány mikrométer hosszúak, és néhány száz nanométer átmérőjűek. A kohleátokban a rétegek közötti ismétlődési távolság 5,1 nm, ami arra utal, hogy a kettősrétegű lipidmembránok közvetlenül egymásnak fekszenek, és a rétegek között nem található számottevő vizes térrész. A kohleátképződés kulcsa a foszfolipid molekula (leggyakrabban foszfatidilszerin, PS) és a kétértékű kationok (általában Ca^{2+}) közötti kölcsönhatás. A Ca^{2+} 1:2 sztöchiometriájú komplexet képez a foszfatidilszerin molekulákkal, azonban a Ca^{2+} és a PS közötti kölcsönhatás részletei máig sem teljesen tisztázottak. A kohleátok előállítására számos módszert dolgoztak ki. Ezek közös jellemzője, hogy negatív töltésű foszfolipidekből felépülő liposzómákat (illetve egyes esetekben a szolubilizált, vagy szerves oldószerben oldott foszfolipideket) elegyítenek Ca^{2+} -ionokkal.

A kohleát membrántekercseket nagyon hamar mint potenciális hatóanyag-hordozó rendszereket kezdték vizsgálni. *Amfotericin B*, antituberkulotikumok és egyéb antibiotikumok, protozoon-ellenes *miltefosine*, VIII-as véralvadási faktor, antitumorális hatású *raloxifen*, illetve egy gyulladások és autoimmun kórképek kezelésére alkalmazott kísérleti hatóanyag kohleátokba zárásáról és sikeres alkalmazásáról is olvashatunk a szakirodalomban. Ugyanakkor a kohleátok mint hatóanyag-hordozó rendszerek, ígéretes tulajdonságaik ellenére, egyelőre nem futottak be fényes karriert a publikációk, szabadalmak, illetve különösen a törzskönyvezett készítmények számát tekintve. Azt gondolom, hogy ez a viszonylagos sikertelenség jól azonosítható szakmai hiányosságokra és technológiai problémákra vezethető vissza, melyek közül meghatározó fontosságú, hogy: (1) a kohleátképződés mechanizmusa máig sem pontosan ismert, és hogy (2) a kohleátok és nem kohleát melléktermékek egymással szorosan aggregálódva találhatóak a mintákban. Kívánatos lenne tehát a kohleátok képződési mechanizmusának pontosabb megismerése, és hatékony aggregáció-gátló, vagy az aggregátumokat szétválasztó eljárás kidolgozása. Ezen problémák megoldása előremozdíthatná a kohleát alapú hatóanyag-hordozó rendszerek fejlesztését.

2. Célkitűzések

Munkám során a kohleát rendszerek tulajdonságainak mélyebb megismerésére, valamint olyan technológiai megoldások kifejlesztésére törekedtem, amelyek a kohleátok hatóanyag-hordozóként való alkalmazását segítik elő. Célkitűzéseimet az alábbiakban foglalom össze:

- (1) **Kohleátok kialakulási mechanizmusának pontosabb megismerése:** Céлом volt feltárni, milyen mechanizmussal alakulnak ki a kohleát membrántekercsek. Ezért elhatároztam, hogy, különböző, jól kontrollált kísérleti feltételeket alkalmazva, DOPS liposzómák és Ca^{2+} -ionok elegyítésével kohleát rendszereket hozok létre, és atomerő-mikroszkóppal (AFM) követem a kohleátok kialakulását.
- (2) **Kohleátok mechanikai tulajdonságainak és szerkezetének jellemzése:** A korábbi DSC és IR vizsgálatok alapján egyértelműnek gondolható, hogy a kohleátok képződése során a fluid folyadékkristályos állapotú foszfolipidek rigid, kristályos állapotba kerülnek. Ugyanakkor nem áll rendelkezésre adat arra vonatkozóan, milyen konkrét következményekkel jár ez az átalakulás a foszfolipid kettősrétegek, illetve a részecske egészének mechanikájára. Elhatároztam, hogy feltárom a membrántekercsek mechanikai tulajdonságait és AFM képalkotás, valamint erőspektroszkópia segítségével egyedi részecskék szintjén jellemzem a kohleátok topográfiáját és belső szerkezetét.
- (3) **Aggregált kohleátok diszpergálása:** A kohleátok képződésük közben nagymértékben és erősen aggregálódnak, ami a kohleát hatóanyag-hordozó rendszerek kifejlesztésének, vizsgálatának és alkalmazásának első számú akadálya. Ezért célul tűztem ki, hogy az aggregált kohleátok diszpergálására alkalmas, a kohleátok szerkezetét nem roncsoló módszert dolgozzak ki.

3. Módszerek

3.1. Lipidrendszerek előállítása

Vékonyfilm-hidratációs technikával 12,4 mM DOPS koncentrációjú multilamelláris vezikula (MLV) szuszpenziót állítottunk elő. Ezt 100 nm pórusméretű polikarbonát membránszűrőn átpréselve kis unilamelláris vezikulákhoz (SUV-okhoz) jutottunk. A kohleátokat úgy állítottuk elő, hogy a SUV-okat CaCl_2 oldattal elegyítettünk gyors elegyítéssel (ezeket a szerkezeti-nanomechanikai kísérletekhez használtuk), vagy dialízissel (a diszpergálási kísérletekhez). A keletkezett szuszpenzió névleges DOPS és Ca^{2+} koncentrációja 6,2 mM volt.

3.2. Kohleátok diszpergálása

A vizsgált lehetséges diszpergálószerkezetek (nátrium-acetát trihidrát; nátrium-tartarát dihidrát; trinátrium-citrát dihidrát; dinátrium-edetát) kívánt koncentrációjú oldatainak 10 μl -ét hozzáadtuk 10 μl kohleát mintához, majd a pipetta hegyén 50-szer oda-vissza átpréselve alaposan összekevertük. Stabil kolloid rendszer létrehozásához az így keletkező diszperzió oldatfázisából a szabad citrát- és kalciumionokat puffercserével eltávolítottuk.

3.3. Szerkezeti és mechanikai vizsgálatok

A mintákban található részecskék morfológiáját fáziskontraszt- és atomerő-mikroszkópos képalkotás segítségével vizsgáltuk. A kohleátok mechanikai tulajdonságait *in situ* AFM erőspektroszkópia segítségével tártuk fel. Az AFM képeket és erőgörbéket a műszerhez tartozó szoftver beépített algoritmusai segítségével elemeztük. A részecskék belső szerkezetét kissetűző röntgenszórás mérés (SAXS) segítségével tártuk fel.

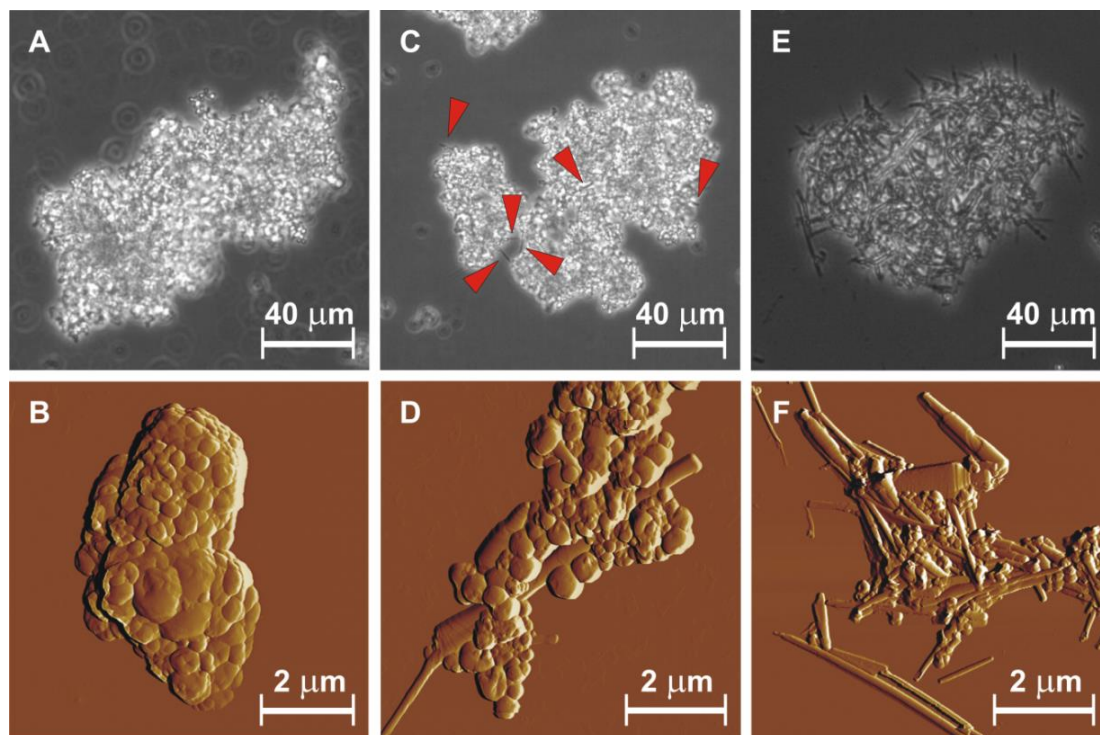
3.4. Felületi töltés és molekuláris kölcsönhatások vizsgálata

A DOPS membrán felületi töltéssűrűség Ca^{2+} koncentrációfüggésének vizsgálatára zéta potenciál méréseket végeztünk. A Ca^{2+} , illetve diszpergálószerkezet indukálta molekuláris kölcsönhatásokat ATR-FTIR spektroszkópiával vizsgáltuk.

4. Eredmények

4.1.1. Kohleátok kialakulása

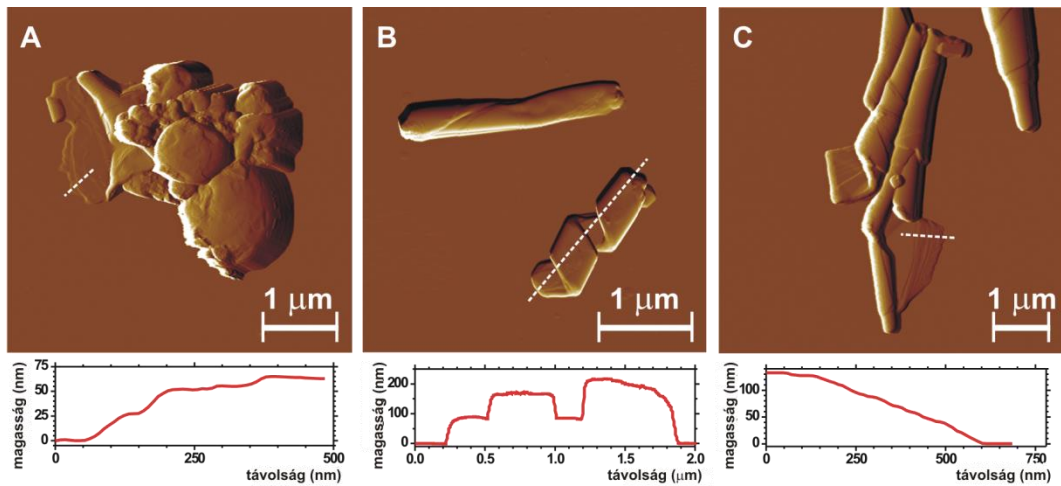
A DOPS SUV-ok felületi töltésének abszolút értéke koncentrációfüggő módon, jelentősen csökkent Ca^{2+} hozzáadására. A kohleátok előállítása során azt tapasztaltuk, hogy a liposzómákat tartalmazó enyhén opálos oldat és a víztiszta CaCl_2 oldat elegyítésekor csapadék képződött, amely szabálytalan alakú, több tíz mikrométer átmérőjű aggregátumokból állt (1. A ábra). Atomerő-mikroszkópos képalkotás során világossá vált, hogy az aggregátumok változatos méretű vezikulákból állnak, megnyúlt, kohleátra emlékeztető struktúrákat nem vagy legfeljebb elvétve találtunk bennük (1. B ábra).



1. ábra Gyors elegyítéssel készült kohleát minták fáziskontraszt (felső sor) és AFM amplitúdó-kontraszt (alsó sor) képe a gyártás után közvetlenül (A és B); 1 hét múlva (C és D); illetve 1 hónap múlva (E és F). A piros nyílhegyek a hosszúkás objektumok azonosítását segítik.

Fáziskontraszt-mikroszkóppal megfigyeltük, hogy a kezdetben szinte csak vezikulák alkotta aggregátumokban idővel (napok-hetek alatt) egyre több hosszúkás struktúra jelent meg (1. C és E ábrák). Ezeknek a hosszúkás struktúráknak a

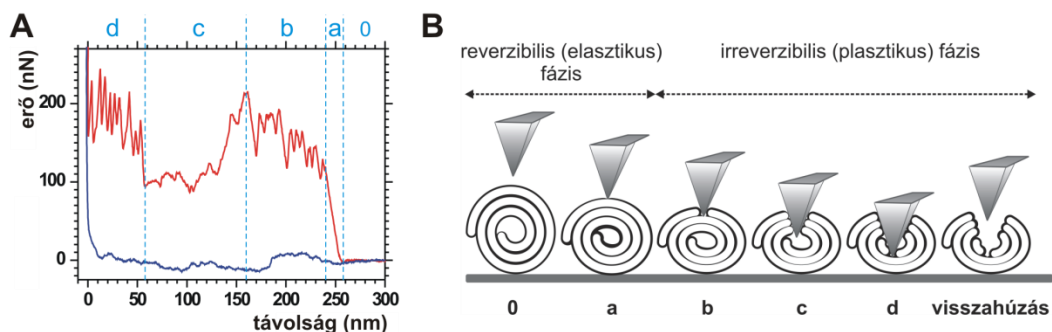
nagyfelbontású AFM-topográfiai képe megfelel a korábban javasolt kohleát modellnek (1. D és F ábrák). A kohleátokhoz gyakorta asszociálódtak lipid vezikulák. Néhány esetben részleges tekeredettséget mutató kohleát részecskéket figyelhettünk meg (2. ábra). A tekeredő lemez magassága a kettősrétegű foszfolipid membrán vastagságának többszöröse volt. Kohleátképződést csak vizes közegű mintákban figyeltünk meg, a minták felületre szárítása után nem jelentek meg további kohleátok az idő múlásával.



2. ábra Részleges tekeredettséget mutató kohleátok AFM amplitúdó-kontraszt képe. A szaggatott fehér vonal mentén mért magasságprofilt a képek alatt jelenítettük meg.

4.1.2. Kohleátok mechanikai jellemzése

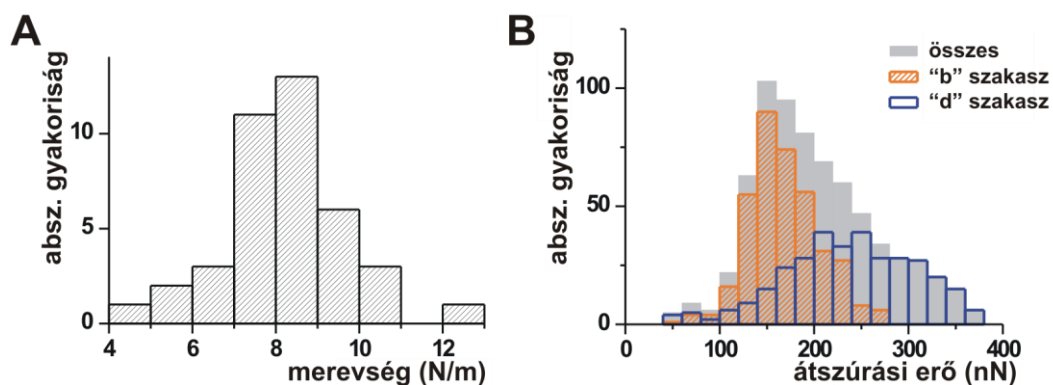
Egyedi kohleát részecskék AFM erőspektroszkópos mechanikai vizsgálata során jellegzetes erőspektrumokat regisztráltunk, melyek a kohleátok nanomechanikai ujjlenyomatának tekinthetőek (3. ábra).



3. ábra (A) Reprezentatív erőspektrum. A vörös vonal a rugólapka közelítése, míg a kék a távolítása során rögzített erőket ábrázolja a csillámfelszíntől való távolság függvényében. (B) Az erőspektrum szakaszainak sémás magyarázata.

A benyomási görbe öt, jól elkülöníthető szakaszra osztható. A „0” szakaszban nem hat erő a rugólapkára. Az „a” szakaszban az erő meredeken, lineárisan növekszik, ami egy ponton, a „b” szakasz kezdeténél, fűrészfogszerű erőcsúcsok sorozatába megy át. Ez a részecske ideálisan rugalmas viselkedését, majd rétegről-rétegre történő átszakítását mutatja. A „c” szakaszban az előző szakasz fűrészfogainál kisebb erővel jelentkező és kevésbé strukturált rész következik, a túl ekkor hatol be a részecske belső üregébe. A „d” szakaszban ismét egy erőcsúcsok sokaságából álló rész követ, ami az alsó rétegek fokozatos átszúrásának következménye. A „d” szakasz végén az erő hirtelen, meredeken megnő, amikor a túl eléri a merev hordozófelszínt. A visszahúzási görbe meglehetősen jellegtelen. A nyomási és visszahúzási görbe között számottevő hiszterézis jelentkezett.

Az erőgörbe kezdeti, lineáris szakaszának meredeksége felel meg a membrántekercs merevségének (vagy rugóállandójának), ennek eloszlását a 4. ábra A panelje mutatja. Az átszúrással szembeni ellenállóképesség az átszúráshoz szükséges erők értékével, vagyis az erőgörbe „b” és „d” szakaszainak csúcsaihoz tartozó erőkkel jellemezhető (eloszlását a 4. ábra B részén ábrázoltuk). Ugyanazon pontban ismételt erőspektroszkópia során mindössze az első terhelési ciklusban regisztráltuk a kohleátokra jellemző, a 3. ábrán bemutatotthoz hasonló erőgörbét. Az ezt követő ciklusok erőgörbéi jelentősen különböztek az elsőtől: nem voltak tettenérhetőek a jellegzetes erőátmenetek és számottevő hiszterézis sem. A részecskéken az AFM tű alakját hordozó benyomódások voltak megfigyelhetőek.



4. ábra (A) Kohleátok merevségének hisztogramja ($n=40$). (B) Átszúrási erőcsúcsok hisztogramja ($n_b=373$ and $n_d=330$).

4.1.3. Mechanikai jellemzés vizes közegben

Vizes közegben is vizsgáltuk a kohleátok morfológiáját és mechanikai tulajdonságait AFM segítségével. Megállapíthattuk, hogy a kohleátok és kialakulási melléktermékeik morfológiája vizes közegben és száraz formájukban gyakorlatilag megegyezik. A száraz és a vizes közegű kohleátok erőspektrumai, különösen azok benyomási erőgörbéinek kezdeti szakaszai, nagyfokú hasonlóságot mutattak. A száraz és a vizes közegű kohleátok erőgörbéinek elemzése során nyert fő mechanikai jellemzők (I. táblázat) hasonlóak voltak egymáshoz. Figyelemreméltó, hogy a vizes közegű kohleátok plasztikus deformációjának nyomai az erőgörbék felvétele után mintegy negyedórával is jól megfigyelhetőek maradtak.

I. táblázat. Száraz és vizes közegű kohleátok mechanikai jellemzői (átlag±SD)

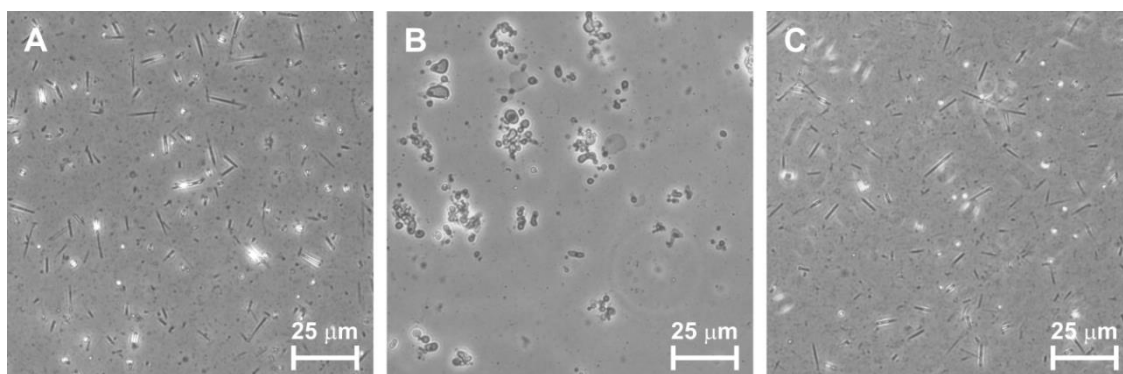
	Száraz kohleátok	Vizes közegű kohleátok
Merevség	5,08±3,69 N/m	5,17±6,61 N/m
Átszűrési erők*	81,23±18,77 nN	63,76±38,63 nN
Csúcs-csúcs távolságok	15,22±7,16 nm	17,79±10,05 nm
Vonalmenti feszültség	kb. 1,2 nN	kb. 1,2 nN

** Az átlagok különböznek, de az erők eloszlásának fő csúcsai egybeesnek. Az átlagok eltérését egy, a vizes közegben türe tapadó lipid kettősréteg átszűréséből származó adatok okozzák. Részleteket lsd. a disszertációban.*

4.1.4. Kohleátok diszpergálása

Feltételeztük, hogy a kohleát membrántekercsek belső rétegei között található Ca^{2+} -ionok nehezebben hozzáférhetőek a kelátképzők számára, mint a felszíni fejcsoportokhoz kapcsolódó, a részecskék aggregációját kiváltó társaik. Amennyiben ez igaz, akkor egy megfelelő Ca^{2+} -affinitással rendelkező molekula csak a részecskék felszínéről távolítaná el a Ca^{2+} -ionokat. Ez előidézné az aggregátumok szétesését, de nem érintené a kohleátok szerkezeti stabilitását. Ezen hipotézis vizsgálatára szisztematikus elemzésnek vetettük alá az ecetsav, borkósav és citromsav és EDTA nátriumsóinak az aggregátumokra kifejtett hatását. Az acetátionok még 500 mM koncentrációban sem tudták szétbontani az aggregátumokat. A tartarátot 500 mM-os koncentrációban alkalmazva az aggregátumok csak részlegesen estek szét. Ezzel szemben a citrátionok koncentrációfüggő módon diszpergálták a kohleátokat. A 0-150

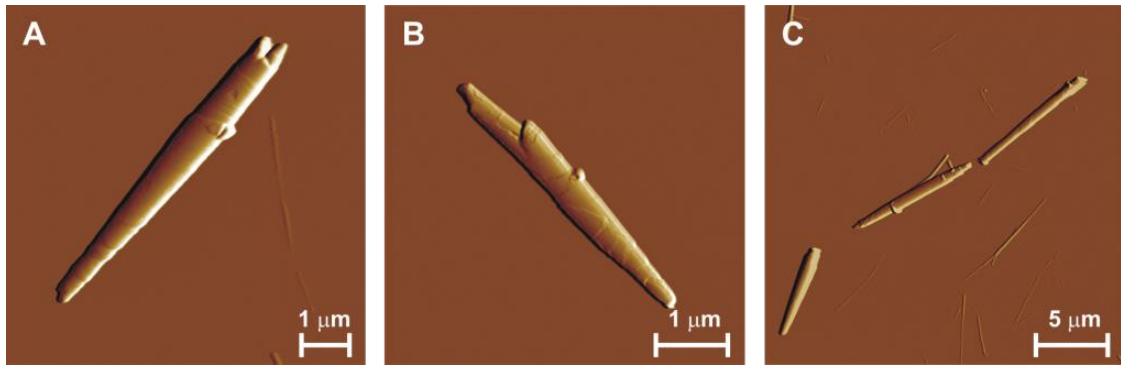
mM nátrium-citrát koncentrációtartományban az aggregátumok legfeljebb részlegesen estek szét, 200 és 212,5 mM koncentrációknál a kohleátok egyenletesen diszpergált állapotban voltak jelen (5. A ábra), míg ennél nagyobb koncentrációknál egyre kevesebb kohleát és egyre több óriási vezikula volt megfigyelhető. Amennyiben a kohleátokat hosszabb ideig inkubáltuk az optimális koncentrációban alkalmazott Na-citráttal, alapvető szerkezeti változásoknak lehettünk tanúi: a kohleátok szerkezete felbomlott (5. B ábra). Ellenben, ha a diszpergálás után a citrátionokat puffercserével eltávolítottuk, a kohleátok nem alakultak át vezikulákká (5. C ábra).



5. ábra Citrátionnal kezelt kohleátok fáziskontraszt-mikroszkópos képe. (A) 212,5 mM nátrium-citráttal frissen diszpergált kohleátok. (B) Ugyanazon minta 24 óra elteltével. (C) Az (A) felvételnek megfelelő minta, melyet a diszpergálás után azonnal centrifugáltunk, és üledékét 100 mM TRIS pufférben (pH=7,4) szuszpendáltuk. A (C) kép 1 hónappal a diszpergálás után készült. A DOPS és Ca^{2+} névleges koncentrációja 3,1 mM volt.

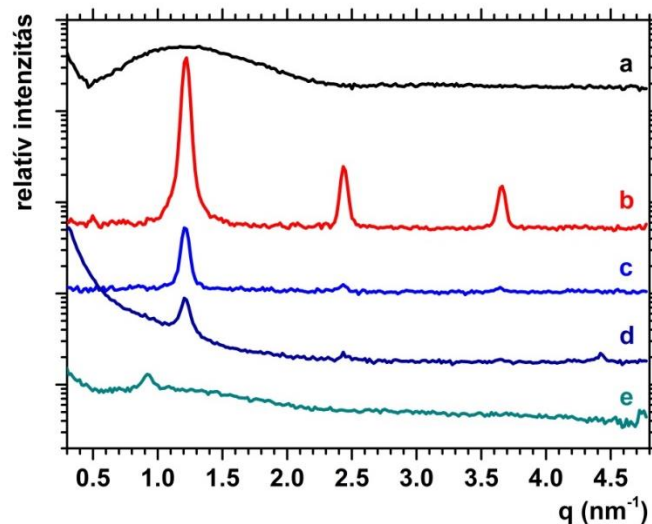
4.1.5. A citrátkezelés hatása a kohleátok szerkezetére

A citrátionnal diszpergált minták szerkezetét nagyfelbontású AFM képalkotás és kisszögű röntgenszórás segítségével vizsgáltuk. A diszpergált kohleátok AFM képei semmilyen strukturális különbséget sem mutattak a kontroll minták kohleátjaihoz képest (6. ábra). A röntgenszórást a foszfolipid kettősréteg vastagságának és rendezettségének megfelelő szórési intervallumban ($0,3-6 \text{ nm}^{-1}$) vizsgáltuk, összesen ötféle mintán: (a) DOPS multilamelláris vezikulákon, (b) aggregált kohleátokat tartalmazó kontroll mintán, (c) 100 mM, illetve (d) 212,5 mM citrátiont tartalmazó kohleát mintán, és (e) 50 mM EDTA-t tartalmazó kohleát mintán. 100 mM citrát-koncentrációnál az aggregátumok csak részlegesen estek szét, 212,5 mM koncentrációnál teljesen diszpergált kohleát mintát kapunk, míg 50 mM EDTA hatására a kohleátok pillanatszerűen átalakulnak óriási vezikulákká.



6. ábra Citrációval diszpergált kohleátok AFM amplitúdó-kontraszt felvételei.

A DOPS MLV rendszer egy széles szórási csúcsot mutat $0,5 \text{ nm}^{-1} < q < 3 \text{ nm}^{-1}$ között (7. ábra, a spektrum), ami a rosszul korrelált multilamelláris rendszerekre jellemző.



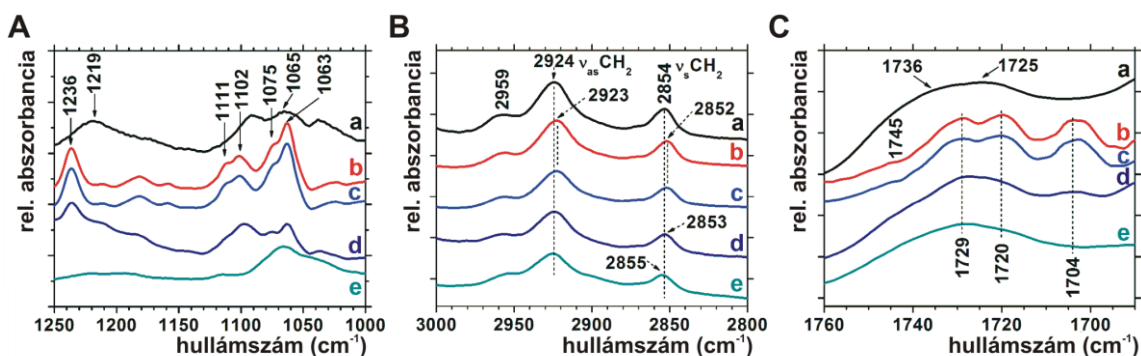
7. ábra (a) DOPS MLV, (b) kontroll kohleátok, (c) kohleátok + 100 mM citráció, (d) kohleátok + 212,5 mM citráció, (e) kohleátok + 50 mM EDTA SAXS diffrakciós spektrumai. A spektrumokat a jobb követhetőség kedvéért önkényesen eltoltuk egymáshoz képest a relatív intenzitás tengely mentén.

A kontroll kohleát minták diffrakciós spektrumán ehhez képest drasztikus változásokat figyelhetünk meg. Éles Bragg-csúcsok jelentek meg $1,2$; $2,4$ és $3,77 \text{ nm}^{-1}$ -nél (7. ábra, b spektrum). Ez erősen rendezett, periodikus rétegzettségű szerkezetre utal, amelyben a rétegek ismétlődési távolsága $5,15 \text{ nm}$. Citráció hozzáadására a csúcsok pozíciója lényegében változatlan maradt, de intenzitásuk csökkent (7. ábra, c és d spektrumok). Ez azt mutatja, hogy ezeknél a citrát-koncentrációknál a rendezett, réteges szerkezet megtartott marad. $212,5 \text{ mM}$ citráció koncentrációnál a SAXS jel monoton növekedést

mutatott a kisszögű tartomány felé haladva, ami az aggregátok felbomlása során szabaddá váló kisebb részecskék diffúz szórásának következménye. EDTA hozzáadása ugyancsak jelentős változásokat okozott a kontroll mintához viszonyítva (7. ábra, *e* spektrum). Egyetlen éles *Bragg*-csúcs jelentkezett $0,92 \text{ nm}^{-1}$ -nél, amely az MLV spektrumon láthatóhoz hasonlóan, széles szórási csúcsra szuperponálódott. Ez a szórási kép arra utal, hogy a réteges rendezett szerkezet részben felbomlott, részben $6,8 \text{ nm}$ -es periodicitással van jelen a mintában.

4.1.6. A lipidrétteg molekuláris változásainak vizsgálata FTIR spektroszkópiával

Az infravörös spektrumok három tartományát elemeztük részletesebben: a foszfát ($1250\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$, 8. A ábra), a metilén ($3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$, 8. B ábra), és az észter karbonilcsoport ($1760\text{-}1690 \text{ cm}^{-1}$, 8. C ábra) nyújtási rezgéseit. A PO_2^- csoport aszimmetrikus és szimmetrikus nyújtási sávjai, amelyek a 1219 , illetve 1065 cm^{-1} -nél találhatóak, nem mutattak különösebb jellegzetességeket a DOPS SUV rendszer esetén (8. A ábra, *a* spektrum).



8. ábra A DOPS molekula FTIR spektrumának (A) foszfát, (B) C-H és (C) észter karbonil nyújtási rezgéseinek tartományai. A puffer spektrumát előzőleg kivontuk. Az egyes spektrumokat az abszorbancaitengely mentén önkényesen eltoltuk egymáshoz képest a jobb követhetőség érdekében. A különböző minták spektrumait kisbetűkkel jelöljük az alábbiak szerint: (a) DOPS SUV, (b) kohleátok; (c) kohleátok + 100mM citrátion, (d) kohleátok + 212,5 mM citrátion; (e) kohleátok + 50 mM EDTA.

A kontroll kohleátoknál a PO_2^- aszimmetrikus nyújtási sávja 1219 cm^{-1} -ről 1236 cm^{-1} -re tolódott, és a szimmetrikus PO_2^- nyújtási sáv négy komponensre hasadt fel (1111 , 1102 , 1075 és 1063 cm^{-1} , 8. A ábra, *b* spektrum). Ezek a változások a foszfátcsoport dehidrációjára, valamint a Ca^{2+} -ion és a foszfát észter közti bidentát komplexképződésre utalnak. 100 mM-os citrátion koncentráció alkalmazása nem

okozott számottevő változást ebben a hullámhossztartományban (8. A ábra, *c* spektrum). A citrátion optimális diszpergáló koncentrációjánál (212,5 mM) a PO₂⁻ nyújtási sávok komponenseinek relatív intenzitásai megváltoztak (8. A ábra, *d* spektrum), pozíciójuk azonban nem változott. Ez a Ca²⁺-PS komplexek egy részének felbomlásával magyarázható. Jelentős változást tapasztaltunk, amikor 50 mM EDTA-t adtunk a kohleátokhoz: a jellegzetes, felhasadt PO₂⁻ nyújtási sávok eltűntek (8. A ábra, *e* spektrum), jelezve a komplexek teljes felbomlását.

A DOPS SUV-ok antiszimmetrikus ($\nu_{as}CH_2$) és szimmetrikus (ν_sCH_2) metilén nyújtási rezgései 2924 és 2854 cm⁻¹-nél jelentkeztek (8. B ábra, *a* spektrum). A kohleátok esetén a metilén nyújtási sávok kismértékben eltolódtak a kisebb hullámszámok felé (8. B ábra, *b* spektrum), szorosabb zsírsavlánc-pakolásra utalva, ami a Ca²⁺-ion és a fejcsoportok közötti erős kölcsönhatás következménye lehet. Amikor a kohleátokhoz 100 mM citrátiont adtunk nem tapasztaltunk jelentős spektrális változást (8. B ábra, *c* spektrum). A diszpergáló citrát-koncentrációnál (212,5 mM) azonban mind az aszimmetrikus, mind a szimmetrikus nyújtási rezgés sávja a nagyobb hullámszámok felé mozdult el, megközelítve a liposzómákra mért értékeket (8. B ábra, *d* spektrum). Vagyis a zsírsavláncok egy része feltehetően már kevésbé szorosan pakolt ebben a rendszerben. Amikor a kohleátokhoz 50 mM EDTA-t adtunk, a szimmetrikus metilén nyújtási rezgések további enyhe hullámszám növekedést mutattak, a rendszer visszanyerte a liposzómákra jellemző zsírsavlánc-pakoltságot.

A DOPS liposzómák esetén az észter karbonilcsoport ($\nu_{C=O}$) rezgésére jellemző tartomány egyetlen széles sávként jelentkezik, ami két (kb. 1736 cm⁻¹-nél, illetve kb. 1725 cm⁻¹-nél található) csúcsra bontható fel (8. C ábra, *a* spektrum). Ezek a két karbonilcsoport különböző mértékben hidratált alpopulációinak feleltethetőek meg. A kohleátok esetében négy $\nu_{C=O}$ nyújtási sáv vált láthatóvá 1745, 1729, 1720 és 1704 cm⁻¹-nél (8. C ábra, *b* spektrum). A hullámszám-csökkenés új hidrogénkötések kialakítására, míg a sáv szélesedés a mozgási szabadság csökkenésére utal. Ezek mögött a poláris fejcsoportok Ca²⁺-ionokkal történő komplexképzése állhat. A citrátion 100 mM-os koncentrációjánál nem tapasztaltunk számottevő spektrális változást (8. C ábra, *c* spektrum). A citrátion diszpergáló koncentrációjánál (212,5 mM) azonban a keskeny $\nu_{C=O}$ sávok intenzitásai csökkentek, és az 1729 és 1720 cm⁻¹-nél található csúcsok egyetlen széles sávvá olvadtak össze, ami 1728 cm⁻¹-nél mutatott maximumot (8. C

ábra, *d* spektrum). Ez a fejcsoportok részleges hidratáltságának következménye lehet. EDTA hozzáadására a kohleátok spektruma a DOPS liposzómákéhoz vált hasonlóvá (8. C ábra, *e* spektrum).

5. Következtetések

5.1. Kohleátok kialakulása

A kohleátok kialakulását leíró különféle modellek kiegészítésekre szorulnak. Az unilamelláris liposzómák Ca^{2+} -ionok mediálta fúziója és aggregációja elsősorban nem planáris foszfolipid kettősrétegekhez, vagy multilamelláris kettősréteg halmokhoz vezet, hanem multilamelláris vezikula aggregátumok kialakulásához. Mivel az aggregátumokban kezdetben egyáltalán nem, vagy legfeljebb elvétve, néhány nap múlva azonban nagy számban találunk kohleátokat, azt feltételezhetjük, hogy a multilamelláris vezikulák alakulnak át valamilyen mechanizmussal membrántekercsekké. Tekintve, hogy a kohleátok viszonylag lassan szaporodtak fel a mintában, ugyanakkor átalakulási köztitermékeket nem sikerült egyértelműen azonosítanunk, azt feltételezhetjük, hogy az $\text{MLV} \rightarrow \text{kohleát}$ átalakulás igen gyors, egyirányú, véletlenszerűen lejártszódó folyamat. A részlegesen tekeredett szerkezetek elemzése rámutatott, hogy legtöbbször nem egyetlen, hanem több párhuzamos foszfolipid kettősréteg tekerceselődése alakítja ki a kohleátszerkezetet. Az, hogy a minta kiszáritásával leáll az MLV-k kohleáttá alakulása, azt mutatja, hogy a vizes közegnek fontos szerepe van a kohleátképződésben. Az átalakulás pontos mechanizmusának megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.

5.2. Kohleátok szerkezeti és mechanikai tulajdonságai

Az atomerő-mikroszkóp kiválóan alkalmasnak bizonyult a kohleát topográfia és belső szerkezet néhány speciális tulajdonságának nagyfelbontású vizsgálatára. Az AFM képek megerősítették a kohleátok korábban felállított szerkezeti modelljét, és megmutatták, hogy a tekercesek tartalmazhatnak belső üreget. Az erőspektroszkópiás mérések segítségével egyedi részecskéket vizsgálva azonosítható a kohleátok nanomechanikai ujjlenyomata, melynek segítségével feltárható a részecske belső szerkezete és mechanikai tulajdonságai. A membrántekercsek más biomolekuláris rendszerekhez képest anomálishan nagy, kb. 1–15 N/m rugóállandóval (merevséggel) rendelkező struktúrák. Kiugróan nagy erők (több tíz, akár néhány száz nN) szükségesek a tekercs átszúrásához, ami azonban – a mérések időskáláján irreverzibilis – plasztikus alakváltozáshoz vezet. Mivel a száraz és vizes közegű kohleátok mechanikai

paraméterei azonosak, a vizes közeg nem játszik szerepet a már kialakult membrántekercsek stabilizálásában. Az egyedi membránrétegek vonalmenti feszültsége (kb. 1,2 nN) nagyságrendekkel haladja meg a folyadékkristályos állapotú foszfolipidekét. Ez, valamint a foszfolipidek átszúrás utáni visszarendeződésének hiánya bizonyítja a kettősrétegek kristályos állapotát. Az átszúrás során az egyes membránrétegek függetlenül viselkednek, vagyis nem állnak mechanikai csatolásban egymással, ami két dolgot jelenthet. (1) Elképzelhető, hogy a szomszédos lipid kettősrétegek fejcsoportjai nem Ca^{2+} -hidakkal kötődnek egymáshoz. A nagyszámú Ca^{2+} -keresztkötés ugyanis nagyon erős csatolást kellene, hogy biztosítson a rétegek között, ami nem vezethetne egymástól független, azonos erejű átmenetekhez. Kivéve, ha azt feltételezzük, hogy a Ca^{2+} keresztkötések dinamikus átrendeződésre képesek. Ebben az esetben viszont számíthatnánk az átszúrt rétegek legalább részleges visszarendeződésére is a perturbáció után, amit nem tapasztalunk. Lehetséges, hogy a Ca^{2+} csak az egyes rétegekben belüli szomszédos fejcsoportokat köti keresztbe, és az így kialakuló, nagyrészt dehidrált, töltésárnyékolt fejcsoport-rétegek *van der Waals* vagy hidrofób kölcsönhatásokon keresztül asszociálódnak egymáshoz. (2) Lehetséges, hogy a rétegek egymáson való elmozdulása nem a fejcsoportok, hanem a zsírsavláncok közötti sík mentén történik.

5.3. Kohleátok diszpergálása

A citrátion koncentrációfüggően hatott a kohleát aggregátumokra. Kis koncentrációknál lazította a szerkezetüket. Megfelelő koncentrációban alkalmazva diszpergálta azokat, míg ennél nagyobb töménységben használva a tekercsek felnyíltak. Ez a hatás annak tulajdonítható, hogy a citrátion képes arra, hogy az oldatban található szabad Ca^{2+} -ionok egy részét megkösse, így csökkentve azok koncentrációját. A kisebb szabad Ca^{2+} koncentráció a $\text{PS}-\text{Ca}^{2+}$ kötődést a disszociáció irányába tolja el. Ebből a szempontból a kohleátok $\text{PS}-\text{Ca}^{2+}$ komplexei két részre oszthatók: (1) egy felületi, könnyen hozzáférhető és (2) egy belső, takarásban lévő hányadra. A Ca^{2+} PS fejcsoportokról való disszociációját, és a membránrétegekből az oldatba vándorlásának sebességét a kohleát és az oldat közti kémiai potenciálgrádiens nagysága határozza meg. A citrátion Ca^{2+} iránti asszociációs konstansa ($\text{pK}_a=3,17$) egy nagyságrendbe esik és valamivel kisebb a PS molekuláénál ($\text{pK}_a=3,9$). A citrátionok és a PS fejcsoportok

versengenek a szabad Ca^{2+} -ionokért. A citrátionokat a PS-nél nagyobb koncentrációban kellett alkalmaznunk ahhoz, hogy annyi szabad Ca^{2+} -iont megkössenek, ami a kémiai potenciálgradienst megfelelő mértékben tolja el ahhoz, hogy az inkubáció viszonylag rövid ideje alatt a könnyebben hozzáférhető felületi PS- Ca^{2+} komplexek disszociáljanak. A mérsékelt kémiai potenciálgradiens nem teszi lehetővé, hogy a belső rétegek Ca^{2+} -ionjainak is legyen idejük kiáramolni, még mielőtt a diszpergálószer puffercserével eltávolítanánk. Ha nem történik puffercsere, az optimális diszpergáló koncentrációban alkalmazott citrátion hosszabb idő alatt természetesen a tekercek belsejéből is kivonja a Ca^{2+} -ionokat.

A jóval nagyobb Ca^{2+} iránti asszociációs konstanssal ($\text{pK}_a=10,75$) bíró EDTA a szabad Ca^{2+} -t nagyságrendekkel nagyobb affinitással köti meg, pillanatszerű, hatalmas növekedést okozva a Ca^{2+} -ionok kémiai potenciálgradiensében. Ez olyan mértékben tolja el a PS- Ca^{2+} komplex egyensúlyát a disszociáció felé, és gyorsítja fel a Ca^{2+} -ionok kiáramlását a kohleát belsejéből is, hogy a jellegzetes tekercs-szerkezet szinte pillanatszerűen bomlik fel. A jóval kisebb asszociációs konstansú borkősav ($\text{pK}_a=1,8$) és ecetsav ($\text{pK}_a=0,53$) azonban még viszonylag nagy koncentrációban alkalmazva sem tud elég Ca^{2+} -iont kivonni a részecskékről, ezért nem is képes diszpergálni azokat.

5.4. Új tudományos eredmények

- (1) Megállapítottam, hogy – a korábban gondoltaktól eltérően – a kohleátok unilamelláris liposzómákból való képződése során először multilamelláris vezikula-aggregátumok keletkeznek, és ezek alakulnak át az egyedi részecskéket tekintve egyirányú, gyors, véletlenszerűen lejátszódó folyamatban membrántekercsekké. A részecskesokaságot tekintve az átalakulás lassú kinetikával játszódik le, több hetet vesz igénybe, amíg a kohleátok túlsúlyba kerülnek a vezikulákkal szemben. Az átalakulás csak vizes közegben megy végbe.
- (2) Atomierő-mikroszkópos erőspektroszkópia segítségével azonosítottam a kohleátok nanomechanikai ujjlenyomatát, ami jól jellemzi az egyedi membrántekercsek szerkezeti és mechanikai tulajdonságait. A kohleátok – más rendezett biomolekuláris struktúrákhoz viszonyítva – anomálishan nagy merevséggel, kimagasló átszúrással szembeni ellenállóképességgel rendelkeznek. A kohleátok kettősrétegű membránjainak vonalmenti feszültségét 1,2 nN-ban állapítottam meg. Ez igen nagy érték, ami, a mechanikai perturbáció során jelentkező irreverzibilis, plasztikus deformációval együtt közvetett bizonyítékot szolgáltat a foszfolipid membrán kristályosodására. A kohleátok membránrétegei nem állnak mechanikai csatolásban egymással. Ez felveti annak lehetőségét, hogy *i.*) a Ca^{2+} -ionok csak ugyanazon kettősrétegen belül létesítenek keresztkötéseket a foszfolipid fejcsoportok között; *ii.*) a szomszédos rétegeket *van der Waals* és hidrofób kölcsönhatások rögzítik egymáshoz.
- (3) Módszert dolgoztam ki kohleát aggregátumok diszpergálására, ami azon alapul, hogy a citrátionokat megfelelő koncentrációban, puffercserével kell alkalmazni. A kidolgozott módszernek megfelelő eljárásban a citrátion nem károsítja a kohleátok jellegzetes membrántekercs-szerkezetét. A kohleát-struktúra megőrzését szolgáló diszpergálás molekuláris háttere az, hogy a Ca^{2+} -ionokat csak a kohleátok felületéről kell eltávolítani, anélkül, hogy a tekercs belső rétegeit stabilizáló Ca^{2+} -ionokat is kivonnánk.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Bozó, T, Wacha, A, Mihály, J, Bóta, A, Kellermayer, MSZ. (2017) *Dispersion and stabilization of cochleate nanoparticles*. Eur J Pharm Biopharm, 117:270-275. IF: 4.519

Bozó, T, Brecska, R, Gróf, P, Kellermayer, MSZ. (2015) *Extreme resilience in cochleate nanoparticles*. Langmuir 31:839-845. IF: 3.993

6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Batta, Gy, Soltész L, Kovács, T, **Bozó, T**, Mészár, Z, Kellermayer, MSZ, Szöllősi J, Nagy, P. (2018) *Alterations in the properties of the cell membrane due to glycosphingolipid accumulation in a model of Gaucher disease*. Sci Rep 8:157. IF: 4,259

Tóth, EA, Oszvald, Á, Péter, M, Balogh, G, Osteikoetxea-Molnár, A, **Bozó, T**, Szabó-Meleg, E, Nyitrai, M, Derényi, I, Kellermayer, M, Yamaji, T, Hanada, K, Vígh, L, Matkó, J. (2017) *Nanotubes connecting B lymphocytes: High impact of differentiation-dependent lipid composition on their growth and mechanics*. BBA- Mol Cell Biol L 1862: 991-1000. IF: 5,547

Bozó, T, Meszáros, T, Mihály, J, Bóta, A, Kellermayer, MSZ, Szebeni, J, Kálmán, B. (2016) *Aggregation of PEGylated liposomes driven by hydrophobic forces*. Colloids Surf B Biointerfaces 147:467-474. IF: 3.887

Osteikoetxea-Molnar, A, Szabó-Meleg, E, Tóth, EA, Oszvald, Á, Izsépi, E, Kremlitzka, M, Biri, B, Nyitray, L, **Bozó, T**, Németh, P, Kellermayer, MSZ, Nyitrai, M, Matkó, J. (2016) *The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes*. Cell Mol Life Sci 73:4531-4545. IF: 5.788

Horváth, Gy, Kemény, A, Barthó, L, Molnár, P, Deli, J, Szenté, L, **Bozó, T**, Pál, Sz, Sándor, K, Szőke, É, Szolcsányi, J, Helyes, Zs. (2015) *Effects of some natural carotenoids on TRPA1- and TRPV1-induced neurogenic inflammatory processes in vivo in the mouse skin.* J Mol Neurosci 56:113-121. IF: 2.352

Pál, Sz, Nagy, S, **Bozó, T**, Kocsis, B, Dévay, A. (2013) *Technological and biopharmaceutical optimization of nystatin release from a multiparticulate based bioadhesive drug delivery system.* Eur J Pharm Sci 49:258-264. IF: 3.005

Kaszás, N, **Bozó, T**, Budai, M, Gróf, P. (2013) *Ciprofloxacin encapsulation into giant unilamellar vesicles: Membrane binding and release.* J Pharm Sci 102:694-705. IF: 3.007

Bozó, T, Mayer, K, Pál, S, Dévay, A. (2009) *A szem korszerű gyógyszeres terápiájának lehetőségei.* Gyógyszerészet 53:5-12.

Bozó, T, Pál, S, Dévay, A. (2008) *Liposzómák fejlesztésének és gyógyszerterápiás alkalmazásának újabb lehetőségei.* Acta Pharm Hung 78:103-109.