Kohleát nanorészecskék biofizikai jellemzése

Doktori értekezés

Dr. Bozó Tamás

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Kellermayer Miklós S. Z., DSc., egyetemi tanár
Hivatalos bírálók:	Dr. Budai Lívia, 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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke 5

2. Bevezetés 6

2.1. Kohleátok 7

2.1.1. Kohleátok szerkezete 7

2.1.2. Kohleátok kialakulása 8

2.1.3. Foszfatidilszerin–Ca^{2+} kölcsönhatás 12

2.1.4. Kohleátok előállításának módszerei 15

2.1.5. Kohleátok mint hatóanyag-hordozó rendszerek 16

2.1.5.1. Amfotericin B és más hatóanyagok bezárása 17

2.1.5.2. Hatóanyag, mint kohleátképző ágens 19

2.1.5.3. Kohleátok biofarmáciai tulajdonságai 20

2.1.5.4. Immunizálás és génterápia 21

2.1.6. A kohleát-szakirodalom kritikus értékelése 23

2.1.6.1. Mennyire megalapozottak az eddigi publikációk eredményei? 24

2.1.6.2. Nem ismert a kohleátképződés részletes mechanizmusa 25

2.1.6.3. A strukturális jellemzés gyakran hiányos 26

2.1.6.4. A méreteloszlás optimalizálása nem megoldott 27

2.1.6.5. A kohleát mintákban melléktermékek is találhatóak 29

2.1.6.6. A kohleátok és melléktermékeik aggregátumokat képeznek 30

2.2. Atomierő-mikroszkópia a mikro- és nanorendszerek vizsgálatában 32

2.2.1. Az atomierő-mikroszkóp működése 32

2.2.2. Hogyan detektálhatunk atomi erőket? 32

2.2.3. Hogyan keletkezik a kép? 34

2.2.3.1. Kontaktmód 34

2.2.3.2. Non-kontakt (tapping vagy tapogató) mód 35
2.2.4. Az AFM-mel mért kölcsönhatások képi megjelenítése 36
2.2.5. Az atomierő-mikroszkópos képalkotás lehetőségei és korlátai 37
2.2.6. Erőspektroszkópia 38
3. Célkitűzések 40
4. Módszerek 41
4.1. Anyagok 41
4.2. Multilamelláris vezikulák előállítása 41
4.3. Kis unilamelláris vezikulák előállítása 41
4.4. Kohleátok előállítása 42
4.4.1. Kohleátok előállítása gyors elegyítéssel 42
4.4.2. Kohleátok előállítása dialízissel 42
4.5. Kohleátok diszpergálása 42
4.6. Fáziskontraszt-mikroszkópia 43
4.7. Atomierő-mikroszkópia és erőspektroszkópia 43
4.8. AFM képek megjelenítése és analízise 44
4.9. A csillámfelszín nedvesedésének vizsgálata 44
4.10. Erőgörbék statisztikai analízise 44
4.11. Zéta potenciál mérése 45
4.12. Zéta potenciál adatok elemzése 45
4.13. Kisszögű röntgenszórás 46
4.14. Infravörös spektroszkópia 47
5. Eredmények 48
5.1. Kohleátok kialakulása 48
5.1.1. Aggregátumok képződése 48

5.1.2. Felületi töltés változása 50
5.1.3. Kohleátképződés..... 51
5.1.4. A kohleát formálódás lehetséges átmeneti alakjai..... 52
5.1.5. A kohleát minta megváltoztatta a csillám nedvesedését 54
5.2. Kohleátok mechanikai jellemzése 55
5.2.1. Egyszeri, illetve ismétlődő terhelés 50 nN erőhatárig..... 55
5.2.2. A kohleátok nanomechanikai ujjlenyomata 56
5.2.3. A kohleátok merevsége és mechanikai ellenállóképessége..... 58
5.2.4. Kohleátok plasztikus deformációja 59
5.2.5. Morfológia és erőspektroszkópia vizes közegben..... 60
5.2.5.1. Mechanikai jellemzés vizes közegben..... 61
5.2.5.2. A kohleát membrán vonalmenti feszültsége..... 63
5.3. Kohleátok diszpergálása..... 66
5.3.1. A diszpergált kohleátok hosszútávú stabilitása 68
5.3.2. A citrátkezelés hatása a kohleátok szerkezetére 70
5.3.3. A lipidréteg molekuláris változásainak vizsgálata FTIR spektroszkópiával 71
6. Megbeszélés 74
6.1. Kohleátok szerkezete és kialakulása..... 74
6.2. Kohleátok nanomechanikai jellemzése 78
6.2.1. A kohleátok nanomechanikai ujjlenyomata 78
6.2.2. Az erőspektrumok érvényessége 79
6.2.3. A kohleátok mechanikai ellenállóképessége 81
6.2.4. Kohleátok plasztikus deformációja 82
6.2.5. Száraz és vizes közegű kohleátok összehasonlítása 83
6.3. Kohleátok diszpergálása..... 85
6.3.1. Alkalmas diszpergálószer keresése 85

6.3.2. A citrátion nem befolyásolja a kohleátok topográfiáját..... 85

6.3.3. A citrátion nem perturbálja a membrántekercsek belső szerkezetét..... 86

6.3.4. A citrátion diszpergáló hatásának molekuláris mechanizmusa 88

7. Következtetések..... 90

7.1. Kohleátok kialakulása 90

7.2. Kohleátok szerkezeti és mechanikai tulajdonságai 90

7.3. Kohleátok diszpergálása..... 91

7.4. Új tudományos eredmények..... 92

8. Összefoglalás..... 94

9. Summary..... 95

10. Irodalomjegyzék..... 96

11. Saját publikációk jegyzéke..... 105

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények..... 105

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények 105

12. Köszönetnyilvánítás 107

13. Melléklet..... 108

1. Rövidítések jegyzéke

AFCo: Finlay kohleát adjuváns (adjuvant Finlay cochleate)

AFM: atomierő-mikroszkóp (atomic force microscope)

AmB: amfotericin B (amphotericin B)

ATR–FTIR: gyengített teljes reflexiós – Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (attenuated total reflection – Fourier transform infrared spectroscopy)

CFU: kolóniaformáló egység (colony forming unit)

DOPS: dioleoil-foszfatidilszerin (dioleoyl phosphatidylserine)

DLS: dinamikus fényszórásmérés (dynamic light scattering)

DSPS: disztearoil-foszfatidilszerin (distearoyl phosphatidylserine)

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)

FTIR: Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier transform infrared spectroscopy)

GFP: zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

HSV: *herpes simplex* vírus

MIC: minimális gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration)

MD: molekuláris dinamika (molecular dynamics)

MLV: multilamelláris vezikula (multilamellar vesicle)

NMR: magmágneses rezonancia (nuclear magnetic resonance)

OAK: oligo-acil-lizil (oligo-acyl-lysyl)

PEG: polietilén-glikol (polyethylene glycol)

PG: foszfatidilglicerin (phosphatidylglycerol)

PS: foszfatidilszerin (phosphatidylserine)

RES: retikuloendotheliális rendszer (reticuloendothelial system)

SAXS: kisszögű röntgenszórás (small-angle X-ray scattering)

SEM: pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope)

SLB: hordozófelülethez adszorbeálódott lipid kettősréteg (supported lipid bilayer)

SUV: kis unilamelláris vezikula (small unilamellar vesicle)

TEM: transzmissziós elektronmikroszkóp (transmission electron microscope)

TRIS: trisz-(hidroximetil)-aminometán (tris(hydroxymethyl)aminomethane))

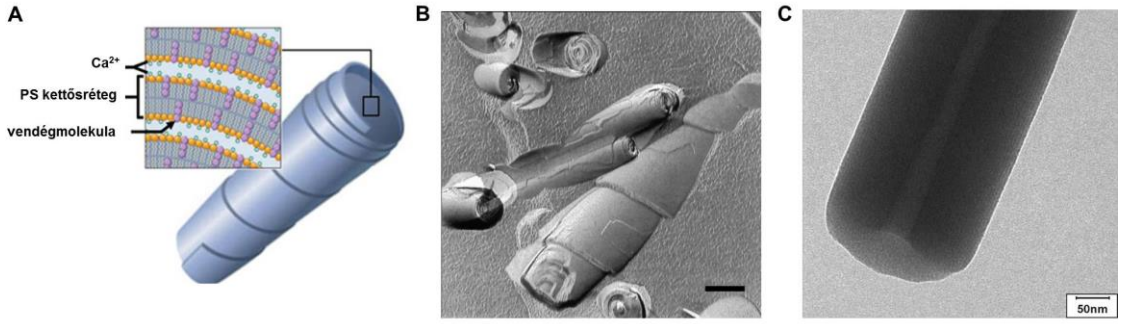
2. Bevezetés

A foszfolipid alapú folyadékkristályos rendszerek évtizedek óta a tudományos érdeklődés homlokterében állnak. Köszönhető ez annak, hogy viszonylag egyszerű eljárásokkal változatos méretű és szerkezetű, biokompatibilis hatóanyag-hordozókat, valamint sejtélettani folyamatok modellezésére alkalmas mikro- és nano-kompartmenteket lehet létrehozni belőlük. A folyadékkristályos gyógyszerhordozók világa már egyetemi hallgatóként megragadta a fantáziámat, önálló tudományos kutatómunkám liposzómák és felülethez adszorbeálódott lipid kettősrétegek biofizikai jellemzésével indult. Témavezetőmmel, *Kellermayer Miklós* professzorral folytatott beszélgetéseinkben azonban időről-időre felötlöttek a mielinhüvelyhez hasonló geometriájú kohleátok, mint különös, tüzetesebb vizsgálatra érdemes mikro-, nanorendszerek. Amikor alaposabban tanulmányozni kezdtem a szakirodalmat, feltűnt, hogy – a kezdeti sikerek és biztató eredmények ellenére – a mai napig nem került forgalomba, vagy előrehaladottabb klinikai vizsgálati fázisba kohleát alapú hatóanyag-hordozó rendszer. A régóta fennálló kíváncsiság ösztönzésére 2013 nyarán készítettem el, és vizsgáltam meg az első kohleát mintát. Meglepődve tapasztaltam, hogy a mintában egyetlen kohleát sem volt látható; a kiindulási liposzómáinkból multilamelláris vezikula-aggregátumok keletkeztek. A kísérletet újonnan rendelt alapanyagokkal megismételve továbbra is csak liposzóma precipitátumot sikerült előállítanom. Mivel tudtam, hogy a frissen előállított liposzóma-preparátumok rövidebb-hosszabb idő alatt megváltozhatnak, ezért egy-két hét múlva újra a mikroszkóp tárgylemezére csöppentettem egy mintát, és észrevettem, hogy a korábban felhőszerű, fehér aggregátumokból, sötét, tűszerű objektumok állnak ki minden irányban. Az atomierő-mikroszkópos vizsgálat hamar megmutatta, hogy a tüskék kohleátok. Amit láttam egyrészt megkérdőjelezte a kohleátok kialakulásáról korábban felállított modellt, másrészt azonnal rávilágított arra, hogy a kohleátok gyakorlati alkalmazásának egyik korlátja az aggregáció lehet. Elhatároztuk, hogy körüljárjuk ezeket a kérdéseket. Kohleátokkal kapcsolatos kutatómunkám első fázisának céljául a részecskék *(1)* kialakulásának megértését, *(2)* szerkezeti-biofizikai jellemzését, *(3)* diszpergálásuk révén gyógyszertechnológiai felhasználásra alkalmassá tételét tűztük ki. Ezeket az erőfeszítéseket és az eredményeket mutatom be doktori értekezésemben.

2.1. Kohleátok

2.1.1. Kohleátok szerkezete

A kohleátok spirálisan feltekeredő foszfolipid kettősrétegekből álló, Ca^{2+}-ionok által stabilizált membrántekercsek (1. ábra). Először *Verkleij* és mtsai. írtak le foszfatidilglicerinből Ca^{2+} hozzáadására keletkező lipidtekercseket 1974-ben [1], azonban a kohleátok felfedezését névadójukhoz, *Papahadjopoulos*-hoz kötik, aki 1975-ben figyelt meg foszfatidilszerinből Ca^{2+} hatására képződő membrántekercseket [2]. Nevüket a görög *kohliasz* (*κοχλίασ*) szó után kapták, ami spirálisan tekeredő házú csigát jelent. 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 [3]. Ez egybeesik a kettősrétegű foszfolipid membrán vastagságával [4,5], ami arra utal, hogy a kettősrétegű lipidmembránok közvetlenül egymásnak fekszenek, és a rétegek között nem található számottevő vizes térrész. A kohleátokat sokáig tömör, belső üreg nélküli tekercsnek gondolták [6]. *Nagarsekar* és mtsai. csak 2014-ben szolgáltatták az első kísérletes bizonyítékot arra nézve, hogy a tekercsek belsejében akár üreg is található. Ezért inkább szőnyegtekercsként, semmint a korábban javasolt tömör, szivarszerű objektumként kell elképzelnünk a kohleátokat [3].



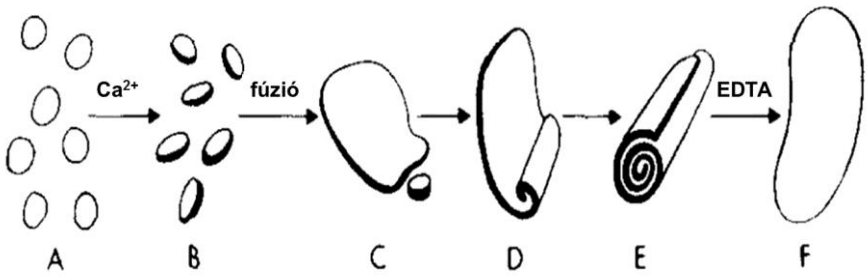
1. ábra *A) Foszfatidilszerin (PS) alapú kohleát membrántekercs szerkezetének sémája. Forrás: http://www.matinasbiopharma.com. Letöltve: 2017. május 18. (B) Kohleátok fagyasztva töréses elektronmikroszkópiával készült képe [6]. A skála hossza 200 nm. (C) Kohleát részecske TEM képe, amin kivehető a réteges szerkezet és a belső üreg [3].*

Nagarsekar és munkacsoportja két fontos megfigyelést tett a kohleátok belső üregét illetően: *(1)* a telítetlen DOPS molekulából álló kohleátok szélesebb üreget tartalmaztak, mint a telített DSPS molekulából állók; *(2)* a belső üreg átmérője monoton növekszik a kohleát külső átmérőjével. Ezen megfigyelések értelmezésére felállított

modelljük szerint a kohleátok teljes belső energiája három részből tevődik össze: *(1)* a többrétegű lipidlemezek hajlítási energiájából; *(2)* a szomszédos kettősrétegek közötti adhézió energiájából; és *(3)* a rétegek hajlítása során az egyedi kettősrétegeken belül keletkező tömörödés, illetve feszülés energiaszükségletéből. A modellből kapott eredmények viszonylag jól illeszkedtek a kísérleti adatokra, és azt sugallták, hogy a kohleátok membránrétegei teljesen relaxált állapotban vannak. Ez arra utal, hogy a képződési lehetőségek közül leggyakrabban, valószínűleg egyetlen membrán-kettősréteg tekeredik kohleáttá. Feltételezésük szerint [3] egy ilyen rendszer ugyanis sokkal könnyebben képes a belső feszültségét önmagán belül relaxálni, mint egy multilamelláris lemezből feltekeredő kohleát, ahol a relaxáció rétegek felhasadását, fúzióját, illetve rétegek közötti foszfolipid-transzportot igényelne. Az előző munkacsoporttal közel egy időben, eltérő módszereket használva szolgáltattak megerősítő bizonyítékokat a kohleátok belső üregének létezésére *Hollander* és mtsai. [7], illetve saját csoportunk. Belső üreg szempontjából három szerkezetet lehet megkülönböztetni: *(1)* tömör kohleátokat; *(2)* kb. állandó üregátmérőjű kohleátokat; és *(3)* változó üregátmérőjű (kónikus) kohleátokat.

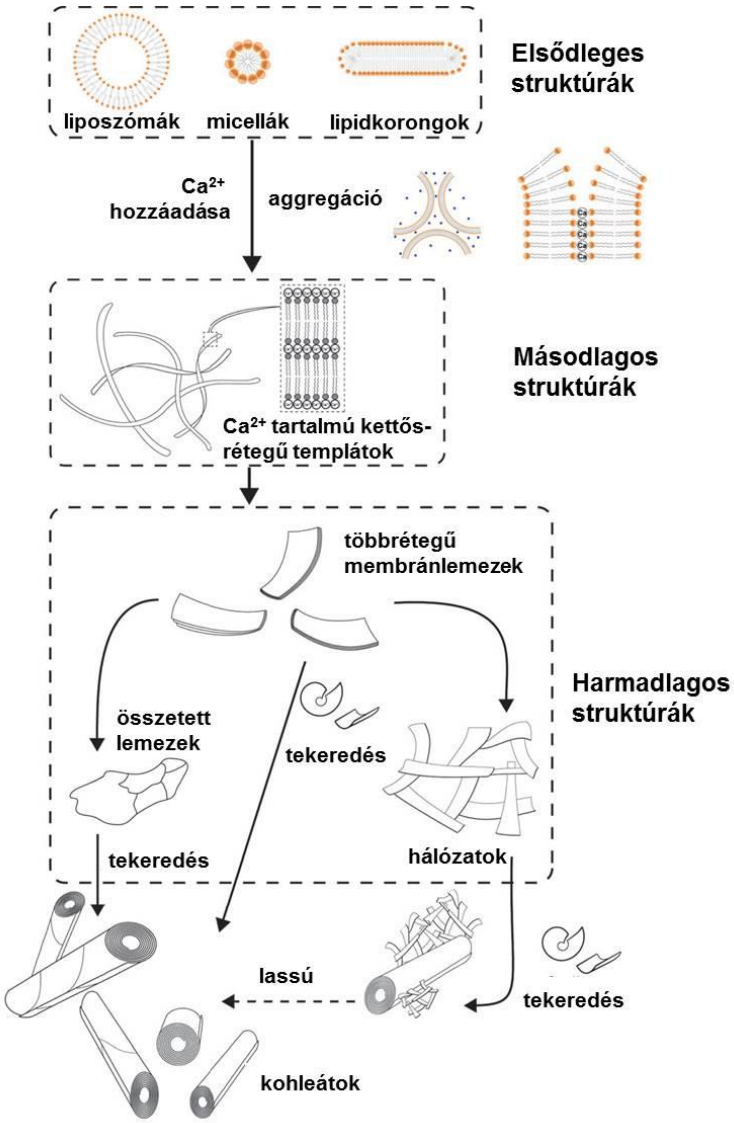
2.1.2. Kohleátok kialakulása

A kohleátok kialakulásának lépéseit a *Papahadjopoulos* és mtsai. által publikált modell alapján mutatom be (lsd. a 2. ábra betűkkel jelölt lépcsőfokait). Eszerint a kohleátok negatív fejcsoporti töltésű liposzómákból *(A)* alakulnak ki oly módon, hogy a liposzómákból a Ca^{2+}-ionok hatására kihasadással kettősrétegű foszfolipid lemezek *(B)* jönnek létre, amik fuzionálnak egymással, hogy a szénhidrogén láncok víznek kitett felületét csökkentsék. Az így képződő nagy felületű membránlemezek *(C)* feltekerednek *(D)*, és kohleátokat *(E)* hoznak létre. A Ca^{2+}-ionok etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) való kivonása a szerkezet felbomlásához, óriás lipidvezikulák létrejöttéhez *(F)* vezet. A szerzők modellje hipotetikus volt, nem szolgáltak kísérletes bizonyítékokkal a kialakulás köztitermékeire. Megjegyezték viszont, hogy a liposzómák aggregációja megelőzheti a fúziót és felhasadást, illetve, hogy a nagyfelületű membránlemezekből több, akár egymással asszociálódva, együtt is tekeredésbe kezdhet.



2. ábra *A kohleátok kialakulásának és felbomlásának feltételezett lépései [2]. Magyarázat a szövegben.*

Feltételezték, hogy a kohleátképződéshez szükséges lehet egy bizonyos minimális membránlemez méret, de a kialakult kohleát további növekedése már liposzómák folyamatos hozzátapadásával is végbemehet. Ez a kialakulási modell a mai napig széles körben elfogadott. A kohleátok felfedezése utáni évtizedekben a legtöbb vizsgálat gyógyszerhordozóként való gyakorlati alkalmazásukra fókuszált. Tüzetesebb szerkezeti analízisük és kialakulásuk vizsgálata csak nemrégiben került ismét az érdeklődés homlokterébe. *Pham* és mtsai. [8] transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képalkotással azonosították a SUV-ok aggregációja és fúziója során keletkező nagyfelületű planáris lipidlemezeket, ezzel megerősítették Papahadjopoulos-ék korábbi elképzelését. *Nagarsekar* és mtsai. [9] viszont revideálták Papahadjopoulos-ék modelljét. Elképzeléseik szerint az elsődleges lipid struktúrák (liposzómák, micellák, lipid korongok) Ca^{2+} hozzáadására multilamelláris köztitermékekké aggregálódnak, illetve fuzionálnak (3. ábra). Megfigyeléseik szerint ezekből – másodlagos struktúraként – szalagszerű, kettősrétegű fragmentumok („ribbon") alakulnak ki. Az átalakulás hajtóereje, feltételezésük szerint, a multilamelláris köztitermékekben uralkodó membránfeszülés lehet, ami a rétegek destabilizálódásához, felhasadásához vezethet. Annak érdekében, hogy a képződött szalagoknak a víz felé exponált felülete és élhossza csökkenjen, a szalagok fuzionálhatnak, illetve aggregálódhatnak egymással, így alakítva ki a harmadlagos struktúraként számontartott többrétegű membránlemezeket („stacks"). A többrétegű membránlemezek akár közvetlenül, akár egymással aggregálva és fuzionálva kohleátokká tekeredhetnek. Ugyanakkor előfordulhat, hogy a membránlemezekből kialakuló hálózatszerű struktúra hosszú ideig fennmarad, és legfeljebb nagyon lassan alakul át kohleátokká.



3. ábra *Kohleátok kialakulásának Nagarsekar és mtsai. által javasolt modellje [9]. Magyarázat a szövegben.*

Szalagszerű képződményeket eddig csak *Nagarsekar* munkacsoportja írt le, többrétegű membránlemezeket azonban más szerzők is megfigyeltek [10]. Részlegesen tekeredett lemezeket krio-transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével *Hollander* és mtsai. csoportjának sikerült először azonosítani [7]. Azt ugyanakkor nem lehet eldönteni, hogy ezek a kohleát feltekeredés átmeneti alakjai, vagy a már kialakult kohleátok részleges széttekeredésével jöttek létre. Feltűnő volt, hogy a legtöbb esetben nem egyedi membrán-kettősrétegek, hanem sokrétegű lemezek alkották a tekercseket. A sokrétegű lemezek feltekeredése ellentmond *Nagarsekar* és mtsai. azon korábbi feltételezésének [3], miszerint a kohleátokat egyedi kettősréteg-tekercsek alkotják. Ők az egyedi, kettősréteg-tekercseket tartalmazó kohleátok kialakulására egy egyszerű

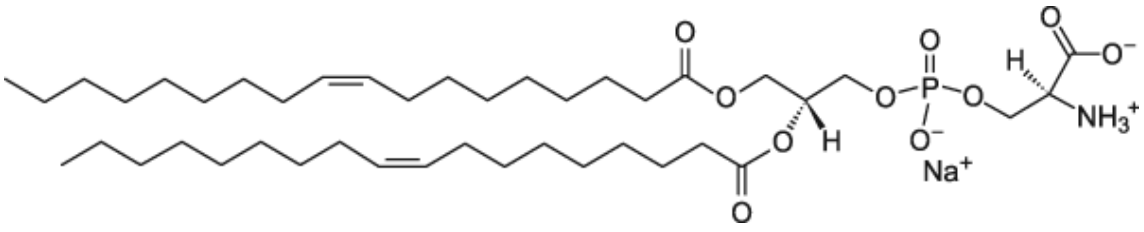
mechanizmust tételeztek fel. Ennek során egy planáris, többrétegű lemez felhajlásakor az n-edik lemez nem önmagával alkot hengert, hanem az (n+1)-edik lemez élével fuzionál. Ez a mechanizmus alakítja ki a spirális szerkezetet.

Az eddigi kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a kohleátképződéshez elengedhetetlenek a negatív töltésű fejcsoportot tartalmazó foszfolipid molekulák. Ez alól egy kivétel ismert: metanol-víz elegyben oldva az eritro-szfingozin is képes tekercsszerű struktúrába rendeződni [11]. A jelenlegi kutatásokban legszélesebb körben alkalmazott foszfatidilszerin molekulán kívül más fejcsoportú foszfolipidek, így például a legelsőként megfigyelt foszfatidilglicerin (PG) [1,10,12] és foszfatidsav [13] is képes membrántekercs szerkezetet létrehozni. Ugyanakkor az ikerionos, nettó zérus töltésű foszfolipidek jelenléte gátolja a PS-tartalmú liposzómák Ca^{2+}-mediálta destabilizálódását, és így a kohleátképződést [14,15]. A koleszterin hatása a kohleátképződésre függ a koncentrációtól: amennyiben koncentrációja 20 mol% alatt van, DOPS liposzómák Ca^{2+} hozzáadására kohleátokat képeznek, azonban ennél nagyobb koleszterintartalom esetén csak planáris lipidlemezek képződnek [8]. Egyes szerzők szerint számos kétértékű kation képes kohleátot képezni foszfatidilszerinekkel [16,17], erre azonban nem szolgáltattak meggyőző kísérletes bizonyítékokat. Éppen ellentétes megfigyelés, hogy a Mg^{2+}, Zn^{2+} és Ba^{2+} például nem hoz létre membrántekercseket DOPS-nel [18]. Ez utóbbi arra utal, hogy az ion töltésén kívül méretének is fontos szerepe lehet a lipid fejcsoportokkal kialakított kölcsönhatásban. Bizonyos polikationos vegyületek is képesek lehetnek kohleátképződést indukálni (lásd 2.1.5.2 fejezet). Foszfatidilglicerin fejcsoport esetén – ellentétben a PS-nel – mind Ca^{2+} [1,19], mind Mg^{2+} [20] hozzáadása kohleátképződéshez vezet. Érdekes módon a PG lipidek kétértékű kationok nélkül, pusztán NaCl jelenlétében is képesek kohleátokat képezni, ha elegendően hosszú ideig alacsony (4-5°C) hőmérsékleten tartják őket [10,21]. Néhány kísérleti megfigyelés alapján a szójából extrahált (85%-os tisztaságú) PS, illetve szintetikus palmitoil-oleoil-foszfatidilszerin (POPS) nem képezett kohleátot Ca^{2+}-ionokkal [18]. Más szerzők megfigyelése [9] szerint viszont a foszfolipidek zsírsavláncának legfeljebb másodlagos jelentősége van a kohleátok létrejöttében. Amennyiben a Ca^{2+} hozzáadása a lipid fázisátalakulási hőmérséklete fölött történik, telített, telítetlen, rövid és hosszú szénláncú foszfatidilszerin molekulákból egyaránt létre lehet hozni kohleátokat [9]. Továbbá minden esetben képződnek kohleátok, ha a

foszfolipid alkoholos molekuláris oldatához [22] vagy vizes közegben képzett, folyadékkristályos struktúráihoz (pl. micella, kettősrétegű lipid korong, liposzóma, [9]) adjuk a Ca^{2+}-ionokat. Mindebből arra következtethetünk, hogy a kohleátképződés kulcsa a foszfolipid molekula és a kétértékű kationok közötti kölcsönhatás.

2.1.3. Foszfatidilszerin–Ca^{2+} kölcsönhatás

A foszfatidilszerin molekulák az eukarióta sejtek legnagyobb mennyiségben előforduló negatív töltésű foszfolipidjei. A PS molekula egy glicerofoszfolipid, melyben a glicerin első és második szénatomjához észterkötéssel egy-egy zsírsav, míg a harmadik szénatomjához foszfodiészter kötésen keresztül egy szerinmolekula kapcsolódik. A sejtmembránban a flippáz enzim gondoskodik arról, hogy a foszfatidilszerinek a membrán citoszol felőli oldalán tartózkodjanak. Ennek a jelentősége abban rejlik, hogy a PS molekulák megjelenése a külső membránlemezben apoptotikus, fagocitotikus, illetve véralvadási szignálként szolgál [23]. A kohleátok membránját felépítő foszfatidilszerin és Ca^{2+}-ion közötti kölcsönhatásnak meghatározó szerepe van a kohleát-szerkezet kialakulásában. Számos különböző (telített, telítetlen, rövid és hosszú) zsírsavláncú PS molekula esetében figyeltek meg Ca^{2+}-indukálta kohleátképződést [9], azonban a közlemények túlnyomó többségében DOPS molekulák alkották a kohleátok membránját (4. ábra). A DOPS esetén a zsírsavláncokat egyszeresen telítetlen olajsav molekulák alkotják. A kettős kötés jelenléte miatt a molekula folyadékkristályos gél-fluid fázisátalakulási hőmérséklete (T_m) mindössze -11°C. A PS fejcsoport a fiziológiás pH körül széles tartományban (pH 4-8-ig) egyszeres nettó negatív töltést hordoz[1].



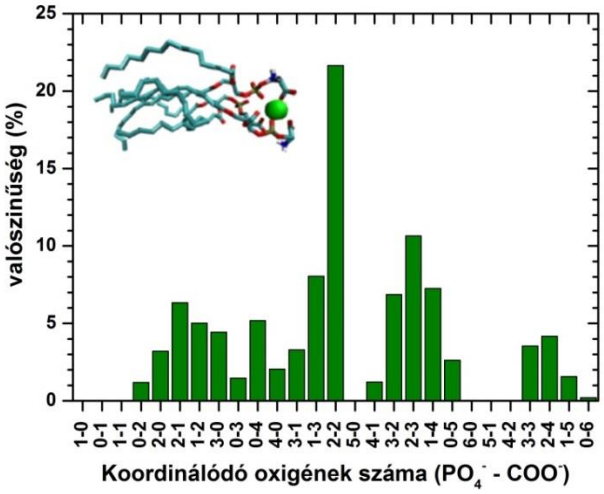
4. ábra *Dioleoil-foszfatidilszerin molekula nátrium sójának szerkezeti képlete. A kép forrása: https://avantilipids.com/product/840035/. Letöltve: 2017. április 13.*

[1] https://chemicalize.com/#/calculation

A Ca^{2+}-ionok és a foszfatidilszerin fejcsoportok közötti kölcsönhatást elsősorban liposzómákon tanulmányozták. A PS vezikulák 1 mM Ca^{2+}-koncentráció fölött először aggregálódnak majd fuzionálnak [24-26]. A Ca^{2+} 1:2 sztöchiometriájú komplexet képez a foszfatidilszerin molekulákkal kísérletes eredmények [24,27-30] és molekuladinamika (MD) szimulációk tanúsága [31,32] szerint. A Ca^{2+}-ionok foszfatidilszerin iránti kötődési affinitása aránylag jelentős, azonban a látszólagos kötődési állandóra széles határok között változó értékeket (pl. 3900 M^{-1} [24]; 10^6–10^4 M^{-1} [33]) találunk az irodalomban. Hasonló módon nagyságrendi különbségeket (pl. 12 M^{-1} [34]; 35 M^{-1} [35]; 10^4 M^{-1} [33]) mutatnak az intrinszik kötődési állandóra közölt eredmények. A nagy különbségek az eltérő kísérleti módszertannak, illetve a kísérleti eredmények értékelésénél alkalmazott elméleti megfontolások különbözőségének tulajdoníthatóak. A Ca^{2+}-ion foszfolipid membránokhoz való kötődése endoterm, entrópiavezérelt folyamat. A Ca^{2+}-ionoknak a PS-hez kötődésekor bekövetkező entrópianövekedés annak a következménye, hogy egyrészt a fejcsoportokhoz kötődő, másrészt a Ca^{2+}-ionok hidrátburkában a tömbfázishoz képest rendezettebb vízmolekulák "kiszorulnak" a kötésből, így a rendszer rendezetlenebbé válik [36,37]. A kötődésben tehát nem az elektrosztatikus kölcsönhatás entalpia-tagja dominál, ami egyébként exoterm folyamatot feltételezne. Ezt az is megerősíti, hogy a kötődés mértéke nagyobb, mint amit pusztán az elektrosztatikus kölcsönhatások alapján feltételezni lehetne [38]. A fent leírtak önmagában a Ca^{2+}-nak a PS-hez való kötődésére igazak. Ezzel szemben, ha a Ca^{2+}-ion koncentrációja olyan nagy, hogy kiváltja a vezikulák aggregációját és fúzióját, akkor erősen exoterm reakciót tapasztalnak [24]. Ezt azzal magyarázzák, hogy az aggregációt, illetve fúziót kiváltó nagyobb Ca^{2+}-koncentrációknál felléphet olyan molekuláris folyamat is, feltehetően a zsírsavláncok kristályosodása (lsd. később), ami jelentős (5,5 kcal/mol) hőfelszabadulással jár.

Infravörös spektroszkópos vizsgálatok eredményei alapján a Ca^{2+} kötődése a foszfátcsoport konformációváltozásához, az észter karbonil-, és a karboxilcsoportok mozgékonyságának csökkenéséhez, továbbá az egyes molekularészekhez asszociált vízmolekulák számának csökkenéséhez vezet [16,39-43]. A PS molekula konformációváltozása a zsírsavláncok rendezettségére is számottevően kihat: a szénlánc folyadékkristályos fluid fázisból kristályos állapotba kerül [16,30,39,44]. Ez a rendezettség olyan nagyfokú, hogy a DOPS-re jellemző fázisátalakulási hőmérséklet -

11°C-ról 120°C-ra emelkedik [45]. A Ca^{2+} két foszfátcsoporttal képez komplexet, az azonban nem egyértelmű, hogy ezek ugyanazon membránrétegen belül két szomszédos lipidmolekula között, vagy szomszédos kettősrétegek foszfolipidjei között alakulnak ki. A szomszédos membránokat összekötő Ca^{2+}-hidak kialakulását több szerző is valószínűsíti [24,46], de egyértelmű kísérletes bizonyítékot, tudomásom szerint, még nem szolgáltattak a létezésükre. NMR vizsgálatok azt mutatták, hogy a Ca^{2+} beágyazódik a membrán hidrofil, fejcsoporti régiójába mélyebben, mint például a Mg^{2+}, ami hajlamos a felülethez közelebb elhelyezkedni [30,47]. Ugyanakkor, Mg^{2+} jelenlétében nem tapasztaltak olyan fúziós jelenségeket, amelyek mögött a Ca^{2+}-hidak kialakulását sejtik. Az MD szimulációk is azt mutatták, hogy a Ca^{2+} nem teljesen a felszínen, hanem a membrán felszínétől kb. 0,5-0,6 nm-re a membránba ágyazódva helyezkedik el [31,48]. A Ca^{2+} különböző módokon köthet be a membránba, melyek közül a legvalószínűbb esetben két PS-molekulának egy-egy foszfát, illetve egy-egy karboxilcsoport eredetű oxigénatomjával koordinálódik (5. ábra).



5. ábra *A Ca^{2+}-ion különböző kötődési módjainak valószínűségi eloszlása, az MD szimulációk alapján. A vízszintes tengelyen a PO_4^- és COO^- csoportokhoz kapcsolódó oxigénatomok száma olvasható, kötőjellel elválasztva. A betétábrán a legvalószínűbb (2-2) mód pillanatképe látható. Martín-Molina és mtsai. [31] cikkéből adaptálva.*

Átlagosan 1,8 oxigénatom érkezik a foszfát, míg 2,4 a karboxilcsoport felől. Ezenkívül átlagosan még 2,8 víz eredetű oxigénatom koordinálódik a PS-hez kötött Ca^{2+}-ionhoz. Ez egyrészt a Ca^{2+}-ion első koordinációs héjának eredetileg 6 vízmolekulájából átlagosan 3,2 elvesztését, másrészt a koordinációs héj enyhe

expanzióját jelenti. A kötődés során maga a PS fejcsoportja is részlegesen dehidratálódik, a Ca^{2+} kötődése után átlagosan 7,5 vízmolekulát tartalmaz csak. A fenti eredmények elfogadásával kapcsolatban óvatosságra int, hogy *Vernier* és mtsai. [32] szerint: *(1)* a Ca^{2+} inkább a PS karboxilcsoportjaihoz kötődik, semmint a foszfátcsoporthoz; *(2)* ha kellően nagy fölöslegben adjuk a Ca^{2+}-ionokat, akkor azok a membránfelületen is megjelenhetnek. Összességében elmondhatjuk, hogy a Ca^{2+} és a PS közötti kölcsönhatás részletei máig sem teljesen tisztázottak.

2.1.4. Kohleátok előállításának módszerei

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 következő pontokban röviden ismertetem a módszerek főbb jellemzőit.

(1) **„Trapping" módszer:** DOPS liposzómákhoz kevertetés mellett, cseppenként adnak hozzá $CaCl_2$ oldatot. Általában 1:1 vagy 2:1 a lipid és Ca^{2+}-ion mólaránya. A kiindulási liposzóma különböző méretű és rétegszámú (lamellaritású) lehet, a keletkező kohleát minta többrétegű lipidlemezeket is tartalmazhat [6,49]. A módszer onnan kapta a nevét, hogy a feltekeredő lipidrétegek csapdába ejthetik a vizes fázisban jelenlévő anyagokat.

(2) **LC (Liposomes before Calcium) dialízis módszer:** Detergenssel szolubilizált foszfolipid oldatból a detergenst dialízissel eltávolítva liposzómákat állítanak elő. Ezután a liposzómákat $CaCl_2$ oldattal szemben dializálják [50]. A módszer elsősorban hidrofób hatóanyagok bezárására alkalmas [6]. Membránfehérjék is jó hatékonysággal zárhatóak így kohleátokba, s legtöbb esetben a natív konformációjukat is megtartják [51]. A módszer egy variánsának tekinthető, amikor a kiindulási liposzómákat nem dialízissel (hanem pl. extrudálással) állítják elő.

(3) **DC (Direct Calcium) dialízis módszer:** Detergenssel szolubilizált foszfolipid oldatot közvetlenül a $CaCl_2$ oldattal szemben dializálják. Feltételezések szerint ilyenkor nem keletkezik liposzómális köztitermék. A DC dialízis módszerrel

képződött kohleátok nagyobb átmérőjűek és jóval hosszabbak, mint az LC dialízis módszer esetén [50,51], de a membránfehérjék bezárási hatásfoka valamelyest kisebb. Az LC és DC módszert előszeretettel alkalmazzák fehérjék és DNS kohleátba zárására [51].

(4) **PEG/Dextrán emulziós (hidrogél izolációs) módszer:** Kis egyrétegű (unilamelláris) liposzómákat oszlatnak el 40%-os dextrán oldatban, majd ezt az elegyet 15%-os polietilén-glikol (PEG) oldatba keverik. A dextrán nem elegyedik a vizes PEG polimerrel, hanem cseppek formájában emulgeálódik benne. Állandó keverés mellett $CaCl_2$ oldatot adnak a rendszerhez, ami lassan a dextrános fázisba diffundál. Ezzel a módszerrel 1 μm-nél kisebb részecskéket, úgynevezett „nanokohleátokat" lehet előállítani [49,52].

(5) **Mikrofluidika-alapú módszer:** Foszfolipidek etanolos oldatát mikrofluidikai cellában elegyítik $CaCl_2$ oldattal. Mikronos nagyságrendű aggregátumok képződnek, amelyek szubmikron hosszúságú kohleátokat is tartalmazhatnak. A keletkező aggregátum (vagy „mikro-szférikus kohleát kompozit") mérete és alakja az etanolos és vizes fázis arányától, az áramlási sebességtől és a lipidkoncentrációtól függ [22].

(6) **Emulgeáló-liofilező módszer:** PS szerves oldószeres oldatában szonikálással diszpergálják a $CaCl_2$ szacharózt is tartalmazó vizes oldatát, majd az így képződött mikroemulziót a hatóanyagot és PEG-t tartalmazó vizes oldatban emulgeálják. A víz/olaj/víz összetett emulziót hirtelen -80°C-ra hűtik, majd liofilizálják. A liofilizátum rehidrálásakor 1 μm-nél rövidebb kohleátok keletkeznek [53].

2.1.5. Kohleátok mint hatóanyag-hordozó rendszerek

A kohleát membrántekercseket nagyon hamar mint potenciális hatóanyag-hordozó rendszereket kezdték vizsgálni. Joggal feltételezhették, hogy a tekercsek figyelemre méltó biofarmáciai profilt kölcsönözhetnek a hatóanyag számára, hiszen nagyon tömör, sokrétegű szerkezetük egyszerre biztosíthat kémiai, enzimatikus és mechanikai védelmet és elnyújtott hatóanyag-leadást. Ez a tulajdonság különösen hasznos lehet

akkor, ha külső hatásokra érzékeny ágenseket, például nukleinsavakat, peptideket, vagy fehérjéket szeretnénk a szervezetbe juttatni. Technológiai szempontból előnyt jelent, hogy a kohleátok viszonylag egyszerű módszerekkel előállíthatóak, hosszú időn keresztül megőrzik szerkezetüket, valamint liofilizálhatóak [3,8,51,54]. Biokompatibilitás szempontjából pedig ideálisak, mert szerkezetüket foszfatidilszerin és Ca^{2+}-ionok, tehát teljes mértékben szervezetazonos összetevők építik fel. A kohleátok elsősorban a membránba ágyazódó lipidoldékony vagy amfifil, esetleg a membránrétegek közé elektrosztatikus kölcsönhatásokkal rögzített, töltött molekulák bezárására lehetnek alkalmasak [6].

2.1.5.1. Amfotericin B és más hatóanyagok bezárása

A legtöbb publikáció és szabadalom az amfotericin B (AmB) bezárásával kapcsolatban jelent meg. Az AmB – szisztémás gombás fertőzések, illetve egyes protozoon fertőzések ellen alkalmazott – makrolid, polién antibiotikum, amely a gombasejtek membránjában az ergoszterolhoz kötődve csatornát képez, és felborítja a sejt homeosztázisát [55]. Toxikus hatása azon alapul, hogy kis mértékben az állati sejtek szteránvázas vegyületeihez, így a koleszterinhez is kötődik [56]. Rossz oldhatósága és biohasznosíthatósága miatt az AmB-t dezoxi-koláttal micella formájában szolubilizált (*Fungizone*®), illetve liposzomális hordozóba zárt formájában (*AmBisome*®) használják fel. Mindkét gyógyszert intravénásan alkalmazzák, és kedvezőtlen mellékhatásprofillal (vese és májkárosodás, központi idegrendszeri hatások, hányinger, láz stb.) rendelkeznek. A humán felhasználás során a hatóanyag 1-5 mg/ttkg dózisait alkalmazzák. Az AmB sem önmagában, sem detergenssel, vagy lipid rendszerek segítségével szolubilizált állapotában sem szívódik fel számottevő mértékben a gasztrointesztinális traktusból. Szükséges lenne tehát egy jobb biohasznosíthatóságot, kedvezőbb mellékhatásprofilt, és perorális alkalmazást biztosító formuláció kifejlesztése.

DOPS és koleszterin 9:1 arányú keverékéből álló membránrétegbe az AmB beépül, és mintegy 20 mol% koncentrációig egyenletesen eloszlik. Az AmB molekulák, a foszfolipidek tengelyével párhuzamosan helyezkednek el [57]. *Phamm* és mtsai. 54%-os [8], míg *Mannino* és mtsai több mint 98% hatékonysággal zártak kohleátba AmB-t [58]. A kohleátok 4 hónapnyi, 4°C-on való tárolás során végig stabilnak bizonyultak: a

kísérleti eredmények alapján a hatóanyag szivárgása elhanyagolható volt [58]. Egy másik vizsgálat szerint, liofilizált formában 6 hónapig 4°C-on tárolva sem változtak meg a jellemző tulajdonságaik [8]. *In vitro*, a kohleátba zárt AmB hatékonyan gátolta a *C. albicans* növekedését, kisebb, mint 1 μg/ml minimális gátló koncentrációban (MIC) [58]. *In vivo*, az AmB kohleátokat intraperitoneálisan, mindössze 0,5 mg/ttkg/nap dózisban alkalmazva egerek szisztémás kandidiázisának kezelésére 100%-os túlélést tapasztaltak a vizsgálat 16 napos időtartama alatt, szemben az üres kohleátokkal kezelt csoport 0%-os, és az azonos dózisú *Fungizone*-nal kezelt csoport 60%-os túlélési rátájával. Az AmB kohleátok ugyanebben a dózisban *per os* alkalmazva is 100%-os túléléshez vezettek. A kontrollcsoportban 0 %, a *Fungizone*-nal kezelt csoportban 70%, míg az *Ambisome*-mal kezelt csoportban 90% volt a túlélés aránya. Az AmB kohleátok perorálisan alkalmazva dózisfüggő módon csökkentették a vese és tüdőszövet CFU (colony forming unit, kolóniaformáló egység) értékét. A vizsgálatok során akár 20 mg/ttkg napi dózis esetében sem tapasztaltak vesetoxicitást, hemolitikus-, vagy immunológiai mellékhatásokat [59]. *Aspergillus fumigatus* okozta szisztémás gombafertőzés esetén egereknek 15 napon keresztül napi 40 mg/ttkg dózisban, intragasztrikusan adagolt AmB kohleát 80%-os túléléshez vezetett, a maximális tolerálható dózisban (4 mg/ttkg/nap) alkalmazott *Fungizone* 20%-os túlélési rátájával szemben. Az AmB kohleát dózisfüggő módon, két nagyságrenddel csökkentette a tüdő, a máj és a vese *Aspergillus* fertőzöttségét [60].

A gombaellenes hatóanyagokon kívül antituberkulotikumok és egyéb antibiotikumok [6], protozoon-ellenes miltefosine [8], VIII-as véralvadási faktor [61,62], antitumorális hatású raloxifen [63], illetve gyulladások és autoimmun kórképek kezelésére alkalmazott ST1959 kísérleti anyag [64] kohleátokba zárásáról és sikeres alkalmazásáról is olvashatunk a szakirodalomban. Elmondható, hogy a kohleátba zárás az esetek többségében védelmet biztosított a hatóanyagoknak az enzimatikus- és kémiai hatásokkal szemben, valamint növelte a hatékonyságot és jelentősen csökkentette a toxikus hatásokat. Figyelemre méltó, hogy a kohleátba zárás lehetővé tette egyes, eladdig csak parenterálisan alkalmazható, rossz biohasznosíthatóságú hatóanyagok (AmB, raloxifen, ST1959) hatékony és biztonságos perorális alkalmazását.

2.1.5.2. Hatóanyag, mint kohleátképző ágens

A kohleátok külön válfaját képviselik azok a membrántekercsek, amelyekben a Ca^{2+} helyett polikationos anyag stabilizálja a tekercsszerkezetet. Több polikationos vegyületről (pl. polilizin, kitozán) közölték, hogy Ca^{2+} hozzáadása nélkül képes kohleátképződést indukálni [65,66]. A negatív töltésű membránokat egymáshoz rögzítő „elektrosztatikus ragasztó" szerepét bizonyos hatóanyagok (pl. tobramicin) is betölthetik [67]. Az így kialakuló tobramicint kötő lipidszerkezeteket[1] a humán előbőr fibroblaszt sejtek felvették, antibakteriális hatékonyságuk pedig az önmagában alkalmazott hatóanyaghoz képest kis dózisoknál ekvivalensnek, nagyobb dózisoknál enyhén nagyobbnak bizonyult [66]. A polikationos, antimikróbás hatással rendelkező oligo-acil-lizil (Oligo-acyl-lysyl, OAK) peptidekről szintén leírták, hogy képesek kohleátokat létrehozni különböző összetételű negatív fejcsoporti töltésű lipidekkel elegyítve. Ezek az oligopeptidek szinergista hatást fejtenek ki kismolekulás antibiotikumokkal együtt alkalmazva. A szinergizmus akkor is jól érvényesült, ha kohleát formában alkalmazták azokat. Eritromicint OAK-kohleátokba zárva a toxikus hatások nagyságrendekkel csökkentek, míg a hatékonyság növekedett az önmagában adott hatóanyaghoz képest. Az eritromicin-OAK kohleátok jelentősen és dózisfüggő módon növelték a túlélést multidrog-rezisztens *E. coli*-val fertőzött egereknél [68,69]. Az OAK-kohleát mintákban a lipidkomponenst általában nem PS, hanem különböző lipidek (foszfatidiletanolamin, foszfatidilglicerin, tetraoleoil-kardiolipin stb.) keverékei alkotják. A kohleátképződés hatékonysága függ a lipidek fajtájától, arányától, az ikerionos lipidek jelenlététől és az OAK molekula szerkezetétől is. A magasabb fázisátalakulási hőmérsékletű és kevésbé hidratált lipidkeverékek gyorsabb kohleátképződést, lazább struktúrát és nagyobb antibakteriális hatékonyságot eredményeztek. A hatékonyság növekedésének oka feltehetően az, hogy a lazább szerkezet több eritromicin bezárását tette lehetővé [69]. Az OAK-kohleát mintákban – a membrántekercseken kívül – változatos alakú és méretű lipidstruktúrák (pl. vezikulák, lemezek) is előfordultak [70].

[1] A hivatkozott közleményben ezeket a szerkezeteket kohleátnak nevezték. Ezt a kifejezést a 2.1.6.3 fejezetben kifejtett okok miatt nem alkalmazom.

2.1.5.3. Kohleátok biofarmáciai tulajdonságai

Segarra és mtsai. egereken vizsgálták a kohleátba zárt AmB biodisztribúcióját és farmakokinetikáját [71]. Az intravénás beadást követően a vér AmB koncentrációjának változása egy meredek kezdeti, majd egy lassabb, közel exponenciális csökkenést mutatott, amelyek a disztribúció és az elimináció fázisainak feleltethetőek meg. A kapott adatokat legjobban kétrekeszes modell segítségével lehetett illeszteni. A farmakokinetikai paraméterek elemzése arra mutatott, hogy a kohleátba zárt AmB sokkal gyorsabban eltűnik a szisztémás keringésből, mint a micellába zárt forma (*Fungizone*). Az egér szerveiben az AmB szövet/vér megoszlási hányadosa a beadás utáni első órában gyors növekedést mutatott, feltehetően a kohleátoknak a kapillárisokban való passzív retenciója miatt. A 2.-tól a 6. óráig terjedő időszak során a májban és lépben tovább növekedett a megoszlási arány, ami feltehetően a retikuloendotéliális rendszer (RES) aktivitásának köszönhető. A tüdőben és a vesékben viszont csökkenést tapasztaltak ebben az időszakban. A 7.-től a 24. óráig a vizsgált szervekben lassú növekedést, illetve telítődést tapasztaltak, ami az AmB vérkeringés és a szövetek közötti megoszlásának az egyensúlyára utal.

Intravénásan alkalmazott rekombináns véralvadási VIII-as faktort (rFVIII) tartalmazó kohleátok biodisztribúciója szignifikánsan eltért az azonos lipidösszetételű rFVIII liposzómákétól [62]. A liposzómák 97%-a a beadás után 4 órával már a máj és lép szöveteiben volt megtalálható, ami arra utalt, hogy a RES gyorsan kivonta azokat a keringésből. Ezzel szemben a kohleátoknak csak 40%-a került a májba és a lépbe ugyanennyi idővel a beadás után. A liposzómák esetében a máj (78%-ban), a kohleátok esetében a lép (31%-ban) akkumulálta nagyobb mértékben a hatóanyag-hordozókat. A kohleátba csomagolt rFVIII farmakokinetikai profilja – egy kezdeti, a beadás után kb. két órával jelentkező csúcsot követően – az önmagában adott rFVIII-ral megegyező diszpozíciót mutatott. A kezdeti növekedés késleltetett hatóanyag-leadási képességre utal, a szabad hatóanyagéhoz hasonló kinetikájú vérszint-csökkenés pedig azt valószínűsíti, hogy a szervezetben a kohleátok nem alakulhattak át liposzómákká. A rFVIII liposzómák ugyanis a RES clearance-hatása miatt jóval meredekebb eliminációs fázist adtak volna. A kohleátba csomagolt rFVIII farmakokinetikai görbe alatti területe jóval kisebb volt a szabad hatóanyagénál. Ez azt jelentheti, hogy a hatóanyag legnagyobb része nem szabadult fel a hordozórendszerből [62].

Maguknak a kohleát részecskéknek a biodisztribúcióját a ^{3}H-koleszterin jelölés segítségével vizsgálták intramuszkuláris és perorális alkalmazás esetén. A jelölő sorsa a szervezetben nagyban függött a beadás módjától. Intramuszkuláris beadásnál elsősorban a beadás helyén volt mérhető a jelölő aktivitása, majd 24 óra elteltével az aktivitás megjelent a távoli szervekben, elsősorban a májban, vékonybélben és tüdőben. A perorális alkalmazásnál 24 óra múltán a jelölő a gasztrointesztinumból gyakorlatilag kiürült, azonban akkumulációt mutatott a szérumban, tüdőben, májban, lépben, vesékben és az agyszövetben . Ugyanakkor megfelelő kontroll vizsgálat hiányában kérdéses marad, hogy a kapott biodisztribúciós profil mennyiben a kohleát-hordozó és mennyiben az abból kiszabaduló koleszterin molekula jellemzője.

Egy olyan vizsgálatban, ahol a kohleátokat mesterséges gyomornedvben, majd mesterséges bélnedvben inkubálták, a struktúra jellegzetes változásait írták le [8]. A gyomornedvben a dinamikus fényszórásméréssel (DLS-sel) mért részecskeméret jelentősen megnőtt, majd bélnedvben csökkent, a morfológiai elemzés pedig a kohleátok gyomornedvben való kitekeredését, és bélnedvben való fragmentálódását, micellaképződését valószínűsítette. Ezzel párhuzamosan a kohleátokba zárt hatóanyagok (AmB, miltefosin) mesterséges gyomornedvben lassabb (55 perc alatt, kb. 13-15%), bélnedvben pedig gyorsabb (3-5 óra alatt, kb. 80%) kioldódást mutattak. A hatóanyag kioldódása és a gyomornedvben kitekeredett kohleátok későbbi degradációja szempontjából a mesterséges bélnedv epesav komponenseinek volt döntő szerepe. Fiziológiás pH-jú, 50 mM-os PBS pufferben a kioldódás mértéke 1 óra alatt kisebb, mint 3%-os volt.

Több vizsgálat is megerősítette, hogy kohleátok képesek hatóanyagukat a sejtekbe juttatni. Rodaminnal jelölt kohleátokat különböző sejtek *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is képesek voltak felvenni [54,72]. Antigén vagy DNS tartalmú kohleátok erős immunválaszt váltottak ki intramuszkuláris és perorális beadást követően (lsd. 2.1.5.4). A kohleátok és sejtek közötti kölcsönhatás részletei azonban nem ismertek.

2.1.5.4. Immunizálás és génterápia

A természetes immunválaszt kiváltó fehérjék, peptidek és szénhidrátok sok esetben az azokat hordozó biológiai membránok felszínéhez kötődnek. Ezért kézenfekvő gondolat, hogy az immunizálás során alkalmazott antigéneket is

lipidmembránokhoz kötve juttassuk a szervezetbe. A patogének alegységeit hordozó proteoliposzómákat valóban sikerrel lehet alkalmazni vakcinációs adjuvánsként. Ezek alapján logikusnak tűnt a liposzómáknál stabilabb kohleát rendszerek alkalmasságát is megvizsgálni [73]. A kohleátba zárt fehérjék, peptidek, illetve DNS fragmentumok képesek voltak antigén-specifikus immunválaszt kiváltani perorális, intranazális és intramuszkuláris alkalmazás estén egyaránt. Hatásukra mind a cirkuláló-, mind a nyálkahártya-antitestek jelentős mennyiségben és hosszú időn keresztül termelődtek. A kohleát vakcinák perorális és intramuszkuláris adagolást követően védelmet biztosítottak vírusfertőzéses tesztekben is [74]. A HIV-1 IIIB vírus *env, tat* és *rev* génjeit, valamint *Herpes simplex vírus* (HSV) glikoprotein B kapszidfehérjéjét kódoló gént tartalmazó DNS plazmidokat 40-80%-os hatékonysággal zárták kohleátokba. Az egereknek intramuszkulárisan, illetve *per os* beadott kohleát HIV DNS vektorok a kontroll csoportokét jelentősen meghaladó sejtszintű válaszokat produkáltak. Egyszeri intramuszkuláris injekció után az antigénspecifikus celluláris immunitás legalább négy hónapig megfigyelhető maradt a kísérleti állatokban. A HSV DNS kohleát vektorok intranazális, intragasztrikus, intramuszkuláris és intraokuláris alkalmazása egyaránt HSV specifikus IgG és IgA antitestek termelődéséhez vezetett. A kohleát vektor 8-40-szer hatékonyabbnak bizonyult, mint az önmagában alkalmazott DNS molekula. Az immunizálás védettséget biztosított az állatoknak egy enélkül letális hatású intravaginális HSV fertőzéssel szemben [54].

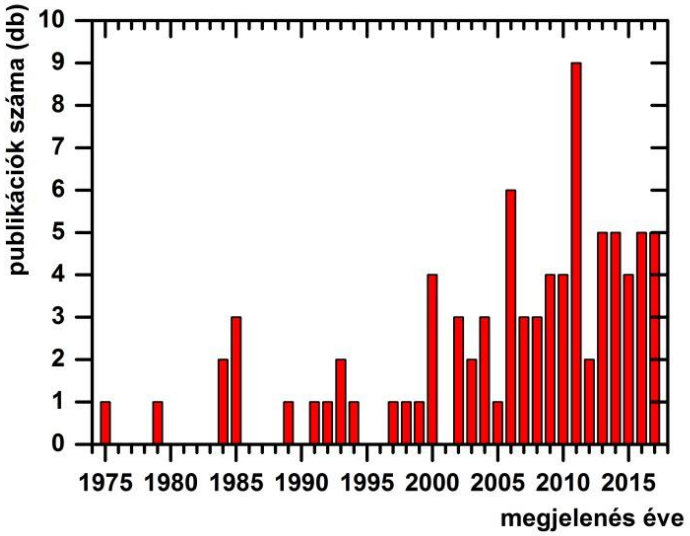
A vakcina adjuvánsok között külön technológiai platformmá nőtte ki magát a *Finlay kohleát adjuvánsok* (adjuvant Finlay cochleate, AFCo) csoportja [75]. Ezek stabil, tubuláris struktúrák, amik baktériumokból kivont, negatív töltésű lipideket, fehérjéket és lipopoliszaharidokat tartalmazó proteoliposzómákhoz Ca^{2+}-ionokat adva keletkeznek. A *Neisseria meningitidis* baktériumon alapuló kohleát adjuvánst AFCo1-nek [76], a *Vibrio cholerae*-ből hasonló módszerrel előállított antigénhordozót az AFCo2-nek nevezték el [77]. Az AFCo1 továbbfejlesztett változata a *Neisseria meningitidis B* tisztított, nem-toxikus LPS molekuláit tartalmazza [78]. Mindegyik kohleát adjuváns a proteoliposzómáékat meghaladó immunogenitással rendelkezett különböző (orr, száj, rektális, vaginális) nyálkahártyákon, vagy akár intramuszkulárisan alkalmazva. Az adjuváns kohleátok az immunizáláson túl akár hatóanyagot is hordozhatnak. Az AFCo 3 sporotrichózis kezelésére kifejlesztett, AmB-t tartalmazó

változata jelentős mértékben növelte a hatóanyag hatékonyságát és csökkentette a toxikus hatásokat *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban egyaránt [78].

In vitro hatékonyan tudtak kohleátba zárt DNS-sel transzfektálni fibroblaszt sejteket. *In vivo* a kohleáttal bevitt, 7400 bázispár hosszúságú plazmid kódolta β-galaktozidáz enzim jelentős aktivitása volt mérhető egér máj és lép szöveteiben intranazális alkalmazást követően. Intramuszkuláris alkalmazás esetén a beadás helyén mértek jelentős enzimaktivitást [54]. Zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein, GFP) kohleátba zárt génjével 4T1 emlő adenokarcinóma sejtek 19,5±10,1%-át sikerült transzfektálni *in vitro* [72].

2.1.6. A kohleát-szakirodalom kritikus értékelése

A kohleátok felfedezésének évétől (1975) 2017. október 18-ig a *PubMed* adatbázisban mindössze 79 olyan találatot kaptam ahol a publikációk címében vagy absztraktjában szerepel a „cochleate" vagy „nanocochleate" szógyök. A publikációs tendencia a 2000-es évektől egyértelmű növekedést mutat (6. ábra).



6. ábra *A PubMed adatbázisban található azon publikációk év szerinti megoszlása 1975-2017. október 18-ig, melyek címükben vagy absztraktjuk szövegében tartalmazzák a „cochleate" vagy „nanocochleate" szót.*

A *Medical Subject Headings* adatbázis egyáltalán nem tartalmazza a „cochleate" kulcsszót. A *Google Patents* adatbázisa 58 olyan találatot ad, ahol az absztrakt tartalmazza a „cochleate" szógyököt. Összehasonlításképpen: a kohleátoknál mindössze

tíz évvel korábban felfedezett, szintén foszfolipid alapú liposzómák kb. tucatnyi törzskönyvezett készítményben szerepelnek hordozórendszerként [79], és éves szinten több ezer publikáció[1] főszereplői.

Nincs tudomásom arról, hogy bárhol a világon törzskönyvezésre került volna kohleát-alapú hatóanyag-hordozó rendszer. A *Food and Drug Administration* honlapján keresztül hozzáférhető adatbázisok nem tartalmazzák a „cochleate" kifejezést. Az *Európai Gyógyszerügynökség* honlapján keresztül elérhető adatbázisokban egyetlen helyen szerepel a „cochleate" kifejezés: egy vakcina adjuvánsokról szóló anyag modern gyógyszerformákat listázó felsorolásában [80]. Ismereteink szerint jelenleg kizárólag a New Jersey-beli Bridgewater székhelyű *Matinas Biopharma* nevű cég foglalkozik kohleát alapú hatóanyag-leadó rendszerek kifejlesztésével[2]. Honlapjuk tanúsága szerint az AmB-kohleát gyógyszerjelöltjük sikerrel teljesítette a fázis I. humán klinikai vizsgálatokat, jelenleg a fázis II. vizsgálatok előkészítése zajlik. Ezenkívül több hatóanyaggal (amikacin, ibuprofen, kaperomicin, meropenem, atovaquone, valamint vakcinák és antivirális szerek) végeznek kohleát-formulációs vizsgálatokat. A Finlay technológiával készült vakcina adjuvánsok közül az AFCo1 egy 2013-as összefoglaló szerint előrehaladott nem-klinikai fejlesztési stádiumban, a fázis I. klinikai vizsgálatok előszobájában járt [75]. Összességében azt láthatjuk, hogy 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 gondoljuk, hogy ez a viszonylagos sikertelenség jól azonosítható szakmai hiányosságokra és technológiai problémákra vezethető vissza, melyek megoldása előremozdíthatná a kohleát alapú hatóanyag-hordozó rendszerek fejlesztését. A mindmáig megoldatlan kihívások a kohleát szakirodalom kritikus értékelése során azonosíthatóak. Ezeket igyekszem röviden összefoglalni az alábbiakban.

---

[1] Például a PubMed adatbázis 2121 darab a „liposome" szógyököt címében vagy absztraktjában szerepeltető publikációt tart számon csak a 2016-os évből.

[2] A *Matinas Biopharma* (www.matinasbiopharma.com) 2015 januárjában vásárolta fel a bizonyos kohleát formulációs technológiákat birtokló *Aquarius Biotechnologies* vállalatot. Az akvizíciótól azt remélték, hogy a korábban hosszú éveken keresztül stagnáló termékfejlesztések előrelendülését, az AmB-kohleát esetén a fázis II. klinikai vizsgálatok elindulását fogja eredményezni [1].

2.1.6.1. Mennyire megalapozottak az eddigi publikációk eredményei?

A hatóanyagok kohleátba zárásának és alkalmazásának egyes aspektusait csak olyan összefoglaló közleményekben olvashatjuk, amelyek a kísérleti módszertant és a kapott eredményeket nem részletezik kellőképpen (lsd.: [6,49,54,73,74,82]). Ezek az összefoglalók több fontos megállapításukat konferencia poszterekre vagy készítés alatt álló, illetve közlésre benyújtott kéziratokra hivatkozva fogalmazzák meg. Olykor egy-egy – módszertani leírással meg nem támogatott – részeredményt mutatnak be a készülő munkákból. Mivel a posztereken bemutatott eredmények javarészt nem hozzáférhetőek, az említett kéziratok többsége pedig végül nem jelent meg, a rájuk hivatkozva tett megállapítások óvatosan kezelendők, nem tekinthetőek kellően alátámasztottnak. Gyakori jelenség a kohleát-irodalomban, hogy egy eredeti közlemény eredményei és ábrái jól-rosszul hivatkozva újra és újra felbukkannak a későbbi összefoglalókban, majd ezeket egészítik ki a szerzők a nem publikált kísérleteikből származó részeredményekkel, következtetésekkel és elméletekkel. Emiatt a terület amúgy is szűkös szakirodalma meglehetősen sok redundanciát tartalmaz, és a szokásosnál is jobban keverednek benne az igazolható adatok a hipotetikus állításokkal.

2.1.6.2. Nem ismert a kohleátképződés részletes mechanizmusa

A kohleátokra vonatkozó közleményeket elolvasva, arra jutottam, hogy a kohleátképződés mechanizmusa máig sem pontosan ismert. Nem teljesen azonosítottak a membrántekercsek kialakulásának köztes állapotai, nem ismert a képződés során keletkező struktúrák szerepe és a kohleát-képződés termodinamikai hajtóereje (lsd. 2.1.2 fejezet). *Papahadjopoulos, Phamm* és *Nagarsekar* különféle transzmissziós és pásztázó elektronmikroszkópos technikákkal készült képek elemzése alapján alkotta meg – egymásnak részben ellentmondó – kohleátképződési modelljét. Elképzeléseiket némi óvatossággal kell fogadnunk, hiszen nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy a mintaelőkészítés egyes lépései (pl.: felület-inkubálás, dehidratáció, szárítás, fagyasztva szárítás, vákuumgőzölés, kontrasztozás) során műtermékek is keletkezhettek.

Mindössze részleges eredményeket ismerünk arra vonatkozóan, hogy miként befolyásolják a preparálási módszerek a kohleátok képződését, különböző összetételek esetén. Nincs tudomásom a gyakorlatban alkalmazható olyan egyszerű módszerről, amelynek segítségével a kohleátképződés hatékonyságát számszerűsíteni lehetne. Az

eddigi kutatások, kimondva-kimondatlanul, fő célja a kohleát-alapú hatóanyag-hordozó rendszerek kifejlesztése volt. Azonban egyelőre sem az eddigi preparálási tapasztalatok, sem a képződési mechanizmusokra javasolt modellek nem teszik lehetővé, hogy racionálisan tervezzünk kohleát-alapú gyógyszerhordozó-rendszereket.

2.1.6.3. A strukturális jellemzés gyakran hiányos

Általánosan elmondható, hogy a legtöbb vizsgálat a kohleátok alkalmazására fókuszál, és elhanyagolja a minta körültekintő strukturális jellemzését. Olykor egyáltalán nem, vagy alkalmatlan módszerrel azonosítják a kohleátok jelenlétét és paramétereit. Egyes esetekben felmerülhet a kérdés, hogy a közlemények szerzőinek valóban kohleát rendszert sikerült-e előállítaniuk. Előfordul, hogy egyszerűen nem közölnek képeket a kohleátokról [50,59,60,62,64,69,71,72,83,84]. Más esetekben képződésüket szemmel (precipitáció), és optikai mikroszkópiával (hosszúkás objektumok jelenléte) „állapították meg" [53,78,85,86]. Kritikusan nézve az előző két módszer egyike sem alkalmas arra, hogy a keletkező struktúrák finomszerkezetét felbontsa, és így a kohleátképződést igazolja. Adjuváns Finlay kohleátokról elvétve közöltek nagyfelbontású elektronmikroszkópos felvételeket. Egyetlen részecske egyetlen részletét ábrázoló kép hivatott bemutatni az AFCo1 jellemző geometriáját [77], a részecskesokaságot bemutató képen pedig a részecskék inkább szálas, mint tekercs szerkezetűnek látszanak [75]. Az AFCo2 részecskék szintén nem tekercshez, hanem vesszőköteghez hasonló struktúrának látszanak, és mindössze egyetlen, apró, rossz felbontású képen valószínűsíthető spirális szerkezet jelenléte [85]. A Ca^{2+} helyett tobramicin vagy polilizin hozzáadására kialakult struktúrák, noha kohleátnak nevezték azokat, a nagyfelbontású pásztázó elektronmikroszkópos képeken valójában egyáltalán nem mutattak kohleátokra utaló morfológiai tulajdonságokat [66]. Kitozán-nanokohleátok TEM felvételén kohleátok helyett valójában multilamelláris vezikula (MLV) aggregátumokat lehet azonosítani [65]. Ráadásul a Ca^{2+}-alapú és kitozános mintákról készült kép valójában egy és ugyanazon felvétel különböző mértékben nagyított változata, ami alapjaiban kérdőjelezi meg a publikáció hitelességét. Az OAK-kohleátok vizsgálata során fénymikroszkópos analízissel, tehát a hosszúkás objektumok relatív mennyiségének becslésével állapították meg, hogy egy-egy adott összetételű minta mennyire kohleátképző tulajdonságú [70]. Az ígéretesnek tartott összetételekről

mindössze egy-egy fagyasztva töréses elektronmikroszkópos képet mutattak be. Ez azonban legfeljebb annak alátámasztására elegendő, hogy megállapíthassuk, az adott mintában voltak-e egyáltalán kohleátok. Egy-egy mintáról közölt néhány nagyfelbontású, reprezentatív felvétel már önmagában is segítené az egyes kohleát-összetételek alapvető értékelését. A minta összességének körültekintő jellemzése pedig magába kellene, hogy foglalja a kohleátok morfológiáját, átmérő- és hossz-eloszlását, mennyiségét, a melléktermékek jellemzését és relatív arányát. Egyes tanulmányok bemutatják ugyan az általuk vizsgált kohleátok méreteloszlását, azonban azokban az esetekben, amikor a méreteloszlás vizsgálatát optikai vagy fluoreszcencia mikroszkópos módszerrel végezték [61,85], bizonytalannak tekinthető, hogy a struktúrák valóban kohleátok voltak-e. A mikroszkóp feloldási határánál kisebb méretű részecskéket pedig eleve nem vehették figyelembe a méretmeghatározásnál. A megbízhatóbb, egész részecske sokaságot figyelembe vevő méreteloszlás-vizsgálatokat elektronmikroszkópos módszerek segítségével végezték [3,22]. Ily módon lehetővé vált mind a kohleát szerkezet azonosítása, mind a részecskék hosszának és átmérőjének meghatározása. Különösen megbízhatónak tekinthetőek azok a vizsgálatok, melyekben a nagyfelbontású képalkotó eljárások közül párhuzamosan többet is alkalmaztak (pl. TEM, SEM, krio-TEM), vagy a képalkotást más szerkezetvizsgáló eljárással (pl. SAXS) egészítették ki [3,9,22].

2.1.6.4. A méreteloszlás optimalizálása nem megoldott

Bármely multipartikuláris hatóanyag-hordozó rendszer formulálásakor fontos követelmény, hogy reprodukálható módon biztosítani tudjuk a technológiai eljárásoknak, illetve az alkalmazásnak megfelelő részecskeméret-eloszlást. A részecskék mérete döntően befolyásolhatja a hordozórendszer szervezeten belüli sorsát, és így a terápia sikerét. Intravénás alkalmazás esetén például, az embóliaveszélyt elkerülendő, sem a részecskék hossza, sem átmérője nem haladhatja meg a néhány μm-t [87]. A legtöbb esetben a kohleátok mindössze néhány száz nm átmérőjűek, ugyanakkor jó néhány μm hosszúak, tehát intravénás alkalmazásra közvetlenül nem lennének alkalmasak. Nem zárható ki, hogy ezek a hosszú és vékony struktúrák topikális vagy perorális alkalmazás esetén – hasonlóan a tűs kristályokhoz – akár szöveti irritációt is kiválthatnak. Részecskeméretük csökkentése tehát mindenképpen indokolt lenne. A

kohleátok (elsősorban) hosszméretének csökkentésére eddig ötféle eljárást publikáltak.

(1) A hidrogél izolációs módszerrel 1 μm-nél rövidebb részecskéket, úgynevezett „nanokohleátokat" lehetett előállítani (lásd 2.1.4 fejezet). Az így előállított kohleát minták DLS-sel meghatározott „mérete" különböző tanulmányokban [8,63,88] 230 és 407 nm között változott[1]. A nanokohleátokról közölt elektronmikroszkópos képeken néhol valóban mikronnál rövidebb [8,82], néhol azonban több mikrométer hosszú részecskéket is láthatunk [63]. Nagy felbontású SEM képek alapos elemzésével a „nanokohleátok" döntő többségének hossza az 1-5 μm tartományba esett [22]. Ez ugyan mind a hossz, mind a polidiszperzitás csökkenését jelentette a trapping módszerrel készült kohleátokhoz képest, azonban továbbra is legfeljebb a részecskék átmérője esett a szubmikronos nagyságrendbe.

(2) A hidrogél izolációs módszer egyszerűsített változatának tekinthető, amikor a Ca^{2+}-ionokat tartalmazó oldatot dextránba kevert liposzómákhoz adták. A dextrános oldatban az alkotórészek diffúziója csökken, így lassul a tekercsek növekedése [61].

(3) Egy másik kísérletben a már kialakult, normál méretű kohleátok méretét egymás utáni fagyasztás-olvasztásos ciklusokkal igyekeztek csökkenteni [61]. A két utóbbi módszer segítségével kapott kohleátok „átlagos mérete" DLS-mérések alapján „500 nm-nek vagy kisebbnek" adódott. Az idézett közlemény azonban nem tartalmazott alátámasztó képet vagy DLS-görbét. További kritikaként fogalmaznám meg, hogy a mérés előtt 0,45 μm-es pórusméretű szűrőn is átpréselték a mintát, ami önmagában is kizárja az 500 nm-nél nagyobb részecskék jelenlétét. Ezek alapján a módosított hidrogél izolációs és a fagyasztás-olvasztásos eljárások alkalmassága a kohleátok méretének csökkentésre nem tekinthető kellően bizonyítottnak.

[1] A DLS-sel végzett méretmeghatározás egy nem-szférikus részecske esetén annak a hipotetikus, tömör gömbnek a sugarát adja meg, ami éppen olyan sebességgel diffundálna az adott közegben, mint ahogy azt a vizsgált részecske teszi [2]. Az így nyert "méret" valójában nem sokat árul el egy henger alakú részecske hosszáról és átmérőjéről. A szférikus alaktól, illetve nem tömör szerkezettől eltérő esetekre korrekciós számításokat kellene végezni.

(4) Az emulgeáló-liofilizáló módszer lényege, hogy – a hidrogél izolációhoz hasonlóan – a Ca^{2+}–PS kölcsönhatás minél kisebb kompartmentekben játszódjon le. Az így nyert kohleátok „mérete" DLS-sel meghatározva 0,8 μm-nek adódott. A szerzők ugyanakkor utaltak arra, hogy ez az érték kisebb, mint az optikai mikroszkópban látható hossz. A mintát nagyfelbontású képalkotó módszerrel nem vizsgálták, az általuk publikált optikai mikroszkópos képen a kohleátok azonosítása a kép gyenge minősége miatt gyakorlatilag lehetetlen [53].

(5) Az eddigi legígéretesebb és jól dokumentált módszer azon alapul, hogy a foszfolipidek etanolos oldatát mikrofluidikai cellában elegyítik $CaCl_2$ oldattal (2.1.4). Ennek a technikának a hátulütője, hogy a bizonyos esetekben valóban szubmikron hosszúságú kohleátok, néhány μm átmérőjű szférikus aggregátumokká (a szerzők nomenklaturájával: „kompozitokká") állnak össze, melyek egymással is hajlamosak agglomerálódni [22].

A fentiek tükrében megállapíthatjuk, hogy a kohleátok méreteloszlásának optimalizálása mindmáig megoldatlan. Szükséges tehát megfelelő eljárás kidolgozása a részecskék nanonizálására, akár speciális előállítási módszer, akár méretcsökkentés segítségével.

2.1.6.5. A kohleát mintákban melléktermékek is találhatóak

Tovább nehezíti a kohleátokról szerzett ismeretek értelmezését, hogy a kohleátként vizsgált minták valójában heterogén, melléktermékeket is jelentős mennyiségben tartalmazó rendszerek. A melléktermékek között előfordulhatnak pl. uni- és multilamelláris vezikulák, lipidlemez kötegek, szabálytalan alakú lipid-kation komplexek. Azokban a közleményekben, amelyekben az ábrákon bemutatott látómező elegendően nagy, és az alkalmazott felbontás megfelelő, jól kivehetőek a nem-kohleát struktúrák is. A melléktermékek jelenléte alapjaiban kérdőjelezi meg az összes analitikai, valamint *in vitro* és *in vivo* hatékonyság, toxicitás, farmakokinetikai és biodisztribúciós vizsgálatokból levont következtetéseket. Mivel a szerzők nem törekedtek a kohleátok és a melléktermékek szétválasztására, a kapott eredmények a heterogén lipid-kation komplexek együttesét, nem pedig magukat a kohleátokat

jellemzik. Ráadásul a kohleátok és egyéb Ca^{2+}-lipid rendszerek jellemzően több tíz vagy akár több száz mikrométeres nagyságú aggregátumokat tartalmaztak (lsd. 2.1.6.6 fejezet). Mivel ez a méret bőven az embóliahatár felett van, a „kohleátok" intravénás alkalmazásról szóló beszámolók különösen zavarba ejtőek. A fentiek fényében kijelenthető, hogy a korábbi vizsgálatok eredményeiből nem állapítható meg egyértelműen a kohleát-alapú hatóanyag-hordozóknak a sejtekkel való kölcsönhatása, biodisztribúciója, toxicitása és hatékonysága sem. A kohleátok, mint hatóanyag-hordozó rendszerek alkalmasságának vizsgálatához feltétlenül szükséges lenne, hogy diszpergált, a melléktermékektől elválasztott, homogén kohleát mintával rendelkezzünk.

2.1.6.6. A kohleátok és melléktermékeik aggregátumokat képeznek

Gyakorlatilag az összes, a 2.1.6.3 pontban tárgyalt, méretmeghatározó eljárás érvényességét megkérdőjelezi az, hogy a kohleátok és nem kohleát melléktermékek egymással szorosan aggregálódva[1] találhatóak a mintákban. A polimorf struktúra és az aggregáció minden olyan publikációban látható, ahol a kialakult részecske-sokaságról is közölnek képet [2,3,7,9,14,16,22,49,51,54,58,61,63,66,68,70,75,78,82]. Ennek ellenére a tanulmányok szövege ritkán említi az aggregáció jelenségét. Az aggregáció oka, hogy a kohleátképződéshez nélkülözhetetlen elektrolit (Ca^{2+}-ion, esetleg polielektrolit hatóanyag) nem csak a membrántekercsek belső szerkezetét stabilizálja, hanem a részecskék felületi töltését is megváltoztatja (illetve, egyes elképzelések szerint, a szomszédos részecskék felületét is összekapcsolhatja egymással). Meggyőződésem, hogy az aggregáció nem csak a méreteloszlás megbízható meghatározását nehezíti meg, hanem a kohleátokból előállítható hatóanyag-hordozó rendszerek fejlesztését is alapvetően gátolta az elmúlt évtizedekben. Létezik egy szabadalom, ami megoldást javasol az aggregáció megszüntetésére olyan módon, hogy kazeint, tejet, különböző tejtermékeket vagy metilcellulózt elegyít a kohleátokhoz [91]. A fehérje természetű

[1] A részecskék csoportosulását az összetartó kölcsönhatások laza vagy szoros jellege alapján az „aggregáció" és „agglomeráció" szavakkal különbözteti meg a szakirodalom. Sajnos nem egyértelmű, hogy melyik szó, melyik esetet jelenti. A nomenklatúra ugyanis nem egységes, a különböző közlemények, szakkönyvek, mi több a nemzeti és nemzetközi standardként használatos gyógyszerkönyvek is egymásnak ellentmondó definíciókat fogalmaznak meg [3]. Disszertációmban az „aggregál", „aggregátum" kifejezéseket alkalmazom a részecskék – általános értelemben vett – csoportosulására.

segédanyagok alkalmazása azonban számos problémát vet fel. Csökkenhet az eltarthatóság ideje, immunreakciók léphetnek fel, és megváltozhat a hatóanyag-hordozó farmakokinetikája. A metilcellulóz, és a szabadalomban felsorolt több tucatnyi, alkalmasnak vélt polimer (pl. különféle cellulózszármazékok, keményítők stb.) alkalmazhatóságára azóta sincsenek egyértelmű kísérletes bizonyítékok. Kívánatos lenne tehát hatékony aggregáció-gátló, vagy az aggregátumokat szétválasztó eljárás kidolgozása.

2.2. Atomierő-mikroszkópia a mikro- és nanorendszerek vizsgálatában

Az atomierő-mikroszkóp működésének külön fejezetben való bemutatását a technika viszonylagos újszerűsége, és a disszertációban bemutatott eredmények (különösen az erőgörbék) értelmezhetőségének megkönnyítése indokolja.

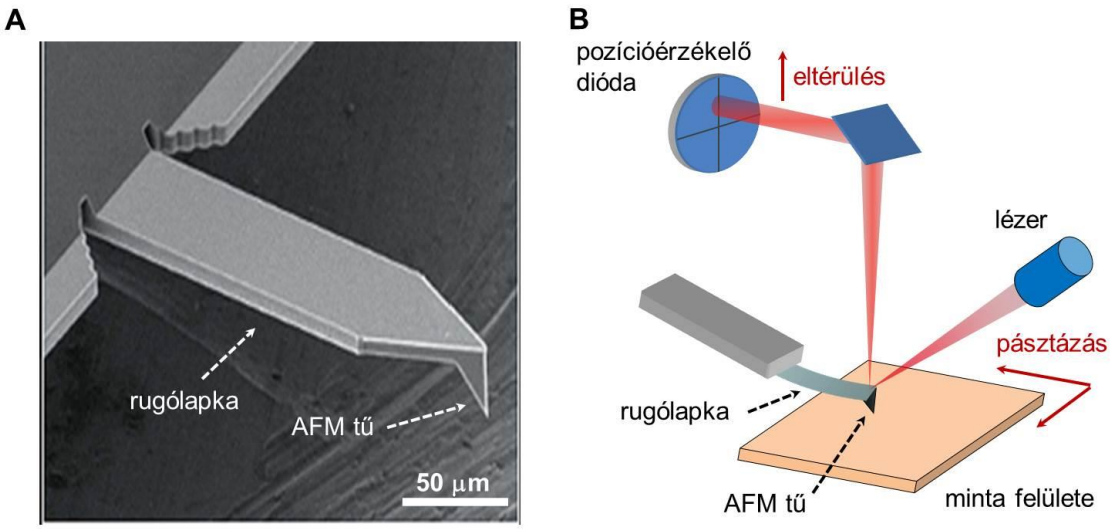
2.2.1. Az atomierő-mikroszkóp működése

A mikroszkóp kifejezés a görög mikron (*μικρόν*, kicsiny) és szkopein (*σκοπείν*, nézni) szavak összetételéből származik, és olyan berendezést jelöl, ami képes láthatóvá tenni a szabad szem felbontási határánál kisebb struktúrákat. A képalkotás általánosabb definíciója alapján egy képet úgy állítunk elő, hogy a vizsgált objektum egy kiválasztott fizikai tulajdonságát pontról-pontra "letapogatjuk", majd a meghatározott, esetleg transzformált értékeket a pontok térbeli/síkbeli helyzetének megfelelően ábrázoljuk. Az atomierő-mikroszkóp (atomic force microscope, AFM) esetében olyan eszközről beszélhetünk, amely az atomok szintjén jelentkező kölcsönhatásokat (atomi erőket) képes detektálni, és ezek segítségével alkot képet a vizsgált tárgy felületéről. A módszer a pásztázó próbamikroszkópok családjába tartozik, közvetlen elődjének a pásztázó alagútáram mikroszkóp (Scanning Tunelling Microscope, STM) tekinthető, amelyet 1981-ben fejlesztett ki *Gerd Binnig* és *Heinrich Rohrer* [92] (1986-ban Nobel díjban részesültek [93]). Az első AFM-et *Binnig, Quate* és *Gerber* építették 1986-ban [94].

2.2.2. Hogyan detektálhatunk atomi erőket?

Az AFM segítségével észlelt atomi erők az atomok pozitív töltésű magjának, illetve negatív töltésű elektronfelhőinek egy másik atom elektronfelhőjére illetve magjára kifejtett elektrosztatikus vonzásából, illetve taszításából származnak. A vonzó és taszító kölcsönhatások egyszerre vannak jelen, ezek mértéke elsősorban a kölcsönhatásba kerülő atomok távolságától függ. Nagyobb távolságoknál a vonzó kölcsönhatások dominálnak, tehát elsősorban az atommag és a másik atom elektronfelhője közti vonzó *Coulomb*-erők érvényesülnek. Az atomokat olyan közelségbe hozva, ahol az elektronfelhőik nagyon megközelítik egymást, átlapolódni kezdenek, az atommag- és elektronfelhő párok közti taszítás dominánssá válik. Az AFM berendezésben az úgynevezett „tű" (tűszonda vagy próba) segítségével tapogatjuk le a

vizsgálandó felületet. A tű csúcsának görbületi sugara általában kisebb, mint 10 nm. A fent leírtak szerint, a tűhegynek és a mintafelületnek az egymáshoz legközelebb kerülő atomjai között távolságfüggő, atomi szintű, vonzó és taszító kölcsönhatások lépnek fel. Nagy (több tíz nanométer) távolságban ezek a kölcsönhatások gyakorlatilag mérhetetlenül kicsivé válnak. Ha a tűt a felszín mindössze néhány nanométeres közelségébe visszük, akkor először eredő vonzó-, majd tovább közelítve eredő taszító kölcsönhatás lép fel. Ahhoz, hogy ezeket a vonzó/taszító kölcsönhatásokat, azok változását detektálhassuk a tűt egy miniatűr laprugó (vagy rugólapka) végére rögzítjük (7. A ábra).



7. ábra *(A) Tűszonda-rugólapka rendszer SEM képe. A kép forrása a gyártó weboldala (http://probe.olympus-global.com), letöltve 2017. július 7-én. (B) Az atomierő-mikroszkóp működésének sémája.*

A tűre ható vonzás, illetve taszítás a laprugó elhajlását okozza. Ezt a mindössze néhány nanométeres elhajlást úgy tesszük mérhetővé, hogy a rugólapka felületét vékony fényvisszaverő fémréteggel vonjuk be, és a lapka végére keskeny lézerfény-nyalábot fókuszálunk (7. B ábra). A visszaverődő fénynyaláb egy négyosztatú pozícióérzékelő diódára esik, amelynek kvadránsain a fényintenzitással arányos fotoáram keletkezik. (Valójában egy optikai emelőt hozunk létre: a laprugó parányi elhajlását a lézersugár a dióda felületén sokkal nagyobb eltérülésként képezi le.) A kvadránsokról, ellenállások közbeiktatásával, feszültségjeleket vezetünk el, melyek elemzésével a lézersugár pozíciója meghatározható. A diódára eső lézersugár pozíciójának változásából – kalibráció elvégzése után – megadható a rugólapka elhajlásának (Δl) mértéke. Ebből a

rugólapka rugóállandójának (k) ismeretében a tűhegyre ható F erő a Hooke-törvény értelmében egyszerűen kiszámítható:

$$F = k \cdot \Delta l.$$

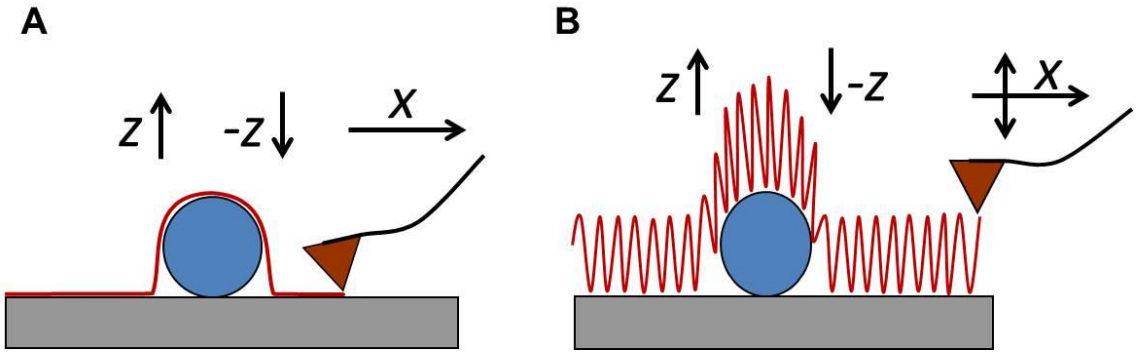
A tűt is tartalmazó rugólapkák anyaga jellemzően szilícium vagy szilícium-nitrid. Ezek hátulja, olykor mindkét felülete vékonyan fémgőzölt. A rugólapka hossza a néhány μm-től a több száz μm-ig terjed, szélességük általában néhány 10 μm. A tű alakja változatos (tetraéderes, kónuszos, hengeres stb.) lehet. A kereskedelmi forgalomban számos különböző alakú és méretű rugólapka kapható. A megfelelő rugólapka kiválasztását elsősorban a vizsgálandó minta és a képalkotás paraméterei szabják meg.

2.2.3. Hogyan keletkezik a kép?

A képalkotás a vizsgálandó felület atomjai és a tűhegy között kialakuló vonzó és taszító kölcsönhatásoknak a – felület különböző pontjaiban történő – detektálásán alapul. A tűvel a minta síkjának egyik tengelye mentén pásztázunk, majd erre a tengelyre merőlegesen, csekély elmozdulást követően, az előző egyenessel párhozamosan végzünk pásztázást. Pontról pontra haladva a minta teljes felülete letapogatható. A pásztázás során egy visszacsatolt szabályozási mechanizmus (feedback áramkör) feladata az, hogy állandó értéken tartsa a tű és a felszín közötti kölcsönhatás mértékét. A visszacsatoló kör ezt a rugólapka függőleges pozíciójának változtatásával biztosítja. Ily módon, megfelelő kalibrációs eljárás után, a pásztázott minta felületének (xy-sík) minden egyes (x,y) koordinátájához hozzárendelhetjük pl. a magasság információt hordozó z-koordinátát is. Amennyiben a mért kölcsönhatások csak a felület z-irányú változásának következményei, az (x,y,z) adathármasokból rekonstruálható a minta domborzati képe. A képalkotás alapvetően két üzemmódban végezhető: kontakt- és non-kontakt módban.

2.2.3.1. Kontaktmód

A kontaktmód (vagy más néven konstanserő-mód) lényege az, hogy a képalkotás megkezdése előtt a rugólapkát addig közelítjük a felszínhez, amíg a tűre taszító erők nem kezdenek hatni, vagyis (makroszkópos megfogalmazással) a tű hozzáér a felszínhez. A taszító erők hatására a rugólapka enyhén visszahajlik.



8. ábra *(A) Kontaktmódú és (B) Non-kontakt módú pásztázás sematikus ábrázolása. A fekete nyilak és betűk a rugólapka elmozdulásának irányát mutatják. Pirossal jelöltük a tűhegy nyomvonalát.*

A visszacsatoló áramkör feladata ebben az esetben az, hogy állandó értéken tartsa a tűre ható erőt. Ezt a rugólapka elhajlásának állandó értéken való tartásával lehet biztosítani. Ahhoz, hogy a rugólapka elhajlása akkor se változzon, ha a pásztázás közben a tű egy felületi mélyedéshez vagy emelkedéshez érkezik, a rugólapka z-pozícióját az előbbi esetben lefelé, utóbbiban felfelé kell korrigálni. Ezekből az elmozdulásokból származik majd a magassági információ (8. A ábra). (A kontakt képalkotási mód hasonló a lemezjátszó működéséhez: a tűt a felszínre helyezzük, majd a lemez elmozdulása során a tű fel-le mozgása követi a felszín barázdáinak nyomvonalát.) A kontakt képalkotási mód hátránya, hogy a tű közvetlenül érintkezik a felszínnel a pásztázás során. Ekkor nem csak vertikális, hanem horizontális erőhatást is kifejt a mintára, mintegy végigkarcolja a felszínt. Ez a képlékeny minták deformációjához, a gyengén adszorbeált részecskék "lesöpréséhez" és a tű szennyeződéséhez vezethet.

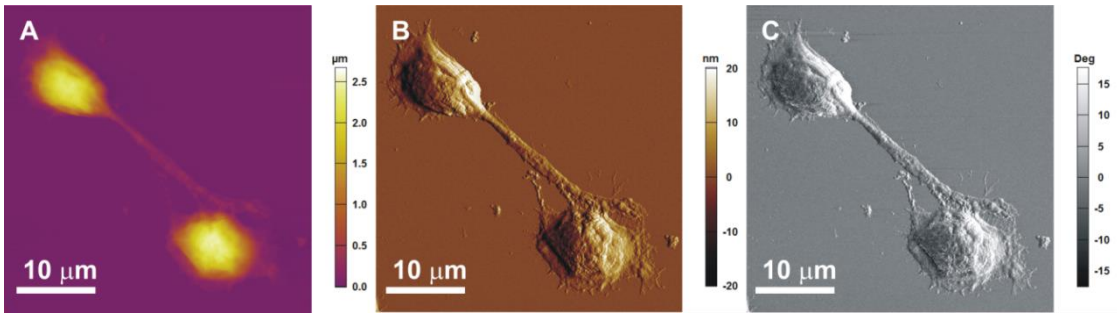
2.2.3.2. Non-kontakt (tapping vagy tapogató) mód

Non-kontakt módban a rugólapkát a rezonanciafrekvenciájához közeli frekvenciaértéken rezegtetjük. Ha a rezgő rugólapka-tű rendszert a felszínhez közelítjük, a tűhegyre ható vonzó vagy taszító kölcsönhatás miatt a rezgési amplitúdó változik. Az amplitúdó-változás mértéke a kölcsönhatás nagyságától, tehát végső soron a tűhegy és a felszín távolságától függ. A feedback feladata ebben az esetben az, hogy a rezgési amplitúdót egy előre meghatározott (a szabad rezgési amplitúdóhoz képest általában 20-50%-kal kisebb) értéken tartsa: ehhez a feedback szükség esetén korrigálja a rugólapka magasságát. Ily módon nyerünk az (x,y)-koordinátákhoz tartozó (z)

magassági információt (8. B ábra). (Ez az eljárás hasonló ahhoz, ahogy a vak ember közlekedik: botjával ütemesen tapogatja a járda felületét, és ha a bot akadályba ütközik, gazdája kitérve folytatja útját.) A módszer előnye, hogy a minta és a tűhegy közti kontaktus átmeneti és gyenge, ily módon a vertikális erőhatás minimalizálható, a horizontális pedig elvben teljesen kiküszöbölhető.

2.2.4. Az AFM-mel mért kölcsönhatások képi megjelenítése

A pásztázás során regisztrált adatokból alapvetően két-, illetve háromfajta kép rekonstruálható. A magasság-kontraszt kép az *(x, y)* felületi koordinátákhoz tartozó magasság információt jeleníti meg színskálázás segítségével (9. A ábra). A magasság-kontraszt képből – bizonyos korlátozások mellett – a térbeli felület topográfiai rekonstrukciója is elkészíthető. A második képfajta a feedback hibáját, vagyis az előre meghatározott elhajlástól, illetve rezgési amplitúdótól való eltérések felületi eloszlását ábrázolja színskálázással. Az így ábrázolt képeket nevezik elhajlás-kontraszt, illetve amplitúdó-kontraszt képnek a kontakt-, illetve a non-kontakt módú mérések esetén (9. B ábra). Ezekből a képekből magasság adatok nem nyerhetőek, viszont az emberi szem számára érzékletesebb módon jelenítik meg a felület relatív magasságviszonyait. A non-kontakt képalkotás esetén egy harmadik képtípust, a fázis-kontraszt képet is használják. Ez a rugólapkát gerjesztő rezgés és a rugólapka kényszerrezgése közötti fáziskülönbséget rendeli hozzá minden *(x, y)* pozícióhoz (9. C ábra). A fáziseltolódásokból a minta adhéziós, illetve rugalmas-viszkózus tulajdonságaira következtethetünk.



9. ábra *Nanocsővel összekötött B-limfociták egyidőben, non-kontakt módú pásztázás során rögzített (A) magasság-kontraszt (B) amplitúdó-kontraszt és (C) fázis-kontraszt AFM képe. A képek mellett jobbra található színskálák kódolják a magasságértékeket, a kívánt kilengési amplitúdótól való eltérést, illetve a fáziskülönbséget. A szerző saját felvételei [95].*

2.2.5. Az atomierő-mikroszkópos képalkotás lehetőségei és korlátai

Az AFM feloldási határa vertikális irányban szubangströmös ($<10^{-10}$ m, míg horizontális irányban szubnanométeres ($<10^{-9}$ m) nagyságrendű. Figyelembe véve, hogy egy hidrogénatom *van der Waals* atomsugara 120 pm-nek, míg kovalens sugara 31 pm-nek felel meg, az AFM felbontása akár egyedi atomok leképezését is lehetővé teszi. A felbontást meghatározó legfontosabb tényező a tű mérete és alakja. Minél hegyesebb a tű, annál kevesebb atom együttes hatását detektáljuk, ezért annál kisebb részleteket tudunk megkülönböztetni. A laterális felbontást a gyakorlatban a tűhegy görbületi sugara és a tű nyílásszöge határozza meg. Az AFM-mel vizsgálható objektumok horizontális (a letapogatási síkon lévő) mérete a szubnanométerestől a több tíz μm-ig terjed. Egyaránt lehetséges tehát egyedi molekulák, nanorészecskék vagy akár sejtek, mikropartikulumok vizsgálata. A hasonló felbontást biztosító elektronmikroszkópos eljárásokhoz képest az AFM jelentős előnye, hogy a minták fixálási vagy festési eljárások alkalmazása nélkül, közvetlenül is vizsgálhatóak. A módszer tehát gyakorlatilag mentesül a mintaelőkészítés műtermékeitől. Ráadásul a pásztázás mind gáz, mind folyadék közegben végezhető, így biológiai minták pufferben történő vizsgálatát is lehetővé teszi. Ennek köszönhetően élő sejtek, natív szerkezetű biomolekulák is vizsgálhatóak. A képalkotás közben a közeg összetétele és hőmérséklete módosítható.

Az AFM-es képalkotás limitációja, hogy a pásztázás viszonylag lassú folyamat. Egy kép elkészítése, méretétől függően, néhány másodperctől akár több tíz percig is eltarthat. Az AFM topográfiai képet állít elő, azaz a keletkező kép a felszínről hordoz információt. A fénymikroszkóppal ellentétben, nem a vizsgált pont alatti struktúrák szummációs képét detektáljuk, vagyis nem „látunk keresztül” a mintán. Az előzőekben bemutatott mindkét felvételi technikához (kontakt és non-kontakt) szükség van arra, hogy a minta jól adszorbeálódjon a hordozófelülethez (szubsztráthoz). Ugyanakkor az is lényeges, hogy az adszorpció ne változtassa meg a minta mérendő tulajdonságait. Ha a felülethez való kötődés nem elég stabil, a mintát a pásztázás közben lesodorhatjuk a felszínről. Ezért döntő jelentőségű az adott mintához a megfelelő hordozó felület megtalálása. Figyelembe kell vennünk, hogy a szubsztráthoz való kötődés egyes esetekben módosíthatja a minta tulajdonságait. A pásztázás során a rugólapkát, a mintára merőleges irányban, csak néhány μm-t mozgathatjuk. Így az ezt meghaladó

magasság-eltérések esetén az objektum egészéről – egyetlen felvételen – nem tudunk jó felbontású képet készíteni. Általános AFM-es alapelv, hogy minél laposabb a minta annál könnyebb róla képet készíteni.

2.2.6. Erőspektroszkópia

Az AFM – a képalkotáson túl – lehetővé teszi a minta néhány mechanikai tulajdonságának vizsgálatát is. A tű segítségével mechanikai manipulációnak vethetjük alá a minta felületének bármely pontját, és eközben detektálhatjuk a rugólapkára ható erőket. (Ahhoz hasonlít ez az eljárás, mint amikor egy makroszkopikus tárgy mechanikai tulajdonságait, a tárgyat ujjunkkal megérintve-benyomva-visszahúzva vizsgáljuk meg. Rögtön érzékelhető, hogy a tárgy kemény vagy puha, rugalmas vagy viszkózus, illetve hogy ragacsos-e.) Az erőspektroszkópia során a rugólapka tűjét adott sebességgel a felület egy adott pontjába nyomjuk, majd, esetleg némi várakozás után, visszahúzzuk. (10. ábra). Az erőgörbén általában a következő szakaszokat tudjuk megkülönböztetni:

(a) Amíg a tű nem éri el a felületet, a rugólapka elhajlása zérus, vagy egy állandó érték.

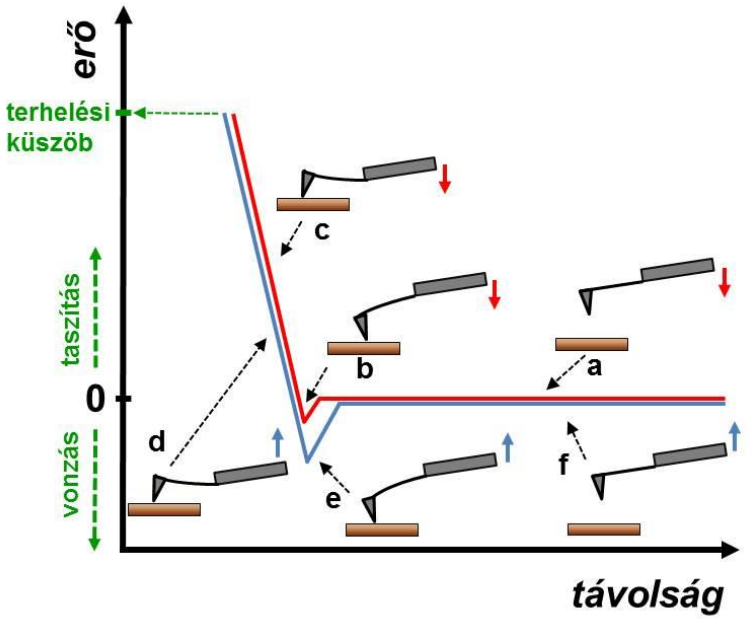
(b) A felület közelében a vonzó kölcsönhatások enyhe adhéziós erőt fejtenek ki a tűre, a rugólapka lehajlik.

(c) Továbbközeledve a felszínhez, a taszító kölcsönhatások válnak dominánssá, a tű eléri a felszínt, a rugólapka visszahajlik. Ilyenkor növekvő erejű nyomásnak tesszük ki a mintát. Egy előre meghatározott erő, vagy távolság elérésekor a közelítés megáll, és

(d) azonnal, vagy egy bizonyos várakozási idő után emelni kezdjük a rugólapkát. Ennek során egyre kisebb erőt fejtünk ki a mintára, csökken a lapka elhajlása.

(e) Amikor elemelnénk a tűt a felszínről, az adhéziós kölcsönhatás még általában visszatartja, ami a rugólapka lehajlásához, negatív erőcsúcshoz vezet.

(f) Amikor ez a kölcsönhatás megszűnik, a lapka visszatér a nyugalmi állapotába.



10. ábra *Idealizált erőspektrum. A piros vonal a benyomási, a kék a visszahúzási görbét jelöli. A betétábrák a rugólapka mozgását és elhajlását mutatják az erőgörbe felvétele során. Magyarázat a szövegben.*

A folyamat során a tűhegy pozíciójának (vagy felszíntől való távolságának) függvényében regisztráljuk a rugólapkára ható erőket. Az így nyert erőgörbe vagy erőspektrum alakjából következtethetünk a minta mechanikai tulajdonságaira, belső szerkezetére, illetve a perturbáció során a mintában keletkezett torzulásokra. A bemutatott példában a tűt végtelenül merevnek tekintett felületbe nyomtuk bele, így az erőgörbén kizárólag a rugólapka deformációjából (elhajlásából) származó változások láthatóak. Az ily módon kapott erőgörbe felszálló részének meredeksége a lapka merevségének (rugóállandójának) felel meg. A minta és a rugólapka együttes erőválaszait úgy tekinthetjük, mintha további, eltérő rugóállandójú rugót sorosan kapcsolnánk a lapkához, s ezt a kapcsolt rendszert írnánk le. A Hooke-törvényt alkalmazva erre a sorosan kapcsolt rendszerre, meghatározhatjuk a minta saját „rugóállandóját”, azaz merevségét (k_m). A vizsgált részecskék nanomechanikai perturbációja során a minta saját merevsége (k_m) egyszerű esetben a következő képletből számítható ki:

$$\frac{1}{k_g} = \frac{1}{k_m} + \frac{1}{k},$$

ahol a k_g az erőgörbe felszálló ágának meredeksége, a k pedig a rugólapka rugóállandója.

3. 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:** Célom 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 atomierő-mikroszkóppal 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 (lsd. 2.1.3 fejezet). 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 (lsd. 2.1.6.6 fejezet). Ezért célul tűztem ki, hogy az aggregált kohleátok diszpergálására alkalmas, a kohleátok szerkezetét nem roncsoló módszert dolgozok ki.

4. Módszerek

4.1. Anyagok

A dioleoil-foszfatidilszerint (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine], DOPS) az Avanti Polar Lipids, Inc.-től (Alabaster, Alabama, USA) vásároltuk. Az Argon 5.0 és nitrogén 5.0 gázokat a Linde Gáz Magyarország Zrt. (Budapest, Magyarország) szállította. Az ultraszűrt, ioncserélt vizet egy Milli-Q Integral 3 Water Production Unit víztisztítóval (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) állítottuk elő, és legfeljebb egy héten belül használtuk. A kerek csillámpala lemezkéket a Ted Pella, Inc. (Redding, CA, USA) szállította. A Whatman Nuclepore membránfilterek (d=100 nm, track-etched membranes), cellulóz dializáló cső (1 cm átmérő, átlagos MWCO=14000), trisz-(hidroximetil)-aminometán (TRIS), kloroform, nátrium-azid, 1 M kalcium-klorid oldat, 0,01%-os polilizin és minden más, kísérleteinkben használt anyag és eszköz a Sigma Aldrich Kft.-től (Budapest, Hungary) származott.

4.2. Multilamelláris vezikulák előállítása

A MLV-ket lipidfilm hidratációs technikával állítottuk elő. Egy tiszta üvegcső falán vékony lipid filmet képeztünk oly módon, hogy a DOPS 20 mg/ml koncentrációjú kloroformos oldatából a szerves oldószert lassan, nitrogéngáz áramában elpárologtattuk. Az oldószernyomokat a csövecske 30 perces vákumozásával (kisebb, mint 20 Hgmm nyomáson) távolítottuk el. A lipid vékonyréteget az 5.1 és 5.2 pontban bemutatott kísérletekhez 2 mM NaN_3 oldattal, az 5.3 pontban bemutatott vizsgálatokhoz 100 mM TRIS pufferrel (pH 7,4) hidráltuk, 100 µl-es részletekben, erőteljes keverés mellett 1 ml hozzáadott térfogatig. A képződött MLV szuszpenzió kb. 10 mg/ml (12,6 mM) koncentrációjú volt a DOPS-re nézve.

4.3. Kis unilamelláris vezikulák előállítása

A kis unilamelláris vezikulákat (Small Unilamellar Vesicles; SUV) MLV

szuszpenzióból állítottuk elő extrudálással [96]. Az MLV szuszpenziót 41 alkalommal[1] préseltük át kézi erővel egy 100 nm pórusméretű Whatman Nuclepore membránon egy AvantiPolar Mini Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) berendezés segítségével.

4.4. Kohleátok előállítása

4.4.1. Kohleátok előállítása gyors elegyítéssel

Nátrium aziddal (2 mM) tartósított 12,4 mM $CaCl_2$ törzsoldatot rétegeztünk óvatosan a 12,4 mM lipid koncentrációjú DOPS SUV szuszpenzióra 1:1 térfogatarányban, majd 3x1 másodpercig kevertük. Az így készült mintákat az 5.1 és 5.2 pontban bemutatott kísérletekhez használtuk.

4.4.2. Kohleátok előállítása dialízissel

A SUV szuszpenziót 100 mM TRIS pufferrel (pH 7,4) 1:1 arányban hígítottuk, majd ebből 400 µl-t helyeztünk dializáló zsákba, és 100 ml lassan kevertetett, 6,2 mM $CaCl_2$ tartalmú 100 mM TRIS pufferbe (pH 7,4) merítettük. 24 óra elteltével a mintát eltávolítottuk a dializáló zsákból. A keletkezett szuszpenzió névleges DOPS és Ca^{2+} koncentrációja 6,2 mM volt. Az így készült mintákat az 5.3 pontban bemutatott kísérletekhez használtuk[2].

A minták előállításának minden lépését 25±1°C-on fénytől védve végeztük. A

---

[1] A pórusmérettel közel egyező liposzómaméret-eloszlás eléréséhez, korábbi tapasztalataink szerint nagyszámú (kb. 20-40) átpréselés szükséges. A páratlan számú extrudálást az indokolja, hogy egy porózus membrán egyik oldaláról indulva, mindkét oldalán egy-egy fecskendőbe préseljük át (oda-vissza) a mintát, s így a páratlan számú ciklus végén az ellenoldali, végső minta, a legkevésbé tartalmazhat visszamaradt, nagyobb liposzómákat.

[2] Először a kialakulási és szerkezeti-nanomechanikai vizsgálatokat végeztük el (5.1 és 5.2 pont), amelyekhez az egyszerűbb, gyors elegyítéses módszerrel állítottuk elő a kohleátokat. Időközben megfigyeltük, hogy dialízissel nagyobb termelékenység érhető el, ezért a diszpergálási kísérletekhez (5.3 pont) már így előállított kohleátokat használtunk. A nagyfelbontású AFM képalkotás azt mutatja, hogy mind a két esetben kohleátok jönnek létre. A különböző módszerekkel előállított kohleátok hasonló topográfiája a dolgozat ábráin is jól megfigyelhető. A 11., 13., 17.B, 20.B, 22.B,C, és 23. ábrák gyors elegyítéssel készült, míg a 32. 39. és 40. ábrák dialízissel előállított kohleátokat mutatnak. A különböző módszerekkel előállított kohleát minták összehasonlító vizsgálata önálló, jelenleg is folyó kutatási program része, így erről nem teszek említést az értekezésben.

kohleát mintákat a felhasználásig légmentesen záró polipropilén csövecskében, fénytől védve, 25±1°C-on tároltuk.

4.5. Kohleátok diszpergálása

A diszpergálási kísérletekhez dialízissel előállított 6,2 mM névleges DOPS és Ca^{2+}, illetve 100 mM TRIS koncentrációjú (pH 7,4) kohleát mintát használtunk. A vizsgált lehetséges diszpergálószerek (nátrium-acetát trihidrát; nátrium-tartarát dihidrát; trinátrium-citrát dihidrát; dinátrium-edetát) kívánt koncentrációjú oldatait 100 mM TRIS pufferrel (pH 7,4) készítettük el. A diszpergáló oldat 10 µl-ét hozzáadtuk 10 µl kohleát mintához, majd a pipetta hegyén 50-szer oda-vissza átpréselve alaposan összekevertük. A kontroll kísérleteket Ca^{2+}-mentes puffer oldattal végeztük.

Stabil kolloid rendszer létrehozásához az így keletkező oldathoz azonnal 80 µl 100 mM-os TRIS puffert (pH 7,4) kevertünk, majd 5 percig centrifugáltuk (Heraeus Biofuge Pico asztali centrifuga, Life Technologies Magyarország Kft., Budapest, Magyarország) 12800 *g*-n. A felülúszót óvatosan eltávolítottuk, és az üledéket 90 µl 100 mM TRIS pufferben (pH 7,4) szuszpendáltuk. Ezt a tisztítási eljárást 3-szor ismételtük meg.

Amikor a Ca^{2+}-ionnak a stabilizált kohleátokra kifejtett hatását vizsgáltuk, az üledéket a diszpergálás utolsó tisztítási lépésénél 6,2 mM $CaCl_2$-ot tartalmazó 100 mM-os TRIS pufferben (pH 7,4) szuszpendáltuk.

4.6. Fáziskontraszt-mikroszkópia

A fáziskontraszt-mikroszkópos vizsgálatokat és felvételeket egy uEye UI 1220 LE digitális kamerával (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm, Németország) felszerelt Nikon Eclipse Ti-U inverz mikroszkóppal (Auro-Science Kft., Budapest, Magyarország) végeztük, 20-szoros, illetve 40-szeres nagyítású Nikon S Planfluor fáziskontraszt objektíveket alkalmazva.

4.7. Atomierő-mikroszkópia és erőspektroszkópia

A vizsgálandó kohleát minta 10 µl-ét 50 µl 100 mM-os TRIS pufferrel (pH 7.4) hígítottuk, majd frissen hasított csillámpala lemezre cseppentettük. 1 perc várakozást követően a minta ki nem tapadt feleslegét ultraszűrt, tisztított vízzel óvatosan lemostuk

a csillámról. Amikor a mintákat vizes közegben vizsgáltuk a mosás végeztével 100 µl ultraszűrt, tisztított vizet cseppentettünk a mintára. A nem vizes közegben (levegőben) vizsgálandó minták esetén a felületet a lemosás után nagytisztaságú (5.0) nitrogéngáz lassú áramával megszárítottuk. A diszpergált kohleátok esetén a csillámlemezeket előzetesen 20 percen keresztül, 100 µl 0,01%-os polilizin oldattal kezeltük szobahőn. A minták kicsöppentése előtt a polilizin oldatot ultraszűrt, tisztított vízzel lemostuk és a felszínt nitrogéngáz áramában megszárítottuk. A mintákat Cypher atomierő-mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, Kalifornia, Egyesült Államok) 0,5-2,5 Hz vonalpásztázási frekvenciával vizsgáltuk. A képalkotást non-kontakt módban végeztük, a szilícium rugólapkákat (OMCL AC-160TS, Olympus, Japán; illetve Arrow UHF és UHF AuD) a rezonanciafrekvenciájukon rezegtetve.

Az erőspektrumokat kontaktmódban, a korábban pásztázott területek jól meghatározott pontjaiban rögzítettük. A görbék felvétele során a tűt állandó, 1 µm/s sebességgel közelítettük a minta felé, és ugyanezzel a sebességgel húztuk vissza. A rugólapkák rugóállandóját a hőrezgési módszer (thermal method [97]) segítségével határoztuk meg. A képalkotást és az erőmérést az AFM üzemi hőmérsékletén (29±1°C-on) végeztük.

4.8. AFM képek megjelenítése és analízise

A képalkotás során 512 x 512 vagy 1024 x 1024 pixel felbontású felvételeket készítettünk, melyeket az AFM vezérlőprogramjába (IgorPro, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, Egyesült Államok) épített algoritmusok segítségével analizáltunk. A dolgozatban, hacsak külön nem jelöljük, amplitúdó-kontraszt képeket mutatunk be. A méretek és magasságok megállapításához a magasság-kontraszt képeket vettük alapul. A magasságlépcsők elemzésekor 8 egyedi kohleát magasságadatait vizsgáltuk.

4.9. A csillámfelszín nedvesedésének vizsgálata

Azt AFM mérésekhez hígított mintából 5 µl-t cseppentettünk frissen hasított csillámra, és egy digitális kamera segítségével videón és fényképfelvételen rögzítettük a mintacsepp szétterülését.

4.10. Erőgörbék statisztikai analízise

Az erőgörbék a mintákon mérhető erőket ábrázolják az AFM-tű és a minta (vagy a csillámlemez) felszíne közötti távolság függvényében. Ezeken az ún. átszúrási görbéken, közelítőleg periodikusan változó erőket mértünk a görbék két („b”-vel és „d”-vel jelzett) szakaszán (lsd. az 5.2.2 fejezetben). A közel periodikus erő-változások maximumai közötti távolságot (amit a felszínhez képest mérünk) nevezzük csúcs-csúcs távolságnak. Az átszúrási görbék „b” és „d” régióinak csúcsszám-analíziséhez kizárólag olyan görbéket vettünk figyelembe (n=18), ahol az átszúrás mind a négy szakasza megfigyelhető volt. Ugyanezen erőgörbéket használtuk a csúcs-csúcs távolságok elemzéséhez és az átszúrási erő hisztogramok készítéséhez. A merevség meghatározásához azonban mindazokat az erőgörbéket (n=40) figyelembe vettük, amelyek teljes „a” és legalább részleges „b” régiót tartalmaztak.

4.11. Zéta potenciál mérése

DOPS liposzómák zéta potenciáljának méréséhez 0,4 mg/ml (0,504 mM) DOPS koncentrációjú szuszpenziót elegyítettünk, 1:1 térfogatarányban, különböző koncentrációjú $CaCl_2$ oldattal. A liposzóma szuszpenzió és a $CaCl_2$ oldatok 100 mM TRIS pufferrel (pH=7,4) készültek. A méréseket egy Zetasizer Nano ZS készülékkel, hajlított kapilláris mérőcellákat használva (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) végeztük, közvetlenül a liposzóma szuszpenziónak a Ca^{2+}-ionokkal való összekeverése után. A berendezés a fényszórásmérésen alapulva elsődlegesen a részecskék sebességét határozza meg egy (4 mW teljesítményű, 633 nm hullámhosszú) koherens lézernyalábpár segítségével. A szórt fényintenzitás autokorrelációs-függvényéből számítja a részecskék elektroforetikus mobilitását (U_e), amelyből a *Henry*-egyenlet felhasználásával határozható meg a zéta potenciál:

$$U_e = \frac{v}{E} = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta},$$

ahol v a részecskék sebessége, E az alkalmazott elektromos térerősség, ε a közeg dielektromos állandója, ζ a zéta potenciál, η a közeg viszkozitása, $f(Ka)$ a *Henry*-féle függvény, melyet a műszer kiértékelő szoftvere a részecskék méretétől és az ionerősségtől függően 1,0 vagy 1,5 értékekkel közelíti [98]. Minden minta esetén három

párhuzamos mérést végeztünk, 25°C hőmérsékleten.

4.12. Zéta potenciál adatok elemzése

Az ionok liposzómafelületre való kötődése megváltoztatja a liposzómák zéta potenciálját. A mért zéta potenciál és annak változása jól leírható a *Langmuir-Freundlich* izoterma segítségével [99]:

$$\zeta = \zeta_0 + \Delta\zeta_{max} \cdot \frac{(K \cdot c)^n}{1 + (K \cdot c)^n},$$

ahol ζ a mért zéta potenciál, ζ_0 a nulla Ca^{2+}-koncentrációnál mért zéta potenciál, $\Delta\zeta_{max}$ a zéta potenciál maximális megváltozása, K a belső (intrinszik) kötődési állandó, c a Ca^{2+}-ion koncentrációja, és n az ionkötődés kooperativitását leíró heterogenitási paraméter.

4.13. Kisszögű röntgenszórás

A kohleát minták kisszögű röntgenszórásos vizsgálatait az MTA Természettudományi Kutatóintézetének CREDO SAXS berendezésével végeztük, amelyben a röntgensugarakat GeniX^{3D} Cu ULD mikrofókuszú rendszer (Xenocs SA, Sassenage, Franciaország) állítja elő és egy kétdimenziós Pilatus-300k CMOS hibrid pixel detektor (Dectris Ltd., Baden, Svájc) detektálja [100,101]. A berendezés vezérlő szoftvere a rögzített szórási képeket azonnal korrigálja a különböző háttérzajok, a mérés geometriája, valamint a minta röntgenabszorpciója által okozott torzítások kiküszöbölése érdekében. A vizsgálandó mintákat enyhe centrifugálás után kb. 1 mm külső átmérőjű és 10 μm falvastagságú bórszilikát üvegkapillárisokba helyeztük. A mintákat 5 perces expozícióknak tettük ki, összesen mintegy 2 órán keresztül, ami lehetővé tette a minták és a berendezés időbeli stabilitásának nyomon követését is. A korrigált szórási képek mintánkénti átlagaiból azimutális átlagolással nyert szórási görbék abszcisszáján az úgynevezett szórási változó (q) értékei szerepelnek, amit az alábbi képlet szerint kaphatunk meg:

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot sin\theta}{\lambda},$$

ahol 2θ a szórás szöge, és λ=0,154 nm a röntgencső réz anódjának Kα

karakterisztikus csúcsához tartozó hullámhossz. A q érték kalibrációja mezopórusos szilícium dioxidra (SBA15 típusú) történik. Az ordinátán szereplő differenciális szórási hatáskeresztmetszet ($cm^{-1} \cdot sr^{-1}$) értékeket a beütésszámokból származtattuk egy korábban kalibrált üveges szén minta segítségével. A rétegek közti ismétlődés távolságát (d) a *Bragg*-egyenlet segítségével számoltuk:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta,$$

ahol a θ szöget az n = 1 elhajlási rendnek megfelelő *Bragg*-csúcshoz tartozó q értékből határoztuk meg.

4.14. Infravörös spektroszkópia

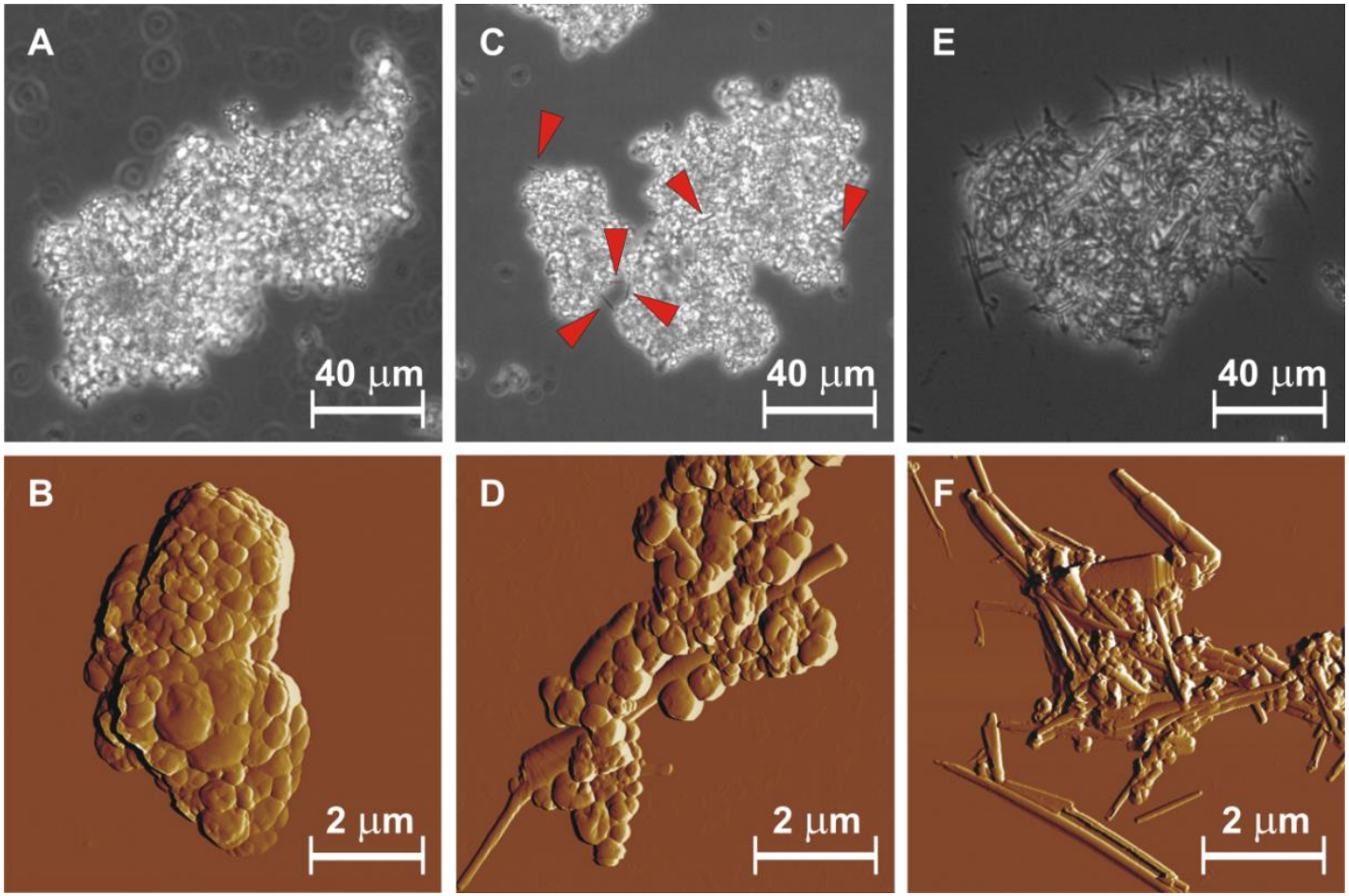
Az ATR-FTIR (gyengített teljes reflexiós – Fourier transzformációs infravörös) spektrumokat egy 'GoldenGate' egyszeresen visszaverő ATR gyémánttal (Specac Ltd., London, UK) felszerelt Varian 2000 FTIR Scimitar Series spektrofotométer (Varian Inc., Palo Alto, Kalifornia, Egyesült Államok) segítségével rögzítettük szobahőmérsékleten. A vizsgálatokhoz 5 µl mintát cseppentettünk az ATR gyémántkristályra. A friss és a kristályon a víz elpárolgásával filmet képző minták spektrumait is felvettük. A spektrumok felvételekor az adatgyűjtési szám 128, a felbontás 2 cm^{-1} volt, és minden adatgyűjtés után ATR korrekciót végeztünk. A spektrumok elemzését a GRAMS/32 programcsomag (Galactic Industries Inc., Egyesült Államok) segítségével végeztük.

5. Eredmények

5.1. Kohleátok kialakulása

5.1.1. Aggregátumok képződése

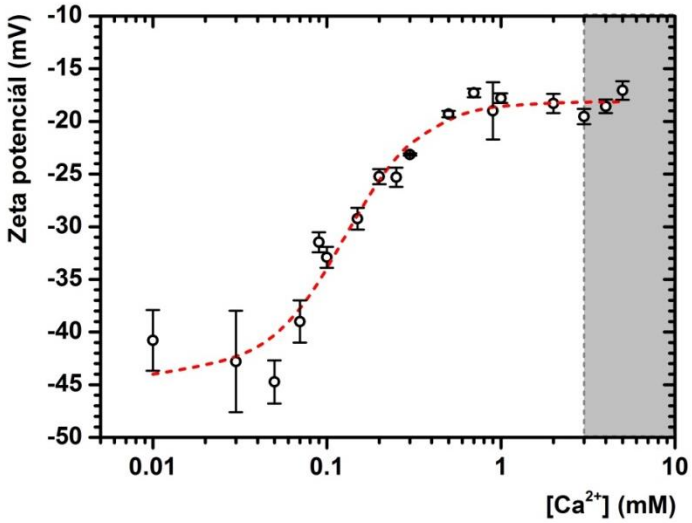
A kohleátok előállításnak lényege, hogy a nettó negatív töltéssel rendelkező DOPS molekulákból készült liposzómákhoz Ca^{2+}-ionokat adunk. Erre két eljárást alkalmaztunk: *(1)* a 4.4.1 pontban leírt gyors elegyítést, illetve *(2)* a 4.4.2 pontban részletezett dialízist. Mindkét esetben azt tapasztaltuk, hogy a liposzómákat tartalmazó enyhén opálos oldat és a víztiszta $CaCl_2$ oldat elegyítésekor csapadék képződik. A keletkezett csapadék fehér, laza szerkezetű, fáziskontraszt-mikroszkóppal vizsgálva szabálytalan alakú, több tíz mikrométer átmérőjű aggregátumokból áll (11. A ábra). A kohleátok kialakulásának és szerkezeti-nanomechanikai tulajdonságainak jellemzését a gyors elegyítéssel készült kohleátokon végeztük. Ily módon lehetőség nyílt az elegyítés után közvetlenül megvizsgálni a minta tulajdonságait, amit az elhúzódó dialízis, vagy trapping módszer nem tett volna lehetővé. Az aggregátumok finomszerkezetét optikai mikroszkópiával nem tudtuk láthatóvá tenni, azt azonban egyértelműen megállapíthattuk, hogy a diffrakciós limitnél nagyobb, hosszúkás struktúrákat nem tartalmaznak. Atomierő-mikroszkópos képalkotás során világossá vált, hogy az aggregátumok változatos méretű vezikulákból állnak, megnyúlt, kohleátra emlékeztető struktúrákat nem vagy legfeljebb elvétve találtunk bennük (11. B ábra). Figyelemre méltó, hogy a vezikulák mérete többszörösen meghaladta a kiindulási liposzómaméretet (d≈100 nm), felületükön pedig gyakran egyenetlenségek, réteghatárok voltak megfigyelhetőek, ami multilamelláris szerkezetre utal. Ezeket a méréseket a felületre csöppentés után kiszárított mintákon végeztük, azonban a vizes közegben végzett erőspektroszkópiához készült képeken is ugyanilyen szerkezeteket figyelhetünk meg (lásd 5.2.5 fejezet).



11. 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.*

5.1.2. Felületi töltés változása

Ca^{2+} hozzáadása során a DOPS liposzómák felületi töltésének abszolút értéke lecsökkent. A liposzómák zéta potenciálja az erősen negatív tartományból az enyhén negatív tartományba növekedett (12. ábra). A zéta potenciál mérése során a liposzómák aggregációját 3 mM, illetve nagyobb Ca^{2+} koncentrációknál figyeltük meg. Az aggregáció nem okozott számottevő zéta potenciál-változást.



12. ábra *DOPS SUV-ok zéta potenciáljának függése a Ca^{2+} koncentrációtól. Az üres körök mutatják a mért értékek átlagát (n=3), a hibasávok a szórást (SD), a szaggatott piros vonal pedig az adatokra illesztett Langmuir-Freundlich izotermát. A szürke sáv azt a Ca^{2+} koncentrációtartományt jelöli, ahol a liposzómák a mérés időtartamán belül aggregálódtak. A kontroll liposzómák zéta potenciálja - 44,2 ± 2,4 mV volt.*

A mért adatokra illesztett Langmuir-Freundlich izotermából származtatható intrinszik kötődési állandó 7995 M^{-1}-nak (pK_a=3,9), a heterogenitási index 1,98-nak adódott. Ez utóbbi arra utal, hogy a Ca^{2+}-ionok bekötése elősegíti további Ca^{2+}-ionoknak a felülethez való adszorpcióját.

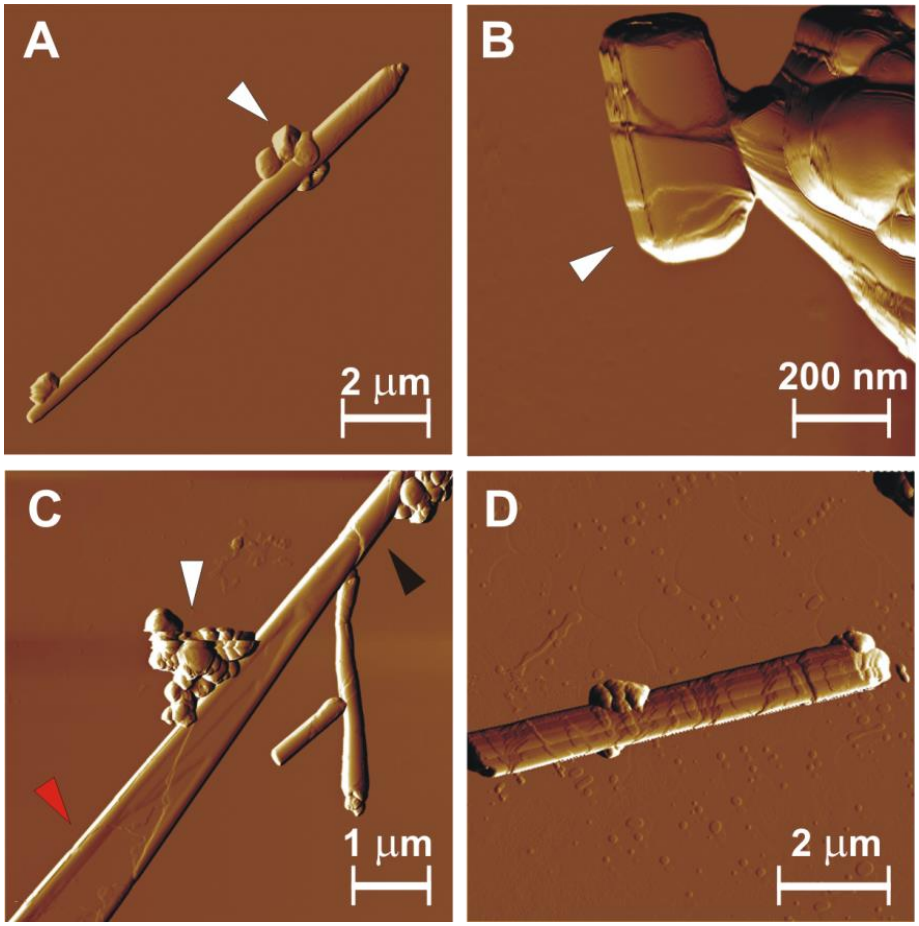
Meg kell jegyeznünk, hogy a mérési módszer 5 nm–10 μm méretű részecskék zéta-potenciál értékeinek meghatározására alkalmas. Mivel a keletkező aggregátumok között nagy számmal találhatóak 10 μm-nél nagyobb átmérőjűek, a megadott zéta potenciál értékek csak 3 mM-nál kisebb Ca^{2+} koncentrációk esetén tekinthetőek megbízhatónak.

5.1.3. Kohleátképződés

Fáziskontraszt-mikroszkóppal megfigyeltük, hogy a kezdetben szinte csak vezikulák alkotta aggregátumokban idővel (napok-hetek alatt) egyre több hosszúkás struktúra jelent meg (11. C és E ábrák)[1]. Ezeknek a hosszúkás struktúráknak a nagyfelbontású AFM-topográfiai képe megfelel a korábban – fagyasztvatöréses elektronmikrószkópos vizsgálatok eredményei alapján – javasolt kohleát modellnek [2]. Henger alakú, fokozatosan változó átmérőjű struktúraként jelentek meg, amelyek felszínén számos magasságlépcső futott körbe, többnyire a hossztengelyükre harántirányban (11. D és F ábrák). Összesen négyféle szerkezetet tudtunk azonosítani: *(1)* hosszú, szivar alakú, változó vastagságú, a végein fokozatosan elkeskenyedő kohleátokat; *(2)* rövidebb fragmentumokat; *(3)* egyik végén hengeres, a másikon részlegesen ellapult struktúrákat; *(4)* hosszanti irányban redőzött lipidstruktúrákat (13. ábra). A kohleátokhoz gyakorta asszociálódtak lipid vezikulák.

A fent leírt kísérleteket úgy végeztük, hogy a vizes közegű kohleát preparátumból bizonyos idő elteltével vett mintákat vizsgáltuk. Amikor a közvetlenül preparálás után csillámlemezre szárított mintát két hét múlva újra megvizsgáltuk, továbbra is csak vezikula aggregátumokat figyelhettünk meg, semmilyen morfológiai átalakulás nyomai nem látszottak (lásd Melléklet, 38. ábra). A kiszárított mintában tehát nem képződtek kohleátok.

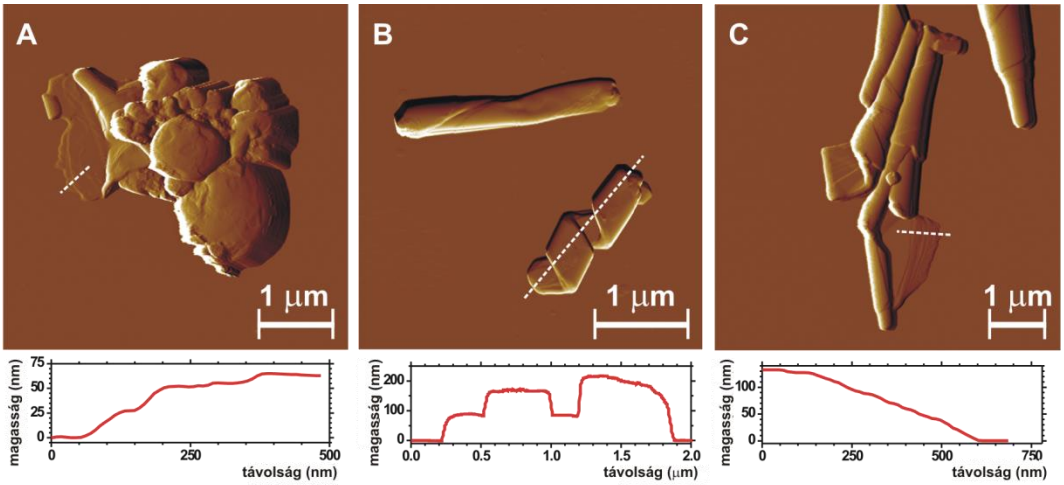
[1] A 11. ábrán bemutatott fáziskontraszt illetve AFM felvételek ugyanabból a preparátumból, egyidőben vett mintákról készültek. Természetesen a minták nem azonosak a két különböző mikroszkópos technika eltérő igényei miatt.



13. ábra *Kohleátok morfológiája. (A) Szivarszerű lipidtekercs hozzátapadt vezikulákkal (fehér nyíllal jelezve). (B) Rövidebb kohleát részecske. A felületen jól kivehetőek a körbetekeredő, lépcsőzetes lipid rétegek. (C) Egyik felén (piros nyíllal jelölt) ellapult, másik felén (fekete nyíllal jelölt) hengeres szerkezetű kohleát. A fehér nyíl aggregált liposzómákra mutat. (D) barázdált felszínű lipidstruktúra.*

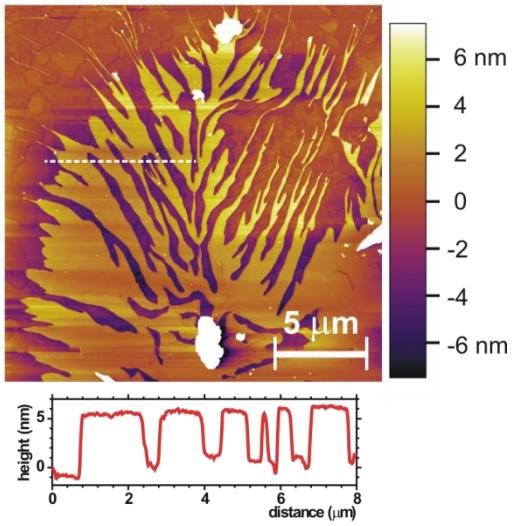
5.1.4. A kohleát formálódás lehetséges átmeneti alakjai

Néhány esetben részleges tekeredettséget mutató kohleát részecskéket figyelhettünk meg (14. ábra). Jól kivehető a képeken, hogy maga a tekeredő lemez is állhat több rétegből (14. A és C ábrák). Ezt megerősíti, hogy a tekeredő rétegek magassága megközelítőleg a kettősrétegű foszfolipid membrán vastagságának (kb. 5 nm) többszöröse (lsd. a 14. ábrán látható magasságprofilokat).



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

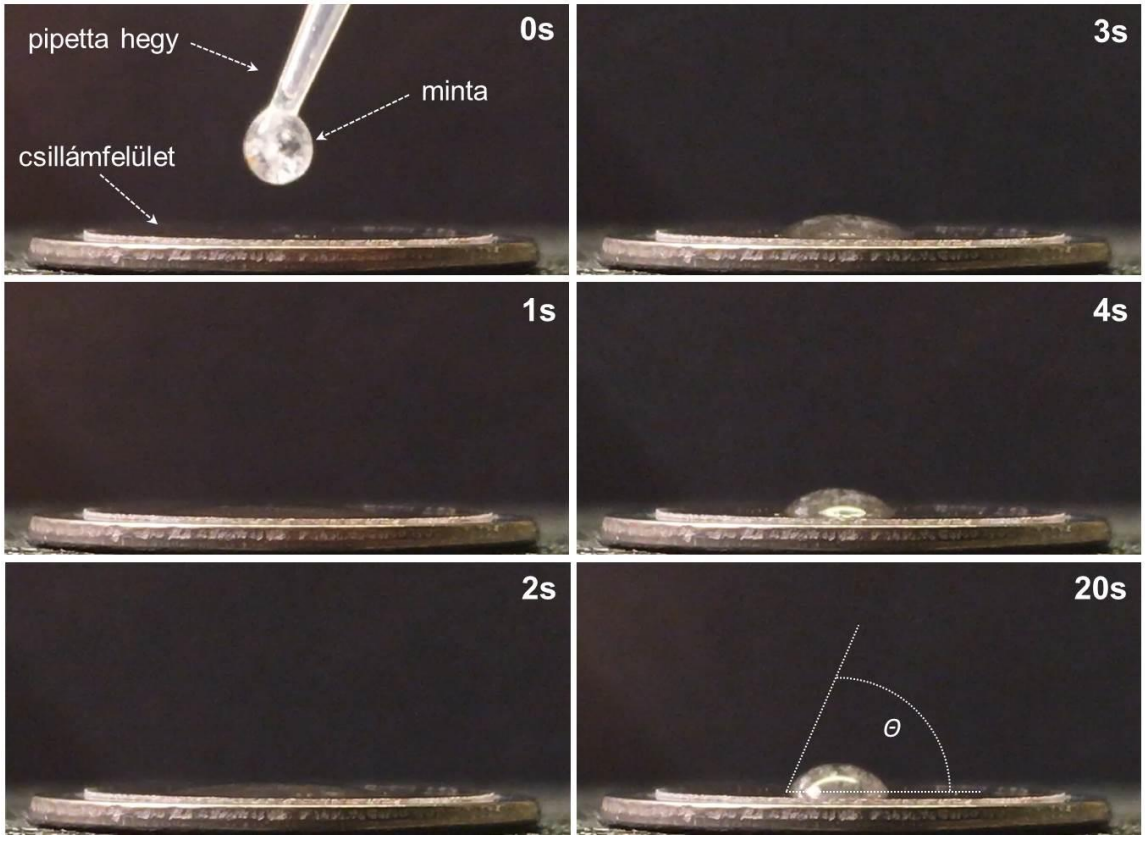
Egyes aggregátumok körül jellegzetes, lapos, elágazó képződmény volt megfigyelhető a háttérben (15. ábra). A struktúra magassága kb. 5 nm volt, ami jól megfelel egy foszfolipid kettősréteg vastagságának. Ezek az elágazó képződmények ritkán voltak láthatóak, és egyaránt előfordultak a friss, csak vezikulákat és a több napos, már kohleátokat is tartalmazó aggregátumok körül.



15. ábra *Egy aggregátumot körülvevő elágazó felületi képződmény AFM magasság-kontraszt képe. A képtől jobbra látható skála mutatja a magasság értékek színkódolását. A színkódolást a háttér mintázatának megjelenítéséhez optimalizáltuk, ezért a 6 nm-nél magasabb objektumok a képen fehér foltnak látszanak. A kép alatt a szaggatott fehér vonal mentén mért magasságprofil látható.*

5.1.5. A kohleát minta megváltoztatta a csillám nedvesedését

Az atomierő-mikroszkópos vizsgálatok előkészítése során érdekes megfigyelés volt, hogy a vízzel hígított kohleát mintákat a frissen hasított csillámra cseppentve azok először szétterültek, majd 1-2 másodperc múlva összehúzódtak, jelentős peremszögű cseppet hozva létre a felületen (16. ábra). Az így kialakuló peremszög nem önmagában a Ca^{2+}-iont kötő foszfolipid membrán, hanem a hordozón kialakuló – kohleátokkal, vezikulákkal és membrán-kettősrétegekkel csak részlegesen borított – vegyes tulajdonságú felület nedvesedését jellemzi. Emiatt a peremszög pontos értékének meghatározását nem tartottam indokoltnak. Mivel a kohleát mintáéval azonos koncentrációjú Ca^{2+}-oldat teljesen szétterült a csillámfelszínen, ezért a 16. ábrán bemutatott peremszög-növekedést nem a Ca^{2+}-ionoknak a csillámhoz való adszorpciója okozza.



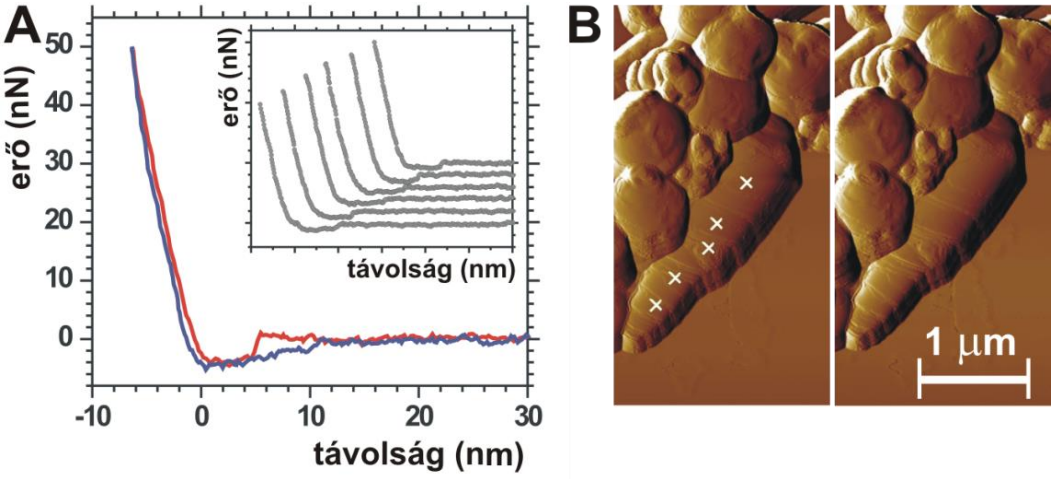
16. ábra *Kohleát minta szétterülése a csillám felszínén. A bal felső kép mutatja a minta felületre cseppentésének pillanatát, a többi kép jobb felső sarkában jelöltük a felületre cseppentéstől eltelt időt. Az utolsó képen jelöltük a hozzávetőleges Θ peremszöget.*

5.2. Kohleátok mechanikai jellemzése

A kohleátok nanomechanikai jellemzését csillámfelületre szárított (levegő közegű) kohleátokon végeztük (lsd. 5.2.1-től 5.2.4 részek). Külön alpontban (5.2.5 fejezet) mutatjuk be a vizes közegű és száraz kohleátok mechanikai paramétereinek összehasonlítását.

5.2.1. Egyszeri, illetve ismétlődő terhelés 50 nN erőhatárig

Egyedi kohleát részecskéket vetettünk alá mechanikai vizsgálatoknak oly módon, hogy az AFM tűjét 1 μm/s sebességgel függőlegesen mozgatva, előre meghatározott pontokon a felszínükbe nyomtuk, majd azonnal visszahúztuk. A visszacsatolt szabályozó kör lehetővé teszi, hogy a méréseket egy a rugólapkában ébredő maximális erőig, terhelésig végezzük. Amikor ezt a terhelést 50 nN-ban maximáltuk, reverzibilis erőválaszt tapasztaltunk. Ezekben az esetekben nem jelentkezett hiszterézis a benyomási és a visszahúzási erőgörbék között (17. A ábra). Az egyedi erőgörbék felvételének ideje kb. 10 ms volt.

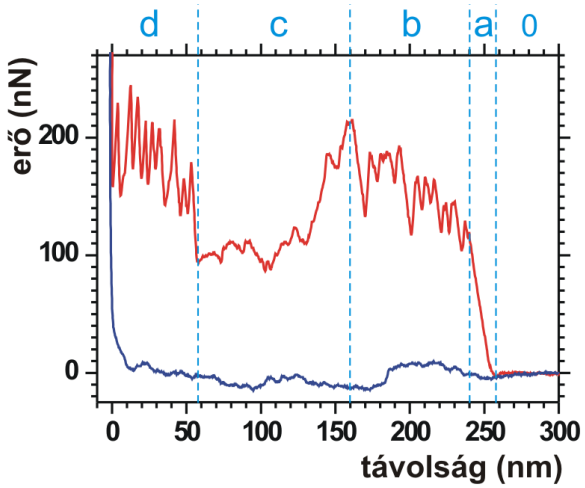


17. ábra *(A) Benyomási (vörös) és visszahúzási (kék) erőválasz, a kohleát felületétől való távolság függvényében, legfeljebb 50 nN terhelésig. A betétábra ugyanazon a helyen végzett ismétlődő mechanikai manipulációs sorozat (balról jobbra haladva) 1., 20., 40., 60., 80., és 100. benyomási görbéjét mutatja. A spektrumokat a jobb követhetőség kedvéért fokozatosan eltoltuk a tengelyek mentén. (B) Aggregátumba ágyazódott kohleát részecske az erőgörbék felvétele előtt (bal oldalt), illetve után (jobb oldalt). A fehér keresztek jelzik azokat a pontokat, amikre 100 egymást követő ciklusban legfeljebb 50 nN erőt fejtettünk ki.*

Az ismételt terhelés hatásának vizsgálatához a részecskéket ugyanazon pontban végzett, 100 egymást követő nyomási-visszahúzási ciklusnak vetettük alá. Ezek során a görbék felszálló szakaszának a meredeksége nem változott, hiszterézis megjelenését, vagy újabb erő-átmenetek feltűnését nem tapasztaltuk (17. A betétábra). Felületi deformáció sem volt látható a részecskéken az erőspektroszkópiás mérések után (17. B ábra).

5.2.2. A kohleátok nanomechanikai ujjlenyomata

A maximális terhelést egy kritikus érték fölé növelve jellegzetes átmenetek jelentek meg a terhelési görbéken. Továbbá a nyomási és visszahúzási görbe között számottevő hiszterézis jelentkezett. A jellemző erőspektrumot a 18. ábra mutatja.

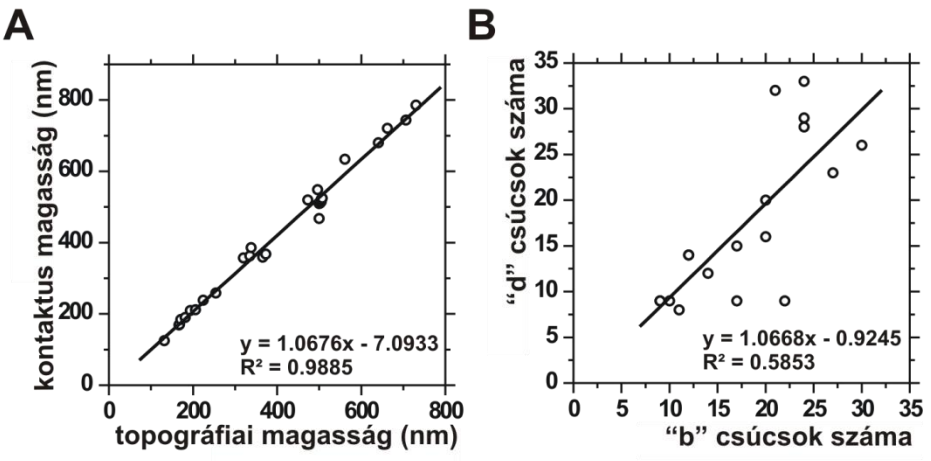


18. ábra *Reprezentatív erőspektrum. A vörös vonal a rugólapka közelítése, míg a kék a távolítása során rögzített erőket ábrázolja a csillámfelszíntől való távolság függvényében.*

A benyomási görbe öt jól elkülöníthető szakaszra osztható, melyeket a 18. ábra felső vízszintes tengelye fölé írt betűkkel és számmal jelöltünk. A szakaszhatárokat a függőleges szaggatott kék vonalak jelzik. 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. A „c” szakaszban az előző szakasz fűrészfogainál kisebb erőkkel jelentkező és kevésbé strukturált rész következik, amit a „d” szakaszban ismét egy erőcsúcsok sokaságából álló rész követ. A „d” szakasz végén az erő hirtelen, meredeken megnő. A visszahúzási görbe meglehetősen jellegtelen. Egyes esetekben a „c” szakasz nem volt azonosítható, a „b” és

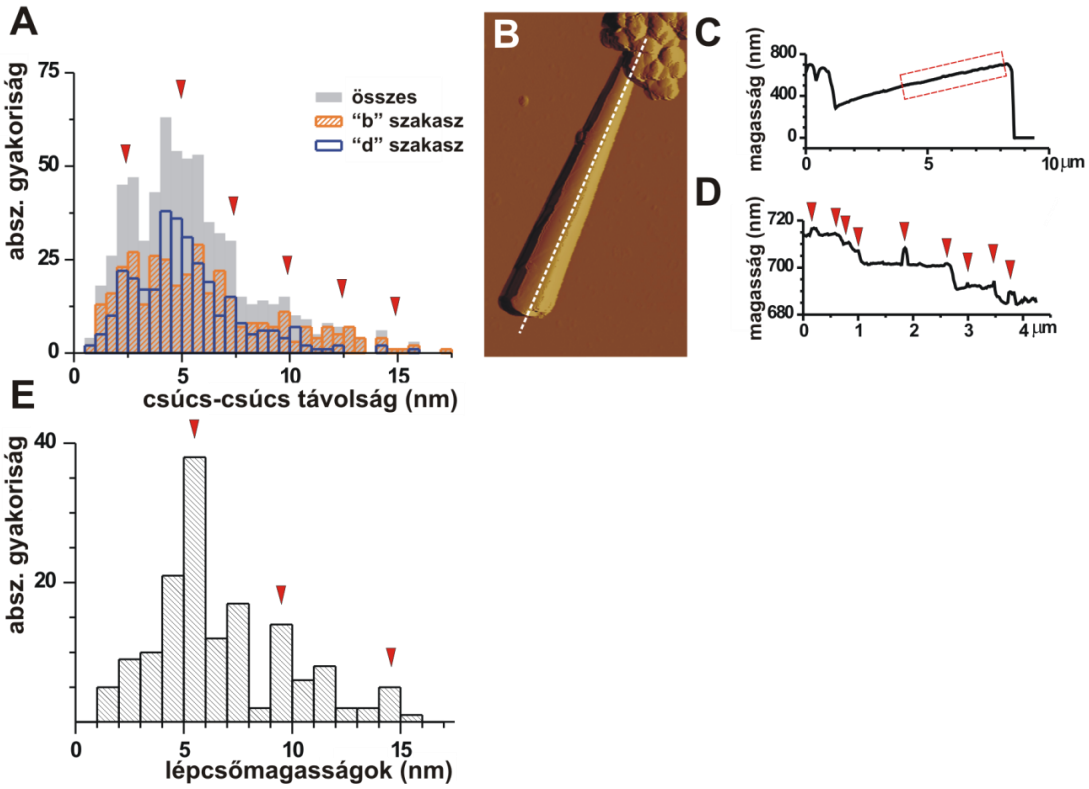
„d” szakaszok összeolvadtak, más esetekben az itt bemutatott összetett erőválasznak csak egy részét tudtuk kimérni.

A kísérletek során felmerült az a kérdés, hogy az erőgörbék felvétele során a kohleát részecskéket teljes egészében átszúrtuk-e, vagy sem. Ennek eldöntésére az erőspektrumokból származtatható un. kontaktus magasságot összevetettük a mechanikai manipuláció helyén a magasság-kontraszt képekről leolvasható topográfiai magassággal. A kontaktus magasság azt a távolságot jelenti, amelyet a tű a részecskével való érintkezéstől a hordozófelület eléréséig tesz meg, tehát a 18. ábrán látható erőgörbén az „a” szakasz kezdetétől a „d” szakasz végéig. A kétféle magasság között nagyon erős öszefüggést találtunk; a görbe meredeksége közel 1, a korrelációs együttható értéke: r=0,9942 (19. A ábra). Kevésbé szoros korrelációt (r=0,7650), de ugyanúgy egyhez közelítő meredekséget számoltuk a „b” és „d” szakaszban található erőcsúcsok számának összehasonlításakor (19. B ábra).



19. ábra *(A) A kontaktus- és topográfiai magasság (n=29), valamint (B) az átszúrási erőgörbe “d” és “b” szakaszában található erőcsúcsok száma (n=18) közötti korreláció.*

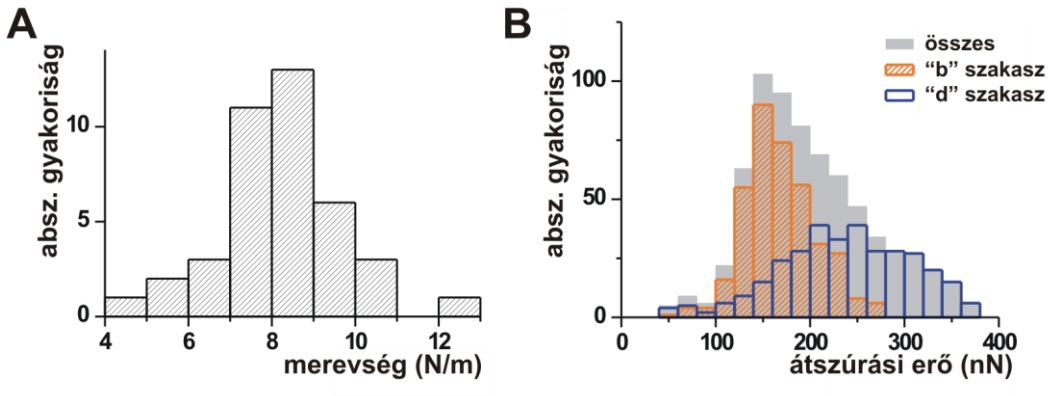
A szomszédos erőcsúcsok közötti (csúcs-csúcs) távolságok multimodális eloszlást mutattak, kb. a 2,5 nm egész számú többszöröseinél jelentkező maximumokkal (20. A ábra). A kohleátok felszínén tapasztalható lépcsőzetes magasságváltozásokat elemezve, ugyancsak több maximummal rendelkező eloszlás adódott (20. B–E ábrák). Ebben az esetben a maximumok megközelítőleg 5,5 nm, 9,5 nm és 14,5 nm-es lépcsőmagasságoknál jelentkeztek.



20. ábra *(A) Az erőgörbék különböző szakaszaiban mért csúcs-csúcs távolságok eloszlása (n_b=356, n_d=313). A piros nyilak 2,5 nm-enként helyezkednek el. (B) Kohleát részecske amplitúdó-kontraszt képe. A fehér szaggatott vonal jelöli azt a részt, melynek magasságprofilját a (C) panel mutatja. A téglalappal kiemelt rész látható a (D) ábrán kinagyítva és az alapvonali meredekségre korrigálva. A piros nyilak a felület lépcsőzetes magasságváltozásaira mutatnak. Az (E) panel ezen lépcsőmagasságok hisztogramját mutatja (n=166), piros nyilak jelölik a maximumokat.*

5.2.3. A kohleátok merevsége és mechanikai ellenállóképessége

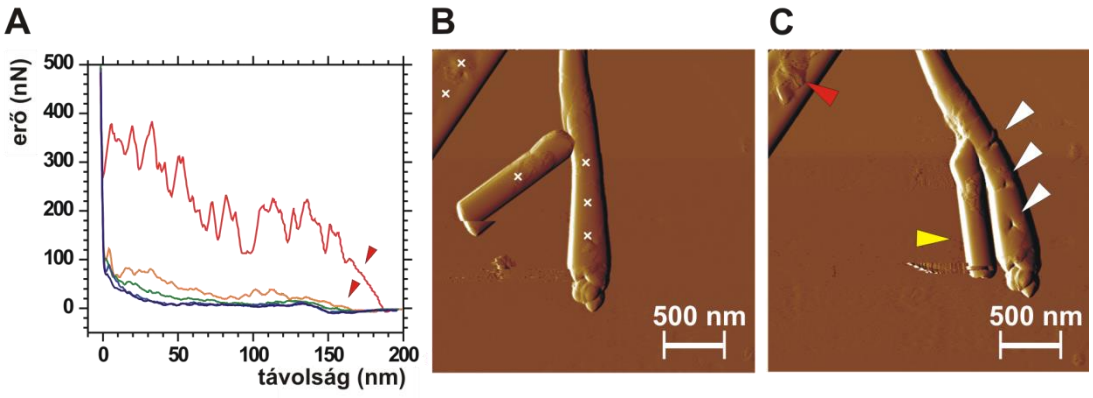
A kohleátok mechanikai paraméterei közül azok merevségét (rugóállandóját), illetve átszúrással szembeni ellenállóképességét elemeztük. Az erőgörbe kezdeti, lineáris szakaszának meredeksége felel meg a membrántekercs merevségének (vagy rugóállandójának), a rugalmas alakváltozásra vonatkozó Hooke-törvény értelmében [8]. A különböző kohleátokon mért merevség-eloszlást a 21. ábra A panelje mutatja. Az átszúrással szembeni ellenállóképesség az átszúráshoz szükséges erők értékével, vagyis az erőgörbe „b" és „d" szakaszainak csúcsaihoz tartozó erőkkel jellemezhető. Ezek eloszlását a 21. ábra B részén ábrázoltuk.



21. ábra *(A) Kohleátok merevségének hisztogramja (n=40). (B) Átszúrási erőcsúcsok hisztogramja (n_b=373 és n_d=330).*

5.2.4. Kohleátok plasztikus deformációja

A plasztikus deformáció vizsgálatára kohleát részecskéket ugyanazon pontban vizsgáltuk többször egymás után, maximálisan 500 nN erővel terhelve azokat. Az ismételt erőspektroszkópia során mindössze az első terhelési ciklusban regisztráltuk a kohleátokra jellemző, a 18. ábrán bemutatotthoz hasonló erőgörbét. Az ezt követő ciklusok erőgörbéi jelentősen különböztek az elsőtől: nem voltak tettenérhetőek a jellegzetes erőátmenetek és számottevő hiszterézis sem (22. A ábra).

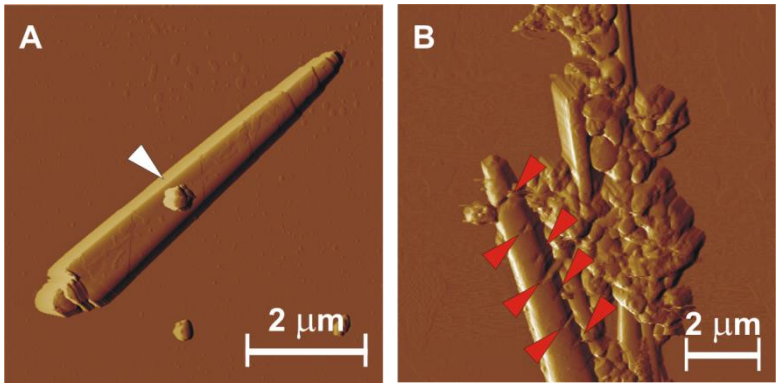


22. ábra *Kohleátok plasztikus deformációja. (A) Egymást követő nyomási erőgörbék. A görbék a pirostól (első benyomás) a liláig (utolsó benyomás) időrendi sorrendet követnek. Nanomechanikai perturbációnak alávetett kohleátok a vizsgálat előtt (B) és utána (C). Az erőspektroszkópiát a fehér kereszttel jelzett pontokban végeztük. A strukturális változásokat nyílhegyekkel jelöljük. A piros nyílhegy membránrétegek kitüremkedését mutatja, a fehér nyílhegyek felületi benyomódásokat jelölnek. A sárga nyílhegy egy, a vizsgálat során elmozdult részecskére mutat.*

Az erőspektroszkópia után pásztázva a vizsgálatnak alávetett részecskéket, megfigyelhetővé váltak a mechanikai perturbáció következményei. Jól látható volt, hogy a plasztikus deformáció a réteges szerkezet megváltozásához vezetett: jellemzően az AFM tű lenyomatát mutató benyomódások és olykor a rétegek oldalirányú torlódásának, esetleg a tű kihúzása közbeni felszakadásának következtében kialakuló kitüremkedések voltak megfigyelhetőek (22. B és C ábrák).

5.2.5. Morfológia és erőspektroszkópia vizes közegben

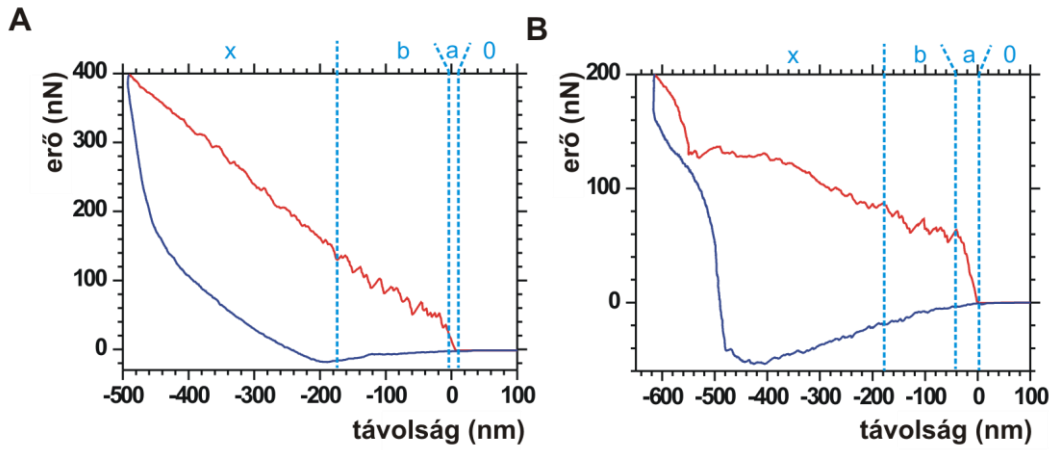
Vizes közegben is vizsgáltuk a kohleátok morfológiáját és mechanikai tulajdonságait AFM segítségével. Erre a célra egy olyan AFM rugólapkát (Arrow UHF) választottunk, aminek létezik két azonos geometriai és mechanikai paraméterekkel rendelkező változata, melyből az egyiket levegő, míg a másikat vizes közegben végzett mérésekre tervezték. Vizes közegben a képalkotás kihívást jelentett, mivel a részecskék, az AFM-tű pásztázó mozgásának hatására, jellemzően elmozdultak eredeti pozíciójukból. Ez arra utal, hogy vizes közegben a kohleátok gyengén adszorbeálódnak a csillámfelülethez. Részben ez, részben a rugólapka rövidsége és az előzőekben bemutatott mérésekhez használtától eltérő geometriai paraméterei okozhatták, hogy a vizes közegű méréseknél rosszabb képminőséget tapasztaltunk, mint levegőben. Ennek ellenére megállapíthattuk, hogy a kohleátok és kialakulási melléktermékeik morfológiája vizes közegben és száraz formájukban gyakorlatilag megegyezik (23. ábra).



23. ábra *(A) szárazon és (B) vizes közegben pásztázott kohleátok AFM amplitúdó-kontraszt képe. A (B) kép erőspektroszkópiás vizsgálatok után készült. A fehér nyílhegy a kohleáthoz asszociálódott vezikula aggregátumra, a piros nyílhegyek az AFM tűje okozta felületi benyomódásokra mutatnak.*

5.2.5.1. Mechanikai jellemzés vizes közegben

A száraz és a vizes közegű kohleátok mechanikai tulajdonságait erőspektroszkópiás mérések segítségével hasonlítottuk össze. A száraz és a vizes közegű kohleátok erőspektrumai, különösen azok benyomási erőgörbéinek kezdeti szakaszai, nagyfokú hasonlóságot mutattak (24. ábra). Az erőgörbe szakaszait a 18. ábrával azonos logika szerint jelöltük. A kontaktus pont elérése („0”szakasz és „a” szakasz határa) után egy meredek, lineáris erőnövekedés volt látható („a” szakasz), majd erő fűrészfogak („b” szakasz) következtek. A 18. ábrán látható „c” és „d” szakaszra jellemző változásokat nem regisztráltunk. Ehelyett egy folyamatosan növekvő erőket mutató, de strukturálatlan szakasz („x”-szel jelölve) következett. A visszahúzási görbék eltértek a benyomási görbéktől, egy széles, negatív adhéziós csúcstól eltekintve meglehetősen jellegtelenek voltak. A két görbe között jelentős hiszterézist tapasztaltunk.

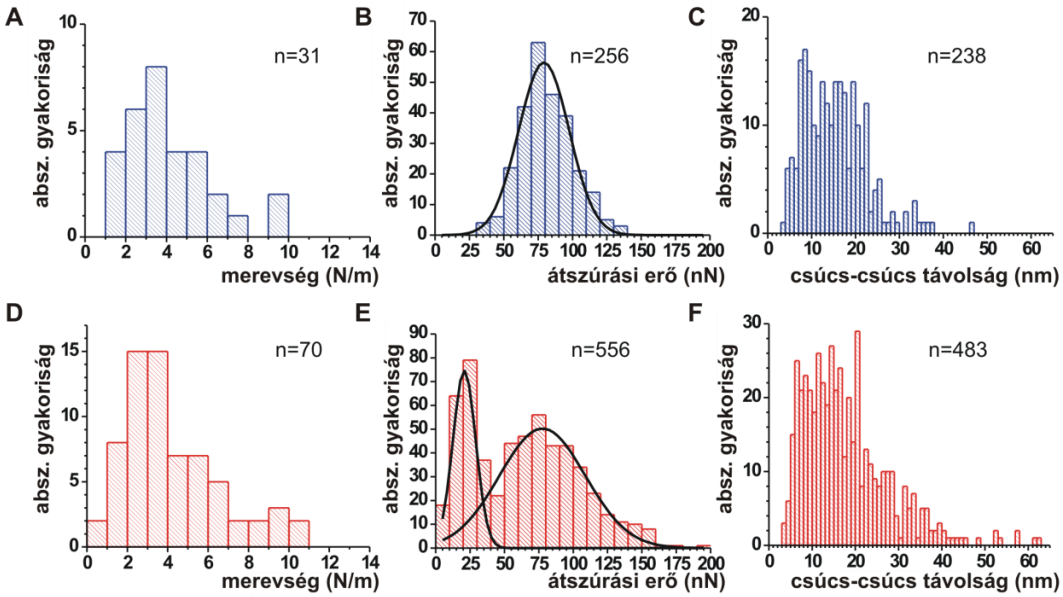


24. ábra *(A) száraz és (B) vizes közegű kohleát erőspektruma Arrow rugólapkával mérve. A piros görbe a benyomás, a kék a visszahúzás során mért erőket mutatja. A távolságot a kohleát felszínétől mérve ábrázoljuk.*

A száraz és a vizes közegű kohleátok erőgörbéinek elemzései során nyert fő mechanikai jellemzők (I. táblázat) nagyságrendi egyezést mutatnak a korábban, másik kohleát mintán, másik (AC 160) rugólapkával mért értékekkel (lsd. 5.2.2 és 5.2.3 fejezet). A száraz illetve vizes közegű kohleátok merevsége és az erőcsúcsok közti távolságértékek eloszlása (25. A és D, illetve C és F ábrák) valamint átlaga hasonló egymáshoz.

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
Átszúrási erők	81,23±18,77 nN	63,76±38,63 nN
Csúcs-csúcs távolságok	15,22±7,16 nm	17,79±10,05 nm



25. ábra *Száraz (A), (B), (C) valamint vizes közegű (D), (E), (F) kohleátok jellemző mechanikai paramétereinek hisztogramjai.*

A membránréteg-átszúrási erők átlaga valamelyest különbözik a száraz, illetve a vizes közegű kohleátokra (I. táblázat). Az átszúrási erő eloszlások maximuma mindkét minta esetén kb. 78 nN-nál jelentkezik, vizes közegben azonban egy további maximum is megjelenik kb. 21 nN-nál (25. B és E ábrák). Ezek a kisebb erők megfelelhetnek a vizes közegben esetlegesen a tűre tapadó membrán-kettősrétegek átszúrási erőátmeneteinek. Liposzómákon és felülethez adszorbeálódott lipid kettősrétegeken végzett korábbi erőspektroszkópiás kísérleteinkben gyakran tapasztaltunk ilyesfajta műtermékeket. Ettől a járulékos hatástól eltekintve, a fő átszúrási erőkre illesztett Gauss-eloszlások csúcsa 79,2 és 77,6 nN-nál jelentkezett a száraz, illetve vizes közegű kohleátokra. Ez arra utal, hogy a két minta között nincs számottevő különbség az átszúráshoz szükséges erők tekintetében. Tehát az átszúrási erő átlagok különbözősége (I. táblázat) csupán a vizes közegű kohleátok bimodális eloszlásának következménye. Figyelemreméltó, hogy a kohleátok plasztikus deformációjának nyomai az erőgörbék felvétele után mintegy negyedórával is jól megfigyelhetőek maradtak (23. B ábra).

5.2.5.2. A kohleát membrán vonalmenti feszültsége

Figyelemreméltó hogy az átszúrási erőcsúcsok egy folyamatosan, jobbról balra növekvő erőválaszra szuperponálódnak (24. ábra). Ennek az oka az, hogy a tűnek nem csak a következő kettősréteg átszúrásához, hanem a már átszúrt membránrétegen keletkezett pórus tágításához is munkát kell végeznie[1]. Egy pórus keletkezését, méretének növelését, úgy is felfoghatjuk, mint egy olyan folyamatot, aminek során a membránban vonalhibát[2] hozunk létre. A membrán vonalmenti feszültsége (λ) az egységnyi hosszúságú él kialakításához szükséges munkának felel meg[3], így ennek figyelembe vételével a vonalhiba létrehozásához szükséges munkát egyszerűen kiszámíthatjuk:

$$dW = \lambda \cdot dl,$$

ahol dl a kiváltott infinitezimális vonalhiba (diszlokáció) hossza, dW a szükséges munka. A kérdés az, hogyan változik a vonalhiba hossza, a beszúrás mélységének (dz) a változásával. (A következőkben az egyszerűség kedvéért ezeket a diszlokációkat röviden "él"-eknek fogom nevezni.) Az él hossza megegyezik az AFM-tű kerületével az adott magasságban; a tű csúcsától számított távolság pedig a beszúrás mélysége (26. ábra). A kerület kiszámítása egyszerű, amennyiben kúp alakú közelítést

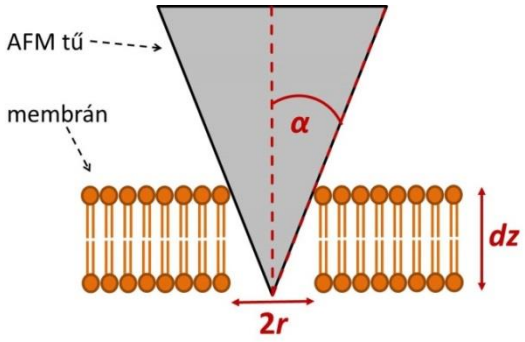
---

[1] Ha az átszúrt rétegeken a pórusok határvonalának a növelésére nem kellene munkát befektetni (nem lépne fel az ún. él-ellenállás) a kohleáton áthaladva mindig csak a soron következő membrán-kettősréteg átszúrással szembeni ellenállását kellene legyőznie a tűnek, ami egy megközelítőleg azonos erőknél jelentkező átszúrási erőcsúcs-sorozathoz vezetne. Pontosan ilyen jellegű erőspektrumot mértek többrétegű membránok henger alakú AFM-szondával való átszúrásakor [4]. Henger alakú tű esetén a már átszúrt membránrétegeken keletkezett pórus mérete nem nő tovább a szonda mélyebbre haladásával, így nem lép fel ellenállás sem. Legfeljebb a henger oldala és az őt körülvevő él közti súrlódás módosíthatja az átszúrási erőket.

[2] Vonalhibának (diszlokációnak) nevezzük azt a jelenséget, amikor egy kristályrács síkjának folytonossága megszakad, illetve amikor egy része rácstávolságnyira eltolódik a többihez képest [5]. Vagyis a kristályrács rendezettsége egy vonal mentén sérül. Általánosabb megfogalmazásban egy sík (pl. egy kohleát membrán-kettősréteg) folytonosságának megszakadását értjük vonalhiba alatt.

[3] Másként fogalmazva, a foszfolipid membránok vonalmenti feszültségén a membránon keletkező él határmenti energiáját értjük [6]. Angol szakkifejezéssel: *line tension*. Mértékegysége: N (J/m). A membrán „él” összetett membránok esetén (pl. az élő sejt membránjában) a lipidek fázisszeparációjával keletkező határvonalat jelenti. Hasonló módon, vonalmenti feszültség jelentkezik a membrán-kettősréteg környezet felé exponált élein, mint amilyen például egy pórus nyílása, vagy egy felülethez asszociált membrán-kettősréteg széle.

alkalmazunk az AFM-tű hegyére[1]. Legyen a kúp fél-nyílásszöge α.



26. ábra *Magyarázat egy membrán-kettősréteg átszúrása során keletkező él vonalmenti feszültségének származtatásához. Az ábra nem méretarányos.*

Ekkor, ha a beszúrás mélysége *dz*, a sugár ennél a mélységnél: $dr = \tan\alpha \cdot dz$, és így a kerület, azaz az él hossza $dl = 2\pi \cdot tan\alpha \cdot dz$. Ennek a *dl*-hosszúságú élnek a kialakításához szükséges erő ($F_{él}$) a befektetendő munka és a beszúrás mélységének a hányadosaként számítható:

$$F_{él} = \frac{dW}{dz} = \frac{\lambda \cdot dl}{dz} = \frac{\lambda \cdot 2\pi \cdot tan\alpha \cdot dz}{dz}$$

$$F_{él} = \lambda \cdot 2\pi \cdot tan\alpha$$

Ezek alapján egyetlen membrán átszúrásakor az (éldiszlokáció kialakításához szükséges) AFM-mel mért erő, mindig ugyanakkora járulékot ad. Ez a járulék csak a tű geometriájától és a membrán vonalmenti feszültségétől (λ) függ. Mivel az $F_{él}$ a membrán-kettősréteg éldiszlokáció kialakításával szembeni ellenállásaként is felfogható, a továbbiakban él-ellenállásnak nevezzük. A fenti levezetés minden egyes rétegre igaz, ezért az erők a rétegek száma szerint összegződnek; ha az átszúrt rétegek száma *n*, akkor az átszúrási erőn kívül szükséges erő-járulék a rétegek számával lineárisan növekszik. Azaz a tű *n*.-dik rétegbe való behatolásához szükséges (az erőgörbén *n*.-dik átszúrási erőcsúcsként megjelenő) erő:

$$F_n = F_{átsz.} + n \cdot F_{él}$$

[1] A mechanomanipuláció során alkalmazott tű valójában tetraéder alakú. Geometriáját, az egyszerűbb leírás kedvéért, α=30° félnyílásszögű kúppal közelítjük.

Az él-ellenállás számításához az első és az utolsó (n.-dik) mért erőket használhatjuk:

$$F_n - F_{n=1} = F_{átsz.} + n \cdot F_{él} - (F_{átsz.} + F_{él})$$

$$F_{él} = \frac{F_n - F_{n=1}}{(n-1)}$$

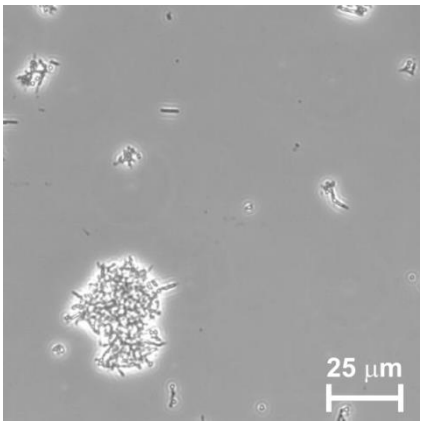
Az él ellenállás ismeretében lehetőségünk nyílik a membrán biofizikai jellemzésére felhasználható vonalmenti feszültség meghatározására:

$$\lambda = \frac{F_{él}}{2\pi \cdot tan\alpha}$$

Mivel az $F_{él}$ mind a száraz, mind a vizes közegű kohleátokra ugyanolyan értékű volt (átlag±SD: 4,5±1,9 nN, illetve 4,5±2,8 nN), az így nyert vonalmenti feszültség mindkét mintára megközelítőleg 1,2 nN-nak adódott. Meg kell jegyezni, hogy az él-ellenállás származtatására fentebb bemutatott gondolatmenet egymásutáni, egyedi membrán-kettősrétegek átszúrását feltételezi. Azaz, nem számol azzal az eshetőséggel, hogy egyszerre több réteg is átszakadhat.

5.3. Kohleátok diszpergálása

A kohleátok kiindulási anyagául szolgáló DOPS vezikulák kitűnő kolloid stabilitással rendelkeznek. Kalciumionok hozzáadásakor azonban rövid időn belül kicsapódnak. Az aggregátumban található kohleátok és vezikulák erősen kötődnek egymáshoz, legalábbis hígítással és intenzív rázással nem, vagy legfeljebb kis mértékben diszpergálhatóak (27. ábra).



27. ábra *Pufferrel (100 mM TRIS pH:7,4) 1:1 arányban hígított és erőteljesen kevert kohleát minta. (Fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel).*

Az aggregációt az okozza, hogy a Ca^{2+}-ionok a liposzómák felszíni töltését megváltoztatják [105], hasonlóan ahhoz, mint amit a saját méréseink mutatnak SUV-ok esetén (lsd.: 5.1.2 fejezet). Ezért kézenfekvőnek tűnik, hogy a Ca^{2+}-ionok eltávolításával az aggregátumoknak szét kellene esniük az azokat alkotó részecskékre. A Ca^{2+} kivonásának azonban nem kívánt következményei is lehetnek, hiszen épp ez a kétértékű kation az, ami feltétlenül szükséges a kohleátok szerkezetének kialakulásához és stabilitásuk fenntartásához. Már a kohleátok felfedezése óta ismert, hogy az erősen Ca^{2+}-kötő EDTA hozzáadására a kohleátok elvesztik stabilitásukat, és igen rövid idő alatt több tíz mikrométer átmérőjű vezikulákká (ún. óriás vezikulákká) alakulnak [2]. Mi abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a kohleát membrántekercsek belső rétegei között található Ca^{2+}-ionok nehezebben hozzáférhetőek a kelátképzők számára, mint a felszíni fejcsoportokhoz kapcsolódók. Amennyiben ez igaz, akkor lehetséges, hogy egy EDTA-nál kisebb Ca^{2+}-affinitással rendelkező molekula csak a részecskék felszínéről távolítja el a Ca^{2+}-ionokat. Ez előidézné az aggregátumok szétesését, de nem érintené a kohleátok szerkezeti stabilitását. Ezen hipotézis vizsgálatára szisztematikus elemzésnek

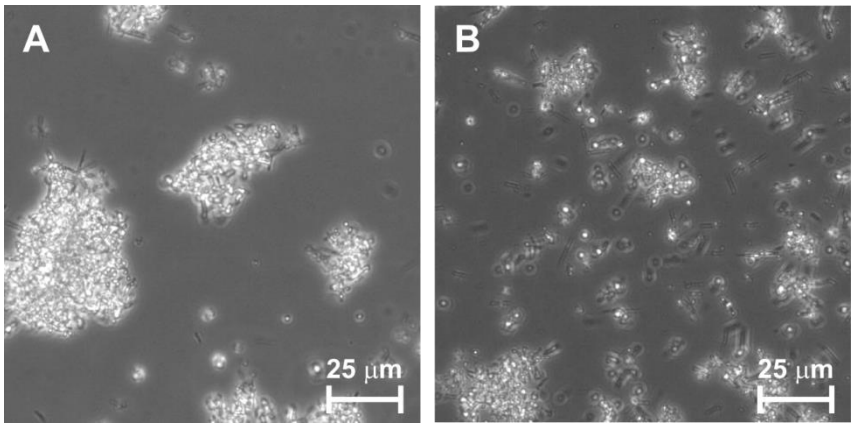
vetettük alá az ecetsav, borkősav és citromsav nátriumsóinak az aggregátumokra kifejtett hatását. Ezek a savak 7,4-es pH-n teljes mértékben disszociált formájukban vannak jelen, és Ca^{2+} iránti asszociációs konstansuk a karboxilcsoportjaik számával együtt növekszik (II. táblázat**).**

II. Táblázat. *Néhány karboxilsav Ca^{2+}-ra, illetve H^{+}-re vonatkozó asszociációs konstansa.*

	pK_a (Ca^{2+})	**Ref.**	**pK_a (H^{+})†**	**Ref.**
Ecetsav	0,53*	[106]	4,75	[107]
Borkősav	1,8**	[108]	3,04; 4,37	[107]
Citromsav	3,17*	[106]	3,13; 4,76; 6,40	[107]
EDTA	10,75*	[109]	0,0; 1,5; 2,0; 2,68	[110]

** 25°C-on és 0,15 M ionerősségnél.*
*** 25°C-on és cca. 0,2 M ionerősségnél.*
† Csak a karboxilcsoportokra vonatkozik, 25°C-on és 0 ionerősségnél.

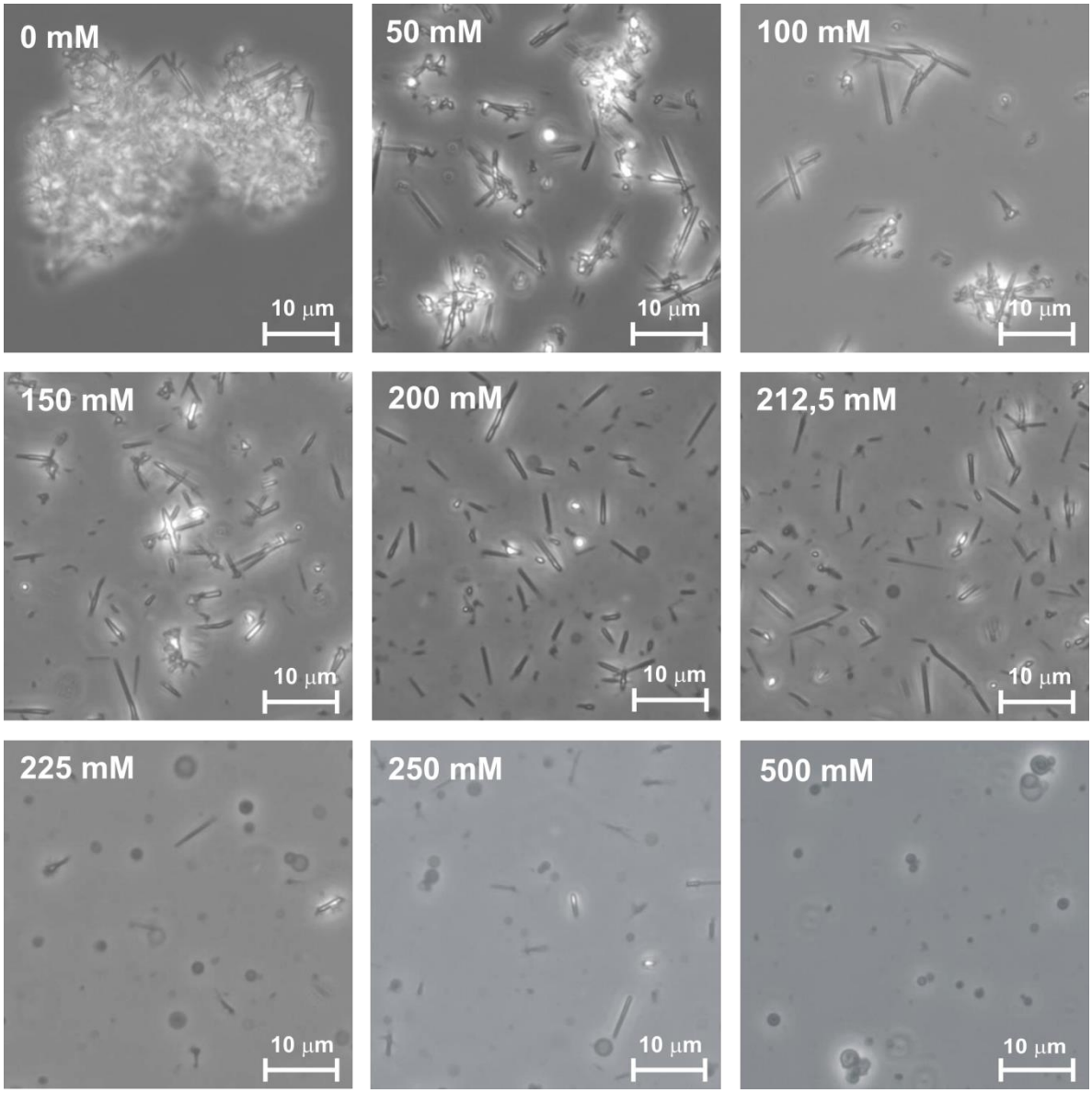
A diszpergálási kísérletekhez dialízissel előállított, képződés közben aggregálódott kohleátokat használtunk (27. ábra és a Melléklet 39. ábrája). Az acetátionok még 500 mM koncentrációban sem tudták szétbontani az aggregátumokat (28. A ábra). A tartarátot 500 mM-os koncentrációban alkalmazva az aggregátumok csak részlegesen estek szét (28. B ábra).



28. ábra *(A) 500 mM acetátion és (B) 500 mM tartarátion kohleát aggregátumokra kifejtett hatása. A minta névleges DOPS és Ca^{2+} koncentrációja 3,1 mM volt.*

Ezzel szemben a citrátionok koncentrációfüggő módon diszpergálták a kohleátokat (29. ábra). 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, míg ennél nagyobb koncentrációknál egyre kevesebb kohleát és egyre több óriási vezikula volt megfigyelhető.

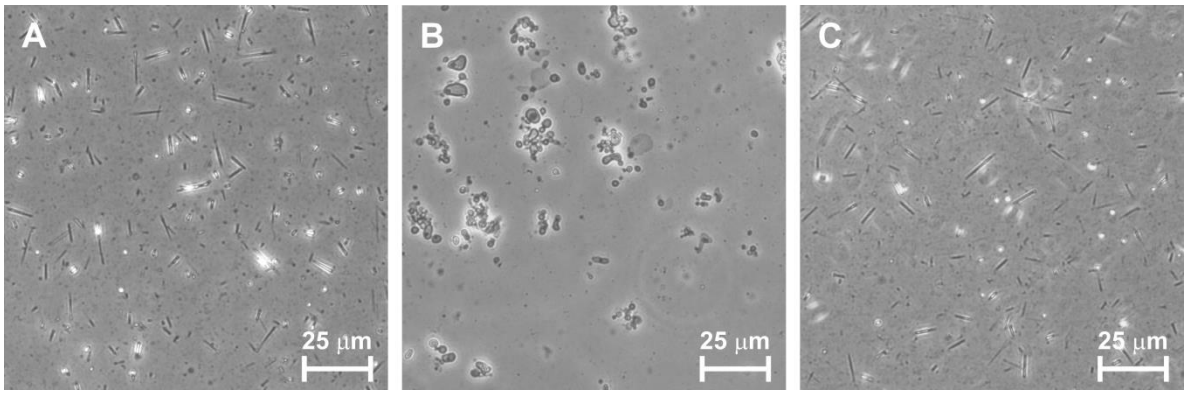


29. ábra *Citrátionok hatása a kohleát aggregátumokra. A nátrium-citrát koncentrációját az egyes képek bal felső sarkában jelöljük. A DOPS és Ca^{2+} névleges koncentrációja 3,1 mM volt.*

5.3.1. A diszpergált kohleátok hosszútávú stabilitása

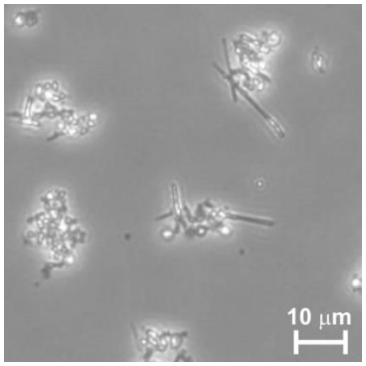
Amennyiben a kohleátokat hosszabb ideig inkubáltuk az optimális koncentrációban alkalmazott Na-citráttal, alapvető szerkezeti változásoknak lehettünk tanúi. A 30. A ábra egy citráttal frissen diszpergált kohleát minta képét mutatja. A 30. B

ábra ugyanazt a mintát mutatja, de 24 óra elteltével. Ezen egyetlen kohleát sem látható, ehelyett óriás vezikulák laza aggregátumai figyelhetőek meg. Másként viselkedett a vizsgált rendszer, ha a diszpergálás után a citrátionokat eltávolítottuk. Ezt úgy értük el, hogy a frissen diszpergált mintát centrifugáltuk, majd az üledéket citrát- és Ca^{2+}-mentes pufferben (100 mM TRIS) szuszpendáltuk. Ekkor a kohleátok nem alakultak át vezikulákká. A részecskék idővel ugyan kiülepedtek az eppendorf-cső aljára, de vortexeléssel vagy pipettázással könnyen ismét szuszpendálhattuk azokat, és még egy hónap múltán is, a frissen diszpergált mintához hasonló megjelenést mutattak (30. C ábra).



30. 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 pufferben (pH=7,4) szuszpendáltuk. A (C) kép 1 hónappal a diszpergálás után készült. A DOPS és Ca^{2+} névleges koncentrációja 3,1 mM volt.*

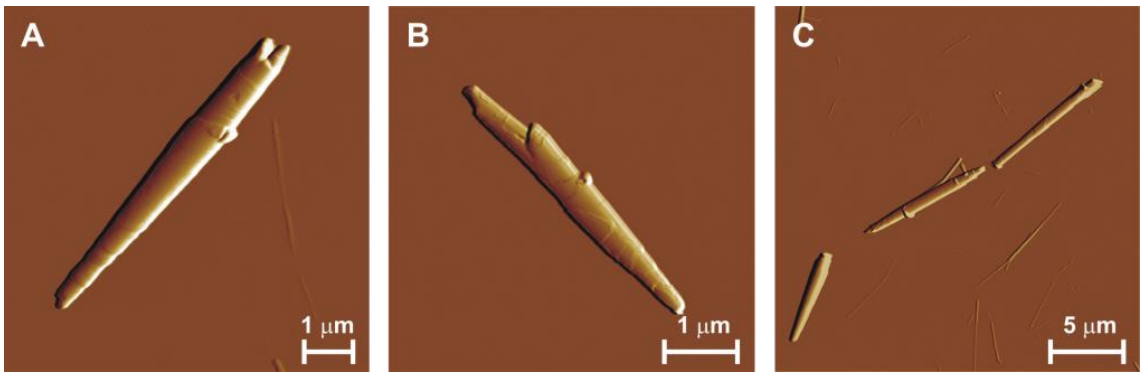
Ha a citrátionok eltávolítása után Ca^{2+}-ionokat tartalmazó oldattal szuszpendáltuk a centrifugált üledéket, a részecskék újra aggregálódtak (31. ábra).



31. ábra *Nátrium-citráttal diszpergált, majd azonnal centrifugált kohleátok üledéke, 6,2 mM Ca^{2+}-iont tartalmazó 100 mM TRIS pufferrel (pH=7,4) szuszpendálva.*

5.3.2. A citrátkezelés hatása a kohleátok szerkezetére

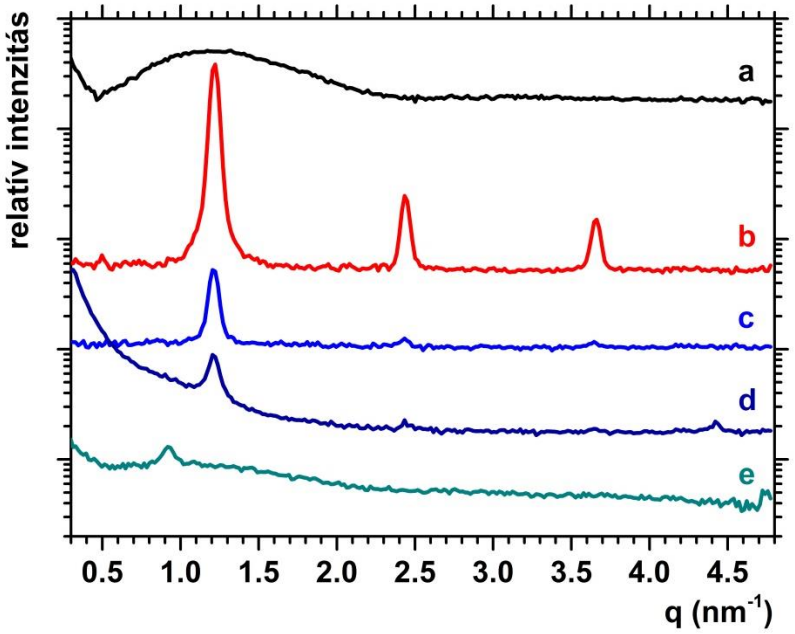
A citrátionnal diszpergált minták szerkezetét nagyfelbontású AFM képalkotás és kisszögű röntgenszórás segítségével vizsgáltuk. A diszpergált kohleátok AFM képei (32. ábra) semmilyen strukturális különbséget sem mutattak a kontroll minták kohleátjaihoz képest. Mindkét esetben a számos módszerrel alátámasztott kohleát szerkezeti modell [2,7] jellemzőit figyelhettük meg. Nevesül: *(1)* a minták hosszúkás részecskéket tartalmaztak, melyek átmérője hossztengelyük mentén lépcsőzetesen változott, *(2)* a membránrétegek szélei jól megfigyelhetőek voltak a részecskék felszínén. Ezen tulajdonságok szőnyegtekercs-szerű elrendezésre utalnak. Egyetlen igazán szembeszökő különbséget állapíthattunk meg a kontroll és a diszpergált minták között: míg a kontroll mintákban a kohleátok többnyire nagyobb aggregátumok részeiként voltak megfigyelhetőek (lásd Melléklet, 39. ábra), addig a citráttal kezelt mintákban, mint különálló részecskék, a szubsztrátfelszínen elszórtan helyezkedtek el (32. C ábra és a Melléklet 40. ábrája).



32. ábra *Citrátionnal diszpergált kohleátok AFM amplitúdó-kontraszt felvételei.*

A röntgenszórást a foszfolipid kettősréteg vastagságának és rendezettségének megfelelő szórási intervallumban (0,3 - 6 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 (29. ábra), míg 50 mM EDTA hatására a kohleátok pillanatszerűen átalakulnak óriási vezikulákká (lásd Melléklet, 41. ábra). A DOPS MLV rendszer egy széles szórási csúcsot mutat 0,5 $nm^{-1} < q < 3\ nm^{-1}$ között (33. ábra, *a*

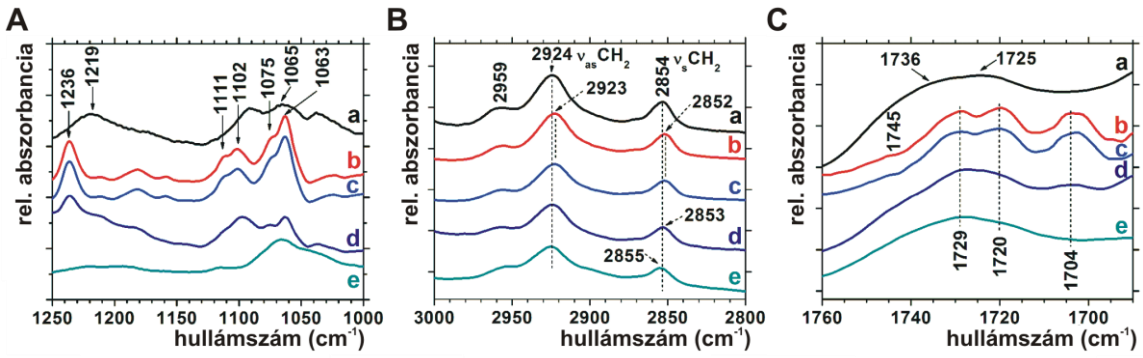
spektrum). A kontroll kohleát minták diffrakciós spektrumán ehhez képest drasztikus változásokat figyelhetünk meg. Éles *Bragg*-csúcsok jelentek meg 1,2; 2,4 és 3,77 nm^{-1}-nél (33. ábra, *b* spektrum). Citrátion hozzáadására a csúcsok pozíciója lényegében változatlan maradt, de intenzitásuk csökkent (33. ábra, *c* és *d* spektrumok), valamint 212,5 mM citrátion koncentrációnál a SAXS jel monoton növekedést mutatott a kisszögű tartomány felé haladva. EDTA hozzáadása ugyancsak jelentős változásokat okozott a kontroll mintához viszonyítva (33. ábra, *e* spektrum). Egyetlen éles *Bragg*-csúcs jelentkezett 0,92 nm^{-1}-nél, amely az MLV spektrumon láthatóhoz hasonlóan, széles szórási csúcsra szuperponálódott.



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

5.3.3. A lipidréteg molekuláris változásainak vizsgálata FTIR spektroszkópiával

Az infravörös spektrumok három tartományát elemeztük részletesebben: a foszfát (1250-1000 cm^{-1}, 34. A ábra), a metilén (3000-2800 cm^{-1}, 34. B ábra), és az észter karbonilcsoport (1760-1690 cm^{-1}, 34. 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 (34. A ábra, *a* spektrum).



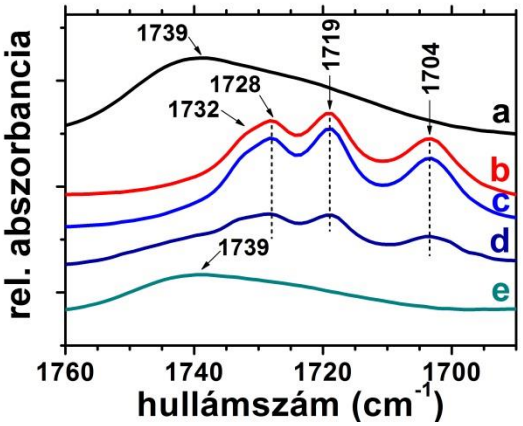
34. ábra *A DOPS molekula (lsd. 4. ábra) FTIR spektrumának (A) foszfát, (B) C-H és (C) észter karbonil nyújtási rezgéseinek tartományai. A puffer spektrumát előzőleg kivontuk. Az egyes spektrumokat az abszorbanciatengely mentén önkényesen eltoltuk egymáshoz képest a jobb követhetőség érdekében. A különböző 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}, 34. A ábra, *b* spektrum). 100 mM-os citrátion koncentráció alkalmazása nem okozott számottevő változást ebben a hullámhossztartományban (34. A ábra, *c* spektrum). A citrátion optimális diszpergáló koncentrációjánál (212,5 mM) a PO2- nyújtási sávok komponenseinek relatív intenzitásai megváltoztak (34. A ábra, *d* spektrum), pozíciójuk azonban nem változott. (Összehasonlítva pl. a 1236 és a 1065 cm^{-1} hullámszámnál mért relatív intenzitásokat a *b* és a *d* spektrumokon, látható a változás.) Jelentős változást tapasztaltunk viszont, amikor 50 mM EDTA-t adtunk a kohleátokhoz: a jellegzetes, felhasadt PO_2^- nyújtási sávok eltűntek (34. A ábra, *e* spektrum).

A DOPS SUV-ok antiszimmetrikus ($\nu_{as}CH_2$) és szimmetrikus (ν_sCH_2) metilén nyújtási rezgései 2924 és 2854 cm^{-1}-nél jelentkeztek (34. B ábra, *a* spektrum). A kohleátok esetén a metilén nyújtási sávok kismértékben eltolódtak a kisebb hullámszámok felé (34. B ábra, *b* spektrum). Amikor a kohleátokhoz 100 mM citrátiont adtunk nem tapasztaltunk jelentős spektrális változást (34. 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 (34. B ábra, *d* spektrum). Amikor a kohleátokhoz 50 mM EDTA-t adtunk, a szimmetrikus metilén nyújtási rezgések további enyhe hullámszám növekedést mutattak.

A DOPS liposzómák esetén az észter karbonilcsoport (*ν*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 (34. C ábra, *a* spektrum). Ezek a két karbonilcsoport különböző mértékben hidratált alpopulációinak feleltethetőek meg [111]. A kohleátok esetében négy *ν*C=O nyújtási sáv vált láthatóvá 1745, 1729, 1720 és 1704 cm^{-1}-nél (34. C ábra, *b* spektrum). A citrátion 100 mM-os koncentrációjánál nem tapasztaltunk számottevő spektrális változást (34. C ábra, *c* spektrum). A citrátion diszpergáló koncentrációjánál (212,5 mM) azonban a keskeny *ν*C=O sávok intenzitásai csökkentek, és az 1729 és 1720 cm^{-1}-nél található csúcsok egyetlen széles sávvá olvadtak össze, ami 1729 cm^{-1}-nél mutatott maximumot (34. C ábra, *d* spektrum). EDTA hozzáadására a kohleátok spektruma a DOPS liposzómákéhoz vált hasonlóvá (34. C ábra, *e* spektrum).

Amikor a mintákat az FTIR kristályra szárítottuk, a fentiekkel megegyező spektrális változásokat tapasztalhattunk. Említésre méltó, hogy az észter karbonilcsoport nyújtási rezgéseinek tartományában a DOPS–Ca^{2+} kölcsönhatásra jellemző keskeny sávok 212,5 mM citrát-koncentrációnál is dominánsak maradtak (35. ábra, *d* spektrum).



35. ábra *Beszárított minták infravörös spektrumának észter karbonil nyújtási tartománya. A puffer spektrumát előzőleg kivontuk. Az egyes spektrumokat az abszorbanciatengely 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 + 100 mM citrátion, (d) kohleátok + 212,5 mM citrátion; (e) kohleátok + 50 mM EDTA.*

6. Megbeszélés

6.1. Kohleátok szerkezete és kialakulása

Az atomierő-mikroszkópos képek megerősítették azt a szerkezeti modellt, amit korábban fagyasztva töréses elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján javasoltak. Méréseink nyomán ehhez két kiegészítést tehetünk:

(1) Az egyik végükön hengeres, másik végükön ellapult tekercsek (pl. 13. C ábra) arra utalnak, hogy a kohleátok rendelkezhetnek belső vizes üreggel. Ezt az erőspektroszkópiás eredmények is megerősítik (lsd. később). Korábban azt gondolták, hogy a kohleátok tömör tekercsek. Csak a közelmúltban, velünk közel azonos időben szolgáltak erre cáfolattal, különböző módszerek segítségével, *Nagarsekar* és mtsai. [3], illetve *Hollander* és mtsai. [7].

(2) Számos képen úgy tűnik (pl. 14. ábra), hogy nem egyedi membrán-kettősrétegek, hanem többrétegű membránlemezek tekerednek kohleátokká. Ez egybecseng Hollander és munkatársainak közelmúltban tett megfigyelésével [7]. Ezt a későbbiekben részletesebben elemzem.

A kohleátok spirálisan tekeredő, többrétegű membránszerkezete az idegsejtek axonját burkoló mielinhüvelyhez hasonló geometriájú. A kohleátszerkezet kialakulása, a membrán-kettősréteg tekercccsé formálódása bonyolult topológiai problémát vet fel. A mielinhüvely esetében a membrántekercset az oligodendrociták, illetve Schwann sejtek membránnyúlványai alakítják ki a sejt saját molekuláris gépezetének aktív közreműködésével [112,113]. A kohleátok esetében azonban passzív módon, külső alakformáló tényezők közrejátszása nélkül, a lipid-kalcium-víz rendszer fizikai-kémiai tulajdonságai és kölcsönhatásai által meghatározottan történik ez a hatalmas topológiai átalakulás, melynek részletei máig nem tisztázottak. A kohleátok kialakulására a felfedezésükkor javasolt modell [2] mindmáig érvényben van. Ehhez a közelmúltban *Nagarsekar* és mtsai. tettek kiegészítéseket [9]. Ezek értelmében (lsd. 2.1.2 fejezet) a liposzómák a kalciummal való reakciójuk során fuzionálnak, kettősrétegű foszfolipid lemezekké roppannak össze. Ezt követően a lemezek önmagukban, vagy egymással asszociálódva bejglihez hasonló geometriájú tekercsekké tekerednek fel, úgy, hogy a

szerkezetet – a szomszédos rétegeket elektrosztatikus kölcsönhatásokon keresztül összetartó – Ca^{2+}-ionok stabilizálják. A kísérletek során meglepődve tapasztaltam, hogy a Ca^{2+}-ionok és a DOPS liposzómák elegyítésekor a fenti modell által sugallt membránlemezek, illetve tekercsszerű struktúrák, legfeljebb elvétve találhatóak a mintában. Ehelyett a kiindulási unilamelláris liposzómák méreténél sokszorta nagyobb, multilamelláris vezikulákból álló aggregátumokat figyelhetünk meg (11. A és B ábrák). A liposzómák fúziójának és aggregációjának oka feltehetően a felületi töltéssűrűség abszolút értékének jelentős csökkenése (12. ábra). Ugyanakkor, az egymást megközelítő vezikulák foszfolipid fejcsoportjainak Ca^{2+}-ionokkal történő keresztkötése sem zárható ki. A kohleátok kialakulása érdekes módon csak az aggregációs folyamatot követően ment végbe (11. ábra). Az érési folyamatról a következő megállapításokat tehetjük:

(1) A kohleátok az aggregátumokban jelennek meg. Ez arra utal, hogy nem az esetlegesen szabadon úszkáló lipid membránlemezek, hanem az aggregátumokat alkotó vezikulák lehetnek a kohleátok előalakjai.

(2) Egyre kevesebb vezikula és egyre több kohleát látható a mintában a napok múltával. Ez megerősíti, hogy valóban a vezikulák alakulnak át valamilyen mechanizmussal kohleátokká.

(3) A kohleát/vezikula arány folyamatos növekedése arra utal, hogy a kohleát forma energetikai szempontból kedvezőbb, mint a multilamelláris vezikula szerkezet.

(4) A vezikula→kohleát átalakulás csak vizes közegben megy végbe. A csillámra cseppentett, megszárított aggregátumok vizsgálatakor nem tapasztaltunk kohleátképződést (lásd Melléklet, 38. ábra). Ez valószínűsíti azt, hogy az átalakulásban szerepe van a vízmolekuláknak, illetve a lipid–Ca^{2+} rendszer vízzel való kölcsönhatásának.

(5) A felületi töltéssűrűség csökkenése (12. ábra) arra utal, hogy a foszfolipidek erősen negatív töltését a Ca^{2+}-ionok (legalább részlegesen) árnyékolták. A kohleátokkal kezelt csillámfelület nedvesedési peremszögének növekedése (16. ábra) azt mutatja, hogy a kalciumionokat kötött DOPS kettősréteg (és így

a kohleátok) felülete a kiindulási liposzómához képest jóval kevésbé hidrofil.

(6) A részlegesen tekeredett kohleátok esetén jól látható, hogy többszörösen rétegzett lemezek feltekercselődése alakítja ki a kohleát struktúrát (14. ábra). Ugyanakkor a képekből nem lehet megállapítani, hogy *(1)* először többrétegű membránlemezek képződtek-e az aggregátumokból, és azok tekerednek kohleáttá, vagy *(2)* valamilyen más mechanizmussal az aggregátumból közvetlenül jöttek létre a kohleátok, amelyek későbbi részleges felnyílása hozta létre ezeket a struktúrákat.

(7) Egyrétegű membránlemezeket nagyon ritkán, egyes aggregátumok körül fedeztünk fel (15. ábra). Ezeknek azonban egyrészt sohasem volt részlegesen tekeredett része, tehát vélhetően nem, vagy csak kevés esetben vesznek részt a kohleátok kialakításában. Másrészt ilyen jellegű struktúrák SUV-okból felületi adszorpcióval, felhasadással, majd összefolyással képződő melléktermékek is lehetnek [114,115]. A különös, ágas szerkezet feltehetően úgy alakul ki, hogy az egyes kohleát-MLV aggregátumok felületéhez asszociálódott vezikulák a minta felületre cseppentése után adszorbeálódnak a csillámhoz, és a visszahúzódó folyadékmeniszkusz (lsd. 16. ábra) húzóerőt gyakorol rájuk.

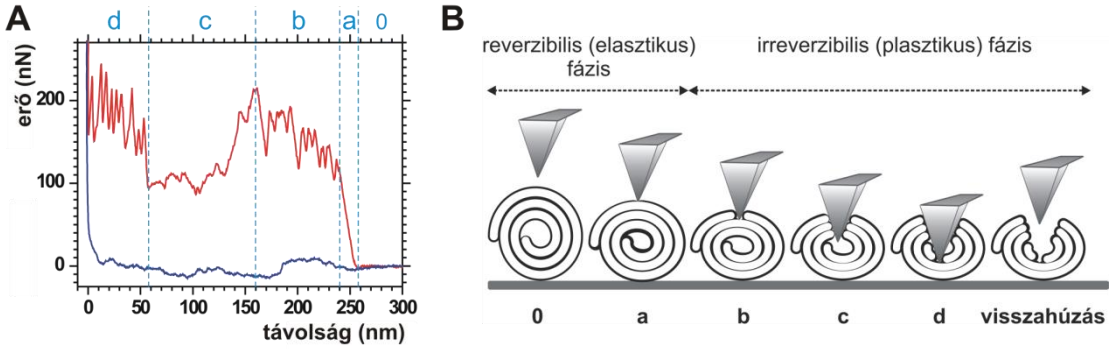
Megfigyeléseink alapján úgy gondoljuk, hogy a kohleátok kialakulását leíró modell jelentős módosításokra szorul. Véleményünk szerint a DOPS liposzómák a Ca^{2+} hozzáadására először multilamelláris vezikulákká fuzionálnak, és ezek a vezikulák aggregálódnak egymással. A multilamelláris vezikulák a többszörös fúziók miatt feltehetően nem szabályos rétegzettségűek és szerkezetűek; az egyes rétegek a felszínen és belül is folytonossági hiányokat tartalmazhatnak. Az így képződő MLV-k tartalmazhatnak valamennyi vizet a rétegeik közé szorulva. A korábbi SAXS mérések nagyon szoros pakolást, míg az FTIR vizsgálatok nagyfokú lipid fejcsoport dehidratációt mutattak (lásd 2.1.1 és 2.1.3 fejezetek). Mindkettő arra utal, hogy a membrántekercs szomszédos rétegei között gyakorlatilag nincs vizes térrész. A zeta potenciál csökkenése és a nedvesedési peremszög növekedése arra utal, hogy a membránrétegek hidrofóbicitása megnőtt. Feltételezhető, hogy az MLV-k szerkezete – a belsejébe csapdázott vízzel együtt – metastabil. Ebből a metastabil szerkezetből, kisebb-nagyobb belső szerkezeti átrendeződések révén, idővel a víz az egyedi membránrétegek

közül kiszorulhat. Ezek során előfordulhat, hogy az MLV megreped, felnyílik, átmenetileg többszörös rétegzettségű lemezt alkot, majd szorosabb pakolást biztosító tekercses szerkezetté zárul vissza. Az MLV-kohleát átalakulás köztes állapotait nem sikerült egyértelműen azonosítanunk. Feltehetően olyan gyorsan lejátszódó folyamatról van szó, amely az AFM-mérések időskáláján nem felbontható. Ez látszólag ellentmondásban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a kohleátok lassan, napok-hetek alatt szaporodnak fel a mintában. Az ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy az MLV→kohleát átalakulás igen gyors, egyirányú, és véletlenszerűen lejátszódó folyamat. Ebben az esetben – hasonlóan a radioaktív magok bomlásához – a részecskesokaság átalakulása egy meghatározott kinetikát követ, azonban az egyes részecskék előre meg nem jósolható időpillanatban, hirtelen alakulnak át. A kohleátok képződésének alaposabb megértéséhez további vizsgálatok elvégzését tervezzük.

6.2. Kohleátok nanomechanikai jellemzése

6.2.1. A kohleátok nanomechanikai ujjlenyomata

A 18. ábrán bemutatott összetett erőspektrum a kohleát nanorészecskék mechanikai ujjlenyomataként értelmezhető. A spektrumok ugyanis mind a kohleátok különleges szerkezetéről, mind a mechanikai tulajdonságaikról információkat tárnak fel. A mechanikai perturbáció során rögzített erőspektrumok egyes szakaszainak értelmezését segíti a 36. ábra.



36. ábra *(A) A 18. ábra ismétlését a B részen látható modell könnyebb megértése miatt tarjuk indokoltnak. (B) A kohleátok mechanikai manipulációjának modellje. Az egyes ábrarészek alatti betűk az (A) ábrán ábrázolt szakaszoknak felelnek meg. A (B) ábra nem méretarányos.*

A „0” szakaszban az AFM tűje közelít a felszín felé, de még nem éri el azt, nincs közöttük mérhető nagyságú kölcsönhatás, így a tűre ható erőhatás zérus. Amint a tű eléri a felszínt, nyomást kezd kifejteni a mebrántekercsre, a rugólapka visszahajlik, meredeken növekvő erőt regisztrálunk („a” szakasz). Ezen szakasz linearitása arra utal, hogy a kohleát – a *Hooke*-törvényt követő – közel ideálisan rugalmas viselkedést mutat. Az ideálisan elasztikus viselkedést az ebben a szakaszban tapasztalt reverzibilitás is megerősíti (17. A ábra). A „b” szakasz egymást követő csúcsai feltehetően az egymás alatt fekvő lipid kettősrétegek átszúrásának feleltethetőek meg. Amint azonban a tű a legbelső réteget is átszakítja és eléri a mebrántekercs belső üregét, a rá ható ellenállás lecsökken, ezért tapsztaljuk az erő csökkenését és ezért válik jellegtelenebbé a görbe („c” szakasz). A belső üregen áthaladva újra jelentős erőnövekményt és ismétlődő erőcsúcsokat láthatunk, ami arra utalhat, hogy a tű elérte az alsó membránrétegeket, és azokat is egyenként szakítja át („d” szakasz). Amikor a tű az utolsó rétegen is áthalad, a

csillámfelszínbe ütközik, az erő meredeken megnő. Ebben az esetben tehát a teljes kohleát tekercset átszúrtuk. Más esetekben a reprezentatív erőspektrum csak egy részletét tudtuk mérni, ami arra utal, hogy a tű csak behatolt a kohleátba, de nem haladt át rajta teljesen. Azokban az esetekben, ahol a „c" szakasz nem volt kivehető, feltételezhetően a membrántekercs nem rendelkezett számottevő méretű belső üreggel, vagy az üreg teljesen eltűnt, miközben a tű egymásnak préselte a felső és alsó rétegeket. A „c" szakasszal rendelkező erőgörbék viszont egyértelműen utalnak rá, hogy a kohleátok rendelkezhetnek belső üreggel.

Különleges figyelmet érdemel, hogy az átszúrási erő-átmenetek egymástól független csúcsok sorozataként jelentkeztek, ami arra utal, hogy a kohleát membránrétegei mechanikai értelemben nincsenek egymáshoz csatolva. Ez azonban felveti azt a kérdést, hogy a Ca^{2+}-ionok a tekercs belsejében vajon valóban keresztkötik-e a szomszédos foszfolipid kettősrétegek fejcsoportjait egymással. Ha egy henger alakú tű segítségével szúrnánk át szomszédos, de egymással csatolásban nem álló foszfolipid kettősrétegeket, akkor egymást követő, azonos erőknél jelentkező, azonos nagyságú fűrészfogak sorozatát kapnánk [102]. Ehhez képest a kohleátok erőgörbéi mindössze annyiban különböztek, hogy a közel azonos nagyságú fűrészfogak egy folyamatosan növekvő erőválaszra szuperponálódtak. Ennek az az oka, hogy a kohleátok esetében a kettősrétegeket tetraéderes, a hegyétől a talpa felé folyamatosan szélesedő tűvel szúrjuk át. Így, az átszúrás során a tű alatt fekvő réteget vertikális erővel terheltük, míg a már átszúrt rétegek horizontális erőt fejtenek ki a tűre. Ez utóbbiból fakadó él-ellenállás (lsd. 6.2.5 fejezet) az átszúrt rétegek számával arányosan növelte a tűre ható erőt.

A visszahúzási görbén nem voltak jellegzetes átmenetek azonosíthatóak, és jelentős hiszterézis mutatkozott a nyomási és a húzási görbék között. Ez arra utal, hogy a kohleát plasztikus alakváltozást szenvedett, és a tű visszahúzásának kb. fél másodperces időtartama alatt nem történt mérhető strukturális visszarendeződés. Tehát a másodperces időskálán a plasztikus deformáció irreverzibilis.

6.2.2. Az erőspektrumok érvényessége

A kontaktus magasság és topográfiai magasság nagyon erős egyezése (közel 1-es meredekség, lásd a 19. A ábrán) alátámasztja azt, hogy az erőspektrum valóban azon molekuláris események lenyomata, amelyek akkor következnek be, amikor a rugólapka

tűje egy kohleát részecske valamennyi rétegén keresztülhalad. Ez ugyanakkor nagyban valószínűsíti, hogy körülbelül megegyező számú átszúrási erőcsúcsot kellene kapnunk a „b” és „d” szakaszban. Ugyanis a tekercs – elvileg – ugyanannyi membránréteget kell tartalmazzon a felső és az alsó felében. Ezt megerősíti, hogy 1-hez közeli arányosságot, és aránylag erős korrelációt találtunk a „b” és „d” szakasz csúcsainak a száma között (19. B ábra). Azt, hogy ez a korreláció nem adódott ennél is szorosabbnak, magyarázhatja az, hogy az átszúrás során olykor egyszerre több rétegen is átszaladhat a tű. Ilyenkor, az egyszerre átszúrt rétegek erő-csúcsai helyett egyetlen erő-csúcs jelentkezik. Ez a jelenség mind a felső, mind az alsó rétegek esetén előfordulhat.

Annak eldöntésére, hogy a „b” és „d” szakasz csúcsai valóban membrán-kettősrétegek átszúrásából származó erőátmenetek-e, megvizsgáltam a szomszédos csúcsok közti távolságokat. Az erőcsúcsok közti távolságok eloszlása mind a „b”, mind a „d” szakasz esetében multimodális (20. A ábra). A legnagyobb relatív gyakoriság 5 nm-nél jelentkezett, ami jól megfelel a foszfolipid kettősréteg vastagságának [4,5]. Eszerint a legtöbb erőcsúcs formájában jelentkező átmenet egyetlen membrán-kettősréteg átszúrásának feleltethető meg. Az ettől eltérő csúcs-csúcs távolság értékek két okra vezethetőek vissza. Egyrészt arra, hogy az átszúrás során maga a tekercs is alakváltozást szenvedhet (összenyomódhat), ami miatt a tű által megtett út nagyobb lehet, mint ami csupán a membrán-kettősrétegen való áthaladáshoz lenne szükséges. Másrészt arra, hogy nem minden esetben membrán-kettősrétegek szakadnak át. Utóbbit támasztja alá, hogy a hisztogramon (20. A ábra) további maximumok voltak megfigyelhetőek a 2,5 nm egész számú többszöröseinél, amely arra utal, hogy egyedi foszfolipid rétegek, illetve rétegkombinációk átszúrása is megtörténhetett a mechanikai manipuláció során. Ez a megfigyelés megerősíti azon feltételezésünket, miszerint a szoros korrelációtól való eltérést, amelyet a csúcsszám analízis során tapasztaltunk (19. B ábra) a többszörös átszúrási események magyarázhatják.

Az előző bekezdésben az átszúrási erőcsúcsok változásairól megállapítottuk, hogy az ismétlődési távolságuk megfelel a foszfolipid kettősréteg vastagságának. Vizsgálni kívántuk azt, hogy az erőkre vonatkozó ismétlődési minta megfelel-e a kohleátok topográfiai magasságváltozásainak. Ezen hipotézis vizsgálatára részletes analízist végeztünk a kohleátokról készült magasság-kontraszt képeken (20. B-E ábrák). A felület magasságváltozásainak hisztogramja egy főmaximumot mutatott 5,5 nm-nél. Ezen kívül

két kisebb maximum is jelentkezett 9,5 és 14,5 nm-nél. Ez az eloszlás és a maximumértékek kitűnő egyezést mutatnak az erő-csúcsok közötti távolságok eloszlásával (20. A ábra). Ez megerősíti azt, hogy valóban a foszfolipid kettősrétegek, illetve kombinációik szakadnak át a kohleátok mechanikai manipulációja során. Összességében az erőspektroszkópiás mérés során regisztrált görbék valóban a kohleátok mechanikai ujjlenyomatának tekinthetőek (18. ábra), a részecskék elasztikus és plasztikus deformációját egyaránt tükrözik. A fentiek értelmében a plasztikus deformációt a kohleátot alkotó membránrétegek egyenkénti, vagy többszörös, sorozatban történő átszúrása okozza.

6.2.3. A kohleátok mechanikai ellenállóképessége

A kohleát elasztikus vagy plasztikus alakváltozásához szükséges erők tükrözik a struktúra mechanikai tulajdonságait és szoros összefüggésben állnak a nanorészecske stabilitásával. A kohleátok esetében tapasztalt merevség meglepően nagy (8,2±1,5 N/m, lsd. 21. A ábra). Ez az érték nagyságrendekkel több, mint például az üres víruskapszidok, liposzómák, felületasszociált lipid kettősrétegek vagy éppen mikrotubulusok merevsége (III. Táblázat).

III. Táblázat. *Nanoméretű biomolekuláris rendszerek mechanikai paraméterei.*

	Rugóállandó (N/m)	**Átszúrási erő (nN)**	**Hivatkozások**
Üres víruskapszidok	0,11 – 1,03	0,6 – 5,8	[116-120]
Liposzómák	0,01 – 0,12	0,6 – 1,1	[121,122]
Hordozófelületi lipid kettősrétegek*	0,01 - 1	0,4 - 36	[123-125]
Mikrotubulusok	0,074 – 0,1	0,3 – 0,5	[126,127]
Kohleátok	4,2 – 12,5	45 – 278**	

**Merev hordozófelülethez adszorbeálódott kettősrétegű foszfolipid membránok. A nemzetközi szakirodalomban használt elnevezésük: supported lipid bilayer (SLB), illetve supported planar bilayer (SPB).*
*** A kohleátok felső membránrétegeit figyelembe véve (v.ö.:21. B ábra).*

Ráadásul a kohleátok membránrétegei akár több száz nN erőnek is ellen tudtak állni anélkül, hogy átszakadtak volna (21. B ábra). Összehasonlításképpen egy egyedi kovalens kötés felszakításához szükséges erő mindössze néhány nN (1,4±0,3 nN a S-Au kötésre, és 2,0±0,3 nN a Si-C kötés esetén) [128]. Nagyfokú rendezettséget mutató

fehérjestruktúrák, mint a mikrotubulusok, vagy a víruskapszidok néhány száz pN, illetve legfeljebb néhány nN erő hatására összeroppannak. Még a merev hordozófelülethez adszorbeálódott lipid kettősrétegek is átszúrhatóak legfeljebb néhány tíz nN erővel (III. Táblázat). Az extrém mechanikai ellenállóképesség arra utal, hogy a kohleátokban a Ca^{2+}-ionok foszfolipidekhez való kötődésének hatására egy többrétegű, nagyon szorosan pakolt, gyakorlatilag kristályos szerkezet jön létre. Ezek alapján a kohleát struktúra a folyadékkristályos foszfolipid molekulák egy új fázisát kell, hogy jelentse.

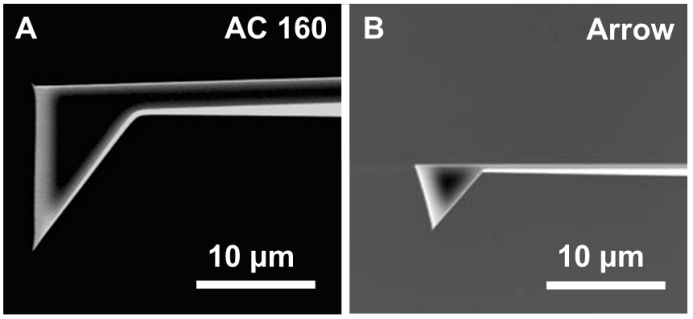
6.2.4. Kohleátok plasztikus deformációja

Figyelembe véve a zsírsavláncoknak a Ca^{2+}-ionok okozta kristályosodását azt várnánk, hogy a kohleátok plasztikus deformációja során a membránrétegek eltolását nem követi visszarendeződés; tehát a deformáció irreverzibilis kell, hogy legyen. Ezt a feltevést ugyanazon pontban többször ismételt erőspektroszkópiás vizsgálattal ellenőriztük. Ennek során csak az első benyomási ciklus során tapasztaltunk a kohleát réteges szerkezetése jellemző erőátmeneteket. A további ciklusok jellemző átmenetek nélküli benyomási görbéket és minimális mértékű hiszterézist mutattak csak (22. A ábra). Ez arra utal, hogy az erőspektroszkópia néhány másodperces időtartama alatt a szerkezet nem rendeződik vissza, tehát a kohleátok, amennyiben a terhelés egy bizonyos határt meghalad, plasztikus, irreverzibilis deformációt szenvednek. A perturbációnak alávetett részecskéket a vizsgálat után újra pásztázva jellegzetes felületi változásoknak lehettünk tanúi (22. B és C ábrák), amelyek bizonyítják, hogy a deformáció eredménye hoszabb, jó pár perces, akár órás időtávon is maradandó. Ez figyelemreméltó annak fényében, hogy a foszfolipid alapú rendszerek (pl. liposzómák, felülethez adszorbeálódott lipid kettősrétegek) esetén a kettősrétegű membrán átszúrását másodpercnél rövidebb idő alatt bekövetkező, spontán regenerálódás követi [129]. A permanens, plasztikus deformáció a szilárd anyagokra, illetve a különlegesen nagy viszkozitású folyadékokra (pl. üveg, bitumen) jellemző. A kohleátok esetén tehát az eredetileg nagyfokú laterális mozgékonysággal rendelkező foszfolipid molekulák valószínűleg egy sokkal rendezettebb, erősebb kölcsönhatásokkal stabilizált struktúrában helyezkednek el. Vagyis a plasztikus deformáció irreverzibilitása közvetett módon alátámasztja, hogy a foszfolipidek a kiindulási folyadékkristályos fázisból a

kalciumionokkal való kölcsönhatás eredményeképpen szilárd, kristályos fázisba kerültek.

6.2.5. Száraz és vizes közegű kohleátok összehasonlítása

A száraz és a vizes közegű kohleátok mechanikai paramétereit egy az előzőektől független kísérletsorozatban, másik kohleát mintán, másik rugólapkát alkalmazva (lsd. lentebb) végeztük. A száraz és a vizes közegű minta kohleát-MLV aggregátumai között nem volt figyelemreméltó morfológiai különbség (23. ábra). Megfigyelhető volt, hogy mindkét minta benyomási erőgörbéi kevésbé voltak strukturáltak, kevesebb erő-fűrészfogat tartalmaztak, mint a 18. ábrán bemutatott erőspektrum (24. ábra). Ennek a méréshez használt rugólapkák különbözősége az oka. Azokat a méréseket, amelyek segítségével a kohleátok mechanikai jellemzését végeztük egy tetraéder alakú tűt hordozó rugólapka (AC 160, Olympus) segítségvel végeztük száraz kohleátokon. A száraz és vizes közegű kohleátok mechanikai paramétereinek összehasonlításához használt rugólapka pár (Arrow UHF) ugyanolyan alakú, de szélesebb nyílásszögű tűt hordoz (37. ábra).



C

	AC 160	Arrow
tű sugár	7 nm	10 ± 2 nm
tű magasság	14 µm	3 ± 1 µm
elülső szög	0 ± 1°	20 ± 1°
hátsó szög	35 ± 1°	35 ± 1°
oldalsó szög	15 ± 1°	30 ± 1°

37. ábra *(A) Olympus AC 160 és (B) NanoWorld Arrow rugólapkák részletének scanning elektronmikroszkópos felvétele. A lapkák végén jól látható a tetraéderes tű. A képeket azonos nagyításnál mutatom be, így a tűk alakjában és méretében jelentkező különbségek jól érzékelhetőek. (C) A rugólapkák tűinek adatai. Az eredeti képek és a specifikáció forrása a forgalmazó weboldala volt: https://afmprobes.asylumresearch.com. Letöltve: 2017. április 7-én.*

Minél szélesebb a tű nyílásszöge, annál nagyobb mértékben súrlódik a tű oldala az általa ütött lyuk széléhez az erőspektroszkópia benyomási ciklusa során. Az így keletkező, ún. él-ellenállás hozzáadódik az egyedi membránrétegek átszúrásával szembeni ellenállásához, mi több hamarosan meghaladja annak mértékét. Emiatt az egyedi membránrétegek átszúrására jellemző erő-átmenetek egyre elkentebbekké, végül

pedig közel lineárisan növekvő jellé válnak. Az átszúrt membránrétegek élének ellenállása fontos adatokkal szolgál az egyedi kettősrétegek tulajdonságairól. Az él-ellenállásból számolható vonalmenti feszültség érték teljesen azonosnak, α=1,2 nN-nak adódott mind a száraz, mind a vizes közegű kohleátokra. Ez az egyezés megerősíti azt, hogy az egyedi membránrétegek szintjén nincs strukturális különbség a száraz és a vizes közegű minta között. Figyelemre méltó, hogy a kohleátok Ca^{2+}-stabilizálta membrán-kettősrétegeinek vonalmenti feszültsége mintegy két-három nagyságrenddel haladja meg a lipid kettősrétegekre jellemző, tipikusan a néhány pN nagyságú értékeket [104,130,131]. Ez a kettősrétegű foszfolipid membránnak a Ca^{2+} hatására bekövetkező kristályosodásának lehet a következménye.

A száraz és vizes közegű kohleátok merevség, átszúrási erő és csúcs-csúcs távolság eloszlásai meglehetősen hasonlóak voltak egymáshoz (25. ábra), ami azt mutatja, hogy a részecskék fő mechanikai paraméterei kiszáradva és folyadékban megegyeznek egymással. Ez arra utal, hogy a vizes közegnek a már kialakult kohleátok szerkezetének stabilizálása szempontjából nincs jelentősége. Korábban megfigyelték, hogy a kohleátok liofilizálhatóak [8,82,132]. Eredményeink tanúsága szerint azonban a kohleátok szerkezete nem csak a kíméletes fagyasztva szárítás, hanem az egyszerű száradás során is ép marad. Mi több, nem csak a külső megjelenésük marad változatlan, hanem a mechanikai tulajdonságaik is, ami a bonyolult belső szerkezetük megtartottságára utal. Az erőspektroszkópia során a vizes közegű kohleátok is plasztikus deformációt szenvedtek, és a deformáció jó pár perces időskálán sem relaxált (23. B ábra). Összességében tehát a foszfolipidek Ca^{2+}-ionokkal való kölcsönhatása következtében kialakuló kohleát szerkezet már közelebb áll tulajdonságaiban a szilárd, kristályos fázisú állapothoz, mint a folyadékkristályos fázishoz. Mérési eredményeink közvetett mechanikai bizonyítékát szolgáltatják a Ca^{2+}-ionok kettősrétegű DOPS membránokat kristályosító hatására.

6.3. Kohleátok diszpergálása

6.3.1. Alkalmas diszpergálószer keresése

Az acetát- és tartarátionok még meglehetősen nagy (500 mM) koncentrációban sem, vagy legfeljebb részlegesen tudták szétbontani az aggregátumokat (28. ábra). A citrátion ellenben hatékonyan diszpergálta a kohleátokat. A diszpergáló hatás függ a koncentrációtól (29. ábra): a kísérletekben alkalmazott lipid és kalciumkoncentrációk esetén az optimális diszpergáló hatást 200-212,5 mM a nátrium-citráttal értük el. Ennél kisebb citrát-koncentrációknál az aggregátumok legfeljebb részlegesen estek szét, míg e fölött a kohleátok óriás vezikulákká alakultak. Tehát a citrátion, egy viszonylag szűk koncentráció tartományban alkalmazva, a kohleát-vezikula-aggregátumok hatékony diszpergáló ágenseként használható.

Abban az esetben, ha az akár optimális koncentrációjú citrátionnal diszpergált kohleát mintát hosszabb ideig állni hagyjuk, a kohleátok membrántekercs-szerkezete felbomlik és a részecskék óriás vezikulákká alakulnak (30. B ábra). Ez azért történhet, mert a feleslegben jelen lévő citrátionok lassanként hozzáférnek a membránrétegek között található, a szerkezetet stabilizáló Ca^{2+}-ionokhoz, és komplexálják azokat. Amennyiben a részecskék diszpergálása után eltávolítjuk a rendszerből a citrátionokat, a kohleátok tekercses szerkezete megtartott marad, mi több, a részecskék, noha ülepedhetnek, de hosszú idő (napok, hetek) alatt sem fognak újra aggregálódni (30. C ábra). Ha a diszpergált majd citrátion-mentesített rendszerhez újra Ca^{2+}-ionokat adunk, ismét aggregáció lép fel (31. ábra). Ez a megfigyelés megerősíti, hogy a citrátion a diszpergáló hatását a Ca^{2+}-ionoknak a részecskék felületéről történő eltávolításával fejheti ki. Ezért marad a rendszer szerkezetileg és aggregációs tekintetben is hosszú időn keresztül stabil, ha a diszpergálás után mind a Ca^{2+}-, mind a citrátionokat eltávolítjuk a kohleátok mellől.

6.3.2. A citrátion nem befolyásolja a kohleátok topográfiáját

Joggal merülhet fel a kérdés, hogy a diszpergálásra megfelelő koncentrációban és ideig alkalmazott citrátion befolyásolja-e a kohleátok szerkezetét. Első megközelítésként feltételezhetjük, hogy nem, mivel a diszpergált minták fáziskontraszt-mikroszkópos képein (29. és 30. A ábrák) ugyanolyan, néhány mikrométer hosszúságú

rudacskákat figyelhetünk meg, mint amilyenek a kontroll minták aggregátumaiból állnak ki, illetve olykor az aggregátumok között szabadon is felfedezhetőek (27. ábra). Kézenfekvőnek tűnik, hogy ezek a diszpergált rudacskák az aggregátumokból felszabaduló egyedi kohleátok. Az alkalmazott felbontás azonban nem elegendő annak megállapítására, hogy ezek az objektumok valóban kohleátok-e, ezért a mintákon AFM képalkotást végeztem. Megállapítottam, hogy a diszpergált minták valóban kohleátokat tartalmaznak, melyeken a kontroll minta kohleátjaihoz képest (39. ábra) semmilyen szembeszökő topográfiai különbség nem volt megfigyelhető (32. és 40. ábrák). Jól látszott, hogy a citráttal kezelt minták kohleátjai egyedi részecskékként, nagyjából egyenletesen eloszolva borítják a felszínt. Ezzel ellentétben, a kontroll minta kohleátjai döntő többségben aggregátumokat alkottak. Mindez arra utal, hogy a citrátion, megfelelő koncentrációban alkalmazva, képes az aggregált kohleátok hatékony diszpergálására anélkül, hogy azok szerkezetét károsítaná. Érdekes jelenség, hogy míg a kontroll, aggregált kohleátok jól tapadtak az enyhén negatív töltésű csillámfelületre, addig a diszpergált kohleátok egyáltalán nem. Ez utóbbiak vizsgálatához a polilizinnel borított, pozitív töltésű csillámfelszín bizonyult alkalmas szubsztrátnak. Ez a megfigyelés arra utal, hogy míg az aggregált minta részecskéinek felületi töltése pozitív, a diszpergálté már negatív lehet. A felületi töltés változása alátámasztja azt az elképzelésünket, hogy a diszpergálás és stabilizálás alapja a Ca^{2+}-ionoknak a felületről történő kivonása. A Ca^{2+}-ionokat a felületről eltávolítva, a negatív töltésű lipid-fejcsoportok elektrosztatikus árnyékolása nagymértékben gyengül.

6.3.3. A citrátion nem perturbálja a membrántekercsek belső szerkezetét

A kontroll és citrátionnal diszpergált kohleátok topográfiai hasonlósága nem zárja ki annak lehetőségét, hogy belső, finomszerkezeti különbségek legyenek a minták között. Ezért a kohleátok belső szerkezetének vizsgálatára kisszögű röntgenszórás (SAXS) vizsgálatokat végeztünk. A SAXS módszerei képesek feltárni a citrátionnak a szomszédos membránrétegek rendezettségére és egymással való térbeli csatoltságára (korrelációjára) kifejtett esetleges hatásait [133]. A DOPS-ből készített MLV minta diffrakciós spektrumán jelentkező nagyon széles, diffúz szórási csúcs (33. ábra *a* spektrum) a jórészt nem korrelált, multilamelláris rendszerekre jellemző [133]. MLV-ről lévén szó, a korreláció hiánya első meggondolásra meglepőnek hathat, azonban

tekintetbe kell vennünk, hogy a DOPS az alkalmazott pH-n erősen negatív felületi töltésű kettősrétegeket alkot, melyek taszítják egymást. A Ca^{2+} hozzáadása a szerkezet jelentős megváltozásához vezet. A kontroll kohleát minta azonos távolságban lévő *Bragg*-csúcsai (33. ábra, *b* spektrum) nagyfokú rendezettséget mutató, periodikus, lamelláris állapotra utalnak. A rétegek ismétlődési távolsága 5,15 nm, ami jó egyezést mutat a *Nagarsekar* és mtsai. által kohleátokra mért 5,1 nm-es értékkel [22]. Ez a távolság egy foszfolipid kettősréteg vastagságának felel meg [4,5]. A citrátiont tartalmazó mintákban a *Bragg*-csúcsok helyzete gyakorlatilag nem változott (33. ábra, *c* és *d* spektrumok), az ismétlődési távolság ezeknél 5,18 nm-nek adódott. A mindössze 0,03 nm különbség nem számottevő. Ez azt jelenti, hogy a citrátion nem befolyásolta a kohleát nagyfokú rendezettségét. A csúcsok intenzitáscsökkenésének feltehetőleg méréstechnikai oka van. (A mintákat ugyanis a mérőkapillárisba való betöltés után centrifugáltuk. Mivel a minták különböző méretű részecskéket, egyes esetekben aggregátumokat is tartalmaztak, így különböző mértékben ülepedtek le. Ennek következtében a kapillárisok alsó részén, ahová a röntgennyalábot fókuszáltuk, különböző mennyiségű lipid helyezkedett el az egyes minták esetén.) A nagyobb citrátion koncentrációjú mintában a szórt intenzitásnak a kisszögű intervallumban tapasztalt monoton növekedése (33. ábra, *d* spektrum) az aggregátumoknál kisebb részecskék jelenlétére utal. Ez a dezaggregációs folyamat során felszabaduló kohleátokat és lipid vezikulákat egyaránt jelentheti. A jelenség a kontroll és a kis citrátion koncentrációjú mintában nem volt megfigyelhető, mivel a nagyméretű aggregátumok szórása nem járul hozzá ehhez a régióhoz.

Az EDTA-t tartalmazó minta diffrakciós spektruma egy széles, elkent csúcsot mutat a 2 nm^{-1}-nél kisebb értékek felé, amire egy határozott, 0,91 nm^{-1}-nél jelentkező *Bragg*-csúcs szuperponálódik (33. ábra, *e* spektrum). Előbbi az MLV minta diffrakciós spektrumán tapasztalthoz (33. ábra, *a* spektrum) hasonló jellegzetesség, ami korrelálatlan kettősrétegű membránok jelenlétére utal. Utóbbi pedig rendezett multilamelláris struktúrák jelenlétét valószínűsíti. Az ezekhez tartozó periodicitás 6,8 nm, ami a kohleátokénál (5,15 nm) számottevően nagyobb. A kettősrétegek pakolása tehát jóval lazább ebben a rendszerben, mint a kohleátokban. Ez logikus következménye annak, hogy az EDTA nem csak a kohleátok felületéről, hanem a belsejükből is kivonja a Ca^{2+}-ionokat, aminek hatására a kohleátok szorosan pakolt tekercsszerkezete

megbomlik, és különböző számú, változatos mértékben korrelált kettősrétegű membránokból álló vezikulák jönnek létre, ahogy a 41. ábrán is látszik.

A SAXS mérések tanúsága szerint a citrátionok nem változtatták meg sem a kohleátok lamelláris rendezettségét, sem a membránrétegeik közti ismétlődési távolságot. Tehát, a kohleátok belső szerkezete nem szenved változást, ha a citrátionokat rövid ideig, és legfeljebb az optimális diszpergáló koncentrációban alkalmazzuk.

6.3.4. A citrátion diszpergáló hatásának molekuláris mechanizmusa

A citrátion diszpergáló hatásának molekuláris mechanizmusát felderítendő infravörös spektroszkópiás méréseket végeztünk. Az infravörös spektrumok munkánkban bemutatott három régiója a foszfát, metilén, illetve észter karbonilcsoportok nyújtási rezgéseit tükrözi (34. ábra), melyek a foszfátcsoport hidratáltságáról, a zsírsavlánc rendezettségéről, illetve a glicerin csoport hidratáltságáról nyújtanak információt. A foszfátcsoport rezgései nagymértékű változást szenvedtek, amikor a DOPS SUV-ok Ca^{2+} hatására kohleátokká alakulnak (34. A ábra, *b* spektrum). Az aszimmetrikus nyújtási sáv eltolódása és a szimmetrikus nyújtási sáv négy komponensre való felhasadása a foszfátcsoport dehidrációjára és foszfát-Ca^{2+} komplex képződésére utal [39]. A kohleátokban a metiléncsoportok nyújtási rezgéseinek a liposzómáknál tapsztalthoz képest kisebb hullámszámok felé való tolódása (34. B ábra, *b* spektrum) a zsírsavláncok szorosabb pakolására utal, ami logikus következménye a lipid fejcsoportok és Ca^{2+}-ionok közti szoros kölcsönhatásnak. Az észter karbonilcsoport rezgési sávjainak keskenyebbé válása is a mozgási szabadság jelentős csökkenésére utal, míg a kisebb hullámszámok felé való eltolódásuk (34. C ábra, *b* spektrum) új hidrogénkötések kialakulásának következménye lehet [41,42]. Citrátion hozzáadására kisebb koncentrációnál nem tapasztaltunk érzékelhető változást sem a foszfátcsoportok, sem a metiléncsoportok, sem az észter karbonilcsoport rezgéseiben (34. A és B ábrák, *c* spektrumai). A citrátion optimális diszpergáló koncentrációjánál viszont a Ca^{2+}-foszfát kölcsönhatásra jellemző nyújtási sávok relatív intenzitása csökkent (34. A ábra, *d* spektrum), ami arra utal, hogy a Ca^{2+}-foszfát komplexek egy része felhasadt. Ezzel párhuzamosan a zsírsavláncok rendezettsége csökkent, a glicerinváz hidratáltsága és mozgási szabadsága pedig nőtt, ahogy a metiléncsoportok

nyújtási rezgéseinek a nagyobb hullámszámok felé való eltolódásából (34. B ábra, *d* spektrum), illetve az észter karbonil-sávok rezgéseinek szélesedéséből és intenzitáscsökkenéséből (34. C ábra, *d* spektrum) következtethető. A beszáradt mintán az észter karbonilcsoport keskeny sávjai határozotabban jelentkeztek (35. ábra, *d* spektrum). Mivel a kisebb víztartalomnál mért spektrális jellemzők jóval specifikusabbak a közvetlen molekuláris kölcsönhatásokra, a keskeny sávok jelenléte alátámasztja, hogy a minta, ennél a citrátion koncentrációnál is, jelentős mértékben tartalmaz kalciumot kötött foszfolipid populációt. Amikor 50 mM EDTA-t adtunk a kohleátokhoz, a foszfátcsoport felhasadt sávjai teljesen eltűntek (34. A ábra, *e* spektrum), vagyis teljesen megszűnt a Ca^{2+}-ion és a foszfátcsoportok közti kölcsönhatás. A szimmetrikus metilén nyújtási rezgések hullámszám-növekedése (34. B ábra, *d* spektrum) a zsírsavlánc rendezettségének csökkenésére, a kiindulási liposzómákéhoz hasonló állapot elérésére utal. Erre utal az észter karbonilcsoport spektrumának DOPS liposzóma spektrumához hasonló megjelenése is.

Összefoglalva, az FTIR spektroszkópia eredményei arra utalnak, hogy az optimális diszpergáló koncentrációban alkalmazott citrátionok csak egy részét távolítják el a Ca^{2+}-ionoknak a kohleátokból. Ugyanakkor a SAXS mérések szerint a kohleátok belső szerkezete nem szenved változást ennek hatására. Ez a két kísérleti eredmény arra utal, hogy a Ca^{2+}-ionok elvonása elsősorban a részecskék felületi lipid fejcsoportjait érintheti, de a tekercsek belsejében kötött Ca^{2+}-ionok koncentrációja nem, vagy csak kis mértékben csökken. Természetesen nem zárható ki, hogy a kohleátoknak a citrátionokkal való összekeverésekor átmenetileg az egyensúlyinál nagyobb citrátion koncentráció lép fel lokálisan, ami néhány kohleát felbomlásához vezethet.

7. Következtetések

7.1. Kohleátok kialakulása

A kohleátok kialakulását leíró különféle modellek (lsd. 2.1.2 fejezet) 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 MLV→kohleát átalakulás igen gyors, egyirányú, véletlenszerűen lejátszódó folyamat. A részlegesen tekeredett szerkezetek elemzése rámutatott, hogy legtöbbször nem egyetlen, hanem több párhuzamos foszfolipid kettősréteg tekercselődése alakítja ki a kohleátszerkezetet. Az, hogy a minta kiszárításával 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.

7.2. Kohleátok szerkezeti és mechanikai tulajdonságai

Az atomierő-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 tekercsek 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 anomálisan 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 (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 rétegeken belüli szomszédos fejcsoportokat köti keresztbe, és az így kialakuló, nagyrészt dehidrált, töltésárnyékolt fejcsoport-rétegek v*an 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.

7.3. 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 PS–Ca^{2+} kötődést a disszociáció irányába tolja el. Ebből a szempontból a kohleátok PS–Ca^{2+} komplexei két részre oszthatók: *(1)* egy felületi, könnyen hozzáférhető és *(2)* egy belső, takarásban[1] lévő hányadra. A Ca^{2+} PS fejcsoportokról való disszociációját, és a membránrétegekből az oldatba vándorlásának

[1] Általánosító megfogalmazás. Azt, hogy a Ca^{2+}-ionok belső rétegekből való kiáramlását a sztérikus takarás, a rétegek közti vizes közeg hiánya, a membrán-kettősrétegek Ca^{2+}-ionokkal, illetve az alkalmazott diszpergálószerekkel szembeni kis permeabilitása, vagy esetleg más tényezők milyen mértékben befolyásolják, nem állt módomban megállapítani.

sebességét a kohleát és az oldat közti kémiai potenciálgrádiens nagysága határozza meg. A citrátion Ca^{2+} iránti asszociációs konstansa (pK_a=3,17) egy nagyságrendbe esik és valamivel kisebb a PS molekuláénál (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 könyebben 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 diszpergálószert puffercserével eltávolítanánk. Ha nem történik puffercsere, az optimális diszpergáló koncentrációban alkalmazott citrátion hosszabb idő alatt természetesen a tekercsek belsejéből is kivonja a Ca^{2+}-ionokat.

A jóval nagyobb Ca^{2+} iránti asszociációs konstanssal (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 potenciálgrádiensében. 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 (pK_a=1,8) és ecetsav (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.

7.4. 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 néhány napos hetes időtartam során membrántekercsekké. 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 – anomálisan 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.

8. Összefoglalás

A kohleátok negatív töltésű foszfolipidek Ca^{2+}-ionokkal stabilizált membrántekercsei amelyek geometriája a mielinhüvelyre emlékeztet. Egyes vizsgálatok szerint biokompatibilis mikro-nanoméretű gyógyszerhordozóként szolgálhatnak, azonban mindmáig keveset tudunk képződésük mechanizmusáról és mechanikai tulajdonságaikról. Fejlesztésüket, vizsgálatukat és alkalmazásukat erősen akadályozza, hogy hajlamosak az aggregációra. Doktori kutatómunkám célja a kohleátok *(1)* szerkezetének és képződésének vizsgálata, *(2)* mechanikai tulajdonságaik jellemzése, és *(3)* az aggregált kohleátok diszpergálására alkalmas módszer kifejlesztése volt. Egyedi kohleátok szerkezeti és nanomechanikai jellemzését végeztem el atomierő-mikroszkópos képalkotás és erőspektroszkópia segítségével. Megállapítottam, hogy a Ca^{2+}-ionok hozzáadására a kiindulási unilamelláris liposzómák először multilamelláris vezikulákat képeznek, és később ezek alakulnak át membrántekercsekké. A vezikulákat körülvevő vizes fázis eltávolításával a kohleátképződés leáll. Rögzítettem a kohleátok nanomechanikai ujjlenyomatát, aminek elemzése megmutatta, hogy a kohleátok, más biomolekuláris rendszerekkel összehasonlítva, anomálisan nagy merevséggel és mechanikai ellenállóképességgel bírnak. A száraz és vizes közegű részecskék mechanikai paramétereiben nem mutatkozott különbség, ami arra utal, hogy az eredetileg folyadékkristályos lipidrendszer dehidrált, kristályos struktúrává alakult a Ca^{2+}-ionok hozzáadására. A kohleátok szilárdnak mondható membránrétegei mechanikai értelemben függetlenek egymástól, ami valószínűsíti a rétegek közti Ca^{2+}-keresztkötés hiányát. Az egyedi kohleát-rétegek közötti mechanikai csatolás hiánya lehetőséget adhat a kohleátokok bizonyos fokú alakváltozására. Eljárást dolgoztam ki kohleát aggregátumok diszpergálására, melynek lényege, hogy a kohleátokat rövid ideig megfelelő koncentrációjú citrátionnal kezeljük, majd a kohleátok mellől puffercserével eltávolítjuk a Ca^{2+}- és citrát-ionokat. Ez az eljárás sem a részecskék alakját, sem a belső szerkezetét nem változtatja meg; a citrátion csak a kohleát felületén lévő, a foszfolipid fejcsoportokhoz kötött, Ca^{2+}-ionokat távolítja el. Ez az eljárás utat nyithat a kohleát hatóanyag-hordozók melléktermékektől való elválasztása, méreteloszlásuk szabályozása, felületi módosításuk, valamint sejtekkel való kölcsönhatásuk és biodisztribúciójuk vizsgálatához.

9. Summary

Cohleates are spirally curving membrane rolls formed from negatively charged phospholipid membranes stabilized by Ca^{2+} ions. Several studies have suggested that they may serve as potential biocompatible micro-nanoscale drug delivery vehicles. However, still little is known about the mechanism and driving forces of their formation and their mechanical properties. Furthermore, their propensity to aggregate severly hinders production development, physico-chemical analysis and pharmaceutical application. The aims of my doctoral studies were to *(1)* follow the formation of cochleates, *(2)* assess their mechanical properties, and *(3)* develop a method to disperse aggregated cochleates. I carried out topographical and structural-nanomechanical characterization of individual cochleate particles by atomic force microscopy imaging and force spectroscopy. It was observed that when Ca^{2+}-ions were added to unilamellar liposomes, multilamellar vesicles form first, then these aggregated vesicles transform into membrane rolls. Drying the vesicles stopped cochleate formation. I recorded the nanomechanical fingerprint of cochleates which revealed that cochleates exhibit extreme stiffness and mechanical resistance compared to other ordered, nanoscale biomolecular systems. Mechanical parameters of dry and hydrated cochleates are similar, indicating that the originally liquid crystalline lipid system transforms into a dehydrated, crystalline structure upon calcium addition. Solid-like membrane layers of cochleates are mechanically independent of each other, thus allowing for shape changes and slow dynamics. I developed a method to disperse aggregated cochleates, the essence of which is to add citrate ions at a proper concentration to cohleates, incubate for a short time, then remove Ca^{2+} and citrate ions from the aqeous phase by buffer exchange. Citrate ions applied transiently and in appropiate concentration do not modify either the shape or the internal structure of cochleates. Citrate removes Ca^{2+} ions from phospholipid headgroups of the surface of cochleates, but it does not affect the Ca^{2+}–lipid interaction stabilizing the inner membrane layers of cochleates. This method may facilitate the development of cochleate drug delivery systems by enabling several technological and analytical advancements (e.g., separation of cochleates from byproducts, controlling size-distribution, surface modification, studying cell-interaction, and biodistribution) that were hitherto hindered by aggregation.

10. Irodalomjegyzék

1. Verkleij AJ, De Kruyff B, Ververgaert PHJT, Tocanne JF, Van Deenen LLM, (1974), *The influence of pH, Ca^{2+} and protein on the thermotropic behaviour of the negatively charged phospholipid, phosphatidylglycerol*, Biochim Biophys Acta, Biomembranes, 339: 432-437.
2. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Jacobson K, Poste G, (1975), *Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles*, Biochim Biophys Acta, 394: 483-491.
3. Nagarsekar K, Ashtikar M, Thamm J, Steiniger F, Schacher F, Fahr A, May S, (2014), *Electron microscopy and theoretical modeling of cochleates*, Langmuir, 30: 13143-13151.
4. Papahadjopoulos D, Miller N, (1967), *Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals*, Biochim Biophys Acta, 135: 624-638.
5. Wachtel E, Bach D, Miller IR, (2013), *Room temperature ordering of dipalmitoyl phosphatidylserine bilayers induced by short chain alcohols*, Chem Phys Lipids, 175-176: 20-26.
6. Zarif L, (2002), *Elongated supramolecular assemblies in drug delivery*, J Control Release, 81: 7-23.
7. Hollander A, Danino D, (2015), *Cochleate characterization by cryogenic electron microscopy methods: Cryo-TEM and Cryo-SEM*, Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 483: 187-192.
8. Pham TTH, Gueutin C, Cheron M, Abreu S, Chaminade P, Loiseau PM, Barratt G, (2014), *Development of antileishmanial lipid nanocomplexes*, Biochimie, 107, Part A: 143-153.
9. Nagarsekar K, Ashtikar M, Steiniger F, Thamm J, Schacher F, Fahr A, (2016), *Understanding cochleate formation: insights into structural development*, Soft Matter.
10. Garidel P, Richter W, Rapp G, Blume A, (2001), *Structural and morphological investigations of the formation of quasi-crystalline phases of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG)*, Phys Chem Chem Phys, 3: 1504-1513.
11. Archibald DD, Mann S, (1993), *Structural studies of lipid fibers formed by sphingosine*, Biochim Biophys Acta, 1166: 154-162.
12. Garidel P, Forster G, Richter W, Kunst BH, Rapp G, Blume A, (2000), *1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) divalent cation complexes: an X-ray scattering and freeze-fracture electron microscopy study*, Phys Chem Chem Phys, 2: 4537-4544.
13. Garidel P, Blume A, (2000), *Calcium induced nonideal mixing in liquid-crystalline phosphatidylcholine−phosphatidic acid bilayer membranes*, Langmuir, 16: 1662-1667.
14. Ramani K, Balasubramanian SV, (2003), *Fluorescence properties of Laurdan in cochleate phases*, Biochim Biophys Acta, 1618: 67-78.
15. Duzgunes N, Nir S, Wilschut J, Bentz J, Newton C, Portis A, Papahadjopoulos D, (1981), *Calcium- and magnesium-induced fusion of mixed phosphatidylserine/phosphatidylcholine vesicles: effect of ion binding*, J Membr Biol, 59: 115-125.

16. Flach CR, Mendelsohn R, (1993), *A new infrared spectroscopoic marker for cochleate phases in phosphatidylserine-containing model membranes*, Biophys J, 64: 1113-1121.
17. Loomba L, Scarabelli T, (2013), *Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates*, Ther Deliv, 4: 1179-1196.
18. Marone PA, Elsmore SK, Sandulow J, Mannino RJ, (2005), *Structural determinants of divalent cation-induced phosphatidylserine cochleate crystallization*, Microsc Microanal, 11: 1244-1245.
19. Tocanne JF, Ververgaert PHJT, Verkleij AJ, van Deenen LLM, (1974), *A monolayer and freeze-etching study of charged phospholipids I. Effects of ions and pH on the ionic properties of phosphatidylglycerol and lysylphosphatidylglycerol*, Chem Phys Lipids, 12: 201-219.
20. Ververgaert JT, De Kruyff B, Verkleij AJ, Tocanne JF, Van Deenen LLM, (1975), *Calorimetric and freeze-etch study of the influence of Mg^{2+} on the thermotropic behaviour of phosphatidylglycerol*, Chem Phys Lipids, 14: 97-101.
21. Michiko K, Takahiro M, Tooru Y, (1993), *Crystalline cylindrical structures of Na^{+}-bound dimyristoylphosphatidylglycerol as revealed by microcalorimetry and electron microscopy*, Biochim Biophys Acta, Lipids and Lipid Metabolism, 1168: 243-248.
22. Nagarsekar K, Ashtikar M, Steiniger F, Thamm J, Schacher FH, Fahr A, (2016), *Micro-spherical cochleate composites: method development for monodispersed cochleate system*, J Liposome Res: 1-9.
23. Leventis PA, Grinstein S, (2010), *The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes*, Annu Rev Biophys, 39: 407-427.
24. Portis A, Newton C, Pangborn W, Papahadjopoulos D, (1979), *Studies on the mechanism of membrane fusion: evidence for an intermembrane Ca^{2+} ion-phospholipid complex, synergism with Mg^{2+} ion, and inhibition by spectrin*, Biochemistry, 18: 780-790.
25. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Newton C, Nir S, Jacobson K, Poste G, Lazo R, (1977), *Studies on membrane fusion. III. The role of calcium-induced phase changes*, Biochim Biophys Acta, Biomembranes, 465: 579-598.
26. Bangham AD, Papahadjopoulos D, (1966), *Biophysical properties of phospholipids. I. Interaction of phosphatidylserine monolayers with metal ions*, Biochim Biophys Acta, Biophysics including Photosynthesis, 126: 181-184.
27. Feigenson GW, (1986), *On the nature of calcium ion binding between phosphatidylserine lamellae*, Biochemistry, 25: 5819-5825.
28. Altenbach C, Seelig J, (1984), *Ca^{2+} binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance. Evidence for the formation of a Ca^{2+} complex with two phospholipid molecules*, Biochemistry, 23: 3913-3920.
29. Mattai J, Hauser H, Demel RA, Shipley GG, (1989), *Interactions of metal ions with phosphatidylserine bilayer membranes: effect of hydrocarbon chain unsaturation*, Biochemistry, 28: 2322-2330.
30. Roux M, Bloom M, (1991), *Calcium binding by phosphatidylserine headgroups. Deuterium NMR study*, Biophys J, 60: 38-44.
31. Martín-Molina A, Rodríguez-Beas C, Faraudo J, (2012), *Effect of calcium and magnesium on phosphatidylserine membranes: experiments and all-atomic simulations*, Biophys J, 102: 2095-2103.

32. Vernier PT, Ziegler MJ, Dimova R, (2009), *Calcium binding and head group dipole angle in phosphatidylserine-phosphatidylcholine bilayers*, Langmuir, 25: 1020-1027.
33. Hauser H, Darke A, Phillips MC, (1976), *Ion-binding to phospholipids*, Eur J Biochem, 62: 335-344.
34. McLaughlin S, Mulrine N, Gresalfi T, Vaio G, McLaughlin A, (1981), *Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine*, J Gen Physiol, 77: 445-473.
35. Nir S, Newton C, Papahadjopoulos D, (1978), *Binding of cations to phosphatidylserine vesicles*, Bioelectrochem Bioenerg, 5: 116-133.
36. Binder H, Zschörnig O, (2002), *The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes*, Chem Phys Lipids, 115: 39-61.
37. Sinn CG, Antonietti M, Dimova R, (2006), *Binding of calcium to phosphatidylcholine-phosphatidylserine membranes*, Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 282-283: 410-419.
38. Newton C, Pangborn W, Nir S, Papahadjopoulos D, (1978), *Specificity of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding to phosphatidylserine vesicles and resultant phase changes of bilayer membrane structure*, Biochim Biophys Acta, Biomembranes, 506: 281-287.
39. Dluhy R, Cameron DG, Mantsch HH, Mendelsohn R, (1983), *Fourier transform infrared spectroscopic studies of the effect of calcium ions on phosphatidylserine*, Biochemistry, 22: 6318-6325.
40. Casal HL, Mantsch HH, Hauser H, (1987), *Infrared studies of fully hydrated saturated phosphatidylserine bilayers. Effect of Li^{+} and Ca^{2+}*, Biochemistry, 26: 4408-4416.
41. Casal HL, Mantsch HH, Paltauf F, Hauser H, (1987), *Infrared and ^{31}P-NMR studies of the effect of Li^{+} and Ca^{2+} on phosphatidylserines*, Biochim Biophys Acta, 919: 275-286.
42. Casal HL, Martin A, Mantsch HH, Paltauf F, Hauser H, (1987), *Infrared studies of fully hydrated unsaturated phosphatidylserine bilayers. Effect of Li^{+} and Ca^{2+}*, Biochemistry, 26: 7395-7401.
43. López-García F, Micol V, Villalaín J, Gómez-Fernández JC, (1993), *Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with phosphatidylserine in the presence of calcium*, Biochim Biophys Acta, Lipids and Lipid Metabolism, 1169: 264-272.
44. Hauser H, Finer EG, Darke A, (1977), *Crystalline anhydrous Ca-phosphatidylserine bilayers*, Biochem Biophys Res Commun, 76: 267-274.
45. Hauser H, (1991), *Effect of inorganic cations on phase transitions*, Chem Phys Lipids, 57: 309-325.
46. Jeremic A, Kelly M, Cho JA, Cho S-J, Horber JKH, Jena BP, (2004), *Calcium drives fusion of SNARE-apposed bilayers*, Cell Biol Int, 28: 19-31.
47. Roux M, Bloom M, (1990), *Ca^{2+}, Mg^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, and K^{+} distributions in the headgroup region of binary membranes of phosphatidylcholine and phosphatidylserine as seen by deuterium NMR*, Biochemistry, 29: 7077-7089.
48. Pedersen UR, Leidy C, Westh P, Peters GH, (2006), *The effect of calcium on the properties of charged phospholipid bilayers*, Biochim Biophys Acta, Biomembranes, 1758: 573-582.

49. Zarif L, (2005), *Drug delivery by lipid cochleates*, Methods Enzymol, 391: 314-329.
50. Gould-Fogerite S, Mannino RJ, (1985), *Rotary dialysis: Its application to the preparation of large liposomes and large proteoliposomes (protein-lipid vesicles) with high encapsulation efficiency and efficient reconstitution of membrane proteins*, Anal Biochem, 148: 15-25.
51. Gould-Fogerite S, Kheiri M, Zhang F, Mannino RJ, (2000), *Cochleate delivery vehicles: Applications in vaccine delivery*, J Liposome Res, 10: 339-358.
52. Jin T, Mannino R, Zarif L, (2000), *Nanocochleate formulations, process of preparation and method of delivery of pharmaceutical agents*, Szabadalmi szám: US 6153217 A.
53. Wang N, Wang T, Zhang M, Chen R, Deng Y, (2014), *Using procedure of emulsification–lyophilization to form lipid A-incorporating cochleates as an effective oral mucosal vaccine adjuvant-delivery system (VADS)*, Int J Pharm, 468: 39-49.
54. Zarif L, Mannino RJ, *Cochleates*, In: Habib NA (szerk.), Cancer Gene Therapy: Past Achievements and Future Challenges, Springer, Boston, MA, 2002: 83-93.
55. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G, (1990), *Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action*, Antimicrob Agents Chemother, 34: 183-188.
56. Sawaya BP, Briggs JP, Schnermann J, (1995), *Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties*, J Am Soc Nephrol, 6: 154-164.
57. Pham TTH, Barratt G, Michel JP, Loiseau PM, Saint-Pierre-Chazalet M, (2013), *Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B–miltefosine-loaded nanocochleates*, Colloids Surf B Biointerfaces, 106: 224-233.
58. Zarif L, Graybill JR, Perlin D, Najvar L, Bocanegra R, Mannino RJ, (2000), *Antifungal activity of amphotericin B cochleates against Candida albicans infection in a mouse model*, Antimicrob Agents Chemother, 44: 1463-1469.
59. Santangelo R, Paderu P, Delmas G, Chen ZW, Mannino R, Zarif L, Perlin DS, (2000), *Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis*, Antimicrob Agents Chemother, 44: 2356-2360.
60. Delmas G, Park S, Chen ZW, Tan F, Kashiwazaki R, Zarif L, Perlin DS, (2002), *Efficacy of orally delivered cochleates containing amphotericin B in a murine model of aspergillosis*, Antimicrob Agents Chemother, 46: 2704-2707.
61. Miclea RD, Varma PR, Peng A, Balu-Iyer SV, (2007), *Development and characterization of lipidic cochleate containing recombinant factor VIII*, Biochim Biophys Acta, 1768: 2890-2898.
62. Kosloski MP, Peng A, Varma PR, Fathallah AM, Miclea RD, Mager DE, Balu-iyer SV, (2011), *Immunogenicity and pharmacokinetic studies of recombinant factor VIII containing lipid cochleates*, Drug Deliv, 18: 246-254.
63. Ağardan NBM, Değim Z, Yılmaz Ş, Altıntaş L, Topal T, (2016), *The effectiveness of raloxifene-loaded liposomes and cochleates in breast cancer therapy*, AAPS PharmSciTech, 17: 968-977.

64. Campo S, Arseni B, Rossi S, D'Alessio V, Lu R, Ngoje J, Ahl PL, Bonitz S, Mannino R, Di Mitri D, Battistini L, Carminati P, De Santis R, Ruggiero V, (2008), *Efficacy of a nanocochleate-encapsulated 3,5-diaryl-s-triazole derivative in a murine model of graft-versus-host disease*, Transplantation, 86: 171-175.
65. Liu M, Zhong X, Yang Z, (2017), *Chitosan functionalized nanocochleates for enhanced oral absorption of cyclosporine A*, Sci Rep, 7: 41322.
66. Syed UM, Woo AF, Plakogiannis F, Jin T, Zhu H, (2008), *Cochleates bridged by drug molecules*, Int J Pharm, 363: 118-125.
67. Jin T, (2004), *Cochleates without metal cations as the bridging agents*, Szabadalmi szám: US 2004/0092727 A1.
68. Livne L, Epand RF, Papahadjopoulos-Sternberg B, Epand RM, Mor A, (2010), *OAK-based cochleates as a novel approach to overcome multidrug resistance in bacteria*, FASEB J, 24: 5092-5101.
69. Sarig H, Ohana D, Epand RF, Mor A, Epand RM, (2011), *Functional studies of cochleate assemblies of an oligo-acyl-lysyl with lipid mixtures for combating bacterial multidrug resistance*, FASEB J, 25: 3336-3343.
70. Epand RF, Sarig H, Ohana D, Papahadjopoulos-Sternberg B, Mor A, Epand RM, (2011), *Physical properties affecting cochleate formation and morphology using antimicrobial oligo-acyl-lysyl peptide mimetics and mixtures mimicking the composition of bacterial membranes in the absence of divalent cations*, The Journal of Physical Chemistry B, 115: 2287-2293.
71. Segarra I, Movshin DA, Zarif L, (2002), *Pharmacokinetics and tissue distribution after intravenous administration of a single dose of amphotericin B cochleates, a new lipid-based delivery system*, J Pharm Sci, 91: 1827-1837.
72. Gibson B, Duffy AM, Gould Fogerite S, Krause-Elsmore S, Lu R, Shang G, Chen ZW, Mannino RJ, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH, (2004), *A novel gene delivery system for mammalian cells*, Anticancer Res, 24: 483-488.
73. Gould-Fogerite S, Kheiri MT, Zhang F, Wang Z, Scolpino AJ, Feketeova E, Canki M, Mannino RJ, (1998), *Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines*, Adv Drug Delivery Rev, 32: 273-287.
74. Gould-Fogerite S, Mannino RJ, (1996), *Mucosal and systemic immunization using cochleate and liposome vaccines*, J Liposome Res, 6: 357-379.
75. Perez O, Romeu B, Cabrera O, Gonzalez E, Batista-Duharte A, Labrada A, Perez R, Reyes LM, Ramirez W, Sifontes S, Fernandez N, Lastre M, (2013), *Adjuvants are key factors for the development of future vaccines: lessons from the finlay adjuvant platform*, Front Immunol, 4: 407.
76. Perez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, Zayas C, Acevedo R, Gonzalez D, Lopez JA, Taboada C, Turtle C, Solis RL, (2004), *Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern*, Immunol Cell Biol, 82: 603-610.
77. Campo JD, Zayas C, Romeu B, Acevedo R, Gonzalez E, Bracho G, Cuello M, Cabrera O, Balboa J, Lastre M, (2009), *Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from Neisseria meningitidis serogroup B induce mucosal and systemic responses*, Methods, 49: 301-308.

78. Batista-Duharte A, Lastre M, Romeu B, Portuondo DL, Tellez-Martinez D, Manente FA, Perez O, Carlos IZ, (2016), *Antifungal and immunomodulatory activity of a novel cochleate for amphotericin B delivery against Sporothrix schenckii*, Int Immunopharmacol, 40: 277-287.
79. Bozó T, Pál S, Dévay A, (2008), *Liposzómák fejlesztésének és gyógyszerterápiás alkalmazásának újabb lehetőségei*, Acta Pharm Hung, 78: 103-109.
80. *Concept paper on the developtment of a Comitee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) note for guidance on requirements for the evaluation of new adjuvants in vaccines*, Gyógyszerügynökség E (2002), London, CPMP/BWP/6622/02.
81. *Matinas BioPharma Establishes LipidBased, Anti-Infective Platform, With Acquisition of Aquarius BioTechnologies Inc.*, (Sajtóközlemény, 2015. január 30.), Matinas BioPharma Holdings, Inc., Bedminster, NJ.
82. Zarif L, Graybill JR, Perlin D, Mannino RJ, (2000), *Cochleates: new lipid-based drug delivery system*, J Liposome Res, 10: 523-538.
83. Day EP, Ho JT, Kunze RK, Sun ST, (1977), *Dynamic light scattering study of calcium-induced fusion in phospholipid vesicles*, Biochim Biophys Acta, Biomembranes, 470: 503-508.
84. Walker SA, Kennedy MT, Zasadzinski JA, (1997), *Encapsulation of bilayer vesicles by self-assembly*, Nature, 387: 61-64.
85. Acevedo R, Perez O, Zayas C, Perez JL, Callico A, Cedre B, Garcia L, McKee D, Mullen AB, Ferro VA, (2012), *Cochleates derived from Vibrio cholerae O1 proteoliposomes: the impact of structure transformation on mucosal immunisation*, PLoS One, 7: e46461.
86. Acevedo R, Callico A, del Campo J, Gonzalez E, Cedre B, Gonzalez L, Romeu B, Zayas C, Lastre M, Fernandez S, Oliva R, Garcia L, Perez JL, Perez O, (2009), *Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from Vibrio cholerae O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice*, Methods, 49: 309-315.
87. Dévay A, *Steril gyógyszerkészítmények*, In: Dévay A (szerk.), A gyógyszertechnológia alapjai, PTE Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet, Pécs, 2013: oldalszám nélkül, e-könyv: www.tankonyvtar.hu
88. Zarif L, Jin T, Segarra I, Mannino R, (2003), *Novel hydrogel-isolated cochleate formulations, process of preparation and their use for the delivery of biologically relevant molecules*, Szabadalmi szám: US 2003/0228355 A1.
89. Bhattacharjee S, (2016), *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?*, J Control Release, 235: 337-351.
90. Nichols G, Byard S, Bloxham MJ, Botterill J, Dawson NJ, Dennis A, Diart V, North NC, Sherwood JD, (2002), *A Review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization*, J Pharm Sci, 91: 2103-2109.
91. Mannino RJ, Gould-Fogerite S, Krause-Elsmore SL, Delmarre D, Lu R, (2004), *Novel encochleation methods, cochleates and methods of use*, Szabadalmi szám: US20140242153 A1.
92. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E, (1982), *Surface studies by scanning tunneling microscopy*, Phys Rev Lett, 49: 57-61.
93. *The 1986 Nobel Prize in Physics*, (Sajtóközlemény, 15.10.1986.), The Royal Swedish Academy of Sciences.

94. Binnig G, Quate CF, Gerber C, (1986), *Atomic Force Microscope*, Phys Rev Lett, 56: 930-933.
95. Osteikoetxea-Molnar A, Szabo-Meleg E, Toth EA, Oszvald A, Izsepi E, Kremlitzka M, Biri B, Nyitray L, Bozo T, Nemeth P, Kellermayer M, Nyitrai M, Matko J, (2016), *The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes*, Cell Mol Life Sci, 73: 4531-4545.
96. MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BP, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR, (1991), *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*, Biochim Biophys Acta, 1061: 297-303.
97. Hutter JL, Bechhoefer J, (1993), *Calibration of atomic-force microscope tips*, Review of Scientific Instruments, 64: 1868-1873.
98. Anonymus, *Zeta potential theory*, In: Anonymus (szerk.), Zetasizer Nano user manual, Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, United Kingdom, 2009: 161-172.
99. Iraolagoitia XLR, Martini MF, (2010), *Ca^{2+} adsorption to lipid membranes and the effect of cholesterol in their composition*, Colloids Surf B Biointerfaces, 76: 215-220.
100. Wacha A, Varga Z, Bota A, (2014), *CREDO: a new general-purpose laboratory instrument for small-angle X-ray scattering*, J Appl Crystallogr, 47: 1749-1754.
101. Wacha A, (2015), *Optimized pinhole geometry for small-angle scattering*, J Appl Crystallogr, 48: 1843-1848.
102. Almquist BD, Melosh NA, (2010), *Fusion of biomimetic stealth probes into lipid bilayer cores*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 5815-5820.
103. Szakáll S, *Rugalmasság és az ásványok képlékeny deformációja*, In: Szakáll S (szerk.), Ásvány- és kőzettan alapjai, Miskolci Egyetem Földtudományi Kar, 2011: oldalszám nélkül, e-könyv: www.tankonyvtar.hu
104. Garcia-Saez AJ, Chiantia S, Schwille P, (2007), *Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes*, J Biol Chem, 282: 33537-33544.
105. Nir S, Bentz J, Wilschut J, Duzgunes N, (1983), *Aggregation and fusion of phospholipid vesicles*, Prog Surf Sci, 13: 1-124.
106. Joseph NR, (1946), *The dissociation constants of organic calcium complexes*, J Biol Chem, 164: 529-541.
107. Goldberg RN, Kishore N, Lennen RM, (2002), *Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers*, J Phys Chem Ref Data, 31: 231-370.
108. Cannan RK, Kibrick A, (1938), *Complex formation between carboxylic acids and divalent metal cations*, J Am Chem Soc, 60: 2314-2320.
109. Arena G, Musumeci S, Purrello R, Sammartano S, (1983), *Calcium- and magnesium-EDTA complexes. Stability constants and their dependence on temperature and ionic strength*, Thermochim Acta, 61: 129-138.
110. Robert M. Smith AEM, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1989: 287.
111. Lewis RN, McElhaney RN, Pohle W, Mantsch HH, (1994), *Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation*, Biophys J, 67: 2367-2375.

112. Quarles RH, Macklin WB, Morell P, *Myelin formation, structure and biochemistry*, In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW (szerk.), Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2006: 51-71.
113. Zuchero JB, Fu M-m, Sloan Steven A, Ibrahim A, Olson A, Zaremba A, Dugas Jason C, Wienbar S, Caprariello Andrew V, Kantor C, Leonoudakis D, Lariosa-Willingham K, Kronenberg G, Gertz K, Soderling Scott H, Miller Robert H, Barres Ben A, (2015), *CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly*, Dev Cell, 34: 152-167.
114. Attwood JS, Choi Y, Leonenko Z, (2013), *Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy*, Int J Mol Sci, 14.
115. Richter RP, Brisson AR, (2005), *Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry*, Biophys J, 88: 3422-3433.
116. Roos WH, Gertsman I, May ER, Brooks CL, Johnson JE, Wuite GJL, (2012), *Mechanics of bacteriophage maturation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 109: 2342-2347.
117. Snijder J, Reddy VS, May ER, Roos WH, Nemerow GR, Wuite GJ, (2013), *Integrin and defensin modulate the mechanical properties of adenovirus*, J Virol, 87: 2756-2766.
118. Michel JP, Ivanovska IL, Gibbons MM, Klug WS, Knobler CM, Wuite GJ, Schmidt CF, (2006), *Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength*, Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 6184-6189.
119. Ivanovska I, Wuite G, Jonsson B, Evilevitch A, (2007), *Internal DNA pressure modifies stability of WT phage*, Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 9603-9608.
120. Roos WH, Radtke K, Kniesmeijer E, Geertsema H, Sodeik B, Wuite GJ, (2009), *Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids*, Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 9673-9678.
121. Li S, Eghiaian F, Sieben C, Herrmann A, Schaap IA, (2011), *Bending and puncturing the influenza lipid envelope*, Biophys J, 100: 637-645.
122. Delorme N, Fery A, (2006), *Direct method to study membrane rigidity of small vesicles based on atomic force microscope force spectroscopy*, Phys Rev E, 74: 030901.
123. Künneke S, Krüger D, Janshoff A, (2004), *Scrutiny of the failure of lipid membranes as a function of headgroups, chain length, and lamellarity measured by scanning force microscopy*, Biophys J, 86: 1545-1553.
124. Alessandrini A, Facci P, (2012), *Nanoscale mechanical properties of lipid bilayers and their relevance in biomembrane organization and function*, Micron, 43: 1212-1223.
125. Garcia-Manyes S, Redondo-Morata L, Oncins G, Sanz F, (2010), *Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails?*, J Am Chem Soc, 132: 12874-12886.
126. de Pablo PJ, Schaap IA, MacKintosh FC, Schmidt CF, (2003), *Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale*, Phys Rev Lett, 91: 098101.

127. Schaap IAT, Carrasco C, de Pablo PJ, MacKintosh FC, Schmidt CF, (2006), *Elastic response, buckling, and instability of microtubules under radial indentation*, Biophys J, 91: 1521-1531.
128. Grandbois M, Beyer M, Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE, (1999), *How strong is a covalent bond?*, Science, 283: 1727-1730.
129. Goertz MP, Stottrup BL, Houston JE, Zhu XY, (2009), *Nanomechanical Contrasts of Gel and Fluid Phase Supported Lipid Bilayers*, The Journal of Physical Chemistry B, 113: 9335-9339.
130. Garcia-Saez AJ, Chiantia S, Salgado J, Schwille P, (2007), *Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM*, Biophys J, 93: 103-112.
131. Puech PH, Borghi N, Karatekin E, Brochard-Wyart F, (2003), *Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge*, Phys Rev Lett, 90: 128304.
132. Gould-Fogerite S, Mannino RJ, (1999), *Cochleate delivery vehicles*, Szabadalmi szám: US5994318 A.
133. Lohner K, Sevcsik E, Pabst G, *Liposome-Based Biomembrane Mimetic Systems: Implications for Lipid–Peptide Interactions*, In: Iglic A, Rappolt M, Kulkarni C (szerk.), Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Academic Press, Cambridge MA, 2008: 103-137.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. 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

11.2. 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, Szente, 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.

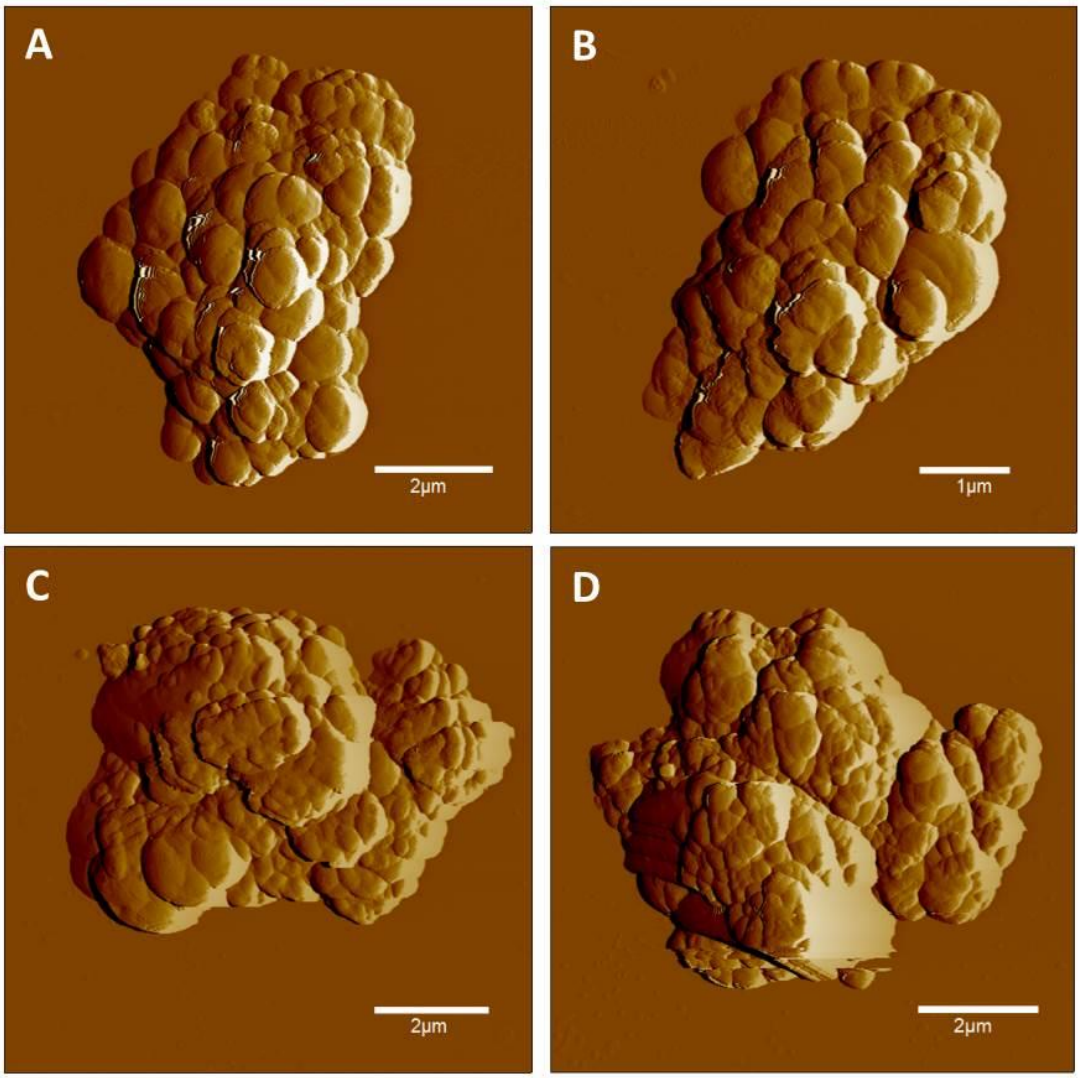
Bozó, T, Pál, S, Dévay, A. (2008) *Liposzómák fejlesztésének és gyógyszerterápiás alkalmazásának újabb lehetőségei*. Acta Pharm Hung 78:103-109.

12. Köszönetnyilvánítás

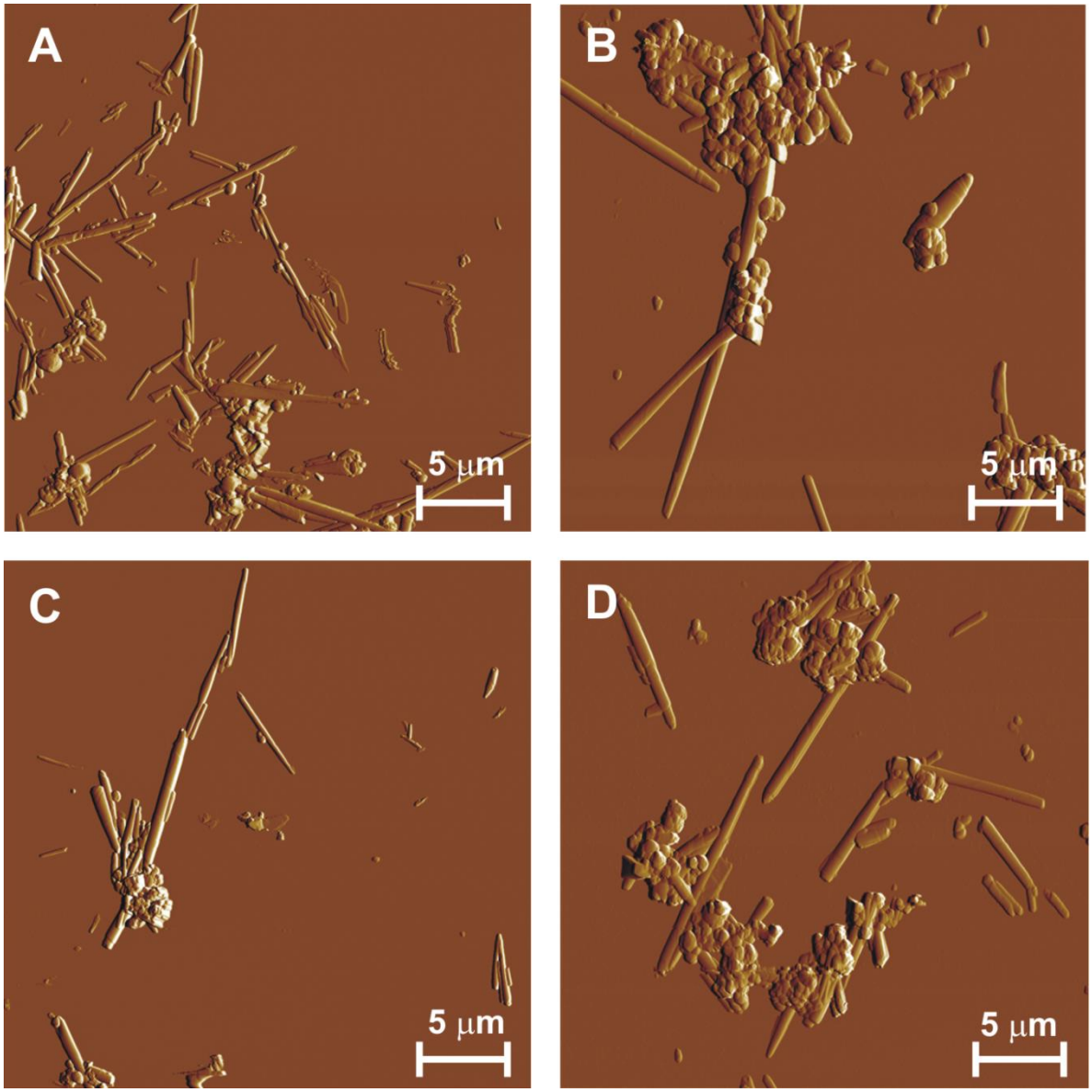
Munkám során mindvégig számíthattam témavezetőm, *dr. Kellermayer Miklós* bátorítására és támogatására. Pozitív hozzáállása, lelkesedése, tudományos kíváncsisága, igazság-keresése, őszintesége és barátságossága példaképpé emelte őt számomra. *Dr. Gróf Pál* lehetővé tette, hogy laboratóriumában éljek és dolgozzak. Mindig a lehető lenagyobb segítőkészséget és türelmet tanúsította irányomban, számos módszert és alapvetést tőle tanultam. A disszertáció elkészítését is hasznos tanácsokkal és észrevételekkel segítette. Sok jó tudományos és baráti beszélgetésünk volt. *Dr. Mike-Kaszás Nóra Valéria* és *Matusné Stein Éva* kedvességükkel, segítőkészségükkel bearanyozták a laboratóriumban, illetve az Intézetben töltött időt. A zéta potenciál méréseket a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetében, *dr. Antal István* támogatásával és *dr. Fülöp Viktor* asszisztenciájával végeztem. Több TDK és ösztöndíjas hallgatóm (*Brecska Richárd, Surján Gergely, Nabil Shaikh, Cassandra Crifase, Szebeni Miklós, Fredrik Sjøholt Morsund* és *Nagy Petra*) dolgozott, illetve dolgozik az irányításom alatt kohleát rendszerekkel. Ők arra késztettek, hogy készüljek, fogalmazzak meg célokat, és készítsek terveket. Sok jó kérdést tettek fel nekem. Szerzőtársaim, akik nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg *dr. Bóta Attila, dr. Brecska Richárd, dr. Gróf Pál, dr. Kellermayer Miklós, dr. Mihály Judith*, és *dr. Wacha András* voltak. *Dr. Derényi Imrével* hasznos beszélgetéseket folytattunk a kohleátok mechanikájáról. A Biofizikai és Sugárbiológia Intézet valamennyi munkatársa segítségemre volt, és jó hangulatú munkaközösséget biztosított. Feleségem, *Bozó-Bauer Andrea Rita*, családom és barátaim feltétel nélkül szerettek, támogattak és imáikban hordoztak akkor is, amikor a munkám szárnyalt és akkor is, amikor csak cammogott. Mindezekért több mint hálás vagyok valamennyiüknek! És mindenek felett teremtő és megtartó Istenemnek.

„Ami ugyanis nem látható Belőle: az Ő örök hatalma és istensége, az a világ teremtésétől fogva alkotásainak értelmes vizsgálata révén meglátható. Ennél fogva nincs mentségük.” *Rómaiakhoz írt levél 1,20*

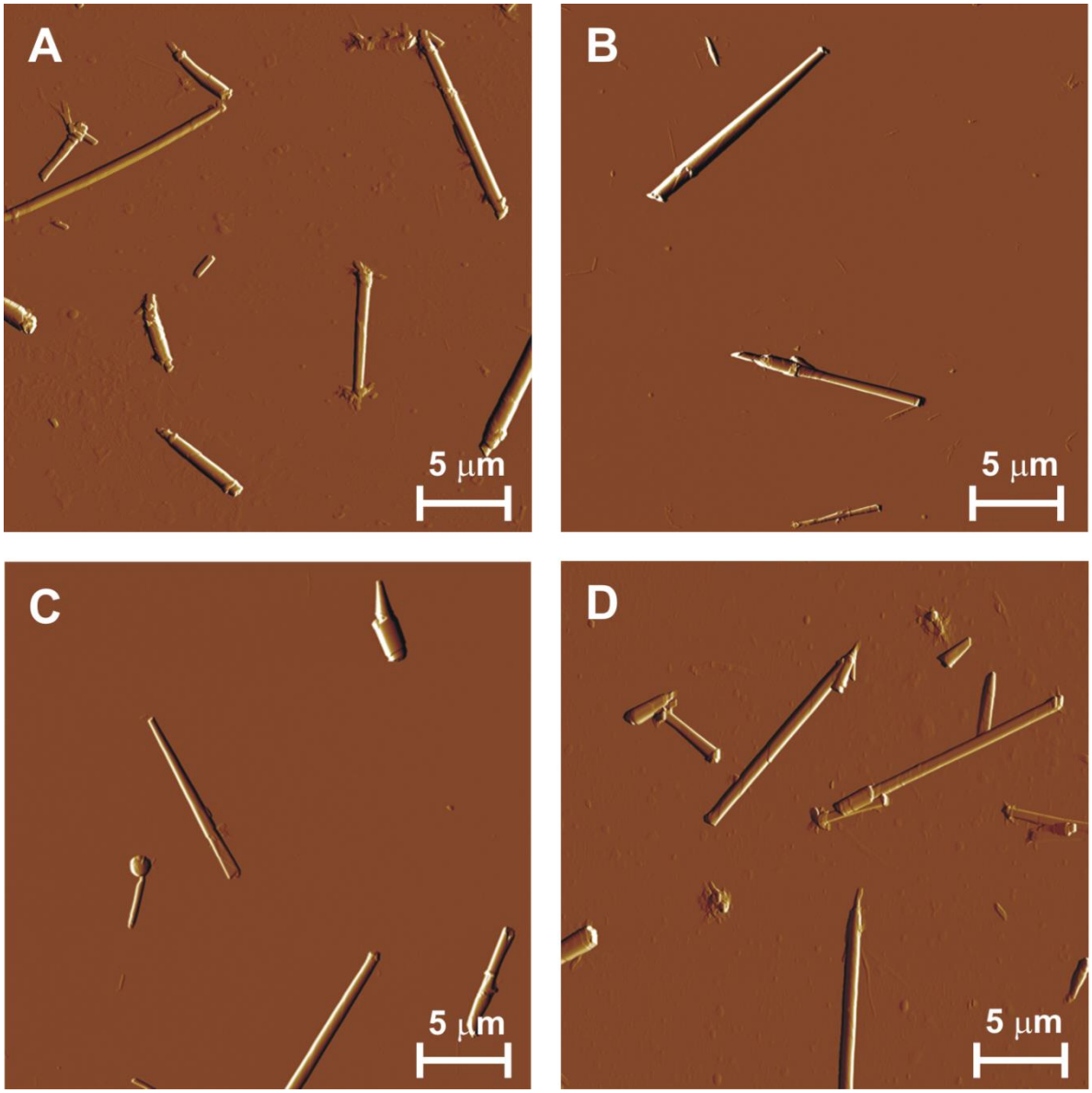
13. Melléklet



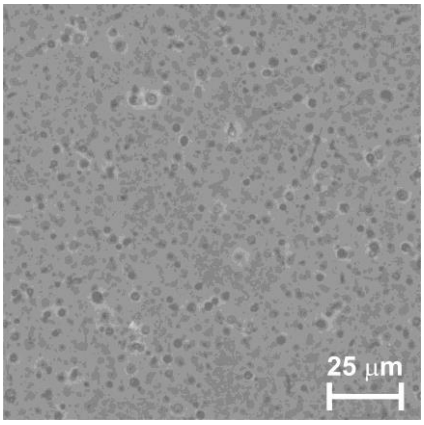
38. ábra *Gyors elegyítéssel készült kohleát minták AFM amplitúdó-kontraszt képe. A mintákat közvetlenül a gyártás után cseppentettük a csillámfelületre, majd ultraszűrt tisztított vízzel mostuk, és N_2 gáz lassú áramával megszárítottuk. A képek a mintaelőkészítés után két héttel készültek.*



39. ábra *Dialízissel előállított kohleátok AFM amplitudó-kontraszt képei.*



40. ábra *Citrátionnal diszpergált kohleátok AFM amplitudó-kontraszt képei.*



41. ábra *50 mM EDTA hatása az aggregált kohleátokra (fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel). A DOPS és* Ca^{2+} *névleges koncentrációja 3,1 mM volt.*