Kölcsönhatások liposzomális rendszerekben a nano-méretektől a sejtméretekig

Doktori értekezés

Mike-Kaszás Nóra

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Gróf Pál egyetemi docens, C.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Zelkó Romána egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Farkas Kornélia egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Monos Emil professzor emeritus, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csempesz Ferenc egyetemi docens, C.Sc.
Dr. Mészáros Tamás egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3

2. BEVEZETÉS 4

2.1. Sejtmembránok 4

2.2. Modellmembránok, liposzómák 6

2.3. A vizsgált hatóanyagok jelentősége 14

2.4. Az alkalmazott mérési módszerek összefoglalása 17

3. CÉLKITŰZÉSEK 26

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 27

4.1. Anyagok 27

4.2. Törzsoldatok 27

4.3. Módszerek 29

5. EREDMÉNYEK 40

5.1. Az óriás (unilamelláris) vezikulák előállításának optimális körülményei 40

5.2. Hatóanyagok liposzómába zárása, kötődése 45

5.3. Zéta-potenciál mérések 48

5.4. Hatóanyagok — liposzómák kölcsönhatásainak molekuláris szintű vizsgálata 51

5.5. A liposzóma típusának hatása a hatóanyag-felszabadulásra 54

5.6. Hatóanyagok fényérzékenységének jellemzése 58

6. MEGBESZÉLÉS 69

6.1. Az óriás vezikulák alkalmazhatósága a biofizikai/gyógyszerészeti vizsgálatokban 69

6.2. Hatóanyagok kompatibilitása liposzómák felületi töltésével 70

6.3. Hatóanyagok kötődésének jellemzése 70

6.4. A bezárt térfogatok összehasonlítása a GUV-ok és MLV-k esetén 73

6.5. A zéta-potenciál hatása az óriás liposzómák mikroszkópos képére 74

6.6. Hatóanyagok kötődése — membránfluiditás 75

6.7. Az LMFX fotobomlása liposzomális CD rendszerekben 76

7. KÖVETKEZTETÉSEK 78

8. ÖSSZEFOGLALÁS 81

9. SUMMARY 82

10. IRODALOMJEGYZÉK 83

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 95
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 97

1. Rövidítések jegyzéke

BLX	β-ciklodextrin és lomefloxacin komplexe
CPFX	ciprofloxacin-hidroklorid
DMPG	dimirisztoil-foszfatidilglicerol
DOX-5	5-doxil-sztearinsav
DPPC	dipalmitoil-foszfatidilkolin
ESR	elektronspin-rezonancia spektroszkópia
GUV	óriás unilamelláris vezikula
HPLX	2-hidroxipropil-β-ciklodextrin és lomefloxacin komplexe
HXD	4-(N,N-dimetil-N-hexadecil)ammonium-2,2',6,6'-tetrametilpiperidin-1-oxil- jodid
LMFX	lomefloxacin-hidroklorid
LX	lomefloxacin oldat
MBLX	multilamelláris vezikulába zárt β-ciklodextrin–lomefloxacin komplex
MHPLX	multilamelláris vezikulába zárt 2-hidroxipropil-β-ciklodextrin–lomefloxacin komplex
MLV	multilamelláris vezikula
MLX	multilamelláris vezikulába zárt lomefloxacin
NBD	2-(12-(7-nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazol-4-il)amino)dodecanoil-1-hexadekanoil-sn-glicero-3-foszfokolin
Rhodamin	LissamineTM rhodamine B-t, 1,2-dihexadekanoil-glicero-3-foszfoetanolamin trietanolamin só, fluoreszcensen jelölt lipid
SBLX	kis unilamelláris vezikulába zárt β-ciklodextrin–lomefloxacin komplex
SHPLX	kis unilamelláris vezikulába zárt 2-hidroxipropil-β-ciklodextrin–lomefloxacin komplex
SLX	kis unilamelláris vezikulába (SUV-ba) zárt lomefloxacin
SUV	kis unilamelláris vezikula
T_m	fázisátalakulási hőmérséklet

2. Bevezetés

Disszertációmban azokat az eredményeimet foglalom össze, amik a liposzomális formulációk lehetőségeit, korlátait, a liposzómák és az általam vizsgált hatóanyagok — mint modellvegyületek — közötti kölcsönhatásokat mutatják be. Az irodalmi áttekintést ezért három területre osztottam: i.) a liposzómák alapvető tulajdonságai; ii.) a vizsgált hatóanyagok jelentősége és főbb fizikai, kémiai tulajdonságai; iii.) az alkalmazott kísérletes módszerek rövid áttekintése.

2.1. Sejtmembránok

A liposzómák tulajdonságainak intenzív vizsgálata azon a felismerésen alapul, hogy az élő szervezetek mindegyikében megtalálható az a struktúra, ami egy a biológiai szempontból működőképes egységet körülhatárol: speciális esetben ez egy sejt, amit a sejtmembrán határol. A sejtmembrán azonban nem egy sztatikus, egyetlen feladatot ellátó struktúra. A sejtplazma és a benne található alkotók körülhatárolásán kívül fenntartja a sejt belseje és környezete közötti kapcsolatot, az anyagcserét, viszont nagymértékben csökkenti a legtöbb ion, vízoldékony molekula passzív diffúzióját a membránon keresztül. E visszatartó funkció felel többek között olyan fontos feladatokért, mint a sejt védelme a mérgező vegyületekkel szemben, az iongradiens fenntartása, valamint annak a speciális reaktortérnek a fenntartása, ami az egyes sejtekben lezajló kismolekulák és makromolekulák szintézisét biztosítja.

A membránok szerkezeti alapja az amfifil lipidmolekulák szerveződéséből létrejött lipid kettősréteg (lipid bilayer), melyben a különböző, akár töltéssel is rendelkező poláris fejcsoportok és az apoláris zsírsavláncok régiója alkalmas a membránfehérjék beágyazására. Egyes fehérjék csatornákként látják el a molekulák transzportját, míg mások szenzorként jelet közvetítenek a sejt belsejébe, vagy éppen a külvilág felé, megváltoztatva ezzel a sejt és a belőlük felépülő szövetek viselkedését. Részben ezek a fehérje-szenzorok — azaz a receptorok — felelősek a sejt és környezete közötti jelátvitelért (Alberts és mtsai 2008).

Egy állati sejtmembrán tömegének, a sejtmembrán típusától függően, 20 – 80 %-át a lipidek teszik ki, melyek között legnagyobb mennyiségben a foszfolipidek fordulnak elő. (Az egyes lipidfajták aránya azonban széles tartományban változhat,

többek között, az adott sejt funkciójától függően). A foszfát-csoport legtöbbször egy glicerin molekulához kapcsolódik, mely általában két zsírsavláncot észteresít. A foszfáthoz többféle csoport kapcsolódhat, mint pl.: kolin, etanolamin, szerin, amelyek töltést is hordozhatnak. Az egyes zsírsavláncok általában 14 és 22 közötti szénatomból épülnek fel, és gyakran tartalmaznak kettőskötéseket. A szénlánc hossza és a kettőskötések száma meghatározza a lipidrendszerek „folyékonyságát" (fluiditását), amit legegyszerűbben a fázisátalakulási hőmérséklettel (T_m) jellemezhetünk. (A latin eredetű „fluiditás" szó azt az összetett tulajdonságot jelenti, ami két sajátosságot tartalmaz: makroszkópos és molekuláris szintű rendezettséget, valamint a molekuláris mozgások időtartományát). A T_m az a hőmérséklet, amelyen a gél és folyadék állapot közötti átmenet megtörténik. A rövidebb szénlánc és a kettőskötések jelenléte csökkenti a T_m-et, azaz a membrán alacsonyabb hőmérsékleten kerül „folyadék" állapotba (Alberts és mtsai 2008, Matkó és Voszka 2007).

Az egyes sejtek lipidösszetétele különböző, és jellemző lehet az adott sejttípusra; sőt egy membránon belül is megfigyelhető a lipidek és a fehérjék heterogén eloszlása. Például a humán vörösvértest membránjában a kolin csoportot tartalmazó foszfatidilkolin (PC) és szfingomielin a kettősréteg külső rétegében található, míg a belsőben nagyobb arányban figyelték meg a foszfatidil-szerin (PS) és foszfatidil-etanolamin (PE) jelenlétét. Mivel a negatív töltésű PS a belső rétegben lokalizálódik, a két réteg között jelentős töltésbeli különbség van. A lipid-asszimetriának funkcionális szerepe van, ugyanis a megfelelő fehérjekonformáció kialakulásának gyakran előfeltétele egy adott fluiditás és a töltések szempontjából megfelelő lipidkörnyezet. Például a fent említett esetben a protein-kináz-C-ről kimutatták, hogy a membrán PS-ben dús, citoszol felöli oldalához kötődik, ugyanis aktivitásához a negatív foszfolipidek jelenléte szükséges (Alberts és mtsai 2008).

Az eukarióta sejtek szinte mindegyike tartalmaz koleszterint, melynek szteránváza a zsírsavláncok apoláris régiójába mélyül, hidroxil-csoportja pedig a poláris fejcsoportok felé orientálódik. A koleszterinnek nagy szerepe van a membrán fluiditásának szabályozásában, ugyanis jelenléte már néhány százalékban is csökkenti azt. Hosszú és telített zsírsavláncú lipidekkel, szfingomielinnel együtt pedig egy kifejezetten merev „tutajt" alakít ki, melyben a lipidek mozgása, diffúziója gátolt. Ezek az ún. lipid „raftok" szelektíven tartalmaznak egyes fehérjéket, mint például a

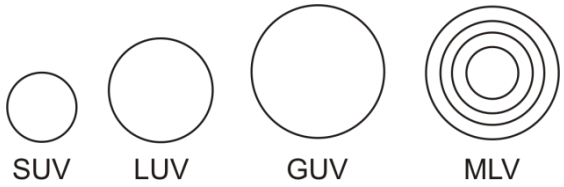
vaszkuláris epithel sejtek kaveoláinak marker fehérjéjét, a caveolin-1-et, ami a nyíró erő által kiváltott ATP-, ill. Ca^{2+} felszabadulásában játszik szerepet (Gaus és mtsai 2003, Yamamoto és mtsai 2011). A plazmamembrán e speciális doménjeinek jelentősége van az endocitózisban, a szekrécióban és a jelátvitelekben is. A „rigid" területet kialakító lipidek és egyes stabilizáló fehérjék inhomogén eloszlását a sejt citoszkeletális rendszere tartja fenn (Alberts és mtsai 2008, Darvas és László 2002).

A membrán fluiditásának optimális értéken tartása alapvető a megfelelő funkciók ellátásához, pl.: a rajta keresztül történő transzport, a lipidek és fehérjék membránbeli diffúziója. Egyes élő szervezetek képesek az optimális állapot szabályozására, fenntartására. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy egyes baktériumok a hőmérsékletcsökkenés hatására végbement membránfluiditás csökkenését több telítetlen zsírsavláncú, így alacsonyabb T_m-mel rendelkező lipid szintézisével és a membránjukba történő beépítésével ellensúlyozzák (Alberts és mtsai 2008).

2.2. Modellmembránok, liposzómák

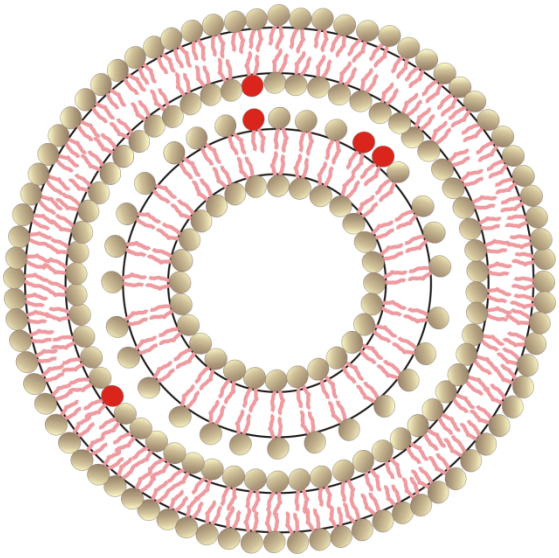
A biológiai membránok felépítését és funkcióját leíró Singer–Nicolson membránmodell megközelítése szerint a folyékony lipid viszkózus kettősrétegébe ágyazódnak az integráns és perifériális fehérjék, felszíneihez pedig szénhidrát láncok kapcsolódnak (Singer és Nicolson 1972). Az ilyen módon leírt membránok modellezésére használt konvencionális liposzómák az előbbi komponensek közül többnyire csak lipidet, azaz az „oldószert" és esetlegesen koleszterint tartalmaznak. A liposzómák olyan mesterségesen előállított, magukba vizes fázist záró szerkezetek, amelyek egy vagy több kettősrétegből épülhetnek fel; alapvetően nem tartalmazzák a fehérjéket és a cukor komponenseket (Bangham 1963). Ebből kifolyólag olyan folyamatok vizsgálatára alkalmasak modellként, amelyekben a lipid kettősréteg *szerepe* az elsődleges.

Ezek a lipidgömböcskék a felépítő kettősrétegek száma szerint lehetnek egy-, vagy többrétegűek, azaz uni-, vagy multilamellárisak. Méretük alapján megkülönböztethetjük a kis-, és a több száz nanométer átmérőjű nagy vezikulákat, a SUV-okat és a LUV-okat (1. ábra). A multilamelláris vezikulák (MLV-k) (2. ábra) akár az egy mikrométeres átmérőt is elérhetik, de az óriás (unilamelláris) vezikulák, azaz GUV-ok még ennél is nagyobbak lehetnek (Mishra és mtsai 2011).



1. ábra Liposzómák típusai méret és a rétegződés (lamellaritás) szerint (a sematizált ábrán a méretarányok nem tükrözik a lehetséges valós méretarányokat).

A maximálisan 100–200 nm átmérővel rendelkező SUV-ok kevésbé stabilak, hajlamosak flokkulációra, fúzióra. A LUV-ok (100 nm felett) és MLV-k, bár méretileg körülbelül egy nagyságrendbe tartoznak, eltérő bezárt vizes fázis és lipidtérfogat aránnyal rendelkeznek, így gyakran különböző a bezárási és leadási tulajdonságuk (Budai és Szőgyi 2001).



2. ábra Egy többrétegű (multilamelláris) vezikula (MLV) szerkezetének sémája, mely megjeleníti a fejcsoportokat (gömbök) és az apoláris oldalláncokat. A piros színnel néhány hibahelyet jelentő lipidet jelöltem.

2.2.1. Liposzómák a gyógyszerszállításban

A gyógyszerszállító liposzómák új lehetőséget jelentenek egyes hatóanyagok alkalmazhatósága számára. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy a gyógyszerfejlesztések során, még a preklinikai vizsgálatokban elvetnek olyan hatóanyagokat, melyek megfelelő terápiás hatással rendelkeznének, de alacsony vízoldhatóságuk miatt formulálásuk nehezebb, illetve kedvezőtlen farmakokinetikai

paraméterekkel, rossz biohasznosulással rendelkeznek. Liposzomális formulálás alkalmazásával, például a liposzómák szolubilizáló hatása miatt, sokan ezek közül a vegyületek közül is alkalmazást nyerhetnek.

A gyógyszermolekulák lipidvezikulába zárásával megvalósuló irányított célbajutás és szabályozható felszabadulás miatt csökkenthető a beadott hatóanyagmennyiség, vagy az alkalmazás gyakorisága, ami a mellékhatások csökkenését eredményezheti. Különösen az alacsony terápiás indexszel rendelkező és a súlyos mellékhatásokat okozó hatóanyagok esetén van nagy jelentősége ezeknek a tényezőknek. A kívánt cél legtöbb esetben az, hogy elérjék a hatóanyag szelektív lokalizációját a beteg területen, pl. a tumorban vagy a gyulladt területen. A liposzómák passzív célbajuttatása (passzív targeting) azon alapul, hogy a tumor hipervaszkularizációja és az érfalak fenesztráltsága miatt ezen a területen a gyógyszerhordozók nagyobb arányban léphetnek ki az érpályából és adhatják le tartalmukat. A tumorsejtek felületén nagyobb mennyiségben expresszálódnak egyes receptorok, mint az egészséges sejteken. Ezen receptorok ligandját a liposzómák felszínére kötve fokozható azok eljuttatása és felvétele a tumorsejtekbe. Ezen az alapon működik a transzferrinnel és fólsavval ellátott vezikulák aktív célbajuttatása (Ryschich és mtsai 2004, Sudimack és Lee 2000).

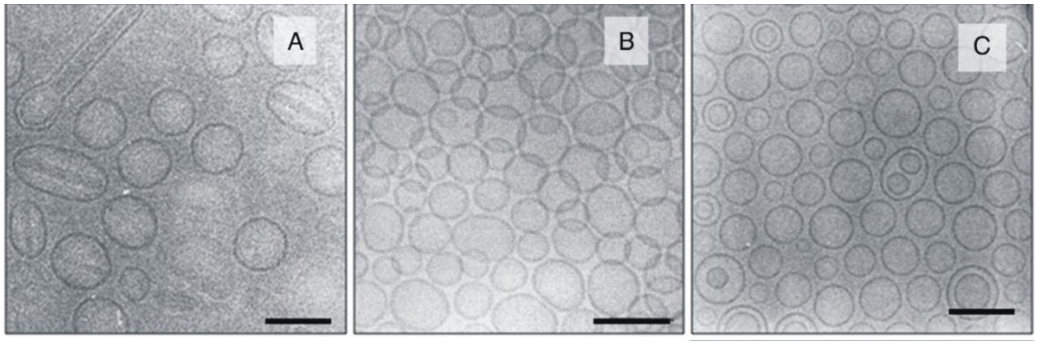
A liposzómák külsőleges alkalmazás során is hathatnak előnyösen a hatóanyag felszívódására, bőrbe jutására. Modellkísérletekben kimutatták, hogy a hidrofil carboxi-fluoreszcein (Verma és mtsai 2003), illetve egyes hatóanyagok, mint a koffein (Touitou és mtsai 1994) és a lidokain (Planas és mtsai 1992) lipidvezikulák jelenlétében a bőr mélyebb rétegeibe jutnak, mint nélkülük.

A hatóanyagok liposzómába történő felvétele három folyamat révén valósítható meg: a belső vizes térbe történő bezárással, a lipidrétegek és a vizes fázis közti megoszlással, valamint az ún. „remote loading” eljárással. *Bezárás* során főleg a vizes oldatokban jól oldódó, hidrofil molekulák „kapszulázása” történik. Amennyiben a hatóanyag oldékonysága szerves oldószerben jobb, mint a vizes oldatokban, s egyben lipofil tulajdonságú is, akkor a két fázis közötti *megoszlásról* beszélhetünk. Az ilyen anyagokat tartalmazó liposzómák előállítása során — általában a szerves fázis vákuumban történő elpárolása után — az oldószer szerepét a lipid-szénláncok veszik át (Chrai és mtsai 2001). Az ún. *„remote loading”* technikával olyan molekulák zárhatók

liposzómába, amelyek a környezet pH-jától függően lehetnek semlegesek vagy rendelkezhetnek töltéssel, azaz amfipatikus, gyenge savak vagy bázisok. A bezárás alapja az, hogy a bezárandó molekulákat olyan oldatösszetétel (pH, sókoncentráció) mellett adják kívülről a liposzómákhoz, amikor a bejuttatandó molekulák semlegesek, vagy össztöltésük nulla. Így ezek, a töltéssel nem rendelkező, lipofil molekulák képesek átmenni a liposzóma falán. A bejutott molekulák a külsőtől eltérő, benti vizes fázis pH-értékén töltést vesznek fel, így membránpermeabilitásuk nagymértékben lecsökken. Ezzel a módszerrel nagyobb bezárási hatásfok érhető el, mint az előző, egyszerűbb bezáráskor (amikor is csak jóval kevesebb típusú hatóanyag zárható be a „remote loading”-gal összemérhető koncentrációban; ugyanakkor a hatóanyag kémiai felépítése korlátozza a „remote loading” módszer alkalmazhatóságát). E technika alkalmazásával lehetséges például morfinszármazékok, glukokortikoidok vagy a rákellenes terápiában használt doxorubicin bezárása (Alam és Hartrick 2005, Avnir és mtsai 2008, Budai és Szőgyi 2001, Chrai és mtsai 2001, Zucker és mtsai 2009).

A liposzómák sok előnyös tulajdonsága és hatása mellett meg kell említeni azt, hogy a liposzómarendszerek is kiválthatnak súlyos allergiás reakciót, — ún. komplement aktivációs pseudoallergiát (az angol rövidítés szerint CARPA) — anafilaxiás sokkot az immunrendszer aktiválásával. Ez a hatás csökkenthető olyan molekuláknak a lipidréteghez történő kötésével, amelyek csökkentik annak lehetőségét, hogy az immunrendszer testidegennek ismerje fel a lipidvezikulákat és a bejuttatott hatóanyagot. Ezt polietilén-glikol oldallánccal rendelkező lipidmolekulákkal lehet elérni (pegilált liposzómák).

Az utóbbi évek intenzíven vizsgált területe a doxorubicin liposzomális formájának (Doxil, Caelyx) immunrendszer-aktiváló hatása. Ebben az esetben maga a hatóanyag az, ami megváltoztatja a vezikulák alakját (3. ábra), felismerhetővé téve így őket az immunrendszer számára (Szebeni és mtsai 2012).



3. ábra A doxorubicint (Doxil) (A), ciszplatint (SPI-077) (B) és hatóanyagot nem tartalmazó vezikulák transzmissziós elektronmikroszkópos képei. A méretvonal 100 nm-t jelent (Szebeni és mtsai 2012).

A vezikulák alakján kívül, azok nagy mérete, multilamelláris szerkezete vagy magas koleszterintartalma (71 %) is kiválthatja a komplement rendszer aktiválását (Szebeni és mtsai 2000). A vezikulák töltése szintén szerepet játszik: a semleges liposzómák nem, míg a pozitív és negatív töltésűek két külön útvonalon aktiválják a komplement rendszert (Chonn és mtsai 1991). Kutatások alapján azonban csupán a negatív felületi töltés, azaz zéta-potenciál nem feltétlenül elégséges az immunválasz kiváltásához, a megfelelő funkciós csoportok jelenléte is szükséges: csak karboxil-funkciós csoporttal rendelkező liposzómák esetén nem tapasztaltak aktiválódást, míg foszfát-csoportok jelenlétében igen (Sou és Tsuchida 2008).

2.2.2. A liposzóma tulajdonságainak változása a hatóanyag – lipid kölcsönhatás következtében

Egy hatóanyag liposzómába történő zárásakor gyakran lép kölcsönhatásba az adott lipidrendszerrel. Fontos a létrejövő kölcsönhatás ismerete, hiszen annak minősége és erőssége megváltoztathatja a vezikulák egyes fiziko-kémiai paramétereit, vagy akár befolyásolhatja a bezárási hatásfokot, a hatóanyag felszabadulásának sebességét. Ennek érdekében vizsgálni kell, hogy a hatóanyag a lipofilitásának megfelelően a liposzóma membránjába ágyazódik-e, vagy annak felszíneához kötődik, esetleg vízben jól oldódó molekula esetén csupán a belső vizes fázisban helyezkedik-e el. Amennyiben a molekula polaritása, lipofilitása (logP), lehetséges mikrospeciációi, illetve a vezikula összetétele, töltése ismert, akkor ezek a tulajdonságok már támpontot nyújthatnak ahhoz, hogy a liposzomális formuláció miként valósul/valósítható meg (Fatouros és Antimisiaris 2002).

Egy lipofil molekula beágyazódása a lipidmolekulák fejcsoportjának vagy a zsírsavláncoknak a régiójába megnyilvánulhat a lipidek mobilitásának, rendezettségének változásában. Ennek a jelenségnek klasszikus példáját mutatja a sejtmembránok és liposzómák gyakori alkotója, a koleszterin jelenléte a membránban. A koleszterin a lipidre jellemző T_m felett (folyadékkristályos fázisban) a fluid zsírsavláncokkal kölcsönhatásba lépve növeli a rendezettséget, azaz rigidebbé teszi a membránt. T_m alatti hőmérsékleten (gél fázisban) csökkenti annak rendezettségét, fluidabb és permeábilisabb szerkezetet eredményezve (Lasic 1995). Egyes molekulák kötődése változást idézhet elő a T_m értékében, mint például a propofol, ami a biológiai és mesterséges membránok gél–folyadék fázisátalakulásának hőmérsékletét és a mikroviszkozitást csökkenti, vagyis fluidabbá teszi a membránt (Bahri és mtsai 2005, Momo és mtsai 2002, Tsuchiya 2001). Kalcium és magnézium ionok esetében a T_m növekszik, azaz a membrán rigidebbé válik (Kataoka és mtsai 1985).

Kevésbé lipofil, vízben is oldódó hatóanyagok inkább a poláris fejcsoportokkal lépnek kölcsönhatásba befolyásolva akár a membrán integritását. Például, amikor szarvasmarha szérum albuminja (BSA) adszorbeálódik DPPC/DPPG keverék-liposzómák felületén, növeli azok permeabilitását (Yokouchi és mtsai 2001).A humán szérum albumin (HSA) adszorpciója is befolyással lehet a véráramba juttatott vezikulákra, ami akár előnytelenül is megváltoztathatja a hatóanyagok kiáramlását, ugyanis kimutatták, hogy a HSA adszorpciója befolyásolja az unilamelláris és a multilamelláris vezikulák fázisátalakulási hőmérsékletét (Galantai és Bardos-Nagy 2000).

A felületi adszorpciót általában elősegítheti, ha töltéssel rendelkező lipidek elektrosztatikus kölcsönhatásba léphetnek az ellentétes töltésű ionokkal vagy gyógyszermolekulákkal (Bensikaddour, Fa, és mtsai 2008, Bensikaddour, Snoussi, és mtsai 2008, Fatouros és Antimisiaris 2002, Tatulian 1983). A fent említett negatív töltéssel rendelkező BSA a vele azonos töltésű DPPC/DPPG keverék-liposzóma felszínén adszorbeálódik. Feltehető, hogy ebben az esetben a molekulák közötti taszító erőt hidrofób kölcsönhatás ellensúlyozza (Yokouchi és mtsai 2001).

(Makro)molekulák, ionok kötődése a vezikulákhoz leárnyékolhatja, megváltoztathatja azok felületi töltését, zéta-potenciálját, ami többféle szempontból is fontos. Például, a liposzómák felületi töltésében bekövetkező változások, az alapvető

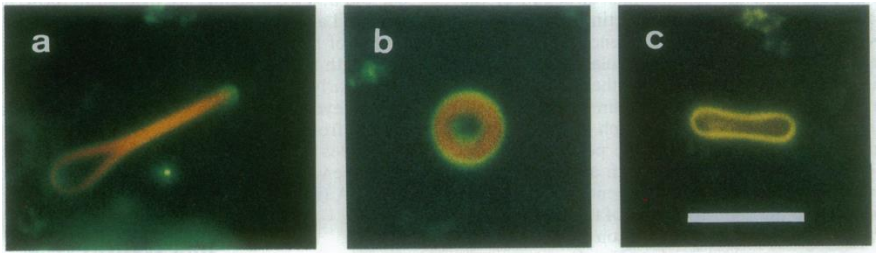
fizikai-kémiai kölcsönhatások módosulása révén, befolyásolhatják a preparátum méreteloszlását, stabilitását is. Irodalmi adatok találhatók arra, hogy a negatív felületi töltéssel rendelkező vezikulák jelenléte segíti a hatóanyag (például a betametazon) penetrációját a bőr mélyebb rétegeibe (Gillet és mtsai 2011), ugyanakkor a negatív töltések felelősek az immunreakciók aktiválásáért is (Szebeni és mtsai 2012).

2.2.3. GUV-ok felhasználása különböző tudományterületeken

Az óriás vezikulák főleg (bio)fizikai és biokémiai vizsgálatokban nyertek felhasználást. Ezekben a vizsgálatokban a vezikulák modellmembrán tulajdonságát és sejtméretű membránmodellként történő alkalmazását használták ki.

Nomura és munkatársainak munkája során egy mesterséges transzlációs elegyben a lipidvezikulák sejtmodellként vettek részt. Az *in vitro* transzlált Apo-citokróm-b5 és fúziós fehérjéje — amik széles körben használt modell membránfehérjék — lipofil tulajdonságokkal bírnak, ezért vizes közegben kicsapódnak, nem a funkciójuk ellátásához szükséges konformációt veszik fel. A vezikulák jelenléte azonban lehetővé tette a fehérjék beépülését a lipofil kettősrétegbe, elősegítve ezzel a vizsgálatukat a működésüknek megfelelő állapotban (Nomura és mtsai 2008).

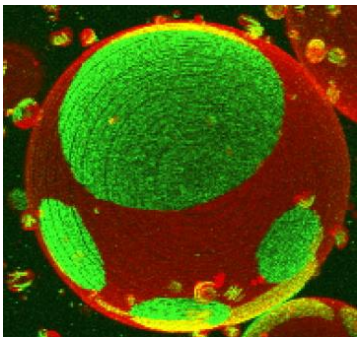
A citoszkeletális rendszer egyik alkotójának, az aktin filamentumnak polimerizációját és annak körülményeit vizsgálta Hotani és munkacsoportja. A sejtekben jelenlévő térfogati viszonyok jobb modellezésére óriás lipidvezikulákba zártak aktin monomereket, majd vizsgálták a keletkező filamentumok hatását a GUV-ok alakjára (4. ábra).



4. ábra Aktin polimerizációjának hatása a mesterséges lipidvezikulák alakjára: dobverő (a) és diszkusz (b). A fluoreszcens felvételeken az F-aktinhoz kötődő rhodaminnal konjugált falloidin látható. c: albumint tartalmazó liposzóma (Miyata és Hotani 1992)

Ezzel a kísérletsorozattal rámutattak az aktin filamentumok sejtmembrán-stabilizáló szerepére: ugyanis különbséget tapasztaltak a liposzómák alaktartásában és rigiditásában akkor, ha az aktint, vagy albumint tartalmazott (Honda és mtsai 1999, Miyata és Hotani 1992).

A lipidtutajok jelentősége ismert a sejtmembránok szerveződésében (lsd. 2.1). Ezeknek a szeparált fázisoknak, vagy éppen a bennük specifikusan feldúsuló fehérjéknek a feltérképezése mind sejtmembránokban, mind azok modelljében lehetséges; például konfokális mikroszkóppal, fluoreszcensen jelölt lipidek, fehérjék felhasználásával (5. ábra) (Garcia-Saez és Schwille 2008).



5. ábra Lipid domének vizsgálata óriás vezikulán konfokális mikroszkóppal különböző fluoreszcens festékkel jelölt lipidek használatával (Garcia-Saez és Schwille 2008).

A lipidek diffúziója követhető a fluoreszcens jel egy adott területen történő kiégetése (bleach) után a még fluoreszcensen aktív lipidek vándorlásának következtében mérhető intenzitásnövekedéssel, az úgynevezett „fluorescence recovery after photobleaching” (FRAP) technikával (Alberts és mtsai 2008). Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiát alkalmaztak GUV-okon, illetve élő sejteken is. E módszerekkel a lipidek diffúziós együtthatójának meghatározása mellett lehetőség volt lipidkoncentrációk, megoszlási hányadosok, molekuláris kölcsönhatások, mint például lipid – fehérje kölcsönhatások vizsgálatára is (Garcia-Saez és Schwille 2008). Egy további érdekes alkalmazási lehetőséget nyújt a lipidvezikulák szilárd felületen történő szétterülésével létrejövő ún. „supported lipid bilayer" (SLB). Ez a jelenség megfigyelhető például csillám, vagy üveg felületeken. Az SLB fluoreszcens mikroszkópos technika mellett vizsgálható atomerő mikroszkóppal (AFM) és optikai hullámvezető módus spektroszkópia (OWLS) technikákkal is (Az általam készített

GUV-preparátumokat használták együttműködő partnereink egy ioncsatorna-aktivitás kimutatására alkalmazandó szenzor kifejlesztésekor (Székács és mtsai 2013)). Az SLB-k szintén használhatóak gyógyszerhatóanyagok vagy fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatára, vagy speciális összetétel esetén nanotechnológiai szenzorokként.

2.3. A vizsgált hatóanyagok jelentősége

2.3.1. Fluorokinolonok a terápiában

A nalidixsav fluorozott származékai, a fluorokinolonok, a DNS-giráz enzim gátlásával fejtik ki baktericid hatásukat. Széles spektrumú, kemoterápiás szerként a csoport több tagja egyaránt hatékony Gram-negatív és Gram-pozitív, illetve intracelluláris baktériumokkal szemben is. Fontos szerepet töltenek be a kórházi- és multirezisztens törzsek terápiájában is. Két nagyon gyakran vizsgált képviselőjük az igen széles körben használt ciprofloxacin (CPFX) és a kiemelkedően erős fényérzékenyítő hatású lomefloxacin (LMFX). A klinikai gyakorlatban főleg a szem, a fül, a tüdő és a húgyutak fertőzésekor alkalmazzák azokat (Appelbaum és Hunter 2000, Graber és Ludwig 2006, Majumdar és mtsai 1992). A két vegyület hatékonyságát több vizsgálat során is összehasonlították, például bakteriális prosztata-, és csontvelőgyulladásban. Az eredmények arra utalnak, hogy az LMFX kisebb dózisok és ritkább adagolás mellett is van olyan hatékony, vagy éppen hatékonyabb is lehet mint a CPFX (Greenberg és mtsai 2000, Naber 2002). Jó felszívódásuk eredményeként számolni kell szisztémás mellékhatásaikkal, amelyek közül a leggyakoribbak és legsúlyosabbak közé a gasztrointesztinális tünetek és a fototoxicitás tartoznak (Graber és Ludwig 2006). Helyileg alkalmazva a bőrgyógyászatban, szemészetben, fül-orr-gégészetben kevesebb mellékhatás fellépésével számolhatunk, mint szisztémás alkalmazás esetén. Oldatuk hatásosnak és jól tolerálhatónak bizonyult például akne, Gram negatív folliculitis (Vali és mtsai 2009) és kötőhártya-gyulladás kezelésében (Gallenga és mtsai 1999). A jobb biológiai hasznosíthatóság és terápiás index elérése érdekében a CPFX mikroméretű szemcséinek pulmonáris úton történő bevitelét is vizsgálják pl. cisztás fibrózis és antrax kezelésében (Zhao és mtsai 2009).

Gyógyszerszállító rendszer, például a liposzómák alkalmazása megoldást nyújthat az említett mellékhatások mérséklésére. Liposzómába zárt fluorokinolonok antimikróbás aktivitásának *in vitro* vizsgálata során a minimális gátló koncentráció

(MIC érték) legalább 50%-kal csökkent a szabad formában alkalmazott fluorokinolonokéhoz képest (Pinto-Alphandary és mtsai 2000, Puglisi és mtsai 1995), ami a toxicitás csökkenését jelentheti. Az irodalom szerint a fluorokinolonok bomlástermékei, illetve a keletkező reaktív oxigén gyökök (ROS) felelősek a fényérzékenyítő mellékhatásért (Albini és Monti 2003, De Guidi és mtsai 2011, Fasani és mtsai 1997, Lhiaubet-Vallet és mtsai 2009, Martinez és mtsai 1998). Így a liposzomális formuláció kedvező hatású lehet, ha csökkenti a hatóanyag bomlását vagy a bomlástermékek koncentrációját (Budai és mtsai 2008, Sortino és mtsai 2001).

2.3.2. A koffein élettani hatásai és bezárása liposzómába

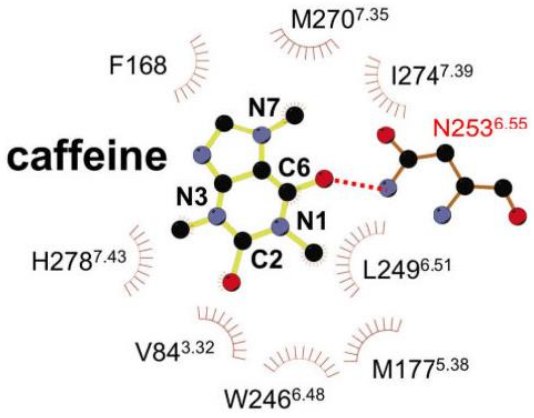
A koffeinnek sok élettani hatása ismert, például a központi idegrendszerre kifejtett stimuláló hatása miatt széles körben alkalmazzák. Serkentően hat a dopamin, az adrenalin és a noradrenalin felszabadulására. Diuretikus hatású, serkenti a gyomorsav és a pepszin szekrécióját. Az adenozin-receptor antagonistája, a cAMP-foszfodiészteráz gátlásával a cAMP szint emelkedését eredményezi, aminek következtében hatással van pl. az intracelluláris Ca^{2+}-szintre, a szív frekvenciájára, a szívizom kontrakciójának erejére, továbbá a hörgőkre is. Gyakran használják fájdalomcsillapítókkal kombinációban, ugyanis agyi érszűkítő hatásával potencírozza azok analgetikus hatását.

Külsőleg alkalmazva a koffein első sorban helyi hatást ér el a hiperproliferatív bőrbetegségek terápiájában (Levi-Schaffer és Touitou 1991) és a kozmetikában (cellulitis kezelése, zsírégetés elősegítése). Ugyanakkor, percutan alkalmazva is elérhető a koffein bronchodilatációhoz szükséges szisztémás, terápiás szintje, így biztonságosan alkalmazható újszülöttek légzési rendellenességének kezelésében (Amato és mtsai 1991).

Előbbiek alapján a koffein bőrön keresztül történő penetrációjának fokozása két cél miatt is történhet: *i.)* a bőrben helyileg hatóanyag-rezervoár létrehozására, *ii.)* a hatóanyag szisztémás terápiás szintjének elérésére. Ezeknek a céloknak eleget tesz a liposzomális formuláció (Touitou és mtsai 1994, Verma és mtsai 2003).

A koffein hatását adenozin receptorokhoz kapcsolódva fejti ki, így átjutása a sejtmembránon nem szükséges, aminek az alacsony lipofilitása (logP -0,07-0,5) nem is kedvezne (Szakonyi és Fülöp 2010). A kötődés hatására a receptor intracelluláris részének konformációváltozása indít be olyan sejtfolyamatokat, amik a koffein

fiziológiás hatását eredményezik. A molekula az A_{2A}-receptor hidrofób zsebébe köt be, illetve H-kötést létesít a receptor egyik aszparaginjának (Asn253) karboxamid csoportjával (Dore és mtsai 2011)(6. ábra). A koffein eme tulajdonságai a lipidekkel lehetséges kölcsönhatásai miatt fontosak, mert mind hidrogénhidak, mind hidrofób kölcsönhatások létrejöhetnek a két molekulafajta között.



6. ábra Hidrogénhíd kialakulása a koffein és az adenozin$_{2A}$- receptor aszparaginja között (Dore és mtsai 2011)

2.3.3. Ciklodextrinek felhasználása

A ciklodextrinek (CD) α-D-glükopiranóz egységekből felépülő, ciklikus, henger alakú oligoszacharidok. A henger külső felszíne poláris, ezért a ciklodextrinek — felépítésüktől függően — vízben többé-kevésbé oldódnak. Belső felszínük apoláris, amibe apoláris csoporttal rendelkező vendégmolekulákat, gyököket nem-kovalens kötéssel tudnak bezárni, így javítják azok látszólagos oldhatóságát. Emiatt a ciklodextrinek jelentősége a gyógyszerészetben és gyógyászatban egyre nő, hiszen zárványkomplex képzésével lehetővé válik egy készítményben a terápiás dózisnak megfelelő koncentráció elérése rossz oldékonyságú hatóanyagok esetén is. CD-formulálás hatására sok esetben javult a hatóanyagok biohasznosíthatósága és módosult a hatóanyagleadás is (Panini és mtsai 1995, Stella és Rajewski 1997). Egy összetettebb rendszer létrehozásával, amikor a hatóanyag-CD komplexét zárták liposzómába, kedvezően befolyásolták a bezárási hatásfokot (Piel és mtsai 2006) és a terápiás hatást is (Dhule és mtsai 2012).

A hatóanyag komplexálása CD-vel befolyásolhatja a fotostabilitást is. Vizsgálatok alapján a komplex egyes vendégmolekulák fotobomlását lassítja (Godwin és mtsai 2006, López-García és mtsai 2010), míg másokét gyorsítja (Wang és mtsai 2007). Ofloxacinnal végzett kísérletek során β-CD-be zárva a hatóanyag oldhatósága ugyan többszörösére nőtt, de fotobomlásának sebessége nem csökkent (Koester és mtsai 2001). Cirkuláris dikroizmus és 2D NMR vizsgálatok azt mutatták, hogy az ofloxacin másképpen helyezkedik el a hattagú (α) és a héttagú (β) CD-k üregében: míg az α-CD csak részlegesen, addig a β-CD szinte teljesen magába zárja az ofloxacint (a piperidin gyűrűt szabadon hagyva) (Tóth és mtsai 2012). A ciklodextrinek érdekes tulajdonsága az, hogy bizonyos esetekben az optikai izomerek között is különbséget mutatnak a bezárási hatásfokukban, így a lomefloxacin két optikai izomerjét is el tudták különíteni β-ciklodextrin-szulfát vagy hidroxipropil-β-ciklodextrin segítségével (Wei és mtsai 2010, Zhou és mtsai 2006).

2.4. Az alkalmazott mérési módszerek összefoglalása

2.4.1. A zéta-potenciál és mérése

Egy kolloid rendszer stabilitását az azt alkotó részecskék felületi töltéssűrűsége, ezáltal azok zéta-potenciálja (ζ-potenciál) nagymértékben befolyásolja. A zéta-potenciál nagysága az ion-ion, ion-dipól kölcsönhatások miatt függ a rendszert alkotó lipidek és a rendszerben jelenlévő további töltött részecskék fajtájától, koncentrációjától; ezért a zéta-potenciál függ a közeg pH értékétől és ionerejétől is. Kísérleti eredmények azt mutatják, hogy amennyiben a zéta-potenciál abszolút értékben nagyobb, mint ~20–30 mV (azaz negatívabb –30 mV-nál, vagy pozitívabb +30 mV-nál), a rendszer kolloidikai szempontból stabilnak tekinthető (Hunter 1981, Wu és mtsai 2011). Ezek alapján szuszpenziók, emulziók, vagy liposzómák esetén az abszolút értékben 30 mV-nál nagyobb zéta-potenciál miatt a részecskék között létrejövő taszítás akadályozza azok flokkulációját.

A zéta-potenciál meghatározható a részecskék elektroforetikus mozgékonyságának (elektroforetikus mobilitás) alapján. Az elektroforézis jelensége során az elektromos mezőben az ellentétes töltésű elektródok felé haladó részecskék sebessége a lézer doppler sebességmérés (angol rövidítés szerint LDV) módszerével

mérhető, így a Henry egyenletet [1] felhasználva a részecskék zéta-potenciálja számolható.

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta\, f(\kappa a)}{3\eta} \qquad [1]$$

ahol U_E az elektroforetikus mozgékonyság, ζ a zéta-potenciál, ε a közeg dielektromos állandója, η a viszkozitás és $f(\kappa a)$ a Henry függvény (Hunter 1981). A Henry-függvény értéke 1,0 és közelítőleg 1,5 között változhat. Ennek pontos értéke függ, például, a részecske méretétől, felépítésétől (Ermakov és mtsai 2001, Malvern-Instruments 2013, Marcelja 1976, Matsumura és mtsai 1999, Ohki 1984, 1984, Ohki és Kurland 1981, Ohki és Ohshima 1984, Ohshima 2002, Sou 2011, Verbich és mtsai 1999). A zéta-potenciál mérése alkalmas lehet ionok, egyes hatóanyagok liposzómákhoz kötődésének kimutatására (Datta és mtsai 2009, Ermakov és mtsai 2001, Ermakov és mtsai 1998, Forsyth és mtsai 1977, Iraolagoitia és Martini 2010, Ohki 1984).

2.4.2. Elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia

Az ESR spektroszkópia alkalmas a liposzómák fluiditásának, a lipidmolekulák egymás között, illetve más molekulák (például gyógyszermolekulák) között fellépő molekuláris kölcsönhatásának, azok változásainak mérésére. A párosítatlan elektronokat tartalmazó molekulák elektronjainak degenerált energiaállapotai mágneses térben felhasadnak (Zeeman-felhasadás), azaz a különböző spinállapotokhoz különböző energiaállapotok tartoznak. Megfelelő frekvenciájú mikrohullámú elektromágneses sugárzás átmenetet indukál a paramágneses molekula különböző energiájú elektronspin állapotai között. Az ESR spektroszkópiai mérések során ehhez az átmenethez szükséges abszorbeált energia spektrális detektálása történik (Kosman 1984, Nordio 1976).

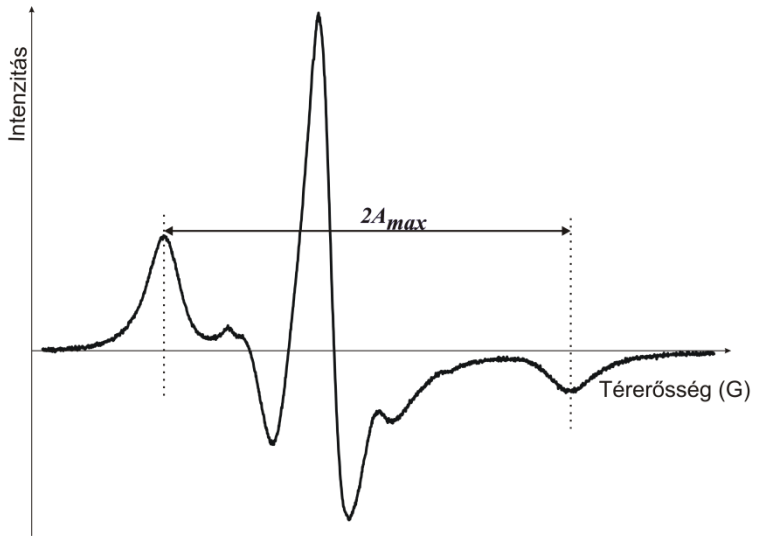
Membránok, liposzómák vizsgálata során ún. paramágneses monitorcsoportként gyakran nitroxid-csoportot tartalmazó szabadgyököt használnak, melyeket pl. különböző szerkezetű lipid (pl. foszfolipid, zsírsavak), koleszterin, alifás szénhidrogénláncok, vagy más a membrán felépítésében résztvevő molekulákhoz kötnek. A „riporter”-, vagy „monitor”-molekula szerkezetét úgy választják meg, hogy ezek szerkezete minél jobban hasonlítson a vizsgálandó lipidekéhez, vagy más

membránösszetevőhöz. Azaz, minél kisebb legyen a perturbáció: a jelölő molekula nem, vagy csak minimálisan változtassa meg a környezetét.

Az ESR spektrumok alapján, többek között, két lényeges tulajdonság határozható meg: 1.) a monitorcsoport környezetének polaritása és 2.) a molekulák rotációs diffúziója. A spektrumok nem csak a rotációs diffúzió korrelációs idejére érzékenyek, hanem a rotációs diffúzió térbeli rendezettségére is. E két utóbbi jellemző az, ami mint „kiátlagolt" közös tulajdonság, a fluiditásként ismert fogalomnak felel meg. Ezáltal minél nagyobb a térbeli rendezettség és minél kisebb a molekuláris forgás sebessége — amit a rotációs diffúziós együtthatóval jellemezhetünk — annál kisebb a fluiditás. Fordított esetben a rendszer fluditása nagyobb. Liposzómák esetén például a fluiditás a hőmérséklet emelésével nő, mert a molekulák forgása gyorsabbá válik, s ugyanakkor a térbeli rendezettség — a kevésbé szoros molekuláris illeszkedés következtében — csökken; nagyobb térszögben mozoghatnak a molekulák. A rotációs diffúziós együttható, valamint a molekuláris „pakoltság" a lipidek egymás közötti illetve a lipideknek más molekulákkal történő kölcsönhatásától függ. Amennyiben a szénlánc mentén vizsgáljuk a molekuláris mozgásokat, úgy megállapítható, hogy a fejcsoportok közötti erős kölcsönhatások következtében a fejcsoporttól kiindulva a rendezettség csökken, a rotációs diffúzió sebessége nő. A membránok ESR spektroszkópiai vizsgálatakor pl. két különböző mélységben szokásos felderíteni a kölcsönhatások változását: egyrészt a fejcsoportokhoz közeli régiókban, másrészt a szénhidrogénláncok végén. Lehetőség van arra is, hogy a fejcsoportoknak a vizes fázis felé exponált szintjén végezzünk méréseket (Griffith és Jost 1976, Smith és Butler 1976).

Az ESR spektrumok egyszerűsített kiértékelése. Az ESR spektrumról leolvasható a két legtávolabbi csúcs távolsága, ami a maximális hiperfinom csatolási állandó kétszerese ($2A_{max}$) (7. ábra). Értéke függ a membrán fluiditásától: alacsonyabb hőmérsékleten, vagy rigidebb membránok esetén nagyobb csatolási állandót mérhetünk. Amennyiben ez a távolság nem olvasható le egyértelműen, akkor a fluiditás jellemzésére más csúcsok távolságait, vagy arányait használhatjuk (Kosman 1984). A mért hiperfinom csatolási állandó, valamint a mozgásmentes állapothoz tartozó határértéke alapján kiszámítható az un. rendparaméter, ami mind a molekuláris rendezettséget, mind a rotációs diffúzió korrelációs idejét tartalmazza: tehát a fluiditást fejezi ki. Egyes esetekben a molekuláris rendezettség és a korrelációs idő kiértékelését

csak részletes spektrumszimuláció teszi lehetővé (Budil és mtsai 1996, Szabó és mtsai 2004).



7. ábra Egy liposzómamembránba zárt spin-jelölt zsírsav tipikus ESR spektruma. $2A_{max}$: a kétszeres maximális hiperfinom csatolási állandó

2.4.3. A bezárási hatásfok és a hatóanyag-felszabadulás meghatározása

A bezárási hatásfok, mint fogalom, definíciója az irodalomban nem egységes. Egyes szerzők csak a liposzómák membránjába, azaz a lipidrétegekbe bezárt hatóanyagot tekintik úgy, mint bezárt hatóanyag mennyiséget. Más szerzők — értelemszerűen olyan esetekben, amikor a bezárt vizes-fázis térfogata jelentős — a belső vizes fázisba bezárt mennyiséget is a bezárt hatóanyag mennyiségeként adják meg. Az utóbbi esetben ismerni kell a lipidrétegek által körülzárt térfogatot, vagy általában feltárással a teljes bezárt mennyiséget meg kell határozni. Ebben az értelemben az elválasztási technikák azok, amelyek meghatározzák, hogy miként adják meg a bezárási hatásfokot.

2.4.3.1. A bezárási hatásfok meghatározása

A hatóanyagot szállító lipidvezikuláknak a hatékony terápia szempontjából fontos tulajdonsága a szállított, azaz a liposzómába zárt anyag mennyisége, amit a liposzómák bezárási hatásfokával fejeznek ki. Az előző fejezetben bemutattam, hogy a hatóanyag tulajdonságai alapján a hatóanyagok alapvetően három helyen lehetnek: 1.) a liposzóma bezárt vizes fázisában nem kötött formában; 2.) a lipidrétegekhez kötve a vizes

fázisban; 3.) a membránhoz kötve a membrán lipidrétegeinek belsejében. A tömeg-mérlegegyenlet alapján, a hatóanyag oldatbeli koncentrációja kisebb lesz a liposzomális formuláció készítésekor alkalmazott $c_{össz}$ koncentrációnál a *kötődési folyamatok* miatt. A kötött mennyiség mérése akkor lesz pontos, ha az alkalmazott elválasztási módszer képes a kötött — nem-kötött egyensúly állandóságát biztosítani. Centrifugálással elérhető ez az elválasztás, és a felülúszóban mért koncentráció arányos lesz a nem-kötött hányaddal. A bezárási hatásfok ebben az esetben valójában a kötött hányadra vonatkozik: a paramétert a liposzómába bezárt hatóanyag mennyiségének (tömegének) és a preparátum összes hatóanyagtartalmának hányadosaként számolják. A bezárási hatásfok (BH) számolható a $BH(\%) = (c_{össz}-c_{kint})/c_{össz}*100$ képlettel is, ahol $c_{össz}$ és c_{kint} a teljes preparátumban és a liposzómákon kívüli vizes térben mért hatóanyagkoncentráció (Benoit és mtsai 1985). A koncentráció mérése pedig bármilyen alkalmas módszerrel megvalósítható. Munkám során abszorpciós spektrofotometriás módszereket alkalmaztam.

2.4.3.2. Bezárási hatásfok és hatóanyag-leadási kinetika meghatározása dialízissel

A hatóanyagok leadási kinetikájának vizsgálatában gyakran alkalmazott módszer a dialízissel történő vizsgálat (Klebovich és mtsai 2012). Ennek során a vizsgálni kívánt rendszert (pl. liposzómás formulációt) megfelelő pórusátmérőjű dializáló-membránba helyezik. A dializáló membrán egyik oldalán állandó keveréssel biztosítják a homogén eloszlást, míg a másik oldalon állandó, vagy szakaszos térfogatcserével mintát vesznek. A mintákban levő hatóanyag koncentrációját meghatározva lehet következtetni a leadási kinetikára. A leadás sebességi állandójától függő mérési idő végén a hatóanyag összmennyisége illetve a megfelelő koncentrációk meghatározhatók (Moreno-Bautista és Tam 2011, Zambito és mtsai 2012). Alapvetően három tényezőtől függ, hogy a leadási kinetikát megfelelően határozzák-e meg: 1.) gondoskodni kell arról, hogy a koncentrációgrádiens ne változzon jelentős mértékben a dialízis során; 2.) a dializálandó térfogat elhanyagolható legyen a dializáló térfogathoz képest; 3.) a dializáló membrán legyen csaknem teljesen permeábilis a hatóanyagra (Zambito és mtsai 2012). Az utóbbi megszorítás feloldható, ha a dialízis kinetikájára vonatkozó méréseket a csak hatóanyagot, de pl. liposzómát nem tartalmazó mérésekkel is kiegészítjük. A GUV-ból

történő hatóanyag-felszabadulást az előzőeknek megfelelő transzport-modellt kidolgozva írtuk le (Kaszas és mtsai 2013).

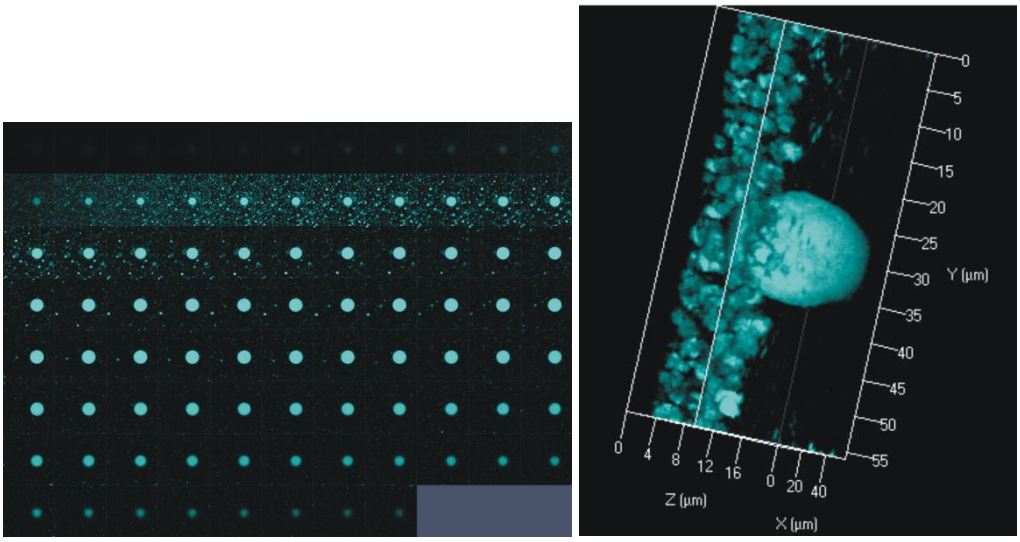
2.4.4. Konfokális lézer-pásztázómikroszkópia

A konfokális lézer-pásztázómikroszkópia (konfokális mikroszkópia) a modern fluoreszcens fénymikroszkópiai eljárások közé tartozik. A konfokális mikroszkópok előnye az epifluoreszcens mikroszkópokkal szemben, hogy képesek egy adott mélységből és nem a minta teljes keresztmetszetéből érkező jelek detektálására. A különböző mélységekben, azaz a z-tengely vékony rétegeiben végzett x-y síkbeli pásztázások eredményeként az objektum virtuális szeletelése megy végbe.

Működési elve. A fluoreszcens molekulák gerjesztése lézerrel történik. Az emittált fotonok mielőtt a detektorba jutnának egy szűk apertúrán haladnak át. Mivel az apertúra konjugált viszonyban van az objektív fókuszsíkjával, az utóbbiból érkező nyalábok az objektívből kilépve párhuzamosak, így a tubuslencse az apertúra nyílására fókuszálja őket, vagyis azok veszteség nélkül juthatnak a detektorba. Az objektív fókuszsíkja alatti vagy feletti rétegekből érkező fotonok össze-, illetve széttartó sugarakként lépnek ki az objektívből, aminek következtében a tubuslencse után azok az apertúra elé vagy mögé fókuszálódnak. A fókuszsíktól minél távolabbról indul egy fluoreszcens jel, annál jobban elnyelődik az apertúra síkjában, annál kisebb intenzitást eredményezve a detektorban, illetve a képen. Az apertúra méretének csökkentésével javítható a z-tengely menti feloldás, azaz a „szeletvastagság”, amely nagyságrendileg akár egy mikrométer is lehet. Egy réteg x-y irányú pásztázásával az adott fókuszsík kétdimenziós képét kapjuk. A z-tengely mentén lépésenként (100 nm – néhány μm) elvégezve az adott fókuszsíkok pásztázását, ezeket a képeket szoftver segítségével térhatású, „háromdimenziós” képpé illeszthetjük (8. ábra) (Damjanovich és Vereb 2007).

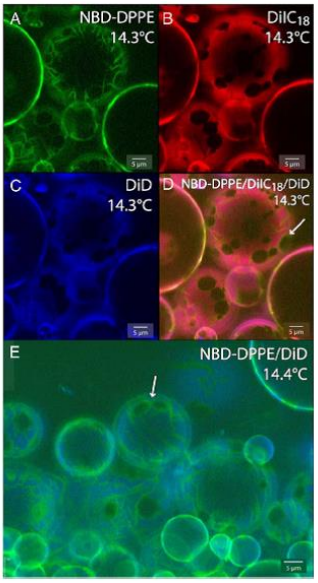
Liposzómákról történő transzmissziós vagy fluoreszcens mikroszkópos képalkotás az óriás vezikulák, esetleg MLV-k esetén lehetséges. A liposzómák vizsgálatánál előforduló paraméter, a belső vizes fázis megléte vagy hiánya fáziskontraszt, transzmissziós vagy epifluoreszcens technikával nem mutat egyértelmű különbséget, azaz a liposzómák és a vizes fázist nem bezáró emulziócseppek nem könnyen különböztethetőek meg. Konfokális mikroszkópos képeken azonban, mivel a vizsgálandó objektum keresztmetszetéről alkothatunk képet, a fluoreszcens lipidek,

vagy más, csak lipidekben oldódó fluoreszcens festékek inkorporálásával készített liposzómák üres karikaként, az emulziócseppek világító „telikörként” jelennek meg



8. ábra Fluoreszcensen festett GUV-preparátum kétdimenziós rétegfelvételei és a belőlük összeállított térhatású („háromdimenziós”) kép (saját felvétel).

Az utóbbi években egyre nagyobb érdeklődés fordul a GUV-ok fluoreszcenciás vizsgálatai felé. Speciális festékek alkalmazásával az alacsonyabb és magasabb olvadáspontú (fluidabb és rigidebb) lipidösszetevőkből felépített liposzómák vizsgálata is előtérbe került. Ennek jelentősége az, hogy a biológiai membránoknál megismert „raftok” szerkezete modellrendszerek segítségével is tanulmányozható. Erre mutat példát a 9. ábra (Juhasz és mtsai 2012).



9. ábra Három fluoreszcens festékkel egyidejűleg jelzett GUV-okról készült konfokális felvétel (Juhasz és mtsai 2012). Jól látható a felvételi hőmérsékleten egymás mellett létező, különböző fluiditású domének rendeződése és az egyes festékek eltérő doménekben való megjelenése.

2.4.5. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria a diagnosztikában és az alapkutatásban is egyre nagyobb teret hódító analitikai módszer. Molekulák ionizálását, fragmentálódását követően valósul meg azok tömeg/töltés (m/z) szerinti elválasztása, vagyis meghatározható a molekulák tömege és mennyisége. A tömegspektrometria széles tömegtartományban használható, szelektív és különböző elválasztástechnikai módszerekkel kombinálható, ebből kifolyólag és a különböző ionizációs technikáknak köszönhetően alkalmas keverékek és mátrixok vizsgálatára is. A gyógyszerészeti területen kiemelt jelentőségű a hatóanyagok és bomlástermékeik kvalitatív és kvantitatív meghatározása biológiai mátrixokban.

A tömegspektrométer (MS) felépítése. Az *ionforrás*ban történik a molekulák gázfázisba vitele és ionizációja, ami több elven is megvalósulhat. Az ionizációs technikák közül az általam is használt elektroporlasztásos ionizációt (ESI) emelném ki, amely alkalmas biológiai makromolekulák méréséhez, és lehetővé teszi az MS nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiához (HPLC-hez) kapcsolását, mivel atmoszférikus nyomáson működik. A spray technika alkalmazása során a HPLC-ből jövő folyékony mintából inert gázzal (nitrogénnel vagy argonnal) porlasztva töltéssel rendelkező,

aeroszol cseppek keletkeznek. Innentől azért, hogy a molekulák más gázrészecskékkel ne ütközzenek, vákuumban haladnak tovább, ami elősegíti az oldószer párolgását is, így a cseppek méretének csökkenését és töltéssűrűségének növekedését. Az *analizátor*ban történik az ionok tömeg/töltés (m/z) hányados szerinti elválasztása, azaz csak a megfelelő m/z arányú ionok jutnak el a detektorba. Az egyik legelterjedtebb analizátor a hármas kvadrupól (QQQ), amit igen gyakran használnak ESI-vel kombinálva. A mérés eredménye az MS-spektrum, amin a csúcsok helye az m/z értéknek felel meg, a csúcsok intenzitása pedig arányos a bevitt anyagmennyiséggel (Damjanovich és Osváth 2007, Somogyi 2008).

3. Célkitűzések

A gyógyszerkutatások folyamatosan előtérben lévő területe a különböző gyógyszerformák kidolgozása a hatóanyagok minél hatékonyabb, mellékhatások nélküli célbajuttatása érdekében. Több évtizedes kutatások azt mutatják, hogy a liposzomális készítmények ígéretesek lehetnek az előző célok eléréséhez. Ezeknek a formulációknak a biofizikai, molekuláris biofizikai módszerekkel történő vizsgálatai ezért fontosak; a hatóanyagoknak a liposzómákkal való alapvető fizikai-kémiai kölcsönhatásainak megismerése az, ami választ adhat arra, hogy lehetséges-e majd a terápiás hatásokban kedvezőbb eredményeket elérni. A molekuláris mozgások, illetve rendezettség jellemzésére alkalmas módszer, többek között, az ESR spektroszkópia. Munkám során ezt a technikát alkalmaztam a liposzómák fluiditásának jellemzésére. A kötődési folyamatokat részben zéta-potenciál mérésekkel, részben elválasztási módszerek segítségével vizsgáltam. A tömegspektrometria nagy érzékenysége tette lehetővé, hogy a modell hatóanyagként választott lomefloxacin fotobomlását vizsgáljam.

Munkám során a következő célokat tűztem magam elé:

1. Az óriás egyrétegű/többrétegű liposzómák preparálási körülményeinek optimalizálása annak érdekében, hogy a minták alkalmasak legyenek spektroszkópiai vizsgálatokra.
2. A ciprofloxacin antibiotikum, mint modell hatóanyag bezárási körülményeinek optimálása különböző mérettartományú és rétegszámú liposzómarendszerekbe.
3. Koffein−liposzóma kölcsönhatás jellemzése ESR spektroszkópiai módszerrel, fizikai-kémiai tulajdonságok különbségének vizsgálata telített és/vagy telítetlen lipideket tartalmazó liposzómák esetén.
4. A fluorokinolon hatóanyagok egyik fontos képviselőjének (ciprofloxacin) kötődési és beépülési tulajdonságainak leírása különböző méretű és rétegszámú liposzómák esetén.
5. A hatóanyag-leadási kinetika és a hatóanyagoknak a liposzóma membránon keresztül történő permeabilitásának meghatározása és leírása egyszerű, dialízis mérések kiértékelésével.
6. Lomefloxacin fotostabilitásának meghatározása kombinált, liposzóma-ciklodextrin formulációk esetén.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok

A liposzómák előállításához használt tojáslecitint a Fluka AG-től (Buchs, Svájc), az L-α–dipalmitoil-foszfatidilkolint (DPPC), a dimirisztoil-foszfatidilglicerol nátrium sóját (DMPG), dioleoil-foszfatidilkolint (DOPC) és a szójalecitint (L-α-foszfatidilkolint) a Sigma Chemical Co-tól vásároltuk. A mikroszkópos felvételekhez a liposzómák membránjainak fluoreszcens festésére használtuk a LissamineTM rhodamine B-t, azaz az 1,2-dihexadekanoil-glicero-3-foszfoetanolamin trietanolamin sóját (Rhodamin), amit az Avanti Polar Lipids-től szereztünk be. Másik fluoreszcens jelölőnk a 2-(12-(7-nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazol-4-il)amino)dodecanoil-1-hexadecano-il-sn-glicero-3-foszfokolin (NBD C12-HPC, továbbiakban NBD) volt (Life Technologies, Magyarország, Budapest). A β-ciklodextrint (β-CD) és a 2-hidroxipropil-β-ciklodextrint (HP-CD) a Cyclolab Kft-től kaptuk. A preparáláshoz, illetve az oldatok készítéséhez használt kloroformot, metanolt, ciprofloxacin-hidroklorid monohidrátot (CPFX), koffeint, dinátrium-(etilén-diamin)-tetraacetátot (EDTA), szacharózt, Trizma® bázist és hidrokloridot (TRIS) a Sigma Chemical Co-tól szereztük be úgy, mint a dializáló cellulóz membránt (D9277) és a spinjelölőként használt 5-doxil-sztearinsavat (DOX-5). Az extrudáláshoz használt 50 és 100 nm-es pórusátmérőjű polikarbonát szűrőket a Schleicher&Schuell GmbH-tól (Dassel, Germany) vásároltuk. A különböző minták lipidkoncentrációját az EnzyChrom Phospholipid Assay Kit segítségével határoztuk meg (BioAssay Systems, USA). Liposzómák szűrésére a Pall Austria Filter GmbH termékét, a Nanosep centrifugacsövet használtuk. Minden kísérlet során deionizált, ultraszűrt vizet használtunk (Milli-Q system, Millipore, Magyarország). A zéta-potenciál mérésekhez DTS1061-típusú mérőcellákat (Malvern Instruments Ltd.) használtunk. A cella tisztítását Hellmanex 2%-os oldatával végeztük (Hellma Analytics GmbH Germany).

4.2. Törzsoldatok

4.2.1. GUV-minták készítéséhez

A lipideket kloroform: metanol 98:2 arányú keverékében oldottuk (általában 5-20 mg lipid/ml koncentrációban) és használatig -20 ^{o}C-on tároltuk. A különböző

méréstechnikák részben eltérő koncentrációjú lipidszuszpenziókat igényelnek. Az egyes mérési technikákhoz használt szűkebb koncentrációtartományt az adott mérés körülményeinek leírásakor részletezem. A liposzómákat tisztán tojáslecitinből vagy 90 mol% DPPC és 10 mol% DMPG keverékéből állítottuk elő. A hidráláshoz használt puffer 20 mM szacharózt, 0,1 mM EDTA-t és 20 mM TRIS-t tartalmazott, pH-ját kálium-hidroxiddal vagy sósavval állítottuk a kívánt értékre (pH 7,2 vagy 5,4). A CPFX oldatát mindig frissen készítettük: a hatóanyagot 0,5 mg/ml (~1,3 mM) koncentrációban oldottuk az előző pufferben, majd pH-ját 5,4-re állítottuk. Mivel a CPFX oldhatósága magasabb pH értékeken alacsonyabb, a 7,2-es pH-jú oldat előállításához a hatóanyagot először pH 5,4-es pufferben oldottuk, majd a további hígítást, a kívánt végkoncentrációig (0,15 mg/ml, ~0,4 mM), 7,2-es pH-jú pufferrel végeztük. A hígítás végén a pH-t ellenőriztük, szükség esetén 7,2-re korrigáltuk.

4.2.2. Lecitinből készített minták törzsoldatai

A lipidfilmek készítéséhez a tojás- és szójalecitint abszolút etanolban oldottuk, általában 20 mg/ml-es koncentrációban. A hidrálásához a 0,3 mg/ml koncentrációjú koffeinoldatot 10 mM foszfát pufferrel (PBS, pH 5,6) készítettük, majd pH-ját ellenőriztük és szükség esetén 5,6-ra állítottuk.

4.2.3. LMFX fotobomlásának vizsgálatához használt törzsoldatok

A 10 mM ciklodextrines oldatokhoz a β-CD-t vagy HPCD-t Milli-Q vízben oldottuk. A β-CD oldásának elősegítésére volt szükség, ezért az oldatot 10 percre ultrahangkádba helyeztük. Az LMFX oldatát mindig frissen készítettük 0,2 mM (~0,07 mg/ml) koncentrációban. Az LMFX-et Milli-Q vízben oldottuk, vagy a megfelelő ciklodextrin oldatában, hogy LMFX és CD komplex keletkezzen (BLX, HPLX oldatok). Az így keletkezett komplexeket tartalmazó oldatokban az LMFX: CD aránya 1:50 volt. A liposzómák előállításához használt lipidek, azaz a DPPC és a DOPC törzsoldatát kloroformmal készítettük.

4.3. Módszerek

4.3.1. Liposzómák előállítása

4.3.1.1. Óriás vezikulák (GUV-ok) előállítása

Az irodalomban fellelhető különböző előállítási módokat több szempontból vizsgáltuk. Olyan módszert kerestünk, amely viszonylag gyors, fiziológiás körülmények között (pH, hőmérséklet, ionerő) kivitelezhető, és lehetőséget ad a későbbiekben speciális körülményeket igénylő anyagok, pl.: fehérjék, bezárására. Ezek mellett szempont volt, hogy könnyen kezelhető, így kellően nagy térfogatú és töménységű, többségében unilamelláris és több μm átmérőjű liposzómákat kapjunk. Előzőek miatt a GUV-ok előállításához Akashi és mtsai protokollját vettük alapul (Akashi és mtsai 1998, 1996). A lipid kívánt mennyiségének (lsd. Eredmények fejezetben, az adott kísérleti körülményeket) megfelelő törzsoldatból a szerves oldószert argon gázzal távolítottuk el egy kémcső falán vékony lipidfilmet hozva létre. Ezt követően a kémcsövet hidrálásig, de legalább 3 órára vákuumba helyeztük, hogy az esetleg visszamaradt szerves oldószert is eltávolítsuk. A képződött lipidfilmet 30 percre kb. 50 ^{o}C-os párakamrába helyezve „előhidráltuk”, majd óvatosan 5 ml temperált puffert, Mg^{2+}, Ca^{2+} vagy CPFX oldatot tettünk a kémcsőbe. A preparátumot az adott lipid fázisátalakulási hőmérséklete (T_m) fölött tartottuk minimum három órán át, illetve maximum egy éjszakán át: tojáslecitin esetén ~35 ^{o}C-on, DPPC/DMPG (90/10 mol%) esetén 50 ^{o}C-on. A preparátum hőmérsékletét lassan, kb. egy óra alatt csökkentettük vissza szobahőmérsékletre. A keletkezett óriás vezikulák egy opálos lipidfelhőt alkottak a folyadékoszlop közepén, amit pipettával 600 μl térfogatban vettünk ki, majd óvatos homogenizálást követően ebből 400 μl-t tettünk dializáló hártyába; a fennmaradó részt használtuk a mikroszkópos felvételek készítéséhez és a lipidkoncentráció meghatározásához.

4.3.1.2. Multilamelláris vezikulák (MLV) előállítása

MLV-t vékonyréteg hidratációs technikával állítottunk elő (Budai és mtsai 2007). A lipidfilm hidrálása során a minta hőmérsékletét az aktuálisan használt lipid fázisátalakulási hőmérséklete (T_m) fölött tartottuk. A preparátumok végső koncentrációja lipidre nézve 1-5 mg/ml (1-7 mM) volt. A minta homogenizálását ötszöri „fagyasztás-olvasztással” végeztük folyékony nitrogént és forró vizet (kb. 80 ^{o}C)

használva. Tapasztalataink szerint a minták egy hosszabb idejű, kvázi-stacionárius állapotot a preparálást követő egy nap után érnek el, ezért méréseinket ezt figyelembe véve végeztük.

A LMFX bomlásának vizsgálatához készített mintákat szobahőmérsékleten fénytől védve tartottuk és az esetleges bomlás minimalizálása érdekében nem vetettük alá a fenti nitrogénes homogenizálási eljárásnak.

4.3.1.3. Kis unilamelláris vezikulák (SUV) előállítása

SUV előállítása frissen preparált MLV-ből ultrahangozással történt Szabó és mtsai által is alkalmazott módszert alapul véve (Szabó és mtsai 2004), vagy extrudálással. Az MLV-t egy Soniprep 150 készülékben ultrahangoztuk 8 μm-es rezgés amplitúdóval (150 W, 23 kHz) 2 x 10 percig, közte 10 perc szünetet tartva, majd az ultrahangfejről esetlegesen származó szennyezések miatt a mintát centrifugáltuk (8340g, 15 perc) és a további vizsgálatokhoz a SUV-okat tartalmazó felülúszót használtuk. Extrudálás során az MLV mintákat 21-szer, majd 41-szer nyomtuk át először 100, majd 50 nm-es pórusátmérőjű polikarbonát szűrőn, 40 ^{o}C-ra termosztált extrúderrel.

4.3.2. Konfokális mikroszkópia

A minták vizsgálatához egy Axio Observer Z.1 inverz mikroszkópot használtunk, mely az LSM 710 Confocor 3 rendszer része (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). A Confocor 3 rendszer három lézerrel felszerelt: Ar-Lézer (458/477/488/514 nm, 25 mW), HeNe Lézer (633 nm, 5 mW), illetve HeNe Lézer (543 nm, 1mW). Az 543 nm-en gerjesztett Rhodamin B által kibocsátott fluoreszcens jelet 555-693 nm között detektáltuk. Az NBD-vel jelölt mintákat 458 nm-en gerjesztettük, a detektálás 555-693 nm között történt. Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objektívet használtunk. A fluoreszcensen jelölt liposzómák preparálása során a Rhodamin B vagy az NBD és a lipidek kloroformos oldatát a filmkészítés előtt elegyítettük úgy, hogy a festékmolekulák mólaránya a lipidmolekulákéhoz viszonyítva általában 1: 1000 (0,1 mol%), vagy annál kisebb legyen.

4.3.3. Lipidassay

A lipidkoncentráció meghatározásának leginkább a dialízisre kerülő, homogenizált GUV-ok esetén volt szerepe. Az általunk vásárolt lipidassay egy enzimes bontás során szabaddá teszi a kolin-csoportokat, melyek így a 4-amino-pirin festékmolekulával lila, spektrofotometriásan kvantitatívan mérhető komplexet alkotnak.

Tojáslecitin esetében a lipidassay gyártója által kiadott protokollt alkalmaztuk. DPPC-ből előállított minták esetén a DPPC magasabb T_m értéke (>40 ^oC) miatt, a mintákat a kimutatási készlet tritonos pufferével keverve 70 ^oC-on tartottuk 30 percig. Így a vezikulák hatásosabban szétestek és ezért a fejcsoportok a bontóenzimek számára hozzáférhetőbbé váltak. Az enzimek hozzáadása a mintához szobahőmérsékleten történt. A lipid koncentrációját a gyártó előírása szerint spektrofotometriásan mértük 585 nm-en.

4.3.4. ESR spektroszkópia

A liposzómák spektrumának hőmérsékletfüggését egy EMX6 Bruker X-sávú, online spektrométerrel vizsgáltuk. Minden mérés során négy pásztázást végeztünk 168 s-os pásztázási valamint 81,9 ms-os konverziós idővel. A spektrumokat 100 gauss mérési ablakban 2048 pontban regisztráltuk. A minták hőmérsékletét egy speciális hőmérsékletszabályozóval +/- 0,1 ^oC pontossággal tudtuk beállítani.

A CPFX-tartalmú liposzómaminták mérése 20 mW mikrohullámú teljesítmény mellett 1,5 gaussos modulációs amplitúdóval történt 15 és 50 ^oC között, míg a koffeines szója- és tojáslecitines minták esetében ezek a paraméterek 2 mW, illetve 1 gauss értéket vettek fel 2 és 50 ^oC között mérve.

A bezárt hatóanyagoknak a lipidekre kifejtett hatását a poláris fejcsoportok és a hidrofób láncok határán akartuk vizsgálni, emiatt a minták spin jelölésére DOX-5-öt használtunk, amit a liposzómák preparálása során a lipidekkel együtt a szerves fázisban oldottunk. A CPFX-ről tudtuk, hogy az irodalom szerint a liposzómák ezen régiójába, a membránba beépül (Bensikaddour, Fa, és mtsai 2008, Budai és mtsai 2007) és a koffein hatását is ebben a régióban kívántuk vizsgálni. A jelölő- és lipidmolekulák mólaránya 1:100 volt. A minták 25 μl-ét egy 1,5 mm belső átmérőjű kapillárisba tettük, majd centrifugáltuk (1800 g, 3 perc). GUV-ok esetén a nagyobb vezikulakoncentráció és

jelerősség elérése érdekében a mintákat eleve a GUV-ok által formált „felhőből" vettük (lsd. 4.3.1.1.).

4.3.5. Zéta-potenciál mérése

A zéta-potenciál mérését a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) készüléken végeztünk SUV-okon, mivel a készülék csak a nanométeres mérettartományban képes a zéta-potenciál pontos mérésére. Minden minta zéta-potenciál értéke legalább 3 párhuzamos, 25 ^{o}C-on végzett mérés eredményéből adódik. A mintákban mindig 1 mg/ml (~1,4 mM) lipidkoncentrációt állítottuk be a vizsgált CPFX, koffein, a megfelelő kétértékű kation törzsoldatával vagy pufferrel hígítva. A vizsgált maximális CPFX koncentráció 1,17 mM (0,45 mg/ml) volt pH 5,4-en, míg pH 7,2-n 0,35 mM (0,135 mg/ml) volt a CPFX alacsonyabb oldhatósága miatt. A zéta-potenciál Ca^{2+}-függését 0-100 mM, a Mg^{2+} hatását 0-50 mM közötti koncentrációtartományban vizsgáltuk. A koffein lipidvezikulák zéta-potenciáljára gyakorolt hatását 45 mM-ig (9 mg/ml) mértük.

A kiértékelés során azt vettük alapul, hogy egy felület borítottsága (Θ) felírható az adott ionkoncentráció mellett kötődött és a maximálisan adszorbeálható mennyiség hányadosaként. Ez a hányados az ionkoncentráció (C) függvényében a Langmuir-Hill egyenlettel, vagy más néven Langmuir-Freundlich izotermával írható le:

$$\theta = \frac{(K_a C)^n}{1+(K_a C)^n} \qquad [2]$$

ahol K_a az adszorpciós vagy kötődési állandó (attól függően, hogy adszorpciót vagy kötődést írunk le), ***n*** a Hill-koefficiens, kooperativitási tényező vagy az energia-eloszlásfüggvény szélességét jellemző heterogenitási paraméter (ismét attól függően, hogy milyen folyamatot írunk le) (Limousin és mtsai 2007).

Mivel a kationok kötődését a negatív töltésű foszfolipid fejcsoportokhoz elektrosztatikus erő hajtja, a borítottság és így az adszorpció jellemezhető a különböző kation-koncentrációk hatására bekövetkező zéta-potenciál mérésével a következő egyenletet alkalmazva:

$$\Delta\zeta = \frac{\Delta\zeta_{max}(K_a C)^n}{1+(K_a C)^n} \qquad [3]$$

A kísérleti pontokhoz nem-lineáris regresszióval illesztettem görbéket Origin szoftvert használva.

4.3.6. Kötött CPFX arányának meghatározása

500 µl liposzóma szuszpenziót 10 kDa-nál vágó szűrőbetéttel ellátott Eppendorf csőben centrifugáltunk (8340g, 20 perc). A keletkező, lipidmentes szűrletet olyan mértékben hígítottam, hogy spektrofotometriás mérése során az abszorbancia 1 körüli értéket adjon. A minták CPFX tartalmát spektrofotometriásan határoztuk meg a 250 és 400 nm között, az Unicam UV 500 készülékkel felvett spektrumok alapján. A koncentráció-meghatározást az általunk 344 nm-nek meghatározott izobesztikus pontban végeztük, így számításunkat függetleníteni tudtuk a pH esetleges változásától. Minden mérési sorozat esetén felvettünk egy legalább 7 pontból álló kalibráló egyenest, mely tartalmazta a dialízis során várható koncentrációtartományt. A moláris extinkciós koefficiens (ε) 5.451 ± 0.055 mM^{-1}•cm^{-1} -nek adódott.

GUV-ok esetén a ~500 µl mintát a képződött „GUV-felhőt” kivéve a kémcsőben maradt oldatból vettük, hogy csökkentsük a szűrő eltömődésének esélyét.

Az összmennyiségre vonatkoztatott kötött CPFX arány kifejezhető az $(n_{B,L}/n_o)$ vagy az $(1 - c_{o,L}/c_o)$ formulával, melyben a $c_{o,L}$ illetve c_o a CPFX koncentrációja a liposzómaminta szűrletében, azaz a vizes fázisban, illetve a kiindulási oldatban. Hasonlóan, $n_{B,L}$, illetve n_o a kötött, illetve összes CPFX mennyiség.

4.3.7. Hatóanyag-felszabadulás vizsgálata egyensúlyi dialízissel és annak kiértékelése

Irodalomi adatok azt mutatják, hogy a hatóanyagoknak a liposzómákból történő felszabadulását alapvetően három módszer alkalmazásával határozzák meg: 1.) centrifugálással megfelelő pórusátmérőjű szűrő segítségével; 2.) nagysebességű centrifugálással a liposzómák „leültetésével”; 3.) kizárásos gélszűréssel. Mindhárom esetben eltávolítják a liposzómákat a szuszpenzióból, és a szűrleményben mérik a hatóanyag koncentrációját. Ezek az elválasztási műveletek, amiket kisebb vezikulák esetén a mindennapi rutinban alkalmaznak, a GUV-ok esetén akadályokba ütköznek. Centrifugálás során az óriás vezikulák sérülhetnek, mivel a külső fázis és a GUV-ok közti csekély sűrűségkülönbség következtében a teljes elválasztás csak túlságosan nagy

centrifugális gyorsulás révén lenne lehetséges. A méretkizárásos kromatográfia során az oszloptöltetet fenntartó szűrő pórusátmérője egy nagyságrendbe esik a GUV-ok méretével, így a szűrő a pórusátmérőjétől függően módosíthatja azok méreteloszlását. A bekezdés elején megadott lehetőségek közül a kötött CPFX koncentrációját az első módszert alkalmazva határoztuk meg. A hatóanyag felszabadulásának kinetikai vizsgálatára azonban a fenti szempontok miatt egyensúlyi dialízist alkalmaztunk anélkül, hogy a liposzómákba be nem záródott hatóanyagot elválasztottuk volna.

Az egyensúlyi dialízist szobahőmérsékleten végeztük. A mintákat (400 μl) 12 kDa molekulatömegnél vágó dializáló hártyába tettük. Dializáló közegként megfelelő pH-jú Tris puffert használtunk, amely kiindulási térfogata 50 ml volt. A külső térből adott időközönként 400 μl-t vettünk, s a minták abszorbanciáját mérve határoztuk meg a dialízis során szabaddá váló hatóanyag mennyiségét. Annak érdekében, hogy mérési módszerünk pontosságát ellenőrizzük, ismert koncentrációjú, lipidmentes CPFX-oldatot dializáltunk, és a mért eredmények alapján számoltunk vissza a dializáló membránban kiinduláskor jelenlévő CPFX mennyiségére. Ez a számolt érték a mérési hibahatáron belül minden esetben megegyezett a tényleges mennyiséggel. Méréseink, illetve a kiértékelés pontosságának növelése érdekében, minden liposzóma minta mérésével párhuzamosan kontroll CPFX-oldatot is dializáltunk.

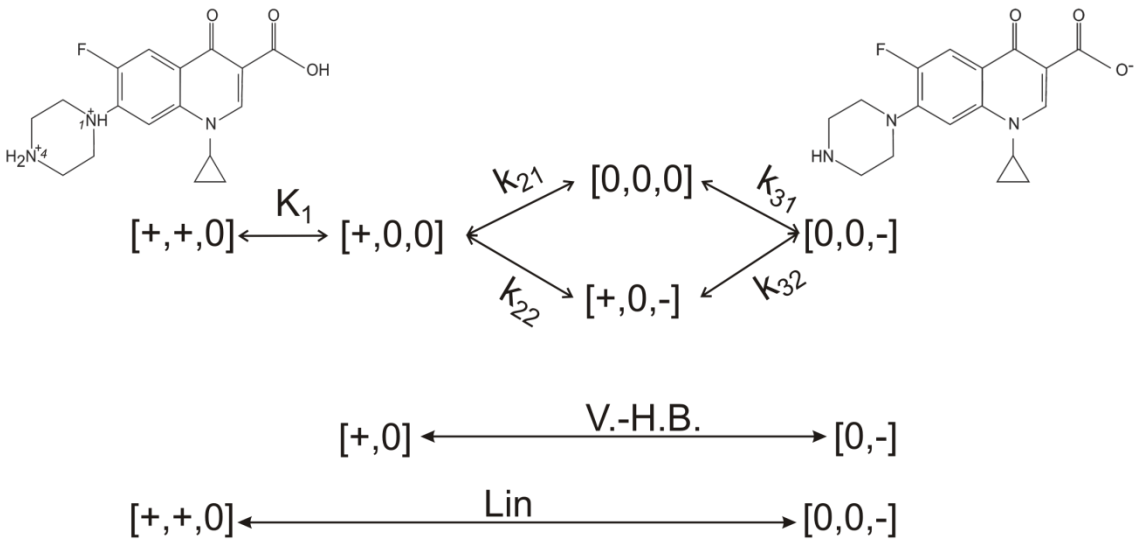
A GUV-okat a preparálás végén nem homogenizáltuk, így — az MLV vagy SUV preparátumokkal szemben — az inhomogén mintavételezés miatt minden esetben meghatároztuk a dializáláshoz használt minták lipidkoncentrációját. A dialízis leírására a következőkből indultunk ki. Jelölje $n_{A,L}$ és $n_{A,o}$ a hatóanyag mennyiségét a liposzóma minta, illetve a lipidet nem tartalmazó CPFX-oldat *alikvot* részletében. A hatóanyag mennyisége a liposzomális mintákban ($n_{A,L}$) egyenlő a szabad és a kötött hatóanyag mennyiségének ($n_{A,F}$ és $n_{A,B}$) összegével, ahol a szabad hatóanyag a liposzómákon belüli és azokon kívüli vizes térben lévő molekulákat jelenti. Az általunk használt lipidkoncentráció mellett a lipidfal térfogata elhanyagolható az oldat térfogatához képest, így a mintarészlet vizes térfogatában lévő szabad és a kiindulási törzsoldat hatóanyag hányada adott kötési állandó mellett konstans: $c_{o,L}/c_o$. Másrészről, a mintarészletben a kötött hányad függ a mintarészlet és a teljes preparátum lipidkoncentrációjának arányától: $c_{L,A}/c_{L,S}$. Ezeket figyelembe véve kapható:

$$\frac{n_{A,L}}{n_{A,o}} = \frac{c_{o,L}}{c_o} + \frac{c_{L,A}}{c_{L,S}} \cdot \frac{n_{B,L}}{n_o} \qquad [4]$$

ami megadja a dializáló hártyában lévő mintarészletben és a lipidet nem tartalmazó CPFX-oldatban lévő hatóanyag arányát. $n_{B,L}/n_o$ a CPFX-kötődési együtthatója volt (lsd. 4.3.6.). MLV-k esetén, ahol a mintavétel homogén volt, a $c_{L,A}/c_{L,S}$ arány 1, így $n_{A,L}/n_{A,o}$ is 1. A GUV-ok inhomogén mintavételezése miatt az $n_{A,L}/n_{A,o}$ tört egynél nagyobb értéket is felvehet. Inhomogén mintavételnél a dializáló hártyában lévő mintarészletben meghatározott lipidmennyiségből számolható az $n_{A,L}/n_{A,o}$ maximális értéke. Ez az az érték, ami vonatkoztatási mennyiségként szolgál a GUV-okból történő felszabadulás kinetikájának leírásakor. A dializáló puffer abszorbanciájának mérését követően határoztuk meg annak CPFX-tartalmát, majd a [4] egyenlet felhasználásával számoltuk a leadott CPFX relatív mennyiségét.

4.3.8. A CPFX mikrospeciációinak számolása az egyes pH-értékeken

A CPFX mikrospeciációinak koncentrációarányát a méréseimben alkalmazott két pH-értéken, 5,4-en és 7,2-n számoltam ki, az irodalomban javasolt disszociációs konstansok felhasználásával. A CPFX állapotainak vizsgálatára kétféle mikrospeciációs sémát találtunk az irodalomban, ezeket összesítve a 10. ábra mutatja (Lin és mtsai 2004, Vázquez és mtsai 2001, Volgyi és mtsai 2012).



10. ábra A CPFX mikrospeciációs állapotai és a folyamatokra jellemző állandók. Zárójelekben a töltések jelölve, a nyilakkal szemléltettem a Vázquez-H-Borrell- (V.-H-B.) és a Lin-féle deprotonációs sémát.

Vázquez és munkacsoportja fluoreszcens technikával vizsgálta a piperazinil gyűrű 4. atomjának és a karboxil-csoportnak, azaz két csoportnak, deprotonálódását (Vázquez és mtsai 2001). Lin és csoportja a karboxil-csoport és a piperazinil-gyűrű 4. atomja mellett a gyűrű 1. pozíciójában lévő csoport deprotonálódását is vizsgálta elektroforetikus mobilitás alapján (Lin és mtsai 2004).

Az eredmények között ismertetem a két séma alapján általam számolt értékeket, amiket a CPFX kötődésének, illetve a mért zéta-potenciálok értelmezésére használok fel.

4.3.9. Koffein bezárási hatásfokának meghatározása

Frissen előállított 10 mg/ml-es lipidkoncentrációjú MLV 400 µl-ét 11000g-n 20 percig centrifugáltuk egy 10 kDa-nál vágó szűrőn keresztül. A lipidmentes szűrlet, azaz a liposzómapreparátum vizes fázisának koffeinkoncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg (273,6 nm) Unicam 2 UV/VIS spektrofotométerrel ($\varepsilon_{273,6}$=10089 $M^{-1}cm^{-1}$). A bezárási hatásfok számolásához a hidráláshoz használt 0,3 mg/ml-es koffeinoldat abszorbanciáját vettük 100 %-nak és az 2.4.3.1. fejezetben megadott képletet használtuk.

4.3.10. Liposzómák UV-besugárzása

Az UV besugárzáshoz kétféle fényforrást használtunk. UV-B forrásként egy széles spektrumú Westinghouse FS-20-as csővel és Schott WG-305 típusú szűrővel felszerelt forrás állt rendelkezésünkre. UV-A fényforrásként T-15.L fluoreszcens csövekkel felszerelt, Vilber-Lourmat UVA besugárzót használtunk. (A lámpák adatait az 1. táblázat tartalmazza.) A mintákat 3 ml-es, 1 cm úthosszú, kvarc küvettában sugároztuk be. A minták hőmérsékletét folyamatosan ~20 ^{o}C-on tartottuk, amire különösen a hosszabb idejű UV-A sugárzás során volt szükség. A besugárzási dózist és az intenzitást CX-312 és CX-365 érzékelőkkel a besugárzás alatt folyamatosan követtük. Az alkalmazott legnagyobb besugárzási dózis az UV-B tartományban ~20 kJ/m^2, UV-A-ban ~200 kJ/m^2 volt. Az átlagos besugárzási teljesítmény ~1 mW/cm^2 illetve 4 mW/cm^2 volt, az UVB illetve UVA lámpák esetén. Megfelelő időpontokban, a kívánt dózist elérve, 100-100 µl-es részleteket vettünk műanyag Eppendorf-csövekbe, amiket a további mérésekig, maximum egy-két napig, –20 ^{o}C-os hűtőben tároltuk.

1. táblázat UV fényforrások adatai

fényforrás	UVB sugárzó FS-20	UVA sugárzó VL-UVA, T-15.L
a spektrális járulék 250-320 nm között (%)	41,9	1,11
a spektrális járulék 320-400 nm között (%)	58,1	98,9
jellemző besugárzási teljesítmény (mW/cm^2)	1,0 (312 nm)	4,0 (365 nm)

4.3.11. UV-A és UV-B sugárzásra vonatkozó bomlási sebességi együtthatók meghatározása

Mivel a két általunk használt fényforrás emissziós spektrumában különböző az UV-A és UV-B sugárzás relatív aránya ($w_{UVA,lámpa}$, $w_{UVB,lámpa}$), az egyes lámpákkal történt besugárzás után meghatározott sebességi állandók (k_1, k_2) ismeretében kiszámolhatjuk a két UV-tartományra külön-külön jellemző sebességi állandókat ($k_{D,UVA}$, $k_{D,UVB}$). A következő egyenlettel az UV-B sugárzásra vonatkozó reakciósebességi állandó számolható (hasonló egyenlet adható meg az UV-A tartományra is):

$$k_{D,UVB} = \frac{k_1 \cdot w_{UVA,VLUVA} - k_2 \cdot w_{UVA,FS20}}{w_{UVB,FS20} \cdot w_{UVA,VLUVA} - w_{UVB,VLUVA} \cdot w_{UVA,FS20}}.$$

Az LMFX abszorpciójának a két UV-tartomány közötti megoszlását ($r_\varepsilon = \varepsilon_{UVB}/\varepsilon_{UVA}$) az LMFX normált abszorpciós spektruma alapján határoztuk meg. Ehhez frissen készített 0,2 mM (~0,07 mg/ml) koncentrációjú LMFX vizes oldatának abszorpciós spektrumát vettük fel 250 és 400 nm között, 0,1 nm-es lépésközökkel a Unicam UV 500 készülékkel.

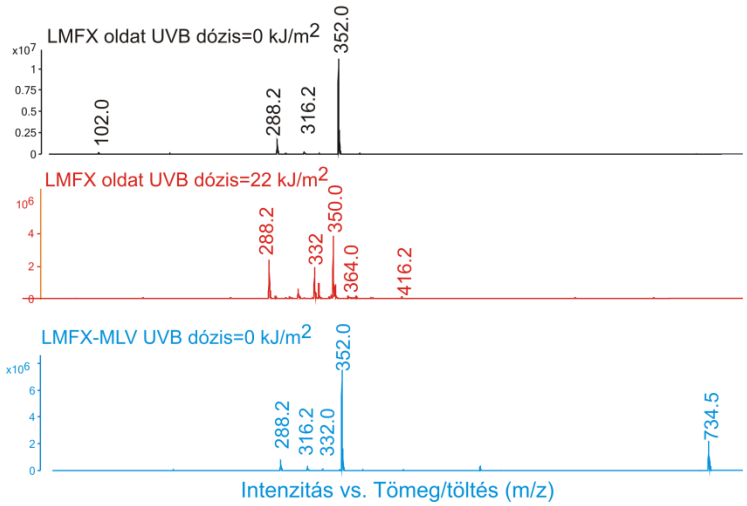
4.3.12. Tömegspektrometriás mérések (MS) és kiértékelésük

Az LMFX-bomlástermékek arányának meghatározásához egy Agilent 1260 HPLC-vel kapcsolt 6460 QQQ tömegspektrométert használtunk. Az injektált mintatérfogat 15 µl volt. Az eluens acetonitril és Milli-Q víz 50:50 elegye volt 0,5 és 1 ml/perces áramlási sebességgel. A HPLC mintabevivő rendszerként működött.

Az MS elektroporlasztásos (ESI) ionforrásának hőmérséklete 300 ^{o}C volt. Porlasztó („nebulizer”) és szárító gázként nitrogént használtunk (35 psi, 13 l/perc). A „sheatgas” áramlási sebessége 11 l/perc volt. A kapilláris- és a fragmentor feszültség 4000 és 50 V-ra lett beállítva, hogy az UV-besugárzás eredményeként megmaradt, illetve keletkezett LMFX molekulákat és a bomlástermékeket detektáljuk, azok további

bomlást az MS-ben ne szenvedjenek. A kvadrupól pozitív módban, 50 és 1000 m/z értékek között detektált. Néhány reprezentatív példát mutat be a 11. ábra.

A minták fagyasztása során néhány esetben a β-CD aggregációját vettük észre. Ezeket a mintákat vortexes rázatás után centrifugáltuk (2000g, 3 perc), majd a felülúszóból injektáltunk. (Feltételezzük, hogy ettől az egyes bomlástermékek aránya a felülúszóban nem változott.) A mért adatok kiértékelését Excel segítségével végeztük. Előkísérleteink alapján az m/z = 50 − 60 tartományban nem kaptunk MS-amplitúdókat egyik komponenstől (lipid, LMFX, ciklodextrin) sem. Így a továbbiakban ezt a tartományt használtuk fel az egyes spektrumok háttértartományának. Az analízis során az MS-spektrumok azon csúcsait vettük figyelembe, amelyek a detektálási határnál nagyobbak voltak, a kisebbeket elhanyagoltuk. A detektálási határ (háttérzaj+3*SEM) meghatározásához minden spektrumon az 50-től 60-ig terjedő m/z tartomány intenzitásértékeinek átlagát és standard hibáját (SEM) számoltuk ki. Az egyes komponensekre (LMFX, lipid, CD) jellemző csúcsok közül azok változását követtük, amelyek nem mutattak átfedést másik komponens csúcsaival.



11. ábra LMFX oldat és DPPC MLV-be zárt LMFX tömegspektruma UV-B besugárzás előtt és után. (m/z=352 LMFX, m/z=734 DPPC)

Az LMFX bomlási folyamatainak kiértékeléséhez a lomefloxacin jellemző csúcsainak relatív arányát határoztuk meg a besugárzási dózis függvényében. A relatív arányok alapján határoztuk meg az egyes bomlási folyamatok sebességi állandóját (k_D). Ehhez a mérési pontokat az Origin-szoftver segítségével kétféle függvénnyel

illesztettük: a bomlási folyamatok leírására leggyakrabban használt exponenciális, és a Weibull-függvénnyel. Utóbbi képletét a [5] mutatja.

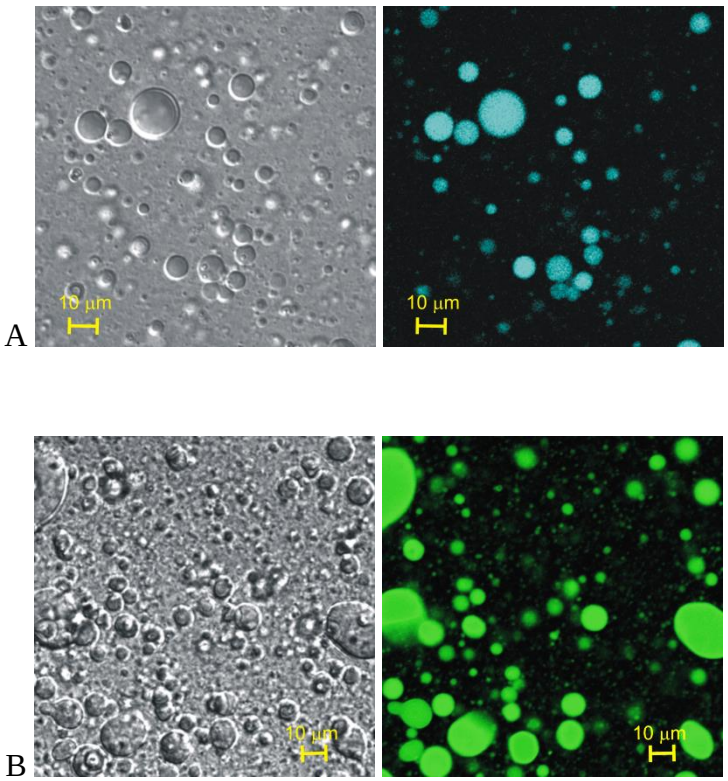
$$y = y_{vég} - \left(y_{vég} - y_0\right)e^{-(k_D D)^a}, \qquad [5]$$

ahol y_0 és $y_{vég}$ az adott m/z értékű bomlástermék kezdeti és végső illesztett relatív aránya, ***a*** pedig a Weibull-függvény alakparamétere. Számításaink alapján, utóbbi értéke 0,9 és 1,6 közötti volt, vagyis a folyamat egyes esetekben gyorsabb, máskor lassabb volt, mint amilyen a közönséges exponenciális függvénnyel lett volna. A kétféle illesztés közötti különbség az alacsonyabb dózisértékeknél kifejezettebb volt. A dolgozatban a Weibull-függvénnyel kapott k_D értékeket hasonlítom össze, mivel a mérési, és az illesztett pontok között minden esetben a Weibull-függvényt alkalmazva kaptunk jobb egyezést, azaz nagyobb regressziós együtthatót és kisebb χ^2 értéket.

5. Eredmények

5.1. Az óriás (unilamelláris) vezikulák előállításának optimális körülményei

Bár az óriás unilamelláris vezikulák előállítására több különböző módszer ismert az irodalomban (Akashi és mtsai 1996, Kim és Martin 1981, Moscho és mtsai 1996, Niles és Cohen 1987), még a legutóbbi időkben is újabb és újabb technikákat dolgoznak ki (Juhasz és mtsai 2012, Lamblet és mtsai 2008, Peterlin és Arrigler 2008, Pott és mtsai 2008, Richmond és mtsai 2011). A preparálási módszerek között, fordított fázisú (Moscho és mtsai 1996), óvatos („gentle") hidrálási (Akashi és mtsai 1998, 1996, Kim és Martin 1981, Niles és Cohen 1987, Rodriguez és mtsai 2005), elektroformációs (Juhasz és mtsai 2012, Lamblet és mtsai 2008, Peterlin és Arrigler 2008, Pott és mtsai 2008, Rodriguez és mtsai 2005), valamint mikro-injektálásos technikák is megtalálhatók (Fischer és mtsai 2000, Richmond és mtsai 2011).



12. ábra Fordított fázisú rotációs vákuum elpárolással előállított minták transzmissziós (bal) és fluoreszcens (jobb) képei. 0,01 mol%-ban Rhodaminnal jelölt szójalecitin (A) és 0,1 mol%-ban NBD-vel jelölt tojáslecitin (B) (pH 8,2).

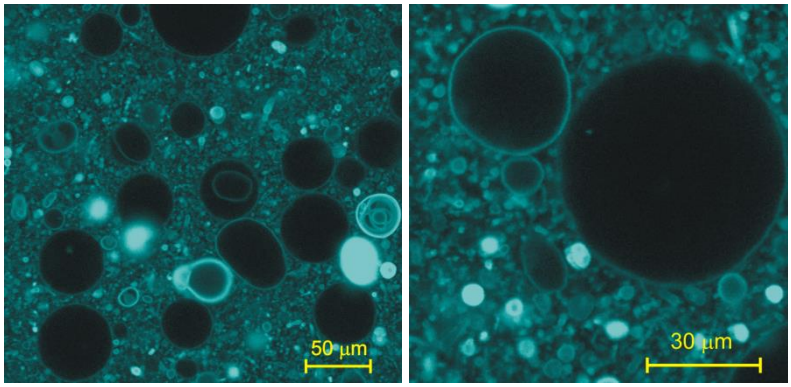
Az irodalmi adatok alapján ígéretesnek tűnt, a spektroszkópiai követelményeket szem előtt tartva, a fordított fázisú módszer (Moscho és mtsai 1996), mert egyszerű, gyors és elegendően nagy mennyiségű liposzóma kinyerését tette volna lehetővé. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételeink azonban arra utaltak, hogy a különböző kísérletekben leggyakrabban használt lipidekkel dolgozva, *a minta nagyon inhomogén*.

Az inhomogenitás mind a méreteloszlásra, mind pedig a kialakuló vezikulák szerkezetére vonatkozóan fennállt. Konfokális felvételeim egyértelműen bizonyították azt, hogy a szerves oldószer elpárolása után, a nagyobb átmérőjű liposzómák túlnyomó többsége 1−20 mikrométeres átmérőjű „lipidgömböcske" (12. ábra).

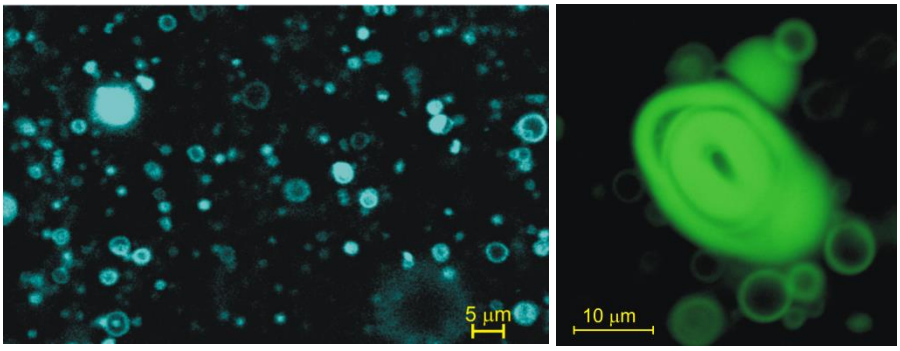
Az óvatos hidrálási technikával sikerült kellően tömény mintát előállítanunk, ami nagy átmérőjű — tojáslecitin preparátumok esetén — akár 50-60 μm-es, GUV-okat is nagy számban tartalmazott. Különböző pH-értékek mellett előállított mintákat vizsgálva azt tapasztaltam, hogy magas pH-értéken (pH 9 fölött) képződnek a legnagyobb számban a nagyobb méretű vezikulák. Azonban a fiziológiás körülményeknek jobban megfelelő, alacsonyabb pH-értékeken is jó minőségű mintákat sikerült előállítani (13. ábra). Az általam vizsgálni kívánt 7,2-es és a bőr pH-értékét megközelítő 5,4-es pH-értéken csak a GUV-ok által alkotott felhők szerkezetében, tömörségében láttam különbséget, azonban a homogenizálás és hígítás után a mikroszkópos képeken a GUV-ok méretében és szerkezetében nem. A saját pufferükkel hígított minták nagyított képein megbizonyosodtunk arról, hogy a kisebb, 2-3 μm-es vezikulák is vizes fázist zárnak be, azaz GUV-ok (14. ábra). Megjelentek az irodalomban is megfigyelt „GUV-a-GUV-ban", lipid-pányva (tether) szerkezetek. (A disszertációmhoz mellékelt kiegészítő fájlokban mutatok be a különböző preparálási módszerekkel előállított mintákban megfigyelt nagyméretű multilamelláris szerkezeteket, amelyeken a GUV-ok és az MLV-k közötti jellemző szerkezeti különbségek is jól láthatók.)

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a kétértékű kationok koncentrációja, a semleges vagy töltéssel rendelkező lipidek, továbbá pl. a szacharóz jelenléte befolyásolja a GUV-ok kialakulását és szerkezetét: pl. neutrális POPC-ből előállított liposzómák esetén 1-10 mM Ca^{2+} vagy Mg^{2+}, illetve negatív töltést hordozó lipid jelenléte növelte az óriás liposzómák számát. A megfelelő koncentrációban bevitt azonos előjelű töltés következtében a lipidrétegek között fellépő elektrosztatikus taszító

erő stabilizálta az egyrétegű szerkezetet és gátolta az aggregációt (Akashi és mtsai 1998, 1996).



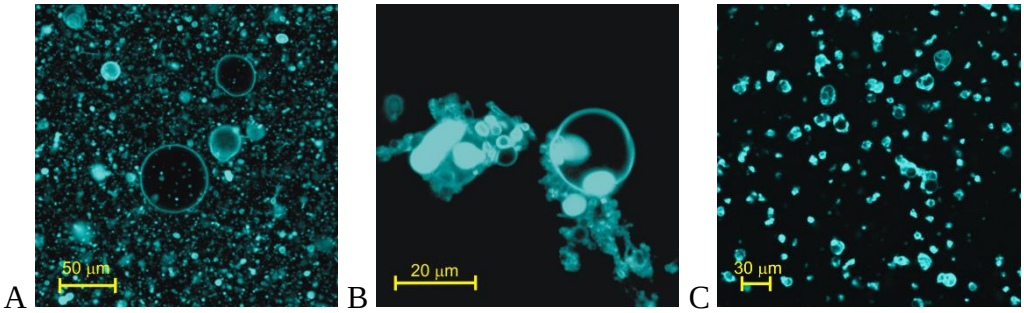
13. ábra Tojáslecitin GUV-ok (0,1 mol% Rhodamin).



14. ábra A fenti (13. ábra) tojáslecitinből előállított kontroll minta részlete hígítva (0,1 mol% Rhodamin pH 7,2). A jobboldali kép egy MLV szerkezetet mutat (NBD jelölés)

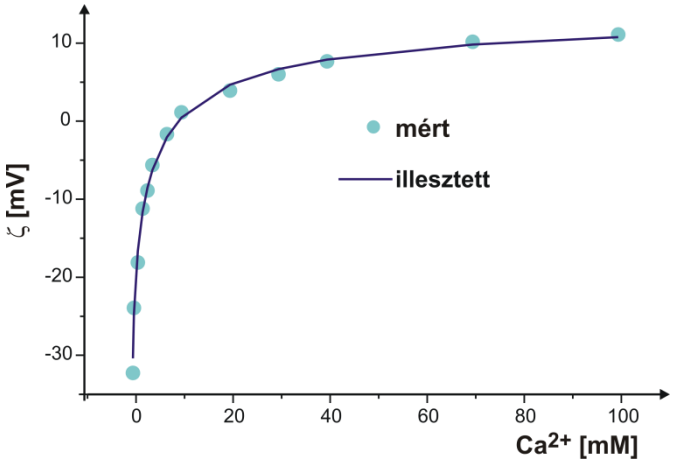
A természetes eredetű lecitinek alkalmazása több szempontból is kedvezőbb egy későbbi liposzomális készítmény üzemi vagy félüzemi méretű előállítása esetén. Fázisátalakulási tulajdonságuk közel áll a DOPC, POPC rendszerekéhez, amennyiben telítetlen, többkomponensű lipidekből álló rendszer lévén alacsony az olvadáspontjuk, azonban a természetes lipid előállítása sokkal egyszerűbb, mint a nagy tisztaságú, esetleg szintetikus lipideké, így áruk is sokkal kedvezőbb. A későbbiekben bemutatott ESR spektroszkópiai eredményeik alapján nem rendelkeznek éles fázisátalakulási hőmérséklettel, fluiditásuk már szobahőmérsékleten is a folyékony fázisnak megfelelő. Munkám során ezért elsősorban szója- és tojáslecitint használtam a GUV-ok előállítására. Az előzőekben bemutatott indoklás alapján megvizsgáltam, hogy az

általam alkalmazott rendszerben, milyen Ca^{2+}-koncentráció kedvez a GUV-ok előállításának. Ehhez $CaCl_2$-ot különböző koncentrációkban (0,5, 1, 3, 5, 10 mM) tartalmazó hidráló pufferrel előállított mintákat készítettem. A mikroszkópos képeken ebben az esetben 3 mM és az annál nagyobb Ca^{2+}-koncentrációknál tapasztaltam a vezikulák aggregációját, ahogy azt a 15. ábra A és B képe mutatja. $CaCl_2$-ot kívülről adva a mintához szintén tapasztaltuk a vezikulák gyors, a mikroszkóp alatt is követhető csoportosulását, aggregációját (15. ábra, C kép).



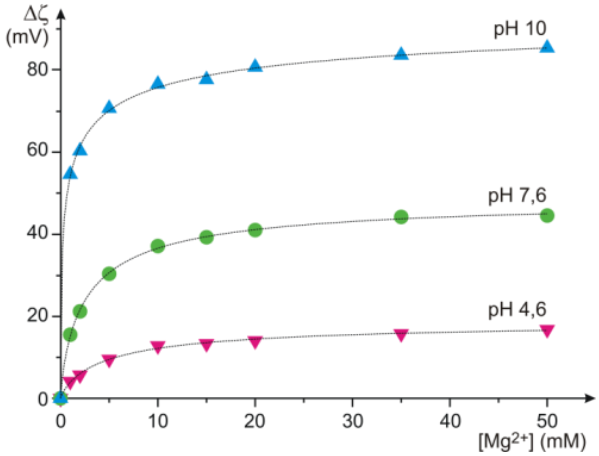
15. ábra Tojáslecitin GUV-ok mikroszkópos képe a preparálás során 0,5 (A) és 3 (B) mM $CaCl_2$ jelenlétében, illetve utólag hozzáadott 5 mM koncentrációban (C).

Mivel a rendelkezésre álló készülékkel csak a nanométeres nagyságrendben megbízható a zéta-potenciál-mérés és az irodalmi adatok nem utalnak arra, hogy a liposzómák felületi töltéssűrűsége a méretükkel változna (adott lipidösszetétel és környezeti ionerősség mellett), a potenciálméréseket a GUV-oknak megfelelő körülmények között előállított kis unilamelláris vezikulákon, SUV-okon végeztem. A 16. ábra szerint pH 7,5-on a Ca^{2+} nélküli zéta-potenciál érték eléri az elmélet által megadott, a minták stabilitásához szükséges 30 mV-os határt (-32,3 mV), ami már minimális Ca^{2+} hozzáadása esetén nem volt elmondható. A sókoncentráció további növelésével a zéta-potenciál abszolút értéke gyors ütemben csökkent, 7-10 mM koncentrációnál pedig megközelítette a 0 mV értéket. A Ca^{2+} koncentrációját tovább növelve pozitív telítési értékhez tart. Emiatt az óriás vezikulák előállításakor a liposzomális szuszpenzió kolloidális stabilitásának érdekében a Ca^{2+} minimális jelenlétére törekedtem.



16. ábra Tojáslecitinből előállított liposzómák zéta-potenciálja a Ca^{2+} koncentráció függvényében (pH 7,5).

A Mg^{2+} -sorral végzett mérések során is hasonló tendenciát tapasztaltam. A Mg^{2+}-ionok hatását a zéta-potenciál változására három pH-értéken (pH 5,4, 7,6, és 10) vizsgáltam. *A pH növelésével* egyre negatívabb zéta-potenciál-érték volt mérhető, ami azzal magyarázható, hogy a lipidek protonálható/deprotonálható csoportjai nagyobb arányban disszociáltak a magasabb pH-értéken, megnövelve ezzel a negatív töltések számát a vezikula felszínén. *A Mg^{2+}-ionok hozzáadása* során azonos Mg^{2+}-koncentráció mellett a zéta-potenciál különböző mértékű változását tapasztaltam az egyes pH-értékeken. Ennek szemléltetésére minden pH-értéken a kiindulási értékhez, azaz a Mg^{2+}-iont nem tartalmazó minta potenciáljához képest tapasztalt eltérést ($\Delta\zeta$) ábrázoltam a Mg^{2+}-ion koncentrációjának függvényében. A 17. ábra alapján az alacsonyabb pH-értékeken a zéta-potenciál kevésbé érzékeny a kation koncentrációjára, mint magasabb pH-értékeken. Ezeknek a méréseimnek az eredményei jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal. Az elvégzett kísérleti munkám célja az volt, hogy a további kísérleteimben tapasztalt, az általam használt lecitinek pontos összetételétől is függő, változásokat megfelelően tudjam értelmezni.



17. ábra Tojáslecitinből előállított liposzómák zéta-potenciáljának változása a Mg^{2+}-koncentráció függvényében különböző pH-értékeken.

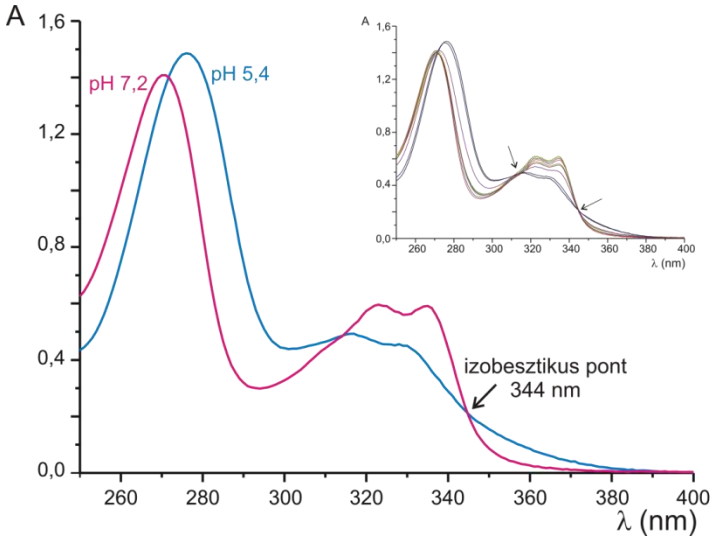
A GUV-ok előállítására vonatkozó kísérleteim azt mutatják, hogy szója-, illetve tojáslecitinből előállított liposzómák esetén a spektroszkópiai vizsgálatokra is alkalmas mintára vonatkozó optimális feltételek akkor teljesülnek, ha az ionerősség alacsony (maximum 50 mM, amibe az oldat pufferének ionerejét is figyelembe kell venni); a kétértékű kationok koncentrációja kisebb, mint 1 mM (ami függ a jelenlévő negatív töltésű lipidek koncentrációjától is).

5.2. Hatóanyagok liposzómába zárása, kötődése

Két, lényegesen eltérő kölcsönhatásokat eredményező modell-hatóanyag vizsgálatát tűztem ki célul. A koffein a töltés nélküli molekulák és a lipidek, a CPFX a töltött hatóanyag molekulák és a lipidek közötti kölcsönhatásokat modellezheti.

A koffein bezárását tojás-, és szójalecitinből előállított (10 mg/ml) multilamelláris vezikula (MLV) esetén mértük. A bezárási hatásfokot centrifugálásos eljárással határoztuk meg a szűrlet koffeinkoncentrációját spektrofotometriásan mérve. Mind a kétféle lecitinnél ~30 % körüli bezárási hatásfokot kaptunk: 31,2 ± 4,4 %-ot a tojás-, és 29,2 ± 3,1 %-ot a szójalecitines minták esetén. A bőrnek megfelelő, 5,4-es, illetve a magasabb pH-értékeken a koffein molekula semleges (pK_a ~0,6), így valószínűleg hidrofób kölcsönhatás jöhetett létre közte és a lipidmolekulák között. De az irodalmi adatok alapján hidrogénhidak is kialakulhatnak, — mint például az adenozin receptor aszparaginjával (6. ábra, 16. oldal) (Dore és mtsai 2011), — ami a koffein−lipid kölcsönhatást szintén stabilizálhatja.

A másik bezárandó modell molekula, a ciprofloxacin, több protonálható/deprotonálható csoporttal rendelkezik. Bezáródását/kötődését különböző lipid összetételű és lamellaritású rendszereken vizsgáltam. A fluorokinolonok abszorbanciája általában pH-függő, így a szűrletek koncentrációjának meghatározását a CPFX spektrumának izobesztikus pontjában végeztem (18. ábra).



18. ábra A beszúrt ábrán a CPFX UV spektruma különböző pH-értékeken, nyilakkal jelölve a két izobesztikus pont. A nagy ábrán a spektrumok az általunk használt két pH-értéken, jelölve 344 nm-en a továbbiakban használt izobesztikus pont (A ~315 nm-nél mérhető abszorbanciák kevésbé felelnek meg az izobesztikus feltételeknek).

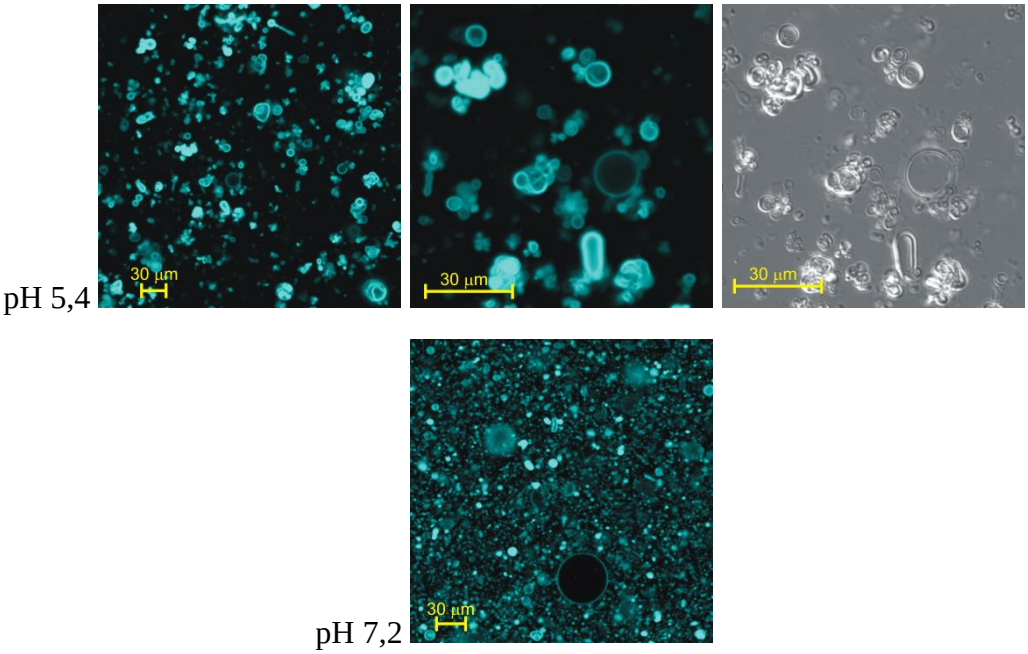
A kötött CPFX hányad, azaz a kötődési együttható ($n_{B,L}/n_o$) értéke, pH 5,4-en *2 mg/ml* lipidkoncentrációjú MLV-knél 0,065 ± 0.015 (6,5 %) volt a tojáslecitines minták és 0,078 ± 0,017 (7,8 %) volt a DPPC/DMPG (90/10 mol%) minták esetén. Vagyis a két lipidösszetételre vonatkozó kötődési hányad a mérési hibahatáron belül megegyezett. *5 mg/ml* tojáslecitin koncentráció mellett a kötött CPFX aránya 0,180 ± 0,042- re (18 %-ra) nőtt. Azaz a lipidkoncentráció 2,5-szeres emelésével a kötött hányad is kb. 2,5-szeresére emelkedett. Ezek alapján egy 10 mg/ml lipidkoncentrációjú minta esetén ~36 % kötött CPFX mennyiséggel számolhatunk, ami nagyságrendben megegyezne a koffein kötődésével, azonos lipidkoncentrációjú MLV esetén.

Az *1 mg/ml lipidkoncentráció* mellett a GUV-ok esetén a kötött hányad 14 % volt 1,3 mM CPFX-koncentráció mellett, ami az 5 mg/ml-es MLV-k kötőképességével esik

egy nagyságrendbe. A lecitin koncentrációjának ötödére csökkentésével (0,2 mg/ml) a kötődési együttható 5,4 % lett, a számolt 2,8 % helyett, ami a mérési hibahatáron (±~3%) belül esik.

A fenti eredmények alapján a lipidkoncentrációt is figyelembe véve a GUV-ok CPFX-kötőkapacitása nagyobb, mint az MLV-ké. Az egységnyi lipidkoncentrációra vonatkoztatott bezárási hatásfok CPFX-re nézve GUV-oknál 20,5 ± 0,65 bezárt-hatóanyag-százalék/(mg/ml lipid), míg MLV mintáknál csak 3,4 ± 0,17 bezárt-hatóanyag-százalék/(mg/ml lipid) lett. A kötődés pH-függését GUV-ok esetén vizsgáltam. Az eredményeim azt mutatták, hogy ebben az esetben a CPFX-kötésében a két pH-értéken (pH 5,4 és 7,2) nincs szignifikáns különbség.

A CPFX jelenléte a mintában hatással volt a GUV-ok mikroszkópos képére is. Hasonló jelenséget tapasztaltunk, mint a magasabb kétértékű kation koncentrációk mellett. 5,4-es pH-n a 0,5 mg/ml CPFX-et tartalmazó mintákban a vezikulák kisebb átmérővel és vastagabb fallal, de ellentétben az MLV-kel nagy belső vizes térrel rendelkeztek, illetve többnyire csoportokban álltak, aggregálódtak (19. ábra). Az utóbbi jelenség valószínűleg a lecsökkent felületi töltéssűrűség eredménye, ami ismert módon a részecskék aggregációjához vezet. pH 7,2-n a (kisebb oldhatóság miatt CPFX-et az előzőnél kisebb koncentrációban tartalmazó) minták gyakorlatilag nem mutattak változást a vezikulák méretében, lamellaritásában, vagy a vezikulák szeparáltságában a kontrollhoz képest (13. ábra).



19. ábra Tojáslecitinből CPFX jelenlétében előállított GUV-ok fluoreszcens és transzmissziós mikroszkópos képei.

A kötődési vizsgálatok alapján a multilamelláris vezikulákkal hasonló bezárási hatásfokot értünk el a két vélhetően más kölcsönhatás által kötődő molekulára: a neutrális koffeinre és a töltést hordozó CPFX-re. Az óriás vezikulák nagyobb fajlagos kötőkapacitással rendelkeznek CPFX-re nézve, mint az MLV-k. A CPFX kötődése pH 5,4-en a GUV-ok aggregációját okozta, míg a magasabb pH-értéken nem.

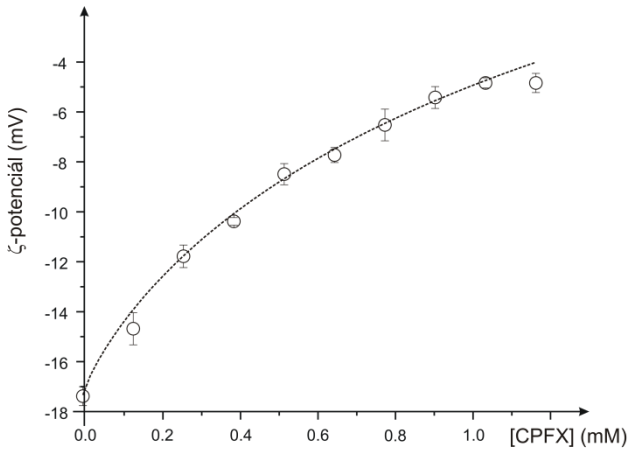
5.3. Zéta-potenciál mérések

Mind a kétféle lecitinből előállított liposzómák zéta-potenciálja pH 5,6-on negatív volt, a szójalecitines minták esetén mértünk negatívabb értéket, –47,57 ± 0,83 mV-ot, míg a tojáslecitines minták esetén –33,12 ± 1,5 mV-ot kaptunk. Az előző liposzómákhoz maximálisan 45 mM-os koncentrációban (~9 mg/ml; ami megfelel 35:1 koffein:lipid aránynak) koffeint adva nem tapasztaltunk változást a zéta-potenciálban, annak ellenére, hogy a fentebb megadott eredményeim alapján a kötődés mintegy 30 %-os volt.

A CPFX kötődését más összetételű pufferrendszerben mértem, mint a koffeinét, amit a GUV-ok preparálásához optimált körülmények indokoltak. Ebben az esetben 20 mM szacharóz, 20 mM TRIS, 0,1 mM EDTA volt az összetétel. Ugyanakkor nem adtunk kálciumot a pufferhez, mert a kálcium kötődése további tényező a zéta-potenciál

változásában. Ahogy azt korábban írtam, a zéta-potenciál méréseket SUV-okon végeztem, mert feltehetően nincs különbség a GUV-ok és a SUV-ok felületi töltéssűrűségében. Ennek megfelelően a tojáslecitinből előállított kontroll SUV-okon végzett méréseim során pH 5,4-en -17,4 ± 0,37 mV, pH 7,2-n -29,2 ± 0,44 mV volt a zéta-potenciál értéke.

CPFX hozzáadása a liposzómákhoz csökkentette azok zéta-potenciáljának abszolút értékét pH 5,4-en: a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (1,17 mM) a CPFX a zéta-potenciál értékét -17,4-ről -4,5 mV-ra változtatta. A zéta-potenciál és a CPFX koncentrációja közötti kapcsolat vizsgálatához korrelációs együtthatót számoltunk és t-próbát alkalmaztunk: a kiszámolt *p*-érték $8{,}89 \cdot 10^{-6}$ volt pH 5,4-en, azaz igen szoros korreláció van a két változó között. A mérési pontokat Langmuir-Hill egyenlet alapján illesztettük (20. ábra), melyben a paraméterek az alábbiak voltak: kötődési állandó (K_a) 0,62 mM^{-1}, CPFX nélküli minta zéta-potenciálja (ζ_{min}) -17,6 mV, végtelen CPFX koncentrációnál a hipotetikus zéta-potenciál (ζ_{max}) 13,0 mV és a Hill-együttható (n) 0,83.



20. ábra Zéta-potenciál változása CPFX koncentrációjának függvényében pH 5,4-en. Az ábrán a legalább három párhuzamos mérésből számolt átlagok hibája van feltüntetve.

A másik vizsgált pH-értéken, 7,2-n nem tapasztaltuk a zéta-potenciál szignifikáns változását az általunk maximálisan 0,35 mM koncentrációban hozzáadott CPFX hatására ($p = 0{,}102$). A kapott eredmények értelmezéséhez a CPFX egyes mikrospeciációs formáinak részarányait kell ismerni adott pH értékek mellett. A

disszociációs állandókra vonatkozó irodalmi adatok alapján mind három-, mind két protonációs állapotot leíró sémának (4.3.8. fejezet, 35.oldal) megfelelő egyensúlyi értékeket kiszámoltam. Az egyes mikrospecieszek arányainak kiszámolásához két modellt vettem alapul. Vázquez és munkacsoportja által (Vázquez és mtsai 2001) meghatározott makro-, és mikrokonstansok pK_a (6,08 és 8,58) és pk_a (6,62, 6,23 és 8,04, 8,43) értékeit használtam fel az ikerionos és a neutrális forma koncentráció-arányának ($q=k_{22}/k_{21}$) számolásához, mely így 2,5-nek adódott. Lin és csoportja eredményeit felhasználva (Lin és mtsai 2004) kiszámoltam az általuk meg nem adott mikrokonstansokat. Az előzőek alapján számolt konstansokat a 2. táblázatban foglaltam össze, amelyeket felhasználva számoltam az egyes mikrospeciáció-koncentrációk százalékos értékét a két, általam vizsgált pH-értéken (3. táblázat).

2. táblázat A CPFX disszociációs konstansai

	pK_{a1}	pk_{21}	pk_{22}	pk_{31}	pk_{32}
a	5.05*	6.74#	6.35#	8.56#	8.95#
b		6.62	6.23	8.04	8.43

*a: *Lin és mtsai (2004)* által megadott makrokonstans; # *Lin és mtsai (2004)* által megadott értékekből számolt mikrokonstansok; *b*: *Vázquez és mtsai (2001)* által megadott mikrokonstansok

3. táblázat A különböző CPFX-mikrospecieszek előfordulásának százalékos aránya két pH-értéken

		Microspecies				
	a	[+,+,0]	[+,0,0]	[0,0,0]	[+,0,-]	[0,0,-]
	b		[+,0]	[0,0]	[+,-]	[0,-]
pH 5.4	a	27.83	62.30	2.82	7.05	0.001
	b		82.71	4.94	12.34	0.01
pH 7.2	a	0.06	8.98	25.66	64.16	1.13
	b		6.79	25.57	63.92	3.73

a: két protonálható csoportot tartalmazó séma alapján számolt értékek (Lin és mtsai 2004); *b*: három protonálható csoportot tartalmazó séma alapján (Vázquez és mtsai 2001) számolt értékek

A táblázat alapján pH 5,4-en a CPFX-molekulák kb. 90 %-a egy, vagy két pozitív töltéssel bír ([+,0], [+,+,0] vagy [+,0,0]). 7,2-es pH-n számításaim alapján a CPFX-molekulák több, mint 60 %-a ikerionos, kb. 25 %-a neutrális formában van jelen. Tehát, a két pH-n ha a CPFX kötött hányada azonos, a CPFX töltésétől függően nagyobb vagy kisebb mértékben változtatja meg a liposzómák felületi töltéssűrűségét. Ez vezethet oda,

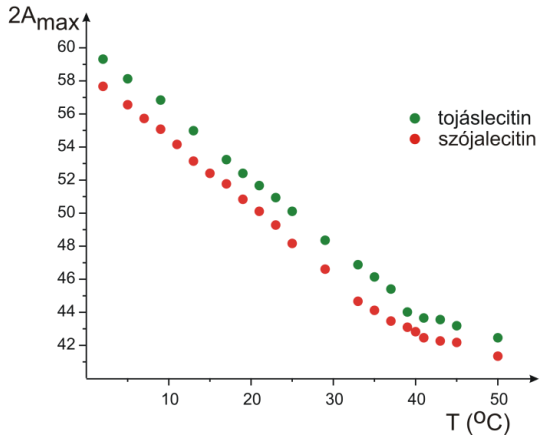
hogy pH 5,4-en az abszolút értékben kisebb zéta-potenciál miatt a liposzómák aggregálódhatnak, míg magasabb pH-n ez nem következik be.

A zéta-potenciál mérések alapján a vizsgált liposzómarendszerek az alkalmazott mérési körülmények között negatív felületi töltésűek, a felületi töltéssűrűséget nem befolyásolja a semleges koffein kötődése. pH 7,2-en a CPFX neutrális és ikerionos formáinak jelentős járuléka miatt a felületi töltéssűrűség nem változik, míg pH 5,4-en a túlnyomóan pozitív töltésű molekulák leárnyékolják a vezikulák eredeti negatív töltését.

5.4. Hatóanyagok — liposzómák kölcsönhatásainak molekuláris szintű vizsgálata

A hatóanyagok kötődése, vagy a felületi töltéssűrűség változása a liposzómákat alkotó kettősrétegben megváltoztathatja a *molekuláris rendezettséget és a molekuláris mozgások időskáláját*. *Ennek a két tulajdonságnak az eredőjét nevezzük fluiditásnak*. A fluiditás vizsgálatára ESR spektroszkópiát alkalmaztam.

A liposzóma mintákat tojás- és szójalecitinből állítottam elő, s az ESR spektroszkópia alkalmazásához, egy ESR-aktív zsírsavval, DOX-5-tel jelöltem maximálisan 1 mol%-ban. A liposzómák fluiditásának összehasonlításához az ESR-spektrumok $2A_{max}$ értékét olvastam le. Az irodalmi adatoknak megfelelően, minden hőmérsékleten a tojáslecitinből készült mintákra mért érték volt a nagyobb, ami azt jelenti, hogy membránjuk rigidebb, mint a szójalecitin-vezikuláknak (21. ábra). Az átlagos különbség 1,58 ± 0,094 gauss volt a teljes hőmérséklettartományt tekintve. (A leolvasás bizonytalanságát figyelembe véve ezzel a módszerrel 0,4 gauss a legkisebb szignifikáns eltérés.) Ismert, hogy a telítetlen zsírsavláncú lipideknek alacsonyabb a T_m-értékük, azaz adott hőmérsékleten fluidabbak, mint az azonos lánchosszúságú, telített lipidek. Az összetételre vonatkozó irodalmi adatok alapján a szójalecitin ~80 %-ban, a tojáslecitin pedig csak ~50 %-ban tartalmaz telítetlen zsírsavláncú lipideket. ESR méréseink eredményei megfelelnek annak az elvárásnak, hogy a szójalecitin, összetétele miatt, adott hőmérsékleten fluidabb, mint a tojáslecitin.

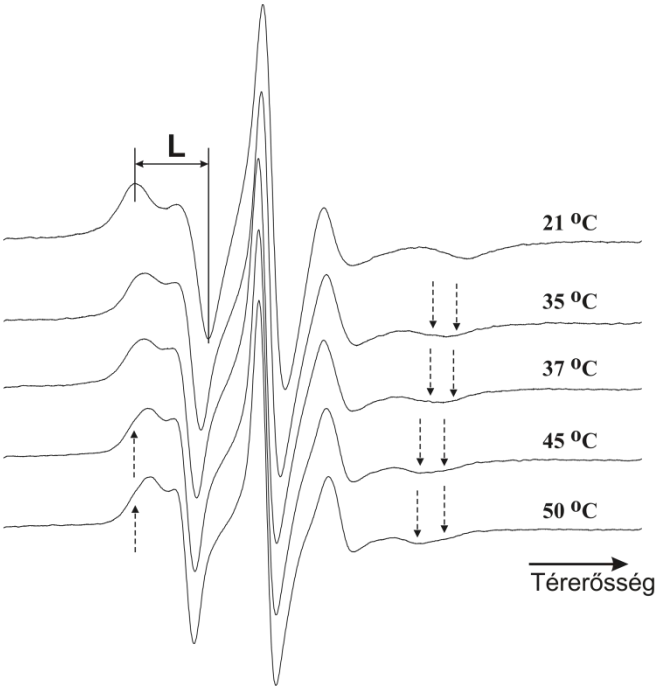


21. ábra DOX-5-tel jelölt tojás- és szójalecitin MLV-k hiperfinom csatolási állandójának kétszerese ($2A_{max}$) ábrázolva a hőmérséklet függvényében.

A koffein hatását a memránfluiditásra az alkalmazott maximális koffeinkoncentráció (2,7 mM; 0,5 mg/ml; koffein:lipid mólaránya 1:5) mellett mértem. A spektrumok kiértékelése azt mutatta, hogy még ebben a koncentrációban sem okozott a koffein kimutatható változást a fluiditásban (lipid koncentráció 10 mg/ml; MLV szerkezet; PBS pH 5,6), a 2 − 50 ^{o}C hőmérséklettartományban. A mért $2A_{max}$ értékek átlagos eltérése a koffeines és a kontroll minták között mindössze 0,03 és 0,02 gauss volt a szója- és tojáslecitinből előállított mintákban. A DOX-5 spinjelölt zsírsav a lipid fejcsoporthoz közel, az ötödik szénatom mélységében érzékeny a fluiditásra. Ezek szerint a koffein a lipidlánc ötödik szénatomjának mélységében nem változtatja meg a fluiditást. Alacsony logP (0,6) értéke alapján inkább a vizes oldatban fordulhat elő nagyobb koncentrációban, mint a lipidek mélyebben fekvő, apolárisabb régiójában. Ezért, kiegészítő méréseink során a spinjelölő fejcsoportjához kapcsolt nitroxid-szondával (HXD) vizsgáltuk a rendezettséget és a korrelációs időt, amikben szintén nem tapasztaltunk a kontrollhoz képest szignifikáns változást a koffeint tartalmazó mintában.

*A töltéssel rendelkező CPFX hatás*os lehet már a lipidrétegek fejcsoportjához közeli régiókban is. Ezért, megvizsgáltam, hogy az adott körülmények között töltésekkel rendelkező és a zéta-potenciál mérések alapján pH 5,4-en a lipidekkel feltehetően elektrosztatikus kölcsönhatásba (is) lépő CPFX befolyásolja-e a lipidmembrán fluiditását. A CPFX-kezelt, szintén DOX-5-tel jelölt GUV-minták ESR spektrumában, a koffeines mintákkal ellentétben, két komponens jelenléte volt megfigyelhető. A különböző hőmérsékleteken a két komponens járuléka eltérő volt. A két komponens ESR jele azonban csak a magasterű szélső értékeknél vált szét, így az

általánosan használt $2A_{max}$ paraméter helyett olyan spektrális paramétert választottam, ami a fluiditás változását ilyen körülmények között is jól leírja. Ez a paraméter az alacsonyterű maximum és minimum távolsága, amit L-lel jelöltem (22. ábra). A két komponens jelenlétére utaló spektrális helyeket nyilakkal szemléltetem a 22. ábrán.



22. ábra 1,28 mM CPFX-szel kezelt lecitin GUV-minta ESR spektrumai különböző hőmérsékleteken. Nyilak mutatják a spektrumokon megjelenő „vállak" helyét. L az alacsonyterű maximum és minimum távolsága.

A hőmérséklet, illetve a fluiditás növekedésével a maximum (a pozitív csúcs) a nagyobb térerősség-értékek felé (azaz jobbra), míg a minimum (a negatív csúcs) a kisebb térerősségek felé (azaz balra) tolódik *az L paraméter értékének csökkenését okozva*. Annak érdekében, hogy az L-paraméterrel kifejezett spektrális-, s ezáltal a fluiditás-változásokat érzékenyebben kimutassuk, a CPFX-kezelt minta spektrumából kivontam az azonos hőmérsékleten felvett kontroll minta spektrumát. Az így kapott spektrumok most már csak azokat a lipidkompartmenteket monitorozzák, amikhez a CPFX molekulák kötődtek. A kiértékelés során a CPFX-kezelt mintákra jellemző L értékeket ezekről a spektrumokról olvastam le.

39 ^{o}C alatt nem volt különbség a kontroll és CPFX-es minták L értékeiben, vagyis nem okozott mérhető fluiditásbeli változást a CPFX jelenléte az ötödik szénatom

mélységében. Azonban 39 és 50 ^{o}C között a *CPFX-et tartalmazó minták* esetén minden hőmérsékleten *kisebb L értéket* határoztunk meg, mint a kontroll GUV mintáknál. Az L-értékek különbségeit az egyes hőmérsékleteken a $\Delta L = L_{kontroll} - L_{CPFX}$ értékekkel fejeztük ki, amelyeket a 4. táblázatban tüntettem fel. Az eredmények alapján *a CPFX fluidabbá tette a lipid-kettősréteget a fejcsoportokhoz közeli régióban*, ahol a DOX-5 jelölő helyezkedett el.

4. táblázat Kontroll és CPFX-es minták ESR spektrumán mért L értékek különbségei különböző hőmérsékleteken

T (^{o}C)	$\Delta L = L_{kontroll}-L_{CPFX}$ (G)
39	1.52 ± 0.20
41	1.32 ± 0.19
45	0.86 ± 0.15
50	0.71 ± 0.10

A dolgozatomban nem tárgyalt spektrumszimuláció is alátámasztotta, hogy két különböző fluiditású lipidpopuláció van jelen minden spektrumban. A CPFX-es mintákban 7,4 ± 2,4 %-kal nagyobb volt a rendezetlen populáció aránya, mint a kontroll mintákban (Kaszas és mtsai 2013). Tehát 5,4-es pH-értéken az elektrosztatikus kölcsönhatás, ami zéta-potenciál mérések alapján kimutatható volt a CPFX és a liposzómák felszíne között, csak 39 ^{o}C fölött okoz kimutatható fluiditás-növekedést a DOX-5 szonda mélységében. A koffein és a CPFX fluiditásra gyakorolt eltérő hatása azt is jelentheti, hogy a hatóanyag-leadás kinetikájában, a különböző hőmérsékleteken várható különbség; pl. a CPFX felszabadulásának kinetikája több fokkal a bőr fiziológiás hőmérséklete fölött megváltozhat.

Az ESR mérések alapján a lipidmembrán fejcsoportjaihoz közeli régió fluiditásában a koffein kötődése nem okoz kimutatható változást, míg a ciprofloxacin, magasabb hőmérsékleteken mérhető fluiditásnövekedést okoz.

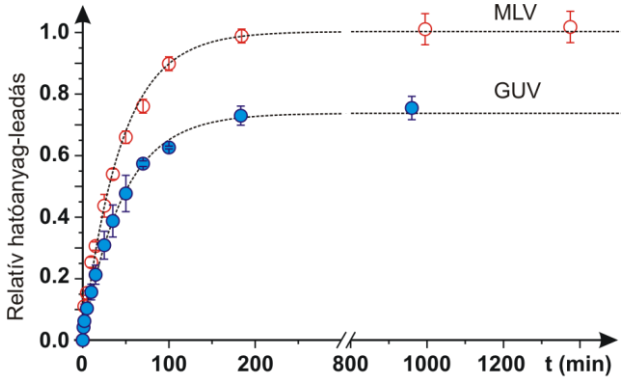
5.5. A liposzóma típusának hatása a hatóanyag-felszabadulásra

Előző eredményeink arra utaltak, hogy a hatóanyagok töltéseinek hatása van a membrán fluiditására. Ez azt is eredményezheti, hogy a semleges, illetve töltött molekulákra vonatkozó membránpermeabilitás a liposzómák szerkezetétől is függhet: a lipofil, semleges molekulák megoszlása nagyobb a membrán apoláris régióiban, így esetleg a permeabilitásuk kisebb ezekre a hatóanyagokra nézve. A fejcsoportokkal való

kölcsönhatás, az előzőekkel ellentétben, a töltéssel rendelkező hatóanyagokra nézve kedvezőbb, ami a kötődésüket ezekhez a csoportokhoz erősebbé teszi. Így töltéssel rendelkező hatóanyagoknál két hatás is modulálhatja a membránpermeabilitást, illetve a hatóanyag leadását: 1.) magán az apoláris régión való „áthaladás" sebessége; 2.) a hatóanyagnak a membránról való „leszakadása" (disszociációja). A következő kísérletsorozatban ezért azt vizsgáltam meg, hogy a CPFX milyen leadási kinetika szerint jut multilamelláris vagy óriás liposzómák membránján át, illetve jut ki magukból a vezikulákból.

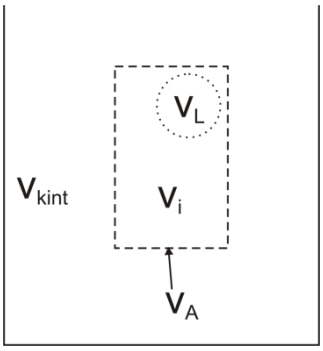
A különböző liposzómarendszereknek a hatóanyag felszabadulására kifejtett hatását egyensúlyi dialízismérésekkel vizsgáltam, a CPFX-leadás időfüggését hasonlítottam össze MLV és GUV mintákon. Az MLV-mintáknál a liposzómát nem tartalmazó CPFX-törzsoldat dialízisekor leadott hatóanyag-mennyiséget vettem 100 %-nak. A 24 órán át tartó egyensúlyi dialízis végén a *leadott hatóanyag (CPFX) mennyisége* a tojáslecitinből készült *MLV-knél közel 100% (97,4 ± 0,84 %)* volt, ami nem függött a lecitin koncentrációjától az általunk vizsgált koncentrációtartományban, mely 1-5 mg/ml közötti volt. A *hatóanyag-felszabadulás* a 10 mol%-ban DMPG-t is tartalamzó DPPC *MLV-k esetén is közel 100 %-os* volt.

Az anyagok és módszerek fejezetben megadott indokok miatt a GUV-ok esetén a mintavételezés inhomogén volt, amit a [4] képlet (35.oldal) alapján vettem figyelembe. Ez magyarázza azt, hogy adott esetben a kiinduló hatóanyag mennyisége, amire a hatóanyag leadás időfüggését viszonyítottuk, a referencia oldathoz képest nagyobb is lehet, mint 100 %. A dialízis során a relatív *hatóanyag-leadás 70,7 ± 1,56 % volt tojáslecitin és 83,2 ± 2,3 % DPPC/DMPG GUV-oknál*. A CPFX-leadás %-os értékei a pH-tól függetlenül hasonló értéket mutattak. A két liposzomális rendszer, azaz GUV-ok és MLV-k relatív hatóanyag-leadásának összehasonlítását az időben a 23. ábra mutatja.



23. ábra A dializáló membránon keresztül leadott CPFX az idő függvényében, tojáslecitin MLV és GUV esetén. Az egyes mérési pontokban a legalább három mérési eredményből számolt átlagok hibáját tüntettük fel.

A leadott hatóanyag mennyisége a dializáló membránon átjutott, valamint a liposzómákon kívüli és az azokon belüli térből származhatott.



24. ábra A dialízis leírásához használt három-rekeszes modell. v_{kint}: a dialíziszsákon kívüli tér; v_L: a liposzómák belső vizes fázisa; v_i: a dializálózsák belsejében levő vizes tér

A liposzómamentes CPFX-oldat dialízise során bebizonyosodott, hogy a CPFX molekulák átjutása a vezikulákon kívüli térből a dializáló közegbe nem akadályozott, így a kétféle liposzómarendszer esetén mért különbséget a bezárt vizes fázisokból történő „felszabadulásbeli” különbség okozhatta. Feltételezhetnénk, hogy az MLV-k a bezárt hatóanyagot jobban visszatartják, mint a GUV-ok, mivel többrétegű szerkezetük miatt a CPFX-molekuláknak több lipofil barrieren kell átjutniuk. Tekintve, hogy a vizsgált pH-kon a CPFX többnyire töltéssel rendelkezik, a lipofil kettősrétegen az átjutása meglehetősen gátolt. Vagyis a le nem adott CPFX arányában mért különbség

egyrészt a vezikulák és az általuk bezárt vizes térfogatok nagyságbeli különbségére utalhat, *másrészt* a liposzómák felületén megkötött CPFX mennyiségi különbségére.

A hatóanyag-felszabadulás kinetikai leírására háromrekeszes modellt dolgoztunk ki (24. ábra). Ez a modell a következőket veszi figyelembe: *1.)* a hatóanyagnak a dializáló hártya falán történő diffúzióját, a dializálózsák által bezárt vizes térből; *2.)* a liposzómák membránjához kívülről kötött hatóanyag leválását és diffúzióját; *3.)* a liposzómák vizes fázisába bezárt és a belső falhoz kötött hatóanyag diffúzióját a liposzóma membránján keresztül (Kaszas és mtsai 2013).

A hatóanyag-felszabadulásra vonatkozó kinetikai görbék kiértékelése alapján a következőket állapítottam meg: *1.)* A dialízismérések alapján óriás liposzómák esetén a hatóanyag ~30%-a helyezkedik el a vezikulák belső vizes terében vagy a lipidmembrán belső felszíneihez kötve, MLV-k esetében ez ~3%; *2.)* a liposzóma membránon át a hatóanyag-leadásra (release) vonatkozó számolt felezési idő a GUV-minta esetén $T_{1/2}$= 54 ± 13,0 h, míg MLV esetén $T_{1/2}$= 18,1 ± 5,4 h; (a liposzómákon kívül a vizes fázisban levő szabad hatóanyagra vonatkozó felezési idő: 28,2 ± 3,2 min). A két eltérő szerkezetű liposzómarendszeren mért adatok látszólag ellentmondásban vannak a várt értékekkel, hiszen egyszerű megfontolás alapján a többszörös lipidrétegeket tartalmazó MLV esetén várnánk lassúbb diffúziót. Ez a látszólagos ellentmondás feloldható azáltal, ha figyelembe vesszük: 1.) a CPFX-nek a membránfelületekhez való kötődését (az MLV-s szerkezetek esetén a többszörösen egymásba illeszkedő lipidrétegek felületén jelentős kötődés történhet), ami a kinetikai egyenletek alapján is gyorsabb deszorpcióhoz vezet; 2.) a GUV-ok és az MLV-k nagy mértékben eltérő bezárt vizes térfogatait; 3.) az MLV-k esetén a lipidrétegek szorosabb illeszkedése következtében, az eltérő kettősréteg-szerkezet miatt fellépő membrán-permeabilitás változását.

A hatóanyag leadását (koffein vagy CPFX) a hatóanyagok elektromosan töltött/töltetlen formái, azok kötődése a membránhoz, valamint a bezárt vizes térfogat nagysága és a liposzómák szerkezete is nagymértékben befolyásolja. Célszerű a hatóanyagok megoszlási és permeabilitási tulajdonságait megvizsgálni annak érdekében, hogy a megfelelő tárolási kapacitású és leadási sebességű rendszert ki tudjuk választani.

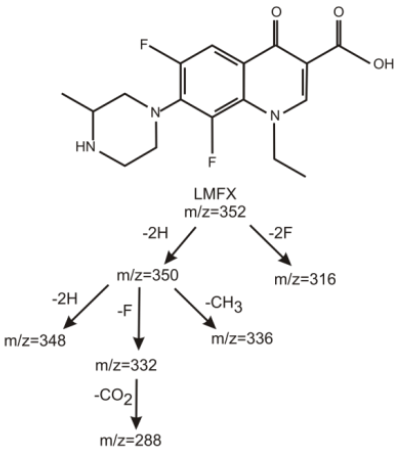
5.6. Hatóanyagok fényérzékenységének jellemzése

A modern hatóanyagok igen sok esetben fényérzékenyek, ami a hatóanyag hatásának csökkenéséhez, önmagának vagy bomlástermékeinek akár fototoxikus hatásához is vezethet. Társszerzők korábbi munkáiban már vizsgálták különböző fluorokinolonok fotobomlását (Budai és mtsai 2008). Munkám során arra kívántam választ kapni, hogy a liposzóma-ciklodextrin kombinált rendszer kínál-e előnyt a fotobomlás csökkentésében.

5.6.1. Ciklodextrin-liposzóma kombinált formuláció hatása az LMFX fotobomlására

A tömegspektrometria, megfelelő kiegészítő módszerek alkalmazásával (pl. gázkromatográfia, HPLC, stb.) egy igen érzékeny detektálási módszer az eltérő molekulatömegek kvalitatív és kvantitatív kimutatására. Az általam vizsgált anyamolekula a lomefloxacin UV-fény hatására keletkező bomlástermékeit tömegspektrometriásan mértem.

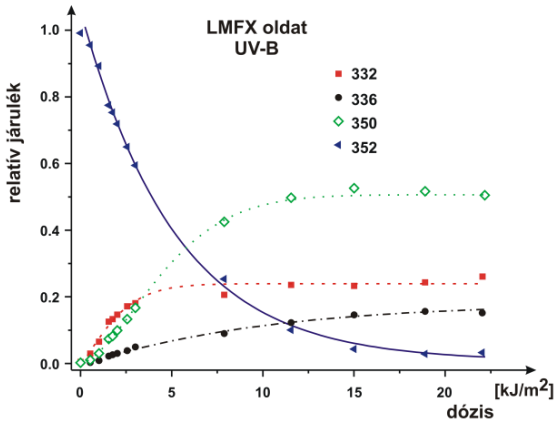
Korábbi vizsgálatok alapján a 352-es m/z értékű LMFX fotobomlása során a 288, 316, 332, 336, 346, 348 és 350 m/z értékű termékek keletkezhetnek (25. ábra) (Budai és mtsai 2009). A 288-as és 316-os m/z értékű LMFX-bomlástermékeket nem vettem figyelembe a jelenlegi ciklodextrin-liposzóma rendszer elemzése során, mivel ezek a csúcsok átlapolódtak más, nem a lomefloxacintól származó csúcsokkal.



25. ábra A lomefloxacin és a fotobomlási folyamatokban létrejövő termékek m/z értékei.

A kiértékelés során azt tapasztaltam, hogy az m/z = 346 és 348 csúcsok járulékai arányosan változtak a besugárzási dózis növekedésével. Azonban a maximumuk az összes minta esetén kisebb volt mint 5%, így a továbbiakban csak az m/z = 332, 336, 350 és 352 csúcsok analízisének eredményét tüntetem fel.

Az UV-besugárzás hatása az LMFX bomlására oldatokban. UV-B sugárzás hatására a kiindulási LMFX (m/z= 352) molekula járuléka gyors ütemben csökkent, míg a bomlástermékeké (332, 336, 350) különböző mértékben nőtt, majd kb. 10 kJ/m^2 dózisérték felett változásuk telítési értéket ért el (26. ábra). Az ábrán látott telítési görbék arra utalnak, hogy az LMFX bomlási folyamatai a párhuzamos kémiai reakcióknak megfelelő séma szerint a 352-es LMFX molekulából kiindulva mennek végbe.

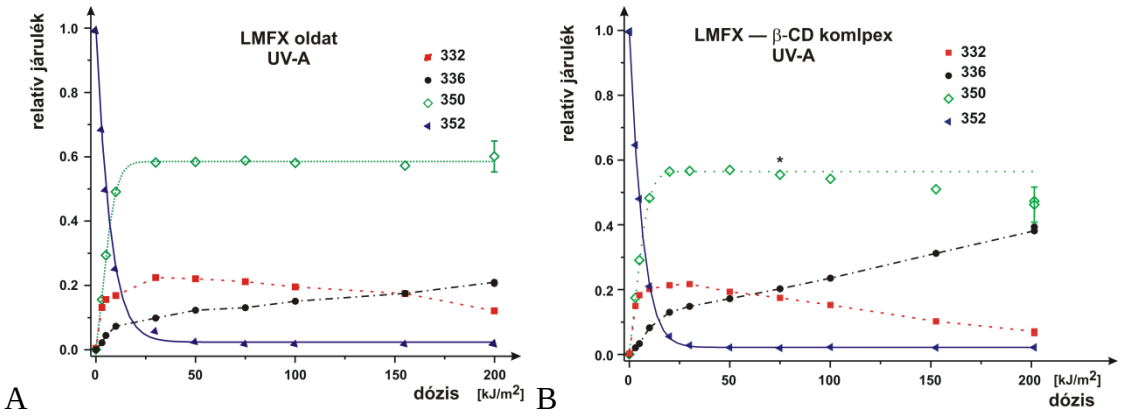


26. ábra Lomefloxacin oldat bomlástermékeinek relatív járuléka az FS20-as szélesspektrumú UV-B lámpával történő megvilágítás után. A mérési pontokat Weibull-függvénnyel illesztettük, a hat párhuzamos mérésből származó adatok legnagyobb SEM értéke 0,035 volt.

A korábbi idézett munkával összehasonlításban az UV-B sugárzáson kívűl a 320-400 nm-es tartományban is tanulmányoztam az LMFX fotobomlását. Az UV-A besugárzást egy nagyságrenddel nagyobb dózisértékig (200 kJ/m^2) folytattam, ami nagyságrendileg megfelel a környezeti sugárzásból egy óra alatt származó UV-A szintnek a mérsékelt égövön. A relatív járulékok a 352-es és 350-es m/z-értékű termékek esetén szintén telítési görbét adtak a dózis függvényében, ahogy azt a 27.A ábra is mutatja. Az előző két komponens esetén és az UV-B besugárzásoknál tapasztaltakkal ellentétben a másik két termék (m/z= 332, 336) görbéje nem telítésbe

ment: az m/z= 332 relatív járuléka 50 kJ/m^2 feletti dózisoknál csökkenő tendenciát mutatott, míg a 336-os csúcsoké tovább nőtt. Ezek alapján a 332-es és a 336-os termék az LMFX fotobomlásának csak köztes terméke. Ez arra utal, hogy az LMFX bomlása részben paralel, részben konszekutív reakcióknak megfelelően megy végbe.

Az LMFX bomlási folyamatát ciklodextrinek (β-CD, HP-β-CD) jelenlétében is vizsgáltam, amelyek közül a β-CD jelenlétében végbemenő folyamatok relatív járulékait mutatja a 27.B ábra. Míg az LMFX (352) járuléka a molekula bomlása miatt a besugárzás végére nullához tartott, addig az előzőektől eltérően ciklodextrinek jelenlétében a 332-es és 336-os mellett a 350-es is köztes termékként, tranziensként viselkedett.



*27. ábra A: UV-A sugárzás hatása LMFX bomlására oldatban (A) és β-CD jelenlétében (B). A 350-es és 352-es görbék illesztése a Weibull-függvénnyel történt (B: a *-gal jelölt pontig). Az egyes m/z-értékek alapján számított, maximális, SEM értéket a 350-es görbe utolsó pontjánál ábrázoltam.*

A komplex liposzomális rendszerre vonatkozó számításaim azt mutatták, hogy az UV-A sugárzást követően a 332-es és a 336-os termékek járuléka minden összetétel, így a liposzómás minták esetén is a köztes termékekre jellemző tendenciát mutatta. A 20 és a 200 kJ/m^2-es dózisú besugárzáshoz tartozó járulékok különbsége, (%UVA$_{200kJ/m2}$-%UVA$_{20kJ/m2}$), a 332-es származék esetében szinte minden esetben negatív értéket, míg a 336-osé pozitív értéket adott (5. táblázat). A lomefloxacin fotobomlását oldatokban vizsgálva, mindkét ciklodextrinszármazék esetén (BLX és a HPLX) kisebb járulékot határoztam meg a 200 kJ/m^2-es dózisra, mint a 20 kJ/m^2-re az m/z = 350 csúcsra. Lipidek jelenléte megváltoztatta ezt a különbséget: β-CD-t tartalmazó mintáknál sem a

telített sem a telítetlen liposzómáknál nem mértem különbséget, s ez a liposzóma szerkezetétől független volt. HP-β-CD-t tartalmazó mintákban a kis egyrétegű liposzómák pozitív eltérést mutattak; MLV-re az eltérés a telített DPPC-nél a szignifikanciahatáron belül maradt, míg a telítetlen DOPC-nél a sorozatban mért legnagyobb pozitív eltérést kaptam.

5. táblázat A 200 és a 20 kJ/m^2-es dózisú UV-A besugárzáshoz tartozó relatív járulékok különbsége*

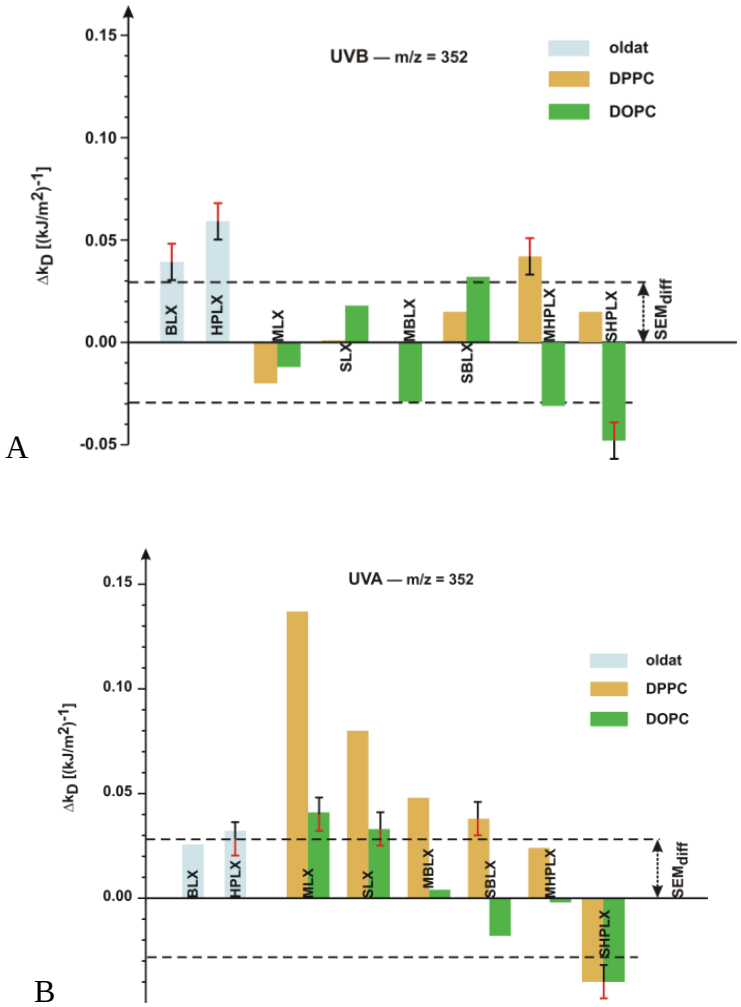
	m/z		
Összetétel	350	332	336
LX	<	-11.4	10.4
BLX	-9.3	-14.0	24.6
HPLX	-32.8	<	39.3
DPPC-MLX	<	-13.1	10.0
DPPC-SLX	<	-17.9	21.3
DPPC-MBLX	<	-8.6	8.1
DPPC-SBLX	<	<	<
DPPC-MHPLX	-11.9	-9.2	24.3
DPPC-SHPLX	12.0	-23.7	25.2
DOPC-MLX	<	-14.9	10.3
DOPC-SLX	<	-16.0	8.7
DOPC-MBLX	<	-18.7	9.1
DOPC-SBLX	<	-14.5	<
DOPC-MHPLX	<	-27.3	25.2
DOPC-SHPLX	25.7	-37.6	21.9

** Az értékek a ($\%_{UVA,200}$-$\%_{UVA,20}$) különbségre vonatkoznak; <: a kétszeres SEM értéknél (8 %) kisebb értékek. LX: LMFX oldat, BLX/HPLX: β-CD/HP-β-CD és LMFX komplexe, M/S: MLV/SUV, DPPC: DPPC-ből előállított liposzómás minták, DOPC: 30 mol%-ban DOPC-t is tartalmazó DPPC minták*

5.6.2. Az LMFX fotobomlási kinetikájának jellemzése a sebességi együtthatókkal

Az LMFX-et ciklodextrinbe és/vagy liposzómába zárva vizsgáltuk a fotobomlásának reakciósebességi állandóját. Az m/z = 352 csúcs az, ami a teljes dózistartományban leírható egyetlen Weibull-függvénnyel, ezért a különböző minták összehasonlítását a későbbiekben csak a kiindulási, LMFX molekula (m/z=352) együtthatói alapján végeztem el.

Azért, hogy az együtthatók változását jobban kifejezzük, az egyes összetételek k_D értékét az LMFX vizes oldatban történő bomlásának k_D értékéhez viszonyítottuk, és különbségüket ábrázoltuk (Δk_D). Így az LMFX Δk_D értéke nulla, amit a 28.A ábra nem tüntet fel. Az ábrán SEM_{diff}-ként jelöltük a különbségekre vonatkozó, maximális standard hibát, és csak azokat a Δk_D értékeket tekintettük relevánsnak, amelyek kívül estek ezen a tartományon, s az adott minta konfidencia intervalluma sem adott átfedést az előző tartománnyal. Az egyes összetételek standard hibáját azokon az oszlopokon tüntettük fel, ahol a Δk_D-érték relevanciája nem lenne egyértelműen leolvasható.



28. ábra Különböző összetételek sebességi együtthatóinak eltérése az LMFX oldat együtthatójától UV-B (A) és UV-A (B) sugárzás hatására. BLX és HPLX: lipidet nem tartalmazó β-, és HP-β-CD oldatok, M: multilamelláris vezikulák (MLV), S: kis unilamelláris vezikulák (SUV). (A: DPPC-ből előállított SLX Δk_D-értéke elhanyagolható.) (Rövidítések lsd. 5. táblázat és a rövidítések jegyzéke.)

Az ábra alapján UV-B sugárzás hatására releváns változás tapasztalható az LMFX bomlási együtthatójában a liposzómamentes oldatban, ha β-CD vagy HP-CD volt jelen (BLX, HPLX). A liposzomális minták közül a DPPC-ből előállított MHPLX szignifikánsan és relevánsan növelte a 352-es sebességi állandóját, míg a DOPC-t is tartalmazó SHPLX csökkentette. Ezek alapján a ciklodextrinek és a lipidösszetételek együttesen befolyásolják a bomlás kinetikáját.

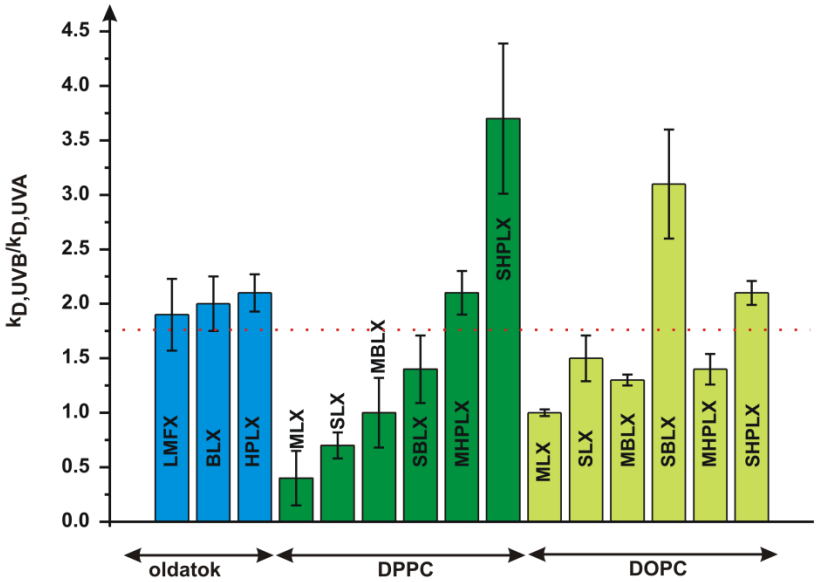
A 28.B ábrán látható, hogy BLX és HPLX oldatok k_D értékei nem változnak az LMFX oldatéhoz képest UV-A sugárzás hatására, ellentétben az UVB-sugárzásnál tapasztaltakkal. Ugyanakkor, a DPPC liposzómák (az MHPLX kivételével) nagymértékben megváltoztatták a k_D-t. Az UV-A sugárzás hatására az LMFX a leggyorsabb bomlását DPPC-liposzómákat tartalmazó formulálásban szenvedte el (MLX, SLX). Ehhez képest, a bomlását lassította a ciklodextrinek jelenléte, de így is gyorsabb volt, mint önmagában az LMFX, vagy a ciklodextrint is tartalmazó vizes oldatban. A DOPC-t 30 mol%-ban tartalmazó liposzomális minták sokkal kisebb mértékű változást eredményeztek a sebességi együtthatóban, csak az MLX mintában tapasztaltuk a k_D értékének szignifikáns és releváns növekedését, míg az SHPLX rendszerben relevánsan és szignifikánsan csökkent az együtthatók értéke mindkét lipidösszetétel esetében.

5.6.3. A lomefloxacin fotobomlásának érzékenysége az UV-A és UV-B sugárzásra

A fotokémiai reakciók spektrális érzékenysége információt szolgáltat arra vonatkozóan, hogy a fotoreakció mennyiben következménye a molekula abszorpciójának, illetve léteznek-e más folyamatok, amik módosíthatják a kizárólag az abszorpciónak tulajdonítható érzékenységet. A részletes, spektrális mérés helyett a két lényeges UV-tartományra, UV-B és UV-A, végeztem méréseket és számításokat.

A fotobomlásra vonatkozó kinetikai méréseim alapján, a besugárzó lámpák spektrális jellemzőinek ismeretében, kiszámítottam azokat a kinetikai állandókat, amik az egyes UV-tartományokat külön-külön jellemzik. Ezek arányát vetettem össze a lomefloxacin abszorpciós spektrumának a megfelelő UV-tartományokon mérhető normált, kumulatív abszorpciók arányával. Amennyiben a két arány megegyezik, úgy a spektrális érzékenységet önmagában az abszorpciós folyamatokkal is értelmezhetjük.

Ellenkező esetben a fotobomlást további fotokémiai folyamatok bekövetkezése is befolyásolja, irányítja. Az LMFX-nek a két UV-tartományba eső abszorpciójának aránya az $r_\varepsilon=\varepsilon_{UVB}/\varepsilon_{UVA}$ képlet alapján 1,75-nek adódott, ahol ε_{UVB} és ε_{UVA} az LMFX abszorpciós értékeinek összege a 280-320 nm-es és a 320-400 nm-es tartományban. A lomefloxacin fotobomlását az m/z=352 csúcs intenzitásának a dózisfüggése alapján leíró sebességi állandókból kiszámítottam a „tisztán" UV-B illetve UV-A sugárzásnak megfelelő sebességi állandókat: $k_{D,UVA}$ és $k_{D,UVB}$ (4.3.11. fejezet, 37. oldal). Ezek arányát ábrázoltam a 29. ábrán, a különböző összetételek esetén.



29. ábra Az UV-A és UV-B sugárzásra jellemző sebességi állandók aránya. Az r_ε= 1,75-ös értéket a pontozott vonallal jelöltem. (Rövidítések lsd. 5. táblázat és a rövidítések jegyzéke.)

Azokat a $k_{D,UVA}/k_{D,UVB}$ értékeket vettük szignifikánsan eltérőeknek az r_ε értéknek megfelelő 1,75-ös szinttől, amelyek az ábrázolt hibasávokkal együtt tértek el 1,75-től. A legkisebb eltérést várakozásainknak megfelelően a lomefloxacin oldata esetén tapasztaltuk, de ettől nem mértünk sokkal nagyobb különbséget a BLX oldatnál sem. A HPLX oldat esetén már szignifikánsan nagyobb értéket kaptunk, ami az adott HP-CD-t tartalmazó liposzomális minták esetében is elmondható volt mind a két lipidösszetétel mellett, kivéve a DOPC-s MHPLX mintát. A liposzómákat tartalmazó minták többsége nagyobb érzékenységet mutatott az UV-A sugárzásra, mivel sebességi együtthatóik aránya kisebb értéket mutatott, mint az r_ε határérték, kivéve az előbb említett 100 %

DPPC-ből előállított MHPLX és SHPLX, illetve a DOPC-t is tartalmazó ciklodextrines SUV-ok (SHPLX, SBLX). Az utóbb felsorolt minták esetében a fotobomlás sebessége kifejezettebb volt az UV-B tartományban, mint UV-A-ban. Különbség fedezhető fel a multilamelláris és az unilamelláris liposzómák viselkedésében is: a csak lamellaritásukban eltérő liposzómás összetételek közül minden esetben a SUV-ok adnak nagyobb arányt, vagyis érzékenyebbek UV-B-re a nekik megfelelő MLV-khez képest.

5.6.4. Az UV-A és UV-B forrásokkal történt besugárzás hatása a bomlástermékek járulékára

A kétféle sugárzásnak az egyes bomlástermékek relatív járulékára gyakorolt hatásának összehasonlításához az egyes összetételek azonos dózisú, 20 kJ/m^2-es, UV-A és UV-B besugárzása esetén meghatározott járulékok különbségét vizsgáltam ($\%_{UVA,20}$-$\%_{UVB,20}$). A 352-es csúcs járulékának változását nem tüntettem fel, mert csak egy esetben, a tisztán DPPC-ből előállított SHPLX minta esetén állapítottam meg a hibahatáron (8,0 %) kívül eső különbséget, ami -8,4 % volt.

6. táblázat 20 kJ/m^2-es UV-A, illetve UV-B besugárzásokhoz tartozó relatív járulékok különbsége ugyanazon összetétel esetén

	m/z		
Összetétel	332	336	350
LX	<	<	<
BLX	<	<	<
HPLX	<	<	12.6
DPPC-MLX	-14.5	<	22.9
DPPC-SLX	-12.4	<	22.1
DPPC-MBLX	<	<	13.4
DPPC-SBLX	<	<	19.3
DPPC-MHPLX	<	<	17.2
DPPC-SHPLX	<	-8.0	13.5
DOPC-MLX	-20.3	<	20.8
DOPC-SLX	-19.7	<	20.0
DOPC-MBLX	<	<	<
DOPC-SBLX	10.7	-10.6	<
DOPC-MHPLX	<	<	<
DOPC-SHPLX	11.9	-10.1	<

Az értékek a ($\%_{UVA,20}$-$\%_{UVB,20}$) különbségre vonatkoznak; <: a kétszeres SEM értéknél (8 %) kisebb értékek. (Rövidítések lsd. 5. táblázat és a rövidítések jegyzéke.)

Az m/z=332-es terméket nézve negatív különbséget kaptunk, vagyis UV-A-ban kisebb járulékkal számolhatunk 20 kJ/m^2-nél, mint UV-B-ben a CD-nélküli liposzómás minták esetén, mindkét lipidösszetétel mellett. A nagyobb eltérést a DOPC SLX és MLX liposzómákra számoltuk. A 350-es termék UV-A-ban a minták többségében stabilabbnak mutatkozott, ugyanis a szignifikáns különbségek mind pozitív értéket adtak. Közülük is kiemelkedik az előbb említett négy összetétel, a DPPC-s és DOPC-s SLX és MLX, amelyek hasonlóan viselkedtek: a legnagyobb járulékkülönbséget produkálták a 350-es m/z értéknél és jelentős negatívat a 332-es esetén. Eltérés a DPPC−s és DOPC-s összetételek között, hogy a CD jelenléte csökkentette a 350-es járulékok különbségét a CD-nélküliekhez képest (SLX, MLX); de míg a DPPC-s mintákban az érték továbbra is jelentős maradt, addig a DOPC-s mintákban már nem volt szignifikáns. A 336-os termék járulékait nézve többségében nem volt szignifikáns a különbség, viszont három esetben a szignifikáns különbséghez közel eső negatív értéket kaptunk, vagyis UV-B-ben a 336-os nagyobb járulékkal szerepelt, mint UV-A-ban, és mind a három összetétel SUV volt, illetve tartalmazott CD-t (DPPC-SHPLX, DOPC-SBLX, DOPC-SHPLX).

Az általunk alkalmazott kétféle besugárzás hatása közti különbséget a maximális dózisok ($\%_{UVA,200}$-$\%_{UVB,20}$) eredményeként kialakult járulékok különbségével is jellemeztük (7. táblázat).

7. táblázat Az UVB vagy UVA besugárzás relatív járulékainak különbsége a maximális dózisoknál ($\%_{UVA,200}$-$\%_{UVB,20}$)

	m/z			
Összetétel	332	336	350	352
LX	-11.7	<	<	<
BLX	-10.4	21.8	<	<
HPLX	-9.7	33.6	-20.2	<
DPPC-MLX	-27.6	<	24.6	<
DPPC-SLX	-30.2	17.7	17.5	<
DPPC-MBLX	-9.3	<	16.1	-8.2
DPPC-SBLX	<	<	18.8	<
DPPC-MHPLX	-14.4	19.3	<	-11.4
DPPC-SHPLX	-21.2	17.2	25.5	-17.6
DOPC-MLX	-35.2	8.7	24.3	<
DOPC-SLX	-35.7	<	25.8	<
DOPC-MBLX	-19.7	<	9.6	<
DOPC-SBLX	<	<	<	<
DOPC-MHPLX	-20.6	18.5	<	<
DOPC-SHPLX	-25.8	11.8	20.5	<

Az értékek a ($\%_{UVA,200}$ - $\%_{UVB,20}$) különbségre vonatkoznak; <: a kétszeres SEM értéknél (8 %) kisebb értékek

A besugárzási dózisok maximumainál a 332-es köztes termék feltüntetett negatív különbségértékei szerint az UV-A besugárzás kisebb járulékokat eredményezett, mint az UV-B besugárzás: az UV-A besugárzás során felvett kinetikai görbék a kb. 50 kJ/m^2 dózisnál elért maximum után csökkennek. Az LMFX oldat besugárzása során nem volt szignifikáns különbség a kétféle sugárzás hatása között a 336-os m/z-értékű bomlástermék járulékában, míg a ciklodextrinek jelenlétében (BLX, HPLX) az UV-A besugárzás hatására ennek a fototerméknek a járuléka megnőtt. Ez a növekedés azonban kisebb, vagy a szignifikancia szintnél kisebbé is válhat, — különösen β-CD esetén — amennyiben a rendszer liposzómát is tartalmazott. A 350-es termék járulékában szintén nem volt különbség a lomefloxacin oldatban, míg az összetételek többségében az UV-A besugárzás eredményezett nagyobb járulékot.

A lomefloxacin fotobomlását, valamint bomlási állandójának spektrális érzékenységét nem csak a liposzómák jelenléte változtatja meg, hanem a ciklodextrin típusa, a CD-kel együtt jelenlévő liposzóma összetétele és szerkezete is. Például az LMFX DPPC rendszerben mindig jobban bomlott, mint DOPC jelenlétében; a

SUV-ok érzékenyebbek voltak UV-B-re, mint az MLV-k; CD-oldatokban a bomlása fokozódott, amit részben kompenzált a liposzómák jelenléte. Ezek arra utalnak, hogy a lomefloxacin és/vagy fototermékei olyan speciális kölcsönhatásba léphetnek a jelenlévő CD-kel vagy lipidekkel, amik a fotobomlás lezajlásában meghatározó szerepet játszó elektroneloszlást a lomefloxacinban és fototermékeiben megváltoztathatják.

6. Megbeszélés

6.1. Az óriás vezikulák alkalmazhatósága a biofizikai/gyógyszerészeti vizsgálatokban

Az óriás vezikulákat sejtmodellként használják a biokémiai és biofizikai vizsgálatok/kísérletek során. A gyógyászatban gyógyszerhordozóként már alkalmazott kisebb méretű liposzómák, főleg a SUV-ok alkalmasak pl. intravénás használatra is (pl. doxorubicin, amfotericin B, vinkrisztin, morfin). A GUV-ok ilyen irányú felhasználása a trombózis és az embóliaveszély, majd az immunrendszer-aktiváló hatása miatt egyelőre nem lehetséges. Méretük miatt inkább külsőleg alkalmazott készítmények formulálása során kaphatnak szerepet. A liposzomális készítmények előnyösek lehetnek szem-, és orrcseppként, ugyanis lipidtartalmukkal stabilizálják a könnyfilmet, illetve biokompatibilisek lehetnek a hallójárat természetes lipidszekrétumával. Ilyen módon az óriás vezikulák, a GUV-ok, a nagy bezárt, vizes térfogatuknak köszönhetően alkalmasak lehetnek a jó vízoldékonyságú hatóanyagok célbajuttatására, ami ebben az esetben jelentheti a hatóanyagnak a hatás eléréséhez szükséges ideig történő „helybentartását” is. A hatóanyagok bőrön keresztül történő (percutan) bejuttatása a szervezetbe szintén egy megfelelő alkalmazási terület lehet, bár a vízoldékony karboxi-fluoreszceinnel végzett kísérletek alapján a festék mélyre jutásához a bőrben elegendő a liposzómák jelenléte is, nem szükséges a molekulák bezárása (Verma és mtsai 2003). Az utóbbi években vizsgálták a liposzómák *per os* történő alkalmazásának lehetőségét is. Az eredmények alapján a liposzómák akár egyéb védőbevonat nélkül is alkalmasak lehetnek, mint orális gyógyszerszállító rendszerek; ugyanis megfelelő lipidösszetétel mellett elérhető, hogy a hatóanyagok védve legyenek a szájban történő bomlástól és a gyomor emésztőfolyamataitól. Egyes vizsgálatok alapján a SUV-okat, a nagyobb görbület és a lazábban „pakolt” szerkezet miatt, az epesavak és sóik alacsonyabb koncentráció mellett szolubilizálják, mint a kisebb görbületű, nagyobb vezikulákat (Maherani és mtsai 2013). Éppen emiatt lehetnek az óriás vezikulák ígéretesek ezen a területen. A különböző felületmódosításokkal, vagy polimer mátrixba történő ágyazással még tovább növelhető lenne a vezikulák stabilitása, illetve cirkulációjának ideje a gasztrointesztinális traktusban, segítve a poláris hatóanyagok abszorpcióját a vékonybél epitélsejtjeiben (Dai és mtsai 2005, Maherani és mtsai 2013).

6.2. Hatóanyagok kompatibilitása liposzómák felületi töltésével

A liposzómák zéta-potenciálját az ideális tartományban úgy lehet a legkönnyebben fenntartani, ha a felületi töltésük előjelének megfelelő töltésű hatóanyagokat zárunk be a liposzómák vizes fázisába. Ez elsősorban olyan hatóanyagokra vonatkozik, amelyek logP értéke kicsi és töltéssel rendelkeznek. Azonos töltések esetén a zeta-potenciál abszolút értékben nem csökken, így az aggregáció, vagy a keletkezésük hatásfoka nem romlik. A negatív zéta-potenciálú lecitin liposzómák esetén, tehát érdemes a hatóanyagoknak negatív töltésű sóit előállítani. Ellenkező esetben pozitív töltésű hatóanyag származékok használata célszerű. A lipofil hatóanyagok esetén két problémát kell megoldani. Egyrészt biztosítani kell, hogy vízben a terápiás hatásnak megfelelően oldhatók legyenek, másrészt, hogy a liposzómákban nagyobb legyen a lipid/vizes-fázis arány. Ezt emulziókkal, vagy MLV-kel lehet elérni. Ebben az esetben a mellékhatások csökkentése és a hatóanyag célbajuttatása lehet az, ami miatt a liposzomális készítmények előnyöket kínálhatnak a hagyományos gyógyszerformákkal szemben.

6.3. Hatóanyagok kötődésének jellemzése

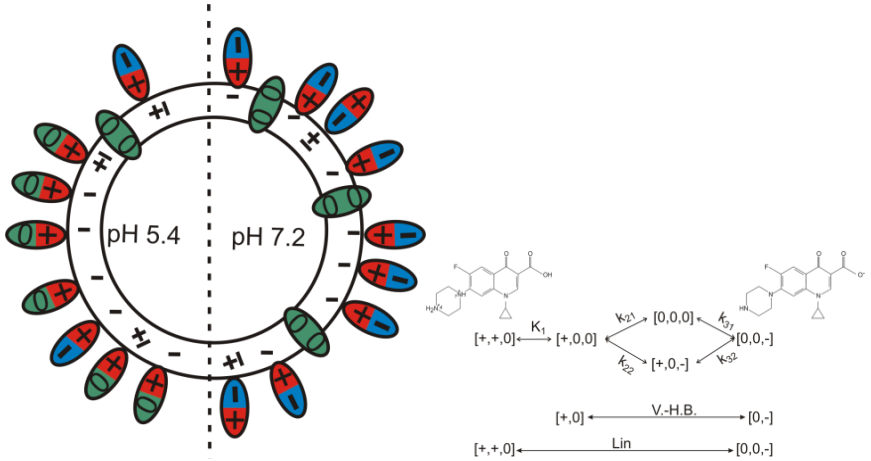
Az alkalmazott hatóanyagok között elsősorban a vízben, illetve apoláris oldószerekben (ezen utóbbiak között lehetnek különféle lánchosszúságú zsírsavakat tartalmazó rendszerek, olajok vagy egyéb szerves oldószerek) való oldhatóság szerint szoktak különbséget tenni. A gyógyszerészi gyakorlatban a vizes és oktanolos fázis közötti megoszlást szokták a logP-értékkel jellemezni. Ez a fogalom azonban sok esetben nem elegendő az oldékonyság jellemzésére, hiszen nagyon gyakran éppen a „vízoldékonyság” elősegítésére a szerves molekuláknak sóit szokták alkalmazni (pl. hidrokortizon-nátrium-hemiszukcinát, fenobarbitál-nátrium, papaverin-hidroklorid, bupivakain-hidroklorid). Takács-Novák és mtsai. (Takács-Novák és mtsai 1995) már korábban is felhívták a figyelmet arra, hogy a logP-érték igen jelentősen megváltozhat a hatóanyagok protonáltsági állapotától függően. Kísérleteimben hasonló jelenséggel találkoztam, amikor a ciprofloxacin, illetve a koffein kötődését írtam le.

A zéta-potenciál mérésekor azt találtam, hogy a koffein nem változtatta meg a zéta-potenciál értékét. Ezzel szemben a ciprofloxacin•HCl alacsonyabb pH-n jelentős mértékben, míg pH 7,2 környékén gyakorlatilag a hibahatáron belül azonos értéket

mutatott. Az általam mért százalékos kötődés ugyanakkor közel azonos volt. Ennek a jelenségnek az értelmezése azt veti fel, hogy a hatóanyagok kötődését az adott pH-n történő disszociált alakok pontos ismeretében lehet leírni. A zéta-potenciál elméleti leírása meglehetősen komplex egyenletek megoldását tételezi fel, sokszor csak numerikusan megoldható problémaként (Ohki 1984, Ohshima 2002, Rooney és Lee 1983, Sou 2011), így a munkám során csak szemi-kvantitatív leírásra törekedtem, a különféle mikrospeciációs formák figyelembevételével.

Az alacsonyabb 5,4-es pH-n a vezikulák felületi töltése negatív, a CPFX-molekulák kb. 90 %-a pedig egy, vagy két pozitív töltéssel bír ([+,0], [+,+,0] vagy [+,0,0]). A negatív lipidfelszín és a pozitív molekulák közötti kötődést elektrosztatikus kölcsönhatás segítheti, melynek eredményeképpen a hatóanyag-molekulák pozitív felükkel fordulva a vezikulák felé azok eredő negatív töltése csökken, mint ahogy a zéta-potenciál abszolút értéke is. 7,2-es pH-n számításaink alapján (3. táblázat, 50. oldal) a CPFX-molekulák több, mint 60 %-a ikerionos, kb. 25 %-a neutrális formában van jelen. Ebben az esetben a nagyobb arányban ikerionos állapotban előforduló molekulák pozitív felükkel fordulnak a negatív lipid-kettősréteg felé, mivel így kifelé, a vizes fázis felé szintén negatív pólusuk mutat, a vezikulák nettó töltése változatlanul negatívnak adódik. A CPFX-molekulák kötődésének és a töltések alakulásának egyszerűsített rajzát a két pH-értéken a 30. ábra mutatja.

A koffein 0,6 körüli pK_a értéke alapján pH 5,6-on töltést nem hordoz, nem alakít ki olyan kölcsönhatást az eredetileg negatív felületi töltésű vezikulákkal, aminek révén a zéta-potenciál megváltozna. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a különböző pufferrendszerekben előállított liposzómák zéta-potenciáljában is. A szintén töltésnélküli glükózt tartalmazó oldatban megmaradt a vezikulák eredetileg negatív felületi töltése, míg az ammónium-acetát disszociált ionjai elfedték azt (Kaszas és mtsai 2008). Nem-ionos felületaktív anyagokból előállított vezikulákon (nioszómákon) sem tapasztalták a koffein hatását a zéta-potenciálra, amit az elhanyagolható mértékű adszorpcióval magyaráztak (Carafa és mtsai 2011).



30. ábra A bal oldali kép a CPFX molekulák liposzómához történő kötődésének sémája a két vizsgált pH értéken. Az elipszisek jelölik a CPFX-molekulákat, bennük a 0,+ és - jelek utalnak a különböző mikrospeciációs állapotokra. Ezen az ábrán a vezikula belső felszíneihez kötődő molekulák nem lettek feltüntetve. A jobb oldali kép emlékeztető a CPFX mikrospeciációs állapotairól.

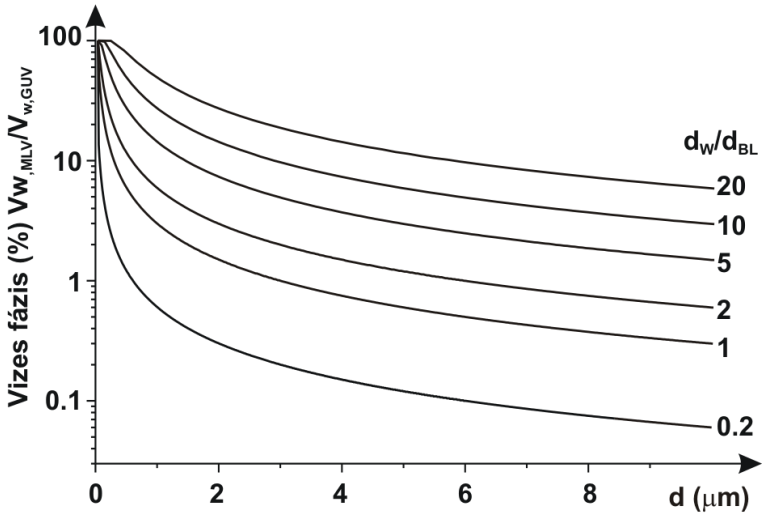
Liposzómák esetén azonban számolhatunk a koffein és a lipidmolekulák között létrejövő hidrofób, dipól-dipól kölcsönhatásokkal, valamint a hidrogénhidakkal történő kötődés sem kizárható (Bahrami és mtsai 2013), amelyek együttesen az általunk mért jelentős kötődést (45. oldal) magyarázhatják. Ez a mért jelentős kötődés az, ami felvetette az ESR-mérés jogosultságát. Elsősorban a fejcsoportokhoz közeli régiókban monitoroztuk a liposzóma-koffein kölcsönhatást. Az alkalmazott spinjelölt vegyületek közül a zsírsavláncot tartalmazó nitroxid vegyület közvetlenül a foszfát fejcsoportok alatti régiókban érzékeny a kölcsönhatások változására. Mivel a méréseim szerint ebben a mélységben nem tapasztaltunk változást sem a mikroszkópikus rendezettségben, sem a rotációs mozgások időskáláján, a következő méréseimben a kettősréteg vízfázisával érintkezésben levő régiót teszteltem. Az alkalmazott spinjelölt vegyület olyan szerkezetű, hogy a tizenhat szénatomot tartalmazó szénhidrogénlánca révén a kettősréteg szénláncaiba jól bemerül, miközben a fejcsoportok és a vizes fázis határán elhelyezkedő nitroxid csoporttal érzékenyen reagál az ebben a rétegben levő változásokra. Méréseim, valamint a kiegészítő spektrum-szimulációs munkák is, azt mutatták, hogy a kötődő koffein nem okoz olyan mértékű változást, ami a fejcsoportok kölcsönhatásait nagymértékben megváltoztatná. Az eredmények alapján vetettük fel azt, hogy a koffein kötődése egy szolvatációs rétegben történne, ami a koffein-membrán

közötti kölcsönhatásban sokkal kisebb mértékben vezetne a lipidek fluiditásának változásához.

6.4. A bezárt térfogatok összehasonlítása a GUV-ok és MLV-k esetén

Hatóanyagok bőrön történő alkalmazásának célja lehet, a gyógyszermolekulák kumulációjának elérése, vagy a szisztémás keringésbe juttatása. Az apoláris, főleg a lipidben oldódó hatóanyagoknak a bőr mélyebb rétegeibe juttatása inkább a nagyobb lipidaránnyal rendelkező, multilamelláris rendszerekkel érhető el. Vízoldékony hatóanyagok esetén viszont a nagyobb bezárási hatásfok eléréséhez éppen az óriás liposzómák nagyobb bezárt, vizes fázisa célszerű.

A dialíziskísérletek során a tojáslecitin GUV-ok 70,7 %-ot, az MLV-k szinte a teljes mennyiséget, a CPFX 97 %-át leadták, vagyis a GUV-ok kb. 30 %-ot, míg az MLV-k 3 %-ot tartottak vissza. Az eltérő méretű és szerkezetű liposzómák a vizes fázis eltérő hányadát zárják be; az MLV-k és GUV-ok által bezárt vizes térfogatban akár több nagyságrendnyi különbség is adódhat. Az általunk használt vékonyréteg-hidratációs technikával előállított MLV-k maximális átmérője kb. 1 μm és ráadásul belső terük nagyobb részét is lipid tölti ki. Ezzel ellentétben a GUV-ok átmérője akár több tíz μm-es is lehet, így a két liposzómatípus által bezárt vizes térfogat nagysága között kb. 1000-szeres lehet a különbség egy egy vezikulát véve. Ha figyelembe vesszük, hogy az általunk használt preparálási technikával előállított GUV-ok méreteloszlása exponenciális (Akashi és mtsai 1998), a mintában az említett különbség akkor is 100-szoros a teljes mintát tekintve. Számításokat végeztem annak értelmezésére, hogy miként változik a bezárt vizes térfogat, azonos átmérőket feltételezve GUV-okra és MLV-kre; amikor az MLV-k több rétegben tartalmaznak lipid-kettősréteget, amelyek egymástól különböző távolságban ismétlődnek, s közöttük vizes fázis van. Például méréseink alapján az MLV-k a CPFX mennyiségének relatív 3 %-át, míg a GUV-ok a kb. 30 %-át tartották vissza. E két adat aránya kb. 10%-ot ad. A 31. ábrán a 10 %-nál a 2 d_W/d_{BL} arányú görbét kb. 0,58 μm-es átmérőnél metszi. Nagyobb d_w/d_{BL} arányoknál a megfelelő átmérő a nagyobb értékek felé tolódik.



31. ábra Azonos átmérőjű MLV-k és GUV-ok által bezárt vizes térfogat aránya az átmérő függvényében.

6.5. A zéta-potenciál hatása az óriás liposzómák mikroszkópos képére

A kétértékű kationok jelenléte a mi méréseink szerint hatással volt a preparátumban a keletkező vezikulák méretére, lamellaritására. A preparálás során 3 mM-os koncentrációban jelenlévő Ca^{2+}-ionok esetén tapasztaltuk a GUV-ok csoportba rendeződését. A GUV-okhoz a Ca^{2+}-ionokat kívülről adva (mint a zéta-potenciál mérések esetén) ugyanezt a hatást észleltük. Nagyságrendileg ez az ionkoncentráció Ca^{2+} és Mg^{2+} esetén is 10 mV alá csökkentette a zéta-potenciál abszolút értékét, ami bőven alatta van a tankönyvek által megadott, a preparátum stabilitásához szükséges 30 mV-os értéknek. Hasonló jelenséget tapasztaltunk 5,4-es pH-értéken a CPFX jelenlétében is, ahol a zéta-potenciál –4,5 mV-ig nőtt. pH 7,4-en a mikroszkópos képen nem tapasztaltunk változást a kontroll mintához képest, és a zéta-potenciál értékében sem.

Ezek alapján a kationok és a töltést hordozó molekulák kötődése, és árnyékoló hatása miatt a lipidvezikulák felületi töltése csökkent, ami együtt járt a vezikulák és a lipidrétegek közötti elektrosztatikus taszítás csökkenésével. Ez a hatás eredményezhette a vezikulák aggregációját és a multilamelláris szerkezet kialakulását megfelelő kationkoncentráció mellett, illetve pH 5,4-en a CPFX jelenlétében. A magasabb pH-értéken, 7,2-n, az ikerionos CPFX-molekulák kötődése nem okozott zéta-potenciálbeli változást, mivel nem változtatta meg a felületi töltéssűrűséget, és így a rétegek közötti

taszító erő sem csökkent; a mikroszkópos képen ezért nem láttuk a GUV-ok aggregációját, lamellaritásának növekedését.

6.6. Hatóanyagok kötődése — membránfluiditás

Az ESR spektroszkópiai módszerek segítségével a membránfluiditás változásai egyszerűen mérhetők. Ennek az az alapja, hogy a molekulák rotációs diffúziója az, amire az ESR spektrumok érzékenyek. Így minden olyan változás, ami a rotációs diffúziót megfelelően megváltoztatja, jelentkezhet az ESR spektrumokon (Grell 1981).

ESR méréseink alapján a CPFX csak 39 ^{o}C felett volt fluiditásnövelő hatással a membránra. A 4. táblázat alapján (54. oldal) a legnagyobb mértékű változás 39 ^{o}C-on volt tapasztalható, a hőmérséklet további növelésével a hatás mértéke csökkent. Ez azzal magyarázható, hogy a hőmérséklet növelésével eleve nő a membrán fluiditása, ami miatt a jelenlévő CPFX molekulák könnyebben, illetve egyre mélyebben tudnak a membránba beépülni, és ott a lipidmolekulákkal, illetve a spinjelölőkkel kölcsönhatásba lépni. Az eredmények alapján a 39 ^{o}C-os hőmérséklet volt szükséges ahhoz, hogy a CPFX hatására bekövetkező fluiditásbeli növekedés a kontroll mintáéhoz képest mérhető legyen. A hőmérséklet további emelése a fluiditás növelésével jár, ami valószínűleg kifejezettebb volt, mint a CPFX fluiditást növelő hatása, ezért mérhettünk a 39 ^{o}C-nál magasabb hőmérsékleteken kisebb különbséget a kontroll és a CPFX-szel kezelt minták fluiditása között. Az ESR spektrumok szimulációja segítségével is meghatároztuk, hogy a CPFX-szel kezelt mintákban 7,4 %-kal nagyobb a rendezetlen komponens jelenléte a kontroll mintákhoz képest.

Méréseink alapján a bőr pH-jának megfelelő 5,6-os pH-értéken mind a szója-, mind a tojáslecitinből készült liposzóma preparátum stabilnak tekinthető volt, hiszen zéta-potenciáljuk abszolútértéke meghaladta a gyakorlatban alkalmazott 30 mV-os elméleti határt (tojáslecitin: –33,12 mV, szójalecitin: –47,57 mV). A szójalecitin kb. 10 mV-tal negatívabb felületi töltése magyarázható azzal, hogy nagyobb arányban tartalmaz foszfatidilszerin fejcsoportokat, amelyek protonálható, vagy deprotonálható csoportjai az aktuális 5,6-os pH-n többségben negatív töltésűek. A tojás-, illetve szójalecitinből előállított vezikulák töltéskülönbségének ellenére a koffein bezárására hasonló bezárási hatásfokot határoztunk meg: tojás esetén 31,2, szója esetén 29,2 %-ot. A mi eredményeinkhez hasonlóan Memoli és munkatársai sem tapasztaltak különbséget

a tojás-, és szójalecitin bezárási hatásfokában, amit egy másik hidrofil modell molekula, a kalcein liposzómába zárásán vizsgáltak (Cevc 2004, Memoli és mtsai 1995, 1994).

Ugyan a koffein alacsony logP értéke alapján nagyobb koncentrációban inkább a vizes fázisban fordulna elő, mint a lipofilben, ismert, hogy egyes hatóanyagok oktanol/víz elegyre meghatározott logP értékének lipidrendszerre történő alkalmazása különbséget okozhat a tapasztalt és a várt megoszlás között (Budil és mtsai 1996, Casal és mtsai 1987). Valószínűleg az említett kölcsönhatások miatt volt a bezárási hatásfok, vagyis inkább a lipidhez kötött koffeinmennyiség (lsd. bezárási hatásfok meghatározása a bevezetésben) jelentős (~ 30%), azonban a növekvő koffeinkoncentráció mellett nem volt mérhető a potenciál szignifikáns változása még 32:1-es koffein-lipid mólarány mellett sem. Ez magyarázható azzal, hogy a koffein 0,6 körüli pK_a értéke alapján pH 5,6-on töltést nem hordoz, . A koffein jelenléte a membrán fluiditására sem volt hatással 5:1 koffein: lipid mólarány mellett sem a zsírsavláncok ötödik szénatomjának mélységében.

Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a liposzómák és a töltés nélküli koffein molekulák közötti kölcsönhatás nincs hatással a vezikulák felületi töltéssűrűségére és fluiditására, bár elég erős ahhoz, hogy centrifugálást követően a koffein adszorbeálva maradjon a vezikulák felszínén.

6.7. Az LMFX fotobomlása liposzomális CD rendszerekben

A lomefloxacin fototoxicitásáért egyes szerzők az UV-sugárzás hatására keletkező reaktív oxigén gyököket (ROS), illetve a H-, F- és CO_2-csoportok leválása után visszamaradó bomlástermékeket teszik felelőssé (De Vries és Beijersbergen Van Henegouwen 2000, Fasani és mtsai 1997). Korábbi munkákból kiderült, hogy a lomefloxacin liposzómába zárása nem védi meg a molekulát a degradációtól, csupán más reakcióutak felé tereli a folyamatot (Budai és mtsai 2008). Mivel ismert a ciklodextrinek hatása a molekulák fotodegradációjára, (ami lehet protektív, más esetekben éppen bomlást serkentő hatás) többféle LMFX-ciklodextrin-liposzóma rendszerben vizsgáltuk meg a lomefloxacin fotobomlását.

Az LMFX (m/z=352) bomlási folyamatára nagyobb reakciósebességi állandókat határoztunk meg UV-A sugárzást követően, mikor a hatóanyag liposzómába volt zárva, mint ha szabad oldatban volt (27. ábra, 60. oldal). Ezt alátámasztják azok az ESR

eredmények is, amelyek szerint nalidixsav bezárásakor a SUV rendszerekben intenzívebb volt a szabadgyök-képződés UV-A sugárzást követően, mint a lipid nélküli mintákban, vagyis az indirekt fotokémiai reakciókat gyorsította a liposzómák jelenléte (Budai és mtsai 2004). Ez lehet azért, mert a lipid kettősréteg befoghatja a lipofil gyököket, amik így hosszabb élettartammal rendelkeznek, így a lipidek peroxidációját, vagy éppen a kettősrétegbe ágyazódott molekulák károsodását idézhetik elő (Budai és mtsai 2004). UV-A besugárzás esetén önmagában a ciklodextrinek jelenléte nem okozott szignifikáns változást a reakciósebességi állandók értékében a lomefloxacin oldatéhoz képest, sőt az UV-B fényforrás hatására a k_D értéke inkább nőtt. Másik fluorokinolon, az ofloxacin esetében sem tapasztalták a β-CD fotoprotektív hatását. (Koester és mtsai 2001), ami magyarázható azzal, hogy a hatóanyag molekulája nem teljesen záródik a CD-henger belső üregébe, a piperazin gyűrűt védtelenül hagyva (Tóth és mtsai 2012). Egyes irodalmak szerint az LMFX két elsődleges bomlási terméke a fluor leválásával és éppen a piperazin gyűrű bomlásával jön létre (De Vries és Beijersbergen Van Henegouwen 2000) karbén szabadgyökös szerkezet kialakulásával. Szintén UV-A besugárzást követően a DPPC-liposzómás LMFX minták megnövekedett k_D-értékéhez képest csökkenést tapasztaltunk, ha a minták ciklodextrint is tartalmaztak, vagyis liposzómák jelenlétében a CD-k fényvédő hatása érvényesült. Mindamellett az általunk vizsgált m/z tartományban nem mutattuk ki a lipid és a ciklodextrin molekulák bomlástermékeit. Ezek alapján azt feltételezhetjük, hogy a lipidekkel kölcsönhatásba lépve a CD molekula másképpen hat az LMFX elektronszerkezetére, ezzel befolyásolva annak és fotoproduktumainak stabilitását. Kisebb változásokat tapasztaltunk az LMFX molekula bomlását jellemző k_D értékeiben a különböző összetételek esetében UV-B besugárzás, mint UV-A során.

A fotobomlásra vonatkozó eredményeim alapján arra következtettem, hogy a fluorokinolonok fotorpoduktumainak keletkezési sebességét, azok arányát nagymértékben befolyásolja mind a liposzómák összetétele, az alkalmazott ciklodextrin fajtája, valamint az UV-sugárzás hullámhossztartománya is.

7. Következtetések

Doktoranduszi munkám során vizsgáltam az óriás egyrétegű vezikulák képződésének optimális körülményeit, modell hatóanyagok kötődését különböző szerkezetű liposzómákhoz, és az azok fluiditásában, zéta-potenciáljában a kötődés következtében végbemenő változásokat, illetve a liposzóma-ciklodextrin rendszernek egy fotodegradábilis hatóanyagra gyakorolt esetleges védőhatását. A disszertációmban bemutatott mérési eredményeim alapján levonható következtetéseket az alábbi pontokban foglalom össze:

1. Az óriás vezikulák előállítására vonatkozó kísérleteim azt mutatják, hogy szója-, illetve tojáslecitinből előállított liposzómák esetén a spektroszkópiai vizsgálatokra is alkalmas mintára vonatkozó optimális feltételek akkor teljesülnek, ha az ionerősség alacsony (maximum 50 mM, amibe az oldat pufferének ionerejét is figyelembe kell venni); a kétértékű kationok koncentrációja kisebb, mint 1 mM (ami függ a jelenlévő negatív töltésű lipidek koncentrációjától is). A spektroszkópiai vizsgálatokhoz szükséges jelentős anyagmennyiség sokkal nagyobb nehézségeket támaszt a preparatív körülményekkel szemben, mint a sokkal kisebb mennyiségi igényű mikroszkópos vagy pl. egyedi molekula vizsgálatok. Ezért az optimális körülmények megállapítása jelentős és szükséges feladat az egyes rendszerek által támasztott speciális feltételek megtalálásához.

2. A kötődési vizsgálatok alapján a multilamelláris vezikulákkal hasonló bezárási hatásfokot értünk el a két vélhetően más kölcsönhatás által kötődő molekulára: a neutrális koffeinre és a töltést hordozó CPFX-re. Az óriás vezikulák nagyobb fajlagos kötőkapacitással rendelkeznek CPFX-re nézve, mint az MLV-k. A CPFX kötődése pH 5,4-en a GUV-ok részleges aggregációját okozta, míg a magasabb pH-értéken nem. Az egyes hatóanyagok kötődésének vizsgálata nem szorítkozhat pusztán egyetlen méretű vagy típusú liposzomális rendszer vizsgálatára; különböző lipidösszetétel és liposzóma-szerkezet mellett is kívánatos a kötődési mérések elvégzése, az egyes különbségek, illetve azonosságok felderítése érdekében.

3. Az alkalmazott mérési körülmények között a vizsgált tojáslecitin- és DPPC-liposzómarendszerek is negatív felületi töltésűek, azaz zéta-potenciáljuk az irodalmi adatokkal egybevágóan negatív. A felületi töltéssűrűséget nem befolyásolja a semleges koffein kötődése, az esetleg kialakuló hidrogén-hídas kötődés ellenére sem. A CPFX neutrális és ikerionos formáinak jelentős járuléka miatt pH 7,2-en a felületi töltéssűrűség nem változik, míg pH 5,4-en a molekulák túlnyomóan pozitív töltése leárnyékolja a vezikulák eredetileg negatív töltését. A liposzomális szerkezetek stabilitásához általánosan javasolt zéta-potenciál fenntartása érdekében a hatóanyagok olyan vegyületeit érdemes használni, ami az előző feltételeknek a legjobban megfelel. Emellett figyelembe kell venni azt is, hogy a hatóanyag terápiás koncentrációjának eléréséhez lipofil vagy hidrofil tulajdonságú hatóanyagot érdemes-e használni. Ennek megfelelően kell a lipidösszetételt, illetve a liposzóma szerkezetet megválasztani.

4. Az ESR mérések alapján a lipidmembrán fejcsoportjaihoz közeli régió fluiditásában a koffein kötődése nem okoz kimutatható változást, míg a ciprofloxacin, magasabb hőmérsékleteken (39 ^{o}C felett), mérhető fluiditáscsökkenést okoz. A fluiditás változása két hatás alapján történhet. Egyrészt a hatóanyag beépülhet a lipidmolekulák apoláris oldalláncai közé, vagy az esetleg poláris fejcsoportokkal léphetnek kölcsönhatásba. Az első esetben elsősorban a membránon belüli mikroszkópikus rendezettség változása befolyásolja fluiditást. Az elsősorban a poláris fejcsoportokkal kölcsönhatásba lépő hatóanyagok, pl. a hőmérséklettől függően, megbontják/megváltoztatják a lipidek fejcsoportjai közötti rendezett szerkezetet, ami a lipidek közötti fő kölcsönhatás révén azok rotációs mozgásának frekvenciáját is növelheti.

5. A hatóanyag leadását (CPFX) a hatóanyagok elektromosan töltött/töltetlen formái, azok kötődése a membránhoz, valamint a bezárt vizes térfogat nagysága és a liposzómák szerkezete is nagymértékben befolyásolja. Az olyan összetett rendszerek esetén is, mint a liposzomális formulációk, a hatóanyag leadásnak a liposzóma membránjára vonatkozó sebességi állandója, egyszerű dialízis-kinetikai mérés alapján meghatározható. Az

általános farmakokinetikai elvekkel összhangban, ahhoz, hogy a megfelelő tárolási kapacitású és leadási sebességű rendszert ki tudjuk választani, adott liposzomális formulációk esetén külön-külön meg kell vizsgálni a hatóanyagok megoszlási és permeabilitási tulajdonságait.

6. Egy fényérzékeny hatóanyag, a lomefloxacin fotobomlását befolyásolni lehet az LMFX-ciklodextrin-komplex liposzómába zárásával. A lomefloxacin fotobomlását, valamint bomlási állandójának spektrális érzékenységét nem csak a liposzómák jelenléte változtatja meg, hanem a ciklodextrin típusa, a CD-kel együtt jelenlévő liposzóma összetétele és szerkezete is. Például az LMFX DPPC rendszerben mindig jobban bomlott, mint DOPC jelenlétében; a SUV-ok érzékenyebbek voltak UV-B-re, mint az MLV-k; CD-oldatokban az LMFX bomlása fokozódott, amit részben kompenzált a liposzómák jelenléte. Ezek arra utalnak, hogy a lomefloxacin és/vagy fototermékei olyan speciális kölcsönhatásba léphetnek a jelenlévő CD-kel vagy lipidekkel, amik a fotobomlás lezajlásában meghatározó szerepet játszó elektroneloszlást a lomefloxacinban és fototermékeiben megváltoztathatják. Megfigyeléseim szerint a lomefloxacin bomlási sebességének és esetleg a fototoxikus mellékhatások kialakulásának csökkentésére alkalmas lehet a DOPC-t tartalmazó lipidrendszer, illetve kis unilamelláris vezikulák használata.

8. Összefoglalás

A gyógyszermolekulák biológiai membránokra gyakorolt hatásának ismerete a pozitív-, és akár a mellékhatások megismerése, előrejelzése szempontjából is kiemelkedő jelentőségű. A liposzómák — napjaink egyik legígéretesebb gyógyszerformája — modellmembránokként alkalmasak az egyes molekulák és a lipidmembránok kölcsönhatásának vizsgálatára is. A nanoméretű liposzómák gyógyszerformaként már több terápiás területen is jelen vannak, viszont a különböző méretből és szerkezetből adódóan az eltérő tulajdonságok és fizikai-kémiai paraméterek miatt (mint a görbület, a lipidmolekulák „pakoltsága", a bezárt vizes térfogat nagysága) egyes esetekben az óriás liposzómák előnyösebbek is lehetnek.

A gyógyszermolekulák és a liposzomális rendszerek kölcsönhatásának megismeréséhez különböző méretű és szerkezetű liposzómákat és kétféle modellvegyületet vizsgáltam: a semleges töltésű koffeint, illetve a különböző pH-értékeken különböző töltéseket hordozó ciprofloxacint. Vizsgáltam az óriás egyrétegű vezikulák képződésének optimális körülményeit, a modell hatóanyagok kötődését/felszabadulását különböző szerkezetű liposzómákhoz/ból, és az azok fluiditásában, zéta-potenciáljában a kötődés következtében végbemenő változásokat. A ciprofloxacin csak 39 ^{o}C fölött tette fluidabbá a membrán fejcsoportjainak régióját, míg a liposzómák zéta-potenciáljára mikrospeciációs állapottól függően volt hatással. A neutrális koffein — az irodalom alapján hidrogén-hídas kötések révén elért — jelentős, 30 %-os kötődése ellenére sem volt mérhető hatással a membrán fluiditására, illetve töltésére. Szintén a felületi töltések, a gyógyszermolekula lipid és a vizes fázis közötti megoszlása, illetve a létrejövő kölcsönhatások azok a paraméterek, amik már a vezikula képződését, illetve a hatóanyag felszabadulását is befolyásolják.

Egy fényérzékenyítő mellékhatást okozó fluorokinolon, illetve ciklodextrines komplexének fotobomlása nem volt kiküszöbölhető liposzómába zárással, viszont különbség volt az egyes bomlástermékek keletkezésének kinetikájában és arányában. Vagyis egy megfelelő ciklodextrin-liposzóma formulációval a bomlási folyamatot más reakcióutakra terelve a mellékhatást okozó termékek keletkezése csökkenthető lehet.

9. Summary

Investigation of the effects of pharmacons on biological membranes is of prominent importance in the prediction of the therapeutic- or the side-effects. Liposomes as modelmembranes are suitable for the investigation of interactions between membrane lipids and drugs. Small liposomes are used in different therapeutic fields, but because of the physico-chemical differences of liposomes caused by the different size (curvature, position of lipid molecules, enclosed aqueous volume), for some purposes giant liposomes could be more suitable.

For the investigation of drugs and liposomal formulations I used two model pharmacons: the neutral caffeine and ciprofloxacin possessing different charges at different pH-values. Optimal conditions of the preparation of GUVs were checked to obtain systems which are more suitable for spectroscopic investigations as well. In addition, binding and release of the model drugs were studied using liposomes of different structures and compositions applying zeta potential measuring and EPR spectroscopic techniques. According to my observation the fluidity of the lipid bilayers did not change in the interaction with caffeine, but ciprofloxacin provoked a fluidity change above ~39 ^{o}C close to the head region of the lipids. Zeta potential changed depending on the pH of the buffer solution which influences the concentration of the different microspecies. Even if the caffeine bound to the membranes at as high as about 30 %, presumably by hydrogen bond, it did not affect the membrane fluidity neither close to the head groups inside the hydrocarbon chains, nor just out/side of the polar head groups in the solvation sheet. Release of the ciprofloxacin from MLVs and GUVs were compared by determining their release rate constant from both liposomal structures. Photodegradation of the lomefloxacin was investigated in complex systems of varying lipid and cyclodextrin composition, in addition, effect of UV-region for the yield and kinetics of the photoproducts were determined and characterized comparing them to free lomefloxacin in solution.

10. Irodalomjegyzék

Akashi K, Miyata H, Itoh H, Kinosita K, Jr. (1998) Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: Critical role of electrostatic repulsion. Biophys J, 74: 2973-2982.

Akashi K, Miyata H, Itoh H, Kinosita K, Jr. (1996) Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. Biophys J, 71: 3242-3250.

Alam M, Hartrick CT. (2005) Extended-release epidural morphine (depodur): An old drug with a new profile. Pain Pract, 5: 349-353.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008) Membrane structure. 617-650.

Albini A, Monti S. (2003) Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. Chem Soc Rev, 32: 238-250.

Amato M, Isenschmid M, Huppi P. (1991) Percutaneous caffeine application in the treatment of neonatal apnea. Eur J Pediatr, 150: 592-594.

Appelbaum PC, Hunter PA. (2000) The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives. Int J Antimicrob Agents, 16: 5-15.

Avnir Y, Ulmansky R, Wasserman V, Even-Chen S, Broyer M, Barenholz Y, Naparstek Y. (2008) Amphipathic weak acid glucocorticoid prodrugs remote-loaded into sterically stabilized nanoliposomes evaluated in arthritic rats and in a beagle dog: A novel approach to treating autoimmune arthritis. Arthritis Rheum, 58: 119-129.

Bahrami H, Tabrizchi M, Farrokhpour H. (2013) Protonation of caffeine: A theoretical and experimental study. Chem Phys, 415: 222-227.

Bahri MA, Heyne BJ, Hans P, Seret AE, Mouithys-Mickalad AA, Hoebeke MD. (2005) Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol. Biophys Chem, 114: 53-61.

Bangham AD. (1963) Physical structure and behavior of lipids and lipid enzymes. Adv Lipid Res, 1: 65-104.

Benoit RL, Boulet D, Seguin L, Frechette M. (1985) Protonation of purines and related-compounds in dimethylsulfoxide and water. Can J Chem, 63: 1228-1232.

Bensikaddour H, Fa N, Burton I, Deleu M, Lins L, Schanck A, Brasseur R, Dufrene YF, Goormaghtigh E, Mingeot-Leclercq MP. (2008) Characterization of the interactions between fluoroquinolone antibiotics and lipids: A multitechnique approach. Biophys J, 94: 3035-3046.

Bensikaddour H, Snoussi K, Lins L, Van Bambeke F, Tulkens PM, Brasseur R, Goormaghtigh E, Mingeot-Leclercq MP. (2008) Interactions of ciprofloxacin with dppc and dppg: Fluorescence anisotropy, atr-ftir and 31p nmr spectroscopies and conformational analysis. Biochim Biophys Acta, 1778: 2535-2543.

Budai L, Hajdu M, Budai M, Grof P, Beni S, Noszal B, Klebovich I, Antal I. (2007) Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: Studies on ciprofloxacin formulations. Int J Pharm, 343: 34-40.

Budai M, Chapela P, Budai L, Wales ME, Petrikovics I, Zimmer A, Grof P, Klebovich I. (2009) Liposomal oxytetracycline and doxycycline: Studies on enhancement of encapsulation efficiency. Drug Discov Ther, 3: 13-17.

Budai M, Gróf P, Zimmer A, Pápai K, Klebovich I, Ludányi K. (2008) Uv light induced photodegradation of liposome encapsulated fluoroquinolones: An ms study. J Photochem Photobiol A Chem, 198: 268-273.

Budai M, Szabó Zs, Zimmer A, Szőgyi M, Gróf P. (2004) Studies on molecular interactions between nalidixic acid and liposomes. Int J Pharm, 279: 67-79.

Budai M, Szőgyi M. (2001) Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes. Acta Pharm Hung, 71: 114-118.

Budil DE, Lee S, Saxena S, Freed JH. (1996) Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion epr spectra in one and two dimensions using a modified levenberg–marquardt algorithm. J Magn Reson A, 120: 155-189.

Carafa M, Marianecci C, Di Marzio L, Rinaldi F, Meo C, Matricardi P, Alhaique F, Coviello T. (2011) A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: Preparation and characterization. J Pharm Pharm Sci, 14: 336-346.

Casal HL, Mantsch HH, Paltauf F, Hauser H. (1987) Infrared and 31p-nmr studies of the effect of li+ and ca2+ on phosphatidylserines. Biochim Biophys Acta, 919: 275-286.

Cevc G. (2004) Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. Adv Drug Deliv Rev, 56: 675-711.

Chonn A, Cullis PR, Devine DV. (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. J Immunol, 146: 4234-4241.

Chrai SS, Murari R, Ahmad I. (2001) Liposomes: a review. BioPharm, 14: 10-14.

Dai C, Wang B, Zhao H, Li B. (2005) Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate. Colloids Surf B Biointerfaces, 42: 253-258.

Damjanovich S, Osváth S. Tömegspektrometria. In: Damjanovich J, Fidy J, Szöllősi J (szerk.), Orvosi Biofizika. Medicina, Budapest, 2007: 605-606.

Damjanovich S, Vereb G. Konfokális lézer-pásztázómikroszkópia, CLSM. In: Damjanovich J, Fidy J, Szöllősi J (szerk.), Orvosi Biofizika. Medicina, Budapest, 2007: 578-583.

Darvas Zs, László V. A plazmamembrán felépítése és működése. In: Darvas Zs, László V (szerk.), Sejtbiológia. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2002: 12-31.

Datta S, Conlisk AT, Li HF, Yoda M. (2009) Effect of divalent ions on electroosmotic flow in microchannels. Mech Res Commun, 36: 65-74.

de Guidi G, Bracchitta G, Catalfo A. (2011) Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences. Photochem Photobiol, 87: 1214-1229.

de Vries H, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. (2000) Photochemical decomposition of lomefloxacin in vitro and in vivo. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 58: 6-12.

Dhule SS, Penfornis P, Frazier T, Walker R, Feldman J, Tan G, He J, Alb A, John V, Pochampally R. (2012) Curcumin-loaded gamma-cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. Nanomedicine, 8: 440-451.

Dore AS, Robertson N, Errey JC, Ng I, Hollenstein K, Tehan B, Hurrell E, Bennett K, Congreve M, Magnani F, Tate CG, Weir M, Marshall FH. (2011) Structure of the adenosine a(2a) receptor in complex with zm241385 and the xanthines xac and caffeine. Structure, 19: 1283-1293.

Ermakov YA, Averbakh AZ, Yusipovich AI, Sukharev S. (2001) Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions. Biophys J, 80: 1851-1862.

Ermakov YA, Makhmudova SS, Averbakh AZ. (1998) Two components of boundary potentials at the lipid membrane surface: Electrokinetic and complementary methods studies. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 140: 13-22.

Fasani E, Mella M, Caccia D, Tassi S, Fagnoni M, Albini A. (1997) The photochemistry of lomefloxacin. An aromatic carbene as the key intermediate in photodecomposition. Chem Commun (Camb), 1329-1330.

Fatouros DG, Antimisiaris SG. (2002) Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. J Colloid Interface Sci, 251: 271-277.

Fischer A, Oberholzer T, Luisi PL. (2000) Giant vesicles as models to study the interactions between membranes and proteins. Biochim Biophys Acta Biomembranes, 1467: 177-188.

Forsyth PA, Marcelja S, Mitchell DJ, Ninham BW. (1977) Phase-transition in charged lipid-membranes. Biochim Biophys Acta, 469: 335-344.

Galantai R, Bardos-Nagy I. (2000) The interaction of human serum albumin and model membranes. Int J Pharm, 195: 207-218.

Gallenga PE, Lobefalo L, Colangelo L, Della Loggia G, Orzalesi N, Velati P, Bujtar E, Ponte F, Damiani S, Bucci MG, Bonini S, Curatola MR, Palma LA, Bonomi L, Gerosa LT, Pagliarusco A, Milan E, Jauch A. (1999) Topical lomefloxacin 0.3% twice daily versus tobramycin 0.3% in acute bacterial conjunctivitis: A multicenter double-blind phase iii study. Ophthalmologica, 213: 250-257.

Garcia-Saez AJ, Schwille P. (2008) Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions. Methods, 46: 116-122.

Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, Jessup W. (2003) Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 15554-15559.

Gillet A, Compere P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. (2011) Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. Int J Pharm, 411: 223-231.

Godwin DA, Wiley CJ, Felton LA. (2006) Using cyclodextrin complexation to enhance secondary photoprotection of topically applied ibuprofen. Eur J Pharm Biopharm, 62: 85-93.

Graber H, Ludwig E. Kinolonok, fluorokinolonok. In: Fürst Zs (szerk.), Farmakológia. Medicina, Budapest, 2006: 968-973.

Greenberg RN, Newman MT, Shariaty S, Pectol RW. (2000) Ciprofloxacin, lomefloxacin, or levofloxacin as treatment for chronic osteomyelitis. Antimicrob Agents Chemother, 44: 164-166.

Grell E. Membrane spectroscopy. Springer-Verlag, Berlin; 1981: 498.

Griffith OH, Jost PC. (1976) Lipid spin labels in biological membranes. 454-519.

Honda M, Takiguchi K, Ishikawa S, Hotani H. (1999) Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking. J Mol Biol, 287: 293-300.

Hunter RJ. (1981) Zeta potential in colloid science. Principles and applications.

Iraolagoitia XL, Martini MF. (2010) Ca(2+) adsorption to lipid membranes and the effect of cholesterol in their composition. Colloids Surf B Biointerfaces, 76: 215-220.

Juhasz J, Davis JH, Sharom FJ. (2012) Fluorescent probe partitioning in guvs of binary phospholipid mixtures: Implications for interpreting phase behavior. Biochim Biophys Acta, 1818: 19-26.

Kaszas N, Bozo T, Budai M, Grof P. (2013) Ciprofloxacin encapsulation into giant unilamellar vesicles: Membrane binding and release. J Pharm Sci, 102: 694-705.

Kaszas N, Budai M, Budai L, Grof P, Zimmer A, Klebovich I. (2008) A bezárási hatásfok növelésének lehetőségei liposzómába zárt lomefloxacinnál. Acta Pharm Hung, 78: 69-74.

Kataoka R, Aruga S, Mitaku S, Kinosita K, Jr., Ikegami A. (1985) Interaction between ca2+ and dipalmitoylphosphatidylcholine membranes. Ii. Fluorescence anisotropy study. Biophys Chem, 21: 277-284.

Kim S, Martin GM. (1981) Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. Biochim Biophys Acta Biomembranes, 646: 1-9.

Klebovich I, Antal I, Ludányi K. Komplexképződés vizsgálata dialízissel. In: Klebovich I, Antal I, Ludányi K (szerk.), Kémiai ellenőrző vizsgálatok a gyógyszertechnológiában. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012: 90-92.

Koester LS, Guterres SS, Le Roch M, Eifler-Lima VL, Zuanazzi JA, Bassani VL. (2001) Ofloxacin/beta-cyclodextrin complexation. Drug Dev Ind Pharm, 27: 533-540.

Kosman DJ. Electron spin resonance. In: Rousseau DL (szerk.), Structural and Resonance Techniques in Biological Research. Academic Press, Orlando, Florida, 1984: 90-102.

Lamblet M, Delord B, Johannes L, van Effenterre D, Bassereau P. (2008) Key role of receptor density in colloid/cell specific interaction: A quantitative biomimetic study on giant vesicles. Eur Phys J E Soft Matter, 26: 205-216.

Lasic DD Chemistry of lipids and liposomes. In: Lasic DD (szerk.), Liposomes from physics to applications. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995: 9-40.

Levi-Schaffer F, Touitou E. (1991) Xanthines inhibit 3t3 fibroblast proliferation. Skin Pharmacol, 4: 286-290.

Lhiaubet-Vallet V, Bosca F, Miranda MA. (2009) Photosensitized DNA damage: The case of fluoroquinolones. Photochem Photobiol, 85: 861-868.

Limousin G, Gaudet JP, Charlet L, Szenknect S, Barthès V, Krimissa M. (2007) Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. Appl Geochem, 22: 249-275.

Lin CE, Deng YJ, Liao WS, Sun SW, Lin WY, Chen CC. (2004) Electrophoretic behavior and pk(a) determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. J Chromatogr A, 1051: 283-290.

López-García MÁ, López Ó, Maya I, Fernández-Bolaños JG. (2010) Complexation of hydroxytyrosol with β-cyclodextrins. An efficient photoprotection. Tetrahedron, 66: 8006-8011.

Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheirolomoom A, Geny D, Linder M. (2013) Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. Biochimie, 95: 2018-2033.

Majumdar S, Flasher D, Friend DS, Nassos P, Yajko D, Hadley WK, Duzgunes N. (1992) Efficacies of liposome-encapsulated streptomycin and ciprofloxacin against mycobacterium avium-m. Intracellulare complex infections in human peripheral blood monocyte/macrophages. Antimicrob Agents Chemother, 36: 2808-2815.

Malvern-Instruments. Zeta potential– an introduction in 30 minutes. http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/zeta.pdf (2013)

Marcelja S. (1976) Lipid-mediated protein interaction in membranes. Biochim Biophys Acta, 455: 1-7.

Martinez LJ, Sik RH, Chignell CF. (1998) Fluoroquinolone antimicrobials: Singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. Photochem Photobiol, 67: 399-403.

Matkó J, Voszka I Biológiai membránok. In: Damjanovich J, Fidy J, Szöllősi J, (szerk.), Orvosi Biofizika. Medicina, Budapest, 2007: 88-94.

Matsumura H, Verbich SV, Dukhin SS. (1999) Investigation of dynamic stern layer of liposomes by utilizing the isoelectric point and isoconducting point. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 159: 271-276.

Memoli A, Palermiti LG, Travagli V, Alhaique F. (1995) Egg and soya phospholipids - sonication and dialysis - a study on liposome characterization. Int J Pharm, 117: 159-163.

Memoli A, Palermiti LG, Travagli V, Alhaique F. (1994) Liposomes in cosmetics .2. Entrapment of a hydrophilic probe. J Soc Cosmet Chem, 45: 167-172.

Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. (2011) Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. J Drug Deliv, 2011: 863734.

Miyata H, Hotani H. (1992) Morphological-changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. Proc Natl Acad Sci U S A, 89: 11547-11551.

Momo F, Fabris S, Bindoli A, Scutari G, Stevanato R. (2002) Different effects of propofol and nitrosopropofol on dmpc multilamellar liposomes. Biophys Chem, 95: 145-155.

Moreno-Bautista G, Tam KC. (2011) Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 389: 299-303.

Moscho A, Orwar O, Chiu DT, Modi BP, Zare RN. (1996) Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93: 11443-11447.

Naber KG. (2002) Lomefloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis. Int J Antimicrob Agents, 20: 18-27.

Niles WD, Cohen FS. (1987) Video fluorescence microscopy studies of phospholipid vesicle fusion with a planar phospholipid membrane. Nature of membrane-membrane interactions and detection of release of contents. J Gen Physiol, 90: 703-735.

Nomura SIM, Kondoh S, Asayama W, Asada A, Nishikawa S, Akiyoshi K. (2008) Direct preparation of giant proteo-liposomes by in vitro membrane protein synthesis. J Biotechnol, 133: 190-195.

Nordio PL. General magnetic resonance theory. In: Berliner L J (szerk.), Spin Labeling Theory and Application. Academic Press, New York, 1976: 5-52.

Ohki S. (1984) Adsorption of local anesthetics on phospholipid membranes. Biochim Biophys Acta, 777: 56-66.

Ohki S, Kurland R. (1981) Surface-potential of phosphatidylserine monolayers .2. Divalent and mono-valent ion binding. Biochim Biophys Acta, 645: 170-176.

Ohki S, Ohshima H. (1984) Divalent cation-induced surface-tension increase in acidic phospholipid-membranes - ion binding and membrane-fusion. Biochim Biophys Acta, 776: 177-182.

Ohshima H. (2002) Modified henry function for the electrophoretic mobility of a charged spherical colloidal particle covered with an ion-penetrable uncharged polymer layer. J Colloid Interface Sci, 252: 119-125.

Panini R, Vandelli MA, Forni F, Pradelli JM, Salvioli G. (1995) Improvement of ursodeoxycholic acid bioavailability by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexation in healthy-volunteers. Pharmacological Research, 31: 205-209.

Peterlin P, Arrigler V. (2008) Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. Colloids Surf B Biointerfaces, 64: 77-87.

Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L. (2006) Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. Int J Pharm, 312: 75-82.

Pinto-Alphandary H, Andremont A, Couvreur P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. Int J Antimicrob Agents, 13: 155-168.

Planas ME, Gonzalez P, Rodriguez L, Sanchez S, Cevc G. (1992) Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. Anesth Analg, 75: 615-621.

Pott T, Bouvrais H, Meleard P. (2008) Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. Chem Phys Lipids, 154: 115-119.

Puglisi G, Fresta M, Mazzone G, Furneri PM, Tempera G. (1995) Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and in-vitro antimicrobial activity. Int J Pharm, 118: 65-76.

Richmond DL, Schmid EM, Martens S, Stachowiak JC, Liska N, Fletcher DA. (2011) Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents. Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 9431-9436.

Rodriguez N, Pincet F, Cribier S. (2005) Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy. Colloids Surf B Biointerfaces, 42: 125-130.

Rooney EK, Lee AG. (1983) Binding of hydrophobic drugs to lipid bilayers and to the (ca2+ + mg2+)-atpase. Biochim Biophys Acta, 732: 428-440.

Ryschich E, Huszty G, Knaebel HP, Hartel M, Buchler MW, Schmidt J. (2004) Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. Eur J Cancer, 40: 1418-1422.

Singer SJ, Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175: 720-731.

Smith ICP, Butler KW. (1976) Oriented lipid systems as model membranes. 411-448.

Somogyi Á Mass spectrometry instrumentation and techniques. In: Vékey K, Telekes A, Vértes Á (szerk.), Medical Applications of Mass Spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2008: 93-135.

Sortino S, De Guidi G, Giuffrida S. (2001) Drastic photochemical stabilization of lomefloxacin through selective and efficient self-incorporation of its cationic form in anionic sodium dodecyl sulfate (sds) micelles. New Journal of Chemistry, 25: 197-199.

Sou K. (2011) Electrostatics of carboxylated anionic vesicles for improving entrapment capacity. Chem Phys Lipids, 164: 211-215.

Sou K, Tsuchida E. (2008) Electrostatic interactions and complement activation on the surface of phospholipid vesicle containing acidic lipids: Effect of the structure of acidic groups. Biochim Biophys Acta, 1778: 1035-1041.

Stella VJ, Rajewski RA. (1997) Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. Pharmaceutical Research, 14: 556-567.

Sudimack J, Lee RJ. (2000) Targeted drug delivery via the folate receptor. Adv Drug Deliv Rev, 41: 147-162.

Szabó Zs, Budai M, Blasko K, Grof P. (2004) Molecular dynamics of the cyclic lipodepsipeptides' action on model membranes: Effects of syringopeptin22a, syringomycin e, and syringotoxin studied by epr technique. Biochim Biophys Acta, 1660: 118-130.

Szakonyi Zs, Fülöp F. Xantinszármazékok. In: Fülöp F, Noszál B, Szász Gy, Takácsné Novák K (szerk.), Gyógyszerészi Kémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010: 481-485.

Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Morse DS, Basta M, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. (2000) Liposome-induced pulmonary hypertension: Properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 279: H1319-1328.

Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Bathori G, Toth M, Bunger R, Barenholz Y. (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: Factors promoting reactogenicity of doxil and ambisome. Nanomedicine, 8: 176-184.

Székács I, Kaszás N, Gróf P, Erdélyi K, Szendrő I, Mihalik B, Pataki Á, Antoni FA, Madarász E. (2013) Owls assay techniques for investigating membrane-bound ion channel activities. PLoS ONE, 8: e81398.

Takács-Novák K, Józan M, Szász G. (1995) Lipophilicity of amphoteric molecules expressed by the true partition coefficient. Int J Pharm, 113: 47-55.

Tatulian SA. (1983) Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. Biochim Biophys Acta, 736: 189-195.

Tóth G, Mohácsi R, Rácz Á, Rusu A, Horváth P, Szente L, Béni S, Noszál B. (2012) Equilibrium and structural characterization of ofloxacin–cyclodextrin complexation. J Incl Phenom Macrocycl Chem, 77: 291-300.

Touitou E, Levischaffer F, Dayan N, Alhaique F, Riccieri F. (1994) Modulation of caffeine skin delivery by carrier design - liposomes versus permeation enhancers. Int J Pharm, 103: 131-136.

Tsuchiya H. (2001) Structure-specific membrane-fluidizing effect of propofol. Clin Exp Pharmacol Physiol, 28: 292-299.

Vali A, Faghihi G, Zaghian N, Koosha M. (2009) The efficacy of topical solution of 0.3% ciprofloxacin in treatment of mild to moderate acne vulgaris. Iranian Red Crescent Med J, 11: 23-27.

Vázquez JL, Merino S, Domenech O, Berlanga M, Vinas M, Montero MT, Hernandez-Borrell J. (2001) Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin: Influence of the n-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity. Int J Pharm, 220: 53-62.

Verbich SV, Dukhin SS, Matsumura H. (1999) Investigation of dynamic stern layer of liposomes by measurements of conductivity and electrophoresis. J Dispers Sci Technol, 20: 83-104.

Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. (2003) Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: A skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. Eur J Pharm Biopharm, 55: 271-277.

Völgyi G, Vizserálek G, Takács-Novak K, Avdeef A, Tam KY. (2012) Predicting the exposure and antibacterial activity of fluoroquinolones based on physicochemical properties. Eur J Pharm Sci, 47: 21-27.

Wang G, Qi P, Xue X, Wu F, Deng N. (2007) Photodegradation of bisphenol z by uv irradiation in the presence of beta-cyclodextrin. Chemosphere, 67: 762-769.

Wei Y, Du S, Ito Y. (2010) Enantioseparation of lomefloxacin hydrochloride by high-speed counter-current chromatography using sulfated-β-cyclodextrin as a chiral selector. J. Chromatogr. B, 878: 2937-2941.

Wu L, Zhang J, Watanabe W. (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev, 63: 456-469.

Yamamoto K, Furuya K, Nakamura M, Kobatake E, Sokabe M, Ando J. (2011) Visualization of flow-induced atp release and triggering of ca2+ waves at caveolae in vascular endothelial cells. J Cell Sci, 124: 3477-3483.

Yokouchi Y, Tsunoda T, Imura T, Yamauchi H, Yokoyama S, Sakai H, Abe M. (2001) Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposomal membrane characteristics. Colloids Surf B Biointerfaces, 20: 95-103.

Zambito Y, Pedreschi E, Di Colo G. (2012) Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—a case study. Int J Pharm, 434: 28-34.

Zhao H, Le Y, Liu HY, Hu TT, Shen ZG, Yun J, Chen JF. (2009) Preparation of microsized spherical aggregates of ultrafine ciprofloxacin particles for dry powder inhalation (dpi). Powder Technol, 194: 81-86.

Zhou S, Ouyang J, Baeyens WR, Zhao H, Yang Y. (2006) Chiral separation of four fluoroquinolone compounds using capillary electrophoresis with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as chiral selector. J Chromatogr A, 1130: 296-301.

Zucker D, Marcus D, Barenholz Y, Goldblum A. (2009) Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. J Control Release, 139: 73-80.

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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: 3,13

Budai L, Kaszás N, Gróf P, Lenti K, Maghami K, Antal I, Klebovich I, Petrikovics I, Budai M. (2013) Liposomes for topical use: Physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin. Sci Pharm, 81: *1151-1166.*

Kaszás N, Budai M, Budai L, Gróf P, Zimmer A, Klebovich I. (*2008*) A bezárási hatásfok növelésének lehetőségei liposzómába zárt lomefloxacinnál. Acta Pharm Hung, 78: 69-74.

A disszertációtól független közlemények

Székács I, Kaszás N, Gróf P, Erdélyi K, Szendrő I, Mihalik B, Pataki Á, Antoni FA, Madarász E. (*2013*) Owls assay techniques for investigating membrane-bound ion channel activities. *PLoS ONE,* 8: e81398.

IF:3,73

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetem kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak a dolgozatom elkészülésében. Köszönöm Prof. Dr. Kellermayer Miklósnak, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra és támogatott abban, hogy az intézetben jó feltételek mellett végezhessem munkámat. Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Gróf Pálnak az elmúlt évek fáradhatatlan tanításáért, bíztatásáért és néha nem kis türelméért. Lelkiismeretes témavezetése és alapos kutatói szemlélete példaként áll előttem. Köszönöm a sok odafigyelést, az inspiráló és az élet minden területén hasznosítható gondolatokat. Köszönettel tartozom Dr. Budai Mariannának, hogy TDK-s éveim alatt erre a területre irányította figyelmemet, és, hogy munkámat azóta is figyelemmel kíséri. Köszönöm szépen Prof. Dr. Klebovich Imrének, Dr. Antal Istvánnak és Dr. Ludányi Krisztinának, hogy maximálisan támogattak és segítettek doktori munkám elvégzésében. Köszönöm dr. Bozó Tamásnak a sok szakmai segítséget, nem utolsó sorban a jó beszélgetéseket és a vidámságot. Köszönetemet fejezem ki a Biofizika és a Gyógyszerészeti Intézet minden kedves kollégájának, akik buzdításukkal és jóindulatukkal sokat tettek azért, hogy a szürke hétköznapokon végzett, vagy a néha késői órákig nyúló munka is jó hangulatban teljen.

Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, férjemnek és testvéremnek, hogy rájuk mindig számíthattam, tőlük minden erkölcsi biztatást és anyagi támogatást megkaptam, ami lehetővé tette, hogy biztos családi háttér mellett a doktori munkámat teljes odaadással végezhessem.