

Mesterséges és biológiai eredetű vezikulák infravörös spektroszkópiai vizsgálata

Artificial and biological vesicles: characterization by infrared spectroscopy

Mihály Judith, Deák Róbert, Szigyártó Imola Csilla, Lőrincz András, Wacha András, Németh Csaba, Varga Zoltán, Bóta Attila

*MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet,
Biológiai Nanokémia Kutatócsoport
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2*

Összefoglaló/ Summary

Az infravörös (FTIR) spektroszkópia megbízható, elterjedt módszer modell-, illetve biológiai membránok jellemzésére; ennek ellenére az általa nyújtott információk nincsenek teljes mértékben kiaknázva. Teljes reflexiós infravörös spektroszkópiával (ATR-FTIR) mesterséges és biológiai eredetű vezikulákat vizsgáltunk:

- i) a gyógyászatban már alkalmazott úgynevezett pegilált, azaz PEG-lánccal stabilizált vezikulák esetében a PEG lánc szerkezeti változásait követtük (a C-O-C kötések *trans-gauche* aránya alapján) az összetétel függvényében;
- ii) új típusú stabilizált vezikulák kifejlesztése céljából a vezikulákat felépítő lipid alapelemek és a különböző adalékanyagok (pl. urzolsav, koleszterin) kölcsönhatásait értelmeztük;
- iii) vörösvértest ghost membránból és mesterséges lipidekből fizikai-kémiai eljárásokkal előállított úgynevezett nanoeritrosómák esetében a mesterséges lipid beépülését vizsgáltuk;
- iv) egy egyszerű, gyors módszert dolgoztunk ki sejt-eredetű (Jurkat) extracelluláris vezikulák izolálásának jellemzésére a fehérje/lipid arány IR spektroszkópiai meghatározásával.

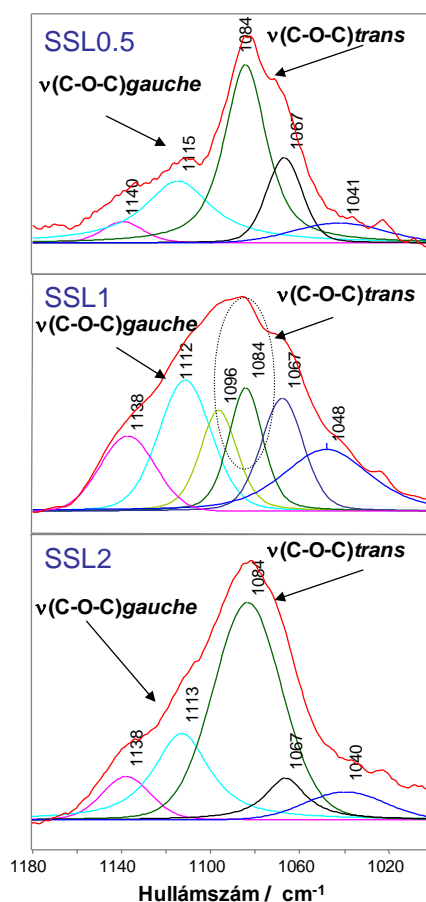
FTIR spectroscopy is a widespread, reliable investigation method to study model and biological membranes; the provided information, however, are still underutilized. In this study the benefit of ATR-FTIR spectroscopy in the study of vesicles (of artificial and biological origin) is demonstrated:

- i) by IR spectroscopic study of *trans-gauche* ratio of the PEG (polyethylene-glicol) chains in the PEGylated 'steady stealth liposomes' we could estimate the hydration level of the vesicle surfaces which is associated with the optimal polymer/lipid ratio;
 - ii) the interactions between basic lipid components and other ingredients (ursolic acid, cholesterol) were studied aiming novel type of sterically stabilized vesicles;
 - iii) in case of nanoerytrosomes obtained by vesicularisation of erythrocyte ghost membranes and synthetic lipids, by physicochemical treatments (sonication and extrusion), the infiltration of synthetic lipids was demonstrated;
 - iv) a protocol based on protein-to-lipid ratio estimation by ATR-FTIR was proposed as a reliable, fast and relative cheap screening approach for EV isolation.
-

Bevezetés

A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése és vizsgálata fontos kutatási területe napjaink kolloidkémiajának. A lipid kettősréteg alapú liposzómák/vezikulák - azon túl, hogy a sejtmembránok modellrendszerei - gyógyszerhordozóként és diagnosztikai eszközként a nanomedicina területén is alkalmazást nyertek, fejlesztésük az orvostudomány legígéretesebb részét képezik.

A gyógyászatban már alkalmazzák az úgynevezett „lopakodó” liposzómákat (steady stealth liposomes - SSL), amelyek jellemzője, hogy a lipid kettősréteget polietilén-glikol (PEG) réteg borítja, ami sztérikus stabilitást és megnövekedett keringési időt biztosít a vezikuláknak. A PEG-lánc szerkezetének infravörös (ATR-FTIR) spektroszkópiai vizsgálatával (a polimer C-O-C kötéseinek *trans-gauche* arányából) a vezikula felületének hidratációjára tudunk következtetni, amely kapcsolatban áll a stabilitás szempontjából optimális polimer/lipid arány értékével.



1. **ábra.** Különböző összetételű SSL vezikulák spektruma: a C-O-C vegyértékrezgés felbontása.

Megállapítottuk, hogy a *trans/gauche* konformáció-aránynak 6 mol% PEG tartalomnál minimuma van. Ez a koncentráció egybe esik a legnagyobb kettősréteg-stabilitást biztosító aránnyal, valamint a „gomba-kefe” konformáció átmenetéhez tartozó koncentrációval [1].

1. **táblázat.** A különböző összetételű SSL vezikulákra számolt C-O-C *trans/gauche* arány

	$A_{v(\text{C-O-C})\text{trans}} / A_{v(\text{C-O-C})\text{gauche}}$
SSL0.5 (HSPC:Chol:DSPE-PEG=3:1:0.5)	1.75
SSL1 (HSPC:Chol:DSPE-PEG=3:1:1)	1.25
SSL2 (HSPC:Chol:DSPE-PEG=3:1:2)	2.50

A PEG polimerrel stabilizált vezikulák alkalmazása során felmerült allergiás jellegű súlyos tünetek miatt [2] más, stabilizáló hatású biokompatibilis molekulák is jelentős kutatási érdeklődésre számíthatnak. Urzolsav multilamellás modell lipidrendszerre történő hatásának tanulmányozása során megállapítottuk, hogy spontán módon nagyszámban képződik unilamellás forma. Az IR spektrumok elemzése alapján az urzolsav, bár szerkezetileg hasonlít a koleszterinhez, nem ékelődik be a lipid szénláncok közé. A vízben rosszul oldódó urzolsav molekulák/aggregátumok a lipidek észter-csoportjainál, az acilláncokra merőlegesen helyezkednek el.

Ezek a kónikus alakú „lipid-tutaj”-urzolsav asszociátumok az önszerveződés során nem-kettősréteg (hexagonális, köbös) szerkezeteket alakítanak ki [3].

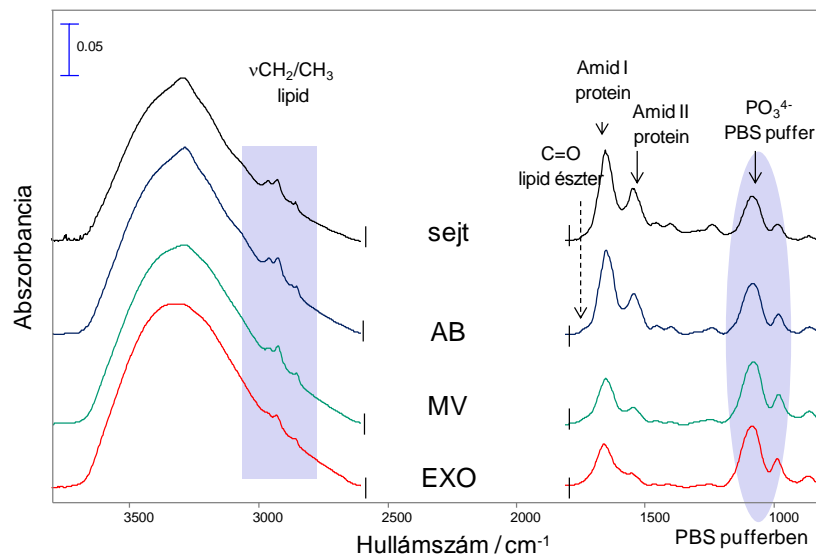
Kutatócsoportunk vörösvértest ghost membránból szintetikus lipid (DPPC) hozzáadásával különböző fehérje/lipid összetételű úgynevezett nanoeritroszóákat állított elő. IR spektroszkópiai mérésekkel egyrészt a szintetikus lipid beépülését követtük a fehérje/lipid arány meghatározásával, másrészt szintetikus lipidekben gazdag domének kialakulását igazoltuk a membránban [4].

2. **táblázat.** Fehérje/lipid arány meghatározása vörösvértest membránból (ghost) készült vezikulákban

	Fehérje/lipid arány (Bradford/Stewart assay)	Spektroszkópiai fehérje/lipid arány A(Amid I)/A (CH₂)
Ghost membrán		0,91
Nanoeritroszóma	0,21	0,59
Nanoeritroszóma (+DPPC)	0,06	0,16
Nanoeritroszóma (+2DPPC)	0,04	0,04

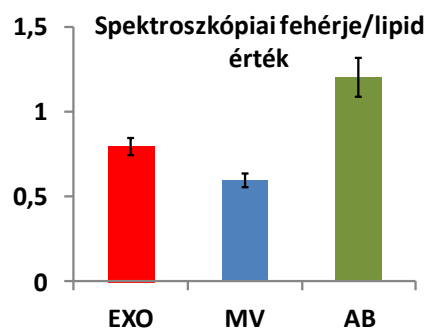
A fenti mesterséges nanoeritroszóák referenciaként szolgálhatnak a természet által előállított extracelluláris vezikulák IR jellemzéséhez. Az extracelluláris vezikulák a sejten kívüli térben található, kettős foszfolipid membránnal határolt, sejt eredetű struktúrák. Az egy mérettartományba eső extracelluláris vezikulák (EV) tulajdonságai – jelen tudományos álláspont szerint – hasonlóságot mutatnak; ennek alapján több EV szubpopulációt különböztethetünk meg: a multivezikulás testek exocitózisával keletkező exoszómák (30-100 nm), a plazmamembránból lefűződéssel létrejövő mikrovezikulák (100 nm -1 µm) és a programozott sejthalál során keletkező apoptotikus testek (800 nm-5 µm). Az extracelluláris vezikulák termelődése általános sejtbioológiai folyamat, gyakorlatilag minden - eddig vizsgált – prokarióta vagy eukarióta sejt termel EV-ket. Sejtbioológiai és élettani jelentőségük mellett az extracelluláris vezikulák potenciális diagnosztikai, prognosztikai és gyógyászati szereppel is bírnak. Az extracelluláris vezikulákra irányuló kutatás egyelőre még számos nehézségbe ütközik. Az extracelluláris vezikulák még nem megfelelően osztályozottak, izolálásuk és jellemzésük még kevésbé standardizált. A leggyakrabban használt és elfogadott EV izolálási módszerek a differenciál és a gradiens ultracentrifugálás, annak ellenére, hogy ezek időigényes eljárások (2-24h). Ráadásul számos gyakorlati problémát felvetnek: a nagy centrifugális erők hatására a sejtek fragmentálódhatnak, a fehérjék és EVk aggregálódnak. Az izolálás során azt is figyelembe kell venni, hogy más, nem vezikuláris struktúrák is együtt ülepedhetnek le, ha méretük és sűrűségük hasonló. Ilyenek például a lipoproteinek, baktériumok (mikrovezikulák), vírusok (exoszómák). Számos más hasonló mérettartományba eső képződmény (fehérje aggregátumok, immunkomplexek) is megtalálható a biológiai folyadékokban, amelyek téves eredményekhez vezethetnek. Ennek fényében szükség van olyan gyors, egyszerű izolálási és jellemzési eljárások fejlesztésére, amely nagy hatékonysággal precíz eredményeket szolgáltatnak.

Az extracelluláris vezikulák részletes ATR-FTIR vizsgálata során egy egyszerű, gyors, kis mintaigényű módszert dolgoztunk ki a különböző extracelluláris szubpopulációk jellemzésére a fehérje/lipid arány IR spektroszkópiai meghatározásán keresztül.



3. **ábra.** Jurkat sejtvonalból differenciál centrifugálással előállított extracelluláris vezikula szubpopulációk ATR-FTIR spektrumai.

Limfocita T-sejtvonalból (Jurkat) differenciál centrifugálással előállított EVk ATR-IR vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az exoszómák (EXO) és a mikrovezikulák (MV) jól elkülönülnek az apoptotikus testektől (AB). Az általunk kidolgozott spektrum-feldolgozási protokoll figyelembe veszi a kis koncentrációt (0,15-0,02 mg/ml összfehérje), illetve a fehérje aggregátumokkal/lipoproteinekkal való kontaminációt.



4. **ábra.** Az ATR-FTIR spektrumok alapján számolt fehérje/lipid arány értékek a különböző EV szubpopulációkra.

Eljárásunkat más forrásból előállított EVk esetében is teszteltük. Eredményünk már jelenlegi stádiumában is alkalmazható EVk izolálásának gyors, egyszerű ellenőrzésére (screening).

Köszönetnyilvánítás

A munka a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- [1] Varga Z., Mihály J., Berényi S., Bóta A., *Eur Polym J.* 49, 2415-2421 (2013)
- [2] Szebeni J., *Toxicology* 216, 106–121 (2005)
- [3] Lőrincz A., Mihály J., Wacha A., Németh Cs., Bóta A., *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 1848, 1092-1098 (2015)
- [4] Deák R., Mihály J., Szigyártó I.Cs., Wacha A., Lelkes G., Bóta A., *Coll. Surf. B* 135, 225-234 (2015)
- [5] Mihály J., Deák R., Szigyártó I.Cs., Bóta A., Varga Z., *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes*, under review