

PÉNZES CSANÁD BOTOND

**MEMBRÁNALKOTÓK, GYÓGYSZERHATÓANYAGOK,
BIOPOLIMEREK ÖSSZETETT STRUKTÚRÁINAK VIZSGÁLATA
FELÜLETJELLEMZÉSI MÓDSZEREKKEL**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Témavezető: Dr. Kiss Éva, egyetemi tanár
ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Inzelt György, egyetemi tanár

Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia program
Programvezető: Dr. Záray Gyula, egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Tanszék
Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma

Budapest, 2016

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Kiss Éva egyetemi tanárnak szeretnék köszönetet mondani munkámhoz nyújtott széleskörű segítségével. Köszönettel tartozom, hogy TDK munkámtól kezdve folyamatosan támogatott a szakmai előmenetelemben.

Köszönöm Dr. Gilányi Tibor egyetemi tanárnak, a Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratórium vezetőjének, hogy lehetővé tette a laboratóriumban való munkámat.

Köszönöm Hórvölgyi Zoltánné Pető Idának a gyakorlati munkában nyújtott lelkiismeretes segítségét, barátságát. Valamint köszönettel tartozok Brodskaya Edit, Gyulai Gergő, Hill Katalin, Schnöller Donát kollegáimnak a közös munkáért és megtisztelő barátságukért.

Köszönöm a laboratórium minden tagjának a munkámhoz nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Túri László tanszékvezetőknek, hogy lehetővé tették munkámat a Fizikai Kémiai Tanszéken a munkámat.

Köszönöm Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatársnak és Horváti Kata tudományos munkatársnak a hatóanyagok szintetizálását, illetve az *in vitro* kísérletek elvégzését.

Köszönöm Dr. Petrik Péternek és Agócs Emilnek az MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézet munkatársainak, hogy lehetővé tették az ellipszometriás méréseket, segítettek a kísérletek kivitelezésében és az eredmények értelmezésében.

Köszönettel tartozom Dr. Mohai Miklósnak és Dr. Bertóti Imrének, az MTA Kémiai Kutatóközpont Anyag- és Környezetkémiai Intézet munkatársainak az XPS mérésekért.

Végezetül, de nem utolsó sorban, köszönöm családomnak, feleségemnek a mindennemű támogatásért és biztatásért.

A dolgozatban leggyakrabban használt rövidítések és jelölések

AFM	atomi erő mikroszkópia (Atomic Force Microscopy)
APTES	3-aminopropil-trietoxi-szilán
DeTAB	n-decil-trimetil-ammónium bromid
DLS	dinamikus fényszórás (Dynamic Light Scattering)
DMPC	1,2-dimiristoil-foszfamidil-kolin
DPPC	1,2-diplamitoil-foszfamidil-kolin
DPPG	1,2-diplamitoil-foszfamidil-glicerin
DTAB	n-dodecil-trimetil-ammónium bromid
ECM	extracelluláris mátrix
EDC	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EO	etilén-oxid
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
HA	hidroxiapatit
HTAB	n-hexadecil-trimetil-ammónium bromid
INH	izoniazid
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schäffer
OCA	tengelyszimmetrikus csepp-profil analízis (Optical Contact Angle)
OTAB	n-oktil-trimetil-ammónium bromid
PAMAM	poli(amidoamin)
PBS	fiziológiás só koncentrációjú foszfát puffer (Phosphate Buffered Saline)
PD	polidiszperzitás
PEI	poli(etilén-imin)
PEO	poli(etilén-oxid)
PLA	politejsav
PLGA	tejsav-glikolsav kopolimer
POM	poli(oximetilén)
PPO	poli(propilén-oxid)
QCM	kvarckristály mikromérleg (Quartz Crystal Microbalance)
SLB	szilárd felület segítségével szétterülő liposzómából kialakuló lipid kettősréteg (Supported Lipid Bilayer)
TBC	tuberkulózis
TTAB	n-tetradecil-trimetil-ammónium bromid
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. BIOKOMPATIBILIS, BIOAKTÍV FELÜLETEK.....	9
2.2. FELÜLETMÓDOSÍTÁS POLIMEREKKEL.....	11
2.2.1. <i>Peptid tartalmú bevonatok</i>	11
2.2.2. <i>Antibakteriális bevonatok</i>	14
2.3. HATÓANYAGOK MEMBRÁNAFFINITÁSA.....	15
2.3.1. <i>Lipid monoréteg technika</i>	15
2.3.2. <i>Kettősréteg modellek</i>	18
2.4. GYÓGYSZERHORDOZÓ NANORÉSZECSKÉK ÉS AZ AFM	20
3. CÉLKITŰZÉSEK	25
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK	27
4.1. ÁLTALÁNOS VEGYSZEREK.....	27
4.2. MODELL MEMBRÁN ALKOTÓI	28
4.3. ANTITUBERKULOTIKUMOK.....	29
4.3.1. <i>Membránmodellek az antituberkulotikumok vizsgálatához</i>	29
4.4. ANTIBAKTERIÁLIS POLIMERMOLEKULÁK	29
4.4.1. <i>Membránmodellek az antibakteriális polimerek vizsgálatához</i>	32
4.5. SEJTNÖVEKEDÉST SEGÍTŐ POLIPEPTID MOLEKULÁK.....	32
4.5.1. <i>Bioaktív molekula rögzítése szilárd felületen</i>	33
4.5.1.1. Sejtnövekedést segítő molekulák felületi reakcióihoz használt vegyületek	33
4.5.1.2. A hordozó felület tisztítása	34
4.5.1.3. Hordozó funkcionálizálása	34
4.5.1.4. Polipeptidek fiziszorpciója	35
4.5.1.5. Polipeptidek kemiszorpciója glutáraldehiddel	35
4.5.1.6. Polipeptidek kemiszorpciója glutársavanhidriddel	35
4.6. NANORÉSZECSKÉK.....	36
4.6.1. <i>Nanorészecskéket felépítő molekulák</i>	36
4.6.2. <i>Nanorészecskék előállítása</i>	37
4.6.3. <i>Membránmodell a nanorészecskék vizsgálatához</i>	37

5.	KÍSÉRLETI MÓDSZEREK.....	38
5.1.	DINAMIKUS FÉNYSZÓRÁS MÉRÉS (DLS)	38
5.2.	ATOMI ERŐ MIKROSKÓPIA (AFM)	38
5.3.	LANGMUIR-MÉRLEGES TECHNIKA.....	43
5.3.1.	<i>Izoterma meghatározás</i>	<i>45</i>
5.3.2.	<i>Stabilitás, illetve penetráció mérés</i>	<i>45</i>
5.3.3.	<i>Langmuir-Blodgett- (LB) és Langmuir-Schäffer- (LS) technika</i>	<i>46</i>
5.4.	KVARCKRISTÁLY MIKROMÉRLEG (QCM).....	46
5.4.1.	<i>Sauerbrey-közelítés</i>	<i>47</i>
5.4.2.	<i>Voinova-közelítés</i>	<i>48</i>
5.4.3.	<i>Johannsmann-közelítés.....</i>	<i>49</i>
5.5.	SPEKTROSKÓPIAI ELLIPSZOMETRIA	51
5.6.	RÖNTGEN-FOTOELEKTRON SPEKTROSKÓPIA (XPS)	54
6.	EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK.....	55
6.1.	BIOAKTÍV POLIMEREK FELÜLETI RÉTEGE SZILÁRD HORDOZÓN	55
6.1.1.	<i>Röntgen-fotoelektron spektroszkópia (XPS).....</i>	<i>56</i>
6.1.2.	<i>Atomi erő mikroszkópia (AFM)</i>	<i>60</i>
6.1.3.	<i>Kvarckristály mikromérleges mérések (QCM)</i>	<i>64</i>
6.1.4.	<i>Ellipszometria</i>	<i>68</i>
6.2.	BIOAKTÍV POLIMEREK KÖLCSÖNHATÁSA LIPID MONORÉTEGGEL	71
6.2.1.	<i>Izoterma vizsgálat</i>	<i>71</i>
6.2.2.	<i>Penetrációs mérések.....</i>	<i>72</i>
6.2.3.	<i>Felület morfológiai jellemzése atomi erő mikroszkóppal (AFM).....</i>	<i>77</i>
6.3.	BIOAKTÍV MOLEKULÁK KÖLCSÖNHATÁSA LIPID MONORÉTEGGEL	82
6.3.1.	<i>Egyszerű modell membrán</i>	<i>82</i>
6.3.1.1.	<i>Penetrációs mérések</i>	<i>82</i>
6.3.1.2.	<i>Felület morfológiai mérése atomi erő mikroszkóppal (AFM).....</i>	<i>83</i>
6.3.2.	<i>Összetett modell membrán.....</i>	<i>86</i>
6.3.2.1.	<i>Penetrációs mérések</i>	<i>86</i>
6.3.2.2.	<i>Felület morfológiai mérése atomi erő mikroszkóppal (AFM).....</i>	<i>87</i>
6.4.	NANORÉSZECSCKE GYÓGYSZERHORDOZÓ KÖLCSÖNHATÁSA LIPID MONORÉTEGGEL.....	89
6.4.1.	<i>Nanorészecskék mérete és alakja.....</i>	<i>89</i>

6.4.1.1. Atomi erő mikroszkóppal végzett mérések (AFM).....	89
6.4.1.2. Dinamikus fényszórással végzett mérések (DLS).....	91
6.4.2. Nanorészecskék membránaffinitása.....	91
7. A DOLGOZAT EGYES FEJEZETEIBEN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSA.....	93
8. ÖSSZEFOGLALÁS	95
9. SUMMARY	96
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	97

1. Bevezetés

Napjainkban a természettudományos kutatások jelentős része az egészségügyhöz kapcsolódó folyamatok megértésére és az ezen a tudáson alapuló fejlesztésre irányul. A téma sokszínűségét és bonyolultságát mindennapi életünkben is tapasztaljuk a kutatások eredményeként megszülető gyógyszerek, gyógyászati segédeszközök által. A gyógyszerek fejlesztését a megjelenő rezisztens, multirezisztens fajok is időszerűvé és sürgőssé teszik. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) is felfigyelt ezekre a tendenciákra, és jelentős kutatásfejlesztési támogatással kívánja ösztönözni az ezirányú vizsgálatokat. Az említett okok miatt fontosak azon kutatások, melyek olyan környezet kialakítását tűzték ki célul, ami a baktériumok és egyéb kórokozók számára kedvezőtlen, de az összetettebb szervezetekre nem gyakorol számottevő hatást. Manapság a kórházi rezisztens baktériumfajok által okozott megbetegedések komoly problémát jelentenek az orvosoknak. Mivel a gyógyszeres kezelés nehézkes és drága, egyre nagyobb igény jelentkezik a megelőzésre. Bár a megelőzésre már 1847-ben Semmelweis Ignácnak köszönhetően felfigyelhetett volna a világ, mégsem lett gyorsan, széles körben elfogadott a fertőtlenítőszer használata. Manapság a prevenció módszerek is tovább fejlődtek, úgymint felületkezelés, például kórházi ágyneműk, falak, illetve egyéb szilárd felületek antibakteriális tulajdonságainak fejlesztése. Ezek a fejlesztések sok súlyos betegség kialakulásáért felelős baktériumok felszaporodását gátolhatják meg [Ignatova, 2012].

Amennyiben mégis kialakul a betegség, hatékony, célzott gyógyszerekre van szükség. A korszerű gyógyászat a lehető legkevesebb mellékhatással rendelkező, az adott kórokozóra speciálisan kifejlesztett hatóanyagokat részesíti előnyben. Az egyik ilyen globális megoldásra váró kór, a fertőző betegségek közül is kiemelten, a tuberkulózis [WHO, 2015]. A betegséget a *Mycobacterium tuberculosis* baktérium okozza, mely ellen a XX. század közepén kifejlesztett gyógyszerek eredményesen vették fel a harcot. A hatékonyságuk ellenére jelentős problémát okoz az elnyújtott kezelési idő, a páciensek nagymértékű együttműködésének szükségessége. A tény, hogy a sikeres kezelés csak kombinált antituberkulotikumokkal érhető el, valamint a megjelent (multi-, poli-, extrém-) rezisztens baktériumok és egyéb, antituberkulotikumokra nem reagáló baktériumfajok megjelenése is [Caminero, 2010].

Ezen kutatások során szerzett tapasztalatok nem csak a kórokozók elleni küzdelemben hasznosíthatók. A szervezetbe beépített gyógyászati segédeszközök, mint idegen anyagok, komoly válaszreakciót váltanak ki a szervezetben. Egy implantátum behelyezése után hosszú az a gyógyulás, amíg az idegen anyag felületén kialakul a szükséges biofilm, mely már az adott szervezet részét képezi. A biofilm kialakulásának segítségével a páciens és a kórház számára is előnyös megoldás születhet.

Munkámban a bakteriális fertőzés elleni hatóanyagjelöltek új formulájának jellemzésével, illetve a fertőzés megelőzésével kapcsolatban a bioaktív felületkezelésnek egyszerűsített modellrendszeren való tanulmányozásával foglalkoztam. Remélhetőleg ezen folyamatok megértése hozzájárulhat a hatékony gyógyszer, illetve megelőző védekezés kifejlesztéséhez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Biokompatibilis, bioaktív felületek

Az orvosi implantátumok, függetlenül az anyaguktól, a beültetés után néhány másodperccel már nem specifikusan kötődő fehérjeréteggel borítottak. Ez az adszorbeált réteg beindítja/aktiválja a védekező mechanizmust, az idegen test reakciót, ami végül is egy rostos tok kialakulásához vezet, ami a szövetből elválasztja az eszközt. Más esetekben ugyanez a folyamat membránok, szenzorok pórusait, felületét zárja el (blokkolja), valamint megakadályozza a hatóanyag felszabadulást a gyógyszerhordozó részecskéből. Sok eszköz lényegében azért nem működik, mert a környező szövetekkel nincs meg a megfelelő kapcsolata [Meyers, 2012]. Egyre nyilvánvalóbb, hogy a sejtes, molekuláris kölcsönhatásoknak a biológiai rendszer – idegen anyag határfelületen makroszkopikus következményei vannak. Az implantátumok következő generációjának sikere attól függ, hogy az eszköz felületének szelektív módosítása által mennyire lehetséges a biológiai kommunikációt biztosítani. A szelektív felületmódosítás hozzájárulhat az implantátum hatékony működéséhez, ami a szövetekkel való kompatibilitást, a kívánt erős, biztos összeépülést jelenti.

A felületmódosítás célozhatja a bioaktív, illetve a biokompatibilis bevonat kialakítását. A biokompatibilitás, vagyis az élő szervezet működésének zavartalan fennmaradása nélkülözhetetlen feltétel. A bioaktivitás ennél többet, a határfelületi kölcsönhatások irányítását jelenti. Implantátumok esetén általában a természetes szövetrel való minél gyorsabb összeépülés elősegítését várjuk el. Vérrrel érintkező idegen anyag esetében az a kedvező, ha olyan módon bioaktív a felülete, hogy nem indukálja a véralvadást, és így a trombozist [Kiss, 2003]. A szöveti reakció, amit az idegen testtel való érintkezés vált ki, részleteiben jól ismert, feltárt folyamat [Castner, 2002; Meyers, 2012]. A lényege a befogadó és az eszköz közötti határos kommunikáció hiánya, ami a fehérjék nem specifikus megkötődéséhez vezet. Az élő szervezet, ezzel szemben, specifikus molekuláris markerek rendszerét használja arra, hogy a sejtek és a környező szövetek kölcsönhatásait szabályozza. Ez arra enged következtetni, hogy az implantátum felületén a megfelelő molekuláris markerek hiánya felelős azért, hogy a szervezet az implantátumot idegen testnek tekinti. Ebből adódik az idegen test reakció elleni küzdelem kétféle megközelítése, amit ideális esetben

együttesen alkalmazhatunk. Egyrészt meg kell akadályozni a nem specifikus fehérje adszorpciót, vagyis „észrevétlenné” kell tenni a felületet. Másrészt bioaktív komponensek felülethez való rögzítésével elérhetjük a megfelelő biológiai rendszer – anyag kölcsönhatásokat. A felületen lévő „jeladó” molekulák, vagy molekula fragmensek hozzájárulnak a biológiai környezetben érvényesülő természetes funkciók utánpótlásához.

A felülethez való rögzítésnek két fő lehetősége a kémiai kapcsolat kovalens kötés kialakításával, illetve a fiziszorpció. Mindkét módszernek vannak előnyei és hátrányai. A kovalens kötéssel rögzített molekula nem deszorbeálódik, hiszen erős kapcsolata van a felülettel. Nehézséget jelent ugyanakkor, hogy az előállítás csak lépésenkénti kémiai reakcióval lehetséges, és minden hordozó más-más technikát kíván. A degradáció leginkább oxidáció vagy hidrolízis által megy végbe. A kémiai kapcsolat főként fehérjét nem adszorbeáló bevonat kialakítására használatos.

A fiziszorpció esetében elektrosztatikus és/vagy hidrofób kölcsönhatás az, ami a felületi réteget a hordozóhoz kapcsolja. Jórészt peptidek, fluorofelületaktív anyagok rögzítésére alkalmazzák. Jellemzője, hogy alapvetően gyenge kölcsönhatás, de a nagyobb molekulák, peptidek, fehérjék, más polimerek méretéből következő többszöröződés erőssé teszi azt. Fém, oxid, valamint polimer felületek borítására használják oldatból való adszorpcióval. Stabilitása kisebb, mint a kémiai kapcsolat esetében. A molekulák deszorbeálódhatnak vagy kémiai bomlásra mehetnek át. Mindkét féle bevonat kialakítására alkalmas.

Kang és Lee [Kang, 2007] arról számolt be, hogy rozsdamentes acélra úgy kapcsoltak kémiai kötéssel biokompatibilis polimert, hogy a fémet elektropolírozás után perkénsavval kezelték, ami hidroxilcsoportokat alakított ki a felületén. Titán felület aktiválására is kidolgoztak hasonló módszert [Fan, 2006]. Azok az eljárások, amelyek nagy energiájú kezelést, szerves oldószert, UV-aktiválást foglalnak magukban, többnyire nem alkalmasak bioaktív molekulák felületi rögzítésére.

A fiziszorpció stratégia szinte bármilyen anyaghoz megfelelő, általában enyhe körülmények között megy végbe, így érzékeny biokomponensekre is alkalmazható.

2.2. Felületmódosítás polimerekkel

2.2.1. Peptid tartalmú bevonatok

Az implantátumok természetes szövetekkel való összeépülésének elősegítése, gyorsítása elsősorban fogászati, ortopédiai, de más orvosi területen is nagy jelentőségű. Lerövidíti a gyógyulási folyamatot, illetve további műtéteket előz meg a biztonságos rögzülés miatt.

Az extracelluláris mátrix (ECM) és a sejtek kölcsönhatását tanulmányozva feltárták ennek mechanizmusát. ECM fehérjék sejtmembrán receptorokhoz kötődve befolyásolják a sejtadhéziót és -szaporodást. Ma már számos természetes és szintetikus biomolekuláról ismert, hogy képes ezt a hatást kiváltani. A sejt-ECM kölcsönhatás meghatározó lépése a csonttal való összeépülésnek, de érzékeny az implantátum felületi összetételére és szerkezetére is.

A felületmódosítás hatékony módja annak, hogy javítsuk a sejt-ECM kölcsönhatást, és fokozzuk a csont biomechanikai stabilitását. Ha olyan anyagokból képeznek felületi bevonatot, mint polilizin, kollagén, és sejt adhéziót elősegítő peptidek, fibronektin, laminin, vitronektin, specifikus peptid szekvenciák, a módosított bioanyag felület képes szabályozni a sejt-ECM kölcsönhatást. Több ilyen szekvenciát azonosítottak, amelyek részt vesznek a receptorral való kölcsönhatásban: RGD, IKVAV és YIGSR. Ezek közül az RGD, amit a fibronektinben fedeztek fel 1984-ben, valószínűleg a legismertebb integrinkötő domén. Az RGD felületi immobilizálásának sok előnye van: konformáció változásra nem érzékeny, felületi sűrűsége könnyen szabályozható, orientációja kedvező a ligandum-receptor kölcsönhatáshoz.

A hidroxipatitot (HA) széles körben vizsgálják mint bevonatképzőt, mivel kémiaiilag és biológiailag hasonló a csont és a fog szerves anyagához. A HA-nak, bár direkt biológiai szignál funkciója nincs, úgy találták, hogy például titán felületen fokozza a csontképződést és javítja a szomszédos csonthoz való kötődést. Ezért célszerűnek látszott a HA bioaktív bevonat tulajdonságait tovább javítani RGD felületi immobilizálásával. Yang és munkatársai kidolgozták az RGD HA-hoz való kapcsolását

és megállapították, hogy a kémiai kapcsolással kötött RGD nagyobb stabilitást mutat, mint a fiziszorpcióval kötött [Yang, 2009].

A fogimplantátumok esetében is nagy jelentőségű a titán felület csontszövettel való összeépülése, melynek elősegítésére, meggyorsítására egy másik megközelítés a bioaktív peptid közvetlen rögzítése a szilárd felületre. Ebből a célból foszfát tartalmú bevonatot tanulmányoztak, mivel a foszfát nagy affinitást mutat a titánoxid felülethez. Bemutatták, hogy foszforilációval nagyobb mennyiségű peptid volt a felülethez köthető, mint adszorpcióval, bár a stabilitás az első esetben sem volt kielégítő [Abe, 2010]. Oya és munkatársai [Oya, 2009] szintén titán felületre PEO kémiai kapcsolásával rögzítették a molekula másik végéhez kapcsolt RGD tripeptidet, ami a sejtadhéziót segíti elő. A megtapadt sejtek (MC3T3-E1) számában, morfológiájában, a megindult differenciálódásban nem, de a kalcifikálódásukban találtak különbséget, így arra a következtetésre jutottak, hogy a bevonat növeli a titán csontszövettel való kompatibilitását.

A szilárd felületre rögzített, biológiai funkcióval rendelkező peptidek esetén megoldandó probléma az, hogy miközben a peptid hozzáférhető a biológiai közegben jelenlévő „partner” komponens számára, a biológiai mátrix egyéb molekulái ne kötődjenek a felszínhez. Ez a követelmény már a biokompatibilis felületek előállításánál felmerült. Jó megoldásnak bizonyult számos alkalmazásban a polietilén oxiddal (PEO) való felületi borítás, ami a nem specifikus fehérje adszorpciót eredményesen szorította vissza [Gölander, 1988; Bajpai, 2008; Kiss, 2008; Unsworth, 2008].

A másik feladat a felülethez való rögzítés, ami a kémiai kapcsolat mellett fiziszorpcióval is megoldható. Mivel sok szilárd felület jellemzően negatív töltésű, igen elterjedt módszer a kationos polimerek adszorpciója. A pozitív töltésű oldalláncot tartalmazó lizin, poliaminosav formában megfelel ennek a követelménynek, így a lehetséges polielektrolitok közül kiemelkedik a polilizin. Ez a polielektrolit fiziológiás pH-n nagy töltéssűrűségű lineáris polimer, amely erősen kötődik üveg, fém és egyéb felületekhez, amelyeken negatív töltésű csoportok alakíthatóak ki. Ezen „sejt letapasztó” tulajdonsága régóta ismert [Mazia, 1975]. Biológiai minták, sejtek elektronmikroszkópos vizsgálatához rögzítő réteggént alkalmazzák, mivel többféle sejt erősen tapad és terül el anélkül, hogy életfunkcióit elvesztené volna. A polilizin

módosított változatai, többek között gyógyszer hatóanyag hordozóként is alkalmazhatók [Hudecz, 1985; Mezö, 1993; Nagy, 2003; Szabó, 2004].

A két funkciót, a fehérje taszító jelleget és a felületi kötődést egy molekulában egyesítve, titán felület peptiddel való funkcionálásáról számolt be Tosatti munkatársaival [Tosatti, 2003]. A polimer polilizin gerincre fésűszerűen kapcsolt PEO láncokból állt, mely a PEO láncok végén tartalmazta a bioaktív peptid molekularészletet. A réteg, PEO tartalmának köszönhetően, rövid idejű fehérjetaszító tulajdonságot mutatott plazma jelenlétében. Az oldalláncvégi peptid csoportok pedig alkalmasak az integrin típusú sejt receptorokkal való kölcsönhatására, ami elősegíti a szöveti integrációt.

A felületmódosítási gondolat hasonló Meyers és munkatársai vizsgálatában, amikor is stent (értágító háló) felületére rögzítettek bioaktív peptidet tartalmazó réteget [Meyers, 2011]. A megfelelő stabilitású felvitelt polimer adszorpcióval valósították meg. Az eljárás egyszerű, oldatba mártással kivitelezhető, ami tekintve a stent bonyolult geometriáját, gyakorlati előnyt jelent. A polimer egy oligoaminosav, aminek egyik végén a szilárd felülethez kapcsolódó szekvencia van, míg a másik vége a biokativitást mutató részlet. A bifunkciós peptid bevonatot úgy tervezték, hogy az RGD szakaszt, ami a vérlemezkék megkötődését is elősegíti, egy másik peptid szekvenciával helyettesítették, ami szelektíven csak az endotelizációt serkenti.

Nagyszámú munkában az ilyen felületek biológiai tesztelésére összpontosítanak, és ritkán fordul elő, hogy a felületi bevonat előállításának részleteivel, vagy a kialakított film fizikai-kémiai jellemzőivel próbálják összefüggésbe hozni a biológiai viselkedést. Én annak bemutatására törekedtem, milyen fizikai-kémiai tulajdonságok, paraméterek határozhatóak meg a felületi rétegekről ehhez az esetleges összevetéshez.

2.2.2. Antibakteriális bevonatok

Az antibakteriális hatóanyagok alkalmazása történhet oldott formában, mint ahogy a vízoldható gyógyszerek, vagy fertőtlenítő, lemosó folyadékok használatakor megvalósul. Szilárd felületek tartós fertőtlenítésének másik, célszerű és hatékony megoldása az antibakteriális felületi bevonat kialakítása. A porózus szilárd anyagot érdemes átítatni az antibakteriális anyaggal. Ebben az esetben a kórokozó pusztulásához a bioaktív felület baktériummal való érintkezése vezet. A bevonatoktól tartós hatást várunk el, így érthető, hogy a stabil rögzítés meghatározó jelentőségű. Ugyanakkor úgy kell megoldani a felületi rögzítést, hogy a molekula biológiai aktivitása is megmaradjon.

A nem-oldatos antimikrobiális polimerek fejlesztése megkívánja, hogy a tulajdonságokat felületi bevonatként tudjuk vizsgálni. A szerkezet–aktivitás kapcsolat megismerése segíti az új polimerek tervezését és szintetizálását [Ignatova, 2012].

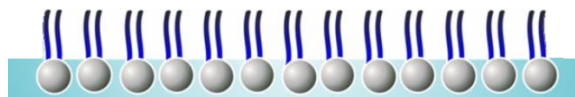
Antimikrobiális tulajdonságú polimer anyagok között vannak szintetikus polimerek és olyanok is, amelyek szerves és szervesetlen összetevőkből épülnek fel [Muñoz-Bonilla, 2012]. Szerkezetüktől függetlenül a kationos, amfipatikus molekulák (peptidek, természetes és mesterséges polimerek) antimikrobiális tulajdonságúak, és egy egyedülálló általános mechanizmus szerint hatnak. Főként az elektrosztatikus erők irányítják ezt a mechanizmust, mely az antimikrobiális molekula kationos csoportja és a kettősrétegű lipid membrán negatív oldala között alakul ki. Emellett a van der Waals kölcsönhatás érvényesül az antimikrobiális molekulák és a foszfolipidek hidrofób részei között. Ezt az általános mechanizmust több paraméter befolyásolja, úgymint (i) membrán összetétel, (ii) antimikrobiális molekulák jellege, (iii) környezeti paraméterek (hőmérséklet, só koncentráció, stb.). Az antimikrobiális szintetikus polimereket fertőtlenítésre és antimikrobiális bevonatok kialakítására ipari területeken is felhasználják. Antimikrobiális polimerek antibiotikumként is használatosak a gyógyszeriparban, a célorganizmusok skálájától, és attól függően, hogyan kerülhető el a toxicitás (hemolitikus aktivitás, az emlősök vörösvérsejtjeinek elpusztítása). Mivel a szerkezet–tulajdonság kapcsolatban nagyrészt nincs különbség, a polimereknek három feltételnek kell megfelelniük: (i) a polimernek vízoldhatónak kell legyen, hiszen a mikrobák vizes közegben szaporodnak, (ii) a polimer tartalmazzon hidrofób részt, amivel a sejtmembránhoz tud kötődni és (iii) kationosnak kell lennie, hogy adhézióval a

mikroba sejtfalába jusson. Számos vízdoldható szintetikus polimerről bizonyították már be az antimikrobiális hatást, például poli(4-vinil-N-hexilpiridinium bromid) alkilált, poli(etilénimin) (PEI), funkcionizált polimetakrilátok [Kenawy, 2003; Waschinski, 2005; Adelman, 2009]. A legtöbb tanulmányozott vízdoldható kationos antimikrobiális polimer lineáris [Gao, 2007]. Az elágazó PEI-alapú polimerek, ideértve a dendrimereket is, lehetőséget nyújtanak arra, hogy szabályozzuk a molekula alakját és a felületi kölcsönhatásokat [Chen, 2000; Pasquier, 2008]. A vízdoldható hiperelágazós polimerek ígéretes alternatívát jelentenek, mivel amfipatikusak, és néhány jellemző peptid tulajdonságot is hordoznak.

2.3. Hatóanyagok membránaffinitása

2.3.1. Lipid monoréteg technika

A lipid monoréteg technika a molekuláris kölcsönhatások meghatározására alkalmas a bioaktív komponens és a lipidből álló sejtmembrán Langmuir-rétege között. A Langmuir-mérlegben létrehozott rendezett lipidréteg a biológiai membránnál sokkal kevésbé komplex rendszer [Maget-Dana, 1999; Brezesinski, 2003], ugyanakkor fontos és jól definiált modell, mivel számos paraméter, a sűrűség, a lipid összetétel, az alsó fázis és a hőmérséklet változtatható [Glomm, 2009]. A monoréteg technika az utóbbi két évtizedben igen elterjedt lett, mivel egyszerű eszköz alkalmazásával értékes információt szolgáltat [Kiss, 2004]. Egyre több közlemény jelenik meg különböző hatóanyagok, gyógyszerjelölt molekulák biológiai membránhoz való affinitásának tanulmányozásáról [Deleu, 2005; Hac-Wydro, 2005; Dynarowicz-Latka, 2001].



1. ábra Lipid monoréteg sematikus ábrája

Az ilyen vizsgálatok gyógyszerészeti, gyógyászati jelentősége nagy, mivel hozzájárulnak ahhoz, hogy a hatóanyag sejtbe jutásának valószínűségét, illetve ennek módját fel tudjuk deríteni, valamint megfelelő gyógyszerhordozó rendszereket fejleszthessünk.

A lipid molekulák víz–levegő határfelületen kialakított rendezett rétege, a Langmuir-film a biológiai membrán legegyszerűbb modelljének tekinthető [MacRitchie, 1990; Kiss Éva, 2006]. Mint ahogy a terjedelmes irodalomból kiragadott néhány példa a továbbiakban mutatja, ezzel az egyszerű, egyrétegű membránmodellel is értékes információk nyerhetők az egyes hatóanyagok membránszerkezetre, permeabilitásra gyakorolt hatásáról, a hatóanyag penetrációjáról, a lipidréttegbe való behatolás és beépülés mértékéről. A keverék filmek kvantitatív analiziséből pedig megállapítható a lipidfilm kompresszibilitására, stabilitására gyakorolt hatásának jellege.

Jabłonowska és munkatársai dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC) monoréteg modellen ibuprofén hatóanyag koncentrációfüggő hatását vizsgálták [Jabłonowska, 2007]. Megállapították, hogy a hatóanyag kis koncentrációban kondenzálja a lipidrétteg, míg nagyobb koncentrációban alkalmazva a hatás ellentétes, a lipidrétteg szerkezetét fellazítja, megbontja. Ezeknek a változásoknak fontos szerepe lehet a membránfunkcióban. Hasonló következtetésre jutottak Ronkart és munkatársai egy antibiotikum (azitromicin) membránnal való kölcsönhatását tanulmányozva [Fa, 2006]. A molekula beépülése a lipid monorétegbe a hidrofób láncok közé, szélesítette a fázisátmeneti tartományt, és entalpiáját lényegesen csökkentette. A membránalkotó molekulák rendezettségének és fluiditásának ilyen változása a permeabilitást növeli, ami összefüggésben van az azitromicin endocitózisra gyakorolt hatásával. Eszerint a hatóanyag, töltésállapotától függően a lipidrétteg felszínén vagy az alkiláncok között helyezkedett el. Az eredményekből számított paraméterek a lipidfilm rendezettségének csökkenésére mutattak. A kísérleti munkák mellett molekuladinamikai szimulációról is beszámolnak, ami szintén a rendezett lipidrétteg és a hatóanyag molekula kölcsönhatásának megismerésére irányult [Pickholz, 2007].

Másrészről Jedlovszky és munkatársai számítógépes szimuláció során DPPC lipidréttegen történő altató hatású szerek diffúzióját vizsgálták. A négyféle hatóanyag (kloroform, halotán, dietil-éter és enflurán) kölcsönhatását a lipidrétteggel azonos hőmérsékleten és kétféle nyomáson vizsgálták. Megállapították, hogy a nyomástól függetlenül a lipid molekulák orientációjának van szerepe a hatás kialakulásában [Fábián, 2015].

A Langmuir-mérleges módszerben a membrán összetétele az egykomponensű lipidfilmhez képest tetszőlegesen módosítható, miáltal a biológiai membrán összetételét közelítő modellrendszerhez jutunk. Zhao és Feng az egyik legelterjedtebben használt rákellenes szer (paclitaxel) DPPC monoréteggel való kölcsönhatását vizsgálta, annak függvényében, hogy a lipidfilm mennyi koleszterint tartalmazott [Zhao, 2006]. A Langmuir-mérleges eredményekből megállapították, majd AFM és FTIR vizsgálatokkal is alátámasztották, hogy a koleszterinnek kondenzáló hatása van, ami gátolja a hatóanyag behatolást, melynek klinikai következményei is vannak. Ezzel összhangban van Banerjee értékes tapasztalata, ami ugyancsak a paclitaxel membránpenetrációjára vonatkozott [Preetha, 2006]. Az egészséges és rákos sejtek membránját eltérő összetételű monoréteggel modellezve arra a megállapításra jutott, hogy a hatóanyag-behatolás jelentősen kisebb a beteg sejteknek megfelelő monorétegbe, mint az egészséges sejt lipidfilmjébe. Ezt a különbséget a membrán összetételével, a beteg sejtmembrán nagyobb koleszterin és szfingomielin tartalmával hozta összefüggésbe. A membránmodell komponenseinek megfelelő megválasztásával a szelektív kötődés is meghatározható. Erre példa egy gombaellenes hatóanyag hatásmechanizmusának felderítése, amelyben a toxikus és kevésbé toxikus származékok összehasonlításában fontos információt szolgáltatott a monoréteges technika [Hac-Wydro, 2005].

Annak tanulmányozása, hogy a hatóanyag hogyan épül be a lipidfilmbe, abból a szempontból is fontos lehet, hogy megfelelő stabilitású liposzómás gyógyszerhordozót tudjunk kialakítani. Ismert tény, hogy a rákellenes hatóanyagként számontartott miltefozin orális terápiája súlyos mellékhatásokkal jár. Mivel az állatkísérletek alapján a hatóanyag liposzómás alkalmazása biztató eredményeket mutatott, részletesen foglalkoztak a miltefozin, lipid, koleszterin monoréteges keverékrendszerek analízisével [Miñones, 2006]. A keverékizotermák analízise segítségével megállapították azt az összetételt, amelynél a legnagyobb stabilitás várható.

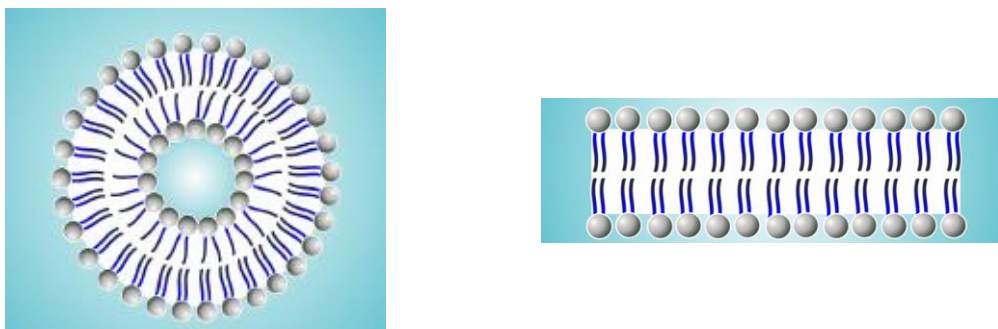
A gyógyszerek jobb hatásának elérése érdekében a hatóanyag molekula kémiai módosítása, illetve speciális szerepű molekulával való kapcsolása is ígéretes eljárás [Manea, 2005]. Pignatello és munkatársai egy modellhatóanyagot kétféle olyan molekularészlettel kapcsoltak, amelyek várhatóan megnövelik a membránhoz való affinitását [Pignatello, 2006]. A módosítás hatását monoréteges, valamint liposzómás rendszerekben, továbbá differenciál szkennning kalorimetriás módszerrel követték. A

konjugátumok viselkedésének összehasonlítása azt mutatta, hogy nem egyszerűen a lipofilitásnövelés, hanem az amfipatikus jelleg fokozása az, ami elősegíti a membránnal való kölcsönhatást.

A tüdő működéséhez nélkülözhetetlen tüdő felületaktív anyagnak nevezett keverék egyik fő komponense is lipid, a DPPC. Emellett más fontos fehérje típusú komponenseket is tartalmaz. Ezek hatását, és a tüdőfunkciót befolyásoló segítő és gátló mechanizmusokat részletesen tanulmányozták Perez-Gil és munkatársai [Serrano, 2006]. A DPPC tüdőbeli jelenlétéből adódik a következtetés, hogy a tuberkulózis kezelésére alkalmas hatóanyagot DPPC-s liposzómás gyógyszerhordozóval célszerű a szervezetbe juttatni. Ehhez végzett monoréteges modellkísérleteket Banerjee és munkatársa a monorétegek dinamikus vizsgálatával [Chimote, 2005].

2.3.2. Kettősréteg modellek

A lipid monoréteg mellett szintén az egyszerűbb membránmodellek közé tartoznak az ún. kettősréteg modellek. A lipid molekulákból képződő kettősréteg, melyet két lipid monoréteg alkot, hidrofób felével egymás felé fordulva, a valódi sejtmembrán lipidszerkezetét tükrözi. A lipid kettősréteg sík elrendeződésű, amikor szilárd hordozófelületen alakítják ki (SLB), vagy zárt, sejtyszerű képződmény, amit vezikulának vagy liposzómának nevezünk.



2. ábra Liposzóma és hordozón kialakított lipid kettősréteg vázlatos rajza

A szilárd felületen elhelyezkedő kettősréteg hordozója lehet üveg-, csillám-, vagy szilíciumlapka [Zhao, 2012]. Ilyen modellrendszerekben a lipidréteg poláris fejcsoportja a hordozó felé néz, míg a szénhidrogén láncok a második monoréteg szénláncáival vannak érintkezésben. Számos előnyük van a lipid vezikulákhoz

hasonlítva. Ezeket a modellrendszereket könnyű előállítani, és sokkal stabilabbak, mint a lipid vezikulák [Loose, 2009]. Szabályozható a lipid aszimmetria is, vagyis előállítható eltérő lipid összetételű alsó és felső réteg, ami a vezikulás rendszereknél nehezen érhető el. További előny, hogy mivel ezek a membránszerkezetek szilárd hordozófelületén helyezkednek el, felületérzékeny módszerekkel például atomi erő mikroszkópiával jellemezhetőek, ami megint csak egyszerűbb, mint a szabadon úszó vezikulák vizsgálata [Mingeot-Leclercq, 2008; Goksu, 2009]. Ugyanakkor a klasszikus, hordozós kettősrétegek legnagyobb hátránya, hogy nem jeleníti meg a sejtmembrán fluiditását, mobilitását. A lipidréteg közelsége a szilárd felülethez módosíthatja a rendszer tulajdonságait, ami hatással van a membránkomponensek mobilitására, az idegen komponens bejutásában szerepet játszó molekuláris kölcsönhatásokra. Ezen probléma megoldására készítettek olyan hordozós kettősréteget is, amelyben az első lipidréteget alkotó molekulákat távtartó, flexibilis láncon keresztül kötik a szilárd hordozóhoz [Rossi, 2007]. A hordozós kettősréteg másik hátránya, hogy gyakran tartalmaz hibákat, vagyis nem folytonos a kettősréteg. Ezért a kölcsönhatási-vizsgálatok előtt célszerű a kettősréteg integritását ellenőrizni. Előállításuk a Langmuir-Blodgett-technikával, vagy a liposzómák kiterítésével lehetséges.

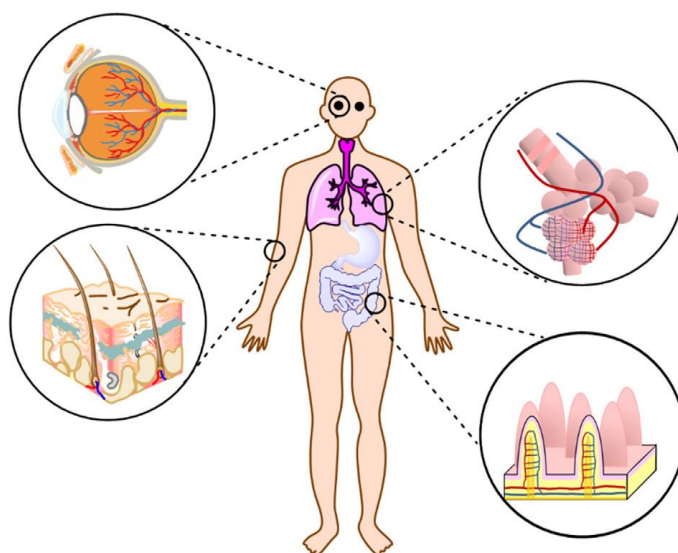
A kettősréteg modelleket is alkalmazzák hatóanyagok, elsősorban membránpenetráló természetes és mesterséges peptidek hatásának vizsgálatára. A nyerhető információ kevésbé kvantitatív, liposzómák esetén leginkább a membrán integritásának megszűnése, vagyis a liposzóma „kilyukadása” detektálható.

Munkámban a Langmuir-monoréteg modell adta lehetőségeket akartam kihasználni a tenziometrikus mérésekben, valamint a lipidréteg szerkezetváltozásának nagyfelbontású képi tanulmányozásában, kettősréteg-modelleket eddig nem vizsgáltam.

2.4. Gyógyszerhordozó nanorészecskék és az AFM

A nanoanyagokat tartalmazó termékek száma az utóbbi évtizedben folyamatosan növekszik. 2014 elején, egy vizsgálati jelentésben több, mint 1800 olyan fogyasztási cikket jelöltek meg, amik nanoanyagokat tartalmaznak [Beddoes, 2015]. Ezek a sporteszközöktől, az élelmiszereken át a textil termékekig, gyermekjátékokig terjednek. A nanorészecskéknek emellett óriási jelentősége van a különböző orvosbiológiai alkalmazásokban, mint pl. gyógyszerhordozók, teranosztikumok, szenzorok.

A nanorészecskék találkozása az élő szervezettel többféle úton lehetséges: a bőrön át, a szemben, a légzőszerven, vagy az emésztőrendszeren keresztül. Ezt szemlélteti a vázlatos alábbi ábra.

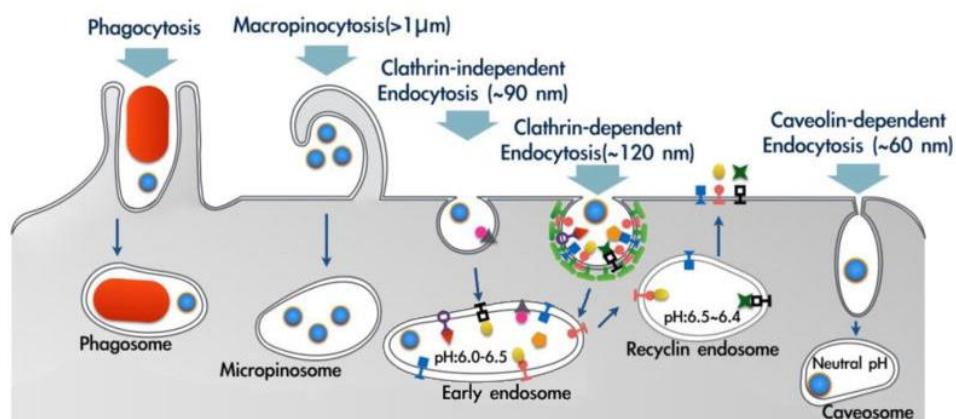


3. ábra A nanorészecskék szervezetbe jutásának főbb útjai [Beddoes, 2015]

A gyógyszerhordozó nanorészecskék esetében is vannak törekvések arra, hogy a szokásos szájon át bevehető vagy közvetlenül a véráramba injektálható formák mellett olyan készítményeket, formulákat is kifejlesszenek, amelyekkel alternatív utat vagy éppen célzott bevitelt valósítanak meg. A tüdő betegségeinek kezelésében kézenfekvő a légzőszerven keresztüli bejuttatás, megkímélve ezáltal a szervezet egészét. Erre a célra alkalmaznak aeroszol készítményeket, de folynak kutatások hatóanyag tartalmú polimer, lipid és kompozit nanorészecskék kifejlesztésére is.

Ezeknek a lehetőségeknek a kihasználása a nanorészecske pontos megtervezését igényli. El tudja-e látni megfelelően feladatát, a hatóanyag hordozását, a hatóanyag védelmét a szervezet különböző kémiai környezetet jelentő részein, a programozott hatóanyag felszabadítást, a célba juttatást, valamint azt, hogy a „kiürült” hordozó ne halmozódjon a szervezetben, későbbi problémát okozva. Ezek mind a nanorészecske tulajdonságaitól, a biológiai rendszerrel való kölcsönhatástól függenek. Ezért rendkívül fontos a biológiai rendszerrel való kölcsönhatás folyamatának, lépéseinek, ennek molekuláris részleteinek feltárása, megismerése. A nanorészecskék tudatos alkalmazásával csaknem egyidős a nanotoxicitás kérdésének felvetése. Ez nem meglepő, hiszen ennek megítélésében, a valóban veszélyes rendszerek kiszűrésében is a meghatározó, az élő szervezettel való kölcsönhatások megismerése, elemzése.

Amikor a nanorészecske a szervezetbe kerül, felületén nagyon rövid idő alatt fehérjeréteg alakul ki, aminek minősége, összetétele irányítja a további biológiai folyamatokat. A biokompatibilitás egyik szükséges, de nem elégséges feltétele éppen ehhez kapcsolódik. Cél, a nem specifikus fehérje adszorpció visszazorítása, megakadályozása. Ez felületmódosítással, többek között hidrofil polimerrel való borítással oldható meg [Stolnik, 2001; Kiss, 2014]. Ugyanakkor a gyógyszerhordozó nanorészecskének be kell jutnia a sejtekbe, így kölcsönhatásba kell lépnie a sejtmembránnal. Ez a folyamat többféle mechanizmus szerint megvalósulhat (4. ábra), de ezek irányításában a méret mellett szerepe van a felületi tulajdonságoknak is [Yameen, 2014].



4. ábra Különböző méretű részecskék sejtbejutásának lehetőségei: fagocitózis, makropinocitózis, klatrinfüggetlen és klatrinközvetített, valamint kaveolinfüggő endocitózis [Yameen, 2014]

A nanorészecskék sejtbejutásának biológiai vizsgálata mellett fontosak, bár nem gyakoriak az egyszerűsített modellrendszerekkel végzett kísérletek, valamint a számítógépes szimulációk. Molekuladinamikai szimulációval Choe és munkatársai például arra a következtetésre jutottak, hogy szénjellegű nanorészecskék a tüdő membránkomponensei közül a fehérjékkel kevésbé, inkább a lipidkomponensekkel mutatnak kölcsönhatást [Choe, 2008]. Gyógyszerhordozó nanorészecskék lipid mono- vagy kettősréteggel való kísérleti vizsgálatával kevés munka foglalkozik. Ezek többsége a nanorészecskék méretétől függő hatásra összpontosít, elsősorban a toxicitás szempontjából [Roiter, 2008]. Két ilyen közleményben a tüdő lipidösszetételéhez közel álló modellel végzett kísérletről számolnak be, amelyben különböző méretű nanorészecskék szerkezetmódosító hatását hasonlították össze AFM-es vizsgálatokkal [Harishchandra, 2010; Dwivedi, 2014].

Az AFM alkalmas a nanorészecskék méretének meghatározására, a tük és a mintafelület közötti kölcsönhatás mérésének alapján. A mintát x-y irányban pásztázva 3D-s képet ad a felületről. Mivel működésének alapja az erőmérés, nanorészecskék felületén lévő hatóanyag, stabilizátor jelenlétét is megerősítheti [Fanun, 2010]. A gyógyszerhordozó kolloidok méretmeghatározását általában fényszórás méréssel végzik. Ez a módszer azonban nem érzékeli a részecske alakját, és a méreteloszlásról is csak korlátozottan ad információt. Az AFM-mel a méretmeghatározás időigényes folyamat, de az egyes részecskék közvetlen megjelenítését teszi lehetővé, speciális minta előkészítés nélkül. Célszerűen módosított tük segítségével a nanorészecskék felületi érdességének és polaritásának jellemzése, a felületi energia meghatározása kiterjeszti az AFM alkalmazását adhéziós problémák, por alakú gyógyszerek stabilitásának megoldására [Mittal, 2015].

Inhalációra tervezett porformájú gyógyszerek esetében az alkalmazhatóság és a hatás, a porszemcsék méretén és alakján túl, nagyban függ a felületi tulajdonságoktól is. Az AFM értékes információt tud szolgáltatni, mind a felület érdességének, simaságának meghatározásában, mind a felület kémiai összetétele által meghatározott felületi energiáról. Előnyt jelent az is, hogy tetszőleges körülmények között, pl. különböző páratartalom esetén is elvégezhető a mérés [Carvalho, 2015].

Az AFM megjelenésétől kezdve hangsúlyosan előnyös tulajdonságként tartjuk számon azt, hogy „bármilyen” közegben alkalmazható, ami tág teret nyit a biológiai vizsgálatoknak. Az egyik intenzíven művelt irány – a nagy felbontóképességen alapuló vizsgálat – a molekuláris kölcsönhatások feltárása, fehérjeszerkezet, aggregáció követése, DNS molekulák megjelenítése és manipulációja [Kellermayer, 2011; Kellermayer, 2012].

Ezzel szemben inkább csak az utóbbi években találunk beszámolót olyan kísérletekről, ahol szövetekkel, nagyobb biológiai objektumok, sejtek, baktériumok felületének AFM-es tanulmányozásával foglalkoznak [Guduru, 2011]. Labhasethwar több munkájában vizsgálta nanorészecskék kölcsönhatását sejtekkel, hogy megismerje a gyógyszerhordozók szerepét a hatóanyag eredményes sejtbe juttatásában [Panyam, 2003]. A sejtmembrán és a nanorészecske kölcsönhatásának folyamatát AFM felvételek sorával, míg a sejten belüli eloszlást konfokális mikroszkóppal követte nyomon [Vasir, 2008]. Hangsúlyozta, hogy a hatékony szállító rendszerek kifejlesztéséhez fontos ismerni a sejtmembránnal való kölcsönhatásukat.

Lamprou és munkatársai gyógyszerhordozó nanorészecskék állati szövetekben való eloszlását vizsgálták 2013-as munkájukban [Lamprou, 2013]. A korábbi gyakorlattól eltérően a nanorészecskék észleléséhez nem volt szükség semmiféle jelzésre. A kölcsönhatási erő mérése alapján még a szöveti mechanikai tulajdonságok változására is tudtak következtetni, amit a nanorészecskék esetleges toxicitásával hoztak összefüggésbe. Egy közelmúltban megjelent részletes áttekintés [Lamprecht, 2014] szerint az atomi erő mikroszkópia az egyik legnagyobb teljesítményű technika a sejtek és hatóanyagok kölcsönhatási mechanizmusának feltárásában, a korszerű gyógyszerhordozók sejtek általi felvételének megismerésében. Szilárd hordozón kialakított modell lipid kettősrétegek valamint azithromycin, enfuvirtide, HIV-1 fusion inhibitor peptid, poly(amidoamin) (PAMAM) dendrimer antibakteriális hatóanyag kölcsönhatását vizsgálták AFM-mel. Megállapították, hogy a rendezett szerkezet megbomlása, a lipidréteg eróziója, a lipidréteg összetételétől függően eltérő intenzitással indul meg a különböző doménekben [Berquand, 2004]. Egy másik munkában időléptetési AFM technikával derítették fel a pórusképző folyamatot, amelyet töltéssel rendelkező dendrimer molekulák idéznek elő DMPC kettősrétegben [Hong, 2004].

Az AFM ideális eszköz nanoméretű felületi mintázat feltárására is. A felület topográfiáját nanométernél is jobb felbontásban tudja megjeleníteni. A nanométerestől mikrométeresig terjedő tartományba eső érdességet meg tudjuk határozni AFM segítségével. Az érdességvizsgálatokban gyakran referencia módszerként is szerepel a képek kiváló felbontása miatt.

Ennek a kiváló felbontóképességnek a kihasználására jó példa egy mikrokristályosítási technika kifejlesztése α -laktóz monohidrát részecskék kialakítására. A kristályosítási körülmények, a hőmérséklet és a túltelítettség szabályozásával nm-nél finomabb felületi érdességet ($Rq= 0,25$ nm) értek el. Az Ra érték is szignifikánsan csökkent, 110 nm-ről 25 nm-re, ami a rendkívül sima nanogömböcskék miatt a termék előnyös „folyási” és tapadási tulajdonságaihoz vezetett [Mei Jin Tan, 2015].

Én szintén ezt a rendkívüli érzékenységet használtam fel, amikor a szilárd felületre átvitt, penetráltatott lipidfilm vizsgálatokor a lipid monoréteg szerkezetének követésére, a felület morfológiájának jellemzésére használtam. Emellett gyógyszerhordozó nanorészecske és modell lipid monoréteg kölcsönhatását is tanulmányoztam, és ennek vizuális megjelenítésére az AFM technikát alkalmaztam.

3. Célkitűzések

A határfelületi kölcsönhatások meghatározó jelentőségűek a biológiai rendszerekben. Munkámban ennek két típusával foglalkozom.

Az egyik a biológiai rendszerrel, sejtekkel kapcsolatba kerülő idegen, szilárd felület, ami lehet az élő szervezetbe ültetett implantátum, vagy éppen *in vitro* biológiai vizsgálatokhoz használt edényzet felülete.

A másik a sejtmembrán és annak külső felülete, ami a szervezetbe juttatott gyógyszerhatóanyag molekuláival kerül érintkezésbe, és elvárjuk, hogy az itt jelentkező kölcsönhatások elősegítsék a hatóanyag sejt általi felvételét. Fizikai, kémiai szempontból az első szilárd/folyadék határfelület, míg a második inkább fluid határfelületnek tekinthető. Ebből következően a határfelület fizikai, kémiai elemzéséhez, a kölcsönhatások megnyilvánulásának követéséhez többféle kísérleti technikát kellett felhasználnom. Céлом egyrészt az volt, hogy a lehető legrészletesebben felderítsem azokat a felületi (kémiai, illetve morfológiai) tulajdonságokat, amelyek befolyásolják a szilárd felületen végbemenő biológiai kölcsönhatásokat. A bioaktív felületi réteg kialakulásának változataival többféle mintát állítottam elő a további, részben *in vivo* biológiai vizsgálatok számára. A különböző kémiai összetételű felületi rétegeket laboratóriumi körülmények között jellemeztem és hasonlítottam össze. A felületi bevonatok vastagságának, szerkezetének meghatározásában a röntgensugár fotoelektron spektroszkópia (XPS), a kvarckristály mikromérleg (QCM) és az ellipszometria mellett fontos szerepe volt az atomi erő mikroszkópiának (AFM).

A hatóanyagok membránaffinitási vizsgálata a lipid monoréteg esetében fluid határfelülethez kapcsolódik. Ennek eszköze a Langmuir-mérleg, melynek segítségével mennyiségi információ nyerhető a lipid-hatóanyag kölcsönhatásról. Fontos szerepe van a képi megjelenítésnek a szerkezetváltozás tanulmányozásában, amely közel molekuláris felbontásban az AFM-mel valósítható meg. Ebben a munkában kapcsolatot kerestem a lipidrétegbe való penetráció és a lipidréteg szerkezetének változása között. Kis molekulatömegű hatóanyag, ennek peptid konjugátuma, valamint polielektrolit típusú, baktériumellenes hatással rendelkező amfipatikus vegyületsor voltak a vizsgált bioaktív komponensek.

Mivel a korszerű gyógyszerformák között egyre nagyobb helyet foglalnak el a kolloidális gyógyszerhordozók, választ kerestem arra is, mi befolyásolja ezek sejtfelülettel való kölcsönhatását, valamint hogyan segíthető elő a gyógyszerhordozó felületi tulajdonságának módosításával a sejt általi felvétel. Ezek megválaszolásához adaptálni kellett a nanorészecskék esetére az oldott hatóanyagokra kidolgozott módszereket.

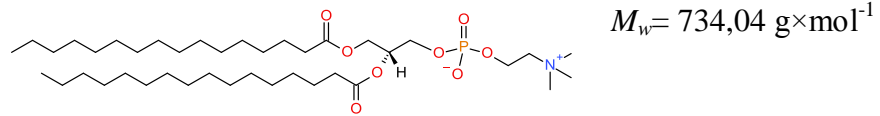
4. Kísérleti anyagok

4.1. Általános vegyszerek

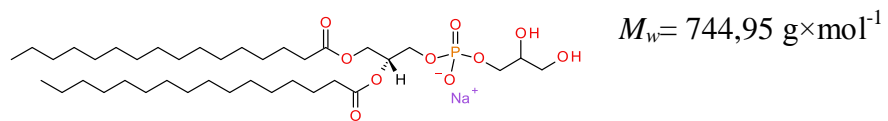
- Langmuir-mérleges mérések során a terítő oldat oldószereként kloroform:metanol 3:1 ($V \times V^{-1}$) arányú, felületaktív szennyeződéstől mentes keverékét használtam. Emellett a metanolt a Langmuir-mérleg tisztítása során is alkalmaztam. Kloroform (Merck Kft, Magyarország, tisztaság >99,4%), metanol (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország, tisztaság $\geq 99,9\%$)
- Pufferek készítése során a kétszer desztillált víz mellett felületaktív anyagoktól mentes dinátrium-hidrogén-foszfátot (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország, tisztaság >99,9%), kálium-dihidrogén-foszfátot (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország, tisztaság >99%), citromsav-monohidrátot ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \times \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország, tisztaság >99%), bórsavat (H_3BO_3) (Reanal Kft, Magyarország, tisztaság: p.a.) és nátrium-kloridot (NaCl) (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország, tisztaság: >96%) használtam. A nagy tisztaságú alapanyagokat hevítéssel tisztítottam, a foszfát sókat 105°C -on tömegállandóságig szárítottam, a NaCl -ot 500°C -on 3 órán keresztül hevítettem.
- Citrát puffert ($\text{pH} = 6,0$) citromsavból és dinátrium-hidrogén-foszfátból készítettem, melyhez NaCl -ot adagoltam fiziológiás mennyiségben ($w = 0,9\% (m \times m^{-1})$) [Gomori, 1955]
- Sörensen puffert ($\text{pH} = 7,4$) dinátrium-hidrogén-foszfátból és kálium-dihidrogén-foszfátból készítettem, melyhez NaCl -ot adagoltam fiziológiás mennyiségben ($w = 0,9\% (m \times m^{-1})$) [Gomori, 1955; Sorensen, 1909]
- Borát puffert ($\text{pH} = 8,0$) bórsavból és nátrium-hidroxidból készítettem, melyhez NaCl -ot adagoltam fiziológiás mennyiségben ($w = 0,9\% (m \times m^{-1})$) [Benton, 2000]
- Tisztításhoz tömény kénsavat (H_2SO_4) (Molar Chemicals Kft, Magyarország, tisztasága: >96%) és hidrogén peroxidot (H_2O_2) 30% ($V \times V^{-1}$) (Molar Chemicals Kft, Magyarország, tisztasága: >96%) használtam.

4.2. Modell membrán alkotói

- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-foszfo-kolin (DPPC)
(Avanti Polar Lipids Inc., tisztaság >99%)



- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-foszfo-(1'-*sn*-glicerin) (DPPG)
(Avanti Polar Lipids Inc., tisztaság >99%)

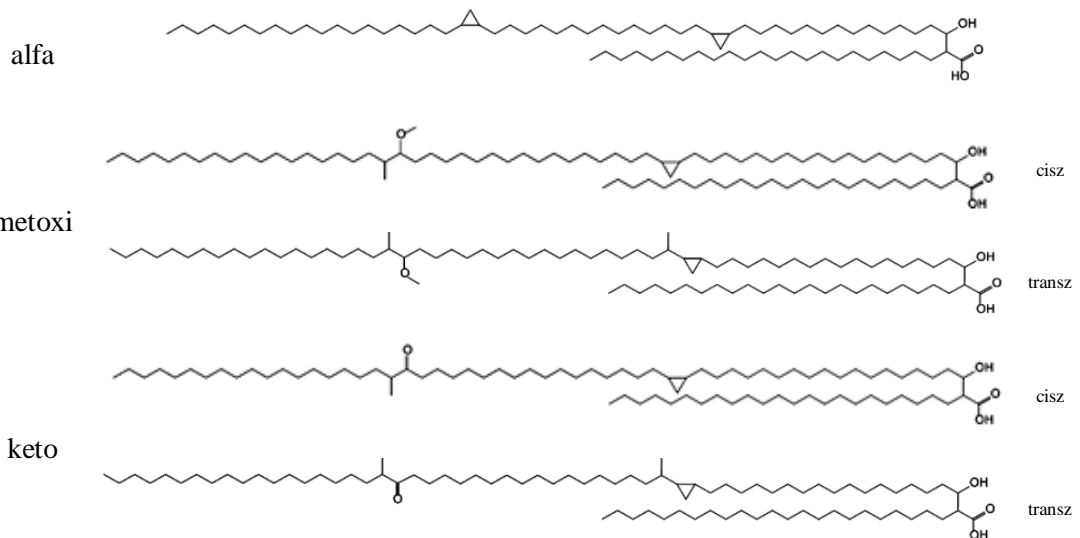


- Phospholipon[®] 100H, mely szteraoil-, palmitoil-kolinok 85:15 (m x m⁻¹)-os keveréke (Nattermann GmbH, tisztaság >99,9%)

$$M_w = 783,03 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

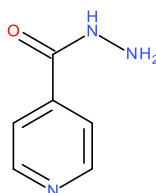
- Mikolsav (α -, metoxi- és keto-mikolsavak keveréke) (Sigma-Aldrich Inc., tisztaság > 98%)

$$M_w = 1100\text{-}1300 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$



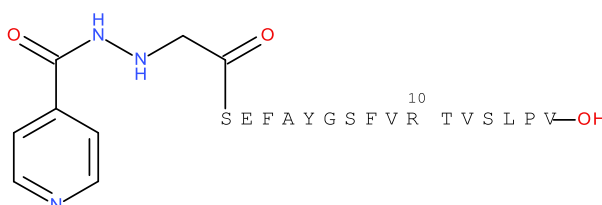
4.3. Antituberkulotikumok

- Izoniazid (INH) [Meyer, 1912; Medical Research Council, 1952]



$$M_w = 137,4 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

- INH-peptid konjugátum, INHredSer (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport)
Az előállítás során szilárd fázisú peptid szintézissel, Fmoc/^tBu stratégiával kapcsolták össze az INH-ból előállított glioxilsav származékot a kiválasztott epitóp szekvenciával ⁹¹SEFAYGSFVRTVSLPV¹⁰⁶ [Horváti, 2009].



$$M_w = 1934,0 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

4.3.1. Membránmodellek az antituberkulotikumok vizsgálatához

Phospholipon[®] 100H lipidkeveréket használtam ($V = 87 \mu\text{l}$, $c = 0,1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) a tisztán lipidből álló monorétegű membrán kialakításához.

A *Mycobacterium* sejt falának jellemző komponensével bővítve a modelleket DPPC+mikolsav keverékfilmeket is készítettem, és használtam a penetráció mérésekhez.

4.4. Antibakteriális polimermolekulák

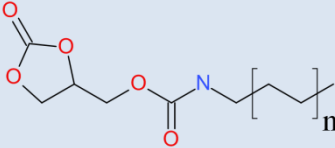
Az antibakteriális polimereket prof. M. Möller irányításával az Aacheni Egyetem Interaktív Anyagok Leibnitz Intézetében tervezték és szintetizálták. Ennek a vegyületcsoportnak, melyek kationos, amfifil polimerek, a gerincét elágazó poli(etilén-imin) (PEI) ($M_w = 25.000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$, BASF, Németország) alkotja, melyre „grafting-to” technikával kvaterner ammónium csoportokat és változó hosszúságú alkilcsoportokat kapcsolnak. A kétlépcsés szintézis rövid áttekintése a következő [Pasquier, 2007]:

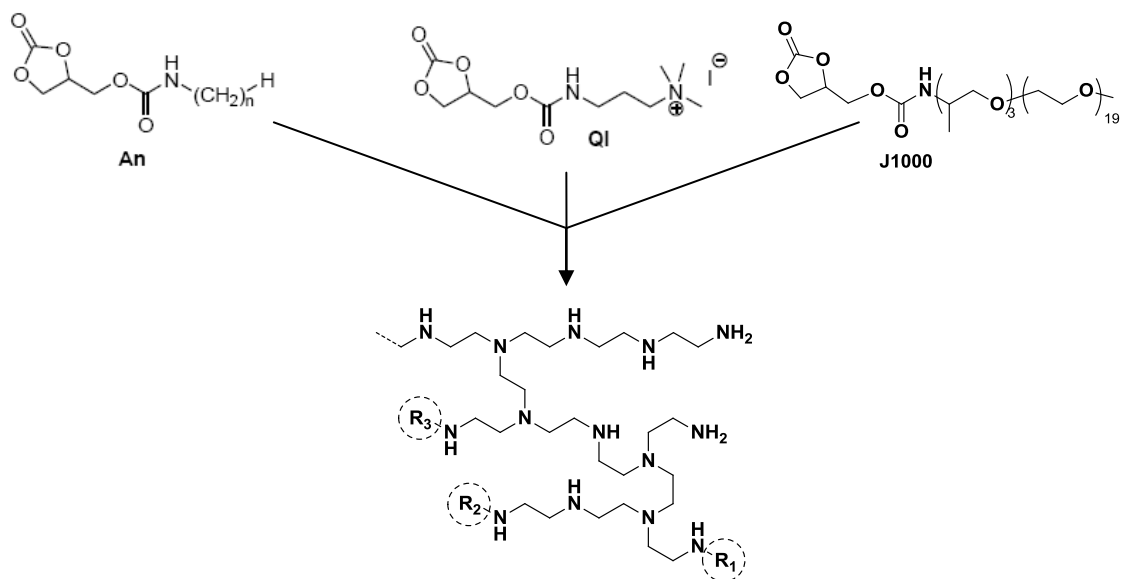
(i) Alkil és kvaterner ammónium csoportok szubsztitúciója etilénkarbonátokat eredményez. Az előállított ciklikus karbonátokat összesítettem (1. táblázat). A sorozat magába foglalja a különböző lánc hosszúságú termékeket, melyek az alkilánc hossz alapján (**An**, n= 8, 10, 12, 14, 16) lettek jelölve. A kvaterner ammónium jodid sója (**QI**), a poli(etilén-oxid) (PEO) ($M_w = 25.000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$) származék (**J**). A legtöbb esetben a karbonátok szubsztitúciós szintézise (2-oxo-1,3-dioxolán-4-il)metilfenil karbonáttal (dikarbonát kapcsolószer) indul, melyhez a megfelelő amint adagoltak.

(ii) Három ilyen szubsztituált karbonátot a PEI gerinchez egyszerre adtak, és a reakció során a primer amin csoportokkal stabil uretán kötéseket kaptak (5. ábra).

A szubsztituált PEI sorozatot PEI-QI-An-J képlettel jelöljük. A PEI primer amin csoportjaira átlagosan 60% alkil, 20% kvaterner ammónium és 20% PEO jut.

1. táblázat Funkcionális, ciklikus karbonátok szerkezetei

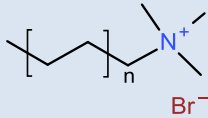
		
Molekula neve/ jele	n	$M_w / \text{g} \times \text{mol}^{-1}$
(2-oxo-1,3-dioxolán-4-il-metil)-oktil-karbamát (A8)	6	273,32
(2-oxo-1,3-dioxolán-4-il-metil)-decil-karbamát (A10)	8	287,35
(2-oxo-1,3-dioxolán-4-il-metil)-dodecil-karbamát (A12)	10	301,38
(2-oxo-1,3-dioxolán-4-il-metil)-tetradecil-karbamát (A14)	12	315,40
(2-oxo-1,3-dioxolán-4-il-metil)-hexadecil-karbamát (A16)	14	329,43



5. ábra Szintézisvázlat a hidrofób polikationok előállításához, funkcionális etilénkarbonátok és PEI felhasználásával

A kationos polimerek vizsgálatához összehasonlító anyagokként a kationos tenzid sorozatot választottuk, melyet a 2. táblázatban tüntettem fel.

2. táblázat Antibakteriális tulajdonságú kationos tenzidek

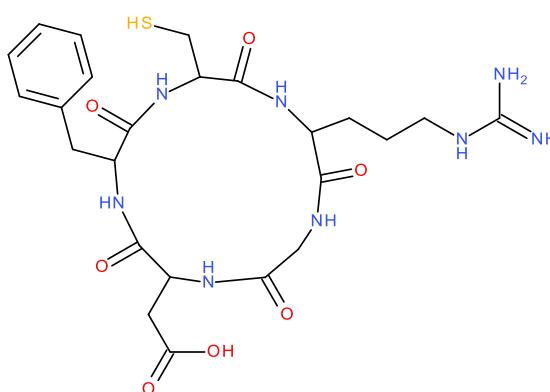
		
Molekula neve/ jele	n	$M_w/ \text{g} \times \text{mol}^{-1}$
n-oktil-trimetil-ammónium bromid (OTAB)	6	252,23
n-decil-trimetil-ammónium bromid (DeTAB)	8	280,29
n-dodecil-trimetil-ammónium bromid (DTAB)	10	308,34
n-tetradecil-trimetil-ammónium bromid (TTAB)	12	336,39
n-hexadecil-trimetil-ammónium bromid (HTAB)	14	364,45

4.4.1. Membránmodellek az antibakteriális polimerek vizsgálatához

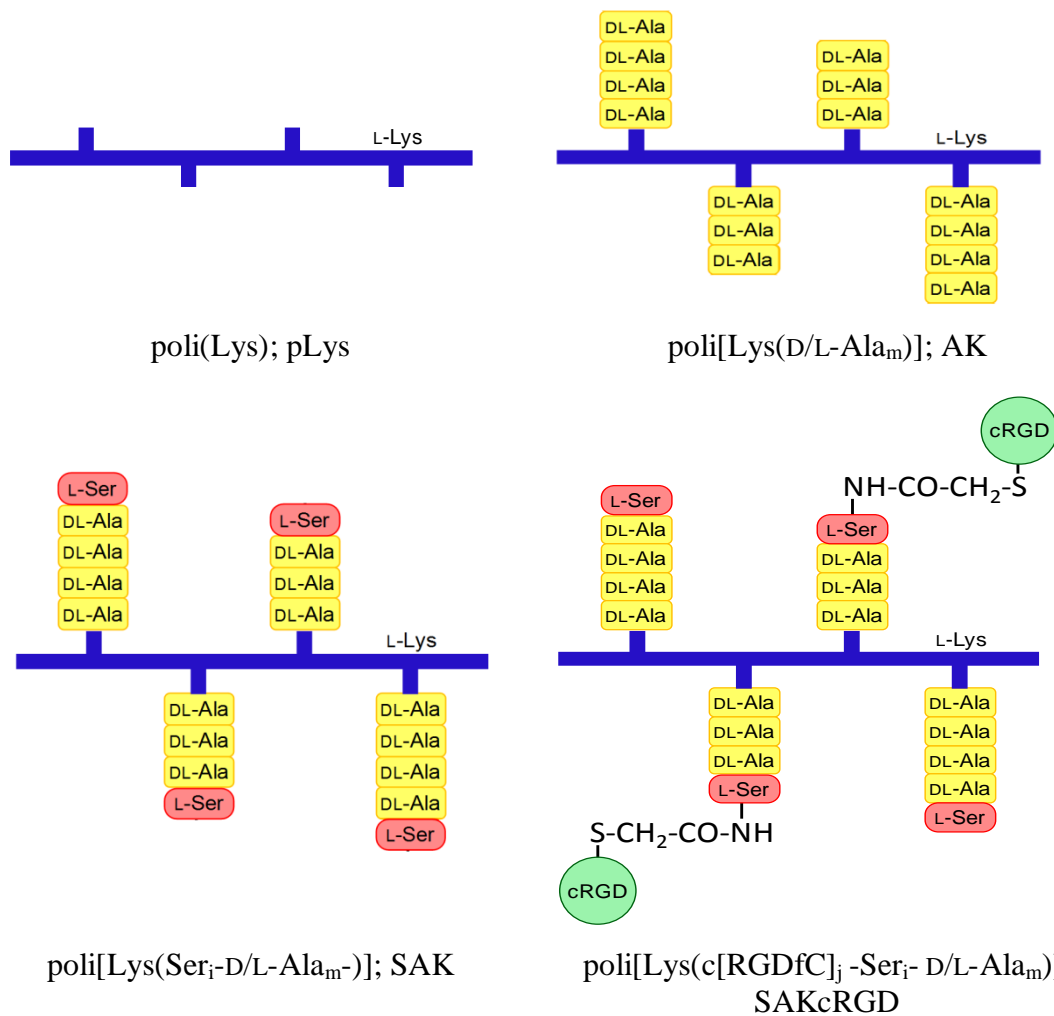
Az antibakteriális polimerek membránaffinitási vizsgálatához DPPC monoréteget, valamint DPPC és DPPG 3:1 molarányú keverékfilmjét használtam.

4.5. Sejtnövekedést segítő polipeptid molekulák

A bioaktív polilizineket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában Dr. Mező Gábor irányításával tervezték és szintetizálták. A polilizin gerincre (pLys) oligoalanin oldalláncokat kapcsoltak (AK), melyek végére szerin aminosavat (SAK) kötöttek. Ezekhez az elágazó gerincen lévő szerinekhez kapcsolták a ciklikus RGD peptidet (SAKcRGD) (6. és 7. ábra) [Mező, 1997; Markó, 2008; Madarász, 2011].



6. ábra ciklo[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys] továbbiakban cRGD peptidszakasz képlete

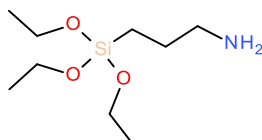


7. ábra A polilizsin és származékainak szerkezete, ahol $m=2,7$, $i=0,9$, $j=0,3$ [Tátrai, 2013; Mohai, 2013]

4.5.1. Bioaktív molekula rögzítése szilárd felületen

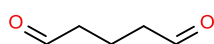
4.5.1.1. Sejtnövekedést segítő molekulák felületi reakcióihoz használt vegyületek

- 3-aminopropil-trietoxi-szilán (APTES) (Sigma-Aldrich Kft., tisztaság >99%)



$$M_w = 221,4 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

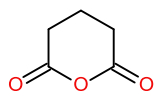
- Pentán-1,5-dial (Glutáraldehid) (Sigma-Aldrich Kft., p.a.)



$$M_w = 100,1 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

- tetrahidropiran-2,6-dion (Glutársavanhidrid)

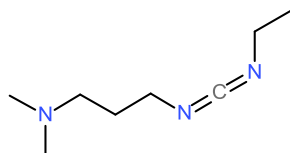
(Sigma-Aldrich Kft., tisztaság >99%)



$$M_w = 114,1 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

- N-etil-N²-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)

(Sigma-Aldrich Kft., tisztaság >97%)



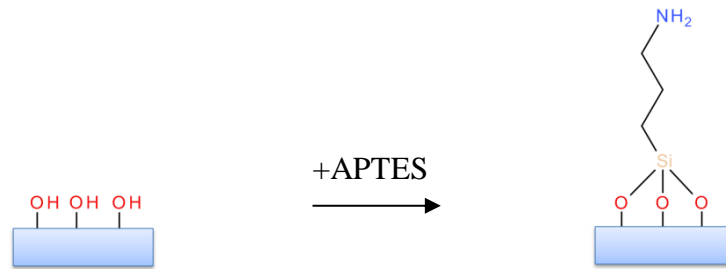
$$M_w = 155,2 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$$

4.5.1.2. A hordozó felület tisztítása

Az üveg felületeken lévő kevés szerves szennyeződést frissen készített 'piranha oldattal' távolítottam el. Az oldat 2:1 térfogatarányú cc H₂SO₄ : H₂O₂ (30% (m×m⁻¹)) elegye.

4.5.1.3. Hordozó funkcionálizálása

A felület primer aminnal történő funkcionálizálását APTES reagenssel, gázfázisú reakcióval végeztem. Az előzőleg 'piranha oldattal' megtisztított hordozót (4.5.1.2.) exszikkátorba helyeztem. Az exszikkátort vízlégszivattyúval leszívattam, és az üveg csonkra gömblombikban 1 ml folyékony APTES-t tettem. 140°C-os szárítószekrénybe helyeztem (8. ábra). Miután az exszikkátor is felmelegedett az APTES áramlását szabaddá tettem az exszikkátor csapjának elfordításával. 2 óra elteltével az exszikkátort kivettem, a csapot elzártam és szobahőmérsékleten hagytam kihűlni. A szililezés utolsó lépéseként éter, 96%-os alkohol, desztillált vizes mosási sorral eltávolítottam a felületen maradt szililező szert. Ezután megszáritottam a hordozó lapokat, és vákuumban tároltam a felhasználásig.



8. ábra Hordozó felület és az APTES közötti reakció

4.5.1.4. Polipeptidek fiziszorpciója

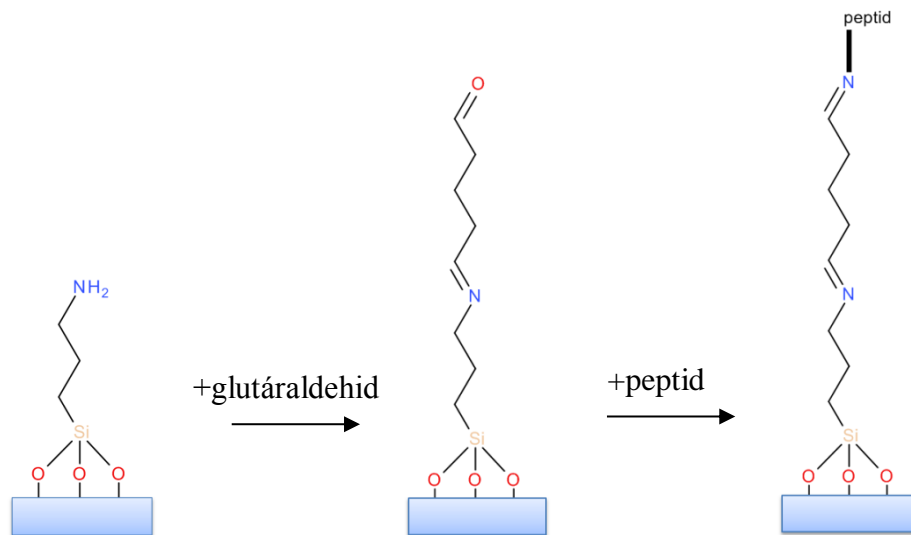
Az előzőleg 'piranha oldattal' megtisztított üveget (4.5.1.2) a megfelelő töménységű peptid oldat 5 cm^3 -jét tartalmazó szcintillációs üvegbe helyeztem. Az 1 órás adszorpciós idő elteltével, mely idő alatt intenzíven rázattam az edényt, 3x5 percig vízzel mostam, majd exsikkátorban szárítottam.

4.5.1.5. Polipeptidek kemiszorpciója glutáraldehiddel

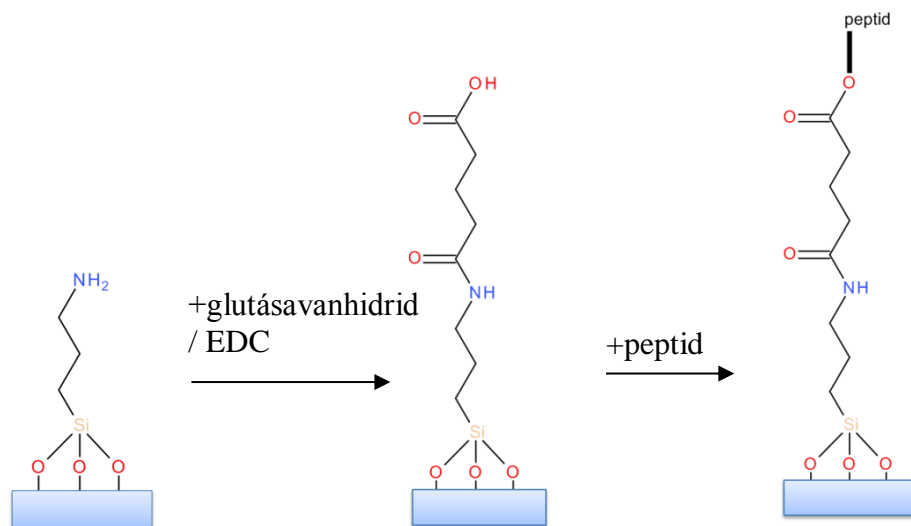
A 4.5.1.3. fejezetben leírtak alapján elkészített funkcionizált hordozót 5 cm^3 1% ($\text{m}\times\text{m}^{-1}$)-os glutáraldehid oldatba merítettem. Az intenzív rázatás mellett a 2 órás reakció felénél kis mennyiségű NaBH_3CN -ot adtam az oldathoz. A reakció végeztével a hordozókat 3x5 percig oldószerrel mostam, majd exsikkátorban szárítottam (9. ábra).

4.5.1.6. Polipeptidek kemiszorpciója glutársavanhidriddel

A 4.5.1.3. fejezetben leírtak alapján elkészített funkcionizált hordozót 5 cm^3 $0,01\text{ mg}\times\text{ml}^{-1}$ glutársavanhidrid oldatba merítve, 15 órán keresztül intenzíven rázattam, majd oldószerrel 3x5 percig mostam a felületet. Ezt követően 5 cm^3 oldószerhez $\frac{1}{4}$ spatulányi EDC-t adtam. 1,5 óra rázatás után a hordozókat 3x5 percig desztillált vízzel mostam. Ezután a hordozót az adott koncentrációjú peptid oldatba helyeztem, ahol 1,5 órás reakció után 3x5 percig oldószerrel mostam, majd exsikkátorban szárítottam (10. ábra).



9. ábra Kemisorpció glutáraldehiddel



10. ábra Kemisorpció glutársavanhidrid/ EDC-vel

4.6. Nanorészecskék

4.6.1. Nanorészecskéket felépítő molekulák

- poli(DL-tejsav/glikolsav) (PLGA), 50% tejsav, 50% glikolsav tartalommal, $M_w = 50.000-75.000$ (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország)
- elágazó poli(etilénimin) (PEI), primer : szekunder : terciér amino csoport 1:2:1 aránnyal jellemezhető, $M_w = 25.000$, pK_a az amino csoportokra 4,5, 6,7, 11,6 (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország)

- poli(etilénoxid)/poli(propilénoxid)/poli(etilénoxid), vagyis PEO-PPO-PEO triblokk-kopolimer (Pluronic[®] F-127), $M_w=12.700$, a központi hidrofób PPO blokk ($M_w=3.248$) és a 70%-os PEO tartalommal jellemezhető a polimer (BASF Kft., Magyarország)
- Pluronic[®] F-127-amin, végcsoport módosítással előállítva Pluronic[®] F-127-ből. [Kiss, 2014, Gyulai, 2016]

4.6.2. Nanorészecskék előállítása

A PLGA nanorészecskék előállítása nanoprecipitációval, oldószer cserével történt. Aceton oldószerrel $10 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ koncentrációjú PLGA oldatot készítettük. Ezt lassan csepegtettük ($3 \text{ } \mu\text{l} \times \text{s}^{-1}$) a stabilizáló polimer (Pluronic vagy PEI) vizes oldatához 500 rpm sebességű kevertetés mellett. A vizes és a szerves fázis térfogataránya 1:10 volt. A nanorészecskék kialakulása további egy éjszakás kevertetés mellett zajlott. Ez idő alatt az aceton teljes mennyisége elpárolgott az oldatból. A nanorészecske szuszpenziót 'centrifugás ülepítéssel' tisztítottuk: 15 perces centrifugálás (12.000g) után a felülúszót eltávolítottuk, majd az üledéket újra diszpergáltuk kétszer desztillált vízzel. Ezt az eljárást háromszor ismételtük meg. Végül a rediszpergált részecskéket 4°C-on tároltuk. Az előállított nanorészecske a tisztítást követően több mint 70%-os hozamú volt. A vizes szuszpenziók kémhatása a pH= 4-5 tartományba esett.

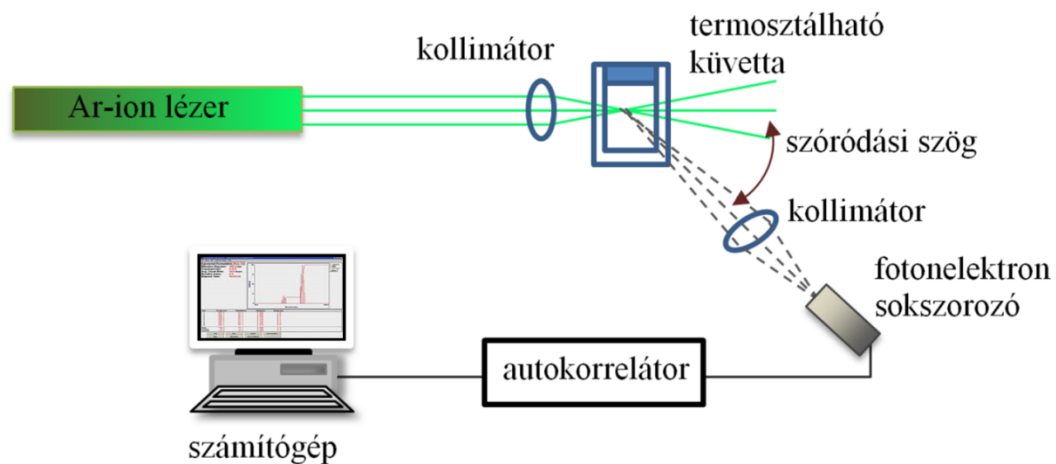
4.6.3. Membránmodell a nanorészecskék vizsgálatához

A nanorészecskék kölcsönhatását lipidréteggel Langmuir-mérlegben vizsgáltuk, ahol a membránaffinitásukra a részecskék lipidrétegbe való adszorpciója és/vagy penetrációja utal. A természetes baktérium negatív töltésű sejtfalának lipidösszetételéhez hasonlóan 75% DPPC és 25% DPPG foszfolipidból álló monorétegű modellt használtunk.

5. Kísérleti módszerek

5.1. Dinamikus fényszórás mérés (DLS)

Az általam használt dinamikus fényszórásmérő készülék (DLS) (Brookhaven Inst., USA) egy BI-200SM goniométert és egy BI-900AT digitális korrelátort tartalmaz. Fényforrásként Ar-ion lézert használ (488 nm), mely vertikálisan polarizált fényt bocsát ki (Omnichrome, model 543AP) (11. ábra).

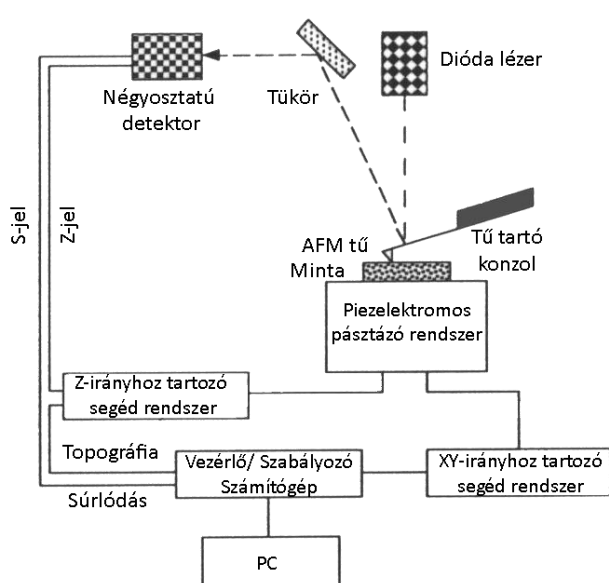


11. ábra Dinamikus fényszórás mérő készülék sematikus ábrája

A vizsgált szuszpenzióban ($c = 0,1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) található részecskékről szóródó fény a fotoelektron sokszorozó segítségével kialakult jelét az autokorrelátor dolgozza fel. A részecskék hatására fluktuáló fény intenzitás–intenzitás autokorrelációs függvényének segítségével olyan adatsorhoz jutunk, melyből a részecskék méretét, polidiszperzitását tudjuk kiszámítani. Vizsgálataim során 25°C -ra termosztálva, 90° szóródási szögnél mértem.

5.2. Atomi erő mikroszkópia (AFM)

Az AFM szilárd felület morfológiájának nanométeres felbontású megjelenítésére alkalmas technika [Binnig, 1986; Birdi, 2003; Kutnyánszky, 2012]. Az általam használt készülék típusa Park Systems, XE-100 (Dél-Korea).



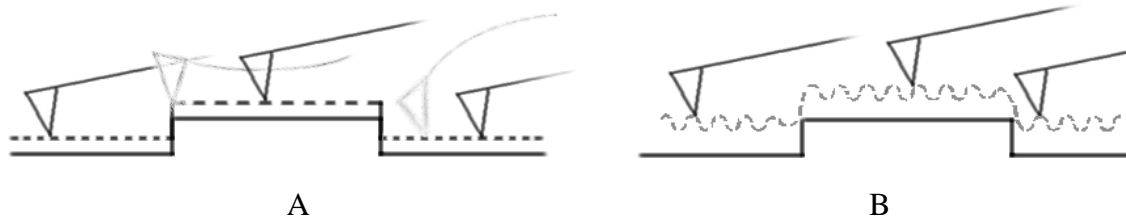
12. ábra A készülék vázlatja és valós képe

A készülék főbb részei:

- A laprugó, melynek minta felőli részén a kb. 10 nm görbületi sugarú, piramis alakú tű található, a hátoldalán pedig fényreflektáló alumínium bevonat. Az erre jutó lézerefény segítségével követhető a laprugó és így a tű mozgása.
- A reflektálódott fény a detektorba jut, ami egy 4 szegmensre osztott pozíció érzékeny fotodióda. Feladata, hogy a mechanikus mozgást elektromos jellel konvertálja.
- A visszacsatoló vagy segédrendszer, mely mérési módtól függően, a minta felületének lekövetésében, az erőhatások kompenzálásában játszik szerepet, jelentős befolyással lehet a mérési határokra, pontosságra.
- A piezo mozgató rendszer, mind a minta vízszintes, mind a tű függőleges irányú mozgatásáért felelős komplex rendszer. A fő egysége egy piezokristály, mely a ráadott feszültséggel arányos módon, 0,01 nanométeres pontossággal, fokozatmentesen, rendkívül gyorsan, jó ismételtetőséggel és nagy teherbírással változtatja méretét.

- Vezérlő/adatgyűjtő számítógépen keresztül a felhasználó adhatja meg a mérési utasításokat.

Az atomi erő mikroszkópia esetén 2 fő mérési módszert különítünk el, a kontakt (13/A. ábra) és a nem-kontakt (13/B. ábra) módot.



13. ábra A) Kontakt módú mérés B) Nem-Kontakt módú mérés sematikus ábrája

A kontakt mód esetén mechanikai kontaktus van a minta és a tű között. A készülék pásztázás közben az elmozdulásokat elektromos jellé alakítja, és ezt morfológiai képként jeleníti meg. Az általam használt állandó erejű kontakt módú mérés során a készülék egy visszacsatoló segédrendszerrel a tű és a minta közötti kölcsönhatási erőt tartja állandóan. A 13/A. ábrán a világos, meghajlott laprugók azt a pillanatot ábrázolják, melyben a felületi objektum magasságkülönbsége miatt változás áll be. A mérés során a visszacsatoló rendszer ezt az állapotot a piezo mozgatórendszer segítségével megszünteti, és a laprugót, ezáltal a tűt is, az eredeti terheltségi állapotába állítja vissza. Az eközben történt változások lesznek a felületi objektum magasságával arányos fizikai paraméterek. Az ábrán szereplő szaggatott vonallal a tű mozgási vonalát kívántam szemléltetni. E mérési típus nagy részletgazdagságú képet ad a jelentős morfológiai különbségekkel rendelkező mintáról. Fontos viszont szem előtt tartani, hogy a mechanikai kontaktus a mérés során roncsolhatja a puha mintákat. Ennek kiküszöbölésére alkalmazhatunk hosszabb, és ezáltal érzékenyebb laprugójú kontakt mérésre alkalmas tűket, vagy választhatjuk a más elven működő nem-kontakt mérési módot is.

A nem-kontakt mód esetén a laprugó a minta felett, de még kölcsönhatásban a felületen lévő molekulákkal, a sajátfrekvenciája közelében lévő frekvencián rezeg. A 13/B. ábrán a szaggatott vonal a tű mozgási vonalát szemlélteti. A mérés során a felületi objektum miatt változtatni kell a mozgási vonalon. Emiatt, mérési módtól függően,

vagy a mozgási amplitúdó [Binnig, 1986] vagy a frekvencia [Albrecht, 1991] fog megváltozni. A visszacsatoló rendszer ezt kompenzálja. A magasságtól függő elektronikai jelet rögzítjük, melyet a kiértékelő szoftver fog megfeleltetni a magasságértékkel. Az általam használt készülék esetében a laprugó amplitúdója széles skálán beállítható, így a szakirodalomból ismert Tapping[®] és True Non-contact[®] mód is használható. Míg a laprugó a Tapping[®] mód esetében néhánytól néhány száz nanométerig tartó tartományban lévő amplitúdóval rezeg, addig a True Non-contact[®] mód esetében ennek a tizedével. Ebből a különbségből adódik, hogy a Tapping[®] mód mozgási középvonala a mintától távolabb esik, mint a másik mód esetében, valamint érzékenyebb visszacsatolást tesz lehetővé a kisebb amplitúdójú True Non-contact[®] mód, vagyis még kevésbé roncsolhatja a mintát, még részletgazdagabb képet kapunk a mérés során [ParkAFM, 2015].

3. táblázat Méréseimhez használt laprugók (tűk) és jellemző paraméterei
[Mikromash, 2015]

Laprugó	Rezonancia frekvencia/	Rugó- állandó/	Hosszúság/	Szélesség/	Vastagság/
	kHz	N×m ⁻¹	μm	μm	μm
CSC38A	20	0,09	250	32,5	1,0
CSC38B	10	0,03	350	32,5	1,0
CSC38C	14	0,05	300	32,5	1,0
NSC36A	90	1	110	32,5	1,0
NSC36B	130	2	90	32,5	1,0
NSC36C	65	0,6	130	32,5	1,0
NSC15	325	40	125	30	4,0

Az atomi erő mikroszkópos mérésekből kapott információink egyrészt a minta vastagságértékei, másrészt a hordozók, a felületi filmek érdességadatai [Whitehouse, 2011; De, 2012].

Az érdességi adatok többféleképpen is megadhatók. A leggyakrabban használt érdességadat, az átlagos érdesség (*R_a*), mely a mérési középvonaltól való abszolút értékek átlagos eltérését mutatja (1. egyenlet).

Átlagos érdesség (*Roughness Average*):

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j|, \quad (1)$$

ahol N a mérési pontok száma, Z_j a középvonaltól való eltérés.

A négyzetes középérték hasonló az átlagos érdességhez, de a négyzetes tag miatt érzékenyebb a kiugró értékekre (2. egyenlet).

Négyzetes középérték (*Root Mean Square (RMS) Roughness*):

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N Z_j^2} \quad (2)$$

Végezetül az érdességmagasság az abszolút szélsőértékek alapján ad egy átlagértéket. Ezt összehasonlítva eldönthető, hogy a maximum vagy a minimum irányba és milyen mértékben találhatóak a szélsőértékek.

Érdességmagasság (*Average Maximum Height of the Profile*):

$$R_z = \frac{1}{10} \left(\sum_{j=1}^{10} H_j - \sum_{k=1}^{10} L_k \right), \quad (3)$$

ahol $\sum_{j=1}^{10} H_j$ a 10 legnagyobb mért érték összege, $\sum_{k=1}^{10} L_k$ a 10 legkisebb mért érték összege.

Az érdességadat átlagosan $<\pm 5\%$ pontossággal volt megadható. A mérések kiértékelését a XEI 1.6, 1.7, 1.8 (Park Systems, Dél-Korea) programokkal végeztem.

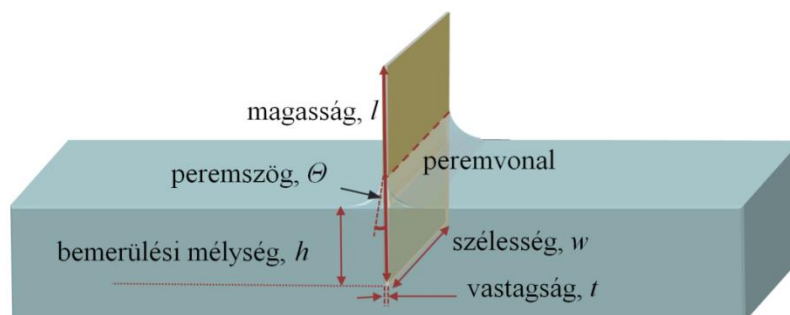
5.3. Langmuir-mérleges technika

A Langmuir-mérleg folyadékfelszínen lévő vékony molekularéteg előállítására és vizsgálására alkalmas eszköz. A Langmuir-mérleg fő egységei: egy sekély teflonkád, mozgatható POM (polioximetilén) gát, Wilhelmy-lemezes ($\pm 0,05 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ pontosságú) felületi feszültség mérő és elektronikai eszközökből áll. A Wilhelmy-lemezes felületi feszültség mérési módszer lényege, a mérendő folyadékba belemártunk egy erőmérőre függesztett szenzort. A lemezkére ható erő (F) a lemez súlyából, a felhajtóerőből és a nedvesedési feszültségből származik:

$$F = (\rho_P l w t) \times g - (\rho_L h w t) \times g + 2(t + w) \times \gamma_{L/V} \cos \theta \quad (4)$$

$$F = F_P - F_B + 2(t + w) \times \gamma_{L/V} \cos \theta, \quad (5)$$

ahol F_P a lemez súlya, ρ_P a lemez sűrűsége, l a lemez magassága, w a szélessége, t a vastagsága, g a nehézségi gyorsulás, F_B a lemezre ható felhajtóerő, ρ_L a folyadék sűrűsége, h a lemez a folyadékba merült részének a hossza, $\gamma_{L/V}$ a folyadék felületi feszültsége, θ a peremszög, valamint $2(t + w)$ a peremvonal hossza (14. ábra).



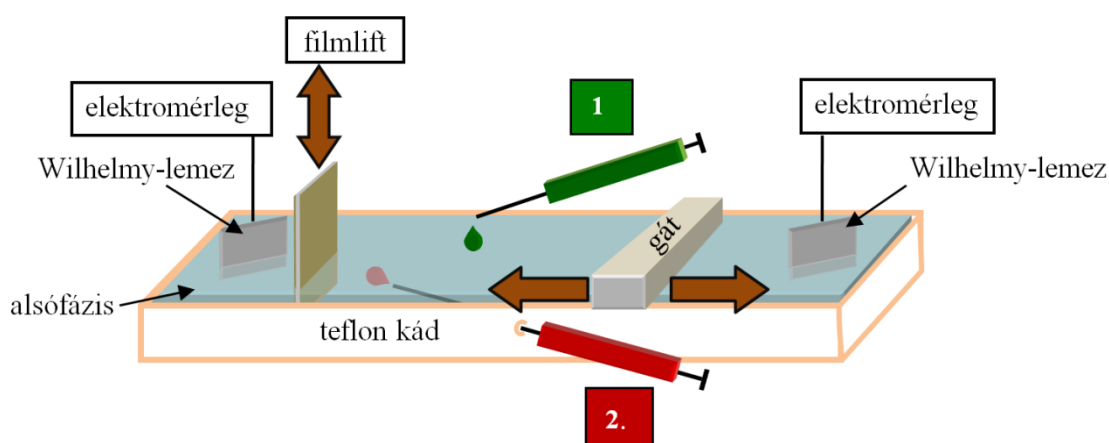
14. ábra Wilhelmy-lemezes felületi feszültség méréshez szükséges adatok

Mivel a lemez súlyára (F_P) tárazzuk a mérleget, és a 0 bemerítési mélységnél $F_B = 0$, csak az egyenlet harmadik tagjával kell számolnunk, amelyben a szenzor tökéletes nedvesedése miatt $\theta = 0^\circ$, így $\cos \theta = 1$.

$$F = 2(t + w) \times \gamma_{L/V} \quad (6)$$

Szenzorként a szokásos platina lemez helyett egyszer használatos Wilhelmy-lemezként szűrőpapír lapot (Whatman Chr1 kromatográfiás szűrőpapír) alkalmaztam. Ez nedvesedés után szintén 0° -os peremszöget mutat, így alkalmas a mérés elvégzéséhez.

A teflon kád és a POM gát tisztítása rutinszerűen metanollal és kétszer desztillált vízzel történt, melyeket egyes esetekben diklórometánnal történő tisztítás is kiegészített. A méréseket több, de állandó hőmérsékleten végeztem. A méréseimhez kétféle készüléket használtam. A KSV-Minimicro Langmuir-mérleget, mely két szimmetrikusan mozgó gátat és egy Wilhelmy-lemezes elektromérleget tartalmazó eszköz. Nagy előnye, hogy a teflon kád önállóan is termosztálható. A másik készülék házi tervezésű és gyártású (MTA, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet), melybe két NIMA ST9000 elektromérleg van beépítve. Ez a készülék egy gáttal üzemel, de a gát mindkét oldalán folyamatosan méri a felületi feszültséget (15. ábra).



15. ábra A Langmuir-mérleg két erőmérő és egy mozgatható gát összeállításban

A mérés kezdetén a teflon kádat feltöltöm az alsó fázissal (víz, puffer, stb.). Ekkor a gát segítségével a felületi szennyezőket tömörítem, és vízlégszivattyúval megtisztítom a folyadékfelszínt. Ezután az időközben termosztált alsófázis méréskész állapotba kerül. Ekkor meghatározom az alsó fázis felületi feszültségét. Végző lépésként különböző módon a felületre, vagy az alsó fázisba injektálok a vizsgált oldatot, és a gát segítségével tömörítem a felületi réteget. Eközben a gátpozíció, vagyis a folyadékfelszín területének függvényében detektálom az oldalnyomást (π), ami a tiszta alsó fázis felületi feszültsége (γ_0) és a filmmel borított területen mért felületi feszültség (γ) különbsége:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma, \quad (7)$$

5.3.1. Izoterma meghatározás

A méréshez alsó fázis felületére Hamilton fecskendővel (15. ábra 1. fecskendő) a vizsgált anyag alsófázisban nem oldódó, illékony oldószerével készített oldatát csepegtetem. Az oldószer elpárolgására 15 percet hagyok, mely után a gát folyamatos mozgásával ($v = 0,7683 \text{ \AA}^2 \times \text{molekula}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) felveszem az oldalnyomás-terület izotermákat. Mérésenként legalább háromszor ismétlem meg a komprimálási/expandálási ciklust.

5.3.2. Stabilitás-, illetve penetrációmérés

A méréshez alsó fázis felületére Hamilton fecskendővel (15. ábra 1. fecskendő) a vizsgált anyag oldatát csepegtetem. Az oldószer elpárolgását követően a gát mozgásával kialakítom az adott tömörségű filmet, amit az oldalnyomás értékével azonosítok.

A 'Stabilitásmérés' esetén a gát ezután már nem mozdul, és időben követem a film oldalnyomás változását 1 órán keresztül.

A 'Penetrációmérés' esetén a gát ugyancsak nem mozdul. 10 perc elteltével az alsó fázisba injektálok a vizsgált anyag alsó fázis anyagával készült oldatát (15. ábra 2. fecskendő), majd az oldalnyomás-változását 1 órán keresztül detektálom.

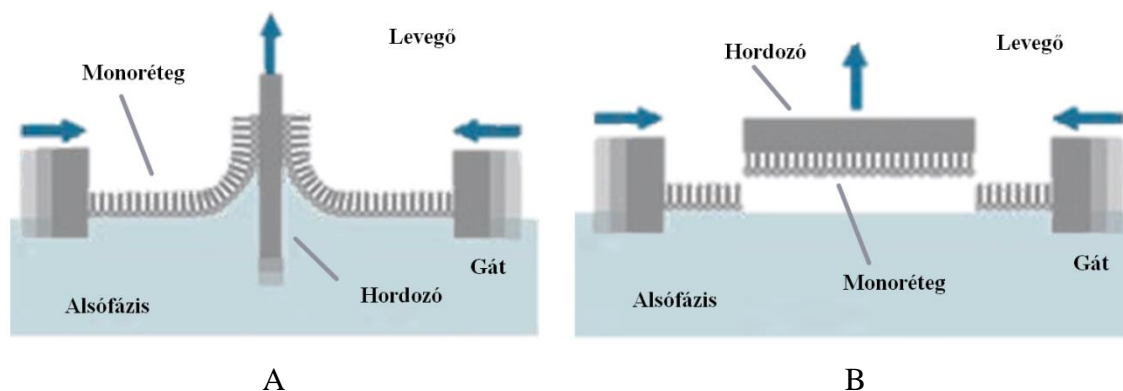
A penetráció mértékét ($\Delta\pi$) az alábbi módon adom meg:

$$\Delta\pi = \pi_{\text{lipid}+\text{hatóanyag}} - \pi_{\text{lipid}}, \quad (8)$$

ahol $\Delta\pi$ az oldalnyomás változás, $\pi_{\text{lipid}+\text{hatóanyag}}$ a penetrációmérés során felvett oldalnyomás érték, π_{lipid} a lipid stabilitás mérésekor felvett oldalnyomás érték.

5.3.3. Langmuir-Blodgett- (LB) és Langmuir-Schäffer- (LS) technika

A Langmuir-filmeket szilárd hordozóra kétféleképpen vihetjük át: Langmuir-Blodgett- (LB) (16/A. ábra), a Langmuir-Schäffer- (LS) (16/B. ábra) technikával.



16. ábra Langmuir-film szilárd hordozóra való átvitelének vázlatja Langmuir-Blodgett- (A) és Langmuir-Schäffer- (B) módszerrel [Biolinscientific,]

A módszerek segítségével sikerült muszkovit csillámra és üvegre átvinni a Langmuir-filmeket.

5.4. Kvarckristály mikromérleg (QCM)

A kvarckristály mikromérleg nagy pontosságú, tömegváltozás méréseket tesz lehetővé. A mérés lényege, hogy az érzékelő felületére rakódó, vagy onnan távozó anyagmennyiség hatására a kvarckristály rezgési frekvenciája megváltozik [Bácskai, 1991; Michielin, 1998; Edvardsson, 2009].

Anyagok adszorpcióját, ennek kinetikáját vákuumban, levegőn vagy folyadék közegben vizsgálhatjuk a kvarckristály mikromérleggel. Az általam használt QCM-200 (Stanford Research Systems, USA) készülék, egy 1 inch (25,4 mm) átmérőjű, AT-vágású, arany elektródos kvarckristály korongot használ szenzorként, melynek alapfrekvenciája 5 MHz (Inficon, Svájc). A mérések során a kristálynak mindig csak egy oldala érintkezett a mérendő környezettel, és a készülék az első rezgési felharmonikust mérte. A rögzített értékek a frekvencia és a mozgási ellenállás. Ezen

adatok felhasználásával, különböző modellek segítségével kiszámolhatjuk a felületen megkötődött anyag mennyiségét.

A disszipáció, a kristály terhelés hatására történő csillapított, harmonikus rezgéséről ad információt, más komplexebb készülék (Q-Sense E4, Svédország) közvetlenül megadja ezt az adatot. Az általam használt QCM-200 készülékkel mérhető mozgási ellenállást meg kell feleltetnünk a disszipáció értékének, melyet az alábbi egyenlet alapján tehetünk meg [Johannsmann, 1992]:

$$D = \frac{8Ae_{26}^2}{d_q^2 Z_q \pi} R_m, \quad (9)$$

$$Z_q = (\rho_q \mu_q)^{1/2} \quad (10)$$

ahol D a disszipáció, R_m a mozgási ellenállás, A a kristály érzékelő felülete, e_{26} a piezoelektromos együttható, d_q a kristály vastagsága, ρ_q a kvarc sűrűsége, μ_q a kvarc nyírási modulusa, Z_q az AT-vágású kvarckristály akusztikus impedanciája.

Kvarckristály mikromérleges méréseket a polipeptidek fizi-, illetve kemisorpciójának vizsgálatai során alkalmaztam. A méréseket termosztált, zárt folyadékcellában $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ hőmérsékleten végeztem. A közeg folyamatos áramoltatása mellett ($0,28 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$) stabil alapvonalat ($\pm 0,5 \text{ Hz} \times \text{min}^{-1}$) 50-60 perc után kaptam. Ezután 1-1 órás időközönként cseréltem az oldatokat a mérési típusnak megfelelően.

5.4.1. Sauerbrey-közelítés

Történetileg az első és ezáltal a legegyszerűbb közelítés a kristály felületén megkötődött anyag mennyiségére a Sauerbrey-közelítés [Sauerbrey, 1959]. Olyan korlátozó feltételezést tartalmaz, miszerint a rétegünk monomolekuláris és a környezet vákuum. Bár ez az elmélet gázok adszorpciójának vizsgálata során kiválóan működik, közelítésként általában QCM-mel történő mérés során meg szokás adni.

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{Z_q} \Delta m_f \quad (11)$$

$$\Delta m_f = \Delta d_f \rho_f, \quad (12)$$

ahol Δf a mért frekvenciaváltozás, f_0 a terhelés nélküli kristály rezonancia frekvencia, $\Delta m_f, \Delta d_f$ a film tömeg-, illetve rétegvastagság változása a filmentes kristályhoz képest, ρ_f a film sűrűsége.

A korlátozó feltevések miatt a film valódi rétegvastagsága és sűrűsége nem határozható meg a Sauerbrey-féle közelítésben. A közelítés továbbfejlesztéseiben a közeg és a viszkoelasztikus réteg sűrűségét és viszkozitását, valamint csak a réteg esetében az elaszticitást is figyelembe vevő modellek születtek.

5.4.2. Voinova-közelítés

A Voinova-modell az anyagi rendszer fizikai paraméterei felől közelítve építi fel rendszerét, mely Voight-féle viszkoelasztikus elemként tartalmazza a réteg reológiai tulajdonságát [Voinova, 1999; Voinova, 2015]. Kifejtve és átalakítva csak az első rezgési felharmonikusra, newtoni folyadék közegben és egyrétegű viszkoelasztikus adszorbeált rétegre a Voinova-közelítést az alábbi képletek adják meg:

A tiszta newtoni folyadék közegre:

$$\Delta f = -\frac{1}{2\pi\rho_q d_q} \sqrt{\eta_k \rho_k \pi f_0} \quad (13)$$

$$\Delta D = \frac{1}{\pi f_0 \rho_q d_q} \sqrt{\eta_k \rho_k \pi f_0} \quad (14)$$

A newtoni folyadék közegre és az egyrétegű viszkoelasztikus filmre:

$$\Delta f = -\frac{1}{2\pi\rho_q d_q} \left(\sqrt{\eta_k \rho_k \pi f_0} + d_f \rho_f 2\pi f_0 - 2d_f \eta_k \rho_k \pi f_0 \frac{\eta_f (2\pi f_0)^2}{\mu_f^2 + (2\pi f_0)^2 \eta_f^2} \right) \quad (15)$$

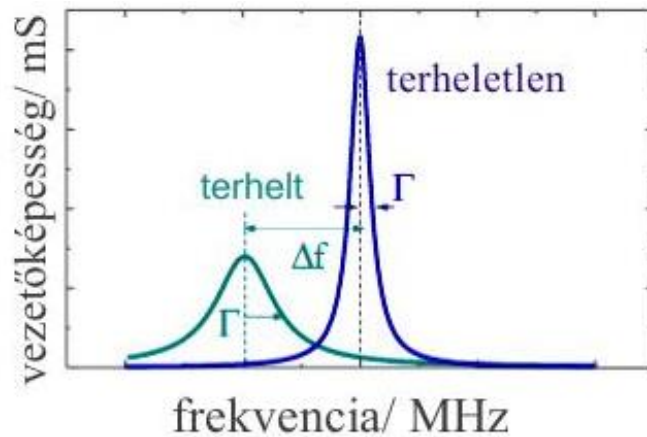
$$\Delta D = \frac{1}{\pi f_0 \rho_q d_q} \left(\sqrt{\eta_k \rho_k \pi f_0} + 2d_f \eta_k \rho_k \pi f_0 \frac{\mu_f 2\pi f_0}{\mu_f^2 + (2\pi f_0)^2 \eta_f^2} \right), \quad (16)$$

ahol Δf a mért frekvenciaváltozás, ΔD a mért mozgási ellenállásból számított disszipáció változás, f_0 a terhelés nélküli kristály rezonancia frekvencia, ρ_q a kvarc

sűrűsége, d_q a kristály vastagsága, $\eta_k \rho_k$ a közeg viszkozitása és sűrűsége, d_f a film vastagsága, μ_f a film nyírási modulusa.

5.4.3. Johannsmann-közelítés

Johannsmann a kvarckristály piezoelektromos leírását tartalmazó képleteket kívánta megfeleltetni az anyagi rendszer fizikai adatainak változásával. Eszerint komplex frekvencia változásként ($\Delta\tilde{f}$) kezeli a frekvencia (Δf) és a mozgási ellenállás (ΔR_m) változását [Martin, 1991; Johannsmann, 1992; Chagnard, 1996].



17. ábra A QCM mérés során fellépő frekvencia és amplitúdó változás

$$\Delta\tilde{f} = \Delta f + i\Delta\Gamma \quad (17)$$

$$\Gamma = R_m \frac{8Ae_{26}^2}{d_q^2} \frac{f}{2Z_q\pi} \quad (18)$$

ahol Γ a félértékszélesség, R_m a mozgási ellenállás, A az effektív terület a kristályon, e_{26} piezoelektromos koefficiens, d_q a kristály vastagsága, Z_q a AT-vágású kvarckristály akusztikus impedanciája.

Két állapot között az alap frekvenciára normált komplex frekvenciaváltozás a következő:

$$\frac{\Delta\tilde{f}}{f_0} = \frac{f - f_0}{f_0} + i \frac{4Ae_{26}^2}{d_q^2 Z_q \pi} \left(R_m \frac{f}{f_0} - R_0 \right), \quad (19)$$

ahol a terheletlen kristály frekvenciája f_0 és ellenállása R_0 .

Általános folyadék közegre a Kanazawa-Gordon egyenlet:

$$\frac{\Delta\tilde{f}}{f_0} = \frac{i}{\pi Z_q} Z_k \quad (20)$$

$$Z_k = \sqrt{i2\pi f_0 \eta_k \rho_k}, \quad (21)$$

ahol a közeg viszkozitása η_k , sűrűsége ρ_k , akusztikus imedanciája Z_k .

Newtoni folyadék esetén a viszkozitást csak az egyenlet valós része tartalmazza. Ily módon megkapjuk az eredeti Kanazawa-Gordon egyenletet [Kanazawa, 1985]:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\rho_k \eta_k}{\pi \rho_q \mu_q}} \quad (22)$$

A newtoni folyadék közegre és egyrétegű viszkoelasztikus filmre alkalmazott teljes egyenlet:

$$\frac{\Delta\tilde{f}}{f_0} = \frac{i}{\pi Z_q} \left[Z_k + i Z_f d_f k_f \left(1 - \frac{Z_k^2}{Z_f^2} \right) \right], \quad (23)$$

ahol a film vastagsága d_f , hullámszám k_f , és az akusztikus impedancia járuléka Z_f .

Sauerbrey-közelítés felhasználása a filmre:

$$Z_f d_f k_f \sim 2\pi f_0 d_f \rho_f \quad (24)$$

Sauerbrey-közelítés korrekciója vagyis a 'missing mass':

$$\text{korrekció} = \frac{2f_0 d_f \rho_f Z_k^2}{Z_q Z_f^2} \quad (25)$$

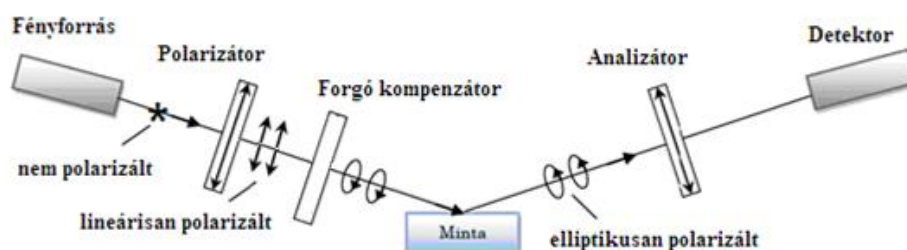
A Johannsmann-modell levezetése után newtoni folyadék közegre és viszkoelasztikus filmre a következő egyenletet kapjuk:

$$\frac{\Delta\tilde{f}}{f_0} = \frac{i}{\pi Z_q} \left[Z_k + i2\pi f_0 d_f \rho_f \left(1 - \frac{Z_k^2}{Z_f^2} \right) \right] \quad (26)$$

Tehát a 26. egyenlet a Kanazawa-Gordon tagból (közeg), a Sauerbrey-tagból (szilárd film) és a korrekciós tagból (viszkoelasztikus korrekció) áll.

5.5. Spektroszkópiai ellipszometria

Reflektáló hordozón található különböző törésmutatójú felületi rétegek spektroszkópiai ellipszometriával vizsgálhatóak.



18. ábra Spektroszkópiai ellipszométer felépítése

Az ellipszometria működési elve szerint, a fényforrásból érkező fényt polarizáljuk, majd a minta felületét elérve a különböző törésmutatójú közegek határfelületén a polarizáció megváltozik. Az ellipszometriával történő mérés során ebből a polarizációváltozásból tudjuk megmondani a filmek rétegvastagságát és komplex törésmutatóját [Tompkins, 2005; Petrik, 2011; Kiss, 2015]. A fény elektromos komplex térerősség vektora (E) a beesési síkkal párhuzamos (\vec{E}_p) és arra merőleges (\vec{E}_s) komplex térerősség vektorra bontható.

$$\vec{E}_s = E_s^0 e^{i(\omega t + \delta_s)} e^{-i\varpi \frac{\bar{n}}{c} r} \quad (27)$$

$$\vec{E}_p = E_p^0 e^{i(\omega t + \delta_p)} e^{-i\varpi \frac{\bar{n}}{c} r}, \quad (28)$$

ahol ϖ a síkhullám frekvenciája, δ a fázisa, $\bar{n} = n - ik$ a komplex közegbeli törésmutató, c a vákuumbeli fénysebesség és \vec{E}_s^0 és \vec{E}_p^0 az amplitúdót jelöli.

Ebből a polarizációs együttható, mellyel a síkhullám polarizációs állapotát jellemezhetjük:

$$\bar{\chi} = \frac{\bar{E}_p}{\bar{E}_s} \quad (29)$$

Mindezt felírva a beeső (i) és a visszavert (r) sugárra is, majd hányadost képezve, a teljes fénysugárról kapunk információt, melyet egy arányszámmal fejezhetünk ki, és komplex reflexiós együtthatónak ($\bar{\rho}$) nevezzük. Az együttható értéke megegyezik a Fresnel-reflexiós együtthatók hányadosával [Tompkins, 2005].

$$\bar{\rho} = \frac{\bar{\chi}_r}{\bar{\chi}_i} = \frac{\frac{\bar{E}_{r,p}}{\bar{E}_{r,s}}}{\frac{\bar{E}_{i,p}}{\bar{E}_{i,s}}} = \frac{\bar{E}_{r,p}}{\bar{E}_{i,p}} \cdot \frac{\bar{E}_{i,s}}{\bar{E}_{r,s}} = \frac{\bar{r}_p}{\bar{r}_s} \quad (30)$$

$$\bar{\rho} = \frac{\bar{\chi}_r}{\bar{\chi}_i} = \frac{|\bar{\chi}_r|}{|\bar{\chi}_i|} e^{i(\delta_r - \delta_i)} = \tan \Psi \times e^{i\Delta} \quad (31)$$

Tehát az amplitúdó változás:

$$\tan \Psi = \frac{|\bar{\chi}_r|}{|\bar{\chi}_i|} = \frac{|\bar{r}_p|}{|\bar{r}_s|} \quad (32)$$

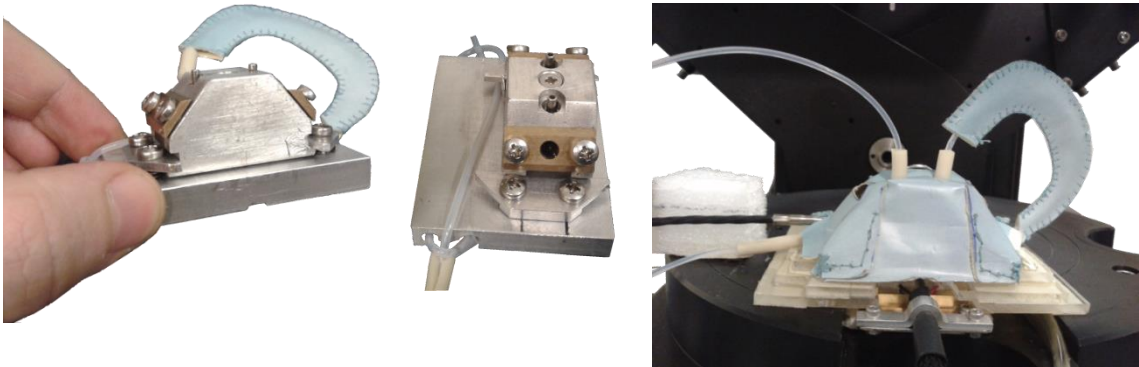
és a fáziseltolódás:

$$\begin{aligned} \Delta = \delta_r - \delta_i &= (\delta_{r,p} - \delta_{r,s}) - (\delta_{i,p} - \delta_{i,s}) = (\delta_{r,p} - \delta_{i,p}) - (\delta_{r,s} - \delta_{i,s}) \\ &= \Delta_p - \Delta_s \end{aligned} \quad (33)$$

A Ψ, Δ ellipszometriai szögek független, a mintára jellemező paraméterek, és a minta rétegvastagságára, komplex törésmutatójára, mikroszerkezetére következtethetünk belőlük. A mérések kiértékelését modellek segítségével, szoftveresen végeztem.

A mérésekhez az MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudomány Kutatóintézet Ellipszometria Laboratóriumának J. A. Woollam M-2000DI (J. A. Woollam Co., USA) spektroszkópiai ellipszométerét, az adatgyűjtéshez, kiértékeléshez CompleteEASE (J. A. Woollam Co., USA) programot használtam. A széles hullámhossz tartományú

(190-1700 nm) fényforrás valamint a többsatornás detektor alkalmassá teszi a készüléket folyadékkezelésben *in situ* mérések elvégzésére.



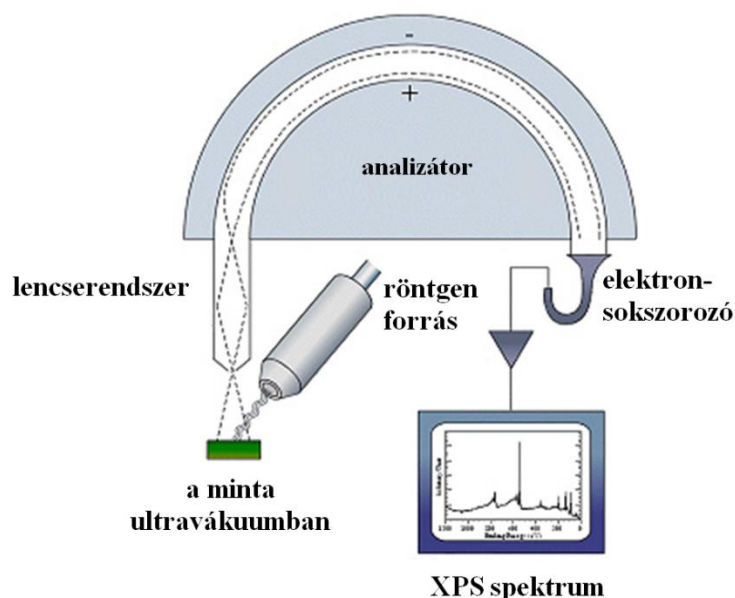
19. ábra A spektroszkópai ellipszométer folyadékcellája és a termosztálást biztosító eszközök fényképe

A készülékhez tartozó gyári kivetta méretei túl nagyok voltak, emiatt az Ellipszometriai Laboratórium munkatársaival közösen a folyadékcella fejlesztésébe fogtunk. Előzőleg a cellába helyezhető minta méretét sikerült $\frac{1}{3}$ -ára csökkenteni. Emellett a különböző hőmérsékleteken történő méréshez megoldottam a termosztálást is, melyet az alumínium burkolat piezoelemmel történő fűtésével, az egyenletes és stabil hőelosztást hűtőkörrrel valósítottam meg. A minta közvetlenül az áramló közeggel érintkezik, így a közeg termosztálását az alumínium talapzatba fűrt lyukakba fűzött csövekben történő áramoltatással sikerült kivitelezni (19. ábra).

Az ellipszometriai mérések adatgyűjtését és kiértékelését a CompleteEASE (J. A. Woollam Co., USA) programmal végeztem el.

5.6. Röntgen-fotoelektron spektroszkópia (XPS)

Adott vékony rétegek felületérzékeny kémiai analízisére szolgáló módszer a röntgen-fotoelektron spektroszkópia (XPS) [Bertóti, 2003].



20. ábra XPS készülék sematikus ábrája [Tampere, 2015]

A mérés során a minta felületét lágy, tipikusan 1486,6 eV (Al K_{α}), illetve 1253,6 eV (Mg K_{α}) energiájú röntgensugárral gerjesztik. A röntgenfotonok néhány mikrométerig hatolnak az anyagba, de az ionizáció hatására a távozó elektronok csak néhány molekula vastagságú rétegből tudják elhagyni a minta felületét. Emiatt az XPS mérést felületérzékeny technikának tekintjük. A mérés kezdetekor a mintát ultravákuumba helyezük, majd a megfelelő röntgensugárral ionizáljuk. Az ekkor kiszabaduló elektronokat az analizátoron és elektronsokszorozón keresztül vezetve detektáljuk. Az így kapott XPS spektrum az anyagból távozó elektronok energiáját, végső soron kötési energiáját tartalmazza. A kötési energia függ az anyagi minőségtől, az atom oxidációs állapotától és kémiai környezetétől. AZ XPS mérések pontossága <10%.

Ezeket a méréseket az MTA-TTK Anyagtudományi Intézetében lévő Kratos XSAM 800 készülékkel Dr. Bertóti Imre és Dr. Mohai Miklós együttműködésével végeztük.

6. Eredmények és kiértékelésük

6.1. Bioaktív polimerek felületi rétege szilárd hordozón

Felületi réteg kialakítására az MTA-ELTE Peptid Kémiai Kutatócsoportja által előállított polipeptideket használtam. A vizsgált peptidek gerincét egy polilizin lánc alkotta. A lizinek oldalláncán található primer aminon keresztül funkcionális csoportok kialakítására nyílt lehetőség. Az ilyen módon funkcionális polilizin származékokat vizsgáltam, melyek szerkezetét és előállítását a 4.5. fejezetben részleteztem. A jelen fejezetben az ott bevezetett jelöléseket használom. Az előzőleg megtisztított és szükség szerint kezelt szilárd felületen két eltérő módon, fizi- és kemisorpcióval rögzítettem a polimereket. A fizisorpció esetén a megkötődött mennyiséget az oldatkoncentráció függvényében vizsgáltam. A kemisorpció esetén két kémiai kapcsolási reakciót tanulmányoztam. Mindkettőhöz először APTES-sel kezeltem a SiO_2 felületet, ezáltal létrehozva egy új, funkcionális réteget. Az első esetben az így előállított primer-amin csoportokkal borított felülethez bifunkciós glutáraldehid segítségével kapcsoltam az amino csoporttal rendelkező poliaminosavat. A második esetben a kémiai rögzítést az amino felülethez glutársavanhidrid/ EDC reakció segítségével végeztem. Feltehető, hogy a felülethez több ponton kémiai kötést kialakító makromolekula stabilan, irreverzibilis módon kapcsolódik.

A felületek jellemzését az alábbi módszerekkel végeztem el:

- Röntgen-fotoelektron spektroszkópia (XPS)
 - A felületi réteg kémiai összetételének megállapítása.
- Atomi erő mikroszkópia (AFM)
 - Rétegvastagság mechanikai úton történő meghatározása (száraz réteg).
 - Részletes morfológiai kép a minta és a pásztázó tű közötti kölcsönhatás alapján.
 - A minta felületi érdességének meghatározása.

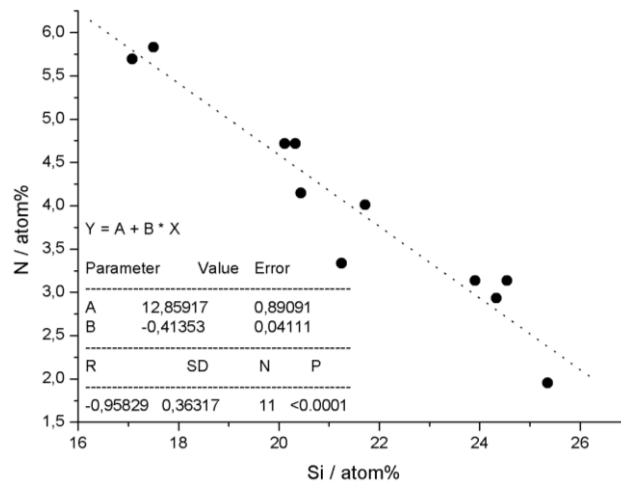
- Kvarckristály mikromérleges módszer (QCM)
 - Adszorpciós felületegységre eső tömeg meghatározása (nedves réteg).
 - Rétegvastagság meghatározása elektromechanikai adatok alapján (nedves réteg).

- Ellipszometria
 - Rétegvastagság optikai úton történő meghatározása különböző modellek segítségével (nedves réteg).

6.1.1. Röntgen-fotoelektron spektroszkópia (XPS)

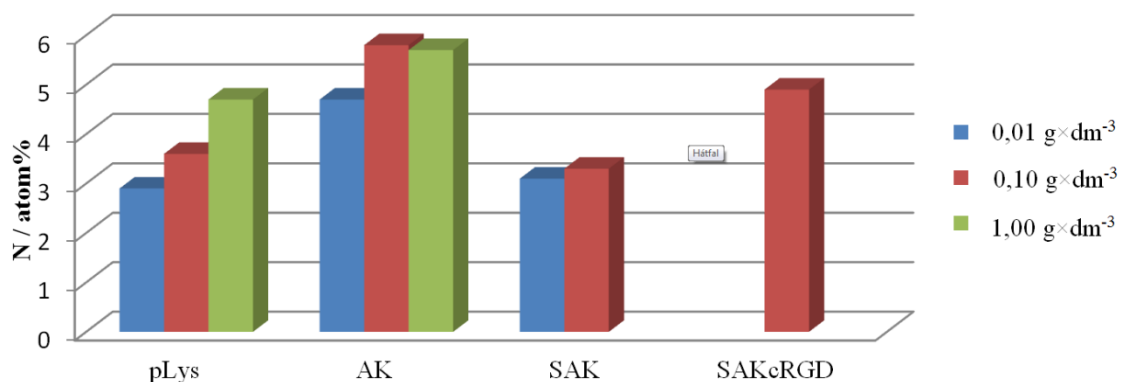
Az XPS segítségével a felületi réteg atomi összetételét tudjuk meghatározni. A szilárd hordozó – üveg és szilícium lapka esetén – szilíciumot és oxigént tartalmaz legnagyobb mennyiségben. Ezen fő elemekhez képest a polipeptid bevonatban új elemként szén és nitrogén, valamint nagyon kis mennyiségben kén jelenik meg. Az új, vagyis a polimert képviselő elemek közül a mennyiségi meghatározáshoz a nitrogént választottuk. Ennek jele a spektrumokban elegendően nagy (>1 N atom%) a kvantitatív értékeléshez. A szén jele is alkalmas lenne, de ezt kevésbé tekintik megbízhatónak az esetleges széntartalmú szennyeződések miatt, így ha van más lehetőség, mint a mi esetünkben a nitrogén jele, ez adja a kvantitatív analízis alapját.

A polipeptid bevonatok esetében az XPS által meghatározott nitrogén tartalom a felületi rétegben arányos a rögzített polipeptid mennyiségével. Mivel a felületet funkcionalizáló APTES által elenyésző mennyiségű nitrogént juttattunk a vizsgált mintára, így a mért nitrogén jel lényegében a polipeptid réteghez rendelhető. Üveg hordozó esetében az XPS által vizsgált réteg szilícium tartalma azt mutatja, milyen vastag rétegben fedi le a hordozót a polipeptid. Minél kisebb a Si atom%, annál nagyobb mennyiségű a polipeptid a felületen, hiszen szilíciumot csak a hordozó tartalmaz. Ez a korreláció jól érvényesül a fiziszorpciós mintáknál (21. ábra). A kémiai kapcsolás esetében más az összefüggés, hiszen ott a hordozó takarásához nem csak a polipeptid járul hozzá, hanem a kapcsoló vegyületek is.

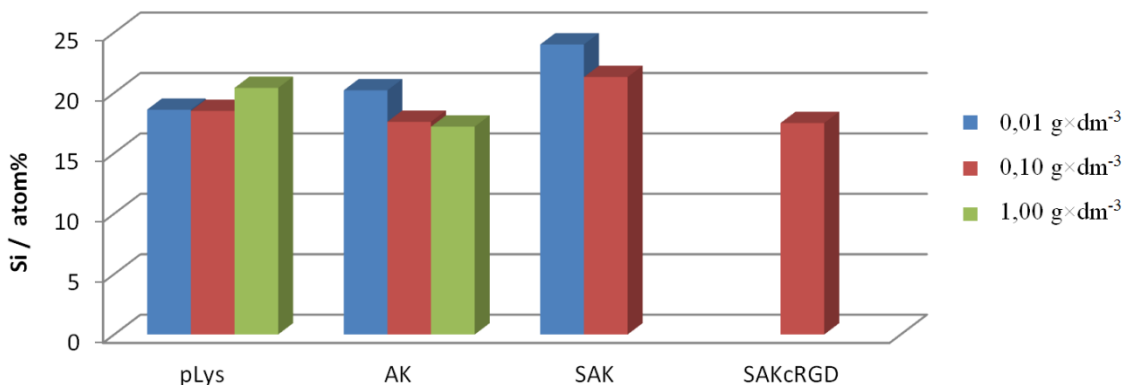


21. ábra Üveg felületre fiziszorpcióval rögzített polipeptid minták XPS méréséből kapott N és Si atom% értékek közötti összefüggés

A 21. ábrán bemutatott N és Si atom% értékek közötti összefüggés által igazolódott, hogy a filmünk azonos tendenciával mutatja a növekvő N és csökkenő Si jelét. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a minta egyenletesen fedett a kialakított polimer réteggel. A felületi réteg kialakításához szükséges és elégséges koncentráció meghatározást XPS-sel követtem pLys, AK, SAK esetében. A vizsgálatok korai fázisában a jelentős anyagigényt figyelembe véve nem dolgoztam a SAKcRGD célvegyülettel. Ennek felületi immobilizálására akkor került sor, amikor a többi anyaggal végzett vizsgálatok alapján kialakultak az optimális kapcsolási körülmények.



22. ábra A fiziszorpcióval üveg felületen előállított polipeptid rétegek XPS-sel meghatározott nitrogén tartalma (N atom%) az oldatbeli koncentráció függvényében

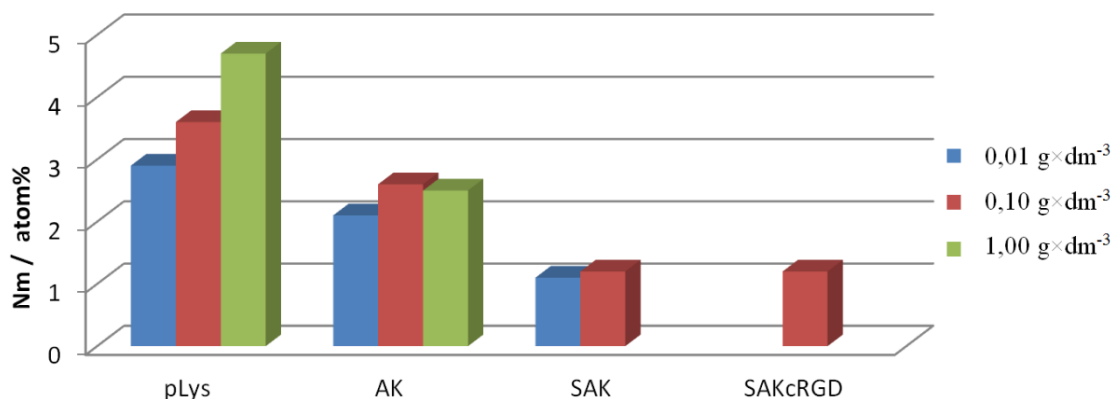


23. ábra A fiziszorpcióval üveg felületen előállított polipeptid rétegek XPS-sel meghatározott szilícium tartalma (Si atom%) az oldatbeli koncentráció függvényében

A 23. ábrán látható, hogy jelentős eltérések nem figyelhetőek meg a különböző koncentrációjú oldatból történő adszorpció esetén. Ennek alapján kismértékű fölösleget a 0,1 g×dm⁻³ koncentrációjú oldattal kívántam megvalósítani, hiszen hasonló mennyiségű, fiziszorpció által kötött polipeptidet eredményezett a felületen, mint a 10x töményebb oldat, de kevesebb anyagfelesleggel. Ennek a megfigyelésnek az eredményét már a SAK adszorpciója során is alkalmaztam, így az 1,00 g×dm⁻³ oldattal nem végeztem el a SAK adszorpció vizsgálatát. A vizsgált polipeptidek molekulánként, illetve monomeregységenként eltérő számú nitrogén atomot tartalmaztak (4. táblázat). Ez alapján célszerű az XPS mérésekből nyert N atom% értékeket Lys egységek nitrogén tartalmára normálni, miáltal a molekuláris borítottsággal arányos mennyiséget kapunk. Ezeket az adatokat tüntettem fel a 24. ábrán.

4. táblázat Különböző polipeptidek monomerjeinek nitrogén tartalma

	p-Lys	AK	SAK	SAKcRGD
N/monomer	2,0	4,5	5,5	8,0



24. ábra A fiziszorpcióval üveg felületen előállított polipeptid rétegek XPS-sel meghatározott, a monomeregységek nitrogéntartalmával normált nitrogén tartalma (N_m atom%) az oldatbeli koncentráció függvényében

A 24. ábrán megfigyelve megállapíthatjuk, hogy míg a pLys nagy mennyiségben adszorbeálódik a felületen, addig az oldalláncainak módosításával előállított polipeptidok egyre kisebb mértékben kötődnek fiziszorpcióval a felülethez. Ez feltehetően arra utal, hogy a kationos polipeptidek megkötődésében fontos szerepe van az elektrosztatikus kölcsönhatásnak. Mivel a töltéssűrűség a polilizinben a legnagyobb, ez kötődik a legnagyobb mértékben.

A kemiszorpció esetében használt polipeptid koncentráció a már előzőleg meghatározott $0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ volt, összhangban a fiziszorpciónál használttal. A polipeptid filmek XPS méréseinek eredményét a háromféle előállításra összehasonlítva az **Hiba! A hivatkozási forrás nem található.** 5. táblázat mutatja. Mindkét kémiai reakció során, melyekben a polipeptideket kovalens kötéssel rögzítjük a felülethez, nagyobb nitrogén tartalmú film alakul ki, mint a fiziszorpció által. A kétféle kémiai kapcsolásnak hasonló eredménye volt a felületi polipeptid mennyiségét tekintve. Ugyanakkor a glutársavanhidriddel végzett reakció megbízhatóbb reakciótípus. Míg a glutáraldehid alkalmazásakor nagy a veszélye annak, hogy az esetleg fölöslegben maradt aldehid a felülettől függetlenül keresztkötéseket alakít ki a polimerrel, addig a savanhidrid/EDC kapcsolásban ez a reakció nem valósul meg. Ezért és az XPS által mutatott nagyobb felületi borítottság miatt a későbbiekben csak az savanhidrid/EDC reakciót használtam a kemiszorpció kivitelezéséhez.

5. táblázat Üveg felületen fizi-, illetve kemisorpcióval rögzített polipeptid filmek XPS analízisének eredménye ($c= 0,1 \text{ g}\times\text{dm}^{-3}$)

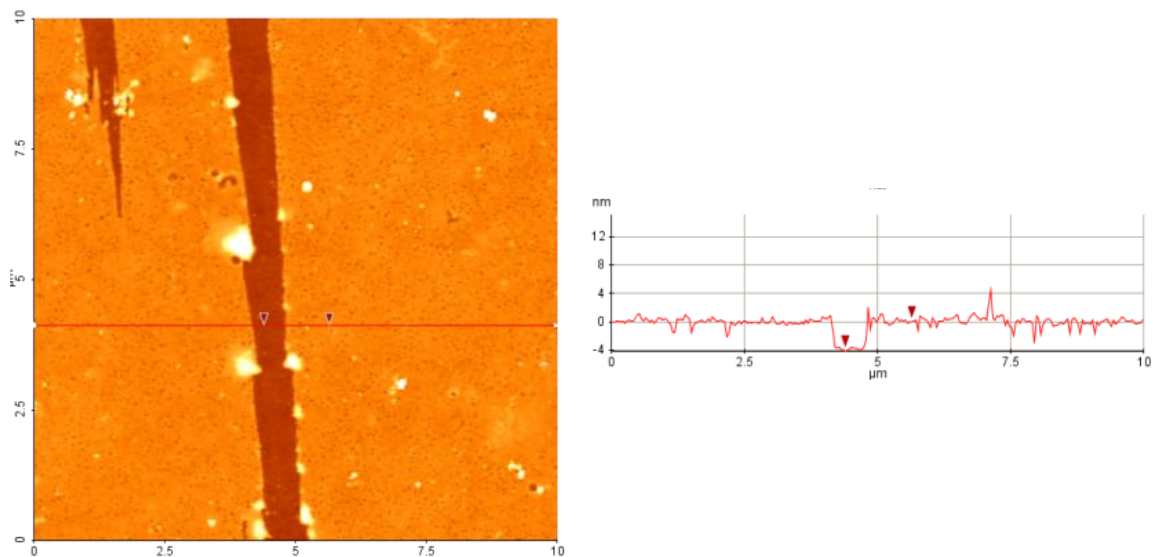
Hordozó: üveg	Fizisorpció	Kémiai kapcsolat (glutáraldehid)	Kémiai kapcsolat (glutársavanhidrid)
Polipeptid	N atom%	N atom%	N atom%
pLys	3,6	6,1	4,0
AK	5,8	7,1	9,5
SAK	3,3	9,5	10,3
SAKcRGD	5,0	-	13,3

A megfelelő koncentráció és reakciótípus kiválasztása után a SAKcRGD-vel is előállítottam a megfelelő mintákat, melyek XPS analíziséből kapott eredményeket szintén 5. táblázatban tüntettem fel.

6.1.2. Atomi erő mikroszkópia (AFM)

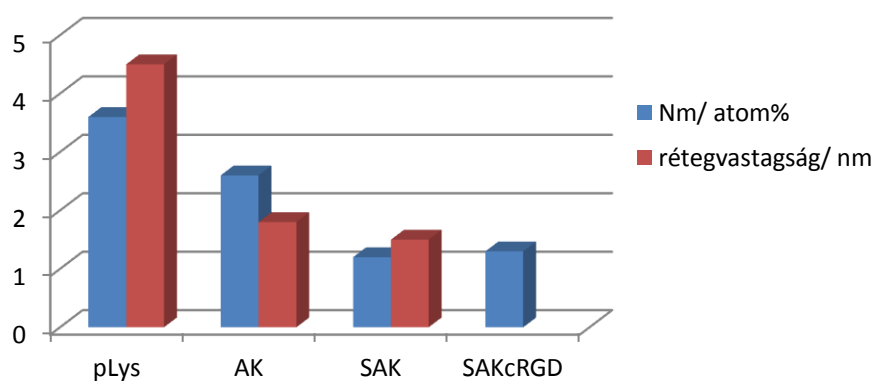
Az atomi erő mikroszkópot a hordozófelületen létrehozott polipeptid filmek vizuális jellemzésére, a rétegvastagság meghatározására használtam. A légszáraz filmek vizsgálata során mért vastagságok a filmek folyadéktartalmából adódó hasonlóság miatt összehasonlíthatóak. Emiatt az AFM-es méréseket száraz filmekben, CSC38-as tüvel 'Soft Contact' módban hajtottam végre.

A film rétegvastagságának meghatározási módját a SAKcRGD példáján mutatom be. Ehhez jól definiált, reprodukálható módon karcot ejtettem a felületen, majd ezen a helyen pásztázva a felületet AFM képet készítettem a mintáról, amint az a 25. ábrán látható. A keresztmetszeti profil görbéről leolvasható a lépcső, vagyis a film vastagsága.

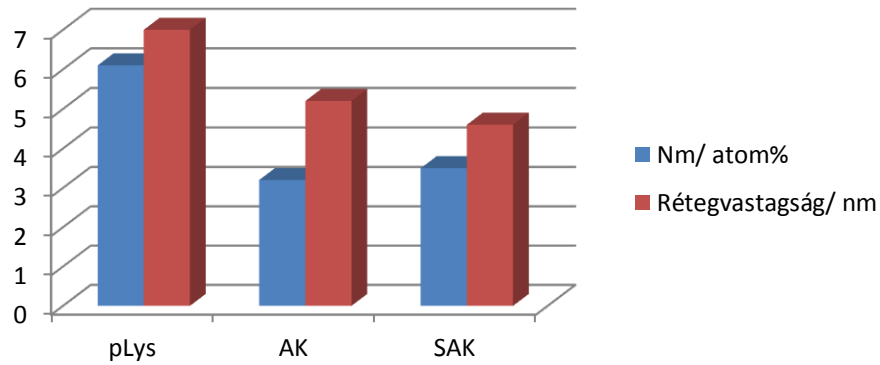


25. ábra A SAKcRGD film vastagságának meghatározása a karc képének AFM felvételén

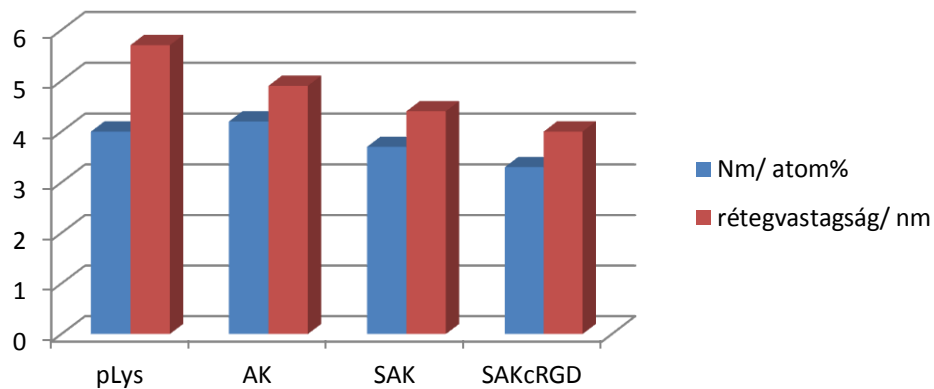
Az atomi erő mikroszkóppal 3 különböző helyen elvégzett rétegvastagság mérés átlag értékeit ($\pm 0,5$ nm) a 26-28. ábrán foglaltam össze. Emellett feltüntettem az XPS adatokból származó nitrogén atom%-ot is, mely a normált egységekre vonatkozik, és a filmet alkotó polimer mennyiségével arányos.



26. ábra A fiziszorpcióval előállított filmek N_m atom% és rétegvastagság/ nm értékei



27. ábra A kemisorpcióval (glutáraldehid) előállított filmek N_m atom% és rétegvastagság/ nm értékei



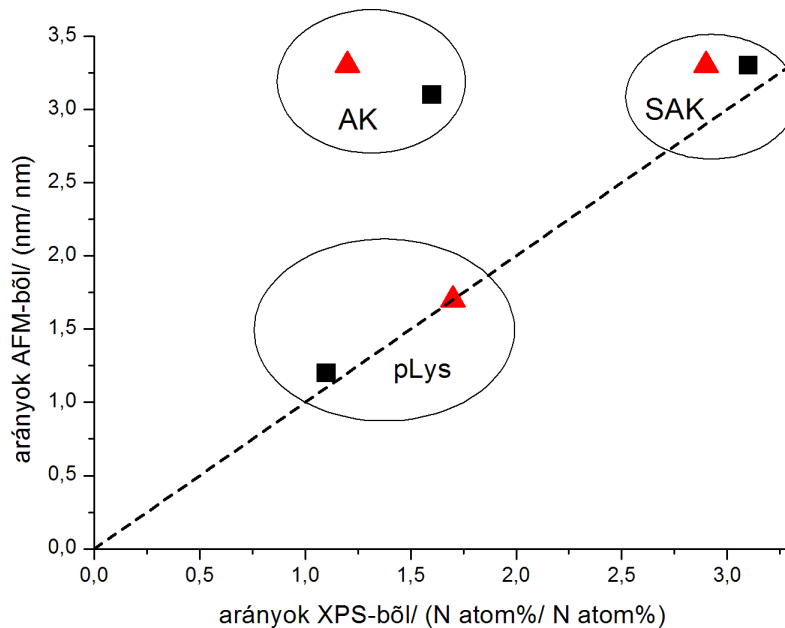
28. ábra A kemisorpcióval (glutársavanhidrid/EDC) előállított filmek N_m atom% és rétegvastagság/ nm értékei

Az AFM mérések mindhárom szorpciós módszer esetében a teljes minta felületén hasonló vastagság-értékeket mutattak, így megállapíthatjuk, hogy a polipeptid rétegek egyenletesen borítják be a hordozót. A rétegvastagságok 1,5 és 4,5 nm közöttiek a fizisorpcióval, míg 4 és 7 nm közöttiek a kemisorpcióval képzett polipeptid filmekben. A rétegvastagság-értékek alakulása megerősíti az XPS eredmények által mutatott tendenciát. Fizisorpcióval kevesebb polipeptid volt rögzíthető, mint kemisorpcióval. Ez összhangban van az adott minták esetén az AFM-mel mért kb. kétszeres vastagsággal.

Ezen túl a különböző összetételű polipeptid rétegek vastagsága is hasonló tendenciát mutat, mint az XPS-sel mért N_m atom% értékek. Fizisorpció esetén a molekula töltéssűrűségének csökkentése jelentősen mérsékli a megkötött mennyiséget, és ez mindkét mérésből hasonlóan látszik. Ugyanakkor az is egyértelmű, hogy ennek a kémiai

kapcsolások esetében kisebb a jelentősége. A csökkenő tendencia a pLys > AK > SAK irányában érvényesül, de a különbség mértéke, különösen a glutársavanhidrid/EDC reakció alkalmazásakor nem haladja meg a 15-20%-ot.

A kemisorpció és a fizisorpció összehasonlításához jó lehetőséget biztosít az XPS által mért N atom% és az AFM által mért rétegvastagságok ábrázolására kemisorpció:fizisorpció arányok képzése mellett (29. ábra).

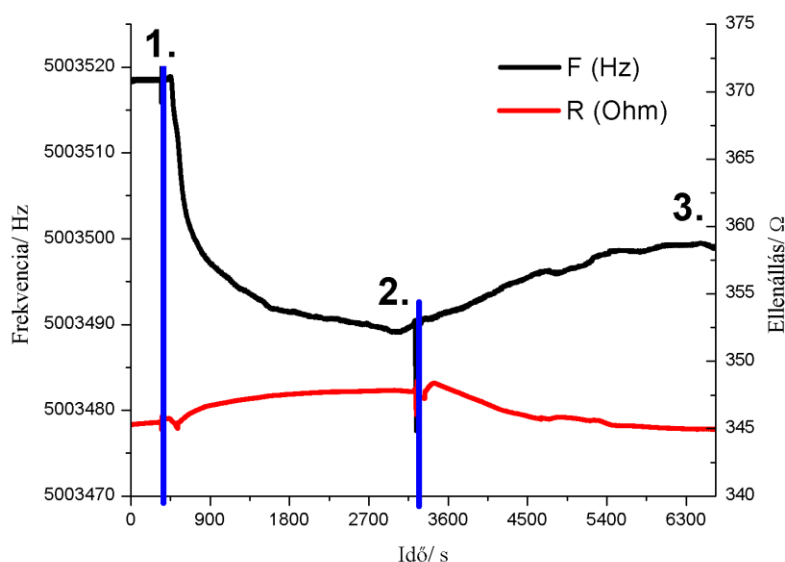


29. ábra Az AFM és XPS mérésekből származó filmvastagság és nitrogén tartalom arányok ábrázolása, ahol glutáraldehid: fizisorpció (■), glutársavanhidrid/EDC: fizisorpció (▲), $y=x$ függvény (szaggatott vonal)

A pLys és SAK rétegek estében azt mondhatjuk, hogy az XPS N atom%-ból számított arányok megközelítőleg megegyeznek az AFM rétegvastagság mérésből számított arányokkal. Ebből az következik, hogy a felületi réteg szerkezete hasonló a két polipeptid esetében. Emellett az összes ábrázolt arány >1 , vagyis a kemisorpció esetén több anyagot sikerült a felszínen megkötni, mint fizisorpcióval. Ez a SAK polipeptidre különösen igaz, hiszen itt az arányszámok 3 körüliek. Az AK esetében a megkötött mennyiség az XPS N atom% arány alapján 1-1,5 értéket mutat, de emellett a rétegvastagságból származó arány 3 körüli, vagyis ebben az esetben egy lazább szerkezetű réteget kaptam.

6.1.3. Kvarckristály mikromérleges mérések (QCM)

A QCM készülék segítségével *in situ*, folyadékkal érintkezésben tanulmányozhattam a polipeptid filmek kialakulását a szilárd hordozón. Mivel az általam használt adszorpció, kemisorpció szobahőmérsékleten zajló folyamat, a kvarckristály mikromérleges méréseket is 24°C-on végeztem el. A készülék jó közelítéssel a felületen megkötött molekulák okozta tömegváltozást mérve adott rögzített környezeti változók esetén, ezért a modellek segítségével felületegységre vonatkozó tömegváltozást tudok számítani.



30. ábra A pLys PBS-ben történő adszorpciójának QCM mérése (1) alapvonal, (2) polipeptid adszorpciója, (3) pufferrel történő öblítés

A QCM mérés során frekvenciát (F) és ellenállást (R) tudok rögzíteni. A 30. ábra első szakasza a mérés azon részét mutatja, amikor a kvarckristály már a közeg által csillapított frekvenciával és ellenállással rezeg. Ebben az állapotban még egyéb hatás nem éri, ezért ezt terhelésmentes alapvonalnak nevezzük, ami eltér a levegőn mért sajátfrekvenciától. A második szakasz a polipeptid adszorpcióját mutatja. A harmadik szakasz a pufferrel történő öblítés során kialakult frekvencia és ellenállás értékeket mutatja.

A polipeptid molekulákról feltételezhető, hogy az adszorpció során olyan laza szerkezetben kötődnek a felületen, hogy a réteg mind viszkózus, mind elasztikus tulajdonsággal rendelkezik. A méréseket az irodalomból ismert három modell szerint értékeltem ki. A Sauerbrey-féle, kronológiailag az első QCM mérések kiértékelésére szolgáló modell, mely a frekvencia változást a kristályon megkötődött merev filmmel felületegységre jutó tömegnövekedésével azonosítja. Mivel merev rétegnek tekinti a filmet, se a közeg, se a film viszkoelasztikus tulajdonságait nem veszi figyelembe. Ezzel szemben a Voinova- és a Johannsmann-modellek a frekvencia és disszipáció mért értékeit három tag változásával azonosítják. Tehát figyelembe veszik a közeg tulajdonságait, a merev film tömegét (Sauerbrey-tömeg) és a viszkoelasztikus korrekciós tagot.

Amennyiben mind a három modell hasonló eredményt ad, úgy a közeg és a korrekciós tagok elhanyagolhatók, vagyis a polipeptid rétegek viszkoelasztikus tulajdonságokat kevésbé mutatnak.

6. táblázat A fiziszorpció végén, valamint zárójelben a pufferes mosás után adódó felületi koncentráció értékek

modell	pLys ($c/ng \times mm^{-2}$)	AK ($c/ng \times mm^{-2}$)	SAK ($c/ng \times mm^{-2}$)	SAKcRGD ($c/ng \times mm^{-2}$)
Sauerbrey	5,2 (3,4)	3,0 (2,8)	3,2 (2,7)	6,9 (6,5)
Voinova	6,0 (4,1)	3,9 (3,4)	3,9 (3,7)	7,4 (6,9)
Johannsmann	5,5 (3,4)	3,0 (2,8)	3,2 (2,9)	7,2 (6,7)

A 6. táblázat adatait megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy bár a rétegünk nem egy szorosan illeszkedő, merev unimolekulás réteg, mégis csak kis eltérés mutatkozik a viszkoelasztikus modellek felhasználásával számított értékekben a Sauerbrey-modellhez képest. A pufferes mosás a pLys-n rétegen kívül a többi réteget alig változtatta, mely erős, stabil adszorpciót feltételez. A SAKcRGD esetében 3 különböző kémhatású pufferben is megvizsgáltam az adszorpciót. Citrát pufferben (pH= 6,0), PBS (pH= 7,4) valamint borát pufferben (pH= 8,0).

7. táblázat SAKcRGD fiziszorpció végén mérhető, valamint zárójelben az adott pufferrel történő mosás utáni értékek

modell	pH= 6,0 (c/ng×mm⁻²)	pH= 7,4 (c/ng×mm⁻²)	pH= 8,0 (c/ng×mm⁻²)
Sauerbrey	4,6 (3,8)	6,9 (6,5)	1,8 (1,9)
Voinova	4,8 (3,9)	7,4 (6,9)	2,1 (2,2)
Johannsmann	4,6 (3,8)	7,2 (6,7)	1,8 (1,9)

Ahogy a 7. táblázatból is látszik, a pH= 8,0-es borát pufferben csekély mértékű volt az adszorpció, míg a legnagyobb tömegváltozás a pH= 7,4-es PBS-ben mutatkozott felületegységenként. Mivel a Voinova-modell alkalmas a felületegységre jutó tömeg meghatározásán kívül a rétegvastagság meghatározására is, így a modellből számított rétegvastagság értékeket a 8. és a 9. táblázatban hasonlítottam össze.

8. táblázat Polipeptidek fiziszorpciója végén, és a PBS pufferes öblítés után mérhető rétegvastagság a Voinova-modell alapján

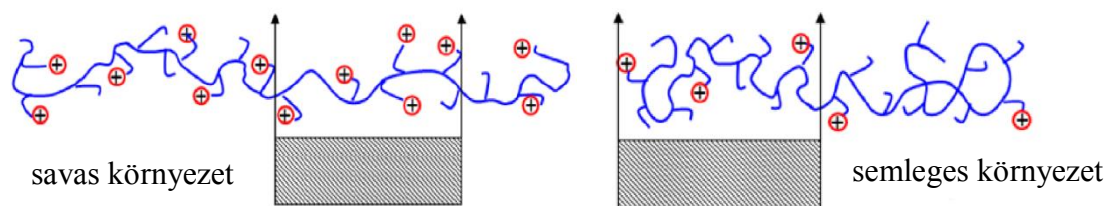
modell	pLys (nm)	AK (nm)	SAK (nm)	SAKcRGD (nm)
Voinova	5,1 (3,4)	3,2 (2,9)	3,5 (3,3)	6,5 (6,1)

9. táblázat SAKcRGD fiziszorpciója végén, és adott pufferrel való öblítés után mérhető rétegvastagság a Voinova-modell alapján

modell	Citrát puffer (nm)	PBS (nm)	Borát puffer (nm)
Voinova	4,2 (3,4)	6,5 (6,14)	1,8 (2,0)

A polimer összetételt tekintve feltűnő a PBS-ből adszorbeálódó SAKcRGD nagy felületi koncentrációja és a 6 nm körüli rétegvastagsága.

Bár az összehasonlítás csak 3 különböző kémhatású pufferben történt, mégis a kirajzolódó pH függés arra utal, hogy a polimer töltéssűrűségének és oldatbeli konformációjának együttes hatása érvényesül. A poláris felületen való fiziszorpcióhoz nyilván hozzájárul a disszociálható csoportok töltésállapota. Legkisebb az adszorpció mennyisége és a rétegvastagság a lúgos közegben a kis töltéssűrűség miatt. Ebből az következne, hogy csökkenő pH-val nő az adszorbeált mennyiség. Ez ellen hat, hogy nagy töltéssűrűségnél a molekula megnyúltabb lesz, és így a felületegységre jutó adszorbeált mennyiség csökken a legkisebb vizsgált pH esetében (31. ábra).



31. ábra Polikationos polimer adszorpció pH függésének sematikus ábrája

A kemiszorpció vizsgálata QCM készülékben bonyolultabb, hiszen a kristály felületén kellene a kémiai reakciót végrehajtani. Ez a cellában nem lehetséges, de az előre elkészített réteg vizsgálható oly módon, hogy a folyamat során kialakuló réteget először légszárazra kell szárítani, majd a QCM készülékben az adott pufferrel hidratálni. Ennek az eljárásnak az az előnye, hogy az egyéb vizsgálatra készített mintákkal azonos módon készül, hátránya viszont, hogy csak egy értéket, a hidratálás utáni értéket tudjuk meghatározni. Ez viszont a fiziszorpció utáni öblített és a kemiszorpció utáni hidratált réteg összehasonlítására kiválóan alkalmas. A 10. táblázatban a kemiszorpcióval előállított polimer filmekre kapott értékeket hasonlítottam össze.

A különböző modellekkel számított felületi koncentráció értékek hasonlóak, nincs lényeges eltérés, ami ugyancsak azt mutatja, hogy a polipeptid rétegek kemiszorpció esetében is megfelelően leírhatóak a merev filmet feltételező összefüggéssel. Feltűnő, és a fiziszorpcióval képzett rétegekhez hasonló, hogy a kémiailag kapcsolt SAKcRGD lényegesen vastagabb, mint a pLys film. A fiziszorpcióval és kemiszorpcióval a felületre rögzített SAKcRGD felületi koncentrációja $7 \text{ ng} \times \text{mm}^{-2}$, míg pLys esetében ez jóval kisebb, $2\text{-}3 \text{ ng} \times \text{mm}^{-2}$.

10. táblázat A kemisorpció végén adódó felületi koncentráció értékek

modell	pLys ($c/ng \times mm^{-2}$)	SAKcRGD ($c/ng \times mm^{-2}$)
Sauerbrey	2,5	7,1
Voinova	2,9	7,8
Johannsmann	2,5	7,2

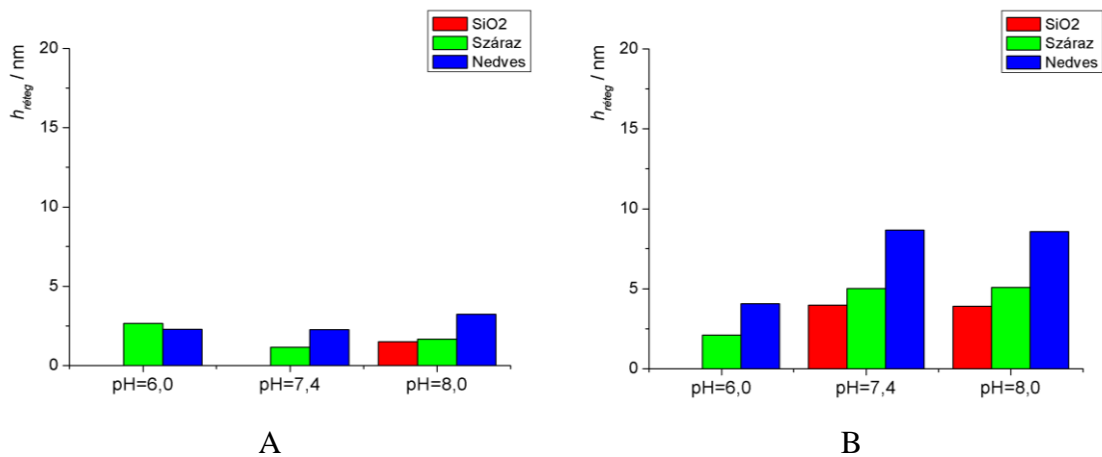
Összefoglalva a felületi polipeptid filmek nedves állapotban, QCM-mel végzett vizsgálatát, azt mondhatjuk, a tanulmányozott 4 polipeptid közül mindkét szorpciós folyamatban a SAKcRGD kötődött a felülethez a legnagyobb mértékben, mely 5-10 nm-es vastagságú réteget alakított ki. A legnagyobb mértékben a pH= 7,4-es (PBS) közegben végzett fizisorpció során, valamint a kémiai kapcsolással kötődött a SAKcRGD. A pufferes öblítés hatására a fizisorbeálódott peptidek a felületről nem, vagy csak kis mértékben (<10%) távoztak. Ezalól kivétel a pLys, amelynek az öblítési folyamatban 30%-nál nagyobb mennyisége távozott. Ezzel párhuzamosan alakul a rétegvastagság is. A SAKcRGD-re 6 nm körüli érték a „stabilan kötött” rétegvastagság, míg a többi polipeptidre ez közelítőleg 3 nm. Jellegzetes az is, hogy a SAKcRGD adszorpciója pH optimumot mutat. 7,4-es pH-nál a legnagyobb a kötött mennyiség, míg ennél savasabb, vagy lúgosabb közegben lényegesen kisebb.

6.1.4. Ellipszometria

Az ellipszometriai mérések során a helyes kiértékelés végett precíz termosztálásra volt szükség. A biológiailag releváns 36°C-os folyadék környezetet csak ebben a készülékben tudtam megvalósítani. A pontos kiértékeléshez a készülék által mért optikai paraméterek segítségével meg kellett határoznom a pufferek és a különböző rétegek törésmutatóját. Ezen adatok birtokában meg tudtam határozni a filmek rétegvastagságát. Háromféle, a rétegre vonatkozó törésmutató kiválasztási koncepcióm volt:

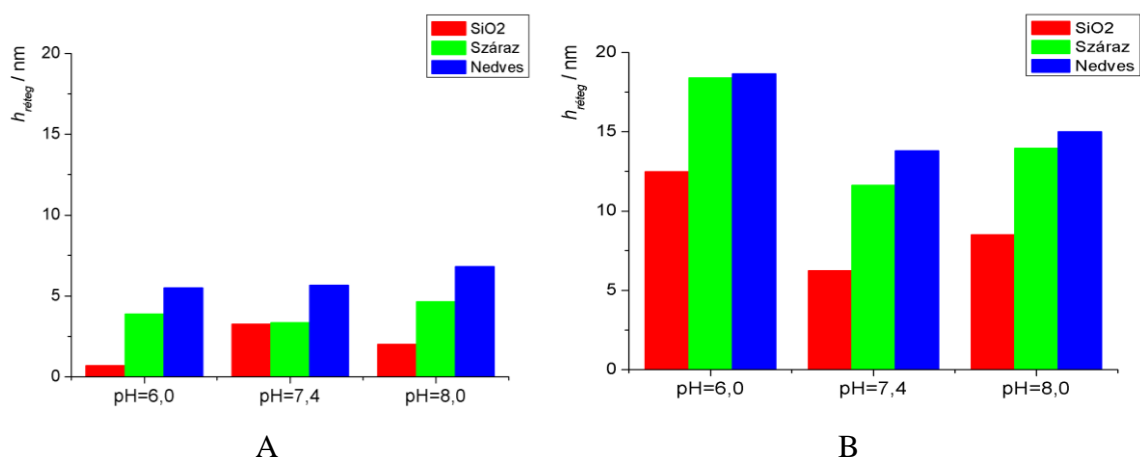
- SiO₂ réteg kiterjesztésének tekintem a polipeptid réteget, így a hordozó adatait használtam a kiértékelés során (SiO₂).

- Száraz állapotban határoztam meg a peptid réteg optikai paramétereit és ezt használtam az adszorbeált réteg kiértékelése során (Szárász).
- A kiértékelés során az optikai paramétereiket és a rétegvastagságot egyszerre illesztettem a mért értékekre (Nedves).



32. ábra A fiziszorpcióval A), illetve kemiszorpcióval B) előállított pLys réteg ellipszometriával meghatározott vastagság (h) adatai 36°C-on

A 32. ábrán polilizin polipeptid felületi megkötődését vizsgálva megállapíthatjuk, hogy fiziszorpció során kialakult rétegvastagság különböző kémhatású pufferek hatására 2-2,5 nm a peptidfilm vastagsága. A kemiszorpciót követően a citrát puffer (pH= 6,0) esetében kis rétegvastagság változást, de a PBS (pH= 7,4) és a borát puffer (pH= 8,0) esetében már jelentősen megvastagodott réteget figyelhetünk meg (5-7,5 nm).



33. ábra A fiziszorpcióval A), illetve kemiszorpcióval B) előállított SAKcRGD réteg ellipszometriával meghatározott vastagság (h) adatai 36°C-on

A SAKcRGD polipeptid esetében a 33. ábrán látható tendenciák alapján kijelenthetjük, hogy az eltérő pufferes közegben nincs számottevő változás a rétegvastagságban. Emellett megfigyelhető a pH= 6,0 (citrát puffer) esetében a kiértékelés során fellépő hiba is a SiO₂ modellt tekintve. Ugyanez a polipeptid a kémiai kötés során vastagabb filmet eredményezett. Feltűnően sokat változott a pH= 6,0 (citrát puffer) esetében 12-18 nm, míg a pH= 7,4 (PBS) közegben 6-12 nm vastagságot mérhettük. A pH= 8,0 (borát puffer) esetében egy kisebb méretű növekedést figyelhetünk meg (7,5-14 nm). A különböző kiértékelésekkel kapott vastagságok arra utalnak, hogy a 'SiO₂' modell a legtöbb polipeptid film vastagságot alábecsüli. Elvi értelemben a legjobb értéket a 'Nedves' modell adja. Ehhez elegendő hasonló a 'Száras' módszer eredménye is.

A rétegvastagságokat egybevetve megállapíthatjuk a 36°C-os mintákról, melyek folyadékkal telített állapotban voltak vizsgálva, hogy a fiziszorpció során vékonyabb filmek alakulnak ki, mint a kemiszorpció során. Mindkét polimerre igaz, hogy kétszer, háromszor olyan vastag a kémiaailag kötött réteg. Ugyanakkor a SAKcRGD film minden esetben vastagabb, mint a pLys.

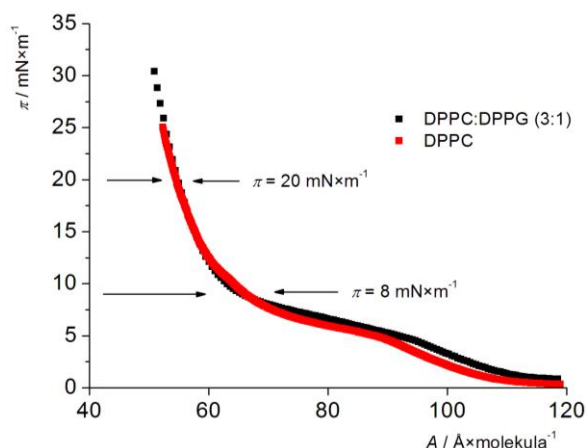
A pH hatását tekintve az adódik mindkét vizsgált polipeptidre, hogy a fiziszorpcióval rögzített réteg vastagsága az adott tartományban nem érzékeny a kémhatásra. A kémiai kötéssel rögzített SAKcRGD esetében jellegzetes az eltérés, a kisebb pH-jú közegben nagyobb rétegvastagság mutatkozik. Ez magyarázható azzal, hogy a polimerlánc maradék disszociálabilis csoportjai töltéssel rendelkeznek, így egy lazább, nagyobb kiterjedésű réteg alakul ki. A többi filmmel összehasonlítva, ahol nincs ilyen egyértelmű változás, az látszik valószínűnek, hogy ahhoz, hogy ez a pH hatás érvényesüljön, van egy szükséges filmvastagság. A fenti példák alapján ez a hidratált filmre közelítőleg 10 nm.

6.2. Bioaktív polimerek kölcsönhatása lipid monoréteggel

A fluid határfelületi vizsgálatok arra irányultak, hogy bioaktív komponensek lipidréteggel való kölcsönhatását tanulmányozzuk. A bioaktív komponens polielektrolit típusú vegyület, illetve vegyületcsalád. Tagjai a PEI vázhoz kapcsolt alkiláncok hosszában térnek el (C8-C16), de mindegyikük rendelkezik kationos csoportokkal is. Mivel a vizsgált anyagok elektrosztatikus töltése meghatározó, annak vizsgálatára, milyen szerepet játszik a membrán affinitásban az elektrosztatikus kölcsönhatás, a szokásos DPPC lipid modell mellett egy másik, keverék lipidfilmet is használtam a penetrációs mérésekben. Ez DPPC és negatív töltésű fejcsoporttal rendelkező DPPG 3:1 molarányú keveréke volt.

6.2.1. Izoterma vizsgálat

A lipidkeverékből – Langmuir-mérlegben történő méréshez – 3:1 ($V \times V^{-1}$) arányú kloroform:metanol eleggyel $c = 1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ koncentrációjú oldatát készítettem el.

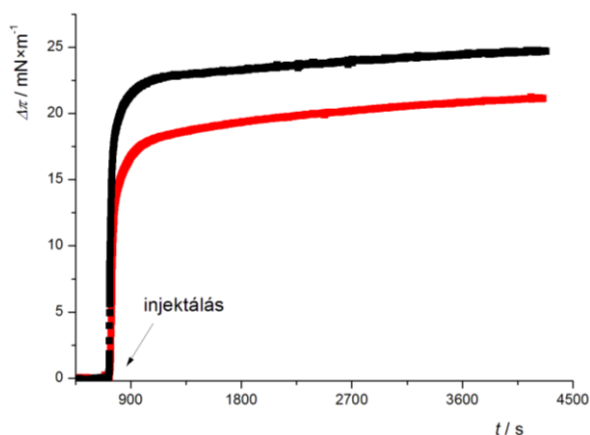


34. ábra DPPC:DPPG (3:1) lipidkeverék izotermája (■) összehasonlítva a tiszta DPPC izotermájával (■) ($t = 23^\circ\text{C}$)

A 34. ábrán látható, hogy a DPPC és a DPPC+DPPG izotermák ezen a hőmérsékleten jelentősen nem térnek el egymástól, így nagy biztonsággal jelölhetek ki két oldalnyomást, melyen a penetrációt kívánom elvégezni. Az egyiket a plató szakasz végénél ($\pi = 8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$), mely a kölcsönhatásokat tekintve 2D-s folyadék analóg állapotú, a másikat a meredek szakaszon ($\pi = 20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$) választom ki, ahol a 2D-s folyadék-szilárd átmenet érvényesül.

6.2.2. Penetrációs mérések

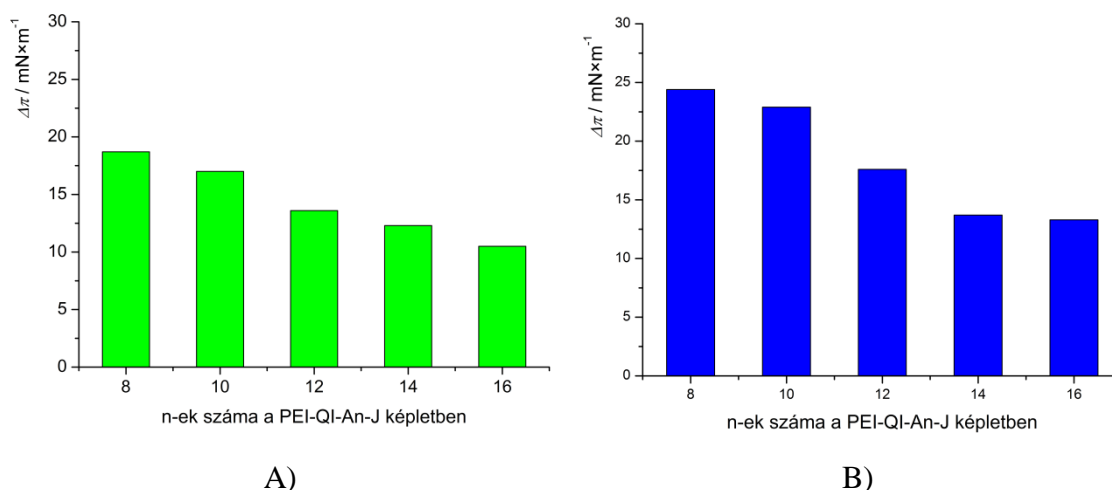
Víz alsófázison kialakított tipikus penetrációmérési görbét mutatok be a 35. ábrán.



35. ábra PEI-QI-A8-J polimer penetrációja DPPC:DPPG (3:1) lipidkeverékbe $\pi = 8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ (■) és $20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ (■) kezdeti oldalnyomásnál ($t = 23^\circ\text{C}$)

A PEI-QI-An-J polimerekkel végzett penetrációs mérések mindegyikére jellemző, hogy az oldalnyomás növekedés rendkívül nagymértékű volt. Mind a tömör illeszkedésű, mind a folyadékanalóg állapotú lipidfilmmel erős kölcsönhatást mutattak a polimerek. Ez a kölcsönhatás, amint a 35. ábra mutatja, elég gyorsan, néhány percen belül kialakult, ezután csak kismértékű, lassú növekedés volt megfigyelhető az oldalnyomásban. A várakozásnak megfelelően a $8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ -es oldalnyomású filmbe nagyobb mértékű volt a penetráció, mint a tömörebb, $20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ -es filmbe.

Az elektrosztatikus kölcsönhatás bemutatására a DPPC és a DPPC+DPPG lipid monorétegbe ($8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$) történő penetrációkat a 36. ábrán foglaltam össze. Az elektrosztatikus vonzásnak köszönhetően a DPPC+DPPG lipidréteggel erősebb a kölcsönhatás. Az eltérés szignifikáns, és a vizsgált polimersorozat minden tagjára igaz.

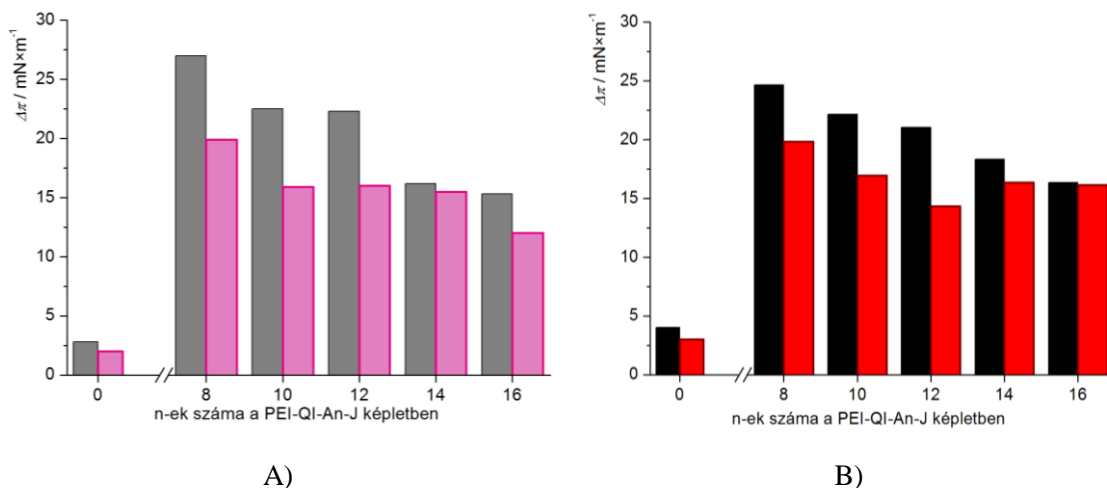


36. ábra Antibakteriális polimerek penetrációja $\pi=8 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ (A) DPPC (B) DPPC+DPPG lipidfilmbe vizes szubfázis esetén

Az igen nagymértékű és gyorsan kialakuló oldalnyomás-változás a lipidhez történő erős affinitást mutatja. Az eredeti PEI viselkedésével ($\Delta\pi < 5 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$) összehasonlítva egyértelmű, hogy ez a nagy membránaffinitás a módosított polimerszármazék hidrofób jellegével van kapcsolatban. A molekulához kapcsolt alkiláncok lényegesen megnövelik a lipidréteggel való kölcsönhatást, akár a DPPC, akár a kevert lipidfilmet tekintjük (37. ábra). A 8 és 20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ -es lipidfilmbe való penetráció mértéke a várakozásoknak megfelelően alakul.

A kevésbé tömör filmbe valamivel nagyobb mértékű a penetráció, mint a 20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ -rel jellemzett tömör illeszkedésű rétegbe. Ez azt valószínűsíti, hogy a membránaffinitás az alkiláncoknak a lipid molekulák közé való bejutásával, „beékelődésével” valósul meg.

Az is figyelemre méltó, hogy PBS alsó fázis esetén már nem tapasztalható a nagyobb mértékű penetráció a töltéssel rendelkező lipidfilmbe (DPPC+DPPG). Az elektrosztatikus kölcsönhatás visszaszorul az elektrolit jelenléte miatt.

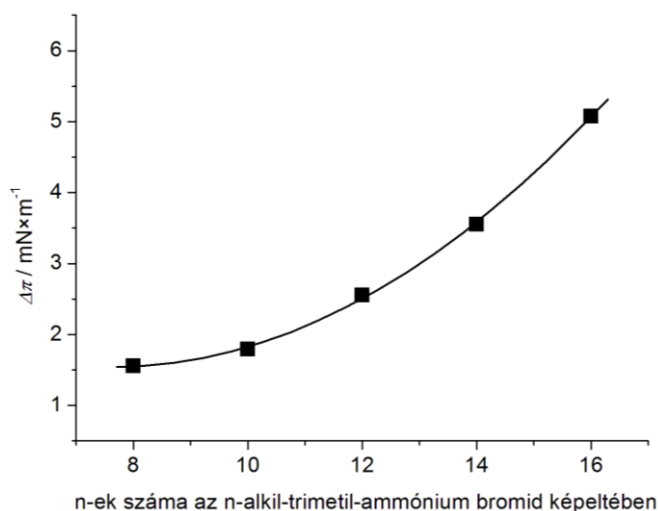


37. ábra A PEI-QI-An-J polimerek penetrációja PBS szubfázisból DPPC (A) $\pi = 8$ (■), $\pi = 20$ $\text{mN} \times \text{m}^{-1}$ (■) és DPPC:DPPG (3:1) (B) filmbe $\pi = 8$ (■), $\pi = 20$ $\text{mN} \times \text{m}^{-1}$ (■)

Amennyiben a hidrofóbitást tekintjük a PEI származékok membránaffinitása fő hajtóerejének, a láncossz növekedésével növekvő penetráció a várható tendencia. Ezt a megállapítást figyelembe véve újabb kérdés merül fel. Az oldalláncokként szereplő, különböző szénatomszámú lineáris alkyláncok önmagukban is hasonló tendenciát mutatnak a penetráció során, vagy a polikationos gerinccel együtt alakul ki a 37. ábrán megfigyelt penetrációs tendencia.

A kérdés megválaszolása végett megfelelő szénatomszámú n-alkil-trimetil-ammónium bromidokból álló sor penetrációját vizsgálok meg, mivel ezek a molekulák is a makromolekulához hasonlóan, amfifil jellegűek. A fejcsoportjuk egyszeres pozitív töltésű kvaterner ammónium ion. Az apoláris rész C8-tól kettesével C16-ig növekvő szénatomszámú n-alkyláncok. A kationos tenzidek penetrációs koncentrációját úgy választottuk meg, hogy az alkil-ammónium bromid molekulák száma megegyezzen a PEI-QI-An-J molekulákban lévő alkyláncok számával.

A $8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ -es lipidfilmbe történő penetráció eredménye a 38. ábrán jól tükrözi azt, hogy a lánc hosszával a kismolekulás penetráció ellentétes tendenciát mutat, mint amit a makromolekulák esetében tapasztaltam. A kismolekulás kationos tenzidek penetrációja annál nagyobb mértékű, minél hosszabb az alkylánc. Ez a tendencia a felületaktivitást követi.

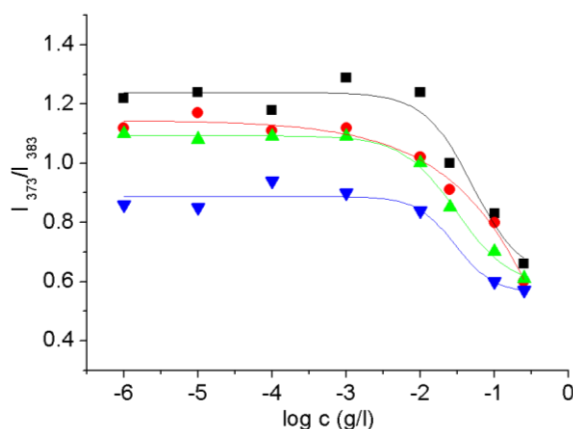


38. ábra n-alkil-trimetil-ammónium bromidok penetrációja $\pi = 8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ DPPC lipidfilmbe

Mivel az n-alkil-trimetil-ammónium bromid penetrációja során olyan koncentrációt válsztottam, mely megegyezik az n-alkil-trimetil-ammónium oldalláncot tartalmazó PEI molekulákon lévő oldalláncok koncentrációjával, a penetráció abszolút értéke is összehasonlítható. A 37. és 38. ábrát összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy az alkil-ammónium bromid amfipatikus molekulák lényegesen kisebb oldalnyomás növekedést okoznak, mint a módosított PEI molekulák. A PEI származékok nagyobb mértékű penetrációja feltételezhetően a polimer jelleggel van kapcsolatban. Az alkil-láncok penetrációjában kooperativitás érvényesülhet: a módosított PEI esetében egy pár oldallánc penetrációja már orientálja a többi oldalláncot a lipidfilm irányába, ezáltal segítve azok penetrációját. Természetesen az összehasonlításban nem hagyható figyelmen kívül a PEI-QI-An-J molekulák többi része sem. A két ellentétes tendencia, a penetrációs tulajdonságokat tekintve, lehetőséget biztosít a makromolekula finomhangolására, amennyiben a molekula szerkezeti tulajdonsága befolyásolja ezt.

A PEI származékok penetrációjának alkil-láncosszal való csökkenésére az alábbiakban kerestem a magyarázatot. Apoláris fluoreszcenciás indikátor jelenlétében (pirén) készítettem el a vizes oldatokat. Ezeknek a fluoreszcencia spektrumát vettem fel a polimer koncentrációjának függvényében. A kritikus micellaképződési koncentráció meghatározására kidolgozott módszert követtem [Kalyanasundaram, 1977]. Ennek lényege, hogy a pirén fluoreszcencia spektruma megváltozik attól függően, hogy poláris vagy apoláris környezetben van a molekula. A spektrumot a 373 és 383 nm-en mérhető

emisszió intenzitás arányával szokták jellemezni. Az aggregálódás kezdetét, az apoláris környezet kialakulását az I_{372}/I_{383} csökkenése jelzi.

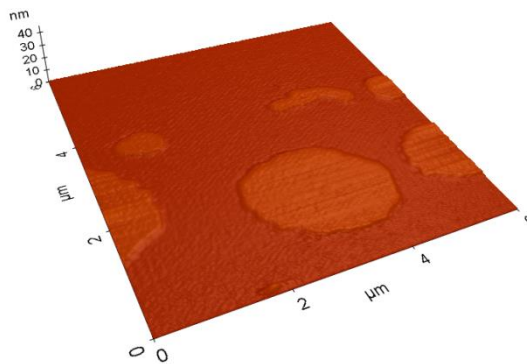


39. ábra A PEI25-QI5 -J5-An15 (n=8 - ■, n=10 - ●, n=14 - ▲, n=16 - ▼) molekulák pirénes közegű fluoreszcencia mérésének eredményei

A 39. ábrán a pirén 373 nm és 383 nm-nél lévő intenzitás csúcsainak arányát ábrázoltam a koncentráció függvényében. A görbe hasonló lefutású, mint egy kismolekulás micellaképződési folyamat esetén történne. Ebből arra következtethetünk, hogy adott koncentráció felett a polimer oldatban is aggregáció történik. Emellett a különböző szénatomszámú oldalláncot tartalmazó polimereket megfigyelve, az aggregáció előtti koncentrációtartományban különbséget láthatunk a szénatomszámtól függően. Ez a várakozással ellentétes, hiszen az lenne feltehető, hogy az azonos polaritású, de kis polimer koncentrációjú oldatokban azonos lesz a pirén csúcsainak intenzitás aránya. Ezzel szemben, a mérések szerint a szénatomszám függvényében már az egyedi polimer molekuláknak is különböző konformációja alakul ki. Míg a PEI-QI-A8-J a leginkább poláros, addig a PEI-QI-A16-J ettől eltérően, némiképp hidrofób környezetet tud kialakítani a pirén számára. Ez a tapasztalat magyarázatot nyújt a penetrációs viselkedésnél mért tendenciára. Vagyis azért nem a PEI-QI-A16-J penetrál a legerősebben, mert az már annyira amfifil, hogy a hidrofób részeit „elrejtí”, mintha önmagában egy micella lenne. Emiatt nem érvényesül a hidrofóbítás a penetráció során. Ez a viselkedés, amit a vizsgált 4 polimer pirénes spektruma mutatja, fokozatosan érvényesül, a hidrofóbítás egyre nagyobb mértékben vezet a vizes oldatban az unimolekulás micellák kialakulásához.

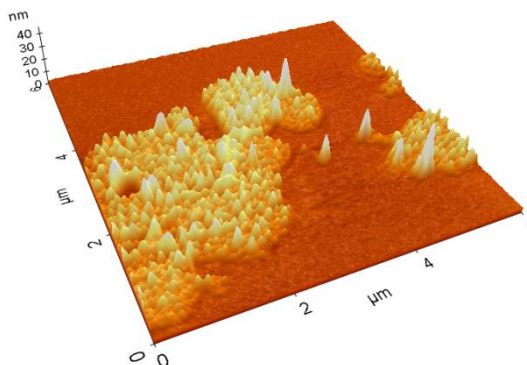
6.2.3. Felület morfológiai jellemzése atomi erő mikroszkóppal (AFM)

A felületi morfológia meghatározásához használt AFM esetén a Langmuir-filmet szilárd hordozóra (muszkovit csillám) Langmuir-Blodgett-technikával vittem át az 1 órás penetráció végeztével. A különböző filmek AFM képeit az alábbi ábrákon mutatom be.

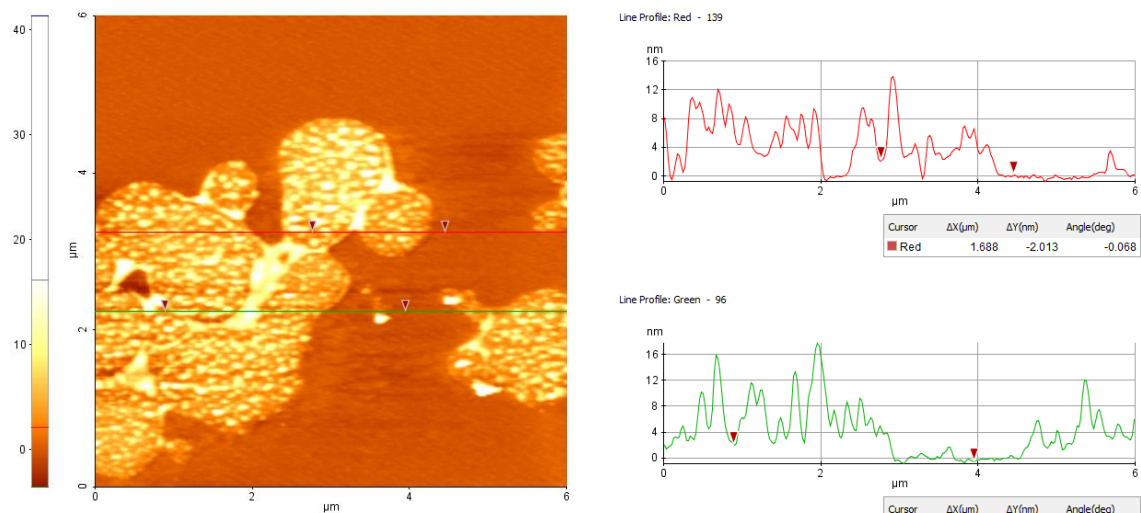


40. ábra $\pi = 8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC lipidfilm AFM-es képe

Ahogy a 40. ábrán megfigyelhetjük, a tiszta lipidfilm inkább sima felületű. A karakterisztikus doménvastagság 1,2 nm, mely összhangban áll a lipid oldalláncok fekvő helyzetű orientációjával. A penetrációt követően nagyfokú változás történik a film felületén. A polimer penetrációja lerombolja a lipidfilm rendezettségét és a film 10-20 nm kiemelkedéseket tartalmazó egyenlőtlen felületűvé válik.

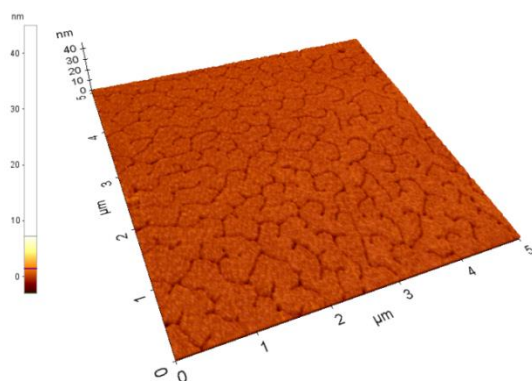


41. ábra $\pi = 8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC lipidfilmbe történő PEI-QI-A₈-J polimer penetrációja után kialakuló felszín AFM-es képe



42. ábra $\pi = 8 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC lipidfilmben történő PEI-QI-A₈-J polimer penetrációja után kialakuló felszín AFM profil képe

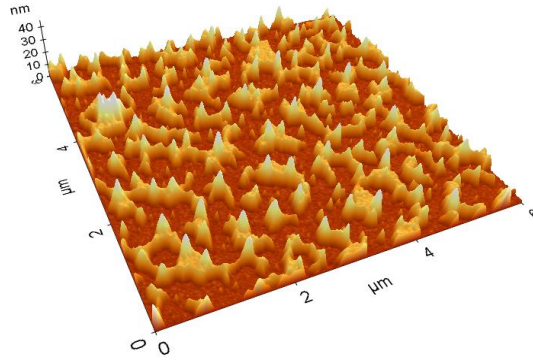
A $20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású lipidfilm AFM-es képe, a Langmuir-mérlegben rögzített izotermával összhangban, tömör szerkezetet mutat. Az előzőleg megismert szigetes szerkezetet szinte folytonos lipidfilm váltotta fel, melyet árkok szabdálnak. Kialakulásuk feltételezhetően a szigetek torlódásával magyarázható. A film rétegvastagsága is megnőtt 2 nm-re, mely a láncok függőleges irányú kiegyenesedésével, a lipidláncok rendeződésével, orientációjuk megváltozásával magyarázható.



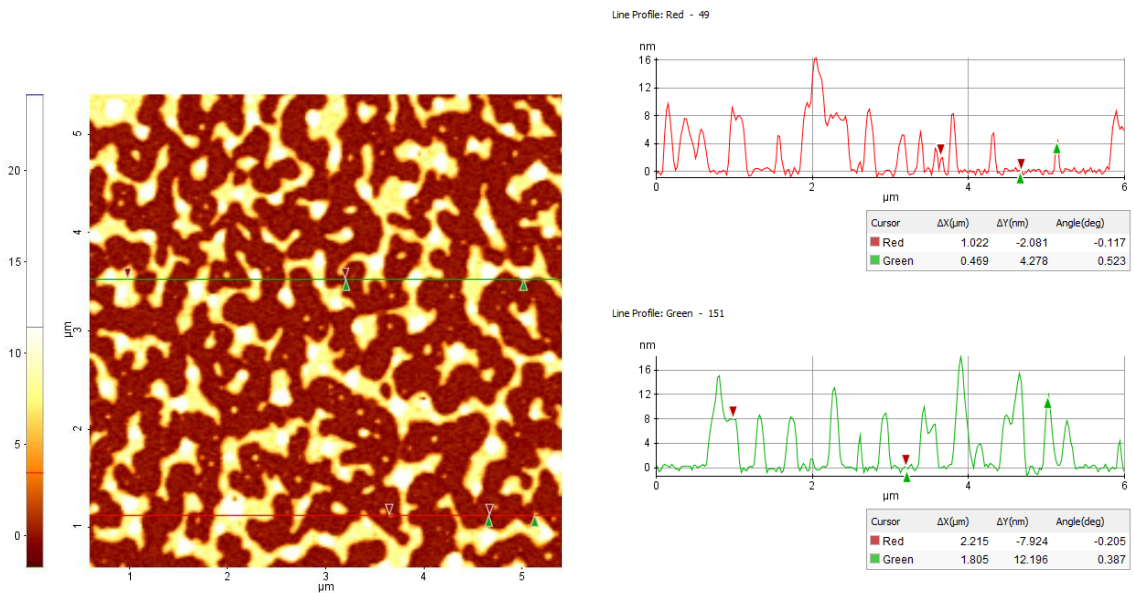
43. ábra $\pi = 20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC lipidfilm AFM képe

A tömörebb film esetén is jelentős változás tapasztalható a penetráció során. A polimerrel való kölcsönhatás következtében a tömörebb film rendezettsége megbomlik. A penetráló molekula teljesen átalakítja a lipidfilm felületét. Érdemes figyelemmel lenni

arra, hogy a megjelenő szigetek magassága a 2 nm többszöröse. Valószínűsíthető, hogy a lipidréteg penetráció során történő átrendeződésével 2-3 rétegű lipidfilmek is kialakultak a felszínen.



44. ábra $\pi = 20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC lipidfilmben történő PEI-QI-A₈-J polimer penetrációja után kialakuló felszín AFM képe



45. ábra $\pi = 20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC lipidfilmben történő PEI-QI-A₈-J polimer penetrációja után kialakuló felszín AFM profilképe

Összegezve, a penetráció mindkét oldalnyomáson drasztikus változásokat okozott a lipidfilm szerkezetében. Ennek a kvantitatív értékelésére meghatároztam az egyes felületekre az érdesség értékeket.

11. táblázat Érdességadatok 10 μm^2 -es felületen meghatározva

	DPPC $\pi= 8 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$	DPPC $\pi= 8 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ penetráció PEI-QI-A ₈ -J	DPPC $\pi= 20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$	DPPC $\pi= 20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ penetráció PEI-QI-A ₈ -J
<i>Ra</i> / nm	0,08	2,86	0,14	2,28
<i>Rq</i> / nm	0,11	3,73	0,17	3,22
<i>Rz</i> / nm	0,08	28,38	0,73	23,58

Figyelembe véve, hogy a mind a 8, mind a 20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC film esetében az átlagos érdesség (*Ra*) a film teljes vastagságának 7%-ára tehető, így kijelenthetjük, hogy sima, a szigeteken belül, összefüggő filmet képez a DPPC a hordozó felületén. Ez összhangban van az AFM-es 3D-s képek összehasonlításával is. Ha a négyzetes közepet nézzük, vagyis határozottabban figyelembe vesszük a lokális minimum és maximum értékeket, akkor a 8 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ jelű DPPC film esetében 9%, míg a 20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ -es esetében 8%-ra módosultak az érdességértékek. Amennyiben az érdességmagasságot (*Rz*) értékeljük, akkor azt érdemes az átlagos érdességtől (*Ra*) való eltérésként értékelni, mivel akkor realisabb képet kapunk a szélsőértékek nagyságának hatásáról is, és össze tudjuk hasonlítani a penetrált filmek értékeivel is. Ez alapján az *Ra*-hoz képest *Rz* 1%-os csökkenést mutat a kevésbé tömör DPPC film, míg a tömörebb esetén 426%-os növekedés volt. Ha figyelembe vesszük a 3D-s képen látható szerkezetet, akkor valószínű, hogy a domének közötti sávon kívül - melyet az érdesség meghatározásakor nem vettem figyelembe - van még legalább 10 darab olyan mély, akár a hordozóig tartó lyuk a lipidfilmben, mely ezt a kiugróan magas érdességmagasság értéket adja. Bár még ezt az *Rz* értéket tekintve is simának és egyenletesnek lehet tekinteni a tömörebb tiszta DPPC filmet is, mégis a kiértékelés hibájának tekintem ezt a kiugró értéket.

A penetrált filmek esetében már az *Ra* és az *Rq* értékek is jól mutatják, a film szerkezete jelentősen megváltozott. Az érdes felszíneket lokális szélsőértékek tartják, de az igazi, szembetűnő különbséget az érdességmagasság (*Rz*) mutatja. A 8 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC filmbe történő penetráció után, 894%-os növekedést tapasztalunk

az érdességmagasság (Rz) értékében az átlagos érdességhez (Ra) képest. Ugyanez a $20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású film esetén 933%-os növekedés volt.

Tehát bármelyik érdességadatot is tekintjük, egyértelmű, hogy az eredeti lipidrétegek simábbak ($R < 1 \text{ nm}$), míg ehhez képest a PEI származékokkal való kölcsönhatás nagyságrendi változásokat. Különösen a penetrált filmen mért Rz értékek nagyok, amik azt mutatják, hogy a felszínen jelentős mértékű kiemelkedés található, az eredeti lipidfelszín drasztikusan degradálódott.

6.3. Bioaktív molekulák kölcsönhatása lipid monoréteggel

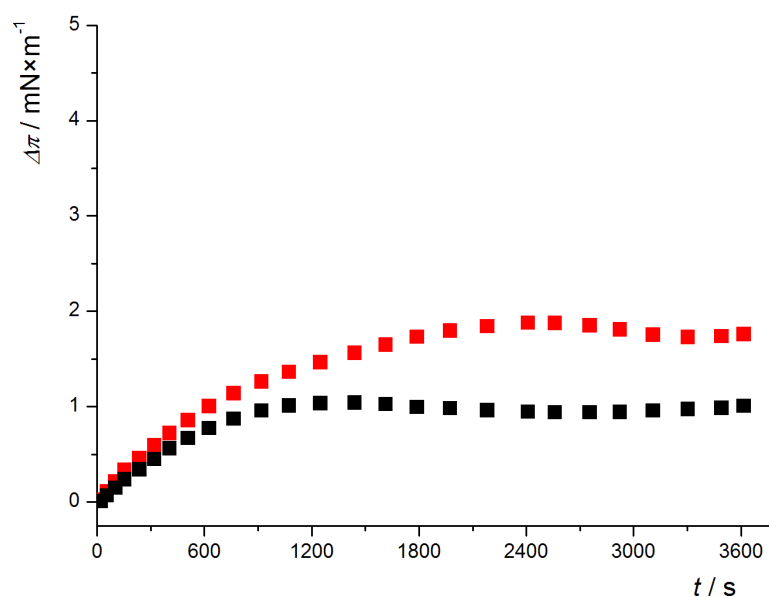
Az eddigi fejezetekkel ellentétben, ahol makromolekulák lipid monoréteggel történő kölcsönhatásait vizsgáltam, ebben a fejezetben kis molekulájú antituberkulotikumok vizsgálatát fogom bemutatni.

6.3.1. Egyszerű modell membrán

Egyszerű membránmodellként tisztán foszfolipidet tartalmazó rendszert használtam.

6.3.1.1. Penetrációs mérések

A membránaffinitás tanulmányozását 15 és 20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$ oldalnyomású Phospholipon lipidfilmekbe történő penetrációs mérésekkel 23°C és 36°C-on, a 5.3.2. leírtak alapján végeztem el (46. ábra).



46. ábra 36°C-on az INH-redSer $\pi= 15 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ (■), $\pi= 20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ (■) oldalnyomású lipid monorétegbe történő penetrációja

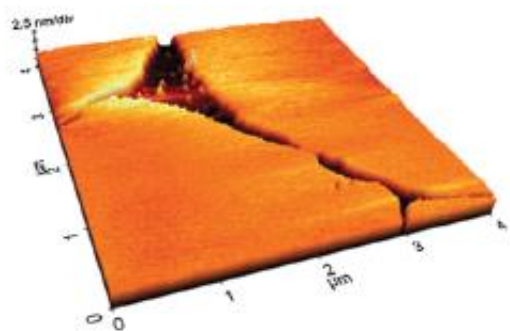
12. táblázat Az INH-peptid konjugátum penetrációs képessége $\pi=15$ és $20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$, 23°C és 36°C -os lipid monorétegbe

Penetráció ideje/ s	A lipidfilm oldalnyomás-változása			
	23°C		36°C	
	15 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$	20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$	15 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$	20 $\text{mN}\times\text{m}^{-1}$
0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	2,6	1,8	1,3	1,6
20	3,1	2,0	1,6	1,9
30	3,6	2,3	1,5	2,3
40	4,0	2,4	1,4	2,4
50	4,6	2,4	1,4	2,1
60	4,9	2,5	1,5	2,2

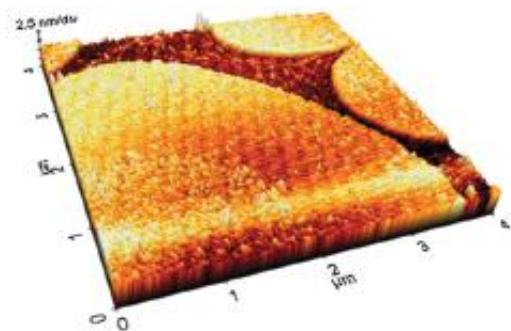
A 12. táblázatot megfigyelve láthatjuk, hogy az injektálás után (0. perc) 23°C -on $15 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ oldalnyomású lipidfilm esetén, az oldalnyomás az első periódusban gyors növekedést mutat, de később a növekedés sebessége csökken, ami 1 óra után sem éri el az egyensúlyi állapotot. A többi esetben a penetráció kezdeti szakasza kevésbé meredek, valamint 20 perc után egy kvázi egyensúlyi értéket ér el az oldalnyomás-változás. Mind a 15 , mind a $20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ oldalnyomású film esetén a 23°C -os lipidfilmbe nagyobb a penetráció, mint a 36°C -ba. Ez látszólag ellent mond annak a ténynek, hogy a magasabb hőmérsékletű filmben a lipid molekulák kevésbé kondenzáltak, rendezettségük kisebb [Miñones, 2006], vagyis nagyobb fokú penetrációra lehet számítani. Valójában a lipid molekulák mozgékonyasága, a film „lágysága” miatt ugyanannyi penetráló INH-peptid konjugátum kisebb oldalnyomás-oldalnyomás-változást tud okozni.

6.3.1.2. Felület morfológiai mérése atomi erő mikroszkóppal (AFM)

A morfológiai vizsgálatok során a referenciaként szolgáló lipid membrán AFM-es képével hasonlítottam össze a penetrált filmek felületét. Az adatokat magasság skálával ellátott felülnézeti vagy 3D-s képként ábrázolhatjuk, valamint vonalmenti ábrázolásban – keresztmetszeti profil – a pontos leolvasást végezhetjük el.

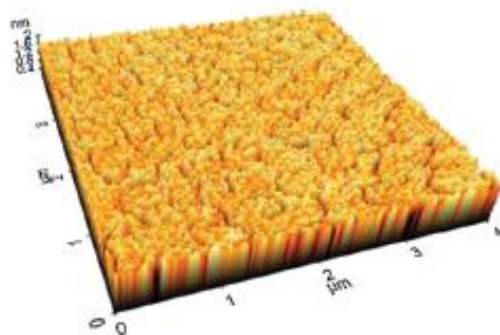


A)

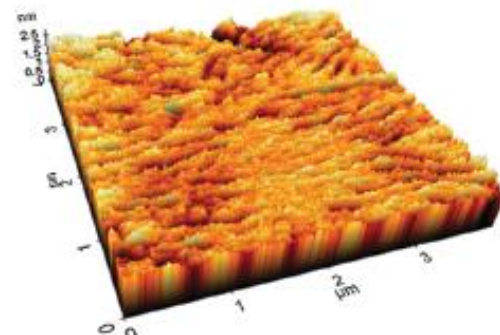


B)

47. ábra $\pi = 15 \text{ mN} \times^{-1}$ oldalnyomású tiszta lipid monoréteg (A) és INH-redSer-rel penetrált lipidréteg (B) AFM felvétele 23°C-on



A)



B)

48. ábra $\pi = 20 \text{ mN} \times^{-1}$ oldalnyomású tiszta lipid monoréteg (A) és INH-redSer-rel penetrált lipidréteg (B) AFM felvétele 23°C-on

A 47. ábra AFM felvételeit megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy a lipidfilm mind a két esetben szigetes szerkezetű. Ezzel szemben a 48. ábrán látható Langmuir-Blodgett-filmek tömör lipidréteget mutatnak, melyet árkok tagolnak.

A 47. ábrán látható szigetek rétegvastagsága $\sim 2 \text{ nm}$. A tiszta lipidfilm felülete egyenletes és sima, míg a penetrált felszín lényegesen érdesebbé vált a penetráció során. A képek szembetűnő módon mutatják a penetráció hatására bekövetkező szerkezetváltozást. Ezt a látvány alapján tett becslést, az érdesség értékkel tudjuk alátámasztani, melyet mind a négy minta esetén a film $9 \mu\text{m}^2$ területére számoltam ki.

13. táblázat Szilárd hordozón lévő tiszta lipid illetve penetráltatott Langmuir-filmek érdességei

Érdesség/ nm	A lipidfilm oldalnyomás-változása (23°C)			
	15 mN×m ⁻¹		20 mN×m ⁻¹	
	tiszta lipid	penetrált	tiszta lipid	penetrált
<i>R_a</i>	0,09	0,40	0,13	0,26
<i>R_q</i>	0,16	0,60	0,17	1,82
<i>R_z</i>	1,13	10,25	1,90	18,68

A tiszta lipidfilm esetében az átlagos érdesség (*R_a*) vagy a négyzetes közép (*R_z*) is a rétegvastagsághoz (~2 nm) képest csak <10% értéket mutat. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgált területen a lipidfilm sima és tömör szerkezetű. Az érdességmagasság adatok figyelembe vételével azt láthatjuk, hogy a film kiugró értékei összemérhetőek a film vastagsággal. A 3D képek alapján a tömörebb film esetén ez nem meglepő.

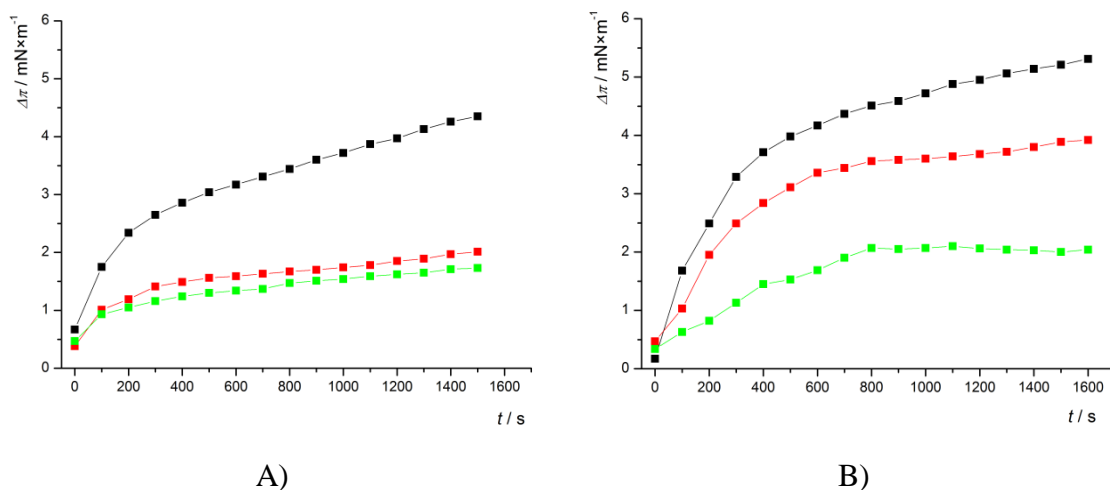
Ezzel szemben a lényegesen nagyobb átlagos érdességeket mutató penetráltatott filmekről kiugróan nagy érdességmagasság (*R_z*) értékeket láthatunk. Az átlagos érdességhez képest két nagyságrendű növekedést tapasztaltunk mind a 15 mN×m⁻¹-es, mind a 20 mN×m⁻¹ film esetén.

6.3.2. Összetett modell membrán

Korábbi lipid modelleket a *Mycobacterium tuberculosis* sejt falának egyik fontos komponensével, a mikolsavval egészítettem ki, ezzel létrehozva egy *Mycobacteriumra* jellemzőbb, összetettebb lipid modellt. A kialakított modellben DPPC:mikolsav 1:1 ($\text{mol} \times \text{mol}^{-1}$)-ban volt jelen.

6.3.2.1. Penetrációs mérések

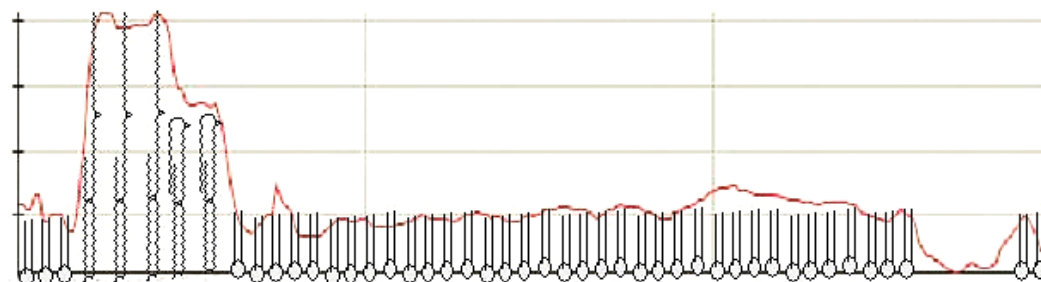
Az INHredSer erőteljesen penetrált a DPPC:mikolsav (1:1) összetett lipidfilmbe (49. ábra), ellentétben az INH-val, ami jó vízoldhatóságával összhangban, gyakorlatilag nem mutatott kölcsönhatást a lipidrétegekkel. A peptid szakasszal való kapcsolat jelentősen megváltoztatta az INH-származék polaritását. Az oktanol/víz megoszlási hányados több nagyságrenddel nagyobb, mint az INH-é, mutatva az apoláris jelleg növekedését. Ez a megnövekedett penetrációs képesség egyértelműen megnyilvánul, mind 23, mind 36°C-on. A különböző tömörségű filmbe való penetráció a várakozásnak megfelelően alakul. A membránaffinitás a kezdeti oldalnyomás növekedésével csökken.



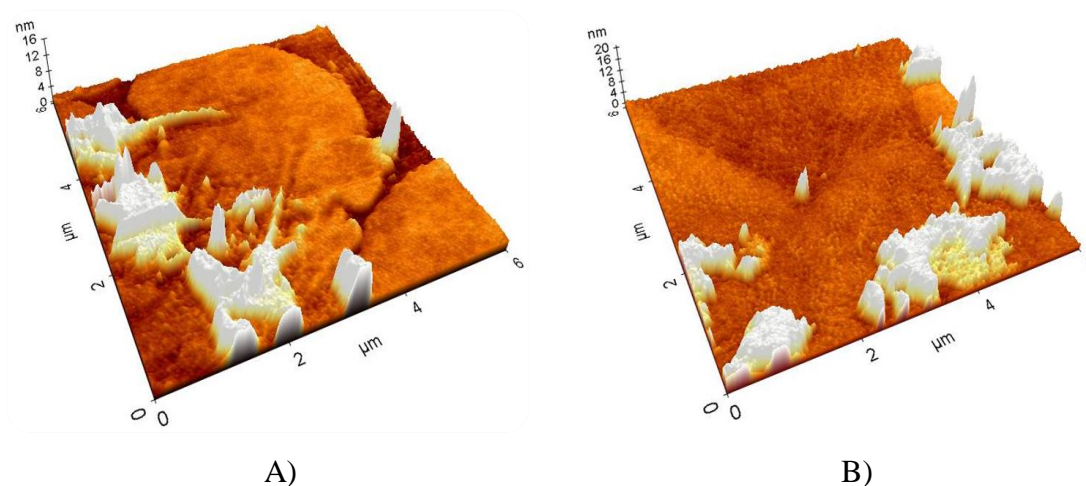
49. ábra INHredSer penetrációja $\pi = 15 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ (■), $20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ (■), $25 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ (■) DPPC + mikolsav (1:1) Langmuir filmbe A) 23°C, B) 36°C

6.3.2.2. Felület morfológiai mérése atomi erő mikroszkóppal (AFM)

A Langmuir-Blodgett-technikával szilárd hordozóra átvitt film részletgazdag képet nyújt a felületről. A DPPC filmhez képest megjelenő mikolsav kiemelkedések jelentősen megváltoztatják a filmről kialakult sima, egyenletes felületű képünket.

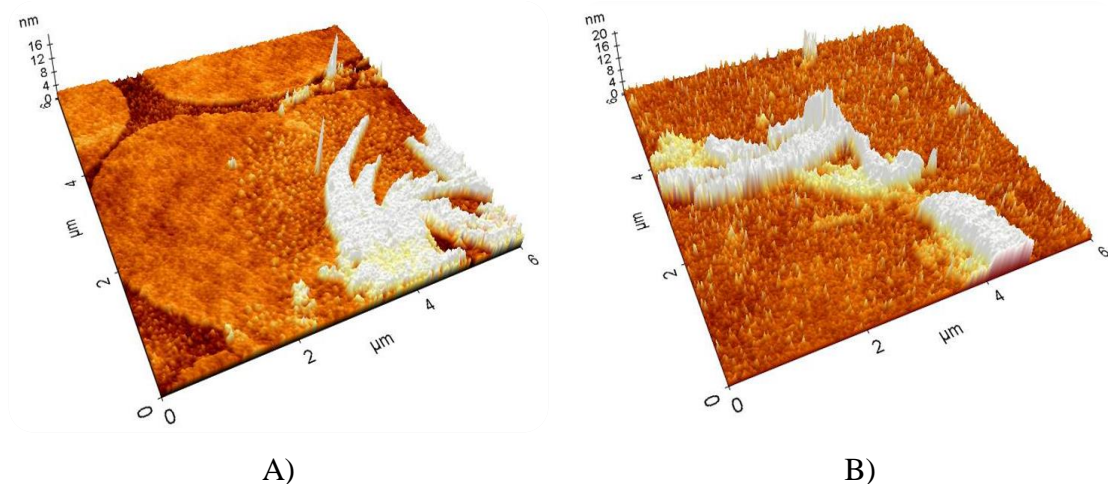


50. ábra DPPC és mikolsav Langmuir-filmben való elhelyezkedésének sematikus ábrája



51. ábra DPPC+mikolsav (1:1) $\pi = 15 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású filmjének (36°C) (A) és INHredSerrel történő penetrációjának (36°C) (B) AFM képei

Az AFM-es képek 3D-s ábrázolása jól mutatja, hogy a penetráció előtti és utáni állapot ránézésre alig különbözik (51. és 52. ábra).



52. ábra DPPC+mikolsav (1:1) $\pi=20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ oldalnyomású filmjének (36°C) (A) és INHreSerrel történő penetrációjának (36°C) (B) AFM képei

A megjelenő új platók és csúcsok miatt a penetrációnak a teljes összetett filmhez való hasonlítása az érdesség alapján nem lehetséges, mivel az eredeti film is jelentős érdességet mutat, biztonsággal nem állapítható meg a lipidfilm határa. Ennek ellenére a 14. táblázatban összefoglalt érdességértékek azt mutatják, hogy a penetrált filmek érdesebbek, nagyobb kiugró értékeket tartalmaznak, és ahogy az 52/B. ábra mutatja, a penetráció következtében eltűnnek a sima felületű lipid domén részletek.

14. táblázat Tiszta lipid, illetve penetrált lipidfilm kétféle oldalnyomás esetén meghatározott érdességadatai

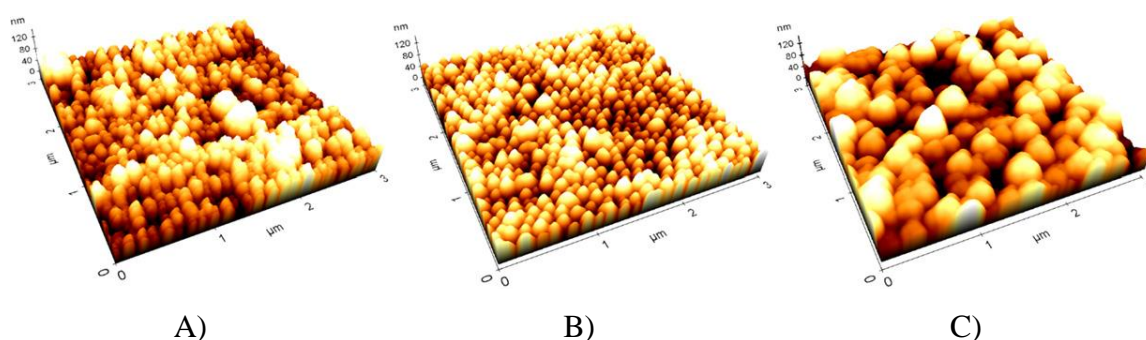
Oldalnyomás:	$\pi=15 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$			$\pi=20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$		
	Ra	Rq	Rz	Ra	Rq	Rz
Tiszta lipidfilm	0,95	1,62	15,03	0,69	1,04	14,74
Penetrált film	1,48	2,30	21,17	1,49	2,24	19,59

6.4. Nanorészecske gyógyszerhordozó kölcsönhatása lipid monoréteggel

6.4.1. Nanorészecskék mérete és alakja

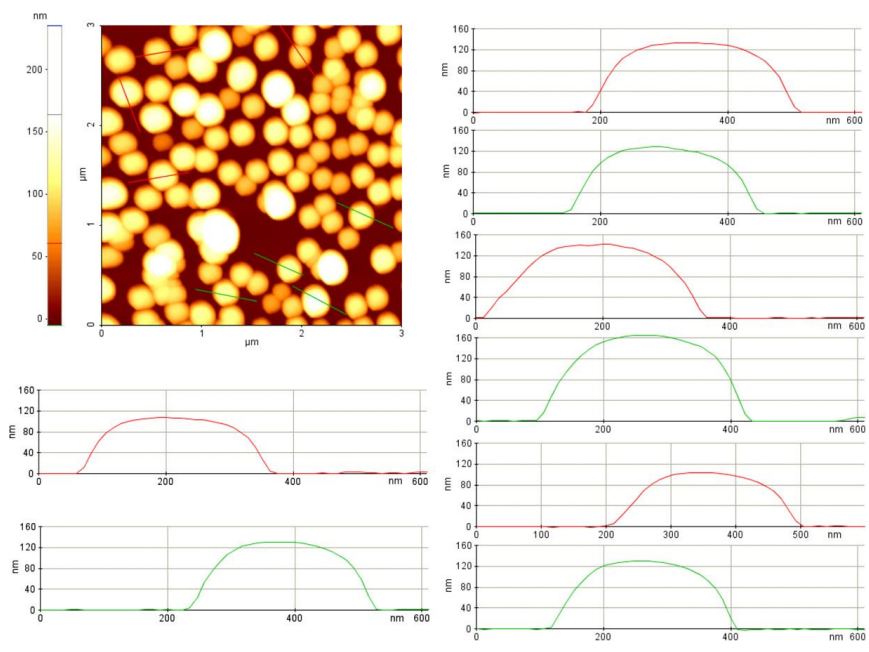
6.4.1.1. Atomi erő mikroszkóppal végzett mérések (AFM)

A nanorészecskék, melyeket 4.6.2 fejezet alapján állítottam elő, jellemezhetőek méret és alak alapján. A Si szilárd hordozó felületén a részecske szuszpenzió egyszerű beszárításával készülő mintákat AFM-mel vizsgáltam. A vastag, részecskével sűrűn borított Si hordozó morfológiájáról készült 3D-s képeket az 53. ábrán mutatom be. Látható, hogy a PLGA nanorészecskék meglehetősen egyformák, gömb alakúak. A polimerrel stabilizált típusok nanoprecipitációs módszerrel készültek egyetlen részecskemérettel. Az észrevehetően nagyobb részecskéket akkor kaptam, ha PEI is jelen volt a Pluronic mellett.

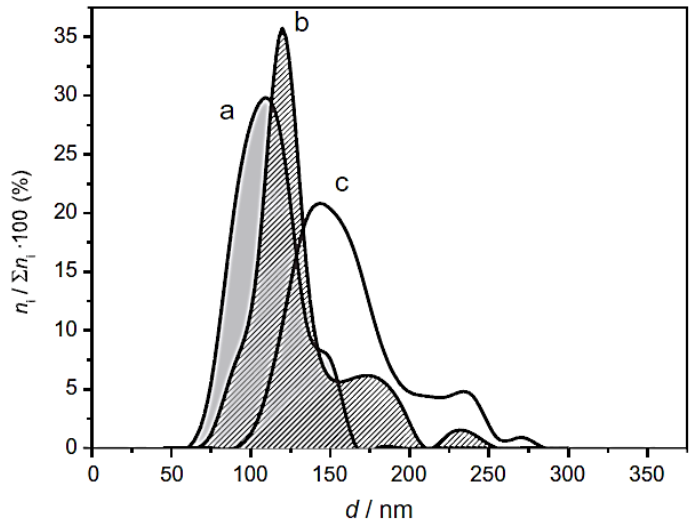


53. ábra A PLGA nanorészecskék AFM képe (A) stabilizátor nélkül, (B) $0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ Pluronic stabilizátorral, (C) $0,0925 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ Pluronic és $0,0075 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ PEI stabilizátorral

Egy másik mintasorozat, mely hígított nanoszuszpenzióból készült, Si felületen szeparáltan elhelyezkedő nanorészecskék képét mutatta, melyek közül néhányat az 54. ábrán mutatok be. Az AFM mérések keresztmetszeti kiértékelése során meg tudtam határozni a részecskék magasságprofilját. A részecskék méreteloszlását rendszerenként 100 részecske méréssel számoltam ki (55. ábra).



54. ábra AFM képek és magasságprofilok az egyedi PLGA részecskékről a méretmeghatározáshoz.



55. ábra Különböző stabilizátorral készített PLGA nanorészecskék mérete AFM-mel meghatározva, a) tiszta PLGA, b) PLGA + $0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ Pluronic stabilizátorral, c) PLGA + $0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ Pluronic + $0,0075 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ PEI stabilizátorral

A 55. ábra alapján megállapítottam, hogy a három rendszer szűk méreteloszlást mutat, különösen a tiszta PLGA és a $0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ Pluronic-kal stabilizált rendszer. A PEI hozzáadásával készített részecskék átlagos mérete megnövekedett és polidiszperzitása is nagyobb volt. Az átlagos átmérőket a 15. táblázatban gyűjtöttem össze.

6.4.1.2. Dinamikus fényszórással végzett mérések (DLS)

A dinamikus fényszórás a folyadékban meghatározott átlagos méretet mutatja. Az intenzitásból az átlagos hidrodinamikai átmérőt és a polidiszperzitást tudtam meghatározni.

15. táblázat Nanorészecskék átmérő adatai AFM és DLS módszerrel meghatározva. AFM mérésekből: számszerinti átlag (d_n), illetve az ebből számított 6. hatvánnyal súlyozott átlag (d_6), DLS mérésekből: hidrodinamikai átmérő (d_{hidr}).

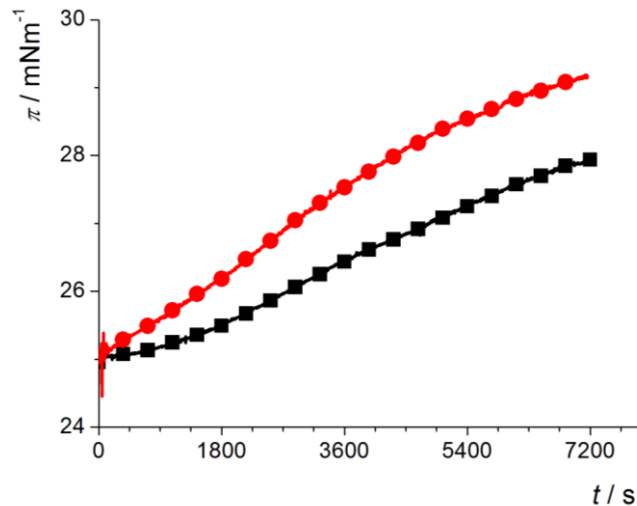
PLGA nanorészecske rendszer stabilizátora	d_n	d_6	d_{hidr}	PD
	nm	nm	nm	
nincs	104	119	139	0,08
0,1 g×dm ⁻³ Pluronic	124	145	150	0,08
0,0925 g×dm ⁻³ Pluronic + 0,0075 g×dm ⁻³ PEI	155	176	181	0,10

A reprodukálhatóságok a nanorészecske mérete (± 5 nm) és a polidiszperzitás ($\pm 0,02$) esetén. A polidiszperzitás értékéből megállapíthatjuk, hogy minden tanulmányozott rendszernél szűk a méreteloszlás $PD \leq 0,1$. A tiszta PLGA részecskék mérete (139 nm) kissé növekszik a Pluronic alkalmazásának hatására, és ez magyarázatot ad a hidratált adszorpciós réteg kialakulására. További méretnövekedés figyelhető meg a PEI hozzáadására. A két mérési technika jó egyezést mutat a meghatározott méretekben, és szignifikánsan nagyobb részecskék alakulnak ki a PEI hatására. Ez jól mutatja, hogy a PEI a felületi adszorpciós réteghez nem csak hozzájárul, hanem befolyásolja az aggregáció folyamatát is.

6.4.2. Nanorészecskék membránaffinitása

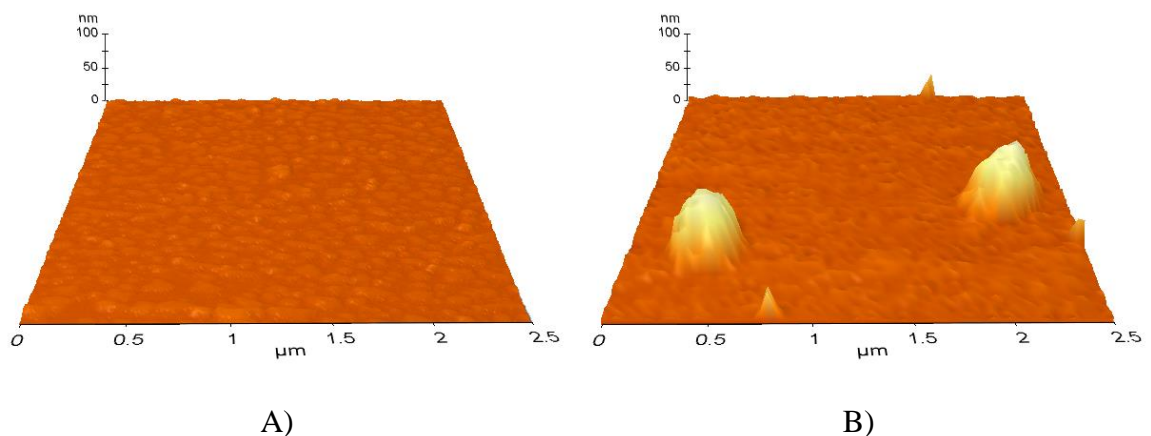
A nanorészecskék lipidréteggel való kölcsönhatását a hatóanyag molekulákkal végrehajtott penetráció vizsgálatához hasonlóan tanulmányoztam. A PLGA nanorészecskék felületének összetételét, polaritását meghatározza a sztérikus stabilizálására használt Pluronic. Az éppen a felületmódosítás céljából előállított Pluronic F127-aminnal stabilizált részecskék membránaffinitását is meghatároztam. A kationos nanorészecske membránaffinitása, a Langmuir-mérlegben vizsgált adszorpció/

penetráció az 56. ábra szerint alakult. A DPPC lipidfilmmel való kölcsönhatás jelentős mértékű, és ez növekszik a negatív töltésű, DPPC+DPPG keverék lipid modell esetén az elektrosztatikus kölcsönhatásnak köszönhetően.



56. ábra PLGA ($0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$) Pluronic F127-aminos nanorészecske penetrációja $\pi = 25 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ oldalnyomású DPPC (■) és DPPC+DPPG (●) Langmuir-lipidfilmbe

A nanorészecskék lipidfilmbe való beépülését Langmuir-Schäffer-technikával előállított szilárd hordozóra átvitt rétegeként AFM-mel vizsgáltam (57. ábra). A penetráció előtti lipidréteg állapotát hasonlítottam össze a penetráció utáni állapottal. A penetráció közvetlen bizonyítékát adja a 3D-s kép azáltal, hogy a lipidréteg tartalmaz nanorészecskéket, míg a penetráció előtti lipidfilm nem.



57. ábra DPPC+DPPG tiszta lipid monoréteg (A) és PLGA ($0,1 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$) Pluronic F127-aminos nanorészecske penetrációja (B) után készült AFM felvételek

7. A dolgozat egyes fejezeteiben bemutatott eredmények hasznosítása

Az előállított polipeptid felületi bevonatok, illetve a membránaffinitással jellemzett antibakteriális polimerek, hatóanyagok, hatóanyag-konjugátumok és gyógyszerhordozók a tervek szerint további biológiai felhasználásra kerültek, illetve kerülnek.

6.1 A szelektív sejt letapadást biztosító peptidekkel készített bevonatok *in vitro* vizsgálatából további munka született.

P. Tátrai, B. Sági, A. Szigeti, A. Szepesi, I. Szabó, Sz. Bősze, Z. Kristóf, K. Markó, G. Szakács, I. Urbán, G. Mező, F. Uher, K. Német: A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces, J Mater Sci: Mater Med 2013, 24, 479–488.

Állatkísérletekhez titán hálóra kellett adaptálni a bioaktív polimerrel végzett felületmódosítást. A Szegedi Kísérleti Műtéttani Csoport munkatársai az Oralbiológiai Tanszék és Műszaki Egyetem munkatársaival együttműködve végezték a csontosodás mértékét jelző mechanikai vizsgálatokat.

K. Turzó, Cs. Berkovics, Á. Györgyei, B. Szabó, Z. Rakonczay, G. Mező, Cs. Péntes, É. Kiss, K. Markó, E. Madarász: In vivo studies on osseointegration of titanium surfaces modified with cyclic RGD-peptides and HAP; kézirat

6.2 NanoBond FP7-es nemzetközi együttműködés keretében textil felületmódosítására alkalmazták a kontakt hatású antibakteriális anyagot. Eredményeink hozzájárultak az optimális összetétel, koncentráció kiválasztásához. Készültek ilyen bevonatú kórházi öltözékek, ágynemű, matracvédő, sportzokni és egyéb egészségügyi textíliák.

6.3 A nagyszámú, *in silico* módszerrel azonosított antituberkulotikus hatóanyag jelölt szelektálásához felhasználhatóak – a fizikai-kémiai paraméterek mellett – az általunk meghatározott membránaffinitási értékek. Ezekkel is történtek további *in vitro* valamint *in vivo* vizsgálatok is.

K. Horváti, B. Bacsa, É. Kiss, G. Gyulai, K. Fodor, Gy. Balka, M. Rusvai, E. Szabó, F. Hudecz, Sz. Bősze: Nanoparticle encapsulated lipopeptide conjugate of antitubercular drug isoniazid: in vitro intracellular activity and in vivo efficacy in a guinea pig model of tuberculosis.

Bioconjugate Chemistry **2014**, 25 (12), 2260–2268.

K. Horváti, B. Bacsa, N. Szabó, K. Fodor, Gy. Balka, M. Rusvai, É. Kiss, G. Mező, V. Grolmusz, B. Vértessy, F. Hudecz, Sz. Bősze: Antimycobacterial activity of peptide conjugate of pyridopyrimidine derivative against Mycobacterium tuberculosis in a series of in vitro and in vivo models.

Tuberculosis, **2015**, 95, S207–S211.

8. Összefoglalás

A biológiai rendszerekben fontos határfelületi kölcsönhatások két típusával foglalkoztam doktori munkámban. A tanulmányozott anyagok, rendszerek egyrészt az idegen szilárd anyag/biológiai rendszer kölcsönhatásához, a biokompatibilis és bioaktív felület kialakításához, másrészt az antibakteriális tulajdonságú hatóanyag-jelöltek, polimerek sejtekkel való kölcsönhatásának jellemzéséhez, fertőzést megelőző felületmódosítási eljáráshoz kapcsolódnak.

A bioaktív felület kialakításához polilizint és ennek három, funkcionalizált változatát használtam. Fiziszorpciós és két kémiai kapcsolási módszerrel állítottam elő felületi rétegeket szilárd hordozón a további, részben *in vivo* biológiai vizsgálatok számára. A különböző kémiai összetételű felületi rétegeket laboratóriumi körülmények között jellemeztem és hasonlítottam össze. A bevonatok vastagságának, szerkezetének meghatározásában a röntgensugár fotoelektron spektroszkópia (XPS), kvarc kristály mikromérleg (QCM) és ellipszometria mellett fontos szerepe volt az atomi erő mikroszkópiának (AFM).

A vizsgálatok eredményéből megállapítottam, hogy a kémiai kapcsolási módszerek a fiziszorpcióval kapottnál két-háromszor nagyobb mennyiségű polipeptid felületi immobilizálását eredményezték, valamint hogy a rétegek egyenletesek és összefüggőek. A polipeptid rétegeket QCM és ellipszometriai módszerrel *in situ*, folyadékkal érintkezésben is tudtam tanulmányozni. A QCM módszerrel mért frekvencia és ellenállás adatok háromféle modellel (Sauerbrey, Voinova, Johannsmann) történő kiértékeléséből arra a megállapításra jutottam, hogy a polipeptid rétegek nem mutatnak érzékelhető viszkoelaszticitást. A polipeptidek közül a legnagyobb vastagságú réteget az elágazó szerkezetű SAKcRGD adta, aminek adszorpciója optimumot mutatott a közepes pH tartományban. Ennek valószínű magyarázata a polimer töltéssűrűségének, és ezzel összefüggésben az oldatbeli expanziós állapotának az együttes érvényesülése.

Bakteriális fertőzés elleni hatóanyagjelöltek, valamint a fertőzés megelőzésében szerepet játszó, polielektrolit típusú felületmódosító polimerek, továbbá gyógyszerhordozó polimer nanorészecskék membránaffinitását lipid modell rendszerek alkalmazásával tanulmányoztam. A penetráció mértékének tenziometrikus jellemzése mellett AFM felvételek segítségével jelenítettem meg a kölcsönhatás szerkezetmódosító hatását. A membránaffinitást mutató komponensek a lipid monoréteg rendezett szerkezetét, az egyenletes filmvastagságot nagymértékben megváltoztatják. A penetrált réteg morfológiájának változását kvantitatív módon az érdességi paraméterekkel adtam meg, amelyek a penetráció következtében több nagyságrenddel növekedtek. Az antibakteriális hatású, kationos, polielektrolit (PEI) származékok modell membránnal való kölcsönhatása nagymértékűnek adódott, és a várakozással ellentétes alkilánchossz függést mutatott. Ennek az anomális viselkedésnek a magyarázata a hidrofób komponensek unimolekulás micellaképződése lehet, amit fluoreszcencia spektroszkópiás mérésekkel igazoltam.

9. Summary

Two types of interfacial interactions with biological relevance were characterized in my work. The materials investigated are partly connected to the foreign body response in living system, the preparation of biocompatible and bioactive surfaces, and on the other hand, to the characterization of molecular interaction of antibacterial drug candidates and polymers with cells including formation of preventive coating on biomaterials.

Polylysine and its three functionalized derivatives were used to prepare bioactive surface. Physisorption and two variations of chemical coupling were used to prepare polypeptide layers on solid support for further, partly *in vivo* biological investigations. The different layers were characterized and compared under laboratory conditions. The thickness, chemical composition and structure of the surface layers were determined by photoelectron spectroscopy (XPS), quartz crystal microbalance (QCM), ellipsometry, and especially by atomic force microscopy (AFM).

It was established from the results that the immobilization of polypeptides onto solid surface by chemical coupling resulted in two or three times higher bound amount comparing to the physisorption. Furthermore, the layers were obtained as continuous and uniform films. The layers were allowed to be characterized *in situ* in hydrated state by QCM and ellipsometry. Evaluating the frequency and resonance values obtained by QCM applying three different models (Sauerbrey, Voinova, Johannsmann) it was concluded that the layers did not possess notable viscoelasticity. The branched SAKcRGD showed the largest layer thickness with a maximum adsorbed amount in the middle range of pH. The combined effect of the charge density of the polymer and its expansion state in the solution might be an explanation for that.

Membrane affinity of antibacterial drug candidates, polyelectrolyte type polymers designed for preventive coating and also drug delivery polymeric nanoparticles was investigated using lipid model systems. Besides the tensiometric determination of the degree of penetration the structural changes induced by interactions were visualized by AFM images. Components with significant membrane affinity drastically changed the ordered structure and smooth surface of uniform lipid monolayer. The variation in the surface morphology of the penetrated layer was described quantitatively by roughness parameters which increased by several orders of magnitudes due to penetration.

Antibacterial derivatives of cationic branched polyelectrolyte presented strong interaction with model lipid membrane and showed a trend with the length of alkyl chains reversed as expected. This special behaviour was explained by formation of unimolecular micelles in the case of hydrophobic compounds which was supported by fluorescence spectroscopy measurements.

10. Irodalomjegyzék

- Abe, Y.; Okazaki, Y.; Hiasa, K.; Hirata, I.; Yoshida, Y.; Taji, T.; Suzuki, K.; Okazaki, M.; Akagawa, Y. *Dent. Mater. J.* **2010**, *29*, 668–672.
- Adelmann, R.; Mennicken, M.; Popescu, D.; Heine, E.; Keul, H.; Moeller, M. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 3093–3107.
- Albrecht, T. R.; Grütter, P.; Horne, D.; Rugar, D. *J. Appl. Phys.* **1991**, *69*, 668.
- Bácskai, J.; Inzelt, G. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1991**, *310*, 379–389.
- Bajpai, A. K. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 343–357.
- Beddoes, C. M.; Case, C. P.; Briscoe, W. H. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *218*, 48–68.
- Berquand, A.; Mingeot-Leclercq, M.-P.; Dufrêne, Y. F. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2004**, *1664*, 198–205.
- Bertóti, I. A Felületvizsgálat Korszerű Módszerei. In *Műszaki felülettudomány és orvosbiológiai alkalmazásai.*; Bertóti, I.; Marosi, G.; Tóth, A., Eds.; B+V: Budapest, 2003; pp. 115–143.
- Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- Biolinscientific. Langmuir, Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaefer Technique
<http://www.biolinscientific.com/technology/l-lb-ls-technique/>.
- Birdi, K. S. *Scanning Probe Microscopes: Applications in Science and Technology*; CRC Press: Boca Raton, Fla, 2003.
- Brezesinski, G.; Möhwald, H. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100-102*, 563–584.
- Caminero, J. A.; Sotgiu, G.; Zumla, A.; Migliori, G. B. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 621–629.
- Carvalho, S. R.; Watts, A. B.; Peters, J. I.; Williams, R. O. Dry Powder Inhalation for Pulmonary Delivery: Recent Advances and Continuing Challenges. In *Pulmonary Drug Delivery*; Nokhodchi, A.; Martin, G. P., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2015; pp. 35–62.
- Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 28–60.

- Chagnard, C.; Gilbert, P.; Watkins, A. N.; Beeler, T.; Paul, D. W.
Sens. Actuators B Chem. **1996**, *32*, 129–136.
- Chen, C. Z.; Beck-Tan, N. C.; Dhurjati, P.; van Dyk, T. K.; LaRossa, R. A.; Cooper, S.
L. Biomacromolecules **2000**, *1*, 473–480.
- Chimote, G.; Banerjee, R. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2005**, *145*, 65–77.
- Choe, S.; Chang, R.; Jeon, J.; Violi, A. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4102–4114.
- Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *283*, 358–365.
- De, R. R. L.; Albuquerque, D. A. C.; Cruz, T. G. S.; Yamaji, F. M.; Leite, F. L.
Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications. In *Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale*; Bellitto, V., Ed.; InTech, Rijeka, 2012.
- Dwivedi, M. V.; Harishchandra, R. K.; Koshkina, O.; Maskos, M.; Galla, H.-J.
Biophys. J. **2014**, *106*, 289–298.
- Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira, O. N.
Adv. Colloid Interface Sci. **2001**, *91*, 221–293.
- Edvardsson, M.; Svedhem, S.; Wang, G.; Richter, R.; Rodahl, M.; Kasemo, B.
Anal. Chem. **2009**, *81*, 349–361.
- Fábián, B.; Darvas, M.; Picaud, S.; Segal, M.; Jedlovszky, P.
Phys Chem Chem Phys **2015**, *17*, 14750–14760.
- Fa, N.; Ronkart, S.; Schanck, A.; Deleu, M.; Gaigneaux, A.; Goormaghtigh, E.;
Mingeot-Leclercq, M.-P. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *144*, 108–116.
- Fan, X.; Lin, L.; Messersmith, P. B. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2443–2448.
- Gao, B.; Zhang, X.; Zhu, Y. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 531–544.
- Glomm, W. R.; Volden, S.; Halskau, Ø.; Ese, M.-H. G.
Anal. Chem. **2009**, *81*, 3042–3050.
- Goksu, E. I.; Vanegas, J. M.; Blanchette, C. D.; Lin, W.-C.; Longo, M. L. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788*, 254–266.
- Gölander, C.-G.; Kiss, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *121*, 240–253.
- Gomori, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1955; Vol. 1, pp. 138–146.

- Gyulai, G.; Magyar, A.; Rohonczy, J.; Orosz, J.; Yamasaki, M.; B osze, Sz.; Kiss, É.
Express Polym. Lett. **2016**, *10*, 216–226.
- Hac-Wydro, K.; Dynarowicz-Łatka, P.; Grzybowska, J.; Borowski, E.
Biophys. Chem. **2005**, *116*, 77–88.
- Harishchandra, R. K.; Saleem, M.; Galla, H.-J. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, S15–S26.
- Hong, S.; Bielinska, A. U.; Mecke, A.; Keszler, B.; Beals, J. L.; Shi, X.; Balogh, L.;
Orr, B. G.; Baker, J. R.; Banaszak Holl, M. M.
Bioconjug. Chem. **2004**, *15*, 774–782.
- Horváti, K.; Mező, G.; Szabó, N.; Hudecz, F.; Bősze, S. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 385–391.
- Hudecz, F.; Votavova, H.; Gaal, D.; Sponar, J.; Kajtar, J.; Blaha, K.; Szekerke, M.
Branched Polypeptides with a Poly(L-Lysine) Backbone: Synthesis,
Conformation, and Immunomodulation. In *Polymeric Materials in Medication*;
Gebelein, C. G.; Carraher, C. E., Eds.;
Springer US: Boston, MA, 1985; pp. 265–289.
- Ignatova, M.; Petkova, Z.; Manolova, N.; Markova, N.; Rashkov, I.
Macromol. Biosci. **2012**, *12*, 104–115.
- Jabłonowska, E.; Bilewicz, R. *Thin Solid Films* **2007**, *515*, 3962–3966.
- Johannsmann, D.; Mathauer, K.; Wegner, G.; Knoll, W.
Phys. Rev. B **1992**, *46*, 7808–7815.
- Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039–2044.
- Kanazawa, K. K.; Gordon, J. G. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1770–1771.
- Kang, C.-K.; Lee, Y.-S. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1389–1398.
- Kellermayer M. *Magy. Tud.* **2012**, 1055–1063.
- Kellermayer, M. S. Z. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2011**, *736*, 439–456.
- Kenawy, E.-R.; Mahmoud, Y. A.-G. *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 107–116.
- Kiss, É. *Characterization of Polymer Blends: Miscibility, Morphology and Interfaces*;
Thomas, S.; Grohens, Y.; Jyotishkumar, P., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2015.
- Kiss, É. Kardiovaszkuláris Anyagok. In *Műszaki felülettudomány és orvosbiológiai
alkalmazásai*; Bertóti, I.; Marosi, G.; Tóth, A., Eds.; B+V:
Budapest, 2003; pp. 260–277.

- Kiss, É.; Dravetzky, K.; Hill, K.; Kutnyánszky, E.; Varga, A.
J. Colloid Interface Sci. **2008**, *325*, 337–345.
- Kiss, É.; Gyulai, G.; Péntes, C. B.; Idei, M.; Horváti, K.; Bacsa, B.; Bősze, S.
Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. **2014**, *458*, 178–186.
- Kiss Éva; Csákvári Béla; Rohonczy János. Langmuir-Blodgett filmek. In *A kémia újabb eredményei*; Akadémiai K.: Budapest, 2006; Vol. 95, pp. 2–25.
- Kiss, É.; Vargha, A.; Vargha-Butler, E. I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 1575.
- Kutnyánszky, E. Addressable Macromolecular Architectures: Towards Stimuli Promoted Motion at the Nanoscale. In; Ph.D. dissertation, Enschede, 2012.
- Lamprecht, C.; Hinterdorfer, P.; Ebner, A.
Expert Opin. Drug Deliv. **2014**, *11*, 1237–1253.
- Lamprou, D. A.; Venkatpurwar, V.; Kumar, M. N. V. R. *PloS One* **2013**, *8*, e64490.
- Loose, M.; Schwille, P. *J. Struct. Biol.* **2009**, *168*, 143–151.
- MacRitchie, F. Biological Processes and Reactions. In *Chemistry At Interfaces*; Elsevier, 1990; pp. 212–240.
- Maget-Dana, R. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462*, 109–140.
- Manea, M.; Hudecz, F.; Przybylski, M.; Mező, G. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 921–928.
- Martin, S. J.; Granstaff, V. E.; Frye, G. C. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2272–2281.
- Mazia, D.; Schatten, G.; Sale, W. *J. Cell Biol.* **1975**, *66*, 198–200.
- Medical Research Council. *BMJ* **1952**, *2*, 735–746.
- Mei Jin Tan, B.; Liew, C. V.; Chan, L. W.; Heng, P. W. S. Particle Surface Roughness - Its Characterisation and Impact on Dry Powder Inhaler Performance. In *Pulmonary Drug Delivery*; Nokhodchi, A.; Martin, G. P., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2015; pp. 199–222.
- Meyer, H.; Mally, J. *Monatshefte Für Chem.* **1912**, *33*, 393–414.
- Meyers, S. R.; Grinstaff, M. W. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1615–1632.
- Meyers, S. R.; Kenan, D. J.; Khoo, X.; Grinstaff, M. W.
Biomacromolecules **2011**, *12*, 533–539.
- Mező, G.; Kajtár, J.; Hudecz, F.; Szekerke, M. *Biopolymers* **1993**, *33*, 873–885.

- Michielin, O.; Ramsden, J. J.; Vergères, G.
Biochim. Biophys. Acta **1998**, *1375*, 110–116.
- Mikromash. Probes and Cantilevers for SPM <http://www.spmtips.com>.
- Mingeot-Leclercq, M.-P.; Deleu, M.; Brasseur, R.; Dufrière, Y. F.
Nat. Protoc. **2008**, *3*, 1654–1659.
- Miñones, J.; Rey Gómez-Serranillos, I.; Conde, O.; Dynarowicz-Łatka, P.; Miñones Trillo, J. J. *Colloid Interface Sci.* **2006**, *301*, 258–266.
- Bertóti, I.; Mohai, M.; Mező, G.; Péntzes, Cs. B.; Kiss, É. Preparation and Quantitative XPS Characterization of a Bioactive Multilayer Structure, ECASIA'13, Forte Village Resort, Sardinia, Italy, October 13-18, 2013. P306
- Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 281–339.
- Nagy, I. B.; Hudecz, F.; Alsina, M. A.; Reig, F. *Biopolymers* **2003**, *70*, 323–335.
- Oya, K.; Tanaka, Y.; Saito, H.; Kurashima, K.; Nogi, K.; Tsutsumi, H.; Tsutsumi, Y.; Doi, H.; Nomura, N.; Hanawa, T. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1281–1286.
- Panyam, J.; Labhasetwar, V. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 329–347.
- ParkAFM. True Non-Contact Mode
<http://www.parkafm.com/index.php/park-afm-technology/true-non-contact-mode>.
- Pasquier, N.; Keul, H.; Heine, E.; Moeller, M. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2874–2882.
- Pasquier, N.; Keul, H.; Heine, E.; Moeller, M.; Angelov, B.; Linser, S.; Willumeit, R. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 903–915.
- Petrik, P.; Egger, H.; Eiden, S.; Agocs, E.; Fried, M.; Pecz, B.; Kolari, K.; Aalto, T.; Horvath, R.; Giannone, D. *MRS Proc.* **2011**, *1352*.
- Pickholz, M.; Oliveira, O. N.; Skaf, M. S. *Biophys. Chem.* **2007**, *125*, 425–434.
- Pignatello, R.; Guccione, S.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Giurato, L.; Lombardo, M.; Puglisi, G.; Toth, I. *Int. J. Pharm.* **2006**, *310*, 53–63.
- Preetha, A.; Huilgol, N.; Banerjee, R. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2006**, *53*, 179–186.
- Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A. R.; Balakrishnan, J.; Heine, D. R.; Minko, S. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 941–944.

- Rossi, C.; Briand, E.; Parot, P.; Odorico, M.; Chopineau, J.
J. Phys. Chem. B **2007**, *111*, 7567–7576.
- Sauerbrey, G. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206–222.
- Serrano, A. G.; Pérez-Gil, J. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *141*, 105–118.
- Sorensen, S. P. L. *Biochem. Z.* **1909**, *21*, 131–304.
- Stolnik, S.; Daudali, B.; Arien, A.; Whetstone, J.; Heald, C. .; Garnett, M. .; Davis, S. .; Illum, L. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2001**, *1514*, 261–279.
- Szabó R. Polilizin gerincű polipeptidek biológiai hatásának vizsgálata in vitro, csillós egysejtű és egér modellsejteken. In; ELTE Biológia Doktori Iskola, 2004.
- Tampere, university XPS honlap <http://www.tut.fi/en/about-tut/departments/optoelectronics-research-centre/research/surface-science/electron-spectroscopy/index.htm>.
- Tátrai, P.; Sági, B.; Szigeti, A.; Szepesi, Á.; Szabó, I.; Bösze, S.; Kristóf, Z.; Markó, K.; Szakács, G.; Urbán, I.; Mező, G.; Uher, F.; Német, K.
J. Mater. Sci. Mater. Med. **2013**, *24*, 479–488.
- Tosatti, S.; Paul, S. M. D.; Askendal, A.; VandeVondele, S.; Hubbell, J. A.; Tengvall, P.; Textor, M. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4949–4958.
- Unsworth, L. D.; Sheardown, H.; Brash, J. L. *Langmuir* **2008**, *24*, 1924–1929.
- Vasir, J. K.; Labhasetwar, V. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4244–4252.
- Voinova, M. V. *J. Sens. Sens. Syst.* **2015**, *4*, 137–142.
- Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Phys. Scr.* **1999**, *59*, 391–396.
- Waschinski, C. J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J. C.
Macromol. Biosci. **2005**, *5*, 149–156.
- Whitehouse, D. J.; Whitehouse, D. J. *Handbook of Surface and Nanometrology*; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2011.
- WHO. Global tuberculosis report
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1.
- Yameen, B.; Choi, W. I.; Vilos, C.; Swami, A.; Shi, J.; Farokhzad, O. C.
J. Controlled Release **2014**, *190*, 485–499.

Yang, C.; Cheng, K.; Weng, W.; Yang, C.

J. Mater. Sci. Mater. Med. **2009**, *20*, 2349–2352.

Zhao, H.; Lappalainen, P. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2823–2830.

Zhao, L.; Feng, S.-S. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *300*, 314–326.

Progress in Adhesion and Adhesives; Mittal, K. L., Ed.; John Wiley and Sons, Inc: Hoboken, New Jersey, 2015.

In *Colloids in drug delivery*; Fanun, M., Ed.; Surfactant science series; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2010.

Handbook of Ellipsometry; Tompkins, H. G.; Irene, E. A., Eds.; William Andrew Pub. ; Springer: Norwich, NY ; Heidelberg, Germany, 2005.

Soil Analysis: Handbook of Reference Methods; Benton, J., Ed.; St. Lucie Press: Boca Raton, Fla, 2000.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- K. Hill, Cs. B. Péntzes, D. Schnöller, K. Horváti, Sz. Bősze, F. Hudecz, T. Keszthelyi, É. Kiss:*
Characterization of the membrane affinity of an isoniazide peptide-conjugate by tensiometry, atomic force microscopy and sum-frequency vibrational spectroscopy, using a phospholipid Langmuir monolayer model
Phys. Chem. Chem. Phys., **2010**, *12*, 11498–11506. IF: 3.453 (20%)
- Gyulai G, Péntzes CsB, Mohai M, Lohner T, Petrik P, Kurunczi S, Kiss É.:*
Interfacial properties of hydrophilized poly(lactic-co-glycolic acid) layers with various thicknesses.
J Colloid Interf Sci., **2011**, *362* (2), 600-606. IF: 3,070 (10%)
- D. Schnöller, Cs. B. Péntzes, K. Horváti, Sz. Bősze, F. Hudecz, É. Kiss:*
Membrane affinity of new antitubercular drug candidates using a phospholipid Langmuir monolayer model and LB technique
Prog. Colloid Polym. Sci., **2011**, *138*,131-138. IF: 2.331 (20%)
- É. Kiss, D. Schnöller, K. Pribranská, K. Hill, Cs. B. Péntzes, K. Horváti, Sz. Bősze:*
Nanoencapsulation of antitubercular drug isoniazid and its lipopeptide conjugate
J. Dispers. Sci., **2011**, *32*, 1728-1734. IF: 0.560 (25%)
- Kiss É, Heine ET, Hill K, He YC, Keusgen N, Péntzes CsB, Schnöller D, Gyulai G, Mendrek A, Keul H, Möller M.:*
Membrane affinity and antimicrobial properties of polyelectrolytes with different hydrophobicity.
Macromolecular Bioscience, **2012**, *12* (9), 1181–1189. IF:3,472 (15%)
- Cs. B. Péntzes, D. Schnöller, K. Horváti, Sz. Bősze, G. Mező, É. Kiss:*
Membrane affinity of antitubercular drug conjugate using lipid monolayer containing mycolic acid
Colloids Surf. A, **2012**, *413*, 142– 148. IF: 2.236 (80%)
- Gyulai G, Péntzes CsB, Mohai M, Csempesz F, Kiss É.:*
Influence of surface properties of polymeric drug delivery nanoparticles on their membrane affinity. *Eur Polym J.*, **2013**, *49* (9), 2495-2503. IF: 2,562 (20%)
- Kiss É, Gyulai G, Péntzes CsB, Idei M, Horváti K, Bacsa B, Bősze Sz.:*
Tuneable surface modification of PLGA nanoparticles carrying new antitubercular drug candidate.
Colloids Surfaces A, **2014**, *458*, 178-186. IF: 2,752 (30%)

Az értekezés témájához kapcsolódó további közlemények

Hill K., **Pénzes Cs. B.**, Bősze Sz., Horváti K., Hudecz F., Vértessy B., Golmusz V., Kiss É.: Mycobacterium tuberculosis elleni új hatóanyag-jelöltek és hatóanyag-konjugátumok lipiddel való kölcsönhatásának vizsgálata egyrétegű membrán modell segítségével. XIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, **2007**, pp.40-43., ISSN 1843-6293

Pénzes Csanád Botond: Antituberkulotikumok vizsgálata modell sejtmembrán rendszeren AFM és Langmuir-mérleges módszerrel

XXXII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2009. október 26-28., pp.129-133.,

ISBN 978 963 482 969 0

Cs. B. **Pénzes**, M. Mohai, G. Mező, I. Szabó, Sz. Bősze, É. Kiss: Chemical and morphological characterization of polypeptide layers deposited for directed cell attachment European Cells and Materials **2010**, 20, (S3), pp.199., ISSN 1473-2262

G. Gyulai, Cs. B. **Pénzes**, P. Petrik, T. Lohner, É. Kiss: Wettability and protein adsorption properties of biodegradable polymeric nanolayers

European Cells and Materials **2010**, 20, (S3), pp.98., ISSN 1473-2262

Gyulai G., **Pénzes Cs. B.**, Petrik P., Lohner T., Kurunczi S., Kiss É.: Polimer nanorétegek felületi és fehérjeadszorpció tulajdonságainak jellemzése

XXXIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2010.október 25-27., pp.60-63.,

ISBN 978-963-315-020-7

Pénzes Csanád Botond, Schnöller Donát, Kobzi Balázs, Bősze Szilvia, Horváti Kata, Mező Gábor, Kiss Éva: Tuberkulózis elleni új hatóanyagok hatása A sejtmembrán szerkezetére MKE 1. Nemzeti konferencia, Program és előadás összefoglaló 2011.05.22-25., pp.269., ISBN 978-963-9970-11-3

G. Gyulai, **Cs. B. Pénzes**, É. Kiss:

Adjusting the surface properties of drug delivery polymeric nanoparticles

In: Gyarmati Benjámin Sándor, Sudár András, Szilágyi András (szerk.)

Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales: "Smart, Nanostructured Systems for Controlled Molecular Release and Biological Interfaces". Konferencia helye, ideje: Siófok, Magyarország, 2012.06.03-2012.06.06. Budapest: Budapest University of Technology and Economics, 2012., pp.132., ISBN:978-963-313-056-8

G. Gyulai, **Cs. B. Pénzes**, F. Csempesz, É. Kiss:

Surface properties and membrane affinity of drug delivery polymeric nanoparticles

In: 10th Conference on Colloid Chemistry: Innovative systems for sustainable development.

Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2012.08.29-2012.08.31. Budapest: Magyar Kémikusok Egyesülete, 2012., pp.94., ISBN:978-963-9970-26-7

É. Kiss, G. Gyulai, **Cs. B. Péntzes**, D. Schnöller, B. Kobzi, M. Kabai-Faix, Z. Hórvölgyi:
Membrane affinity in delivery of bioactive components
In: Gyarmati Benjámin Sándor, Sudár András, Szilágyi András (szerk.)
Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales: "Smart, Nanostructured Systems
for Controlled Molecular Release and Biological Interfaces". Konferencia helye, ideje: Siófok,
Magyarország, 2012.06.03-2012.06.06. Budapest: Budapest University of Technology and
Economics, 2012., pp.62., ISBN:978-963-313-056-8

Cs. B. Péntzes, G. Gyulai, K. Sliwa, E. Heine, H. Keul, M. Moeller, É. Kiss:
Evaluation of membrane affinity of novel antimicrobial polymers
In: 10th Conference on Colloid Chemistry: Innovative systems for sustainable development.
Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2012.08.29-2012.08.31. Budapest: Magyar
Kémikusok Egyesülete, 2012., pp.104., ISBN:978-963-9970-26-7

Cs. B. Péntzes, G. Gyulai, M. Kabai-Faix, Z. Hórvölgyi, É. Kiss:
Visualisation of interactions of nanoparticles with cell membrane in model systems
In: Gyarmati Benjámin Sándor, Sudár András, Szilágyi András (szerk.)
Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales: "Smart, Nanostructured Systems
for Controlled Molecular Release and Biological Interfaces". Konferencia helye, ideje: Siófok,
Magyarország, 2012.06.03-2012.06.06. Budapest: Budapest University of Technology and
Economics, 2012., pp.135., ISBN:978-963-313-056-8

Gyulai G., **Péntzes Cs. B.**, Csempeš F., Horváti K., Bősze Sz., Kiss É.:
Surface properties of nanoparticulate PLGA drug carriers
In: Kasza Gy (szerk.)
International Conference on Bio-Friendly Polymers and Polymer Additives: From Scientific
Aspects to Processing and Applications: Program and Book of Abstracts. Konferencia helye,
ideje: Budapest, Magyarország, 2014.05.19-2014.05.21. Budapest: Palatinus, 2014., pp. 57.,
ISBN:978-963-08-9492-0

Kiss É., Gyulai G., **Péntzes Cs. B.**, Horváti K., Bősze Sz.:
PLGA nanoparticles for advanced drug delivery
In: Kasza Gy (szerk.)
International Conference on Bio-Friendly Polymers and Polymer Additives: From Scientific
Aspects to Processing and Applications: Program and Book of Abstracts. Konferencia helye,
ideje: Budapest, Magyarország, 2014.05.19-2014.05.21. Budapest: Palatinus, 2014., pp. 19.,
ISBN:978-963-08-9492-0

Péntzes Cs. B., Gyulai G., Varga A., Kurunczi S., Petrik P., Lohner T., Kiss É.:
Improvement of surface biocompatibility of PLGA
In: Kasza Gy (szerk.)
International Conference on Bio-Friendly Polymers and Polymer Additives: From Scientific
Aspects to Processing and Applications: Program and Book of Abstracts. Konferencia helye,
ideje: Budapest, Magyarország, 2014.05.19-2014.05.21. Budapest: Palatinus, 2014., pp.50.,
ISBN:978-963-08-9492-0

Előadások (orális):

Pénzes Csanád Botond:

Mycobacterium tuberculosis elleni hatóanyag-jelöltek vizsgálata egyrétegű membrán modell segítségével

ELTE TTK, Kémia TDK Konferencia, 2007. 11.

XXIX. OTDK, Kémiai és Vegyipari Szekció, Debrecen, 2009. 04. 06-08.

Prezentációs-díj és verseny, Budapest, Magyar Tudományos Akadémia, 2009. 06. 08.

K. Hill, Cs. B. **Pénzes**, Sz. Bősze, K. Horváti, F. Hudecz, É. Kiss:

Characterization of new antitubercular drug candidates-phospholipid interaction by Langmuir balance technique

9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, 2007. 10. 5-7., Abstr. pp.59.

Hill K., **Pénzes** Cs. B., Szabó G., Horváti K., Bősze Sz., Hudecz F., Szabadka Z., Grolmusz V., Varga B., Vértessy B., Kiss É.:

Mycobacterium tuberculosis túléléséhez elengedhetetlen fehérjéket gátló, in silico meghatározott ligandok és izoniazid-konjugátumok lipiddel való kölcsönhatásának vizsgálata monorétegekben

MTA Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2007. 06. 05.

K. Hill, Cs. B. **Pénzes**, Sz. Bősze, K. Horváti, F. Hudecz and É. Kiss:

Characterization of new antitubercular drug candidates-phospholipid interaction by Langmuir balance technique,

ETH Zürich, Svájc, 2008. 03.

Kiss É., Hill K., **Pénzes** Cs., Schnöller D., Bősze Sz., Horváti K., Hudecz F., Keszthelyi T.:

Potenciális antituberkulotikumok kölcsönhatása lipid monoréteggel

MTA Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes 2009. 05. 26-28.

Keszthelyi Tamás, Kiss Éva, Hill Katalin, **Pénzes** Csanád, Schnöller Donát, Bősze Szilvia, Horváti Kata, Hudecz Ferenc:

Potenciális antituberkulotikum és lipid monorétegek kölcsönhatásának vizsgálata összefrekvencia-keltési spektroszkópiával

Kutatóközponti Tudományos Napok, Budapest, 2010. 11. 23.

Pénzes Csanád Botond, Dr. Kiss Éva:

Biológiai jelentőségű felületi rétegek morfológiájának tanulmányozása

VII. Magyar SPM találkozó, Szeged, 2011. 05. 26.

Előadások (poszter):

- K. Hill, Sz. Bősze, K. Horváti, F. Hudecz, Cs. B. **Pénzes**, G. Szabó, É. Kiss:
Molecular interaction between membrane lipid and antibacterial peptide conjugates related to enhanced drug transport
ESF Research Conference, ESF-EMBO Conference on Biological Surfaces and Interfaces, Sant Feliu, Spanyolország, 2007.06.01-06.
ELTE Innovációs Nap, Budapest, 2010. 03. 03.
- K. Hill, Cs. B. **Pénzes**, D. Schnöller, K. Horváti, Sz. Bősze, T. Keszthelyi, É. Kiss:
Interaction of antitubercular drug-conjugates with lipid monolayer studied by SFG and tensiometry
ESF-EMBO Symposium on Biological Surfaces and Interfaces, Saint Feliu de Guixols, 2009.
- K. Hill, Cs. B. **Pénzes**, K. Horváti, Sz. Bősze, T. Keszthelyi, É. Kiss:
Application of cell membrane model to assess the penetration ability of drug and drug-conjugates
EuroNanoMedicine Conference, Bled, 2009. 09. 28-30. Abstr. pp.158.
- K. Hill, Cs. **Pénzes**, D. Schnöller, F. Hudecz, K. Horváti, Sz. Bősze, T. Keszthelyi, É. Kiss:
Interaction of antitubercular drug candidates with lipid monolayer studied by SFG and tensiometry and AFM
Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Budapest, 2009. 06. 24-27.
- Kiss É., Pribranská K., Schnöller D., **Pénzes** Cs. B., Hill K., Horváti K., Bősze Sz.:
Membrane affinity and nanoencapsulation of antitubercular drugs and drug conjugates
FormulaVI (Nanoformulation 2010), Stockholm, 2010.06.09-2010.06.11., pp. 5.
- K. Horváti, K. Pribranska, D. Schnöller, Cs. B. **Pénzes**, N. Szabó, G. Mező, É. Kiss, Sz. Bősze:
Lipopeptide based approach for specific delivery of antitubercular drug isoniazid
International Conference on Antimicrobial Research, Valladolid, 2010. 11. 03-05.
- Pénzes** Cs. B., Schnöller D., Kobzi B., Bősze Sz., Horváti K., Mező G., Kiss É.:
Effect of new antitubercular drugs on the structure of the cell membrane models
EuroNanoForum, Budapest, 2011. 05. 30 - 06. 01.
- Cs. B. **Pénzes**, D. Schnöller, Sz. Bősze, K. Horváti, G. Mező, É. Kiss:
Membrane affinity of antitubercular drug candidates
25. ECIS, Berlin, 2011. 09. 03-09.
- É. Kiss, Cs. B. **Pénzes**, G. Gyulai:
Integration of emerging soft nanotechnology into the functionalisation of textiles
Innovation Convention 2011, Brussels, 2011. 12. 05-06.
ELTE Innovációs Nap, Budapest, 2012. 02. 23.

É. Kiss, Cs. **B. Péntzes**, G. Gyulai:

Membrane affinity of antibacterial polymers

ALTENPFLEGE 2012 "To introduce the new technology to the healthcare market",
Hannover, 2012.03.27-2012.03.29.

É. Kiss, Cs. **B. Péntzes**, G. Gyulai:

Membrane affinity of antibacterial polymers

European Technology Platform (for the future of textiles and clothes),
Brussels, Belgium, 2012.03.29-2012.03.30.

G. Gyulai, **Cs. B. Péntzes**, K. Sliwa, E. Heine, H. Keul, M. Moeller, É. Kiss:

Novel Antibacterial Polymers with Enhanced Membrane Affinity

NanoFormulation 2012., Barcelona, 2012.05.28-2012.05.31. pp. 103.

Cs. B. Péntzes, G. Gyulai, K. Pribansky, K. Horváti, Sz. Bösze, É. Kiss:

AntiTB drug conjugates encapsulated into PLGA nanoparticles

NanoBioMed DECHEMA Conference 2012., Frankfurt, 2012 pp. 86.

G. Gyulai, **Cs. B. Péntzes**, K. Sliwa, E. Heine, H. Keul, M. Moeller, É. Kiss:

Interaction of antibacterial polymers with lipid nanolayers

NanoBioMed DECHEMA Conference 2012., Frankfurt, 2012. pp. 85.

Gyulai G., **Péntzes Cs. B.**, Dobrádi A., Szabó R., Bösze Sz., Kiss É.: Surface modification of
drug carrier PLGA nanoparticles to enhance their cell membrane affinity

Formula VII. Mullhouse, 2013.07.01-04.

Bertóti I., Mohai M., Mező G., **Péntzes Cs. B.**, Kiss É.: Preparation and Quantitative XPS

Characterization of a Bioactive Multilayer Structure,

ECASIA'13, Forte Village Resort, Sardinia, 2013. 10. 13-18, P306

Egyéb közlemény

M. Ujvári, S. Vesztergom, Cs.B. **Péntzes**, G.G. Láng:

Changes of the interfacial stress with electrode potential in the Ru|0.1 M perchloric acid system

Electrochemistry Communications, **2013**, 28, 111-113

IF: 4,287

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához**I. A doktori értekezés adatai**

A szerző neve: Pénzes Csanád Botond

MTMT-azonosító: 10028640

A doktori értekezés címe és alcíme:

Membránalkotók, gyógyszerhatóanyagok, biopolimerek összetett struktúráinak vizsgálata felületjellemzési módszerekkel

DOI-azonosító³⁹ 10.15476/ELTE.2016.009

A doktori iskola neve: Kémiai Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve:

Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Kiss Éva, PhD, DSc

A témavezető munkahelye: Eötvös Loránd Tudományegyetem

II. NyilatkozatokA doktori értekezés szerzőjeként⁴⁰

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Tudományszervezési és Egyetemközi Kapcsolatok Osztályának ügyintézőjét hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴¹

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴²

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.⁴³

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2016.02.01.


a doktori értekezés szerzőjének aláírása

³⁸ Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII.1. napjától.

³⁹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

⁴⁰ A megfelelő szöveg aláhúzendő.

⁴¹ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴² A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

⁴³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.