

Válasz Tombácz Etelkának az MTA doktorának disszertációmról készített bírálatában feltett kérdéseire és megjegyzéseire

Tisztelt Professzor nő!

Először bírálatában feltett kérdéseire válaszolok majd a bírálatban megfogalmazott észrevételekkel kapcsolatban fejtem ki véleményemet.

1. A Synperonic A7-víz rendszer in situ tanulmányozásához kapcsolódóan. Hogyan állítja elő a mintákat? Milyen mechanikai behatás érte őket a nyírási vizsgálatok előtt? Hogyan biztosította, hogy a minták azonos nyírási állapotban legyenek a vizsgálatok előtt?

A 80 (m/m)%-os Synperonic A7-víz rendszer készítésének módja (hasonlóan a többi, ettől eltérő koncentrációk esetében is):

Zárható üvegbe 0,1%-os pontossággal bemértünk 16 g, előzőleg kb. 40°C-os vízfürdőn megolvasztott Synperonic A7-et (gyártó: ICI Surfactants, Brüsszel, Belgium), majd 4 g desztillált vizet. Az üvegbe teflonborítású mágnes magot tettünk, majd 50 °C-os vízfürdőn 15 percig kevertettük. Ezután a mágnes magot kivettük és az oldatot a kevertetéskor belekerült levegőbuborékok eltávolítása érdekében 3 percig 3000-es fordulatszámon MLW típusú laboratóriumi centrifugán forgattuk. Az így elkészült A7-víz rendszer közel üvegszerűen átlátszó, krém- vagy zselészerű. A mintát felhasználás előtt legalább egy hétig szobahőmérsékleten állni hagytuk, további tárolása is szobahőmérsékleten, fénytől elzárva történt. A mintatartó üvegből széles fejű spatulával, lassú mozdulattal a szendvics cellára kentük és lefedtük. A kisszőgű szórásgörbén megfigyelhető Bragg reflexió szélessége és magassága alapján ellenőrizhető volt a minta rendezettsége. Ezt az állapotot a hasonló módon betöltött és fagyasztva tört minták elektronmikroszkópos felvételein is tapasztaltuk.

2. A 89. ábrán (116. o.) a DPPE-DPPG rendszerre 40 és 70 °C között mért szórásgörbéket mutat be. A modell-membránok tanulmányozásánál miért tért el ilyen jelentősen a választott hőmérséklet intervallum a biológiai rendszerekkel releváns tartománytól?

A magas hőmérséklet választásának fizikai-kémiai okai vannak. A hőmérséklet növelésével a rendszerben fázisátmenet zajlik le, amely a lipidek effektív alakváltozásával valamint az egész rendszer szerkezetbeli átalakulásával jár. A kikényszerített fázisátalakulással az alacsonyabb hőmérséklettartományban vizsgált (általában gél fázisban lévő) szerkezet mellett a magasabb hőmérsékletre tartozó (általában folyadékkristályos) szerkezet jellemzését is elvégezhetjük, így a szerzett információk összessége az effektusok értelmezését könnyíti meg (például a magasabb hőmérsékleti tartományban a szénláncok pakolódása szimmetrikussá válik, a lipidek alakja megváltozik, így a változások fényében nemcsak a magasabb, hanem az alacsonyabb fázisbeli szerkezeti változások is értelmezhetőek). Ezen felül a magas hőmérséklet biológiai rendszerek szempontjából sem irreleváns. Például a bakteriális lipid rendszereknél a 60 °C feletti hőmérséklet a sterilizálással járó változásokat érinti. A baktériumok külső plazmamembránjában a fő lipid komponens a DPPE. Baktériumokból preparált membránképletek termikus vizsgálatánál tapasztaltuk, hogy a membrán fehérjék denaturálódását a lipid kettősréteg fázisátalakulása előzi meg, a két folyamat széles hőmérséklet tartományban (62 – 70°C) következik be.

3. *Mennyire közelíti a 10 mM PBS a biológiai miliőt vagy csak akár a fiziológiás körülményeket?*

A fiziológiás körülmények változatosak, a vizsgálat célja, a szöveti környezet dönti el, hogy melyik puffer használata a célszerű. A fiziológiai kísérletek során korábban acetát, citrát, borát, karbonát, foszfát puffer rendszereket használtak 10 mM koncentrációban, később elterjedtek a nem természetes pufferek (pl. TRIS, HEPES). A puffer rendszerek koncentrációja a „hatóanyagra” vonatkozik, tehát a 10 mM koncentrációjú oldat 10 mM Na_2HPO_4 mellett 2 mM KH_2PO_4 -et és az izotóniás körülmények biztosításához 137 mM NaCl-ot, valamint 2,7 mM KCl-ot tartalmaz (vannak olyan PBS pufferek is, amelyek kalcium vagy magnézium sókat is tartalmaznak, ezeket külön feltüntetik). A PBS nem minden esetben tartalmaz NaCl-t (ez nem izotóniás PBS puffer).

Az izotóniás PBS jól közelíti a fiziológiás körülményeket. A disszertációmban leírt esetekben különböző puffer rendszerek szerepelnek. Az alap fiziko-kémiai kölcsönhatások megismerése céljából olyan rendszereket vizsgáltam, amelyek preparálásához tiszta vizet használtam fel. Ez egy ideális állapot lenne a lipid és egyéb vendégmolekulák által kiépített szerkezetek és azok atomi léptékű részleteinek megismeréséhez. Sajnos a vizsgálatokhoz beszerzett és költséges lipidek (természetesen egyéb komponensek is) tisztasága korlátozott. A lipidek tisztasága 99,5 %. A 0,5 % -t megközelítő egyéb lipidek (esetleg nyomnyi mennyiségben visszamaradt gyártásközi intermedierek) a mezomorf fázisok szerkezeti és termikus jellemzőit befolyásolja (Bóta et al. C & S A. 1998; 141(3):441-448., Langmuir 1999; 15(9):244-250.). A nyomnyi szennyezők (a vendégmolekulákkal bevitt szennyezőket is figyelembe véve) hatásának ellensúlyozására nem izotóniás puffereket használtam (TRIS, PBS). Biológiai, orvosi felhasználást célzó (pl. sztérikusan stabilizált vezikulákkal kapcsolatos) vizsgálatok esetében izotóniás PBS puffert használtam.

4. *Hogyan változik az ikerionos fejcsoportot tartalmazó DPPC töltés állapota a pH-val a vizsgált pH-tartományban?*

A hidratált molekula nettó töltése zérus. A DPPC, mint a legtöbb lecitin, a pH 4 - 8 tartományban tekinthető semleges molekulának (E. Chain, I. Kemp, Biochem. J. 28(6) (1934) 2052-2055). A DPPC izoelektromos pontja 6,5 és 7,5 között van az alkalmazott és biológiailag releváns puffer rendszerekben. A pH értékének csökkenésével (pH <4) a DPPC töltése pozitív, míg a lúgos tartományban (pH >8) negatív lesz. A disszertációban szereplő, a hidratált DPPC molekula által felépített szerkezetek vizsgálatához kapcsolódó kísérleteknél semleges pH tartományt állítottam be, tiszta vizet vagy puffer rendszereket (PBS, TRIS) használtam fel. Ugyanakkor figyelembe kell venni azt is, hogy a savas és a lúgos közegben is hidrolízis következhet be, amelynek mértéke a pH értékétől, az összekeverést követő időtartamtól és a hőmérséklettől függ. Ennek hatásával két esetben számoltam: a hidratált, sztérikusan stabilizált polialmasav-DPPC , valamint a CuO nanorészecskéket tartalmazó lipid rendszer esetében.

Bírálom „Milyen hatása van az elektrolitoknak?” kérdését úgy értelmezem, hogy az a hidratált DPPC molekulák sokasága, azaz a kettősréteg és az elektrolitok közötti kölcsönhatásra vonatkozik. Továbbá az elektrolitokat a fémsók esetére szűkítem.

A DPPC molekulák (molekuladinamikai számításokból jól ismert) térszerkezete olyan, hogy a fejcsoport kolin része a zsírsavláncok régiójához áll közelebb, míg a negatív töltésű foszfát csoport a rétegnormális irányában kifelé áll. Ennek következtében a hidratált foszfolipidek felszíne a pozitív töltésű kationokat, fémionokat adszorbeálja. A kationok fejcsoporttal történő kölcsönhatása erős, annak mértéke a különböző kationok (fémionok) tulajdonságaitól (döntően töltéssűrűségétől) függ. Az egyértékű fémionok gyengébben a kétértékű fémionok erősebben kötődnek (evvel kapcsolatosan a Hofmeister effektushoz tartozó ionok hatását, különösen adott kation esetében (pl. Na^+) az ellenionok fajtáinak szerepét kell említeni). Az egyértékű fémionok, különösen extrém magas, biológiailag nem releváns koncentráció tartományban általában a rétegperiódus változását okozzák. A változások mértékét figyelembe véve a mi laboratóriumi berendezésünk feloldása nem elégséges, ezért ilyen jellegű vizsgálatokat nem végeztem. Kétértékű fémionok a rétegrendszer szétcsatolódását eredményezik, ezen felül (a lipidek biológiailag releváns hőmérséklettartományában) a kettősrétegek síkjában a felület periodikus mintázatában is perturbációt idéznek elő. Kétértékű és egyértékű fémionok együttes jelenlétében a kétértékű ionok hatását az egyértékű ionok leárnnyékolják. A rézionok fejcsoport közeli, pontos, atomi léptékű leírását a kisszögű szórással nem lehet elvégezni. A Cu^{2+} ionra vonatkozó rezonáns görbék csak a kezdeti szórési tartományban voltak mérhetőek, ami arra mutat, hogy a Cu^{2+} ionok (pontosabban azok többsége) a szétcsatolt kettősrétegek közötti térrészben található (disszertáció 140. oldal). Cd^{2+} ionok esetében egyértelmű az eredmény; azok a fejcsoportok felületén és a szétcsatolt rétegek között helyezkednek el (disszertáció 119. ábra, A, betétábrája, a határozottabb effektus a Cd^{2+} ion nagyobb anomális effektusának következménye). A Cu^{2+} és Cd^{2+} ionok a kettősrétegek közötti kölcsönhatásában okozott változások szélesebb körű vizsgálatával Varga Zoltán Ph.D. munkája keretében foglalkozott (disszertációban idézett [215] irodalom: Varga Zoltán: Structural perturbations in phospholipid model membrane systems: The effects of dihalogenated phenol compounds and metal ions, Ph.D. dolgozat és tézis, 2009). Ebben a munkában a kisszögű röntgenszórás és anomális kisszögű röntgenszórás mellett molekula dinamikai számításokat és DSC valamint fagyaszttvöréssel kombinált elektronmikroszkópos módszereket alkalmaztunk. A CuCl_2 és $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ rétegrendszerre gyakorolt hatását vizes valamint TRIS puffer rendszerekben tanulmányozta, továbbá a NaCl jelenlétének hatását is nyomon követtük. A NaCl 0,5 M koncentrációban ($\text{Cu}^{2+}/\text{DPPC}=0,05$ arány esetében tanulmányozva) megszünteti a rétegek szétcsatolódását, amit az 5. rendben jelentkező Bragg reflexiók is tanúsítanak. Ezen felül az anomális kisszögű röntgendiffrakcióval a Cu^{2+} ionok periodikus rétegszerű elhelyezkedését is bizonyította. A Cu^{2+} ionok fejcsoportjához való kötődésével a szomszédos rétegek között elektrosztatikus taszítás lép fel. Varga Zoltán Goldstein elméleti munkájára alapozva megmutatta, hogy az elektrosztatikus taszítás nagyobb, ha a felület hullámos. Megállapította, hogy az előátmenet és szétcsatolódás együtt jár (disszertáció: 113. ábra, és [236]: J. Phys. Chem. B 2008;112:8430-8434). Értelmezte az előátmenet hőmérsékletének, a Cu^{2+} ionok jelenlétében megfigyelhető csökkenését. Megállapította, hogy a CuCl_2 és a TRIS-Cu(II) komplex jelenléte egyaránt a rétegek szétcsatolódásához vezet. A TRIS-Cu(II) komplexszel kapcsolatos munkánkat 2009 után folytattuk és a korábbi eredményeket pontosítottuk (az eredmények ismertetésére külön részben térek ki).

5. *A 2%-s polialmasav/DPPC rendszerrel kapcsolatban. Hová tud kitapadni az anyag? Hogy kerül a koleszterin a kettősrétegbe? Mekkora a vezikulák?*

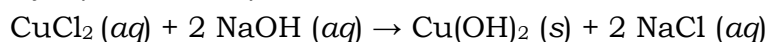
Az összeállított rendszert (lipidet, PEG láncsal kapcsolt lipidet, koleszterint tartalmaz, közegeként vagy tiszta vizet vagy puffert használtunk), a felsorolt komponensek összegére vonatkoztatva 1 – 2 tömeg%-s koncentrációban készítettük. Ez egy szokásos, elterjedt koncentráció.

A mintát hőtornával, rázással homogenizáltuk. A kialakuló vezikulák formája különböző és mérete inhomogén eloszlású volt. Első lépésben 200, majd 100, és végül 80 μm pórusátmérőjű polikarbonát szűrőn (ez egy vékony, fehér hártya, ami egy vékony fóliadarabra hasonlít) nyomtuk át az acélból készített extrúderen, nagynyomású nitrogéngáz segítségével. A kitapadás a szűrő felületén következett be. Az egyrétegű (unilamellás) vezikulák készítéséhez a koleszterin felhasználása triviális. Erre a disszertációmban a 3.2.4.3 *Vezikulák, mint nanohordozók* pontban egy saját közleményt, a [129] -t adtam meg, a 4.6.2.4 *Foszfolipidek* pontban, mint „kiegészítő anyagok, pl koleszterin”-re, valamint a 5.2.7 *Polialmasavat tartalmazó egyrétegű vezikula jellemzése* pontban „sztérikusan stabilizált liposzómák készítésénél szokásos komponenseket, arányokat felhasználva” (disszertáció 130. oldal) megfogalmazásokkal utaltam.

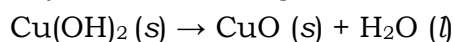
A polialmasavat tartalmazó, többségében egyrétegű vezikulák sugara (R_0 -al jelölve) a kisszőgű görbe illesztése alapján $R_0=33,7 \pm 0,4$ nm. A 3. táblázatban tévesen, [Å] egységben szerepel.

6. Az 5.3. *Nanoreaktorok* pontban a Cu^{2+} ionok hatását vizsgálja a DPPC/víz rendszerekben kialakuló rétegszerkezetre, majd lúg hozzáadásával $\text{Cu}(\text{OH})_2$ és CuO nanorészecskéket állít elő a lamellák közötti terekben; továbbá a CdS nanorészecskék kialakulását vizsgálja DPPC/víz alapú liposzómákban és Synperonic A7/víz rendszerekben. ...A vizsgált rendszerekben milyen kémiai folyamatok valószínűsíthetők?

Az (aq)-val jelölt hidratált formák a disszociált formákat jelölik, kiinduláskor a Cu^{2+} ionok a fejcsoportoknál helyezkednek el.

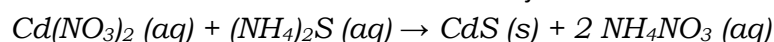


majd a rendszert melegítettük:



Az első, idevonatkozó közleményben csak a nanorészecskék formálódásának tényét tudtuk megállapítani ([238] Bóta: J. Appl. Cryst. 2007; 40: 259-263). A további vizsgálatok során a lipid rendszerből etanol alkalmazásával kimostuk a részecskéket és tű alakú, a CuO -ra jellemző morfológiájú részecskéket figyeltünk meg elektronmikroszkóp segítségével.

A Cd^{2+} ionokat tartalmazó rendszerben lezajló reakció:



7. A CdS nanorészecskék vizes DPPC ill. Synperonic A7 rendszerekben történő előállításával kapcsolatban. Mi befolyásolja valójában a primer nanorészecskék méretét, morfológiáját?

A hidratált DPPC rendszer esetében monoform, közel gömb alakú részecskék kialakulását figyeltük meg. 0,01 és 0,05 Cd^{2+} /DPPC molarányú rendszerekkel végeztem kísérleteket, de megbízható anomális effektust csak a nagyobb Cd^{2+} /DPPC arány esetében nyertem. A disszertáció 119. és 120. ábráján mutattam be a modell-elképzelésemet. Valószínűsítem, hogy a prekursor tartalmazó domének egymástól függetlenek és kiterjedésük hasonló, ami alakra és méret nézve relatíve hasonló részecskék kialakulását biztosítja.

Synperonic A7 alkalmazásával heterogénebb alakú és méretű részecskék keletkeztek. Azt tapasztaltam, hogy a rendszer réteges szerkezetében a Cd^{2+} /Synperonic A7 arány, a réteges szerkezet állapota (=töredezettsége: a rétegek halmazából álló domének redukált vastagsága és redukált laterális kiterjedése) valamint a rendszerre kifejtett külső nyírás befolyásolja a részecskék méretét és

morfológiáját. A nanoreaktorok „falai”, a reakció térrészeket egymástól elválasztó hidratált kettősrétegek hálózata valószínűleg megakadályozza, hogy nagyobb méretű egykristályok alakuljanak ki és vagy a kicsiny méretű nanocsírák összenőjenek (disszertáció 130. oldal).

Az általános észrevételekkel kapcsolatban:

A disszertáció a kisszögű röntgenszórás alkalmazását tárgyalja különböző kolloid rendszerek esetére. A kisszögű szórás, mint módszernek a lehetőségei kerültek bemutatásra. A rendszerek előállítása, részletes bemutatása nem volt célom. A disszertáció így is „terjedelmes” jelzöt kapott. Ha a bírálóm véleményét szem előtt tartottam volna, akkor annak terjedelme 30- 50 oldallal lett volna több. Evvel párhuzamosan a kisszögű szórás, mint módszer ismertetése kisebb súllyal szerepelne. (Disszertációm másik két bírálója inkább további kisszögű szórással kapcsolatos elméleti és gyakorlati problémák kifejtését látta volna szívesen, ami az én eredeti szándékomhoz is közelebb esik.) Elismerem, hogy a megfogalmazott problémák, feltett kérdések fontosak, de a disszertáció szempontjából marginális jellegűek. Az ismertetett rendszerekkel kapcsolatos eredmények egy kivételével már közlésre kerültek. Közleményeim hivatkozásaiban szerepelnek azok a munkák, amelyek a hiányolt részleteket tárgyalják. Az elektrolitokkal kapcsolatos, bírálóm által leírt problémák megoldására a kisszögű röntgenszórás (anomális kisszögű röntgenszórás/diffrakció) csak (erősen) korlátozott mértékben alkalmas, amit bírálóm meg is jegyzett („A használt módszerek nem alkalmasak a kémiai változások kimutatására.”). Ugyanakkor tény, hogy a tárgyalt rendszerekben elosztatott fém ionokból kompakt nanorészecskék állíthatók elő és azok a kisszögű röntgenszórás módszerével hatékonyan vizsgálhatók (különösen alkalmas az anomális technika, mert mindenfajta elválasztás nélkül végezhető el a méretjellemzés). Bírálómnak arra az észrevételére, amely szerint a TRIS és a Cu^{2+} ionok közötti komplexképződés a domináns (valamint arra a megjegyzésére, hogy a „kapcsolódó, igen gazdag irodalmi háttér alapján tisztázni kellett volna.”), külön ki szeretnék térni. A disszertációban szerepel (Varga Zoltánnal közös közlemények, valamint Ph.D. dolgozata), hogy a Cu^{2+} ionok erősen kötődnek a fejcsoporthoz. A TRIS molekulák hidratált DPPC rendszerben szintén a fejcsoporthoz foszfát csoportjához kötődnek. ([235] : Karácsony, Mihály, Bóta: A Tris pufferrendszer hatása. Kémiai Panoráma. 2012; 8(4):34-39., ezt követően Karácsony Zsuzsanna (fizikus hallgató): Ionok hatása hidratált foszfolipid kettősrétegek szerkezetére, Diplomamunka, BME, 2012. témavezető: Bóta A., Mihály Judith), Mihály, Karácsony, Németh, Wacha, Bóta: The effect of TRIS buffer on DPPC-water system, kézirat, beküldés előtt). Az atomi szintű információkat ATR-IR spektroszkópiai módszerrel nyertük, DSC, kis és nagyszögű röntgenszórással, fagyasztatással kombinált TEM, valamint DFT elméleti számításokkal és spektrumértelmezésekkel kiegészítve. A fejcsoporthoz rezgések közül a hidratációra leginkább érzékeny aszimmetrikus foszfátrezgések a jellemzőek, a különböző vendégmolekulák jelenléte nem változtatta meg a foszfolipid hidratáltsági fokát. Kivételt képez a NaCl oldattal készített DPPC rendszer: Na^+ ionok kölcsönhatásba léphetnek a foszfát fejcsoporthoz, kis mértékben dehidratálják azokat. (Természetesen elektrolitok esetében azok ionjainak hidratált formáira gondolunk, pl ez sósav esetében is triviális). Az alacsonyabb hullámszámú szimmetrikus $\nu_2\text{PO}_2^-$ rezgés összetettebb, átlapolódhat az azonos tartományba eső P-(O-C)₂ rezgéssel. A vállként megjelenő sáv az R-O-P-O-R' diészter-foszfát rezgéséhez rendelhető. A TRIS puffer jelenlétében a diészter rezgésénél egy további váll jelenik meg, ami a TRIS és a foszfátcsoporthoz közötti lokalizált kölcsönhatásra utal. Érdekes módon ez a kölcsönhatás NaCl jelenlétében erősebb. Ezek alapján a vizes rendszerben ismert TRIS – Cu(II) komplex mindkét tagja ugyanarra a helyre kötődik preferáltan, ami arra a következtetésre vezet, hogy a komplex széteshet.

Ugyanakkor az ESR mérések - Bírálom véleményével teljes összhangban - azt igazolták, hogy a TRIS – Cu(II) nagyon erős komplex. 5 tömeg%-ban készített DPPC rendszer ESR jele olyan, mintha a lipid ott sem lenne. Az ESR jel (legalább 90%-ban) a komplex dominanciáját mutatja. A két módszer eredményeinek figyelembevételével említettem disszertáciomban a TRIS és a Cu²⁺ konkurenciáját. Elismerem Bírálom jogos kritikáját – ilyen értelemben disszertációm hiányosságát -, hogy a Cu²⁺ ion hidratált DPPC rendszeren belüli elhelyezkedését tisztázni kell.

Megköszönöm Bírálomnak hasznos, gondolatébresztő észrevételeit, kérdéseit és a disszertáció értékelésébe fektetett munkáját.

Tisztelettel és köszönettel:

Bóta Attila

Budapest, 2013. 10. 12.