

SZEMCSÉS ÉS RÉTEGES NANOSZERKEZETEK KISSZÖGŰ RÖNTGENSZÓRÁSA

MTA DOKTORA DISSZERTÁCIÓS DOLGOZAT TÉZISEI

BÓTA ATTILA

(MTA-TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT, MOLEKULÁRIS FARMAKOLÓGIAI INTÉZET, 2012.)

1.

Kisszögű röntgenszórás módszerével meghatároztam, hogy a különböző fafélésegekből (bükk, tölgy, fenyő), papíripari cellulózzrostból, csonthéjas maghéjból (barackmag), polimerekből (Polietilén-tereftalát: PET, Poliakrilonitril: PAN) „vízgőzös aktiválással” előállított aktív szenek hasonló méretű, 1 – 1,5 nm kiterjedésű elemi egységekből, kristallitokból épülnek fel. Megállapítottam, hogy az aktív szén szénváza anizotrop. Az anizotrop tulajdonságot a hozzávetőlegesen 100 nm kiterjedésű, az említett elemi egységekből álló halmazok hordozzák. Az anizotrópia az aktív szén előállítására felhasznált alapanyag textúrájából ered és az a karbonizálási folyamat révén rögzül az aktív szén vázszerkezetében. A fa textúrája, annak szállító edénnyalábjaik elrendeződése az aktív szén kristallit halmazainak szerkezetében, az edénnyalábok eredeti irányában és az arra merőleges síkban is irányfüggő sajátságokat okoz. Tipikusan az 50%-os konverzióval járó aktiválási folyamatok az anizotrópiát – a vizsgált fafélések esetében eltérő mértékben – megszüntetik. A kétdimenziós szórási képek alapján megállapítottam, hogy az anizotrópia $q \sim 1/nm$ -nél nagyobb szórásváltozó tartományban tűnik el. Ennek megfelelően az 1 nm átmérőjű gömbökből, mint választott szerkezeti elemekből felépített alakzatok alkalmasak a fa-alapanyagú aktív szenek anizotrop tulajdonságainak rekonstruálására. Az anizotrop jellegnek megfelelően felépített alakzatok elméleti kisszögű szórási képének és a valós rendszer szórási képének összevetésével megállapítottam, hogy az anizotrópia eltűnése az elemi kristallitok elgázosításával és a kristallit halmazok szétesésével jár együtt.

2.

A Petró József által előállított (BME, 2000.) újfajta nem piroforos, alumínium-oxid hordozós Raney-típusú nikkell katalizátor legalább négy összetevőt tartalmazó komplex rendszerének kisszögű szórásából, az anomális kisszögű röntgenszórás módszerének

felhasználásával, meghatároztam a katalizátor nikkell részecskéinek kisszögű szórását jól közelítő szeparált anomális szórási görbéket, valamint a nikkell részecskék kisszögű szórását kizárólagosan jellemző tiszta rezonáns görbéket. A szeparált görbék alapján a nikkell részecskék átlagosan 5,63 nm magasságú és 3,54 nm átmérőjű „tömzsi” hengerek, míg a tiszta rezonáns görbe alapján átlagosan két, 4,16 nm átmérőjű ($\sigma=0,24$) gömb alakú részecskét tartalmazó aggregátumok. A tiszta rezonáns görbe alapján meghatároztam, hogy a preparációs művelet során a kiindulási nikkell 76%-a alakult át nikkell nanorészecskékké.

3.

Synperonic A7-víz (80 tömeg%) nem-ionos tenzid-víz rendszer rétegszerkezetét nyírási igénybevétel (átlagosan 4,2 1/s nyírási sebesség) mellett tanulmányozva megállapítottam, hogy a nyírás hatására a rétegszerkezet korrelációja csökken. A nyírás megszüntetése után a szerkezet nem rekombinálódik, hanem további lassú szerkezeti változások következnek be, ami a rendszer lokális összetételének megváltozásával, Synperonic A7-ben gazdagabb és szegényebb domének kialakulásával jár. A szobahőmérsékleten végzett nyírással jelentős energia ($0,38 \pm 0,07$ J/g, a rétegszerkezet – izotrop folyadék közötti fázisátalakulási hő egyharmada) tárolódik. A nyírási folyamatok során a kezdeti, több mikrométer kiterjedésű, nagyszámú rétegből álló szabályos forma hozzávetőlegesen 100 – 200 nanométeres, szabálytalanul pakolt doménekké esik szét. A szerkezeti és morfológiai kép követésével megállapítottam, hogy a folyás és viszkozitás görbék felvétele során alkalmazott nyírási igénybevétel során a 80 tömegszázalékos Synperonic A7-víz rendszer reológiai sajátosságait döntően a mikrométer-közeli doménszerkezet és kisebb mértékben a nanométeres periódusú rétegszerkezet változásai határozzák meg.

4.

Egy centroszimmetrikus modellt vezettem be sokrétegű vezikulák (liposzómák) szerkezetének és kisszögű szórásának jellemzésére. Morfológiai vizsgálatok során megfigyeltem, hogy a fázisátmeneti tartományban, vagy idegen molekulák jelenlétében a liposzómák rétegeinek elrendeződése szabálytalan, nagy része szétcsatolt állapotban van. Az elrendeződési formákat két osztályba soroltam: szabályosabb és kevésbé szabályos típusba. A szabályosabban (közel rácsszerűen) pakolódt gömbszimmetrikus rétegek halmazát, mint blokkot definiáltam. A blokkok között nincs korreláció, teljesen szétcsatolt állapotban vannak. A blokkokat a kettősréteg közötti, nagymértékben és véletlenszerűen megvastagodott vízrétegek választják el. A blokkok rétegeinek száma paraméter, értéke – a szórási görbékkel

való egybevetés alapján – 1 és 10 között van. A blokkok kisszögű szórása jellemző a liposzóma egészének szórására. A modell paramétere – a blokkok rétegszáma mellett – a rétegek fluktuációja, a blokkokat elválasztó vízrétegek fluktuációja (csak növekedés következhet be), valamint a liposzóma összes rétegeinek száma. A modellel a sokrétegű vezikulák kisszögű diffrakciós csúcsainak a fázisátmenetek hőmérséklettartományában bekövetkező, valamint idegen molekulák által okozott alakváltozását, kiszélesedését a nagyszámú, de alacsony belső rétegszámmal rendelkező blokkok kialakulására vezettem vissza.

5.

A dipalmitoilfoszfátidil-kolin (DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidilkolin)/víz alapú vezikulák gél és hullámos gél fázisai közötti ún. előátmenetet tanulmányozva megállapítottam, hogy fázisátalakulás során a kettősrétegen belüli (rövidtávú) és a kettősrétegek közötti (hosszú távú) szerkezeti formák nem szimultán változnak. A fázisátmenet hőmérséklettartományában kialakuló szerkezeti formák a termikus előéletnek, a korábbi állapot hőmérsékletének hatását mutatják. A termikus előélet hatása csak hosszú idő után (hozzávetőlegesen egy hét) tűnik el. A fázisátmenet hőmérséklettartományában kialakuló hibahelyek eltérő mértékű hatással vannak a szomszédos fázisokban (mind a gél, mind a hullámos gél) a rétegszerkezet rendezettségére. Összetett, termikus előülethez kapcsolódó memória effektust figyeltem meg, ami a fázisátmenet hőmérséklettartományában kialakuló réteghibák egymást követő két hőkezelés utáni újbóli megjelenésében nyilvánul meg. A vendégmolekulák jelenlétében (a 2,4-diklórfenol példáján bemutatva) az előátmenet elsőrendű fázisátmeneti karaktere gyengén elsőrendűvé (közel folytonos) változik. Megállapítottam, hogy az előátmenet hőmérséklettartományában a 2,4-diklórfenol perturbációs hatása (2,4-diklórfenol/DPPC= 0,02 mol/mol arány alatt) megnövekszik és az egymásba alakuló gél és hullámos gél fázisok szerkezetétől eltérő más, idegen szerkezet/szerkezetek (pl. összetolt kettősrétegek) alakulnak ki.

6.

A DPPC és a 2,4-diklórfenol kölcsönhatását kis- és nagyszögű röntgendiffrakcióval tanulmányozva meghatároztam a DPPC-víz-2,4-diklórfenol rendszer fázisdiagramját a 20-45 °C hőmérséklet határok és [0 – 1] 2,4-diklórfenol/DPPC mol/mol tartományban. A 2,4-diklórfenol lokális elhelyezkedésének tanulmányozására a kontraszt variációs kisszögű

röntgendiffrakció és az anomális kisszögű röntgendiffrakció módszereit felhasználva megállapítottam, hogy a DPPC-víz rendszer gél szerkezete 2,4-diklórfenol jelenlétében a hullámos gél szerkezetéhez hasonló formába alakul, a kettősrétegek felületi hullámának (a felületi redő) periódusa a DPPC - víz rendszer tipikus 1,2-1,4 nm-es értékéről 2,4 – 3,0 nm-re nő. Azonosítottam a DPPC rendszerben a 2,4-diklórfenol hatására formálódott összetolt (angol elnevezéssel „interdigitated”) gél fázist.

7.

A szulfonsav származéka, a Szulfadiazin amfipatikus kémiai karakterének következtében a baktériummembránok lipidösszetételét modellező liposzómák (DPPG+DPPE) kettősrétegének fejcsoport-rétegéhez kapcsolódik (DPPE: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidiletanolamin, DPPG: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidilglicerol). Megállapítottam, hogy a molekula elhelyezkedése nem karakterisztikus. A Szulfadiazint tartalmazó kettősrétegek sokaságának morfológiáját a lipidek aránya valamint az alkalmazott puffer rendszer és a rendszer komponenseinek tisztasági foka nagymértékben befolyásolja. A Szulfadiazin jelenlétében DPPG/DPPE=0,95 mol/mol arányú rendszer szabályos rétegszerkezete szétcsatolódik, a szétcsatolódás mértéke a Szulfadiazin/lipid aránnyal együtt nő, és a vizsgált legnagyobb 1/1 molaránynál sem szűnik meg. A DPPG/DPPE=0,95 arányú rendszerben a Szulfadiazin a liposzómákra jellemző gömbhéjai helyett nagy kiterjedésű, 5 – 10 mikrométert is meghaladó nagyszámú párhuzamosan elhelyezkedő sík halmazából álló domének képződnek, amelyek a hatóanyag lokális koncentrációját jelzik. Igazoltam, hogy a Szulfadiazin jelenlétében létezik a DPPG/DPPE arányának egy intervalluma (ez az intervallum 0,1 és 0,4 közötti értékre becsülhető), amelyben a rétegszerkezet szétcsatolódása a legnagyobb mértékű. A liposzómák többé-kevésbé szabályos gömbszerű alakjának eltűnése együtt jár a szétcsatolódással, amit egy összetett „kaotikus” morfológiai kép kialakulása kísér. Megállapítottam, hogy a DPPG/DPPE nagyobb arányánál (DPPG/DPPE=0,5) a rétegszerkezet szabályossága nem függ a Szulfadiazin koncentrációjától, ugyanakkor morfológiailag a szabályos liposzómák alakját legnagyobb mértékben megközelítő formák alakulnak ki.

8.

Megállapítottam, hogy a humán sejtmembránt modellező DPPC-víz rendszerek karakterisztikus rétegszerkezete és a kettősrétegen belüli szénlánc pakolódása az aminoglikozidok két képviselőjének (Tobramycin, Streptomycin) hatására egyik

fázisállapotban (gél, hullámos gél, folyadékkristályos) sem változik meg a [0 – 1] aminoglikozid/lipid mólarány intervallumban. Ugyanakkor a nem „igazi aminoglikozid” Spectinomycin (aminocyclitol) a vizsgált legkisebb Spectinomycin/DPPC=0,01 mol/mol arány esetében is rendezetlenséget okoz a lipidek szénláncának pakolódásában, és a vizsgált legmagasabb Spectinomycin/DPPC=1 mol/mol mólarány esetében mind a kettősrétegen belüli, mind a rétegek közötti rendet megszünteti. Megállapítottam, hogy a Tobramycin, Streptomycin, Spectinomycin egységesen szerkezetépítő hatást váltanak ki a bakteriális membránok modellrendszerében (DPPG/DPPE=0,2 mólarányánál; DPPG: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidilglicerol). Meghatároztam az aminoglikozid és aminocyclitol származékok által a bakteriális membránokban indukált szerkezeti változások közötti különbséget, amely szerint az aminoglikozidok esetében (Tobramycin, Streptomycin) szabályos rétegszerkezet, míg az aminocyclitol származék (Spectinomycin) esetében a biológiai membránok szerkezetétől idegen, hexagonális struktúra alakul ki.

9.

Megállapítottam, hogy a Salmonella minnesota R595 lipopoliszacharid (LPS) a humán sejtmembránt modellező DPPC/víz liposzómákban nagy koncentrációban (1 LPS/DPPC mol/mol arány) a gél és a folyadékkristályos szerkezetek közötti különbséget megszünteti, ezáltal a főátmenet elsőrendű karakterét gyengén elsőrendűvé változtatja. A LPS ~0,01 mol/mol LPS/lipid arányánál a DPPC-víz rendszer karakterisztikus rétegszerkezetének rendezettségét csökkenti, nagyobb koncentrációnál ([0,1 – 1] mol/mol LPS/DPPC tartomány) saját önszerveződésének megfelelően köbös fázis kialakulását indukálja. A LPS a LPS/lipid= ~0,01 mol/mol arányú jelenlétében a DPPE-ből, mint fő lipidkomponensből és egyéb membránalkotó lipidekből álló – a bakteriális membránoknak megfelelő – modell rendszerekben lokálisan, a sejtmembrán rétegszerkezetétől eltérő köbös nanoszerkezet kialakulását eredményezi. A LPS/lipid arány növelésével a köbös szerkezet lesz meghatározó. A rendszerhez 0,2 lipid/lipid arányban adott egyéb lipidek (DPPG: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidilglicerol, DPPA: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidsav, DPG: 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol) hatása a biológiailag nem releváns folyadékkristályos állapotban nyilvánul meg: DPPG jelenlétében köbös, DPPA jelenlétében amorf, DPG jelenlétében hexagonális és köbös szerkezetek alakulnak ki.

10.

DPPC foszfolipidból, koleszterinből és polialmasavból álló stabilis unilamellás vezikulát állítottam elő. A vezikula rendszer méretét, méreteloszlását és rétegszerkezetét nagy precizitású kisszögű és ultra kisszögű szinkrotron adatok alapján határoztam meg. A szerkezeti jellemzést ún. „két G” illesztés alapján határoztam meg a vezikula sugarától is függő formafaktor figyelembevételével. Megállapítottam, hogy az ultra kisszögű szórási adatokból és a fagyasztatással kombinált transzmissziós elektronmikroszkópia alapján meghatározott méreteloszlás adatok jó egyezésben vannak. A polialmasav a lipidek külső, fejcsoport régiójában aszimmetrikus módon helyezkedik el. Lokalizációjuk Gauss függvényvel jellemezve $2\sigma=0,8$ nm széles, a lipid két oldalán mért távolságuk 5,16 nm. Az illesztés alapján megállapítottam, hogy a túlnyomóan unilamellás vezikulák mellett ~5-8 darabszám százalékos arányban kétrétegű vezikulák is jelen vannak a rendszerben, amely megfigyelés összhangban van a fagyasztatással nyert képi információkkal. A kétszeres kettősréteg távolsága 7,45 nm, ami gyengén szétcsatolt rétegszerkezetet jelez.

11.

Megállapítottam, hogy Cu^{2+} ionok hatására DPPC/víz alapú vezikulák rétegszerkezete szétcsatolódik, azaz a sokrétegű liposzóma rendszer kettősrétegei korrelálatlan állapotba kerülnek és a rétegek közötti távolság lényegesen meghaladja a szabályos vízréteg vastagságát. A Cu^{2+} ionok elhelyezkedését anomális kisszögű szórással tanulmányozva megállapítottam, hogy a réz-ionok eloszlása a liposzómában inhomogén és az eloszlás formája a $\text{Cu}^{2+}/\text{DPPC}$ arány és a hőmérséklet függvénye: a $\text{Cu}^{2+}/\text{DPPC}=0,02$ mol/mol molarány alatt a rézionok periodikusan, a liposzómák rétegeinek megfelelően helyezkednek el. Ennél nagyobb koncentráció esetében a rézionok egy része a rétegek lokális szétcsatolódásával képződött vizes régiókban van jelen. Ezek a domének hozzávetőlegesen 30 nm kiterjedésűek. NaOH és hőkezelés hatására a liposzómás rendszerben 15 nm átlagos méretű CuO (részben $\text{Cu}(\text{OH})_2$ tartalmú) nanorészecskék keletkeznek.

12.

A DPPC alapú vezikulák Cd^{2+} ionok hatására szétcsatolódnak és a szétcsatolódással keletkezett kettősrétegek közötti térrészek további reagens adagolása során nanoreaktorokként viselkednek. A hidratált DPPC/ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ rendszerbe $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ reagenst adagolva szűk méreteloszlású CdS nanorészecskéket állítottam elő. A CdS nanorészecskék alakja közelítőleg

gömb, átlagos átmérője 6 – 7 nm. A szintézis lépéseit anomális röntgenszórással követtem és a részecskék jellemzését azok szeparálása nélkül, a reakcióelegyben végeztem el.

13.

Megállapítottam, hogy nem-ionos tenzid (etoxilált zsíralkohol, Synperonic A7)-víz rendszerben Cd-ion jelenléte a rendszer lamellás fázisában a rétegek szétcsatolódásához vezet. A Synperonic A7 – víz – $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ rendszerhez $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ reagens oldatát adagolva 8-10 nm átlagos átmérőjű, monoform, közel gömb alakú CdS nanorészecskék keletkeznek. A CdS nanorészecskék szintézisének lépéseit anomális röntgenszórással követtem és a részecskék jellemzését azok szeparálása nélkül, a reakcióelegyben végeztem el. Forgó tárcsás eszközt terveztem és készítettem a szintézis végrehajtásához. Az eszköz alkalmazásával, a centrifugális erő kihasználásával rúd alakú CdS nanorészecskéket állítottam elő. Az anizotrop részecskék átlagos hossza 50-60 nm átlagos átmérője 8-14 nm.

14.

Kisszögű és nagyszögű röntgenszórás egyidejű detektálására alkalmas (SWAXS) kombinált, nyitott mintatartó-terű, kamerát építettem kompakt Kratky kamera felhasználásával. Kisszögű és nagyszögű röntgenszórás mérésére alkalmas kisszögű kollimációs egységet terveztem, fejlesztettem és építettem elterjedt kereskedelmi pordiffrakciós berendezésekhez. A kisszögű eszközzel ellátott diffraktométerek a $0,1 - 130^\circ$ teljes kis- és nagyszögű szórási szögtartományban, holt intervallum nélkül detektálnak és mind transzmissziós, mind reflexiós mérési elrendezésben alkalmazhatók.