Új, liposzómába zárt TBC ellenes vegyületek vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Kósa Nikoletta

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Herényi Levente, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Müllner Nándor PhD., egyetemi docens
Dr. Uray Katalin PhD., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zelkó Romána, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Budai Lívia, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Solymosi Katalin, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest
2021

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke 5

2. Bevezetés 10

2.1. Nano-gyógyszerszállító rendszerek 10

2.2. Liposzómák 12

2.2.1. Foszfolipidek 12

2.2.2. Koleszterin és koleszterin származékok 13

2.3. Liposzómák csoportosítása 14

2.3.1. Lamellaritás szerinti csoportosítás 14

2.3.2. Méret szerinti csoportosítás 15

2.3.3. Felszíni vagy összetételbeli módosítás szerinti csoportosítás 15

2.4. Liposzómák előállítási módszerei 17

2.4.1. Vékonyréteg-hidratációs technika (Bangham módszer) 17

2.5. Liposzómák vizsgálati módszerei 18

2.5.1. Méreteloszlás vizsgálata fényszórásméréssel 18

2.5.2. Lipidösszetétel vizsgálata kromatográfiával 19

2.5.3. Bezárási hatásfok meghatározása 21

2.5.4. In vitro kioldódási vizsgálatok 22

2.6. Liposzóma-sejt kölcsönhatás típusai 22

2.6.1. Fagocitózis 23

2.6.2. Pinocitózis 23

2.7. Liposzómák alkalmazása a gyógyászatban 24

2.7.1. Liposzómák a fertőző betegségek kezelésében 24

2.7.2. Liposzómák a daganatos betegségek kezelésében 27

2.7.3. Liposzómák szerepe a vakcinációban 29

2.8. Liposzómák mint modellmembránok 31

3. TBC 33

3.1. Epidemiológia 34

3.2. A TBC fajtái és kemoterápiája 34

3.2.1. Gyógyszer-szenzitív TBC 34
3.2.2. Látens TBC kezelése 38
3.3. Rezisztencia 38
3.3.1. A rezisztencia típusai 38
3.3.2. Gyógyszerrezisztens TBC kezelése 39
3.3.3. Új TBC-ellenes gyógyszerek 40
3.4. Mycobacterium Taxonomia 41
3.4.1. Mycobacterium tuberculosis complex 42
3.4.2. A Mycobacterium sejtfal 42
3.4.3. Mycobacterium-makrofág kölcsönhatás 44
3.4.4. TBC diagnosztika 45
3.5. TBC vakcináció 47
3.5.1. BCG 47
3.5.2. Vaccae™ 48
3.5.3. RUTI® 48
3.5.4. Vírus-vektor TBC vakcina 48
3.5.5. mRNS-alapú TBC vakcina 48
3.6. Új antituberkulotikumok keresése *in silico* dokkolás segítségével 48
4. Célkitűzések 50
5. Módszerek 51
5.1. Anyagok 51
5.2. Antituberkulotikumok kiválasztása *in silico* dokkolással 52
5.3. Liposzóma minták készítése vékonyréteg-hidratációs technikával 53
5.4. A liposzómák méreteloszlás-analízise DLS méréssel 54
5.5. Bezárási hatásfok meghatározása extinkció méréssel 56
5.6. A liposzómába zárt antituberkulotikumok és a natív hatóanyag *in vitro* sejtek általi felvételének vizsgálata áramlási citometriával 57
5.7. In vitro citotoxicitás mérése MTT-teszttel 58

5.8. Az antituberkulotikumok *in vitro* hatékonyságának meghatározása Mycobacterium tenyészeten és Mycobacteriummal fertőzött monocita sejtkultúrán 60

6. Eredmények 62

6.1. Az előállított liposzóma minták jellemzése 62

6.2. A bezárási hatásfok kiértékelése 63

6.3. A liposzómába zárt és a szabad hatóanyagok *in vitro* MonoMac-6 sejtek általi felvétele és toxicitásának jellemzése 64

6.4. Antituberkulotikumok *in vitro* hatékonysága és szelektivitása Mycobacterium tenyészeten 66

6.5. Antituberkulotikumok *in vitro* hatékonysága Mycobacteriummal fertőzött MonoMac-6 sejteken 68

7. Megbeszélés 70

7.1. A liposzóma minták stabilitását befolyásoló tényezők 70

7.2. A bezárási hatásfokot befolyásoló szempontok 72

7.3. A natív és a liposzómába zárt hatóanyagok citotoxicitásának jellemzése 73

7.4. *In vitro* antituberkulotikus aktivitás jellemzése és összehasonlítása szabadon növő Mtb $H_{37}Rv$ kultúrán és intracelluláris Mtb $H_{37}Rv$ törzseken 73

7.5. Az optimális antituberkulotikum formuláció a TBC terápia szempontjából 75

8. Következtetések 77

8.1. A liposzómák stabilitása 77

8.2. Az antituberkulotikumok bezárási hatásfoka 77

8.3. A liposzómába zárt és a natív molekulák in vitro sejtek általi felvétele 77

8.4. A liposzómába zárt és a natív molekulák *in vitro* sejtekre kifejtett citotoxicitása és szelektivitása 78

8.5. A liposzómába zárt és a natív készítmények *in vitro* hatékonysága intracelluláris Mtb $H_{37}Rv$-vel fertőzött MonoMac-6 monocita modellen 78

8.6. Új tudományos eredmények 79

9. Összefoglalás 81

10. Summary 82

11. Irodalomjegyzék 83

12. Saját publikációk jegyzéke 94

12.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények 94

12.1.1. Publikációk 94

12.1.2. Poszterek 94

13. Köszönetnyilvánítás 95

1. Rövidítések jegyzéke

ALC-0159	2-[(polietilénglikol)-2000]-N,N-ditetradekilacetamid
ALC-0315	((4-hidroxibutil)azanediil)bisz(hexán-6,1-diil)bisz(2-hexildekanoát)
AS01	MPL-ből és SM-102-ből álló vakcina adjuváns
BCG	Bacillus Calmett-Guérin
BH%	Bezárási hatásfok%
CAEC	Koleszterin-2-aminokarbamát
CARPA	Complement Activation-Related Pseudoallergy, Komplement aktiváció-függő pszeudoallergia
CFU	Colony Forming Unit, Telepképző egység
CHEMS	Koleszterin-hemiszukcinát
CHOL	Koleszterin
COPA	Koleszterin-oxipropán-1-amin
COVID-19	Coronavirus disease 2019, Koronavírus betegség 2019
CPS	Cirkumsporozoita
CT	Computed Tomography
CYP3A4	Citokróm P450 szupercsalád enzim
DS-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non- Integrin, Dendritikus sejt specifikus intercelluláris adhéziós molekula
DLS	Dinamic Light Scattering, Dinamikus fényszórás(mérés)
DMG-PEG2000	1,2-dimirisztoil-rac-glicero-3-metoxipolietilén-glikol-2000
DMPC	1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolin
DMPG	1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfatidil-glicerol
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNR	Daunorubicin
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolin
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-foszfatidil-etanolamin
DOPS	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-foszfatidil-szerin

DOTAP	1,2-dioleoil-3-(trimetilammonium-propán)
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilammonium-klorid
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolin
DPPG	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidil-glicerol
DSPC	1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolin
DSPE	1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfatidil-etanolamin
DSPG	1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfatidil-glicerol
dUMP	2'-deoxiuridin-5'monofoszfát
dUTP	2'-deoxiuridin-5'trifoszfát
DXR	Doxorubicin
EMA	European Medicines Agency, Európai Gyógyszerügynökség
EMB	Etambutol
Fab	Fragment antigen binding, Antigén kötő fragmens
FBS	Fetal Bovin Serum, Magzati borjúsavó
FDA	Food and Drug Administration, Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FWHH	Full Width at Half Height, Magasság felénél mért szélesség
FSC	Forward Scatter, Előre szórt (fény)
GLUT	Glucose Transporter, Glukóz átjutását segítő transzmembrán protein
GUV	Giant Unilamellar Vesicle, Óriás unilamelláris vezikula
HA	Hemagglutinin
HDL	High Density Lipoprotein, Nagy sűrűségű lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etánszulfonsav
H1N1, H3N2	Az A típusú influenza vírus altípusai
HIV	Human Immunodeficiency Virus, Humán immundeficiencia-vírus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HPMI	HEPES-el pufferált RPMI oldat

HSPC	L-α-hidrogénezett szója foszfatidil-kolin
IC_{50}	The half maximal inhibitory concentration, A maximális gátlókoncentráció fele
IGRA	Interferon Gamma Release Assay, Interferon gamma felszabadulás vizsgálat
INF-γ	Interferon-γ
INH	Izoniazid
IR	Infrared Spectroscopy, Infravörös spektroszkópia
KatG	Catalase-peroxidase G, Kataláz-peroxidáz G
LAM	Lipoarabinomannán
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification, Hurokközvetített izotermikus amplifikáció
LC	Liquid Chromatography, Folyadékkromatográfia
LDL	Low density lipoprotein, Kis sűrűségű lipoprotein
LPA	Line probe assay
LUV	Large Unilamellar Vesicle, Nagy unilamelláris vezikula
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, Mitogén-aktivált ptotein kináz
MDR	Multidrug resistance, Multidrug rezisztencia
MIC	Minimal Inhibitory Concentration, Minimális gátló koncentráció
MLV	Multilamellar Vesicle, Multilamelláris vezikula
MOI	Multiplicity of Infection, Fertőzés multiplicitási index
MPEG	N-(karbonil-metoxi-polietilén-glikol-2000)
MPL	3-O-desacil-4′-monofoszforil lipid A
MS	Mass Spectroscopy, Tömegspektrometria
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium-bromid
MUV	Medium Unilamellar Vesicle, Közepes unilamelláris vezikula
MVV	Multivesicular Vesicle, Multivezikuláris vezikula
NA	Neuroaminidáz

NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Mágneses magrezonancia
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, Nukleotid-kötő oligomerizációs domén fehérje 2
OD	Optical density, Optikai denzitás
OLV	Oligolamellar Vesicle, Oligolamelláris vezikula
PAA	Poliakrilamid
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeráz láncreakció
PDR	Polydrug Resistance, Polidrug rezisztencia
PDT	Photodynamic Therapy, Fotodinamikus terápia
PEG	Polietilén-glikol
PEG-Chol	Pegilált koleszterin
PI	Propídium-jodid
PIM	Foszfatidil-inozitol-mannozid
plasmalogen	1-alk-1´-enil-2-acil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolin
pNIPAM	poli(N-isopropilakrilamid)
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolin
pre-XDR	pre-Extensively resistance, pre-Extenzív rezisztencia
PVA	Polivinil-alkohol
PVP	Polivinil-pirrolidon
PZA	Pirazinamid
QS-21	*Quillaja Saponaria*, Szappankéregfából előállított szaponin
RES	Reticuloendothelial System, Retikuloendotéliális rendszer
RIF	Rifampicin
ROS	Reaktív oxigén származék
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute, Sejttenyésztéshez használt puffer
rpoB	RNA polymerase β subunit, RNS polimeráz β alegység
RR	Rifampicin Resistance, Rifampicin rezisztens
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Súlyos akut légzőszervi szindróma coronavírus 2

scFv	Single-chain fragment variable
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SEC	Size Exclusion Chromatography, Méretkizárásos kromatográfia
SI	Seelectivity Index, Szelektivitási index
SM-102	Heptadekán-9-il 8-((2-hidroxietil) (6-oxo-6-(undeciloxi)hexil) amino)oktanoát
spp.	Subspecies, Alfaj
SSC	Side Scatter, Oldalra szórt (fény)
SUV	Small Unilamellar Vesicle, Kis unilamelláris vezikula
TB501	6-hidroxi-7-{[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]metil}-2-[(2E)-3-(2-metoxifenil)prop-2-én-1-ilidén]-2,3-dihidro-1-benzofurán-3-on
TB515	(2E)-6-hidroxi-2-(3-fenilprop-2-in-1-ilidén)-2,3-dihidro-1-benzofurán-3-on
TBC	Tuberkulózis
T_H	Helper T-sejt
TLR	Toll-like receptor, Toll-szerű receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α, Tumor nekrózis fakor-α
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography, Ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia
V/O	Víz az olajban
VRK	Vékonyréteg kromatográfia
WHO	World Health Organization
XDR	Extrém gyógyszer rezisztencia

2. Bevezetés

Mivel doktori munkám során a munkacsoportunkban folyó többféle kutatási témába is bekapcsolódtam, így disszertációmban is kitérek a liposzómák modellmembránként való alkalmazására. A terjedelmi keretekre való tekintettel azonban dolgozatomban ezt a témakört részleteiben nem tárgyalom, csak a probléma felvetésére és a közös munkafolyamatokra utalok.

Doktori értekezésemben a jobb áttekinthetőség érdekében, az egyes megnevezéseknek csak a rövidebb formáját használtam. A rövidítések feloldása a rövidítések jegyzékében található.

A TBC a világon az egyik leggyakrabban előforduló fertőző betegség, amellyel az emberiség már régóta küzd. A WHO több évtizede célul tűzte ki a TBC végleges eradikációját, amely mindmáig sikertelennek bizonyult. Tulajdonítható ez a hosszú és költséges terápiának, amely során gyakran alakulnak ki különféle gyógyszerek okozta interakciók és mellékhatások. Továbbá egyre gyakrabban jelentkezik rezisztencia az alkalmazott hatóanyagokkal szemben, amely további gyógyszerek bevonását és ezáltal hosszabb kezelési időt eredményez. A rendelkezésünkre álló, véges számú antituberkulotikumok mellett megfogalmazódott az igény új TBC-ellenes vegyületek felkutatására, és azok terápiába integrálására. A felhasználni kívánt hatóanyagok célszervhez történő eljuttatása javítható nano-gyógyszerhordozó rendszerek, például liposzómák segítségével, továbbá ezáltal a dózisfüggő mellékhatások is nagyrészt elkerülhetőek. Doktori munkám során célul tűztem ki liposzómákba zárt, új antituberkulotikumok előállítását. Ennek fényében a doktori értekezésemet a nano-gyószerszállító rendszerek irodalmi áttekintésével kezdem, majd pedig a TBC kórkép tárgyalásával folytatom, végezetül a doktori disszertációmat képező tudományos kísérleteket és eredményeket mutatom be.

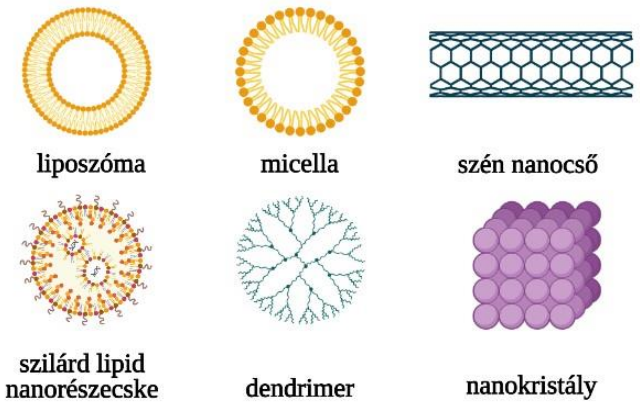
2.1. Nano-gyógyszerszállító rendszerek

A nanotechnológia, a nanoméretű rendszerek előállításával és szerkezeti jellemzőivel foglalkozó tudományág, globálisan az egyik leggyorsabban fejlődő terület. Az utóbbi években jelentős szerepet kapott az orvostudományban is. A gyógyszerfejlesztésben a nanotechnológia alkalmazása számos új lehetőséget kínált,

amely lehetővé tette többek között a célzott hatóanyag-szállítást, optimalizálva a hatóanyagok biohasznosíthatóságát. Az 1980-as évek óta számos nanogyógyszer engedélyeztetésére került sor (1).

A konvencionális gyógyszerformákkal (például tablettákkal) szemben a nanogyógyszerek eltérő viselkedést mutatnak a szervezetben, amely egyrészt a jóval kisebb méretüknek (10–1000 nm), a megnövekedett összfelszínnek, valamint a különböző felszíni szerkezetnek köszönhető. A gyógyszertervezés és a gyógyszergyártás során, a legfőbb cél, olyan hatóanyag és gyógyszerforma megalkotása, amely a legkevesebb mellékhatás mellett a legnagyobb hatékonysággal rendelkezik. A klasszikus gyógyszerformáknál gyakori problémát jelent a rossz biohasznosíthatóság, a szelektivitás hiánya miatti nem kívánt hatások megjelenése, és a gyógyszermolekula esetleges szerkezeti átalakulása során bekövetkező csökkent hatékonysága a hatás helyén. Ezek a problémák a nanoméretű gyógyszerszállító rendszerek alkalmazásával nagyrészt kiküszöbölhetőek, például a hatóanyagok jobb oldódása révén, vagy a bezárt molekulák programozott kioldódásával a gyógyszerformából, amely egy meghatározott trigger hatására jön létre (2).

A legelterjedtebb nanoszállító rendszerek (1. ábra) közé sorolhatóak: a liposzómák, micellák, szén nanocsövek, szilárd lipid nanorészecskék, dendrimerek, továbbá a nanokristályok, nanoemulziók és a nanoszuszpenziók (1).



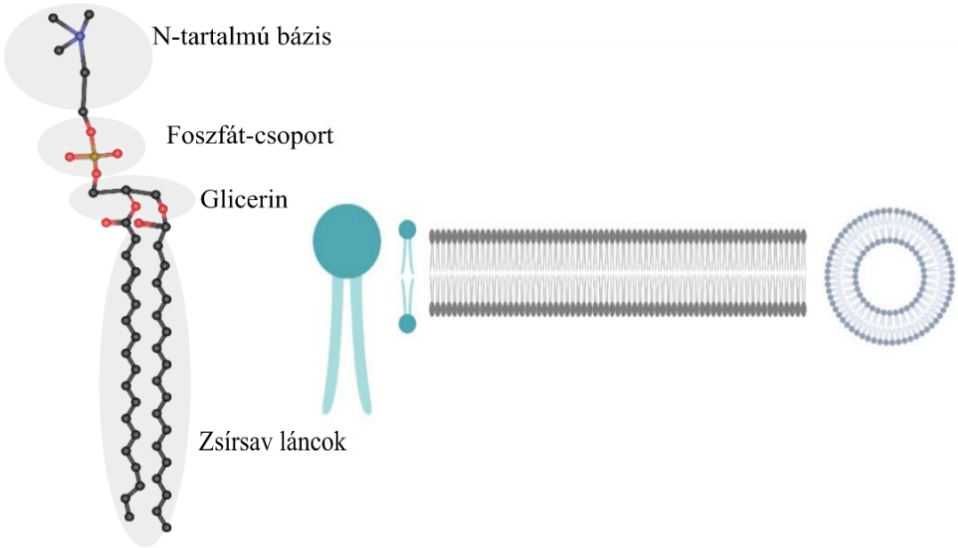
1. ábra: *Nanoszállító rendszerek* (2).

2.2. Liposzómák

A liposzómák létezését 1961-ben *Alec D. Bangham* fedezte fel, az elnevezés azonban kutatótársától *G. Weissmantól* származik. A liposzómák elsődleges alkotóelemei a foszfolipidek, amelyek kettősréteget alkotva, vezikulát formálva vizes fázist zárnak közre. A liposzómák ezen kívül még koleszterint és egyéb molekulákat is tartalmazhatnak. Az így kialakuló termodinamikailag stabil szerkezet felhasználását tekintve számos lehetőséget rejt magában. A liposzómák alkalmazhatóak, mint gyógyszerszállító rendszerek, illetve mint modellrendszerek, biológiai membránok tanulmányozására (3).

2.2.1. Foszfolipidek

Az emberi szervezetben szerepük nagy jelentőséggel bír, mint a membránok alkotóelemei, a tüdő és a perikardium felületaktív anyaga, valamint az epesavakkal együtt részt vesznek az emulzifikálásban, azaz a szervezetben előforduló különféle anyagok vízoldhatóvá tételében. A természetben előforduló foszfolipidek mellett ezek a molekulák mesterségesen is előállíthatóak. Semleges pH-án, töltésüket tekintve vannak pozitív, negatív és semleges foszfolipidek. Alapvázuk szerint lehetnek szfingozin és glicerin alapvázzal rendelkező struktúrák. Ehhez kapcsolódnak a különböző fejcsoportok, mint például a kolin, szerin, etanolamin, és a különféle hosszúságú és telítettségű zsírsavláncok, mint például a dipalmitoil, a dimirisztoil vagy a disztearoil (4).

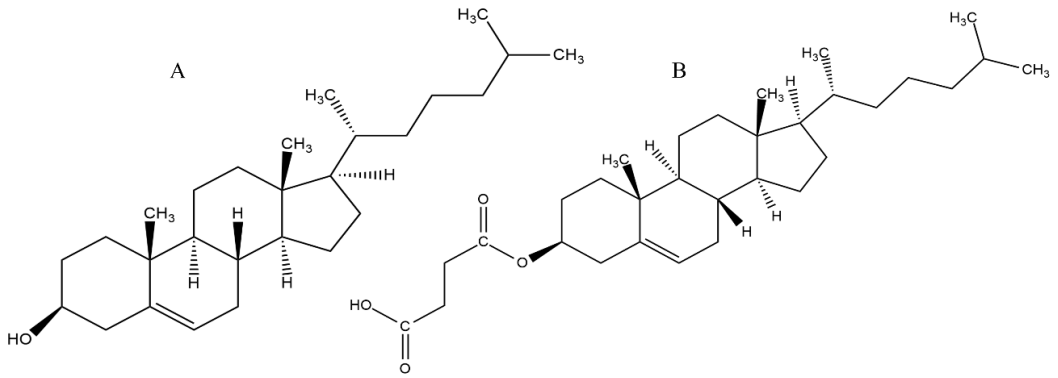


2. ábra: *Foszfolipid molekula és a membránkettősréteg szerkezete* (4, 5).

A liposzómák leggyakoribb alkotó elemei a következő foszfolipidek: foszfatidil-kolin (lecitin), foszfatidil-szerin, foszfatidil-etanolamin (cefalin), foszfatidil-glicerol, difoszfatidil-glicerol (kardiolipin) és foszfatidil-inozitol. Szerkezetüket tekintve mindegyik molekulában közös az amfifil megjelenés, amely az apoláris zsírsavláncokat és a poláris fejcsoportot foglalja magában (2. ábra). Víz jelenlétében az amfifil szerkezetnek köszönhetően a poláris csoportok a vízmolekulák felé, míg az apoláris láncok egymás felé rendeződnek, és kialakul a folyadékkristály szerkezet (4).

2.2.2. Koleszterin és koleszterin származékok

A koleszterin (CHOL) nagyon fontos szerepet tölt be az eukarióta szervezetekben. Szerkezetét tekintve szterán alapvázzal (centrális négygyűrűs struktúra) rendelkezik, ahol a 3-as helyzetben egy hidroxilcsoport (proximális hidrofil csoport), a 17-es helyzetben egy metil-heptán csoport (disztális hidrofób csoport) helyezkedik el. A molekulaszerkezetéből adódó sajátságok következtében stabilizálja a membránt, és befolyásolja annak permeabilitását. A nagyobb koleszterinkoncentrációval csökken a membrán permeabilitása és növekszik a rigiditása (6). Liposzómák esetében a gyógyszermolekula bezárási hatásfokát csökkenti a magasabb CHOL tartalom. Liposzómák formulálása során a leggyakoribb lipid/CHOL arány 2:1, valamint 1:1. A CHOL növeli a foszfolipid láncok rendezettségét, ezáltal csökken a vezikulák mérete (7, 8). A koleszterin származékok a CHOL molekulából valamilyen módosítással nyert struktúrák (3. ábra). Általában a 3-as pozícióban található hidroxilcsoporthoz történik a különböző oldalláncok konjugálása.



3. ábra: *A koleszterin (A) és a koleszterin-hemiszukcinát (B) kémiai szerkezete* (6).

A koleszterin-hemiszukcinát (CHEMS) esetében a 3-as pozícióban lévő hidroxilcsoporthoz szukcinilsavat konjugáltak, amely egy pH-ra érzékeny oldallánc. Ennek köszönhetően a CHEMS-t tartalmazó membrán alacsony pH hatására szerkezetváltozást szenved. 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-foszfatidil-etanolamin (DOPE) lipiddel kombinálva növelhető a vezikula fúzióképessége. A CHEMS-DOPE tartalmú liposzómákat pH-szenzitív vezikuláknak nevezi az irodalom (9). Ezzel a módosítással befolyásolható a hatóanyagot tartalmazó vezikulák destabilizálódása, és ezáltal a hatóanyag leadása (10). A pH változásra érzékeny liposzómák működési elvét és felhasználást későbbiekben, a 2.3.3.3.1. részben fejtem ki bővebben. Pegilált koleszterin (PEG-CHOL) észterek inkorporálásával megnövelhető a vezikulák keringési ideje, azáltal, hogy az immunrendszer kevésbé ismeri fel a módosított liposzóma felszínt (11). Koleszterin-oxipropán-1-amint (COPA) és a koleszterin-2-aminokarbamátot (CAEC), mint pozitív töltésű koleszterin származékokat DNS/RNS szállítására alkalmas liposzómák előállításához használnak fel (12).

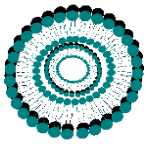
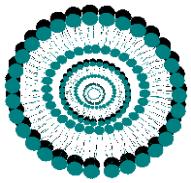
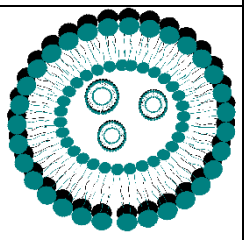
A megfelelő foszfolipid és CHOL összetétel megválasztásával, illetve a vezikula felszín módosításokkal a liposzómák különböző típusai állíthatóak elő.

2.3. Liposzómák csoportosítása

A liposzómák a következő szempontok szerint csoportosíthatóak (13):

2.3.1. Lamellaritás szerinti csoportosítás

1. táblázat: *Liposzómák csoportosítása a membrán kettősrétegek száma szerint* (13).

Kettősréteg száma	1	<5	5-20	>50
Típus	Unilamelláris vezikulák (ULV)	 Oligolamelláris vezikulák (OLV)	 Multilamelláris vezikulák (MLV)	 Multivezikuláris vezikulák (MVV)

2.3.2. Méret szerinti csoportosítás

2. táblázat: *Liposzómák csoportosítása a vezikulák mérete szerint* (13).

Méret	20-200 nm	200-500 nm	500-10000 nm	100-200 μm
Típus	Kis méretű pl. SUV	Közepes méretű pl. MUV	Nagy méretű pl. LUV	Óriás méretű pl. GUV

2.3.3. Felszíni vagy összetételbeli módosítás szerinti csoportosítás

2.3.3.1. Konvencionális liposzómák

Ebbe a csoportba azok tartoznak, amelyek csak foszfolipid és esetleg CHOL komponensekből állnak. Felszínük semmilyen módosítással nem rendelkezik. *In vivo* alkalmazva a retikuloendoteliális rendszer (RES) által nagyon hamar felismerésre és eliminációra kerülnek. Ugyanakkor, épp ezen rendszert érintő betegségek, fertőzések kezelésére alkalmazhatóak széles körben. A liposzómák eliminációjának folyamata két lépésben történik, elsődlegesen szérum proteinek (opszoninok) kötődnek a vezikulák felszínére, majd a felszínen lévő opszoninokat ismeri fel a monocita rendszer, amely a liposzómák szervezetből történő eltávolításához vezet. A szervezeten belül megfigyelhető a liposzómák kölcsönhatása a HDL és az LDL lipoproteinekkel, aminek hatására a vezikula elvesztheti a bezárt tartalmát. Nagyobb koleszterintartalommal, valamint kisebb vezikulamérettel a szervezet általi felismerés és elimináció valamelyest kiküszöbölhető (14).

2.3.3.2. Hosszú keringési idejű vagy lopakodó liposzómák (stealth liposomes)

Ezek a liposzómák felszíni módosításként valamilyen polimert tartalmaznak. A polimer kapcsolható egy arra alkalmas foszfolipidhez vagy koleszterinhez, amely később beépül a membránba, továbbá fizikailag is adszorbeálható a felszínhez. A hidrofil felszín segítségével lényegesen csökkenthető a RES általi felismerés és a keringésből való elimináció, ugyanis a polimer réteg, körbefogva a liposzóma felszínt, gátolja az opszoninok kötődését, ezáltal sztérikusan stabilizálja azt. A következő polimerek használhatóak a felszín módosítására és ezáltal a keringési idő meghosszabbítására:

monoszialoglikozidok, glukuronsav, polietilén-glikol (PEG), polivinil-pirrolidon (PVP), poliakrilamid (PAA), polivinil-alkohol (PVA) stb. Ezen molekulák eleget tesznek a felszíni polimerekkel szemben támasztott követelményeknek, úgymint oldhatóság, hidrofilitás, biokompatibilitás, flexibilitás. A gyógyászatban az egyik leggyakrabban alkalmazott polimer a PEG, amely alacsony toxicitással, továbbá jó biodegredabilitással és biokompatibilitással is rendelkezik. Kiválóan alkalmas a fehérjék és a liposzómák elmaszkírozására az immunrendszer felismerő mechanizmusaival szemben. Azonban, a PEG-gel borított liposzómák nem minden esetben tekinthetőek immunológiailag inertnek, ugyanis egyes tanulmányok szerint aktiválják a komplement rendszert, amely lényegében egy proteázokból álló kaszkád rendszer, és az úgynevezett CARPA (Complement Activation-Related Pseudoallergy) pszeudoallergiás reakcióhoz vezetnek (15). A PEG molekulasúlyával és a láncok sűrűségével befolyásolható a felszíni borítottság (14).

2.3.3.3. Trigger-szenzitív liposzómák

Ezen típusú liposzómák membránszerkezete valamilyen jel, például pH-változás (pH-szenzitív liposzómák), vagy hőmérsékletváltozás (hőmérséklet-szenzitív liposzómák) hatására módosul, amely leggyakrabban a membránkettősréteg destabilizációjához vezet.

2.3.3.3.1. pH-szenzitív liposzómák

A pH-változás hatására a következő események mehetnek végbe a membránban:

- negatív töltésű lipidek protonálódás hatására semlegesítődnek, aminek következtében a lamelláris szerkezet átalakul;
- membránhoz kapcsolt negatív töltésű polimerek, fehérjék protonálódása, ami lízishez vagy fúzióhoz vezet;
- lipidek savas pH hatására bekövetkező hidrolízise, amely a membrán destabilizációját okozza;
- felületaktív anyagok átalakulása ionizáció során pozitív töltésű savakká.

Szervezeten belül a pH lokális megváltozását eredményezheti gyulladás, tumor vagy infarktus. Ilyenkor a pH akár 5,5 értékre is lecsökkenhet a 7,4-es normál értékhez képest. A pH-szenzitív vezikulák fő komponensei olyan liposzóma alkotóelemek,

amelyek tartalmaznak titrálható karboxil-csoportot és olyan foszfolipidet, amely elősegíti a vezikula fúzióját. A leggyakoribb pH-szenzitív liposzóma komponensek ezek alapján a CHEMS és a DOPE. Az így előállított liposzóma azonban felszíni módosítás hiányában az immunrendszer hatására hamar kiszűrődne a keringésből, ezért célszerű olyan foszfolipidet is beépíteni a rendszerbe, amely tartalmaz PEG konjugátumot. A PEG-et leggyakrabban DSPE foszfolipiddel kapcsolják össze, amely kismértékben a pH-szenzitivitás csökkenéséhez vezet. Ez a probléma orvosolható olyan szerkezeti módosítással, amely lehetővé teszi a PEG molekulák leválását a felszínről savas pH hatására, például PEG konjugálása diortoészter vagy vinil-éter kötésen keresztül.

Egyéb pH-szenzitív szintetikusan előállított foszfolipidek is ismeretesek, mint például a plazmalogén vagy a pH változásra érzékeny fehérjék, mint például a GALA peptid, liszteriolizin továbbá a hemagglutinin N-terminusa (16).

2.4. Liposzómák előállítási módszerei

A liposzómák elállítására számos módszer ismeretes: vékonyréteg-hidratációs technika, fordított fázisú párologtatás technika, oldószer (éter/alkohol) injektálás technika, fagyasztva szárítás módszer, stb.

2.4.1. Vékonyréteg-hidratációs technika (Bangham módszer)

Az egyik legrégebbi és legelterjedtebb módszer liposzómák előállítására. A folyamat lényege az, hogy a membrán alapanyagokat (foszfolipid, CHOL) szerves oldószerben, vagy valamilyen oldószer elegyben (kloroform, metanol) oldják, majd az oldószert elpárologtatják. Ennek hatására az edény falán fokozatosan egy lipidfilm alakul ki. A következő lépés a hidrálás, amelynek során a lipidfilmet valamilyen vizes fázisú puffer kis részleteiben oldják, úgy, hogy a hőmérsékletet tartósan a fázisátalakulási hőmérséklet fölé emelik. A folyamat során a vezikulák spontán kialakulnak. Főleg MLV-k képződnek 1-5 µm mérettartományban.

Homogén, kisebb méreteloszlású minta előállítására az ultrahang-besugárzás módszere, vagy az extrudálási technika használható. Az ultrahang-besugárzás módszer hatékony, de fennáll a kontamináció veszélye, mivel az ultrahang fejből fémtörmelék kerülhet a mintába. Ehhez képest az extrudálás egy zárt térben történik, ahol a mintát egy megadott pórusátmérőjű polikarbonát membránon préselik át. Ennek hátránya az lehet,

hogy a membrán eltömődése szivárgást és ezzel együtt a minta elvesztését okozhatja, továbbá csak kis mintamennyiségre limitált a rendszer (5).

2.5. Liposzómák vizsgálati módszerei

A liposzómák tulajdonságai sokféle szempont szerint vizsgálhatóak. Eleget téve a gyógyszerformákkal szemben támasztott követelményeknek fontos ismerni a stabilitást, a hatóanyag-tartalmat, a gyógyszerforma szervezeten belüli útját, kölcsönhatását sejtekkel, a bezárt gyógyszermolekula leadásának és hatásának módját. A gyógyszerformával szemben támasztott követelmények alapján a vizsgálati módszerek az alábbi csoportokba sorolhatóak:

3. táblázat: *A liposzómák vizsgálatára használt módszerek csoportosítása* (17).

A. Morfológiai jellemzők vizsgálata	• **méreteloszlás** (alak, stabilitás)
B. Szerkezeti jellemzők vizsgálata	• **összetétel (**fázisátalalkulási hőmérséklet, permeabilitás, fluiditás)
C. Funkcionális jellemzők vizsgálata	• **bezárási hatásfok** (kémiai stabilitás, kötődés, kioldódás, reakcióképesség)

A felsoroltak közül többnyire azok a vizsgálati módszerek kerülnek részletesebb tárgyalásra, amelyeket a PhD-munkám során jómagam is felhasználtam.

2.5.1. Méreteloszlás vizsgálata fényszórásméréssel

Dinamikus Fényszórásmérés (Dynamic Light Scattering, DLS)

A DLS alkalmas a szuszpendált részecskék méreteloszlásának a meghatározására, amely a nano-gyógyszerszállító rendszerek igen fontos jellemzője. Továbbá a fényszórás mérése során következtethetünk az aggregáció mértékére, valamint a mérést adott időközönként megismételve információt kaphatunk a vezikulák stabilitásáról. A vezikulák a megfelelő oldószerben szuszpendálva Brown mozgást végeznek.

Gömb alakot feltételezve a részecskékre jellemző mozgékonyság a következő összefüggéssel adható meg:

$$u = \frac{1}{6\pi\eta r}$$

u: részecskékre jellemző mozgékonyság, η: a közeg viszkozitása, r: a részecske sugara.

A DLS mérőösszeállításban fényforrásként monokromatikus lézerfényt használunk, amely leggyakrabban He-Ne, Ar, vagy szilárdtest lézerek. A megvilágítást közben a részecskék által szórt fény intenzitását ($J_{szórt}$) detektáljuk.

$$J_{szórt} = J_0 \frac{8\pi^4 N\alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + cos^2\theta)$$

$J_{szórt}$: a szórt fény intenzitása, J_0: a megvilágító fény intenzitása, N: részecskeszám, α: polarizálhatóság, λ: hullámhossz, R: a detektor távolsága, θ: a detektálás szöge.

A részecskék Brown mozgásának következtében a szórt fény intenzitása időbeli fluktuációt mutat. A véletlenszerű intenzitás-fluktuáció autokorrelációs függvényéből kiszámítható a vezikulák hidrodinamikai sugara.

A DLS készülék további főbb részei a lézer fényforrás mellett: a minta elhelyezésére szolgáló mintatartó, valamint a detektor. A detektor nagyon fontos része a készüléknek, ezért legtöbbször nagy érzékenységű, jó időbeli felbontású detektorokat, például fotoelektron-sokszorozót használnak erre a célra (18, 19).

2.5.2. Lipidösszetétel vizsgálata kromatográfiával

Nagyon elterjedt analitikai módszer, amely az anyagok elválasztására használható. A folyamat során valamilyen állófázist − amely lehet oszlop vagy síklap elrendezésű − és mozgófázist alkalmaznak − amely halmazállapotát tekintve többnyire folyadék vagy gáz.

2.5.2.1. Vékonyréteg kromatográfia (VRK)

Rendkívül egyszerű, költséghatékony és gyors módszer. Az állófázis egy hordozóra van rögzítve, amely lehet műanyag, alumínium vagy üveg. Az állófázis anyaga leggyakrabban szilikagél vagy alumínium-oxid. Normál fázisú VRK esetén az állófázis poláris és a mozgófázis apoláris tulajdonággal bír, míg fordított fázisú VRK esetén ezek ellenkezője figyelhető meg. A VRK főleg lipidek vagy a bezárt hatóanyag minőségi elválasztásra és detektálásra alkalmazható, azonban a megfelelő számítások és további műszerek bevonásával jó közelítéssel mennyiségi analízisre is alkalmassá tehető (20).

2.5.2.2. Folyadékkromatográfia (LC)

A folyadékkromatográfia során a módszer elméleti hátterét az képezi, hogy a liposzómák méretük szerint, illetve a komponensek különböző adszorpciós tulajdonságainak köszönhetően választhatóak el a megfelelő oszloptöltet segítségével. A legegyszerűbb mérési eljárást képviseli ebben a kategóriában a méretkizárásos kromatográfia (Size Exclusion Chromatography, SEC). A megfelelő oszloptöltet alkalmazásával a vezikulák méret szerinti elválasztása, illetve a liposzómákba bezárt és a be nem zárt hatóanyag elválasztása végezhető el. A SEC-re alkalmazható gélek közé sorolhatóak egyrészt a nagy pórusátmérőjű agaróz típusú gélek (Bio-gel A150, Sepharose 2B, Sepharose CL-2B, Sepharose 4B és Sepharose CL-4B) és a keresztkötéseket tartalmazó dextrán gélek (Sephadex, Sephacryl S-1000). Az eluens ebben az esetben víz, vagy valamilyen vizes puffer.

A nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás eljárások (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) a liposzómák és lipidkomponensek elválasztásának, valamint mennyiségi és minőségi mérésének egy modernebb sokkal reprodukálhatóbb, gyorsabb módját képezik, amely ezzel együtt nagyobb költségigénnyel is jár. Az elválasztás alatt alkalmazott nyomás 400 bar, míg az ultra nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) során ez 1200 bar. A méret szerinti elválasztásra alkalmas gélek a TSK típusú gélek, mint például a GDNA PW, a G6000 PWXL és a G5000 PW. Az elválasztást követően a HPLC kombinálható DLS, abszorbancia továbbá fluoreszcencia méréssel, amelyek segítségével a bezárási hatásfokot és a méret szerinti eloszlást is meg lehet határozni. Normál fázisú (poláris) HPLC esetén szilikagél, míg fordított fázisú (apoláris) HPLC estében módosított felszínű szilikagél töltetű oszlopokat alkalmaznak a liposzómák lipidösszetétel szerinti elválasztásához, amelyet a kvantitatív és kvalitatív analízis céljából tömegspektrometriával (MS), infravörös spektroszkópiával (IR) vagy mágneses magrezonancia spektroszkópiával (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) kombinálhatnak. Az elválasztás hatékonyságát a következő paraméterek befolyásolják: az állófázis és a mozgófázis térfogata, a komponensek megoszlási hányadosai, a mozgófázis összetétele, az állófázis anyagi minősége, a rendszerben uralkodó hőmérséklet, nyomás, és az eluens áramlási sebessége (21).

2.5.3. Bezárási hatásfok meghatározása

A bezárási hatásfok pontos meghatározása egy gyógyszerszállító rendszer esetében elengedhetetlen fontosságú paraméter. Liposzómák esetén a hatóanyag fizikai, kémiai profilja határozza meg, hogy a vizes fázisban vagy a lipid fázisban halmozódik-e fel. A bezárási hatásfok meghatározására több módszer ismert, amelyek közös alappillére, hogy a be nem zárt hatóanyag és a bezárt molekula egymástól elválasztásra kerüljön.
Az elválasztásra alkalmas módszerek közül a SEC már említésre került a 2.5.2.2. részben.

2.5.3.1. Méretkizárásos kromatográfia (SEC)

Az elválasztás során egy olyan oszlopot alkalmaznak, amely meghatározott pórusátmérőjű géllel van megtöltve. A gél megválasztása függ az elválasztandó anyagtól és a vezikulaméretttől. A vezikularetenció elkerülése végett célszerű az elválasztási lépés előtt az oszlop telítése üres liposzómákkal. Az elválasztás elve alapján a nagyobb átmérővel rendelkező vezikulák gyorsabban átjutnak az oszlopon, mivel nem képesek a pórusokba bejutni és ott elidőzni, ellentétben a kis molekulákkal, amelyek méretükből adódóan csak később jutnak át az oszlopon. Ezáltal térben és időben a bezárt, és a vezikulákba be nem zárt hatóanyag elválasztható egymástól. A koncentráció végső meghatározásához az eluálódott minták spektroszkópiai mérése szükséges. A módszer hátránya, hogy rendkívül időigényes (21).

2.5.3.2. Dialízis

Az elválasztási folyamathoz szükséges a liposzóma mintát tartalmazó dializáló cella, amely egy membránnal van elválasztva a puffert tartalmazó médiumtól. A membrán pórusátmérője tetszőlegesen megválasztható a bezárt hatóanyagtól függően. Az elválasztás azon elven alapul, hogy méretüket tekintve a liposzómák nem képesek átjutni a dializáló membránon, viszont a be nem zárt molekulák átjuthatnak. A puffert tartalmazó külső közegből (akceptor) rendszeres mintavételt követően spektroszkópiai mérési eljárásokkal meghatározható az átjutott molekulák koncentrációja. A mérési módszer hátránya, hogy a megmért bezárási hatásfok nem mindig tükrözi a tényleges értéket, mivel a dialízis során az elválasztandó molekulára nézve az egyensúly viszonylag lassan áll be a dializáló membrán két oldala között, ezért az akceptor fázisból a nem megfelelő időben vett és kiértékelt minta a bezárási hatásfok alá- vagy túlbecsülését eredményezi.

Az egyensúly beállta előtt a mért bezárási hatásfok kevesebb lesz mint a tényleges, míg túlbecsülve az egyensúly beálltához szükséges időt a liposzómákba bezárt hatóanyag diffúziója indulhat meg, aminek köszönhetően a mért bezárási hatásfok jóval több lesz mint a valóságban (22, 23).

2.5.3.3. Centrifugálás

Nagy fordulatszámú centrifugálás során a be nem zárt molekulák és a liposzómák egymástól elválaszthatóak. A folyamat eredményeként a liposzómák pellet formájában az edény alján gyűlnek össze, míg a be nem zárt hatóanyag a felülúszóban lesz megtalálható. A folyamat hátránya, hogy időigényes, gyakori a liposzómák deformációja és SUV-ok esetén az elválasztás kis hatékonyságot mutat (22).

2.5.4. In vitro kioldódási vizsgálatok

A liposzómákba zárt hatóanyag kioldódása dializáló cellában vizsgálható. A dialízis során változtatható a közeg pH-ja, hőmérséklete, kémiai összetétele, és kvantitatíven meghatározható e külső hatások befolyása a kioldódás profiljára. A közeg paramétereinek a megváltozása különösen fontos a trigger-szenzitív liposzómáknál, amelyek a bezárt hatóanyagot egy adott környezeti trigger hatására adják le. Ugyanakkor a dializáló membrán relative kis felülete miatt, az in vitro egyensúlyi dialízissel meghatározott hatóanyag kioldódása a nanorészecskékből lassabb, mint a valóságban (22).

2.6. Liposzóma-sejt kölcsönhatás típusai

Kis molekulák és sejtek közötti kölcsönhatás minősége függ a molekulák fiziko-kémiai tulajdonságaitól és a sejtek típusaitól. Ezek alapján a kis molekulák sejtek általi felvétele történhet egyszerű diffúzióval, facilitált diffúzióval és aktív transzporttal. Ezzel szemben a gyógyszerszállító nanorendszerek nagyobb egységeket képviselnek, mint a kis molekulák. A megnövekedett felszín miatt a sejtek általi felvétel eltérő internalizáló mechanizmusok által szabályozott. A liposzómák sejtekkel való kölcsönhatására befolyással van a sejtek típusa, a liposzómák felszíni töltése, a kettősrétegek száma, továbbá a nanorészecskék mérete és felszíni szerkezete. A liposzómák első lépésben kitapadnak a sejt felszínéhez, amelyet a vezikulák fúziója, lízise vagy a liposzóma és a sejtmembrán közötti lipidkicserélődés követ (24–26).

A liposzómák leggyakrabban az endocitózis egyik formájával kerülnek az intracelluláris térbe.

2.6.1. Fagocitózis

Nagyobb méretű vezikulákra jellemző, általában opszonizáció előzi meg a szervezeten belül. Főleg makrofágok és monociták végzik a fagocitózist. A folyamat során képződő 0,5-10 µm átmérőjű fagoszóma, későbbiekben a lizoszómával fúzionál, létrehozva a fagolizoszómát (25, 27).

2.6.2. Pinocitózis

Olyan endocitotikus módszer, amelynek során a sejt az extracelluláris térből vesz fel egy kis mennyiségű folyadékot és az abban oldott különféle anyagokat. Ezen kívül megfigyelhető a kisméretű részecskék receptorspecifikus pinocitózisa is. A pinocitózis az alábbi altípusokba sorolható (25, 27):

Makropinocitózis

Nem receptor mediált felvétel. Gyakorlatilag minden sejtnél megfigyelhető ez a típusú endocitózis, főleg a semleges töltéssel rendelkező vezikulák internalizációja esetében. A vakuólumok sorsa a sejten belül a késői endoszómával való fúzió, vagy visszakerülnek a sejtmembránhoz és azzal fúzionálnak (25, 27).

Klatrin-függő endocitózis

Ez egy klatrin receptorok által mediált internalizációs mechanizmus. A liposzómák kitapadnak a felszínhez, majd a sejtmembrán felszínén lévő klatrin-1 fehérjék polimerizálódnak, először egy üreget alakítanak ki, majd lefűződik ez a membránrész. A 100 nm körüli liposzómák többsége ezzel a módszerrel kerül be a sejtekbe. A klatrinburkos vezikulák a korai endoszómával fúzionálnak vagy tartalmuk visszakerül az extracelluláris térbe (25, 27, 28).

Kaveola-függő endocitózis

A kaveola fehérje által mediált, a klatrin-függő endocitózishoz hasonló energiaigényes folyamat, bár attól valamivel lassúbb. Kaveolaburkos vezikulák jönnek létre, amelyek akár képesek meg is kerülni a korai endoszómával való fúziót, létre hozva ezzel a kaveoszómát, amely több kaveolaburkos vezikula egyesülésével jön létre. A 60-80 nm körüli méreteloszlású vezikulákra jellemző sejtfelvevő mechanizmus (25, 27).

Speciális receptorok által mediált internalizáció

Ebben az esetben a liposzómák felszínére olyan molekulát kapcsolnak, amely ligandum funkciót tölt be és speciálisan képes kötődni a sejt felszínén található receptorához. Ilyen kapcsolt ligandum lehet, például a transzferrin, amely a transzmembrán glikoprotein típusú transzferin receptorhoz kapcsolódik. A felszíni glükózt tartalmazó liposzómák, a GLUT receptor ligandumai, ennek köszönhetően a vezikulák felhalmozódhatnak a tumor sejtekben, ugyanis a fokozott glükózfelhasználás miatt azok több GLUT receptort tartalmaznak, mint a normális sejtek. Továbbá a daganatos sejtek membránjában nagyobb mennyiségben folsav receptorok is találhatóak, amelyek speciális liganduma a folsav. Ezért a felszíni folsavat tartalmazó liposzómákkal is célba vehetőek a tumoros sejtek (29).

2.7. Liposzómák alkalmazása a gyógyászatban

2.7.1. Liposzómák a fertőző betegségek kezelésében

A fertőző betegségek kiváltói lehetnek: vírusok, baktériumok gombák és paraziták. A továbbiakban ezek közül csak a bakteriális fertőzéseket emelném ki.

A nem patogén baktériumok megtalálhatóak a talajban, vízben, levegőben és fontos szerepet játszanak az emberi szervezetben, például az egészségesen működő bélflóra kialakításában. A patogén baktériumok azonban számos fertőzés okozói, amelyek antibiotikumos kezelés nélkül akár halálos kimenetelűek is lehetnek. Az antibiotikum kemoterápia elengedhetetlen alapfeltétele, hogy az alkalmazott vegyületek szelektíven csak a baktérium sejtre fejtsenek ki károsító hatást és megfelelő koncentrációban legyenek jelen a fertőzés helyén. Jelenleg a rendelkezésünkre álló antibakteriális vegyületeket támadáspontjuk szerint csoportosítjuk. Ez alapján a hatóanyagok gátolhatják a baktériumok szaporodását vagy elpusztíthatják a bakteriális sejteket oly módon, hogy károsítják a bakteriális sejtmembránt vagy a bakteriális DNS-t, valamint gátolhatják a bakteriális fehérjeszintézist. A baktériumok többsége rendkívül alkalmazkodónak bizonyult a károsító hatásokkal szemben, és számos antibiotikumra nézve fejlődött ki rezisztencia. A rezisztencia kialakulásához továbbá hozzájárulhat a felelőtlen antibiotikumhasználat és a nem megfelelő beteg-együttműködés (compliance).

Az antibiotikumok liposzómákba csomagolásának az előnye az, hogy célzottá tehető az antibakteriális terápia, aminek következtében a mellékhatások megjelenése mérséklődik, továbbá megfelelő koncentráció érhető el a gyógyszermolekulák számára nehezen megközelíthető helyeken is. Leggyakrabban azokat az antibiotikumokat zárják liposzómákba, amelyek biohasznosíthatósága nem kielégítő a terápia szempontjából, vagy pedig az alkalmazás során a dózistól függő, káros mellékhatások jelentkeznek. Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) által már jóváhagyott készítmény az Arikayce, amely amikacin hatóanyagot tartalmaz 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidil-kolinból (DPPC) és CHOL-ból készített liposzómákban. Orphan drugként van számontartva. Az orphan drug-ok olyan gyógyszerek, amelyeket ritka betegségek megelőzésére, kezelésére vagy diagnózisára használnak. A ritka betegségek a Föld lakosságának mintegy 6-8 %-át érintik, prevalenciáját tekintve az Európai Unióra nézve ez 5/10 000, míg az USA-ben ez 6,4/10 000 eset (30). Az Arikayce fő indikációja olyan pulmonális fertőzések kezelése, amelyet a *Mycobacterium avium complex* által előidézett patogének okoznak, cisztás fibrózissal nem rendelkező páciensek esetében. A készítményt inhalálva kell alkalmazni. Kutatások folynak olyan liposzómába zárt készítményekkel, amelyek ciprofloxacint tartalmaznak a *Klebsiella pneumoniae* vagy *Sterptococcus pneumoniae* által okozott tüdőt érintő bakteriális fertőzések kezelésére. A baktériumok által kialakított ellenálló réteg, a biofilm képződés megakadályozása és megszűntetése is lehetővé válik a liposzómák segítségével. Leggyakrabban a következő baktériumok alakítanak ki biofilmet a szájban, a bőrön és a gyógyászatban használt különböző eszközök felületén (katéter): *Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis, Streptococcus gordonii, Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius, Staphylococcus epidermidis, Proteus vulgaris.* Liposzómákba zárt fluorokinolon és aminoglikozid, valamint béta-laktám antibiotikumok ígéretes konstrukcióknak bizonyultak ezekkel a kórokozókkal szemben. A módosított nano-gyógyszerszállító rendszerek alkalmazhatóak intracelluláris kórokozóknál is, mint például a *Mycobacterium tuberculosis* által okozott tuberkulózis (TBC) kezelésére, ahol a makrofágon belül elhelyezkedő baktérium sejtek nehezen érhetőek el az alkalmazott antibiotikumok számára (31, 32).

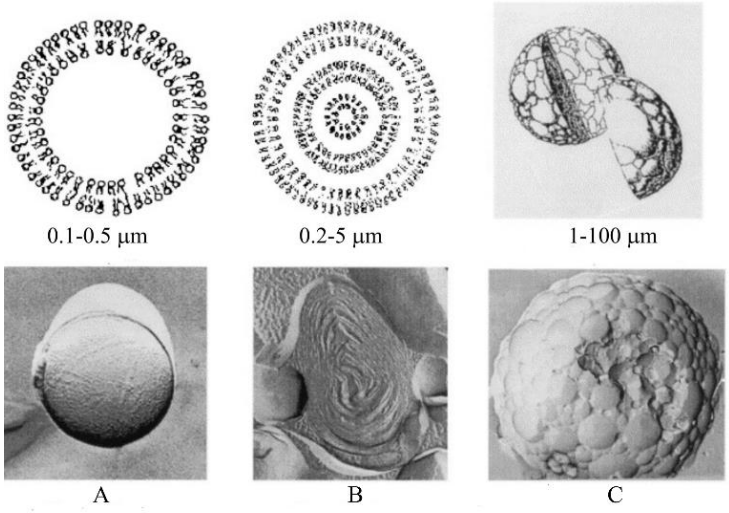
A mikózisok kialakulásához számos hajlamosító tényező vezethet, mint például a magas életkor, immunhiányos állapotok, immunszuppresszív gyógyszeres kezelés. A

gombás fertőzések egyik legsúlyosabb formái a szisztémás mikózisok, ahol a belső szervek gombás fertőzése figyelhető meg. A kórkép kezelés hiányában fatális következményekkel járhat a betegekre nézve. A szisztémás gombás fertőzések kezelésére leggyakrabban alkalmazott gombaellenes szerek közé sorolható az amphotericin B, és az azol típusú vegyületek (flukonazol, itrakonazol). Az amphotericin B szerkezetét tekintve egy makrociklikus lakton amfifil tulajdonsággal. Farmakokinetikája meglehetősen rossz, főként nagy molekulatömege, kis permeabilitása és alacsony szolubilitása miatt. Az amphotericin B hatásmechanizmusa annak köszönhető, hogy képes a gombák sejtfalában található ergoszterinhez kötődni, és kilyukasztja a sejtmembránt, ami a gombasejt pusztulásához vezet. Fungicid és fungisztatikus hatással is rendelkezik, a hatás helyén elért koncentrációtól függően. A gombák sejtfalát alkotó ergoszterin nagyon hasonló a humán sejtekben található CHOL molekulához, ezért az amphotericin B ehhez is kötődik valamilyen mértékben, amely a terápia során megjelenő mellékhatások kialakulásáért felelős. Az amphotericin B főbb mellékhatásaiként megemlíthető: a nefrotoxicitás, kardiotoxicitás, trombocitopénia és a neurotoxicitás. Az amphotericin B molekula liposzómákba csomagolása során növelhető a szelektivitás mértéke, és ezáltal csökkenthető a konvencionális terápiát kísérő káros mellékhatások megjelenése. 1995-ben került bevezetésre az első liposzómás amphotericin B készítmény Abelcet® néven. A liposzómák DMPC és DMPG lipidekből állnak 7:3 arányban. 1997-ben hozták forgalomban az Ambisome® készítményt, amely HSPC-t, CHOL-t, DSPG-t és amphotericin B-t tartalmaz 2:1:0,8:0,4 arányban. Az Abisome® készítmény a kis átmérőjű vezikuláknak és a CHOL membránstabilizáló hatásának köszönhetően, hosszabb keringési idővel és jobb vezikulastabilitással rendelkezik. 1996-ban került engedélyezésre az FDA által az Amphotec® liposzómás készítmény. Összetételét tekintve CHOL-szulfát és amphotericin B elegyéből álló 100 nm alatti átmérőjű kis unilamelláris vezikulákat tartalmazó liposzómás gyógyszerforma. A liposzómákba csomagolt amphotericin B farmakokinetikáját tekintve szignifikánsan jobbnak bizonyult a szabad hatóanyaggal szemben és a mellékhatásprofilja is nagymértékben javult a terápia során (33, 34).

2.7.2. Liposzómák a daganatos betegségek kezelésében

A daganatos betegségek kezelése számos kihívással állítja szembe a szakembereket, főként a tumorok diverzitásának és a daganatellenes szerek mérsékelt szelektivitásából adódó mellékhatásoknak köszönhetően. Az alternatív gyógyszerszállító rendszerek a daganatellenes szerek farmakodinamikai és farmakokinetikai profilját javíthatják. A nanogyógyszerek segítségével növelhető a tumorellenes szerek szelektivitása, és ezáltal csökkenthető az egészséges sejteket is érintő káros hatások megjelenése. A daganatellenes kemoterápia szempontjából mérföldkőnek számított az FDA által 1995-ben jóváhagyott Doxil® fantázianevű DXR tartalmú liposzómába zárt nanogyógyszer. A vezikula HSPC, CHOL és DSPE-hez kapcsolt MPEG 56:38:5 molarányú elegyéből áll. Az aktív betöltéses technikának köszönhetően a 80-100 nm átmérőjű liposzómák DXR tartalma meghaladja a 90 %-ot, amely a liposzóma belsejében precipitált formában található meg. A pegilált felszín a liposzómák hosszabb keringési idejét eredményezi. A Doxilt® intravénásan alkalmazzák, indikációját tekintve ováriumkarcinómában és AIDS okozta Kaposi szarkómában. A Doxillal® végzett terápia során a betegek kevesebb mellékhatásról számoltak be, főként a DXR okozta kardiotoxicitás csökkent szignifikánsan. A DaunoXome® liposzómába zárt készítményt 1996-ban engedélyezték az AIDS okozta Kaposi szarkoma kezelésére. A vezikulák a daunorubicin (DNR) hatóanyagot tartalmazzák, amely egy DXR-hez hasonló, ugyancsak antraciklin-glikozid vázzal rendelkező vegyület, amely interkaláció révén képes károsítani a DNS-t. A liposzómák a következő mólarányú összetétellel rendelkeznek: DSPE:CHOL:DNR, 10:5:1. A vezikulák átlagos átmérője 45 nm, amelynek köszönhetően kevésbé felismerhetőek a RES számára. A liposzómába zárt gyógyszerkészítmény farmakokinetikája jobbnak bizonyult a szabad molekulával szemben, ugyanis a gyógyszer felezési ideje a korábbi 0,77 órához képest 4-5,6 órára növekedett (34).

A Depocyt® készítmény citarabint tartalmaz, amely DepoFoam® technológiával készült lipidalapú multivezikuláris rendszer és alkalmas hidrofil molekulák viszonylag nagy hatékonyságú bezárására és a nyújtott hatóanyag-leadásra.



4. ábra: *Unilamelláris liposzómák (A), multilamelláris liposzómák (B) és multivezikuláris liposzómák (C) vázlatos és elektronmikroszkóppal készített képe* (35).

A DepoFoam® rendszerek 1-100 µm mérettartomány között előforduló multivezikuláris vezikulák (4. ábra). Méretüket tekintve jóval nagyobbak, mint az unilamelláris vagy a multilamelláris liposzómák. A Depocyt® DOPC és DPPG biodegradábilis lipidekből áll, amely a hatóanyag kioldódását követően lebomlik a szervezetben. A Depocyt® gyógyszert neoplasztikus meningitis kezelésére használják intratekális úton. A citarabin felezési ideje a Depocytnak® köszönhetően 3 óráról (36) 141 órára emelkedett, amely kedvezőnek bizonyult a gyógyszer hasznosíthatóságát és a mellékhatásokat tekintve (34).

A Mepact® nanogyógyszer 2004-ben került forgalomba az EMA által, mint orphan drug, nem-metasztatizáló osteosarcoma kezelésére gyermekeknél, serdülőknél és fiatal felnőtteknél. Fő hatóanyaga a mifamurtide vagy másnéven muramil-tripeptid-foszfatidil-etanolamin, amely a *Mycobacterium* fajok sejtfalában előforduló muramil-dipeptid szintetikus származéka. Hatását tekintve immunstimuláló szerepet tölt be, amely a szervezetben lévő makrofágokat, monocitákat és dendritikus sejteket aktiválja a sejteken található NOD2-receptorhoz kapcsolódva. Az aktiváció következtében interleukinek és tumor nekrózis faktorok termelődnek a makrofágok által, amelyek képesek elpusztítani a tumoros sejteket, míg az egészséges sejteket nem károsítják. A liposzómák DOPS-t és POPC-t tartalmaznak 3:7 mólarányban. Méretüket tekintve 100 nm alatti multilamelláris liposzómák (34).

2.7.3. Liposzómák szerepe a vakcinációban

A vakcinák segítségével lehetővé vált az emberiség számára a különféle betegségek, fertőzések megelőzése. A liposzómák egyrészt, mint szállító rendszerek játszanak fontos szerepet a vakcinációban, ugyanis a segítségükkel kisebb peptidek/protein antigének, mRNS, DNS származékok szállíthatóak a szervezetben anélkül, hogy gyors eliminációjukra vagy lebomlásukra kerülne sor a gazdaszervezetben, másrészt a vezikulák lipidösszetételüknek, felszíni töltésüknek, membrán rigiditásuknak és méretüknek köszönhetően fontos immunmoduláns szerepet töltenek be.

A vakcinák első generációjához tartoznak az elölt vagy a legyengített kórokozókat tartalmazó védőoltások. Jelenleg azonban az alegység vakcinák kerültek a fókuszba, amelyek a fertőzés szempontjából lényeges peptid antigént vagy az ezt kódoló RNS, DNS régiót tartalmazzák. Számos előnyük közé sorolható a jobb definiálhatóság, kontrolláltabb és gyorsabb előállítás, nagyobb hatékonyság. A liposzómák képesek aktiválni mind a sejtes mind az antigén immunválaszt a helper T-sejtek (T_H1 és a T_H2) aktivációjával (37, 38).

2019 decemberében kezdődött Wuhan-ban, az azóta globálissá fejlődő COVID-19 pandémia, amelynek kiváltásáért a SARS-CoV-2 vírus felelős. A fertőzés egyénenként változó lefolyású lehet, és a betegség súlyosságát befolyásolja a szervezetbe jutott vírus koncentrációja is. A COVID-19-ben eddig több százmillió ember fertőződött meg és jelenleg több mint 5 millió halálos áldozatot számlál (39). Univerzális kezelés és gyógyszer, jelenleg nem áll rendelkezésünkre, ezért a legjobb stratégia a vírussal szemben a védekezés, amelyet a védőoltásokon keresztül érhetünk el. 2020. december 21-én a BioNTech/Pfizer által kifejlesztett Comirnaty (40) nevű mRNS vakcina, 2021. január 6-án pedig a Moderna (Spikevax) (41) mRNS vakcinája kapott forgalomba hozatali engedélyt az EMA-tól. Az mRNS-t önmagában a szervezet gyorsan elbontja, illetve eliminálja ezért az mRNS szállítását és a sejtekbe juttatását lipidalapú nanoszállító rendszerekkel oldják meg. Mivel az mRNS negatív töltésű, pozitív töltésű lipidek szükségesek a molekula bezárásához, amelyek alkalmazása nagy kihívást jelentett a fejlesztők számára a kationos lipidek toxicitása miatt. Az ALC-0315 egy funkcionális kationos lipid, amely a formulálás során adott pH-n pozitív töltéssel rendelkezik és képes az mRNS-t kötni. Az ALC-0159 egy pegilált lipid, amely elmaszkírozva a nanovezikula

felszínét, megakadályozza a nemspecifikus proteinekhez való kötődését, ezáltal biztosítja az mRNS-t tartalmazó vezikula hosszabb keringési idejét. A vezikulák tartalmaznak ezenkívül még CHOL-t és DSPC-t, ez utóbbi egy ikerion tulajdonsággal rendelkező semleges töltésű lipid. Szerepük a membránkettősréteg kialakítása, stabilizálása és a vezikula sejtekkel történő fúziójának az elősegítése. Az így kialakított rendszer kompatibilis a szervezettel és nem okoz toxikus mellékhatásokat, ugyanakkor képes betölteni a funkcióját, azaz a koronavírus tüskefehérjét kódoló mRNS molekulát a sejtekbe bejuttatni, és kiszabadítani a vezikulákból. Ezt követően a sejt már legyártja az mRNS által kódolt tüskefehérjét és prezentálja azt az immunsejteknek a szervezeten belül, hogy az esetleges fertőzés során sikeresen eliminálja a test számára idegen vírusokat (40). A Spikevax vakcina hasonló elgondoláson alapul, mint a Comirnaty. Összetételét tekintve a következő alkotóelemekből áll: SM-102, CHOL, DSPC és DMG-PEG2000. Az SM-102 egy nemrégiben szintetizált ionizálható tulajdonsággal rendelkező lipid, amely kationos formában megköti az mRNS-t, és az így létrejött semleges forma már kompatibilis a szervezettel (40–42).

Az Infexal® V Berna lipid alapú influenza elleni védőoltás 1997-ben került forgalomba elsőként Svájcban. Az Infexal® V egy háromértékű alegység vakcina, amely a H1N1, H3N2 és influenza B törzsből származó hemagglutinin (HA) és neuroaminidáz (NA) antigéneket tartalmaz. A lipidkettőréteg foszfatidil-kolin és foszfatidil-szerin lipidekből áll, illetve, HA és NA vírus antigének vannak a membránba ágyazva. Az így kialakított egységet viroszómának nevezzük. A viroszómák átlagos átmérője 150 nm. A klinikai vizsgálatok és a forgalomba hozatal óta gyűjtött adatok alapján az Infexal® V hatékony eszköznek bizonyult a fertőzés megelőzését illetően (43).

Mosquirix™ az első malária ellenes védőoltás, amely lényegében egy egyértékű rekombináns fehérjét tartalmazó alegység vakcina. A védőoltás a *Plasmodium falciparum* cirkumsporozoita (CPS) fehérje egyes epitópjait tartalmazza hepatitis B vírus antigénnel fúzionáltatva. A CPS fontos szerepet tölt be a sporozoita májba jutásához, amelyre a malériát hordozó szúnyog csípését követően kerül sor. Adjuvánsként liposzóma alapú rendszert alkalmaztak. A liposzómák készítéséhez DOPC lipidet és CHOL-t használtak, az adjuváns szerepét pedig az AS01 töltötte be, amely MPL-ből és QS-21 szaponinból

áll. A Mosquirix™ vakcinát használják mind felnőttek, mind gyerekek immunizálásához az endémiás területeken (44, 45).

2.8. Liposzómák mint modellmembránok

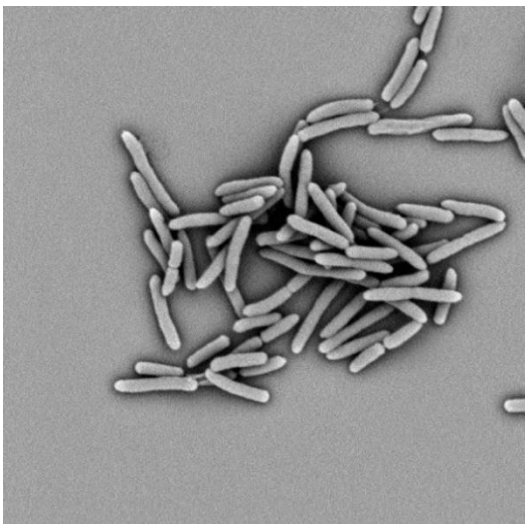
A sejt az élő szervezet legkisebb önállóan működő egysége, amelyet sejtmembrán vesz körül. A sejtfal szerkezetét tekintve foszfolipid kettősrétegből áll. A fehérjék ebben a kettősrétegben foglalnak helyet, mintegy beleágyazva a sejtfalba. Ugyanakkor a sejtfal és azok fehérje komponensei, a Singer-Nicolson modell szerint, egy dinamikusan változó rendszer, amely lehetővé teszi a sejt alkalmazkodását a megváltozott környezettel szemben. A sejtfal szerepe egyrészt az intracelluláris közeg védelme, másrészt a kapcsolatteremtés is az extracelluláris környezettel. A liposzómák a sejtekhez képest egyszerűbb rendszereknek tekinthetőek, ezért alkalmasak a biológiai membránok modellezésére. Liposzómák segítségével vizsgálhatóak a sejtet, illetve a sejtfalat érő különböző fizikai/kémiai hatások, és azok rövid és hosszútávú következményei, továbbá modellezhetőek a gyógyszermolekulák membránokkal való kölcsönhatásai. Különösen fontos ez a gyógyszerfejlesztés során, ahol a kölcsönhatás típusa befolyással van a gyógyszermolekula abszorpciójára és disztribúciójára, és ezáltal a hasznosíthatóságára is (46, 47).

A modellmembránok segítségével tanulmányozhatóak a sejtekre ható oxidatív stressz mechanizmusai és következményei. Fiziológiás, illetve patológiás körülmények között a lipidperoxidáció okai a következők lehetnek: sugárbehatás, klórozott szénhidrogén származékok okozta toxicitás, mutagenezis, karcinogenezis, és a sejt öregedése, stb. Az oxidáció által kiváltott lipidkárosodás leggyakrabban a telítetlen lipideket érinti. A folyamat egy láncreakcióként írható le, amelynek első lépése, hogy a kiváltó tényezők hatására, például fény, magas hőmérséklet vagy enzimatikus aktivitás, a zsírsavak elektronleadás vagy elektronfelvétel során szabad gyököket hoznak létre, amely oxigéngazdag környezetben peroxid képződést idéz elő, amely újabb lipideket képes oxidálni (47). A szabadgyökök (ROS) által okozott oxidatív károsodást a tudománynak sikerült orvosi szempontból hasznossá tennie. A fotodinamikus terápia (PDT) során daganatos sejtekbe vagy baktériumok által kialakított biofilmek helyére, fényre érzékeny molekulákat juttatnak, ezeket nevezzük fényérzékenyítő anyagoknak, amelyek normál körülmények között nem rendelkeznek toxikus hatással, azonban egy adott hullámhosszú

fénnyel megvilágítva, a fotokémiai reakció során ROS képződik, amely károsítva a sejtmembránt a bakteriális vagy a daganatos sejtek pusztulásához vezethet. Ily módon az alkalmazott terápia lokalizálható és szelektívvé tehető (48). A leggyakrabban előforduló fényérzékenyítő anyag a porfirin vagy a molekula módosításával keletkező porfirin származékai. Kutatócsoportunk egyik kutatási területe mezoporfirin származékok membránhoz való kötődésének, illetve a membrán-környezetben való elhelyezkedésének jellemzése; a besugárzás hatására képződő ROS kimutatása, valamint mennyiségének meghatározása; továbbá közvetlen sejtmembránt károsító hatásának igazolása. Ebben a munkában modellrendszerként különböző liposzómákat használtunk (49). A klinikai gyakorlatban alkalmazott, jelenleg is forgalomban lévő porfirin származékok a következők: a Photofrin® (nyelőcső és tüdőkarcinóma), a Foscan® (fej és nyaki daganatok), továbbá a Veteporfin® (makula degeneráció) (48).

3. TBC

A TBC cseppfertőzéssel terjedő betegség, amelyet a *Mycobacterium tuberculosis* baktérium okoz. A *Mycobacterium tuberculosis* pálcika alakú, néha elágazó fonalakat alkotó (5. ábra), lassan növő, vastag ellenálló sejtfallal rendelkező kórokozó (50).

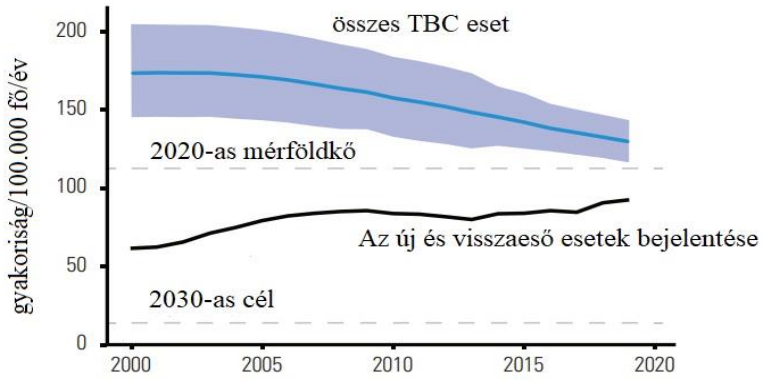


5. ábra: *Mycobacterium tuberculosis pásztázó elektormikroszkóppal készített képe, 13000 nagyítás. Forrás: © S. Homolka, Research Center Borstel, Leibniz Lung Center*

Prevalenciáját tekintve a Föld lakosságának mintegy egynegyede fertőzött TBC-vel. Annak ellenére, hogy a TBC kezelhető, évente mégis több mint 1 millió halálos áldozatot regisztrálnak. A WHO 2020-as adatai szerint a halálozási arány tovább növekedett a COVID-19 fertőzés terjedésének következtében. A meglehetősen hosszú kezelési idő, amely a legjobb kimenetel esetében is minimum fél év, komoly anyagi, testi és szellemi megterhelést jelent a betegek számára (6. ábra) (51).

A HIV fertőzött személyeknél meglehetősen nagy kihívást jelent a TBC kezelése az antivirális gyógyszerek és az antituberkulotikumok interakciója, valamint az ebből adódó mellékhatások miatt. A HIV/TBC koinfekció a WHO 2020-as jelentése szerint kb. 208 000 ember halálát okozta. Ebből adódóan a TBC komoly veszélyt jelent a HIV betegkre nézve, ugynis a TBC fertőzés az egyik vezető halálok ebben az esetben. (51).

3.1. Epidemiológia



6. ábra: *A TBC esetszámainak alakulása az évek függvényében* (51).

A TBC az egyik legősibb fertőző betegség, amely betegség eradikációját a WHO már több évtizede célul tűzte ki. 2019-ben mintegy 10 millió új TBC fertőzöttet regisztráltak, főleg India, Indonézia és Kína területén. A COVID-19 fertőzés extrém gyors terjedése a világban torzította az újabb TBC statisztikákat is. A hiányos adatszolgáltatás 25-30 %-os visszaesést okozott a bejelentett (detektált és a kezelt) esetszámokban (51).

3.2. A TBC fajtái és kemoterápiája

Anatómiai szempontból a TBC pulmonális és extrapulmonális csoportra osztható. A kezelés szempontjából elsődlegesen fontos tisztázni, hogy a TBC milyen manifesztációjával állunk szemben, ugyanis megkülönböztetünk az alkalmazott gyógyszerekre érzékeny, az alkalmazott gyógyszerekre nem érzékeny, azaz rezisztens törzseket, valamint látens TBC-t.

3.2.1. Gyógyszer-szenzitív TBC

A gyógyszerekre jól reagáló TBC kezelésének a protokollja közel 35 éve nem változott. A kezelés időtartama átlagosan 6-12 hónap, ami személyenként nagy variabilitást mutat. Itt elsősorban elsővonalbeli szerek kombinációit alkalmazzák: izoniazid (INH), rifampicin (RIF), etambutol (EMB) és pirazinamid (PZA). A vegyületek

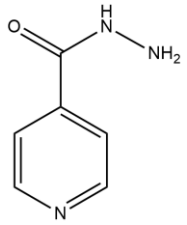
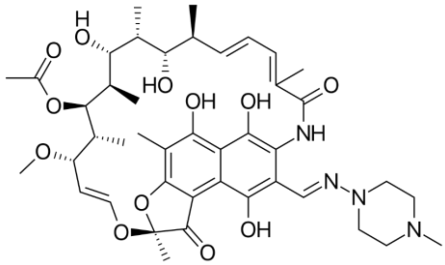
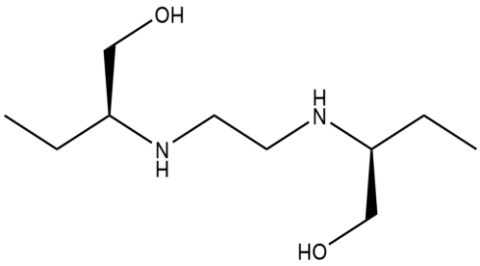
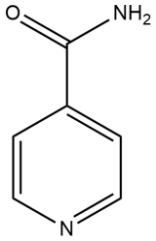
szerkezeti képleteit a 4. táblázat foglalja össze A klasszikus TBC terápia két részre osztható:

1). Intenzív fázis (2 hónap): INH, RIF, EMB, PZA;

2). Fenntartó fázis (4 hónap): INH, RIF (52).

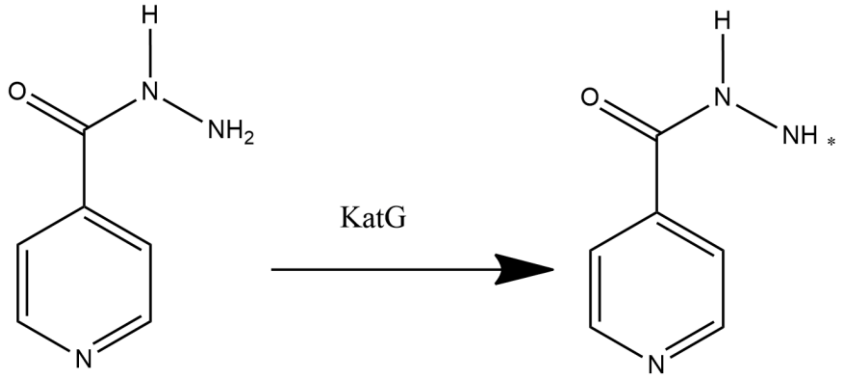
Az intenzív fázisban a kezelés fő célja a gyorsan szaporodó baktériumok elpusztítása és a fertőzés transzmissziójának a megakadályozása. A fenntartó fázisba pedig az alvó baktériumokra hatva a visszaesés elkerülése az elsődleges szempont (53).

4. táblázat: *A TBC kezelésére használt elsővonalbeli antibiotikumok.*

Molekulaszerkezet	**Név**
	Izoniazid (INH)
	Rifampicin (RIF)
	Etambutol (EMB)
	Pirazinamid (PZA)

3.2.1.1. Izoniazid (INH)

Az osztódó baktériumokra baktericid, míg a nyugvó kórokozókra bakteriosztatikus hatást fejt ki. Az INH egy prodrug[1], amely diffúzió útján jut be a baktériumba, majd ott a *Mycobacterium tuberculosis* által termelt KatG (kataláz-peroxidáz) aktiválja (7. ábra). Az aktivált forma több ponton gátolja a mikolsav szintézist, amely lipid fontos alkotóeleme a baktérium sejtfalának (54). Az INH MIC értéke: 0,02-0,2 µg/ml. RIF-fel, EMB-vel és PZA-val kombinációban alkalmazzák a rezisztencia elkerülése végett. Szájon át adagolva gyorsan felszívódik. A szervezeten belül az N-acetil



7. ábra: *Az INH aktivációja a KatG enzim által a hatást kifejtő formává* (54).

transzferáz enzim bontja és mivel ennek az enzimnek a működése egyénenként nagy variabilitást mutat ezért a vérszintje és a felezési ideje személyenként szintén változhat. A kaukázusi és afro-amerikai népcsoport 40-70 %-ánál kevésbé működik ez az enzim, ezért ők a lassú acetilálókhoz sorolhatóak. Ebből kifolyólag az INH terápiája során szükséges a májenzimek folyamatos monitorozása és amennyiben a helyzet megkívánja a dózis módosítása. Paracetamollal, valamint alkohollal alkalmazva növeli a májkárosodás esélyét (55).

[1] Prodrug: a gyógyszer molekula az adott formájában nem rendelkezik terápiás hatással, hanem a szervezeten belül bizonyos enzimek hatására aktív formává metabolizálódik.

3.2.1.2. Rifampicin (RIF)

Hatását tekintve a bakteriális DNS-függő RNS-polimerázt gátolja. Mind a gyorsan szaporodó, mind az alvó TBC baktériumokra, illetve az intracelluláris kórokozókra is baktericid hatást fejt ki. Alkalmazható szájon keresztül és intravénásan is. A RIF összességében jól tolerálható antibiotikum. Mellékhatásként gyakori a testnedvek elszíneződése és a hepatotoxicitás. Hosszabb ideig adagolva előfordulhatnak túlérzékenyégi reakciók, mint kiütés, trombocitopénia és vesekárosodás. Indukálja a CYP3A4 enzim működését, aminek következtében erősen módosíthatja többek között az antiaritmiás, gombaellenes és HIV-fertőzésben alkalmazott antivirális gyógyszerek hatását (56).

3.2.1.3. Etambutol (EMB)

Az arabinogalaktán szintézist gátolva megakadályozza a baktérium sejtfal felépülését. Csak kombinációban alkalmazható. Potencírozza az INH hatását, azaz együttes alkalmazásukkor nagyobb hatás alakul ki, mint az külön-külön várható lenne. Az alkalmazott dózisban főleg bakteriosztatikus hatást fejt ki. Szájon át alkalmazva jól felszívódik. Alkalmazása fokozott elővigyázatosságot igényel a dózistól függő mellékhatásai okán, amely főként az oculotoxicitás és az ototoxicitás (57).

3.2.1.4. Pirazinamid (PZA)

A nikotinamid alapvázzal rendelkező pirazin analóg. Hasonlóan az INH-hoz prodrug. A PZA-ból pirazinsav keletkezik a savas pH hatására, és lényegében ez a forma fejti ki a baktériumellenes hatást. Monoterápiában alkalmazva többnyire hatástalan, ezért adagolása csakis kombinációban javasolt az elsővonalbeli antituberkulotikumokkal. Mind baktericid mind bakteriosztatikus hatással is rendelkezik. A PZA fontos szerepet játszik a TBC terápiájában, ugyanis főleg a perzisztáló sejtekre fejt ki hatást. Ennek köszönhetően csökkenthető a TBC terápiája 6 hónapra, valamint megelőzhető a relapszus kialakulása. Étkezés utáni bevétellel hasznosul a legjobban. Máj- és vesefunkció csökkenés során az alkalmazott dózis módosítsa szükséges (55, 58).

3.2.2. Látens TBC kezelése

Látens TBC-ről akkor beszélünk, ha az adott személy TBC fertőzésen esett át, de nem alakult ki a TBC klinikai manifesztációja. A látens TBC az esetek 5-10 %-ában aktív fertőzéssé progrediál. Diagnosztizálására korábban a tuberkulin bőrpróbát alkalmazták, amely ma már csak korlátozottan alkalmazható, mivel a BCG oltáson átesett személyek gyakran fals pozitív eredményt mutatnak. Jelenleg az interferon-gamma tesztet alkalmazzák, amely a *Mycobacterium tuberculosis* által termelt antigének hatására a T-sejtekből felszabadult interferon-gammát mutatja ki. Ez merőben eltér az oltás során alkalmazott *Mycobacterium bovis* antigénjeitől, így az esetleges TBC-elleni oltás nem ad álpozitív eredményt, és immunszuppresszált betegeknél is alkalmazható. Hátránya az eszközigény miatti magasabb költség.

A WHO ajánlásai szerint a látens TBC az alábbi gyógyszerekkel kezelhető:

- INH naponta, 6 vagy 9 hónapig;
- INH+rifapentin heti egyszer, 3 hónapig;
- INH+RIF naponta, 3 hónapig;
- RIF naponta, 3-4 hónapig (51).

A leggyakrabban alkalmazott az INH monoterápia, azonban a toxikus mellékhatások és a rossz tolerálhatóság miatt a rövidebb ideig alkalmazott INF+RIF/rifapentin vagy a RIF monoterápia kedvezőbb kimenetelű (59).

3.3. Rezisztencia

A TBC helyzet súlyosságát tovább növeli a rezisztens törzsek megjelenése. Az ilyen megbetegedésekhez tartozó esetszámot 2019-ben több mint 500 000-re becsülték. A legtöbb rezisztens esetszámot Indiában, Kínában, Oroszországban, valamint az egykori Szovjet tagállamokban, például Ukrajnában regisztráltak. A kezelt betegek 17,7 %-ánál volt megfigyelhető a rezisztencia valamilyen formája (51).

3.3.1. A rezisztencia típusai

- Monodrug rezisztencia: a TBC baktérium egyféle gyógyszerre rezisztens.
- Polidrug rezisztencia (PDR-TBC): az adott TBC baktérium több mint 1 gyógyszerrel szemben ellenálló, de nem rezisztens egyszerre az INH-ra és a RIF-re is.

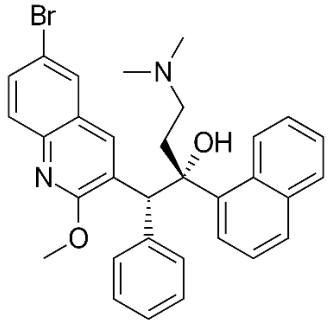
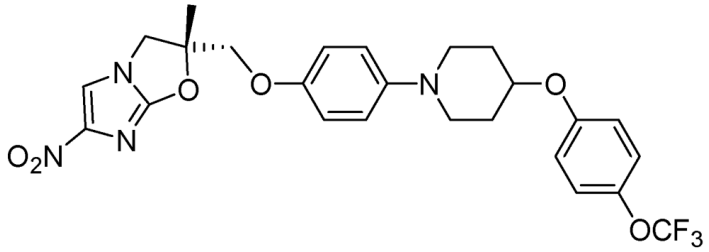
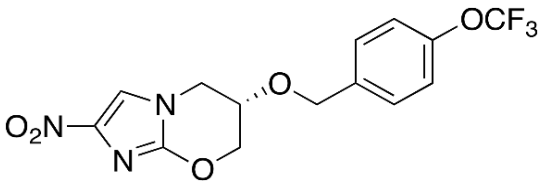
- Multidrug rezisztencia (MDR-TBC): az adott kórokozó mind RIF-re, mind az INH-ra nézve rezisztens.
- Pre-extenzív rezisztencia (pre-XDR-TBC): a rezisztencia azon formája, amikor a kórokozóval szemben mind az INH, mind a RIF hatástalan, illetve ezen kívül valamilyen fluorokinolonnal vagy másodvonalban alkalmazott intravénás aminoglikoziddal (kanamycin, capreomycin) szemben is ellenálló.
- Extenzív rezisztencia (XDR-TBC): A rezisztencia legsúlyosabb formája, amikor a RIF és az INH mellett rezisztencia alakul ki a másodvonalban alkalmazott fluorokinolonok, valamint legalább az egyik parenterálisan alkalmazott aminoglikoziddal (amikacin, kapreomycin vagy kanamycin) szemben is (60).

3.3.2. Gyógyszerrezisztens TBC kezelése

Az intravénásan használt aminoglikozidok, mint például a kanamycin és a capreomycin háttérbe szorultak, jelenleg főként a szájon át alkalmazható antibiotikumokat preferálják az ajánlások. Miután a rezisztencia adott formája megállapításra került, a WHO legfrissebb ajánlása szerint az elsődlegesen választandó szerek: fluorokinolonok (levofloxacin, moxifloxacin), bedaquilin, linezolid. Másodsorban választandó gyógyszerek közé sorolhatóak: clofazimine, cycloserin vagy terizidone, delamanid, EMB, meropenem. A kezelés során legalább 4 gyógyszer kombinációját alkalmazzák, miután tesztekkel igazolták, hogy melyik vegyületre érzékeny a kórokozó. Megkülönböztetünk hosszú, illetve rövidebb lefolyású kezelést. A hosszabb kezelés során akár 24-60 hónapig is szükséges a terápia alkalmazása, míg a rövidebb opció során 9-12 hónapig tart a kezelés. A hosszú terápia során 6 hónapig legalább 4 fent említett gyógyszer kombinációját alkalmazzák, amit 18-20 hónapos kezelési időszak követ, amely során 3 gyógyszert alkalmaznak együttesen. A rövidebb idejű kezelés csak akkor alkalmazható, ha az adott betegnél tesztekkel igazolták a baktériumnak a fluorokinolonokra való érzékenyégét. A rövidebb terápia során a gyógyszerek következő kombinációját alkalmazzák: 4-6 hónapig moxifloxacin, amikacin, ethionamid, clofazimine, nagy dózisú INH, PZA és EMB, majd ezt követően még 5 hónapig moxifloxacin, clofazimine, PZA és EMB (60).

3.3.3. Új TBC-ellenes gyógyszerek

5. táblázat: *A TBC kezelésére használt új gyógyszerek.*

Molekulaszerkezet	Név
	Bedaquilin
	Delamanid
	Pretomanid

3.3.3.1. Bedaquilin

Gátolja a *Mycobacterium tuberculosis* ATP-szintáz proton pumpáját, és ezáltal a fontosabb anyagcsere-folyamatokat is. Diarylquinoline szerkezettel rendelkező molekula (5. táblázat), amelyet az FDA engedélyezett 2012-ben, az EMA pedig 2014-ben (61) a TBC kezelésére. Ezt az antibiotikumot is kombinációban célszerű alkalmazni. Linezoliddal kombinálva komoly sikereket értek el a rezisztens törzsekkel fertőzött betegek terápiája során. Gyerekeknél is alkalmazható 6 év fölött. A bedaquilinnel szembeni rezisztencia eddig kis mértékben mutatkozott, azonban keresztrezisztenciáról számoltak be azon betegek többségénél, akik kaptak már korábban clofazimine-t. A bedaquilin adagolása mellett fontos a rendszeres EKG vizsgálat, ugyanis QT-intervallum megnyúlást okoz, továbbá szükséges a májenzimek vizsgálata. Delamaniddal való

kombinációja nem javasolt, ugyanis növeli a kardiotoxikus mellékhatások megjelenésének a gyakoriságát (62, 63).

3.3.3.2. Delamanid

2014-ben az EMA által engedélyezett gyógyszer a TBC kezelésére. Szerkezetét tekintve egy dihidro-nitroimidazo-oxazol származéka (5. táblázat). Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szemben hatástalan, illetve a bélflórát alkotó baktériumokra nézve sem hatékony, csak a *Mycobacterium tuberculosis* baktériumra fejt ki baktericid hatást. A mikolsav és a ketomikolsav szintézis gátlásával megakadályozza a mikobakteriális sejtfal felépítését. Prodrug, amelyet egy deazaflavin dependens nitroreduktáz aktivál. Szájon át alkalmazzák. Felszívódása étellel bevéve a legjobb. MIC értéke meglehetősen alacsony: 0,006-0,0024 µg/ml. Leggyakoribb mellékhatásai: gasztrointesztinális problémák, álmatlanság, fejfájás, QT-intervallum megnyúlás, tremor. Metabolizmusa csak kis részben történik CYP450 enzimeken keresztül, ezért más gyógyszerekkel való interakciója nem számottevő (64, 65).

3.3.3.3. Pretomanid

2019-ben elsőként az FDA által engedélyezett gyógyszer a rezisztens TBC törzsek kezelésére, majd 2020-ban az EMA által is engedélyeztetésre került (66). Nitroimidazoxazin szerkezettel rendelkező antituberkulotikum (5. táblázat), amely hatásos mind a gyorsan szaporodó, mind a perzisztáló baktériumokkal szemben is, gátolva a mikobakteriális sejtfal, valamint a fehérje szintézisét. Minimális gátló koncentációja a MDR-TBC törzsek ellen kevesebb mint 1 µg/ml. A következő kombinációk részeként alkalmazzák: 1) Bedaquillin, pretomanid és linezolid; 2) Bedaquillin, pretomanid, moxifloxacin és PZA. Szedése szájon át magas zsírtartalmú étellel javasolt. Több útvonalon keresztül metabolizálódik, 20 %-ban CYP3A4 útvonalon keresztül. Mellékhatásai között megemlítendő a meglehetősen gyakori perifériás neuropátia, akne, anémia, gasztrointesztinális panaszok, megnövekedett májenzimek, látási zavarok (67, 68).

3.4. Mycobacterium Taxonomia

A *Mycobacterium spp*. tagjai az Actinobacteria törzsbe, azon belül pedig a Mycobacteriaceae családba tartoznak, amely közel 170 fajt tart nyilván. A

Mycobacteriaceae családban előfordulnak patogén (*Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae*), opportunista patogén (*Mycobacterium avium, Mycobacterium simiae, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium haemophilum*) és nem patogén (*Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium phlei*) egyedek is. A *Mycobacterium ulcerans* egy opportunista baktérium, elsősorban a trópusokon előforduló fekélyes bőrbetegséget okoz, amely kezelés nélkül krónikus fekéllyé alakulhat (69).

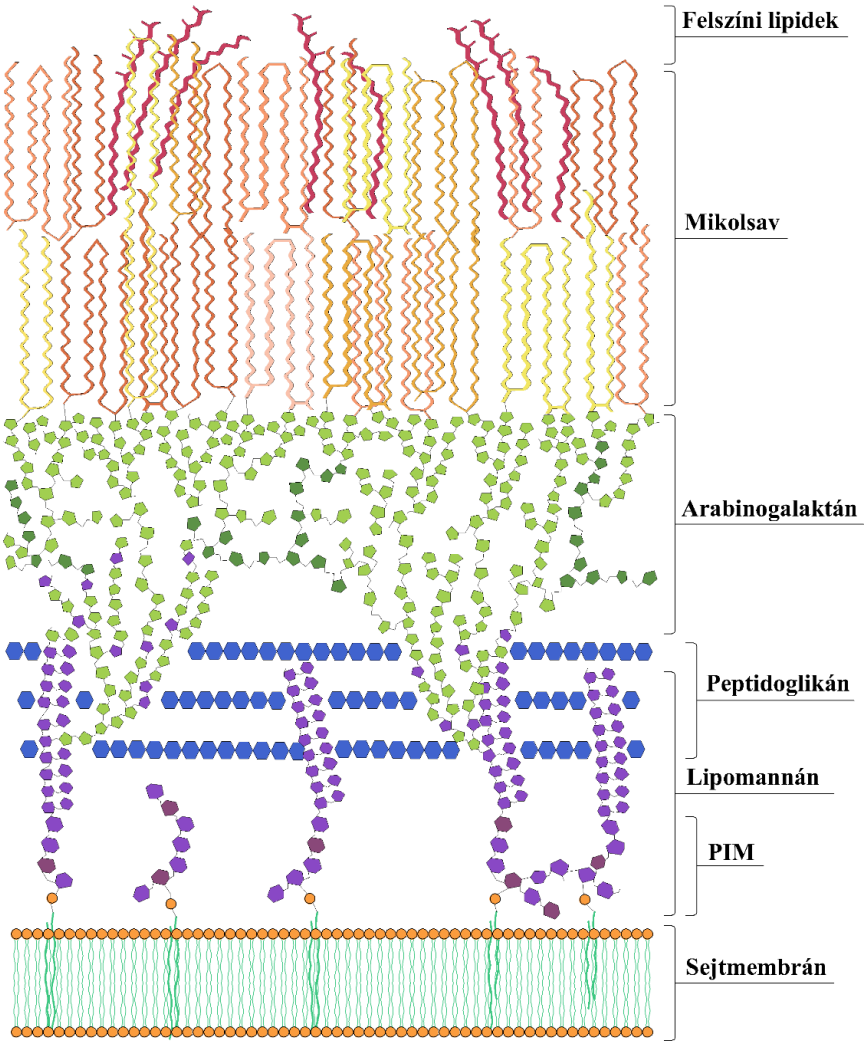
Taxonómiai besorolásukat tekintve a genetikai vizsgálatok alapján egyre több új *Mycobacterium* fajt fedeznek fel, amelyeket korábban a morfológiai vizsgálatok során tévesen más családokba soroltak. Morfológiájukat tekintve pálcika alakú, nem motilis, nem spóraképző, rendkívül ellenálló sejtfallal rendelkező (mind savas közegre, mind alkoholra), aerob baktériumok. DNS-ükben guanin és citozin található 62-70 mol %-ban. Sejtfaluk főleg nagy molekulasúlyú mikolsavból áll (70).

3.4.1. Mycobacterium tuberculosis complex

Ezen összefoglaló néven nevezett csoport tagjai genetikailag nagyon hasonlóak, a nukleinsavakat tekintve 99,9 %-os a hasonlóság, azonban patogenitásuk meglehetősen különböző. Ide sorolhatóak a következő baktériumok: *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium microti, Mycobacterium canettii, Mycobacterium caprae, Mycobacterium pinnipedii, Mycobacterium suricattae, Mycobacterium mungi, Mycobacterium dassie és Mycobacterium oryx*. Mindegyik TBC-szerű tüneteket okoz, például a *Mycobacterium bovis* a szarvasmarha TBC-ért felelős, de bizonyos körülmények között megbetegítheti az embert is (71).

3.4.2. A Mycobacterium sejtfal

A baktérium sejtfala különleges szerkezetű (8. ábra). A kettős foszfolipid réteget egy peptidoglikán réteg követi, amely fontos komponense mind a Gram-pozitív mind a Gram-negatív baktériumoknak. Kruciális szerepet tölt be a védelemben, a sejt rigiditásának és alakjának a fenntartásában.



8. ábra: *Mycobacterium tuberculosis sejtfalának általános felépítése* (72).

A peptidoglikánhoz kapcsolódó következő réteg az arabinogalaktán, amely galaktóz és arabinóz monomerekből épül fel. Ez a *Mycobacterium* sejftal legfontosabb poliszacharidja. A peptidoglikán és arabinogalaktán réteg együttesen kb. 4-10 nm vastagságú. Az arabinogalaktánhoz kapcsolódó, a sejtfal 3. rétegét a mikolsav alkotja, amely egy α-alkil-β-hidroxi zsírsav. Vastagsága 10-12 nm. Kémiai szerkezetét tekintve háromféle mikolsavat különböztetünk meg: α-mikolát, methoxy-mikolát és keto-mikolát. A mikolsavat képező zsírréteg nagyon fontos a bakérium védelme és virulenciája

szempontjából. További glikolipidek és fehérjék kapcsolódhatnak a felszínhez a foszfatidil-mioinozitol egyégen keresztül, úgymint lipomannán, lipoarabinomannán. Ezek a komponensek is hozzájárulnak a sejftal integritásához, permeabilitásához (73, 74). A baktérium sejtfalához kapcsolódik még egy gyengén kötődő külső réteg. Ezt nevezzük a *Mycobacterium tuberculosis* tokjának. Főleg poliszacharidok alkotják: glikogén-szerű α-glükán, arabinomannán és mannán. A baktérium ellenállóképességét és ezáltal a túlélését növeli (50, 73–75).

3.4.3. Mycobacterium-makrofág kölcsönhatás

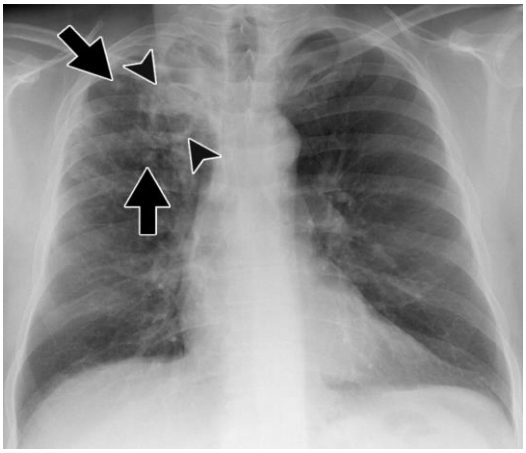
A makrofág sejtek képezik az elsődleges védelmi vonalat a szervezeten belül. Lokalizációjukat és morfológiájukat tekintve rendkívül sokszínű sejtekről van szó, amelyek a tüdőben, májban, központi idegrendszerben is előfordulnak. Fagocitálják a test számára idegen sejteket. Antigéneket prezentálnak az a T-sejtek számára, interleukint és citokint is termelnek. A tüdőben megtalálható monocita sejteket alveoláris makrofágoknak nevezzük, amelyek, mint immunsejtek, a tüdőbe kerülő baktériumokat, vírusokat, elhalt sejteket fagocitálnak és ezáltal fontos szerepet töltenek be a tüdőbe kerülő idegen anyagokkal szembeni védelemben. Az inhalált *Mycobacterium tuberculosis* baktériumok az alveolusokba jutnak, ahol azonnal felveszik őket a makrofágok. A fagocitózisban a következő receptorok játszanak szerepet: Fc, komplement, mannóz és a DS-SIGN (76). Ezt követően a fagoszóma acidifikációja következik be. A fagoszóma fúziója a lizoszómával tovább csökkenti a vakuólán belüli pH-t. A *Mycobacterium tuberculosisnak* megvan az a képessége, hogy megakadályozza ezt a fúziót, ezáltal csökkenti az acidifikáció mértékét. Mi több, a baktérium arra is képes, hogy kiszabaduljon a fagolizoszómából, egy másik vakuólába vagy a citoplazmába menekül, ahol szaporodni is képes. Ezek a folyamatok addig biztosítják a *Mycobacterium tuberculosis* túlélését, amíg a makrofágok nem aktiválódnak. Ennek következtében a TBC baktérium alapvetően gátolja a makrofág aktivációt több ponton is. A lipoarabinomannán (LAM) a *Mycobacterium tuberculosis* baktérium sejtfalának fontos alkotóeleme, amely gátolja az INF-γ, TNF-α, Toll-like receptorok (TLR) által mediált útvonalat, a fagoszóma-lizoszóma fúziót, és közvetlenül a MAPK-t, amellyel igyekszik megakadályozni a makrofág aktivációt (50).

3.4.4. TBC diagnosztika

A pulmonális TBC fertőzésre jellemző tünetek, úgymint a produktív köhögés, véres köpet, hőemelkedés, éjszakai verejtékezés, étvágytalanság, gyengeség, valamint a súlyvesztés csak az esetek 5-10 %-ban jelentkeznek egyértelműen. Az extrapulmonális TBC esetében a tünetek sokszínűsége tovább nehezíti a pontos diagnózis felállítását. Ezért a TBC fertőzés gyanúja esetén fontos szerepet játszanak a képalkotó és a különböző labordiagnosztikai eljárások (77).

3.4.4.1. Röntgen képalkotás

A mellkasröntgenből (9. ábra) kiderülhet az aktív TBC jelenléte, illetve pontos képet kaphatunk arról, hogy a fertőzés milyen stádiumban van. Primer TBC esetében főleg egyedi léziók figyelhetőek meg a jobb tüdő középső alsó szakaszán, illetve jellemző még a nyirokcsomók megnagyobbodása. Post-primer vagy secunder TBC-ről akkor beszélünk, amikor a látens fertőzés aktívvá válik, vagy a beteg újrafertőződéséről van szó. Jellegzetes megjelenése a röntgen képen a nekrotikus részek, fibrózis, tüdőszövet destrukciója főleg a felső és alsó tüdőlebenyekben. Látens fertőzés röntgen képalkotással nem mutatható ki (77).



9. ábra: *Post-primer TBC röntgen képe. A nyilak a kisebb elváltozásokat jelzik, míg a nyílhegyek egy lézióra mutatnak a tüdő jobb felső lebenyében* (78).

3.4.4.2. Mikroszkópos vizsgálat

Ziehl-Neelsen festést alkalmazva a saválló baktériumok megfigyelhetőek mikroszkóppal. A beteg köpetéből szerzett mintát először karbol-fukszinnal kezelik, majd sósav-etanol keverékkel mossák ki a festéket. A saválló baktériumoknál nem mosható ki a festék, ugyanis azok lipidben gazdag, vastag, ellenálló sejtfallal rendelkeznek. Végül metilén-kéket alkalmazva a hátteret festik meg. A biztos eredmény érdekében 3 különböző köpet mintából szükséges a vizsgálatot elvégezni. A harmadik vizsgálat elhagyható abban az esetben, ha az első két festés ugyanazt mutatta. Ez a módszer viszonylag gyorsan kiértékelhető. A Ziehl-Neelsen festés hátránya, hogy nem specifikus a TBC-re, bármilyen saválló baktérium esetében pozitív eredmény figyelhető meg, továbbá a mintavétel nehézsége, illetve viszonylag sok baktérium jelenléte szükséges a megfelelő kimutatáshoz (77).

3.4.4.3. Mycobacterium tuberculosis tenyésztése

A baktérium tenyésztése Löwenstein-Jensen táptalajon történik, amely egy tojás alapú szilárd médium, specifikusan a *Mycobacterium tuberculosis* tenyésztésére. A Löwenstein-Jensen médium főbb összetevői: glicerin, ásványi sók és malachitzöld festék, továbbá penicillin és nalidixsav a Gram-negatív és a Gram-pozitiv baktériumok ellen. A TBC baktérium egy lassan növő baktérium, minimum 2 hét szükséges az első telepek megjelenéséig, néha 4-8 hétig is eltarthat a folyamat. A telepek morfológiájára jellemző a fehéres sárgás szín, szabálytalan, redős felszínű telepképző egységek (77).

3.4.4.4. Immunológiai módszerek

3.4.4.4.1. Tuberkulin-bőrpróba (Mantoux teszt)

A teszt során tisztított fehérje derivátumot juttatnak a bőr alá, majd 48-72 óra elteltével megvizsgálják a beadás helyét. A megadott időintervallumon belül, ha az induráció mértéke ≥ 5 mm, akkor a teszt pozitívnak tekinthető. A vizsgálat viszonylag egyszerű, azonban gyakran félrevezető eredményekkel szolgál. Nagyon gyakori a fals pozitivitás olyan személyeknél, akik kaptak BCG oltást, ugyanakkor az immunszuppresszált betegeknél alacsonyabb a szenzitivitás mértéke (77).

3.4.4.4.2. QuantiFeron Gold-teszt (IGRA)

Gyakorlatilag a tuberkulin-bőrpróbát helyettesítő teszt. Működését tekintve a vérből mutatják ki a *Mycobacterium tuberculosis* hatására termelődő INF-γ-t. Az eredmény 24 órán belül leolvasható. Használata főleg akkor javasolt, ha a TBC-re való kockázat magas, az adott személy már kapott BCG-oltást és az immunrendszert érintő betegség áll fenn. 5 évnél fiatalabb gyerekeknél nem javasolják ezt a típusú tesztet, ugyanis ebben a korcsoportban nem minden esetben voltak reprodukálhatóak az eredmények (79).

3.4.4.5. Molekuláris diagnosztika

Ezek a tesztek a nukleinsav amplifikácis technikán alapulnak, amely a TBC gyors és megbízható kimutatására, illetve az estleges rezisztencia detektálására szolgálnak. Mintaként a betegektől gyűjtött köpet vagy vér használható fel. A leggyakrabban alkalmazott tesztek a következőek: LAMP (80), LPA (81), Xper®MTB/RIF (77, 82).

3.5. TBC vakcináció

3.5.1. BCG

A BCG vakcinát *Albert Calmette* és *Camille Guérin* fejlesztette ki. Emberi alkalmazására elsőként 1921-ben került sor. A védőoltás lényegében legyengített *Mycobacterium bovis* törzset tartalmaz, amelyet az utóbbi 100 évben világszerte alkalmaznak a TBC megelőzésére. Jelenleg ez az elérhető és egyetlen hivatalos forgalomban lévő oltás. Az eredeti *Mycobacterium bovis* törzs még az I. Világháború során elveszett, ezért országonként a BCG oltáshoz különféle genotípusú törzseket használhatnak, amelyek klinikai vizsgálatok alapján különböző hatással és mellékhatással is rendelkezhetnek. Egyes tanulmányok szerint a BCG oltás a leprózis ellen is védelmet nyújt. A BCG oltást gyerekkorban alkalmazva 80 %-os biztonsággal megelőzhető az aktív TBC kialakulása. Felnőtteknél alkalmazva ez az arány már meglehetősen széles skálán mozog az egyedi immunrendszert tekintve, 0-80 %-ban nyújt csak védelmet a fertőzéssel szemben (83).

3.5.2. Vaccae™

Kínában alkalmazott vakcina, jelenleg (2021. májusa) a klinikai vizsgálat III. fázisában tart. *Mycobacterium vaccaet* tartalmaz, amely egy nem TBC-t okozó *Mycobacterium* törzs (84).

3.5.3. RUTI®

Fragmentált, nem toxikus *Mycobacterium tuberculosist* tartalmaz liposzómába zárva. Ezen kívül tartalmaz még fehérje, lipid és glikolipid antigéneket. Indikációját tekintve olyan TBC-s betegeknél alkalmazzák, akiknél a TBC aktív formája van jelen és a kezelési idő csökkentése a cél (84).

3.5.4. Vírus-vektor TBC vakcina

Mycobacterium tuberculosis antigéneket tartalmazó citomegalovírus vagy adenovírus hordozók kiválóan alkalmasak a szöveti effektor T-sejtek aktivációjára, amelyek még a korai fázisban megakadályozzák a fertőzés kialakulását a kolonizáció gátlásával. Az így kifejlesztett vakcinának a potenciális hátránya az lehet, hogy a vírus elleni antitestek megakadályozzák a TBC elleni immunválaszt is (85).

3.5.5. mRNS-alapú TBC vakcina

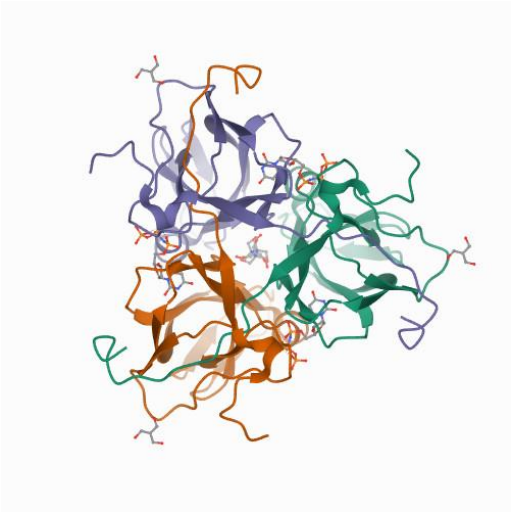
Az mRNS a DNS egy adott régiójának az információját hordozza és a segítségével megy végbe az adott régiót kódoló fehérje szintézise. TBC esetében alkalmazva mind a T, mind a B-sejtek indukálhatóak vele az immunválasz során. A védettség kialakulásához néhány hét szükséges és bármikor újra alkalmazható az immunizálás érdekében. További előnye, hogy biztonságosabb, az oltás során nincs fertőzésveszély, mint például a legyengített vagy az elölt kórokozókat tartalmazó vakcinák esetében. Stabilitása jobb és számos hordozómolekula alkalmazható az mRNS védelmére és a sejtbe történő bejuttatására. Az mRNS-alapú vakcinák gyors fejlődésének köszönhetően ez a technika potenciális lehetőséget kínál új TBC ellenes vakcina kifejlesztéséhez (85, 86).

3.6. Új antituberkulotikumok keresése *in silico* dokkolás segítségével

Az *in silico* dokkolás módszert körülbelül az 1970-es évek óta használják. Eredetileg azzal a céllal alkalmazták, hogy definiálják és jobban megértsék az egyes gyógyszermolekulák kapcsolódását a célpontjukhoz. Napjainkban a dokkolás módszert a

gyógyszerkutatás számos területén használják úgy, mint ismert szerkezetű célmolekulákhoz való hatóanyagkeresés, lehetséges mellékhatások előre jelzése, valamint ismert és használt hatóanyagok számára új célhelyek felkutatása. Az egyre bővülő adatbázisoknak és dokkolási algoritmusoknak köszönhetően, továbbá a biológiailag fontos makromolekulák 3D-s szerkezetének ismeretében, nagyobb hatékonysággal definiálhatóak a célmolekulák és az azoknak megfelelő ligandumok (87).

A *Mycobacterium tuberculosis* genomja régóta ismert, azonban a gének nagy hányadához még mindig nem sikerült pontos biológiai funkciót rendelni (88). A *Mycobacterium tuberculosis* genetikai állományának jobb megismerése vezetett a dUTP-áz bakteriális enzim funkciójának a feltárásához. A dUTP-áz egy fontos enzim (10. ábra), amely megtalálható sok baktériumban és vírusban, és fontos szerepet tölt be a DNS javításban és a timidilát bioszintézisben. A *Mycobacterium tuberculosis* számára, ugyancsak eszenciális szereppel bír a dUTP-áz enzim, a baktériumok túlélését és szaporodását tekintve. Katalizálja a dUTP elbontását, amelyből dUMP és pirofoszfát keletkezik. Csökkenti az uracil mennyiségét, amely ha nagyobb arányban van jelen, a timidin helyett épül be a DNS-be, és a sejtek pusztulásához vezet (89, 90). Tehát a dUTP-áz bakteriális enzim potenciális célpontként szolgálhat az új antituberkulotikumok számára (91). A dUTP-áz 3D-s szerkezetének ismeretében az *in silico* dokkolás megfelelő eszköz, hogy új molekulák kötődését vizsgáljuk, fajspecifikusan a mikobakteriális enzimhez (92, 93).



10. ábra: *Bakteriális dUTP-áz enzim (EC 3.6.1.23, Rv2697c) szerkezete* (94).

4. Célkitűzések

Tudományos munkám során elsődleges célul tűztem ki, olyan antituberkulotikumokat tartalmazó liposzómás készítmények formulálását, amelyek hatékonyak lehetnek a TBC terápiájában. Céljaim között szerepelt a hatóanyagot tartalmazó vezikulák következő tulajdonságainak a megismerése:

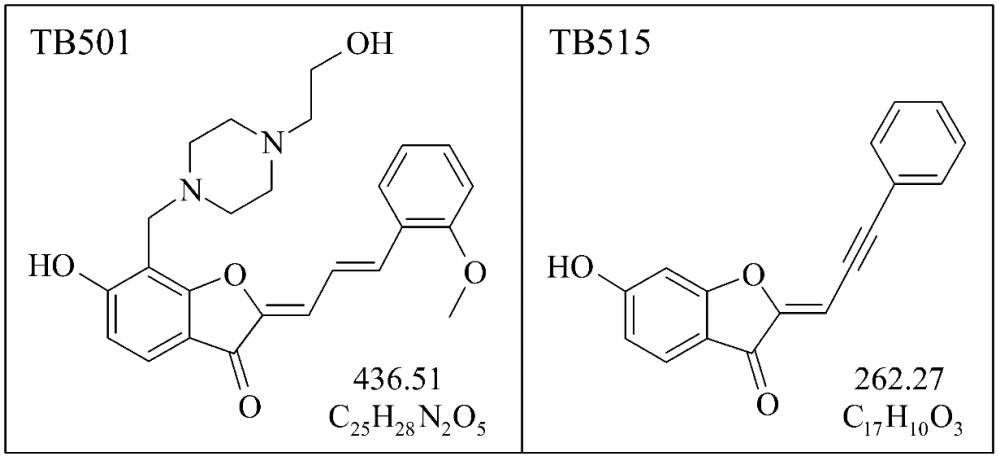
1. Az előállított liposzómák méreteloszlásának vizsgálata és a változások nyomon követése.
2. Az antituberkulotikumok bezárási hatásfokának a meghatározása.
3. A liposzómába zárt készítmények *in vitro* monocita sejtek általi felvételének a meghatározása és összehasonlítása a szabad hatóanyagokkal.
4. A liposzómás készítmények és a szabad hatóanyagok *in vitro* citotoxicitásának a meghatározása monocita sejtkultúrán.
5. A szabad és liposzómába zárt készítmények *in vitro* hatékonyságának a megállapítása.

Doktori munkám során tanulmányoztuk a ROS membránkárosító hatásait, amelyre a liposzómákat biológiai modellmembránként alkalmaztuk. Ebben a munkában betöltött szerepem főként a liposzóma minták előkészítése és ellenőrzése volt. Ezeket a konkrét lépéseket az 5.3. és az 5.4. részekben foglaltam össze. Ezen vizsgálatok eredményeit doktori disszertációmban nem ismertetem.

5. Módszerek

5.1. Anyagok

A liposzómák készítéséhez szükséges lipidek, nevezetesen a DPPC (16:0), a DOPE (18:1) és a DSPE-PEG (18:0) beszerzése az Avanti Polar Lipids Inc.-től (Alabaster, Alabama, USA) történt. A CHEMS-t, DMPC-t (14:0), DSPC-t (18:0), DOPC-t (18:1), a lipidek feloldására használt kloroformot ($CHCl_3$), illetve a hatóanyagok oldására használt DMSO-t a Sigma-Aldrich-tól (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A lipidfilm készítéséhez nitrogén gázt használtunk, amely a Linde Gáz Magyarország Zrt.-től (Budapest, Magyarország) származott. A lipidfilmek hidrálásához PBS (1,8 mM KH_2HPO_4,10 mM Na_2HPO_4, 137 mM NaCl, pH= 7,4) puffert használtunk, amelyhez a szükséges anyagokat a Sigma-Aldrich-tól (Budapest, Magyarország) rendeltük. A pufferhez használt szűrt és ioncserélt vizet a Milli-Q Integral 3 Water Production Unit (Merck Milipore, Billerica, MA, USA) víztisztító berendezéssel állítottuk elő, amelyhez Millipack 0,22 µm pórusátmérőjű membránt használtunk.



Antituberkulotikum	Hidrogén kötés Donor/Akceptor	Molekula tömeg (g/mol)	log P
TB501	2/7	436.51	1.523
TB515	1/3	262.27	3.290

11. ábra: *Az in silico dokkolás során talált TB501 és TB515 molekulák kémiai szerkezete és kémiai tulajdonságai* (95, 96).

Az *in silico* módszerrel kiválasztott **TB501** (6-hidroxi-7-{[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il]metil}-2-[(2E)-3-(2-metoxifenil)prop-2-én-1-ilidén]-2,3-dihidro-1-benzofurán-3-on) és a **TB515** ((2E)-6-hidroxi-2-(3-fenilprop-2-in-1-ilidén)-2,3-dihidro-1-benzofurán-3-on) antituberkulotikumokat (11. ábra) a SONEAS Vegyipari Kft.-től (Budapest, Magyarország, korábban Ubichem Kutató Kft.) szereztük be.

Az extrudáláshoz használt polikarbonát membránfilterek (Whatman Nucleopore d=100 nm), és az elválasztáshoz használt Sepharose 4B gél beszerzése a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) történt.

Az *in vitro* sejtkultúrához használt anyagokat, úgymint a humán MonoMac-6 monocita sejtkultúrát (DSMZ no.: ACC 124) a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH-tól (Braunschweig, Németország), az RPMI-1640-t, magzati borjúsavót (fetal bovin serum, FBS), tripszint, gentamicint, HPMI-puffer (HEPES-sel pufferált RPMI) készítéséhez szükséges alapanyagokat, glukózt, a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország), a glutamint pedig a Lonza Kft.-től (Basel, Svájc) szereztük be.

5.2. Antituberkulotikumok kiválasztása *in silico* dokkolással

Az ELTE Számítógéptudományi Tanszék által használt, saját fejlesztésű FRIGATE (97) dokkoló algoritmus segítségével a dUTP-áz bakteriális enzim szelektív gátlóit kerestük. Ehhez a szabad hozzáférésű ZINC adatbázis (https://zinc.docking.org/) (98, 99) került felhasználásra, amely több millió, a kereskedelemben is kapható kis molekulát tartalmaz. A molekulákról minden fontos információ elérhető, ami a dokkoláshoz szükséges, úgy mint a molekulák 3D-s szerekezte, számolt logP érték, valamint a hidrogén kötés donor/akceptor száma. A dUTP-áz aktív helye, ahová a dokkolás történt a monomerek feszíni hurkai, amelyek különböznek a humán dUTP-áz enzim szerekezettől (93). A dokkolás eredményeként kaptuk a TB5 fantázianévvel rendekező molekula családot amelyek 2,3-dihidro-benzofurán alapvázzal rendelkeznek (100, 101).

A molekulák kiválasztásánál a Lipinski-szabályok kruciálisak voltak:

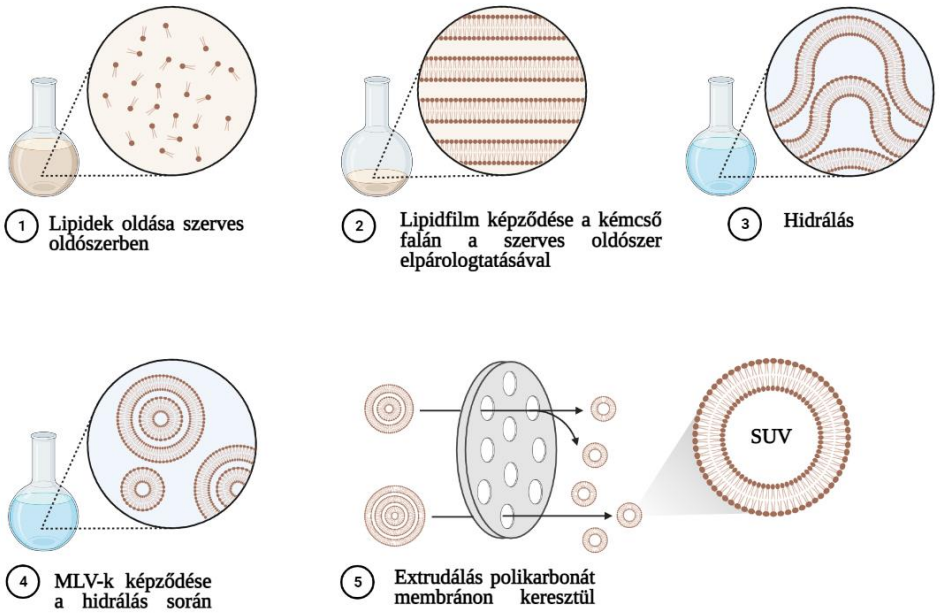
- < 500 Da moltömeg
- logP < 5

- maximum 5 hidrogén donor kötés
- maximum 10 hidrogén akceptor kötés.

A Lipinski-szabályok segítségével optimalizálhatók egy molekula várható farmakodinámiai és farmakokinetikai tulajdonságai (102).

5.3. Liposzóma minták készítése vékonyréteg-hidratációs technikával

Ennek során a 2.4.1. részben leírtak szerint jártunk el. A lipidfilm készítéséhez szükséges lipideket, összesen mindig 10 mg-ot 100 µl kloroformban feloldottuk, majd nitrogén gáz segítségével a szerves oldószert elpárologtatva, az üvegcső falán kialakult a lipidfilm. A $SUV_{összetett}$ liposzómáknál a DOPE:CHEMS:DSPE-PEG, 5:4:1 tömegarányát vettük. A TB501 és TB515 antituberkulotikumokat a hidrálási fázisban, vagy a lipidfilm készítés során adtuk a rendszerhez (10 mg lipid estében a lipid:hatóanyag mólarány 10:1). A szerves oldószer teljes eltávolításához a mintát egy éjszakára exszikkátorban hagytuk. A következő fázisban a lipidfilmet PBS puffer 100 µl-es részleteivel 1 ml-ig hidráltuk, a lépések között kevertetést alkalmazva.



12. ábra: *A kis unlilamelláris liposzómák (SUV) preparálásának lépései.*

A SUV-ok előállításához a mintát extrudáltuk, amelyhez Avanti Polar Mini Extrudert (Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster, Alabama, USA) és 100 nm pórusátmérőjű polikarbonát membránt használtunk. Az extrudálás során, akárcsak a hidrálási lépés alatt, a hőmérsékletet a fázisátalakulási hőmérséklet (kb. 55 ºC) fölött tartva, 41-szer préseltük át a liposzóma mintát (12. ábra). Az átpréselés számának a növelésével érhető el a kívánt vezikula méret és a minta homogenitása. Páratlan számú extrudálás során a minta a kezdeti állapothoz képest az ellentétes oldali fecskendőben található, amellyel kiküszöbölhető az esetleges lipid reziduumok jelenléte.

A modellmembránok előállításához kisebb módosításokkal ugyanezt a technikát alkalmaztuk. Minden esetben 10 mg foszfolipidet használtunk a lipidfilmek készítéséhez, amelyet 200 µl kloroformban oldottunk, majd nitrogéngáz segítségével párologtattuk el a szerves oldószert a lipidfilm kialakulásáig. A következő lipidösszetételű liposzómák készültek: az egykomponensű DPPC, DMPC, DSPC, továbbá a kétkomponensű DPPC:DOPC minták 8:2 tömegarányban. SUV-ok előállításához ultrahangos besugárzást, illetve extrudálást alkalmaztunk a hidrálást követően.

Az ultrahangos kezelést az MSE Soniprep 150 berendezéssel végeztük. Az előállított ultrahang hullámok frekvenciája 23 kHz, amplitudója 8 µm volt. A kezelést, hogy elkerüljük az ultrahang okozta túlmelegedést, 2 × 10 percig alkalmaztuk, 5 perces szünettel. Az ultrahang fejből származó esetleges szennyeződések eltávolítására, a mintákat 10 percig 15000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk (Beckman J2-21 centrifuga).

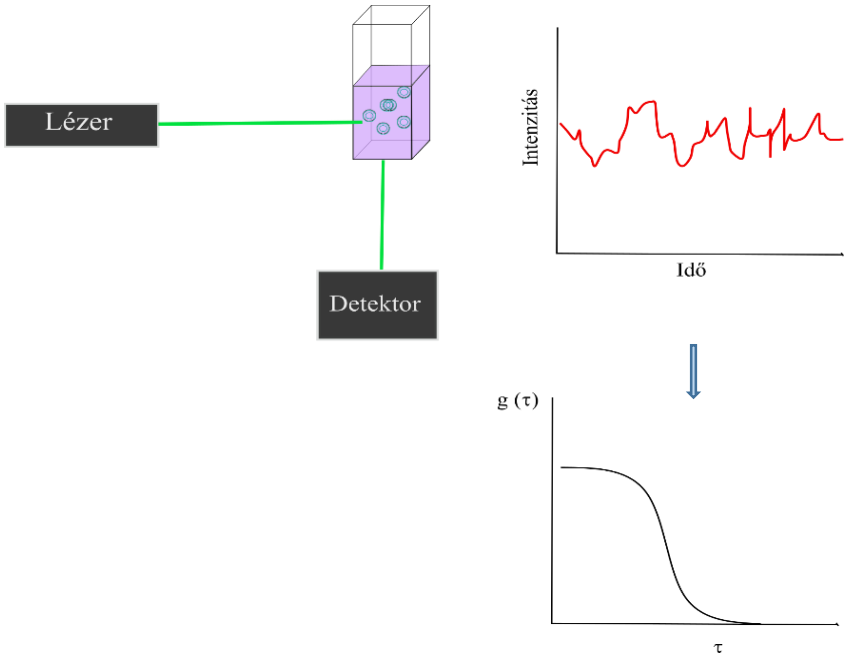
Az extrudálást a fentebb említett mini extruderrel végeztük 45 ºC-on. A modellmembránoknál alkalmazott 45 ºC-os hidrálási és extrudálási hőmérséklet a különböző lipidösszetételből adódó, eltérő fázisátalakulási hőmérséklettel magyarázható. A mintákat a 400 nm, majd a 100 nm pórusátmérőjű polikarbonát membránon legalább 15-15-ször, végül az 50 nm pórusátmérőjű membránon 35-ször préseltük át a kívánt méreteloszlású SUV-ok előállításához.

5.4. A liposzómák méreteloszlás-analízise DLS méréssel

A fényszórás méréshez 40 µl liposzóma mintát higítottunk 200 µl PBS pufferrel. A méréseket egy házi építésű, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben továbbfejlesztett

fényszórásmérő berendezéssel végeztük. A megvilágításhoz szilárdtest lézerfényforrást használtunk (Melles Griot 58-BLS-301, 457 nm, 150mW), a minták által szórt fény intenzitását a megvilágító fénynyalábhoz képest 90°-os szögben detektáltuk (Hamamatsu detektor, H7155 PMT modul). A mért adatokból nyert autokorrelációs függvényeket a maximum entrópia módszer (MEM) alapján értékeltük ki (103) (13. ábra). Ennek segítségével, gömb alakú részecskéket feltételezve, megadható a részecskék diffúziós állandója (D). Az Einstein-Stokes egyenletet alapul véve, ismerve a pontos hőmérsékletet (T) és a közeg viszkozitását (η), a hidrodinamikai sugár kiszámolható:

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$



13. ábra: *Liposzóma minták méreteloszlásának meghatározása DLS méréssel* (49, 103).

A használt modell alapján a liposzómák tömege a felülettel arányos, amely a gömb alakú részecskék sugarának a négyzetével arányos. A hidrodinamikai sugár a tömegeloszlás görbe r^{-2} szerinti súlyozásával került kiszámításra.

A méréseket a minták előállítását követően az 1. és az 5. hét után megismételtem. A 4 ºC-on tárolt liposzóma minták méreteloszlását az időben követve információt nyertünk azok stabilitásáról is.

5.5. Bezárási hatásfok meghatározása extinkció méréssel

A be nem zárt molekulák elválasztásához a SEC eljárást alkalmaztuk (lásd 2.5.3.1. fejezetben). Egy 5,8 cm^3 térfogatú, 0,7 cm átmérőjű oszlopot Sepharose 4B géllel töltöttünk meg, amelyet előzőleg egy éjszakán át duzzasztottunk PBS pufferben. Az elválasztási lépés előtt a gél oszlopon üres liposzóma oldatot bocsátottunk át, ezzel telítve az oszlopot, olyan célból, hogy a hatóanyagot tartalmazó liposzómák retencióját kiküszöböljük. Az elválasztás során 0,5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk. Az elválasztás elve alapján a nagyobb vezikulák hamarabb futnak át az oszlopon, míg a kisebb méretű, be nem zárt hatóanyag molekulák a pórusokban elidőzve később eluálódnak.

A TB501 és TB515 molekulák bezárási hatásfoka (BH%) megállapítható, ha az elválasztás után mért abszorbancia értékeket elosztjuk az elválasztás előtti abszorbancia értékekkel. Az abszorbanciamérést a Nanodrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware) végeztük a 250-550 nm-es hullámhossztartományban. Az alkalmazott minta mennyisége 2 µl volt. A BH% pontos meghatározásához megmértük a minták abszorpciós spektrumát az elválasztás előtt, majd az elválasztást követően is. A vezikulák miatti fényszórás kiküszöböléséhez a hatóanyagot nem tartalmazó liposzóma minták extinkcióját is megmértük. Ezekre a mérési pontokra a $J_{szórt} \sim 1/\lambda^4$ szórástörvény alapján hatványfüggvény illeszthető. Későbbiekben ezzel korrigáltuk, illetve normáltuk az abszorpciós spektrumokat. Az abszorbanciákat a TB501 esetében 400 nm-en, a TB515 esetében pedig 370 nm-en olvastuk le. Ezek alapján a Lambert-Beer törvény értelmében a liposzómákba zárt hatóanyag relatív mennyisége megadható. A BH% meghatározása során fontos szempont volt a hatóanyagot tartalmazó liposzóma minták további felhasználása, és azok roncsolásmentes mérése a legkisebb mintaveszteséggel.

5.6. A liposzómába zárt antituberkulotikumok és a natív hatóanyag *in vitro* sejtek általi felvételének vizsgálata áramlási citometriával

A liposzómába zárt és a natív hatóanyagok sejtek általi felvételét és a sejtekre kifejtett hatásukat humán MonoMac-6 monocita sejtkultúrán végeztük. A MonoMac-6 sejtek kiválóan alkalmasak a tüdőben található, a TBC fertőzés esetén a baktériumokat fagocitáló, érett makrofágok modellezésére (104–106). A sejteket 37 ºC-on tenyésztettük, 5 % CO_2-vel dúsított atmoszférán. Médiumként RPMI-1640-et használtunk, amely 10 %-os hővel inaktivált FBS-t, 2 mM L-glutamint és 35 µM gentamicint tartalmazott. 24 órával a tervezett mérés előtt a sejteket 24-lyukú sejtkultúrához való lemezre osztottuk szét. A sejtek száma 10^5 sejt/1ml médium/lyuk volt. A liposzómába zárt és a szabad antituberkulotikumokat szérum mentes RPMI-1640 médiumban oldottuk és tovafutó hígítást készítettünk. A sejtekhez hozzáadott liposzómába zárt hatanyag maximális koncentrációja 320 µM volt. A MonoMac-6 sejteket a liposzómába zárt és a szabad hatóanyaggal is 3-3 órán keresztül tenyésztőszekrényben inkubáltuk 37 ºC-on, 5 % CO_2-vel dúsított atmoszférán. Az inkubációs idő letelte után a sejteket RPMI-1640 médiummal kétszer átmostuk, majd a felülúszót eltávolítva 100 µl 0,25 %-os tripszint adtunk hozzájuk, amellyel 2 percig inkubáltuk őket (37 ºC, 5 % CO_2), annak érdekében, hogy felszabadítsuk a letapadt sejteket is. Ezt követően a sejtekhez 0,8 ml 10 %-os FBS/HPMI-t (100 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,4 mM $MgCl_2$, 0,04 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 20 mM glükóz, 24 mM $NaHCO_3$ és 5 mM Na_2HPO_4, pH= 7,4) adtunk, majd a mosást követően 0,25 ml HPMI-ben reszuszpendáltuk és átvittük a citometriához használt csövekbe. A hatóanyagok sejtek általi felvételét BD LSR II áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk, minden mérés duplikálva történt. A megvilágításhoz lézer fényt használtunk (Coherent Sapphire szilárdtest dióda-lézer, 22 mW), majd detektáltuk a sejtek által kibocsátott fluoreszcencia fény (csatorna FITC, emisszió λ= 505 nm-en; Long Pass 505 nm, Band Pass 530/30 nm, gerjesztés λ= 488 nm-en), és a sejtek által szórt fény (Előre szórt fény, Forward Scatter, FSC; Oldalra szórt fény, Side Scatter, SSC) intenzitását. Az FSC a sejtek méretéről ad információt, az SSC pedig a sejtek granuláltságáról, ezáltal megmérhető az élő/halott sejtek aránya, ami a vegyületek

citotoxicitására utal. A mérést megelőző kapuzást[2] propídium-jodid (PI) festéssel ellenőriztük. A TB501 és TB515 antituberkulotikumok rendelkeznek saját fluoreszcenciával ezért a sejtek által felvett vegyületek fluoreszcencia jelet adnak, amelynek nagysága arányos a sejtek TB501 és TB515 tartalmával. A mérés kiértékelése a FACSDiva 5.0 programmal történt. Kontrollnak hatóanyaggal nem kezelt sejteket használtunk a mérés során és ehhez hasonlítottuk a 160 μM koncentrációnak megfeleltethető szabad és liposzómába zárt készítményeket.

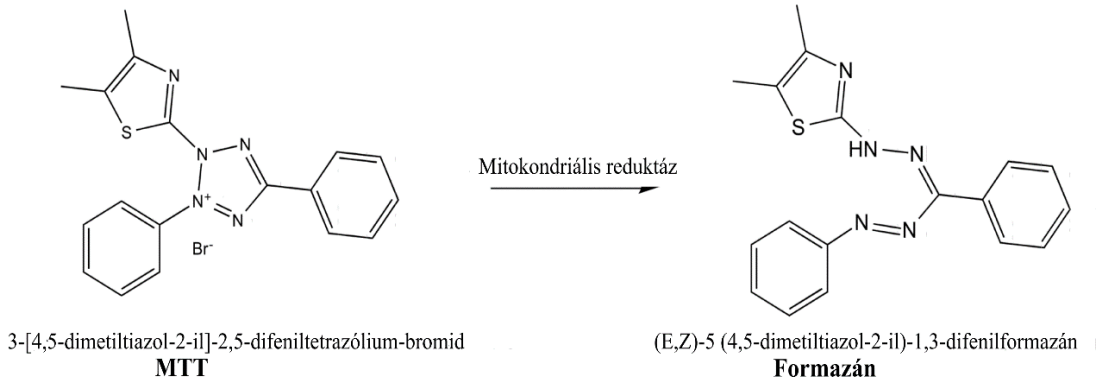
A kezelt MonoMac-6 sejtek morfológiáját Olympus CKX41 fluoreszcencia mikroszkóppal (Hamburg, Németország, Olympus U-RFLT50 higanygőz lámpával felszerelt fluoreszcens mikroszkóp, WideBlue DM500 BP460-490 BA520 IF filter, gerjesztési hullámhossz tartomány: 460–490 nm, 20x nagyítású objektív) is megfigyeltük. A sejteket a kezelést, mosást és a reszuszpendálást követően 96 lyukú lapos sejttenyésztő lemezre vittük, és ezt követően fluoreszcencia mikroszkóppal készítettünk képeket a sejtekről.

5.7. In vitro citotoxicitás mérése MTT-teszttel

Az MTT-teszt a sejtek életképességének kimutatására szolgáló vizsgálat. A sárga színű MTT-t a sejtek felvéve, vízben oldhatatlan lila színű formazán kristállyá alakítják, a sejtek mitokondriumában található oxidoreduktáz enzimek hatására (14. ábra). A képződött formazán kristályok mennyisége arányos a működőképes mitokondriumok és ezáltal az élő sejtek számával.

---

[2] Kapuzás (gating): Áramlási citometria mérés során előre beállított paraméter(ek) alapján történő sejtpopuláció szűrés.

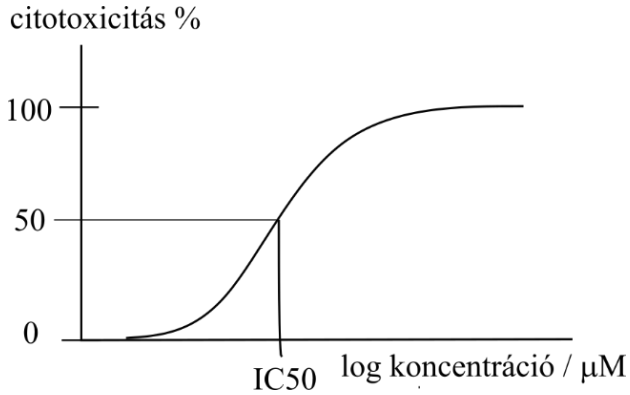


14. ábra: *Az MTT-teszt alapját képező kémiai reakció* (107).

A mérést humán MonoMac-6 monocita sejteken végeztük. A sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezen helyeztük el. A sejtek száma a lemezen 15×10^3 sejt/lyuk volt. Ezt követően a sejteket 24 órán keresztül 37 ºC-on inkubáltuk, majd hozzáadtuk a natív és a liposzómába zárt készítményeket, amelyeket előzetesen szérummentes RPMI-1640-el elegyítettünk. A szabad hatóanyagok esetében a szérummentes RPMI-1640 2 % DMSO-t tartalmazott. A sejtek ezt követően 37 ºC-on, 16 órán keresztül inkubálódtak, mind a szabad mind a liposzómába zárt hatóanyagokkal. Kontrollként a sejteket 2 % DMSO-t tartalmazó szérummentes RPMI-1640-el kezeltük. Az inkubáció leteltével a sejteket kétszer mostuk szérummentes RPMI-1640-el, majd 45 µl MTT-oldatot (2 mg/ml) adtunk a mintákhoz. A sejtek 4 órán át inkubálódtak az MTT-oldattal, majd 1500 rpm-en, 5 percig centrifugáltuk, és eltávolítottuk a sejtekről a felülúszót. A sejtekhez ezt követően 100 µl DMSO-t adtunk, hogy a vízben oldhatatlan formazán kristályokat oldatba vigyük. A minták OD mérése ELISA Reader (iEMS Reader, Labsystems, Finnország) segítségével történt 540 nm-en (abszorpciós maximum közelében) és 620 nm-en (referencia hullámhossz). Valamennyi mérést kétszer végeztünk el, négy párhuzamos méréssel. A kiértékelés során az 540 nm-en mért OD érétkekből kivontuk a 620 nm-en mért OD értékeket, és a citotoxicitást a következő egyenlettel adtuk meg, százalékban kifejezve (a képletben már a korrigált OD szerepel):

$$Citotoxicitás\ \% = [1 - OD_{kezelt}/OD_{kontroll}] \times 100$$

A szigmoid lefutású dózis-hatás görbékből a sejtekre nézve megállapítottuk az 50%-os gátlást okozó koncentrációt (IC_{50}) (15. ábra). A görbe kiértékeléséhez OriginPro 2018 programot használtunk.



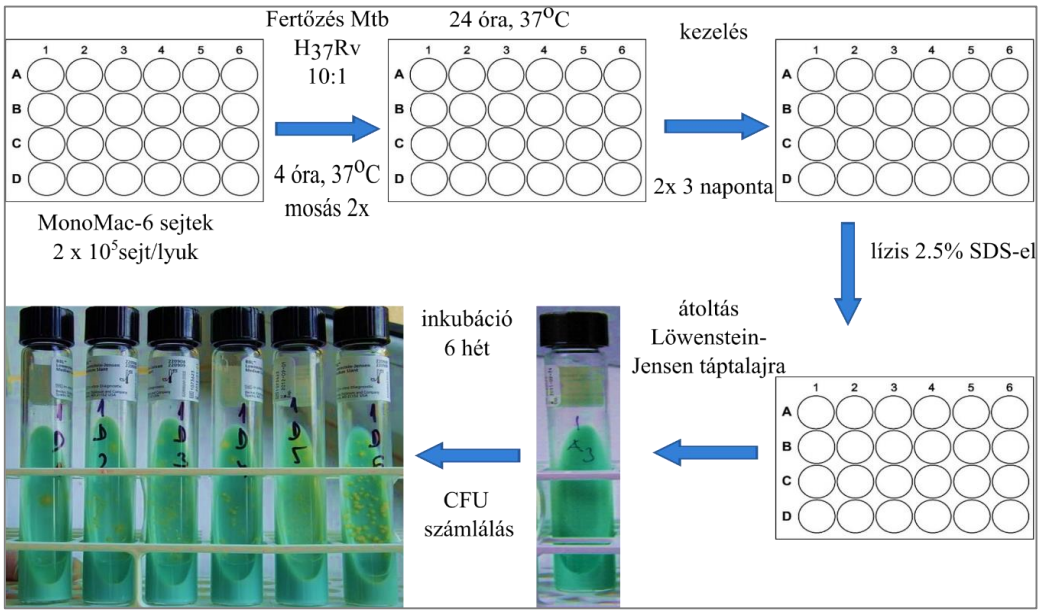
15. ábra: *Az MTT-tesztből származó citotoxicitás mértéke az alkalmazott hatóanyagok koncentrációjának függvényében, amelyből megállapítható az IC_{50} érték.*

5.8. Az antituberkulotikumok *in vitro* hatékonyságának meghatározása Mycobacterium tenyészeten és Mycobacteriummal fertőzött monocita sejtkultúrán

A natív hatóanyagok *in vitro* hatékonyságát kétféle *Mycobacterium* törzsen is vizsgáltuk, a lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ (ATCC 27294) és a RIF-re és INH-ra rezisztens Mtb A8 MDR (ATCC 35822) törzseken. A törzseket Sula félszintetikus folyékony médiumban (pH = 6,5) tenyésztettük, majd a natív hatóanyagokat 0,05-100 μg/ml koncentrációban adtuk a médiumhoz. A szabad hatóanyagokat DMSO-ban oldottuk. A *Mycobacterium* tenyészeteket a hatóanyagok hozzáadását követően 37 ºC-on, 28 napig inkubáltuk, majd ezt követően meghatároztuk az antituberkulotikumok MIC értékeit, vagyis azt a legkisebb hatóanyag koncentrációt, amely láthatóan gátolta a baktériumok növekedését. Az antituberkulotikus hatás igazolására a törzseket a kezelést követően átoltottuk szilárd Löwenstein-Jensen médiumra, majd további 28 napig inkubáltuk azokat. A telepképző egységek megszámolásával (Colony Forming Unit, CFU) igazoltuk a hatóanyagoknak a baktériumok növekedésére kifejtett hatását. Minden mérést legalább kétszer ismételtünk meg.

Az intracelluláris *Mycobacteriumok* ellen kifejtett antituberkulotikus hatást, mind a natív, mind a liposzómába zárt készítményekre is megvizsgáltuk. A mérést humán MonoMac-6 monocita sejtkultúrán végeztük (16. ábra).

A sejteket az 5.6. pontban leírtak alapján tenyésztettük és készítettük elő. A kísérlet előtt a sejteket 24 lyukú lemezre vittük, a sejtek száma 2 × 10^5 sejt/1ml médium/lyuk volt, és ezt követően egy éjszakán át inkubáltuk azokat. A MonoMac-6 sejteket ezt követően lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ törzzsel fertőztük meg. A fertőzés multiplicitása (Multiplicity of Infection, MOI[3]) 10 volt. A sejtkultúrát ezt követően kétszer szérummentes RPMI-1640-el mostuk, majd egy napig inkubáltuk. Ezt követően adtuk hozzá a fertőzött sejtekhez a szabad hatóanyagokat (TB501 és TB515), valamint a kétféle liposzómába zárt antituberkulotikumokat ($SUV_{öszetett}$ és SUV_{DPPC}), különböző koncentrációkban (a legmagasabb koncentráció 100 µM volt). 3 nap elteltével a kezelést újra megismételtük, majd újabb 3 nap elteltével a sejteket mostuk, hogy a kezelésből visszamaradt hatóanyagokat eltávolítsuk. Ezt követően a sejteket 2,5 % dodecil-szulfáttal lizáltuk, és Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon tenyésztettük. 6 hét inkubáció után a CFU-k megszámlálásával kiértékeltük az eredményt. A kísérletek az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben történtek.

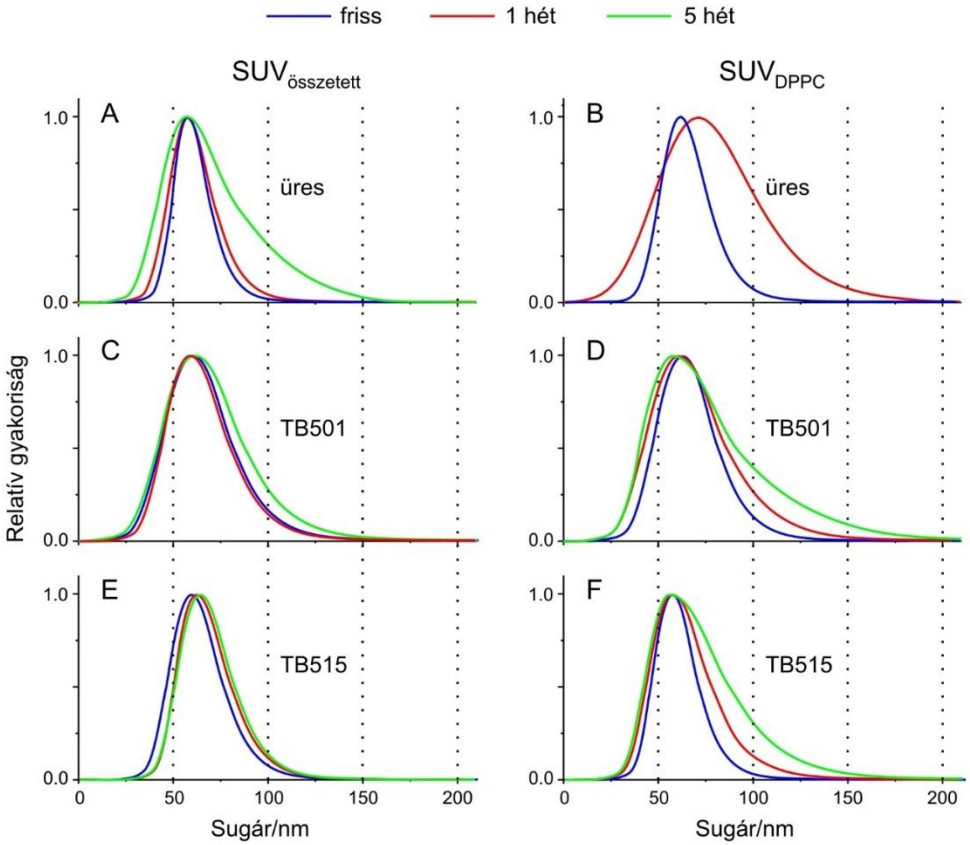


16. ábra: *A natív és a liposzómákba zárt hatóanyagok in vitro hatékonyság vizsgálatát leíró folyamatábra Mtb $H_{37}Rv$ törzzsel fertőzött humán MonoMac-6 monocita sejtkultúrán.*

[3] MOI (Multiplicity of Infection): A fertőző ágensek száma/ sejtszám.

6. Eredmények

6.1. Az előállított liposzóma minták jellemzése

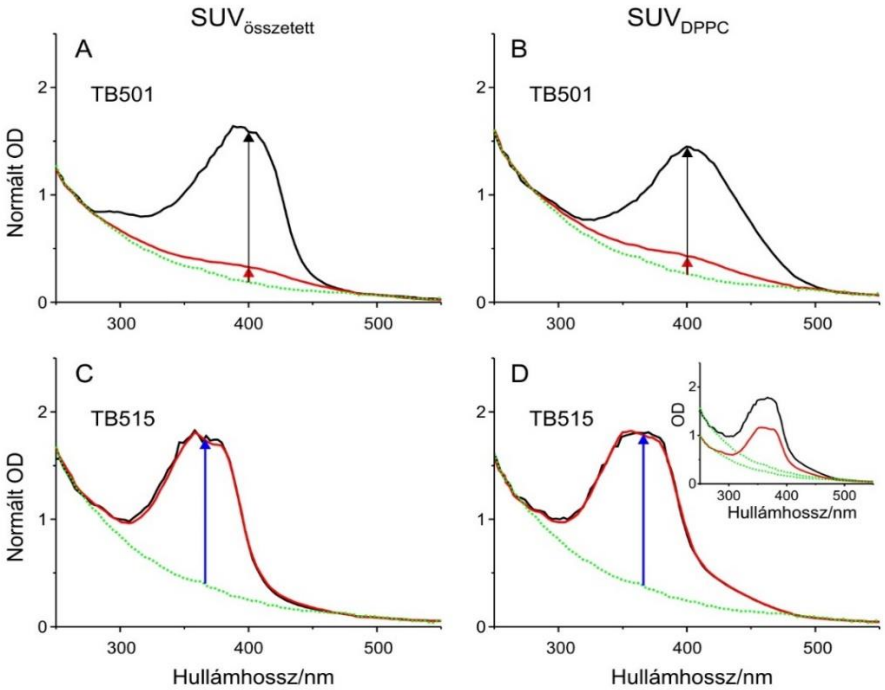


17. ábra: *SUV_{DPPC} és a $SUV_{összetett}$ liposzómák méreteloszlásának időbeni követése DLS méréssel. Kék görbe: friss minta; piros: 1 hetes minta; zöld: 5 hetes minta. A SUV_{DPPC} minták esetében 5 hét elteltével a mérés során detektált autokorrelációs függvények már nem voltak kiértékelhetőek* (108).

A vékonyréteg hidratációs technikával, majd extrudálással előállított friss SUV-ok sugarának módusza 60 nm volt (17. ábra), mind a hatféle liposzóma minta esetében. A DLS mérést megismételtük az 1 és 5 hét elteltével is. Időben követve a méreteloszlás alakulását a minták stabilitásáról kaptunk információt. Az üres SUV_{DPPC} liposzómáknál 1 hét elteltével a módusz a 60 nm-es kezdeti értékhez képest 15 %-kal nőtt, míg 5 hét elteltével a vezikulák fúziójának következtében a DLS mérésből származó autokorrelációs függvények már nem voltak kiértékelhetőek, ezért azt nem is tüntettük fel a mérési eredmények között. A többi mintára jellemző módusz gyakorlatilag változatlan maradt.

A méreteloszlás másik jellemző paramétere az FWHH érték, amely a görbék maximum magasságának a felénél mért szélessége. A leghomogénebbnek 22 nm FWHH paraméterrel a hatóanyagot nem tartalmazó $SUV_{összetett}$ liposzómák bizonyultak, amely érték 5 hét elteltével kb. a duplájára nőtt. A TB501 és TB515 hatóanyagokat tartalmazó vezikuláknál viszont megfigyelhető, hogy a FWHH paraméterek 5 hét elteltével sem változtak számottevő mértékben. Igaz volt ez mind a SUV_{DPPC}, mind a $SUV_{összetett}$ liposzómákra nézve. A hatóanyagot nem tartalmazó $SUV_{összetett}$ mintáktól eltekintve a legkisebb FWHH paraméter a TB515-t tartalmazó vezikuláknál tapasztaltuk. A többinél: SUV_{DPPC}+TB515 ez 35-40 nm volt, míg a $SUV_{összetett}$+TB515 minták esetében ez 25-30 nm-nek bizonyult.

6.2. A bezárási hatásfok kiértékelése



18. ábra: *A bezárási hatásfok (BH%) meghatározásához a normált abszorpciós spektrumok a TB501 és a TB515 hatóanyagokra nézve. A detektált abszorpciós spektrumok az elválasztás előtt (fekete görbe) és az elválasztás után (piros görbe). A liposzómák általi fényszórás értékek zöld színnel szerepelnek. Az eredeti mért, normálás nélkülihez hasonló spektrumok a D részben vannak feltűntetve* (108).

Az abszorpciós spektrumok mérése a SEC alkalmazása előtt, illetve után történtek. Az 5.5. részben már említettek szerint a TB501 esetében az abszorbanciát 400 nm-en, a TB515-re nézve pedig 370 nm-en olvastuk le és a két érték (SEC előtt és után) hányadosából számoltuk a BH%-t, miután az egyes görbékből levontuk a liposzómáktól származó fényszórás értékeket. A normálásnak köszönhetően az elválasztás előtti és elválasztás utáni görbék liposzóma koncentrációja azonosnak tekinthető (18. ábra). A bezárási hatásfok értékeket a TB501 és TB515 anyagokra, valamint a SUV_{DPPC} és a $SUV_{összetett}$ liposzómák esetében a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: *A SUV_{DPPC} és a $SUV_{összetett}$ liposzómákba zárt TB501 és TB515 antituberkulotikumok számolt bezárási hatásfoka a 18. ábra alapján (az átlag 95%-os konfidencia intervallummal (CI) jellemezve)* (108).

Antituberkulotikum	**$SUV_{összetett}$** (%)	**SUV_{DPPC}** (%)
	95% CI	95% CI
TB501 (400 nm)	10,0—10,6	13,1—14,1
TB515 (370 nm)	96,6—98,8	97,2—99,2

A mérési eredmények alapján szembetűnő, hogy a TB515 molekula esetében a BH% majdnem 100 %-os, addig a TB501 anyagra nézve ez az érték 10 % körüli. A két molekula, mivel ugyanazon családhoz tartozik, közös alapvázzal rendelkezik, azonban az oldalláncok minősége eltérő, amely eltérő molekulaméretben és lipofilitásban nyilvánul meg. Ezek a tulajdonságok befolyásolják a vezikulákba záródás mértékét.

6.3. A liposzómába zárt és a szabad hatóanyagok *in vitro* MonoMac-6 sejtek általi felvétele és toxicitásának jellemzése

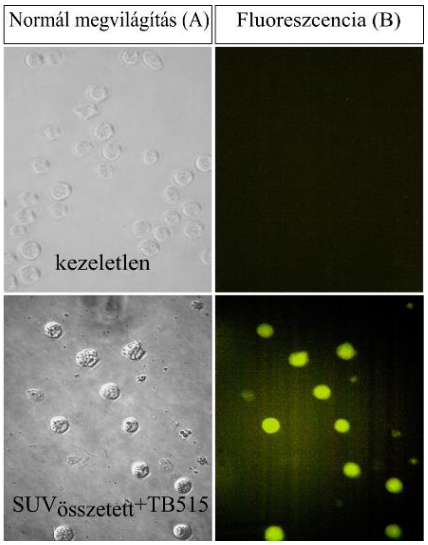
A mérések alapján, mint ahogyan azt a 7. táblázat is összefoglalja, a kétféle hatóanyagra nézve a sejtek általi felvétel meglehetősen különbözőnek bizonyult. Az *in vitro* monocita sejtekben mért eltérő hatóanyag-mennyiséget erősen befolyásolta a TB501 és TB515 hatóanyagokra mért különböző BH% értékek. Ebből kifolyólag a jobb összehasonlíthatóság érdekében TB501-es hatóanyagra nézve 160 μM koncentrációnál vizsgáltuk meg a monocita sejtek általi felvételt a szabad és a liposzómákba zárt hatóanyagok esetében. A sejtek általi felvétel a $SUV_{összetett}$ liposzómákra nézve volt a

legjobb, míg a SUV_{DPPC} közel hasonló értékeket mutatott, mint a natív molekula. A TB515 molekula liposzómákba zárhatósága jobbnak mutatkozott a TB501 vegyülettel szemben, ezért itt a 100 %-os sejtek általi felvételéhez adtuk meg a hatóanyag mennyiséget µM-ban. Az eredmények alapján a szabad hatóanyaghoz képest a liposzómákba zárt készítményeket hatékonyabban vették fel a MonoMac-6 humán monocita sejtek.

7. táblázat: *A natív és a liposzómába zárt (SUV_{DPPC}, $SUV_{összetett}$) antituberkulotikumok MonoMac-6 sejtek általi felvétele, áramlási citometria mérések alapján. TB501-re nézve 160 µM-nál a maximális sejtek általi felvételt adtuk meg, míg a TB515 vegyület esetében a 100 %-os felvételnél a legkisebb hatóanyagkoncentráció µM-ban kifejezve* (108).

Antituberkulotikum	Natív	$SUV_{összetett}$	SUV_{DPPC}
TB501 (felvétel % 160 µM-nél)	0,15-0,2	1,2-1,5	0,2-0,25
TB515 (100 % felvételnél a mennyiség µM-ban)	20-40	80-160	80-160

A sejtek általi felvételt közvetlenül fluoreszcencia mikroszkóppal is igazoltuk (19. ábra).



19. ábra: *A $SUV_{összetett}$+TB515 mintával kezelt és a kezeletlen sejtek képe fluoreszcencia mikroszkóppal, áteső fénnyel (hagyományos mikroszkópi kép) (A) és WideBlue filterrel (fluoreszcencia kép) (B) rögzítve. A kezelt sejteken az alkalmazott minta koncentrációja: 25 µM* (108).

A TB501 és TB515 hatóanyagok saját fluoreszcenciájának következtében fluoreszcencia mikroszkóppal nyomon követhető a natív és a liposzómába zárt hatóanyagok sejtek általi felvétele. A legnagyobb fluoreszcencia intenzitás a TB515 molekula esetében volt megfigyelhető.

Az áramlási citométerrel végzett mérések alapján elmondható, hogy a liposzómába zárt készítmények kevésbé voltak toxikusak a MonoMac-6 monocita sejtekre, a szabad hatóanyagokhoz képest, miután a sejteket kezeltük a natív és a bezárt hatóanyagokkal. A 8. táblázat alapján a kezeletlen sejtekhez viszonyítva a halott sejtek százalékos aránya a liposzómába zárt antituberkulotikumok esetében volt a legkisebb. A kétféle liposzómát összehasonlítva, a $SUV_{összetett}$ liposzómás készítményeknél több sejtpusztulást számoltunk a SUV_{DPPC} liposzómákhoz képest, mindkét hatóanyagtartalom esetén megfigyelhető volt ez a tendencia, azonban ez az arány még így is kedvezőbb volt a natív vegyületekhez képest.

8. táblázat: *Az áramlási citométerrel mért élő sejtek százalékos aránya a humán MonoMac-6 monocita sejtkultúrán, a natív és a liposzómákba zárt antituberkulotikumokkal történő kezelést követően. A citotoxicitás mértékét 160 µM hatóanyag koncentráció mellett vizsgáltuk a kontroll (kezeletlen) mintákhoz képest* (108).

Antituberkulotikum	Koncentráció (µM)	Natív (%)	$SUV_{összetett}$ (%)	SUV_{DPPC} (%)
TB501	0 (kontroll)	90-92	89-92	91-93
	160	66-76	74-76	89-92
TB515	0 (kontroll)	91-94	92-93	92-95
	160	77-82	82-90	85-90

6.4. Antituberkulotikumok *in vitro* hatékonysága és szelektivitása Mycobacterium tenyészeten

A TB501 és TB515 hatóanyagok *in vitro* antituberkulotikus hatását kétféle *Mycobacterium* kultúrán vizsgáltuk, és megállapítottuk a hatóanyagok MIC értékeit a

lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ és az Mtb MDR A8 (RIF-re és INH-ra rezisztens) törzseken. A szabad hatóanyagok MIC értékeit a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: *A natív hatóanyagok (TB501 és TB515) minimális gátló koncentráció értékei (MIC) az Mtb $H_{37}Rv$ és az Mtb MDR A8 törzseken µM és µg/ml koncentráció egységben kifejezve* (108).

Antituberkulotikum	**MIC (µM)**		**MIC (µg/ml)**	
	***Mtb* $H_{37}Rv$**	**MDR A8**	***Mtb* $H_{37}Rv$**	**MDR A8**
TB501	46	138	20	60
TB515	19	3,8	5	1

A TB515 hatóanyagnál mindkét törzsre nézve alacsonyabb MIC értéket állapítottunk meg a mérés során, ami Mtb $H_{37}Rv$ esetében 19 µM volt, míg az Mtb MDR A8-ra nézve 3,8 µM.

A kolorimetriás MTT-teszt során megállapítottuk a szabad hatóanyagok IC_{50} értékét, azaz azt a koncentrációt, ahol a monocita sejtek 50 %-a elpusztult. A mért IC_{50} értékek jó inidikátorai az antituberkulotikumok citotoxicitásának és az IC_{50}/MIC hányadosból a készítmények szelektivitási indexe (SI) állapítható meg.

10. táblázat: *A natív antituberkulotikumok IC_{50} értéke a MonoMac-6 sejtekre nézve, kolorimetriás MTT-teszt alapján, továbbá az IC_{50} és MIC arányokból számolt szelektivitási index (SI). A MIC értékeket az Mtb $H_{37}Rv$ kultúrán mértük* (108).

Antituberkulotikum	**MonoMac-6**	
	IC_{50} (µM)	**SI** ***Mtb* $H_{37}Rv$**
TB501	218	4,7
TB515	78	4,0

Az eredmények alapján szembetűnő, hogy a TB501 molekula magasabb IC_{50} értékkel rendelkezik a makrofágokra nézve, tehát kisebb toxicitást mutatott, mint a TB515 vegyület. Azonban az alacsony SI értékek alapján ezek a vegyületek mérsékelten szelektívek, tehát natív formájuk a 10. táblázatban megadott koncentrációban a monocita

sejtek 50 %-át elpusztította. A liposzómába zárt készítményeknél az IC_{50} értékek minden esetben 250 µM fölöttiek voltak. A kapott eredmények alapján a molekulák szelektivitása liposzómába zárva növelhető.A liposzómákba zárt antituberkulotikumokkal történő kezelés során a MonoMac-6 sejteken csak egy meghatározott térfogatig alkalmazhatóak liposzómát tartalmazó oldatok a sejttenyésztő médium mellett, valamint a monocita sejtek véges sejtfelvevő képességének miatt nem sikerült elérni azt a felső határértéket, ahol a sejtek 50%-ának pusztulása megfigyelhető.

6.5. Antituberkulotikumok *in vitro* hatékonysága Mycobacteriummal fertőzött MonoMac-6 sejteken

11. táblázat: *Telepképző egységek száma (CFU) az Mtb $H_{37}Rv$ törzzsel fertőzött MonoMac-6 sejtek különböző koncentrációjú antituberkulotikumokkal való kezelését majd Löwenstein-Jensen táptalajon való tenyésztést követően* (108).

Antituberkulotikum	**Koncentráció (µM)**	**CFU szám**		
	kontroll (0)	**konfluens telepek**		
		Natív	**$SUV_{összetett}$**	**SUV_{DPPC}**
TB501	12,5	>100	10-50	10-50
	25	50-100	0	1-10
	50	10-50	0	0
	100	1-10	0	0
TB515	12,5	>100	>100	>100
	25	>100	>100	>100
	50	>100	10-50	50-100
	100	>100	0	0

A kísérlet során MonoMac-6 monocita sejteket fertőztünk meg lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ törzzsel, majd a fertőzött monocita sejteket natív és a liposzómába zárt antituberkulotikumokkal kezeltük. A mintákat 6 hétig tenyésztettük Löwenstein-Jensen táptalajon, majd ezt követően leolvastuk a CFU értékeket, amelyeket a 11. táblázat foglal össze.

A TB501 molekula natív formája, 25 µM koncentrációban már képes gátló hatást kifejteni az intracelluláris *Mycobacteriumra*. Liposzómába zárva növelhető a hatóanyag sejtekbe való bejuttatása, ezért a gátló hatás a liposzómába zárt gyógyszerformáknál jobb, főleg a $SUV_{összetett}$ készítményeknél, ahol nem volt egy CFU sem.

A TB515 vegyület intracelluláris hatékonysága a TB501 molekulával szemben jóval kisebbnek bizonyult, ugyanis natív formában még 100 µM koncentrációban sem volt képes gátló hatást mutatni az Mtb $H_{37}Rv$ törzzsel szemben, ugyanakkor a vegyület liposzómába zárva 25-50 µM között csökkentette a CFU-k számát. A hatás ebben az esetbe is a $SUV_{összetett}$ liposzóma típusnál mutatkozott jobbnak. Kontrollként kezeletlen mintát alkalmaztunk, ahol összefolyt telepek voltak megfigyelhetőek.

7. Megbeszélés

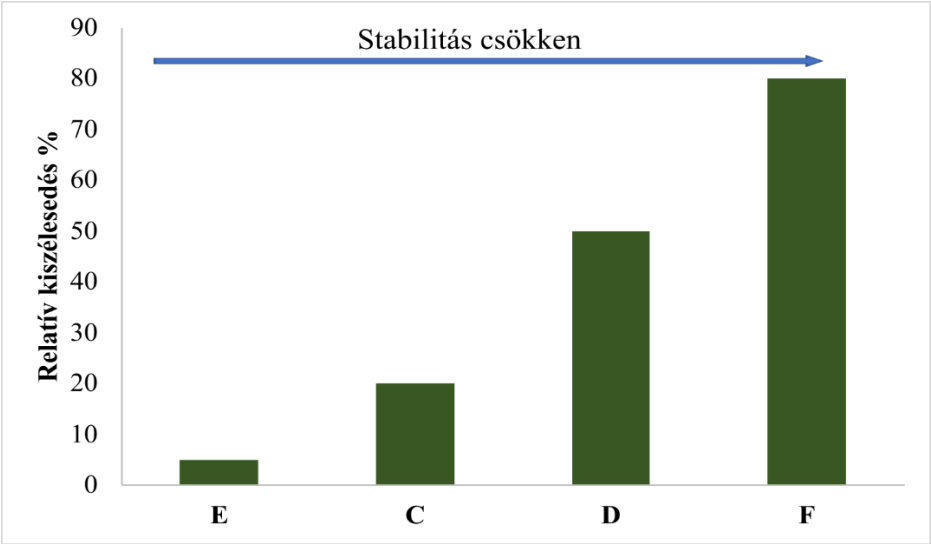
7.1. A liposzóma minták stabilitását befolyásoló tényezők

A liposzóma minták stabilitására számos tényező van befolyással, úgymint a vezikulák mérete, lamellaritása, felszíni struktúrák jelenléte vagy hiánya, a vezikula komponensek mennyisége és minősége, amelyet a tudományos cikkek részletesen tárgyalnak (109–114). Ismeretes, hogy a vizes oldatban lévő vezikulák bizonyos idő elteltével egymással fúzionálnak, flokkulálnak, más szóval megváltozik a vezikulák eredeti mérete és szerkezete. A hatóanyagot tartalmazó liposzómák esetében ez a bezárt molekulák szivárgását, esetlegesen elvesztését idézi elő. Amennyiben a liposzómák gyógyászati célra predestináltak, elengedhetetlen szempont a gyógyszerformát illetően a stabilitás és a pontos adagolt hatóanyag-mennyiség ismerete.

Az egykomponensű SUV_{DPPC} és a többkomponensű pegilált $SUV_{összetett}$ liposzómák vizsgálata során, 5 hét elteltével a többkomponensű liposzómák stabilabbnak mutatkoztak a SUV_{DPPC} liposzómákhoz képest. Mindez indokolható egyrészt az összetett liposzómák CHEMS komponensével, amely koleszterin alapvázával beépül a membránba és stabilizálja azt, másrészt a felszínhez kapcsolt polietilén-glikol molekulákkal, amelyek beborítják a felszínt, és megakadályozzák a vezikulák egymáshoz tapadását. Fontos szempont az optimális PEG koncentráció alkalmazása, ugyanis 10 % molkoncentráció fölötti PEG mennyiség egyrészt gátolná a vezikula *in vivo* biohasznosulását, másrészt a liposzóma kettősréteg stabilitását is csökkenti. Irodalmi adatok alapján a pegiláció csökkenti a bezárt hatóanyag szivárgását is a liposzómákból (115). A pegiláció azonban nemcsak *in vitro* bizonyult kedvezőnek, hanem *in vivo* is számos előnnyel rendelkezik a szabad felszínű vezikulákhoz képest. A liposzómák számára biztosított hidrofil felszín és az ahhoz kapcsolódó víz molekulák megakadályozzák a vezikulák RES általi gyors felismerését, az opszoninok és különböző proteinek kitapadását a liposzómák felszínére, amely a vezikulák eliminációjához vezethet. Tehát ebből kifolyólag, a pegilált liposzómákat *in vivo,* intravénásan alkalmazva hosszabb keringési idő jellemzi (116). A TBC esetében, ami főleg a tüdőt érintő betegség, az inhaláció a gyógyszerbevétel egy kényelmesebb módja lehet a betegek számára. A pegiláció az inhalációs adagolás során is számos előnnyel jellemezhető, úgymint

elnyújtott hatóanyag-leadás és a bezárt farmakon védelme a lebontó enzimekkel szemben. Az elnyújtott hatásnak köszönhetően az adagolás gyakorisága csökkenthető, amely nagyban hozzájárul a jobb beteg complience-hez és megelőzhető a rezisztens törzsek kialakulása a terápia során (117, 118).

A vezikulák stabilitására befolyással voltak a bezárt hatóanyagok fiziko-kémiai tulajdonságai. Kétféle kumaron (2,3-dihidro-benzofurán) alapvázzal rendelkező antituberkulotikumot vizsgáltuk, a TB501 és TB515 fantázianévvel rendelkező vegyületeket, amelyek alapváza ugyan megegyező volt, ugyanakkor az oldalláncaik minőségben különbözőek voltak, amelynek köszönhetően a két vegyület molekulatömege, lipofilitása és a molekulán lévő hidrogén kötés donor/akceptorok száma eltérőnek bizonyult. A DLS mérésekből származó eredmények alapján, nevezetesen, hogy a hatóanyagok jelenléte növelte a stabilitást, továbbá figyelembe véve a molekulák lipofilitásását, az antituberkulotikumok feltételezhetően a liposzóma membránba épülnek be, ezáltal homogénebb méreteloszlás figyelhető meg. 5 hét elteltével megvizsgálva a DLS görbék relatív kiszélesedésének százalékos arányát, a következő stabilitási sor állapítható meg a különböző liposzómákra (SUV_{DPPC} $SUV_{összetett}$) nézve: $SUV_{összetett}$+TB515 (≈ 5 %) < $SUV_{összetett}$+TB501 (≈ 20 %) < SUV_{DPPC}+TB501 (≈ 50 %) < SUV_{DPPC}+TB515 (≈ 80 %).



20. ábra: *A TB501 és TB515 hatóanyagokat tartalmazó SUV_{DPPC} és $SUV_{összetett}$ liposzómák DLS görbéjének relatív kiszélesedése 5 hét elteltével a friss mintákhoz képest.* ***C****: $SUV_{összetett}$+TB501,* ***D****: SUV_{DPPC}+TB501,* ***E****: $SUV_{összetett}$+TB515,* ***F****: SUV_{DPPC}+TB515.*

A 20. ábra összefoglalja a fényszórás mérések során tapasztalt FWHH paraméterváltozást, és az ebből származtatott relatív kiszélesedés mértékét, amely 5 hét elteltével a liposzóma minták stabilitására enged következtetni. A mért értékek alapján a legstabilabb a $SUV_{összetett}$+TB515 minta volt.

7.2. A bezárási hatásfokot befolyásoló szempontok

Irodalmi adatok alapján az optimális BH% eléréséhez egyidőben sok szempontot kell figyelembe vennünk, ugyanis az adott hatóanyag BH%-át befolyásolja a liposzóma készítés módja, a vezikulák típusa, a membránt kialakító komponensek, és nem utolsó sorban a bezárni kívánt molekula fiziko-kémiai tulajdonságai (119).

A membrán kettősréteg kialakításában részt vevő foszfolipidek töltése és a zsírsavláncok hosszúsága befolyással van mind a hidrofób, mind a hidrofil tulajdonságú molekulák bezárására. SUV_{DPPC} típusú liposzómák DPPC foszfolipidből állnak, amelynél a glicerin alapvázhoz két telített, 16 szénatomot tartalmazó palmitinsav kapcsolódik, a poláros csoportot pedig a foszfatidil-kolin alkotja. A hosszú, telítetlen zsírsavláncok kedveznek a hidrofób molekulák membránkettősrétegben történő felhalmozódásának. Ugyancsak kedvező a bezárási hatásfok szempontjából a koleszterin és a koleszterin-származékok jelenléte a membránban, amelyek stabilizálják a kettősréteget, elősegítve a nagyobb bezárási molekulamennyiség elérését (119). A kétféle vegyület, amivel munkám során foglalkoztam, a TB501 és TB515 molekula. Ismeretes, hogy ezek a vegyületek lipofil tulajdonsággal rendelkeznek, a TB515 lipofilabb (logP=3,290), mint a TB501 (logP=1,523). Molekulatömegükből és az oldalláncokból adódóan a TB501 nagyobb molekula a TB515 vegyülethez képest. A két vegyület fiziko-kémiai tulajdonságai alátámasztják a mérések során számolt bezárási hatásfokot, ami szerint a TB515 molekula majdnem 100 %-a a vezikulákba záródott be, viszont a TB501 esetében ez az érték alig volt nagyobb mint 10 %. Az irodalomban közöltek alapján a CHEMS hatással van a bezárási hatásfokra a hatóanyagok lipofilitásától és az alkalmazott konentrációtól függően (8, 119). A mérési eredmények alapján a kétféle liposzómát vizsgálva a $SUV_{összetett}$ vezikulánál adott arányban alkalmazott CHEMS csak kismértékű eltérést okozott a BH%-ban összehasonlítva a SUV_{DPPC} liposzómával. A legjobb BH%-val a SUV_{DPPC}+TB515 és a $SUV_{összetett}$+TB515 liposzómák rendelkeztek.

7.3. A natív és a liposzómába zárt hatóanyagok citotoxicitásának jellemzése

Az antituberkulotikumok által okozott citotoxicitás mértékét áramlási citometriával és MTT-teszttel vizsgáltuk. Áramlási citometriával nagyszámú sejtet tartalmazó minta vizsgálható egyszerre, valamint jól reprodukálható módszer. A rövidtávú direkt sejtpusztulásról szolgáltat információt. Egy mérés során számos paraméter követhető nyomon valós időben, mint például a sejtek általi hatóanyag-felvétel, valamint a sejthalál mértéke is. Az MTT-teszt egy közvetett módszer, amely az élő sejtek metabolikus aktivitását és ezáltal az élő sejtek számát hivatott vizsgálni a színváltozással járó formazán kristályok mennyiségéből. Az MTT mérési adatokból meghatározható a vegyületek IC_{50} értékei (120, 121). Az áramlási citometria mérés során, ahol az inkubáció időtartama 3 óra volt a natív TB501 molekula mutatott nagyobb mértékű citotoxicitást a TB515 vegyülethez képest, míg az MTT mérés során, ahol az inkubációs idő 16 óra volt a TB501 antituberkulotikum rendelkezett magasabb IC_{50} értékkel (218 µM), azaz alacsonyabb sejtkárosító hatással a TB515-el (78 µM) szemben. Az MTT-teszttel a hosszú távú sejtkárosító hatás is nyomon követhető. A sejtekben történő különféle anyagcsere-reakciók következtében az áramlási citometria mérésből és az MTT-tesztből adódó eredmények eltérhetnek. Mind az áramlási citometria, mind az MTT-teszt során gyűjtött adatokból elmondható, hogy a liposzómába zárt hatóanyagok szelektivitása növelhető, ezáltal csökkenthető a molekulák sejtekre kifejtett toxikussága.

7.4. *In vitro* antituberkulotikus aktivitás jellemzése és összehasonlítása szabadon növő Mtb $H_{37}Rv$ kultúrán és intracelluláris Mtb $H_{37}Rv$ törzseken

In vitro lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ és az Mtb MDR A8 (RIF-re és INH-ra rezisztens) törzseken tesztelve a TB501 és TB515 molekulák antituberkulotikus hatásosságát, a TB501 molekula hatékonyabbnak bizonyult a Mtb $H_{37}Rv$ kultúrán 46 µM MIC értékkel, a rezisztens Mtb MDR A8 törzsekkel szemben, ahol ez az érték 138 µM volt. A TB515 molekula az Mtb MDR A8 törzzsel szemben mutatott nagyobb hatékonyságot 3,8 µM MIC értékkel, a Mtb $H_{37}Rv$ törzseken pedig 19 µM volt a mért MIC érték. Összehasonlítva a két molekulát, elmondható, hogy a TB515 vegyület hatékonyabbnak bizonyult mindkét *Mycobacterium* törzsön (Mtb $H_{37}Rv$, Mtb MDR A8) a TB501 hatóanyaggal szemben.

A TBC-ről azonban ismeretes, hogy intracelluláris baktérium lévén a fertőzést követően a makrofágokba kerül, ahol a baktérium ellenálló sejtfalának (50, 73), továbbá a lizoszómális fúzió megakadályozásának köszönhetően képes túlélni és tovább szaporodni a gazdaszervezetben (76). Az orálisan alkalmazott gyógyszerek többsége nem képes megfelelő koncentrációt elérni a makrofágokon belül, ezért a fertőzés kezelése hosszadalmas és gyakran alakul ki rezisztencia (52, 60, 122). A liposzómális gyógyszerszállító rendszerekkel növelhető a szelektivitás és az intracellulárisan bejuttatott hatóanyag mennyisége (123). A szervezetben történő mechanizmusok modellezésére MonoMac-6 humán monocita sejteket fertőztünk meg Mtb $H_{37}Rv$ törzzsekkel, majd vizsgáltuk a fertőzött mintákon a natív és a liposzómákba zárt formulációk hatékonyságát. Ami a mérések alapján szembetűnő, hogy amíg a TB515 a *Mycobacterium* sejtkultúrákon meglehetősen hatékonynak bizonyult, addig az intracelluláris baktériumokkal szemben még 100 μM fölött sem mutatott gátló hatást. A TB501 molekulánál natív formában már 25 μM koncentrációban megfigyelhető érdemi gátlás az intracelluláris *Mycobacterium* modelleken. Azonban, liposzómába zárva, mind a SUV_{DPPC}, mind a $SUV_{összetett}$ liposzómáknál javult az *in vitro* hatékonyság az intracelluláris baktériumokkal szemben. A liposzómális gyógyszerformák segítségével növelhető a sejtek általi hatóanyag-felvétel. Ismert, hogy a liposzóma–sejtek közötti kölcsönhatás és a sejtek általi felvétel nagymértékben függ a liposzómát alkotó komponensek minőségétől és mennyiségétől, a liposzómák méretétől és felszíni struktúrájától, valamint a kölcsönható sejtek típusától. Irodalmi adatok alapján a vezikulák sejtek általi felvétele két lépésben történik, első lépésben a liposzómák a sejtek felszínéhez adszorbeálódnak, majd endocitózis révén internalizálódnak a sejtekbe. A pegilált felszínnek köszönhetően a sejtek általi felvétel valamelyest csökkent, azonban ez a hatás számottevően 5 %-os molarány felett érvényesül (124). A $SUV_{összetett}$ liposzómáknál a pegilált lipid aránya kb. 2,5 mol %, ami jelen esetben nem csökkentette nagy mértékben a sejtek általi felvételt. A többkomponensű liposzómák formulálása során az összetétel DOPE lipidet is tartalmazott, amely elősegíti a vezikulák fuzogenitását, valamint pH csökkenés hatására megváltozik a szerkezete, amely a membránt destabilizálja. A CHEMS is fontos funkcióval bírt a tervezés során, egyrészt stabilizálja a membrán kettősréteget, másrészt a hemiszukcinát csoportnak köszönhetően

szintén szerkezetváltozást szenved a savas pH hatására. Ezáltal egy olyan liposzómális struktúrát sikerült előállítanunk, amely a pH csökkenés, mint trigger hatására kiüríti a vezikulákba zárt tartalmat (9, 10, 125). Az ármalási citométerrel kapott mérési eredmények igazolják, hogy a többkomponensű liposzómális struktúra sikeresen felvételre kerül az intracelluláris térbe és a savas pH hatására leadja a vezikulákba zárt hatóanyagot. *In vitro* fertőzött sejteken, mind a TB501, mind a TB515 tartalommal rendelkező $SUV_{összetett}$ liposzómák hatékonyabb gátlást fejtettek ki az intracelluláris baktériumokra az egykomponensű SUV_{DPPC} struktúrával szemben.

7.5. Az optimális antituberkulotikum formuláció a TBC terápia szempontjából

12. táblázat: *A natív (TB501, TB515) és a liposzómákba (SUV_{DPPC}, $SUV_{összetett}$) zárt hatóanyagok mérések által meghatározott fiziko-kémiai és biológiai tulajdonságainak összefoglaló táblázata* (108).

Antituberkulotikum	*Gyógyszerforma*	Stabilitás (SUV)	BH%	Sejtek általi felvétel	Non-toxikusság	Intracelluláris gátlás
TB501	***Natív***	—	—	nagyon alacsony	mérsékelt	mérsékelt
	$SUV_{összetett}$	jó	alacsony	alacsony	mérsékelt	kitűnő
	SUV_{DPPC}	mérsékelt	alacsony	nagyon alacsony	kitűnő	kitűnő
TB515	***Natív***	—	—	kitűnő	jó	nagyon alacsony
	$SUV_{összetett}$	kitűnő	kitűnő	jó	kitűnő	jó
	SUV_{DPPC}	mérsékelt	kitűnő	jó	kitűnő	jó

A legjobb gyógyszerjelölt formuláció meghatározásához egyidejűleg számos tényező mérlegelése szükséges, amelyeket a 12. táblázat foglal össze. Egy gyógyszerformával szemben kruciális tényező a stabilitás. A $SUV_{összetett}$ liposzómák stabilitása felülmúlta a SUV_{DPPC} vezikulát tartalmazó minták stabilitását. A DLS mérésből származó méreteloszlás görbék már az első hét után jelentős változást mutattak

az üres SUV_{DPPC} minták esetében, és 5 hét elteltével a mintákból származó autokorrelációs görbék gyakorlatilag kiértékelhetetlennek bizonyultak. A TB515 molekula $SUV_{összetett}$ liposzóma mintákra kifejtett stabilizáló hatásának köszönhetően az 5. hét után a kiszélesedés mértéke alig haladta meg az 5 %-ot a kiindulási értékhez képest. A $SUV_{összetett}$+TB515 készítmények bezárási hatásfoka kitűnőnek bizonyult és a MonoMac-6 sejtekre kifejtett toxikusság mértéke elhanyagolható volt. A sejtek általi felvétel a TB515 tartalmú összetett liposzóma mintának, és az intracelluláris baktériumokra kifejtett hatása szintén jónak bizonyult, azonban az *in vivo* intracelluláris bakteriális gátlás messze elmaradt a natív TB501 és a liposzómákba zárt formával szemben. A liposzómális TB501 készítmények viszont rosszabb értékkel rendelkeznek a stabilitás, a bezárási hatásfok és a sejtek általi felvételt illetően. Tehát minden szempontot mérlegelve, az *in vitro* mérések alapján, a $SUV_{összetett}$+TB515 készítmény ígéretes antituberkulotikumnak tekinthető, és az *in vivo* mérések esetleges pozitív kimenetele esetén potenciális jelölt a TBC terápiájára.

8. Következtetések

8.1. A liposzómák stabilitása

A DLS mérések alapján a lipidmembrán stabilitását növelte a CHEMS jelenléte és a felszínt borító PEG molekulák, amelyek sztérikusan stabilizálták a felszínt, ezáltal csökkentették a vezikulák közötti aggregáció mértékét. Ezen felül, mind a SUV_{DPPC}, mind a $SUV_{összetett}$ liposzómák esetében megfigyelhető volt a stabilitás növekedése a TB501 és TB515 hatóanyagok hozzáadását követően, amely arra enged következtetni, hogy a molekulák lipofil tulajdonságaiknak köszönhetően a membránkettősrétegbe épülnek be. A stabilitás szempontjából a legígéretesebb konstrukció a $SUV_{összetett}$+TB515 minta volt, amely 5 hét elteltével mindössze 5 %-os kiszélesedést mutatott az eredeti értékhez képest. A legkisebb stabilitással a hatóanyag nélküli SUV_{DPPC} minták rendelkeztek.

8.2. Az antituberkulotikumok bezárási hatásfoka

Összehasonlítva a TB501 és a TB515 hatóanyagokat az elválasztást követő abszorbancia mérések alapján elmondható, hogy a TB515 hatóanyagnak mind a SUV_{DPPC}, mind a $SUV_{összetett}$ liposzómákban nagyobb volt a BH%-a a TB501 molekulához képest. Az eltérés magyarázható a két molekula különböző fiziko-kémiai tulajdonságaival, úgymint oldhatóság, molekula méret, lipofilitás és a hidrogén kötések száma. A TB515 molekula lipofilabb és méretét tekintve kisebb molekula, mint a TB501 vegyület. A különböző összetételű liposzóma minták (SUV_{DPPC}, $SUV_{összetett}$) számottevő mértékben nem befolyásolták a BH% mértékét.

8.3. A liposzómába zárt és a natív molekulák in vitro sejtek általi felvétele

A liposzómába zárt TB515 és TB501, valamint a natív formában lévő hatóanyagok sejtek általi felvételét áramlási citometriával és fluoreszcencia mikroszkóppal vizsgáltuk. A natív TB515 molekula sejtek általi felvétele jobbnak bizonyult a natív TB501 antituberkulotikumhoz képest. A MonoMac-6 monocita sejtek általi felvétele növelhető, hogyha a TB501 és TB515 molekulákat SUV_{DPPC} és $SUV_{összetett}$ liposzómákba zárjuk. Ez a tendencia különösen a TB515 hatóanyagra nézve érvényesül,

ahol eleve nagyobb liposzómális BH%-t értünk el. A fluoreszcencia mikroszkópos képek is igazolják, hogy a liposzómába zárt készítmények sejtek általi felvétele sikeres volt.

8.4. A liposzómába zárt és a natív molekulák *in vitro* sejtekre kifejtett citotoxicitása és szelektivitása

A készítmények sejtfelvételt követő, direkt citotoxicitása áramlási citométerrel szintén megmérésre került, amelyből kiderül, hogy a natív hatóanyagok monocita sejtekre kifejtett toxikus hatása nagyrészt maszkírozható, ha a vegyületeket liposzómába zárjuk. A legkisebb toxicitást mutató készítmény a SUV_{DPPC}+TB515 volt.

A hosszabbtávú citotoxicitást MTT-teszttel mértük, amely megadta azt a natív hatóanyagkoncentrációt, amelynél a humán MonoMac-6 monocita sejtek 50 %-a elpusztul. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a magasabb IC_{50} értékkel rendelkező TB501 hatóanyag kevésbé volt toxikus a sejtekre nézve, mint az alacsonyabb IC_{50} értékkel bíró TB515 vegyület.

In vitro, kétféle mikobakteriális törzset vizsgáltunk a lassan növő Mtb $H_{37}Rv$-t és a rezisztens Mtb MDR A8-at. Meghatároztuk azt a legkisebb hatóanyag koncentrációt, ahol a molekulák gátló hatása már megfigyelhető (MIC), és ezt összevetve az IC_{50} értékekkel megadtuk a szelektivitás mértékét, amelyből arra következtethetünk, hogy a natív vegyületek kevéssé szelektívek a gátolni kívánt *Mycobacterium tuberculosis* baktériumra nézve, mert a monocita sejtekre is toxikus hatást fejtenek ki. Az alacsony SI kiküszöbölhető, hogyha a liposzómákba zárt molekulákat alkalmazzuk, amelyek mind az áramlási citometria mérés, mind az MTT-teszt során kisebb toxicitást mutattak.

8.5. A liposzómába zárt és a natív készítmények *in vitro* hatékonysága intracelluláris Mtb $H_{37}Rv$-vel fertőzött MonoMac-6 monocita modellen

A natív hatóanyagoknál a TB515 molekula gátolta nagyobb hatékonysággal a lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ törzseket, ugyanakkor az intracelluláris törzseknél még 100 μM koncentrációban is hatástalannak mutatkozott. A TB501 molekula hatékonysága alul maradt a TB515 vegyülethez képest a szabadon növő Mtb $H_{37}Rv$ tenyészeten, azonban az intracelluláris gátlása kimagasló hatékonyságot mutatott a TB515 molekulához képest. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a sejtekben lezajló komplex metabolikus

folyamatok révén a TB515 molekula kevésbé tudja kifejteni a gátló hatását, annak ellenére, hogy a sejtek nagyobb mennyiségben képesek felvenni a TB501-el ellentétben. Liposzómába zárva, fertőzött sejteknél mind a TB515, mind TB501 molekuláknál jelentős javulás figyelhető meg a mikobakteriális sejtekre kifejtett hatásukat illetően. A SUV_{DPPC}+TB515 és $SUV_{összetett}$+TB515 készítményeket 100 μM koncentrációban alkalmazva az összes baktériumot elpusztították és egyetlen CFU sem képződött.

A hatóanyagokat tartalmazó liposzómás készítmények formulációja során, az eddig elvégzett vizsgálatok és mérések alapján, figyelembe véve az összes szempontot, úgymint eltarthatóság, bezárási hatásfok, toxikusság, és az intracelluláris gátlás mértéke a TBC fertőzés kemoterápiájába beilleszthető, legpotensebb jelölt a $SUV_{összetett}$+TB515 készítmény.

8.6. Új tudományos eredmények

- Két újonnan szintetizált antituberkulotikumot (TB501, TB515) sikeresen bezártam konvencionális (SUV_{DPPC}) illetve pegilált pH-szenzitív csoportot tartalmazó ($SUV_{összetett}$) liposzómákba. Megállapítottam, hogy a liposzómákba zárt antituberkulotikumok stabilizálják a vezikulákat, ezáltal azok hosszabb ideig eltarthatóak. Megvizsgáltam, a kétféle hatóanyag liposzómákba történő bezárási hatásfokát. A TB515 antituberkulotikum liposzómákba történő bezárhatósága 90 % fölötti, szemben a TB501 hatóanyaggal, amely kb. 10 % volt.

- Méréssel igazoltam a liposzómákba zárt antituberkulotikumok MonoMac-6 sejtek általi felvételét, és a sejtekre kifejtett toxikusságot a szabad hatóanyagokkal szemben. A liposzómákba zárt antituberkulotikumokat a sejtek nagyobb hatékonysággal veszik fel, összevetve a natív antituberkulotikumokkal. Ezzel szemben a natív formában lévő molekulák sejtkárosító hatása maszkírozható és ezáltal a szelektivitás növelhető a liposzómális gyógyszerformákkal.

- Meghatároztam a liposzómákba zárt antituberkulotikumok *in vitro* intracelluláris baktériumellenes hatását és összevetettem azokat a szabad gyógyszerformákkal. Liposzómákba zárva az antituberkulotukumok hatékonyabbak az intracellulárisan elhelyezkedő TBC-t okozó *Mycobacteriumokkal* szemben.

- Az előállított kétféle antituberkulotikumot tartalmazó stabil, liposzómális nano-gyógyszerszállító rendszerek közül, amelyek bizonyítottan kisebb toxicitással, ezáltal nagyobb szelektivitással és nagyobb hatékonysággal rendelkeznek a natív formában lévő hatóanyagokkal szemben, a legigéretesebb jelölt a $SUV_{összetett}$+TB515 készítmény, amely további *in vivo* vizsgálatokat követően akár potenciálisan is használható a TBC kezelésére.

9. Összefoglalás

A TBC mindmáig az egyik legelterjedtebb fertőző betegség a világon. Az egyre gyakoribb rezisztens törzsek megjelenése miatt szükségessé vált új antibiotikumok előállítása és bevezetése a TBC terápiájába. Doktori munkám során liposzómába zárt, újonnan szintetizált antituberkulotikumok tanulmányozásával foglalkoztam. Az antituberkulotikus aktivitással rendelkező TB501 és TB515 molekulák a dUTP-áz bakteriális enzim szelektív gátlói, amelyet *in silico* dokkolás segítségével szűrtek ki. Célul tűztem ki olyan liposzómába zárt antituberkulotikumok formulálását, amelyek hatékonyan alkalmazhatóak a TBC kezelésében. Vizsgáltam a hatóanyagokat tartalmazó SUV_{DPPC} (DPPC lipidből álló) és a $SUV_{összetett}$ (DOPE:CHEMS:DSPE-PEG lipidekből álló) liposzómák méreteloszlását és stabilitását. A legjobb stabilitással rendelkező minta a $SUV_{összetett}$+TB515 készítmény volt, mely a fényszórásmérések alapján 5 hét elteltével sem mutatott számottevő méreteloszlásbeli változást. Megmértem az egyes hatóanyagok liposzómákba történő bezárási hatásfokát (BH%), amely a TB515 molekulára nézve bizonyult a legnagyobbnak, mind a SUV_{DPPC}, mind a $SUV_{összetett}$ készítmények esetében. A *Mycobacterium tuberculosis* egy intracelluláris baktérium. A fertőzést követően a makrofágok fagocitálják a szervezetbe kerülő baktériumokat. Sajnos az alkalmazott hatóanyagok csak kis hányada képes hatásos koncentrációt elérni a sejteken belül, ezért többféle hatóanyag hosszútávú alkalmazása szükséges a TBC kezelése során. A liposzómába zárt és a szabad hatóanyagok sejtek általi felvételének a vizsgálatára humán MonoMac-6 monocita sejtkultúrát alkalmaztunk. A liposzómába zárt vegyületeket a sejtek jobb hatékonysággal vették fel, továbbá a vezikulákba zárt forma növelte a hatóanyagok szelektivitását, amely a kisebb citotoxicitásban volt mérhető. A liposzómába zárt készítmények *in vitro* intracelluláris hatékonyságát lassan növő Mtb $H_{37}Rv$ *Mycobacterium* törzzsel fertőzött monocita sejteken vizsgáltuk. A natív formában lévő antituberkulotikumok intracelluláris baktériumokra kifejtett hatékonyságát növelte, ha a vegyületeket liposzómába zártuk. A leghatékonyabb liposzómális forma a többkomponensű, pegilált, pH-szenzitív $SUV_{összetett}$ minta volt. Összegezve a kísérletek eredményeit a TBC kezelésére leginkább a $SUV_{összetett}$+TB515 készítmény tűnik alkalmasnak.

10. Summary

Tuberculosis (TB) is still one of the most frequent infectious diseases nowadays worldwide. Due to emerging resistant *Mycobacterial* strains, the development of new antitubercular agents is of utmost importance. My doctoral thesis aimed to study two newly synthesized antituberculotic drug candidates in their native form and as liposome-encapsulated drug delivery systems. Employing *in silico* docking methods two promising drug candidates were selected, namely TB501 and TB515 molecule, which displayed selective inhibitor ability of *Mycobacterial* dUTP-as enzyme. This work focused on the formulation of encapsulated liposomal antituberculous drugs which may elevate the effectiveness of TB therapy. The size distribution and long-term stability of the drug-containing monocomponent SUV_{DPPC} (DPPC lipid) and the multicomponent SUV_{mixed} (DOPE:CHEMS:DSPE-PEG) liposomes were determined by dynamic light scattering. The sample that displayed the best long-term stability was the SUV_{mixed}+TB515 sample, which did not show a significant change in size distribution even after 5 weeks. The encapsulation efficiency (EE%) of the drug candidates was measured for each antitubercular agent in both liposomal formulations. TB515 displayed the highest EE in SUV_{DPPC} and SUV_{mixed} liposomes as well. *Mycobacterium tuberculosis* is an intracellular bacterium. During infection, the bacteria that have entered the body the pathogen is phagocytosed by the macrophages. Unfortunately, only a small fraction of the applied drugs can reach an effective concentration within the concerned cells, so long-term use of multiple drugs is required in the case of the treatment of TB. To investigate the cellular uptake of the liposomal formulations and native drugs a human MonoMac-6 cell culture was used. The liposomal formulations were taken up by the cells with higher efficiency and the vesicle-encapsulated form increased the selectivity of the drugs which resulted in the lower cytotoxicity. The *in vitro* intracellular efficacy of liposome-encapsulated formulations was investigated in monocytic cells infected with slow-growing Mtb $H_{37}Rv$ *Mycobacterium* strain. The liposome-encapsulated antituberculotic agents proved to be more efficacious on intracellular bacteria compared to the agents administered in their native form. The most efficient liposomal formulation is the multicomponent, pegylated, pH-sensitive SUV_{mixed} sample. Summarizing the results of the experiments, the SUV_{mixed}+TB515 formulation is the most promising formulation for the treatment of TB.

11. Irodalomjegyzék

1. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. (2018) Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. Front Chem, 6: 360.
2. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. (2019) Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. Nanomedicine, 14: 93–126.
3. Bozzuto G, Molinari A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. Int J Nanomedicine, 10: 975–999.
4. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, Deng Y. (2015) A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. Asian J Pharm Sci, 10: 81–98.
5. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. (2012) Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. J Colloid Sci Biotechnol, 1: 147–168.
6. Henriksen J, Rowat AC, Brief E, Hsueh YW, Thewalt JL, Zuckermann MJ, Ipsen JH. (2006) Universal Behavior of Membranes with Sterols. 90: 1639–1649.
7. Schade DS, Shey L, Eaton RP. (2020) Cholesterol review: A metabolically important molecule. Endocr Pract, 26: 1514–1523.
8. Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. (2015) Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. Drug Deliv Transl Res, 5: 231–242.
9. Ferreira DDS, Lopes SCDA, Franco MS, Oliveira MC. (2013) PH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. Ther Deliv, 4: 1099–1123.
10. Hafez IM, Cullis PR. (2000) Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior. Biochim Biophys Acta - Biomembr, 1463: 107–114.
11. Le NTT, Nguyen DTD, Nguyen NH, Nguyen CK, Nguyen DH. (2021) Methoxy polyethylene glycol–cholesterol modified soy lecithin liposomes for poorly water-soluble anticancer drug delivery. J Appl Polym Sci, 138: 49858.
12. Han SE, Kang H, Shim GY, Suh MS, Kim SJ, Kim JS, Oh YK. (2008) Novel cationic cholesterol derivative-based liposomes for serum-enhanced delivery of

siRNA. Int J Pharm, 353: 260–269.

13. Trucillo P, Campardelli R, Reverchon E. (2020) Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids. Processes, 8: 1–15.
14. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomedicine, 1: 297–315.
15. Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, Alaaeldin E, Hussein A, Sarhan HA, Szebeni J, Ishida T. (2019) PEGylated liposomes: immunological responses. Sci Technol Adv Mater, 20: 710–724.
16. Sawant RR, Torchilin VP. (2010) Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers. Soft Matter, 6: 4026–4044.
17. Gómez-Hens A, Manuel Fernández-Romero J. (2005) The role of liposomes in analytical processes. TrAC - Trends Anal Chem, 24: 9–19.
18. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, Ventosa N. (2011) Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. Prog Mol Biol Transl Sci, 104: 1–52.
19. Manaia EB, Abuçafy MP, Chiari-Andréo BG, Silva BL, Oshiro Junior JA, Chiavacci LA. (2017) Physicochemical characterization of drug nanocarriers. Int J Nanomedicine, 12: 4991–5011.
20. Pokol G, Gyurcsányi E. R, Simon A, Bezúr L, Horvai Gy, Horváth V, Dudás KM. In: Pokol György (szerk.), Analitikai kémia. Typtex kiadó, Budapest, 2017: 310-363.
21. Grabielle-Madelmont C, Lesieur S, Ollivon M. (2003) Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. J Biochem Biophys Methods, 56: 189–217.
22. Wallace SJ, Li J, Nation RL, Boyd BJ. (2012) Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. Drug Deliv Transl Res, 2: 284–292.
23. Dipali SR, Kulkarni SB, Betageri G V. (1996) Comparative Study of Separation of Non-encapsulated Drug from Unilamellar Liposomes by Various Methods. J Pharm Pharmacol, 48: 1112–1115.

24. Margolis LB. (1984) Cell interaction with model membranes Probing, modification and simulation of cell surface function. BBA - Biochim Biophys Acta, 779: 161–189.
25. Manzanares D, Ceña V. (2020) Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. Pharmaceutics, 12: 1–22.
26. Holovati JL, Gyongyossy-issa MIC, Acker JP. (2008) Effect of Liposome Charge and Composition on the Delivery of Trehalose into Red Blood Cells. 218: 207–218.
27. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. (2013) The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. Asian J Pharm Sci, 8: 1–10.
28. Yang MM, Wilson WR, Wu Z. (2017) pH-Sensitive PEGylated liposomes for delivery of an acidic dinitrobenzamide mustard prodrug: Pathways of internalization, cellular trafficking and cytotoxicity to cancer cells. Int J Pharm, 516: 323–333.
29. Zhang R, Qin X, Kong F, Chen P, Pan G. (2019) Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane. Drug Deliv, 26: 328–342.
30. Franco P. (2013) Orphan drugs: The regulatory environment. Drug Discov Today, 18: 163–172.
31. (2020) European Medicines Agency: EMA/473660/2020 Assessment report Arikayce liposomal https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/arikayce-liposomal-epar-public-assessment-report_en.pdf /2021.04.13.
32. Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. (2010) Liposomes as delivery systems for antibiotics. Int J Pharm, 387: 187–198.
33. Faustino C, Pinheiro L. (2020) Lipid systems for the delivery of amphotericin B in antifungal therapy. Pharmaceutics, 12: 1–47.
34. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. (2017) Liposomal formulations in clinical use: An updated review. Pharmaceutics, 9: 1–33.
35. Ye Q, Asherman J, Stevenson M, Brownson E, Katre N V. (2000) DepoFoam(TM) technology: A vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs. J Control Release, 64: 155–166.

36. Momparler RL. (2013) Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. Exp Hematol Oncol, 2: 20.
37. Schwendener RA. (2014) Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances. Ther Adv Vaccines, 2: 159–182.
38. Henriksen-Lacey M, Korsholm KS, Andersen P, Perrie Y, Christensen D. (2011) Liposomal vaccine delivery systems. Expert Opin Drug Deliv, 8: 505–519.
39. https://www.worldometers.info/coronavirus/ 2021.10.21.
40. (2021) European Medicines Agency: EMA/707383/2020 Corr.1* Assessment report Comirnaty. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf /2021.04.13.
41. (2021) European Medicines Agency: EMA/15689/2021 Corr.1* Assessment report Covid-19 Vaccine Moderna. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf /2021.03.11.
42. Yang D. (2021) Application of nanotechnology in the COVID-19 pandemic. Int J Nanomedicine, 16: 623–649.
43. Mischler R, Metcalfe IC. (2002) Inflexal®V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: Production. Vaccine, 20: 5–11.
44. (2015) European Medicines Agency: EMA/CHMP/439337/2015 Assessment report Mosquirix™. https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-outside-eu/mosquirix-public-assessment-report_en.pdf /2021.04.17.
45. Laurens MB. (2019) RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. Hum Vaccines Immunother, 16: 480–489.
46. Matos C, Moutinho C, Lobão P. (2012) Liposomes as a model for the biological membrane: Studies on daunorubicin bilayer interaction. J Membr Biol, 245: 69–75.
47. Faroux JM, Ureta MM, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A. (2020) An overview of peroxidation reactions using liposomes as model systems and analytical methods as monitoring tools. Colloids Surfaces B Biointerfaces, 195: 111254.
48. Kübler AC. (2005) Photodynamic therapy. Med Laser Appl, 20: 37–45.
49. Bőcskei-Antal B, Zolcsák Á, Kósa N, Voszka I, Csík G, Tóth K, Herenyi L. (2019)

Comparison of light-induced formation of reactive oxygen species and the membrane destruction of two mesoporphyrin derivatives in liposomes. Sci Rep, 9: 1–10.

50. Rastogi N. (2003) An Introduction to Mycobacterial Taxonomy, Structure, Drug Resistance, and Pathogenesis. Textb Intest Infect AIDS, 89–115.
51. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
52. Kurz SG, Furin JJ, Bark CM. (2016) Drug-Resistant Tuberculosis: Challenges and Progress. Infect Dis Clin North Am, 30: 509–522.
53. Lee A, Xie YL, Barry CE, Chen RY. (2020) Current and future treatments for tuberculosis. BMJ, 368: m216.
54. Timmins GS, Deretic V. (2006) Mechanisms of action of isoniazid. Mol Microbiol, 62: 1220–1227.
55. Isoniazid. https://www.pharmindex-online.hu/termekek/isonicid-100-mg-tabletta-6697 /2021.06.26.
56. Rifampicin. https://www.pharmindex-online.hu/gyogyszerek/hatoanyagok?q= Rifampicin /2021.06.26.
57. Drew RH. (2021) Ethambutol : An overview. UptoDate, 1–11.
58. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. (2003) Mode of action of pyrazinamide: Disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. J Antimicrob Chemother, 52: 790–795.
59. Haley CA. (2017) Treatment of latent tuberculosis infection. Microbiol Spectr, 5: 27.
60. Mase SR, Chorba T. (2019) Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. Clin Chest Med, 40: 775–795.
61. (2021) European Medicines Agency: EMA/74439/2021, Medicine overview of Situro (bedaquiline). https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/sirturo-epar-medicine-overview_en.pdf /2021.11.05.
62. Li Y, Sun F, Zhang W. (2019) Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. Drug Dev Res, 80: 98–105.

63. Esposito S, Bianchini S, Blasi F. (2015) Bedaquiline and delamanid in tuberculosis. Expert Opin Pharmacother, 16: 2319–2330.
64. Lewis JM, Sloan DJ. (2015) The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Ther Clin Risk Manag, 11: 779–791.
65. Ryan NJ, Lo JH. (2014) Delamanid: First global approval. Drugs, 74: 1041–1045.
66. (2020) European Medicines Agency: EMA/169333/2020, Medicine overview of Pretomanid FGK (pretomanid). https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/pretomanid-fgk-epar-medicine-overview_hu.pdf /2021.04.13.
67. Keam SJ. (2019) Pretomanid: First Approval. Drugs, 79: 1797–1803.
68. Shirley M. (2020) Pretomanid in drug-resistant tuberculosis: a profile of its use. Drugs Ther Perspect, 36: 273–279.
69. Forbes BA. (2017) Mycobacterial Taxonomy. J Clin Microbiol, 55: 380–383.
70. Jagielski T, Minias A, van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A, Dziadek J. (2016) Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. Clin Microbiol Rev, 29: 239–290.
71. Niemann S, Merker M, Kohl T, Supply P. (2016) Impact of Genetic Diversity on the Biology of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains. Microbiol Spectr, 4 (6).
72. Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. (2020) The mycobacterial cell envelope — a moving target. Nat Rev Microbiol, 18: 47–59.
73. Brennan PJ. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis, 83: 91–97.
74. Abrahams KA, Besra GS. (2018) Mycobacterial cell wall biosynthesis: A multifaceted antibiotic target. Parasitology, 145: 116–133.
75. Bandaru R, Sahoo D, Naik R, Kesharwani P, Dandela R. (2020) Pathogenesis, biology, and immunology of tuberculosis. Nanotechnol Based Approaches Tuberc Treat, 1–25.
76. Gengenbacher M, Kaufmann SHE. (2012) Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. FEMS Microbiol Rev, 36: 514–532.
77. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, Sapkota B.

(2020) Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. Mol Biol Rep, 47: 4065–4075.

78. Nachiappan AC, Rahbar K, Shi X, Guy ES, Mortani Barbosa EJ, Shroff GS, Ocazionez D, Schlesinger AE, Katz SI, Hammer MM. (2017) Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. Radiographics, 37: 52–72.
79. Efthimiou P, Sood S. (2007) QuantiFERON TB Gold Test: The new standard for screening of latent tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis? Ann Rheum Dis, 66: 276.
80. Mori Y, Notomi T. (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother, 15: 62–69.
81. WHO. (2008) Molecular Line Probe Assays For Rapid Screening Of Patients At Risk Of Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) Policy Statement. 9.
82. Lawn SD, Nicol MP. (2011) Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Futur Microbiol, 6: 1067–1082.
83. Tran V, Liu JUN, Behr MA. (2014) BCG Vaccines. 2: 1–11.
84. Fletcher HA, Schrager L. (2016) TB vaccine development and the End TB Strategy: Importance and current status. Trans R Soc Trop Med Hyg, 110: 212–218.
85. Méndez-Samperio P. (2019) Novel vaccination strategies and approaches against human tuberculosis. Scand J Immunol, 90: 1–6.
86. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. (2018) mRNA vaccines-a new era in vaccinology. Nat Rev Drug Discov, 17: 261–279.
87. Pinzi L, Rastelli G. (2019) Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. Int J Mol Sci, 20: 4331.
88. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol, 48: 77–84.
89. Vértessy BG, Tóth J. (2009) Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. Acc Chem Res, 42: 97–106.

90. Nagy GN, Leveles I, Vértessy BG. (2014) Preventive DNA repair by sanitizing the cellular (deoxy)nucleoside triphosphate pool. FEBS J, 281: 4207–4223.

91. Mészáros B, Tóth J, Vértessy BG, Dosztányi Z, Simon I. (2011) Proteins with complex architecture as potential targets for drug design: A case study of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Comput Biol, 7: e1002118.

92. Chan S, Segelke B, Lekin T, et al. (2004) Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis dUTPase: Insights into the catalytic mechanism. J Mol Biol, 341: 503–517.

93. Varga B, Barabás O, Takács E, Nagy N, Nagy P, Vértessy BG. (2008) Active site of mycobacterial dUTPase: Structural characteristics and a built-in sensor. Biochem Biophys Res Commun, 373: 8–13.

94. Leveles I, Harmat V, Nagy G, Takacs E, Lopata A, Toth J, Vertessy BG. Structure of the mycobacterium tuberculosis DUTPase D28N mutant 3H6D. https://www.rcsb.org/structure/3H6D /2021.06.25.

95. Kiss É, Gyulai G, Pénzes CB, Idei M, Horváti K, Bacsa B, Bosze S. (2014) Tuneable surface modification of PLGA nanoparticles carrying new antitubercular drug candidate. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp, 458: 178–186.

96. Horváti K, Gyulai G, Csámpai A, Rohonczy J, Kiss É, Bösze S. (2018) Surface Layer Modification of Poly(d, l-lactic-co-lycolic acid) Nanoparticles with Targeting Peptide: A Convenient Synthetic Route for Pluronic F127-Tuftsin Conjugate. Bioconjug Chem, 29: 1495–1499.

97. Scheich C, Szabadka Z, Vértessy B, Pütter V, Grolmusz V, Schade M. (2011) Discovery of novel MDR-mycobacterium tuberculosis inhibitor by new FRIGATE computational screen. PLoS One, 6: 1–9.

98. Irwin JJ, Shoichet BK. (2005) ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. J Chem Inf Model, 45: 177–182.

99. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. (2012) ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. J Chem Inf Model, 52: 1757–1768.

100. Horváti K, Bacsa B, Szabó N, Dávid S, Mezo G, Grolmusz V, Vértessy B, Hudecz F, Bősze S. (2012) Enhanced cellular uptake of a new, in silico identified antitubercular candidate by peptide conjugation. Bioconjug Chem, 23: 900–907.

101. Zsila F, Bősze S, Beke-Somfai T. (2020) Interaction of antitubercular drug candidates with α1-acid glycoprotein produced in pulmonary granulomas. Int J Biol Macromol, 147: 1318–1327.
102. Lipinski CA. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. J Pharmacol Toxicol Methods, 44: 235–249.
103. Módos K, Galántai R, Bárdos-Nagy I, Wachsmuth M, Tóth K, Fidy J, Langowski J. (2004) Maximum-entropy decomposition of fluorescence correlation spectroscopy data: Application to liposome-human serum albumin association. Eur Biophys J, 33: 59–67.
104. Zjegler-heitbrock HL, Thiel E, Futterer A, Herzog V. (1988) Establishment of a human cell line (Monomac 6) with characteristics of mature monocytes. 461: 456–461.
105. Wright EL, Quenelle DC, Suling WJ. (1996) Use of Mono Mac 6 Human Monocytic Cell Line and J774 Murine Macrophage Cell Line in Parallel Antimycobacterial Drug Studies. 40: 2206–2208.
106. Friedland JS, Shattock RJ, Griffin GE. (1993) Phagocytosis of mycobacterium tuberculosis or particulate stimuli by human monocytic cells induces equivalent monocyte chemotactic protein-1 gene expression. Cytokine, 5: 150–156.
107. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. (2018) Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc, 6: 469–472.
108. Kósa N, Zolcsák Á, Voszka I, Csik G, Horváti K, Horváth L, Bősze S, Herényi L. (2021) Comparison of the Efficacy of Two Novel Antitubercular Agents in Free and Liposome-Encapsulated Formulations. Int J Mol Sci, 22 (5): 2457.
109. Bozzuto G, Molinari A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. Int J Nanomedicine, 10: 975–999.
110. Zhang L, Granick S. (2006) How to stabilize phospholipid liposomes (Using nanoparticles). Nano Lett, 6: 694–698.
111. Lombardo D, Calandra P, Caccamo MT, Magazù S, Kiselev MA. (2019) Colloidal stability of liposomes. AIMS Mater Sci, 6: 200–213.
112. Nele V, Holme MN, Kauscher U, Thomas MR, Doutch JJ, Stevens MM. (2019) Effect of Formulation Method, Lipid Composition, and PEGylation on Vesicle

Lamellarity: A Small-Angle Neutron Scattering Study. Langmuir, 35: 6064–6074.

113. Du Plessis J, Ramachandran C, Weiner N, Müller DG. (1996) The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. Int J Pharm, 127: 273–278.

114. Jain NK, Nahar M. (2010) PEGylated Nanocarriers for Systemic Delivery. In: Grobmyer SR, Moudgil BM (eds) Cancer Nanotechnology. Methods Mol. Biol. 221–234.

115. Silvander M. (2002) Steric stabilization of liposomes - A review. Prog Colloid Polym Sci, 120: 35–40.

116. Milton Harris J, Martin NE, Modi M. (2001) Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet, 40: 539–551.

117. Bassetti M, Vena A, Russo A, Peghin M. (2020) Inhaled Liposomal Antimicrobial Delivery in Lung Infections. Drugs, 80: 1309–1318.

118. Muralidharan P, Mallory E, Malapit M, Don H, Mansour HM. (2014) Inhalable PEGylated phospholipid nanocarriers and PEGylated therapeutics for respiratory delivery as aerosolized colloidal dispersions and dry powder inhalers. Pharmaceutics, 6: 333–353.

119. Kulkarni SB, Betageri G V, Singh M. (1995) Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. J Microencapsul, 12: 229–246.

120. Wang X, Xia Y, Liu L, Liu M, Gu N, Guang H, Zhang F. (2010) Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater, 95 B: 357–364.

121. Gordon J, Brown M, Reynolds M. (2018) Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. Diseases, 6: 85.

122. Campbell IA, Bah-Sow O. (2006) Pulmonary tuberculosis: Diagnosis and treatment. Br Med J, 332: 1194–1197.

123. Pinheiro M, Lucio M, Lima JLFC, Reis S. (2011) Liposomes As Drug Delivery Systems for the Treatment of TB: Passive & Active Targeting of Liposomes as Drug Delivery Systems for the Treatment of TB. Nanomedicine, 6: 1413–1428.

124. Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. (1998) Liposome-cell interactions in vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. Biochemistry, 37: 12875–12883.
125. Paliwal SR, Paliwal R, Vyas SP. (2015) A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery. Drug Deliv, 22: 231–242.

12. Saját publikációk jegyzéke

12.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

12.1.1. Publikációk

Kósa N, Zolcsák Á, Voszka I, Csík G, Horváti K, Horváth L, Bősze S, Herenyi L (2021) Comparison of the Efficacy of Two Novel Antitubercular Agents in Free and Liposome-Encapsulated Formulations. Int. J. Mol. Sci, 22:2457

Bőcskei-Antal B, Zolcsák Á, **Kósa N**, Voszka I, Csík G, Tóth K, Herenyi L. (2019) Comparison of light-induced formation of reactive oxygen species and the membrane destruction of two mesoporphyrin derivatives in liposomes. Sci Rep, 9: 1–10.

12.1.2. Poszterek

Kósa N, Bőcskei-Antal B, Horváti K, Bősze S, Herényi L, Voszka I. Investigation of Encapsulated Liposomal Antituberculotics and Effects on in Vitro Model Systems. Biophys. J. 110:246A-247A. 1226-Pos. 60th Annual Meeting of the Biophysical-Society. Los Angeles (CA), USA 2016.02.27.-2016.03.02

Kósa N, Horváti K, Bőcskei-Antal B, Bősze S, Herényi L, Voszka I. Newly Synthesized Liposomal Antituberculotic Compounds and Effects on In Vitro Model Systems. Liposomes, Exosomes, Virosomes From Model. Complex Membr. Process. to Med. Diagnostics Drug Deliv. pp. 106. Ascona, Svájc 2016.09.11-16.

Kósa N, Hegedűs N, Szigeti K, Bőcskei-Antal B, Horváti K, Herényi L, Bősze Sz, Voszka I. Liposzómába zárt új farmakonok a TBC terápiájában. MBFT XXVI. Kongresszus, Szeged 2017. 08.22-25.

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, ***Dr. Herényi Leventének***, aki sok jó tanáccsal, odafigyeléssel, türelemmel és éleslátással kísért végig kutató munkám rögös útjain. Hálával adózom a disszertációm és a tudományos publikációim megírásában nyújtott rengeteg segítségéért, támogatásáért és nem utolsó sorban a mindig pozitív életszemléletéért.

Köszönettel tartozom ***Dr. Voszka Istvánnak***, aki TDK munkám során megismertetett a liposzómák sokszínű világával, és aki egyetemi éveim alatt témavezetésével indított el és kísért a tudomány útján. Hálával tartozom a számtalan hasznos tanácsért és segítőkészségéért, amellyel hozzá járult a disszertációm megírásához.

Köszönöm ***Dr. Kellermayer Miklósnak***, aki lehetővé tette és biztosította, hogy ehhez a közösséghez tartozhatok és a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben végezhetem a munkám. A tudomány iránti lendületével, fáradhatatlanságával mindig példaként járt előttem.

Köszönetemet szeretném kifejezni ***Dr. Bősze Szilviának***, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársának, aki a sejteken végzett mérésekben volt tanítómesterem.

Köszönöm ***Dr. Csík Gabriellának***, ***Dr. Zolcsák Ádámnak, Dr. Bozó Tamásnak*** és ***Dr. Horváti Katának*** a tudományos együttműködést és a szakmai segítséget.

Köszönet ***Dr. Bozó Tamásnak*** és ***Dr. Veres Dánielnek***, hogy gondosan átnézték és véleményezték a készülő disszertációmat.

Hálával gondolok minden kedves kollégámra mind a szakmai, mind a baráti segítségükért. Köszönöm nekik azt a páratlan hangulatot, jókedvet és bajtársiasságot, amit tőlük kaptam.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet szeretném kifejezni a támogatásért és a sok türelemért a barátaimnak és a családomnak, akik akkor is bíztattak és mellettem voltak, amikor nehézségekkel küzdöttem.