



Liver-on-a-chip eszköz fejlesztése gyógyszermetabolizmus vizsgálatára

Tudományos Diákköri Dolgozat

SZERZŐ: SEPSIK NORMAN

KONZULENSEK:

DR. ENDER FERENC, VIK EET

DR. BALOGH GYÖRGY, VBK KKFT

Tartalomjegyzék

1. Összefoglaló.....	5
2. Bevezetés.....	6
2.1. A gyógyszerfejlesztés folyamatának áttekintése	6
2.1.1. Hepatocita alapú metabolit szűrés.....	9
2.1.2. Máj mikroszóma alapú metabolit szűrés.....	9
2.1.3. Rekombináns humán enzim alapú metabolit szűrés.....	10
2.1.4. A metalloporfirin, mint potenciális metabolit szűrési modell	10
2.1.1. In-vitro vizsgálati módszerek összefoglalása	11
2.2. Problémafelvetés	11
2.3. Célkitűzések	12
3. A technológiai ismeretek összefoglalása	13
3.1. Elektrosztatikus szálképzés.....	13
3.2. Folyadékkromatográfiás tömegspektrometria.....	14
3.3. UV-Vis spektrofotometria.....	15
3.4. 3D nyomtatási technológiák.....	15
3.5. Enzimkinetika	16
3.6. Enzimkinetika mikroreaktorban	18
4. Kutatási előzmények összefoglalása	19
4.1. Metalloporfirin rögzítése mágneses nanorészecskére.....	19
4.2. Liver-on-a-Chip mágneses nanorészecske alapú mikroreaktor	20
4.3. Hordozórendszer előállítása nanorészecske-nanoszál kompozittal.....	20
5. Kutatási terv	21
6. Nanokompozit előállítása elektrosztatikus szálképzéssel.....	23
6.1. Kísérletterv és felhasznált anyagok.....	23
6.2. Szálképzési eredmények bemutatása	24
6.3. Konklúzió	26
7. Biokompatibilitási vizsgálatok	27

7.1.	Célkitűzés	27
7.2.	Kísérletterv és felhasznált anyagok.....	27
7.3.	Az FeTPPS-polimer kapcsolat és kiloldódás vizsgálata	27
7.4.	A biomimetikus oxidáció reakciókinetikájának vizsgálata.....	28
7.5.	Biokompatibilitási vizsgálatok eredményei	29
7.6.	Konklúzió	31
8.	<i>Mikroreaktor kazetta előállítása.....</i>	32
8.1.	Műszaki specifikáció.....	32
8.2.	Mikroreaktor kazetta tervezése.....	33
8.3.	Megvalósítási eredmények és tapasztalatok	35
8.4.	Konklúzió	38
9.	<i>A máj metabolizmusának biomimetikus vizsgálata a Liver-on-a-Chip eszközben</i> 39	
9.1.	Célkitűzés	39
9.1.	Kísérletterv és felhasznált anyagok.....	39
9.2.	Mérési eredmények összefoglalása	41
9.3.	Konklúzió	43
10.	<i>Kitekintés és további tervek.....</i>	44
11.	<i>Hivatkozásjegyzék</i>	45

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Koplányi Gábornak a nanoszálak kompozit, valamint a katalizátor elkészítése során nyújtott segítséget.

Köszönöm Decsi Balázsnak a folyadékkromatográfiás tömegspektrometria mérések során nyújtotta segítséget.

Köszönöm Balogh György tanár úrnak a lelkiismeretes szakmai irányításait.

Köszönöm Ender Ferencnek a lelkiismeretes szakmai irányításait, a dolgozatom megírása során nyújtotta tanácsait, meglátásait és javításait.

Köszönöm Hantos Gusztávnak a mikroreaktor 3D nyomtatása során nyújtotta segítséget.

Kulcsszavak

Mikrofluidika, nanotechnológia, elektrosztatikus szálképzés, gyógyszerhatóanyag szűrés, Organ-on-a-Chip, Lab-on-a-Chip

Jelölésjegyzék

ABS	akrilonitril-butadién-sztirol
ADME	abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkrécio
API	aktív gyógyszerészeti összetevő / active pharmaceutical ingredient
ASA	akrilonitril-sztirol-akrilészter
CPE-HG 100	PET/Kopoliészter filament
CyP	citokróm
CyP450	citokróm P450
DCM	diklórmétán
DMF	N,N-dimetilformamid
EMA	Európai Gyógyszerügynökség, European Medicines Agency
FDA	Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal / Food and Drug Administration
FDM	ömledékrétegzés / Fused Deposition Modelling
FeTPFP	15,10,15,20-tetrakis(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)vas(II) porfirin
FeTPPS	5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatofenil)vas(II) porfirin
HPLC-UV-MS	nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer ultraibolya detektorral
IJP	tintasugaras nyomtatás / ink jet printing
MeOH	metanol
MNP	mágnes nanorészecskék / magnetic nanoparticles
MP	metalloporfirin
PDMS	dimetil-polisziloxán
PET	polietilén-tereftalát
PLA	polilaktid
PP	polipropilén
RP	gyors prototípusozás / rapid prototyping
RPM	percenkénti fordulatszám / rotation per minute
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp
SLA	sztereolitográfia / stereolithography
SLS	szelektív lézeres szinterezés / selective laser sintering
STY	volumetrikus produktivitás / space time yield
<i>t</i> BuOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperoxid
UV-Vis	Ultraibolya-látható spektroszkópia / Ultraviolet–visible spectroscopy

1. Összefoglaló

Az Organ-on-a-Chip mikroreaktorok az élő szervezet egyes szerveinek funkcióját modellezni képes *in-vitro* mikrofluidikai eszközök. A fejlesztett Liver-on-a-chip eszköz a máj metabolizmusának bizonyos aspektusait modellezi. A gyógyszerkutatás preklinikai fázisához kapcsolódó farmakokinetikai vizsgálatok egyik fontos lépése a hatóanyagjelölt molekulák májhoz kötött metabolizmusának *in-vitro* modellezése. Az élő szervezetben a gyógyszermetabolizmus általában a májban nagyobb mennyiségben jelenlévő citokróm P450 (CyP450) enzimsalád által katalizált oxidatív átalakulással történik. Az (ipari) gyógyszerkutatás gyakorlatában a fenti enzimet tartalmazó máj mikroszóma (hepatociták endoplazmatikus retikuluma) alapú biológiai modellt használnak, ennek a rendszernek azonban számos korlátja ismert.

Kutatásunk keretében olyan új, nanokompozit rendszert fejlesztünk, ami a jelenleg használt *in-vitro* biológiai modell biomimetikus alternatívája. A biomimetikus rendszerben máj mikroszóma helyett egy nanorészecskére rögzített, polimer nanoszálba ágyazott metalloporfirin organokatalizátor rendszert használunk, ami a CyP450 enzimsalád aktív helyének szerkezeti analójaként a mikroszóma által végzett átalakítást modellezi, de nem rendelkezik annak bizonyos korlátaival.

Az elvégzett kísérletek a nanokompozit rendszer elektrosztatikus szálképzés technológiával történő előállítására, a mikroreaktor kazetta megtervezésére, FDM 3D nyomtatás alapú előállítására és összeszerelésére, valamint az eszköz kísérleti alkalmazásban történő validálására fókuszálnak.

A kísérletes munka során sikeresen reprodukáltuk a biomimetikus nanokompozit rendszert és azt egy általunk fejlesztett, folyamatos áramlású mikrocatornás reaktorba integráltuk. A kutatási munka célkitűzése, hogy a rögzítetlen katalizátorhoz képest a nanokompozit rendszerben korábban kísérletesen tapasztalt kiemelkedő biokatalitikus aktivitást az áramlásos mikroreaktor rendszerben is igazoljuk.

A megvalósított Liver-on-a-Chip rendszerben sikeresen demonstráltuk egy ismert gyógyszermolekula, az *amlodipin* oxidációját a fő humán metabolit *dehidroamlodipinné*. A kísérletek során a szakirodalomból ismert áramlásos megvalósításokhoz képest azonos termelékenységet értünk el nagyságrendileg kevesebb katalizátor molekula felhasználása mellett.

2. Bevezetés

2.1. A gyógyszerfejlesztés folyamatának áttekintése

Az FDA fogalomtára alapján összefoglalva gyógyszernek tekintünk minden olyan betegség diagnosztizálására, gyógyítására, enyhítésére, kezelésére vagy megelőzésére szánt anyagot, amely a szervezet szerkezetének vagy bármely funkciójának befolyásolására szolgál (az élelmiszereken kívül) [1].

A gyógyszerkutatás és fejlesztés folyamata egy kifejezetten bonyolult, költséges és időigényes folyamat, amely során több tízezer gyógyszer hatóanyag jelölt (API – Active Pharmaceutical Ingredient) szűrése és kutatása szükséges ahhoz, hogy a megfelelő gyógyszerhatóanyagot megtalálják. Átlagosan 10-12 évig tart, mire egy adott gyógyszer piacra kerül, a gyógyszerfejlesztés költsége tipikusan 0.8 és 1.8 milliárd dollár közé tehető [2].

A fejlesztési folyamat során a rendelkezésre álló 10 000 – 50 000 hatóanyag jelöltből kell az egyetlen, kereskedelmi forgalomba kerülő hatóanyagot kiválasztani. Az egyes fázisokban előforduló hatóanyagjelöltek számát a 1. táblázat tartalmazza. A folyamat elkülönülő szakaszokból áll, ezek különböző tevékenységeket foglalnak magukba, más szabályok szerint kivitelezik őket, ugyanakkor egymásra épülnek, és a sorrendjük hatóságok által meghatározott [3]. Ezeket a folyamatokat a 2-1. ábra mutatja. Európában és az Egyesült Államokban már a kutatási folyamat megkezdéséhez is szükség van az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) vagy az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) jóváhagyására, valamint szintén ezek a hatóságok felügyelik az összes többi lépést is és döntenek a gyógyszerhatóanyag jelöltek sorsáról a klinikai fejlesztések végén [4].



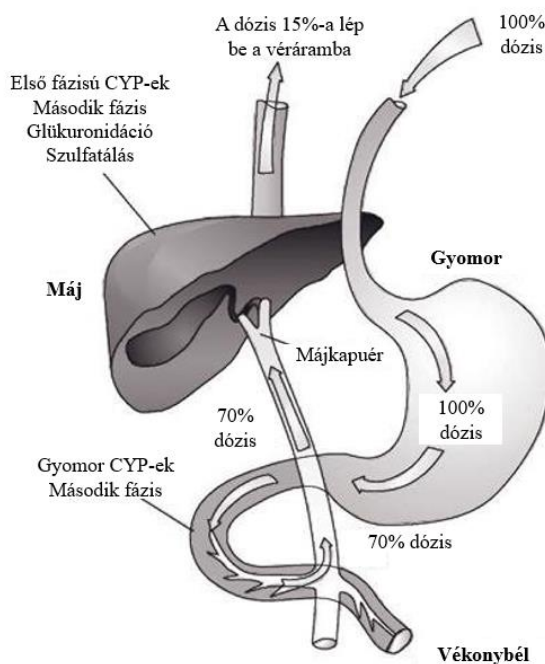
2-1. ábra. A gyógyszerkutatás és -fejlesztés folyamatának összefoglaló ábrája [3]

Az FDA fogalomtára alapján összefoglalva gyógyszernek tekintünk minden olyan betegség diagnosztizálására, gyógyítására, enyhítésére, kezelésére vagy megelőzésére

szánt anyagot, amely a szervezet szerkezetének vagy bármely funkciójának befolyásolására szolgál (az élelmiszereken kívül) [1].

A gyógyszerhatóanyag jelöltek vizsgálata és kiválasztása abszorpciós, disztribúciós, metabolikus, és exkréciós (ADME) vizsgálatok alapján történik. Ezeknek a vizsgálatoknak az célja a gyógyszerhatóanyag koncentráció időbeni alakulásának modellezése a vérkeringésben és a test szerveiben valamint szöveteiben, illetve a *biohasznosulás* becslése, illetve mérése [5]. A *biohasznosulás* a bevitt és a ténylegesen keringésbe jutott (tehát hatásképes) gyógyszer aránya.

A gyógyszerhatóanyag hasznosulása és kiválasztása a szervezeten belül a bevitel úttól is függ [6]. A főbb beviteli utak: enterális (például orálisan – szájon át, rektálisan – a végbélnyíláson át), parenterális (intravaszkulárisan – közvetlenül a vérkeringésbe, intramuszkulárisan – az izomszövetbe, szubkután – a bőrfelszín alá) vagy topikális (bőrön vagy nyálkahártyán) [7].



2-2. ábra. A dózis mennyiségének alakulása az enterális úton bejutott gyógyszereknél [8]

Az enterális úton bevitt gyógyszer biohasznosulását a *first-pass hatás* befolyásolja (melyet a 2-2. ábra mutat). A szájon át bevitt hatóanyag először a gyomron majd a bélrendszer kezdeti szakaszán (*duodenum*) halad át. Innen a hatóanyag nagy része az ún. portális keringés által a májba kerül (kb. 70%), kisebb része a bélrendszeren áthaladva (hasznosulás nélkül) kiürül. A májig eljutó hatóanyag a májban metabolikus úton módosul vagy lebomlik, majd a májat elhagyva éri el a szisztémás keringési rendszert.

Ennek következtében a hatás helyszínén csak az eredeti dózis egy része (kb. 15%), vagy az eredetileg bevitt hatóanyag módosult formája áll rendelkezésre [9], [10]. Ezt a folyamatot a 2-2. ábra mutatja. A máj-függő metabolizmus magába foglalja az ún. első fázisú reakciókat (oxidáció, redukció, hidrolízis) melyek során a gyógyszer poláris vagy reaktív csoportokat kap, majd ezt sok esetben második fázisú reakciók (konjugáció) követik melyek következtében a gyógyszer glükuronsavval, szulfáttal vagy más molekuláriszerekkel kapcsolódik amelyek elősegítik a vizeletbe vagy epébe történő kiválasztást [11]. Az oxidatív metabolizmusáért a citokróm P450 (CYP450) enzimek szupercsaládjába tartozó *hem-csoport* tartalmú fehérjék felelősek, melyek túlnyomórészt a *hepatociták endoplazmatikus retikulumában* vannak jelen [12]. A metabolizmus melléktermékeit metabolitoknak nevezzük [13] melyek a folyamat során farmakológiai szempontból az alábbi csoportokba sorolhatók [14] :

1. inaktívvá vált metabolitok
2. teljesen vagy részben aktív metabolitok a tervezett hatással
3. aktív, de toxikus metabolitok.

A gyógyszerkutatás kutatási és preklinikai fázisainak egyik fő célkitűzése a hatóanyag jelöltek metabolizmus-vizsgálata, legelső sorban az 1) és 3) csoportba eső metabolitok kizárása [15]. A következőkben néhány jelenleg is használt metabolit szűrési módszert fogok ismertetni.

1. táblázat. A gyógyszerkutatás egyes fázisaiban vizsgált hatóanyagjelöltek száma, és vizsgálatra használt vizsgálati módszerek

Fázis:	Hatóanyag kutatás	Preklinikai fázis	Klinikai fázis I-II.	Klinikai fázis III.
Hatóanyag-jelöltek száma	10000 - 50000	250-500	kb. 5	1
Vizsgálati módszerek	In silico módszerek [2]	In-vitro, in-vivoállatkísérletek hepatocita és máj mikroszóma modell [16]	In-vivokísérletek önkénteseken [3], [17], [18]	In-vivokísérletek önkénteseken [19]

2.1.1. Hepatocita alapú metabolit szűrés

A hepatocita a máj parenchimaszöveinek egyik sejtípusa, amely számos májfunkcióban vesz részt és a gyógyszermetabolizmus fő helyszínéül szolgál. A primer hepatociták a gyógyszerhatóanyag jelöltek szűrésére is alkalmazhatók *in-vitro* körülmények között [20]. Fő előnyük, hogy fiziológiás koncentrációban tartalmazzák a már korábban bemutatott első és második fázisú metabolikus reakciókhoz tartozó enzimeket és egyéb kofaktorokat. Ezáltal olyan környezetet biztosítanak, amelyek együttesen nagyon pontos *in-vitro* – *in-vivo* egyezést mutató modellt alkotnak a gyógyszer metabolizmus vizsgálatára [21]. Segítségükkel vizsgálni lehet az idegen és szennyező anyagok felhalmozódását (bioakkumuláció) vagy aktív kiválasztását [22].

A hepatociták funkciójának fenntartása *in-vitro* körülmények között (főleg hosszabb ideig, 60 perces meghaladó vizsgálat esetén) nehézkes, így használatuk korlátozott abban az esetben, ha például a metabolitok lassan alakulnak ki [23], [24], [25].

Kutatási fázisban lévő kísérleti módszertanok is legfeljebb párszáz párhuzamos vizsgálat elvégzését teszik lehetővé [26], az ipari gyakorlat ennél a mennyiségnél egy nagyságrenddel kisebb. A hepatocita modell az FDA által elfogadott, gyógyszer metabolitok vizsgálatára szolgáló, *in-vitro* körülmények közt alkalmazható módszer [27].

2.1.2. Máj mikroszóma alapú metabolit szűrés

A hepatociták áteresztőképessége korlátozott, hiszen gondos odafigyelést igényel a megfelelő sejttételekesség fenntartása, emiatt használatuk jelentős manuális, nehezen automatizálható labormunkát igényel, és emiatt gyakran második szintű szűrési folyamatnak minősül [28]. A hepatocita modell alacsony áteresztőképessége miatt manapság egyre inkább elterjedt, hogy a máj szubcelluláris izolátumán, a mikroszómán alapuló *in-vitro* modellt alkalmazzák [3]. Ennek a módszernek az áteresztő képessége 10-100 molekula/nap köré tehető [29]. A legfőbb előnyök közé sorolható a nagyobb áteresztőképesség, egyszerűbb használat, az alacsonyabb költség, könnyebb tárolás a hepatocita modellhez képest [24], [30]. A máj mikroszómán alapuló modelleket az első szintű szűrési folyamatok közé sorolják [28]. A mikroszóma modellre jellemző enzim koncentráció és kofaktorok száma nem a fiziológiás körülményeknek megfelelő, ezért az *in-vitro* – *in-vivo* egyezés gyengébb, mint a hepatocita modell esetén [22]. A máj mikroszóma a hepatocita modellhez hasonlóan az FDA által közölt gyógyszer metabolitok

vizsgálatára vonatkozó útmutatójában szerepel, mint *in-vitro* körülmények közt alkalmazható módszer [27].

2.1.3. Rekombináns humán enzim alapú metabolit szűrés

A rekombináns enzimek molekuláris biológiai technikákkal preparálható, kereskedelmi forgalomban is kapható izolált enzimek [15]. Az előzőleg bemutatott modellek a *CYP450* enzim család több tagját is tartalmazzák, így a különböző enzimek metabolikus folyamatai nem vizsgálhatók különállóan. Ez megnehezíti bizonyos gyógyszer metabolitok szelektív (adott enzimtől függő) előállítását. A *CYP* enzimcsalád tagjainak rekombináns előállításával olyan modellrendszer hozható létre, amely egyszerre csak egyetlen humán *CYP* variánst tartalmaz [31]. Ez viszont egyben azt is jelenti, hogy nem alkalmasak a metabolitok aktivitásának fiziológiás sejtrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálatára [32]. Legfőbb előnyük a metabolitok szelektív előállítása mellett, hogy a mikroszóma rendszerhez képest is egyszerűbb a használatuk és magasabb az áteresztőképességük, amely 100 és 1000 molekula/nap közé tehető [14].

2.1.4. A metalloporfirin, mint potenciális metabolit szűrés modelle

A porfirinek olyan gyűrűs vegyületek, amelyeket négy pirrol heterociklusos molekula épít fel, egymás közt metilén hidakkal összekapcsolva [33]. Képesek fémionokkal komplexeket képezni, ezeket nevezzük metalloporfirineknek [34]. A metalloporfirin mag szerkezete hasonlóságot mutat a *CyP450* vasporfirinjéhez, így ezen a szerkezeti hasonlóságon alapul a szintetikus előállított metalloporfirin molekulák alkalmazása számos kismolekulás hatóanyag szerkezetbeli oxidációs reakciójának modellezésében. Ez a tulajdonság a metalloporfirinek potenciális gyógyszerhatóanyag-jelölt szűrés modelle alapjává teheti [35], ugyanis az ún. biomimetikus tulajdonságot kihasználva képesek egy lépésben metabolitokat létrehozni anélkül, hogy komplex biológiai mátrix (pl. mikroszóma, *CyP450* enzim vagy különböző kofaktorok) lenne jelen. Ugyanakkor a metalloporfirinek homogén oxidatív rendszerekben relatíve alacsony stabilitással rendelkeznek [36].

2.1.1. *In-vitro* vizsgálati módszerek összefoglalása

Az alábbi 2. táblázat foglalja össze a kutatási és ipari gyakorlatban használt *in-vitro* gyógyszerhatóanyag vizsgálati modelleket. A hepatocita sejt modell abszolút áteresztőképességére vonatkozóan nem találtunk megbízható irodalmi forrást, de a folyamat nagyrészt manuális jellege miatt praktikusan alacsonyabb, mint a mikroszóma modell esetén.

2. táblázat. A kutatási és ipari gyakorlatban használt *in-vitro* gyógyszerhatóanyag vizsgálati modellek

Módszer	Vizsgálat célja	Áteresztőképesség [1/nap]
CyP450 rekombináns enzim modell	Enzimkinetika, kvalitatív specifikus metabolit katalízis	[100-1000/nap]
Mikroszóma modell	Kvantitatív metabolitikus katalízis, metabolit stabilitás vizsgálat	[10-100/nap]
Hepatocita sejt modell	Szenyvező és idegen anyagok felhalmozódásának, kiválasztásának, valamint a metabolit stabilitásának pontos <i>in-vitro</i> – <i>in-vivo</i> egyezést mutató vizsgálata	Alacsony

2.2. Problémafelvetés

Mivel a gyógyszerfejlesztés teljes folyamatára vetítve a gyógyszerhatóanyag metabolitok vizsgálata az egyik legszűkebb keresztmetszet [37] szűrési technológiák átbocsátóképességének javítása aktív kutatási terület [38]. Az átbocsátóképesség növelésének egyik lehetséges útja a folyamatok integrálása pipettázó-robot rendszerekbe. Ezek a rendszerek nagy számú (pl. 96) mintán azonos lépéseket nagy hatékonysággal hajtanak végre [37]. Az irodalomban találunk olyan technológiákat, melyek az arányos méretcsökkentés hatásait (mikrofluidika) kiaknázva célozzák biomolekulák adott feltételek szerinti szűrését, elsősorban adott szerv (pl. máj) mikrostruktúrájához hasonló áramlási környezet kialakításával [39]. Ennek a megközelítésnek az alternatívája a májban történő metabolizmus leutáncázása (biomimikri) szintetikus molekulákkal. Ezek a molekulák új, nagyobb hatékonyságú, könnyebben kezelhető, stabilabb metabolit szűrő rendszerek alapjai lehetnek. A 4. fejezetben részletesen ismertetem a kutatócsoport eredményeit a metalloporfirin által katalizált biomimetikus reakción alapuló

modellrendszeren, ami a rekombináns *CyP450* enzimekkel végezhető vizsgálatok nagyobb átbocsátóképességű alternatívájaként szolgálhat.

A metalloporfirin alacsony stabilitását sikerült megnövelni nanohordozórendszerek használatával, de a legnagyobb biokatalitikus aktivitást mutató, nanoszál alapú hordozórendszer a gyakorlatban körülményesen alkalmazható. Ennek oka, hogy a nanoszálás szövedék minták szilárd halmazállapotúak, ezért nem integrálhatók a nagy átbocsátóképességű pipettázó robot rendszerekkel.

2.3. Célkitűzések

A dolgozatban bemutatott kutatómunka általános célja a nanoszálás kompozit rendszerben immobilizált metalloporfirint tartalmazó mikroreaktor kazetta kialakítása, ami a jövőben alkalmas lehet egy nagy átbocsátóképességű metabolit szűrőrendszer elemi egységeként működni.

Az általános cél eléréséhez az alábbi, specifikus célokat fogalmaztuk meg:

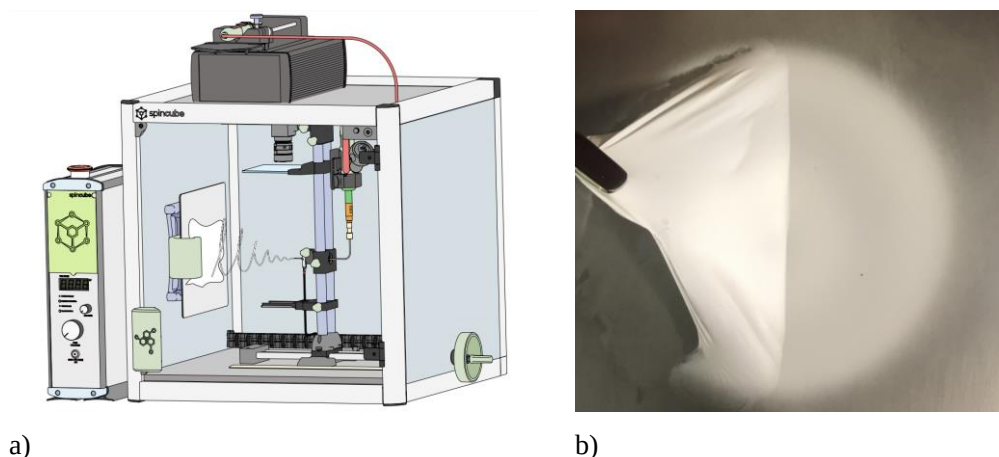
- C1.A már létező és kutatócsoport által megalkotott nanoszálás kompozit rendszer reprodukálása
- C2.A nanoszálás kompozit rendszer integrálása egy erre a célra tervezett mikroreaktor kazettába
- C3.A mikroreaktor biomimetikus működésének demonstrációja

3. A technológiai ismeretek összefoglalása

3.1. Elektrosztatikus szálképzés

Az elektrosztatikus szálképzés egy széles körben használt technológia nanoszálak előállítására. Nanoszálnak nevezzük az olyan egydimenziós nanostruktúrákat, melyek karakterisztikus mérete (átmérője) a 100 – 2000 nm mérettartományba esik. Az elektrosztatikus szálképző (*electrospinner*) berendezés egy folyékony halmazállapotú *prekurzor* oldatból egy szilárd halmazállapotú *nanoszálak szövetéket (scaffold)* hoz létre. A szövetekben a nanoszálak egymáshoz képesti orientációja, struktúrális felépítése, anyagösszetétele, a folyamat termelékenysége alapján különböző elektrosztatikus szálképzési technológiák terjedtek el [40],[41].

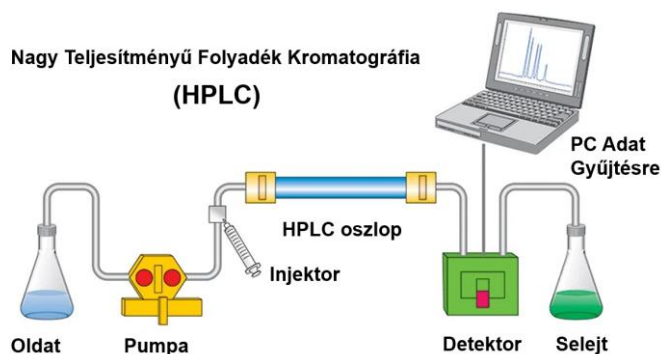
A 3-1. a) ábra a legegyszerűbb, úgynevezett *egytűs-lapkollektoros* elrendezést mutatja (Spincube, Spinsplit Llc, Budapest) amelyet én is használtam a nanoszálak kompozit rendszer előállítása során. Ebben az elrendezésben a berendezés magasfeszültségű tápegységből, fecskendőpumpából, szálképző kapillárisból (tűből), és egy vezetőképes földelt kollektor lemezből áll. Utóbbi kettő között potenciálkülönbséget hozunk létre (tipikusan 15-40 kV). Az így kialakuló elektrosztatikus térbe juttatjuk a szálképző kapillárison keresztül a polimer oldatot (vagy ömledéket), mely a felületi feszültség miatt csepp alakot vesz fel a kapilláris végén. Az elektromos tér hatására a polimer oldatban a lévő pozitív töltések akkumulálódnak a csepp felszínén, ami erős taszító hatást eredményez közöttük (*elektrosztatikus nyomás*). Ennek hatására a csepp alakú polimer oldat elnyújtott kúpos alakot vesz fel. Ezt a képződményt nevezzük Taylor-kúpnak. Növelve a feszültséget egy ponton túl a felületegységre eső elektrosztatikus nyomás értéke meghaladja a felületi feszültség értékét és a folyadékkúp csúcsából anyag sugár kilövellés (*jetting*) következik be. Ezt a képződményt nevezzük Taylor-kúpnak. A Taylor-kúpból induló vékony folyadéksugár ostorozó mozgással halad a földelt kollektor lemez felé, minek hatására az oldatban lévő polimer láncok megnyúlnak. Ezzel egyidejűleg a megnőtt Szöveg beírásához kattintson vagy koppintson ide. szubmikronos méretű egyenletes szálakat [36], [42], [43], [44], melyek a kollektort elérve véletlenszerű orientációban rendeződve sűrű szövetéket alkotnak amelyet a 3-1. b) ábra mutat.



3-1. ábra. a) Spincube (Spinsplit Llc, Budapest) elektrosztatikus szálképző [45] b) egytűs-lapkollektoros elektrosztatikus szálképzéssel létrehozott nanoszálak szövedék képe, a korong átmérője 5 cm

3.2. Folyadékkromatográfiás tömegspektrometria

A nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography) a vizsgált folyadék oldatot alkotó vegyületek mennyiségi meghatározását szolgálja. A berendezés elvi elrendezését a 3-2. ábra mutatja.

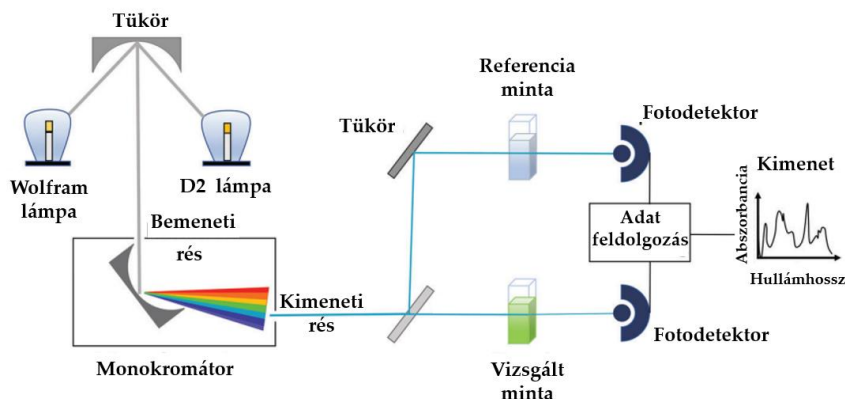


3-2. ábra. HPLC berendezés elvi ábrázolása [46]

Működési elve, hogy a vizsgált mintát egy folyamatosan áramló neutrális oldathoz injektáljuk, és magas nyomáson a vizsgált mintára specifikus szilárd *állófázist* tartalmazó fémoszlopon (*kolonna*) keresztül áramoltatjuk. Az oszlopban a vizsgált mintát alkotó vegyületek és az állófázis között létrejött specifikus kölcsönhatások révén az egyes fázisok szeparálódnak és különböző időben (*retenciós idő*) érkeznek az oszlop után helyezett *detektorba*. A detektor egy kiválasztott hullámhosszon (vagy hullámhossz tartományon) mérhető elnyelődési jel alapján az adott retenciós idővel rendelkező vegyület mennyiségével arányos jelet állít elő [47]. technikát a biokompatibilitási vizsgálatok során (7. fejezet) alkalmaztam.

3.3. UV-Vis spektrofotometria

Az UV-Vis (Ultraibolya-Látható fény) spektrofotometria a kémiában elterjedt gyors analitikai módszer. Egy tipikus UV-Vis berendezést mutat a 3-3. ábra.



3-3. ábra. UV-Vis vizsgálat elvi ábrázolása [48]

A vizsgálat során a fénynek a mintában történő elnyelődését (abszorbanciáját) vagy a minta fényáteresztőképességét (*transzmittanciáját*) mérjük. A vizsgált mintát alkotó vegyületek különböző jellemző hullámhossztartományban nyelik el a *monokromátorban* előállított fényspektrumot [49].

Az adatokat általában egy ismert spektrális válasszal rendelkező referencia mintához hasonlítják és az így kapott eredményeket kiértékelik. A kapott abszorbancia spektrum a mintát felépítő vegyületekre és azok mennyiségére jellemző [48]. Az UV-Vis spektrofotometriát a mikroreaktorból gyűjtött minták összetételének vizsgálata során (9. fejezet), valamint a biokompatibilitási vizsgálatok során (7. fejezet) alkalmaztam.

3.4. 3D nyomtatási technológiák

3D nyomtatással hoztam létre a mikroreaktor kazetták testét (8. fejezet). A 3D nyomtatási technológiák egyik fő előnye, hogy a fizikai (kinyomtatott) modell gyorsan előállítható a digitális modellből. Utóbbi alakja, tűrései, funkciója igény szerint gyorsan változtathatóak, a digitális eszközökkel nehezen feltárható tervezési hibák könnyen kijavíthatóak, a tervezés-fizikai előállítás iterációs ideje gyorsabb, mint az alternatív (pl. forgácsolós) technológiák esetén [50]. Ez az ún. gyors prototípus gyártás (*rapid prototyping*, RP) módszere [51]. Az ISO/ASTM52900-21 szabvány [52] rögzíti a 3D nyomtatási technológiákat. Az akadémiai kutatásokban leggyakrabban használt technológiák közé sorolható a sztereolitográfia (SLA), ömledékrétegzés (FDM), tinta sugaras nyomtatás (IJP), szelektív lézer szinterezés (SLS) [53]. Ezek közül az FDM és

SLA nyomtatási technológia elérhető számomra, így az általuk nyújtotta előnyök és hátrányok alapján választom ki, hogy melyiket fogom használni a későbbiek során. Ezeket az 3. táblázat tartalmazza. Bár az FDM technológiával a termék felületi minősége rosszabb, mégis a gyors termékelőállítás sebesség és könnyű kezelhetőség miatt a tudományos munkám során ezt a technológiát használtam. További lényeges szempont volt az FDM technológia széles anyagválasztéka a megfelelő biokompatibilitást biztosító szerkezeti anyag kiválasztásához (lásd bővebben a 7. fejezetet).

3. táblázat. Az SLA és FDM nyomtatási technológiák rövid leírása. legfontosabb előnyökkel és hátrányokkal

	SLA	FDM
Leírás	UV vagy lézerfény fókuszálásával a folyékony gyanta ágy egy adott mélységében térhálósítás alakul ki, létrehozva egy szilárd réteget [54].	Termoplasztikus polimer filamentet olvadáspontig hevítve a nyomtatási felületre juttatva rétegről rétegre épül fel a munkadarab [55]
Előnyök	Felbontása kiváló ($20\ \mu\text{m}$), pontossága akár $\pm 50\ \mu\text{m}$ is lehet [56]	Alacsony üzemeltetési költség, olcsó és széles anyagválaszték, könnyű alkalmazhatóság [57]
Hátrányok	Drága alapanyag, utótérhálósítás szükséges a maradék gyanta eltávolítására [58]	Komplex geometria támaszanyagot igényel, pontossága limitált ($\pm 127\ \mu\text{m}$) [56]

3.5. Enzimkinetika

Az enzimek (E) olyan, természetben előforduló makromolekulák, melyek katalizátorként működnek, azaz a kémiai reakciókhoz szükséges aktiválási energiájának csökkentésével felerősítik a reakciók sebességét, miközben a reakció lezajlása után maguk nem fogynak el, és változatlan formában újra használhatók [59], [60]. Az enzimek meghatározott számú aktív hellyel rendelkeznek ahová szubsztrátok (S) kötődhetnek és átalakulhatnak termék (P). A reakció kinetikáját az alábbi (1) -es egyenlet írja le [61]:



A kinetikára jellemző k_1 , k_2 , k_3 konstansok értéke egy adott enzim-szubsztrát párra jellemző, és segítségével az enzim katalitikus jellemzésére szolgáló paraméterek számolhatók. Az enzim által végzett reakció az *aktív központban* zajlik, utóbbit tartja és orientálja az enzim protein szerkezete. Egyes esetekben az *aktív központ* önállóan is működőképes (például a CYP450 enzimcsalád metalloporfirin molekulája).

Az enzimek biokatalitikus jellemzésére számos paraméter létezik, melyeket a következőkben fogok ismertetni Decsi és társai [25] munkája alapján.

Szubsztrát konverzió (c , [%])

$$c = \left(1 - \frac{n_s}{n_s + n_p} \right) \cdot 100 \text{ [%]} \quad (2)$$

ahol n_s és n_p a szubsztrát és termék moláris tömegei, a reakció során átalakított szubsztrát és termék arányára jellemző. Amennyiben minden szubsztrát átalakult, a konverzió 100%.

Biomimetikus aktivitás (U_B , [$U \text{ g}^{-1}$])

$$U_B = \frac{n_{s_0} \cdot c}{t \cdot m_B} [U \text{ g}^{-1}] \quad (3)$$

amely a teljes katalizátor rendszer tömegegységre vonatkoztatott termelékenységét mutatja meg. U a szubsztrát konverzió sebessége [$\mu\text{mol min}^{-1}$], n_{s_0} a szubsztrát kezdeti mennyisége, c a konverzió, t a reakció idő [min], m_B a biomimetikus katalizátor rendszer egészére vonatkozó tömege [g].

Specifikus aktivitás (U_P , [$U \text{ g}^{-1}$])

$$U_P = \frac{n_{s_0} \cdot c}{t \cdot m_P} \quad (4)$$

a katalizátorra (metaloporfirinre) vonatkozó aktivitás, ahol m_P metalloporfirin tömege a rögzített biomimetikus katalizátorban [g].

3.6. Enzimkinetika mikroreaktorban

Az alábbi paraméterrel a mikroreaktorok hatékonyságát tudjuk jellemezni:

Volumetrikus termelékenység (space time yield, STY).

$$STY = \frac{m_p}{V_r \cdot t} [mg \cdot l^{-1} \cdot h] \quad (5)$$

a reaktor térfogatában időegység alatt létrehozott termék mennyisége, ahol m_p a termékek tömege, V_r a reaktor térfogata.

4. Kutatási előzmények összefoglalása

A következőkben a kutatócsoport korábbi eredményeit foglalom össze. A saját munkám ezekre a már meglévő eredményekre épült, de egyes esetekben szükséges volt a publikált módszertan alapján a kísérletek megismétlése. A metalloporfirin, mint biomimetikus modell alkalmazhatóságának kérdése már a 2000-es évek óta kutatott terület [62]. A kutatócsoport elsődleges célja nanohordozó rendszerek alkalmazásával megvalósított, metalloporfirin alapú metabolit szűrő modell kidolgozása volt.

4.1. Metalloporfirin rögzítése mágneses nanorészecskére

Az olcsó és könnyen előállítható szintetikus metalloporfirinek (MP) legnagyobb hátránya, hogy homogén oxidációs körülmények között könnyen lebomlanak (autooxidálódnak), ami rövid élettartamot eredményez. Ismert, hogy az MP kirögzítése (immobilizációja) szilárd hordozóra megnöveli a molekula élettartamát [63]. A kutatócsoport bebizonyította, hogy a szintetikus metalloporfirinek (a kísérletben FeTPFP^1 és FeTPPS^2) - melyeket felületükön amino csoportokkal funkcionalizált mágneses nanorészecskékre (magnetic nanoparticles, MNP) rögzítettek, képesek magasabb aktivitású biomimetikus oxidációra (MNP-NH-FeTPFP esetén az $U_p = 223,8 \text{ U g}^{-1}$), mint azok a metalloporfirinek, amelyek nem voltak rögzítve hordozóanyagra (homogén FeTPPS esetén $U_p = 132,7 \text{ U g}^{-1}$). A metabolizmus viszont függ a használt metalloporfirintől, a rögzítés módjától, valamint a vizsgálati módszertől ugyanis az FeTPPS esetén kisebb aktivitást tapasztaltak a rögzített esetben ($U_p = 80,8 \text{ U g}^{-1}$) mint a szabad FeTPPS esetén ($U_p = 153,6 \text{ U g}^{-1}$) [25]. Egy másik kísérlet során ezt a két metalloporfirint rögzítették olyan funkcionizált MNP-re, melyek felületükön két funkciós csoporttal lettek ellátva (aminopropil-metil csoportokkal). A kísérletük során bizonyítást nyert, hogy a két funkciós csoporttal ellátott MNP-k eredményesebb hordozónak bizonyultak, mint az egy funkciós csoporttal rendelkezők (az 1:0 és 1:4 aminopropil:metil arányú FeTPFP U_p értékre rendre kb. 90 U g^{-1} -ről kb. 320 U g^{-1} -ra emelkedett). FeTPPS rendszer esetén (MNP-FeTPPS) sokkal magasabb biokatalitikus aktivitással bírt (1:4 aminopropil:metil esetén $U_p = 960 \text{ U g}^{-1}$), így a további kísérleti munkák során ezzel dolgoztak tovább [64].

¹ 5,10,15,20-tetrakis(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)iron(II) porphyrin

² 5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatophenyl)iron(II) porphyrin

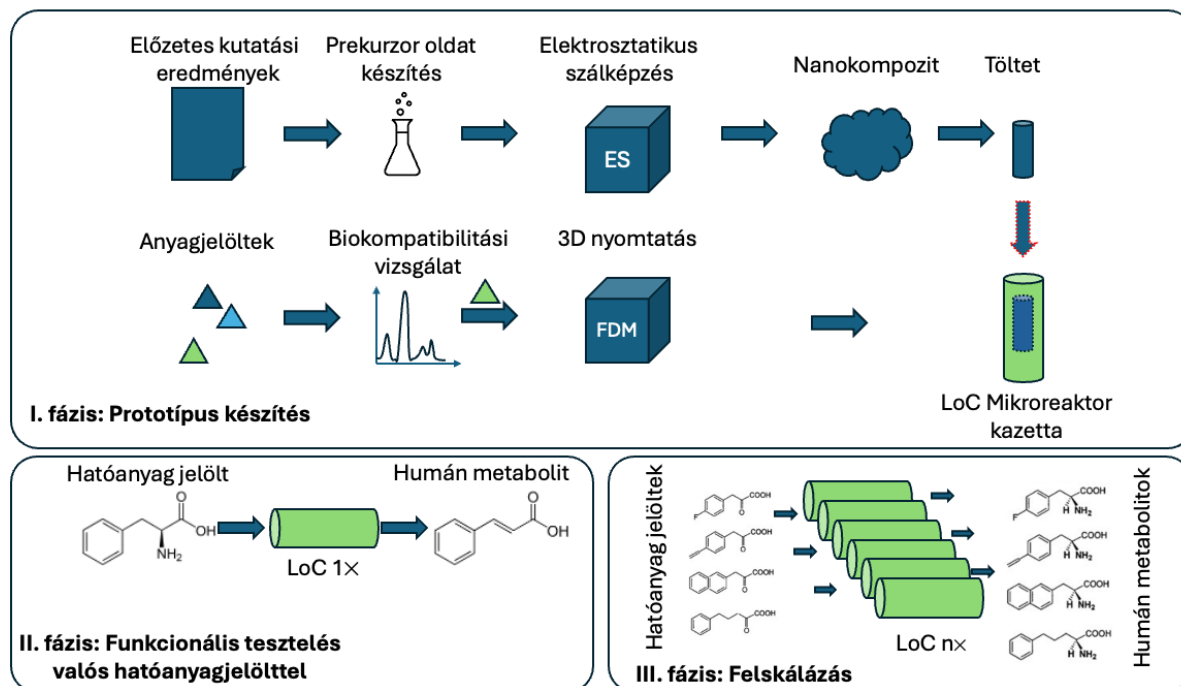
4.2. Liver-on-a-Chip mágneses nanorészecske alapú mikroreaktor

A kutatócsoport további kísérletei során egy PDMS alapú mikrofluidikai reaktort (MagneChip, Spinsplit Llc., Budapest) használt, hogy vizsgálja az MNP-re rögzített metalloporfirineket folytonos áramlási körülmények között. Mindhárom esetben a mikroreaktor volumetrikus produktivitása kimagasló volt (MNP-FeTPFP és MNP-FeTPPS esetén az STY értéke rendre $25,3$ és $25,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a szakaszos, kémcsőben végzett reakciókhoz képest (MNP-FeTPPF, MNP-FeTPPS az STY értéke rendre $0,31$ és $2,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), viszont a biokatalitikus aktivitás nem volt kiemelkedő. [25], [64]. A MagneChip rendszer alacsony biokatalitikus aktivitására vonatkozóan a kutatócsoport korábban bizonyította [65], hogy az MNP-k közötti átlagos távolság olyan alacsony, hogy gátolhatja az analit molekulák hozzáférését a reakcióelegyhez, ezáltal csökkentve a biomimetikus oxidációt.

4.3. Hordozórendszer előállítás nanorészecske-nanoszál kompozittal

Az MNP-k közötti átlagos távolság növelésére merült fel a nanoszálás kompozit rendszer létrehozásának gondolata. A nanoszálás kompozit alapját politejsav (PLA) szálak alkotják, amelyek magukba foglalják az MNP-FeTPPS biokatalizátort. A nanoszálás szövedék mikroszerkezetéből illetve az MNP koncentrációból adódóan az átlagos MNP-MNP távolság megnő a MagneChip rendszerben felvett morfológiához (gyakorlatilag egymáshoz érő részecskék) képest. A nanoszálás kompozitot elektrosztatikus szálképzés technológiájával állították elő (Spincube, Spinsplit Llc, Budapest). Több különböző koncentrációjú MNP-FeTPPS -t tartalmazó mintát is készítettek, melyek közül az $1.25 \text{ w/w\%}$ -os összetétel bizonyult optimálisnak. Az elkészült minták specifikus biomimetikus aktivitását is meghatározták, ami kimagasló volt ($U_p = 80\,363 \text{ U g}^{-1}$) a natív FeTPPS ($U_p = 812 \text{ U g}^{-1}$) valamint az MNP-FeTPPS-hez képest ($U_p = 542 \text{ U g}^{-1}$) [36].

5. Kutatási terv



5-1. ábra. A kutatási terv összefoglalása

Kutatási tervemet a 5-1. ábra foglalja össze. A kutatási folyamat három fázisra különül el:

1. fázis: Prototípus készítés: a Liver-on-a-Chip (LoC) eszköz elkészítése a nanokompozit töltet és a mikroreaktor kazetta integrációjával,
2. fázis: a LoC eszköz tesztelése valós hatóanyag jelölttel, sikeres teszt esetén a humán metabolit azonosítása a kimeneti oldalon,
3. fázis: a mikroreaktor kazetta több példányának együttes használata több hatóanyag párhuzamos teszteléséhez.

TDK munkámban az 1. és 2. fázis teljesítését tűztem ki célul.

Az 1. fázis során a nanokompozit előállítását a kutatócsoport korábbi munkáin alapul, a már publikált kísérleti leírás reprodukálásával (lásd bővebben: 6. fejezet). Ennek a folyamatnak az első lépése az FeTPPS-MNP-t tartalmazó PLA prekurzor oldat, majd ebből a nanoszál szövedék előállítása elektrosztatikus szálképzéssel. A nanoszál szövedékből a mikroreaktor kazettába helyezhető töltetet kell készíteni.

A mikroreaktor kazetta előállításához olyan, 3D nyomtatásra alkalmas alapanyagot kell választani, amivel a II. fázisban tervezett reakció komponensei nem lépnek reakcióba. Az

ehhez kapcsolódó biokompatibilitási vizsgálat leírása a 7. fejezetben található. A mikroreaktor kazetta tervezésével és elkészítésével foglalkozik a 8. fejezet.

A III. fázis reprezentálja a kutatás ipari relevanciáját. Az ipari gyakorlatban használt hepatocita, mikroszóma és rekombináns enzim modellek áteresztő képessége ebben a sorrendben nő, míg az *in-vivo* – *in-vitro* egyezés folyamatosan csökken. Mivel a hatóanyag jelöltek szűrése továbbra is a fejlesztési folyamat legszűkebb keresztmetszete (lásd Problémafelvetés, 2.2. fejezet), valós ipari igény jelentkezik robosztus, egyszerűen használható, olcsó és könnyen skálázható hatóanyag szűrési módszerek iránt. A tervezett rendszerről elmondható:

1. a biomimetikus katalízis alapja szintetikus metalloporfirin, olcsó, könnyen hozzáférhető molekula, egyszerű reakcióval használható
2. a metalloporfirin stabilitását növelni kell, melyre az ismertett nanokompozit rendszer bizonyítottan megfelelő
3. A nanokompozit töltetű mikroreaktor kazetta több példánya megfelelő folyadékkezelő rendszerbe ágyazható és működésük párhuzamosítható. További vizsgálatot igényel azonban a mikroreaktor újrahasználhatósága és a párhuzamosítás párhuzamos folyadékgainak gyakorlati felső korlátja.

A fentiek alapján tehát a biomimetikus elvű Liver-on-a-Chip eszköz az ipar aktuális, de még nem megoldott igényének kielégítését célozza.

Ugyanakkor a konstrukció újszerű, a metalloporfirint gyógyszerhatóanyag szűrés céljából alkalmazó mikrofluidikai rendszert más kutatócsoport még nem publikált, ezen belül a nanoszálal szövetéket tartalmazó mikroreaktor konstrukciója először ebben a dolgozatban kerül publikálásra.

6. Nanokompozit előállítása elektrosztatikus szálképzéssel

6.1. Kísérletterv és felhasznált anyagok

Prekurzor oldat előállítása - A szálképzés során felhasznált prekursor oldat összetételét és a szálképzés előállítási paramétereit Balogh-Weiser és társai [36] munkája alapján választottam meg.

Politejsavat (PLA 230 kDa) 8 w%-ban oldottam fel diklórmétán (DCM) valamint N,N-dimetilformamid (DMF) (DCM:DMF, V/V, 6:1) elegyében egy 10 ml-es üvegcsében, majd szobahőmérsékleten mágneses keverőasztalon szobahőmérsékleten 450 RPM értéken folyamatosan kevertettem addig, ameddig a PLA teljesen fel nem oldódott. Ezt követően MNP-ket illetve, funkcionalizált (FeTPPS-el ellátott) MNP-ket adalékoltam a PLA oldathoz és képeztem belőlük nanoszálakat. A kutatócsoport eredményei alapján az 1,25 w/w%-os szárazanyag tartalmú nanokompozit mutatta a legnagyobb biomimetikus aktivitást, így én egyből emellett az adagolás mellett döntöttem (1,25 w/w% MNP valamint MNP-FeTPPS a kész PLA/MNP illetve PLA/MNP-FeTPPS nanokompozitban). Az MNP-ket 400 μ L DCM:DMF (V/V, 6:1) szuszpendáltam majd az oldatokat 10 percen át szonikáltattam, miután összekeverve a PLA polimer oldattal még egy percen át vortexeltem a kész prekursor oldatot.

Elektrosztatikus szálképzés - A nanoszálak kompozit (PLA/MNP-FeTPPS) előállításához egy horizontális elrendezésű elektrosztatikus szálképző berendezést használtam (Spincube, Spinsplit Llc, Budapest Hungary), 18 μ l min⁻¹ -es adagolási sebességgel, 19-21 kV gyorsítófeszültség értékekkel egy 1,2 mm (22 G) átmérőjű kapillárisal. A prekursor oldatokat egy 3 ml -es fecskendőbe helyeztem. Az emitter és kollektor lemez között lévő távolság 15 cm volt. A szálképzés szobahőmérsékleten történt 40-60 % relatív páratartalom mellett. A sík kollektor lemezre először egy alumínium fóliát rögzítettem, majd keresztirányban 6 db 180 x 10 mm méretű üvegszál hordozót helyeztem fel egymás alá, és erre képeztem a szálakat. Az üvegszál hordozófelületek használatával a szálak szövődék mikroreaktorba elhelyezendő inzeret köré könnyebben feltekercselhető. A kollektor tömegét a szálképzés előtt és azt követően precíziós labormérlegen megmértem. Erre azért volt szükség, hogy a mikroreaktorba kerülő szálak

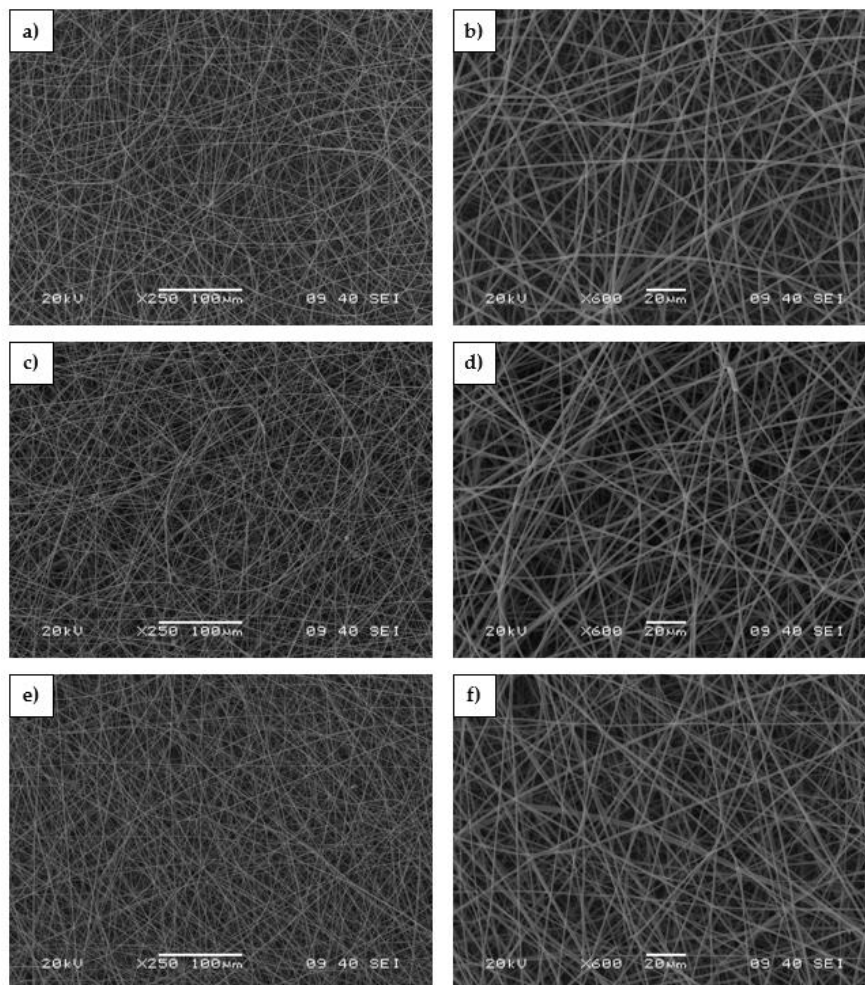
termék tömegét meg tudjam határozni. valamint könnyebben fel tudjam tekercselni egy a mikroreaktorba elhelyezendő inzert köré.

A biomimetikus aktivitás meghatározása - A nanoszálás kompozit (PLA/MNP-FeTPPS) biomimetikus aktivitását az MNP-re rögzített FeTPPS biztosítja. Így mind a biofunkcionalizált MNP-k, mind pedig a nanoszálás kompozitok aktivitását megvizsgáltam szakaszos (batch) reakciókban. Ehhez a mérés során a mintákból 5 mg -ot használtam fel melyeket $1,5\text{ ml}$ -es Eppendorf csövekben helyeztem el, $335\text{ }\mu\text{l}$ amlodipin tartalmú metanol:acetát buffer oldatban ($2,5\text{ mg ml}^{-1}$, MeOH:Acetát 4:1 V/V; $\text{pH} = 4,5$; 64 mM) amelyhez $665\text{ }\mu\text{l}$ MeOH:Acetát buffert adagoltam. Ezeket $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 900 RPM -en 30 percen át rázattam. Az elegyekhez $1\text{ }\mu\text{l}$ *tert*-butil-hidroperoxidot (tBuOOH) oxidálószerként adagoltam amellyel elindítottam a reakciót, majd ismét rázattam $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 1200 RPM -en 10 percen át. Ezután egy, az UV-Vis spektrometria mérésnél használt mikropate-re $25\text{ }\mu\text{l}$ oldatot mértem be az Eppendorf csövekből valamint $95\text{ }\mu\text{l}$ MeOH:Acetátot. Az oldatokat UV-Vis spektrofotometriával vizsgáltuk $250\text{-}600\text{ nm}$ -es tartományon. A biomimetikus aktivitás vizsgálat akkor tekinthető eredményesnek, ha a funkcionizált MNP jelenlétében az amlodipin törzsoldat biomimetikus oxidációja teljes mértékben végbemegy 100% -os konverzió mellett. Ezt úgy lehet ellenőrizni, hogy az UV-Vis spektrofotometria kapott spektrumokon az amlodipinre jellemző intenzitás csúcs eltűnik, ami teljes konverzióra enged következtetni. Ha ez a jelenség megfigyelhető, akkor felhasználható a funkcionizált MNP a nanoszálás kompozitok elkészítésére, melyeknek szintűgy mértük az aktivitását a már bemutatott módszer segítségével hasonló eredményeket várva. Feltehetőleg a konverzió értéke kisebb mértékű lesz a nanoszálás kompozit esetén, hiszen a funkciós csoportok egy része a szálakba lesz csapdázva.

6.2. Szálképzési eredmények bemutatása

Szálmorfológia vizsgálata - Az elkészült nanoszálás kompozitokról (PLA/MNP-FeTPPS) pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készültek annak érdekében, hogy megvizsgáljam a termék minőségét és jellemezzem a nanoszálás kompozitot. Ehhez a $600\times$ nagyítású SEM mikroszkópi felvételek alapján az *ImageJ* program segítségével átlagos szálátmérőt és azok szórását határoztam meg $100\text{-}100$ különálló szál megmérésével. Ezt megtettem a csak PLA tartalmú, csak MNP-t, valamint a funkcionizált MNP-eket tartalmazó minták esetében is. A mikroszkópi felvételeket az 6-1. ábra mutatja, az átlagos szálátmérő értékeket pedig a 4. táblázat. A szálátmérők

relatív szórása megegyezik a kutatócsoport korábbi eredményeivel, így ezt elfogadhatónak tekintették.



6-1. ábra. SEM mikroszkópi feltételek PLA esetén 250x (a) és 600x (b) nagyításban, PLA/MNP esetén 250x (c) és 600x (d) nagyításban, PLA/MNP-FeTPPS esetén 250x (e) és 600x (f) nagyításban,

4. táblázat. PLA, PLA/MNP és PLA/MNP-FeTPPS átlagos szálátmérője és azok szórása

Minta összetétele	Átlagos szálátmérő, $d_{\text{átl}}$ [μm]	Szórás, σ [μm]
PLA	1,62	0,30
PLA/MNP	1,53	0,29
PLA/MNP - FeTPPS	1,53	0,30

A biomimetikus aktivitás vizsgálat eredményeit a 5. táblázat foglalja össze. Mint látható az MNP-FeTPPS biokatalizátor közel teljes, 98 %-os konverziót mutatott (már 10 perc után), míg a PLA/MNP-FeTPPS esetén ehhez képest alacsonyabb, 17% volt az átalakítás mértéke, ami nagyságrendileg egyezik a kutatócsoport korábbi mérésével (24.8 %) [36].

Az eredmények értelmezéséhez érdemes megvizsgálni a két készítmény biomimetikus és specifikus biomimetikus aktivitását is ((4). egyenlet), tekintve, hogy a nanoszálak kompozit FeTPPS tömegaránya jóval kisebb (1,25 w/w%), mint az MNP-FeTPPS esetében (100 w/w%).

5. táblázat. A vizsgált minták konverzió, biomimetikus és specifikus biomimetikus aktivitás értékei

Jellemző	A-MNP-FeTPPS	B- PLA/MNP-FeTPPS	A/B arány
Mintamennyiség [mg]	5	5	1
FeTPPS mennyiség [mg]	0,02087	0,0002609	80
Konverzió c [%]	97,83	17,48	5,6
Biomimetikus aktivitás U_B [$U\ g^{-1}$]	150,95	866,29	0,173
Spec. biomim. aktivitás U_P [$U\ g^{-1}$]	36 158,54	5 533 603,5	0,6%

6.3. Konklúzió

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy sikeresen reprodukáltam a nanoszálak kompozitot, megfelelő morfológiával. Látható, hogy a nanokompozit minta rendelkezik biomimetikus aktivitással, és mind a biomimetikus aktivitása (5,6-szoros növekedés), mind a specifikus biomimetikus aktivitása jelentősen magasabb az MNP-FeTPPS készítményénél (utóbbi csupán a nanokompozit 0,6%-a), tehát a kutatócsoport korábbi eredményeivel összhangban adott katalizátor molekula több átalakítást végez időegység alatt. Ezek alapján a mintát alkalmasnak találtuk további tesztelésre folyamatos áramlásos körülmények között, mikroreaktorban.

7. Biokompatibilitási vizsgálatok

7.1. Célkitűzés

A biokompatibilitás vizsgálat célja az volt, hogy a rendelkezésemre álló 3D nyomtatási alapanyagokból kiválasszam azt, amely nem reagál, azaz inerten viselkedik azokkal a reagenssekkel, amik a Liver-on-a-Chip eszköz első tesztelése során használni terveztük, mint például az amlodipin gyógyszerhatóanyag molekula, a MeOH:Acetát puffer, *t*BuOOH oxidálószer, valamint az FeTPPS katalizátor.

7.2. Kísérletterv és felhasznált anyagok

A mikroreaktor éles tesztelése során az alábbi anyagokkal érintkezik a reaktortest:

- gyógyszerhatóanyag molekulával,
- MeOH:Acetát bufferrel
- *t*BuOOH oxidálószerrel
- FeTPPS katalizátorral

A rendelkezésre álló 3D nyomtatásban használt polimereket vizsgáltuk meg biokompatibilitás szempontjából:

- ABS (Akrilnitril-butadién-sztirol)
- ASA (Akrilnitril-sztirol-akrilészter)
- CPE-HG 100 (PET / Kopoliészter alapú filament)
- PLA (politejsav)
- Vezetőképes polimer
- SLA nyomtatáshoz használt általános gyanta
- PP (polipropilén)

A mérések során a már korábban bemutatott UV-Vis spektroszkópia és a HPLC-UV-MS analitikai technikákat használtam fel arra, hogy a fenti anyagok és a kiválasztott 3D nyomtatási polimer alapanyagok biokompatibilitását megvizsgáljam.

7.3. Az FeTPPS-polimer kapcsolat és kiloldódás vizsgálata

A polimerek és az FeTPPS között fellépő esetleges kötődést és a felhasznált oldószerek polimerekre gyakorolt hatását UV-Vis spektrofotometriával vizsgáltuk.

Kísérleti leírás: Az UV-Vis mérés során a kísérleteimet 1,5 ml térfogatú csavaros üvegcsékben végeztem és a reakcióelegyek össztérfogata minden esetben 0,5 ml volt. A reakcióelegyek összetétele az alábbiak szerint változott:

- *Referencia minta:* A referencia minták 486 μ l metanolt és 14 μ l FeTPPS-t (0,735 mM, metanolban oldva) tartalmaztak.
- *Vizsgálati minták:* A vizsgált minták 486 μ l metanolt és 14 μ l FeTPPS-t (0,735 mM, metanolban oldva), valamint a polimer mintákat is tartalmaztak. Az egyes polimer filamentekből 10 mg lett bemérve, az SLA gyanta mintából 30-40 mg.

A reakcióelegyeket 72 órán keresztül 37 °C-on, 1100 RPM sebességgel rázattuk (Eppendorf Thermomixer Comfort rázó gép (Eppendorf GmbH., Hamburg, Németország). Egy óra, majd 72 óra folyamatos rázás után mintát vettem a reakcióelegyekből és UV-Vis spektrumot 200 nm és 700 nm közötti hullámhossztartományon vettem fel (Multiskan SkyHigh mérőtálca spektrofotométer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A méréseket 3 párhuzamos mintán ismételtük meg.

Kiválasztási kritérium: Ideális esetben a vizsgált polimer és az FeTPPS nem lép kapcsolatba, tehát a 72 óra után felvett UV-Vis spektrum nem, vagy elhanyagolható mértékben tér el a referencia mintától, tehát az FeTPPS-re jellemző intenzitás csúcs 400 [nm] -en ugyanolyan magasságú a polimer minta jelenlétében, mint a vak FeTPPS minták esetében, illetve nem jelenik meg új intenzitás csúcsérték (pl. anyag kioldódás miatt).

7.4. A biomimetikus oxidáció reakciókinetikájának vizsgálata

Az amlodipint tartalmazó anyavegyület oxidatív átalakulását vizsgáltuk a polimer mentes referencia reakcióhoz viszonyítva HPLC-UV-MS módszerrel.

Kísérleti leírás: Hasonlóan a 7.3-as fejezethez végeztem el a reakciókat. A reakcióelegyek az alábbi módon változtak:

Referencia minta: A referencia minták 490 μ l metanolt és 10 μ l 10 mM -os gyógyszer törzsoldatot tartalmaztak. Ez alapján számolható a konverzió.

Vak minta: A vak minták 384 μ l metanolt, 10 μ l 10 mM -os gyógyszer törzsoldatot, 6 μ l tBuOOH törzsoldatot (147 mM) és 100 μ l 4,5-ös pH értékű vizes puffer oldatot (64 mM) puffer oldatot tartalmaztak. A vak minta esetén igazoltuk a reakció biomimetikus jellegét.

Vizsgálati minták: A vizsgált minták 370 μ l metanolt, 10 μ l 10 mM -os gyógyszer törzsoldatot, 14 μ l FeTPPS (0,735 mM, metanolban oldva) oldatot, 6 μ l tBuOOH törzsoldatot (147 mM) és 100 μ l 4,5-ös pH értékű vizes puffer oldatot (64 mM) puffer oldatot tartalmaztak.

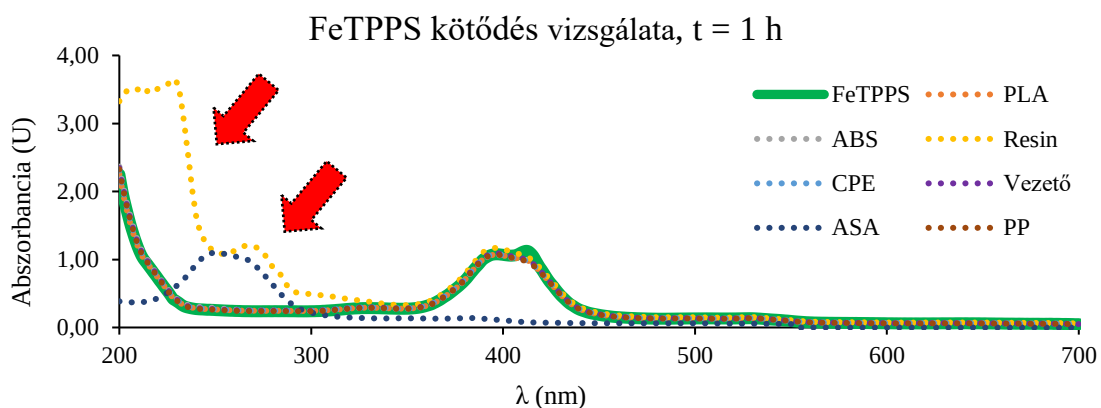
A reakcióelegyet hígítatlanul az alábbi HPLC-UV-MS technikával vizsgáltam. Az analitikai vizsgálatokat Waters 2690 folyadékkromatográfiás rendszerhez kapcsolt Waters Micromass Quattro Ultima Pt tandem kvadrupol tömegspektrométerrel (Milford, MA, USA) végeztük. A detektálást Waters 2487 Dual λ Absorbance detektorral végeztük. Az elemzést 40 °C-on végeztük Kinetex XB C18 oszlopon (150x4,6 mm, 2,6 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 1 ml/perc mozgófázis áramlási sebességgel. Az alkalmazott A eluens összetétele 0,1 térfogatszázalék hangyasav vízben oldva, B eluens pedig MeCN:H₂O 95:5 arányú elegye, amihez 0,1 térfogatszázalék hangyasavat adtunk. A gradiens elúciós program: 0 – 11 perces tartományban 5-100% B lineáris gradienst, 11 – 13 perces tartományban 100% B izokratikus szakaszt alkalmaztunk. Ezt egy 2 perces kiegyenlítési periódus követett a következő injektálás előtt 5% B összetétel alkalmazásával. Az injektálási térfogatot 5 μ l-re állítottuk be, és a kromatográfiás profilt 240 ($\pm$ 4) nm hullámhosszon regisztráltuk. A tömegspektrometriás körülmények a következők voltak: ionforrás: ESI, pozitív ionmód, pásztázó ion üzemmód (150 – 600 m/z), szárítógáz (N₂) hőmérséklete 350 °C, áramlási sebessége 5,5 l/perc, porlasztó gáz (N₂) nyomás 6 bar, kvadrupol hőmérséklete 120 °C, kapilláris feszültség 2500 V, fragmentor feszültség 60 V. Az adatok feldolgozása MassLynx 4.0 szoftverrel történt.

Kiválasztási kritérium: Az a polimer tekinthető a legalkalmasabb a mikroreaktor kazetta alapanyagának, amelynél az anyavegyület konverziójának reakció utáni százalékos értéke közel azonos a referencia (polimer nélküli) minta esetében mérthez.

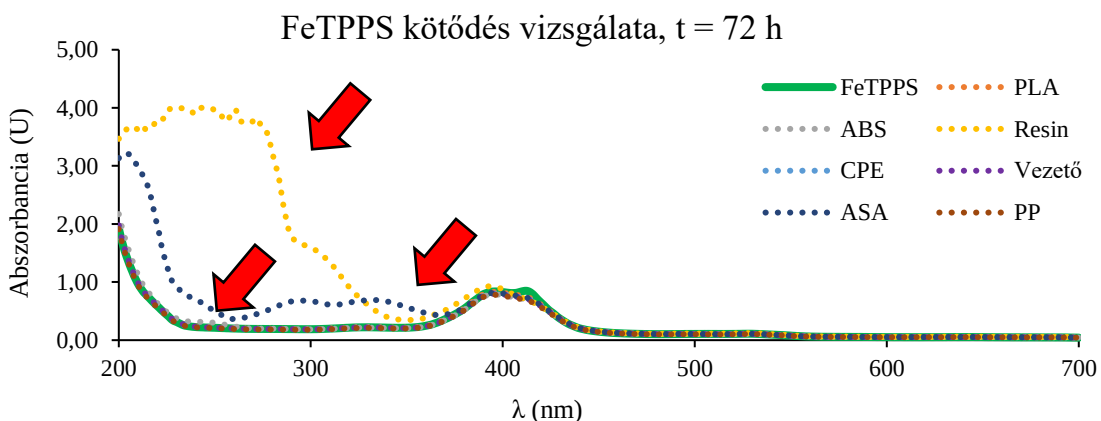
7.5. Biokompatibilitási vizsgálatok eredményei

Először az UV-Vis eredményeket mutatom be hiszen ennek függvényében haladtam tovább a HPLC-UV-MS mérésekkel. Két mérési sorozat készült, az egyik esetben 1 óra a másik esetben 72 óra után vizsgáltuk meg a mintákat. Az eredményül kapott spektrumokat a 7-1. ábra és 7-2. ábra mutatja. Az ideális reaktor anyag jelenlétében a referencia elegy (csak FeTPPS-t tartalmazó oldat) görbéjéhez megegyező görbét kell kapjunk, hiszen ez mutatja azt, hogy a reakcióelegyben lévő polimer nem volt semmilyen befolyással az FeTPPS-re, illetve nem történt a polimerből kioldódás. Megfigyelhető,

hogy a referencia FeTPPS spektrumához képest a PLA, CPE, vezetőképes polimer és PP nem, vagy csak a természetes szórás mértékében tér el, így az semmilyen befolyással nem volt az FeTPPS-re, illetve nem történt belőle kioldódás a reakcióelegybe. Ugyanez nem mondható el az SLA gyanta és ASA esetében, hiszen ott egyrészt az FeTPPS-re jellemző csúcs ($\lambda = 393 \text{ nm}$) intenzitása is megváltozott, ami az FeTPPS mennyiségének csökkenését jelentette, másrészt megjelentek új az inert mintánál nem megfigyelhető csúcsok, amelyek valamilyen új korábban nem jelenlévő anyagra utalnak, ez pedig feltehetően attól van, hogy a reakcióelegybe kioldódás történt az adott anyagokból. Az ABS esetében *1 óra* után még megfelelőnek bizonyult a minta, viszont *72 óra* után kioldódásra utaló csúcs jelent meg (kb. $\lambda = 251 \text{ nm}$ hullámhossznál). A kioldódásra utaló jeleket az ábrákon lévő piros nyilakkal jelöltem.



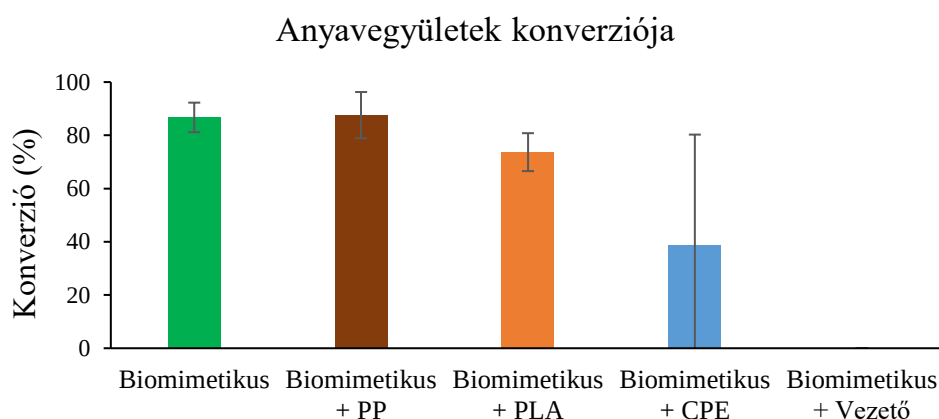
7-1. ábra. UV-Vis vizsgálat eredményei $t = 1 \text{ h}$ után, referencia spektrum: FeTPPS



7-2. ábra. UV-Vis vizsgálat eredményei $t = 72 \text{ h}$ után, referencia spektrum: FeTPPS

Az UV-Vis előszűrés alapján megfelelőnek ítélt négy polimer (PLA, CPA, vezető, PP) esetén a biomimetikus oxidáció lezajlását vizsgáltuk a referencia esethez (polimer nélküli) viszonyítva, HPLC-UV-MS módszerrel. A mérések eredményét a 7-3. ábra

mutatja, melyen ábrázoltam az anyavegyület konverziójának értékét a referencia biomimetikus és az egyes polimerek jelenlétében végbement biomimetikus reakciók esetében. A szórások értékét $n = 3$ mérésből számoltam ki. Megfigyelhető, hogy a konverzió értéke a referencia reakcióhoz képest („Biomimetikus”, 86,72%) a PP jelenlétében kis mértékben megnőtt (87,58%), tehát kedvezően hatott a biomimetikus oxidáció folyamatára. A vezető polimer ezzel szemben teljesen gátolja a reakciót (0%), illetve a CPE esetében szintén jelentős gátlást láthatunk (38,61%). A PLA esetében az anyavegyület konverziója (73,67 %) hasonló a PP esethez, de feltehetően a PLA kis mértékben katalizálja az oxidálószer bomlását vagy adszorbeálja a felületén.



7-3. ábra. HPLC mérések eredményei az UV-Vis méréseken megfelelt polimerek esetén

7.6. Konklúzió

Az FeTPPS-polimer interakció vizsgálat során az ABS, ASA és SLA gyanta anyagokat az FeTPPS-re nézve nem találtuk biokompatibilisnek, míg a PLA, vezetőképes polimer, CPE és PP anyagok esetén elhanyagolható mértékű reakciót tapasztaltunk. Utóbbi anyagok jelenlétében megvizsgáltuk a biomimetikus oxidációs reakciót. A vizsgálatok során úgy találtuk, hogy a PP és PLA anyagok elhanyagolhatóan kis mértékben befolyásolják a reakciókinetikát. Mivel a PLA sokkal univerzálisabban használható anyag a 3D nyomtatás során a PP-hez képest, a további kísérleteket ezzel az anyaggal végeztük, fenntartva, hogy egy végleges konstrukciót érdemes PP alapon (is) megvalósítani. Továbbá a PLA a későbbiekben használt amlodipin gyógyszerhatóanyag molekulával nem lép reakcióba, és nem akadályozza a biomimetikus oxidációt.

8. Mikroreaktor kazetta előállítása

8.1. Műszaki specifikáció

A mikroreaktor kazetta kialakítása során az alábbi műszaki specifikációt vettem alapul melyeket az alábbi 6. táblázat tartalmaz:

6. táblázat. Amikroreaktor kazetta műszaki specifikációi

Paraméter	Érték
Alapanyag	PLA (politejsav)
Nyomtatási technológia	FDM
Nanoszálas kompozit mennyisége	10 mg
Geometriai kialakítás	Hengerszimmetrikus
Csatlakozók (ki és bemenet)	¼-28 UNF (ANSI B1.1)
Újrahasználhatóság	A nanoszálás kompozit cserélhető

A mikroreaktor kazetta alapanyagát a biokompatibilitási vizsgálatok alapján választottam ki, amely FDM technológiával könnyen megmunkálható. A nanoszálás kompozit termék mennyiségére vonatkozóan meghatároztam a kutatócsoport korábbi munkájában [64] a PDMS alapú MagneChip mikrofluidikai reaktorba MNP formájában csapdázott katalizátor mennyiségét. A kísérlet során a MagneChip reaktor kamráiban összesen 1,2 mg MNP-FeTPPS katalizátort helyeztek el. Mivel az MNP-FeTPPS a teljes nanoszálás kompozit termék 1,25w% -a így az alábbi (6) -os egyenlet alapján kiszámolható a nanoszálás kompozitban lévő PLA tömege.

$$\frac{m_{MNP-FeTPPS}}{m_{MNP-FeTPPS} + m_{PLA}} = 1,25\% \quad (6)$$

ahol az $m_{MNP-FeTPPS}$ a funkcionális MNP tömege a nanoszálás kompozitban mg -ban, az m_{PLA} a PLA tömege a nanoszálás kompozitban mg -ban.

A nanoszálás kompozitban lévő PLA tömege ez alapján 94,8 mg melyhez hozzáadva a szükséges 1,2 mg MNP-FeTPPS-t adódik, hogy összesen 96 mg nanoszálás kompozit kellene, ahhoz hogy a megfelelő mennyiségű katalizátort biztosítani tudjam.

Ekkora tömegű nanoszálás kompozit elhelyezése a mikroreaktorban praktikusán nem lehetséges. A kutatócsoport korábban bizonyította [36], hogy 10 mg nanokompozit használatával, batch körülmények között megfelelően mérhető reakció megy végbe. A

korábbi méréseink alapján (6.2. fejezet) jelentős biokatalitikus aktivitás növekményt várunk a nanokompozit rendszer esetén (*151 U/g* vs. *866 U/g*). Ez alapján *16.6 mg* töltetmennyiség adna azonos jelet, de a csoport korábbi munkájával történő közvetlen összevethetőség miatt a töltetmennyiséget *10 mg*-ban határoztuk meg, tehát ennyi nanokompozitot kell a mikroreaktor reakciókamrájában elhelyezendő inzert köré tekercselni.

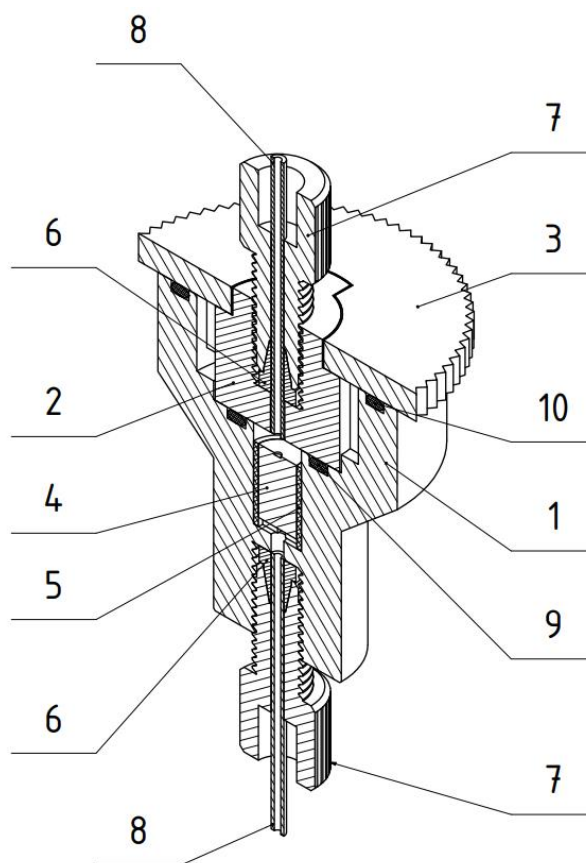
Ekkora mennyiségű nanoszál töltet nehezen helyezhető el klasszikus PDMS alapú mikrofluidikai megoldások esetén, illetve a kutatócsoport korábban hiába próbálkozott korábban a plazmabondoláson alapuló PDMS-nanoszál-üveg heterostruktúrák létrehozásával. Ezek alapján a PDMS alapú konstrukciókat elvettem, és 3D nyomtatott megoldások felé fordultam.

A 3D nyomtatott reaktor nagyobb szabadságot enged a geometriai kivitelezésben is, hiszen nem szükséges planár struktúrákra szorítkozni. A megvalósítás során szempont volt, hogy a reaktor a labortechnikában használt szabványos $\frac{1}{4}$ -28-as UNF fluidikai csatlakozókkal kompatibilis legyen, így hengersizmetrikus kialakítás mellett döntöttem. A mikroreaktor így három elemből tevődik össze: 1) reaktortest, 2) cserélhető, nanokompozittal borított inzert, 3) fedőkupak, oldható kötéssel.

8.2. Mikroreaktor kazetta tervezése

A következőkben részletesen bemutatom az alap koncepciót és az iterációkat, amelyeken keresztül eljutottam a jelenleg használt verzióhoz. A 8-1. ábra az egyes alkatrészeket és komponenseket számozva jelöltem. A már korábban említett hengersizmetrikus kialakítást választottam és terveztem meg a mikroreaktort. A szerelhetőséget szem előtt tartva három részből áll a szerkezet. A kivehető inzert mellett a reaktortest két elemből áll, melyek oldható bajonett záras kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A kapcsolódó homlokfelületek közé O-gyűrűs tömítést terveztem be. Az egyik *22.1 x 1.6 mm* méretű O-gyűrű (10) a fenti csatlakozó felületek között helyezkedik el, a másik *8 x 2 mm méretű* O-gyűrű (9) a reaktor belsejében helyezkedik el. Mindkét alapanyaga nitril-butadién gumui (NBR). A mikroreaktor kupak része tartalmazza az egyik szabványos $\frac{1}{4}$ -28-as UNF menetes kialakítást ahová a korábban említett mikrofluidikai csatlakozó (7) szerelhető a benne átvezetett *1/16"* külső átmérőjű teflon csővel (8), melyet egy ferrule-on (6) halad át. Hasonlóan, a mikroreaktor test (1) része is tartalmaz ugyanilyen kialakítást ugyanerre a célra. A tömítéseket behelyezve a mikroreaktor kupak (2) nem

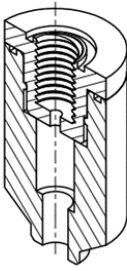
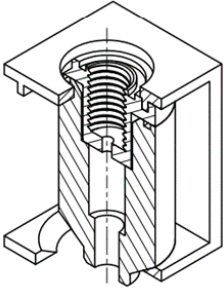
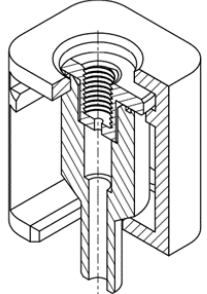
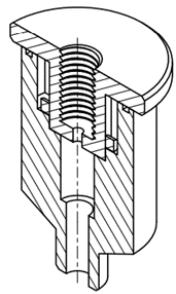
forgatható el, egy applikátor (3) segítségével azonban tengely irányú összenyomás után elforgatható lesz és a bajonett pályán 90° -ot forgatva rögzíthető miközben az O-gyűrűk a tömítő homlokfelületnek simulnak. Az említett applikátor recézést tartalmaz a kényelmes és stabil fogás érdekében. Még összeszerelés előtt azonban a nanoszálas kompozittal (5) bevont inzeret (4) be kell helyezni a mikroreaktor testben kialakított reakciókamrába, ez egyszerű laborban használatos csipesszel történik. A reakcióelegy a mikrofluidikai csatlakozón keresztül érkezik a mikroreaktorba, majd átnedvesítve a nanoszálas kompozitot a kiömlő nyíláson át a mikrofluidikai csatlakozón keresztül távozik, majd a minta begyűjtésre kerül. Az inzeret felett rést hagytam, hogy ne legyen jelentős fojtás a rendszerben, az inzeret alja pedig keresztirányú kiömlő csatornákat tartalmaz, ahol a reakcióelegy távozhat a rendszerből.



8-1. ábra. A tervezett mikroreaktor kazetta konstrukció LOCV5

A korábbi mikroreaktor kazetta változatokat az alábbi 7. táblázat foglalja össze amiben az egyes konstrukciókat kód névvel láttam el illetve egy általános leírást adtam róluk.

7. táblázat. Korábbi mikroreaktor konstrukciók és azok jellemzése

LOCV1	LOCV2	LOCV3	LOCV4
			
Bajonett záras megoldás, a bajonett pálya a mikroreaktor kupakba tervezve. Két tömítés, a menetes részen és az alkatrészek csatlakozó felületén. Szabad kiömlés a mikroreaktor test alján.	A két elem hornyokon keresztül csúszik egymásba, a tengely irányú elmozdulást egy tartóelem akadályozza meg. Két tömítés, a menetes részen és az alkatrészek csatlakozó felületén. Szabad kiömlés a mikroreaktor test alján.	A két elem hornyokon keresztül csúszik egymásba, a tengely irányú elmozdulást egy átalakított tartóelem akadályozza meg. Mikroreaktor kupakon gallér található, a szerelhetőség miatt. Egy tömítés található az alkatrészek csatlakozó felületén. Szabad kiömlés a mikroreaktor test alján.	Bajonett záras megoldás, a bajonett pálya a mikroreaktor testbe tervezve. Mikroreaktor kupakon gallér található, a szerelhetőség miatt. Egy tömítés található az alkatrészek csatlakozó felületén. Szabad kiömlés a mikroreaktor test alján.

8.3. Megvalósítási eredmények és tapasztalatok

A következőkben részletesen ismertetem az egyes megvalósított konstrukciókkal kapcsolatos tapasztalataimat, valamint azokat a lépéseket, amelyek a jelenleg használt mikroreaktor konstrukciójához vezetett el.

A LOCV1-es verzió az első elkészített mikroreaktor prototípus. Ebben a kialakításban egy bajonett záras kapcsolatot terveztem a csatlakozó alkatrészek közé. A bajonett pályát a mikroreaktor kupak tartalmazta, a hozzávezetést és rögzítést végző csapokat a mikroreaktor testben helyeztem el. A két alkatrészt egybeeső külső átmérővel terveztem meg. Ezek mindegyike kedvezőtlen volt a szerelhetőség szempontjából, valamint a bajonettkötés nem bizonyult stabilnak.

A LOCV2-es verzióban a bajonettzár helyett a mikroreaktor kupakba négy darab tengelyirányú hornyot, a mikroreaktor testben pedig ezekbe illeszkedő síneket helyeztem

el, így a két alkatrész könnyedén egymásba csúszthatóvá vált. A tengely irányú elmozdulást egy külső tartóelem akadályozta meg, amelybe a mikroreaktor összeszerelt állapotban oldalról az erre a célra kialakított síneken lehetett pozícionálni. A tartóból való elmozdulást a mikrofluidikai csatlakozó akadályozta volna meg. Ezzel a verzióval az volt a probléma, hogy a tartót túl vékony falvastagsággal terveztem meg, így az az egyik szerelés során eltört.

Ebből tanulva készült el a LOCV3-as verziószámú mikroreaktor amely több változtatást is tartalmaz. Az egyik ilyen, hogy a könnyebb szerelhetőség érdekében a mikroreaktor kupak külső átmérőjét szélesebbre terveztem, így azt könnyebb volt eltávolítani a mikroreaktor testből. Az előző két verzióban található O-gyűrűs tömítések közül elhagytam azt, amely a mikrofluidikai csatlakozó és a mikroreaktor kupak között volt megtalálható és csak a két alkatrész közötti O-gyűrűs tömítést hagytam meg. Az alkatrészek csatlakozási módja megfelelt az előző LOCV2-es verzióban látottakhoz. A tartóelem vastagságát megnőveltem, hogy az ne sérüljön az összeszerelés során. Az eddig említett három verzió a CraftBot Plus 3D FDM nyomtatóval készült, amely az 1/4-28 UNF menetet nem a kellő minőségben nyomtatta ki, ezáltal a mikrofluidikai csatlakozók behajtása nem, vagy csak nagyon nehezen volt kivitelezhető, így ezeket a verziókat nem próbáltam ki áramlási tesztekben.

A LOCV4-es konstrukció Prusa i3 MK3 nyomtatón készült, ami sokkal jobb minőségű alkatrészeket eredményezett. További lényeges különbség ebben a verzióban a csatlakozás kialakításában található, ugyanis visszatértem az eredeti bajonettzáras megoldáshoz, ezúttal a pályát a mikroreaktor testbe terveztem bele, a csapokat pedig a mikroreaktor kupakra. Ezáltal a szerelhetőség nagyban javult, és nem is volt szükség a továbbiakban egy plusz tartóelemet elkészíteni. A menetes rész minősége sokat javult az előző verziókhoz képest, így ebbe már mikrofluidikai csatlakozókat tettem és teszteltem áramlási tesztek alá vettem. Az alapgondolat szerint a mikroreaktor test kamrájába egy inzerthelyezendő, amely köré a korábban elkészített nanoszálak kompozitot feltekerjük. Először az összeszerelt mikroreaktort enélkül az preparált inzerthelyezendő nélkül próbáltam ki, ekkor nem volt tapasztalható semmiféle szivárgás. Azonban amikor belekerült az inzerthelyezendő a nanoszálak kompozittal együtt jelentős fojtás keletkezett a rendszerben, ami szivárgás formájában mutatkozott meg. Továbbá az egyik alkalommal a mikrofluidikai csatlakozót nagyobb nyomatékka húztam meg a kelletténél ezáltal a mikroreaktor kupak két réteg között elvált.

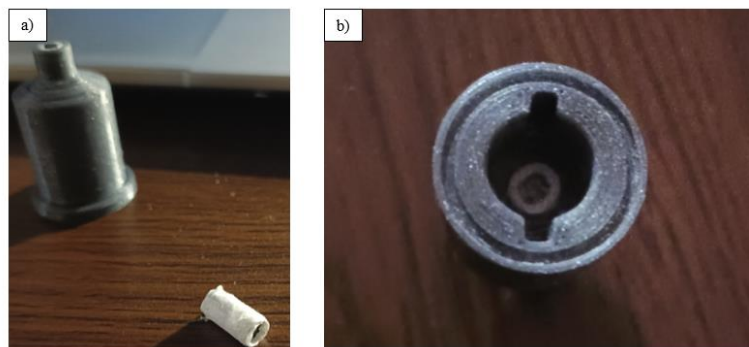
Ezen tapasztalatokat felhasználva a LOCV5 verzióban módosítottam az alkatrészek méretén. Egyrészt a mikroreaktor kupak és test vastagságát megnőveltem, hogy szilárdabbak legyenek, másrészt a csatlakozó részek átmérőjét úgy terveztem át, hogy a két alkatrész könnyedén egymásba illeszthető legyen. Egy plusz O-gyűrűs tömítést terveztem a mikroreaktor testben lévő homlokfelületre. Az O-gyűrű méretét úgy választottam meg, hogy jelenlétében a mikroreaktor kupak ne tudjon elfordulni a bajonett pályán, csak abban az esetben, ha egy tengelyirányú erővel ráhatást nem gyakorolunk. Ez arra jó, hogy a tömítés a homlokfelületnek feszülve eredményesebb tömítést hoz létre. Az FDM 3D nyomtatási technológiák, mint azt a korábbi 3.4 fejezetben említettem a felületi érdesség viszonylag nagy, ami a LOC4 típusban feltehetően szivárgást okozott. Ennek megoldására ketté vettem a mikroreaktor kupakot (8.2 ábra 2. és 3. elem), melyeket nyomtatás után ragasztottam össze. Ezáltal a 2. és 3. elem O gyűrűvel érintkező felületének érdessége nagy mértékben csökkent.

A későbbiekben szükséges a reaktor nanoszálás kompozit által elfoglalt térfogatának meghatározása. Ezt a következő módon határoztam meg. Először kiszámoltam a mikroreaktor kamrájának térfogatát ($207,3451 \mu\text{l}$) majd az inzert térfogatát ($135,7168 \mu\text{l}$) a (7) -es egyenlet alapján majd a két értéket kivontam egymásból. Így megkaptam, hogy a mikroreaktor nanoszálak által elfoglalt térfogata $71,6283 \mu\text{l}$.

$$V = D \cdot \pi \cdot h \text{ [mm}^3 = \mu\text{l]} \quad (7)$$

ahol D a kamra (6 mm), valamint az inzert átmérője ($4,8 \text{ mm}$), h a kamra (11 mm) illetve inzert magassága (9 mm).

Az 8-2. a) ábra mutatja a kinyomtatott mikroreaktor és az elkészített, inzert köré feltekert nanoszálás kompozit töltet, az 8-2. b) ábra pedig megfigyelhető a nanoszálás kompozitot magába foglaló mikroreaktor a kupak nélkül.



8-2. ábra. Az inzert köré feltekert nanoszálás kompozit töltet (a) és a mikroreaktor a benne elhelyezett nanoszálás töltettel (b)

8.4. Konklúzió

Elmondható tehát, hogy sikerült egy olyan mikroreaktor konstrukciót megterveznem és elkészítenem, amely az áramlási viszonyok mellett képes a feladatát betölteni, azaz nem szivárog belőle a reakcióelegy, illetve a nanoszálak kompozitot képes magában tárolni, anyagát tekintve biokompatibilis, szerelhetősége egyszerű, az alkatrészek kötése oldható és az inzert igény szerint kicserélhető benne.

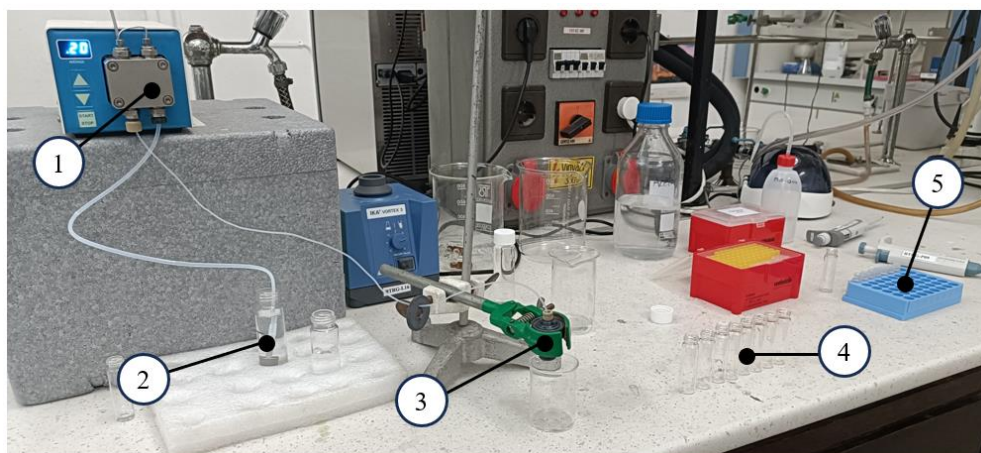
9. A máj metabolizmusának biomimetikus vizsgálata a Liver-on-a-Chip eszközben

9.1. Célkitűzés

A kutatócsoport által korábban használt MagneChip mikroreaktor alapú Liver-on-a-Chip eszközben végrehajtott biomimetikus oxidáció kinetikájának összehasonlítása az új nanoszálás kompozit tartalmú mikroreaktoréval, amely akkor tekinthető sikeresnek, ha az amlodipin humán metabolitja megjelenik az eszköz kimenetén ideális esetben teljes, de legalább 25%-os konverzió mellett. A 25% konverziós célértéket tapasztalati úton határoztuk meg; a reaktorgeometria lényeges módosítása nélkül, csupán az analit koncentráció és áramlási sebesség optimalizálásával 3-4-szeres konverziós hatásfoknövekedés érhető el.

9.1. Kísérletterv és felhasznált anyagok

A kísérleti összeállítást a 9-1. ábra mutatja, mely áll egy HPLC pumpából (1), a gyógyszerhatóanyagot tartalmazó törzsoldatból (2) és mikroreaktorból (3). A mikroreaktor kimenetéről vett mintákat 4 percenként, 1 percig gyűjtöttem be 5 ml-es üvegcékbe (4). Ezt követően a mintákat a későbbi HPLC vizsgálatra alkalmas 1 ml-es tartókba pipettáztam, melyeket mintatartóban (5), 5 °C-on hűtve tároltam a HPLC-vel végzett analízisig. A kísérlet során a legújabb kialakítású mikroreaktort (LOCV5) használtam.



9-1. ábra. A Liver-on-a-Chip áramlásos reakció vizsgálati elrendezése: HPLC pumpa (1), a gyógyszerhatóanyagot tartalmazó törzsoldat (2), mikroreaktor (3), átmeneti mintatartó (4), mintatartó (5)

Az áramlási sebesség megválasztásánál a kutatócsoport korábbi, MagneChip-el végzett kísérletekben [64] használt áramlási sebességet vettem alapul. A kiválasztási kritérium az időegység alatt legtöbb átalakítást eredményező áramlási sebesség volt, ez az adott kísérletben $200 \mu\text{l min}^{-1}$ értékre adódott 90%-os konverzió mellett. Az első kísérlet során használt *amlodipin* oldat koncentrációját a korábbi MagneChip kísérletek esetén legnagyobb konverziót mutató $0,125 \text{ mg ml}^{-1}$ értékre választottuk. A méréseket két módon is elvégeztem. Az egyik esetben a bevezetést a mikroreaktor tetején kötöttem be (*egyenes bekötés*), a másik esetben pedig megfordítottam a bekötést és alulról történt a gyógyszerhatóanyag adagolása (*fordított bekötés*), így ugyanis a nyomásterhelés nagy része a reaktor eleve zárt részére esik. A két bekötési mód között a rendszert desztillált vízzel mostam át, a töltetet nem cseréltem ki. A kísérleteket 45 illetve 50 percen át végeztem a egyenes és fordított bekötött esetben.

A kísérletek során meghatároztuk a mikroreaktor kimenetéről felvett minták *amlodipin* és humán metabolitja, a *dehidroamlodipin* koncentrációját a mintavételi idő függvényében HPLC-UV-MS módszerrel.

A mikroreaktorban lezajló biomimetikus oxidáció jellemzésére a konverzió (*c*) és space-time-yield (*STY*) értékeket számoltam ki.

A konverzió érték számolásánál vettem az adott mintavételi periódusban mért *amlodipin* és *dehidroamlodipin* intenzitás értékeket, majd ezek relatív arányát számoltam a (2) -es képlet szerint.

Az *STY* számolásánál az (5) -ös képlet alapján abból indultam ki, hogy a tiszta *amlodipin*-t tartalmazó referencia minta intenzitás értékét arányítottam a kimeneti oldalon felvett minták intenzitás értékéhez. Továbbá, feltételeztem, hogy az *amlodipin* és a *dehidroamlodipin* egységnyi koncentrációjú oldata azonos tömegű terméket jelent, mivel a két vegyület moláris tömege közel azonos.

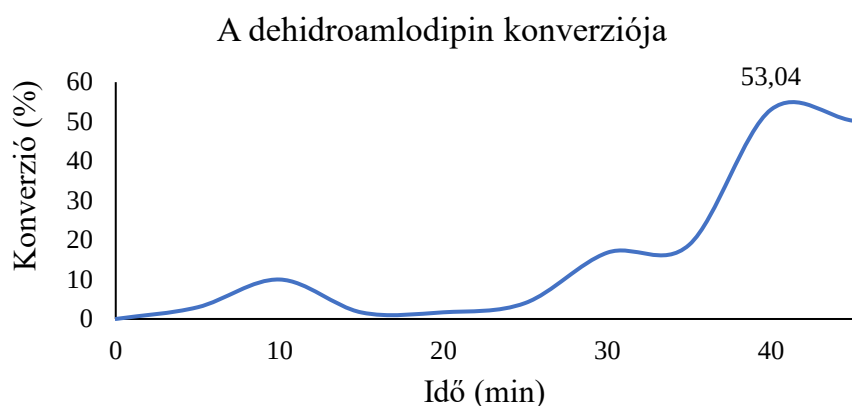
Az *STY* értéket az utolsó mintavétel során kapott 100% konverzió esetére számoltam ki azt feltételezve, hogy a teljes konverzió elérése a rendszer ebben a stabil munkapontban marad.

Ekkor a *dehidroamlodipin* tömege a koncentráció és a mintatérfogat szorzatából $25 \mu\text{g}$ volt.

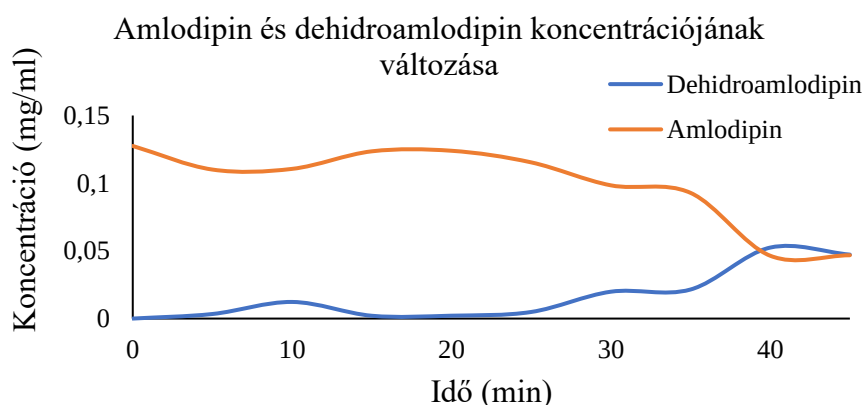
A reaktor térfogata a 8.3 fejezet alapján $71 \mu\text{l}$, a reakció ideje pedig megegyezik a kivett minta gyűjtési idejével (1 perc).

9.2. Mérési eredmények összefoglalása

Egyenes bekötés: A korábban tesztelt mikroreaktor az első négy mintavételig (20. perc) nem mutatta szivárgás jeleit, azonban az 5. mintánál megfigyeltem, hogy a bajonettzár pályában a reakcióelegy jelent meg. A szivárgás mértéke elhanyagolható volt, nem kezdett el csepegni, emellett folyamatosan történt a kilépő oldalon mintavételezés. A feltételezett szivárgás ellenére folytattam a kísérleteimet. Miután végeztem a kísérletekkel, desztillált vízzel átmostam a rendszert. Normál bekötés esetén a dehidroamlodipin konverziójának időbeli változását a 9-2. ábra, míg koncentrációjának időbeli változását a 9-3. ábra mutatja.



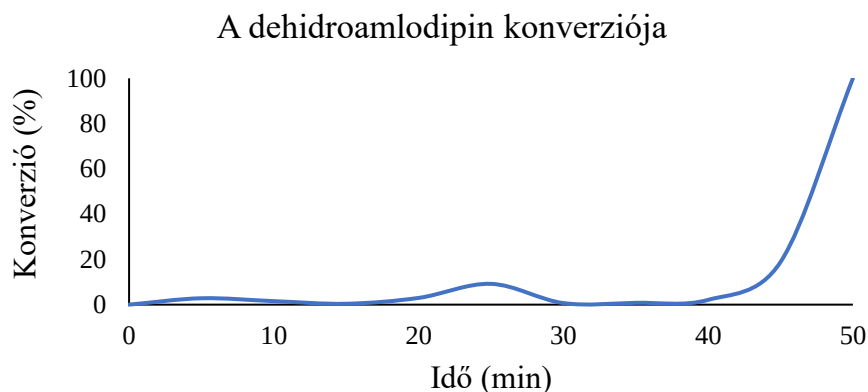
9-2. ábra. A dehidroamlodipin koncentrációjának változása a vizsgálati idő függvényében egyenes bekötés esetén



9-3. ábra. Az amlodipin és dehidroamlodipin koncentrációjának változása a vizsgálati idő függvényében egyenes bekötés esetén

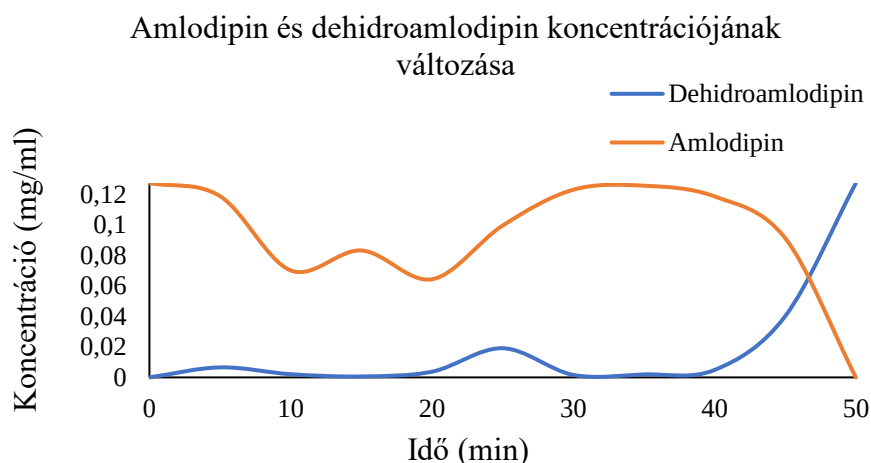
Látható, hogy 40 perc után a konverzió értéke kb. 50% -os értékre (maximális mért érték: 53,04%) áll be, ezt megerősíti mind az *amlodipin* fogyása, mint a *dehidroamlodipin* koncentráció növekedése is, független mérések alapján.

Fordított bekötés: Az így végzett kísérletek során is tapasztaltam kis mértékű szivárgást, de az a kilépő furaton át jövő oldattal együtt került begyűjtésre. Ebben az esetben a kiszivárgott reakcióelegy már áthaladt a nanoszálal kompoziton, tehát a kontinuitás elve nem sérült: a be és kijövő (begyűjtött) anyagmennyiség megegyezik.



9-4. ábra. A dehidroamlodipin koncentrációjának változása a vizsgálati idő függvényében fordított bekötés esetén

A fordított bekötés esetén számított konverzió értékeket a 9-4. ábra, a koncentrációk időbeli változását pedig a 9-5. ábra mutatja. Megfigyelhető, hogy ebben az esetben a konverzió értéke kevésbé nőtt az idő előrehaladtával, majd a végén hirtelen ugrásszerűen megnőtt. Mivel a begyűjtött minták analízise csak később történt meg, ezt a rendszerre jellemző viselkedést nem tudtuk figyelembe venni.



9-5. ábra. Az amlodipin és dehidroamlodipin koncentrációjának változása a vizsgálati idő függvényében fordított bekötés esetén

Mind az *amlodipin* teljes elfogyása, mind a függetlenül mért, annak kezdeti koncentrációjával megegyező *dehidroamlodipin* metabolit megjelenése a mintában megerősíti, hogy ekkor a rendszer 100 %-os konverzió mellett működött. Az STY

számított értéke $21,13 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, ami összemérhető a kutatócsoport korábbi eredményével, ugyanakkor a nanoszálak kompozit rendszerben csak az átalakítást végző metalloporfirin molekulák 1/80-a van jelen (lásd 5. táblázat).

9.3. Konklúzió

Elmondható, hogy a mikroreaktor áramlásos környezetben használva képes volt az amlodipin átalakítására úgy, hogy annak humán metabolitja mérhető volt a kimeneten. Összehasonlítottam egy egyenes és egy fordított bekötésű mikroreaktor elrendezést, melyből az derült ki, hogy mindkét esetben az adott paraméterek mellett kb. 40 perc elteltével egyensúlyi állapot áll be az átalakításban. A két elrendezés közül a fordított bekötés eredményesebbnek bizonyult, a rendszer ebben az állapotban 100% konverziót ért el. Ebben az elrendezésben, 100% konverziónál számított STY érték a kutatócsoport korábbi eredményivel egy nagyságrendbe esik, egy nagyságrenddel kevesebb katalizátor molekula használata mellett. Ez az eredmény megerősíti a korábbi tapasztalatokat (lásd 7.5. fejezet), miszerint a nanoszálba ágyazott MNP-FeTPPS részecskék térbeli elrendeződése kedvezően hat a katalizátor biomimetikus aktivitására.

10. Kitekintés és további tervek

A dolgozatomban elején kitűzött összes célt sikerült teljesíteni.

C1. A már létező és kutatócsoport által megalkotott nanoszálak kompozit rendszer reprodukálása – az általam reprodukált nanokompozit rendszer a kutatócsoport korábbi eredményeivel jól egyező tulajdonságokat mutatott

C2. A nanoszálak kompozit rendszer integrálása egy erre a célra tervezett mikroreaktor kazettába – a mikroreaktor kazetta tervezése és tesztelése 5 iteráción keresztül történt meg, az 5. generációs kazettában demonstrációs mérést hajtottam végre

C3. A mikroreaktor biomimetikus működésének demonstrációja – két elrendezésben (*egyenes* és *fordított*) demonstráltam a rendszer működését, és mindkét esetben jelentékeny konverziót tapasztaltam.

A jelenlegi demonstrációs jellegű méréseket a jövőben természetesen újra meg kell ismételni lehetőleg három párhuzamos esetben, hogy a rendszer robusztusságáról képet kapjunk. Nincsen igazán jó magyarázatunk arra, hogy a konverzió (mindkét bekötés esetén) miért csak kb. 40-45 perc után éri el a maximumát. A jövőben szeretnénk más áramlási geometriákkal is próbálkozni (a jelenlegi laterális áramlás helyett keresztirányú áramlás), és megvizsgálni az áramlási profil hatását a rendszer időbeli viselkedésére. Ugyan a jelenleg használt elrendezésben használt nanokompozit töltet mennyisége elegendőnek tűnik, a nanoszálak termék reprodukálható létrehozása kapcsán több ötlet (pl. forgókollektor használata) is felmerült. A mikroreaktor kazetta működőképes de nem tökéletes, így ennek a fejlesztése is további feladatok elé állítja a kutatócsoportot.

11. Hivatkozásjegyzék

- [1] “<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-glossary-terms>. 11/14/2017”.
- [2] B. Shaker, S. Ahmad, J. Lee, C. Jung, and D. Na, “In silico methods and tools for drug discovery,” Oct. 01, 2021, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.compbimed.2021.104851.
- [3] K. G. M. (szerk.), *A gyógyszerkutatás kémiája*. Akadémiai Kiadó, 2015. doi: 10.1556/9789630590761.
- [4] G. A. Van Norman, “Drugs and Devices Comparison of European and U.S. Approval Processes,” 2016.
- [5] A. Reichel and P. Lienau, “Pharmacokinetics in drug discovery: an exposure-centred approach to optimising and predicting drug efficacy and safety,” in *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 232, Springer New York LLC, 2016, pp. 235–260. doi: 10.1007/164_2015_26.
- [6] J. L. Pesante-Pinto, “Clinical Pharmacology and the Risks of Polypharmacy in the Geriatric Patient,” Nov. 01, 2017, *W.B. Saunders*. doi: 10.1016/j.pmr.2017.06.007.
- [7] M. L. Bruschi, Ed., “1 - General considerations,” in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing, 2015, pp. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00001-1>.
- [8] “Illustration of the ‘First Pass Effect’. ‘First Pass and Plasma Drug Levels (Introduction) (Human Drug Metabolism).’ Whatwhenhow RSS. Web. 03 Feb. 2016.”.
- [9] D. Choudhary, H. Goykar, D. Kalyane, R. K. Tekade, and N. Sreeharsha, “Prodrug design for improving the biopharmaceutical properties of therapeutic drugs,” in *The Future of Pharmaceutical Product Development and Research*, Elsevier, 2020, pp. 179–226. doi: 10.1016/B978-0-12-814455-8.00006-2.
- [10] X. He, “Chapter 18 - Integration of Physical, Chemical, Mechanical, and Biopharmaceutical Properties in Solid Oral Dosage Form Development,” in *Developing Solid Oral Dosage Forms*, Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Z. Zhang, L. Liu, and W. R. Porter, Eds., San Diego: Academic Press, 2009, pp. 407–441. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00018-7>.

- [11] M. Feghali, R. Venkataramanan, and S. Caritis, “Pharmacokinetics of drugs in pregnancy,” Nov. 01, 2015, *W.B. Saunders*. doi: 10.1053/j.semperi.2015.08.003.
- [12] D. Iacopetta *et al.*, “Impact of Cytochrome P450 Enzymes on the Phase I Metabolism of Drugs,” May 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/app13106045.
- [13] O. A. Almazroo, M. K. Miah, and R. Venkataramanan, “Drug Metabolism in the Liver,” Feb. 01, 2017, *W.B. Saunders*. doi: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
- [14] F. J. Dowd, “Pharmacokinetics: The Absorption, Distribution, and Fate of Drugs,” in *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition*, Elsevier, 2017, pp. 15–43. doi: 10.1016/B978-0-323-39307-2.00002-3.
- [15] I. P. Nnane and X. Tao, “DRUG METABOLISM | Metabolite Isolation and Identification,” in *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Second Edition., P. Worsfold, A. Townshend, and C. Poole, Eds., Oxford: Elsevier, 2005, pp. 305–311. doi: <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00109-6>.
- [16] A. P. Li, “Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties,” 2005, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.ddtec.2005.05.024.
- [17] N. A. M. Tamimi and P. Ellis, “Drug development: From concept to marketing!,” Oct. 2009. doi: 10.1159/000232592.
- [18] C. A. Umscheid, D. J. Margolis, and C. E. Grossman, “Key concepts of clinical trials: A narrative review,” Sep. 2011. doi: 10.3810/pgm.2011.09.2475.
- [19] Bernard. Lo and M. J. . Field, *Conflict of interest in medical research, education, and practice*. National Academies Press, 2009.
- [20] P. Huang and Q. Chen, “Generation of hepatocytes by transdifferentiation,” in *Stem Cells and Cancer in Hepatology: From the Essentials to Application*, Elsevier, 2018, pp. 103–114. doi: 10.1016/B978-0-12-812301-0.00006-2.
- [21] D. Zhang, G. Luo, X. Ding, and C. Lu, “Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development,” *Acta Pharm Sin B*, vol. 2, no. 6, pp. 549–561, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.apsb.2012.10.004.
- [22] A. P. Li, “The scientific basis of drug-drug interactions: Mechanism and preclinical evaluation,” 1998.
- [23] E. Novik, T. J. Maguire, P. Chao, K. C. Cheng, and M. L. Yarmush, “A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies,” *Biochem Pharmacol*, vol. 79, no. 7, pp. 1036–1044, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.bcp.2009.11.010.

- [24] E. F. A. Brandon, C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen, and J. H. M. Schellens, "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons," Jun. 15, 2003, *Academic Press Inc.* doi: 10.1016/S0041-008X(03)00128-5.
- [25] B. Decsi *et al.*, "Liver-on-a-chip-magnetic nanoparticle bound synthetic metalloporphyrin-catalyzed biomimetic oxidation of a drug in a magnechip reactor," *Micromachines (Basel)*, vol. 10, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/mi10100668.
- [26] J. Liu *et al.*, "Novel Multiplexed High Throughput Screening of Selective Inhibitors for Drug-Metabolizing Enzymes Using Human Hepatocytes," *AAPS Journal*, vol. 26, no. 3, Jun. 2024, doi: 10.1208/s12248-024-00908-8.
- [27] Fda, Cder, and AAttrakchi, "Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry," 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>
- [28] J. K. Sodhi and L. Z. Benet, "Successful and Unsuccessful Prediction of Human Hepatic Clearance for Lead Optimization," Apr. 08, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01930.
- [29] L. Di, E. H. Kerns, S. Q. Li, and G. T. Carter, "Comparison of cytochrome P450 inhibition assays for drug discovery using human liver microsomes with LC-MS, rhCYP450 isozymes with fluorescence, and double cocktail with LC-MS," *Int J Pharm*, vol. 335, no. 1–2, pp. 1–11, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.039.
- [30] S. Asha and M. Vidyavathi, "Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-A review," Mar. 2010. doi: 10.1007/s12010-009-8689-6.
- [31] K. Schroer, M. Kittelmann, and S. Lütz, "Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis," Aug. 01, 2010, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/bit.22775.
- [32] M. Ooka, C. Lynch, and M. Xia, "Application of in vitro metabolism activation in high-throughput screening," Nov. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms21218182.
- [33] F. Bryden and R. W. Boyle, "Metalloporphyrins for Medical Imaging Applications," in *Advances in Inorganic Chemistry*, vol. 68, Academic Press Inc., 2016, pp. 141–221. doi: 10.1016/bs.adioch.2015.09.003.

- [34] E. V Antina and N. Sh Lebedeva, "Molecular Porphyrin and Metalloporphyrin Complexes," 2001.
- [35] F. Li, Y. Li, Y. Wan, H. Lv, X. Gao, and Y. Yu, "Metalloporphyrin-Based Biomimetic Catalysis: Applications, Modifications and Flexible Microenvironment Influences (A Review)," Jan. 01, 2023, *Pleiades Publishing*. doi: 10.1134/S1070363223010255.
- [36] D. Balogh-Weiser *et al.*, "Novel biomimetic nanocomposite for investigation of drug metabolism," *J Mol Liq*, vol. 368, p. 120781, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2022.120781.
- [37] J. H. Ansede and D. R. Thakker, "MINIREVIEW High-Throughput Screening for Stability and Inhibitory Activity of Compounds toward Cytochrome P450-Mediated Metabolism," 2004.
- [38] S. M. Mennen *et al.*, "The Evolution of High-Throughput Experimentation in Pharmaceutical Development and Perspectives on the Future," *Org Process Res Dev*, vol. 23, no. 6, pp. 1213–1242, Jun. 2019, doi: 10.1021/acs.oprd.9b00140.
- [39] K. Song, G. Li, X. Zu, Z. Du, L. Liu, and Z. Hu, "The fabrication and application mechanism of microfluidic systems for high throughput biomedical screening: A review," *Micromachines (Basel)*, vol. 11, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.3390/mi11030297.
- [40] Y. Sun, S. Cheng, W. Lu, Y. Wang, P. Zhang, and Q. Yao, "Electrospun fibers and their application in drug controlled release, biological dressings, tissue repair, and enzyme immobilization," 2019, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c9ra05012d.
- [41] A. Keirouz *et al.*, "The History of Electrospinning: Past, Present, and Future Developments," Jun. 09, 2023, *John Wiley and Sons Inc*. doi: 10.1002/admt.202201723.
- [42] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, "Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications," Apr. 24, 2019, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- [43] A. Haider, S. Haider, and I. K. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology," Dec. 01, 2018, *Elsevier B.V*. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.

- [44] M. S. Islam, B. C. Ang, A. Andriyana, and A. M. Afifi, “A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications,” Oct. 01, 2019, *Springer Nature*. doi: 10.1007/s42452-019-1288-4.
- [45] “<https://spinsplit.com/spincube/>”.
- [46] “<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>.”
- [47] J. M. R. Bélanger, J. R. Jocelyn Paré, and M. Sigouin, “Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications,” *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol. 18, no. C, pp. 37–59, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0167-9244(97)80011-X.
- [48] F. S. Rocha, A. J. Gomes, C. N. Lunardi, S. Kaliaguine, and G. S. Patience, “Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis,” *Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 96, no. 12, pp. 2512–2517, Dec. 2018, doi: 10.1002/cjce.23344.
- [49] M. Picollo, M. Aceto, and T. Vitorino, “UV-Vis spectroscopy,” *Physical Sciences Reviews*, vol. 4, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1515/psr-2018-0008.
- [50] K. S. Prakash, T. Nancharaih, and V. V. S. Rao, “ScienceDirect Additive Manufacturing Techniques in Manufacturing-An Overview,” 2017. [Online]. Available: www.sciencedirect.com
- [51] S. Jain, R. Gujjala, P. Abdul Azeem, S. Ojha, and R. K. Samudrala, “A review on mechanical and In-vitro studies of polymer reinforced bioactive glass-scaffolds and their fabrication techniques,” Mar. 01, 2022, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.ceramint.2021.11.206.
- [52] “ISO/ASTM52900-21, Additive manufacturing — General principles — Fundamentals and vocabulary. ASTM International. West Conshohocken, PA, 19428-2959 USA”.
- [53] A. Waldbaur, H. Rapp, K. Länge, and B. E. Rapp, “Let there be chip - Towards rapid prototyping of microfluidic devices: One-step manufacturing processes,” Dec. 2011. doi: 10.1039/c1ay05253e.
- [54] J. Huang, Q. Qin, and J. Wang, “A review of stereolithography: Processes and systems,” Sep. 01, 2020, *MDPI*. doi: 10.3390/PR8091138.
- [55] P. Zhang, Z. Wang, J. Li, X. Li, and L. Cheng, “From materials to devices using fused deposition modeling: A state-of-art review,” Jan. 01, 2020, *De Gruyter Open Ltd*. doi: 10.1515/ntrev-2020-0101.

- [56] J. Wang, A. Goyanes, S. Gaisford, and A. W. Basit, "Stereolithographic (SLA) 3D printing of oral modified-release dosage forms," *Int J Pharm*, vol. 503, no. 1–2, pp. 207–212, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.016.
- [57] A. Cano-Vicent *et al.*, "Fused deposition modelling: Current status, methodology, applications and future prospects," Nov. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.addma.2021.102378.
- [58] M. Mukhtarkhanov, A. Perveen, and D. Talamona, "Application of stereolithography based 3D printing technology in investment casting," Oct. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/mi11100946.
- [59] J. Kaushal, G. Singh, and S. K. Arya, "Emerging trends and future prospective in enzyme technology," *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*, pp. 491–503, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-89929-1.00036-6.
- [60] B. A. Kornbrust, T. Forman, and I. Matveeva, "Applications of enzymes in breadmaking," in *Breadmaking: Improving quality, Second Edition*, Elsevier Inc., 2012, pp. 470–498. doi: 10.1533/9780857095695.2.470.
- [61] S. Liu, "Enzymes," in *Bioprocess Engineering*, Elsevier, 2017, pp. 297–373. doi: 10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1.
- [62] W. Lohmann and U. Karst, "Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism : SStrategies, advantages and limitations," *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, no. 1, pp. 79–96, May 2008, doi: 10.1007/s00216-007-1794-x.
- [63] M. Wolak and R. Van Eldik, "Mechanistic studies on peroxide activation by a water-soluble iron(III)-porphyrin: Implications for O-O bond activation in aqueous and nonaqueous solvents," *Chemistry - A European Journal*, vol. 13, no. 17, pp. 4873–4883, 2007, doi: 10.1002/chem.200601148.
- [64] D. Balogh-Weiser *et al.*, "Magnetic nanoparticles with dual surface functions—efficient carriers for metalloporphyrin-catalyzed drug metabolite synthesis in batch and continuous-flow reactors," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 12, pp. 1–16, Dec. 2020, doi: 10.3390/nano10122329.
- [65] P. Pálovics, F. Ender, and M. Rencz, "Towards the CFD model of flow rate dependent enzyme-substrate reactions in nanoparticle filled flow microreactors," *Microelectronics Reliability*, vol. 85, pp. 84–92, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.microrel.2018.03.035.

