



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

OTDK dolgozat

Diamino-oxidáz nanoszálas formulációja innovatív terápiák kifejlesztéséhez

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Készítette:

Stummer Tamás

Neptun kód:

MTD49S

Egészségügyi mérnök

Msc hallgató

Témavezető:

Dr. Balogh Diána

egyetemi adjunktus

Konzulens:

Tóth Gergő Dániel

Phd hallgató

Dr. Ender Ferenc

egyetemi docens

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

1. Köszönetnyilvánítás	3
2. Bevezetés	4
3. Irodalmi összefoglaló	6
3.1. Hisztamin	6
3.2. Hisztamin intolerancia	7
3.2.1. A hisztamin intolerancia kezelése	8
3.3. Enzimhelyettesítő Terápia (<i>Enzyme Replacement Therapy</i>)	9
3.3.1. Diamino-oxidáz, mint potenciális terápiás enzim	9
3.4. Enzim formulálási módszerek	11
3.4.1. Adszorpción és elektrosztatikus vonzáson alapuló eljárások	12
3.4.2. Kovalens kötésen alapuló eljárások	12
3.4.3. Affinitás kölcsönhatáson alapuló eljárások	12
3.4.4. Keresztkapcsolás	13
3.4.5. Csapdázás, kapszulázás	13
3.5. Elektrosztatikus szálképzés	15
3.5.1. Szálképzési paraméterek	17
4. Célkitűzés	23
5. Anyagok és módszerek	24
5.1. Felhasznált anyagok	24
5.2. Prekurzor elegyek elkészítése	24
5.2.1. Prekurzor elegyek viszkozitásának vizsgálata	25
5.3. PVA nanoszálak előállítása	25
5.3.1. Nanoszálak morfológiai vizsgálata	25
5.3.2. Raman spektroszkópia	26
5.3.3. Rugalmassági modulus meghatározása	26
5.4. DAO enzimatis aktivitásának meghatározása	27
5.4.1. Irodalmi módszer alkalmazhatóságának igazolása	27

5.4.2.	Nanoszálás DAO készítmények aktivitásának mérése	29
5.4.3.	Enzimkészítmények összehasonlítása	29
5.4.4.	Enzimaktivitás számítása	31
6.	Eredmények	32
6.1.	Elektrosztatikus szálképzés	32
6.1.1.	Prekurzor elegyek viszkozitásának vizsgálata	33
6.2.	Nanoszálak morfológiai vizsgálata	35
6.2.1.	Szálképezhetőség átfogó értékelése (<i>Spinning-score</i>)	38
6.2.2.	Young-modulusz meghatározása	39
6.3.	Raman spektroszkópia	42
6.4.	A DAO nanoformulálására alkalmas PVA prekursor kiválasztásának szempontjai	44
6.5.	DAO tartalmú nanoszálak enzimatis aktivitásának vizsgálata	44
6.5.1.	UV-Vis DAO aktivitás <i>assay</i> fejlesztése	44
6.5.2.	Enzimatis aktivitás mérése	48
7.	Összefoglalás	52
8.	Függelék	60

1. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Balogh-Weiser Diánának témavezetői munkájáért, szakmai tanácsaiért, valamint a tudományos munkám lektorálásáért.

Kiemelt köszönettel tartozom Tóth Gergő Dániel konzulensemnek elhivatott támogatásáért és szakszerű iránymutatásáért. Mindig rendelkezésemre állt, bármikor kerestem kérdéseimmel. Türelmes, barátságos hozzáállása folyamatos motivációt adott, ami miatt nemcsak szakmai fejlődésem vált lehetővé, hanem sokat tanulhattam a problémák megközelítésének gyakorlati módszereiről is. Köszönöm a bizalmat, a tanácsokat és a bátorítást, amelyek nagyban hozzájárultak a munkám elkészüléséhez.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani Dr. Ender Ferencnek, akinek útmutatása nélkül nem kerültem volna ebbe a befogadó kutatócsoportba.

Végül szeretnék köszönetet mondani a Bioorganikus Kémiai Kutatócsoport minden tagjának, akik az elmúlt 2 évben hozzájárultak a szakmai munkám fejlődéséhez.

2. Bevezetés

Számos olyan megbetegedés létezik, aminek hátterében enzim diszfunkció vagy az enzim hiánya áll. Ezek kezelése során gyakran alkalmaznak enzim helyettesítéses terápiát [1, 2]. A terápia során az alacsony aktivitású vagy hiányzó enzimeket kívülről juttatják be a szervezetbe, ami változatos adminisztrációs útvonalon történhet meg (pl.: *per os* vagy *intravenalis*). Az általunk kutatott diamino-oxidáz (DAO) enzim (EC 1.4.3.22) felelős a szervezetben felhalmozódott hisztamin lebontásáért, mely alulműködése esetében hisztamin az egyén szervezetében intolerancia alakul ki. A hisztamin intoleranciában szenvedő betegek nem képesek elegendő DAO termelésére, melynek következtében a szervezetükben felhalmozódó hisztamin allergiaszerű krónikus idegrendszeri és gasztroenterális tünetek és gasztrointesztinális panaszok kialakulását idézi elő [3, 4]. A hisztamin intolerancia kezelésére már jelenleg is kaphatók piaci forgalomban étrend kiegészítők (DAOfood Plus® kapszula, Daosin étrendkiegészítő tabletta), azonban ezen termékek palettája igencsak szűkös.

A hisztamin intolerancia kezelését célzó modern készítmények között a szakirodalom szerint ígéretes potenciállal kecsegtetnek a DAO tartalmú a szukróz alapú tabletták, a karboximetil keményítő tabletták, valamint az enzim szérumkénti alkalmazása is [5–7].

A korábban felsorolt eljárásokhoz mellett a modern nanoformulációs technikák is ígéretes alternatívát nyújthatnak korszerű DAO terápiás készítmény előállítására. Ezek egy jelentős képviselője az elektrosztatikus szálképzés, melynek segítségével gyorsan és költséghatékonyan állítható elő kiemelkedően nagy fajlagos felületű nanoszálak szerkezet. Ez eljárás során az létrehozott szövedék képes mind a felületén megkötve, mind pedig a szálak belsejébe zárva enzimeket rögzíteni, mindeközben jelentősen fokozza azok stabilitását és aktivitását, anélkül, hogy az enzimet érő formulációs stressz rontana a biokatalitikus aktivitáson [8].

A kutatómunkánk célja egy új, nanoformulált DAO-tartalmú enzimkészítmény kifejlesztése. A DAO enzimet elektrosztatikus szálképzéssel előállított poli(vinil-alkohol) (PVA) nanoszálakba csapdázzuk. Munkánk során optimalizáljuk a szálképzés paramétereit, és tanulmányozzuk a nanoszálak belsejébe ágyazott enzimek hatását a szálképzési folyamatban nyert készítmények szerkezetére. Vizsgáljuk továbbá a szálképzéshez használt prekursor elegyek viszkozitását rotációs viszkoziméter segítségével. A szálképzés során képződött rendezetlen szövedék morfológiáját fénymikroszkóppal, illetve pásztázó elekt-

ronmikroszkóppal elemezzük. A nanoszálak kezelhetőségét és viselkedését mechanikai behatásokkal szemben szakítógéppel teszteljük. Igazoljuk az enzim jelenlétét Raman spektroszkópia segítségével. A natív és a rögzített DAO aktivitását UV-Vis spektrofotometriás módszerrel vizsgáljuk, összehasonlítva a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető DAO-tartalmú készítményekkel.

3. Irodalmi összefoglaló

3.1. Hisztamin

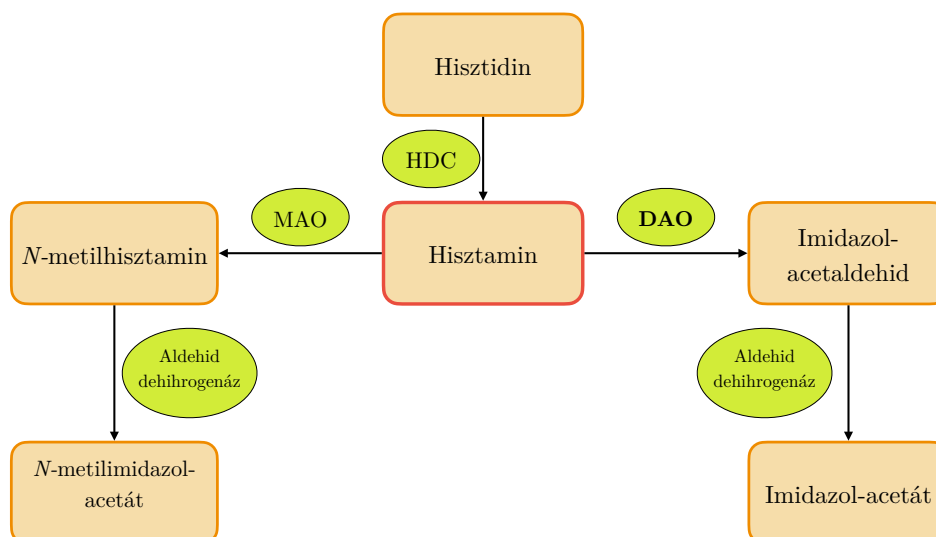
A hisztamin a biogén anyagok csoportjába tartozó nitrogéntartalmú heterociklusos vegyület, mely több élőlény szervezetében is megtalálható[9]. Felfedezése 1910-ben Sir Henry Dale nevéhez fűződik[10]. Az emberi szervezetben legfőbb előfordulási helye a hízósejtekben található, itt zajlik a termelése és raktározása is. Ezeken kívül számos sejtben megtalálható a vegyület, ilyenek a trombociták, hipotalamikus magvainak hisztaminerg neuronjai, bazofil és neutrofil granulociták, enterokromaffin jellegű sejtek, és az enterokromaffinsejtek. A hisztamin számos feladatot lát el a szervezetben. Szerepet játszik az izomösszehúzódnásban, az immunválasz kialakításában, a gyulladásos folyamatokban, a vérnyomás ingadozás és a gyomorsav termelésének szabályzásban, valamint az erek permeabilitásának megváltozásában. A szervezetben számos helyen található különböző funkciójú hisztamin receptor, ezért hatását neurotranszmitterként is kifejezheti[11, 12].

Kiemelendő hisztamin receptorok [13–15]:

- **H1 receptor:** Fokozza a viszketést, a fájdalmat, az értágulást, az érrendszeri permeabilitást, a hipotenziót; a kipirulást, a fejfájást, a tachikardiát, a hörgőszűkületet, a légúti *vagus afferens* idegek és a köhögési receptorok stimulációját; csökkenti az *atrioventricularis* csomópont vezetési idejét.
- **H2 receptor:** Befolyásolja a bél transzportfolyamatainak mechanizmusait. Növeli a gyomorsav szekréciót, az érrendszeri permeabilitást, hipotenziót, kipirulást, fejfájást, tachikardiát, kronotróp és inotróp aktivitást, hörgőtágulást, nyálkatermelést (légutak esetében).
- **H3 receptor:** Főként az agyban van jelen. Szerepet játszik a bioritmus kialakításában, szabályozza a testhőt, valamint segíti bizonyos tápanyagok és a víz felvételét. Megakadályozza a túlzott hörgőszűkületet.
- **H4 receptor:** Gyulladásos és immunológiai szereppel rendelkezik. Elősegíti a myeloblastok és promyelociták differenciálódását.

A hisztamin keletkezése hisztidin-dekarboxiláz-enzim (HDC) segítségével jön létre, mely során a hisztidin aminosav dekarboxilálódik. A kialakult termék négy különböző

úton bomlik le különböző melléktermékek jelenlétében. Ez a négy folyamat az acetilezés, a metiláció, az oxidatív dezamináció és a hidroxilezés. Ezek közül a szervezetben leggyakrabban oxidatív dezamináció játszódik le, mely során diamino-oxidáz (DAO) és monoamino-oxidáz (MAO) víz és oxigén jelenlétében dezaminálja a hisztamint. Az említett bomlási folyamatok az 1. ábrán láthatóak [16–20].



1. ábra. Hisztamin oxidatív dezaminációval végbemenő bomlási útvonalai. HDC: hisztidin-dekarboxiláz-enzim, MAO: monoamino-oxidáz, DAO: diamino-oxidáz[20]

3.2. Hisztamin intolerancia

Szervezetünkben a diamino-oxidáz (DAO) felelős a hisztamin lebontásáért. A hisztamin felszabadulhat *endogén* módon, vagy táplálkozás során bizonyos ételek fogyasztásakor külsőleg *exogén* úton kerül be a szervezetbe. Egy egészséges ember képes lebontani azt a mennyiségű hisztamint, amire a szervezetnek fiziológias körülmények között már nincs szüksége. Amennyiben a DAO képződésében hiba lép fel, annak termelődése részlegesen vagy végleg leállhat. Ennek következtében a DAO enzimatisz működése legyengül, vagy esetleg teljes egészében elmarad, a hisztamin lebontása jelentősen lelassul, bizonyos esetekben le is állhat, melynek következtében a hisztamin felhalmozódik a véráramban. A klinikai tünetek legnagyobb hányadát a folyamatosan magas koncentráción lévő hisztamin okozza. A hisztamin intolerancia kórképe változékony. Leggyakrabban allergiás tünetekről számolnak be a páciensek. Csökkent enzimaktivitás esetén ezek a tünetek magas

hisztamintartalmú ételek fogyasztásakor jelentkeznek, amik gyakran a frissességüket elvesztett élelmiszerekben találhatóak vagy olyan gyógyszerári készítmények fogyasztása esetén, amik elősegítik a hisztamin felszabadulását a szervezetből. A hisztamin intolerancia a népesség körülbelül 1%-át érinti, elsősorban középkorú férfiak és nők körében. A betegséggel járó tünetek hasonlóak más allergiás reakciókhoz, illetve egyéb, az 1. táblázatban felsorolt tünetekhez, ezért felismerése nehéz és félreérthető.[11, 13, 16, 21, 22].

1. táblázat. Hisztamin intolerancia során lehetségesen kialakuló tünetek csoportosítása különböző fiziológiás szempontok alapján. [11, 13, 16, 21, 22]

Érintett területek	Tünetek
Emésztőrendszeri problémák	puffadás, hasfájás, hasmenés, gyomorégés, hányás, reflux, émelygés
Bőrtünetek	viszketés, vörösödés, kiütések
Kardiovaszkuláris tünetek	szívritmuszavar, ingadozó vérnyomás
Vegetatív tünetek	fokozott izzadás, hőhullámok
Idegrendszerrel kapcsolatos tünetek	fejfájás, migrén, szédülés, eszméletvesztés
Légúti panaszok	tüsszögés, légszomj, asztmaszerű tünetek, orrfolyás, köhögés
Menstruáció	gyakori menstruációs zavarok
Ödéma képződés	leggyakrabban szemhéj ödéma
Krónikus tünetek	fáradtságérzet, alvási zavarok, depresszió, szorongás

3.2.1. A hisztamin intolerancia kezelése

A hisztamin intolerancia kezelése több módon lehetséges, bár végleges gyógyulást egyik sem nyújt. A terápia meghatározó része a diéta, amit a páciens állapotának megfelelően állítanak össze. Ezt nevezik az *"Arany-standard"* terápiás útnak. A diéta során a páciensnek kerülnie kell a magas hisztamin tartalmú ételek fogyasztását, mint például a fermentált termékek, tenger gyümölcsei, szója termékek, érlelt sajtok, tej, hüvelyesek, avokádó, banán vagy a csokoládé[19, 23]. A felsoroltak helyett pedig alacsony hisztamin tartalmú ételek fogyasztása ideális, mint például a kenyér, rizs, tojás, méz, stb [23]. Enyhe tünetek kezelése lehetséges továbbá antihisztamin tartalmú készítményekkel, például cetirizinnel[24][25]. Amennyiben a diéta nem célravezető, érdemes figyelembe venni a szervezetben termelt diamino-oxidáz enzim működését esetlegesen befolyásoló gyógyszerkészítményeket, ha a páciens ilyen típusú készítményeket szed, akkor a terápia módosítása javasolt. Ezek a

készítmények lehetnek fájdalomcsillapítók, mint az Aszpirin, a Naproxen, vagy az Ibuprofen. Antibiotikumok, mint a tetraciklin. Továbbá antipszichotikumok, antidepresszánsok és egyéb gyógyszerkészítmények, mint a Verapamil vagy a Cimetidin [26, 27]. A hisztamin intolerancia kezelésében megoldást nyújthat az exogén forrásból bejutatott diamino-oxidáz (DAO) tartalmú gyógyszerek vagy étrendkiegészítők alkalmazása. [28].

3.3. Enzimhelyettesítő Terápia (*Enzyme Replacement Therapy*)

Az emberi szervezetben előfordul, hogy az enzimek hibásan, vagy alulműködnek. Ezek kiváltó oka leggyakrabban valamiféle genetikai rendellenesség. A hiányos működésű enzimek következtében fellépő élettani elváltozások tüneti kezelésére elterjedten alkalmaznak Enzim Helyettesítési Terápiát (ERT)[29]. A terápia során az alacsony aktivitású vagy hiányzó enzimeket külső forrásból juttatják be a szervezetbe. Ez megtörténhet többféle adminisztrációs útvonalon, mint például szájon át történő (orális) gyógyszerformulákkal (Migalastat [30]), vagy intravénás injekcióval (pl.: Vimizim, Elaprase, Aldurazyme[29])[31]. A gyógyszerformulák és tápálékkiegészítők alkalmazása kevésbé súlyos esetekre jellemző. Ilyen lehet a hasnyálmirigy alulműködés (EPI-exocrine pancreatic insufficiency), hisztamin intolerancia vagy például a laktóz intolerancia kezelése[32]. Súlyosabb esetekben intravénás injekciót alkalmaznak. Ilyen lehet például a Gaucher-kór (β -glükózidáz enzim működésének zavara), a Fabry-kór (béta-galaktozidáz működésének zavara) vagy az MPS (*Mucopolysaccharidosis*) (IDUA (α -L-*Iduronidase*) enzim hiánya)[32]. Az MPS több fajtáját különböztetjük meg. Ilyen az MPS I (Hurler, Hurler-Scheie, Scheie szindróma), MPS II (Hunter szindróma), MPS IV A (Morquio A szindróma) vagy a MPS VI (Maroteaux-Lamy szindróma). Ezek a szindrómák hatással lehetnek az ízületekre, a szívre, a látásra, a növekedésre, az állóképességre, a légzőrendszerre, vagy az immunrendszerre. [32–34]

3.3.1. Diamino-oxidáz, mint potenciális terápiás enzim

A diamino-oxidáz a 2. ábrán látható réz tartalmú enzim (*AOC, amine oxidase copper-containing 1*), melynek feladata diamino vegyületek, mint például a hisztamin, illetve néhány primer monoamin oxidációja. Szekunder és tercier aminok esetén aktivitással nagyon kis mértékben vagy egyáltalán nem rendelkezik [35, 36]. Az enzim az emberi szervezetben az AOC1 (*AOC, amine oxidase copper-containing 1*) génen kódolódik [37].

Legfőbb feladata az emberi szervezetben a hisztamin lebontása, melyet víz és oxigén jelenlétében katalizál [3]. A DAO elsősorban a bélhámsejtekben szabadul fel, ahol a plazmamembránhoz kapcsolódó vezikulákban tárolódik[36–38]. Ez a lokalizáció lehetővé teszi a gyors szekréciót a véráramba. Továbbá a vékonybélben kívül a vesében, valamint terhesség esetén a placentában található meg[16, 39]. A vesén belül a DAO a plazmamembrán vezikuláris struktúráiban tárolódik, különösen a vese epithelsejtekben. Ez a lokalizáció arra utal, hogy a DAO nemcsak a hisztamin metabolizmusban, hanem a vese működéséhez kapcsolódó egyéb fiziológiai folyamatokban, például a gyulladásban és az immunválaszokban is szerepet játszhat[40]. Az enzimet több úton is izolálták már, többek között lóbabából, sertésveséből és különböző mikroorganizmusokból [35, 36]. Számunkra a sertésveséből izolált a legfontosabb, hiszen ezt alkalmazzák legtöbbször kereskedelmi forgalomban kapható DAO tartalmú enzinkészítményekhez (például DAOSIN, DAOFOOD+).



2. ábra. Humán diamino-oxidáz homodimer kristályszerkezete, molekulatömege 180-186 *kDa*, mérete 2,5 Å (PDB:3HI7) [13, 41]

DAO tulajdonságai

A különböző forrásból izolált enzimek pH optimumai közel azonos tartományba esnek kisebb eltérésekkel. A lóbaból izolált minták esetén a pH optimum 6-os pH értéken található. Az emberi belekből izolált enzim aktivitása hisztamin szubsztrát bontásakor 6,4-6,5 pH értékeken a legnagyobb. Putreszcin bontása esetén az enzim aktivitása 6,6-7 pH értékeken mérhető leginkább[42–44].

Hőmérséklet tekintetében a különböző módon izolált enzimek tulajdonságai eltérnek. Az emberi enzim optima 37 °C, a lóbaból izolált enzim optima 35-45 °C (~ 40 °C). Eredettől függetlenül a DAO aktivitása 45 °C felett csökken és 60 °C körül elvész[43, 44].

Az emberi belekben található DAO 180-186 kDa össztömegű. Az érték két alegység tömegéből, amik egyenként 90-92 kDa , valamint az enzim réztartalmából tevődik össze. Az állati eredetű DAO enzimek hasonló tömeget mutatnak. Ezzel szemben a növényi eredetű lóbaból kinyert enzim molekulatömege csupán 121 kDa [43].

3.4. Enzim formulálási módszerek

Az enzimek olyan biológiai katalizátorok, amelyek felgyorsítják a szervezet életfenntartásához elengedhetetlen biokémiai reakciókat, miközben csökkentik a reakciók aktiválási energiáját, majd a reakció után eredeti állapotukat visszanyerve újra felhasználhatók. [45]. Működésükhöz optimális hőmérséklet- és pH - tartomány, valamint megfelelő enzim-szubsztrát arány szükséges. Ilyen körülmények között az enzimek működése maximális aktivitás kifejtése mellett zajlik. Az optimálistól eltérő körülmények (magas hőmérséklet, megváltozott kémhatás, megváltozott ionkoncentráció) befolyásolhatják az enzim molekuláris struktúráját, ami miatt elveszíthetik a szubsztráthoz való kötődés képességét, mely az aktivitás csökkenéséhez, vagy elvesztéséhez vezet[46].

Az enzimek formulálására számos metódus található. Az enzimek szilárd fázisú tartósítására legelterjedtebben alkalmazott liofilizálással por állagú készítményhez juthatunk, melynek vízben történő feloldásával enzim oldatokhoz juthatunk. Emellett lehetséges, hogy az enzimeket valamilyen hordozó (*carrier*) nanorészecskékhez rögzítsük. A rögzítéshez szilárd hordozókat alkalmaznak, amik megfelelő tulajdonságokkal (magas fajlagos felület, mechanikai stabilitás, porózus szerkezet, kémiai stabilitás stb.) rendelkeznek az enzimek rögzítéséhez. A rögzítési eljárásokat leggyakrabban a hordozó és az enzim között kialakuló

kölcsönhatás típusa szerint szokás osztályozni. Ez alapján megkülönböztetünk adszorpción és elektrosztatikus vonzáson alapuló eljárásokat, csapdázást, affinitás kölcsönhatáson alapuló eljárásokat, kovalens kötésen alapuló eljárásokat és kerszetkapcsolást[47]. Az alább bemutatott enzimrögzítési eljárások összefoglalója a 2. táblázatban látható.

3.4.1. Adszorpción és elektrosztatikus vonzáson alapuló eljárások

A két eljárás nehezen elkülöníthető egymástól. Mindkettő gyenge másodrendű kölcsönhatásokor alapul, mint a Van- der Waals erők vagy az elektrosztatikus vonzás. Ezen eljárások előnye, hogy az enzimeket minimális szerkezeti változtatás nélkül szilárd hordozóhoz lehet reverzibilisen kötni. Hátrányuk viszont, hogy a másodrendű kölcsönhatások a környezeti paraméterek változásaira érzékenyek, ezért az ionerősség, a pH és a hőmérséklet változása a kötések felbomlásához vezethet, ami az enzimtömeg elvesztését jelenti ezzel pedig az aktivitás csökken [47, 48].

3.4.2. Kovalens kötésen alapuló eljárások

Az eljárás során, annak nevéből adódóan a hordozó és a rögzíteni kívánt enzim között kovalens kötést hozunk létre. Ezt valamilyen keresztkapcsoló molekula használatával tudjuk elérni. Ilyen keresztkapcsoló molekula lehet például a glutáraldehid. Az eljárás előnye, hogy erős és stabil kötések hoz létre, amelyek ellenállnak a lemosódásnak és a denaturációnak, viszont a kialakuló kovalens kötések változtathatnak az enzim szerkezetén, ezért annak katalitikus aktivitása csökkenhet [47, 49, 50].

3.4.3. Affinitás kölcsönhatáson alapuló eljárások

Az eljárás során a szilárd hordozó felületén lévő funkciós csoportokat úgy módosítják, hogy az a rögzíteni kívánt enzim geometriai komplementere legyen. Az eljárás előnye, hogy a kialakuló specifikus kölcsönhatások hasonló stabilitással bírnak, mint az elsőrendű kötések. Emiatt enzimvesztéssel sem kell számolnunk. Az ilyen hordozók előállítása viszont rendkívül költséges, mivel minden rögzítendő enzim esetén különböző funkciós csoportokat kell kialakítani [47, 51].

3.4.4. Keresztkapcsolás

Keresztkapcsoló reagensek (pl.: glutárladehid) alkalmazásával az enzim molekulák között kovalens kötést alakítunk ki. Ennek következtében enzimaggregátumok és enzimkristályok jönnek létre. Az eljárás előnye, hogy az elsőrendű kötések miatt az enzimek stabilitása magas és nem lép fel enzimveszteség, továbbá nincs szükség hordozó részecske alkalmazására. Hátránya pedig, hogy a kötések miatt az enzim katalitikus tulajdonságai változhatnak, valamint az alkalmazott reagensek általában toxikus hatásúak [51, 52].

3.4.5. Csapdázás, kapszulázás

Az csapdázás és a kapszulázás kritikus technikák az enzimek immobilizálásában. Fokozzák az enzimek stabilitását és megkönnyítik a különböző alkalmazásokban való felhasználásukat. Bár ezeket a kifejezéseket gyakran felváltva használják, a módszertan és az alkalmazás tekintetében finom különbségeket is jelölhetnek.

A csapdázás magában foglalja az enzimek immobilizálását szilárd vagy gél mátrixban, lehetővé téve számukra, hogy aktívak maradjanak, miközben mozgásuk fizikailag korlátozottak. A módszer során nem alakul ki elsőrendű kémiai kötést az enzim és a hordozó mátrix között, viszont a szerkezetet másodrendű kötések stabilizálhatják [53, 54]. Az eljárás előnye, hogy fokozza az enzimek stabilitását, így azok ellenállóbbá válnak a környezeti változásokkal, például a hőmérséklet- és pH -ingadozásokkal szemben. Lehetővé teszi az enzimek könnyebb elválasztását a reakcióelegyeiből, ami megkönnyíti az ipari alkalmazásokban való újra felhasználásukat [53, 55]. Az eljárás legnagyobb hátránya, hogy az általunk alkotott hordozó mátrix diffúziós gátat képez. Ennek következtében csökkenti az enzim és a szubsztrátum kapcsolódásának esélyét és gátolja a termék kilépését [47].

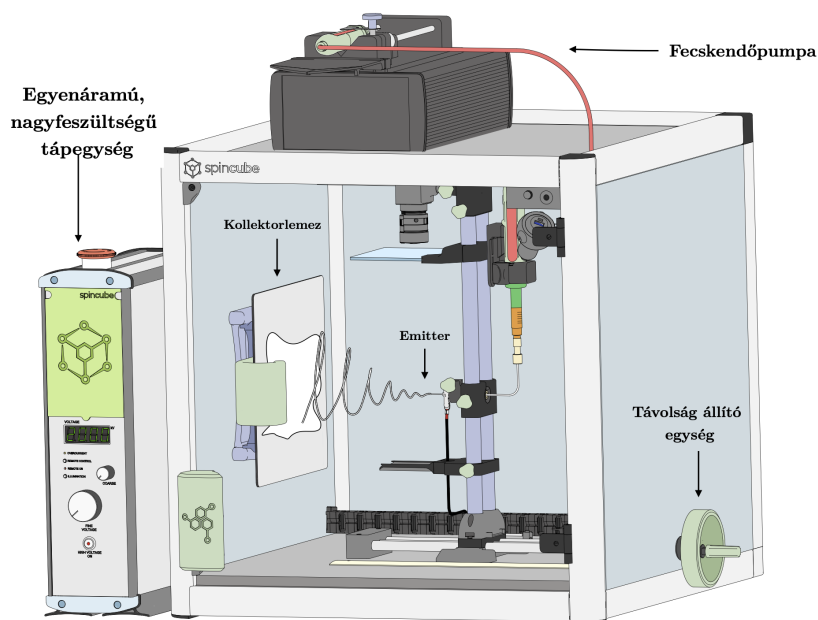
A kapszulázás a csapdázáshoz hasonló, ellenben kifejezetten az enzimek membránrendszerbe zárására vonatkozik. Ez egy meghatározott mikrokörnyezetet hoz létre, amely védi az enzimeket, miközben lehetővé teszi a szubsztrátok befelé és a termékek kifelé történő diffúzióját [56]. Mindkét módszer kulcsfontosságú az enzimek teljesítményének optimalizálásához a biokatalízistól a környezeti kármentesítésig, valamint jelentősen hozzájárulnak az ipari folyamatok hatékonyságához és fenntarthatóságához [57].

2. táblázat. A leggyakoribb enzimrögzítési eljárások előnyeinek és hátrányainak áttekintése

Rögzítés módja	Előnyök	Hátrányok
Adszorpciós/elektrosztatikus kölcsönhatás	• Megvalósítása egyszerű és költséghatékony • Az enzim nem esik át kémiai módosításon	• Alacsony reakcióspecifikusság • Enzimveszteség
Kovalens kötés	• Minimális enzimveszteség • Az enzim stabil kötésekkel irreverzibilisen rögzíthető • Erős elsőrendű kötés kialakulása az enzim és a hordozója között	• Szükséges a hordozó kémiai módosítása • Irreverzibilis kötések is létrejöhetnek, melyek gátolják az ismételt felhasználást
Affinitás	• Reakcióspecifikusság kiemelkedő • Gyors	• Komplikált, drága megvalósítás • Az enzimben specifikus csoportok jelenlétének szüksége • Csökkenhet az enzimaktivitás • Sztérikus módosulások következhetnek be az enzimen
Keresztkapcsolás	• Alacsony katalizátorveszteség • Az enzim stabil kötések révén rögzül • Nem szükséges hordozó	• Problémák diffúzió során • Komplikált megvalósítás • Az enzim kémiai módosításon esik át • Költséges (kizárólag fehérjék felhasználása)
Csapdázás, kapszulázás	• Nagyfokú stabilitás • Az enzim nem esik át kémiai módosításon	• Jelentős diffúziós gát • Méretnövelése komplikált

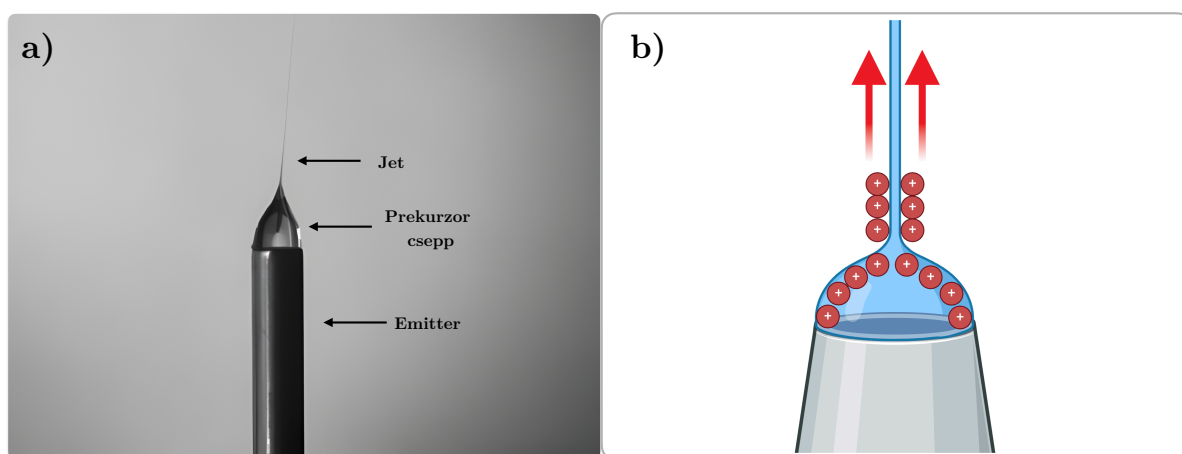
3.5. Elektrosztatikus szálképzés

A nanotechnológia kiemelkedő szerepet játszik a gyógyszeriparban a gyógyszerhordozók előállítása során [58]. Az elektrosztatikus szálképzés napjainkban egy rohamosan feltörekvő nanoanyag előállítására képes technológia. Ennek oka, hogy alkalmazásával specifikus segédanyagok alkalmazása nélkül magas minőségű, nagy fajlagos felületű, szubmikronos átmérőjű polimer szálak állíthatók elő, amik felhasználhatók hatóanyagok rögzítésére, fehérjék vagy más bioanyagok tartósítására, illetve gyógyszerhordozók előállítására [59]. A technológia során magas feszültségű elektromos tér alkalmazásával oldat vagy olvadék állapotban lévő polimerekből nanoszálak szintetizálhatók. A magas feszültséget általában zárt térben hozzák létre, ahogy 3. ábrán is látható. A polimer oldatot az elektromos tér magasabb potenciállal rendelkező oldalán elhelyezkedő emitter tű hegyén egyenletes áramlási sebességgel pumpáljuk keresztül, ami az emitterből kiáramolva folyadékcseppet alkot. A folyadékcsepp – és következésképpen a benne található polimer molekulák – a magas egyenpotenciálra kapcsolt tűn keresztülhaladva feltöltődik, majd csúcsa egy pontba koncentrálódik és megnyúlik az elektromos tér zero potenciáljaként funkcionáló gyűjtőlemez, a kollektor felé. A kialakult geometriát a 4. ábrán bemutatott Taylor-kúpnak nevezzük.



3. ábra. Horizontális elrendezésű laboratóriumi szálképző berendezés, (SpincubeBASE, Spinsplit, Budapest, Magyarország)

Ha az elektromos tér által kifejtett "húzó-taszító" erő meghaladja a cseppet összetartó felületi feszültséget a kúp csúcsából folyadékáram indul meg a tér 0 potenciálján elhelyezkedő kollektor lemez felé. Amennyiben az oldott polimer molekulák közötti kohéziós erő megfelelő mértékű, úgy a folyadékáram folytonos, stabil és egyenletes lesz. Alacsony kohéziós erő esetén az anyagáramlás időről időre megszakad, az emitterhegyről polimer cseppek lépnek ki. Ellenben túlságosan magas kohéziós erő esetén az erőtér nem képes meghaladni a részecskék közötti összetartó erőt, így a folyadékáram kilépése gátlódik, a csepp mérete és tömege növekedni kezd, ami leszakad és egyben hagyja el az emitterhegyet. Az anyagáram (*jet*) sebessége a cseppből kilépve fokozatosan növekszik. Kezdetben stabil áramlási profillal jellemezhető, amit a molekulák között kialakuló taszító kölcsönhatás és a felületi feszültség viszonyával lehet jellemezni. Ebben az esetben ohmikus áramlásról beszélünk. A tér által feltöltött molekulák a folyadékszál felületére vándorolnak. Ezek között taszító erők lépnek fel, aminek következtében a szál "ostorozó" mozgást végez. A vándorlás következtében az áramlási profil ohmikusról konvektívra vált, az áramlási sebesség tovább nő. A megnőtt áramlási sebesség és az ostorozó mozgás miatt a szál fajlagos felülete jelentősen megnő. Ennek következtében az pillanatszerűen elveszíti a nedvességtartalmát, így a kollektorlemezen lecsapódott szálak szilárd halmazállapotúak lesznek. [60]



4. ábra. a) Elektrosztatikus szálképzés során kialakuló, az emitterhegyből kitörő folyadékáram, más néven Taylor-kúp. b) A Taylor-kúpban felhalmozódott feszültség és haladásának iránya.

Az eljárásnak többféle megvalósítása létezik, ezek két nagy csoportra oszthatók, túalapú és tűmentes eljárások. A túalapú eljárások keretében az emitter egy fecskendő tű vagy egyéb szűk átmérőjű henger alakú szerkezet, amíg a tűmentes eljárás során szabad folyadékfelszínről történik a szálak szintetizálása. Túalapú eljárásokból két kiemelkedő elrendezés létezik, ami lehet vertikális vagy horizontális.

Vertikális elrendezés esetén lehetséges a szálképzés fentről-lefelé (tengelyes típusú), illetve lentől-felfelé (fordított típusú) történő működtetése. Előnye a fentről-lefelé történő szálképzésnek, hogy alacsonyabb elektromos erőter alkalmazása is elegendő, mivel a gravitáció is erősítheti az erőter működését. Ellenben hátránya, hogy esetleges áramingadozás, vagy egyéb meg nem határozott probléma folytán egész cseppek is leszakadhatnak az emitterhegyről, amik tönkre tehetik az addig elkészült terméket. A tengelyes elrendezés során keletkezett szálak vastagabbak, míg a fordított típusú elrendezésben vékonyabbak[61].

3.5.1. Szálképzési paraméterek

A szálképzés során számos olyan paraméter beállításáról gondoskodnunk kell, amik változtatása esetén módosulhat a szál termék morfológiája és mennyisége. Ezeket a paramétereket 3 nagyobb csoportba sorolhatjuk: oldat-paraméterek, műveleti paraméterek és környezeti paraméterek. Az oldat-paraméterek közé sorolható az oldat koncentrációja, a moláris tömege, a viszkozitása, a vezetőképessége, valamint az emitterhegyen ülő folyadékcsepp felszínén létrejövő felületi feszültség. A műveleti paraméterek közé sorolható az alkalmazott feszültség, az adagolási sebesség, az emitterhegy és a kollektorlemez távolsága, az emitterhegy átmérője, a kollektor anyaga, illetve annak kialakítása. Végezetül a környezeti paraméternek tekintjük a szálképzés során mérhető hőmérsékletet és páratartalmat. Fontos megemlíteni, hogy az egyes paraméterek szignifikánsan függenek egymástól, valamint létezhetnek olyan esetek amikor egy paraméter változtatásával egyszerre több változót is befolyásolunk. Ilyen például a koncentráció-molekulatömeg-viszkozitás esete [62–68].

Oldat-paraméterek

Molekulatömeg, koncentráció és viszkozitás

A címben szereplő három változóból nem vagyunk képesek úgy változtatni egyet, hogy arra ne reagáljon a többi is. Emiatt ezek bemutatása együtt célszerű. A polimer molekulatömege annál nagyobb, minél hosszabb láncú polimert alkalmazunk. A magas molekulatömeg, illetve koncentráció hatással van az oldat viszkozitására, tehát a megfelelő morfológiájú szálak anyagok előállításához a szálásítandó oldatnak megfelelő molekuláris tömeggel és elegendő viszkozitással kell rendelkeznie[69, 70]. A molekulatömeg növelésével a polimer molekulák egy adott térszben nagyobb kiterjedésűek lesznek, nagyobb felülettel lesznek képesek egymással érintkezi, ami a szálképzés során előny, ugyanis a kialakult kohéziós erők miatt állandó és stabil polimersugár képes kialakulni, ami megelőzi a cseppes termék kialakulását. Magasabb molekulatömegű polimerből előállított szálak anyag nagyobb szálátmérővel rendelkezik a kisebb molekulatömegűhöz képest [71]. A koncentráció növelésével a szálak szintén vastagodnak, ugyanis a töményebb oldat vastagabb szálként tud kilépni a Taylor-kúpból[72, 73]. Ennek oka, hogy a koncentráció növekedésével adott térrészbe több polimer molekula kerül, melyek között statisztikailag több, eredőben erősebb kölcsönhatások alakulnak ki, vagyis nő a kohézió. Sikeres szálképzéshez szükség van egy olyan molekulatömeg és koncentráció meghatározására, melyek együttesen elegendő molekuláris kohéziót alakítanak ki. Ez a prekursor elegy viszkozitásban jelenik meg. Ellenkező esetben, ha a paraméterek értéke túl alacsony, akkor az oldatot összetartó kohéziós erők nem elegendők a folyamatos anyagátadáshoz, így nem szálak, hanem csak polimercseppek képződnek. A szálak termék és a polimercseppek kialakulása közti folyamat az *electrospraying*. Másik oldalról, ha a változók értéke túl magas a folyadék nem alakít ki Taylor-kúpot, csepp formában marad az alkalmazott feszültség ellenére[74–78]. Az értékek többkomponensű oldatok esetében is változhatnak, például a viszkozitás értékek fehérjék hatására csökkenhetnek a tiszta polimer oldatkhoz képest[79].

Vezetőképesség

Általánosságban elmondható, hogy a polimer elegyek vezetőképessége megfelel a szálképzés feltételeinek. Néhány polimer estében a vezetőképesség ionizáló sókkal javítható.[59, 80]. Amennyiben a vezetőképesség nő, a termék szálátmérője csökken, ellentétes esetben a

szálak áterője növekszik. Ennek oka, hogy a megnövekedett vezetőképesség növeli a töltéshordozó kapacitást, ami a szálképzés során stabilabb és megnyúltabb folyadéksugárhoz (*jet*) vezet, ez pedig lehetővé teszi a finomabb szálak kialakulását.[63, 68, 81]. A megnövekedett vezetőképesség továbbá simább és egyenletesebb szálmorfológiát eredményezhet. Ezzel szemben az alacsony vezetőképesség szabálytalanságokat és gyöngyök kialakulását eredményezheti a polimer sugár elégtelen nyújtása miatt[82].

Felületi feszültség

Az oldat felületi feszültsége nagy jelentőséggel bír a szálképzés során. Ahhoz, hogy gyöngymentes szálas szerkezetet érjünk el, szükséges a felületi feszültség csökkentése. Abban az esetben, ha az oldat felületi feszültsége megnő, a cseppből kilépő polimersugarak instabillá válnak, aminek következtében a polimer apró cseppekben fog leszakadni az emitterről, vagyis "spraying" alakul ki. Ennek következtében pedig gyöngyös szerkezet jön létre[68].

Műveleti paraméterek

Alkalmazott feszültség

Az alkalmazott feszültség az egyik legfontosabb paraméter a 3.5.1. fejezet felsoroltak közül. Az elektródok között létrehozott potenciálkülönbség nélkül a folyamat nem is valósulhatna meg. A feszültség növelése javítja a sugár és a Taylor-kúp stabilitását, amik elősegítik az egyenletes szálképződést. Ez a fokozott elektrosztatikus erőknek köszönhető, amelyek segítenek leküzdeni a felületi feszültséget. Ha azonban a feszültség túl magas, az instabilitáshoz vezethet, és gyöngyképződést vagy szabálytalan struktúrákat eredményezhet.[63, 72, 83].

Adagolási sebesség

Az adagolási sebesség nagyban befolyásolja a kész termék szálas morfológiáját, illetve az átmérő nagyságát. Az áramlási sebesség növelése általában a szálak átmérőjének növekedéséhez vezet. Ez azért következik be, mert a nagyobb áramlási sebesség vastagabb sugárnyalábot eredményez, ami csak részleges száradáshoz és nagyobb szálak kialakulásához vezethet[83, 84]. Ezzel együtt a sebesség növelésekor a szerkezetben található

hibák száma is növekszik, kritikus küszöbérték feletti áramlási sebességnél gyöngyök képződhetnek az elégtelen oldószerpárolgás miatt. Az áramlási sebesség tekintetében csak küszöbértékeken belüli értékek mellett képes a Taylor-kúp stabilan kialakulni[84, 85].

Emitterhegy és kollektorlemez távolsága (*TCD, tip-collector-distance*)

Az emitterhegy és a kollektorlemez távolsága meghatározza a polimerszál útjának hosszát, ezzel együtt pedig a befolyásolja annak reziduális oldószertartalmát. Növelése nagyobb szálátmérőkhöz vezet. A jelenség annak tulajdonítható, hogy a polimer sugár kevésbé nyúlik, mivel hosszabb utat tesz meg, mielőtt eléri a kollektort, ami lehetővé teszi, hogy több anyag halmozódjon fel és vastagabb szálakat képezzen[86, 87]. Ennek ellenére a nagyobb *TCD* javítja a szálak morfológiájának egyenletességét, viszont túlzott növelése esetén az a sugár nem megfelelő nyújtása és az oldószer elpárolgásának megnövekedett ideje miatt inhomogén morfológiát eredményez [64]. Az optimális távolság berendezésként eltérő, viszont elmondható, hogy laboratóriumi keretek között általánosságban 10 *cm* - 20 *cm* közé esik[88, 89].

Emitterhegy átmérője

Az emitterhegy átmérője meghatározza, hogy mennyi folyadék, milyen sebességgel tud egyszerre belépni a szálképző térbe. Meghatározza a nyomásesés mértékét. A nyomásesés hatására pedig a szűkületet követően a Bernoulli-törvény alapján felgyorsul a folyadék áramlása. Magasabb viszkozitású anyagok esetében célszerű kisebb belső tűátmérővel dolgozni, a fojtáson való átpréselődés szétzilálja a kialakult polimer molekula asszociátumokat, ezzel ideiglenesen csökkentve a viszkozitást, illetve keveredést is előidéz. Általánosságban elmondható, hogy nagyobb belső tűátmérő mellett vastagabb, míg kisebb emitterhegy átmérő mellett vékonyabb szálátmérőket kapunk. Fennálló probléma, nagyobb belső tűátmérő esetén a prekursor elegy beszáradása, ezesetben az emitterhegy részén kialakuló Taylor-kúp nagyobb felülettel érintkezik a levegővel, ami az oldat megszilárdulásához vezethet. A száraz polimer blokádnak képes eldugítani a rendszert, ezzel leállítva a szálképzést. [73, 90].

Kollektor anyaga

A szálképzés során a kollektor gyűjti össze a töltéssel rendelkező szálakat, vagyis vezető elektródaként működik, emiatt az anyagi minősége befolyásolhatja a kész termék morfológiáját. Leggyakrabban alumínium fóliát alkalmaznak kedvező vezetőképessége miatt, viszont ezen kívül több megoldás is létezik. Ilyen például a vezetőképes textíliák[68], valamint drótháló és papír [91] alkalmazása. A korábban feltüntetett módszereket gyakran alkalmazzák alumíniumfóliával együtt.

Kollektor kialakítása

A szálképzés során használt kollektor kialakítására számos eltérő megoldás ismeretes, ezek közül a legelterjedtebbek a sík lemez vagy a forgó dob. Korábbi kutatások alapján elmondható, hogy a gyűjtőfelület kialakítása, valamint mozgása, befolyásolhatja a termék szálátmérőjét. A forgó dob alacsonyabb átlagos szálátmérőket és szórást képes elérni, mint a mozdulatlan lemez, mindemellett egy forgási sebességet meghaladva képes a nanoszálak orientációját is befolyásolni[92].

Kollektorlemez mérete

A kollektor lemez vagy dob mérete befolyásolja azt a felületet, amin a szálképzés során elkészült nanoszálak képesek megtapadni. A nagyobb felület befolyásolhatja a kialakult töltések eloszlását. A gyűjtőfelület mérete által befolyásolt tényezők más, magasabb rendű változóktól is függenek, mint például a feszültség vagy az oldat koncentrációja. Emiatt a szálképzés folyamatában alacsony jelentőséggel bír.[93].

Környezeti paraméterek

Hőmérséklet

Az elektrosztatikus szálképzés folyamatában rengeteg olyan paraméter található, ami függ a hőmérséklettől, így kijelenthető, hogy kulcsszerepet játszik a technológiában. Hatással van a szálképzés során kialakuló szilárd polimer nanoszálak kristályossági fokára, a polimerlánc konformációjára vagy az oldat viszkoelasztikus tulajdonságaira, ezáltal a szálképzés stabilitására[94]. A hőmérséklet növelésével a szálátmérők bizonyos pontig csökkennek, a

megváltozott viszkozitási viszonyok és a megnövekedett párolgás miatt[95, 96].

Páratartalom

A szálképzés során az elkészült termék morfológiáját tekintve a páratartalom is jelentős szereppel bír. Szálképzés során a polimer *jet* száradási karakterisztikája a környezeti páratartalom függvényében jelentősen változhat. Magas páratartalom esetén a polimeroldat nem veszíti el nedvességtartalmát, így az nem szilárdul meg. Ennek következtében gyöngyök, "egybefolyt" szegmensek jelenhetnek meg a szálas terméken. Emellett a magas páratartalommal előállított nano és mikroszálak vastagabbak, szerkezetük durvább és porózusabb, gyapjú szerű terméket vagy nanoszöveteket hoznak létre. Alacsony páratartalom esetén a szálas szerkezetek átmérője alacsonyabb, szerkezetük simább, viszont azok előállítása lassabb[68, 97–99].

4. Célkitűzés

Kísérleteink során célunk egy olyan új, elektrosztatikus szálképzéssel létrehozott, nanoformulált DAO-tartalmú enzimkészítmény kifejlesztése, ami a későbbiekben alapjául szolgálhat egy piaci forgalomban kapható formulációnak.

Munkánk során részletesen vizsgálni kívánjuk a szálképzéshez használt prekursor anyagok viszkozitását, illetve azon szálképzési paramétereket (molekulatömeg, koncentráció, adagolási sebesség, feszültség, emitter-kollektor távolság, emitter átmérő stb.), amikkel a legkisebb felszültségű stabil munkapontban PVA nanoszálak létrehozására vagyunk képesek.

Célunk az előállított nanoszálak szerkezetek rugalmassági tulajdonságainak vizsgálata, valamint azok morfológiájának jellemzése pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM).

Raman spektroszkópiával szeretnénk igazolni, hogy az enzim sikeres csapdázását a nanoszálakban.

Célunk egy irodalmi analógián alapuló módszer továbbfejlesztése, ami alkalmas a DAO aktivitásának szelektív mérésére. A módszert felhasználva célunk a DAO tartalmú nanoszálak készítmények biokatalitikus aktivitásának meghatározása és összevetése a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható DAO tartalmú termékekkel.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált anyagok

Sertésveséből izolált diamino-oxidáz (*diamine-oxidase enzyme from porcine kidney*), Mowiol[®] Poli(vinil-alkohol) 3-88 (24 *kDa*), Mowiol[®] Poli(vinil-alkohol) 4-88 (31 *kDa*), Mowiol[®] Poli(vinil-alkohol) 8-88 (67 *kDa*), Mowiol[®] Poli(vinil-alkohol) 18-88 (130 *kDa*), Mowiol[®] Poli(vinil-alkohol) 40-88 (205 *kDa*), 4-Amino-*N,N*-dimetilanilin, 4-aminoantipirin, putreszcín-dihidroklorid, kálium-dihidrogén-foszfát, nátrium-dihidrogén-foszfát, nátrium-hidroxid, izopropanol a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) termékei. Tormaperoxidáz (*Horseradish peroxidase enzyme*) az Apollo Scientific terméke. A mérések során használt víz minden esetben a Millipore Milli Q víztisztító rendszer használatával készült (Bradford, MA, USA).

5.2. Prekurzor elegyek elkészítése

Polimer prekursor elegyek készítése

A nanoszálak előállításához használni kívánt különböző molekulatömegű szilárd poli(vinil-alkohol) pelleteket (5.1. fejezetben leírt Mowiol[®] készítmények) vízben oldottuk fel a kívánt koncentrációkra. A tiszta polimer nanoszálak elkészítéséhez PVA elegyek 5, 10, 15, 20, 25 *m/m%* koncentrációban készültek el, míg az eznimtartalmú nanoszálakhoz 10, 15, 20, 25, 27 *m/m%* koncentrációjú poli(vinil-alkohol) elegyeket készítettünk. A pelletek feloldását 60 °C hőmérsékleten végeztük síkrázógépben (Heidolph Instruments Vibramax 100, Schwabach, Németország), mágneses keverőben, illetve a viszkózusabb elegyek esetén ultrahangos fürdő segítségével.

DAO tartalmú polimer prekursor elegyek készítése

Az enzim rögzítéséhez 5.2. fejezetben előállított prekursor elegyek, annyi DAO oldatot (25 *mg/mL*, foszfát puffer: *pH*=6,5, 70 *mM*) adtunk, hogy az így kapott elegyből előállított szálak katalizátor 10 tömegszázalékban tartalmazza a kívánt enzimet. Az általunk választott enzimrögzítési technika a csapdázás volt. Ennek érdekében a DAO oldatokat a polimer elegy kihűlését (T_j37°C) követően az elegybe kevertük. A kapott

prekurzor elegyeket síkrázógéppel, másghneses keverővel 37 °C hőmérsékleten 2 óra alatt homogenizáltuk.

5.2.1. Prekurzor elegyek viszkozitásának vizsgálata

A prekurzor elegyek dinamikai viszkozitásának meghatározását Anton Paar Physica MCR 301 Rheometer (Anton Paar GmbH, Gratz, Austria) segítségével végeztük. Minden mérés alkalmával 100 μm mennyiségű mintát vizsgáltunk. Minden mintából 3 párhuzamos mérést hajtottunk végre. A készülék mérőterét minden minta esetében 25 °C hőmérsékleten termosztáltuk. A mérések között a mérőfej (CP 25-1, 25 mm/1 átmérőjű kúpos lemez) és a reométer lapja desztillált vízzel és izopropil-alkohollal lett megtisztítva.

5.3. PVA nanoszálak előállítása

A 5.2. fejezetben elkészített prekurzor elegyekből horizontális elrendezésű elektrosztatikus szálképző berendezés (SpincubeBASE, Spinsplit, Budapest, Magyarország) segítségével nanoszálakat állítottuk elő. Az optimális szálképzési paraméterek a különböző molekulatömegű polimerek esetében egyesével határoztuk meg. Az alkalmazott adagolási sebességet (jellemzően 1;U;8 $\mu\text{L}/\text{perc}$) és az emitterre kapcsolt feszültséget (jellemzően 15;U;21 kV) a különböző polimer elegyek esetében a függelék 9. és 10. táblázata tartalmazza. A táblázatokban azok a molekulatömegek és koncentrációk szerepelnek, amik szálképzése lehetséges volt. A szálképzés során 35-42% relatív páratartalom és 20-23 °C hőmérséklet volt mérhető. A szálképzés során az kollektorlemez és az emitter távolsága 20 cm volt. A prekurzor elegyeket fecskendőpumpával (tefloncsövön keresztül) juttattuk el a G20 átmérőjű emitterig.

5.3.1. Nanoszálak morfológiai vizsgálata

A morfológiai vizsgálatokat JSM JEOL-5500LV SEM-EDS (Tokió, Japán) pásztázó segítségével hajtottuk végre. A mintákat a mérés előtt porlasztó készülékkel (Polaron sc760 mini sputter coater, Thermo VG Microtech, Waltham, MA, USA) néhány atom vastagságban arany réteggel vontuk be Argon-plazma segítségével (10 mA, 180 mp), hogy azok megfelelő vezetőképességgel rendelkezzenek. A mérés során nagyvákuum üzemmódot használtunk. A felvételek elkészítésekor 1000 $\times$, 2000 $\times$, 2500 $\times$ és 5000 $\times$ nagyítást alkal-

maztunk az adott szálak termék igényeinek megfelelően. Az elkészült felvételeket, az ImageJ 1.53r digitális kép kiértékelő programot használtuk (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A program segítségével minden minta esetében 100 mérési pont alapján meghatározzuk a nanoszálak átlagos átmérőjét és azok szórását.

5.3.2. Raman spektroszkópia

A nanoszálak Raman térképezést Thermo Fisher DXR diszperzív Raman készülékkel végeztük (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), amely CCD kamerával és 780 nm-es hullámhosszon működő diódalézerrel volt felszerelve. A minta előkészítéséhez a nanoszálakat összehajtottuk, majd egy tárgylemezre erősített rozsdamentes acél mintatartóba helyeztük. A Raman kémiai térképet különböző nanoszálak esetén $148 \times 208 \mu m$ méretű felületről nyertük $4 \times 4 \mu m$ felbontással, miközben 24 mW teljesítményű lézert alkalmaztunk $50 \mu m$ résméret mellett. A kémiai térkép spektrumát 2 mp expozíciós idővel és 6 mp felvételi idővel vettük fel, $3300-200 cm^{-1}$ Raman eltolódás tartományban, kozmikus sugárzás és fluoreszcencia korrekciókkal.

5.3.3. Rugalmassági modulus meghatározása

Az anyagok rugalmasságának meghatározásához, az elkészített szálak termékekből $3 \times 1 cm$ területű téglatesteket vágunk ki, majd ezekről fénymikroszkóp segítségével $40\times$ nagyításban képet készítettünk (Függelék: 25. ábra). A nanoszálak szövet keresztmetszeti inhomogenitásának korrekciója miatt minden vizsgált polimer esetében 3 képet készítettünk, majd ezek után digitálisan meghatároztuk a szálak anyagok vastagságát, amihez a ImageJ 1.53r digitális kép kiértékelő programot használtuk. A kiértékelés során képenként 10 mérési pontot alkalmaztunk. A nanoszálak anyagból felépülő téglatesteket $4 \times 4 cm$ méretű papírkeretbe rögzítettük. Az előkészített mintákon Instron 5543 egytengelyes szakítógépet (Norwood, MA, USA) segítségével szakítóvizsgálatot végeztünk el a minta végleges tönkremenetelig. A meghatározott értékek alapján a rugalmassági (Young) modulus a szakítógörbe kezdeti felfutó szakaszán az alábbi összefüggés alapján számolható:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F \times L_0}{\Delta L \times A} \quad (1)$$

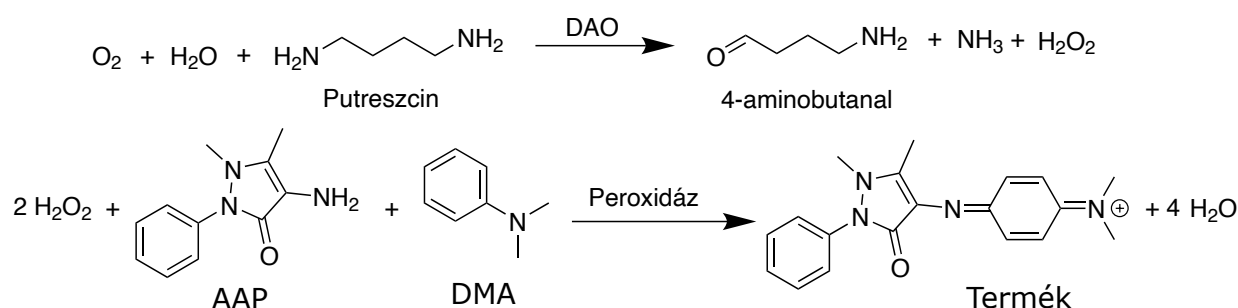
Melyben σ , a terhelés [Pa]; ϵ , a fajlagos megnyúlás [-]; F , a próbatestre ható erő

$[N]$; A , a próbatest felülete $[m^2]$; L_0 , a próbatest kezdeti hossza $[m]$; ΔL , a megnyúlt és a kezdeti hossz különbsége, vagyis a kezdeti hossz megváltozása szobahőmérsékleten $[m]$.

5.4. DAO enzimatisz aktivitásának meghatározása

5.4.1. Irodalmi módszer alkalmazhatóságának igazolása

Az aktivitás méréshez a 5. ábrán bemutatott reakciót alkalmaztuk. Ehhez putreszcint dihidrokloridot (szubsztrát), peroxidáz-enzimet, N,N -dimetilanilin és 4-aminoantipirint oldatát készítettük el. A reagensekből oldatot készítettünk, amiknek összetétele a 3. táblázatban található.



5. ábra. A modellreakció egyenlete, ahol a putreszcint a diamino-oxidáz (DAO) szubsztrátja, melynek oxidatív terméke a 4-aminobutanal, N,N -dimetilanilin (DMA), 4-aminoantipirint (AAP) segéd reakcióval a DAO reakció által képződő H_2O_2 a peroxidáz enzim a N -(2,3 dimetil-1-fenil-5-pirazon)- N,N' dimetilamin- p -benzokinon diiminonium ion (Termék) fotometriás eljárással szelektíven detektálható ($\lambda = 544\text{nm}$) terméket adja [43]

Az eljárás validálása érdekében elsőként kis reakciótérfogaton hajtottuk végre a reakciót, megmérve az anyag teljes abszorbancia spektrumát. Az mérést fotometriás eljárással egy Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, USA) UV-Vis spektrofotométerrel végeztük el. A készülékhez Greiner Bio-One 96 well UV-Star F-bottom Full plate microplate-et használtunk (Greiner Bio-One Hungary Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország). A lemez zsebeibe (*well*) bemért $290 \mu\text{L}$ térfogatú reakcióelegy a 4. táblázatban foglaltak alapján lett összeállítva. A mérést 30 *percen* keresztül 37°C hőmérsékleten végeztük. Az abszorbancia értékek felvétele 30 *perc* után történt $300\text{-}800 \text{ nm}$ hullámhossztartományon. A termékképződést 544 nm hullámhosszon detektáltuk.

3. táblázat. Diamino-oxidáz aktivitásának méréséhez használt reagens oldatok bemért mennyisége. *A mérések során különböző mennyiségű és típusú enzimmészítményeket alkalmaztunk. Egy adott reakció során csak az egyik típus került a reakcióelegybe. A reakciók során reakciónként egy puffer alkalmaztunk, ami foszfát puffer (70 mM; pH = 6,5) vagy intesztinoszolvens puffer (50 mM, pH = 6,2, 5. táblázat) lehetett.

Komponens	Bemért anyagok mennyisége
Putreszcin oldat	4,44 mg Putreszcin dihidroklorid 1 mL puffer
Peroxidáz oldat	1 mg Peroxidáz enzim 1 mL puffer
4-aminoantipirin / N,N-dimetilanilin oldat	0,8 mg 4-aminoantipirin 2 µL N,N-dimetilanilin 10 mL puffer
Diamino-oxidáz oldat*	5 mg DAO v. 10 mg nanoszálal enzimmészítmény v. 0,3 mg enzimmtartalmú DAOSIN/DAOFOOD+ 1 mL puffer

4. táblázat. A micoplate lemezbe bemért oldatok mennyisége

Oldat neve	Bemért mennyiség (µL)
Putreszcin	10
Peroxidáz	10
4-aminoantipirin/ N,N-dimetilanilin oldat	20
DAO oldat	50
Puffer (Foszfát puffer, 70 mM, pH=6,5)	200

A sikeres validáció után végrehajtottuk a reakciót az általunk létrehozott 3. táblázatban foglalt nanoszálás enzim mennyiséggel. Minden mérést 3 ismétlésben végeztünk el, valamint a korrekció érdekében minden esetben megmértük az enzimet nem tartalmazó oldatok aktivitását is.

5.4.2. Nanoszálás DAO készítmények aktivitásának mérése

Az általunk használt intesztinoszolvens puffer összetétele a 5. táblázatban látható.

5. táblázat. Intesztinoszolvens pufferhez használt anyagok és azok bemért mennyisége.

Komponens neve	Bemért mennyiség
Kálium dihidrogén foszfát	680 <i>mg</i>
Nátrium hidroxid	92 <i>mg</i>
Ioncserélt víz (Milli-Q)	100 <i>mL</i>

A 5.4.1. fejezet alapján az aktivitás mérést elvégeztük a 3. táblázatban foglalt szálás anyag mennyiség ötszörösével foszfát puffer (70 *mM*; $pH = 6,5$) és intesztinoszolvens puffer (50 *mM*, $pH = 6,2,5$. táblázat) környezetben, azok összehasonlítása végett. Minden mérést 3 ismétlésben hajtottunk végre. A reakció hossza 30 *perc* volt, 37 °C hőmérsékleten.

5.4.3. Enzimkészítmények összehasonlítása

Az aktivitás vizsgálat során összehasonlítottuk az tiszta liofilizált enzimet, az általunk létrehozott nanoszálás enzimkészítményt, valamint a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható formulált DAO tartalmú enzimkészítményeket (DAOSIN, DAOFOOD+). A készítmények összehasonlítása során a reakciótérfogatot 3 *mL* térfogatra emeltük. Ennek összetétele a 6. táblázatban látható. A méréseket síkrázógépben 37 °C hőmérsékleten 30 percig végeztük. Mintavételezés a reakció 30. *percénél* történt, ami során 100 μL térfogatú mintát vettünk ki az elegyből, majd azt Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, USA) UV-Vis spektrofotométerrel elemeztük.

6. táblázat. Diamino-oxidáz biokatalitikus aktivitás méréséhez használt reakcióelegy 3 mL reakciótérfogattal.

Oldat neve	Bemért mennyiség (μL)
Putreszcin	104
Peroxidáz	104
4-aminoantipirin/ N,N-dimetilanilin oldat	207
DAO oldat	520
Puffer (Intesztinoszolvens puffer, 50 mM, pH=6,2)	2590

A kereskedelmi forgalomban kapható minták esetében a reakcióelegy tartalmazta a 6. táblázat összetevőin kívül a dörzsmozsárban porított és homogenizált tablettákat is. A DAOSIN étrendkiegészítő esetében az egész tablettá tartalma belekerült a reakcióba. Ezzel ellentétben a DAOFOOD+ lágykapszulában a 6. ábrán látható 4 különálló tablettá található, ami a tablettá felnyitása után szeparálható. Ebben az esetben csak a sertésvese izolátumot tartalmazó tablettákat porítottuk és homogenizáltuk, majd adtuk hozzá a reakcióelegyhez.



6. ábra. DAOFOOD+ étrendkiegészítő tablettá felépítése.

5.4.4. Enzimaktivitás számítása

A 5.4. fejezetben leírtak alapján meghatározott abszorbancia értékek felhasználásával, a különböző enzim koncentrációk a Lambert–Beer-törvény alapján számolható:

$$C_e = \frac{A}{\epsilon \times l} \left[\frac{\text{mol}}{L} \right] \quad (2)$$

Melyben C_e az enzim koncentrációja [$\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$], A a mért abszorbancia [AU], ϵ a moláris extinkciós koefficiens [$L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$], l az optikai úthossz [cm].

A meghatározott koncentráció alapján a konverzió, a fajlagos specifikus aktivitás, a biokatalitikus aktivitás és az aktivitás hozam az alábbi egyenletek alapján számítható:

$$c = \frac{C_e}{n_{AAP}} \times 100 [\%] \quad (3)$$

Melyben c a konverzió [%], C_e az enzim koncentrációja, n_{AAP} a reakcióban szereplő limitáló tényező, vagyis az aminoantipirin kezdeti anyagmennyisége.

$$U_B = \frac{c [\%] \times n_{AAP} [\mu\text{mol}]}{t [\text{perc}] \times m_{ek} [g]} \left[\frac{U}{g} \right] \quad (4)$$

Melyben U_B a fajlagos specifikus aktivitás, c a konverzió [%], n_{AAP} a reakcióban szereplő aminoantipirin kezdeti anyagmennyisége [μmol], t a reakcióidő [perc], m_{ek} a felhasznált enzimkészítmény vagy tabletta tömege [g].

$$U_E = \frac{c [\%] \times n_{AAP} [\mu\text{mol}]}{t [\text{perc}] \times m_e [g]} \left[\frac{U}{g} \right] \quad (5)$$

Melyben U_E a biokatalitikus aktivitás, c a konverzió [%], n_{AAP} a reakcióban szereplő aminoantipirin kezdeti anyagmennyisége [μmol], t a reakcióidő [perc], m_e a felhasznált enzim tömege [g].

$$Y_a = \frac{U_E}{U_{E(nativ)}} \times 100 [\%] \quad (6)$$

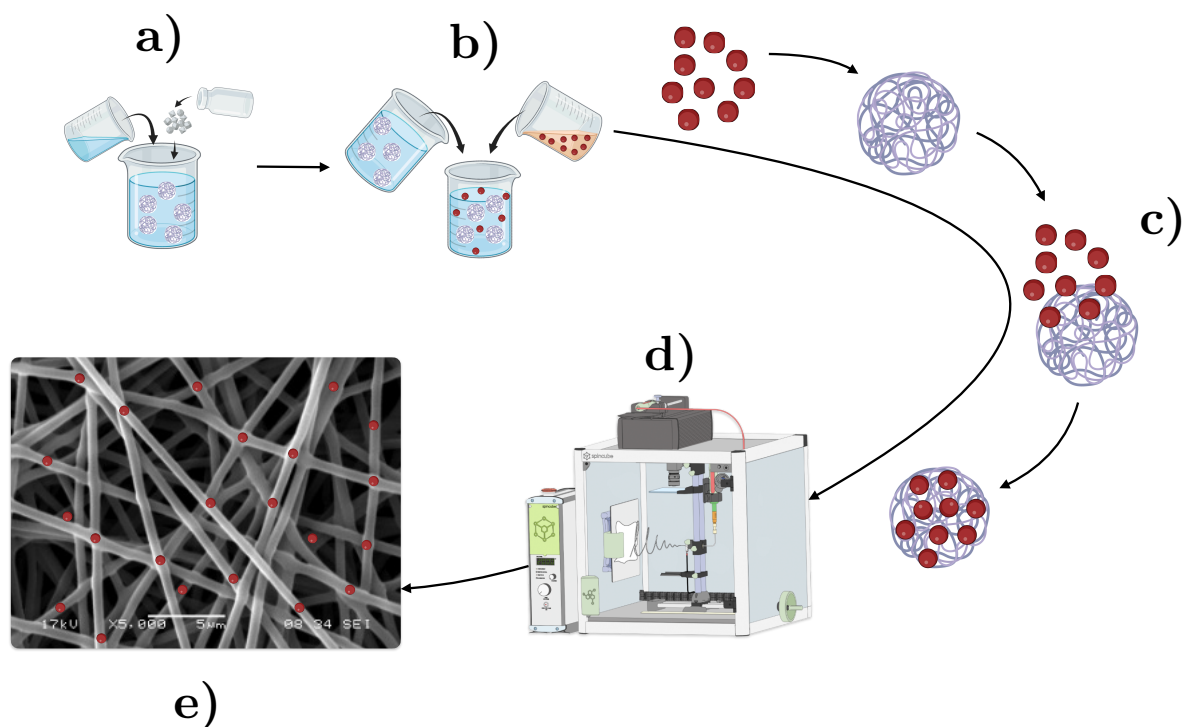
Melyben Y_a az aktivitás hozam, U_E az adott komponens fajlagos specifikus aktivitása [$U \times g^{-1}$], $U_{E(nativ)}$ a tiszta enzim oldat fajlagos specifikus aktivitása [$U \times g^{-1}$].

6. Eredmények

6.1. Elektrosztatikus szálképzés

Munkánk során egy nanoszálak morfológiájú enzim-hordozó létrehozása céljából elvégeztük a szálképzés optimalizálását, a prekursor elegy és a szálképzési folyamat esetében. Kísérleteink különböző molekulatömegű poli(vinil-alkoholból) (24, 31, 67, 130, 205 *kDa*) előállított eltérő koncentrációjú (5, 10, 15, 20, 25 *m/m%*) elegyek tesztelésével kezdődtek, mely során vizsgáltuk az elegyek viszkozitását, szálképezhetőségét és az előállított nanoszálak szövetek morfológiáját. A kísérletek során célunk a megfelelő szerkezettel rendelkező technikailag könnyen, gyorsan és stabilan előállítható PVA hordozó megtalálása volt.

Az enzim nanoszálba történő rögzítése elektrosztatikus szálképzés alkalmazásával több lépésben érhető el. Ezt a folyamatot mutatja be a 7. ábra. Mindenekelőtt egy homogén eloszlású egyenletes polimer prekursor elegy készítése szükséges **(a)**), ugyanis ez biztosítja, hogy későbbiekben a szálképzési folyamat stabil legyen, valamint, hogy a hozzákevert enzimek **(b)**) is homogén eloszlást mutassanak a polimer mátrixban. Az oldatban a diffúzió és a polimer láncok, valamint a fehérjék között kialakuló kölcsönhatások eredője képpen a fehérjemolekulák a polimer molekulák láncai közé diffundálnak **(c)**). A szálképzés során a polimer láncok az elektromos térben orientálódnak, szoros mátrixot alkotnak fehérje körül **(d)**). Ennek hatására fehérje fizikailag rögzül a folyamat végére megszilárduló nanoszálak belsejében **(e)**). A kialakult nanoszálak szerkezet megvédi az enzimet az esetleges sérülésektől, valamint óvja a megváltozott környezeti paraméterekkel szemben (mint például a hőmérséklet vagy a megváltozott kémhatás) [100].

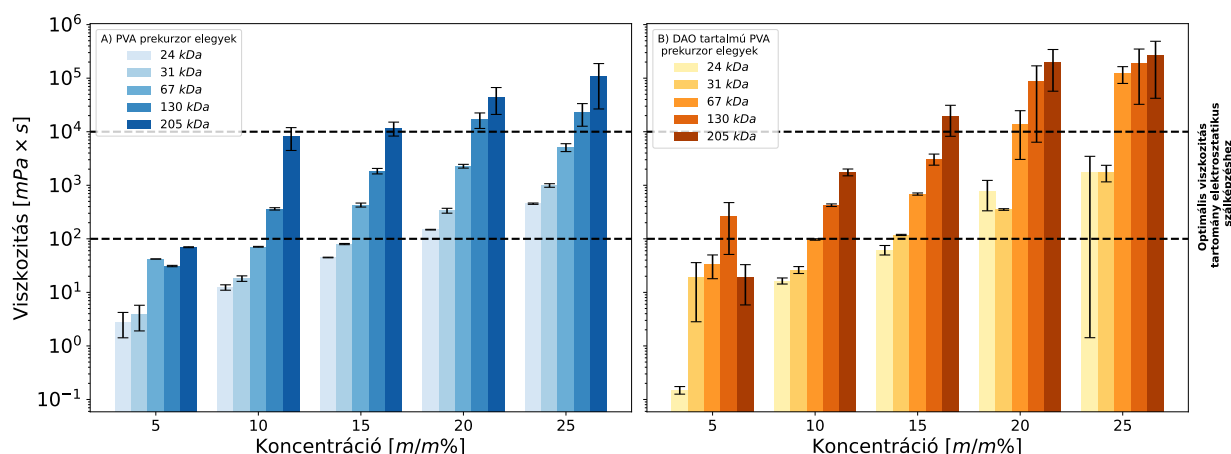


7. ábra. DAO csapdázásának folyamata elektrosztatikus szálképzés alkalmazásával. **a)** Polimer prekursor elegy elkészítése, **b)** Prekursor elegy és az enzimodat elkeverése, **c)** Az enzim molekulák és a polimer mátrix keveredése, **d)** Elektrosztatikus szálképzés, **e)** A folyamat végén létrejövő, enzim tartalmú nanoszál termék.

6.1.1. Prekursor elegyek viszkozitásának vizsgálata

Az elektrosztatikus szálképzés szempontjából kiemelkedő jelentőséggel bír a prekursor elegy viszkozitása. Szakirodalmi adatok szerint az sikeres és stabil szálképzéshez szükséges viszkozitás $10^2 \text{ mPa} \times \text{s}$ és $10^4 \text{ mPa} \times \text{s}$ közé esik [101], így várhatóan a tartományba eső elegyek lesznek számunkra használhatóak. A vizsgált prekursor elegyek viszkozitás értékei a 8. ábrán láthatók.

A kapott értékek alapján a következő megállapításokat tehetjük. Az enzimet tartalmazó poli(vinil-alkohol) elegyek viszkozitása átlagosan magasabb a tiszta polimer elegyeknél. Mindkét prekursor elegyekről elmondható, hogy túlnyomórészt a mért viszkozitás értékek monoton növekvő tendenciát követnek, a molekulatömeg függvényében. Ez a jelenség azal indokolható, hogy a molekulatömeg növelésével nő a polimerlánc hossza. A nagyobb

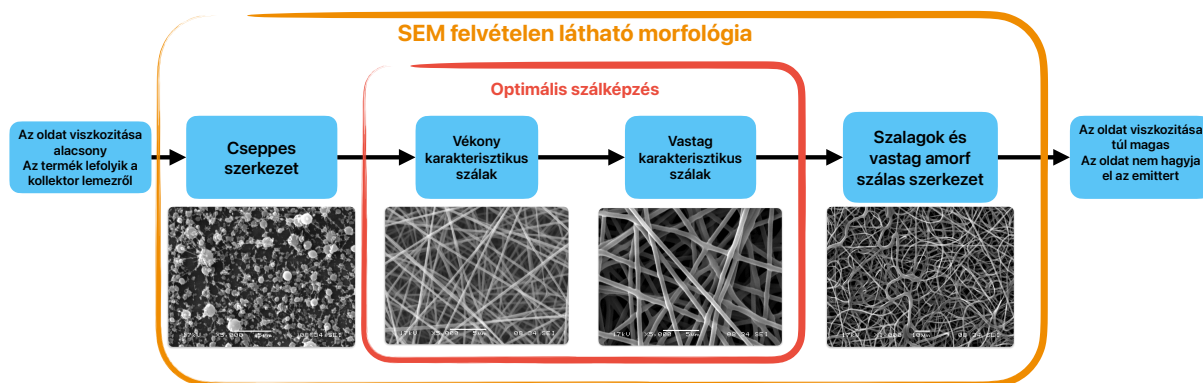


8. ábra. **A)** Diamino-oxidázt nem tartalmazó tiszta PVA és **B)** DAO tartalmú polimer elegyek reológiai vizsgálat során meghatározott dinamikus viszkozitás értékei [$mPa \times s$]. A vizsgálatot Anton Paar Physica MCR 301 Rheometer (Anton Paar GmbH, Gratz, Austria) segítségével végeztük, 25 °C hőmérsékleten. Minden mérést három ismétlésben végeztük. Szaggatott vonal jelzi azt a szakirodalomban fellelhető [101] optimális viszkozitás tartományt, amiben az elektrosztatikus szálképzés stabil.

kiterjedésű között statisztikusan több és eredőben nagyobb molekuláris összetartó erő figyelhető meg, ami alapján az elegyek viszkozitása nő. Továbbá elmondható, hogy a mért értékek szórásában több helyen kiugró értékek tapasztalhatók a magas molekulatömegű és koncentrációjú enzim tartalmú poli(vinil-alkohol) elegyek esetében. Ennek oka lehet, hogy az oldat összeállítása során a polimer oldat és az enzim oldat keverése tökéletlen volt, inhomogén oldat alakult ki, ehhez hozzájárult az is, hogy a polimer és az enzim elkeverése során nem alkalmazhattunk magas hőmérsékletet, hiszen ez az enzimaktivitás csökkenéséhez vezetett volna. Megemlítendő, hogy az enzimtartalmú 130 kDa és 205 kDa molekulatömegű 20% és 25% koncentrációjú elegyek esetében az enzimek beoldása jelentős komplikációkkal jár. A megnövekedett dinamikus viszkozitás a diffúzió csökkenéséhez vezet, az oldat gélesedik, ami után melegítés nélkül az enzim csak részlegesen tud eloszlani az elegyben. A körülményes oldatbavitel miatt ezeket a variációkat elvetettük a lehetséges prekursorok listájáról.

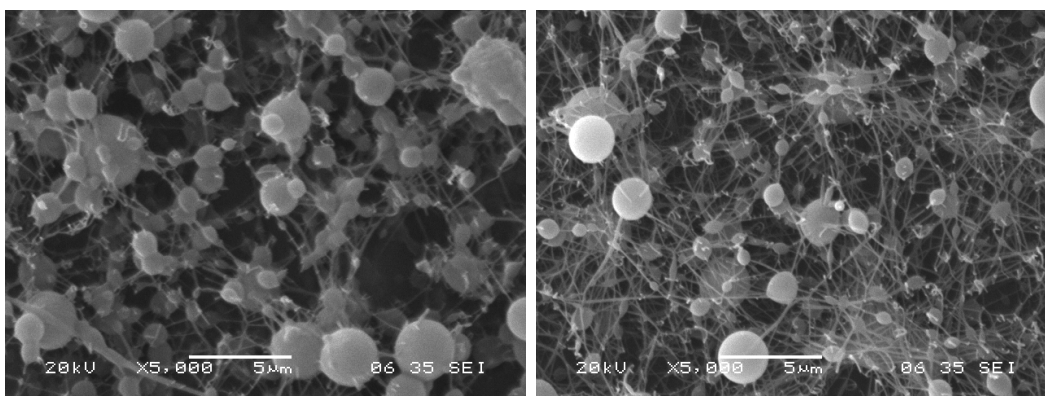
6.2. Nanoszálak morfológiai vizsgálata

Az elektrosztatikus szálképzéssel létrehozott készítmények morfológiája a 9. ábrán látható.



9. ábra. Elektrosztatikus szálképzés során lehetségesen kialakuló morfológiai szerkezetek az oldat koncentrációjának, a viszkozitásának és az alkalmazott PVA molekulatömegének növelése függvényében.

A szálképzés során a függelék 9. és a 10. táblázatban foglalt koncentrációkból készült vizsgálható minta. Ennek oka lehet, hogy kis molekulatömegű poli(vinil-alkoholból) készült, alacsony koncentrációjú elegyekben (például 8. ábra PVA 24, 31 kDa 5, 10, 15 $m/m\%$) a molekulákat összetartó erők nem voltak képesek Taylor-kúp kialakítására. Ennek oda, hogy az emittert elhagyó folyadékáram a hiányzó kohézió miatt nem volt folyamatos, a polimer kisebb aggregátumok formájában közelítette meg a kollektor lemezt. Ennek következtében az emittert elhagyó polimer nem szálakra, hanem inkább cseppekre, szálakkal összekötött cseppekre, úgynevezett gyöngysorra (*bead*) hasonlító szerkezetet alakított ki. A szálképzésre jellemző, hogy ilyen esetekben a Taylor-kúp stabilitása esetleges, a kialakult kúp váratlanul összeomolhat, a szálképzés közben "*spraying*" alakulhat ki. Ilyen esetek láthatók a függelék 21. ábrájának SEM felvételein. Ezek a szerkezetek inhomogének, változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, emiatt előállításuk nem jól szabályozható, így ezeket nem tekintjük potenciális hordozónak.



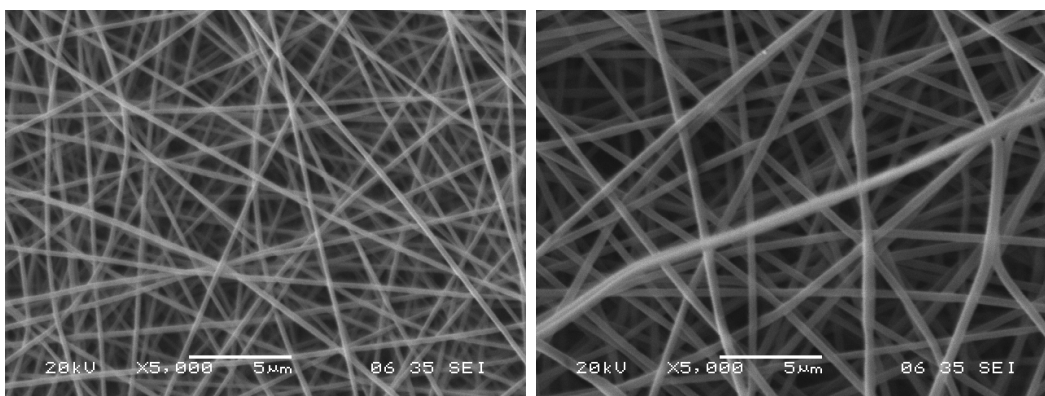
(a) PVA+DAO 24 *kDa* 20%

(b) PVA 31 *kDa* 15%

10. ábra. SEM felvételek alacsony koncentrációjú és alacsony molekulatömegű poli(vinil-alkoholból) készült, enzimet tartalmazó nanoszálakról elektrosztatikus szálképzés után 5000x nagyításban.

A prekursor koncentrációjának és a PVA molekulatömegének növelésekor a képződött szövetek szálak formát vett fel és a szálképzés alatt egyenletesen jött létre. Ilyen koncentrációkon képesek vagyunk karakterisztikus szálak létrehozására akár nagy mennyiségben is. A szálképzés során a Taylor-kúp a folyamat teljes hossza alatt stabil. Ilyen szálak képletek láthatók a függelék 22. ábrájának SEM felvételein.

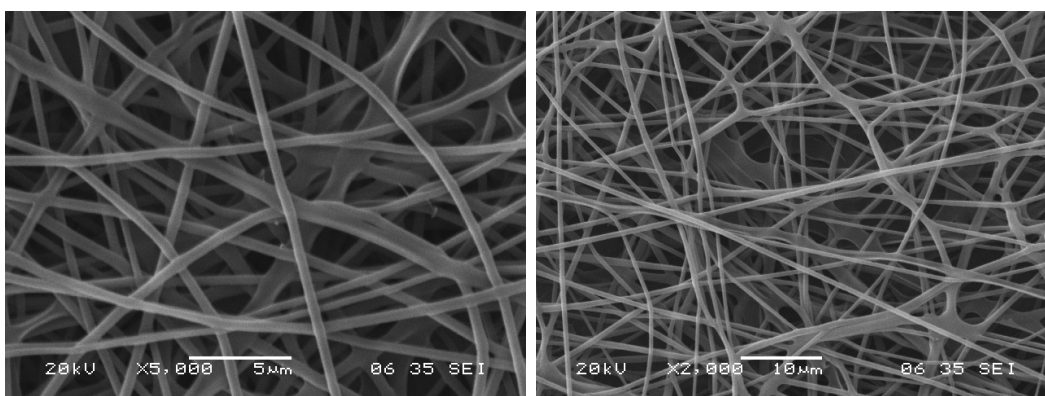
Amennyiben tovább növeljük a molekulatömeget és a koncentrációt a szövetek megtartja a szálak szerkezetét, viszont azok morfológiája változatos és rendezetlen lesz. Szalagra (*ribbon*) hasonlító vagy amorf polimer szerkezetek jelennek meg, amik sokkal vastagabbak, mint az alacsonyabb koncentrációval rendelkező oldatból készült nanoszálaké. A rendezetlen szerkezet és a lecsökkent felület miatt a függelék 23. ábráján látható, és az azokhoz hasonló szerkezetek, a polimer cseppekhez hasonlóan szintén kerülendők és nem tekinthetők potenciális hordozónak.



(a) PVA 130 *kDa* 10%

(b) PVA 130 *kDa* 15%

11. ábra. SEM felvételek enzimet tartalmazó poli(vinil-alkohol) nanoszálakról elektrosztatikus szálképzés után 5000x nagyításban.



(a) PVA+DAO 205 *kDa* 10%

(b) PVA+DAO 205 *kDa* 15%

12. ábra. SEM felvételek magas molekulatömegű poli(vinil-alkoholból) és magas koncentrációjú oldatból készült, enzimet tartalmazó nanoszálakról elektrosztatikus szálképzés után 5000x és 2000x nagyításban.

Az enzimmentes polimerekhez hasonlóan, az enzimtartalmú szálak esetében is megjelennek a 9. ábrán bemutatott morfológiai jellemzők. Ezek a szerkezetek a 10., 11., 12. ábrákon láthatók. Ellentétben az tiszta polimert használó szálképzéssel, az enzimes szálképzésről elmondható, hogy kevésbé stabil, Taylor-kúpja hajlamosabb a spontán összeomlásra, így ebből kevesebb értékelhető minta készült.

6.2.1. Szálképezhetőség átfogó értékelése (*Spinning-score*)

A nanoszálak szálképezhetőségének értékelésére egy 4 szintű szubjektív skálát hoztunk létre. A térkép a szálképezhetőség eredményességét és stabilitását reprezentálja. A mérések során minden szálképzést 4 kategóriába soroltuk, a kategóriákat pedig színkódoltuk.

: A szálképzés során az oldat viszkozitása túlságosan alacsony vagy túlságosan magas volt, ennek következtében a szálképzés nem volt lehetséges. Taylor-kúp nem alakult ki.

: A szálképzés során tapasztalható termék képződése. A rendszer nem stabil, a Taylor-kúp gyakran leszakad, helyenként *spraying* tapasztalható. A termék nem feltétlenül vizsgálható pásztázó elektronmikroszkóppal.

: A szálképzés során a rendszer stabilitása nagyobb, a Taylor-kúp alkalmanként leszakad, a szálképzés újraindul. Az eljárás karakterisztikus szálak terméket eredményez kis mennyiségben.

: A szálképzés során a rendszer stabil, nem igényel folyamatos beavatkozást, magára hagyható. A Taylor-kúp nem szakad le a szálképzés ideje alatt. Az eljárással nagy mennyiségű karakterisztikus szálak termék állítható elő.

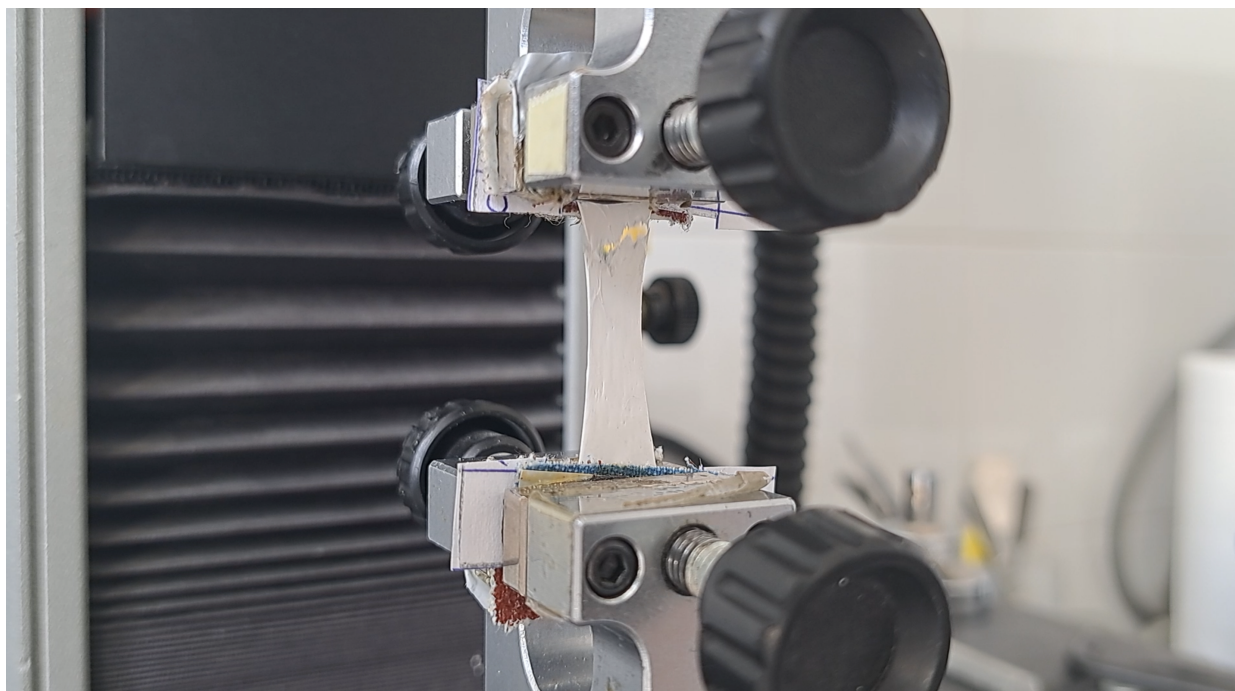
A SEM felvételek digitális kiértékelése során kapott szálátmérő értékeket a 7. táblázat tartalmazza. Az eredmények alapján elmondható, hogy a kiindulási kombinációk töredéke alkalmas nanoszálak formálására. A sikeres nanoszálak átmérője mindkét esetben hasonló tartományba esik. Így kijelenthető, hogy az enzim jelenléte nem befolyásolta jelentősen a szálak átmérőjét. A koncentrációk és a molekulatömegek növekedésével a szálátmérők átlagos nagysága és annak szórása is nőtt, ami egyre változatosabb, valamint rendezetlenebb szerkezeti mátrixra utal.

7. táblázat. Polimer minták szálképezhetőségi táblázata a szálképezhetőség eredményességét és stabilitását, valamint digitális kiértékelés után kapott átlagos szálátmérőket $[nm]$ reprezentálja.  → Az oldat szálasítása technológiai akadályok miatt nem lehetséges.  → A szálképzés során tapasztalható termék képződése. A rendszer nem stabil, a Taylor-kúp gyakran leszakad, helyenként *spraying* tapasztalható. A termék nem feltétlenül vizsgálható pásztázó elektronmikroszkóppal.  → A szálképzés során a rendszer stabilitása nagyobb, a Taylor-kúp alkalmanként leszakad, a szálképzés újraindul. Az eljárás karakterisztikus szálas terméket eredményez kis mennyiségben.  → A szálképzés során a rendszer stabil, nem igényel folyamatos beavatkozást, magára hagyható. A Taylor-kúp nem szakad le a szálképzés ideje alatt. Az eljárással nagy mennyiségű karakterisztikus szálas termék állítható elő. Az aláhúzott értékek a dinamikus viszkozitás értékek alapján potenciális hordozó jelöltek. Vastagon szedve a kiválasztott polimer látható.

PVA Koncentráció [m/m%]	Átlagos szálátmérő $[nm]$									
	Poli(vinil-alkohol) Molekulatömeg $[kDa]$					Poli(vinil-alkohol) + DAO Molekulatömeg $[kDa]$				
	24	31	67	130	205	24	31	67	130	205
5										
10			142±65	185±47	599±132			176±27	267±39	549±171
15			169±44	321±75	645±95			222±41	435±93	687±218
20			218±45	547±72	1413±443		172±47			
25		137±36	286±57			178±31	201±38			

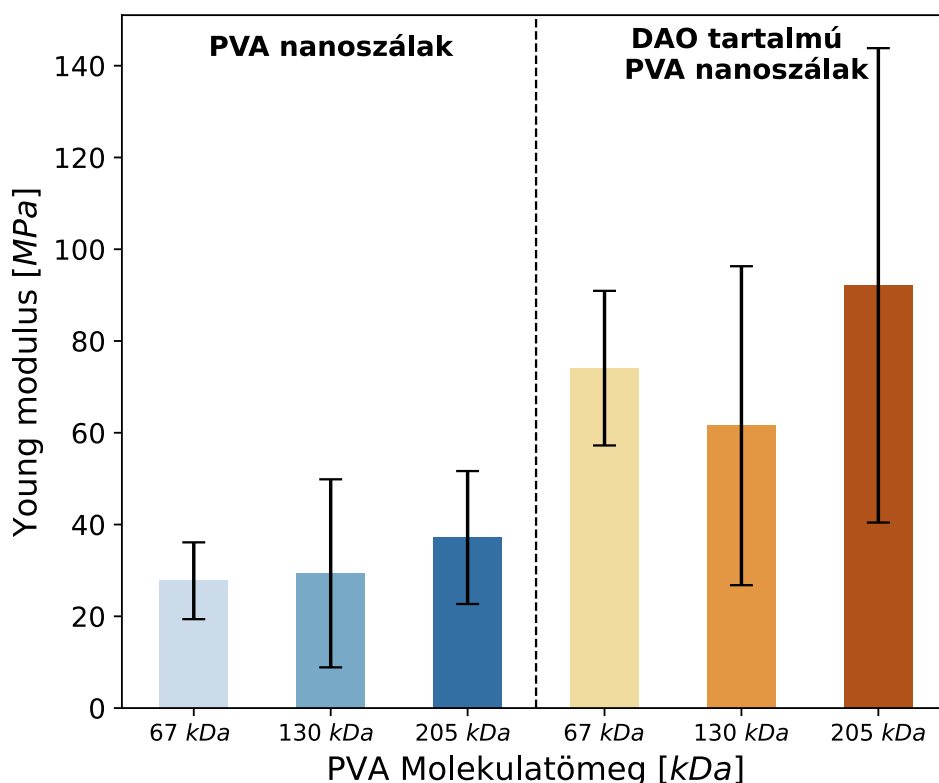
6.2.2. Young-modulusz meghatározása

A nanoszálás készítmény kezelése vagy formulálása során fontos jellemzője a kezelhetősége. Erre jó visszajelzést ad a készítmény mechanikai stabilitása. Ennek meghatározása érdekében szakítóvizsgálatnak vetettük alá a készítményeket (13. ábra).



13. ábra. Instron 5543 egytengelyes szakítógépet (Norwood, MA, USA) segítségével elvégzett szakítóvizsgálat pillanatképe.

A csapdázott komponensek rugalmasságra gyakorolt hatásának tanulmányozása érdekében összehasonlítottuk a tiszta polimert tartalmazó nanoszálak és az enzimet tartalmazó nanoszálak rugalmassági tulajdonságait. Azért, hogy tágabb képet kapjunk a molekulatömeg szerepéről, vizsgáltuk a különböző PVA alapanyagok molekulatömegének hatását a képzett szálak mechanikai stabilitására. Ennek érdekében az összehasonlítottuk azokat a tiszta polimerből készült nanoszálakat, valamint az enzim tartalmú nanoszálakat, amiknek szálképzési térkép értéke a lehető legmagasabb, azonos koncentrációjú oldatból készültek, illetve eltérő molekulatömeggel rendelkeztek. Választásunk a 14. ábrán látható 10 $m/m\%$ koncentrációjú elegyekből készült 67 kDa , 130 kDa és 205 kDa molekulatömegű PVA nanoszálakra esett. A 14. ábrán látható eredmények alapján elmondható, hogy az enzimtartalmú szálak termékek szemmel láthatóan magasabb rugalmassági modulussal rendelkeznek, mint a tiszta polimerből készült nanoszálak, ebből adódóan az enzimet tartalmazó nanoszálak ridegebb tulajdonságokkal rendelkeznek. Kezelésük a megváltozott fizikai tulajdonságok ellenére is óvintézkedések nélkül végezhető.



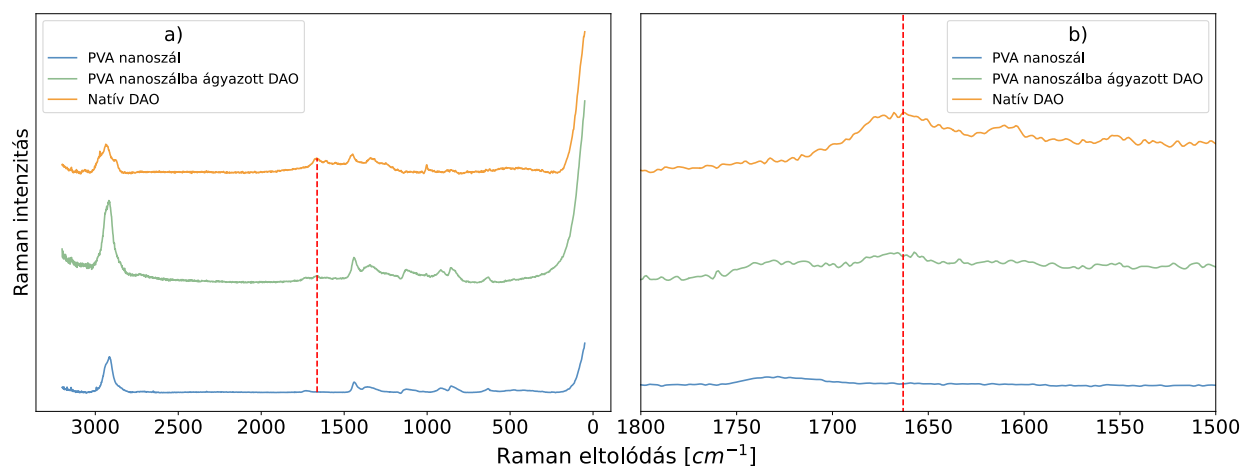
14. ábra. Instron 5543 egytengelyes szakítógép (Norwood, MA, USA) segítségével elvégzett szakítóvizsgálat eredményei a korábban kiválasztott hordozóval (PVA 130 kDa 10%) azonos koncentrációjú, de különböző molekulatömegű nanoszálak esetén.

Young-modulus értékek statisztikai vizsgálata

A mért eredmények (14. ábra) közti különbségek elemzése érdekében többfaktoros varianciaanalízist (ANOVA) hajtottunk végre. A varianciaanalízis előtt az adatok varianciájának homogenitását Levene-próbával vizsgálatuk meg, miszerint a kijelenthető, hogy a csoportjaink közti variancia nem egyenlő ($p = 0,021$). A variancia különbségek miatt az ANOVA során Welch korrekciót alkalmaztunk. A kapott eredmények szerint elmondható, hogy a különböző polimerek viselkedése közel azonos ($p = 0,505$), ezzel ellentétben az enzimot tartalmazó és a enzimentes polimerből készült szálak termék Young-modulusa között szignifikáns különbség áll fenn ($p = 0,006$; $\eta^2 = 0,441$). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a molekulatömegnek nincs, míg az enzimtartalomnak szignifikáns hatása van a Young-modulus értékekre. A statisztikai elemzést a JASP statisztikai program segítségével végeztük [102].

6.3. Raman spektroszkópia

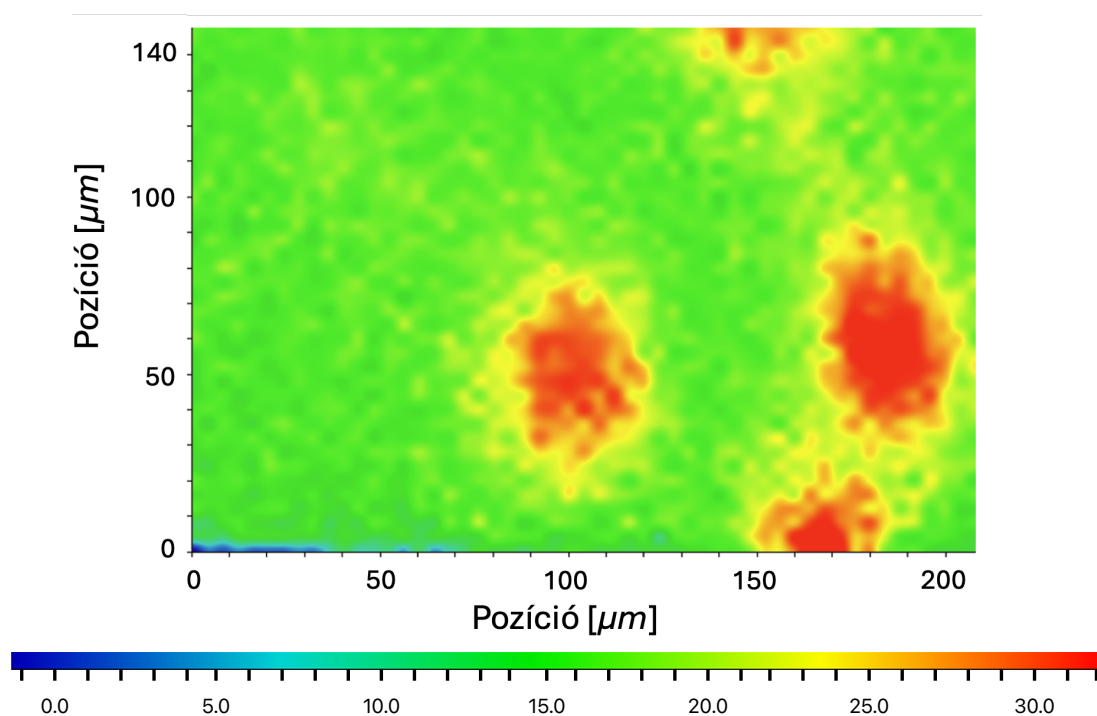
A biokatalitikus aktivitás vizsgálat előtt, méréssel szeretnénk volna igazolni az enzim jelenlétét a nanoszálakban. Erre a célra ígéretes a Raman spektroszkópia és térképezés, ami korábbi publikációkban is használt módszer [101, 103, 104]. A folyamat a molekulák jellemző vibrációs és rotációs állapotai közötti kvantált energiaátmenetek megfigyelésén alapul. Az aminosavakból felépülő fehérjék különböző funkciós csoportokat tartalmaznak (például karbonil- és amid csoportokat), a mérés során az amid csoportban található C=O kötések detektálhatók $1500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ tartományban [105]. A detektált kötések a Raman spektrumon csúcsok formájában jelennek meg. Ezek a csúcsok a DAO mentes szövetek spektrumában nem találhatók meg.



15. ábra. Liofilizált DAO, DAO tartalmú, valamint enzimmentes PVA nanoszálak Raman spektruma. A mérést Thermo Fisher DXR diszperzív Raman készülékkel végeztük (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). **a)** Teljes Raman spektrum. **b)** Az a) ábrán látható karakterisztikus csúcs nagyított képe.

A 15. ábrán látható, hogy $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ értékeknél intenzitáskülönbségek mérhetőek a natív DAO és a PVA nanoszálak Raman spektrumai között. Ezek megfeleltethetőek az alfa hélix szerkezetű fehérjékben megtalálható az amid I. régió C=O nyúlási átmenetnek. Továbbá látható, hogy a nanoszálak DAO tartalmú enzimmészítmény Raman spektrumán a benne található fehérjetartalom miatt szintén megjelent egy karakterisztikus csúcs 1661 cm^{-1} értéknél, ami a DAO jelenlétére utal. A 16. ábrán látható kémiai térkép ennek az eltolódási csúcsnak az intenzitás eloszlását ábrázolja a minta vizsgált felületén. A piros

szín jelzi a DAO erős jelenlétét, a zöld terület vegyes összetételt mutat, míg a kék szín a térkép azon területeit jelöli, amelyek más komponensre jellemző eltérő spektrumokat tartalmaz, vagyis jelen esetben az enzimet nem tartalmazó régiókat. Az intenzitás eloszlása alapján kijelenthető, hogy a fehérjék a vizsgált szálas készítményekben homogén eloszlást mutatnak, csak elszórtan figyelhető meg a fehérjék aggregációja, ahogy ezt a 16. ábrán látható vörös régiók is mutatják.



16. ábra. Elektrosztatikus szálképzéssel létrehozott poli(vinil-alkohol) (PVA) alapú nanoszálak szövetek Raman-kémiai térképe, amely a diamino-oxidáz relatív előfordulását, valamint eloszlását jellemzi. A mérést Thermo Fisher DXR diszperzív Raman készülékkel végeztük (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). A színskálán található piros szín jelzi a DAO erős jelenlétét, a zöld terület vegyes összetételt mutat, míg a kék szín a térkép azon területeit jelöli, amelyek más komponensre jellemző eltérő spektrumokat tartalmaz, vagyis jelen esetben az enzimet nem tartalmazó régiókat.

6.4. A DAO nanoformulálására alkalmas PVA prekursor kiválasztásának szempontjai

Korábbi méréseink során 4 szempont szerint vizsgáltuk a különböző prekursor elegyeket. Ezek az elegyek viszkozitása, a keletkezett szöveték morfológiája, szálképzési skálája és rugalmas tulajdonságai. A szálképzési térkép alapján, ami a szálképzési folyamat zökkenőmentességét és stabilitását hivatott szemléltetni 3 olyan prekursor elegyet kaptunk, amiknek enzimet tartalmazó polimeroldat szálképzésének minősége a legmagasabb kategóriába esett. Az említett esetek a 7. táblázatban zöld jelöléssel szerepelnek. Ezek viszkozitása a szakirodalmi referencia értékein belül található (8. ábra), rugalmas tulajdonságaik (14. ábra) nagyrészt megegyeznek, így a maradék két kategória alapján szelektáltunk tovább. Az aláhúzott elemek a morfológiai hibáik (12. ábra), valamint megnövekedett szálátmérőik (7. táblázat) miatt nem felelnek meg az általunk kitűzött kritériumoknak, így ezek nem alkalmasak az enzimhordozó szerepére. Végezetül a vizsgálatok alapján a 7. táblázatban fekete színnel kiemelt 130 *kDa* molekulatömegű, 10 *m/m%* koncentrációjú oldat mellett döntöttünk, hiszen ez mind a 4 kitűzött kritériumnak megfelelt, vagyis viszkozitása a szakirodalmi adatok alapján kijelölt tartományba esett (8. ábra), morfológiai hibát nem tartalmaz, karakterisztikus szálas szerkezettel rendelkezik (11. ábra), kezelése ridegebb tulajdonságai miatt az enzimet nem tartalmazó polimer oldathoz képest könnyebb, valamint a 7. táblázatban aláhúzott, már szelektált esetek közül ez rendelkezett a legnagyobb fajlagos felülettel.

6.5. DAO tartalmú nanoszálak enzimatis aktivitásának vizsgálata

6.5.1. UV-Vis DAO aktivitás *assay* fejlesztése

A enzimatis aktivitás meghatározásához robusztus UV-VIS spektrofotometriás módszer megalkotását tűztük ki célul, mely kiválthatja a DAO aktivitásának mérésére jelenleg elterjedten alkalmazott költséges és nehezen hozzáférhető nagyműszeres (UHPLC) módszereket. Az kidolgozott aktivitás mérési metódus Yang és társai [43] munkásságán alapul. A diamino-oxidáz természetes szubsztrátja a hisztamin, mellyel közeli szerkezeti rokonságban álló, de annál jelentősen olcsóbban hozzáférhető putreszcin meg-

felelő modell szubsztrátként alkalmazható. Az eljárásról elmondható, hogy gyorsan végrehajtható, szelektív, szükség esetén kis minta számmal és minta mennyiséggel, nagy áteresztőképességgel, könnyen kivitelezhető. A reakció során az oldat színe lilára változik. A keletkezett szín UV-Vis spektrofotométerrel mérhető ($\lambda = 544 \text{ nm}$).

Extinkciós koefficiens prediktálása

A 6.5.1. fejezetben bemutatott módszer segítségével meghatározható abszorbancia értékek aktivitást leíró paraméterre történő átalakításához szükség van a vizsgált molekula extinkciós koefficiensére (ε). Mivel ez a vegyület jelenleg kereskedelmi forgalomban nem hozzáférhető, bérgyárttatása pedig költséges, ezért az ε értékét *in silico* módszer segítségével becsültük meg. A Yang és társai által [43] publikált terméket (4-[4-(Dimetilamino)fenil]imino-1,5-dimetil-2-fenilpirazol-1-ium-3-on, 5. ábra) a Molview szoftver [106] segítségével megrajzolva, meghatároztuk annak SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) szerkezeti kódját. A Chemprop Python alapú algoritmus [107] képes gépi tanulás (*Machine learning*) végrehajtására, ami szerkezeti (SMILES) kódok segítségével képes molekulák kémiai tulajdonságainak prediktálására, így alkalmas az extinkciós koefficiens becslésére is. A tanuló modell önmagában nem tartalmaz olyan adatbázist, amiben megfelelő mennyiségű extinkciós koefficiens szerepel. Ennek kiküszöbölése érdekében Edward J. Beard és társai munkájához közölt adatbázist vettük alapul, amiben ~ 1400 molekula ε értéke megtalálható [108][109]. Az adatbázist 50 iterációban elemeztettük a tanuló algoritmussal, majd az általunk meghatározott SMILES kódot felhasználva az alábbi prediktált értéket kaptuk: $33226,625(L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$

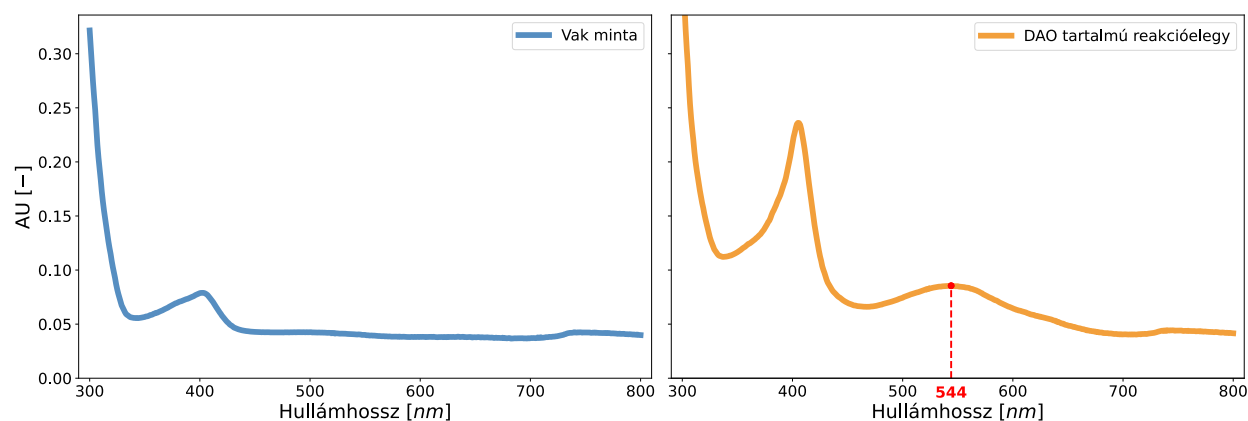
Enzimaktivitás vizsgálata

A 6.5.1. fejezetben leírtak alapján a reakció lezajlása során az oldat színe fokozatosan lilára változik. Ezt az állapotot jól szemlélteti a 17. ábra, amin a DAO nem tartalmazó és a DAO tartalmú reakcióelegyek láthatók a reakció 30. percében. A keletkezett lila szín 544 nm hullámhosszon detektálható. Az enzimatis aktivitás mérése során felvett (18. ábrán található) spektrumokon jól látható, hogy az enzimet nem tartalmazó (vak) reakcióelegyhez képest, DAO tartalom esetében 544 nm hullámhosszon abszorbancia csúcs jelent meg. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a keletkezett termék a DAO katalitikus működésének hatására jött létre, vagyis az enzim jelenléte nélkül nem ment végbe

a mérést zavaró kémiai átalakulás, így a módszer alkalmasnak tekinthető az enzim katalitikus aktivitásának mérésére.



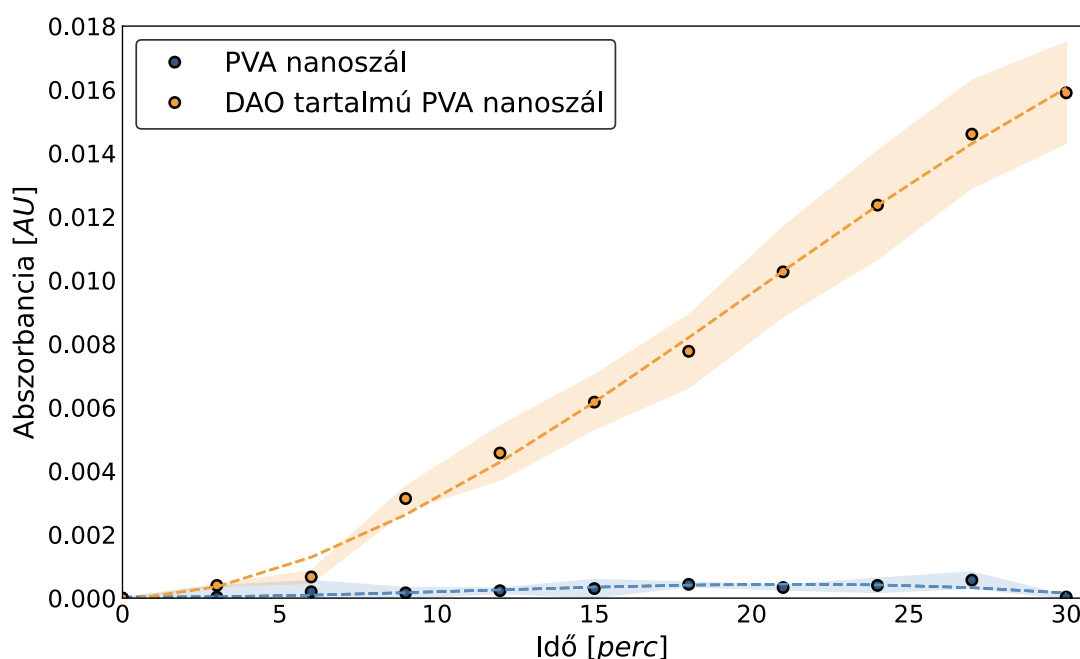
17. ábra. Yang és társai [43] munkásságán alapuló tesztreakció, bal oldalon enzimet nem tartalmazó, jobb oldalon enzimet tartalmazó elegy esetén. A keletkezett szín spektrofotometriásan mérhető ($\lambda = 544 \text{ nm}$). A reakcióelegy putreszcin-dihidrokloridot, peroxidáz-enzimet, 4-aminoantipirint, *N,N*-dimetilanilint, DAO és tormaperoxidáz enzimeket és intesztinoszolvens puffert ($pH=6,2$; 50 mM) tartalmaz.



18. ábra. Enzimmentes és diamino-oxidázt tartalmazó oldatok 300 nm és 800 nm között mért abszorbanancia spektruma. A mérést mikrolemezben Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, USA) UV-Vis spektrofotométerrel végeztük 37°C hőmérsékleten. Az ábrán látható értékek a reakció $30. \text{ perce}$ után kerültek rögzítésre.

Enzim tartalmú nanoszál aktivitásának vizsgálata

A 5.4. fejezetben bemutatott UV-Vis analitikai módszer segítségével megvizsgáltuk az általunk létrehozott DAO tartalmú nanoszálak enzimkészítmény aktivitását. A PVA mátrix jelenlétének hatását enzimet nem tartalmazó PVA nanoszálal elvégzett aktivitás méréseben tanulmányoztuk. A kapott eredményeket a 19. ábra mutatja be. Jól látható, hogy az enzim aktivitása, a mérés 30. percéig monoton emelkedést mutat. A görbe nem ér el maximumot, vagyis szükség esetén a reakció hosszabb időablakban is vizsgálható a megbízhatóbb detektálás érdekében.



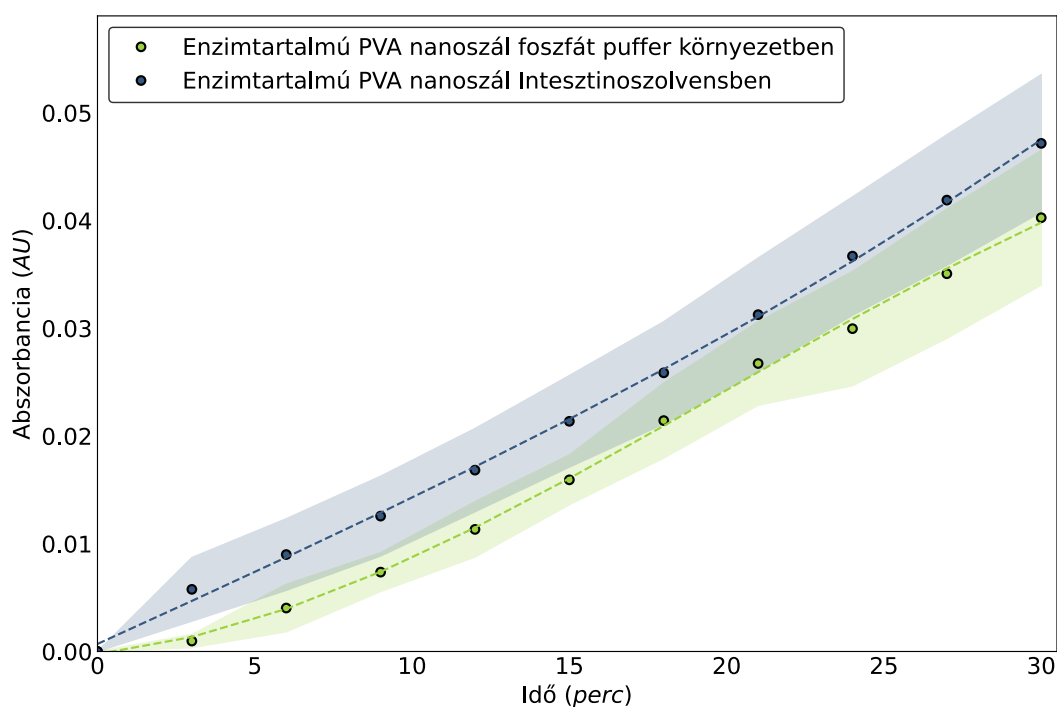
19. ábra. Enzimaktivitás vizsgálata Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, USA) UV-Vis spektrofotométerrel. A vizsgálatot elvégeztük DAO tartalmú és DAO nélküli nanoszálak esetében is. A tesztreakcióban képződött terméket 544 nm hullámhosszon detektáltuk. A reakcióelegy putreszcín-dihidrokloridot, tormaperoxidázt, 4-aminoantipirint, *N,N*-dimetilanolint és foszfát puffert (pH=6,5, 70 mM) tartalmaz (T=37 °C). A görbe körül elhelyezkedő régió a mért értékek szórását mutatja be, ami minden esetben kisebb, mint 40%, n=3 mérés esetén.

A DAO enzimet nem tartalmazó nanoszál esetében, a katalízis mentes reak-

cióelegyben nem látható abszorbanca növekmény, vagyis a vizsgált időtartamban minden termékképződés a DAO aktivitásának köszönhető. Ennek fényében kijelenthető, hogy az enzim a nanoszálba rögzítése megőrizte a katalitikus aktivitását.

6.5.2. Enzimatis aktivitás mérése

A spektrofotometriás mérések eredményének kiértékelésekor figyelembe kell venni a mérőműszer kalibrációját és azt a mérési tartományt, ahol a műszer pontos és megbízható eredmény szolgáltat.



20. ábra. Enzimaktivitás vizsgálata Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, USA) UV-Vis spektrofotométerrel. DAO tartalmú nanoszálak esetében foszfát és intesztinoszolvens pufferekben. A tesztreakcióban képződött terméket 544 nm hullámhosszon detektáltuk. A reakcióelegy DAO tartalmú nanoszálakat, putreszcín-dihidrokloridot, tormaperoxidázt, 4-aminoantipirint, *N,N*-dimetilanilint és foszfát puffert ($pH=6,5$; 70 mM) vagy intesztinoszolvens puffert ($pH=6,2$; 50 mM) tartalmaz ($T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$). A görbe körül elhelyezkedő régió a mért értékek szórását mutatja be, ami minden esetben kisebb, mint 50%, $n=3$ mérés esetén.

Spektrofotométer készülékek esetén ajánlott a kapott abszorbancia értékeket (AU) 0,1 és 1 közötti skálán mérni, ugyanis a műszer ebben a tartományban a legmegbízhatóbb [110]. Előző méréseink alatt (19. ábra) a legmagasabb kapott abszorbancia érték $\sim 0,16$ volt. Annak érdekében, hogy méréseink eredményei ne csak a 0,1-1 tartomány alján helyezkedjenek el megnövelt enzim és szubsztrát koncentrációt alkalmaztunk. A vékonybél kémhatása eltér a foszfát pufferétől. Mivel a DAO itt fejti ki hatása legnagyobb részét, így a vékonybél körülmények szimulálása érdekében indokolt intesztinoszolvens környezet használata. A 20. ábrán látható aktivitás eredményekről elmondható, hogy az intesztinoszolvens körülmények között mért értékek magasabb aktivitást mutattak, mint a foszfát puffer alkalmazása esetén. Ez előnyös, mivel az enzimnek későbbiekben a bélnedvben hivatottak kifejteni aktivitásukat.

Enzimkészítmények összehasonlítása

Mivel a 20. ábra eredményei a koncentráció növelés ellenére sem érték el a kívánt 0,1-1 (AU) terjedő abszorbancia értékeket, ezért arányosan közel tízszeresére növeltük a reakciótérfogatot. A nagyobb térfogat jobb hatásfokkal kevertethető a reakció során, ami által lecsökken a diffúziós ellenállás, így megnő az enzim és a szubsztrát találkozásának valószínűsége. Ezáltal fokozódik a biokatalitikus aktivitás [111]. A nagyobb térfogat továbbá nagyobb termikus stabilitással bír, ami kiemelkedő jelentőségű az enzimaktivitás szempontjából [112].

A 6.5.1. fejezetben bemutatott analitikai módszer, valamint a 6.5.1. fejezetben leírtak által meghatározott extinkciós segítségével meghatároztuk a PVA nanoszálakba ágyazott DAO enzimaktivitását. A mérést a 5.4. fejezet alapján végeztük, a katalitikus működést leíró paramétereket a 5.4.4. fejezet alapján számítottuk ki.

8. táblázat. Elektrosztatikus szálképzési eljárással PVA nanoszálakba rögzített diamino-oxidáz katalitikus aktivitásának vizsgálata. A tesztreakciókat 37°C hőmérsékleten, állandó rázatás mellett végeztük. A táblázat a reakciók kezdetétől számított 30 *perc* elteltével vett minták spektrofotométeres vizsgálatából számított eredményeket összegzi. A mérés során a különböző technológiával formulált diamino-oxidáz készítményeket hasonlítottunk össze a konverzió (%), a biokatalitikus aktivitás (U_B , $[U \times g^{-1}]$), a fajlagos specifikus aktivitás (U_E , $[U \times g^{-1}]$) és az aktivitás hozam (Y_A , %) függvényében.

Készítmény	Konverzió [%]	U_B $[U \times g^{-1}]$	U_E $[U \times g^{-1}]$	Y_a [%]	Relatív szórás [%]
Natív enzim	76,4	$8,3 \times 10^{-5}$	$2,76 \times 10^{-3}$	100	0,2
Nanoszálás enzimkészítmény	52,3	$2,84 \times 10^{-5}$	$9,46 \times 10^{-3}$	342	6,7
DAOSIN	5,2	$6,71 \times 10^{-7}$	$1,56 \times 10^{-2}$	566	6,6
DAOFOOD+	2,8	$2,77 \times 10^{-7}$	$8,58 \times 10^{-3}$	310	31,7

A 8. táblázatban különböző enzimkészítmények összehasonlításából kapott értékek láthatók. Munkánk során vizsgáltuk a natív DAO, az általunk létrehozott nanoszálás enzimkészítmény, valamint a jelenleg két kereskedelmi forgalomban kapható DAO tartalmú enzimkészítmény, vagyis a DAOSIN és a DAOFOOD+ termékek aktivitását. Az eredmények alapján elmondható, hogy a vártak megfelelően a konverzió, és az enzimkészítmény tömegére normált biokatalitikus aktivitás (U_B) a tiszta enzim oldat esetében volt a legmagasabb. Ezt követte az általunk létrehozott nanoszálás enzimkészítmény, majd a kereskedelmi forgalomban kapható készítmények, amik két nagyságrenddel kisebb értékeket értek el, mint a nanoszálás formuláció. Ezzel szemben az enzim tömegére normált specifikus aktivitás (U_E), valamint az aktivitás hozam (Y_a), a DAOSIN enzimkészítmény esetében volt a legmagasabb. Ezt követte a nanoszálás enzimkészítmény, a DAOFOOD+, majd a tiszta enzimoldat. Fontos megemlíteni, hogy a DAOSIN étrendkiegészítő esetében az aktivitás meghatározása során a teljes tabletta belekerült a reakcióelegybe, ami során a egyéb formulációs segédanyagok és stabilizáló ágensek kerültek az oldatba. Mivel ezek az anyagok számunkra ismeretlenek voltak ezért nem tudjuk, hogy hogyan befolyásolják a katalitikus aktivitást. Továbbá megemlítendő, hogy a vizsgált enzimkészítmények közötti morfológiai különbségek is befolyásolhatták

az aktivitást. A natív enzim és a nanoszálás enzimkészítmény oldószerükben azonnal feloldódnak, ezzel valódi oldatot létrehozva. A DAOSIN, illetve a DAOFOOD+ készítmények viszont csak részlegesen oldódtak be, ami során szuszpenzió keletkezett. Továbbá befolyásoló tényező lehetett, a kereskedelemben kapható készítmények esetében mért alacsony abszorbancia. Ennek oka, hogy egy tabletta vagy kapszula teljes enzimtartalma $0,3\text{ mg}$, ami töredék része a natív enzim vagy a nanoszálás enzimkészítménynek vizsgálata során alkalmazott DAO mennyiségnek. Ezt a mennyiséget megnövelni az általunk használt módszerben nem lehetett, ugyanis az enzimtömeghez képest szilárd anyag térfogata jóval nagyobb volt. Az enzimtartalom növelésével a szilárd komponensek tömege összevethetővé vált volna a reakcióterfoggal, így gátolva a reakciót. Az általunk alkalmazott enzim mennyiség a reakcióelegyben még elfogadható mennyiségű szilárd komponenst jelentett, ami nem befolyásolta túlzottan a reakciót. Végül pedig befolyásoló tényező lehet a formulált DAO pontos típusa is, mely a gyógyszerári készítmények esetében nem ismert, a gyártó által nem nyilvánosságra hozott információ.

7. Összefoglalás

Kutatómunkánk során célul tűztük ki, hogy elektrosztatikus szálképzés segítségével egy olyan diamino-oxidáz tartalmú, poli(vinil-alkohol) alapanyagú, nanoszálak készítményt hozzunk létre, ami új lehetőséget adhat DAO alapú enzimhelyettesítéses terápia (ERT) kifejlesztéséhez.

Munkánk során kitértünk a PVA prekursor elegyek reológiai vizsgálatára, az elektrosztatikus szálképzéssel létrehozott nanoszálak morfológiai tulajdonságainak meghatározására, valamint vizsgáltuk a nanoszálak viselkedését mechanikai feszültség ellen. A potenciális PVA nanoszálakba enzimet csapdáztunk, aminek jelenlétét később mérhető módszerrel kimutattuk. Irodalmi analógia alapján kidolgoznunk egy nagy áteresztőképességű, szelektív és robosztus metódust, ami lehetőséget ad a DAO biokatalitikus aktivitásának mérésére. Ez alapján pedig összehasonlítottuk az általunk létrehozott készítményt a piaci forgalomban kapható DAOSIN és DAOFOOD Plusz készítményekkel.

A célkitűzésnek megfelelően megmértük egy eltérő koncentrációjú és molekulatömegű PVA alapanyagokból előállítható vizes prekursor elegyek viszkozitását rotációs reométer segítségével, majd ezekből nanoszálakat szintetizáltunk és SEM felvételek segítségével megvizsgáltuk azok morfológiai tulajdonságait.

Az elkészült szálak termék rugalmassági tulajdonságainak feltérképezésére szakítóvizsgálatot hajtottunk végre, ami alapján elmondhatjuk, hogy az DAO ridegebb tulajdonságokat ad a nanoszálaknak. A legjobb eredményeket elért polimerek közül meghatároztuk a szerkezeti és gyártási szempontok alapján legígéretesebb prekuzort. Ez a 130 kDa molekulatömeggel és 10 m/m% koncentrációval rendelkező poli(vinil-alkohol) oldat volt. A kiválasztott polimer viszkozitása a szakirodalmi referencia tartományba esett, szálképzési folyamata stabil és kiegyensúlyozott volt, valamint a lehetséges jelöltek között ez rendelkezett a legkisebb szálátmérővel, vagyis a legnagyobb fajlagos felülettel.

Igazoltuk az enzim jelenlétét a nanoszálakban Raman spektroszkópia segítségével, ami során jól azonosítható volt az enzimre jellemző karakterisztikus eltolódás csúcs.

A biokatalitikus aktivitás mérésére során sikerrel alkalmaztuk a szakirodalomban fellelhető, általunk tökéletesített UV-VIs spektrofotometriás módszert. Mellyel sikeresen megmértük az enzim és a nanoszálak enzimkészítmény aktivitását. Láthattuk, hogy az enzim, a vékonybelet szimuláló intesztinoszolvensben magasabb aktivitást mutatott,

mint a foszfát pufferben. Gépi tanulásra képes algoritmus segítségével sikeresen prediktáltuk a kifejlesztett metódus termékének extinkciós koefficiensét, aminek köszönhetően a továbbiakban az enzim aktivitás számolható. Végül összevetettük a különböző enzimkészítmények katalitikus aktivitását. A kapott eredmények alapján a nanoszálas enzimkészítménnyel a legtöbb esetben legalább olyan, vagy jobb aktivitás és konverzióval rendelkezett, mint a piaci készítmények.

Végezetül elmondható, hogy irodalmi analógia alapján kidolgozott aktivitás mérési metódusunk segítségével sikeresen megmértük egy általunk létrehozott nanoszálas enzimkészítmény enzimatisz aktivitását. A PVA nanoszálba ágyazott DAO legalább olyan, esetenként jobb tulajdonságokkal rendelkezik, mint a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható DAO tartalmú készítmények, ami okot adhat a készítmény további kutatására és optimalizálására.

Hivatkozások

- (1) Marchetti, M.; Faggiano, S.; Mozzarelli, A. *Current Medicinal Chemistry* **2022**, *29*, 489–525.
- (2) Brady, R. O.; Schiffmann, R. *The Lancet Neurology* **2004**, *3*, 752–756.
- (3) Wolvekamp, M.; De Bruin, R. *Digestive Diseases* **1994**, *12*, 2–14.
- (4) Schnedl, W. J.; Schenk, M.; Lackner, S.; Enko, D.; Mangge, H.; Forster, F. *Food science and biotechnology* **2019**, *28*, 1779–1784.
- (5) Wantke, F.; Proud, D.; Siekierski, E.; Kagey-Sobotka, A. *Inflammation Research* **1998**, *47*, 396–400.
- (6) Calinescu, C.; Mondovi, B.; Federico, R.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M. A. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *428*, 48–56.
- (7) Kettner, L.; Seitzl, I.; Fischer, L. *Nutrients* **2022**, *14*, 2621.
- (8) Jankowska, K.; Su, Z.; Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Pinelo, M. *Environmental Technology & Innovation* **2023**, 103408.
- (9) Patel, R. H.; Mohiuddin, S. S. **2020**.
- (10) Parsons, M. E.; Ganellin, C. R. *British journal of pharmacology* **2006**, *147*, S127–S135.
- (11) Maintz, L.; Novak, N. *The American journal of clinical nutrition* **2007**, *85*, 1185–1196.
- (12) Kovacova-Hanusova, E.; Buday, T.; Gavliakova, S.; Plevkova, J. *Allergologia et immunopathologia* **2015**, *43*, 498–506.
- (13) McGrath, A. P.; Hilmer, K. M.; Collyer, C. A.; Shepard, E. M.; Elmore, B. O.; Brown, D. E.; Dooley, D. M.; Guss, J. M. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9810–9822.
- (14) Jutel, M.; Akdis, M.; Akdis, C. *Clinical & Experimental Allergy* **2009**, *39*, 1786–1800.
- (15) Akdis, C. A.; Simons, F. E. R. *European journal of pharmacology* **2006**, *533*, 69–76.
- (16) Mondovi, B.; Rotilio, G.; Costa, M.; Finazzi-Agro, A.; Chiancone, E.; Hansen, R. E.; Beinert, H. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242*, 1160–1167.
- (17) Kusche, J.; Lorenz, W.; Schmidt, J. **1975**.
- (18) Marquardt, D. L. *Clinical Reviews in Allergy* **1983**, *1*, 343–351.
- (19) Maintz, L.; Novak, N. *The American journal of clinical nutrition* **2007**, *85*, 1185–1196.
- (20) Schwelberger, H.; Ahrens, F.; Fogel, W.; Sánchez-Jiménez, F. *Histamine H₄ receptor: a novel drug target for immunoregulation and inflammation. London: Versita* **2013**, 63–102.
- (21) Comas-Basté, O.; Sánchez-Pérez, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Latorre-Moratalla, M.; Vidal-Carou, M. d. C. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1181.

- (22) Siebenhaar, F.; Melde, A.; Magerl, M.; Zuberbier, T.; Church, M.; Maurer, M. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2016**, *30*, 1774–1777.
- (23) Martin, I. S. M.; Brachero, S.; Vilar, E. G. *Allergologia et immunopathologia* **2016**, *44*, 475–483.
- (24) Portnoy, J. M.; Dinakar, C. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2004**, *5*, 125–135.
- (25) Hrubisko, M.; Danis, R.; Huorka, M.; Wawruch, M. *Nutrients* **2021**, *13*, 2228.
- (26) Puig Vera, P. **2021**.
- (27) Tobajas, Y.; Alemany-Fornés, M.; Samarra, I.; Romero-Giménez, J.; Tintoré, M.; Del Pino, A.; Canela, N.; Del Bas, J. M.; Ortega-Olivé, N.; de Lecea, C. és tsai. *Journal of Clinical Medicine* **2023**, *12*, 7502.
- (28) Jochum, C. *Nutrients* **2024**, *16*, 1219.
- (29) Parini, R.; Deodato, F. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 2975.
- (30) Nowicki, M.; Bazan-Socha, S.; Błażejewska-Hyżorek, B.; Kłopotowski, M. M.; Komar, M.; Kuszta, M. A.; Liberek, T.; Małyszko, J.; Mizia-Stec, K.; Oko-Sarnowska, Z. és tsai. *Orphanet journal of rare diseases* **2024**, *19*, 16.
- (31) De la Fuente, M.; Lombardero, L.; Gómez-González, A.; Solari, C.; Angulo-Barturen, I.; Acera, A.; Vecino, E.; Astigarraga, E.; Barreda-Gómez, G. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 9181.
- (32) Concolino, D.; Deodato, F.; Parini, R. *Italian journal of pediatrics* **2018**, *44*, 117–126.
- (33) Montalto, M.; Curigliano, V.; Santoro, L.; Vastola, M.; Cammarota, G.; Manna, R.; Gasbarrini, A.; Gasbarrini, G. *World journal of gastroenterology: WJG* **2006**, *12*, 187.
- (34) González-Davis, O.; Villagrana-Escareño, M. V.; Trujillo, M. A.; Gama, P.; Chauhan, K.; Vazquez-Duhalt, R. *Virology* **2023**, *580*, 73–87.
- (35) Zeng, J.; Wu, J.; Chen, H.; Ni, S. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology* **2021**, *7*, 331–334.
- (36) Kettner, L.; Seitz, I.; Fischer, L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2022**, *38*, 232.
- (37) Okutan, G.; Perucho Alcalde, T.; Ruiz Casares, E.; Penadés, B. F.; Sánchez Niño, G. M.; Terrén Lora, A.; López Oliva, S.; Torrente Estríngana, L.; Duelo, A.; San Mauro Martín, I. *Frontiers in Genetics* **2023**, *14*, 1180777.
- (38) Ji, Y.; Sakata, Y.; Li, X.; Zhang, C.; Yang, Q.; Xu, M.; Wollin, A.; Langhans, W.; Tso, P. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2013**, *304*, G732–G740.
- (39) Gludovacz, E.; Maresch, D.; Bonta, M.; Szöllösi, H.; Furtmüller, P. G.; Weik, R.; Altmann, F.; Limbeck, A.; Borth, N.; Jilma, B. és tsai. *Journal of biotechnology* **2016**, *227*, 120–130.
- (40) Schwelberger, H. G.; Bodner, E. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1997**, *1340*, 152–164.

- (41) <https://www.rcsb.org/structure/3hi7> Megtekintve: 2024.04.19.
- (42) Biegański, T.; Kusche, J.; Lorenz, W.; Hesterberg, R.; Stahlknecht, C.-D.; Feussner, K.-D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1983**, *756*, 196–203.
- (43) Yang, R.; Chen, H.; Han, Y.; Gu, Z. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, *92*, 1709–1715.
- (44) <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.4.3.22> Megtekintve: 2024.04.19.
- (45) Chen, K.; Arnold, F. H. *Nature Catalysis* **2020**, *3*, 203–213.
- (46) Eed, J. *Essai* **2012**, *10*, 19.
- (47) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1–9.
- (48) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.
- (49) Cao, L., *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*; John Wiley & Sons: 2006.
- (50) Böhm, A.; Trosien, S.; Avrutina, O.; Kolmar, H.; Biesalski, M. *Frontiers in chemistry* **2018**, *6*, 214.
- (51) Mateo, C.; Pessela, B. C.; Fuentes, M.; Torres, R.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols* **2020**, 175–187.
- (52) Yamaguchi, H.; Kiyota, Y.; Miyazaki, M. *Catalysts* **2018**, *8*, 174.
- (53) Imam, H. T.; Marr, P. C.; Marr, A. C. *Green Chemistry* **2021**, *23*, 4980–5005.
- (54) Da S. Pereira, A.; Souza, C. P.; Moraes, L.; Fontes-Sant’Ana, G. C.; Amaral, P. F. *Polymers* **2021**, *13*, 4061.
- (55) Homaei, A. A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R. *Journal of chemical biology* **2013**, *6*, 185–205.
- (56) Chang, T. *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins: Volume 1*; Springer: 1977, 69–90. old.
- (57) Maghraby, Y. R.; El-Shabasy, R. M.; Ibrahim, A. H.; Azzazy, H. M. E.-S. *ACS omega* **2023**, *8*, 5184–5196.
- (58) Iannazzo, D.; Pistone, A.; Romeo, R.; Giofrè, S. V. és tsai. *J Aids Hiv Infec* **2015**, *1*, 1–13.
- (59) Angammana, C. J.; Jayaram, S. H. *Particulate Science and Technology* **2016**, *34*, 72–82.
- (60) Merritt, S. R.; Exner, A. A.; Lee, Z.; von Recum, H. A. *Advanced Engineering Materials* **2012**, *14*, B266–B278.
- (61) Yang, C.; Jia, Z.; Xu, Z.; Wang, K.; Guan, Z.; Wang, L. *2009 IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, 2009, 204–207. old.

- (62) Williams, G. R.; Raimi-Abraham, B. T.; Luo, C. *Nanofibres in Drug Delivery* **2018**, *1*, 24–59.
- (63) Chinnappan, B. A.; Krishnaswamy, M.; Xu, H.; Hoque, M. E. *Polymers* **2022**, *14*, 3719.
- (64) Refate, A.; Mohamed, Y.; Mohamed, M.; Sobhy, M.; Samhy, K.; Khaled, O.; Eidaroos, K.; Batikh, H.; El-Kashif, E.; El-Khatib, S. és tsai. *Heliyon* **2023**.
- (65) Mollaghadimi, B. *IET nanobiotechnology* **2022**, *16*, 239–249.
- (66) Keirouz, A.; Wang, Z.; Reddy, V. S.; Nagy, Z. K.; Vass, P.; Buzgo, M.; Ramakrishna, S.; Radacsi, N. *Advanced Materials Technologies* **2023**, *8*, 2201723.
- (67) Cleeton, C.; Keirouz, A.; Chen, X.; Radacsi, N. *ACS biomaterials science & engineering* **2019**, *5*, 4183–4205.
- (68) Ibrahim, H. M.; Klingner, A. *Polymer Testing* **2020**, *90*, 106647.
- (69) Ramakrishna, S., *An introduction to electrospinning and nanofibers*; World scientific: 2005.
- (70) Koski, A.; Yim, K.; Shivkumar, S. *Materials letters* **2004**, *58*, 493–497.
- (71) Tang, C.; Levit, S. L.; Swana, K. F.; Thornton, B. T.; Barlow, J. L.; Dotivala, A. C. *Applications of Polymer Nanofibers* **2022**, 1–40.
- (72) Jacobs, V.; Anandjiwala, R. D.; Maaza, M. *Journal of applied polymer science* **2010**, *115*, 3130–3136.
- (73) Liu, Y.; Wang, Y.; Lee, C.-H.; Kan, C.-W.; Lu, X. *Polymers* **2024**, *16*, 154.
- (74) Qasim, S. B.; Zafar, M. S.; Najeeb, S.; Khurshid, Z.; Shah, A. H.; Husain, S.; Rehman, I. U. *International journal of molecular sciences* **2018**, *19*, 407.
- (75) Yoon, J.; Yang, H.-S.; Lee, B.-S.; Yu, W.-R. *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1704765.
- (76) Mendes, A. C.; Stephansen, K.; Chronakis, I. S. *Food Hydrocolloids* **2017**, *68*, 53–68.
- (77) Liao, Y.; Loh, C.-H.; Tian, M.; Wang, R.; Fane, A. G. *Progress in Polymer Science* **2018**, *77*, 69–94.
- (78) Demir, M. M.; Yilgor, I.; Yilgor, E.; Erman, B. *Polymer* **2002**, *43*, 3303–3309.
- (79) Wang, Y.; Hsieh, Y.-L. *Journal of Membrane Science* **2008**, *309*, 73–81.
- (80) Zuo, W.; Zhu, M.; Yang, W.; Yu, H.; Chen, Y.; Zhang, Y. *Polymer Engineering & Science* **2005**, *45*, 704–709.
- (81) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. *Biotechnology advances* **2010**, *28*, 325–347.
- (82) Munawar, M. A.; Schubert, D. W. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 10295.
- (83) Kalluri, L.; Satpathy, M.; Duan, Y. *Dental Oral Biology and Craniofacial Research* **2021**, *4*.
- (84) Abdallah, A. E.; Atibeni, R. A.; Sassi, K. M.; Sakal, S. A. *Int. Sci. Technol. J* **2021**, *27*, 1–13.

- (85) Zargham, S.; Bazgir, S.; Tavakoli, A.; Rashidi, A. S.; Damerchely, R. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* **2012**, *7*, 155892501200700414.
- (86) Subrahmanya, T.; Arshad, A. B.; Lin, P. T.; Widakdo, J.; Makari, H.; Austria, H. F. M.; Hu, C.-C.; Lai, J.-Y.; Hung, W.-S. *RSC advances* **2021**, *11*, 9638–9663.
- (87) Topuz, F.; Abdulhamid, M. A.; Holtzl, T.; Szekely, G. *Materials & Design* **2021**, *198*, 109280.
- (88) Duan, X.-P.; Yan, X.; Zhang, B.; Zhang, Z.-G.; Yu, M.; Zhang, H.-D.; Yang, D.-P.; Long, Y.-Z. *RSC advances* **2016**, *6*, 66252–66255.
- (89) Long, Y.-Z.; Yan, X.; Wang, X.-X.; Zhang, J.; Yu, M. *Electrospinning: Nanofabrication and applications*; Elsevier: 2019, 21–52. old.
- (90) Medeiros, G. B.; Lima, F. d. A.; de Almeida, D. S.; Guerra, V. G.; Aguiar, M. L. *Membranes* **2022**, *12*, 861.
- (91) Wang, X.; Um, I. C.; Fang, D.; Okamoto, A.; Hsiao, B. S.; Chu, B. *Polymer* **2005**, *46*, 4853–4867.
- (92) ÇAVDAR, F. Y.; UĞUZ, A. *Mechanical Engineering Journal* **2019**, *6*, 18–00298.
- (93) Khamforoush, M.; Agha-Moalapour, R. *Iranian Polymer Journal* **2016**, *25*, 875–886.
- (94) Ramazani, S.; Karimi, M. *e-Polymers* **2014**, *14*, 323–333.
- (95) Morsy, R. *Polymer Bulletin* **2023**, *80*, 1519–1530.
- (96) De Vrieze, S.; Van Camp, T.; Nelvig, A.; Hagström, B.; Westbroek, P.; De Clerck, K. *Journal of materials science* **2009**, *44*, 1357–1362.
- (97) Mailley, D.; Hebraud, A.; Schlatter, G. *Macromolecular Materials and Engineering* **2021**, *306*, 2100115.
- (98) Nezarati, R. M.; Eifert, M. B.; Cosgriff-Hernandez, E. *Tissue Engineering Part C: Methods* **2013**, *19*, 810–819.
- (99) Barua, B.; Saha, M. C. *Polymer Engineering & Science* **2018**, *58*, 998–1009.
- (100) Ribeiro, E. S.; de Farias, B. S.; Junior, T. R. S. C.; de Almeida Pinto, L. A.; Diaz, P. S. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *183*, 1959–1970.
- (101) Tóth, G. D.; Kállai-Szabó, N.; Lengyel, M.; Süveg, K.; Ender, F.; Katona, G.; Kazsoki, A.; Zelkó, R.; Antal, I.; Balogh, G. T. és tsai. *Journal of Molecular Liquids* **2023**, *389*, 122819.
- (102) JASP Team JASP (Version 0.18.3)[Computer software], 2024.
- (103) Tóth, G. D.; Kazsoki, A.; Gyarmati, B.; Szilágyi, A.; Vasvári, G.; Katona, G.; Szente, L.; Zelkó, R.; Poppe, L.; Balogh-Weiser, D. és tsai. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 972.
- (104) Balogh-Weiser, D.; Molnár, A.; Tóth, G. D.; Koplányi, G.; Szemes, J.; Decsi, B.; Katona, G.; Salamah, M.; Ender, F.; Kovács, A. és tsai. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1174.

- (105) Kolesov, B. A. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2017**, *179*, 216–220.
- (106) <https://molview.org/> Megtekintve: 2024.09.29.
- (107) <https://chemprop.readthedocs.io/en/main/quickstart.html> Megtekintve: 2024.09.29.
- (108) Beard, E. J.; Sivaraman, G.; Vázquez-Mayagoitia, Á.; Vishwanath, V.; Cole, J. M. *Scientific data* **2019**, *6*, 307.
- (109) https://figshare.com/articles/dataset/Comparative_dataset_of_experimental_and_computational_attributes_of_UV_vis_absorption_spectra/7619672/2 Megtekintve: 2024.09.29.
- (110) <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/brochures/BR53063-guide-pharmaceutical-standards-uv-vis-spectrophotometers.pdf> Megtekintve: 2024.09.29.
- (111) Robinson, P. K. *Essays in biochemistry* **2015**, *59*, 1.
- (112) Wang, F.; Liu, Y.; Du, C.; Gao, R. *Biomolecules* **2022**, *12*, 599.