



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat

Makromolekulák alkotta (bio)kolloidok kialakítása változó
oldhatóságú vegyületek formulálására

Kókai Kata Panna

Vegyész mesterszak II. évf.

Témavezető:

Juhászné Dr. Csapó Edit

egyetemi docens

Szeged

2024

Tartalmi összefoglaló

A Szegedi Tudományegyetem Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszékén működő MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoport – Juhászné Dr. Csapó Edit vezetésével – már megalakulása előtt is intenzíven foglalkozott szérumfehérjék, valamint természetes és szintetikus (ko)polimerek alkotta hatóanyag hordozóként funkcionáló kolloid részecskék kialakíthatóságával. Ezen gyógyszerhatóanyag hordozó rendszerek (DDS) döntően a kolloid mérettartományba sorolhatóak ($d = 1\text{--}500\text{ nm}$). A hordozó részecskék felhasználhatóak olyan terápiás vegyületek vagy akár étrendkiegészítők és vitaminok szervezetbe vitelére is, amelyek célzott helyre történő eljutását jelentősen nehezítik a nevezett vegyületek korlátozott oldhatósága vagy instabilitása (pl.: hőmérséklet- vagy fényérzékenységük stb.), illetve a hatóanyagok formulálása révén növelhetjük hatékonyságukat is.

A szérumfehérjék és (ko)polimerek kombinálása révén önszerveződéssel is kialakítható összetett hordozó részecskék tulajdonságainak megismerése új kutatási irányvonal a kutatócsoportban, mely munkához 2024-ben csatlakoztam. A diákköri munkám során egy szérumfehérje, a vasmentes-transzferrin (Tf), és egy szintetikus kopolimer, a poli-(tejsav-glikolsav (PLGA), kombinálásával egy új hordozó részecske nanoprecipitációs eljárással történő kialakításán dolgoztunk, melyre a szakirodalomban hivatkozást még nem találhatunk. Vizsgáltuk a makromolekulák közötti, főként másodrendű kölcsönhatások révén milyen méreteloszlású részecskék állíthatók elő. A részecskék előállítására az erősen toxikus oldószerek használatát mellőztük, és stabilizálószerként egy nemionos felületaktív anyagot, az E-vitamin egy biokompatibilis származékát (D- α - tokoferol polietilén-glikol szukcinát, TPGS) alkalmaztuk. Ezen aktív E-vitamin a részecskék stabilizálásán túlmenően hatóanyagként is funkcionálhat és amfipatikus karaktere révén szolubilizációval elősegítheti más hidrofób hatóanyagok kapszulázását is. A Tf/PLGA részecskéket eltérő oldhatóságú modell vegyületek formulálására használtuk. Nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagok (NSAID) közül modellként választottuk a ketoprofént (KP) és az ibuprofént (IBU), valamint az antioxidánsok közé tartozó a kolekalciferolt (D₃-vitamin) is tanulmányoztuk. Meghatároztuk ezen kismolekulák kapszulázási hatékonyság- (EE(%)) és hatóanyag töltöttség (DL(%)) értékeit a Tf/PLGA/TPGS-alapú hordozóba formulálva, valamint a hatóanyagok *in vitro* kioldódásának vizsgálatára is végeztük kísérleteket.

Kulcsszavak: transferrin, PLGA, nanoprecipitáció, hatóanyag hordozó, kapszulázás

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	2
Tartalomjegyzék.....	3
Ábra- és táblázatjegyzék.....	4
Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
1.1. A hatóanyag hordozók általános áttekintése.....	7
1.2. A polimer-alapú hatóanyag hordozó rendszerek főbb sajátosságai	8
1.3. A szérumfehérje-alapú hatóanyag hordozó rendszerek.....	11
1.4. A kutatómunka közvetlen előzménye.....	13
1.5. A modellként választott hatóanyagok rövid jellemzése	14
2. Célkitűzés	17
3. Felhasznált anyagok és vizsgálati módszerek	18
3.1. Felhasznált vegyszerek.....	18
3.2. A kolloid részecskék kialakítási folyamata.....	19
3.3. A különböző hatóanyagok formulálása a Tf/PLGA hordozókhoz.....	19
3.4. A kísérletek során alkalmazott vizsgálati módszerek	20
3.4.1. Zavarosság mérés (Turbidimetria)	20
3.4.2. Dinamikus fényszórás (DLS)	20
3.4.3. Peremszögmérés	21
3.4.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)	21
3.4.5. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)	22
3.4.6. Transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)	22
3.4.7. UV-látható spektrofotometria (UV-Vis)	22
4. Eredmények és értékelésük	25
4.1. A Tf/PLGA hordozók kialakítása és jellemzése	25
4.2. A különböző hatóanyagok kapszulázása a Tf/PLGA hordozókba	34
4.3. Az eltérő modell vegyületek in vitro hatóanyag-kioldódási vizsgálatai.....	39
5. Összefoglalás	43
Köszönetnyilvánítás.....	44
Irodalomjegyzék	45
Melléklet	49

Ábra- és táblázatjegyzék

Ábrajegyzék

- 1. ábra:** Néhány nanoszerkezetű hatóanyag hordozó struktúra sematikus szerkezete [5]... 8
- 2. ábra:** A PLA és PLGA kopolimerek szerkezeti képlete (balra), ill. a nanokapszula és a nanogömb típusú részecskék sematikus ábrája (jobbra) [11]..... 9
- 3. ábra:** Polimer/szérumfehérje összetett részecskék nanoprecipitációs eljárással történő előállításának főbb lépései..... 10
- 4. ábra:** Reprezentatív méreteloszlási görbék a hatóanyaggal töltött kolloid részecskékről közvetlenül az elkészítés után és a vizes diszperzió egyhetes 5°C-on történő tárolása után (**A**), ill. az egy hétig tárolt részecskék vizes diszperziójának reprezentatív TEM felvétele a feltételezett sematikus szerkezettel (**B**) [26]..... 14
- 5. ábra:** A modellként választott hatóanyagok szerkezeti képletei..... 15
- 6. ábra:** A Tf/ PLGA-alapú kolloid rendszer zavarosságának változása a stabilizálószer (TPGS) jelenlétében és annak hiányában ($c_{TPGS} = 0,0625 \text{ mM}$)..... 25
- 7. ábra:** A stabilizátor (TPGS) jelenlétének hatása a hordozó részecskék átlagos hidrodinamikai méretére (d_{DLS}) és a PDI értékére (**A**: stabilizátor nélküli- és **B**: stabilizátorral Tf/PLGA hordozó). 26
- 8. ábra:** A stabilizátor (TPGS) jelenlétének hatása a hordozó részecskék átlagos hidrodinamikai méretére (d_{DLS}) és a PDI értékére különböző sókoncentrációk mellett (**A**: stabilizátor nélküli- és **B**: stabilizátorral a Tf/PLGA hordozó). 27
- 9. ábra:** Reprezentatív DLS mérésekkel meghatározott méreteloszlási görbék a stabilizátor nélküli (**A**) és stabilizátor melletti (**B**) hordozók esetén rögtön a részecskék kialakításának napján és 10 nappal később. 28
- 10. ábra:** A tiszta Tf, PLGA(50:50), TPGS (**A**) és a különböző Tf/PLGA(50:50,65:35, 75:25)/TPGS (**B**) hordozók FTIR spektrumai a karakterisztikus csúcsok kiemelésével. ... 29
- 11. ábra:** DSC görbéi, a degradációs hőmérséklet változásának (ΔT_d) kiemelésével a PLGA(50:50) és a Tf/PLGA(50:50)/TPGS (**A**), a PLGA(65:35) és a Tf/PLGA(65:35)/TPGS (**B**), a PLGA(75:25) és a Tf/PLGA(75:25)/TPGS (**C**) ill. a Tf és a TPGS (**D**)..... 31
- 12. ábra:** Adott PLGA kopolimerek és Tf/kopolimer összetett rendszerek peremszög értékei vízzel szemben, a mérés közben regisztrált reprezentatív fotókkal..... 32
- 13. ábra:** A makromolekulák alkotta hordozó részecskék reprezentatív TEM képei (**A**: Tf/PLGA/TPGS; **B**: HSA/PLGA/TPGS). 34

14. ábra: A kolekalciferol (D ₃) UV-spektrumai 1,4-dioxánban növekvő D ₃ -vitamin koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese ($\lambda_{\max} = 267$ nm).	35
15. ábra: A ketoprofén UV-spektrumai 1,4-dioxánban növekvő KP koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese ($\lambda_{\max} = 252$ nm).	36
16. ábra: A ibuprofén UV-spektrumai etanolban növekvő IBU koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese ($\lambda_{\max} = 223$ nm).	37
17. ábra: A formulálatlan D ₃ -vitamin ill. a hatóanyagot tartalmazó formuláció kioldódási profilja fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között (Weibull-modellel illesztve).	40
18. ábra: A formulálatlan KP ill. a hatóanyagot tartalmazó formuláció kioldódási profilja fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között (Weibull-modellel illesztve).	41
19. ábra: A formulálatlan IBU ill. a hatóanyagot tartalmazó formuláció kioldódási profilja fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között (Weibull-modellel illesztve).	42

Melléklet ábra jegyzéke

1. M ábra: A D ₃ -vitamin UV-spektrumai fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között növekvő D ₃ koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese.	49
2. M ábra: A ketoprofén UV-spektrumai fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között növekvő KP koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese.	49
3. M ábra: A ibuprofén UV-spektrumai fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között növekvő IBU koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese. ...	50

Táblázatjegyzék

1. táblázat: A már korábban publikált BSA/PLGA [26] és a Tf/PLGA TPGS-sel stabilizált hordozó rendszerek peremszög értékei vízzel szembeni összehasonlítása.	33
2. táblázat: A vizsgált hatóanyagok kapszulázási hatékonyság értékei (EE(%)) és a részecskék hatóanyag töltöttségeinek (DL(%)) összehasonlítása.	38
3. táblázat: A vizsgált hatóanyagok kapszulázási hatékonyság értékei (EE(%)) és a részecskék hatóanyag töltöttségeinek (DL(%)) összehasonlítása, ugyanazon kiindulási koncentrációk esetén ($c = 0,4$ mg/cm ³).	39
4. táblázat: A kioldódási görbékre nem-lineáris paraméterbecsléssel illesztett kinetikai modellek (5–9. egyenlet) korrelációs együtthatói, kiemelve a legjobb illesztés adatai.	42

Rövidítések jegyzéke

ACE	aceton
BSA	marha szérum albumin
D3	kolekalciferol (D ₃ -vitamin)
DDS	gyógyszerhordozó rendszerek (Drug Delivery Systems)
DSC	differentiális pásztázó kalorimetria
EtOH	etil-alkohol (etanol)
FDA	Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (USA)
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
HSA	humán szérum albumin
IBU	ibuprofén
KP	ketoprofén
MQ víz	ultratiszta Milli-Q víz (fajlagos vezetés: 0,055 mS/cm 25 °C-on)
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyag
PBS	foszfát pufferes sóoldat (pH = 7,4, 0,9 % NaCl)
PCL	poli(kaprolakton)
PEC	polielektrolit komplex
PEG	polietilén-glikol
PLA	poli(tejsav)
PLGA	poli-(tejsav-glikolsav)
PNIPAM	poli(<i>N</i> -izopropil-akrilamid)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
Tf	transzferrin
TP	<i>D</i> - α -tokoferol
TPGS	<i>D</i> - α -tokoferol polietilén-glikol szukcinát
TVK	teljes vaskötő képesség
TWEEN	Tween 20
UV-Vis	UV-látható (spektrofotometria)

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

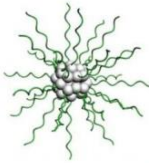
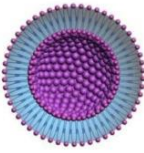
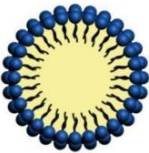
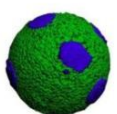
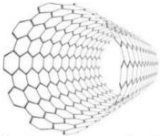
1.1. A hatóanyag hordozók általános áttekintése

Számos gyógyszerhatóanyag rövid felezési idővel, gyors metabolikus lebomlással, alacsony biológiai hozzáférhetőséggel és korlátozott szöveti eloszlással rendelkezik, ezáltal a szervezeten belül a célhelyre történő eljutása korlátozott. Mindezen példaként említett tulajdonságok miatt a gyógyszerhatóanyagokat hordozó mikro-, vagy nanoszerkezetű rendszerek alkalmazásával lehetőség nyílna új, korszerű terápiás lehetőségek fejlesztésére [1,2]. A hordozórendszerek megóvják az aktív hatóanyagokat pl.: a lebomlástól, valamint szabályozható mennyiségben juttatható el alkalmazásukkal a gyógyszer a célhelyre, illetve a szükségtelen toxikus mellékhatások is csökkenthetők [3]. A gyógyszerek terápiás hatásának helyére történő eljuttatásának módszerei még mindig a gyógyszerkutatás egyik meghatározó témája, ezért a hatékony tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerhordozó rendszerek tervezése fontos kihívás a klinikai kutatásokban [4].

A kolloid mérettartományú részecskéket kis méretük (1–500 nm) és anyagi minőségüktől függő egyedi tulajdonságaik miatt gyakorta tanulmányozzák, mint potenciális hatóanyag hordozó rendszerek. Néhány ilyen kolloidális hordozó sematikus szerkezetét az **1. ábra** mutatja [5].

A legújabb megközelítéseket figyelembe véve a leggyakrabban használt gyógyszerhordozók közé tartoznak a nanoszerkezettel rendelkező mind szervetlen-, mind szerves-alapú struktúrák (pl.: polimer, kerámia, és fémes), liposzómák, micellák, dendrimerek stb. A megfelelő gyógyszerhordozó rendszerek használatának elsődleges oka, hogy képesek biztosítani a gyógyszer nagyobb mennyiségű és hosszabb ideig tartó biológiai hozzáférhetőségét, és ezáltal a terápiás hatékonyságot [6,7].

Munkánk során szintetikus polimerek és szérumfehérjék alkotta, kolloid mérettartománnyal rendelkező hordozó részecskék kialakításával és azok változó oldhatóságú vegyületek formulálására gyakorolt hatásának feltérképezésével foglalkoztam, így a következő alfejezetben – a téma sokrétűsége és a diákköri dolgozat terjedelmi korlátai miatt – csak ezen fentebb megnevezett makromolekulák főbb tulajdonságait foglalom össze.

 Polimer-alapú hordozók	 Micellák	 Dendrimerek
 Liposzómák	 Szilárd lipid hordozók	 Arany hordozók
 Mágnes-alapú hordozók	 Vírus-alapú hordozók	 Szén nanocső-alapú hordozók

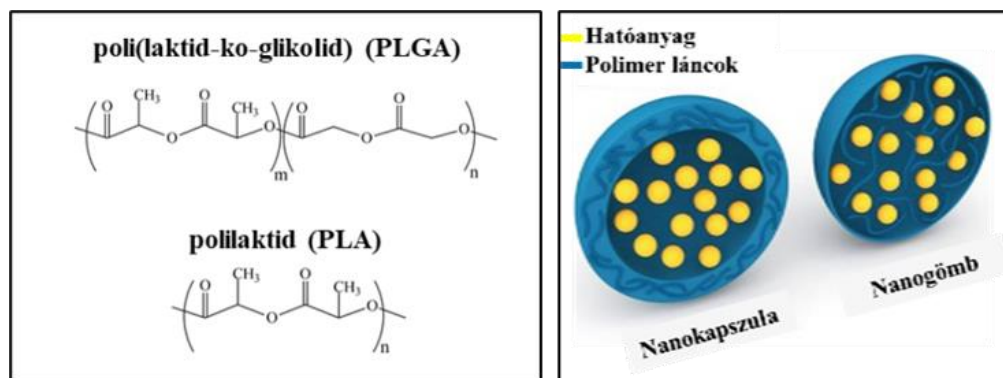
1. ábra: Néhány nanoszerkezetű hatóanyag hordozó struktúra sematikus szerkezete [5].

1.2. A polimer-alapú hatóanyag hordozó rendszerek főbb sajátosságai

Gyógyszerhatóanyagok formulálására alkalmazható hordozók egyik nagy családját a polimer-alapú rendszerek alkotják, ahol kiemelt cél biokompatibilis és biodegradábilis, tehát nem-toxikus makromolekulák felhasználása. Alkalmazásuk egyik legfontosabb feltétele, hogy a szervezetbe történő bejutásuk esetén a hatóanyag felszabadulásakor lejátszódó polimer degradáció olyan monomer végterméke(ke)t eredményezzen, melyek az emberi szervezetben lejátszódó anyagcsere folyamatok révén lebonthatóak. Ezen makromolekulák lehetnek természetes eredetűek, mint pl.: a kitozán, az alginát, vagy éppen a zselatin, de szintetikusan előállított származékok (pl.: poli(tejsav) (PLA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), polikaprolakton (PCL), polietilén-glikol (PEG), poli(*N*-izopropil-akrilamid) (PNIPAM)) is [8,9].

Munkánk során a PLA kopolimerjei közül a legelterjedtebben vizsgált, a glikolsav mellett előállított poli(laktid-ko-glikolid)-t tanulmányoztam. A láncban lévő glikolsav mennyiségét növelve a makromolekula hidrofilitása és azáltal degradációs sebessége is növelhető. Hidrolízise során tejsav és glikolsav monomeregységek képződnek, ami metabolikus úton a Krebs-ciklus révén lebontható. Ennek köszönhetően a PLGA kopolimerek FDA (*Food and Drug Administration*, Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (USA)) engedéllyel rendelkeznek, így hatóanyag hordozó rendszerként való felhasználásukban nagy potenciál rejlik [10]. Ezen polimer-alapú

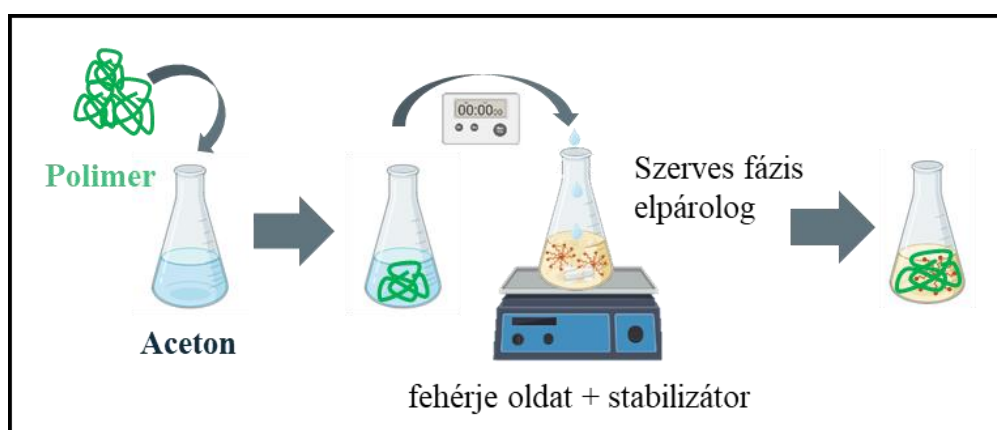
hordozó rendszerek esetén a hatóanyag elhelyezkedésétől függően több eltérő szerkezetet különböztetünk meg, mivel a hatóanyag megkötődhet a részecskék felületén vagy a részecskékben egyenletesen eloszlva, de akár egy központi magban csoportosulva is [11,12]. A PLA és PLGA kopolimerek szerkezetét a **2. ábra** (balra) mutatja be a nanokapszula és nanogömb típusú hordozók ábrái mellett (**2. ábra** (jobbra)).



2. ábra: A PLA és PLGA kopolimerek szerkezeti képlete (balra), ill. a nanokapszula és a nanogömb típusú részecskék sematikus ábrája (jobbra) [11].

Nanokapszula típusú rendszereknél a hatóanyag magokat egy polimer héj borítja, míg a nanogömböknél a hatóanyag a polimer mátrixban homogénen oszlik el. Ezen struktúráknak a kialakulását az előállításukhoz alkalmazott kísérleti módszerek típusa és azok kísérleti körülményei nagymértékben szabályozzák. A fentebb említett sajátságai alapján a polimer-alapú hordozókat egyaránt alkalmazzák rákellenes vegyületek, vakcinák, vitaminok vagy akár kisebb hormonok formulálására is. Előállításukat tekintve ma már számos eljárás ismert a szakirodalomban, ahol az egyes eljárások között megkülönböztetünk olyanokat, ahol a polimer-alapú hordozó részecskéket a kiindulási monomeregységekből állítjuk elő polimerizációval vagy polireakciókkal, illetve már kereskedelmi forgalomból beszerezhető kész polimerek felhasználásával. Kutatócsoportunk munkatársai a fentebb megnevezett módszerek mindegyikével állítottak már elő koloid részecskéket, de költséghatékonyság szempontjából a kereskedelmi forgalomban kapható kopolimerекből kialakítható rendszerek tanulmányozásával foglalkoznak. Polimerek felhasználásával a leggyakrabban alkalmazott eljárások közé sorolhatjuk pl.: az emulziós, a gélesedési, a „kisózásos” ill. a nanoprecipitációs technikákat, melyek révén változó méretű koloid mérettartományú hordozó részecskék alakíthatók ki.

Kutatómunkám során ezen utóbbi eljárást sajátítottam el, amelynek főbb lépéseit – az általam felhasznált anyagokat figyelembe véve – sematikusán a **3. ábrán** szemléltetem. Ezen előállítási folyamat során – melyet másnéven oldószer kiszorításos eljárásnak is nevezhetünk – a felhasználni kívánt hidrofób sajátságú polimert és ideális esetben a szintén hidrofób karakterű hatóanyagot egy vízzel jól elegyedő szerves oldószerben oldják fel és az így elkészített oldatot a stabilizátort is tartalmazó vizes közegbe csepegtetik állandó sebességgel. Mivel diákköri munkám kapcsán vegyes összetételű részecskék kialakíthatóságán dolgoztunk, a szérumfehérjét is a vizes fázis tartalmazta a stabilizátorral együtt, mely ilyen módon egy kis módosítása a klasszikus nanoprecipitációs eljárásnak. A szerves oldószer teljes mértékű elpárologtatásával a polimer kicsapódik a vizes közegben, ami főként nanorészecskék vagy kolloid mérettartományú részecskék képződését eredményezi. Szerves oldószerként gyakorta használnak acetont, etanolt, dioxánt, dimetil-szulfoxidot stb., mivel nagyon jól elegyednek vízzel és az emulziós eljáráshoz képest kevésbé toxikusak a környezetre.



3. ábra: Polimer/szérumfehérje összetett részecskék nanoprecipitációs eljárással történő előállításának főbb lépései.

Kutatócsoportunk munkatársai nanoprecipitációs eljárással már sikeresen állított elő tisztán PLA- és PLGA-alapú kolloidális (180–280 nm) hatóanyag hordozó részecskéket, ahol eltérő hidrofilitású vegyületek kapszulázhatóságát tanulmányozva bizonyították, hogy a molekulák hidrofilitásának csökkenésével preferáltabb a mag-héj szerkezetű kolloid részecskék kialakítása. A tokoferol (TP)-tartalmú rendszerek kialakítása során igazolták, hogy a hatóanyag mennyisége növelhető a glikolid tartalom emelésével és annak kioldódása a polimer hidrofilitásának módosításával erősen kontrollálható [13]. Emellett azonos méretű

(~ 200 nm) és ketoprofén (KP)-tartalmú (DL(%) ~ 7,5 %), PLGA-alapú mag-héj részecskék kialakítása során igazolták, hogy a kontrollált hatóanyag felszabadulást a PLGA magon kialakított Pluronic F127 (PLUR) vagy Tween 20 (TWEEN) alkotta héjak szabályozása révén lehet kontrollálni. Rámutattak arra, hogy a nagyobb molekulatömegű PLUR egy laza héjat alkot a PLGA részecskéken, ami elősegíti a hatóanyag gyorsabb kioldódását, míg a kisebb molekulatömegű TWEEN egy kompaktabb adszorpciós réteget képez a polimermag felületén, így a hatóanyag felszabadulása gátoltabb [14].

1.3. A szérumfehérje-alapú hatóanyag hordozó rendszerek

Az elmúlt évtizedben a természetes makromolekulák közül a fehérjék felhasználásával előállítható fehérje-alapú hordozók alkalmazása is a figyelem középpontjába került. A gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztésénél a növényi (pl.: szójafehérje) mellett az állati eredetű fehérje-alapú rendszerek használata sokkal inkább elterjedtebb (mint pl.: zselatin, transzferrin, ovalbumin, humán (HSA) ill. marha szérum albumin (BSA) stb.) [15–17]. A Tudományos Diákköri dolgozatom elkészítése során a HSA-t és a transzferrint (Tf) használtuk fel gyógyszerhordozó kolloid részecske előállítására a PLGA kopolimer mellett. A szérum albumin-alapú részecskékkel való munkát a Kutatócsoport munkatársainak korábbi munkái alapozták meg.

A Kutatócsoport munkatársai korábban BSA-alapú hordozó részecskéket állítottak elő deszolvációs/kicsapásos eljárással, mely révén neuroaktív hatással rendelkező kinurénsav vér-agy-gáton való transzportját sikerült megvalósítani, ugyanis a nevezett vegyület önmagában – hordozó nélkül – nem képes a központi idegrendszer szöveti terét a vértől elválasztó védőgáton átjutni [18]. A kifejlesztett, kb. 100 nm-es átlagos átmérővel rendelkező BSA-alapú formuláció elfogadott magyar (HU1500356) és nemzetközi szabadalommal (US10857236B2) is rendelkezik. A BSA és a HSA szérumfehérjék is alkalmasak ún. polielektrolit komplex elnevezésű (PEC) komplex hordozó részecskék kialakítására, attól függően, hogy milyen pH-n szeretnénk a komplex részecskék létrehozását. Izoelektromos pontjuk alatt döntően pozitív, míg izoelektromos pontjuk felett negatív felületi töltéssel rendelkeznek, így előbbi esetben polianionnal, míg utóbbi esetben polikationnal elektrosztatikus kölcsönhatás és hidrofób kölcsönhatások révén komplex részecskék alakíthatóak ki [19].

Ezen utóbbi, a makromolekulák önszerveződésén alapuló eljárást használtuk a korábban említett nanoprecipitációs eljárással kombinálva arra, hogy egy teljesen új

gyógyszerhatóanyag hordozó rendszert alakítsunk ki jelen kutatómunkámhoz. A fehérje-alapú hatóanyag hordozó makromolekulaként a Tf-t választottuk, mivel az izoelektromos pontja nem tér el jelentősen a szérum albuminétól, így várhatóan alkalmas lehet a PLGA-val a fenn említett eljárások révén hordozó részecskék kialakítására.

A Tf az állati vérplazmában megtalálható a vasion fő szállító fehérjemolekulája. Az emberi szervezetben a vas létfontosságú nyomelem, melynek elengedhetetlen szerepe többek között a vörösvértestek működéséhez. Segítségével szállítódik az oxigénmolekula a tüdő ereiből a szervezet minden sejtjéhez. A Tf egy főként a májban termelődik, és felezési ideje körülbelül 8 nap a szérumban. A keringő vérben, pontosabban a vér szérum részében a vas molekula a transferrinhez kötve szállítódik. A szérum teljes vaskötő képessége (TVK) a vér transferrin szintjének a függvénye, így koncentrációja a vérben az egyén tápláltsági állapotát is tükrözi. A szérumfehérje elsődleges élettani funkciói közé tartoznak még az ozmotikus nyomás- és a pH-szabályozása, segítve számos endogén anyag és gyógyszer, vagy akár biomarkerek szállítását, ezzel biztosítva a lehetséges új diagnosztikai útvonalakat [20].

A Tf két lebenyből áll az N- és C-terminálison; ezeknek a lebenyeknek nagyon magas a homológiája, és egy rövid régió köti össze őket. Minden lebeny egy fémionhoz, például vashoz, galliumhoz, alumíniumhoz, cinkhez vagy kadmiumhoz kötődhet, különböző affinitással [21].

A Tf-t potenciális lehetőségként azonosították a gyógyszerhatóanyaggal töltött hordozó részecskék kialakításához, a rák kezelésére és diagnosztizálására. A legtöbb Tf és kolloid részecske kölcsönhatása konjugációs módszerrel tioéter kötés kialakítását foglalja magában a tiolált transferrin és a maleimid tartalmú részecskék között [22]. A Tf-t, mint hatóanyag hordozót már számos korábbi megközelítésben megkísérelték, de jellemzően a Tf, mint cél ligandum alkalmazhatóságát bizonyították. Ezen esetek egy részében a részecskék elvesztették specifitásukat *in vivo* [23]. Ennek kiküszöbölése érdekében például előállítottak egy olyan PLGA-PEG-alapú Tf-módosított hordozó rendszert, amely átgát a vér-agy-gáton el egészen a glióma sejtekbe, ahová így gyógyszerhatóanyagokkal együtt sikeres kezelhetik a glioblasztómát [24].

A szakirodalomban a szérumfehérje-alapú hatóanyag hordozó rendszerek előállítására számos eljárás ismeretes, mint a fehérjék önszerveződése, emulgeálás, gélesítésen alapuló, porlasztva szárítás ill. az ún. deszolvációs (kicsapásos) eljárások [25]. Azért is kiválóan alkalmasak a szérumfehérjék hatóanyag hordozó részecskéként funkcionálni, mivel a

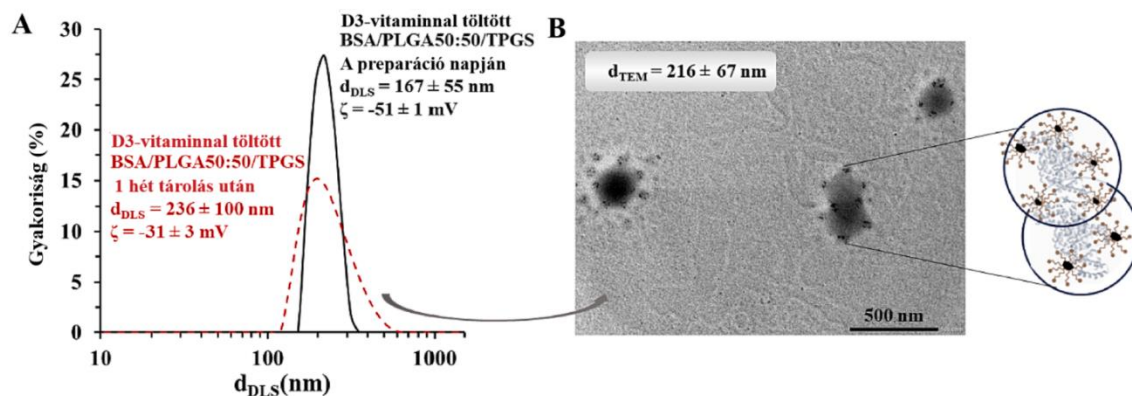
hatóanyag a fehérje adott kötőhelyeihez is képes kapcsolódni, de a fehérje részecske felületén adszorbeálódva is megtalálható.

1.4. A kutatómunka közvetlen előzménye

A *Tartalmi összefoglalóban* is már említésre került, hogy a kutatómunkánk közvetlen előzményeként a Kutatócsoport munkatársai, a BSA szérumfehérje és a PLGA kopolimer kombinálásával, nanoméretű hordozó részecskéket állított elő ($d \sim 200$ nm), mely révén a polimer hidrofób karakterét hidrofilebbé sikerült módosítani [26], melyet peremszög mérésekkel bizonyítottak. A hordozó részecskék előállítására az erősen toxikus oldószerek használatát mellőzték és stabilizálószerként egy nemionos felületaktív anyagként funkcionáló természetes E-vitamin-származékot, a TPGS-t alkalmazták, amely egyedülálló hármas szereppel rendelkezhet ezen formulációban. A hordozórészecskék stabilizálásán túlmenően aktív E-vitamin hatóanyagként is funkcionál, és szolubilizációval elősegítheti más hidrofób hatóanyagok kapszulázását is.

Mind a BSA/TPGS, mind a BSA/PLGA kölcsönhatásokat elsőként jellemezték kvantitatív módon a szakirodalomban számos fizikai-kémiai és kolloidkémiai technikával (pl.: izoterm titrációs kalorimetria (ITC), cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia, turbiditás mérés stb.) annak érdekében, hogy a hordozó részecskék vizes közegű előállítása megvalósítható legyen.

Ehhez a munkához csatlakozva még Projekt munkám keretein belül tovább optimalizáltuk a szérum albumin/PLGA hordozó részecskék tisztítási lépését, ill. egy már meglévő modell vegyület a kolekarciferol (D_3 -vitamin) mellett egy másik, a ketoprofén formulálhatóságát vizsgáltuk. A D_3 -vitamin tartalmú BSA/PLGA/TPGS részecske reprezentatív méreteloszlási görbéi, illetve egy transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvétel a hatóanyag tartalmú hordozó részecskéről egy heti tárolást követően a **4. ábrán** látható.



4. ábra: Reprezentatív méreteloszlási görbék a hatóanyaggal töltött kolloid részecskékről közvetlenül az elkészítés után és a vizes diszperzió egyhetes 5°C-on történő tárolása után (A), ill. az egy hétig tárolt részecskék vizes diszperziójának reprezentatív TEM felvétele a feltételezett sematikus szerkezettel (B) [26].

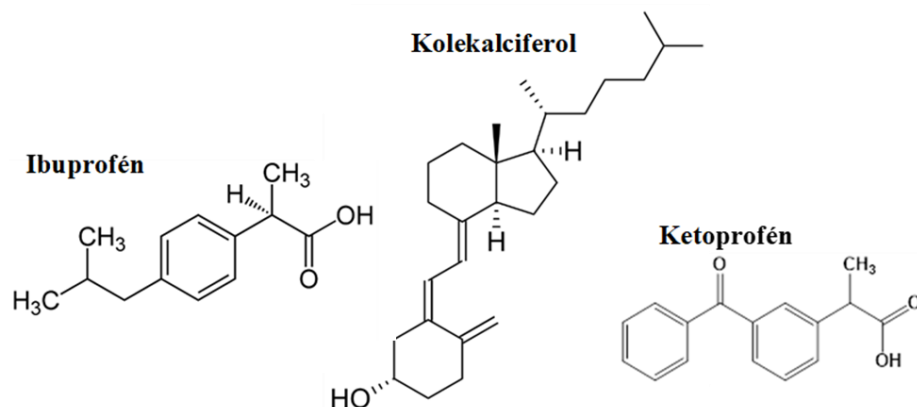
A Projekt munkám során elsajátított módszerek (nanoprecipitációs eljárás, önszerveződésen alapuló eljárás, deszolvatációs technika) ismeretében kíséreltük meg a szérum albumin Tf-re történő cseréjét. A PLGA/Tf párosításra a szakirodalomban is található adat, de nem olyan összetételű rendszerre, mint amelyet munkánk során terveztünk kialakítani. J. Chang és munkatársai például Tf-nel, BSA-nal és Tween20 felületaktív anyaggal felületmódosított PLGA-alapú részecskéket hoztak létre.

A Tf-nel borított PLGA részecskék átmérője $d < 100$ nm, és $\zeta = -31,9$ mV értékkel rendelkezett. Jól ismert, hogy a transferrin *in vivo* növelheti nanorészecskék agyi bejuttatását a vér-agy gáton keresztül, azonban az agyi felvételükben szerepet játszó mechanizmusok még nem tisztázottak egyértelműen. Munkájuk során igazolást nyert, hogy a fehérjék adszorpciója a részecskék felületén legalább 12 napig stabilnak bizonyult 37 °C-on. A tisztán PLGA-alapú és a BSA-nal módosított rendszerekkel ellentétben a Tf-PLGA részecskéket a sejtek nagymértékben adszorbeálták és endocitálták egy energiafüggő folyamat segítségével. Vizsgálataik arra utaltak, hogy a Tf-nel felületmódosított részecskék specifikus módon kölcsönhatásba lépnek a sejtekkel és a caveolae-útvonalon keresztül jutnak be a sejtekbe [27].

1.5. A modellként választott hatóanyagok rövid jellemzése

Modell vegyületként három kismolekulát választottunk ki, melyeket a Kutatócsoportban már előzetesen – más kolloid részecskék esetén – sikeresen használtak.

Ezen kismolekulák, az antioxidánsok közé tartozó kolekalciferol (D₃-vitamin), amely hidrofóbicitása miatt került be modell vegyületeink közé, illetve két fájdalomcsillapító hatású vegyület, a ketoprofén (KP), amely kevésbé vízdékony és az ibuprofén nátrium sója (IBU), amely hidrofil sajátságú. Szerkezeti képleteik az **5. ábrán** láthatóak.



5. ábra: A modellként választott hatóanyagok szerkezeti képletei.

A hidrofób sajátságú vitaminok, mint a D₃-vitamin az anyagcserefolyamat során létrejövő reaktív oxigén- és szénközpontú gyökök megkötésében játszhatnak szerepet, illetve az emberi szervezet anyagcsere folyamatainak szabályozásában. Ezáltal jelenlétük a szervezetben mérsékelhetik a reaktív gyökök esetleges mellékhatásait. Mindkét említett vitamin képes kapcsolódni hidrofób kölcsönhatásokon keresztül a szérum albumin hidrofób kötőzsebeibe [28], ennek megfelelően a Tf szérum fehérjéhez is. A D₃-vitamin a 7-dehidrokoleszterinből UV-fény hatására végbemenő folyamatok által keletkezik, élettani hatással bíró formája a májban vagy vesében hidroxilálással keletkezik. A kolekalciferol (D₃-vitamin) egy szteroid hormon prekursora, ami a kalcium és a foszfát anyagcserét is szabályozza, többek között az izomműködésre és az immunrendszeri folyamatokra is hatással van [29].

A KP a nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyag (NSAID) család tagja, fehér kristályos por formában csaknem szagtalan. Metanolban nagyon jól, etanolban, acetonban vagy éterben jól oldódik, vízben pedig csaknem oldhatatlan. Olvadáspontja körülbelül 93–96 °C. Fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő és lázcsillapító hatású. Gyulladáscsökkentő hatás erősebb, mint az ibuproféné, viszont kevesebb mellékhatással és alacsony toxicitással rendelkezik. Szájon át szedhető és könnyen felszívódik a gyomor-bélrendszerből; 1 adagolás után a plazmában mért csúskonzentrációja kb. 0,5–2 óra alatt érhető el. Felezési ideje 1,6–1,9 óra [30].

Az IBU kémiai neve a (RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propánsav és gyakorlatilag nem oldódik vízben, de szabadon oldódik acetonban és metilén-kloridban. Ezért kísérleteink során az IBU nátrium sóját használtuk, amely viszont gyakorlatilag korlátlanul oldódik MQ vízben pH = 7,40 esetén. A leggyakrabban alkalmazott propionsav és arilpropionsav származékok között sorolhatjuk fel az IBU-, illetve KP-tartalmú készítményeket, az un. „profének”-et. Mellékhatásaik lehetnek a gyomor nyálkahártya irritációja/sérülése (gyomorfekély), vérárvadási-mechanizmusra kifejtett hatás, diuretikus hatás (nátrium- és vízretenció) és akár bőrgyógyászati tünetek megjelenését is okozhatják [31].

2. Célkitűzés

A gyógyszerhatóanyag hordozó és leadó rendszerek fejlesztése folyamatosan a kutatások középpontjában áll. A diákköri munkám során a MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoporthoz csatlakoztam a 2023/2024. tanév II. félévében. A Kutatócsoport munkatársai – a nemesfém nanoszerkezetekkel kapcsolatos kutatómunka mellett – már több éve intenzíven foglalkoznak főként makromolekulák felhasználásával előállítható kolloidális hatóanyag szállító részecskék fejlesztésével. A munka során tanulmányozták már természetes (pl.: hialuronsav, kitozán) és szintetikus (pl.: PLA, PLGA) makromolekulák, valamint tisztán szérumfehérjék alkalmazhatóságának korlátait mind hidrophil és mind hidrophób modell vegyületek formulálhatóságára vonatkozóan. A tavalyi évben indult azon kutatómunka, mely során szérumfehérjék kopolimerekkel való kölcsönhatásának eredményeképpen állítottak elő hordozó részecskéket, mely kutatómunkából egy nemzetközi közlemény is született.

Ezen munka folytatását tűztük ki célul, azaz új összetételű kolloidális hordozó részecskék előállítását, illetve az újonnan létrehozott részecskék fizikai kémiai és kolloidkémiai finomhangolását, utolsó lépésként pedig modell vegyületekkel való formulálhatóságának vizsgálatát. Munkánk során elsőként a makromolekulák (Tf, PLGA) optimális arányait kívántuk meghatározni zavarosság mérések és dinamikus fényszórás (DLS) mérések sorozatán keresztül, majd vizsgáltuk a stabilizátor jelenlétének szükségességét is, így kialakítva az új hatóanyag hordozót. A részecskék összetételének és szerkezetének tanulmányozása végett peremszögméréseket, Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiás (FTIR) valamint differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérésekkel is jellemeztük a hordozót. Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételeket készítettünk, hogy meghatározhassuk az előállított kolloidális hordozó részecskék morfológiáját, valamint átlagos méretét és méreteloszlását.

Végezetül a Tf/PLGA/TPGS hatóanyag hordozókat felhasználva eltérő oldhatóságú modell vegyületek (D₃-vitamin, KP, IBU) formulálhatóságát is tanulmányozni kívántuk. Célunk volt meghatározni a részecskék kapszulázási hatékonyság (EE(%)) és hatóanyag töltöttség (DL(%)) értékét valamint a hatóanyagok *in vitro* kioldódásának feltérképezésére is terveztünk vizsgálatokat a rendelkezésre álló idő alatt.

3. Felhasznált anyagok és vizsgálati módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek

- Transzferrin (Tf; 80 kDa; vasmentes, $\geq 98\%$, *Sigma*)
- Poli(tejsav-glikolsav) 50:50 (PLGA 50:50; $M_w = 30\text{--}60$ kDa; *Sigma*)
- Poli(tejsav-glikolsav) 65:35 (PLGA 65:35; $M_w = 40\text{--}75$ kDa; *Sigma*)
- Poli(tejsav-glikolsav) 75:25 (PLGA 75:25; $M_w = 66\text{--}107$ kDa; *Sigma*)
- D- α -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát (TPGS; 25% TP tartalom; *Sigma*)
- Ketoprofén (KP; 99 %; *Sigma*)
- Ibuprofén (IBU; ≥ 98 %; *Sigma*)
- Kolekalciferol (D₃-vitamin; ≥ 98 %; *Sigma*)
- Nátrium-klorid (NaCl, ≥ 99 %, *Molar*)
- Aceton (ACE; ≥ 99 %; *Molar Chemicals Kft*)
- 1,4-dioxaciklohexán (1,4-dioxán; $\geq 99,8$ %, *Sigma*)
- Etanol (EtOH; $\geq 99,9$ %, *Molar*)
- Nátrium-hidroxid (NaOH; 99,8 %; *Molar*)
- Sósav (HCl; 37,0 %; *VWR*)
- Nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; ≥ 99 %; *Molar*)
- Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; 98,5 %; *Molar*)
- Nátrium-dodecil-szulfát (SDS; $\geq 98,5$ %; *Sigma*)
- Cellulóz alapú dialízis membrán (vágási érték = 14 kDa; *Sigma*)

A törzsoldatok és pufferek elkészítéséhez nagy tisztaságú MQ vizet (*Millipore, Milli-Q Integral3*, fajlagos vezeték: 0,055 mS/cm 25 °C) használtunk minden esetben. A preparatív munka analitikai tisztaságú vegyszerek felhasználásával történt, vagyis alkalmazásuk előtt további tisztítást nem végeztünk.

Az *in vitro* hatóanyag-kioldódási vizsgálatokhoz használt foszfát pufferes sóoldat (PBS) elkészítéséhez 1,3867 g dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrátot ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; $c = 0,0155 \text{ M}$), 0,1749 g nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrátot ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; $c = 0,0045 \text{ M}$) és 2,25 g nátrium-kloridot (NaCl; $c = 0,1540 \text{ M}$) oldottam fel 250 cm³ MQ vízben.

A fiziológias körülmények elérése érdekében az oldat pH értékét 7,4-re állítottuk be. Az oldatot 4 °C-on tároltuk, valamint elkészítést követően legfeljebb három napig használtam.

3.2. A kolloid részecskék kialakítási folyamata

A nem-ionos tenzid (TPGS) felhasználása mellett előállított Tf/PLGA-alapú hordozók előállítása során első lépésben a TPGS törzsoldatot készítettem el ($c_{\text{TPGS}} = 9,0 \text{ mg/cm}^3$), melyet az oldódás elősegítése érdekében 90 percen keresztül 120 rpm sebességgel kevertettem. Második lépésben a Tf törzsoldatát ($c_{\text{fehérje}} = 2,0 \text{ mg/cm}^3$) is elkészítettem, melyet 30 percig 370 rpm sebességgel kevertettem.

Ezt követően a szérumfehérje $1,0 \text{ cm}^3$ -es vizes oldatához adtam a nem-ionos TPGS tenzid törzsoldatból úgy, hogy a TPGS:Tf anyagmennyiség aránya 10:1 legyen. Ez az arány a TPGS cmc értékét ($\text{cmc} = 0,020 \pm 0,001 \text{ mM}$) biztosan meghaladja. Ezután 4 cm^3 össztérfogatra kiegészítettem a mintákat MQ vízzel, majd 90 percen át kevertettem a rendszereket. Mindeközben a PLGA-t ($c_{\text{PLGA50:50}} = 10,0 \text{ mg/cm}^3$) acetonban (ACE) oldottam, majd oldódás után $0,2 \text{ cm}^3$ térfogatrészt részletekben a vizes oldathoz csepegtettem. A PLGA acetonos oldatának hozzáadását követően 1 percig 700 rpm, majd ezután 30 percig 370 rpm sebességgel kevertettem a rendszert.

Az előállított mintákat centrifugálással előtisztítottam, egyes mérések előtt pedig 30 percen át 14 000 rpm fordulatszámon tisztítottam. A felülúszók eltávolítását követően a mintákat MQ vízben való rediszpergálás után 4 °C-on tároltam.

3.3. A különböző hatóanyagok formulálása a Tf/PLGA hordozóhoz

A D₃-vitamin vizes fázisban rosszul oldódik, de szerves oldószerekben, mint például az ACE-ban kiválóan. A formulálhatóság érdekében a D₃-vitamint három különböző tömegarányban (D₃:Tf = 1:2, 1:4, 1:8) adtam a rendszerhez úgy, hogy a D₃ molekulákat a PLGA ACE-os oldatának megfelelő térfogatába ($V_{\text{PLGA}} = 0,2 \text{ cm}^3$) előzetesen feloldottam és a 3.2. *A kolloid részecskék kialakítási folyamata* fejezetben leírtak szerint a szerves fázist a rendszerhez adagoltam.

A nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagokat (IBU, KP) a megfelelő térfogatú Tf vizes oldatában ($V = 1,0 \text{ cm}^3$) oldottam a pH beállítása nélkül. Az IBU nátrium sója formájában ebben a közegben jól oldódik, míg a KP vizes közegben alig, ezért a IBU esetén a három különböző IBU:Tf tömegarányt (4:1, 2:1, 1:1) vizsgáltunk, míg a KP esetén csak a

KP:Tf 1:4 (m/m) arány volt vizsgálható. A hatóanyag-tartalmú részecskéket egy éjszakán át szobahőmérsékleten 370 rpm fordulatszámon kevertettem, majd tisztítás után 4 °C tároltam.

A Tf/PLGA-alapú kolloidális részecskébe formulált hatóanyagok kapszulázási hatékonyságának, a részecskék hatóanyag töltöttségének ill. a hatóanyagok *in vitro* kioldódásának meghatározását minden esetben liofilizált mintákból végeztük. A hatóanyag-tartalmú részecskéket a tisztítási lépés után 4–4 cm³ MQ vízben rediszpergáltam, majd rögtön utána fagyasztva szárítottuk. A liofilizált mintákat -20 °C hőmérsékletű mélyhűtőben tároltuk a mérések megkezdéséig.

3.4. A kísérletek során alkalmazott vizsgálati módszerek

A kísérleti munka során alkalmazott mérés technikák rövid bemutatása az egyes technikák során alkalmazott pontos kísérleti leírásokat nem tartalmazzák, ezek az adott eredmény bemutatásánál kerülnek ismertetésre.

Néhány mérés technika esetében (FTIR, DSC és UV-Vis) a mérésekhez felhasznált pormintákat fagyasztva szárítással (liofilizálással) állítottuk elő. A minták fagyasztását -20 °C hőmérsékletű mélyhűtőben készítettük elő, illetve az oldószert 4 mbar nyomáson egy *Christ Alpha 1-2 LD* típusú fagyasztva szárító berendezéssel távolítottuk el. A mintákat minden esetben 4 °C-on tároltuk.

3.4.1. Zavarosság mérés (Turbidimetria)

A turbidimetriás mérések kivitelezése révén következtethetünk a kolloidális hordozó részecskék kialakulásáról ill. azok aggregációs folyamatáról is. Méréseink során a hordozó összetételének optimalizálásához hozzájárulva a turbiditás méréseket egy *LP2000 (Hanna Ins.)* turbidiméter segítségével végeztük. A méréseket szobahőmérsékleten ($T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$) kiviteleztem minden esetben, a PLGA koncentráció változtatásával titráltam a stabilizátor (TPGS) tartalmú és a TPGS nélküli fehérje (Tf) oldatokat. Minden esetben 3–3 ismételt mérést végeztem.

3.4.2. Dinamikus fényszórás (DLS)

A kolloid rendszerben lévő szóró centrumok Brown-mozgása okozza a fényszóródás intenzitásának változását. Minél kisebb méretűek a diszperzióban lévő részecskék, annál intenzívebb mozgást produkálnak. A részecskék folyamatosan mozgásban vannak, ezért

történik időbeli változás a szórt fény intenzitásában. Az, hogy mi az optimális mérési szög, a szórási intenzitásától és a minta koncentrációjától függ. Az előállított hordozó részecskék méretének, méreteloszlásának meghatározását *Horiba SZ-100* típusú dinamikus fényszórás mérő alkalmazásával végeztem. A 4 mW teljesítményű, 633 nm hullámhosszú He-Ne lézerrel megvilágított részecskéken szóródott fény intenzitásának időbeli fluktuációját rögzítettem. A tartomány, ahol a műszer pontosan mér, a 0,3 nm–10 µm közötti mérettartomány.

Az intenzitás változásait detektálva egy korrelációs függvényt hoz létre a digitális autokorrelátor. Ezeket a mérési pontokat detektálva a műszerhez kapcsolt program a részecskék diffúziós együtthatóját (D) határozza meg, majd az Einstein-Stokes egyenlet **(1. egyenlet)** alapján:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (1)$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet, η a viszkozitás és R a diffundáló részecske hidrodinamikai sugarát jelöli. Az egyenletet alkalmazva a részecskék hidrodinamikai átmérőjét számítja ki a már említett program, így az előállított hordozó struktúrák átlagos méretére (d_{DLS}) vonatkozó információk is meghatározhatóak.

3.4.3. Peremszögmérés

A peremszögméréseket szobahőmérsékleten *KRÜSS FM40Mk2 Easy Drop* típusú készülék segítségével rögzítettük, ahol a megfelelő értékeket a *Drop Shape Analyser (DSA25E)* program segítségével állapítottuk meg. A mérésekhez egy 0,5 mm átmérőjű, acél tűvel felszerelt fecskendővel és egy nagy felbontású kamerát használtunk.

A rétegek elkészítéséhez a Tf/PLGA/TPGS részecskéket tartalmazó mintákat használtam, melyet 5 rétegben csepegtettük egy-egy tárgylemezre, hogy minél homogénebb rétegek alakuljanak ki. A peremszög értékeket 25 °C hőmérsékleten és légköri nyomáson határoztuk meg 3–3 párhuzamos mérés átlagából.

3.4.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérések egy *Mettler-Toledo 822^e* készülék és egy *Mettler-Toledo TG/SDTA 851^e* műszer felhasználásával történt *Dr. Varga Norbert* segítségével. A detektált DSC görbéket 25–500 °C közötti hőmérséklettartományon

vettük fel 5 °C/perc felfűtési idő és 50 cm³/perc áramlási sebességű nitrogén közeg beállítása mellett.

3.4.5. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

Az FTIR méréseket egy ATR feltétellel (ATR PRO ONE) ellátott Jasco FT/IR-4700 spektrométeren végeztük liofilizált pormintákon, amelyek segítségével meghatározhatóak az egyszerű és az összetett biopolimerek szerkezetváltozásai, valamint az elkészített minták összetételére vonatkozóan is információkat nyerhetünk. Ehhez a normalizált spektrumokon látható karakterisztikus rezgési sávokat, illetve azok eltolódását vagy változását kell megfigyelnünk. A méréseket 128 interferogram átlagolásával 1 cm⁻¹ felbontás mellett a közép infravörös tartományon (500–4000 cm⁻¹).

3.4.6. Transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

Az előállított részecskék morfológiájának, valamint átlagos méretének és méreteloszlásának meghatározásához transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételeket készítettünk, ahol a felvételeket a jogosultsággal rendelkező Turcsányi Árpád készítette el. A felvételek egy Fei Tecnai G2 20 X-Twin High-Resolution típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal, 120 kV gyorsítófeszültség alkalmazása mellett készültek. Az átlagos átmérő értékeket 50–60 darab részecske méretének átlagaként határoztuk meg az ImageJ szoftver segítségével.

3.4.7. UV-látható spektrofotometria (UV-Vis)

A kolloidális hordozó részecskékbe formulált hatóanyagok kapszulázási hatékonyságának, a részecskék hatóanyag töltöttségének ill. a hatóanyagok *in vitro* kioldódásának meghatározását UV-Vis spektrofotometriás módszerrel végeztük. A méréseket egy Shimadzu UV-1800 két fényutas spektrofotométer segítségével 200–400 nm hullámhossz tartományon rögzítettük 1 cm úthosszú kvarc küvettában. A kalibrációs egyenest az abszorpciós maximumoknál leolvasható értékek alapján készítettük, amelyhez a Lambert-Beer törvényt (2. egyenlet) használtuk:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} c l \quad (2)$$

ahol a ϵ_{λ} moláris abszorbanca és az l optikai úthossz alapján a mért oldat koncentrációja (c) és az adott hullámhosszon mért abszorbanca (A_{λ}) közti összefüggés kizárólag híg oldatokra érvényes.

A regisztrált spektrumok, illetve a kalibrációs görbe alapján a kapszulázási hatékonyság értékét (EE(%)) (3. egyenlet) és a részecskék hatóanyag töltöttségét (DL(%)) (4. egyenlet) az alábbi egyenletekkel határoztuk meg:

$$EE(\%) = \frac{\text{hatóanyag kapszulázott tömege}}{\text{hatóanyag teljes tömege}} \times 100 \quad (3)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{hatóanyag kapszulázott tömege}}{\text{részecskék teljes tömege}} \times 100 \quad (4)$$

A különböző hatóanyagot tartalmazó formulációk mindegyikén *in vitro* hatóanyag kioldódási vizsgálatokat végeztünk, a hatóanyag felszabadulás időbeli változásának detektálásához. A méréseket fiziológiás körülmények alkalmazása mellett (PBS, pH = 7,4, 0,9% NaCl) 37 °C-on termosztált rendszerben, a D₃-vitamin formulált és formulátlan mintái esetében a pufferoldat tenzidet (SDS, $c = 5 \text{ mg/cm}^3$) is tartalmazott a kioldódó hatóanyag oldhatóságának növelése érdekében.

A cellában a mintát a pufferoldattól egy cellulóz membrán választotta el, amelyet a mérések megkezdése előtt legalább egy napon keresztül duzzasztottunk MQ vízben. A féligáteresztő cellulóz membrán belsejébe meghatározott mennyiségű tiszta hatóanyagot, vagy liofilizált formulát adagoltunk. A hatóanyag kioldódását 300 percig követtük nyomon meghatározott időközönként egy-egy mintavétellel. A hatóanyagtartalom meghatározását – ahogyan a EE(%) és a DL(%) esetében is – UV-spektrumok segítségével előre elkészített kalibrációs egyenesek alapján határoztuk meg.

Az egyes rendszerek kinetikai tulajdonságait nemlineáris regresszióval illesztett tapasztalati és analitikus kinetikai modellekkel definiálhatjuk [32,33]. A főként csak a hatóanyag koncentrációjától függő kioldódási folyamatok jellemzésére előszeretettel alkalmazzák az **elsőrendű** kinetikai modellt, ami a következő egyenlettel írható le (5. egyenlet):

$$c_t = c_0 e^{-kt} \quad (5)$$

ahol c_t a hordozóban lévő hatóanyag koncentrációja t időpillanatban, c_0 a hatóanyag kiindulási koncentrációja és k az elsőrendű kioldódási állandó.

A **másodrendű** kinetikai modellel számos biológiai rendszer leírható (**6. egyenlet**).

$$c_t = \frac{1}{\frac{1}{c_0} + k_2 t} \quad (6)$$

ahol c_t a hordozóban lévő hatóanyag koncentrációja t időpillanatban, c_0 a hatóanyag kiindulási koncentrációja és k_2 a másodrendű sebességi együttható. A számolások során gyakran felhasznált **Korsmeyer-Peppas** kinetikai modell egy szemempirikus egyenlet (**7. egyenlet**), mely a kioldódási folyamatok leírásakor szemelőt tartja a hordozó alakját (henger, film, gömb) is:

$$c_t = c_0 k_m t^n \quad (7)$$

ahol c_t a felszabadult hatóanyag koncentrációja t időpillanatban c_0 a kiindulási hatóanyag koncentráció a hordozóban, n a kioldódási mechanizmust leíró diffúziós-oldódási index, és k_m a kinetikai állandó, ami tartalmazza a hordozó rendszer szerkezeti és geometriai tulajdonságát. Abban az esetben, ha az n értéke 0,5 (hengernél: 0,44; gömbnél: 0,42; filmnél: 0,50), akkor diffúzió kontrollált hatóanyag felszabadulási folyamatról beszélünk (Fick-diffúzió). Viszont $n = 1,0$ esetén relaxáció (erózió) kontrollált kioldódásról beszélünk (Case II. transzport). A két érték között a diffúzió és erózió egyaránt befolyásoló hatással van és a hatóanyag felszabadulása erózió kontrollált nem-Fick diffúziós folyamatnak tekinthető. A **Weibull**-egyenlet (**8. egyenlet**) széles körben felhasználható empirikus kinetikai modellel:

$$c_t = c_0 \left(1 - e^{-\left(\frac{t-T}{a}\right)^b} \right) \quad (8)$$

ahol c_t a kioldódott hatóanyag t időpillanatban mért koncentrációja, c_0 a felszabadult hatóanyag össz koncentrációja, T pedig a mérés kezdete és a hatóanyag-felszabadulás közötti késeltetési idő. Az a az időfüggést jellemző skálaparaméter, míg a b alak paraméter (a kioldódási görbe exponenciális ($b = 1$), szigmoid ($b > 1$) vagy parabola ($b < 1$) alakú). Egy másik gyakran alkalmazott egyenlet a **Higuchi** kinetikai modell (**9. egyenlet**), mely a kioldódási koncentrációt az idő négyzetgyökéhez viszonyítja:

$$c_t = c_0 k_H \sqrt{t} \quad (9)$$

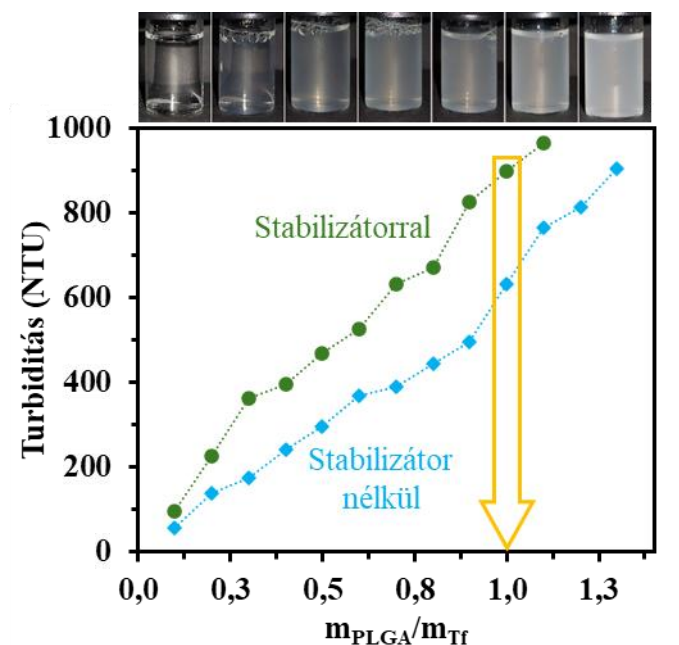
ahol c_t a hatóanyag koncentrációja a hordozó mátrixban t időpillanatban, c_0 a hatóanyag kezdeti koncentrációja, k_H a Higuchi kioldódási állandó.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A Tf/PLGA hordozók kialakítása és jellemzése

Munkánk első lépésben az összetett Tf/PLGA/TPGS hordozó komponens-arányának szisztematikus változásával nyomon követtük a rendszer turbiditásának, valamint a hordozók átlagos hidrodinamikai átmérőjének és méreteloszlásának változását, mely révén egy optimális összetétel kialakítása volt a fő cél.

A turbiditás méréseket szobahőmérsékleten ($T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$) kiviteleztem minden esetben, ahol a Tf-tartalmú vizes oldathoz adagoltam a PLGA acetonos oldatát szisztematikusán növelve a $m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}}$ arányt. Egyik esetben a rendszer tartalmazott TPGS stabilizátort (**6. ábra**, zölddel), míg a másik esetben nem (**6. ábra**, kékkel). A vizes közeg térfogata mindkét esetben $5,0\text{ cm}^3$ volt, a PLGA kopolimer ($c_{\text{PLGA}50:50} = 10\text{ mg/cm}^3$, ACE-ban oldva) $25\text{--}25\text{ }\mu\text{l}$ -es térfogatban került a rendszerhez, a Tf koncentrációja a titrálás során $0,50\text{--}0,47\text{ mg/cm}^3$ között változott (a hígulás miatt), míg a TPGS koncentrációja a stabilizátort is tartalmazó mintában $0,095\text{--}0,090\text{ mg/cm}^3$ között (szintén a hígulás miatt). Minden esetben 3–3 párhuzamos mérést végeztem. A zavarosság mérés eredményét **6. ábrán** mutatjuk be.

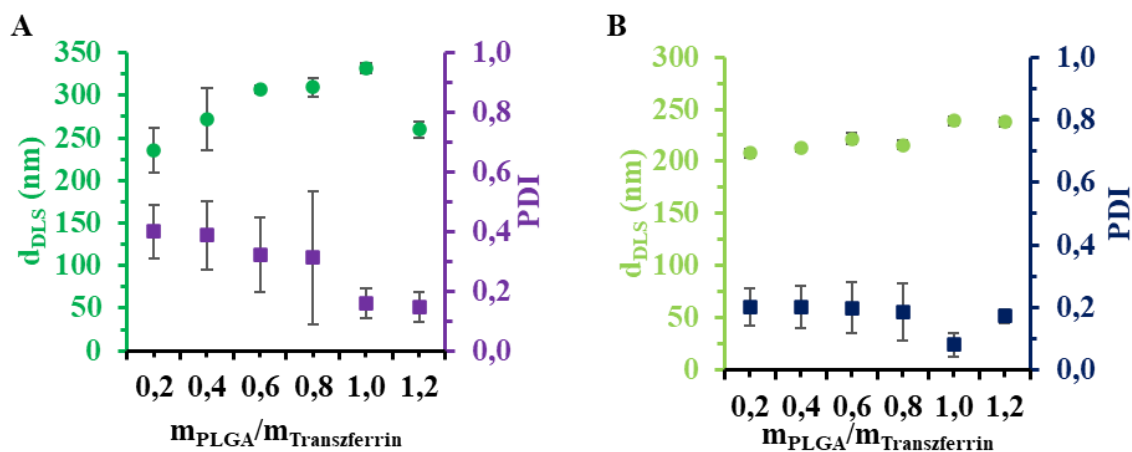


6. ábra: A Tf/ PLGA-alapú koloid rendszer zavarosságának változása a stabilizálószer (TPGS) jelenlétében és annak hiányában ($c_{\text{TPGS}} = 0,0625\text{ mM}$).

A **6. ábra** eredményei alapján elmondható, hogy $m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}} = 0,1\text{--}1,1$ makromolekula tömegarány tartomány esetén a nem-ionos tenzid jelenléte nem befolyásolta számottevő mértékben a rendszer zavarosságát, a mért értékek hasonló módon változnak.

Ha az alkalmazott makromolekula tömegarány meghaladta a $m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}} > 1,1$ értéket, akkor a hozzáadott stabilizálószer mennyiségének hatására a rendszer zavarossága kisebb tömegarány esetén volt detektálható, e tömegarány felett a rendszer nem tekinthető stabilnak, laza pelyhes csapadék megjelenése figyelhető meg. Optimális Tf/PLGA tömegaránynak a ($m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}}$) az 1,0-es tömegarányt választottuk, mert ezen tömegarány esetén még mind TPGS nélküli-, mind TPGS melletti makromolekulák alkotta kolloid részecske stabilisnak tekinthető. Az 1:1 tömegarány megegyezik a Kutatócsoport 2024-ben publikált BSA/PLGA(50:50)/TPGS hatóanyag hordozó részecske esetén megállapított BSA:PLGA(50:50) tömegaránnal [26].

A következőkben a DLS mérések eredményeit prezentáljuk, melyeket **7. ábrán** mutatunk be. A Tf/PLGA-alapú hatóanyag hordozók átlagos részecske átmérő értékeit az előtisztítást követően mértük. Az előtisztítást minden esetben 10 percen át 3000 rpm fordulátú centrifugálással végeztük a hordozó részecskét nem alkotó komponensek eltávolítása végett.



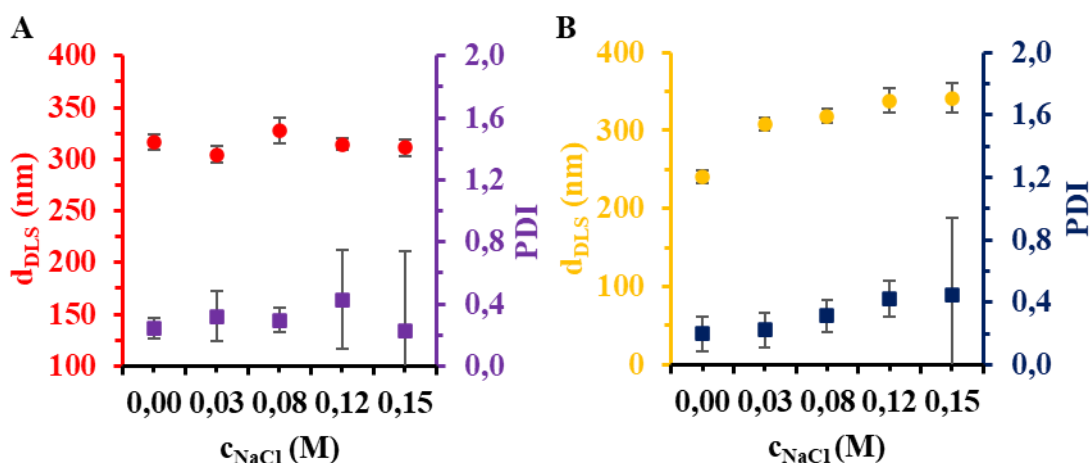
7. ábra: A stabilizátor (TPGS) jelenlétének hatása a hordozó részecskék átlagos hidrodinamikai méretére (d_{DLS}) és a PDI értékére
(**A:** stabilizátor nélküli- és **B:** stabilizátorral Tf/PLGA hordozó).

A turbidimetriás mérés eredményeivel összhangban a DLS mérések révén is hasonló megfigyelés állapítható meg, hiszen a $m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}} = 0,2\text{--}1,2$ tömegarány tartományon közel azonos átlagos hidrodinamikai átmérőjű kolloid részecskék képződése detektálható a

stabilizátor jelenlétében ($d = 223 \pm 8$ nm, $PDI = 0,17 \pm 0,12$), ahogyan azt a **7.B ábra** is szemlélteti. A szintetikus PLGA kopolimer feleslege esetében ($m_{PLGA}/m_{Tf} > 1,2$) a részecskék átlagos átmérőjét nem ábrázoltuk, mivel az előzetes turbiditás mérések alapján tudjuk, hogy a részecskék nem tekinthetők stabilnak, illetve aggregációs folyamatok megjelenése detektálható.

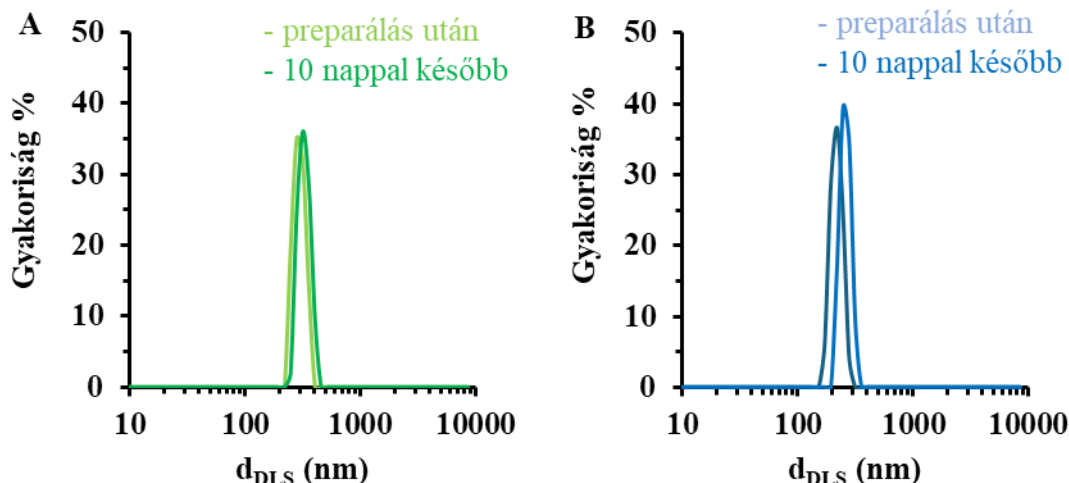
A TPGS, mint felületaktív molekula hiányában mind a részecskék átlagos hidrodinamikai átmérője ($d = 286 \pm 31$ nm) mind a polidiszperzitási index értékek ($PDI = 0,29 \pm 0,22$) értéke és azok szórása jelentősen nagyobb, amit a **7.A ábra** mutat be. Az említett értékek és szórásaik növekedése a TPGS-sel stabilizált részecskékkel szemben arra utal, hogy ezen komplex összetételű Tf/PLGA részecskékbe a TPGS ($c_{TPGS} = 0,0625$ mM) vagy akár más, a TPGS-hoz hasonló szerkezetű és tulajdonságú felületaktív anyag is jelentős stabilitást eredményez a részecskék struktúrájában. Az előállított vegyes összetételű részecskék stabilitásának érdekében azok átlagos hidrodinamikai méretének változását is követtük növekvő NaCl koncentráció függvényében, ahol a sókoncentráció fiziológiás körülményekig változtattunk, azaz a koncentráció 0,0–0,15 M között változott.

A mintákat előtisztítottuk (3000 rpm, 10 perc) és mérés előtt egy napig 4 °C-on tároltuk. Az eredményeket a **8. ábrán** láthatjuk. Megállapítható, hogy mérhető aggregáció nem következik be, a TPGS hiányában (**8.A ábra**) a részecskék mérete $d = 300–310$ nm, míg TPGS jelenlétében (**8.B ábra**) hasonló, a $d = 300–320$ nm átlagos érték figyelhető meg.



8. ábra: A stabilizátor (TPGS) jelenlétének hatása a hordozó részecskék átlagos hidrodinamikai méretére (d_{DLS}) és a PDI értékére különböző sókoncentrációk mellett (**A:** stabilizátor nélküli- és **B:** stabilizátorral a Tf/PLGA hordozó).

A sötűrésen túl a részecskék időbeni stabilitását is vizsgáltuk a **6. ábra** alapján optimálisnak választott 1:1 Tf/PLGA tömegarányú előtisztított (3000 rpm, 10 perc) hatóanyag hordozók esetében 10 nap elteltével. A TPGS alkalmazása mellett, illetve hiányában előállított minták átlagos hidrodinamikai méretét is DLS mérésekkel határoztuk meg, mely eredmények a **9. ábrán** láthatóak.



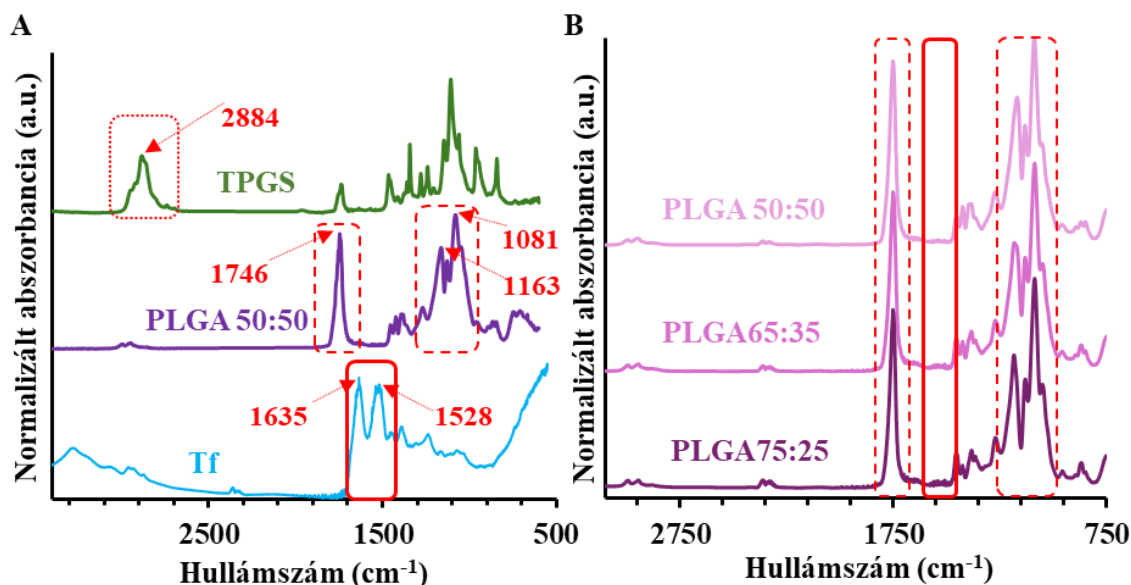
9. ábra: Reprezentatív DLS mérésekkel meghatározott méreteloszlási görbék a stabilizátor nélküli (**A**) és stabilizátor melletti (**B**) hordozók esetén rögtön a részecskék kialakításának napján és 10 nappal később.

Megfigyeléseink során azt tapasztaltuk, hogy stabilizátor nélküli Tf/PLGA részecskék esetén (**9.A ábra**) az időnek nincs hatása a részecskeméretre (kb. 25–30 nm eltérés detektálható 10 nap elteltével), míg TPGS mellett az időnek valamivel nagyobb befolyása van a részecske méretre (kb. 35–40 nm eltérés detektálható a 10. napra), de mint paraméter nem befolyásolja számottevően a részecskék átlagos hidrodinamikai átmérőjét (**9.B ábra**).

A méréseink alapján a TPGS jelenléte nem stabilizálja jobban időben a részecskéinket, de a **9. ábrán** is jól látszik, hogy stabilizátort tartalmazó mintákban a részecskék jelentősen (~70 nm) kisebbek. A Tf/PLGA/TPGS részecskék kisebb mérete továbbra is indokolja a stabilizátor használatát.

Ezután a makromolekulák kölcsönhatásait vizsgáltuk Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR), differenciális pásztázó kalorimetriával (DSC), valamint peremszög értékek meghatározásával. Ezen mérések kivitelezéséhez *Dr. Varga Norbert* nyújtott segítséget.

Az optimálisnak választott $m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}} = 1,0$ tömegarány alkalmazása esetében TPGS ($C_{\text{TPGS}} = 0,0625 \text{ mM}$) felhasználásával stabilizált, és centrifugálással tisztított (14000 rpm, 30 perc) Tf és a különböző tejsav:glikolsav arányú PLGA(50:50) valamint (65:35) és (75:25) hordozók, valamint a hordozót alkotó komponensek, azaz a tiszta Tf, a kopolimerek (PLGA50:50, PLGA65:35, PLGA75:25) és a TPGS szerkezeti jellemzőit is vizsgáltuk FTIR mérések kivitelezése révén. Az eredményeket a **10. ábra** mutatja be.



10. ábra: A tiszta Tf, PLGA(50:50), TPGS (A) és a különböző Tf/PLGA(50:50,65:35, 75:25)/TPGS (B) hordozók FTIR spektrumai a karakterisztikus csúcsok kiemelésével.

Elsőként a hordozót alkotó komponensek esetében vizsgáltuk a jellemző karakterisztikus csúcsok megjelenését. A TPGS alkil (C–H) nyújtórezgése 2884 cm^{-1} hullámszámnál jelenik meg, míg a Tf-hoz tartozó amid I és amid II csúcsok 1635 cm^{-1} és 1528 cm^{-1} értékek esetében detektálhatóak. A PLGA kopolimerek karbonilcsoportja 1746 cm^{-1} értéknél jelenik meg, és az észterkötés az ujjenyomat régióban, 1163 cm^{-1} és 1081 cm^{-1} értékeknél detektálhatóak ($\nu \leq 1500 \text{ cm}^{-1}$). A Tf és PLGA komponensekre jellemző karakterisztikus csúcsok a különböző Tf/PLGA/TPGS mintákban a tisztítási eljárás után is detektálhatóak. A PLGA karakterisztikus csúcsai jelentősebben, míg a Tf-re jellemzők valamelyest kisebb mértékben, de azonosíthatóak, addig a TPGS karakterisztikus csúcsa már nem látható a makromolekuláris hordozó mintákban.

Ennek oka a tisztítási lépésben keresendő, mivel FTIR méréseinknél tisztított, liofilizált mintákat használtuk a DLS és zavarosság mérésekkel ellentétben, ahol csak előtisztított

mintákat mértünk. Így mivel utóbbi mérés technikák igazolták a TPGS jelenlétét és fontosságát, az FTIR mérés esetén pedig nem volt detektálható a jelenléte a liofilizált részecskéken, így annak meghatározó mennyisége csakis a tisztítási lépésnél a felülúszó eltávolításával együtt távozhatott a rendszerből. Jelen munkában az újonnan előállított részecskék tisztítási protokolljának kidolgozása még nem befejezett. Ezen munka egy külön Dolgozat témája is lehetne, ahogyan az előzetes Projektmunkám fő témája a korábban említett HSA/PLGA/TPGS részecskék tisztítási lépésének optimalizálása volt. A tisztítási lépés optimalizálásának nehézsége, hogy minden egyedi összetételű részecskének saját tisztítási, centrifugálási protokollra van szüksége. Ha túl alacsony centrifugálási paraméterek (idő, fordulatszám) mellett tisztítunk a pellet nem fogja tartalmazni a kialakított kolloidális részecskéket, de ha túl magas centrifugálási paramétereket használunk a részecskék aggregálódása figyelhető meg.

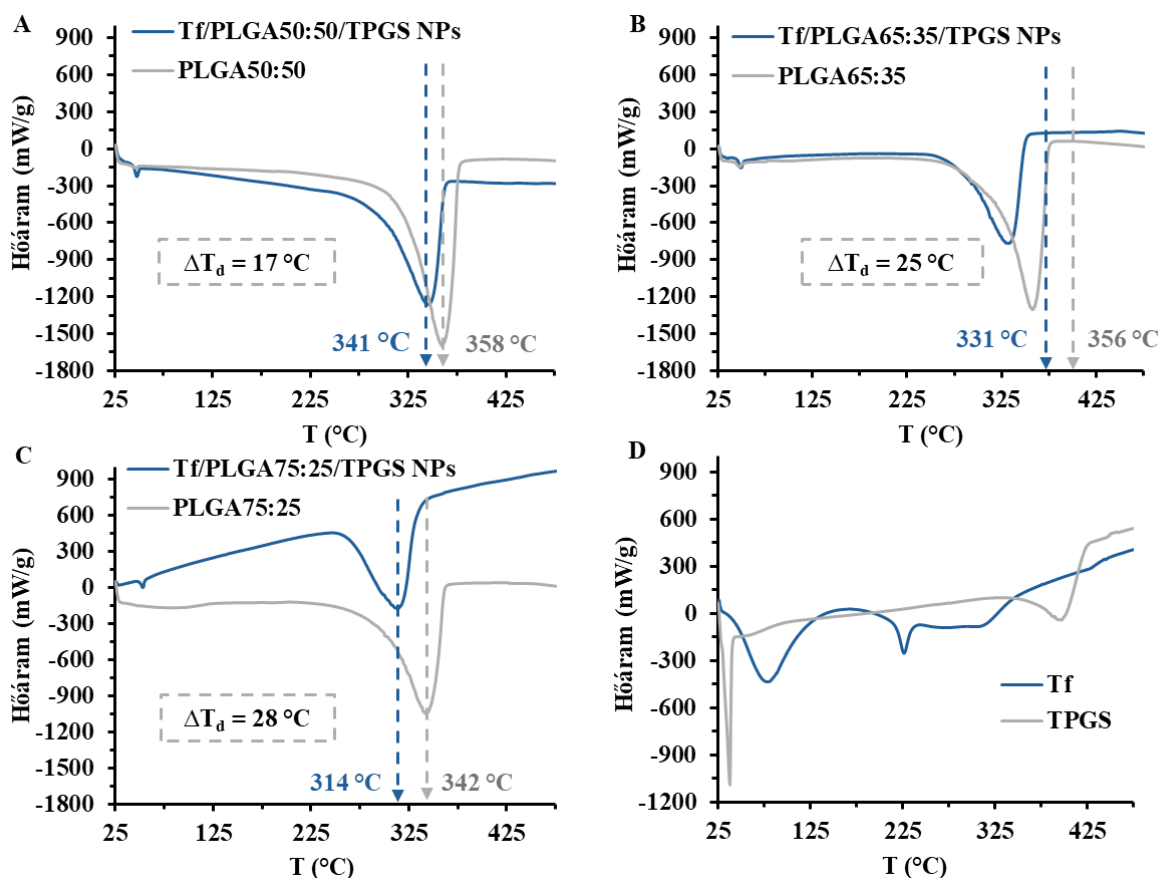
Jelen munkánk során a választott tisztítási paraméterek (14000 rpm, 30 perc) megválasztásnál figyelembe vettük a 2024 tavaszán készült Projektmunkám előzetes eredményeit (10000–14000 rpm között jelentős változás a részecskeméretében nem detektálható és minden esetben 30 percig volt ideális a centrifugálás, több idő esetén aggregáció volt megfigyelhető), melyet azért tehattünk meg mivel a Tf/PLGA/TPGS-alapú hordozók nem térnek el jelentősen a HSA/PLGA/TPGS-alapúaktól.

A TPGS felületaktív anyaggal stabilizált Tf/PLGA (50:50) v. (65:35) v. (75:25) hordozók további szerkezeti jellemzéséhez termoanalitikai vizsgálatokat (DSC) is végeztünk. A különböző Tf/PLGA/TPGS minták esetében a mért entalpogramokat összehasonlítottuk a releváns tisztított, liofilizált stabilizálószer- és fehérjementes PLGA mintákkal (koacervált), hogy meghatározzuk a TPGS és Tf jelenléte által okozott különbséget, ami a **11. ábrán** látható. A DSC mérések esetén is az optimálisnak választott $m_{PLGA}/m_{Tf} = 1,0$ makromolekula tömegarány alkalmazásával előállított, a TPGS ($C_{TPGS} = 0,0625$ mM) felhasználásával stabilizált, és centrifugálással (14000 rpm, 30 perc) tisztított Tf/PLGA/TPGS-alapú hatóanyag hordozók liofilizált mintáit használtuk.

A tiszta PLGA mintákkal összehasonlítva, $T_d = 358$ °C (PLGA(50:50)), $T_d = 356$ °C (PLGA(65:35)) és $T_d = 342$ °C (PLGA(75:25)), a PLGA degradáció endoterm csúcsmaximuma (T_d) a Tf/PLGA/TPGS mintáknál eltolódik ($T_d = 341$ °C (Tf/PLGA(50:50)/TPGS), $T_d = 331$ °C (Tf/PLGA(65:35)/TPGS) és $T_d = 314$ °C (Tf/PLGA(75:25)/TPGS)), mely bizonyítja a PLGA és a Tf/TPGS közötti kölcsönhatást. A PLGA monomerarány Tf/PLGA/TPGS hordozórendszerre gyakorolt hatásának vizsgálata

érdekében a degradációs hőmérséklet maximum értékeinek különbségét (ΔT_d) is meghatároztuk. Ezen adatok a **11. ábrán** kiemelve is szerepelnek.

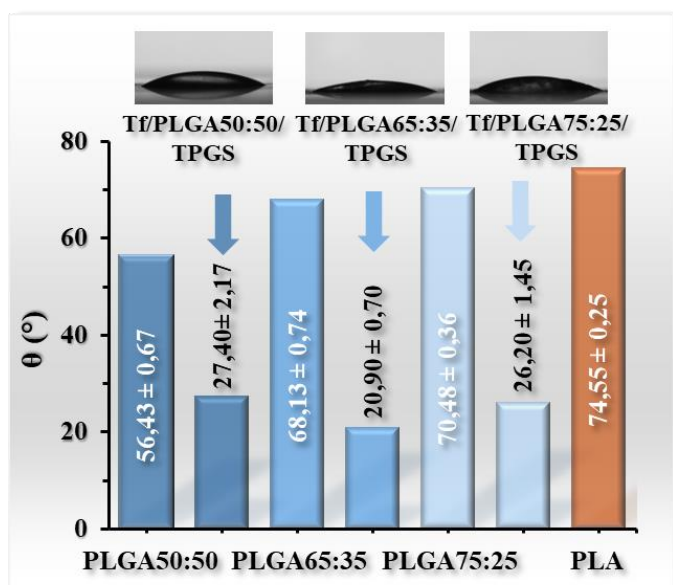
Az eredmények azt mutatják, hogy a ΔT_d értékek szisztematikusan növekednek a tejsav:glükolsav arány változásával $\Delta T_d = 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról (PLGA(50:50)) $\Delta T_d = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra (PLGA(75:25)), ami az FTIR mérésekhez hasonlóan megerősíti, hogy a hordozóanyagok a kopolimer hidrofilitásával (azaz tejsav:glükolsav arányával) szabályozhatók.



11. ábra: DSC görbéi, a degradációs hőmérséklet változásának (ΔT_d) kiemelésével a PLGA(50:50) és a Tf/PLGA(50:50)/TPGS (A), a PLGA(65:35) és a Tf/PLGA(65:35)/TPGS (B), a PLGA(75:25) és a Tf/PLGA(75:25)/TPGS (C) ill. a Tf és a TPGS (D).

Az FTIR és DSC eredmények alapján az összetett hordozó struktúra előállíthatósága igazolható, a makromolekulák fizikai keverékének jelenléte kizárható. Ennek további megerősítésére peremszög meghatározására irányuló méréseket is végeztünk, kiemelten fókuszálva a fehérje jelenléte által bekövetkező változásokra, melyet a **12. ábra** mutat be.

A peremszög mérés során használt Tf/PLGA/TPGS minták szintén az optimálisnak választott $m_{\text{PLGA}}/m_{\text{Tf}} = 1,0$ makromolekula tömegarány alkalmazásával történt, különböző PLGA(50:50) v. (65:35) v. (75:25) kopolimerekkel és Tf-nel, amelynek koncentrációja $1,0 \text{ mg/cm}^3$. A tisztított felület aktív TPGS ($c_{\text{TPGS}} = 0,0625 \text{ mM}$) felhasználásával stabilizált hordozókat tisztítási lépés nélkül, a prepalálást követő napon mértük le. A mérés technikai kivitelezését a 3.4.3. *Peremszögmérés* alfejezetben ismerttettem.



12. ábra: Adott PLGA kopolimerek és Tf/kopolimer összetett rendszerek peremszög értékei vízzel szemben, a mérés közben regisztrált reprezentatív fotókkal.

A tiszta PLGA kopolimerek nedvesítő tulajdonságai $56,4^\circ$ -ról (PLGA(50:50)) $70,5^\circ$ -ra (PLGA(75:25)) változtak a tejsav mennyiségének növelésével arányosan. A legmagasabb tejsav-tartalmú PLA esetében $74,6^\circ$ határozható meg. Ezen eredményeket a MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoport már publikálta a BSA/PLGA/TPGS-alapú hordozóról szóló nemzetközi publikációjában [26]. Az összetett hordozóban, mivel a Tf és TPGS jelenléte számottevően növeli a hidrofil jelleget, a meghatározott peremszög értékek nagymértékben ($< 30^\circ$ -ra) csökkennek. Ezenkívül, a mintasorozaton belüli kopolimer arány változása nem kimutatható; az értékek számottevően nem térnek el egymástól a Tf/PLGA/TPGS koloidális hordozókban $27,4^\circ$ -ról (PLGA(50:50)) $26,2^\circ$ -ra (PLGA(75:25)).

Ezen mérési eredmények összehasonlíthatóak a Kutatócsoport előzetes eredményeivel, amelyeket az **1. táblázatban** feltüntettem. A theta (θ) értékek a szérum albumin-alapú PLGA

kopolimerek alkotta hordozók esetén a tejsav:glikolsav aránytól függetlenül nagyobbak, mint a Tf-tartalmú részecskék esetén. Összefoglalva elmondható mind a BSA/PLGA/TPGS makromolekulás hordozókról, mind a Tf/PLGA/TPGS hordozókról, hogy a komplex részecskék hidrofób jellege a tejsav:glikolsav arány változtatásával kismértékben hangolható, és a fehérje jelenlétével a PLGA hidrofób karaktere csökkenthető. A regisztrált peremszögértékek arra is utalnak mindkét hordozóban, hogy ezeknél a komplex részecskéknél nem a jól elkülönülő mag-héj szerkezet kialakulása valósul meg, mert a külső polimer héj jelenlétében a tiszta polimer esetében detektált peremszögértéket közelítené a meghatározott peremszög értékek, ami ezen rendszerek esetében nem igaz.

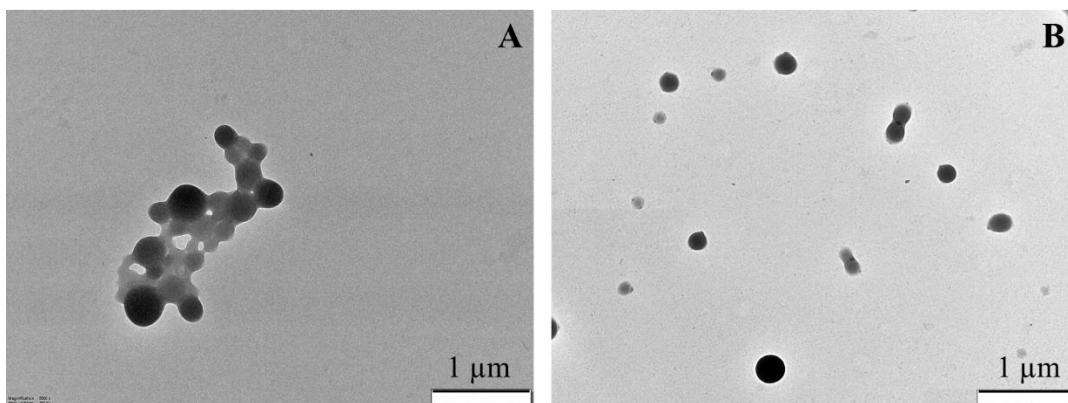
1. táblázat: A már korábban publikált BSA/PLGA [26] és a Tf/PLGA TPGS-sel stabilizált hordozó rendszerek peremszög értékei vízzel szembeni összehasonlítása.

	Θ (°)
BSA/PLGA 50:50/TPGS	36,06 $\pm$ 0,32
TF/PLGA 50:50/TPGS	27,40 $\pm$ 2,17
BSA/PLGA 65:35 / TPGS	36,47 $\pm$ 0,63
TF/PLGA65:35/TPGS	20,90 $\pm$ 0,70
BSA/ PLGA 75:25 / TPGS	38,73 $\pm$ 0,56
TF/ PLGA 75:25 / TPGS	26,20 $\pm$ 1,45

További összehasonlítás céljából a Tf/PLGA/TPGS-alapú hordozó részecskék centrifugálással történő tisztítását követően, illetve a HSA/PLGA/TPGS-alapú centrifugált mintáink TEM felvételeit is rögzítettük (**13. ábra**). A felvételek alapján meghatároztuk a hordozó részecskék morfológiáját, méretét, méreteloszlását és feltételezhető szerkezetükre is javaslatot tettünk.

A **13. ábrán** példaként két felvétellel demonstráljuk, hogy a részecskék morfológiájára a különböző szérumfehérje tartalmú vegyületeknek hasonló, a felvételeken jól látszik a részecskék sztérikus alakja. A Tf-alapú kopolimer hordozó részecske mérete némileg nagyobb, (**13.A ábra**), mint a szérum albumin-alapú hordozók esetén (**13.B ábra**). A Tf-alapú hordozó meghatározható átlagos részecskemérete $d = 228,5 \pm 17,6$ nm, míg a HSA/PLGA/TPGS-alapú hatóanyag hordozónál $d = 155,0 \pm 15,4$ nm. A méretbeli különbségre adhat magyarázatot a két fehérje méretbeli különbözősége, hiszen a Tf valamivel nagyobb molekulatömeggel rendelkezik (80 kDa) a HSA-val szemben (66,5 kDa).

Sajnos jobb minőségű TEM felvételek elkészítésére nem volt lehetőség, mert az alkalmazott gyorsítófeszültség mellett a minták sérültek, így csak kisebb nagyítás mellett tudtunk pár felvételt rögzíteni.



13. ábra: A makromolekulák alkotta hordozó részecskék reprezentatív TEM képei
(**A:** Tf/PLGA/TPGS; **B:** HSA/PLGA/TPGS).

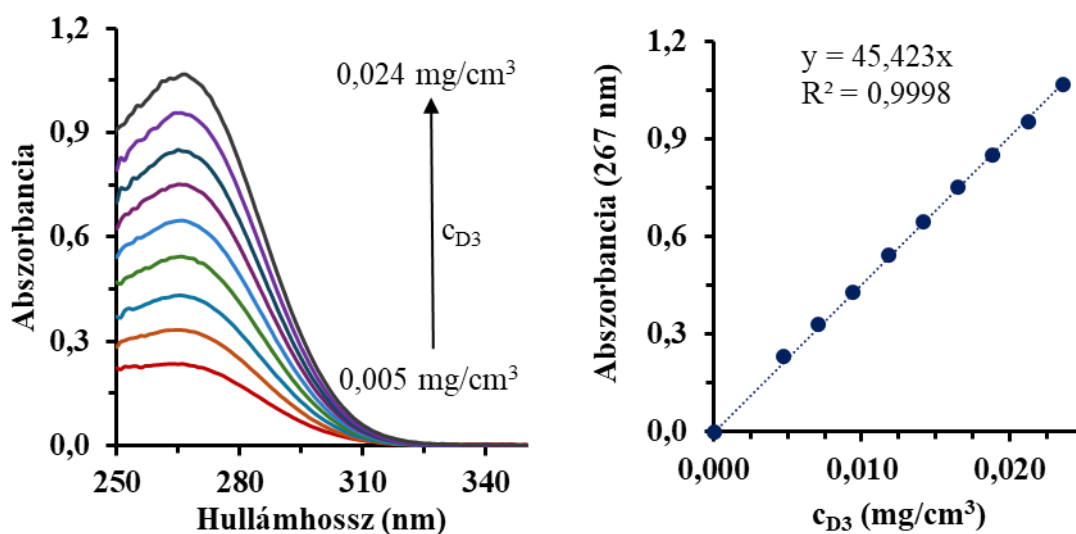
4.2. A különböző hatóanyagok kapszulázása a Tf/PLGA hordozóba

Az ideálisnak tekintett összetétel meghatározását, illetve az új hatóanyag hordozó tulajdonságainak jellemzést követően, munkánk következő lépésében megkísérletük modell hatóanyagok kapszulázását megvalósítani a Tf/PLGA50 összetételű hordozóba stabilizátor (TPGS) jelenlétében. A kutatómunkám alapját jelentő, 2024 év elején megjelent publikációban [26] megállapították a csoport munkatársai, hogy a hidrofób sajátságú modell vegyületek szolubilizálására is alkalmas lehet a TPGS, mely a BSA/PLGA összetett hordozórendszer stabilizálószerként is funkcionál. A kolloid hordozórendszer előnyeinek bizonyítására egy erősen hidrofób vegyületet, a D₃-vitamint sikeresen kísérelték meg formulázni [26].

A Kutatócsoport korábbi munkájában részletesen vizsgálták a ketoprofén (KP) nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyület (NSAID) kapszulázását a nanoprecipitációs módszerrel előállított, tisztán PLGA hordozó részecskékbe [14], így ennek érdekében a Projektmunka kivitelezése során is megkísérletük ezen vegyület formulálását a HSA/PLGA összetett hordozó részecskékbe, mely a frissen készített $m_{KP}/m_{HSA} = 0,09$ tömegaránynál preparált minta esetében fotometriás méréseket végeztünk, kivitelezése révén a hatóanyag-tartalom meghatározásra került, mely érték megközelítőlegesen 3–4 %-nak adódott.

A fenti előzményekre tekintettel a Tf/PLGA/TPGS összetételű hordozókba a hidrofób sajátosságú modell vegyületek, a kolekalciferol (D_3) illetve a KP kapszulázhatóságát vizsgáltuk. Mindemellett hidrophil kismolekulaként az ibuprofént (IBU) is kiválasztottuk formulálásra. A D_3 -vitamint szerves oldószerben (ACE-ban) oldottuk, míg a KP-t és a IBU-t a vizes közegű Tf oldatban, majd ezeket kapszuláztuk a 3.3. *A különböző hatóanyagok formulálása a Tf/PLGA hordozóhoz* alfejezetben ismertetett módon. Az eredményeket kismolekulák szerint csoportosítva mutatom be, növekvő hidrofilítási sorrendben ($\log P(D_3) = 8,80$ [34]; $\log P(KP) = 2,71$ [35]; $\log P(IBU) = 1,89$ [36]).

Elsőként a D_3 formulált ill. nem formulált mennyiségének meghatározása érdekében a D_3 -vitamin kalibrációs egyenesét készítettük el 1,4-dioxán közegben. A spektrumsorozatot és a kalibrációs egyenest a **14. ábra** mutatja be. A D_3 UV-spektrumában megjelenő abszorbancia maximum $\lambda_{\max} = 267$ nm hullámhosszon figyelhető meg. Rögzítettük a növekvő D_3 -tartalmú 1,4-dioxán oldatok abszorbancia értékeit. A D_3 -tartalmú ($c_{D_3} = 0,5$ mg/cm³) Tf/PLGA/TPGS összetételű hordozókat előállításuk után 30 percen át 14000 rpm fordulatszámon centrifugálással tisztítottuk, majd liofilizáltuk.

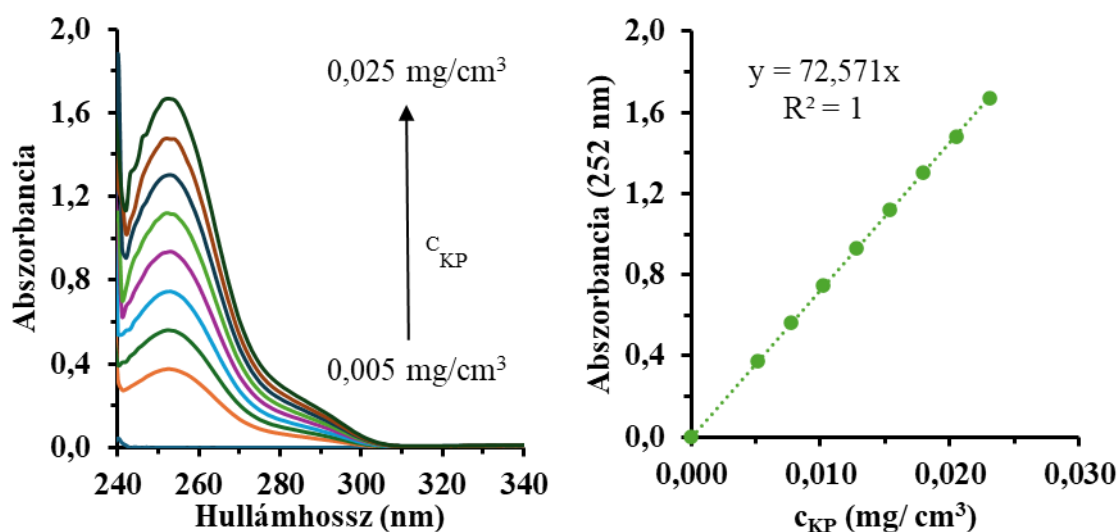


14. ábra: A kolekalciferol (D_3) UV-spektrumai 1,4-dioxánban növekvő D_3 -vitamin koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese ($\lambda_{\max} = 267$ nm).

A fagyasztva szárított pormintákat 1,4-dioxánban oldottuk, így közvetlenül határozhatjuk meg a DL(%) és EE(%) értékeket a (3)-(4) egyenletek alapján. A kapszulázási hatékonyság ($EE(\%) = 39,1 \pm 0,7$) és a részecske hatóanyag töltöttség ($DL(\%) = 20,3 \pm 2,6$) viszonylag magas értéke azzal magyarázható, hogy a politejsav-glikolsav tartalmú PLGA

kopolimer a kis hidrofilitású vegyületek kapszulázhatóságát preferálja, így kialakítva a mag-héj szerkezetű kolloid részecskéket.

Következő lépésként a KP kalibrációs egyenesét készítettük el szerves oldószer (1,4-dioxán) közegben. A spektrumsorozatot ill. a kalibrációs egyenest a **15. ábra** mutatja be. A KP UV-spektrumában megjelenő abszorbancia maximum $\lambda_{\max} = 252 \text{ nm}$ hullámhosszon figyelhető meg, így ezen hullámhosszon rögzítettük a növekvő KP-tartalmú oldatok abszorbancia értékeit. A KP vízben igen csekély mértékben oldódik ($c_{\text{KP}} < 0,5 \text{ mg/cm}^3$), a hatóanyagtartalmú minták elkészítése során azt a következtetést vontuk le, hogy a Tf vizes oldatához adott KP csak egy bizonyos mennyiségig növelhető ($c_{\text{KP}} = 0,125 \text{ mg/cm}^3$). Három különböző tömegarányt kiválasztva (1:1, 1:2, 1:4) csak a legkisebb tömegarálynál oldódott fel teljesen a KP a Tf-oldatban. Így megállapítottuk, hogy ha a kapszulázott hatóanyag mennyisége meghaladja a $m_{\text{KP}}/m_{\text{Tf}} = 0,25$ tömegarányt, akkor a diszperz rendszerben aggregátumok megjelenése detektálható, a rendszer nem tekinthető stabilnak.

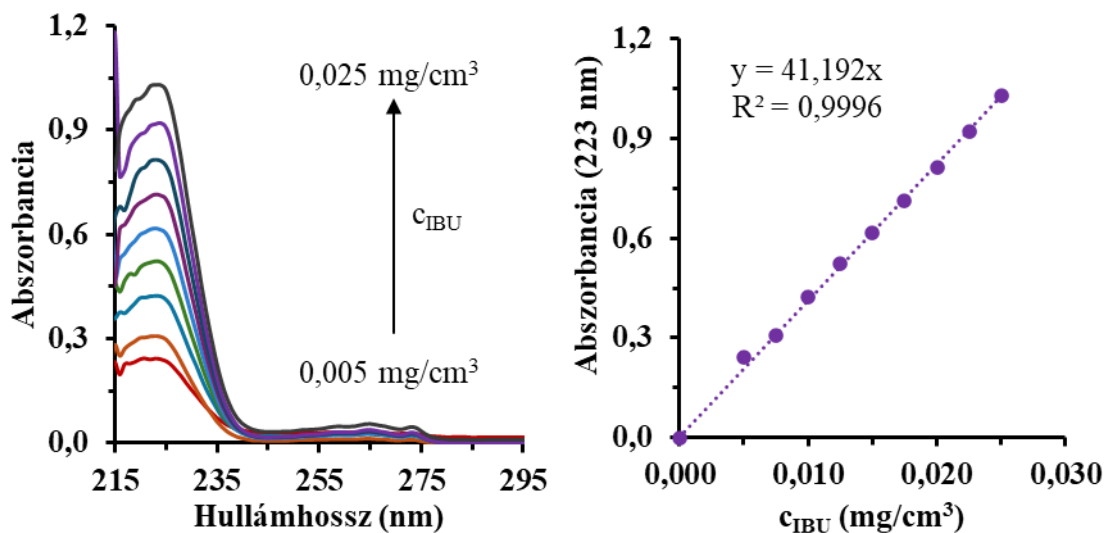


15. ábra: A ketopropfen UV-spektrumai 1,4-dioxánban növekvő KP koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese ($\lambda_{\max} = 252 \text{ nm}$).

A $m_{\text{KP}}/m_{\text{Tf}} = 0,25$ tömegarány alatti KP-tartalmú minták esetében a tisztítási lépést követően elvégeztük a fotometriás méréseket, majd ezek révén a kapszulázási hatékonyság értékének ($\text{EE}(\%) = 5,7 \pm 1,3$) és a részecskék hatóanyag töltöttségének ($\text{DL}(\%) = 7,2 \pm 1,1$) meghatározását is. A méréseket ebben az esetben is liofilizált minták oldószeres (1,4-dioxán) oldatában végeztem a közvetlen meghatározás érdekében. A KP hatóanyag

HSA/PLGA/TPGS összetett hordozónál mért hatóanyag-tartalmához képest kis mértékű növekedés figyelhető meg a Tf-alapú hordozóban. Mindkét hordozó esetén a KP kapszulázása teljesen megegyező preparálási lépésekkel készült.

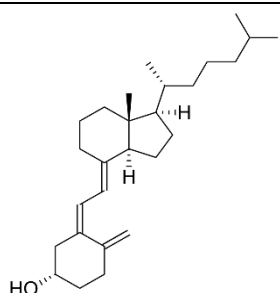
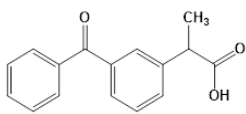
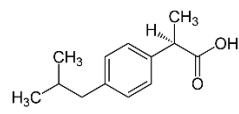
Az IBU hatóanyag kapszulázása volt munkánk következő lépése, amely munka hasonlóan az előzőekhez a kalibrációs egyenes felvételével indult; a fotometriás mérések eredménye a **16. ábrán** láthatóak. A kalibrációs egyenes felvételét $\lambda_{\max} = 223 \text{ nm}$ hullámhosszon, szerves oldószer (EtOH) közegében végeztem, mert a kapszulázási hatékonyságot és a hatóanyag töltöttséget ebben az esetben is közvetlenül a IBU-tartalmú Tf/PLGA/TPGS hordozó fagyasztva szárított mintáiból határoztuk meg, amely szerves fázisban oldódott fel teljesen. Az alacsony kapszulázási hatékonyság ($EE(\%) = 1,7 \pm 0,9$) magyarázata, hogy az eredeti IBU koncentráció ($c_{\text{IBU}} = 2,0 \text{ mg/cm}^3$) túl magas volt a vizsgált minta hordozórészecske koncentrációjához képest, a mellett is, hogy az IBU a Tf vizes oldatában a legmagasabb IBU:Tf tömegarány (4:1) esetén is teljesen feloldódott. Az alacsony kapszulázási hatékonyság mellett a hatóanyag töltöttség igen magas. Az IBU hatóanyag esetében a mért hatóanyag töltöttség ($DL(\%) = 53,9 \pm 2,2$) jelentősen magasabb az Kutatócsoport előzetes eredményeihez képest ($\sim 30\%$), melynek magyarázata lehet, hogy a rendszerben lévő nem-ionos tenzid (TPGS) megköti a IBU egy részét, amit így tisztítást követően a pelletbe kerülve a liofilizált mintával együtt mértünk.



16. ábra: A ibuprofén UV-spektrumai etanolban növekvő IBU koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese ($\lambda_{\max} = 223 \text{ nm}$).

Az egyes formulációk esetén a kapszulázási hatékonyság (EE(%)) és hatóanyag tartalom (DL(%)) értékeket a **2. táblázat** foglalja össze. Bár hatóanyagoként több minta is elkészült, de mindegyik esetében a legnagyobb kiindulási hatóanyag tartalmú minták (D3:Tf = 1:2; IBU:Tf = 4:1; KP:Tf = 1:4) esetén végeztük el ezen méréseket. Ezen eredményekből jól látszik, hogy a különböző főbicitású modell vegyületek különböző EE(%) és DL(%) értékeket eredményeznek. A részecskék szerkezeti sajátosságait nézve a nanoprecipitációnál – amely módszert munkánk során alkalmaztunk – a mag-héj szerkezet kialakulása csak nagyon hidrofób hatóanyagok esetében valósulhat meg, ahol lehetőség adódik a polimer láncok hidrofób részeinek hatóanyag körüli csoportosulására. Hidrofilebb gyógyszerszármazékoknál a precipitáció mértéke jelentősen eltérhet, ami csökkenti a fentebb említett mag-héj struktúra kialakulásának lehetőségét.

2. táblázat: A vizsgált hatóanyagok kapszulázási hatékonyság értékei (EE(%)) és a részecskék hatóanyag töltöttségeinek (DL(%)) összehasonlítása.

	Kolekalciferol	Ketoprofén	Ibuprofén
Szerk. képlet			
EE(%)	39,1 ± 0,7	5,7 ± 1,3	1,7 ± 0,9
DL(%)	20,3 ± 2,6	7,2 ± 1,1	53,9 ± 2,2

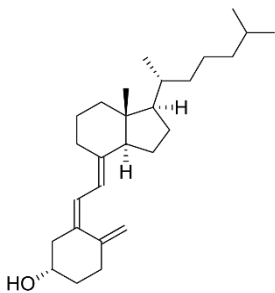
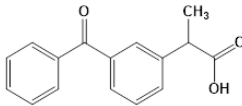
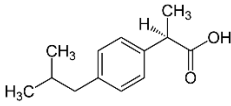
Jelen alfejezetben tárgyalt EE(%) eredmények összehasonlításra nem alkalmasak az eltérő kiindulási hatóanyag-koncentrációk miatt, ellenben a DL(%) értékek – amelyeket a szakirodalomban is jobban preferáltak – már alkalmasabbak. A jelen DL(%) értékek alapján az IBU kimagaslóan jó kapszulázható, míg a D₃-vitamin és a KP esetében ez az érték némileg kisebb. A D₃ és a KP -tartalmú minták esetén kapott értékeket összevetve a D₃ vonatkozásában kapott valamelyest nagyobb értékre magyarázatot adhat az, hogy rosszabb vízoldhatósággal rendelkezik, így inkább preferáltabb a jelenléte a hidrofób hordozón belül a TPGS jelenléte mellett. A DL(%) értékek makromolekulás hordozók esetében néhánytól max. 15-20 % között változik [13,14,19,26], így az IBU esetén mért viszonylag nagy érték hitelessége még kérdéses.

Munkánk utolsó lépéseként célunk volt a EE(%) értékek összevethetősége miatt azonos kiindulási hatóanyag koncentrációk mellett is tanulmányozni a molekulák formulálhatóságát, valamint kioldódási vizsgálatokat is terveztünk elvégezni, melynek eredményeit a következő alfejezetben foglaljuk össze.

4.3. Az eltérő modell vegyületek *in vitro* hatóanyag-kioldódási vizsgálatai

Kutatómunkánk utolsó fázisaként elvégeztük a három általunk vizsgált modell hatóanyag mindegyikén az *in vitro* hatóanyag-kioldódási vizsgálatokat, amelynek első lépéseként az eltérő kiindulási hatóanyag koncentrációk helyett azonos kiindulási mennyiségeket használtunk. Ehhez egy olyan kiindulási hatóanyag/Tf tömegarányra volt szükség, amely mind a három kismolekula (D3, KP, IBU) esetén megfelelő lehet (hatóanyag/Tf = 0,8) a molekulák oldhatóságát is figyelembe véve. Ezután a mintákat az előzőekhez hasonlóan elkészítettem és liofilizáltam őket. A fagyasztva szárított minták spektrofotometriás vizsgálatai alapján a **14-16. ábrán** látható kalibrációs egyenesek segítségével meghatároztam ismételten az adott modell hatóanyaghoz tartozó kapszulázási hatékonyság értékeket (EE(%)) és a részecskék hatóanyag töltöttségeket (DL(%)), amely eredményeket a **3. táblázat** foglal össze. Ezen értékek fontosságát az összehasonlítás túl az *in vitro* kioldódási vizsgálatokhoz való felhasználása is adja.

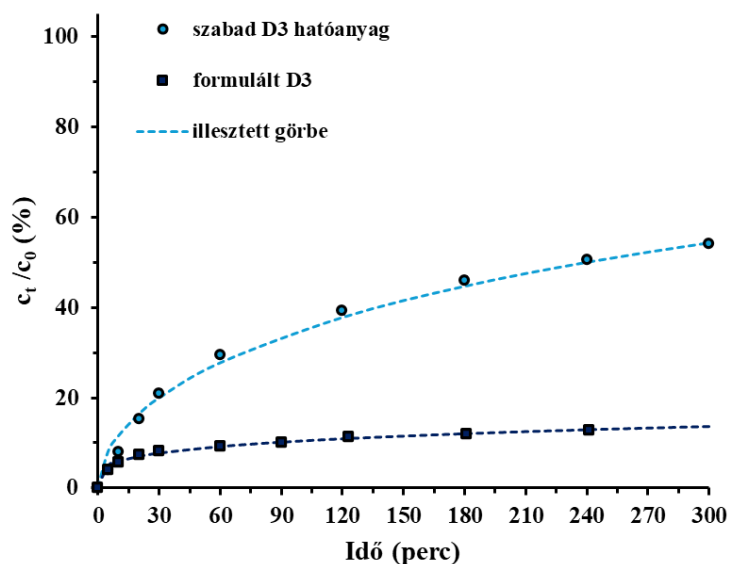
3. táblázat: A vizsgált hatóanyagok kapszulázási hatékonyság értékei (EE(%)) és a részecskék hatóanyag töltöttségeinek (DL(%)) összehasonlítása, ugyanazon kiindulási koncentrációk esetén ($c = 0,4 \text{ mg/cm}^3$).

	Kolekalciferol	Ketoprofén	Ibuprofén
Szerk. képlet			
EE(%)	30,81	55,95	10,43
DL(%)	19,84	31,10	50,30

A **3. táblázatban** látható értékek alapján elmondható, hogy az EE(%) alapján a ibuproféné a legalacsonyabb ($EE(\%)_{IBU} = 10,43$) érték, míg a kolekarciferol EE(%) értéke

30,81 és a ketoprofén EE(%) értéke a legmagasabb ($EE(\%)_{KP} = 55,95$). A D3 esetén közel azonos értékeket kaptunk, így itt a koncentrációnak nincs számottevő hatása a vizsgált koncentráció tartományban. A kapott EE(%) érték az IBU esetén a vártaknak megfelelően változik, hiszen némileg kisebb kiindulási koncentrációkból indultunk ki, ami a nagyobb EE(%) értékeket jelenti (1,7%-ról ~ 10%-ra). A DL(%) továbbra is kiugróan nagy értéknek mutatkozik, ami értelmezhető azzal, hogy a szabad, nem formulázott IBU-tól nehéz megszabadulni a tisztítási folyamat során, ami így növeli a pellet IBU tartalmát. Akár szabad fehérje is lehet a felülúszóban, ami az IBU-nel komplexet képezve szintén centrifugálható. ennek eredményeképpen az IBU-re kapott érték csak feltételekkel fogadható el, és további méréseket igényel, amire viszont a dolgozat összeállítására álló időben nem sikerült elvégezni. A KP vonatkozásában a kiindulási koncentrációt közel háromszorosára növeltük, ami az eredmények alapján kedvező volt a formulálás szempontjából, hiszen az a **3. táblázatban** lévő értékek növekedtek, de feltehetően itt is lehet szabad, formulálatlan KP hatóanyag, amitől a tisztítási folyamatban nem sikerült megszabadulni és az növeli a pellet hatóanyag tartalmát.

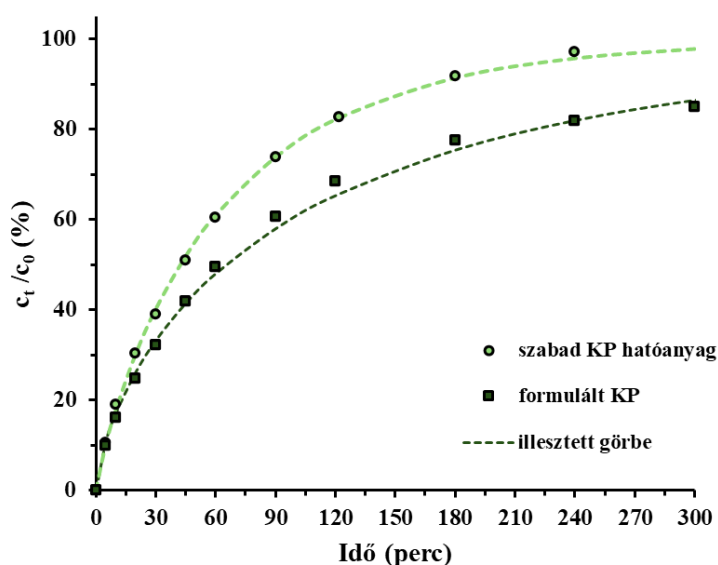
Ezek ismeretében munkák utolsó lépéseken, meghatároztuk a kioldódási folyamatokat mind a D₃-vitamin (**17. ábra**), mind a ketoprofén (**18. ábra**), mind az ibuprofén (**19. ábra**) Tf/PLGA/TPGS alapú hordozóba formulált mintáiban.



17. ábra: A formulálatlan D₃-vitamin ill. a hatóanyagot tartalmazó formuláció kioldódási profilja fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között (Weibull-modellel illesztve).

Vizsgálataink során a kapszulázott hatóanyag kioldódásának nyomon követése fiziológias körülmények alkalmazása mellett (PBS puffer, pH = 7,4; T = 37 °C) történt, a mérések minden esetben 300 percen keresztül zajlottak.

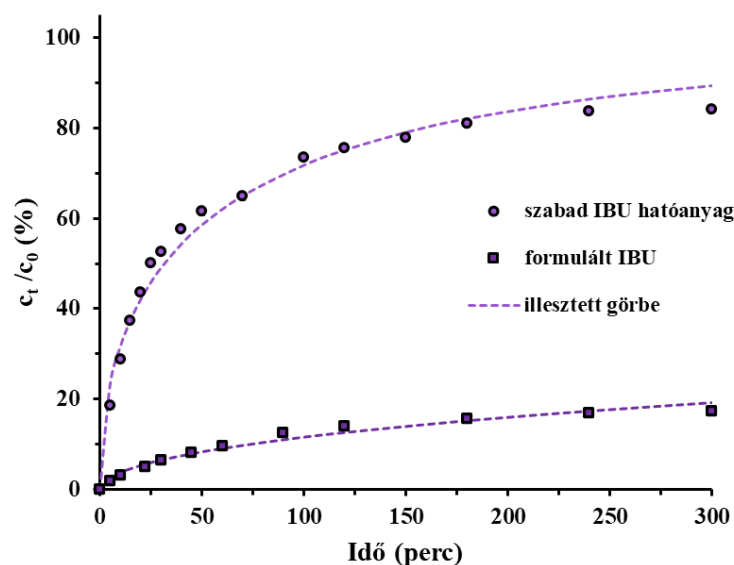
Az **17. ábra** eredményei értékelése során az a következtetés vonható le, hogy a Tf/PLGA/TPGS formuláció alkalmazásával nagyobb hatóanyag-retenció figyelhető meg, ugyanis a hatóanyag 12,05 %-a szabadul fel és jut át a membránon 120 perc elteltével (14,26 % 300 perc után), míg a nem formulázott hatóanyag esetén ez az érték 39,22 %. A formuláció alkalmazásával hozzávetőlegesen 24 %-os hatóanyag visszatartás és időben elnyújtott leadás megvalósítása lehetséges.



18. ábra: A formulálatlan KP ill. a hatóanyagot tartalmazó formuláció kioldódási profilja fiziológias körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között (Weibull-modellel illesztve).

A KP esetén a **18. ábrán** látható, hogy a hordozó alkalmazásával hozzávetőlegesen 35 %-os hatóanyag visszatartás, így elnyújtott időbeni leadás valósítható meg. A nagyobb hatóanyag-retenció formulálatlan KP 84,89 %-a szabadul fel 300 perc, míg hordozóba formulálva 49,07 %.

Az ibuprofén mérése során, amelyet a **19. ábra** mutat be, azt tapasztaltuk, hogy a formulázott hatóanyag közel 18 %-a jut át a hatóanyag-kioldódási vizsgálatok során alkalmazott cellulóزالapú membránon keresztül, míg a formulálatlan hatóanyag körülbelül 84 %-a volt mérhető a fotometriás mérések során, tehát ebben az esetben is a hatóanyag nagyobb mértékű visszatartása figyelhető meg a hatóanyag hordozó alkalmazásával.



19. ábra: A formulálatlan IBU ill. a hatóanyagot tartalmazó formuláció kioldódási profilja fiziológias körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között (Weibull-modellel illesztve).

A három modell vegyület *in vitro* hatóanyag kioldódási vizsgálatainak eredményei alapján megalapíthatjuk, hogy a formuláció alkalmazása a hatóanyag retencióját elősegítette. Az IBU esetén volt ez a retenció a legerősebb, de a KP és a D₃-vitamin kioldódási profiljai is azt mutatják, hogy a formuláció sikeresnek és hatékornak bizonyult.

A kioldódási görbéket különböző kinetikai modellekkel is megillesztettük, mely illesztések során mindhárom esetben a Weibull-modell adta a legjobb illesztést. A nem-lineáris paraméterbecsléssel illesztett modellgörbék korrelációs együtthatóit a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat: A kioldódási görbékre nem-lineáris paraméterbecsléssel illesztett kinetikai modellek (5–9. egyenlet) korrelációs együtthatói, kiemelve a legjobb illesztés adatai.

Kinetikai modell	Kolekalciferol		Ketoprofén		Ibuprofén	
	szabad	formulált	szabad	formulált	szabad	formulált
Elsőrendű	0,9283	0,7355	0,9898	0,9138	0,9584	0,8491
Másodrendű	0,9714	0,7525	0,9982	0,9718	0,9919	0,8722
Korsmeyer-Peppas	0,9797	0,9929	0,9616	0,9671	0,9552	0,2294
Weibull-egyenlet	0,9898	0,9934	0,9952	0,9825	0,9869	0,9743
Higuchi	0,9700	0,9004	0,9382	0,9573	0,8640	0,9794

5. Összefoglalás

A Szegedi Tudományegyetem TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszékén működő MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoport munkájához 2024-ban csatlakoztam. A Kutatócsoport munkatársainak segítségével egy új makromolekulák alkotta kolloid gyógyszerhatóanyag hordozó kialakítását és az előállított részecskék karakterisztikus sajátságaira vonatkozó méréseket végeztünk.

Vizsgáltuk a PLGA és Tf makromolekulák kölcsönhatását vizes közegben, majd megállapítottunk, hogy az 1:1 tömegarányú Tf/PLGA-alapú kolloidális hordozó a munkánk során használt stabilizátorszer (TPGS) jelenlétében kisebb, kompaktabb részecskéket alkot, mely részecskék mérete körülbelül ~ 220 nm. A TPGS jelenléte a részecske stabilitására nincs számottevően hatással. DSC mérésekkel igazoltuk, hogy a rendszerünk nem fizikai keverék, hanem a makromolekulák között kölcsönhatás van. Ez a degradációs hőmérséklet maximum értékeinek az eltolódásaiból, illetve a Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiás (FTIR) alapján észlelhető. Ezen mérések közben a tisztítási lépés (14000 rpm, 30 perc) hatásait is vizsgáltuk a hatóanyag hordozó, mely munka optimalizálása még várat magára, de a tisztítás hatására a TPGS a liofilizált mintákban nem kimutatható az FTIR mérésekből.

Munkánkban a hordozó különböző PLGA tejsav:glikolsav arányával történő karakterisztikus finomhangolását is elvégeztük, mely eredményeket a Kutatócsoport korábbi eredményeivel összehasonlítottunk és megállapítottuk, hogy a kis mértékben hidrofóbicitása finomhangolható a formulációnak. Végül a fizikai kémiai és kolloidkémiai szempontok alapján optimálisnak tekintett összetett hordozó részecskék formulálhatóságát is elemeztük különböző oldhatóságú kismolekulák kapszulázhatóságán keresztül.

Az mérések alapján meghatározott, optimális tömegarányú hordozókba modell vegyületeket kapszuláztunk hidrofób (D_3 -vitamin, ketoprofén) és hidrofil (ibuprofén) karakterüket figyelembe véve, mely eredmények alapján összehasonlítottuk a DL(%) és EE(%) értékeiket. A hidrofil sajátságú vegyület DL(%) értéke a legkisebb $(DL(\%)_{IBU} = 6,5 \pm 2,2)$, ezt követi az erősebben hidrofób kismolekula $(DL(\%)_{D_3} = 19,84 \pm 2,6)$.

Munkánk utolsó fázisában a vizsgált kismolekulák Tf/PLGA/TPGS hordozóba formulált rendszerének az *in vitro* hatóanyag-kioldódási vizsgálatait végeztük el fiziológias környezetben. A kioldódási vizsgálatok eredményei alapján a Weibull-modell szolgáltatja a legjobb illesztést.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani *Prof. Dr. Tóth Ágota* egyetemi tanárnak – a SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének – aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett tanszéken kutatómunkát végezzek.

Szeretnék köszönetet mondani *Juhászné Dr. Csapó Edit* egyetemi docensnek, hogy az MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoporthoz csatlakozhattam a vegyész mesterképzésem során, illetve, hogy témavezetésével részt vehetek a Tudományos Diákköri Konferencián.

Köszönöm továbbá az egész Kutatócsoport szakmai segítségnyújtásán túl mutatott kedvességét és támogatását. Különösképpen szeretném megköszönni *Dr. Varga Norbertnek* a munka során nyújtott segítségét, és *Turcsányi Árpád* a TEM felvételek elkészítését.

Irodalomjegyzék

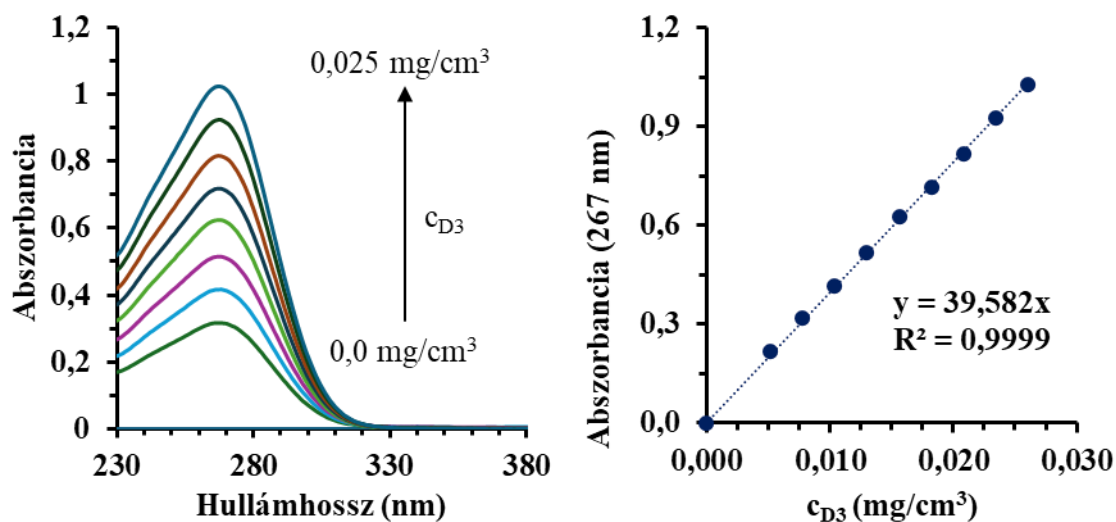
- [1] A. Mansour, M. Romani, A.B. Acharya, B. Rahman, E. Verron, Z. Badran, Drug Delivery Systems in Regenerative Medicine: An Updated Review, *Pharmaceutics*. 15 (2023) 695. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020695>.
- [2] N. Rasenack, B.W. Müller, Micron-Size Drug Particles: Common and Novel Micronization Techniques, *Pharm. Dev. Technol.* 9 (2004) 1–13. <https://doi.org/10.1081/PDT-120027417>.
- [3] S. Hua, Advances in nanoparticulate drug delivery approaches for sublingual and buccal administration, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 491535. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01328>.
- [4] S. Adepun, S. Ramakrishna, Controlled drug delivery systems: Current status and future directions, *Molecules*. 26 (2021) 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>.
- [5] A.P. Singh, A. Biswas, A. Shukla, P. Maiti, Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles, *Signal Transduct. Target. Ther.* 4 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0068-3>.
- [6] S. Choudhury, S. Paul, S. Goswami, K. Deb, Methods for nanoparticle synthesis and drug delivery, *Adv. Nanotechnology-Based Drug Deliv. Syst.* (2022) 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88450-1.00005-3>.
- [7] M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, M.E. Wechsler, N.A. Peppas, R. Langer, Engineering precision nanoparticles for drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (2021) 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- [8] A. Zielinska, F. Carreiró, A.M. Oliveira, A. Neves, B. Pires, D. Nagasamy Venkatesh, A. Durazzo, M. Lucarini, P. Eder, A.M. Silva, A. Santini, E.B. Souto, Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology, *Molecules*. 25 (2020) 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.
- [9] R. Patel, U. Kuwar, N. Dhote, A. Alexander, K. Nakhate, P. Jain, Ajazuddin, Natural Polymers as a Carrier for the Effective Delivery of Antineoplastic Drugs, *Curr. Drug Deliv.* 21 (2023) 193–210. <https://doi.org/10.2174/1567201820666230112170035>.
- [10] T.H. Tan, H.V. Lee, W.A. Yehya Dabdawb, S.B.B.O.A.A. Hamid, A review of nanocellulose in the drug-delivery system, *Mater. Biomed. Eng. Nanomater. Drug Deliv.* (2019) 131–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816913-1.00005-2>.

- [11] D. Sobot, S. Mura, P. Couvreur, Nanoparticles: Blood Components Interactions, *Encycl. Polym. Nanomater.* (2014) 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36199-9_227-1.
- [12] S.S. Guterres, M.P. Alves, A.R. Pohlmann, Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications, *Drug Target Insights.* 2 (2007). <https://doi.org/10.33393/dti.2007.1300>.
- [13] N. Varga, Á. Turcsányi, V. Hornok, E. Csapó, Vitamin e-loaded pla- and plga-based core-shell nanoparticles: synthesis, structure optimization and controlled drug release, *Pharmaceutics.* 11 (2019) 357. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070357>.
- [14] N. Varga, R. Béltéki, Á. Juhász, E. Csapó, Core-Shell Structured PLGA Particles Having Highly Controllable Ketoprofen Drug Release, *Pharmaceutics.* 15 (2023) 1355. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051355>.
- [15] A.G. Ribeiro, J.E.F. Alves, J.C.S. Soares, K.L. dos Santos, Í.T.T. Jacob, C.J. da Silva Ferreira, J.C. dos Santos, R.D.S. de Azevedo, S.M.V. de Almeida, M. do C.A. de Lima, Albumin roles in developing anticancer compounds, *Med. Chem. Res.* 30 (2021) 1469–1495. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02748-z>.
- [16] A. Loureiro, N. G. Azoia, A. C. Gomes, A. Cavaco-Paulo, Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers, *Curr. Pharm. Des.* 22 (2016) 1371–1390. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160125114900>.
- [17] V. Hornok, Serum albumin nanoparticles: Problems and prospects, *Polymers (Basel).* 13 (2021) 3759. <https://doi.org/10.3390/polym13213759>.
- [18] N. Varga, E. Csapó, Z. Majláth, I. Ilisz, I.A. Krizbai, I. Wilhelm, L. Knapp, J. Toldi, L. Vécsei, I. Dékány, Targeting of the kynurenic acid across the blood-brain barrier by core-shell nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 86 (2016) 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.02.012>.
- [19] A.N. Kovács, N. Varga, Á. Juhász, E. Csapó, Serum protein-hyaluronic acid complex nanocarriers: Structural characterisation and encapsulation possibilities, *Carbohydr. Polym.* 251 (2021) 117047. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117047>.
- [20] M.M. Yin, P. Dong, W.Q. Chen, S.P. Xu, L.Y. Yang, F.L. Jiang, Y. Liu, Thermodynamics and Mechanisms of the Interactions between Ultrasmall Fluorescent Gold Nanoclusters and Human Serum Albumin, γ -Globulins, and Transferrin: A Spectroscopic Approach, *Langmuir.* 33 (2017) 5108–5116. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00196>.

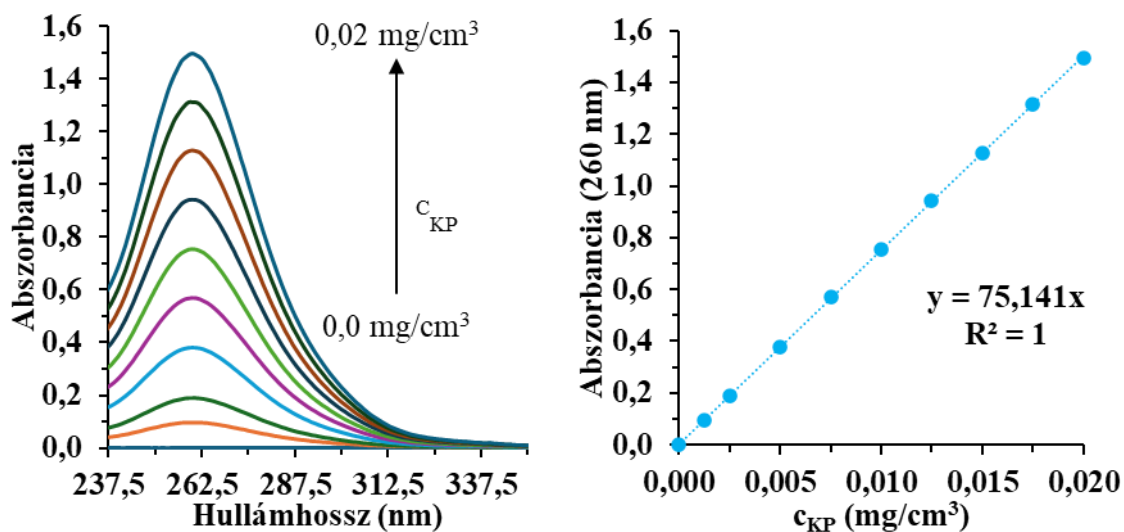
- [21] H. Kawabata, Transferrin and transferrin receptors update, *Free Radic. Biol. Med.* 133 (2019) 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>.
- [22] M.A. Fernandes, G. Hanck-Silva, F.G. Baveloni, J.A. Oshiro Junior, F.T. de Lima, J.O. Eloy, M. Chorilli, A Review of Properties, Delivery Systems and Analytical Methods for the Characterization of Monomeric Glycoprotein Transferrin, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 51 (2021) 399–410. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1743639>.
- [23] A. Salvati, A.S. Pitek, M.P. Monopoli, K. Prapainop, F.B. Bombelli, D.R. Hristov, P.M. Kelly, C. Åberg, E. Mahon, K.A. Dawson, Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface, *Nat. Nanotechnol.* 8 (2013) 137–143. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.237>.
- [24] T. Kang, M. Jiang, D. Jiang, X. Feng, J. Yao, Q. Song, H. Chen, X. Gao, J. Chen, Enhancing Glioblastoma-Specific Penetration by Functionalization of Nanoparticles with an Iron-Mimic Peptide Targeting Transferrin/Transferrin Receptor Complex, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 2947–2961. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00222>.
- [25] A.M. Asrorov, N. Mukhamedov, M. Kayumov, A. Sh. Yashinov, A. Wali, A. Yili, S.Y. Mirzaakhmedov, Y. Huang, Albumin is a reliable drug-delivering molecule: Highlighting points in cancer therapy, *Med. Drug Discov.* 22 (2024) 100186. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2024.100186>.
- [26] A.N. Kovács, N. Varga, J. Bogner, Á. Juhász, E. Csapó, Enhancing the hydrophilicity of poly(lactic-co-glycolic acid) with serum albumin by creating colloidal drug carriers, *J. Mol. Liq.* 398 (2024) 124271. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124271>.
- [27] J. Chang, Y. Jallouli, M. Kroubi, X. bo Yuan, W. Feng, C. sheng Kang, P. yu Pu, D. Betbeder, Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.035>.
- [28] R. Bouillon, D. Manousaki, C. Rosen, K. Trajanoska, F. Rivadeneira, J.B. Richards, The health effects of vitamin D supplementation: evidence from human studies, *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021 182. 18 (2021) 96–110. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00593-z>.
- [29] D.D. Bikle, J.S. Adams, S. Christakos, Vitamin D: Production, metabolism, action,

- and clinical requirements, *Prim. Metab. Bone Dis. Disord. Miner. Metab.* (2018) 230–240. <https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch30>.
- [30] S. Harirforoosh, W. Asghar, F. Jamali, Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 16 (2013) 821–847. <https://doi.org/10.18433/J3VW2F>.
- [31] S. Bindu, S. Mazumder, U. Bandyopadhyay, Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective, *Biochem. Pharmacol.* 180 (2020) 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.
- [32] L.L. Lao, N.A. Peppas, F.Y.C. Boey, S.S. Venkatraman, Modeling of drug release from bulk-degrading polymers, *Int. J. Pharm.* 418 (2011) 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.020>.
- [33] P. Trucillo, Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release, *Processes*. 10 (2022) 1094. <https://doi.org/10.3390/pr10061094>.
- [34] S. Deb, A.A. Reeves, S. Lafortune, Simulation of physicochemical and pharmacokinetic properties of vitamin d3 and its natural derivatives, *Pharmaceuticals*. 13 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph13080160>.
- [35] A. Mannila, H. Kokki, M. Heikkinen, M. Laisalmi, M. Lehtonen, H.L. Louhisto, T. Järvinen, J. Savolainen, Cerebrospinal fluid distribution of ketoprofen after intravenous administration in young children, *Clin. Pharmacokinet.* 45 (2006) 737–743. <https://doi.org/10.2165/00003088-200645070-00008>.
- [36] H. Wu, Z. Deng, B. Zhou, M. Qi, M. Hong, G. Ren, Improved transdermal permeability of ibuprofen by ionic liquid technology: Correlation between counterion structure and the physicochemical and biological properties, *J. Mol. Liq.* 283 (2019) 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.03.046>.

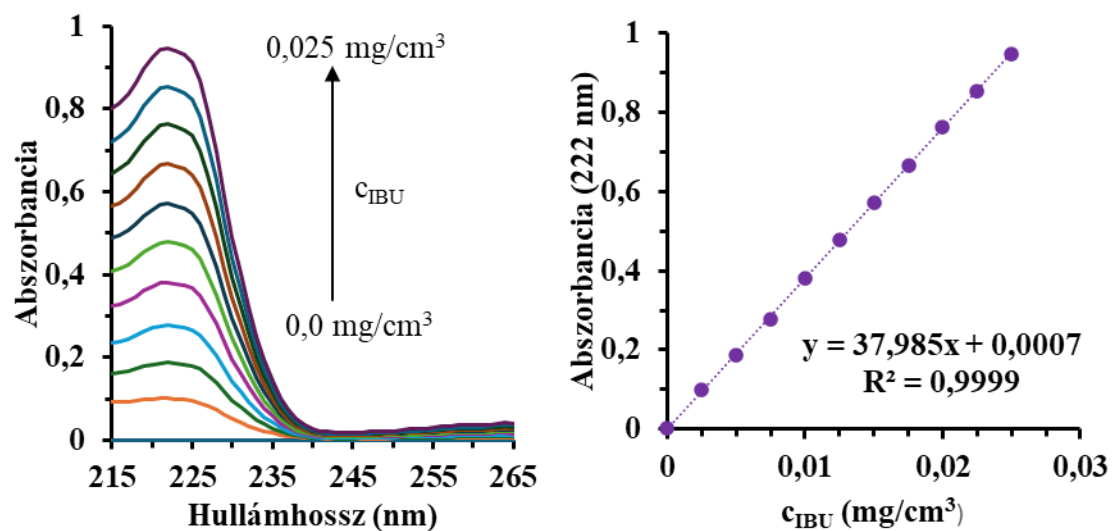
Melléklet



1. M ábra: A D₃-vitamin UV-spektrumai fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között növekvő D₃ koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese.



2. M ábra: A ketoprofén UV-spektrumai fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között növekvő KP koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese.



3. M ábra: A ibuprofén UV-spektrumai fiziológiás körülmények (PBS, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) között növekvő IBU koncentrációk esetén és a hatóanyag kalibrációs egyenese.