



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat

Új összetételű, szérumfehérje és hialuronsav alkotta kolloidális hatóanyag hordozó részecskék tervezése

Torma Bianka

Vegyész mesterszak II. évf.

TÉMAVEZETŐ:

Juhászné Dr. Csapó Edit

egyetemi docens

Konzulens:

Seres László

III. Kémia PhD hallgató

Szeged

2024

Tartalmi összefoglaló

Napjainkban számos kutatás foglalkozik minél hatásosabb gyógyszerkészítmények fejlesztésével. A legjelentősebb nehézségek, melyekkel a szakembereknek szembe kell néznie az, hogy az adott készítmény képes legyen a hatóanyagot a szervezetben célzottan, azon a helyen leadni, ahol arra szükség van, illetve, hogy minél tovább fejtse ki hatását. Ennek eléréséhez a klasszikus gyógyszerformák mellett már elterjedtek a kolloidális hatóanyagszállító rendszerek, melyek képesek szabályozni a hatóanyag felszabadulási folyamatát. Ahhoz, hogy egy optimális összetételű és szerkezetű gyógyszerhordozó rendszert hozzunk létre, elengedhetetlenek a gyógyszertechnológiai vizsgálatok mellett a formuláció kialakíthatóságára és összetételére irányuló fizikai-kémiai és kolloidkémiai vizsgálatok is, melyek kutatómunkám motivációját jelentették.

Diákköri dolgozatom témáját két természetes makromolekula, egy nagy mólúlyú poliszacharid, a hialuronsav (HyA) és a transferrin (Tr) fehérje kölcsönhatásából létrejövő kolloid rendszer kialakíthatóságának feltérképezése és annak részletes jellemzése jelentette. Tanulmányoztam, hogy a képződő kolloid részecskék alkalmasak lehetnek-e a jövőben gyógyszerhatóanyag(ok) szállítására. Munkám első lépésében nagy jelentőséget tulajdonítottunk a két molekula közötti kölcsönhatás jellemzésére, melynek eredményeképp megállapítottuk, hogy a részecskék kialakulásában mind elektrosztatikus, mind hidrofób kölcsönhatások is fontos szerepet játszanak. Vizsgálataink során a makromolekulák tömegarányának és a pH értékének változtatása mellett számos körülmény hatását vizsgáltuk a keletkező részecskék főbb tulajdonságaira. Dinamikus fényszórás (DLS) mérések kivitelezése mellett a rendszerek zéta-potenciál és áramlási potenciál értékeinek meghatározásán túl reológiai és zavarosság méréseket is végeztünk a részecskék kialakíthatósági korlátjainak felderítése érdekében, mely vizsgálatok eredményeképp sikerült megtervezni egy optimális méretű és szerkezeti tulajdonságokkal rendelkező hordozó előállítását. Megállapítottunk azt a makromolekula tömegarányt ($m_{Tr}/m_{HyA} = 2$), amely mellett stabil kolloid részecskék alakíthatók ki. Az előállított konjugátumok méretét, méreteloszlását és szerkezetét transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) illetve DLS mérések mellett cirkuláris dikroizmus (CD) és Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiás (FTIR) mérésekkel jellemeztük, valamint a kolloid részecskék kinetikai stabilitását is felderítettük.

Kulcsszavak: poliszacharid, transferrin, polielektrolit komplex, nanoszerkezet, önszerveződés

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló.....	2
Tartalomjegyzék	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Kolloidális gyógyszerhordozók	5
2.2. Polielektrolit komplexek (PEC).....	6
2.3. Hialuronsav	8
2.4. Transzferrin.....	10
2.5. Kutatócsoport előzmények.....	12
3. Célkritizés	14
4. Felhasznált anyagok és szintézismódszerek	15
4.1. Vegyszerek	15
4.2. Tr/HyA (2:1 tömegarányú) részecskék előállítása	15
5. Vizsgálati módszerek.....	16
5.1. Dinamikus fényszórás (DLS) és zéta-potenciál meghatározás	16
5.2. Turbidimetria	17
5.3. Áramlási potenciál	17
5.4. Viskozitás	18
5.5. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR).....	18
5.6. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)	18
5.7. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	19
5.8. Izoterm titrációs kalorimetria (ITC).....	19
5.9. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)	19
6. Kísérleti eredmények és értékelésük.....	20
6.1. A HyA és Tr közötti kölcsönhatás vizsgálata.....	20
6.2. Makromolekulák aránya és a pH hatása a kolloid részecskékre	21
6.3. A polimer koncentrációjának hatása a kolloid diszperziók paramétereire	27
6.4. Kísérleti körülmények hatása a kolloid diszperziók sajátságaira.....	28
6.5. A Tr/HyA = 2 tömegarányánál előállított részecskék karakterizálása	30
7. Összefoglalás.....	35
8. Köszönetnyilvánítás	37
9. Irodalomjegyzék	38

1. Bevezetés

A gyógyszeripar mindenkori feladatai közé tartoznak meglévő és új gyógyszerek fejlesztése, a célzott hatóanyag szállítás megvalósítása, valamint az oldhatóság, a hatóanyag felszabadulás és a biohasznosulás javítása. Ezeket többek között különböző koloidális rendszerekkel próbálják elősegíteni, mint például a liposzómák, fehérjék, fehérje-polimer rendszerek. Sok kutatás folyik az utóbb említett fehérje-polimer struktúrákkal kapcsolatban, ígéretes terápiás szerek lehetnek a célzott hatóanyagleadásuknak köszönhetően. Hátrányuk közé sorolható viszont a hatóanyag gyors kioldódása és a kis fizikai stabilitásuk [1]. Az ilyen rendszerek képesek a hatóanyagok „maszkolására” ezáltal szállítására. Viszont ehhez fontos vizsgálni kölcsönhatásukat különféle biológiai folyadékokkal vagy ahhoz hasonló körülmények között, mivel hajlamosak aggregálódni bizonyos kondíciók mellett, ezzel elvesztve hatóanyag hordozó funkciójukat [2].

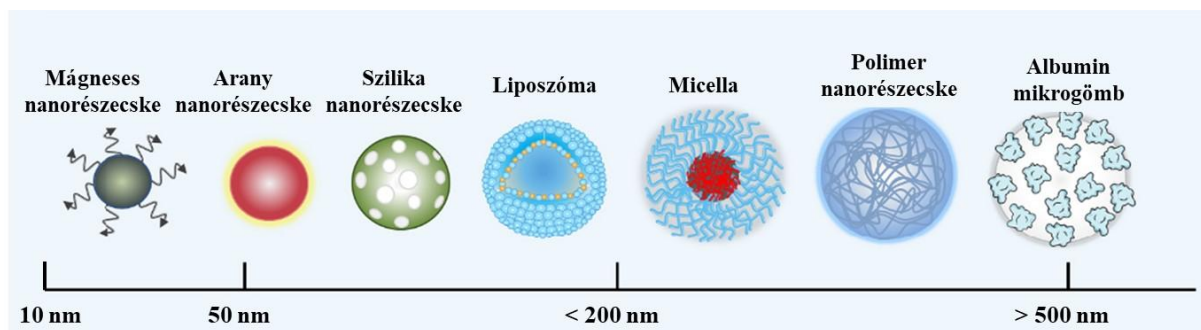
Az MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoport már megalakulása előtt is, közel 8 éve foglalkozik makromolekulás kolloidokból felépülő, gyógyszerhatóanyag hordozóként funkcionáló kolloid részecskék kialakítási lehetőségeinek a feltérképezésével. Az elmúlt néhány év kutatómunkája során sikeresen hoztak létre és jellemeztek szérumfehérjék (humán szérum albumin (HSA), marha szérum albumin (BSA)) [3,4], poliszacharidok (pl.: hialuronsav (HyA), kitozán, alginát) [3–5] valamint szintetikus kopolimerek (poli(tejsav-glikolsav) PLGA) [6] felhasználásával összetett hordozó részecskéket.

Ezen ígéretes kutatási programhoz kapcsolódva egy újabb szérumfehérje, a transferrin alkalmazhatóságát kívánjuk tanulmányozni, melynek hialuronsavval való kombinációja révén előállítható kolloid részecskékre nem találhatunk irodalmi hivatkozást. Munkánk során szeretnénk megvizsgálni a két makromolekula közötti interakciót, illetve feltérképezni a belőlük kialakuló kolloid diszperzió fizikai-kémiai és kolloidkémiai sajátosságait. Olyan részecskék előállítását kíséreljük meg, melyek a jövőben potenciálisan gyógyszerhatóanyag hordozó rendszerként tudnak funkcionálni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Kolloidális gyógyszerhordozók

A nanométeres mérettartományba eső szerkezetek egyedülálló fizikai-kémiai sajátságokkal rendelkeznek, ennek okán az elmúlt évtizedek során számos kutatás indult különféle gyógyszerészeti felhasználásukat illetően. Ahogy az **1. ábrán** is látható, a kolloidális gyógyszerhordozók méretüket tekintve nagyjából a 10 – 500 nm-es mérettartományba esnek. Néhány összetett, többkomponensű részecske 500 – 1000 nm közötti mérettel is rendelkezhet. Előnyük, hogy felhasználhatók mind már meglévő, illetve új gyógyszerek terápiás indexének javítására, illetve azok toxicitásának csökkentésére is, mivel a hatóanyag felszabadulása nem a fizikai-kémiai sajátságaitól függ, hanem a hordozó részecske tulajdonságaitól [7].



1. ábra: Néhány kolloidális gyógyszerhordozó sematikus ábrája és mérettartományuk [8].

A szakirodalom a hordozórendszereken belül számos csoportot különít el anyagi minőség szerint, mint például a szerves, szervetlen, lipid és polimer alapú hordozók [9].

A lipid alapú hordozók (liposzóma, lipid nanorészecskék) fontosságát mutatja, hogy kulcs szerepet játszottak a COVID-19 mRNS alapú vakcinák kifejlesztésében [10,11]. Az ilyen módon történő hatóanyag leadás javítja a gyógyszer biológiai eloszlását, illetve farmakokinetikáját. Ezen kívül számos más liposzómás gyógyszert engedélyeztek és alkalmaznak az orvosi gyakorlatban napjainkban is, mivel a lipid vezikulák képesek mind hidrofíl, mind lipofil hatóanyagok szállítására is [9].

A szervetlen alapú hordozók közé sorolhatók a nemesfémek, szilika és szén alapú rendszerek. Az arany nanorészecskék ígéretes eredményeket mutatnak daganatos betegségek kezelésére, ugyanis a célba juttatni kívánt hatóanyag közvetlenül a nanorészecskék felületére köthető kovalens, illetve nem-kovalens kölcsönhatásokkal is, mely révén lehetőség van a felület módosítására, például antitestek, szénhidrátok vagy más ligandumok segítségével, melyek szelektívek lehetnek a daganatos sejtekre [12].

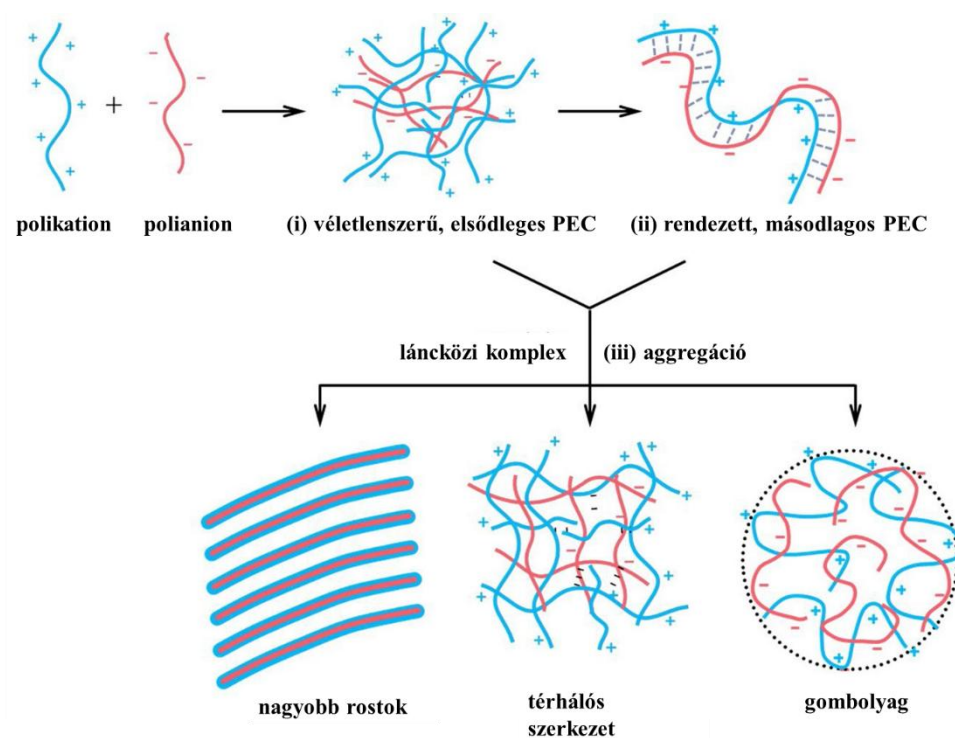
A polimer alapú hordozók csoportja rendkívül széles, jelentős tulajdonságuk a kivételesen nagy mértékű szerkezeti változatosságuk. Ide tartoznak a természetes polimerek, mint pl.: poliszacharidok, polinukleotidok. Ezek előnyös sajátása a biohasznosíthatóság, illetve biokompatibilitás, ezen kívül a szervezet képes őket a hatóanyag leadás után toxikus melléktermék nélkül lebontani. Így általában módosítás nélkül alkalmazhatók hordozóként. Másik fő csoport a mesterségesen előállított polimerek, például a polietilén-glikol, politejsav és a poliamidok. Ezek előnye, hogy lehetőségünk van a szintézis során hangolni a hordozót, kívánt tulajdonságainak megfelelően [13,14].

Diákköri munkám során természetes makromolekulákkal foglalkoztam. A legfőbb motiváció egy szérumfehérje és egy poliszacharid kölcsönhatásából egy olyan polielektrolit komplexszerű (PEC) hordozó részecske kialakítása volt, mely alkalmas lehet kolloidális hatóanyag hordozó részecsként funkcionálni. A PEC hordozó részecskék és az általam alkalmazott makromolekulák bővebb jellemzésére a további fejezetekben térek ki.

2.2. Polielektrolit komplexek (PEC)

A polielektrolitok a makromolekulák egy meghatározó csoportja, melyek ismétlődő egységekből épülnek fel és pozitív vagy negatív töltéssel rendelkeznek. Egyedülálló sajátságokkal bírnak, melyek nagyban megkülönböztetik őket a töltéssel nem rendelkező polimerektől. Már kismértékű disszociáció is jelentős változást okoz fizikai-kémiai tulajdonságaikban [15]. Egyik különös tulajdonságuk, elsőként az 1940-es években megfogalmazott *polielektrolit-effektus*, miszerint a polielektrolit oldatok csökkent viszkozitása nő az oldat hígításával [16]. Egyaránt alkalmazzák őket vízkezelésben, kozmetikai-, gyógyszer- és papíriparban [15,17,18].

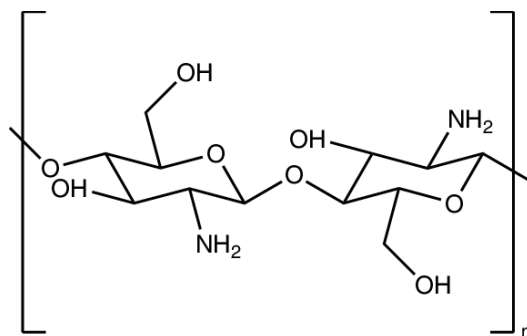
Az utóbbi időben megnövekedett gyógyszerhordozóként történő felhasználási területének népszerűsége, melynek oka, hogy a polielektrolithoz oldatfázisban ellentétes töltésű gyógyszerhatóanyag vagy másik polimer elektrosztatikus kölcsönhatás révén kötődni tud. Ennek következtében mag-héj, vagy vegyes összetételű komplex nanorészecskék, makromolekula önszerveződés (PEC) jönnek létre, melyek fokozhatják a hatóanyag biológiai hozzáférhetőségét. Ezen túlmenően a polielektrolitok magukban is összeállhatnak adott felületi töltéssel rendelkező kolloid vagy nanorészecskéket képezve, melyek képesek magjukban is hatóanyagot kapszulázni. A PEC-ek kialakulásának sematikus folyamata a **2. ábrán** látható.



2. ábra: Különféle polielektrolit komplexek kialakulása [19].

Ezen folyamat ellentétes töltésű polielektrolitok egymással való kölcsönhatása révén, elektrosztatikus kölcsönhatás által valósul meg két vagy három lépésben. Az első lépésben egy véletlenszerű, elsődleges vagy ún. primer komplex alakul ki, a polimerláncok konfigurációjának torzulásával. Ezt követően egy másodlagos, avagy szekunder komplex kialakulása a meghatározó, mely keresztkötések révén jön létre. Utolsó lépésben bizonyos körülmények között a primer és szekunder komplexek aggregálódhatnak, feltételezhetően hidrofób kölcsönhatások következtében, így különféle stabil szerkezetek jöhetnek létre, például térhálós-, mag-héj szerkezet vagy gombolyag [19]. A megjelölt szerkezetek közül, ha mag-héj szerkezet alakul ki, akkor az egyik polielektrolit alkotja a magot, míg a másik a héjat. Ezt a folyamatot többek között a töltéssűrűség, lánc hossz, ionizációs fok, ionerősség és a pH is nagyban befolyásolja. Stabilabb nanorészecske alakul ki hosszabb, nagyobb töltéssűrűséggel rendelkező láncokból. Nagyon fontos paraméter az egymással reagáló polielektrolitok aránya. Ez jelentősen befolyásolja a keletkező részecskék méreteloszlását és fizikai-kémiai tulajdonságait [15].

Ezeket a részecskéket már sikeresen alkalmazzák hordozóként a gyógyszeriparban. Első ilyen előállított PEC-ek között voltak a kitozán alapú hordozók. A kitozán (3. *ábra*) egy pozitív töltésű, lineáris, természetes poliszacharid, mely kitűnő biokompatibilitással és biodegradábilis karakterrel rendelkezik. Emellett ammóniumcsoportjai jó bioadhezivitást és tumor ellenes tulajdonságot is mutatnak [19].



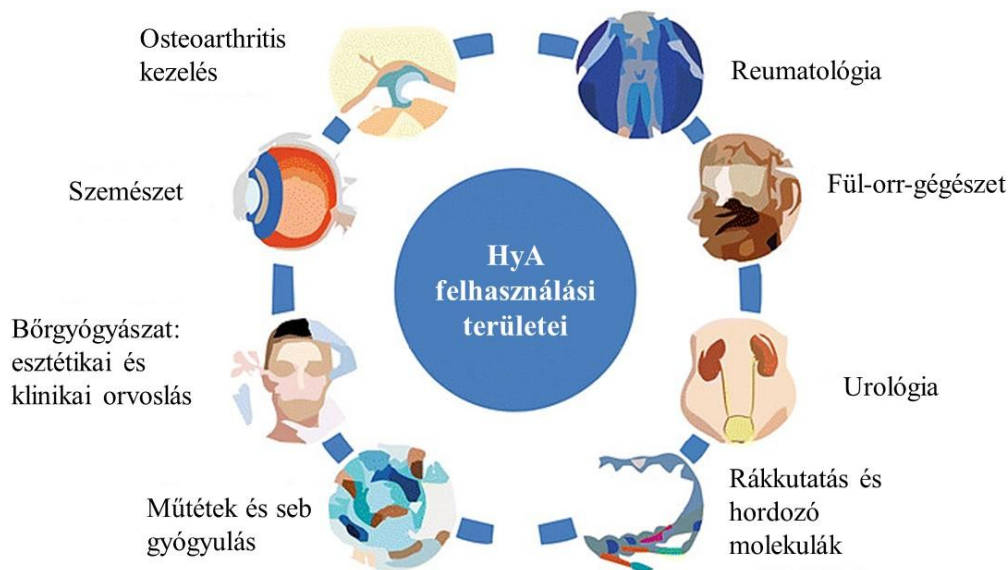
3. *ábra*: A kitozán szerkezeti képlete [20]

Egy frissebb kutatási munka folyamán 2021-ben, D. Nikolova és csapata Bulgáriában egy nem-szteroid gyulladáscsökkentőt, a diklofenák-nátriumot csomagolták kitozán és nátrium-alginát alkotta részecskébe, három tömegarányban ($m_{\text{alginát}}/m_{\text{kitozán}}$: 2; 1; 0,5). A hatóanyagot az alginát oldatban oldották fel, majd ez után adták hozzá a kitozán oldathoz, így a diklofenák és a PEC tömegaránya véglegesen 1:1 volt. A kapszulázási hatékonyság az első két tömegaránynál 85-89% körül volt, míg a harmadik aránynál, ahol a kitozán volt nagyobb mennyiségben csak 30% körüli értéket mértek. A kioldódási vizsgálatokat gyomor-bél traktushoz hasonló körülmények között vizsgálták, a pH=1,2 és 6,8 volt. Alacsonyabb pH-n az első 2 órában a kapszulázatlan diklofenákból és a kapszulázott részecskékből sem tapasztaltak hatóanyag kioldódást. A 6,8-es pH értéken a tiszta diklofenák 100%-a felszabadult az első 4 óra alatt. Az 1:1-es tömegarányú részecskébe csomagolt diklofenáknak azonban az első 6 órában lineárisan szabadul fel a 60%-a, majd az első 24 óra után a hatóanyag maradék 30%-a. Az ilyen részecske ígéretes, mivel a gyomorban alacsony pH-n nincs hatóanyag felszabadulás, de utána magasabb pH-n a belekben egy nyújtott, egyenletes kioldódás tapasztalható [21].

2.3. *Hialuronsav*

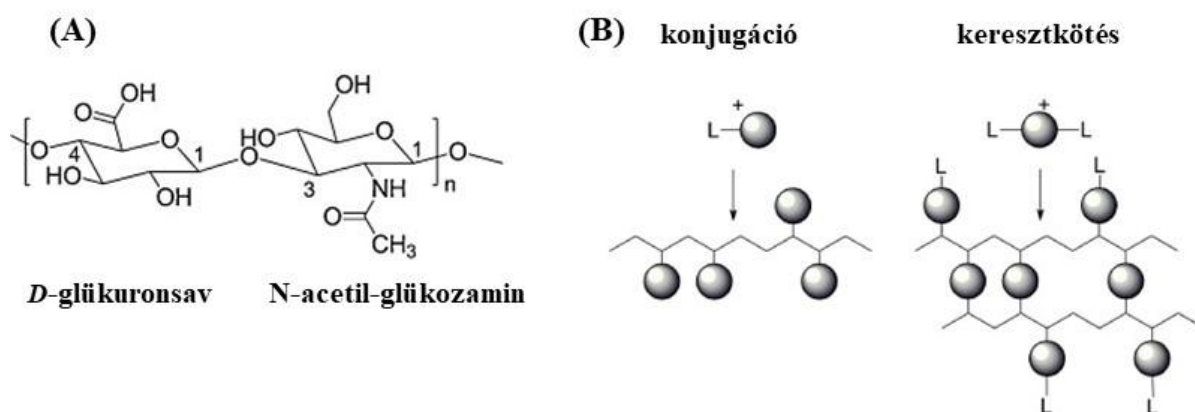
A hialuronsav (HyA) a természetben is előforduló biopolimer, mely napjainkban széleskörű felhasználási területtel rendelkezik többek között a kozmetikai-, orvosi- és gyógyszeriparban (4. *ábra*). Karl Meyer és John Palmer 1934-ben fedezte fel egy szarvasmarha szemének üvegtestében, de csak 1964-ben sikerült szintetikus úton is előállítani. A glükózaminoglikánok csoportjába sorolható, melybe beletartozik még egyebek mellett a heparin, a kondroitin-szulfát A és C és a dermatán-szulfát. A csoportban a hialuronsav az egyetlen, ami nem tartalmaz ként. Lineáris polimer szerkezete kétféle cukor alegységből áll össze, egyik a *D*-glükuronsav, másik pedig az *N*-acetyl-*D*-glükózamin, β -1,4- és β -1,3-glikozidos kötésekkel kapcsolódva egymáshoz. Molekulatömege 20 – 4000 kDa között változhat, attól függően, hogy milyen enzim katalizálja a kialakulását. A szervezetben főként testnedvekben és a szövetek

extracelluláris mátrixában fordul elő nagyobb mennyiségben. Kulcsszerepet tölt be a szövetek hidratáltságának fenntartásában és számos egyéb biológiai folyamatban. Fiziológias pH-n a glükuronsav karboxilcsoportjai deprotonált állapotban vannak (hialuronát, $pK_{a,HyA} \sim 2,9$), helyüket Na^+ -ionok veszik át. Ebből adódik, hogy a HyA negatívan töltött, hidroxil-, karboxil- és acetamidcsoportjai hidrogénkötés kialakítására képesek, köztük a vízmolekulák könnyen be tudnak illeszkedni ezáltal stabil szerkezetet alakítanak ki. Funkciós csoportjait erősen hidrofíl karakter jellemzi, mely garantálja a kiemelkedő vízdékonyságot [22,23].



4. ábra: A HyA néhány felhasználási területe [24].

Ahhoz, hogy a HyA több módon is felhasználható legyen és további előnyös tulajdonságokkal rendelkezzen, lehetséges szerkezetének mesterséges módosítása. Ezt két féle eljárással szokás megtenni, keresztkötéssel, illetve konjugációval. Mindkét folyamat ugyanazon a kémiai reakción alapul, azonban annyiban különböznek, hogy a konjugációnál egy vegyületet egy kötéssel kapcsolnak a HyA lánchoz, míg a keresztkötésnél a HyA láncok is kapcsolódnak egymáshoz, legalább két kötéssel, ahogy a **5./B ábrán** is látható. A HyA keresztkötésére többféle eljárás létezik, melyek például a közvetlen térhálósítás és HyA származékok keresztkötése. A két hozzáférhető funkciós csoport (**5./A ábra**) a karboxilcsoport és a hidroxilcsoport, emellett még nyerhető egy aminocsoport az N-acetilcsoport deacitilezésével. Nem tudni, hogy pontosan melyik hidroxilcsoport vesz részt a reakcióban, de feltételezhetően az N-acetil glükózamin 6-os szénatomjához kapcsolódó csoportja, mivel ez helyezkedik sztereokémiaiailag a legjobban hozzáférhető pozícióban [25].



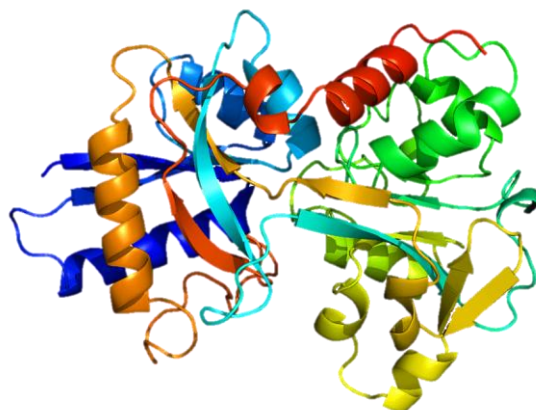
5. ábra: A HyA monomeregységének szerkezeti képlete (A) ill. a konjugáció és a keresztkötés folyamatának sematikus ábrája (B) [25].

Ilyen keresztkötött szerkezetű HyA alapú hatóanyag hordozót fejlesztettek sikeresen kutatócsoportunk munkatársai [26]. A keresztkötések aránya 50%, 75% ill. 100% volt, a segédreagensek pedig EDEA (2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)) és EDC (etilkarbodimid-metiodid) voltak. 7 napon át tartó dialízissel tisztították, majd liofilizálták. Készítettek egy kationos tenziddel (CTAB; cetiltrimetilammónium-bromid) semlegesített felületi töltésű változatot is, ezáltal megváltoztatva a HyA hidrofobicitását. Ehhez a CTAB-ot a HyA vizes oldatához adták és így készítettek belőle részecskéket. Bizonyítottan sikerült mindkét módszerrel hordozó nanorészecskéket létrehozni. A részecskék karakterizálása érdekében szerkezet- és oldatkémiai vizsgálatokat végeztek, majd egy hidrofób hatóanyagot, a ketoprofént (KP) kísérelték meg kapszulázni. A KP kapszulázási hatékonysága mindkét előállítási módszernél 95% körüli értéket ért el. A kioldódási vizsgálatok alapján kiderült, hogy ha egy relatíve kis mennyiségű CTAB van elektrosztatikusan kötve a részecskéhez, akkor az egy gyorsabb és inkább diffúzió kontrollált folyamatot eredményez. Ezzel szemben a keresztkötött HyA esetében a hatóanyag oldódása lassabb folyamat, viszont a felszabadulása egy diffúzió és erózió kontrollált kioldódást okozott. Ezzel bebizonyosodott, hogy a keresztkötött HyA részecskék jobb hatóanyag hordozók, mint az egyéb más úton módosított változataik [26].

2.4. Transzferrin

A transzferrin (szérum transzferrin – Tr), egy glikoprotein, a gerincesek számára nélkülözhetetlen fehérje. Sematikus szerkezetét a **6. ábra** mutatja. Az azonos nevű fehérjecsald tagja, melyek fő funkciója, hogy megkössék és szállítsák a vas(III)-ionokat a szervezetben. Az első fehérjét a transzferrin családból 1944-ben fedezték fel a tojásfehérjében,

mint vas-kötő vegyületet. Azóta a többi tagot széles körben tanulmányozták és jellemezték a különféle fajok esetében.



6. ábra: A transferrin sematikus szerkezete.

Az emberi szervezetben a transferrinek közül háromféle van jelen. A *laktoferrin* például a tejben, könnyben, nyálban, epében és légúti folyadékokban található. Emellett fontos szerepet játszik a veleszületett immunrendszer támogatásában, mivel széles pH-tartományban képes megkötni a vasat így megakadályozza, hogy a legtöbb patogén baktérium megszerezze azt. A *melanotranszferrin* egy vas-kötő fehérje, elsőként a humán bőrrákos sejtekben mutatták ki. Azóta sok más sejttípusban is igazolták jelenlétét, főként a nyálmirigyekben, a bőrben és a vesében. A Tr család többi tagjával szemben a melanotranszferrin csak egyetlen vaskötő hellyel rendelkezik. Valószínűleg fontos szerepet játszik a daganatképződésben és a tumor vasanyagcseréjében. A *szérum transferrin* főként a vérplazmában és a szövetek közötti folyadékokban van jelen, mint a nyirok- és az agy-gerincvelői folyadék vas hordozója, melyhez két vas(III)-ion tud reverzibilisen kötődni. Biztosítja, hogy a vas oldatban maradjon fiziológias körülmények között és megakadályozza, hogy részt vegyen redox reakciókban. A laktoferrin mellett a veleszületett immunrendszer fő védekező mechanizmusa [27].

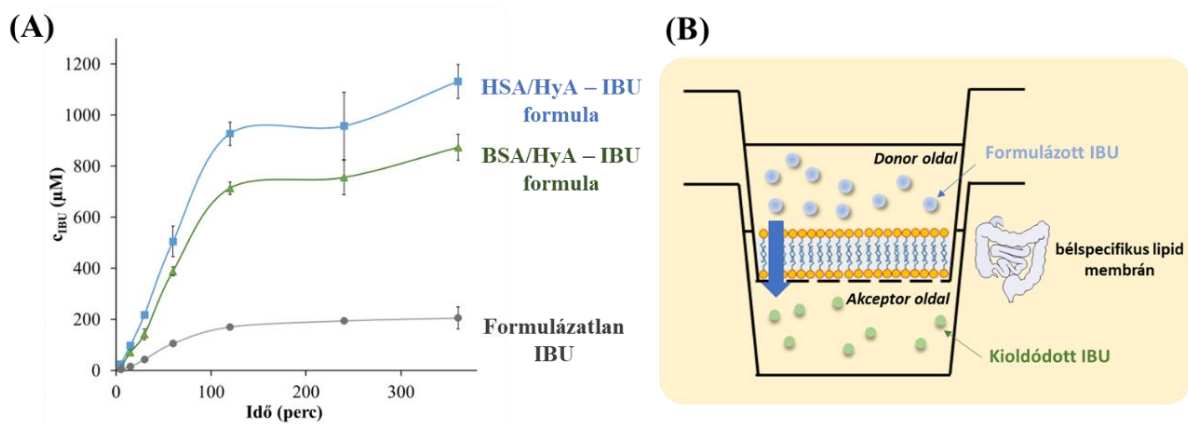
A vas a plazmában kering mígnem kapcsolódik a célsejt transferrin receptorjához. Egy karbonát-ionnak jelen kell lennie, hogy a vasat a transferrinhez irányítsa, taszító töltést létrehozásával. A transferrin nagy affinitással tud kötődni két vas(III)-ionhoz. A szükséges karbonát-ion ligandumként is szolgál a vas stabilizálására a transferrin kötőhelyén. A transferrin a vashoz való kötődés után konformációváltozáson megy keresztül. Ezek után a célsejt savas, 5,6-os pH-ja csökkenti a vas-transzferrin közötti kölcsönhatást és elősegíti a vas felszabadulását a kötőhelyről [28].

A transferrin vasszállító képességét sok módon próbálják kiaknázni. Egyik ilyen kutatási terület a rákellenes hatóanyagok fejlesztése. Mivel a daganatsejtek vasigénye jóval az

egészséges sejtek igénye felett van, lehetőség adódik célzottan, a tumorsejtekre szelektív gyógyszerforma kidolgozása transzferrinnel bevont hatóanyag esetében. Például a doxorubicin, egy antraciklin, daganatellenes szer, amely más citotoxicitással rendelkező hatóanyaghoz hasonlóan számos súlyos mellékhatással bír használata folyamán. A doxorubicin transzferrinhez való kapcsolásával a rákos sejtek célzott terápiája lehetséges, kevesebb mellékhatás mellett [29].

2.5. Kutatócsoport előzmények

A kutatócsoportunkban több, a dolgozatomhoz közvetlen kapcsolódó tudományos közlemény született már, melyek eredményei támpontot adtak a kutatómunka indításához. Egy környezetbarát, egylépéses preparálási protokollt kidolgozva - térhálósító anyagok és szerves oldószerek használata nélkül - hialuronsav és marha szérum albumin (BSA) alkotta gyógyszerhordozó részecskéket hoztak létre és vizsgálták kapszulázási lehetőségeit [3,4]. A szakirodalomban elsőként tanulmányozták kvantitatív módon ezen makromolekulák közötti pH függő kölcsönhatásokat. Igazolást nyert, hogy $m_{BSA}/m_{HyA} = 2$ tömegarány alkalmazása mellett ígéretes, megfelelő kolloid stabilitással rendelkező, átlagosan 210 nm-es részecskék előállíthatóak, melyek képződését TEM felvételek is bizonyították. Mindemellett a csoport munkatársai feltételezték a mag-héj szerkezet kialakulását, melyre az áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározására irányuló vizsgálatok is következtetni engedtek (a BSA adszorpciója a HyA felületére kizárható). A hordozó részecskék kialakítása és részletes karakterizálása után 2 eltérő főbitással rendelkező modell molekula kapszulázására is történtek vizsgálatok. Mindkét modellként választott hatóanyag tartalmaz egy aromás gyűrűt és egy karboxilcsoportot, viszont a töltésük pH = 4,50 értéknél eltérő. Egyik az ibuprofén (IBU) ($\log P = 1,74$) nem-szteroid gyulladáscsökkentő, a másik pedig a 2-pikolinsav (2-PA) ($\log P = -0,1$), idegvédő, immunológiai és antiproliferációs hatással rendelkezik. A kapszulázási hatékonyság az IBU-nál 40%, míg a 2-PA esetében 14% volt. Az ibuprofén (IBU) bélben történő felszívódását modellezve igazolták, hogy a fehérje/HyA alapú formuláció, amely megnövekedett oldhatóságot, gyorsabb oldódást és nagyobb permeabilitást biztosít, kontrolláltabb, alacsonyabb dózisú és gyomornyálkahártyát kímélő terápiás megoldást jelenthet a nagy dózisú IBU alapú terápiában. A hatóanyag felszabadulását a fehérjék anyagi minőségének változtatásával is tudták szabályozni, melyet a 7. *ábra* is szemléltet [3].



7. ábra: BSA/HyA és HSA/HyA alapú hordozó részecskékből az IBU felszabadulási görbéi (A) és a méréshez alkalmazott modell rendszer sematikus ábrája (B) [3].

Egy másik kutatómunka során a hialuronsav mellett a humán szérum albumint (HSA) használták gyógyszerhordozó kialakítására [5]. Hasonlóan az előzőleg bemutatott HyA/BSA rendszerhez, ebben az esetben is a $m_{HSA}/m_{HyA} = 2$ tömegarány bizonyult a legkedvezőbbnek. Ezen hordozó részecskéket a D3 vitamin kapszulázására használták fel.

Ezt a kutatási munka sorozatot folytatva a dolgozatom tárgya egy hatóanyag hordozó részecske kialakítása a hialuronsav és egy újabb szérumfehérje, a transferrin kölcsönhatásával.

3. Célkitűzés

Ígéretes kutatócsoporti előzményekre alapozva, Tudományos Diákköri dolgozatomban megvalósult kutatás célja hialuronsav (HyA) és transferrin (Tr) makromolekulák alkotta, kolloidális hordozó részecskéként funkcionáló rendszer létrehozása és vizsgálata volt. Egy olyan összetett részecske kialakítását tűztük ki célul, mely a jövőben sikeresen alkalmazható gyógyszerhatóanyag szállítására. Az általunk használt két makromolekulából ilyen rendszert még nem készítettek és nem tanulmányoztak hasonló formában vagy összetételben, így nincsenek irodalmi előzmények a részecskék kialakíthatóságának korlátaira vonatkozóan. Ennek értelmében szükséges volt első körben a két makromolekula kölcsönhatásának részletes vizsgálata, majd a kialakuló kolloid rendszer részletes fizikai-kémiai és kolloidkémiai jellemzése.

A fehérje és a poliszacharid közötti interakció teljes körű feltérképezéséhez többféle mérési módszert terveztünk használni, beleértve DLS, reológia, zavarosság-mérés és CD spektroszkópiai mérések kivitelezését. A vizsgálatok során célunk volt feltérképezni, hogy milyen hatással van a pH és a makromolekulák tömegarányának szisztematikus változása a kialakuló diszperzió sajátságaira. Ennek tudatában egy megfelelő pH érték, illetve makromolekula tömegarány kiválasztása után célunk volt egy ideális előállítási protokoll kidolgozása is. Ehhez több kísérleti paramétert (adagolási sebesség, ionerősség, HyA koncentráció, keverési idő) kívántunk optimalizálni. Az így előállított hordozó részecskék karakterizálását tűztük ki munkánk végső céljául, melyet TEM, FT-IR, DSC és stabilitás méréssel terveztünk megvalósítani.

4. Felhasznált anyagok és szintézismódszerek

4.1. Vegyszerek

- Nagy molekulatömegű nátrium-hialuronát (HyA, $(C_{14}H_{21}O_{11}N)_n$, $M_w=1,5-1,8 \times 10^3$ kDa, $\leq 1\%$ fehérje, Sigma)
- Humán apo-Transzferrin (Tr, $M_w=79\,570$ Da, $\geq 98\%$, Sigma)
- Nátrium-acetát trihidrát ($CH_3COONa \times 3 H_2O$, $\geq 99\%$, VWR)
- Ecetsav (CH_3COOH , $\geq 96\%$, VWR)
- Nátrium-klorid ($NaCl$, $\geq 99\%$, VWR)

A felhasznált vegyszerek analitikai tisztasága miatt nem volt szükséges további tisztításukra. A megfelelő oldatok előállítására nagy tisztaságú Milli-Q vizet (Millipore, Milli-Q, Integral3, fajlagos ellenállás $18,2\text{ M}\Omega \times \text{cm}$ $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on) alkalmaztunk.

4.2. Tr/HyA (2:1 tömegarányú) részecskék előállítása

A részecskék kialakítását megelőző 24 órában $1,0\text{ mg/mL}$ koncentrációjú HyA törzsoldatot készítettünk, melyet pár óra kevertetés után egy éjszakára hűtőbe tettünk. Másnap a frissen elkészített $\text{pH} = 4,50$ ecetsav-acetát pufferrel $0,25\text{ mL}$ $1,0\text{ mg/mL}$ koncentrációjú HyA törzsoldatot $5,0\text{ mL}$ -re hígítottuk ($c_{\text{HyA}} = 0,05\text{ mg/mL}$). Ezt követően egy $5,0\text{ mg/mL}$ -es Tr oldatot készítettünk a szilárd Tr nevezett pufferben történő oldásával, melyet 30 percig kevertettünk, hogy megfelelően oldódjon. A HyA oldathoz $10\text{ }\mu\text{L}/20\text{ s}$ adagolási sebességgel adagoltunk $100\text{ }\mu\text{L}$ Tr oldatot $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 500 rpm kevertetési sebesség mellett. Az így kialakított részecskéket további 1 órán át kevertettük. A szilárd mintát igénylő vizsgálati módszerekhez a részecske diszperziót 1 órán keresztül $15\,000\text{ rpm}$ sebességgel centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk. A több mintából kapott szilárd anyagokat egyesítettük. Ezután folyékony nitrogénnel fagyasztottuk és liofilizáltuk a mintákat.

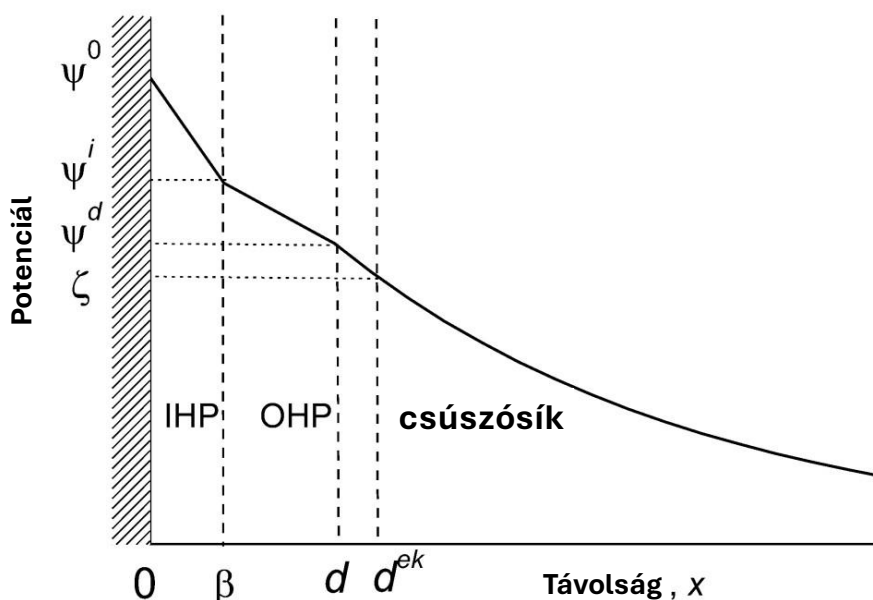
1. táblázat: Az ecetsav-acetát pufferek elkészítéséhez bemért ecetsav (m_{ecetsav}), valamint a Na-acetát tömege ($m_{\text{Na-acetát}}$) és azok koncentrációja ($c_{\text{össz}}$) ($V_{\text{puffer}} = 250\text{ cm}^3$, $I = 15\text{ mM}$).

Puffer	m_{ecetsav} (g)	$m_{\text{Na-acetát}}$ (g)	m_{NaCl} (g)	$c_{\text{össz.}}$ (mmol/dm^3)
pH=3,6	0,2194	0,0330	0,1917	15
pH=4,0	0,1918	0,0756	0,1591	15
pH=4,5	0,1514	0,1810	0,0913	15

5. Vizsgálati módszerek

5.1. Dinamikus fényszórás (DLS) és zéta-potenciál meghatározás

A dinamikus fényszórás mérés az egyik legelterjedtebb módszer kolloid diszperziók részecskéinek *ill.* nanoszerkezetek hidrodinamikai átmérőjének meghatározására. A mérési módszer a Tyndall effektuson alapul. A mintát He-Ne lézerrel világítjuk meg és a szórt fény intenzitásának időbeli fluktuációját rögzítjük. A megfigyelt térrészben a részecskék Brown-mozgásának következtében folyamatosan változik a szórt fény intenzitása. A Brown-mozgás sebessége arányos a rendszerünkben jelen lévő részecskék méretével. A mért adatokból egy autokorrelációs függvény és a Stokes-Einstein egyenlet segítségével meghatározhatók a részecskék hidrodinamikai átmérője (d), a diffúziós együttható *ill.* a méreteloszlás (polidiszperziós index – PDI). A részecskék hidrodinamikai átmérője mellett elektroforetikus fényszórással meghatároztuk a ζ -potenciál (zéta-potenciál, ZP), másnéven elektrokinetikai potenciál értékeit is. A mérés során a felületi töltéssel rendelkező részecskéket elektromos erőterbe helyezük, ennek következtében elhasad az ionokat is tartalmazó hidrodinamikailag immobilis réteg, ezáltal potenciálkülönbség alakul ki a hasadási sík és az oldat között. Ez a potenciál a ζ -potenciál, melynek abszolútértéke a részecskék kinetikai stabilitásával van összefüggésben. A **8. ábrán** láthatók egy pozitív töltésű felület esetében kialakuló potenciál- és töltésviszonyok.



8. ábra: A töltések és potenciálok sematikus ábrázolása pozitív töltésű határfelületen ψ^0 – felületi potenciál, ψ^i – belső Helmholtz sáv potenciálja, ψ^d – diffúz réteg potenciál, ζ – zéta potenciál) [30].

Alapja az elektromos kettősréteg modell, melyben elkülönítünk egy fix, felülethez szorosan kötődött negatív töltésű réteget, illetve egy lazább, diffúz réteget, melyben egyaránt találhatók pozitív illetve negatív ionok is. Bonyolultabb esetek modellezése érdekében ezeket a rétegeket tovább lehet bontani. A felületi töltést kiegyenlítő, szorosan kapcsolódó ionokat Stern-rétegnek nevezzük, melyet egy belső (IHP)- és egy külső (OHP) Helmholtz-rétegre bonthatunk. A megkülönböztetésre azért van szükség, mivel vannak olyan ionok melyek a felülettel specifikus kölcsönhatás kialakítására képesek, míg mások csak a felület töltésével kerülnek interakcióba. Az OHP után ($x=d$) kezdődik a diffúz réteg, melynek határa a csúszósík, ahol a mért potenciál az elektrokinetikai- vagy másnéven a zéta(ζ)-potenciál [30]. A DLS és ζ -potenciál méréseket egy Horiba SZ-100 típusú dinamikus fényszórásmérő műszerrel végeztük, $25 \pm 0,1$ °C-on ($\lambda_{\text{lézer}} = 633$ nm, He-Ne lézer) és a szórt fény 90°-os szögben detektáltuk. A ζ -potenciálok meghatározása a Smoluchowski modellel történt. A mért paraméterek értékét minden esetben legalább 5-5 mérési eredmény átlagaként számoltuk.

5.2. *Turbidimetria*

A kolloid diszperziók meghatározó jellemzője a fényszórásuk. Többek között ebből is lehet következtetni a rendszerben végbemenő szerkezeti folyamatokra, mint például részecskék kialakulása vagy éppen azok aggregációja. Ugyanis minél több aggregátum van jelen a közegben, annál nagyobb mértékben érvényesül a Tyndall-effektus. A hordozó részecskék karakterizálásához turbidimetriás vizsgálatokat végeztünk, azt kihasználva, hogy egy adott tömegarány elérésekor a rendszer aggregál, durva diszperziók keletkeznek, a minta turbiditása pedig lecsökken. A folyamat követésére egy LP2000 Hanna Ins. típusú zavarosságmérő készüléket alkalmaztunk, szobahőmérsékleten. A mérések során 0,05 mg/mL koncentrációjú HyA oldatot titráltunk 5 mg/mL koncentrációjú Tr oldattal, 10 μ L-es adagolást alkalmazva 3,6, 4,0 és 4,5-ös pH értékeken.

5.3. *Áramlási potenciál*

Ellentétes töltésű makromolekulákból álló PEC-ek esetén a polielektrolitok tömegarányától függően azonosítható a neutralizációs- vagy töltéskompenzációs pontjuk. Ilyenkor a makromolekulák olyan arányban vannak jelen, hogy a kialakuló konjugátum töltése kiegyenlítődik. Ehhez használatos az ún. részecske töltés detektor (Particle Charge Detector – PCD), egy elektromosan töltött részecskéket tartalmazó diszperziók mérésére alkalmas technika. A műszer hengeres teflonedényben, egy teflon-oszlop által mozgást generál a mintában, amely hatására a részecskék körüli elektromos kettősréteg nyírásából a tefloncső

falában elhelyezkedő elektródon potenciálkülönbség mérhető (mV). Ezen rendszer pH méréssel kombinálva lehetőség nyílik a különféle töltéssel rendelkező részecskék izoelektromos pontjának meghatározására is.

A méréseket egy Mütek PCD 04 töltéstitrátorral végeztük, szobahőmérsékleten. Ecetsav-acetát pufferben 10 mL, 0,05 mg/mL HyA oldathoz adagoltuk az 5 mg/mL-es Tr törzsoldatot, 10 μ L-enként. Így a különféle tömegarányú pontokban mértük az áramlási potenciál értékét és a módosított Boltzmann-egyenlet [31] és nemlineáris paraméterbecslés segítségével határoztuk meg a görbék inflexiós pontjait.

5.4. *Viszkozitás*

A vizsgálatokat egy Anton Paar ViscoQC 300 típusú reométerrel végeztük, egy koncentrikus henger (C-DG26) geometriájú feltét használata mellett, $25 \pm 0,1$ °C-on termosztálva. A kezdeti HyA oldat koncentrációja 0,05 mg/mL volt, ebből 14 mL-t mértünk be a hengerbe. 250 1/s-os nyírási sebesség mellett titráltuk az 5 mg/mL-es Tr törzsoldattal, 25 μ L-es egységekben, két adagolás között eltelt idő minden esetben 90 s volt. Ilyen paraméterekkel, több különböző pH értéken (3,60; 4,00; 4,50) is elvégeztünk legalább 2-2 mérést.

5.5. *Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)*

Az FT-IR mérések kivitelezésében *Dr. Varga Norbert* segédkezett. Egy ATR feltéttel ellátott, (ATR Pro One) egyszeres reflexiójú Jasco FT/IR-4700 spektrométert használtunk. A tiszta HyA és Tr szilárd részecskék mellett még a 4,50-es ecetsav-acetát pufferes közegben előállított Tr/HyA (2:1) részecskéket centrifugálás után fagyasztottuk majd liofilizáltuk és az így kapott szilárd mintát porítottuk és vettük fel IR-spektrumukat. A színeképeket 15 interferogram átlagolásával 1 cm^{-1} felbontással, $500\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ tartományon rögzítettük. A normalizált spektrumon látható karakterisztikus rezgési sávokból és annak változásaiból megállapíthatók a végbement szerkezeti változások az egyszerű és összetett biopolimerek között.

5.6. *Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)*

A differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérések kivitelezése *Dr. Varga Norbert* segítségével, egy Mettler-Toledo 822e kaloriméterrel műszerrel történt. A detektált DSC görbéket $25\text{--}500$ °C közötti hőmérséklettartományon vettük fel 5 °C/perc felfűtési idő és 50 mL/perc áramlási sebességű nitrogén közeg beállítása mellett. A mérésekhez liofilizált pormintákat állítottunk elő pH = 4,5 pufferből való fagyasztva szárítás segítségével. Az eredményeket STARe 12.10 szoftverrel értékeltük ki.

5.7. *Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia*

A mintaelőkészítés során a fehérjéből 0,02 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk, melynek CD-spektrumához viszonyítottuk a részecskében lévő fehérje jelét. A kolloid adduktumok előállítása a 4.2. fejezetben leírtak szerint történt, majd a részecskediszperzió olyan mértékben lett hígítva, hogy a fehérjekoncentráció 0,02 mg/ml legyen benne. A CD spektrumokat egy Jasco J-1100 CD spektrométerrel (ABL&E-JASCO) rögzítettük $25 \pm 1^\circ\text{C}$ -on 1 cm optikai úthosszú kvarcküvetében. A színeképek 100 nm/perc pásztázási sebességgel készültek a közép UV-tartományban (200-300 nm) 3 L/perc N_2 áramlás mellett. A végső görbéket 3 mérés átlagából kaptuk. Fényforrásként egy vízűtéssel ellátott, nagy energiájú xenonlámpát (450 W) alkalmaztunk. A kiértékelés során a spektrométer saját szoftverjét használtuk, melynek segítségével a Reed és Yang-modellt alkalmazva illesztettük a CD spektrumokat, így lehetőségünk nyílt számszerűsíteni a fehérjét felépítő másodlagos szerkezetű részeket százalékos arányát.

5.8. *Izoterm titrációs kalorimetria (ITC)*

Az izoterm titrációs mikrokolorimetriás (ITC) méréseket egy MicroCal VP-ITC típusú kalorimétert alkalmazva végeztünk. A mérések során a különböző pH-jú (3,6, 4,0 és 4,5) HyA oldatokat ($1,4301\text{ cm}^3$ mintacella) titráltuk rendre 1,00, 1,40 és 1,875 mg/mL koncentrációjú Tr oldatokkal (egy 0,280 mL térfogatú fecskendőből) 10 μL /5 perc adagolási sebesség mellett. A műszer az adott mennyiségű fehérje beceppentésekor felszabaduló vagy elnyelődő hő mennyiségét méri időben (dQ/dt). Az így kapott csúcsok integrálását az Origin Microcal 7.1 szoftverrel segítségével végeztük el, így az 15. ábrán látható entalpogramokat megkapva. Minden esetben 2–2 mérést végeztem.

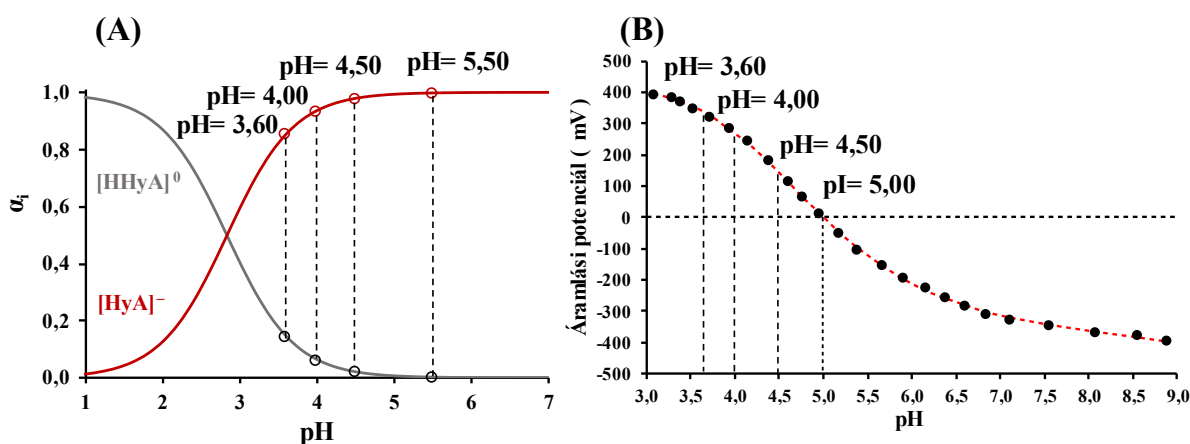
5.9. *Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)*

A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képek Turcsányi Árpád PhD hallgató segítségével készültek egy FEI Tecnai G2 20 X-Twin típusú TEM készülékkel 200 kV gyorsítófeszültségen. A mintákat előzetesen egy órán át dializáltuk, hogy megtisztítsuk a pufferek nagy részétől és így pufferközegű diszperzióként vittük fel egy TEM felvételek készítésére alkalmas réz gridre, majd az oldószert elpárologtattuk. Az átlagos átmérő értékeket 50–60 darab részecske méretének átlagaként határoztuk meg az *ImageJ* szoftver segítségével.

6. Kísérleti eredmények és értékelésük

6.1. A HyA és Tr közötti kölcsönhatás vizsgálata

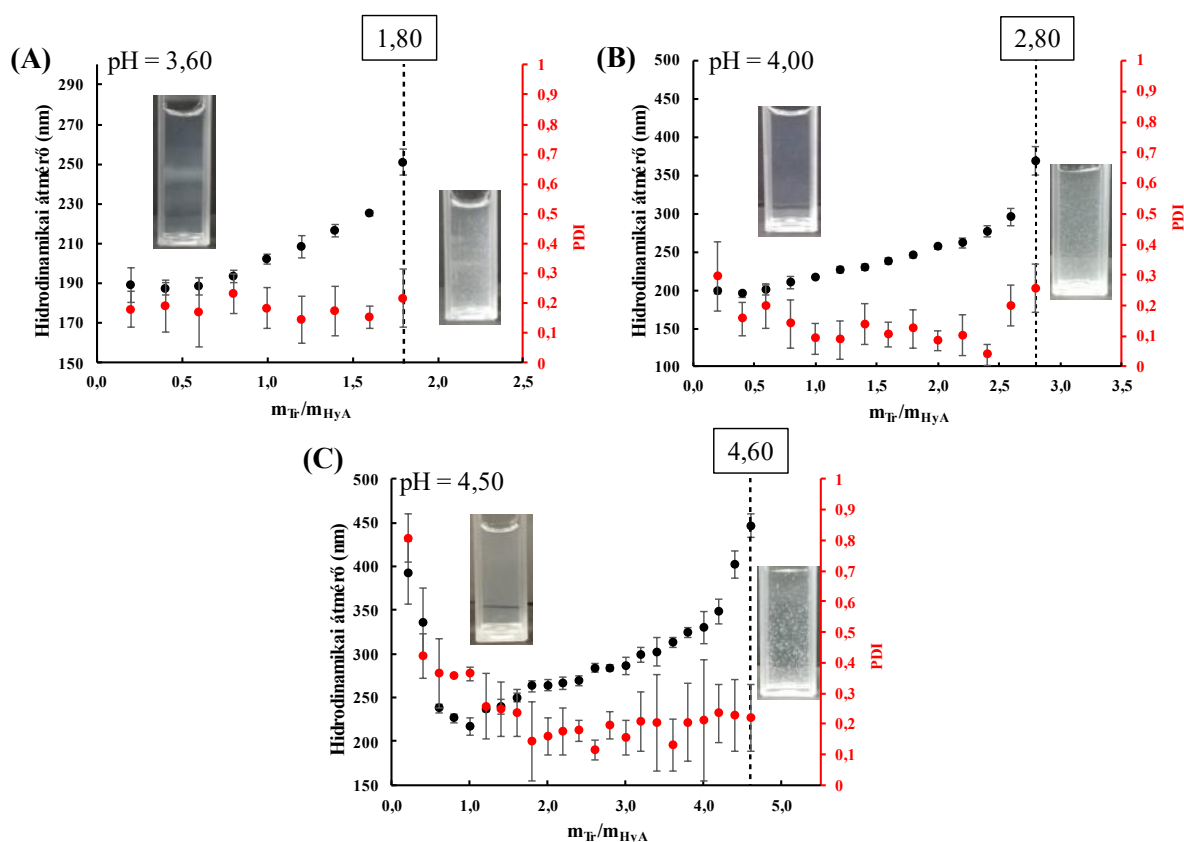
Egy hatóanyaghordozó rendszer fejlesztésénél nagy hangsúlyt kell fektetni a felépítő komponensek közötti kölcsönhatás feltérképezésére. Ismerve az általunk használt makromolekulák tulajdonságait és az irodalmi előzményeket, okkal feltételezhetjük, hogy a transferrin és a hialuronsav között legfőképp elektrosztatikus kölcsönhatás érvényesül. Ezért első lépésként meg kellett vizsgálnunk, hogy a pH változásával hogyan változik a makromolekulák, illetve a belőlük kialakuló részecskék töltése. Ehhez szükséges ismerni a polimer koncentrációeloszlás görbáját, mely a **9.A. ábrán** látható és a savi disszociációs állandóját, amelyet az irodalomban előzményekben már meghatároztak ($pK_a \approx 2,9$) [32]. Ebből kiderül, hogy az általunk vizsgált pH értékeken ($pH = 3,60; 4,00; 4,50$) a HyA többségben a deprotonált, negatív töltésű formájában van jelen ($[HyA]^-$). Tudnunk kell ezen kívül a transferrin pH függő sajátságairól is. Ennek megismerésére áramlási potenciál mérésen alapuló részecske felületi töltés titrálást végeztünk, mely a **9.B. ábrán** látható görbét eredményezte. A kísérlet során 0,001 M koncentrációjú sósavval állítottuk a pH-t a kezdeti értékre és 0,05 M koncentrációjú NaOH-al 20 μL /lépés adagolással titráltuk a Tr-tartalmú oldatot és minden pontban leolvastuk a pH és áramlási potenciál értékeket. Ebből megkaptuk a transferrin izoelektromos pontját, amely $pH = 5,00$ értéknek adódott. Tehát $pH = 5,00$ alatt – a későbbiekben általunk is használt értékeknél – bruttó pozitív (amelyet a pozitív áramlási potenciál értékek jeleznek), felette pedig bruttó negatív töltéssel rendelkezik, továbbá az is megfigyelhető, hogy a pH növelésével ezen pozitív töltés nagysága számottevően csökken, amely a makromolekulák között kialakuló kölcsönhatás jellegét jelentősen befolyásolhatja.



9. ábra: (A) A HyA protonált és deprotonált formájának koncentrációeloszlás görbéje a pH függvényében ($c_{HyA} = 0,04$ mg/mL). (B) A transferrin áramlási potenciál értékeinek változása a pH függvényében ($c_{Tr} = 0,3$ mg/mL).

6.2. Makromolekulák aránya és a pH hatása a kolloid részecskékre

Miután a részecskéket felépítő makromolekulák pH-függő tulajdonságait meghatároztuk és megállapítottuk, hogy a töltésviszonyokat tekintve van lehetőség elektrosztatikus kölcsönhatás kialakulására, feltételezhetjük a kolloid részecskék képződését is a rendszerben. A következőkben DLS méréseket végeztünk (**10. ábra**), hogy lássuk hogyan hatnak a különböző makromolekula tömegarányok a kialakuló szerkezetek méretére. Az egyes tömegarányoknál mért hidrodinamikai átmérő értékeket adott pH beállítása esetén a **10. ábra** foglalja össze. pH = 3,60; 4,00 és 4,50 értékeken 5,0 mL 0,05 mg/mL koncentrációjú HyA oldatot titráltunk 5,0 mg/mL-es Tr oldattal, 10 μ L-es lépésekben.

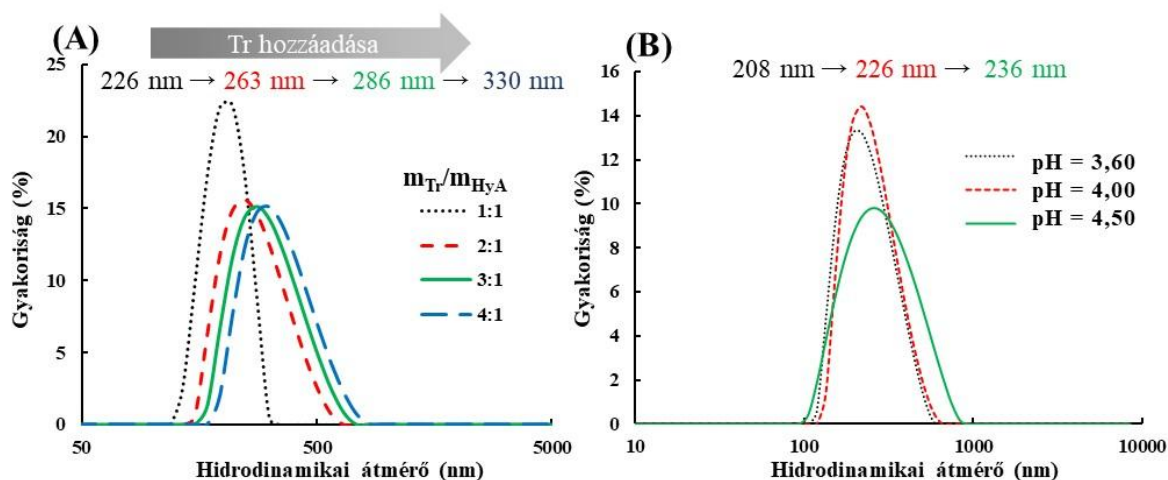


10. ábra: A makromolekulák egymáshoz viszonyított arányának, valamint a pH hatásának a részecskeméretre és a polidiszperzitási indexre (PDI) gyakorolt hatása (A) pH= 3,6, (B) pH= 4,0 és (C) pH= 4,5 értékeken. (c_{HyA} = 0,05 mg/mL, V_{HyA} titrálandó = 5,0 mL, c_{Tr} = 5 mg/mL, adagolás: 10 μ L/lépés).

Ahogy ránézünk a **10. ábrára**, elsőre azt láthatjuk, hogy a hidrodinamikai átmérő változása az (A) és (B) esetben hasonló görbét ír le, a részecskék mérete egyenletesen növekszik, viszont az aggregáció az (A) ábrán egy egész tömegarány egységgel kisebb értéken detektálható. Ez összhangban van az előző pontban megismert paraméterekkel, vagyis alacsonyabb pH-n a HyA

még nem teljes mértékben deprotonált formában van jelen, valamint a fehérje is jelentősen több pozitív töltéssel rendelkezik, ezért már kevesebb Tr hatására is aggregálni fog a rendszer. Az alacsonynak tekinthető PDI értékek ezekben az esetekben drasztikusan nem változnak a vizsgált tartományon.

A **10. C. ábra** azonban abban különbözik az első kettőtől, hogy a hidrodinamikai átmérő értékek első szakaszában kiugró pontokat, nagy részecskeméretet mértünk. Ez azért fordulhat elő, mert a titrálás kezdetén még nem alakultak ki a részecskék vagy ha voltak is már a rendszerben, nem olyan mennyiségben, hogy ezt a műszer megfelelő pontossággal mérni tudta volna. A PDI értékek is nagyobbak ezekben az esetekben, tehát a rendszerünk polidiszperzebb, mint a titrálás későbbi fázisaiban, tehát jóval több különböző méretű részecskéket mért a műszer, ez is alátámasztja a kapott értékek pontatlanságát az első titrálási lépésekben. A folyamat előrehaladtával Tr/HyA 1:1-es tömegaránytól kezdve a hidrodinamikai átmérő mérete közel azonos az alacsonyabb pH-n kapott értékekhez. A PDI is lecsökken és $\sim 0,2$ körül stabilizálódik. Az aggregáció Tr/HyA = 4,60-os tömegarálynál történik, mivel ezen értéknél van már jelen annyi Tr, amely képes a kialakult részecskéket destabilizálni.

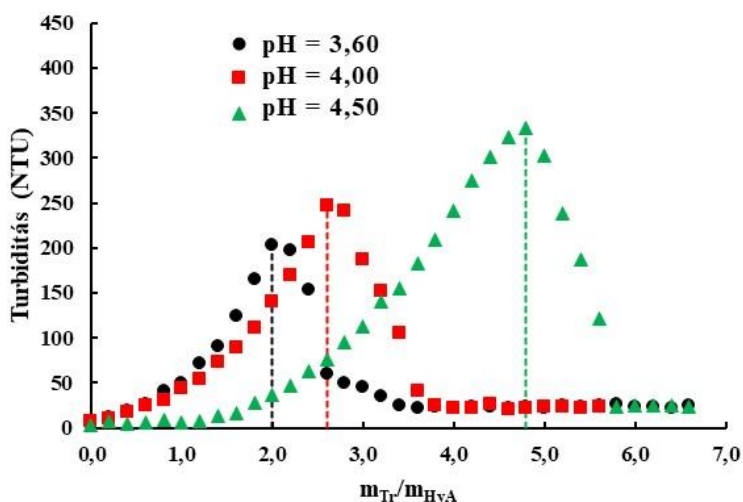


11. ábra: (A) A transferrin adagolásával kapott Tr/HyA részecskék hidrodinamikai átmérői és differenciális méreteloszlás függvényük pH = 4,50 értéken, különböző Tr/HyA tömegarányok esetében ($c_{HyA} = 0,05$ mg/mL, V_{HyA} titrálendő = 5 mL, $c_{Tr} = 5$ mg/mL, adagolás: 10 μ L/lépés). (B) A különböző pH értékeken előállított Tr/HyA részecskék differenciális méreteloszlás függvénye ($m_{Tr}/m_{HyA} = 1,2$).

Amennyiben egy adott pH-n előállított részecskék méretét figyeljük meg különböző tömegarálynál (**11. A ábra**, szórt fény alapú gyakoriság), láthatjuk, hogy növekvő Tr mennyiséggel a részecskeméret is egyre nagyobbak. Az azonos mennyiségű makromolekulák esetében 1:1-es aránynál alakulnak ki szembetűnően a legkisebb részecskék és a csúcsok

szélessége alapján ez a közeg szolgáltatja a legkevésbé polidiszperz méreteloszlást is. Ha adott makromolekula arányánál a különböző pH-n előállított részecskék méretét vizsgáljuk (**11. B. ábra**), látható, hogy a pH növekedésével a részecskék hidrodinamikai átmérője is nő, valamint a legmagasabb pH-n vannak a legváltozatosabb méretű konjugátumok.

A DLS mérésekből kapott eredmények alátámasztására ugyanolyan koncentráció körülmények között turbidimetriás vizsgálatokat is végeztünk, melyből kapott adatok a **12. ábrán** láthatóak. A kezdetben növekvő zavarosság a folyamatosan megjelenő részecskékre utal, majd minden esetben mérhető egy maximum pont, amely után csökken a turbiditás. Ennél a pontnál történik az aggregáció, amely után az összeállt nagyobb konjugátumok leülepedése miatt csökken a válaszjel. A kapott maximumok ($m_{Tr}/m_{HyA} = 2,0$, pH= 3,6; $m_{Tr}/m_{HyA} = 2,6$, pH= 4,0; $m_{Tr}/m_{HyA} = 4,8$, pH = 4,5) jó egyezést mutatnak a DLS által az aggregációs pontokban meghatározott makromolekula arányokkal.

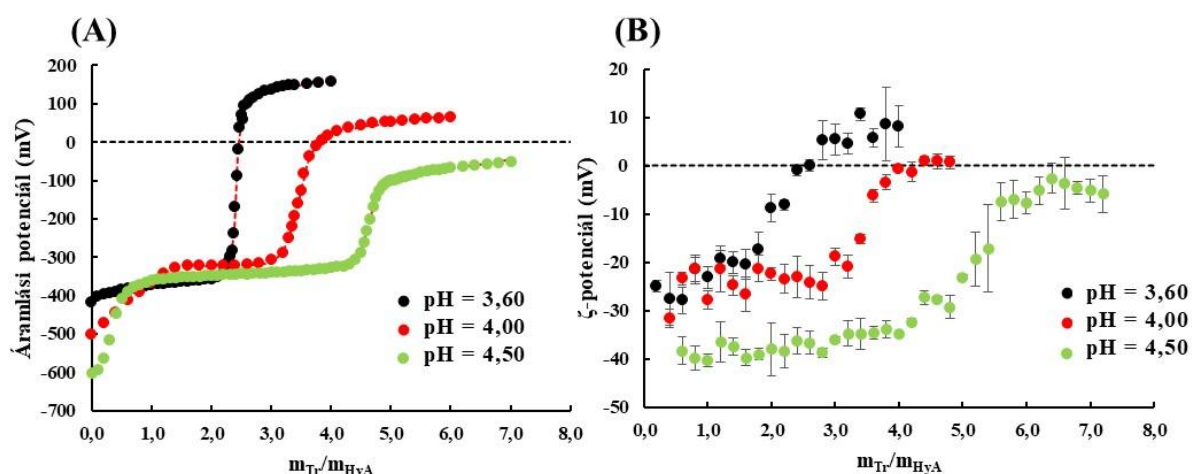


12. ábra: A minták turbiditás értékeinek változása a makromolekula arány függvényében, különböző pH értékeken ($c_{HyA} = 0,05$ mg/mL, $V_{HyA} = 5$ mL, $c_{Tr} = 5$ mg/mL).

Mivel nem áll rendelkezésünkre pontos adat arról, hogy adott pH értékeken a fehérje mennyi nettó pozitív töltéssel rendelkezik, ezért áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározására irányuló méréseket végeztünk a kvantitatív jellemzés érdekében. Ehhez az ecetsav-acetát pufferrel készített 0,05 mg/mL koncentrációjú HyA oldatból 10 mL-t 10 μ L/lépés adagolással titráltunk 5 mg/mL koncentrációjú Tr oldattal. Minden pontban rögzítettük az áramlási potenciál értékét, a kapott görbéket a **13. A. ábra** foglalja össze.

Kezdetben nagy negatív értékeket mértünk, amikor még csak HyA van a rendszerben. Ez jó egyezést mutat azzal a feltételezéssel, hogy a polimer a vizsgált pH tartományon mindig negatív töltéssel van jelen (**9. A. ábra**). Az is alátámasztja a feltételezésünket, hogy pH növekedésével

egyre negatívabb kiindulási pontot rögzítettünk, amit a polimer deprotonálódásával magyarázhatunk. A transzferrin adagolása közben – egy kezdeti gyors növekedést követően – lineáris növekedést tapasztalunk (~ -340 mV), majd a válaszjel hirtelen megugrását tapasztaljuk. Ilyenkor a transzferrin pozitív töltését a HyA már nem tudja kompenzálni és a rendszerben aggregáció lép fel. Az ezt követően hozzáadott transzferrin már feleslegben lesz és ez határozza meg a rendszer áramlási potenciáljának értékét. A pH = 4,50 esetben az áttöltés nem is tud megvalósulni, amely azzal magyarázható, hogy kezdetben a HyA nagy része már deprotonált állapotban van és a hozzáadott transzferrin pozitív töltése nem elég a rendszer teljes áttöltésére. Mivel nem minden pH érték esetében jól definiált a rendszer izoelektromos pontja ($U_{\text{áraml.}} = 0$), ezért a görbéket a módosított Boltzmann-egyenlettel illesztettük, és az így kapott inflexió pontok értékeit határoztuk meg, amelyek információval szolgálnak számunkra az aggregációról. Az így kapott értékekből ($m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}} = 2,41$, pH= 3,6; $m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}} = 3,46$, pH= 4,0; $m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}} = 4,63$, pH= 4,5).

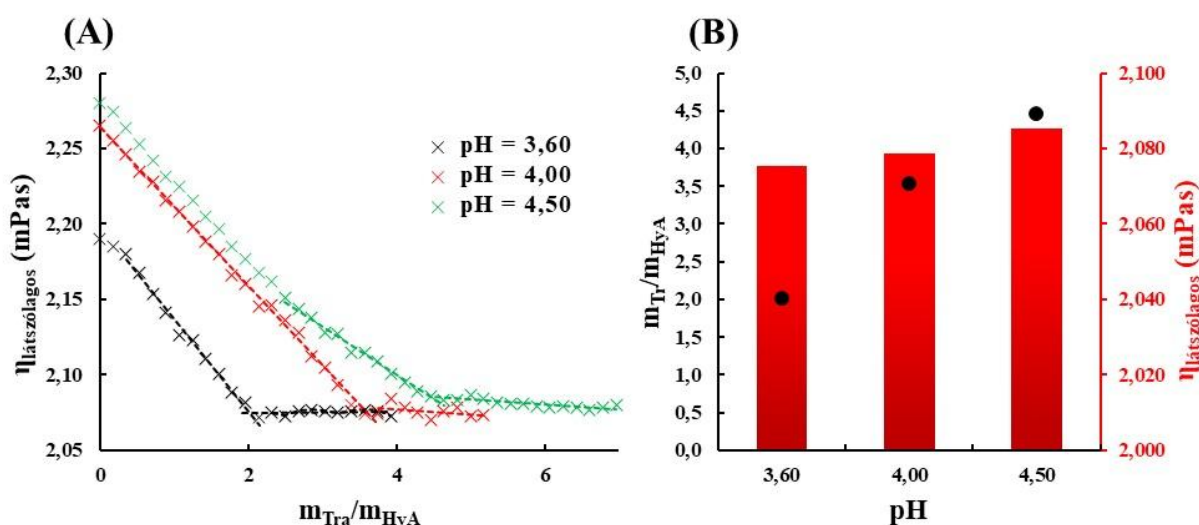


13. ábra: (A) A makromolekulák tömegarányának hatása az áramlási potenciálra, valamint (B) a makromolekulák tömegarányának hatása a zéta-potenciálra, különböző pH értékeken ($c_{\text{HyA}} = 0,05$ mg/mL, $V_{\text{HyA}} = 10$ mL, $c_{\text{Tr}} = 5$ mg/mL).

Ezen eredmények megerősítésére ugyanezen körülmények között a kialakuló részecskék ζ -potenciál értékeit is meghatároztuk (**13.B. ábra**). A kapott adatsorok nagymértékben párhuzamosak az áramlási potenciál érték változásával és hasonlóképp is magyarázhatók, valamint azt is megállapíthatjuk, hogy a pH növelésével egyre negatívabb ζ -potenciállal rendelkező, azaz kinetikailag egyre stabilabb kolloid adduktumok előállítása lehetséges.

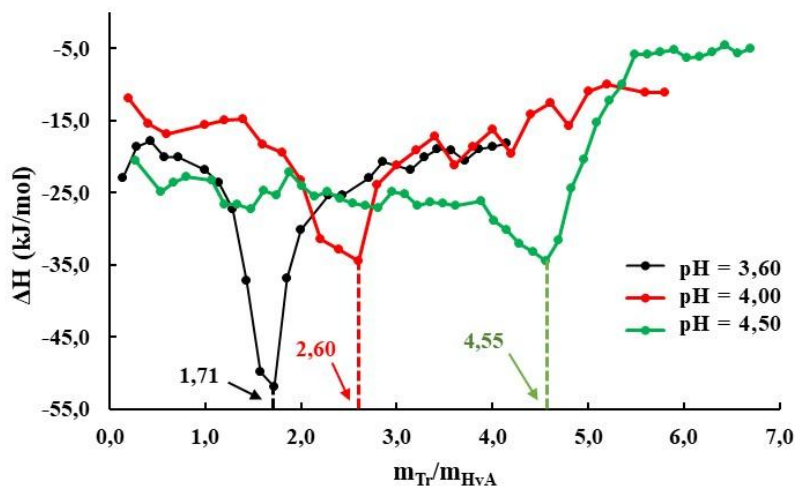
Folytatásként reológiai méréseket végeztünk, mivel egy HyA tartalmú rendszer viszkozitása a molsúly mellett függ az oldatban jelen lévő koncentrációjától is. A mérőcellában egy híg

polimeroldat volt, melyhez tömény Tr oldatot adagoltunk 25 μL -es lépésekben 90 másodpercenként, a kapott adatok a **14. A. ábrán** láthatók. A kiindulási pontban a HyA oldat viszkozitását mértük, majd ahogy adagoltuk hozzá a Tr-t, egyre csökkent a rendszer viszkozitása. Ez azzal magyarázható, hogy a polimer vizes közegű térhálós szerkezete gyengül, majd megszűnik. A töréspontig folyamatosan képződnek a részecskék, a töréspont után, mikor már nem változik jelentősen a viszkozitás, több részecske nem alakul ki, helyette aggregációs folyamatok mennek végbe. Az eltérő pH értékek esetén kapott töréspontoknál (**14. B. ábra**) az eddigiekben kapott tömegarányokhoz hasonló tendencia figyelhető meg. Nagyobb pH-n később aggregál a rendszer, mivel több pozitív fehérjét bír el a kezdetben nagy negatív töltésű HyA.



14. ábra: (A) A tömegarányok hatása a folyásgörbékre különböző pH értékeken, (B) az illesztésből számított látszólagos viszkozitás (oszlopok) és makromolekula tömegarányok (●) a töréspontokban ($c_{\text{HyA}} = 0,05 \text{ mg/mL}$, $V_{\text{HyA}} = 14 \text{ mL}$, $c_{\text{Tr}} = 5 \text{ mg/mL}$).

A makromolekulák közötti kölcsönhatás vizsgálatát izoterm titrációs kalorimetriás mérésekkel is vizsgáltuk, melyekből kapott entalpogramokat a **15. ábrán** foglaltunk össze. Látható, hogy a titrálás során végig negatív entalpia értékeket mértünk, tehát az egyes titrálási lépésekben a részecskék kialakulása exoterm folyamatok eredménye. A használt híg polielektrolit oldatok miatt, az egy-egy pontban rögzíthető hőeffektus kicsi volt, de a minimumok helye így is párhuzamosan követi az eddigi mérésekből kapott értékeket, valamint igen jó egyezést mutatnak a fényszórásméréssel megállapított aggregációs pontokkal.



15. ábra: A tömegarányok hatása az integrált ITC görbékre különböző pH értéken.

($c_{\text{HyA}} = 0,05 \text{ mg/mL}$, $V_{\text{HyA}} = 1,4301 \text{ mL}$, $c_{\text{Tr}} = 1,00; 1,40; 1,875 \text{ mg/mL}$ rendre 3,60; 4,00 és 4,50-es pH értékeken).

Az eddigi számos vizsgálati módszerrel kapott eredményeket az **2. táblázat** foglalja össze. A különböző pH értékeken kapott trend minden esetben megegyezik, az érzékelhető kisebb különbségeket az adja, hogy minden műszer esetében a koloid diszperzió más-más paramétere alapján kaptuk a karakterisztikus pontokat.

2. táblázat: Az általunk használt vizsgálati módszerekkel karakterisztikus pontjai ($m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}}$) különböző pH értékeken. (ITC – minimum, DLS – aggregáció, turbidimetria – maximum, áramlási potenciál – inflexiós pont, reológia – töréspont).

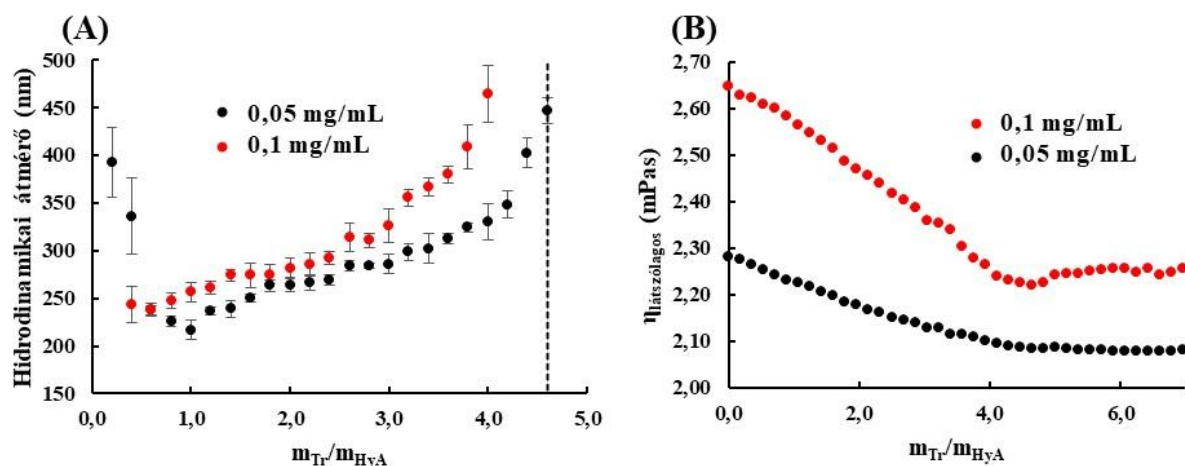
	pH= 3,60	pH= 4,00	pH= 4,50
ITC	1,71	2,60	4,55
DLS	1,80	2,80	4,60
Turbidimetria	2,00	2,60	4,80
Áramlási potenciál	2,41	3,46	4,63
Reológia	2,01	3,52	4,45

Az előzőekben bemutatott mérési módszereket figyelembe véve a további vizsgálatainkhoz a pH = 4,50 közeget választottuk, mivel több paraméter (hidrodinamikai átmérő – **10.C. ábra**, ζ -potenciál – **13.B. ábra**) is alátámasztja, hogy ezen a pH-n állíthatóak elő a legstabilabb részecskék. A makromolekulák arányát tekintve $m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}} = 2$ tömegarányt találtuk ideálisnak, mivel 4,50-es pH-n elég távol van az aggregációra kapott karakterisztikus pontoktól, illetve

ilyen arányban előállított kolloid diszperzióban elég részecske képződik, hogy a használt műszerekkel megfelelő pontossággal lehessen mérni a későbbiekben.

6.3. A polimer koncentrációjának hatása a kolloid diszperziók paramétereire

Miután kiválasztottuk a részecskék megfelelő előállításához szükséges paramétereket ($\text{pH} = 4,50$; $m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}} = 2:1$) megvizsgáltuk, van-e hatása a polimer kezdeti koncentrációjának a kialakuló konjugátumok tulajdonságaira. Megmértük a részecskék hidrodinamikai átmérőjét (**16. A. ábra**), melyből kiderült, hogy magasabb kezdeti HyA koncentráció esetén minden tömegaránynál nagyobb részecskék alakulnak ki ($m_{\text{Tr}}/m_{\text{HyA}} = 2$ tömegarány esetében 263 nm 0,05 mg/ml és 281 nm 0,1 mg/ml polimerkoncentrációknál), a két görbe lefutása azonban megegyezik. Számunkra hatóanyag hordozó rendszer kialakításánál a kisebb részecskeméret, ezáltal a hígabb polimer oldat a kedvezőbb.



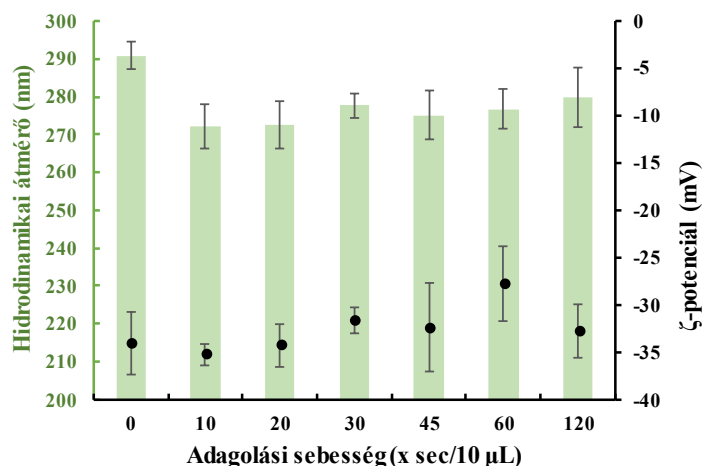
16. ábra: (A) A részecskeméret és (B) látszólagos viszkozitás makromolekula arány függése különböző HyA koncentrációk esetén ($c_{\text{Tr}} = 5 \text{ mg/mL}$, $\text{pH} = 4,50$).

A viszkozitás értékeket a **16. B. ábrán** láthatjuk. Itt nagyobb eltérést tapasztalhatunk a két polimer koncentráció között. A töményebb HyA oldat kiindulási látszólagos viszkozitás értéke jóval magasabb, amely a polimer térhálós szerkezetével magyarázható. A két rendszer közötti további különbség, hogy a fényszórásméréssel meghatározott aggregációs pont, valamint a viszkozitásgörbe töréspontja kis mértékben az alacsonyabb tömegarányok irányába tolódik el a polimer koncentrációjának növelésével (rendre $4,60 \rightarrow 4,00$ és $4,45 \rightarrow 4,28$). A 0,05 mg/mL-es koncentrációjú HyA oldattal készült diszperziók viszkozitása egyenletesen lefutó, alacsonyabb, vízhez közelebbi értéket vesz fel, amely egy gyógyszerhatóanyag hordozó rendszer esetén kedvezőbb. A viszkozitás és hidrodinamikai átmérő értékek alapján a 0,05 mg/mL-es koncentrációjú polimer oldatot érdemes a további méréseknél is használni.

6.4. Kísérleti körülmények hatása a kolloid diszperziók sajátosságaira

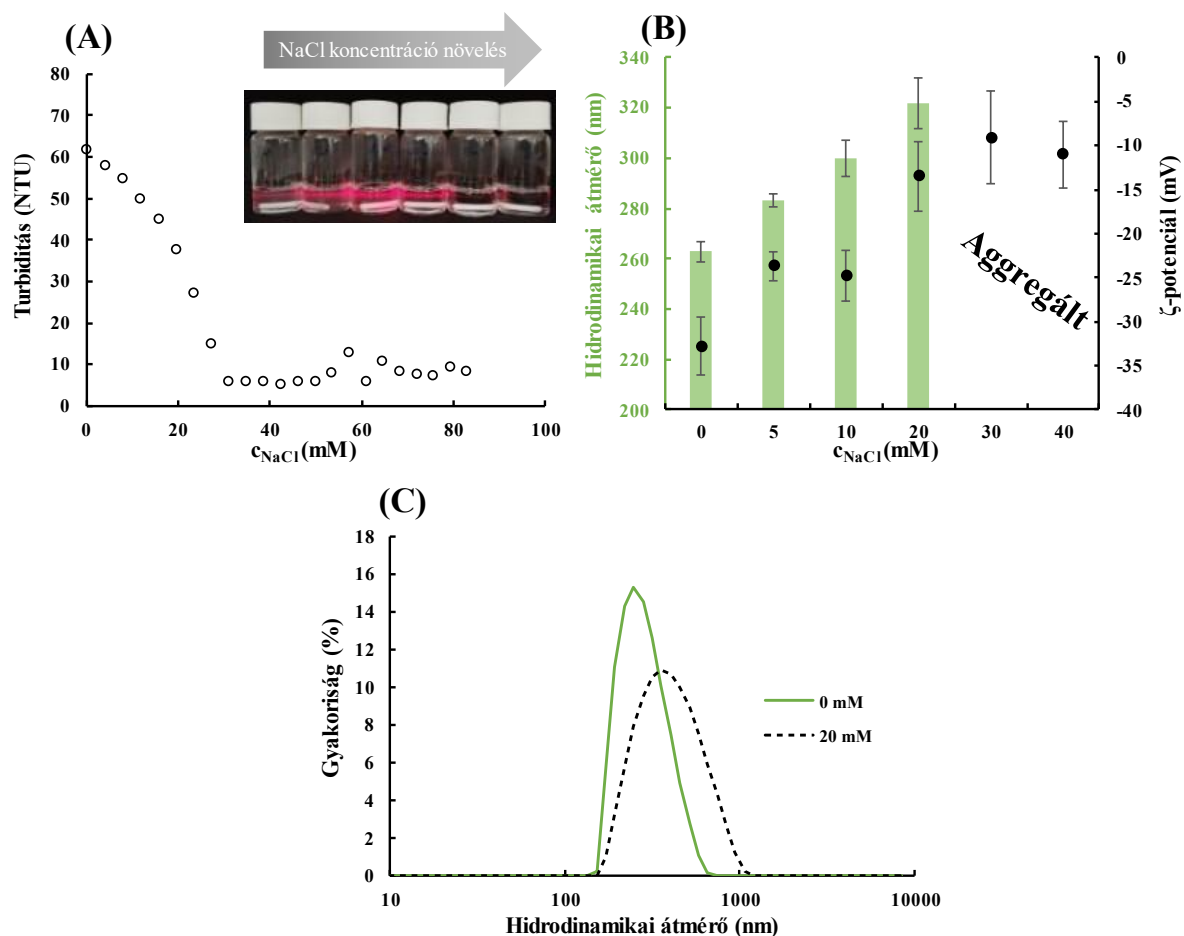
A következő vizsgálatok azokra a paraméterekre vonatkoznak, melyeket egyszerűen változtatva lehetőségünk van hangolni a keletkező részecskék meghatározó tulajdonságait. Ezeket a méréseket már csak $\text{pH} = 4,50$ ecetsav-acetát pufferben Tr/HyA 2:1 tömegarány mellett végeztük.

A Kutatócsoport munkatársainak korábbi tapasztalatai alapján [5] várható, hogy a részecskeméretet jelentősen befolyásolhatja a Tr oldat adagolási sebessége a polimerhez. Ezért különböző adagolási időkkel készítettük el a kolloid diszperziókat és mértük a keletkező konjugátumok hidrodinamikai átmérőit és zéta-potenciál értékeit (**17. ábra**). Az eredményekből azt a következtetést tudtuk levonni, hogy csak a fehérje térfogat egyben történő hozzáadásával keletkeznek nagyobb méretű részecskék. Ha a szükséges térfogatot $10 \mu\text{L}/\text{lépesben}$ adjuk a polimerhez, az adagolások közötti időtartam növelése nem okoz nagy változást sem átmérőben sem pedig zéta-potenciál értékben. Ezek miatt a $20 \text{ s}/10 \mu\text{L}$ adagolási sebességet választottuk, mivel az adott kísérleti elrendezésünkben könnyebben kivitelezhető, mint a $10 \text{ s}/10 \mu\text{L}$, viszont a keletkező részecskék tulajdonságai nem különböznek számottevően.



17. ábra: Az adagolási sebesség ($10 \mu\text{L}/\text{lépes}$) hatása a részecskeméretre és a zéta-potenciálra ($c_{\text{HyA}} = 0,05 \text{ mg/mL}$; $V_{\text{HyA}} = 5 \text{ mL}$; $c_{\text{Tr}} = 5 \text{ mg/mL}$; $V_{\text{Tr, összes}} = 100 \mu\text{L}$).

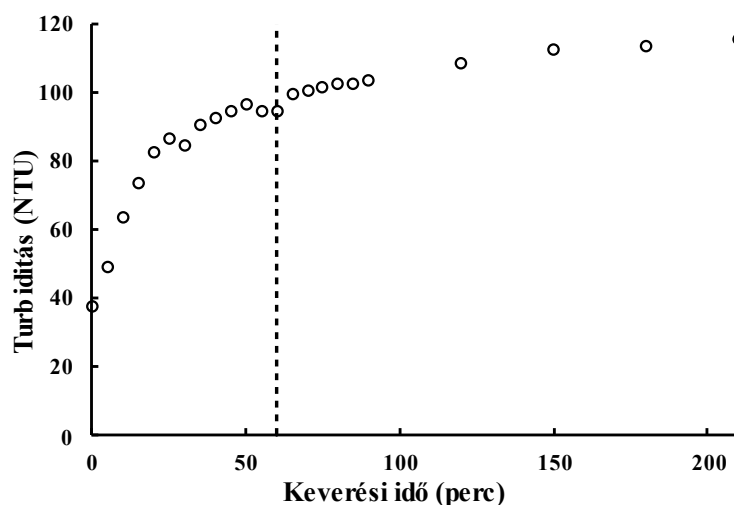
Mivel rendszerünkben főleg elektrosztatikus kölcsönhatást feltételezünk, mindenképp szükséges volt tanulmányoznunk inert só hozzáadásának hatását a keletkező diszperzióra. Ennek vizsgálatára az elkészített részecskediszperziókhoz különböző mennyiségű tömény NaCl oldatot adagoltunk és követtük a rendszer tulajdonságainak változását, ahogyan azt a **18. ábra** mutatja.



18. ábra: (A) A hozzáadott NaCl hatása a diszperzió turbiditására, (B) hidrodinamikai átmérőjére és ζ -potenciáljára, valamint (C) a méreteloszlásra (c_{HyA} , titrálendő = 0,05 mg/mL; V_{HyA} titrálendő = 5 mL; C_{Tr} = 5 mg/mL; $V_{\text{Tr, össz}}$ = 100 μ L).

A kísérletek során növekvő mennyiségű (0,00 – 0,08 M) nátrium-klorid jelenléte mellett mértük a diszperzió turbiditását, hidrodinamikai átmérőjét és zéta-potenciál értékeit. A DLVO–elmélet szerint egy inert só megjelenése a rendszerben, képes lecsökkenteni az azonos töltésű részecskék közötti elektrosztatikus taszítást, olyan módon, hogy a konjugátumokhoz képest ellentétes töltésű ionok leárnýékolják azok töltését. Ennek következtében a van der Waals kölcsönhatások kerülnek előtérbe, így eleinte egyre növekvő átmérőjű részecskék keletkeznek, majd a rendszer teljesen aggregálni fog. Ez látható a **18. B. ábrán**, hiszen a folyamatosan növekvő ζ -potenciál értékek egyre kevésbé stabil rendszerre utalnak, valamint a részecskeméret is jelentős mértékben megnő az inert só megjelenésével. Ugyanez a trend megfigyelhető a **18. C. ábrán** is, hiszen a bemutatott méreteloszlás görbe a só hatására ellaposodik és kiszélesedik, ez is igazolja a különböző méretű összekapcsolódott részecskék jelenlétét. Az aggregációs pont a zavarosság mérés során is jól látható (**18. A. ábra**) és egybeesik a DLS által kapott

koncentráció értékkel, mindkét esetben 30 mM NaCl hatására teljesen destabilizálódik a diszperzió.



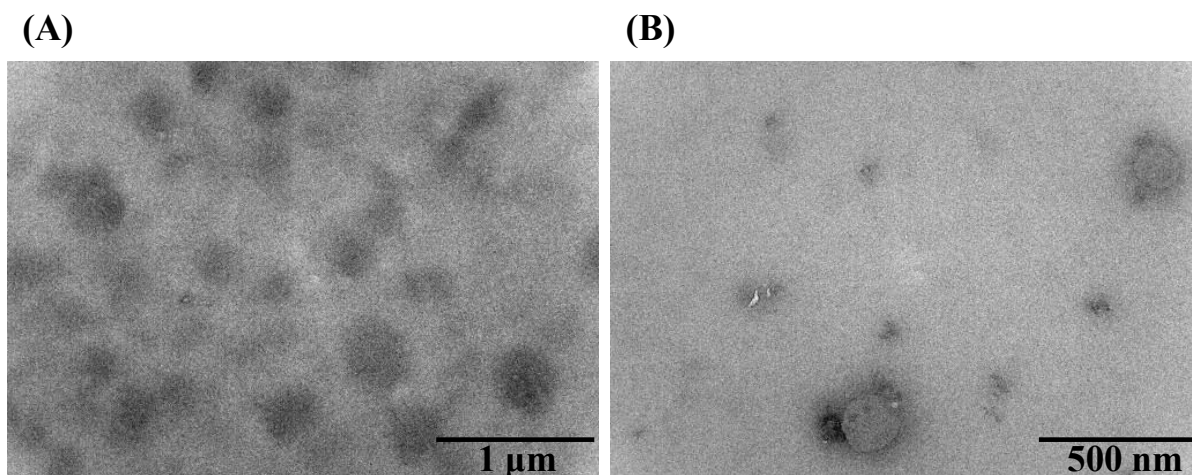
19. ábra: A keverési idő hatása a turbiditásra.

Az előzetes mérésekhez szükséges részecskék összeállításánál szembevető volt a rendszer zavarosságának változása adott kevertetési idő után. Az optimális keverési idő meghatározásához turbidimetriás méréseket végeztünk a frissen elkészített részecske diszperzióra. Megfigyelhető a **19. ábrán**, hogy a kiindulási pontban, amikor az összes fehérjét hozzáadtuk a polimerhez, a zavarosság 40 NTU értéket vett fel. Ez idő elteltével, kevertetés mellett nagy mértékben megváltozott. Nagyjából 1 óra után elérte a 100 NTU értéket, ami után a növekedés lelassult, mivel 200 perc elteltével is még csak 120 NTU turbiditáértéket mértünk. Mindez a részecskék kialakulásának sebességével magyarázható, hiszen ezen asszociátumok kialakulása – ahogyan azt a mérési eredmények is bizonyítják - nem pillanatszerű. Így ezen mérés alapján megállapítottuk, hogy a további részecskediszperziók kialakításánál 1 órás keverési idővel szükséges dolgozni.

6.5. A $Tr/HyA = 2$ tömegaránynál előállított részecskék karakterizálása

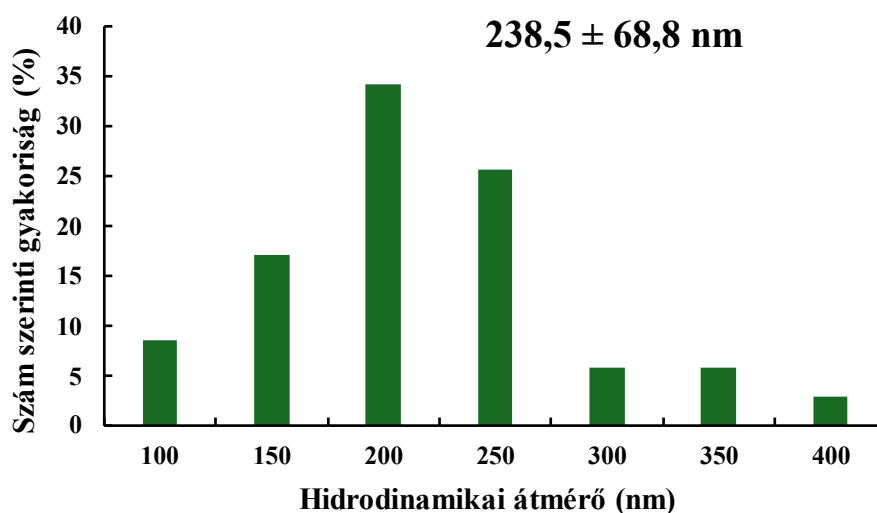
Az eddigi paraméterfüggési vizsgálatok eredményeinek birtokában meghatároztunk egy optimalizált előállítási protokollt a részecskékre, mely a 4.2. fejezetben olvasható. Ez alapján állítottuk elő a következőkben használt mintákat is. A részecskék méretének, méreteloszlásának és morfológiájának meghatározására transzmissziós elektronmikroszkópos képeket készítettünk. Elsőként a részecskepreparálás után túl sok puffert tartalmazott az elegyünk, így nem tudtunk jó felvételeket készíteni. Ezért a kész részecske diszperziót dializáltuk MQ vízben, konduktometriás módszerrel követve a közeg fajlagos vezetőképességét, mely nagyjából 1 óra

után konstans értéket vett fel. A dializált diszperzióban lévő részecskék hidrodinamikai átmérőjét fényszórásméréssel ellenőriztük és nem tapasztaltunk változást a dialízis előtti mérethez képest. Az így kapott minta kis mennyiségét cseppentettük fel egy TEM gridre és így már jobb minőségű felvételeket tudtunk rögzíteni.



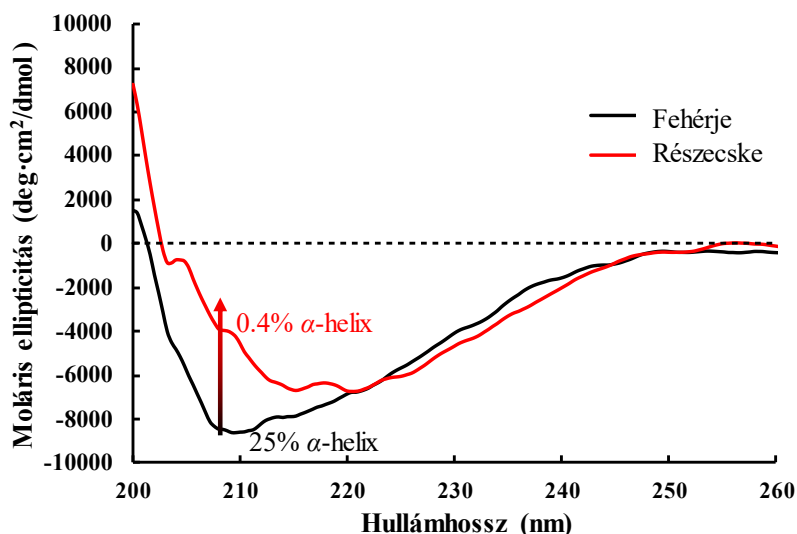
20. ábra: Az optimális körülmények között előállított Tr/HyA kolloid részecskék transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei.

A **20. A** és **B** ábra alapján elmondhatjuk, hogy a részecskéink többségben gömb alakot vesznek fel. A **20. B** ábrán látható, hogy a gömb alakú részecskéket különféle polimerláncokhoz hasonló hosszabb konjugátumok is körülvehetik. A kapott méreteloszlás diagram (**21. ábra**) alapján látható, hogy a meghatározott részecskék nagysága jó egyezést mutat a DLS alapján mért értékekkel és a méretskála szerint átlagosan $238,5 \pm 68,8$ nm méretű részecskéket állítottunk elő.



21. ábra: Az optimális körülmények között előállított Tr/HyA kolloid részecskék transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei alapján kapott méreteloszlás diagramja.

A további kölcsönhatások jelenlétének meghatározása céljából CD spektroszkópai méréseket végeztünk, mind a fehérje, mind pedig a kialakult részecskék esetében, pH = 4,50 közegben (22. ábra).



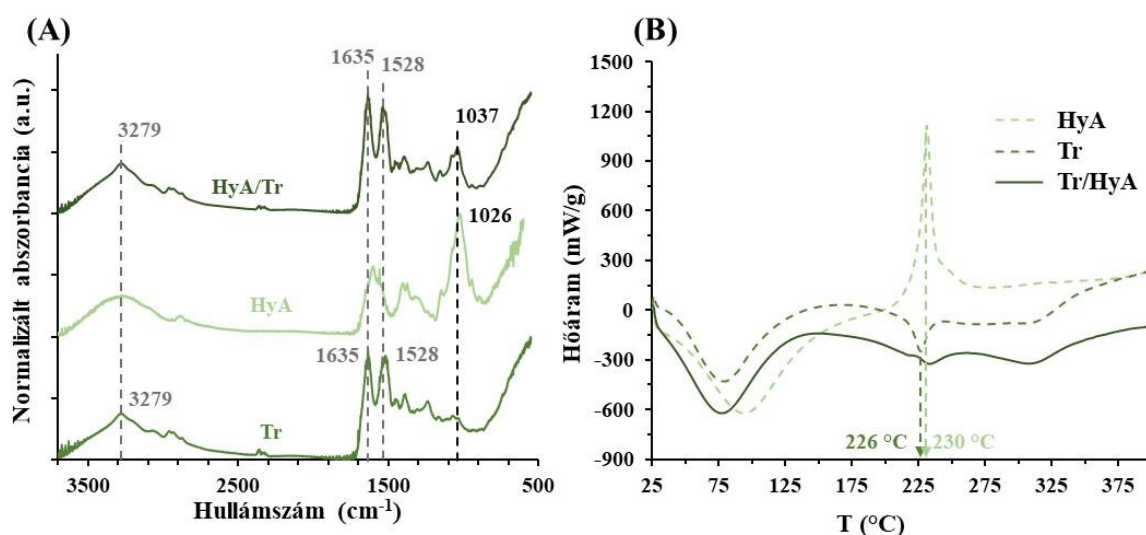
22. ábra: A fehérjét és a fehérje-polimer konjugátumokat tartalmazó minták CD spektrumai pH = 4,50-n ($c_{Tr}=0,02$ mg/mL; $m_{Tr}/m_{HyA} = 2$; $c_{HyA} = 0,01$ mg/mL).

A spektrumok regisztrálását követően lehetőségünk nyílt azok Reed- és Yang modellel történő illesztésére, amelynek segítségével a fehérje másodlagos szerkezetének változását követhetjük nyomon. Az így kapott szerkezeti elemek százalékos megoszlását a 3. táblázat hasonlítja össze mindkét modell esetében. A fehérjére kapott görbére a Yang-modell jobb illesztést ad, míg a részecskékre a Reed-modell volt pontosabb, amit az illesztés hibáinak (RMS) értékei mutatnak. A kapott eredmények rámutatnak arra, hogy a szabad fehérje 25%-os α -hélix tartalma a polimerrel való kölcsönhatás következtében 0,4%-ra csökkent. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a makromolekulák nem fizikai keverékként vannak jelen a rendszerben, hanem jelentős kölcsönhatás alakul ki közöttük. Mivel ilyen nagy mértékben változott a fehérje másodlagos szerkezete, feltételezzük, hogy az elektrosztatikus kölcsönhatások mellett hidrofób interakciók is jelen vannak a molekulák között. A különbség a fehérje és a részecske α -hélix értékei között abból eredhet, hogy a rendszerben jelen levő HyA térhálós szerkezete nem engedi olyan mértékben kitekeredni a fehérjeláncokat, ahogyan az szabad szolvatált formájában lehetséges.

3. táblázat: A Tr másodlagos szerkezeti elemeinek százalékos megoszlása a HyA távollétében és jelenlétében az illesztés jóságával (RMS).

	Tr		HyA-Tr	
	Yang	Reed	Yang	Reed
α -hélix	25	10,6	31,8	0,4
β -redő	20,7	47,5	0	66,3
Turn	23,6	4,2	40,6	0
Random	30,6	37,7	27,6	33,3
RMS	8,082	10,812	34,436	22,301

Következőleg kvalitatív IR és termoanalitikai méréseket (DSC) hajtottunk végre. Mindkét esetben vizsgáltuk mind a részecskéket, illetve az azokat felépítő makromolekulákat is. A **23. A. ábrán** a fehérje FT-IR görbéjén 1635 és 1528 cm^{-1} -nél a vártak megfelelően azonosíthatóak az amidcsoportok abszorpciós csúcsai. Ez változatlanul a részecske spektrumán is megjelenik. A polimer esetében 1026 cm^{-1} -nél a C=O kötés rezgési sávját láthatjuk, amely a részecske spektrumán kis mértékben eltolódott, amelyből feltételezhetjük kölcsönhatás jelenlétét a két makromolekula között.



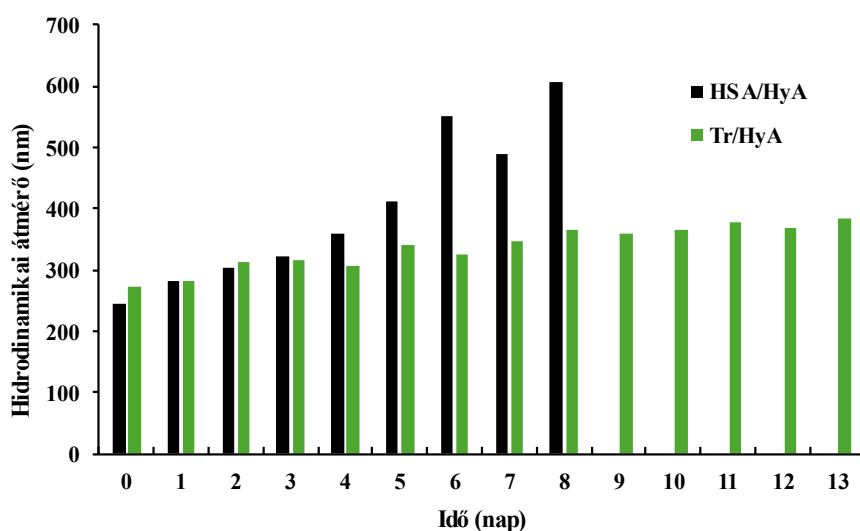
23. ábra: A HyA (—), a Tr (—) és a 2:1 Tr:HyA (—) tömegaránynál szintetizált konjugátumok (A) IR-spektrumai és (B) DSC görbéi.

A regisztrált DSC görbéket a **23. B. ábra** szemlélteti. A szabad HyA-ra jellemző éles exoterm csúcs 230 $^{\circ}\text{C}$ -nál a részecske spektrumán szinte teljes mértékben eltűnik, ugyanúgy mint, a

fehérjére kapott minimum 226 °C körül. A DSC mérésekből összességében láthatjuk, hogy a vizsgált minta a Tr és HyA keveréke, ám közöttük egyértelmű kölcsönhatás jelei nem mutatkoznak.

A **23. A. és B. ábrán** a részecskére kapott görbékről azt tudjuk megállapítani, hogy a vártnak megfelelően, a keverék összetételét tekintve nagyrészt fehérjéből áll, mivel a Tr csúcsai látszódnak nagyobb mértékben mindkét esetben.

A Tr/HyA részecskék karakterizálásának utolsó lépéseként a kialakuló kolloid diszperzió hidrodinamikai átmérőjét több napon keresztül mértük, ezzel vizsgálva a rendszer kinetikai stabilitását. Az eredményeket összehasonlítottuk a kísérleti munka egyik előzménye alapján előállított HSA/HyA hatóanyag szállító részecskék stabilitásával. A kapott értékeket a **24. ábra** ismerteti. Látható, hogy mindkét rendszer az első 3 napon közel azonos mérettel rendelkezik, majd a 4. naptól kezdve a HSA/HyA részecskék nagyobb mértékű növekedése indul meg és a 8. napon már 600 nm feletti aggregátumok képződését tapasztaljuk. Ezzel szemben a Tr/HyA részecskék esetében egyenletes, kismértékű méretnövekedést tapasztalunk és az összeállítástól számított, majdnem két hét elteltével is 400 nm-nél kisebb hidrodinamikai átmérőjű részecskék vannak jelen a rendszerben.



24. ábra: Tr/HyA és HSA/HyA részecskék méretváltozása az idő múlásával.

($c_{\text{HyA, titrálandó}} = 0,05 \text{ mg/mL}$; $V_{\text{HyA titrálandó}} = 5 \text{ mL}$; $c_{\text{Tr}} = 5 \text{ mg/mL}$; $V_{\text{Tr, össz}} = 100 \text{ }\mu\text{L}$,
 $c_{\text{HSA}} = 5 \text{ mg/mL}$; $V_{\text{HSA, össz}} = 100 \text{ }\mu\text{L}$).

A DLS mérések rávilágítottak arra, hogy a fehérje cseréje HSA-ról Tr-re, több nappal hosszabbítja, ezáltal javítja a kialakuló részecskék stabilitását, ami egy optimalizált hatóanyag hordozó estében a legfőbb paraméterek egyike.

7. Összefoglalás

Tudományos Diákköri munkám során ígéretes kutatócsoporti eredményekre alapozva egy poliszacharidból és egy fehérjéből álló, döntően a makromolekulák önszerveződése révén kialakítható kolloid részecskék főbb sajátságait vizsgáltunk.

Első lépésben meghatároztuk a biomakromolekulák töltésviszonyait, változó pH értékeknél. Megállapítottuk, hogy a HyA $pK_a \approx 2,90$ érték felett főként deprotonált formában van jelen a közegben, a transzferrin izoelektromos pontja $pH = 5,00$, amely alatt bruttó töltése pozitív, felette meghatározóan negatív. Az ellentétes töltések kialakítása végett ecetsav-acetát pufferes közegekben dolgoztunk, melyek pH értékei rendre 3,60; 4,00 és 4,50 volt. Vizsgáltuk, hogy a makromolekulák tömegarányának és a pH változtatásának milyen hatása van a kolloid diszperzió sajátságaira. Ehhez DLS, ζ -potenciál, reológia, turbiditás, áramlási potenciál és ITC méréseket hajtottunk végre, a 3 fent említett pH értéken, változó makromolekula tömegarány mellett. Minden mérési módszerrel ugyanazt a trendet sikerült megállapítani, miszerint a legstabilabb részecskék ($d_h \approx 270$ nm; ζ -pot. ≈ -40 mV), ezáltal kolloid diszperzió a $pH = 4,50$ -es közegben képződik. A regisztrált mérési eredmények alapján kidolgoztunk egy optimális részecske előállítási és tisztítási protokollt, melyben a makromolekulák Tr/HyA 2:1 tömegarányal vannak jelen $pH = 4,50$ közegben.

Ezt követően vizsgáltuk kétféle kezdeti HyA koncentráció (0,05; 0,1 mg/mL) mellett kialakuló részecskék méretét, méreteloszlását és szerkezetét, melyből igazolást nyert, hogy a növekvő HyA koncentráció a viszkozitásgörbék töréspontját a kisebb Tr/HyA tömegarányok felé tolja és ugyanez tapasztalható a fényszórás mérések által meghatározott aggregációs pontok esetében is. Ez hidrofób kölcsönhatás jelenlétére is utalhat, ezért CD spektroszkópiai méréseket is végeztünk a szabad fehérjére, illetve a fehérje-polimer konjugátumra. Megállapítottuk, hogy a HyA jelenléte lecsökkenti a fehérje másodlagos szerkezetében az α -hélix tartalmat $\sim 25\%$ -ról $\sim 0,4\%$ -ra, ebből is láthattuk, hogy a két molekula között valóban alakul ki kölcsönhatás és nem fizikai keverékük azonosítható.

A következő lépésben számos kísérleti körülmény optimalizálást hajtottunk végre. Meghatároztuk az ideális adagolási sebességet (20 s/10 μ L), az ionerősséget ($I = 15$ mM) és a megfelelő keverési időtartamot (1 óra).

A kialakított részecskék részletes karakterizálását is elvégeztük. TEM felvételekkel megerősítettük a DLS-el kapott részecskeméreteket és IR spektroszkópiai mérésekből igazoltuk a makromolekulák közötti kölcsönhatás jelenlétét. Emellett a DSC görbékből kiderült, hogy a konjugátum túlnyomórészt fehérjét tartalmaz, de a biomakromolekulák pontos arányát a

formulációban nem sikerült kvantitatív módon meghatározni. A képződő összetett kolloid részecskék stabilitási vizsgálatainak eredményét elemezve megállapítható, hogy a Tr/HyA rendszer egyértelműen nagyobb kinetikai stabilitással rendelkezik, mint a korábban előállított HSA/HyA szérumfehérje/poliszacharid részecskéket tartalmazó diszperzió.

A TDK munkám eredményei alapján kijelenthető, hogy az általunk kidolgozott módszerrel a Tr/HyA részecskék megfelelő kolloid stabilitással előállíthatóak és potenciálisan képesek lehetnek gyógyszerhatóanyag szállítására. Ezért elkezdtünk ibuprofén modell vegyülettel formulálási vizsgálatokat végezni a kialakított részecskékre, viszont a rendelkezésre álló idő alatt nem sikerült minden ehhez szükséges mérést végrehajtani, így kiértékelhető adatok hiányában ez már nem képezi a dolgozatom részét. Az eddig kapott eredmények ígéretesek, így jövőbeni célunk minden formulálási vizsgálat mihamarabbi megvalósítása, ezzel teljes mértékben feltérképezve a Tr/HyA részecske hatóanyaghordozó sajátosságait.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Tóth Ágota** tanszékvezető egyetemi oktatónak, hogy lehetőséget biztosított az általa vezetett Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszéken szakdolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Juhászné Dr. Csapó Edit** egyetemi docensnek és konzulensemnek **Seres László** PhD hallgatónak a sok segítségért és támogatásért, amit kutatómunkám során kaptam.

Köszönöm **Dr. Varga Norbert** tudományos munkatársnak az IR-spektroszkópai és a DSC mérésekben nyújtott segítségét és hasznos szakmai tanácsait.

Köszönöm **Turcsányi Árpád** PhD hallgató segítségét a TEM felvételek elkészítésében és érdekes, elgondolkodtató meglátásait kutatómunkámmal kapcsolatban.

Szeretném megköszönni **a kutatócsoport minden munkatársának**, hogy gondolataikkal, baráti beszélgetéseikkel kellemes légkört teremtettek munkám során.

Végül köszönöm **családomnak** a támogatást és biztatást, melyet kezdetektől fogva kaptam.

9. Irodalomjegyzék

- [1] J.H. Ko, H.D. Maynard, A guide to maximizing the therapeutic potential of protein–polymer conjugates by rational design, *Chem Soc Rev* 47 (2018) 8998–9014. <https://doi.org/10.1039/C8CS00606G>.
- [2] P. Kiran, A. Khan, S. Neekhara, S. Pallod, R. Srivastava, Nanohybrids as Protein-Polymer Conjugate Multimodal Therapeutics, *Front Med Technol* 3 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmedt.2021.676025>.
- [3] A.N. Kovács, G. Katona, Á. Juhász, G.T. Balogh, E. Csapó, Albumin-hyaluronic acid colloidal nanocarriers: Effect of human and bovine serum albumin for intestinal ibuprofen release enhancement, *J Mol Liq* 351 (2022) 118614. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118614>.
- [4] 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>.
- [5] N. Varga, L. Seres, N.A. Kovács, Á. Turcsányi, Á. Juhász, E. Csapó, Serum albumin/hyaluronic acid nanoconjugate: Evaluation of concentration-dependent structural changes to form an efficient drug carrier particle, *Int J Biol Macromol* 220 (2022) 1523–1531. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.125>.
- [6] 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>.
- [7] G.M. Barratt, Therapeutic applications of colloidal drug carriers, *Pharm Sci Technol Today* 3 (2000) 163–171. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(00\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00255-8).
- [8] X. Cong, Z. Zhang, H. Li, Y.-G. Yang, Y. Zhang, T. Sun, Nanocarriers for targeted drug delivery in the vascular system: focus on endothelium, *J Nanobiotechnology* 22 (2024) 620. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02892-9>.
- [9] G.C.N.B. Lôbo, K.L.R. Paiva, A.L.G. Silva, M.M. Simões, M.A. Radicchi, S.N. Bão, Nanocarriers Used in Drug Delivery to Enhance Immune System in Cancer Therapy, *Pharmaceutics* 13 (2021) 1167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081167>.
- [10] R. Tenchov, R. Bird, A.E. Curtze, Q. Zhou, Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement, *ACS Nano* 15 (2021) 16982–17015. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.
- [11] H.C. Hong, K.S. Kim, S.A. Park, M.J. Chun, E.Y. Hong, S.W. Chung, H.J. Kim, B.G. Shin, A. Braka, J. Thanappan, S. Jang, S. Wu, Y.J. Cho, S.-H. Kim, An mRNA vaccine against SARS-CoV-2, (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436375>.

- [12] H. Huang, R. Liu, J. Yang, J. Dai, S. Fan, J. Pi, Y. Wei, X. Guo, Gold Nanoparticles: Construction for Drug Delivery and Application in Cancer Immunotherapy, *Pharmaceutics* 15 (2023) 1868. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071868>.
- [13] S.H.S. Boddu, P. Bhagav, P.K. Karla, S. Jacob, M.D. Adatiya, T.M. Dhameliya, K.M. Ranch, A.K. Tiwari, Polyamide/Poly(Amino Acid) Polymers for Drug Delivery, *J Funct Biomater* 12 (2021) 58. <https://doi.org/10.3390/jfb12040058>.
- [14] A. Kakkar, G. Traverso, O.C. Farokhzad, R. Weissleder, R. Langer, Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems, *Nat Rev Chem* 1 (2017) 0063. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0063>.
- [15] C. Lim, Y. Shin, K.T. Oh, Polyelectrolyte Complex for Drug Delivery, *Drug Targets and Therapeutics* 3 (2024) 62–73. <https://doi.org/10.58502/DTT.23.0027>.
- [16] H. Yang, Q. Zheng, R. Cheng, New insight into “polyelectrolyte effect,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 407 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.05.031>.
- [17] V. Vergaro, F. Scarlino, C. Bellomo, R. Rinaldi, D. Vergara, M. Maffia, F. Baldassarre, G. Giannelli, X. Zhang, Y.M. Lvov, S. Leporatti, Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells, *Adv Drug Deliv Rev* 63 (2011) 847–864. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.007>.
- [18] B.G. De Geest, M.A. Willart, B.N. Lambrecht, C. Pollard, C. Vervaet, J.P. Remon, J. Grooten, S. De Koker, *Angewandte Chemie International Edition* 51 (2012) 3862–3866. <https://doi.org/10.1002/anie.201200048>.
- [19] D. Wu, L. Zhu, Y. Li, X. Zhang, S. Xu, G. Yang, T. Delair, Chitosan-based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review, *Carbohydr Polym* 238 (2020) 116126. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116126>.
- [20] G. Bazargan, S.A. Fischer, D. Gunlycke, Effect of Structure and Hydration Level on Water Diffusion in Chitosan Membranes, *Macromol Theory Simul* 30 (2021). <https://doi.org/10.1002/mats.202000064>.
- [21] D. Nikolova, M. Simeonov, C. Tzachev, A. Apostolov, L. Christov, E. Vassileva, Polyelectrolyte complexes of chitosan and sodium alginate as a drug delivery system for diclofenac sodium, *Polym Int* 71 (2022) 668–678. <https://doi.org/10.1002/pi.6273>.
- [22] L. Allegra, S. Della Patrona, G. Petrigni, Hyaluronic Acid, in: 2012: pp. 385–401. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23056-1_17.
- [23] R.D. Price, M.G. Berry, H.A. Navsaria, Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60 (2007) 1110–1119. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2007.03.005>.

- [24] J.D. de Oliveira, L.S. Carvalho, A.M.V. Gomes, L.R. Queiroz, B.S. Magalhães, N.S. Parachin, Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms, *Microb Cell Fact* 15 (2016) 119. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>.
- [25] C.E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydr Polym* 85 (2011) 469–489. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>.
- [26] E. Csapó, H. Szokolai, Á. Juhász, N. Varga, L. Janovák, I. Dékány, Cross-linked and hydrophobized hyaluronic acid-based controlled drug release systems, *Carbohydr Polym* 195 (2018) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.073>.
- [27] A.M.N. Silva, T. Moniz, B. de Castro, M. Rangel, Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective, *Coord Chem Rev* 449 (2021) 214186. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214186>.
- [28] Ogun AS, Adeyinka A. Biochemistry, Transferrin. [Updated 2022 Nov 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532928/>, n.d.
- [29] F. Atyabi, F. Zahir, F. Khonsari, A. Shafiee, F. Mottaghitalab, Combination therapy of macromolecules and small molecules: approaches, advantages, and limitations, in: *Nanostructures for Cancer Therapy*, Elsevier, 2017: pp. 541–561. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00021-0>.
- [30] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema, Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 77 (2005) 1753–1805. <https://doi.org/10.1351/pac200577101753>.
- [31] Á. Juhász, L. Seres, N. Varga, D. Ungor, M. Wojnicki, E. Csapó, Detailed Calorimetric Analysis of Mixed Micelle Formation from Aqueous Binary Surfactants for Design of Nanoscale Drug Carriers, *Nanomaterials* 11 (2021) 3288. <https://doi.org/10.3390/nano11123288>.
- [32] V.Z. Prokopović, C. Duschl, D. Volodkin, Hyaluronic Acid/Poly-L-Lysine Multilayers as Reservoirs for Storage and Release of Small Charged Molecules, *Macromol Biosci* 15 (2015) 1357–1363. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500093>.