



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

Lágy Anyagok Kutatócsoport

Poliaszparaginsav-*l*-poli(N-izopropilakrilamid) kotérhálós hidrogél szintézise és tulajdonságainak vizsgálata

Tudományos Diákköri Dolgozat

Készítette:

Solti Katalin

Gyógyszervegyész-mérnöki szak, MSc. II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Szilágyi András Ferenc
egyetemi adjunktus

Konzulens:

Némethy Árpád
tanszéki mérnök

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009 "Új
tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos
műhelyeiben" című program támogatta.

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	4
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1	Szabályozott hatóanyag-leadás polimer gélekkel.....	5
2.1.1	A pH-érzékeny hatóanyag-leadó rendszerek.....	7
2.1.2	Hőmérsékletérzékeny hatóanyag-leadó rendszerek	8
2.1.3	Multireszponzív polimer gélek.....	9
2.2	Aminosav alapú polimer gélek.....	10
2.2.1	A poliszukcinimid módosítása	11
2.3	A poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) jellemzése és felhasználása.....	16
2.4	Kotérhálós rendszerek	18
2.4.1	Az amfilik kotérhálók előállítása	19
2.4.2	Az amfilik kotérhálók felhasználása.....	20
2.5	Nem-szteroid gyulladáscsökkentő farmakonok	21
3	CÉLKITŰZÉS	22
4	KÍSÉRLETI RÉSZ	23
4.1	Felhasznált anyagok.....	23
4.2	Allil-aminnal és etanolaminnal módosított PSI előállítása	23
4.3	A PSI-I-PNIPAAm kotérháló szintézise	23
4.4	Diaminobutánnal (DAB) keresztkötött poliszukcinimid gél (PSI-DAB) előállítása	25
4.5	A poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm - BAAm) hidrogélek előállítása.....	25
5	MÉRÉSI MÓDSZEREK	26
5.1	A kotérhálós hidrogélek szerkezetének és morfológiájának vizsgálata.....	26
5.1.1	Mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR).....	26
5.1.2	Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) vizsgálatok.....	26
5.2	A gélek duzzadásfokának mérése a környezeti paraméterek függvényében.....	26
5.2.1	A gélek pH-érzékenységének vizsgálata abszolút duzzadásfokok mérésével	26
5.2.2	A gélek hőmérsékletérzékenységének vizsgálata abszolút duzzadásfokok meghatározásával.....	27
5.2.3	A gélek duzzadáskinetika vizsgálata abszolút duzzadásfokok meghatározásával	27
5.2.4	A gélek szinérézis kinetika vizsgálata abszolút duzzadásfokok meghatározásával	27

5.2.5	A gélek oszcillációs duzzadás-szinerézis kinetikája a környezeti hőmérséklet függvényében.....	28
5.2.6	A gélek oszcillációs duzzadás-szinerézis kinetikája a környezeti pH függvényében.....	28
5.3	Kioldódás-vizsgálat	28
5.4	Citotoxicitási vizsgálatok.....	29
6	EREDMÉNYEK	30
6.1	Az optimális gél kiválasztása.....	30
6.2	A duzzadásfok pH-érzékenységeinek a vizsgálata.....	32
6.3	A duzzadásfok hőmérsékletérzékenységeinek vizsgálata	34
6.4	A gélek duzzadáskinetika vizsgálta a környezeti pH és hőmérséklet függvényében.....	35
6.5	A gélek oszcillációs duzzadás-szinerézis vizsgálata a pH és a hőmérséklet függvényében.....	36
6.6	A kotérhálók morfológiai vizsgálata	37
6.6.1	A hőmérséklet hatása a PSI- <i>l</i> -PNIPAAm és a PASP- <i>l</i> -PNIPAAm gélek szerkezetére.....	37
6.6.2	A pH valamint az alkalmazott duzzasztószer ionerősségeinek hatása a PASP- <i>l</i> -PNIPAAm gélek szerkezetére	38
6.7	Kioldódás vizsgálatok.....	39
6.8	PASP gélek sejttöxicitásának vizsgálata	41
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	42
8	IRODALOMJEGYZÉK.....	43

1 Bevezetés

A gyógyszeripari kutatásokkal párhuzamosan az anyagtudomány fejlődése lehetővé tette új, modern hatóanyag-hordozó rendszerek kifejlesztését, melyekkel megvalósítható a hatóanyagok pontos hely és idő szerinti célba juttatása a szervezetben. A különböző típusú hatóanyag-szállító rendszerek kidolgozásánál a legfőbb törekvés, hogy a hatóanyag-leadás sebessége és helye a terápiás célt a lehető legjobban szolgálja. Az új gyógyszerformák tervezésénél meghatározó tényező az emberi szervezetben a hely szerint változó fiziológiai körülmények, ezért előtérbe kerültek az olyan multireszponzív polimer gélek, melyek érzékenyen képesek reagálni az élő szervezetben jellemző két legfontosabb paraméterre, a hőmérséklet és a pH megváltozására.

Kutató munkám kiinduló pontja az volt, hogy előállítsak egy, az emberi szervezettel teljes mértékben biokompatibilis, a környezetet és a szervezetet nem terhelő, toxikus bomlástermékeket nem generáló, a környezeti paraméterek változtatására reagálni képes kotérhálós szerkezetű hidrogélt, mely alkalmazható hatóanyag-leadó mátrixként.

Ezt a célt a pH-érzékeny poliaszparaginsav (PASP) és a testhőmérséklet közeli fázisátalakulással rendelkező, hőmérsékletérzékeny poli(N-izopropilakrilamid)-ból (PNIPAAm) felépülő kotérháló létrehozásával kívántam elérni. Szakdolgozatomban [1] már beszámoltam a poliaszparaginsav-*l*-poli(N-izopropilakrilamid) (PASP-*l*-PNIPAAm) kotérhálók dimetil-szulfoxidban történő előállításáról, jelenlegi munkámban a kotérhálók szintézisét vizes közegben valósítottam meg, mert a NIPAAm polimerizációja vizes fázisban nagyobb polimerizációfokot biztosít, ami pedig jobb mechanikai tulajdonságú hidrogéleket eredményez. A poliszukcinimid (PSI) alap polimer vízzoldhatóságát a főlánc etanolaminnal történő kémiai módosításával oldottam meg. Allil-amin csoportok beépítésével biztosítottam, hogy a módosított PSI allil oldalcsoportjain keresztül részt vegyen az NIPAAm gyökös mechanizmusú polimerizációjában, kialakítva ezzel egy multireszponzív PSI-*l*-PNIPAAm kotérhálós hidrogélt. Az ezt követő lúgos hidrolízis során a mátrix átalakítható PASP-*l*-PNIPAAm kotérhálóvá.

Vizgáltam az előállított gélek egyensúlyi duzzadásfokát a környezeti pH, valamint hőmérséklet függvényében. Előzetes kioldódás vizsgálatokat végeztem diklofenák-nátrium, nem szteroid típusú gyulladáscsökkentővel. A kifejlesztett PNIPAAm-*l*-PASP kotérháló rendszerrel egy elnyújtott hatóanyag-leadást sikerült megvalósítani, ami védelmi funkciót biztosít a gyomornyálkahártya számára, így a mellékhatások veszélye csökkenthető.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Szabályozott hatóanyag-leadás polimer gélekkel

A hatásos gyógyszeres terápia megvalósításának számos akadályja létezik, amelyek nem csupán a hatóanyag farmakológiai és farmakokinetikai tulajdonságaiból erednek, hanem alapvető probléma az is, hogy egyetlen hagyományos gyógyszerkészítmény sem képes arra, hogy a belőle szabaddá vált hatóanyagot a szükséges koncentrációban eljuttassa a megfelelő receptorhoz. A hagyományos gyógyszerformák hátrányainak a kiküszöbölésére számos, új módosított hatóanyag-leadású rendszert fejlesztettek ki a gyógyszeriparban [2].

A módosított kioldódás háromféle mechanizmussal játszódhat le: késleltetett, szakaszos és nyújtott. A késleltetett kioldódás esetében egy bizonyos késleltetési idő után indul meg a hatóanyag-felszabadulása, míg szakaszos kioldódás esetén pontosan meghatározott időszakokban, a nap folyamán ritmusosan. A nyújtott hatóanyag-leadású készítményeknél lassúbb kioldódás kinetika figyelhető meg, mint a konvencionális készítményeknél, így a hatástartam növelhető, míg a dózisok gyakorisága és az esetleges mellékhatások csökkenthetők [2].

Az emberi szervezet homeosztázisának egyensúlya visszaállítható, ha a gyógyszerhordozó a hatóanyagot csak abban az időpontban adja le, mikor arra valóban szüksége van. Ilyen, a szervezet természetes működését utánozni képes, visszacsatolások elven működő rendszereket *intelligens polimer gélek* segítségével tudunk készíteni.

A polimer gélek térhálós szerkezetű polimerek, melyek a térháló láncai között nagy mennyiségű folyadékot - duzzasztószert - képesek megkötni. A háromdimenziós térhálós vázszerkezet alakállandósága a nagy mennyiségű folyadék (nagyobb, mint 90%) jelenléte esetén sem szűnik meg [3]. A diffúzibilis részecskék számára átjárhatók, nagy folyadéktartalmuk miatt fizikai-kémiai tulajdonságaik az oldatokéhoz hasonlóak. A géleket a folyadékoktól rendszerint a rugalmassági modulus, vagy a viszkozitás alapján különböztetik meg [4]. A szilárd halmazállapotra jellemző tulajdonságuk a deformálhatóság és a már említett alakállandóság, mely a szerteágazó vázszerkezetnek köszönhető [5].

Attól függően, hogy a polimer gél vázát milyen kölcsönhatások tartják össze fizikai illetve kémiai polimer gélekről beszélünk.

A *kémiai gélekben* a részecskék között stabil kémiai kötések (kovalens kötések) alakulnak ki, amelyek végtelen molekulatömegű térhálót eredményeznek [4]. pl.: diaminobutánnal keresztkötött poliszukcinimid

A *fizikai gélek* szerkezetét másodrendű kötések tartják össze. Tulajdonképpen bármely folyamat, ami kedvez a polimer láncok ideiglenes összekapcsolódásának, fizikai géleket eredményezhet. Ugyanakkor ezek a gélek az őket összetartó kötések jellegéből adódóan hőmérsékletemelés hatására általában felbomlanak [4]. Ilyen fizikai gél pl.: zselatin

A polimer gélek egyedülálló tulajdonsága, hogy érzékelik közvetlen környezetük fizikai, illetve kémiai állapotának egy vagy több jellemzőjét, majd valamelyik állapotjelzőjük jelentős megváltoztatásával, gyors és egyértelmű választ adnak a környezeti változásra. Ez a válasz általában a polimer gélek jelentős térfogat változásában nyilvánul meg (1. ábra), ami magával vonja az ettől függő összes tulajdonság változását is [6]. Jelentős mértékben módosulnak az optikai, mechanikai és transzport tulajdonságok. Mivel a polimer gélek környezeti ingerhatásokra érzékenyek, így a hatóanyag-leadás szabályozhatóvá válhat a pH, a hőmérséklet, az ionerősség, koncentráció, illetve elektromos/mágneses tér hatására [7].



1. ábra: Hidrogélek térfogatváltozása a pH függvényében

Az ilyen rendszerekkel megoldható, hogy a hatóanyag-leadás a test egy meghatározott részében történjen (pl. emésztőrendszer egy meghatározott pH értékkel bíró szakaszán).

Orvosbiológiai alkalmazásuk feltétele, hogy az élő szervezettel összeférhetőek legyenek (biokompatibilitás), a szervezet ne kezelje a polimer géleket testidegenként, valamint, hogy megfelelő mechanikai tulajdonságokkal rendelkezzenek a felhasználásuk helyén (biofunktionalitás). Hatóanyag-hordozóként való alkalmazásuk esetén, miután leadták az adott terápiás területen a hatóanyagot fontos a biológiai lebonthatóságuk, ami történhet oxidatív, hidrolitikus vagy enzimatis úton.

Az intelligens polimer gélek duzzadási és hatóanyag-leadási mechanizmusa leginkább háromféle modellel írható le: diffúzió-, duzzadás- és kémiai-kontrollált. A leggyakoribb ezek közül a *diffúziókontrollált*, melyet a Fick-törvényekkel tudunk leírni empirikus összefüggések felhasználásával. A *duzzadáskontrollált* esetben egy nyitó-záró mechanizmusról beszélünk, melyben zárt állapotban a térháló gátolja a hatóanyag diffúzióját, viszont a megfelelő külső hatás megnöveli a gél térfogatát így a láncok közötti átlagos

távolságot, melynek következtében a hatóanyag ki tud áramolni a rendszerből. A hatás megszűnésével a gél szinerizál, a hálóláncok távolsága lecsökken az eredeti értékre, ezzel újra megakadályozva a kioldódást. A *kémiaiilag kontrollált* mechanizmus esetén, a hordozó mátrixban lejátszódó kémiai reakció határozza meg a kioldódás végbemenetelét [8].

Kutatómunkám szempontjából a pH és a hőmérséklet megváltozására érzékeny, szabályozott hatóanyag-leadást biztosító rendszerek a legfontosabbak, ezért a továbbiakban ezen rendszerek bemutatásával foglalkozom.

2.1.1 A pH-érzékeny hatóanyag-leadó rendszerek

A pH-érzékeny hatóanyag-leadó rendszerek ionizálható csoportokat tartalmazó polimerekből épülnek fel, ezért polielektrolitoknak is nevezik őket. A polielektrolitok savas vagy bázikus jellegű csoportokat tartalmaznak, így a környezet pH változásának hatására protont képesek leadni vagy felvenni. A polielektrolitokból felépülő gélek a közeg kémhatásától függően duzzadással, illetve szinerézissel képes szabályozni a hatóanyag felszabadulását [7]. A polielektrolit gélek duzzadásáért a funkciócsoportok elektrosztatikus taszítás és solvatációja a felelős, a duzzadás mértékét a közeg pH-ja és ionerőssége együttesen befolyásolja.

Az anionos hidrogélek duzzadásfoka¹ savas közegben kismértékű, neutrális láncként viselkednek a polimerláncok, ám a pH növelés már hatással van a polimer filicitására, melynek változása maga után vonja a duzzadásfok jelentős növekedését, ez pedig felgyorsítja a kioldódási folyamatot. A kationos polimerekből felépülő gélek láncai alacsony pH értéken ionizálódnak, melynek hatására duzzadásfokuk megnő.

A pH-érzékeny hatóanyag-leadó rendszerek napjainkban leginkább az orálisan adagolt készítmények területén alkalmazzák [9], azonban daganatterápiában célzott hatóanyag-leadó rendszereként is előtérbe kerültek (pH-szenzitív-liposzómák [10,11]). Különösen nagy a pH-érzékeny hatóanyag-leadó rendszerek jelentősége a gyomorfekély kezelésében. A gyomor savtartalmára érzékeny polimerrel ellátott gyógyszerformával pulzáló hatóanyag-leadást értek el [12]. Ezzel szembe az anionos pH-érzékeny polimer gélekkel meg tudjuk akadályozni a

¹ A gél méretváltozását a gél tömeg duzzadásfokával jellemezhetjük:

$$Q_m = \frac{m_{\text{gél}}}{m_{\text{kiszáritott gél}}}$$

ahol $m_{\text{gél}}$ a duzzadt gél tömege, míg $m_{\text{kiszáritott gél}}$ a duzzasztószer nélküli kiszáritott gél tömege.

hatóanyag kioldódását a gyomor savas pH-ján, hiszen a gyomor és a belek közötti pH-különbség elég nagy ahhoz, hogy a hidrogélek duzzadásfokát jelentősen befolyásolja, így a hordozó csak a belekbe érkezéskor adja le a hatóanyagot, ahol a testnedv már közel semleges kémhatású [13].

A gyógyszeriparban pH-érzékeny hidrogélként is felhasznált polimerek egyike a kitozán, mely a kitin deacetilált származéka. A kintin rákok és kagylók páncéljának természetes komponense. A kitin biokompatibilis, pH függő kationos polimer, vízzoldható pH = 6,2 értékig, és ha vizes oldatát pH = 6,2 érték fölé lúgosítjuk, az a polimer kicsapódásához vezet. Ezt a tulajdonságát használja fel a gyógyszeripar a hatóanyag-leadás területén [14].

További ipari példa pH-érzékeny polimerekre: poliakrilamid (PAAm), poliakrilsav (PAA), poli(N,N-dimetil-amino-etil-metakrilát) (PDEAEMA), a polimetakrilsav, polietilén-glikol (PEG), poliaszparaginsav (PASP) [15,16].

2.1.2 Hőmérsékletérzékeny hatóanyag-leadó rendszerek

A hőmérséklet által szabályozott rendszerek esetében hőmérsékletváltozás hatására fázisátalakulással egybekötött szerkezetváltozás következik be, ez a hatóanyag leadását is befolyásolja. Megkülönböztethetünk *negatív és pozitív hőmérsékletérzékenységű* rendszereket [17].

A *negatív hőmérsékletérzékenységgel* rendelkező polimerek egy bizonyos hőmérséklet felett oldhatatlanná válnak az adott közegben. Az a hőmérséklet, ahol ez a fázisátalakulás bekövetkezik, a fázisátalakulási hőmérséklet, a fázisdiagram minimum pontját alsó kritikus szételegyedési hőmérsékletnek (Lower Critical Solution Temperature, LCST) nevezzük. Ilyen negatív hőmérséklet-függést mutató polimerek például a poli(N-izopropilakrilamid) és származékai, valamint a poli(metil-vinil-éter) [17,18].

A *pozitív hőmérséklet-függésű* polimerek adott összetételű oldatában a fázisátalakulási hőmérséklet alatt a polimer kicsapódása tapasztalható. A fázisdiagram maximum pontját felső kritikus szételegyedési hőmérsékletnek (Upper Critical Solution Temperature, UCST) nevezzük.

Mind a két típusú hőmérsékletérzékenységet befolyásolhatja a polimer kémiai szerkezete, a koncentráció, elektrolitok, egyéb adalékanyagok [17].

A hőmérsékletérzékenységre jó példa az etilhidroxietil-cellulóz [19,20]. Vizes oldatának viszkozitása a hőmérséklet emelkedésével csökken, bizonyos ionos felületaktív anyagok, mint például a nátrium-dodecil-szulfát hozzáadásával melegítés hatására 30-40 °C-on kemény és

átlátszó gélle alakul. A felületaktív anyag hozzákapcsolódik az etilhidroxietil-cellulózhoz, így a térháló pontok száma a hőmérséklet emelkedésével megnövekedik, a felületaktív anyagok a polimerláncokat összekapcsolva kialakítják a gélstruktúrát [21].

Számos természetes polimer vizes oldata gélt képez hőmérsékletcsökkenés hatására, ilyen a zselatin szol-gél átalakulása, azonban néhány cellulóz származék kivételt képez ez alól [22]. A metilcellulóz és a hidroxipropil-metilcellulóz vizes oldata hőmérséklet emelkedés hatására gélesedik, 40-50 °C, illetve 75-90 °C között [23,24].

A leggyakrabban kutatott hőmérsékletérzékenységet mutató polimer a PNIPAAm, a polimer hidrogél származékai hőmérsékletváltozás hatására reverzibilisen duzzadnak és szinerizálnak a hőmérsékletváltozás irányának megfelelően. A PNIPAAm ezen tulajdonságát szakaszos, szabályozott hatóanyag-leadású hordozókban felhasználhatjuk. Egy lehetséges alkalmazás során, a PNIPAAm a gél fázisátalakulási hőmérséklete alatt diffúzió-szabályozott módon szabadul fel a hatóanyag, míg LCST értéke felett megszűnik a kioldódás, ekkor ugyanis a gél felületén egy bőrszerű réteg alakul ki, ami megakadályozza a víz és a hatóanyag kiáramlását a gélből [25].

A gyógyszeriparban és az orvosbiológiában számos hőmérsékletérzékenységgel rendelkező polimer és kopolimer felhasználási lehetőségeit vizsgálják, közülük is a legfontosabbakat az 1. táblázat foglalja össze [26].

Polimer	Biokompatibilitás	Biodegradibilitás	Biotoxicitás	LCST (°C)
PEO-PPO-PEO	nem ismert	magas	alacsony	5-30
PEG-PLGA-PEG	magas	magas	nem ismert	30-35
PMPA	nem ismert	nem ismert	nem ismert	51
PNVCL	magas	magas	alacsony	32-34
EPG	magas	nem ismert	alacsony	32-42
PLGA-PEG-PLGA	magas	magas	nem ismert	37

1. táblázat: Néhány, az egészségügyben alkalmazott termoreszponzív polimer

2.1.3 Multireszponzív polimer gélek

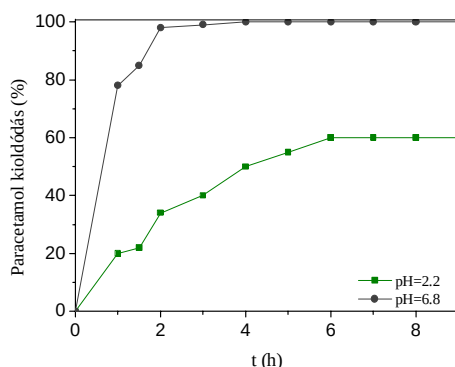
Azokat a polimer géleket nevezzük multireszponzívnak, amelyek többféle környezeti paraméter változására képesek reagálni.

A 2.1.2 fejezetben említett pH hatására gélesedő, kationos kitozán oldatok hőmérsékletérzékeny és pH-függő rendszerre válnak béta-glicerofoszfát hozzáadása után [27]. Az így előállított kitozán-glicerofoszfát hidrogélek kiválóan alkalmasak implantátumok

kialakítására, továbbá magas porozitásuk miatt makromolekulák és gyenge vízdékonyságú hatóanyagok szállítására is alkalmazhatóak.

Szintén multireszponzív tulajdonsággal rendelkezik a poli(N-akrilóil-N-polipiperazin) (PNANP). A polimer vizes oldatának LCST-je 37 °C, de ha a környezeti pH-t pH = 6 és pH = 10 között változtatjuk, az fázisátalakulási hőmérséklet 65 °C és 25 °C között változik [28].

A poli(N-izopropilakrilamido-ko-akrilsav), a poli(N-izopropilakrilamid-ko-N,N-dimetil-amino-etil-akrilamid), valamint a poli(N-izopropilakrilamid-ko-itakonsav) kopolimerek ugyancsak érzékenyek mind a pH és a hőmérséklet változására [28,29]. Itakonsavval kopolimerizálva a NIPAAm-ot megfelelő keresztkötő molekula jelenlétében egy olyan hidrogélt hozhatunk létre, ami alkalmas a vastagbélben a paracetamol szabályozott hatóanyag-leadására [28]. A vastagbélben történő hatóanyag-leadás során fontos, hogy a hidrogél ne duzzadjon meg savas pH-n viszont jó duzzadási tulajdonsága legyen neutrális, lúgos közegben. A PNIPAAm-itakonsav hidrogél pH indukált duzzadása a hőmérséklet által is kontrollált, így megfelelő a kioldódási profillal rendelkezik (2. ábra).



2. ábra: A paracetamol kioldódás görbéje pH = 2,2 és pH = 6,8 pufferben

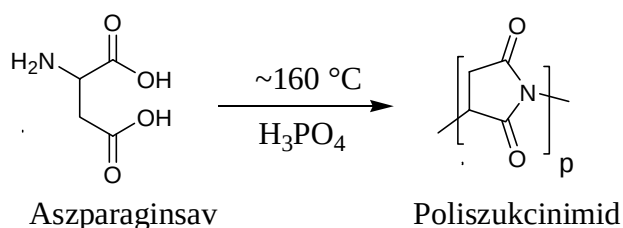
A paracetamol kioldódása a gélből megközelítőleg 6 óra alatt zajlik le pH = 2,2-es, míg közel 2 óra alatt pH = 6,8-os közegben. Korábbi irodalmak szerint a paracetamol teljes felszabadulása az eddig vizsgált hatóanyag-hordozókból 5 óra volt, tehát jelentős javulást lehet elérni a multireszponzív hidrogél alkalmazásával [29].

2.2 Aminosav alapú polimer gélek

Munkám során előállított polimer hidrogélek alapját a poliaminosavak képezik. Ezek a polimerek, valamint a belőlük előállított polimer gélek érzékenyen reagálnak a környezeti pH megváltozására, valamint aminosav építőelemeiknek köszönhetően enzimatis úton

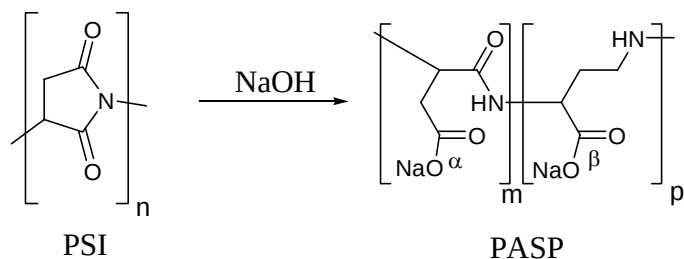
lebonthatók toxikus metabolitok keletkezése nélkül. A poliaminosavak alkalmazása e tulajdonságuk miatt értékelődik fel a már meglévő hatóanyagok célzottabb, és hatékonyabb bejuttatása terén. Felhasználásukkal olyan mátrixok valósíthatók meg, melyek az élő szervezettel teljes mértékben biokompatibilisek, így nem váltanak ki immunreakciót [30].

Az általam tervezett polimer gél alapjául a poliszukcinimidet (PSI) választottam. A PSI előállítása az aszparaginsav termikus polikondenzációjával történik mezitilén-szufolán elegyben H_3PO_4 katalízis mellett (3. ábra):



3. ábra: A poliszukcinimid előállítása termikus polikondenzációval aszparaginsavból

Hidroxidionnal, mint nukleofil reagenssel reagálva a PSI poliaszparaginsavvá (PASP) hidrolizál (4. ábra), mely, térhálós rendszerek esetén pH-érzékeny hidrogéleket eredményez [8,31].

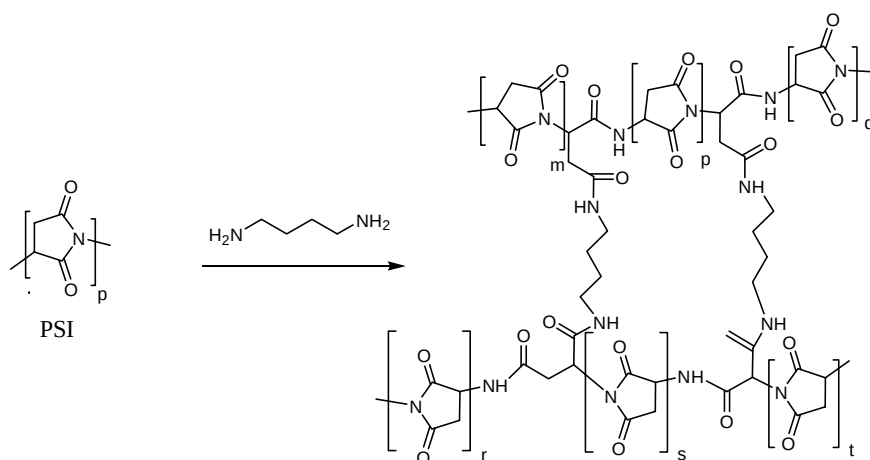


4. ábra: A poliaszparaginsav (PASP) előállítása poliszukcinimidből (PSI)

2.2.1 A poliszukcinimid módosítása

A polimer lánc tulajdonsága különböző módosító molekulákkal megváltoztatható, így aminosavakból és más természetes vegyületekkel a polimerek végtelen variációja építhető fel, lehetővé téve az egyes alkalmazásokhoz optimalizált polimer gélek létrehozását. A poliszukcinimid (PSI) láncot aktív imid kötéselei lehetővé teszik, hogy nukleofil csoportot tartalmazó molekulákkal reagáltassuk [32]. A szukcinimid gyűrűk lehetővé teszik azt is, hogy kémiaiailag térhálósított gél állítsunk elő a poliszukcinimid, vagy akár a módosított poliszukcinimid láncból. Ehhez olyan molekulára van szükségünk, melyek legalább két

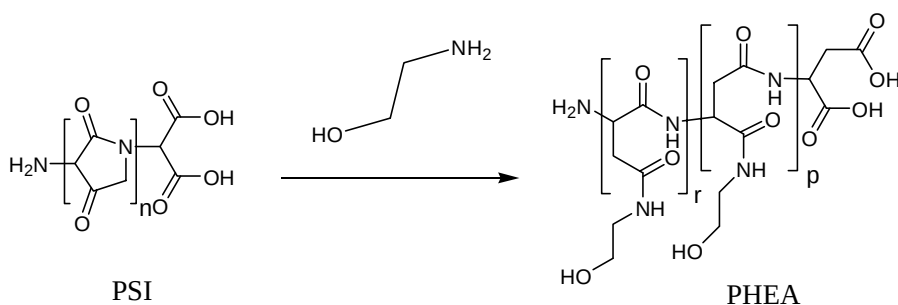
nukleofil funkciós csoportot tartalmaznak. Ilyenek a természetes diaminok (például a diaminobután) (5. ábra). Az így képzett gél lúgos hidrolízisével PASP gélt kapunk.



5. ábra: A poliszukcinimid láncok összekapcsolása diaminobutánnal

Ha tehát a polimert megfelelő körülmények között nukleofil reagensekkel hozzuk kapcsolatba, a szukcinimid gyűrű felnyílik.

Az irodalomban legnagyobb számban a poli(hidroxietyl-aszparagin) (PHEA) gélesítésére találunk példákat [33-35]. Előnye, hogy a polimer biokompatibilitása mellett a térhálósítási reakció során a felhasznált oldószer sem terheli a környezetet, hiszen mind a PHEA, mind a keresztkötést létrehozó molekulák (aminoalkoholok) jól oldódnak vízben (6. ábra). Emellett az aminosav alapú polimer gélek vizes közegben történő előállításával a későbbi felhasználás során csökkenthető a felesleges mérgező anyag bevitel.



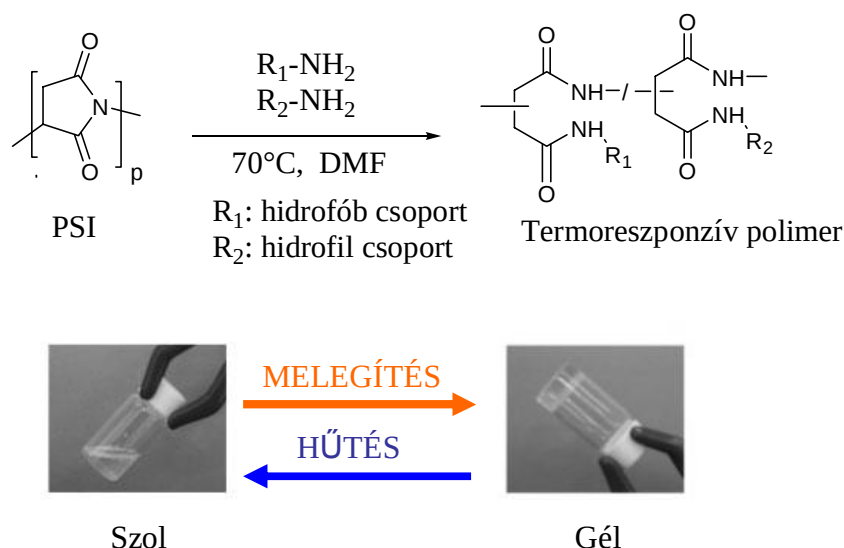
6. ábra: A poli(hidroxietyl-aszparagin) (PHEA) előállítása poliszukcinimidből (PSI)

Az előállított módosított PSI egyes tulajdonságai az alaplánchoz kapcsolt aminoalkoholok alkil láncának hosszúságával szabályozhatók. Rövidebb szénlánc esetén a kapott polimer inkább hidofil, hosszabb szénlánc esetén hidrofób jellegű [36]. A PSI reakciója különböző aminoalkoholokkal (5-aminopentanollal és 6-aminohexanollal) azonban

nem csak a polimer lánc oldhatóságát befolyásolja, hanem egy hőmérsékletérzékeny polimert eredményez, ami vizes közegben vizsgálva jól definiálható fázisátalakulási hőmérséklettel rendelkezik [36].

A PASP hőmérsékletérzékenysége tételéről megállapították, hogy csupán hidrofíl aminoalkoholokkal módosított PSI esetében nem következik be a fázisátalakulás melegítés hatására, vagyis a szol-gél átmenet vizes közegben. Azonban, ha a polimer láncba egy hidrofób (dodecilamin) és egy hidrofíl (aminoalkohol) csoportot viszünk be, egy kontrollálható szol-gél és gél-szol fázis átmenettel rendelkező PASP-t kapunk, amelynél a fázisátalakulás a környezeti hőmérséklet megváltozására megy végbe (7. ábra) [37,38].

A fázisátalakulás hőmérséklete függ a polimer koncentrációtól, a molekulatömegtől és a módosító csoportok arányától, valamint lánc hosszúságától is.



7. ábra: Szol-gél-szol fázisátalakulással rendelkező hőmérsékletérzékeny poli(N-szubsztituált-aszparaginsav) előállítása

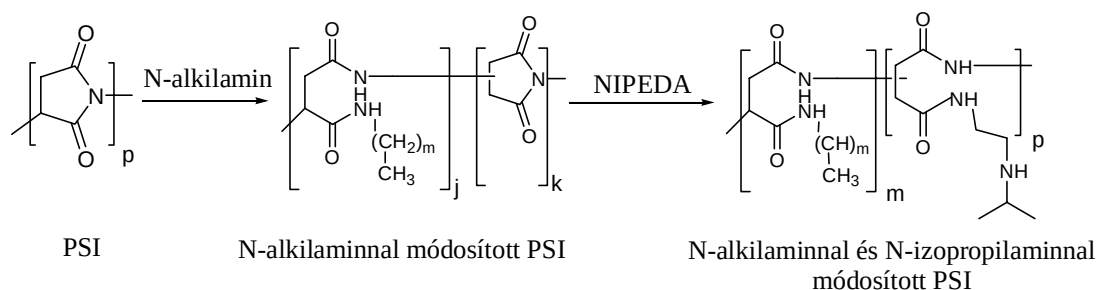
Ebben az esetben, ha növeljük a hidrofób dodecilamin mennyiségét, megnő a polimer oldat viszkozitása és egyre alacsonyabb hőmérséklet szükséges a gél kialakulásához (2. táblázat) [39].

Dodecilamin tartalom (mol%)	LCST ($^\circ C$)
36	50
39	37
41	22
44	14

2. táblázat: Az alsó kritikus oldhatósági hőmérséklettel függése a polimer hidrofób alkilaminnal történő módosítás mértékétől

Hasonló tendencia figyelhető meg a hidrofíl aminoalkoholokkal történő módosítás esetében is. Az oldallánc hosszának növelésével a fázisátalakulási hőmérséklet lineárisan csökken. A hidrofób polimer oldalláncok bevitele tehát a polimer dehidratációja és az aggregáció miatt szükséges. Ez az oka annak, hogy a PSI-t csupán hidrofíl 5-amino-1-pentanollal és 6-amino-1-hexanollal reagáltatva a polimer nem mutat szol-gél-szol átmenetet semmilyen koncentrációban [37,38].

A PSI-t hidrofób N-alkilaminnal (dodecilamin) és N-izopropil elágazó csoporttal (NIPEDA) módosítva egy szobahőmérsékleten vízzel oldható, jól definiált LCST értékkel rendelkező, valamint szol-gél átmenetet mutató amfifil polimert kapunk (8. ábra). Ennek a rendszernek már a hőmérsékletérzékenysége mellett, a fázisátalakulási hőmérsékletének pH-függését is vizsgálták vizes oldatban [40,41].



8. ábra: A poliszukcinimid módosítása az oldhatóságot befolyásoló csoportokkal

A kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a fázisátalakulási hőmérsékletet a polimer hidrofób-hidrofíl egyensúlya, a vízmolekulák és a polimer láncok közötti H-hidak, valamint a környezet pH-értéke is meghatározza. Az LCST változását dodecilaminnal és N-izopropilaminnal módosított poliaszparaginsav (LA/NIPEDA/PASP) rendszeren vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy csökkentve a vizes oldat pH-értékét a rendszer LCST-je egyre magasabb hőmérséklet tartományok felé tolódott el. Ennek oka, hogy a módosított PASP N-izopropil csoportja, annak pK_a értéke alatt protonálódik - a polimer-víz kölcsönhatás egyre növekedik az ionizáció növekedésével-, ami elősegíti a polimer vízzel oldhatóságát és így nagyobb hőmérséklet szükséges a fázisok szeparációjához [40].

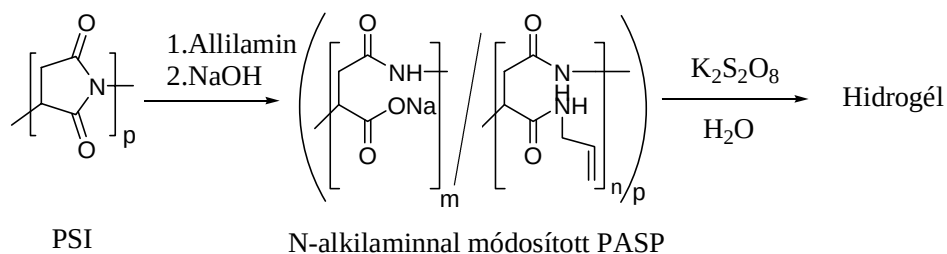
A polimerek testhőmérséklet hatására bekövetkező in situ gélesedése injektálható gélek előállítását teszi lehetővé, valamint e tulajdonságuknak köszönhetően felhasználhatóak lokálisan alkalmazható bioadhezív gyógyszerhordozó-rendszerek formájában is [36 - 41].

A fentiek alapján elmondható, hogy az aminosav láncok módosításával előre programozhatóak a polimerek fizikai-kémiai tulajdonságai, aminek következtében

felhasználási területük bővül. Alkalmazásuk során számos környezetvédelmi szempont is érvényesül biokompatibilitásuk, biológiai lebonthatóságuk és vízzoldhatóságuk révén. A módosított polimerek kedvező tulajdonságai a gyógyszeripartól az építőiparig számos területeken alkalmazhatók, ilyen pl. a poliaminosavakból előállított szuperabszorbens polimer [42].

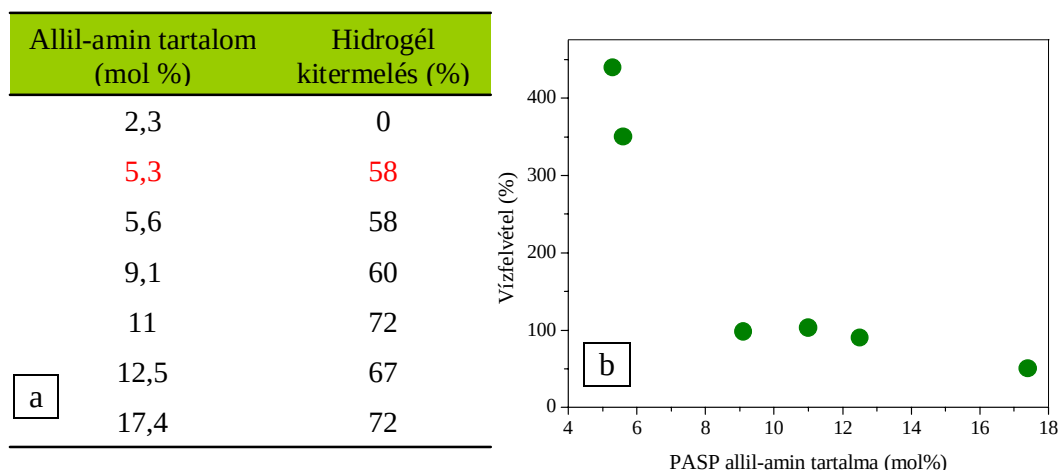
A szuperabszorbens polimerek olyan 3 dimenziós térháló struktúrával rendelkeznek, melyek nagy mennyiségű vizet és vizes oldatot képesek felszívni és magukban tartani [43]. A szuperabszorbens polimereket legnagyobbbrészt akrilsavból készítik térhálósítószer felhasználásával oldószeres vagy szuszpenziós polimerizációval. Tulajdonságait legnagyobb mértékben a személyi higiéniai termékekben használják ki egészségügyi betétek és babapelenkák formájában. Hátránya az akrilsavból készült termékeknek, hogy használatuk után olyan szennyezők halmozódhatnak fel a környezetben, melyek nem bomlanak le. Ilyen például a maradék monomer, térhálósítószer, a katalízisból származó melléktermékek, extrahálható polimer és nehézfémek. Az USA-ban már tervezték betiltásukat, esetleg büntetőadók bevezetését, így a gyártók érdekelté váltak olyan biológiailag lebontható termékek kifejlesztésében, melyek nem terhelik a környezetet [42,43].

Szuperabszorbens poliaszparaginsav polimer nyerhető a PSI allil-aminnal történő módosításával az alábbi reakció szerint (9. ábra):

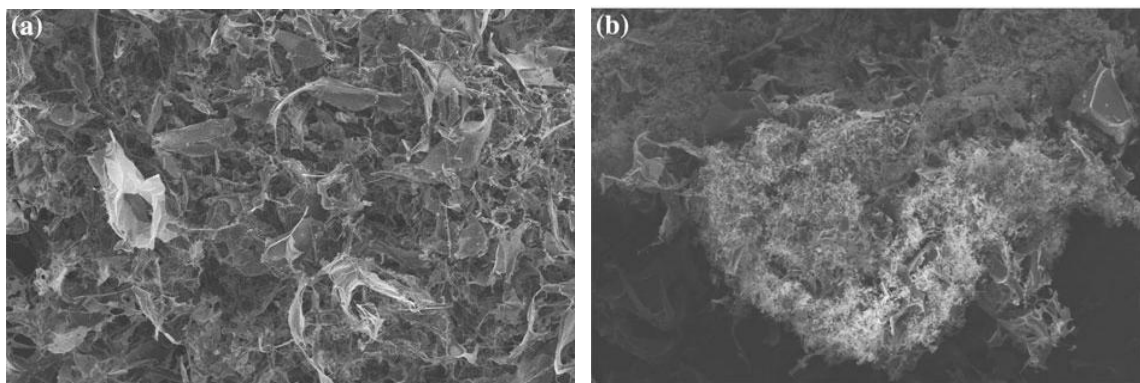


9. ábra: Allil-aminnal módosított poliszparaginsav hidrogél előállítása

A PASP láncról lelógó telítetlen kötések redox iniciátor jelenlétében, vizes közegben képesek összekapcsolódni hidrogélt kialakítva. A tapasztalatok szerint 5,3 mol % allil-csoport tartalom mellett a módosított polimernek csupán az 58 %-a gélesedett be (10.a ábra), viszont ez a gyengébben keresztkötött hidrogél több vizet képes magában tartani, mint a magasabb százalékban módosított polimerlánc. (10.b ábra) [42].



10. ábra: (a) A hidrogél preparáció sikeressége az allil-amin tartalom függvényében, (b) A hidrogél vízfelvevő képessége a polimer allil-amin tartalmának függvényében



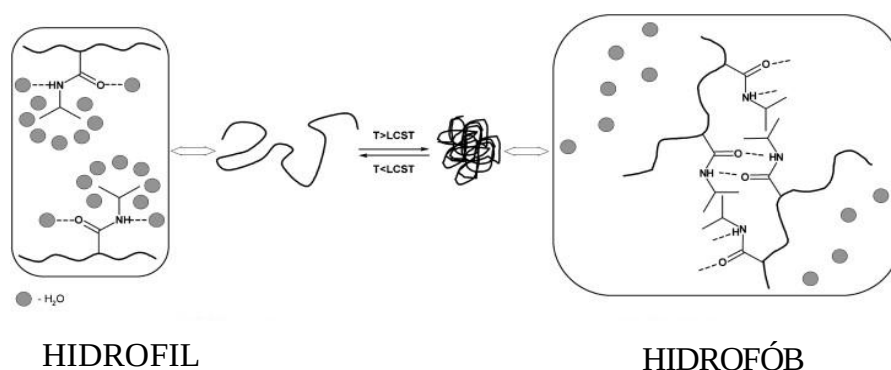
11. ábra: (a) 5,3 mol %-ban allil-aminnal módosított polimer SEM felvétele, (b) 17,5 mol %-ban allil-aminnal módosított polimer SEM felvétele

A SEM felvételekből is látszik (11.a és 11.b ábra), hogy az 5,3 mol % alli-csoportot tartalmazó PASP hidrogél sokkal több és tágabb pórusokkal rendelkezik, melynek következtében több vízmolekulát tud megkötni a háromdimenziós mátrixban, mint a 17,5 mol %-ban keresztkötött hidrogél. Az allil-aminnal módosított PASP tehát alkalmas lehet szuperabszorbens polimerként való felhasználásra is [42].

2.3 A poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) jellemzése és felhasználása

A poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) egy negatív hőmérsékletérzékenységet mutató polimer, mely alsó kritikus szételegyedési hőmérséklettel (LCST) rendelkezik. Különlegessége abban áll, hogy ez az LCST érték a lineáris polimer esetén az emberi testhőmérséklet közelében, 32 °C-on található, ezért vált a kutatócsoportok kedvelt témakörévé a kopolimereinek és származékainak vizsgálata [44].

A polimer láncban ismétlődő monomer egysége az 12. ábrán látható. A monomer karbonil- és amid csoport része hidrofíl karakterű, míg az izopropil csoport és a polimer szénváz hidrofób. A PNIPAAm szerkezetéből adódik, hogy H-híd alakulhat ki a vízmolekulák és a polimer poláris csoportjai között illetve a polimer-polimer között (intermolekuláris), valamint a polimer láncon belül (intramolekuláris) [44]. Ezen kívül hidrofób kölcsönhatás következhet be, ha a vízmolekula nem tud a másik molekula nem-poláris részével H-hidas szerkezetet kialakítani [44]. Az LCST alatt a kedvező H-hidas szerkezet miatt a polimer oldódik vízben, LCST értéke felette azonban a kötések felszakadnak, hidrofóbbá válik a polimer, aggregálódik és így kicsapódik a vizes oldatból.

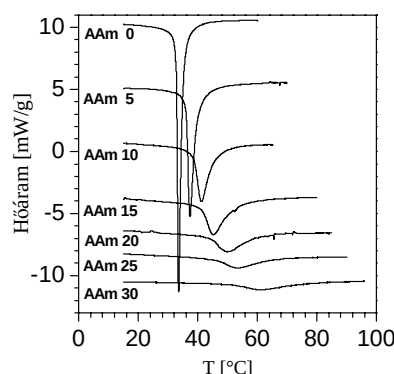


12. ábra: A poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) oldhatóságának megváltozása az alsó kritikus oldhatósági hőmérsékleten

A PNIPAAm fázisátalakulási hőmérséklete elektrolitok, oldószer és kopolimerizáció hatására módosítható. A duzzasztott PNIPAAm gél esetében a víznél jobb oldószernek számító, szerves közeg hozzáadása esetén a fázisátalakulási hőmérséklete alacsonyabb lesz, mint vízben, ez a „cononsolvency” jelenség, ami igen ritka a polimerek körében. Az elektrolitok módosítják az LCST értéket, mivel vízben hidratálódnak, ezzel megváltoztatják a víz struktúráját a láncok körül, ami legtöbbször a fázisátalakulási hőmérséklet csökkenéséhez vezet [45].

Intelligens tulajdonságainak köszönhetően a PNIPAAm kopolimereit rendkívül széles körben alkalmazzák és irodalma igen gazdag. Térhálók egész sorát állították elő, hogy a PNIPAAm fázisátalakulási tulajdonságait vizsgálják, illetve fázisátalakulási hőmérsékletét valamilyen irányban eltolják. Tapasztalatok alapján elmondható, hogy a hidrofób karakterű monomerek csökkentik, míg hidrofíl, illetve töltéssel rendelkező monomerek növelik a kopolimerek fázisátalakulási hőmérsékletét [45]. A kopolimerizáció hatás figyelhető meg a poli(vinil-alkohol)/poli(N-izopropil-akrilamid-ko-akrilamid) egymásba hatoló térhálók PVA/(PNIPAAm-ko-AAm) IPN [45] fázisátalakulási hőmérsékletében. A jelenség DSC

mérésekkel igazolható (13. ábra). A kopolimerizációhoz leggyakrabban használt monomerek: akrilsav, metakrilsav, kitozán, nátrium-akrilát, poli(terc-butilmetakrilát), polioxietilén [46 - 50].



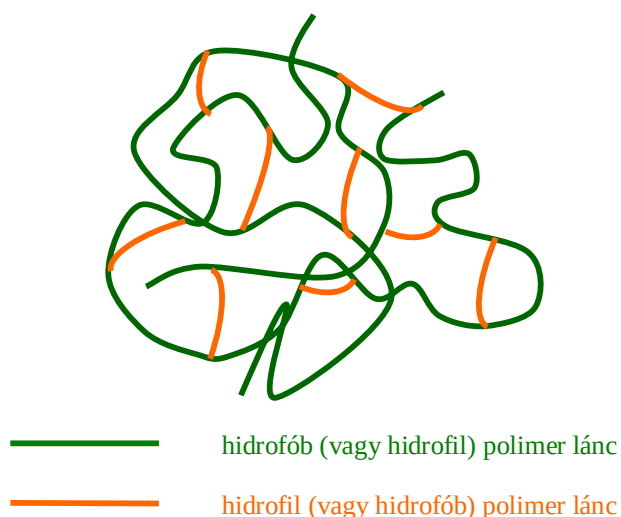
13. ábra: A kopolimerizáció hatása a PVA/(PNIPAAm-ko-AAm) IPN fázisátalakulási hőmérsékletére

A legnagyobb figyelem a PNIPAAm orvosbiológiai alkalmazásai felé irányul, mivel ez a polimer nemcsak hőmérsékletérzékeny, de biokompatibilis és inert anyag is. Az utóbbi időben főként bioszeparációs, enzim immobilizációs, génbejuttatási és sejt kultúra alkalmazásokban vizsgálták [51 - 54]. A sejt kultúrák felületét PNIPAAm réteggel ojtva pl. a sejtek kibocsátását hőmérséklettel lehet „vezérelni” enzimatis behatás helyett. Egy másik alkalmazásban megfigyelték, hogy a monorétegben tenyésztett kondrocita sejtek elvesztették fenotípusukat (jelen esetben gömb alakjukat), míg egy PNIPAAm-akrilsav térhálóban megtartották azt [55]. Ugyanezt a térhálót alkalmazták Langerhans szigetek immobilizálására is mesterséges hasnyálmirigy kísérletekben [54]. Bár a PNIPAAm klinikai alkalmazása korlátozott mivel nem biodegradibilis, azonban ez a kedvezőtlen tulajdonság kiküszöbölhető, biológiailag lebontható polimerekkel való ötvözéssel, mint például a kitozán vagy a poliaszparaginsav.

2.4 Kotérhálós rendszerek

A kotérhálók többféle polimer láncból felépülő anyagi rendszerek, melyekben a polimereket kémiai kötések kapcsolják össze, továbbá a polimerizációfokukat tekintve összemérhetők a vázalkotó polimer láncok [56].

Valójában speciális szerkezetű kopolimerekről van szó (14. ábra). Amennyiben nem csak egyfajta monomerből építjük fel ezeket a makromolekulákat, teljesen új szerkezettel és tulajdonságokkal rendelkező polimerek állíthatók elő a legkülönbözőbb alkalmazási igényeknek megfelelően [56].



14. ábra: Az amfifil kotérhálók sematikus szerkezete

A kotérhálókra jellemző elágazásos, jól definiált szerkezet nemcsak a fizikai tulajdonságok szabályozására ad lehetőséget, hanem a polimer molekulán belül található nagyszámú láncvég alkalmat kínál különböző funkciós csoportok vagy meghatározott tulajdonságokkal rendelkező molekulák (pl. optikai, mágneses, folyadékkristályos tulajdonságokat hordozó vagy gyógyszer-hatóanyag molekula) hozzákapsolására is [56].

Számos publikáció foglalkozik a nanoszerkezetű amfifil kotérhálók előállításával és azok speciális tulajdonságaival. Az amfifil polimer kotérhálók olyan különleges, térhálós polimer szerkezetek, amelyek hidrofil és hidrofób polimer komponensekből épülnek fel. Ezeknek az anyagoknak az a különlegessége, hogy széles összetétel-tartományban mindkét polimer egymásba hatoló, de összefüggő ún. kofolytonos fázist képez. Szerkezetükből adódóan kölcsönhatásba lépnek, mind apoláris, mind poláris anyagokkal, illetve duzzadni képesek mind vizes, mind szerves oldószerben. Mivel vízben is duzzadnak, így speciális hidrogéleknek tekinthetők [57].

2.4.1 Az amfifil kotérhálók előállítása

Az irodalomban számos publikáció foglalkozik az amfifil kotérhálók előállítási lehetőségeivel, azonban van néhány alapkövetelmény a szintézissel és az alkalmazott monomerekkel szemben, melyeket mindig tartani kell:

- A két komponensnek (hidrofób és hidrofil) kopolimerizálhatónak kell lennie.
- A szintézis közben fázis szeparáció nem léphet fel, hiszen ez a két eltérő filicitású összetevő makroszkopikus szételegyedéséhez vezetne.

- A képződő polimer láncok elég hosszúak legyenek, annak érdekében, hogy több (legalább kettő) keresztkötést tartalmazzanak, és így térháló képződjön.

A leggyakrabban alkalmazott eljárás a *makromonomer* módszer. A módszer lényege, hogy az egyik polimer komponenst külön szintetizálják és ellátják reaktív végcsoportokkal, majd azt a másik polimer komponens monomerével gyökös polimerizációban kopolimerizálják. Ebben az esetben az első polimer a makromolekuláris keresztkötő a kotérhálóban. Erre jó példa a pH-érzékeny polimetakrilsav-*l*-poliizobutilén amfifil kotérháló szintézise [58].

Másik fontos módszer kotérhálók előállítására az *élő polimerizációs* technikával végrehajtott szekvenciális monomer és térhálósítószer adagolása [58]. A módszer lényege, hogy először szekvenciális monomer adagolással egy blokk-kopolimert állítanak elő mindkét végén reaktív csoportokkal. A második lépésben pedig ezt a telekelikus blokk-kopolimert térhálósítják. Ezzel a módszerrel történik ABA triblokk kopolimer-alapú kotérhálók előállítása is [58].

Végül a harmadik lehetőség amfifil kotérhálók szintézisére a *lánc-lánckapcsolás*. Ebben az esetben a hidrofil és hidrofób polimer láncokat külön szintetizálják, funkcionalizálják, majd összekapcsolják. Példaként a PEG és zselatin polimerekből felépülő térhálót említem, mely szintézise során mindkét alkotó polimerből akrilamido makromert szintetizáltak, és ezen makromerek gyökös reakciójával hozták létre a gélstruktúrát [58, 59].

2.4.2 Az amfifil kotérhálók felhasználása

A kotérhálók szerkezete és felépítése következtében igen sokrétű a felhasználásuk. Biokompatibilitásuk, és kiváló mechanikai tulajdonságaiknak köszönhetően jelentős szerepet tölthetnek be a biológia és orvosbiológia területén.

A kotérhálók jó szövetbarát tulajdonságát *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokkal is bizonyították [60]. *In vitro* kísérletekben a fehérjemegkötést valamint a monocitakerakódást mérték [61]. Ezen kísérletek eredményei alapján lehetőség nyílik alkalmazásukra szintetikus érpótló anyagként, csont- és porc pótló, illetve növesztő mátrixként [62-65]. Immunoizolációs membránok a cukorbetegség gyógyításának ígéretes eszközei, ugyanis a kotérháló pórusai a kisebb molekulákat (inzulin, glükóz) még átengedik, de az immunoglobulinok számára átjárhatatlanok [66,67]. A polidimetilsziloxán (PDMS) alapú térhálókat oxigénáteresztő képességük révén kontaklencseként alkalmazzák [58, 59]. A kotérhálóknak azonban nem csak biológiai szerepük kiemelkedő. Többek között alkalmazhatóak katalizátor-, szenzor, illetve

enzim-hordozó anyagként, nanoreaktorként, enantiomerek elválasztására [57], nagy oxigén áteresztő képességű, illetve oldószer áteresztő membránokként, mikroorganizmusok letapadását gátló anyagokként, sejtkultúra közegként.

A környezet paramétereinek megváltozása (pH, hőmérséklet) bizonyos kotérhálónál gyors választ idéz elő [56]. Az intelligens viselkedés egyes homopolimer hidrogéleknél is ismert, de azokkal szemben a kotérhálók esetében mind a mechanikai erősség, mind az amfifil karakter előnyt jelent, hiszen apoláris és poláris molekulát egyszerre és külön-külön is képesek ezek az anyagok megkötni, ezért alkalmazhatók szabályozott gyógyszerkibocsátásra.

2.5 Nem-szteroid gyulladáscsökkentő farmakonok

A nem-szteroid típusú gyulladásgátló farmakonok (Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug, NSAID) világviszonylatban a leggyakrabban javasolt gyógyszerek közé tartoznak. Széles körben használják a humángyógyászatban, elsősorban fájdalom- és lázcsillapításra, valamint reumás megbetegedések kezelésére. A hatóanyagokat orális gyógyszerkészítményekben és helyi kezelésre szánt készítményekben használják fel, hagyományos gyógyszerformákban (tabletta, kúp, oldat), illetve a dermatológiai készítményeknél gél-, krém- és kenőcsformájában [68].

Hatásukat a gyulladás kialakulásában döntő szerepet játszó, prosztaglandin-szintézisben résztvevő ciklooxygenáz enzimek (COX-1 és COX-2) aktivitásainak csökkentésével érik el [68,69].

A terápiás célra gyakran használt NSAID-vegyületcsoport legismertebb képviselője a diklofenák, ami karboxil csoportja miatt pH függő oldhatósággal rendelkezik. Lúgosabb pH-értéknél jobb oldékonyságot mutat, mint savas közegben. A vegyület savas jellegű, oldódás közben disszociál és amfoter tulajdonságú sókat képezhet. A gyógyszeriparban kálium, nátrium és hidroxietilpirrolidin sók formájában használják, a dietilammónium és dietilamin sók pedig helyi alkalmazásra szánt készítményekben fordulnak elő. A diklofenák tartalmú készítmények tartós szedése esetén a nyálkahártya károsodása léphet fel, melynek oka a prosztaglandin-szintézis gátlása. Ezáltal a gyomornyálkahártya védelmi funkciója csökken, mivel a prosztaglandin fontos szerepet játszik a gyomornyálkahártya barrier funkciójának fenntartásában [69,70]. Több tanulmány bizonyította, hogy a szisztémás NSAID hatóanyagok kezelésben hosszabb távon részesülő betegek hatszor gyakrabban szorulnak kórházi ápolásra, mint gyógyszereket nem szedő betegtársaik [68-70].

A mellékhatásokat nem konvencionális készítmények előállításával lehet csökkenteni.

3 Célkitűzés

A polimerek és a polimer gélek szerepe a gyógyszer-technológiában felértékelődött, mivel a belőlük készült hordozó mátrixokkal biztosítható a hatóanyagok jól definiált kinetikával történő kioldódása. Az emberi testben a két legmeghatározóbb fizikai-kémiai paraméter a hőmérséklet és a pH, ezért előtérbe kerültek az olyan multireszponzív polimer gélek, melyek ugrásszerű és jelentős térfogatváltozással képesek válaszolni a fent említett paraméterek változására.

Munkámban egy pH- és egy hőmérsékletérzékeny polimer tulajdonságainak kombinálását tűztem ki célul, ehhez a kotérhálós szerkezet kialakítását találtam megfelelőnek. A tervezett hidrogél pH-érzékenységet a gélvázat alkotó poliszukcinimid (PSI), valamint a belőle lúgos hidrolízissel előállított poliaszparaginsav (PASP), a hőmérsékletérzékenységet pedig a kotérhálót alkotó másik polimer, a poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) felhasználásával kívántam elérni. A preparáció vizes közegben történő megvalósításához célul tűztem ki a PSI vízzoldhatóvá tételét, valamint allil-mellékcsoporthal történő módosítást, melyekkel megvalósítható a PNIPAAm kiépítése a már meglévő PSI polimer vázon. A PSI vízzoldhatóságát etanolaminos, a kettős kötések beépítését allil-aminos módosítással kívántam elérni. Előzetes vizsgálatok alapján a vizes közegben lejátszódó NIPAAm gyökös polimerizációját APS iniciátor és TEMED katalizátor felhasználásával láttam megfelelőnek.

Céлом volt, hogy a módosított PSI polimer szerkezetét ^1H -NMR vizsgálatokkal igazoljam, a vizes közegben előállított kotérhálós hidrogélek morfológiáját pedig SEM felvételekkel jellemezzem.

Céлом volt továbbá, a kotérhálók hőmérséklet- és pH-érzékenységének a bizonyítása az egyensúlyi duzzadásfokok meghatározása alapján.

Diklofenák-nátrium nem szteroid gyulladáscsökkentő felhasználásával kívántam bizonyítani, hogy az általam létrehozott módosított hatóanyag-leadó rendszer a gyomorsav pH-ján magában tartja, majd a fokozatosan növekvő pH-értékek hatására adja csak le a hatóanyagot a célzott terápiás területen, modellezve az emberi szervezetben lejátszódó elnyújtott hatóanyag-leadást.

A kifejlesztett multireszponzív rendszer biztonságos gyógyászati alkalmazhatóságát citotoxicitás vizsgálatok megvalósításával kívántam bizonyítani.

4 Kísérleti rész

4.1 Felhasznált anyagok

A kísérlethez felhasznált anyagok: N-izopropilakrilamidot [NIPAAm] az Acros Organics cégtől, az ammónium-perszulfátot [APS] az Aldrich-től, az azo-bis-izobutironitrilt [AIBN], és az allil-amint a Merck cégtől, az N,N,N',N'-tetrametiletilén-diamin [TEMED] a Fluka Analytical-től vásároltuk. A poliszukcinimidet a csoport szintetizálta aszparaginsav termikus polikondenzációjával.

A kísérletek során felhasznált pufferek citromsav-, imidazol- illetve borax alapúak voltak. A duzzasztószerként illetve mosáshoz használt milliporos desztillált víz MilliQ készülékkel készült.

4.2 Allil-aminnal és etanolaminnal módosított PSI előállítása

A kutatócsoport által szintetizált PSI lánc módosítását allil-aminnal és etanolaminnal végeztem DMSO-s közegben.

Recept 20 mól %-ban allil-aminnal és 20 mól %-ban etanolaminnal módosított PSI polimer oldatra.

Egy 10 ml-es üvegedénybe 0,97 g PSI-t 5 ml DMSO-ban illetve 0,115 g (150 μ l, 0,002 mol) allil-amint és 0,122 g (121 μ l, 0,002 mol) etanolamint szintén 5 ml DMSO-ban oldottam fel, majd folyamatos kevertetés közben összemértem az oldatokat. A reakció idő lejártá után (3 nap) a kapott reakcióelegyből a módosított polimert butanol háromszoros feleslegével kicsaptam, majd üvegszűrőn szűrtem. A leszűrt csapadékot 2 napig levegőn, majd további 2 napig vákuum alatt szárítottam (kitermelés 85 %). A reakció végbemeneteléről kvalitatív ^1H -NMR és FTIR mérésekkel győződtem meg.

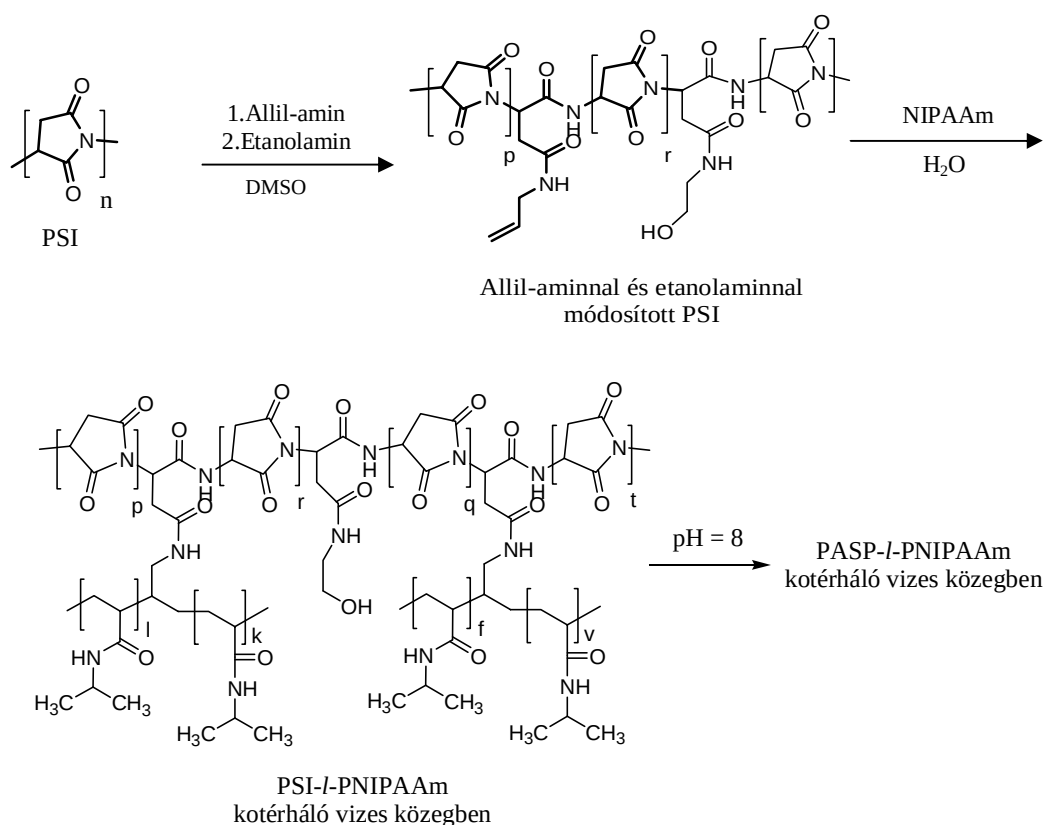
4.3 A PSI-I-PNIPAAm kotérháló szintézise

A szintézis során felhasználtam a korábban 20 mol%-ban allil-aminnal és 20 mol%-ban etanolaminnal módosított PSI-t és hexán/toluol elegyében átkristályosított PNIPAAm-ot.

A receptet 20 g össztömegű PSI-I-PNIPAAm kotérháló előállításához adom meg. Egy zárható üvegedénybe bemértem 1,000 g allil-aminnal és etanolaminnal módosított PSI-t, 1,500 g NIPAAm-ot és feloldottam 16,693 g nitrogénnel átbuborékolgatott desztillált vízben. A rendszert intenzív kevertetés mellett homogenizáltam, majd hűtőben tároltam. Ezután a frissen elkészített 5 m/m %-os APS/vizes oldatból 0,6667 g-ot és az 1:1 arányú TEMED/vizes-oldatból 0,0667 g-ot mértem be az üvegedénybe. Az elkészített oldatot

erőteljesen összeráztam és előre behűtött üveglapra öntöttem, mely 2 mm vastag szilikon kerettel volt lefedve. A gélesítést 5-8 °C-on végeztem, a gélesedési idő 1 nap volt. A gélalapokból 0,8 mm átmérőjű korongokat vágtam a későbbi vizsgálatokhoz. Az ezt követő lúgos hidrolízis (pH = 8, imidazol puffer, 3 nap) során kaptuk meg a PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélt.

Az előállított kotérháló szintézisének lépései az 15. ábrán látható.



15. ábra: PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélek szintézise vizes közegben

4.4 Diaminobutánnal (DAB) keresztkötött poliszukcinimid gél (PSI-DAB) előállítása

A gélek előállítása során 0,194 g PSI-t feloldottam 4,793 g DMSO-ban. A kapott 2 mmol/g-os PSI DMSO-os oldatához 0,0088 g diaminobután (DAB) 1 mmol/g-os DMSO-os oldatát adtam folyamatos kevertetés közben. Az így kapott polimer oldatból 2 mm vastagságú gélfilmet öntöttem, melyekből 0,8 mm átmérőjű korongokat vágtam ki a későbbi vizsgálatokhoz. A gélesedés 30 perc alatt ment végbe szobahőmérsékleten 25 °C-on. A kapott gélkorongokat imidazol alapú pH = 8-as puffer oldatban hidrolizáltam 3 napig PASP-DAB hidrogéllé.

4.5 A poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm - BAAm) hidrogélek előállítása

A PNIPAAm géleket NIPAAm monomer és N,N'-metilén-bisz(akrilamid) (BAAm) térhálósító gyökös polimerizációjával állítottam elő. Az 0,8 g átkristályosított NIPAAm-t feloldottam 4,025 g DMSO-ban, majd folyamatos kevertetés közben hozzáadtam a 0,052 g BAAm-ot. A reakció iniciátora 0,1 g ammónium-perszulfát (APS) 5 m/m%-os DMSO-s oldata, katalizátora 0,01 g N,N,N',N'-tetrametiletilén-diamin (TEMED) volt. A későbbi vizsgálatokhoz 2 mm vastagságú gélfilmet öntöttem, melyből 0,8 mm átmérőjű korongokat vágtam. A gélesítés 37 °C-on történt 1 napig. A kapott gélkorongokat desztillált vízben mostam eltávolítva az el nem reagált monomereket.

5 Mérési módszerek

5.1 A kotérhálós hidrogélek szerkezetének és morfológiájának vizsgálata

5.1.1 Mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR)

Az allil-aminnal és etanolaminnal módosított PSI-t feloldottuk 20 mg/ml koncentrációba d6-DMSO-ban (20 mg/ml). A polimer ^1H -NMR spektrumát 500 MHz Bruker típusú spektrométerrel vettük fel szobahőmérsékleten.

5.1.2 Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) vizsgálatok

Az enyhén lúgos és savas közegben duzzasztott polimer hidrogéleket folyékony nitrogénben fagyasztottam, hogy szerkezetük rögzüljön, majd liofilizáltam őket. A SEM felvételeket JEOL JSM 6380 LA készülék segítségével készültek.

5.2 A gélek duzzadásfokának mérése a környezeti paraméterek függvényében

5.2.1 A gélek pH-érzékenységének vizsgálata abszolút duzzadásfokuk mérésével

Vizsgált kotérhálók: PSI-*l*-PNIPAAm, PASP-*l*-PNIPAAm 25 °C-on, és PASP-*l*-PNIPAAm 37 °C-on. A kotérhálók pH-érzékenységét különböző pH-jú vizes pufferekben való duzzasztással vizsgáltam. Az elkészített pufferek ionerőssége egységesen $I = 0,15 \text{ M}$ volt, a pH értékek $\text{pH} = 2$ és $\text{pH} = 12$ között változnak a puffersorozaton belül. Az alkalmazott puffer alapanyagok: citromsav ($\text{pH} = 2-6$), imidazol ($\text{pH} = 6-8$), borax ($\text{pH} = 8-12$) volt. A pontos pH 1M NaOH és 1M HCl segítségével állítottam be, az ionerősséget KCl hozzáadásával biztosítottam.

A 2 mm vastag géllapokból kivágott 0,8 cm átmérőjű géleket belehelyeztem különböző pH-jú pufferekbe. A géleken többször puffert cserélttem és az egyensúly beállása után lemértem a duzzadt gélek tömegét. A tömegmérés után a géleket desztillált vízbe tettem. A vizet szintén kétszer cseréltem, majd lemértem a vízben duzzasztott tömegüket is. Ezután a PSI-*l*-PNIPAAm géleket szobahőmérsékleten, majd 2-3 órát vákuum alatt szárítottam.

A PASP-*l*-NIPAAm hidrogélek mérése során 2 mm vastag PSI-*l*-PNIPAAm géllapokból kivágott 0,8 mm átmérőjű géleket először $\text{pH} = 8$ pufferben hidrolizáltam, és csak ezután helyeztem őket különböző pH-jú pufferekbe. A PASP-*l*-PNIPAAm gélek pH-függését vizsgáltam 25 °C és 37 °C is. A szárítást követően kapott szárazanyag tömegek és a pufferekben duzzasztott tömegek arányából meghatároztam a gélek abszolút duzzadásfokát.

A gél abszolút duzzadásfokát a gél tömeg duzzadásfokával jellemezhetjük:

$$Q_m = \frac{m_{\text{gél}}}{m_{\text{kiszáritott gél}}}$$

ahol $m_{\text{gél}}$ a duzzadt gél tömege, míg $m_{\text{kiszáritott gél}}$ a duzzasztószer nélküli kiszáritott gél tömege.

5.2.2 A gélek hőmérsékletérzékenységének vizsgálata abszolút duzzadásfokok meghatározásával

A vizsgált rendszerek: PASP-*l*-PNIPAAm pH = 8 pufferben duzzasztva, PASP-*l*-PNIPAAm vízben illetve pH = 3 pufferben duzzasztva.

A felhasznált pufferek ionerőssége 0,15 M volt. Egy nap duzzasztás után minden sorozatból egy-egy gél adott hőmérsékleten tartottam 48 órán keresztül. A hőkezelés után lemértem a gélek tömegét, majd desztillált vízzel mostam, végül kiszáritottam őket. A mért értékekből kiszámítottam az abszolút duzzadásfokot.

5.2.3 A gélek duzzadáskinetika vizsgálata abszolút duzzadásfokok meghatározásával

A vizsgált rendszerek: PASP-*l*-PNIPAAm, PNIPAAm-BAAm, PSI-DAB kiszáritott gélek pH = 7,6 foszfát pufferben duzzasztva

A duzzadás kinetika vizsgálathoz kiszáritott, preparált állapotban 0,8 mm átmérőjű géleket 25 °C-on, pH = 7,6 foszfát puffer oldatban duzzasztottam vissza, majd meghatározott időközönként lemértem a 1-1 gélkorong tömegét. A mintavétel 10 percenként, majd 30 percenként történt 1 napon keresztül. A kezdeti szárazanyag tömegek és a foszfát pufferben duzzasztott tömegek arányából meghatároztam a gélek abszolút duzzadásfokát.

5.2.4 A gélek szinerézis kinetika vizsgálata abszolút duzzadásfokok meghatározásával

A vizsgált rendszerek: PASP-*l*-PNIPAAm, PNIPAAm-BAAm, PSI-DAB pH = 7,6 foszfát pufferben, 25 °C-on, majd 50 °C-on duzzasztott gélek.

A pH = 7,6 foszfát pufferben duzzasztott géleket 25 °C-ról áttettem 50 °C-os puffer oldatban és termosztáltam 50 °C-on. Az előző méréshez hasonlóan bizonyos időközönként, először 10 percenként, majd 1 óránként mértem 1-1 gél tömegét. A kezdeti szárazanyag tömegek és az 50 °C-os foszfát pufferben duzzasztott tömegek viszonyából határoztam meg az abszolút duzzadásfokot.

5.2.5 A gélek oszcillációs duzzadás-szinerézis kinetikája a környezeti hőmérséklet függvényében

A vizsgált rendszerek: PASP-*l*-PNIPAAm, PNIPAAm-BAAm, PSI-DAB pH = 7,6 foszfát pufferben, 20 °C-on, illetve 50 °C-on duzzasztott gélek.

A gél mintákat pH = 7,6 foszfát pufferben duzzasztottam 25 °C-on az egyensúlyi duzzadásfok beálltáig, majd 50 °C és 25 °C-on felváltva termosztáltam a géleket. Minden hőkezelés után mértem a gélek tömegét és meghatároztam duzzadásfokukat.

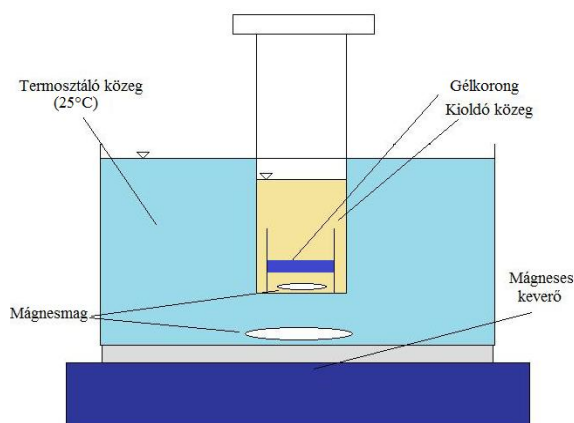
5.2.6 A gélek oszcillációs duzzadás-szinerézis kinetikája a környezeti pH függvényében

A vizsgált rendszerek: PASP-*l*-PNIPAAm, PNIPAAm-BAAm, PSI-DAB gélek pH = 3 illetve pH = 8 pufferben, 25 °C-on duzzasztva.

A gél mintákat pH = 8 pufferbe duzzasztottam 25 °C-on az egyensúlyi duzzadásfok beálltáig, majd pH = 3 és pH = 8 puffer oldatba felváltva áztattam a géleket 2-2 órán keresztül, majd tömegmérés alapján meghatároztam duzzadásfokukat.

5.3 Kioldódás-vizsgálat

A gélek későbbi alkalmazásához fontos a gyógyszerek hatóanyag-kioldódási sebességének ismerete. A hidrolizált PASP-*l*-PNIPAAm kotérhálók kioldódási kinetikájának vizsgálatát diklofenák-nátrium, nem szteroid típusú gyulladáscsökkentővel, mint modell hatóanyaggal végeztem el különböző hőfokokon pH = 7,6 foszfát pufferben, illetve 37 °C-on pH = 1,2 sósavas előkezelés után pH = 7,6 foszfát pufferben. Első esetben a PASP-*l*-PNIPAAm kiszáritott géleket 5 g/l koncentrációjú pH = 7,6 pufferben oldott diklofenák-nátrium törzsoldatba áztattam 1 napig. A gél egy tartóhálóra tettem, amit egy üvegedénybe helyeztem (16. ábra).



16. ábra: A hatóanyag kioldódás vizsgálatához használt készülék

A keskeny üvegedényeket 10 ml frissen készített pH = 7,6 foszfát pufferrel töltöttem fel, ami kellőképp ellepte a gélét. Folyamatos kevertetés mellett félóránként 2 cm³ mintát vettem. Minden egyes mintavétel után 2 cm³ pH = 7,6 foszfát pufferrel pótoltam az oldatot. A mérést 37 °C és 42 °C-on is elvégeztem. A 24 órán keresztül 30 percenként vett mintákat 5 ml-es üvegedényekbe pipettáztam bele.

Második esetben az 5 g/l koncentrációjú diklofenák-nátrium foszfát pufferes oldatában visszaduzzasztott gél 90 percig pH = 1,2 sósavval feltöltött üvegedénybe, majd a 90 perc elteltével újból pH = 7,6 foszfát pufferbe áthelyezve vizsgáltam az előzőekben leírt módszer szerint 37 °C-on.

A minták mennyiségi elemzését UV-VIS spektrofotometriás módszerrel végeztem el Jena Specord 200 készüléken. Az anyag jellemző elnyelési sávját 280 nm-en van, adott hullámhosszon az abszorbancia egyenesen arányos a koncentrációval és így az UV-VIS spektrofotometriás módszer az anyag érzékeny kvantitatív meghatározására alkalmasnak bizonyult. A mérés szelektivitását az biztosította, hogy a diklofenák-nátrium elnyelési tartományában (280 nm-en) egyéb komponens nem ad jelet.

5.4 Citotoxicitási vizsgálatok

A citotoxicitás vizsgálatok során két modell került alkalmazásra: a PASP-*l*-NIPAAm kotérhálós hidrogél sejttoxicitási mérése Caco-2 sejtvonalon és a humán epithél sejtek PASP-*l*-NIPAAm kotérhálós hidrogél felületén történő növesztése.

A PASP-*l*-PNIPAAm gélek sejttoxicitási mérése: Az LDH teszt, amely a membránkárosodott sejtekből felszabaduló laktát dehidrogenáz (LDH) mennyiségét méri és a sejtelhalás indikátoraként alkalmazható. Az LDH enzim mérése a kereskedelmi forgalomban lévő LDH kittel történt.

Humán epithél sejtek PASP-*l*-NIPAAm gél felületén történő növesztése: A PASP-*l*-NIPAAm géleket egy 24-lyukú lemezen szilikon zsírral rögzítettük. A szilikonzsírt vékony rétegben a lemez lyukainak alján oszlattuk el, majd ezt követően a rendszert újrasztileztük plazmasterilezővel. A PASP gélekből 1,5 cm átmérőjű korongokat vágtunk ki. Az így előkészített mintát a lemez lyukaiba helyeztük. Az üveg fedőlemezek és a géلكorongok egy részét patkányfarok kollagénnel vontuk be.

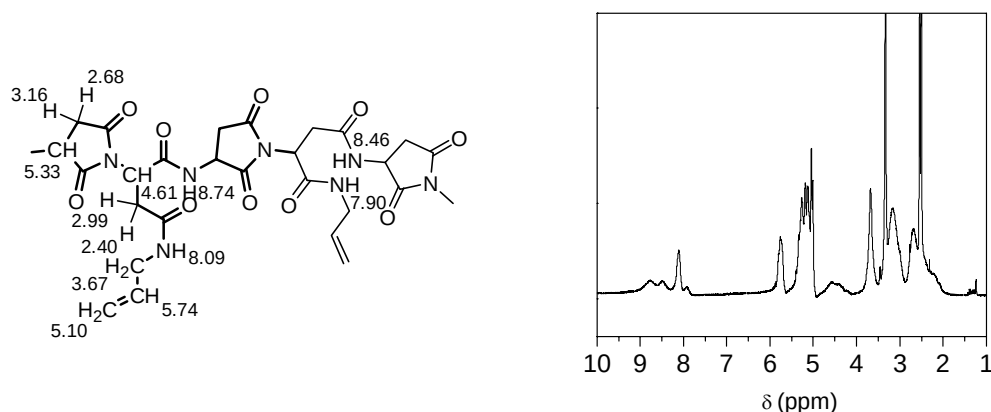
6 Eredmények

6.1 Az optimális gél kiválasztása

Az általam létrehozott kotérháló új, az irodalomban nem ismeret rendszer, ezért szükség volt az általam kitűzött felhasználásnak megfelelően a kotérháló fizikai-kémiai, illetve mechanikai tulajdonságainak optimalizálására. A kísérleti munka során a következő paramétereket változtattam a gél tulajdonságainak optimalizálásához: a PSI allil-aminnal illetve etanolaminnal történő módosítási aránya, a PNIPAAm/PSI tömegaránya, a PNIPAAm és a PSI polimerek koncentrációja.

A kotérhálók DMSO-s közegű előállításánál az tapasztaltuk [1], hogy a PSI allil-aminnal történő módosítása lehetővé teszi, hogy gyökös polimerizáción keresztül a NIPAAm beépülésével PSI-*l*-PNIPAAm kotérháló jöjjön létre. A NIPAAm polimerizációjának kezdőpontja és lánceleme is lehet a PSI láncról lelógó allil-csoport.

A módosítás végbemeneteléről ^1H -NMR vizsgálatokkal győződtem meg, mely a 17. ábrán látható.



17. ábra: Allil-aminnal módosított PSI szerkezete és ^1H -NMR spektruma

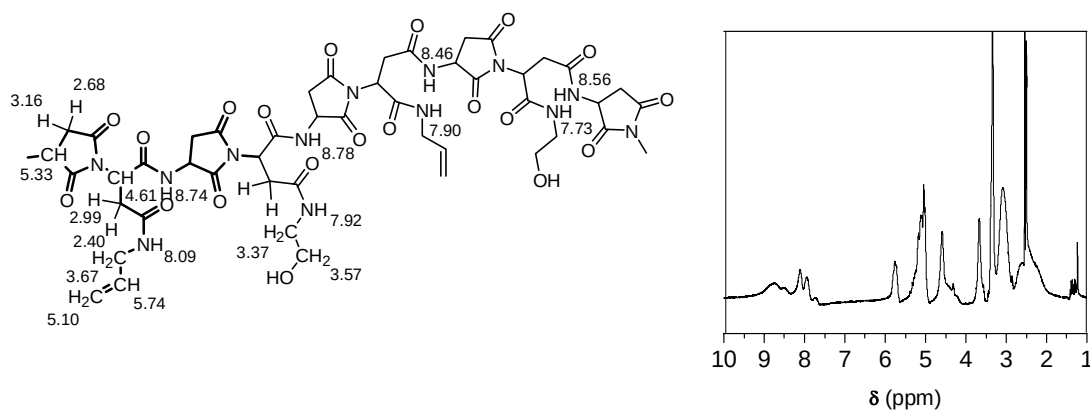
Az 17. ábrán látható 3,16 és 2,68 ppm körüli jelek a PSI karbonil csoport melletti szénatomról lelógó hidrogéneket jelölik. Az allil-amin metilén ($\text{CH}_2=$) csoportjának hidrogén jelei 5,1 ppm körül jelennek meg közvetlenül a szukcinimid gyűrű metin ($-\text{CH}-$) (5,33 ppm) valamint a poliszukcinimid elágazási helyén található metin szénhez kapcsolódó hidrogén jele mellett ($-\text{CH}-$) (4,61 ppm). A felnyílt és zárt gyűrűk jeleinek intenzitásából határozzuk meg a módosítási arányt. A PSI módosítási aránya befolyásolja a gélesedés kimenetelét. A 20 mol%-os módosítás esetén a NIPAAm jelenlétében végzett gyökös polimerizáció során már

gélesedtek a polimer oldatok. Nagyobb módosítási arány alkalmazása nem célszerű, mert a PSI és a PASP pH-érzékenysége nem érvényesül a kotérhálóban. Továbbá a nagy allil-amin koncentráció a PNIPAAm láncok hosszát csökkenti, és kisebb polimerizációs fokú PNIPAAm láncszakasz jön létre. Ez a PNIPAAm hőmérsékletérzékenységének a lerontásához vezetne.

A fenti tapasztalatokból tehát tudjuk, hogy a 20 mol %-ban allil-aminnal módosított polimerből kedvező mechanikai tulajdonságú gélek önthetők, ami azt jelenti, hogy a gél képes 10%-os alakváltozást reverzibilisen elszenvedni.

A vizes közegű térhálósítás megvalósításának első lépéseként a PSI vízdoldhatóvá tételét és a lelógó allil-csoportokkal történő módosítást kellett megoldani úgy, hogy az oldhatóságot biztosító csoportokon kívül, a gélesedéshez szükséges és elégséges mennyiségű kettős kötést alakítsunk ki a PSI láncokon. A vízdoldhatóságot a polimerlánc etanolaminnal történő módosításával kívántam elérni. Megállapítottam, hogy a vízdoldhatóságot nem csak az etanolaminnal történő módosítás mennyisége, hanem az allil-aminnal és etanolaminnal történő módosítás együttesen is befolyásolja.

Oldhatósági próbák alapján megállapítottam, hogy a 40 mol % -ban módosított PSI (20 mol%-ban allil-amin, 20 mol%-ban etanolamin) már jól és megfelelő mennyiségben oldódik vizes közegben ahhoz, hogy gél állítsunk elő. A vízdoldható PSI ^1H -NMR spektruma látható a 18. ábrán.



18. ábra: Allil-aminnal és etanolaminnal módosított PSI szerkezete és ^1H -NMR spektruma

A 18. ábrán látható, hogy az allil-aminnal történő módosításhoz képest (17. ábra) megjelentek a hidroxietil csoportokhoz tartozó kémiai eltolódások. A hidroxietil csoport metilén csoportjainak eltolódásai ($-\text{CH}_2-$) 3,37; 3,57 ppm átfednek az allil-aminos módosítás metilén csoportjaival ($-\text{CH}_2-$) 3,67 ppm, valamint a szukcinimid gyűrű metilén csoportjával ($-\text{CH}_2-$) 3,16 ppm.

A továbbiakban, a gélek előállításához 20 mol%-ban allil-aminnal és 20 mol%-ban etanolaminnal módosított PSI-t használtam fel. Az optimalizálás további lépéseként a polimer összkoncentrációt tartottam állandó értéken úgy, hogy a NIPAAm/módosított PSI tömegarányát változtattam. Vizsgáltam, hogy a komponensek tömegaránya hogyan befolyásolja a gélesedés lejárásodását és a gélesedési időt, valamint, hogy a pH-, ill. hőmérsékletérzékenység hogyan érvényesül különböző arányok esetén.

Azok a gélek, melyekben a PSI tömege megegyezett a PNIPAAm tömegével, vagy annál nagyobb volt, a duzzadásfok pH-függése dominált. Azokban az esetekben, ahol a PNIPAAm/PSI tömegarány nagyobb volt, mint 1, a hőmérsékletérzékenység érzékelhetőbbé vált és hőmérséklet növelésének hatására szinerizáltak a gélek. A gélesedés és a hőmérsékletérzékenység szempontjából azok a gélek a megfelelőek, melyekben a gélen belüli PNIPAAm tömege nagyobb a módosított PSI-hez képest.

A NIPAAm/PSI = 60/40 tömegarányú gél minden elvárásnak eleget tesz, ezért a további méréseket ezen a gélen végeztem. A kiválasztott gél multireszponzív, mert hidrolízis után jelentős pH- és hőmérsékletérzékenysége van, pH = 3 pufferbe szinerizál, pH = 8 pufferben megduzzadt, valamint fázisátalakulási hőmérséklet felett szinerizált és elfehéredett.

Az optimális PSI-*l*-PNIPAAm tömegarány és a polimerek térhálósági foka ismeretében vizsgáltam, hogy a polimerek összkoncentrációjának változtatása hogyan módosítja a gélek tulajdonságait. Megállapítottam, hogy a 12,5 m/m% polimer összkoncentráció optimálisnak tekinthető, mert alacsonyabb koncentráció esetén túl lágy és nehezen kezelhető, magasabb polimer összkoncentráció esetén pedig merev, mechanikailag sérülékeny géleket kaptam.

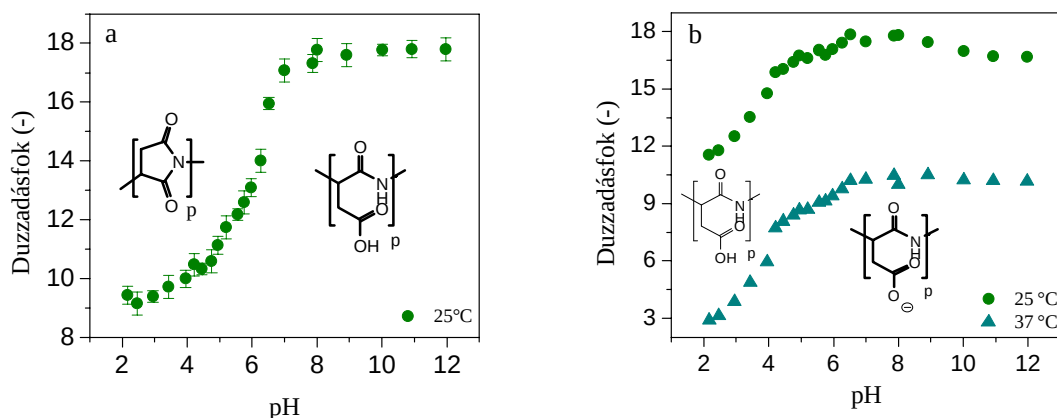
Az optimális gél összetétel tehát:

PSI/ NIPAAm mól arány	1,600
PSI/ NIPAAm tömeg arány	40/60
Polimer összkoncentráció	12,5 %
PSI módosítás allil-aminnal és etanolaminnal	20-20 %

3. táblázat: Az előállított kotérháló összetétele

6.2 A duzzadásfok pH-érzékenységének a vizsgálata

A 19.a ábrán a PSI-*l*-PNIPAAm gélek egyensúlyi duzzadásfoka 25 °C-on a 19.b ábrán a PASP-*l*-PNIPAAm gélek egyensúlyi duzzadásfoka látható 25 °C és 37 °C-on a pH függvényében.



19. ábra: (a) PSI-I-PNIPAAm és (b) PASP-I-PNIPAAm hidrogélek egyensúlyi duzzadásfoka különböző pH-jú puffer oldatokban és hőmérsékleten

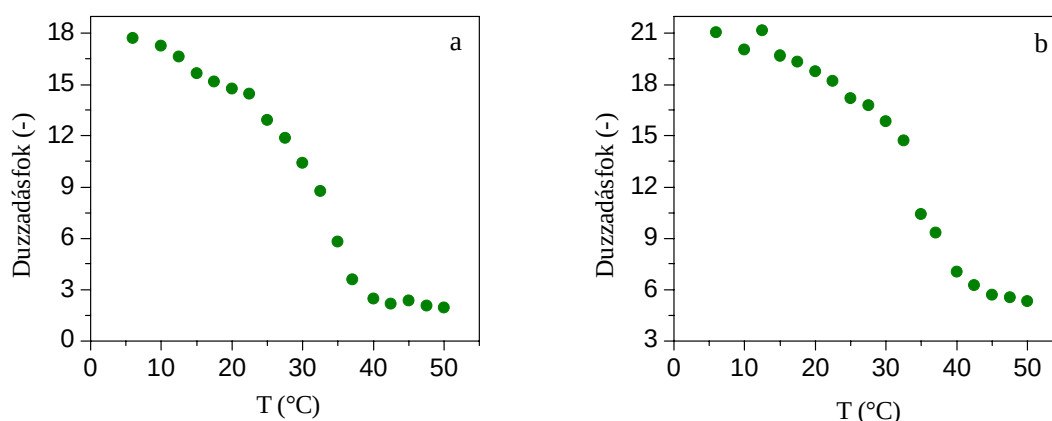
Az 19.a ábrán megfigyelhető, hogy pH = 6 körüli tartományban a PSI-I-PNIPAAm hidrogélek jelentős térfogatváltozást szenvednek. A tapasztalt egyensúlyi duzzadásfok – a duzzadt hidrogél egyensúlyi tömegének és a kiszáritott hidrogél tömegének hányadosa – növekedés a hidrogélt alkotó PSI láncok szerkezetéből adódik. Ahogy az irodalomból ismert PSI-DAB gélek esetében is tapasztaltuk, pH = 7,3 alatt a PSI lánc szukcinimid gyűrűi zárt formában vannak jelen, ennél lúgosabb közegben a szukcinimid gyűrűk felnyílnak, és a polimer lánc elhidrolizál, poliaszparinsavvá alakul. A képződő polielektrolit gél láncai lúgos közegben jól szolvatálódnak, a hidrogél megduzzad. Ez az ún. „PSI-PASP átmenet” irreverzibilis folyamat. Az 19.a ábrán látható, hogy ez az átmenet (inflexió) PSI-I-PNIPAAm kotérhálók esetében pH = 6-ra tolódik, ugyanis a korábbi láncmódosítás során felnyitott gyűrűk elősegítik, hogy már alacsonyabb pH értéknél meginduljon a hidrolízis.

A poliszukcimidből készült gél savas közegben hidrofób karakterű, míg semleges és lúgos oldatban az irreverzibilis kémiai reakció lejátékozása után hidrofíllé válik. A kialakult hidrofíll PASP-I-PNIPAAm hidrogélek duzzadásfokának jelentős változása pH = 4,5 körül mérhető (19.b ábra), ami az aszparaginsav disszociációs állandójára ($pK_{a\alpha} = 3,3$, $pK_{a\beta} = 4,5$) vezethető vissza. A két disszociációs állandó értéke nem válik el. A PASP alapú gélekben pH = 4,5 érték alatt a szabad karboxil csoportok protonáltak, a gél neutrálisnak tekinthető láncok alkotják, míg pH = 4,5 felett a karboxil csoportok deprotonáltak, disszociáltak formában vannak jelen és a töltéssel rendelkező láncok miatt a duzzadásfok jelentősen megnő.

A hidrogélek hőmérsékletfüggését a duzzadásfokok jelentős csökkenése igazolta, miközben a környezet hőmérsékletét 25 °C-ról 37 °C-ra emeltem (19.b ábra). Ennek oka az, hogy a kotérhálót alkotó PNIPAAm láncok vizes fázisban a fázisátalakulási hőmérséklet alatt

szolvatált állapotban vannak jelen, míg az LCST értéke felett nem, vagy csak részben oldódnak. Ekkor a hidrogélek a hőmérséklet emelésével egy hidrofil, duzzadt állapotából, egy viszonylag hidrofób, kis duzzadásfokú állapotba mennek át, elveszítve víztartalmuk jelentős részét. A PNIPAAm gélek térfogatváltozása a testhőmérséklet közelében, egy igen szűk hőmérséklettartományban játszódik le. Ez a térfogati fázisátalakulás a PASP pH-függéséhez hasonlóan megfordítható folyamat.

6.3 A duzzadásfok hőmérsékletérzékenységének vizsgálata



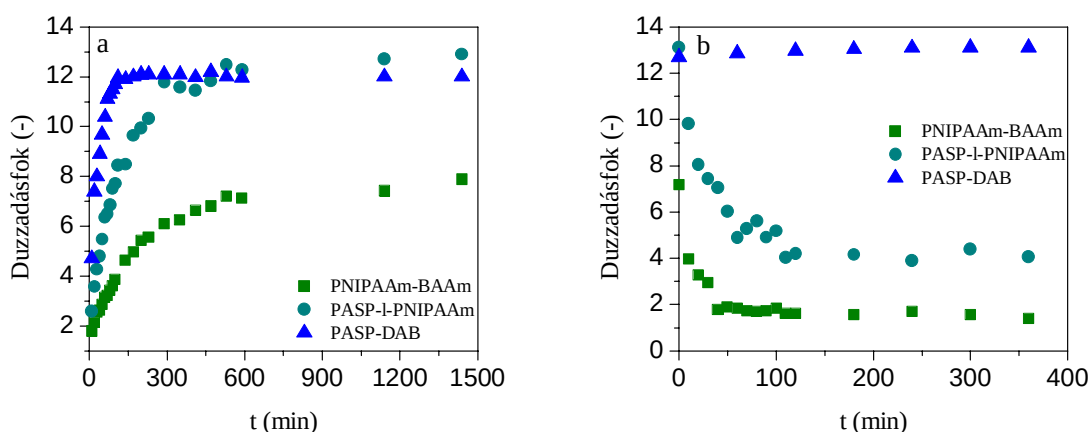
20. ábra: A PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélek egyensúlyi duzzadásfokának hőmérsékletfüggése (a) pH = 3 és (b) pH = 8 puffer oldatokban

A 20.a és a 20.b ábrán az általunk vizsgált kotérhálók duzzadásfokának hőmérsékletfüggései láthatók. Láthatjuk, hogy a hőmérséklet függvényében bekövetkező duzzadásfok csökkenés nem ugrásszerű, mint ahogy az a PNIPAAm géleknél ismert [3]. Egy nyújtott inflexióval rendelkező görbét kapunk, ami PNIPAAm kopolimerizációjának következménye. A PNIPAAm lánc a PSI lánchoz az allil-amin csoportokon keresztül kapcsolódik, így az allil-amin egység a PNIPAAm szempontjából komonomerként fogható fel. A PNIPAAm kopolimerizációja mindig a fázisátalakulás hőmérséklet intervallumának kiszélesedését eredményezi. Látható, hogy pH = 3 pufferben (20.a ábra), amikor a PASP neutrális, az emberi test hőmérsékletén (37 °C) már lejátszódik a fázisátalakulás, míg pH = 8 pufferben (20.b ábra), ahol a PASP polielektrolit, 37 °C-on ez a folyamat még csak részleges. A teljes fázisátalakulás 45 °C-on fejeződik be. Ezzel azt bizonyítottam, hogy a duzzadásfokot a pH és a hőmérséklet együttesen határozzák meg.

6.4 A gélek duzzadáskinetika vizsgálta a környezeti pH és hőmérséklet függvényében

A 21. ábra a PASP-*l*-PNIPAAm, PNIPAAm-BAAm, és a PSI-DAB kiszárított gélek duzzadáskinetika (a) és szinerézisének kinetika (b) vizsgálatát mutatja.

A duzzadás kinetika vizsgálat során (21.a ábra) a kiszárított géleket 25 °C-on, pH = 7,6-os foszfát pufferben (PBS) visszaduzzasztva azt tapasztaltuk, hogy a PASP-DAB hidrogél gyorsabban duzzad meg, mint a NIPAAm-BAAm gélek. Ez a PASP hidrofíliájával magyarázható, továbbá azzal, hogy a PASP-alapú hidrogél pH = 7,6 PBS-ban már disszociál, így a gél pórusainak mérete megnövekedik, melynek következtében a vízmolekulák diffúziója könnyebben megy végbe, mint a PNIPAAm-BAAm hidrogélek esetében.



21. ábra: PSI-*l*-PNIPAAm kotérhálós hidrogélek (a) duzzadáskinetika és (b) szinerézisének vizsgálata pH = 7,6-ban, 25 °C-on

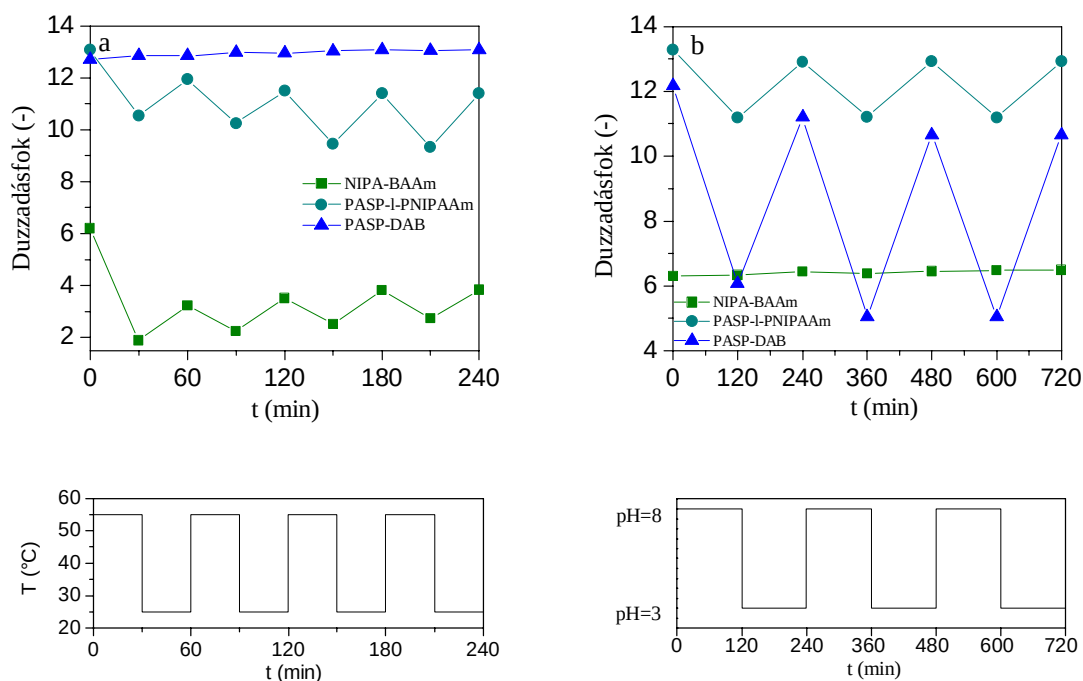
A PASP-*l*-PNIPAAm kotérhálós hidrogél duzzadási sebessége, és a duzzadásfoka várhatóan a PNIPAAm és a PASP hidrogél mérési adatai közé esik.

A 21.b ábra a PASP-*l*-PNIPAAm, a PNIPAAm-BAAm, és a PSI-DAB hidrogélek szinerézisének kinetikáját mutatja pH = 7,6 foszfát pufferben, 50 °C-on (a PNIPAAm LCST-je felett) termosztálva. A PNIPAAm-BAAm hidrogél duzzadásfokában látható, hogy 50 °C-on már 40 perc után beállt az egyensúly, láthatóan lejátszódott a PNIPAAm fázisátalakulása. A PASP-*l*-PNIPAAm kotérhálós hidrogélek esetében az egyensúly már csak 100 perc után áll be, míg a PASP-DAB gél nem mutatott jelentős hőmérsékletfüggést.

6.5 A gélek oszcillációs duzzadás-szinerézis vizsgálata a pH és a hőmérséklet függvényében.

Az 22. ábrák az PASP-*l*-PNIPAAm kotérhálós hidrogél duzzadásfokának reverzibilis hőmérséklet és pH-függését mutatja, összevetve a PNIPAAm-BAAm és a PASP-DAB hidrogélek duzzadási viselkedésével.

Az különböző hidrogéleket foszfát pufferben (PBS) 25 °C és 50 °C-on felváltva termosztáltuk 30-30 percig (22.a ábra) és azt tapasztaltuk, hogy a hőmérsékletérzékeny PNIPAAm-alapú gél rendelkezik a legkisebb duzzadásfokkal, valamit szenved a legnagyobb mértékű szinerézist. Ez a jelenség megegyezik a szinerézis kinetika vizsgálatnál tapasztaltakkal. A PASP-DAB gél várhatóan nem mutatott reverzibilis hőmérsékletfüggő változást.

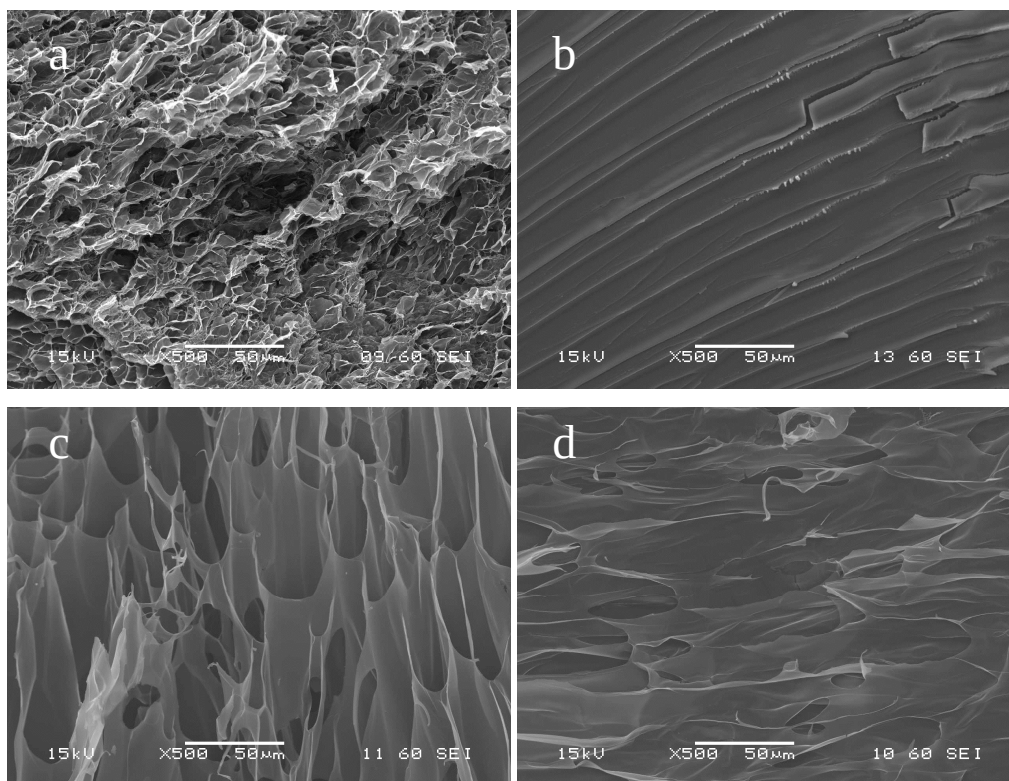


22. ábra: PSI-*l*-PNIPAAm kotérhálós hidrogélek oszcillációs duzzadás-szinerézis kinetika vizsgálata különböző (a) hőmérsékleten és (b) pH-jú puffer oldatokban

A hidrogéleket pH = 3 illetve pH = 8 pufferben felváltva duzzasztva (22.b ábra) látható, a PNIPAAm-alapú hidrogél nem mutatott pH-függést, míg a PASP-DAB hidrogél a PASP polielektrolit jellege miatt reverzibilis térfogatváltozást szenvedett. A fenti kísérleti eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a multireszponzív PASP-*l*-PNIPAAm kotérháló térfogatváltozása a környezeti pH és T megváltozásának a hatására reverzibilis és többször megismételhetőek, ezért a gélen belüli transzportfolyamatok előre programozhatók.

6.6 A kotérhálók morfológiai vizsgálata

6.6.1 A hőmérséklet hatása a PSI-*l*-PNIPAAm és a PASP-*l*-PNIPAAm gélek szerkezetére



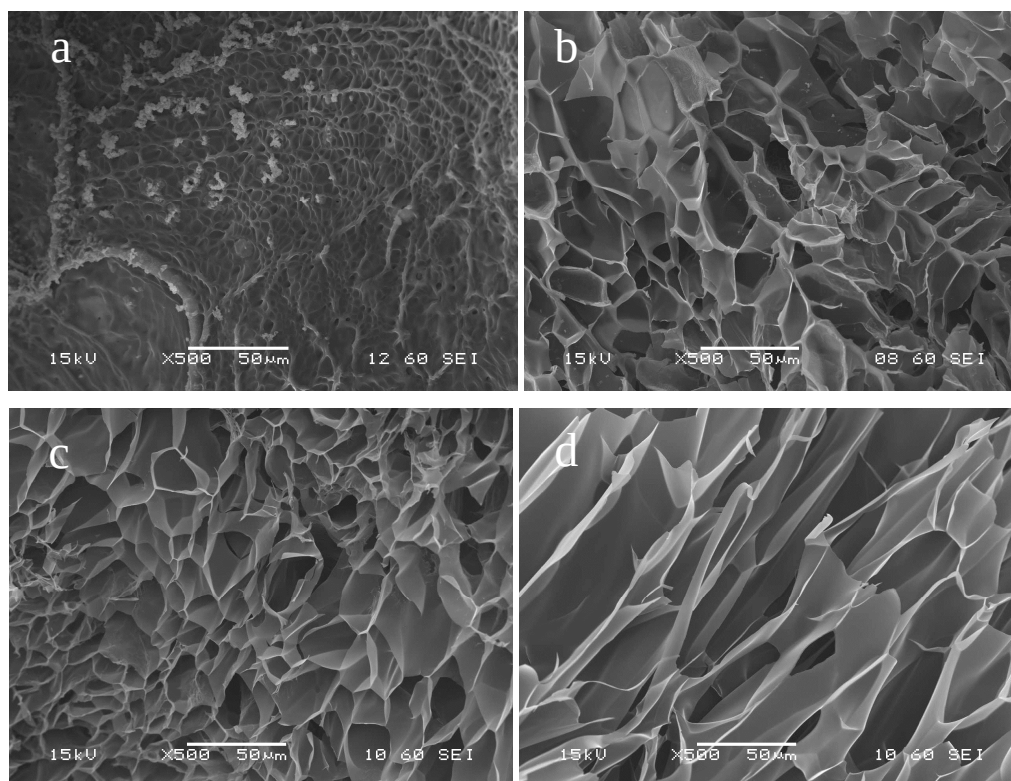
23. ábra: A PSI-*l*-PNIPAAm és PSI-*l*-PNIPAAm hidrogélek vízben duzzasztva, különböző hőmérsékleteken; (a) PSI-*l*-PNIPAAm vízben, $T = 25\text{ °C}$ (500x), (b) PSI-*l*-PNIPAAm vízben, $T = 50\text{ °C}$ (500x), (c) PASP-*l*-PNIPAAm vízben, $T = 25\text{ °C}$ (500x), (d) PASP-*l*-PNIPAAm vízben, $T = 50\text{ °C}$ (500x)

A SEM vizsgálatok alapján megállapítható (23. ábra), hogy mind a PSI-*l*-PNIPAAm, mind a PASP-*l*-PNIPAAm gélek esetében a hőmérsékletet szobahőmérsékletről (25 °C) a PNIPAAm fázisátalakulási hőmérséklete fölé emelve (50 °C), a gélek szerkezete jelentősen megváltozik. A 25 °C -on nyitott pórusok 50 °C -on bezáródnak, elmosódnak, a gél egy sokkal kompaktabb szerkezetet vesz fel.

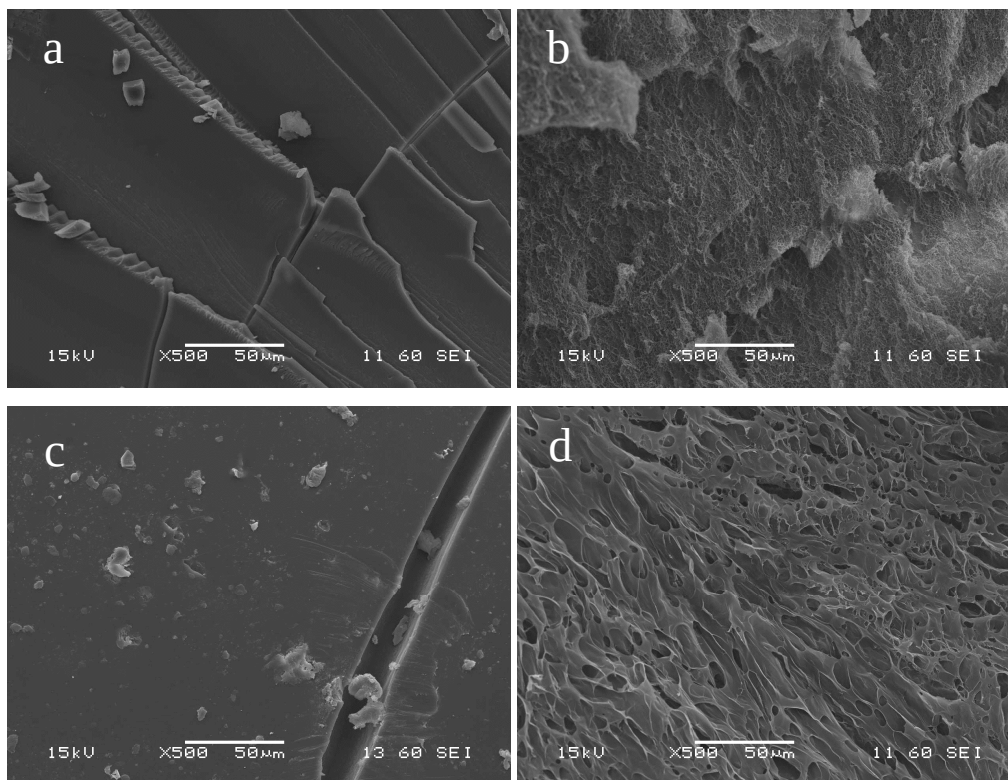
A PSI és PASP hidrogélek szerkezetbeli eltérése is látható a felvételeken, melynek következményét már a duzzadásfok vizsgálatoknál is tapasztaltuk (19.a ábra). A PASP hidrogél sokkal nyitottabb pórusokkal rendelkezik, mint a PSI, mely a PASP láncban lévő felnyitott szukcinimid gyűrűk következménye.

6.6.2 A pH valamint az alkalmazott duzzasztószer ionerősségének hatása a PASP-*l*-PNIPAAm gélek szerkezetére

A gélek SEM vizsgálata során kapott eredmények alátámasztják a gélek duzzadásából kapott eredményeket, mely szerint a gélek savas pH-n kisebb duzzadásfokkal rendelkeznek, mint lúgos pH-n (24. ábra). Lúgos, pH = 8 és pH = 11 értéken a gélek pórusai kitágulnak, miközben a gél térfogata, illetve duzzadásfoka többszörösére nő.



24. ábra: A PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélek különböző pH-jú és ionerősségű oldatokban 25 °C-on, (a) PASP-*l*-PNIPAAm pH = 3 citromsavas puffer oldatban (500x); (b) PASP-*l*-PNIPAAm pH = 8 imidazol puffer oldatban (500x); (c) PASP-*l*-PNIPAAm pH = 3 HCl-oldatban (500x); (d) PASP-*l*-PNIPAAm pH = 11 NaOH-oldatban (500x);

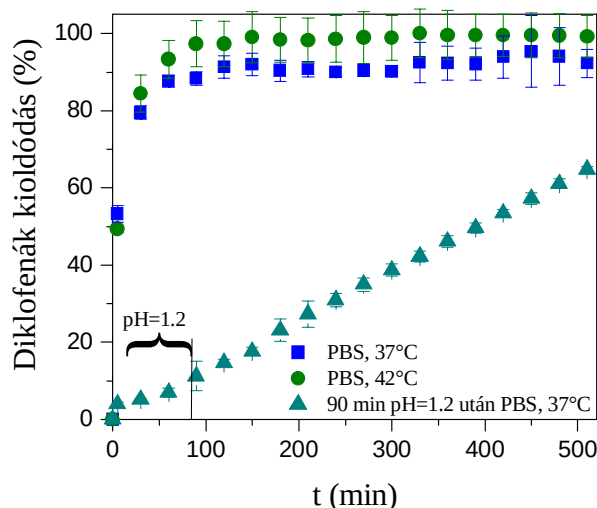


25. ábra: A PASP-*I*-PNIPAAm hidrogélek különböző pH-jú és ionerősségű oldatokban 50 °C-on, (a) PASP-*I*-PNIPAAm pH = 3 citromsavas puffer oldatban (500x); (b) PASP-*I*-PNIPAAm pH = 8 imidazol puffer oldatban (500x); (c) PASP-*I*-PNIPAAm pH = 3 HCl-oldatban (500x); (d) PASP-*I*-PNIPAAm pH = 11 NaOH-oldatban (500x);

A 25 °C-on vizsgált kotérhálók esetében tett megállapítások érvényesek 50 °C-on is. A pH = 8 puffer oldatban duzzasztott gélek tágabb pórusokkal rendelkeznek, mint pH = 3 puffer oldatban, valamint az ionerősség lecsökkentésével a gélek duzzadásfoka megnövelhető. Továbbá megfigyelhető, hogy a PNIPAAm fázisátalakulási hőmérséklete felett, a gélek kompakt tömör szerkezetet vesznek fel, a gél pórusai összehúzódnak (25. ábra). Alacsony pH-n tömör, egységes felületeket kapunk, míg lúgos pH-kon a szerkezet pórusai a 25 °C-on mért pórusok méretének töredékei. Az ionerősség hatása itt kisebb mértékben érvényesül, ugyanis elnyomja a PNIPAAm szerkezetének megváltozása.

6.7 Kioldódás vizsgálatok

A kioldódás vizsgálatokat PASP-*I*-PNIPAAm hidrogélekből az emberi test hőmérsékletén, 37 °C-on és egy lázas betegnek „megfelelő” testhőmérsékleten, 42 °C-on végeztük diklofenák-nátrium nem szteroid típusú gyulladáscsökkentővel, mint modell hatóanyaggal (26. ábra).



26. ábra: Diklofenák-nátrium kioldódása PASP-*I*-PNIPAAm hidrogélekből 37 °C és 42 °C-on foszfát pufferben (pH = 7,6) és savas előkezelés (pH = 1,2) után foszfát pufferben (pH = 7,6) 37 °C-on

Az 26. ábrából megállapíthatjuk, hogy a diklofenák-nátrium pH = 7,6 foszfát pufferes (PBS) oldatában visszaduzzasztással nyert gélekből a kioldódott hatóanyag mennyisége 37 °C-on kevesebb, mint a PNIPAAm fázisátalakulása feletti hőmérsékleten 42 °C-on. Ez azzal magyarázható, hogy a PNIPAAm fázisátalakulása során bekövetkező térfogatcsökkenés - a kipréselő hatás révén - a gélbe zárt hatóanyagot gyorsabb kioldódásra készíti, tehát a hőmérséklet jelentős hatással van a kioldódás kinetikájára. Az ábrán látható, hogy csak PBS közegben történő kioldódás esetén a leadott hatóanyag tömege (mg) már 120 percnél (2h) eléri a maximális értéket.

A 26. ábrában háromszöggel jelölt kioldódás első 90 percét pH = 1,2 HCl oldatban, majd a további hatóanyag-leadást szintén PBS közegben végeztük. Jól látható, hogy a savas előszakasz (90 min) után a gélekből történő hatóanyag-kioldódás megnő, de még 520 percnél sem éri el azt a maximumot, amit csak PBS közegben már 120 percnél tapasztaltunk.

Az általunk kifejlesztett PASP-*I*-PNIPAAm multireszponzív hatóanyag-hordozó rendszer tehát a gyomorsav pH-ján magában tartja a diklofenák-nátriumot, majd a pH-t a vékonybélben található értékre emelve a PASP-*I*-PNIPAAm hidrogélek kismértékben megduzzadnak, ami a hatóanyag felgyorsuló leadását idézi elő. A PASP-*I*-PNIPAAm hidrogélek alkalmazásával a hatóanyag-leadás tehát gyakorlatilag nem megy végbe a gyomorban és lelassul a vékonybélben. Az azonos módon alkalmazott, hagyományos hatóanyag-hordozó rendszerekhez képest, ezzel az elnyújtott hatóanyag-leadással növelhető a hatástartam és csökkenthető a mellékhatások veszélye.

6.8 PASP gélek sejttöxicitásának vizsgálata

A citotoxicitás vizsgálatokhoz két modellt alkalmaztunk. Egyik a PASP-*l*-PNIAAm kotérhálós hidrogél sejttöxicitási mérése Caco-2 sejtvonalon és a humán epithél sejtek növesztése a hidrogél felületén.

A sejttöxicitási vizsgálatok eredménye kimutatta, hogy a vizsgált PASP-*l*-PNIAAm gélek 24 óra után nem károsították a Caco-2 epitél sejteket. A PASP-*l*-PNIAAm kotérhálók a PASP-DAB gélekhez hasonlóan a pozitív kontroll csoportnak megfelelő értékeket mutattak mind a laktát dehidrogenáz (LDH) felszabadulás és az XTT festékkonverzió mérésnél. A negatív kontrollunk a Triton X-100-al kezelt sejtek voltak, amelyek a kezelés hatására elpusztultak. Az XTT festékkonverzió kinetikája szintén nem mutatott szignifikáns különbséget a pozitív kontroll és a PASP-al kezelt csoportok között. Az eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált PASP gélekből nem oldódnak ki a humán epithél sejtekre káros anyagok.

Epithél sejtek PASP gélek felszínén történő növekedésének vizsgálata kimutatta, hogy a Caco-2 sejtek könnyen tapadnak a műanyag csészéhez, valamint az üveg fedőlemezhez, azonban a vizsgálataink során a patkány fark kollagénnel bevont és nem bevont különféle PASP gélek felületén nem tapadtak le és nem nőttek a sejtek. A kísérlet alatt a PASP-*l*-PNIAAm kotérhálós hidrogél jelentős zsugorodást mutatott a tápoldatban, aminek következtében a sejtek a kis felszínű gélkorongra nem tudtak hozzátapadni. Bár az epithél sejtek nem tapadtak a PASP-*l*-PNIAAm kotérhálós gélre, de a lemez műanyag lyukinak aljára kitapadtak és nőttek a gél jelenlétében, ami megerősíti azt, hogy ezek a gélek nem toxikusak a humán sejtekre.

Összességében tehát elmondható, hogy a gélek nem bizonyultak toxikusnak a humán Caco-2 sejtvonalra és tulajdonságaik alapján olyan alkalmazásokban használhatók fel, ahol a sejtek összetapadása hátrányos és elkerülendő. Ezen biokompatibilis gélek alkalmazhatók lehetnek abdominális vagy más sebészeti beavatkozások utáni adhéziók megakadályozására. Vizsgálatra kerültek a kutatócsoport módosított PASP géljei is, amelyek szintén nem voltak toxikusak a Caco-2 sejtvonalra, de a sejtnövesztési vizsgálatokban az előzőekkel ellentétben a géleken a sejtek növekedtek. Ezen rendszerek alkalmasak lehetnek sejtenyészetekből szövettenyészetek előállítására.

7 Összefoglalás

Munkám során a pH-érzékeny poliaszparaginsav (PASP) és a hőmérsékletérzékeny poli(N-izopropilakrilamid) tulajdonságait ötvözve sikerült előállítanom vizes közegben egy teljesen új, eddig még nem vizsgált kotérhálós szerkezetű hidrogélt. Két polimer tulajdonságainak kombinálására a két polimer egymásra építésével nyert kotérhálós rendszerek kiválóan alkalmasak.

A szintézis során elsőként a poliszukcinimidet (PSI) állítottam elő polikondenzációs reakcióval. A PSI-t, mint alap polimert sikeresen módosítottam vízzoldhatóságot biztosító etanolaminnal illetve telítetlen kötést tartalmazó allil-aminnal. Vizsgáltam, hogy a láncmódosítás hogyan befolyásolja a gélesedés eredményét. Megállapítottam, hogy amennyiben az egy PSI láncon lévő funkcionálisok száma egy bizonyos határérték alá csökken, akkor a gélesedés nem játszódik le, valamint, ha nem elegendő a hidrofil csoportok mennyisége (hidroxietil) a polimer nem oldódik megfelelő mértékben vizes közegben. Optimális kiindulási PSI vízzoldhatóvá tételéhez és gélesedéséhez a 20 mol%-ban etanolaminnal és 20 mol%-ban allil-aminnal módosított PSI polimert találtam megfelelőnek, melyre gyökös polimerizációban a PNIPAAm láncok ráépíthetők.

Vizsgáltam a géleket alkotó NIPAAm/PSI tömegarányok gélesedésre, mechanikai tulajdonságra, valamint fizikai – kémiai tulajdonságra gyakorolt hatását. A hőmérsékletérzékenység csak abban az esetben érvényesül, ha a gél alkotó vázban a NIPAAm/PSI tömegarány egynél nagyobb. Az előkísérleteket figyelembe véve, a további vizsgálatokhoz kiválasztottam egy minden tulajdonságában kedvező gél.

A kotérhálós hidrogélek hőmérséklet és pH-érzékenységet az egyensúlyi duzzadásfok meghatározásával vizsgáltam. Az kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy az általam előállított kotérhálós hidrogélek duzzadásfoka előre programozható a gél összetételével.

Az előzetes kioldódás vizsgálatok során sikerült elnyújtott hatóanyag-leadást megvalósítanom diklofenák-nátrium, nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő modell hatóanyag alkalmazásával.

8 Irodalomjegyzék

- 1 Solti K. *Szakdolgozat BME, Budapest* **2010**
- 2 Antal I., Klebovich I. *LAM* 2008, 18, 783-789.
- 3 Flory P.J. *Faraday Discussion of the Chemical Society* 1974, 57, 7-18.
- 4 Feil H., Bae, Y.H., Feijen J., Kim S.W. *Journal of Membrane Science* **1991**, 64, 283-294.
- 5 Gandhi M.V., Thompson B.S. *Smart materials and structures, Chapman and Hall* **1992**.
- 6 Zrínyi M. *Mindentudás Egyeteme* 16. előadás **2003**
- 7 Zrínyi M. *Magyar Tudomány* **1999**, 697-704.
- 8 Gyenes T. *PhD értekezés, BME, Budapest* **2007**
- 9 Lowman A.M., Morishita M., Kajita M., Nagai T., Peppas N.A. *Journal of Pharmaceutical Science* **1999**, 88, 933-937.
- 10 Collins D., Litzinger D.C., Huang L. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1990**, 1025, 234-242.
- 11 Hafez I.M., Ansell S., Cullis P.R. *Biophysical Journal*, **2000**, 79, 1438-1446.
- 12 Rácz I., Antal I., Plachy J. *Pharmazie*, **1996**, 51, 323-327.
- 13 Rácz D., Dr. Nagy M., Dr. Zsuga M., Dr. Kéki S. *Műanyag és gumi* **2012**, 49, 149-153.
- 14 Onishi H., Machida Y. *Biomaterials* **1999**, 20, 175-182.
- 15 Balamuralidhara V., Pramodkumar T.M., Srujana N., Venkatesh M.P., Vishal N. G., Krishna K.L., Gangadharaopa H.V. *American Journal of Drug Discovery and Development* **2011**, 1, 24-48.
- 16 Saima A., Saeid R. and Kanchan K. *Scientific Research and Essay* **2009**, 3, 1175-1183.
- 17 Ward M. A. , Theoni K. G. *Polymers* **2011**, 3, 1215-1242.
- 18 Shild H.G., Tirrell D.A. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, 94, 4352- 4356.
- 19 Carlsson A., Karlström G., Lindman B. *Colloids and Surfaces* **1990**, 47, 147-165.
- 20 Carlsson A., Karlström G., Lindman B., Stenberg O. *Colloid and Polymer Science* **1988**, 266, 1031-1036.
- 21 Carlsson A., Lindman B., Watanabe T., Shirahama K. *Langmuir* **1989**, 5, 1250-1252.
- 22 Sarkar N. *Journal of Applied Polymer Science*, **1979**, 24, 1073-1087.

- 23 Zhang YQ, Tanaka T, Shibayama M. *Nature* **1992**, 360, 142-144.
- 24 Heymann E. *Transaction of the Faraday Society* **1934**, 31, 846-864.
- 25 Feil H., Bae Y.H., Feijen J., Kim S.W. *Macromolecules* **1993**, 26, 2496-2500.
- 26 Li J., Wang B., Wang Y.: *International Journal of Pharmacology* **2006**, 2, 513-519.
- 27 Chenite A., Bushmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 46, 39-47.
- 28 Jeong, B.; Gutowska, A. *Trends in Biotechnology* **2002**, 20, 305–311.
- 29 Kalagasidis K. M., Ilic M., Filipovic J. *Polymer Bulletin* **2009**, 63, 197-211.
- 30 Seok K. M., Soo H. K., Ji-Heung K. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2000**, 6, 276-279.
- 31 Andrade J. D. *ACS Symp. Ser. 631; American Chemical Society: Washington, DC. 1996*
- 32 Gyenes T., Torma V., Gyarmati B., Zrínyi M. *Acta Biomaterialia* **2008**, 4, 733-744.
- 33 Neri P., Antoni G., Benvenuti F., Colola F., Gazzei G. *Journal of Medicinal Chemistry* **1973**, 16, 893-897.
- 34 Giammona G., Carlisi B., Palazzo S. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry* **1987**, 40, 2813–2818.
- 35 Antoni G., Arezzini C., Cocola F., Gazzei G., Neri P. *II Farmaco Edizione Scientifica*. **1979**, 34, 146-156.
- 36 Yoichi T., Kurisawa M., Uyama H., Kakuchi T., Kobayashi S. *Chemical Communications*. **2003**, 106-107.
- 37 Watanabe E., Tomoshige N., Uyama H. *Macromolecular Symposia* **2007** 249-250., 509-514.
- 38 Takeuchia Y., Takashi T., Uyamaa H. *Polymers for Advanced Technology* **2011**, 22, 620–626.
- 39 Jong R. M., Young S. J., Dong J. Ch., Dukjoon K., Ji H. K. *Macromolecular Research* **2011**, 19, 515-518.
- 40 Jong R.M., Young H.P., Ji-Heung K. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, 111, 998–1004.
- 41 Jong R. M., Ji-Heung K. *Bulletin Korean Chemical Society* **2006**, 27, 1981-1984.
- 42 Umeda S., Nakade H., Kakuchi T. *Polymer Bulletin* **2011**, 67, 1285–1292.

- 43 Dr. Farkas F. *European Chemical News*, **2005**, 31, 8-21.
- 44 Schild H.G. *Progress in Polymer Science* **1992**, 17, 163–249.
- 45 Szilágyi A. *PhD értekezés BME, Budapest* **2005**
- 46 Tadashi T., Tokuhiko A.T. *Polymer* **2008**, 49, 525-533.
- 47 Gao Y., Xingmin J., Yihua Y., Hui D., Hual Z. *Journal of Wuhan University of Technoloty-Mater* **2009**, 571-574.
- 48 Wen F. L., Ying J. CH. *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, 82, 2487-2496.
- 49 Yan L.L., Zhang L., Xu F. *Chemical Engineering Journal* **2012**, 189-190.
- 50 Dotcheva D., Christo B. T. *Polymer Bulletin* **1999**, 42, 709-716.
- 51 Bulmus V. *Bioconjugate Chemistry* **2000**, 11, 78-83.
- 52 Lee H. Park T.G. *Biotechnology Progress* **1998**, 14, 508–516.
- 53 Kim H.K., Park T.G. *Enzyme and Microbioal Technology* **1999**, 25, 31–37.
- 54 Vernon B. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1999**, 10, 183–198.
- 55 Ahn Y.H. *US patent* **2001** US6103528
- 56 Iván B. *OTKA zárójelentés* **2004- 2008**
- 57 Dr. Szabó S., Dr. Iván B., Dr. Scherble J., Dr. Thomann R., Dr. Mülhaupt R. *Műanyag és gumi* **2009**, 12, 461-464.
- 58 Kali G. Á. *Doktori értekezés, ELTE, Budapest* **2009**
- 59 Zimmermanna J., Bittnerb K., Starkb B., M.ulhaupta R. *Biomaterials* **2002**, 23, 2127–2134.
- 60 Rimmer S., German M.J., Maughan J., Sun Y., Fullwood N., Ebdon J., MacNeil S. *Biomaterials* **2005**, 26, 2219-2230.
- 61 Bruns N., Bannwarth W., Tiller J.C. *Biotechnology Bioengineering*, **2008**, 101, 19-26.
- 62 He S., Yaszemski, M.J., Yasko A.W., Engel P. S.;Miklós A.G. *Biomaterials* **2000**, 21, 2389-2394.
- 63 Behraves E., Jo S., Zygorakis K., Mikos A.G. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 374.
- 64 Tanahashi K., Jo S., Mikos, A.G. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1030-1037.
- 65 Behraves E., Timmer M.D., Lemoine J.J., Liebschner A.K., Mikos A.G. *Biomacromolecules*, **2002**, 3, 1263-1270.
- 66 Isayeva I. S., Kasibhatla B.T., Rosenthal, K.S., Kennedy, J.P. *Biomaterials* **2003**, 24, 3483-3491.
- 67 Shamlou S., Kennedy J.P., Levy R.P. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, 35, 157-163.

- 68 Dr. Emmer J, Dr. Lovrity Z., Dojcsákné Kiss-Tóth É., Juhászné Szalai A. Koska P., Dr. Fodor B. *Egészségtudományi Közlemények* **2012**, 2, 25–31.
- 69 Maggi C.A., Lualdi P., Mautone G. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1990**, 38, 207–208.
- 70 Bálint G. *Golden Book Kiadó, Budapest*, **1997** p 23.