

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

Gyógyszerhordozó nanorészecskék előállítására és vizsgálata

DOBRÁDI ANITA

Környezettan BSc

4. évfolyam

Témavezető: Dr. Kiss Éva egyetemi tanár

Konzulens: Gyulai Gergő doktorandusz

Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Tanszék
Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———

——— Természettudományi Kar ———

— Budapest, 2012 —

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Irodalmi áttekintés	3
<i>Gyógyszerhordozók fajtái.....</i>	3
<i>Nanorendszerek előállítása.....</i>	6
Célkitűzés	8
Kísérleti rész	9
<i>Felhasznált anyagok</i>	9
<i>Nanorészecskék előállítása</i>	10
<i>Méretmeghatározás dinamikus fényszórás méréssel.....</i>	11
<i>Stabilitásvizsgálat.....</i>	12
<i>Hatóanyag tartalom meghatározás</i>	13
<i>Hatóanyag felszabadulás</i>	13
Eredmények	14
<i>Nanoszuszpenziók előállítása és jellemzése</i>	14
<i>Nanoszuszpenziók kolloid stabilitása</i>	18
<i>Hatóanyag tartalom</i>	19
<i>Hatóanyag felszabadulás</i>	23
Összefoglalás.....	25
Irodalomjegyzék.....	27

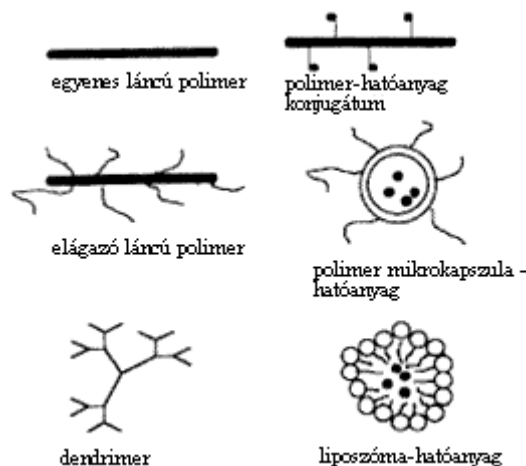
Irodalmi áttekintés

Az orvostudomány kezdete óta megoldandó probléma a gyógyszerek szervezetbe juttatásának módja, a hatóanyag eljuttatása a megfelelő helyre, illetve a lehető legkevesebb mellékhatással járó, alacsony, de hatásos dózis biztosítása a betegek számára. A hagyományos, hordozó nélküli hatóanyag bevitelnek számos hátránya van: előfordulhat, hogy a hatóanyag nehezen szívódik fel, nem jut el a megfelelő mennyiség a célszervbe. Emiatt nagyobb mennyiségű hatóanyag bevitele szükséges, esetenként gyakoribb adagolással. Ezek következményeként gyakoribbak és súlyosabbak lehetnek a mellékhatások is. Gyógyszerhordozó rendszer használatával ezek a kockázatok csökkenthetők, kiküszöbölhetők, segítségével a nem vízoldható hatóanyagok szervezetbe juttatása is megoldható. Továbbá a hordozó méretének és felületének szabályozásával a hatóanyag célszervbe való eljuttatása is megvalósítható, így mérsékelhető a szervezet többi részének szükségtelen gyógyszer-terhelése.

Gyógyszerhordozók fajtái

A kolloidális gyógyszerhordozókat két nagy csoportba lehet osztani. Az egyikbe, a polimer gyógyszerhordozók közé tartoznak a polimer mikro- és nanorészecskék, mikrogélek, dendrimerek (szabályos, elágazó szerkezetű, gömbszerű polimer molekulák) és a polimer-hatóanyag konjugátumok is. A másik nagy csoportba azok a gyógyszerhordozók tartoznak, amelyek kisebb egységek, molekulák spontán asszociációja útján keletkeznek, és többnyire rendelkeznek egy hatóanyag-szállításra alkalmas üreggel (pl. liposzóma). [1]

A többkomponensű polimer terapeutikumoknak szerkezet alapján való csoportosítását mutatja az 1. ábra:



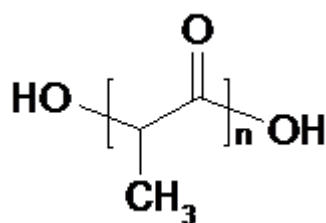
1. ábra: Polimer terapeutikumok

(Hudecz Ferenc: Polimer terapeutikumok. Magyar Tudomány, 1998.)

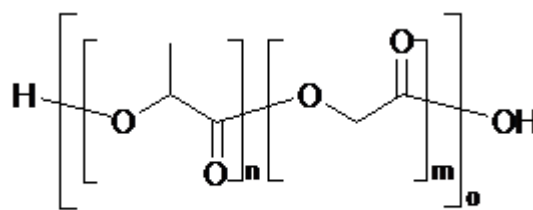
A lebomló polimer alapanyagú hordozók segítségével szabályozott hatóanyag-felszabadulást is el lehet érni, ami az adagolás gyakoriságát és a szükséges hatóanyag mennyiségét szintén csökkenti. Ha ismerjük a hordozó polimer fizikai, kémiai és szerkezeti tulajdonságait, megtervezhető, hogyan, milyen ütemben menjen végbe a lebomlás a szervezetben, ezáltal megvalósítható a hatóanyag felszabadulásának optimális sebessége a célszervben [1].

A biológiailag lebomló polimerek alkalmazása a gyógyászatban régóta bevált és széles körben elterjedt módszer. Ezeket az anyagokat az orvostudomány sokféle területen használja biokompatibilis implantátumok, ortopédiában alkalmazott rögzítők, lebomló sebtapaszkok, szálak (pl. sebvarró cérna) formájában [2, 3]. A biológiailag lebomló polimerek szintén orvosi célú felhasználása ezen anyagok gyógyszerhordozóként való alkalmazása.

A biodegradábilis polimerek között kiemelkedő jelentőségűek a poliészterek, különösképpen a poli-tejsav (PLA) és a poli-glikolsav (PGA), illetve ezek kopolimerjei (PLGA) igen elterjedtek. Nagy előnyük, hogy a bomlástermékeik nem toxikusak, a hatóanyag leadásakor a hordozó degradálódó anyaga nem károsítja a szervezetet és nem halmozódik fel. A keletkező tejsav a szervezet anyagcseréjének is terméke. A lebomlás sebessége a polimer összetételétől függ, így ezzel szabályozható, hogy a kapszulázott hatóanyag milyen gyorsan szabadul fel.



PLA



PLGA

2. ábra: PLA és PLGA szerkezeti képlete

Ezen polimerekből képződő részecskék felületi hidrofóbitása miatt gondot jelenthet, hogy a belőlük előállított gyógyszerhordozó nanorészecskék gyorsan kiürülnek a szervezetből. Hidrofilitásuk felületmódosítással növelhető, így elegendően hosszú ideig tartózkodnak a véráramban, hogy megvalósuljon programozott hatóanyag-leadás.

A PLA és PLGA poliészterek. Degradációjuk sav- vagy lúgkatalizált hidrolízis során megy végbe. Az élő szervezetben ehhez járul hozzá az enzimatis leontás is. A hidrolízis sebessége függ a polimer, kopolimer összetételétől. Legnagyobb sebességgel a random kopolimerek degradálódnak, a legkisebb sebességgel pedig a tiszta PLA [4].

Jól leírt és a gyakorlati orvostudományban is alkalmazott biodegradábilis gyógyszerhordozók a közelmúltig a mikrométeres mérettartományban fordultak elő. Az elmúlt évtizedekben azonban egyre inkább előtérbe kerültek a szubmikron méretű, nanométeres mérettartományba eső kolloid gyógyszerhordozó részecskék. A legtágabb meghatározás szerint nanorészecskének nevezünk minden, 1 mikrométernél kisebb átmérőjű (szubmikrométeres) részecskét. Méretükből adódóan a közvetlenül a sejtekbe való bejuttatásuk könnyebb, mint más, nagyobb részecskerendszerek esetén. A gyógyszerhordozó mérete több szempontból is lényeges: a szabályozott hatóanyag-leadás, illetve a célszervbe juttatás is nagyban függ ettől a paramétertől. A gyógyszer bejuttatási módja a szervezetbe szintén függ attól, milyen mérettartományba esik a hatóanyag (és a hordozó). Mivel például a legkisebb kapillárisok átmérője a szervezetben 5 μm , intravénás adagolásra kizárólag a jóval ez alatti mérettartományba eső részecskék alkalmasak. A nanométeres méretű részecskék alkalmazása a hatóanyag jó eloszlata mellett emiatt is előnyben részesülhet [5].

A nano méretű gyógyszerhordozók jelentőségére kiváló példa az idegrendszeri megbetegedések, károsodások gyógyszeres kezelésének problémája. A központi idegrendszert

a szervezet többi részétől a vér-agy gát határolja el, ez biztosítja, hogy toxikus anyagok ne juthassanak be az agyba, illetve a tápanyagfelvétel is ezen keresztül történik az agy felé. A vér-agy gát védő funkciója miatt azonban a központi idegrendszer megbetegedései nehezen gyógyíthatóak a hagyományos módszerekkel, amennyiben a hatóanyag, illetve a hordozó mérete, vagy más fizikai-kémiai tulajdonságai miatt nem jut át a vér-agy gáton. A 100 nm-nél kisebb részecskék azonban képesek átjutni az agyba, így az ennek megfelelő mérettartományú nano-hordozó segítségével célzott hatóanyagtranszport valósítható meg. Ezáltal lehetővé válik a gyógyszeres kezelés akár Parkinson-kór, Alzheimer-kór, központi idegrendszeri fertőzés, sclerosis multiplex vagy agytumor esetén [6, 7, 8].

Mivel a nanoméretű gyógyszerhordozók kolloidális rendszerek, nagy a fajlagos felületük. Ezért a nanodiszperz rendszerekben a határfelületi jelenségeknek fizikai-kémiai szempontból kiemelt jelentősége van. Gyógyszerhordozó nanorendszerek létrehozásánál egyik fő célunk a rendszer stabilitásának megőrzése a diszperzitásfok és az eloszlás állandóságának biztosításával. Ezt felületmódosító anyag hozzáadásával érhetjük el úgy, hogy a részecskék még az emberi szervezet belső körülményei között is a kívánt ideig megőrizték kinetikai stabilitásukat.

Nanorendszerek előállítása

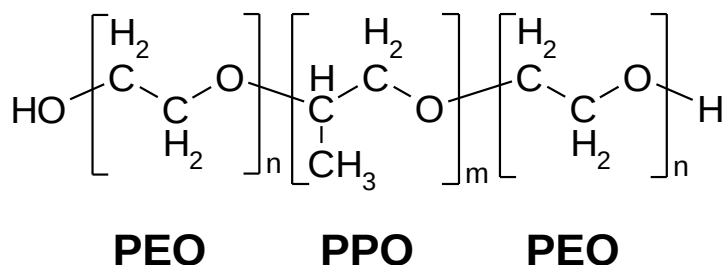
A kolloid méretű, polimer alapú nanorészecskék előállítására többféle módszer ismert: emulziós-oldószer-elpárologtatásos módszer, polimerizáció, v/o/v kettős emulziós módszer, nanoprecipitáció, stb. Az emulziós-oldószer-elpárologtatásos módszer során például a polimert tartalmazó, vízzel nem elegyedő szerves fázist adnak a vizes fázishoz, majd a keletkező emulziót diszpergálják egy vizes, stabilizátort tartalmazó fázisban. Itt a szerves oldószer diffúzió révén kerül a vizes fázisba, ahonnan kevertetés közben párologtatják el [9]. A keletkező polimer részecske méretét az emulzió cseppmérete határozza meg. A módszer mikroméretű részecskék előállításához megfelelő, ám a nanorendszerek előállítására nem bizonyult alkalmasnak. Ezzel az eljárással a keletkező hordozó polimer szerkezete pórusos lesz.

Kolloidális nanorészecskék előállításának egy másik módja a számos előnnyel bíró nanoprecipitációs technika [10]. Ezzel az előállítási módszerrel elérhető, hogy a keletkező polimer részecske a nanométeres mérettartományba esik. A módszer egyszerű, gyors, könnyen hozzáférhető, és jól reprodukálható eredményt ad. Kiindulási anyagként polimerek szerves oldatát alkalmazzák. Ezáltal elkerülhető az a polimerizációs eljárás során jelentkező

probléma, hogy nem megfelelő körülmények esetén a végtermék különböző méretű részecskékből fog állni, a rendszer polidiszperz lesz.

Az eljárás során vízzel elegyedő szerves oldószerben oldják a szilárd állapotú hordozó polimert, illetve a bevinni kívánt hatóanyagot. Kevertetés közben cseppenként adagolják a szerves fázist a felületmódosító stabilizátort tartalmazó vizes fázishoz. Az elegyedés miatt oldószercsere történik, a hidrofób hordozó kicsapódik a nagyrészt vízből álló keverék oldószerben, magába zárva a hatóanyag molekuláit. A szerves oldószer párologtatással távolítható el. A vizes fázis rendszerint oldott polimer adalékot is tartalmaz. A leggyakrabban alkalmazott adalék a PVA, mely a kicsapódó nanorészecske felületére adszorbeál [11].

A hordozó felületi tulajdonságainak megváltoztatására az amfipatikus poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli(etilén-oxid) kopolimerek lehetséges stabilizátorként jöhetnek számba. Ez a vegyület a hidrofób PPO-lánca révén kapcsolódni tud a szintén hidrofób hordozó felülethez, a hidrofil PEO- lánc révén pedig képes stabilizálni a hordozó polimert a vizes közegben. A Pluronic- adszorpció hozzájárul a sztérikus stabilizálás mellett a részecske felületi biokompatibilitásának növeléséhez, azáltal, hogy csökkenti a felületi fehérje adszorpciót, és így a hordozó vérben való tartózkodási ideje megnő. Ezáltal lehetővé válik a programozott hatóanyag- felszabadulás [12, 13].



3. ábra

Pluronic szerkezeti képlete

Célkitűzés

A politejsav alapú kolloidális gyógyszerhordozók jól alkalmazhatók a programozott hatóanyag leadás és a célzott hatóanyagtranszport megvalósítására. Nano méretű részecskék célszerűen a nanoprecipitáció módszerével állíthatók elő. Számos ilyen nanorészecske előállításáról és különböző hatóanyagoknak ebbe való kapszulázásáról számoltak be az irodalomban, amelyeket igen eltérő körülmények között valósítottak meg.

Mivel sok paraméternek van hatása a képződő rendszer tulajdonságaira (hőmérséklet, fázisarány, oldószer minőség, oldószer elegy összetétele, stabilizáló szer minősége és mennyisége, különböző adalékanyagok, a keverés módja, a minta feldolgozása), eddig nem alakult ki egy áttekinthető kép arról, milyen módon állítható elő kívánt tulajdonságú rendszer.

A célunk az volt, hogy szisztematikusan vizsgáljuk meg néhány kiválasztott paraméter hatását a biodegradábilis nanorészecskék előállítására. Ezek a tényezők a PLA, PLGA polimer összetétele, a szerves oldószer minősége, a stabilizáló szer minősége. A stabilizátor megválasztását az indokolta, hogy az egyik ilyen típusú vegyületet (Pluronic F127) korábbi kísérletekben eredményesen alkalmaztuk. Célunk az ilyen típusú, de más polaritású vegyületek hatásának összehasonlítása.

Az előállított nanoszuszpenziók jellemzésére a lehetséges felhasználás szempontjából meghatározó jelentőségű tulajdonságokat vizsgáltunk. Ezek a méret és méreteloszlás, elektrolit oldatban való stabilitás, valamint a feldolgozás utáni rediszpergálhatóság. Ezek a vizsgálatok a hatóanyag hordozó jellemzését jelentették.

A tanulmányozott paraméterek alapján egy kiválasztott rendszerrel hatóanyag kapszulázási vizsgálatokat is tervezünk. Ehhez egy modellvegyületet használunk. Ez a 4-amino-szalicilsav. Választásunkat az indokolta, hogy a PAS régóta ismert tuberkulózis elleni szer, azonban a megfelelő hatás elérése érdekében mindeddig túlságosan nagy dózisban kellett alkalmazni. Emiatt több és súlyosabb mellékhatás jelentkezett. Gyógyszerhordozó rendszer alkalmazásával ezek várhatóan kiküszöbölhetőek. A PAS különös jelentősége abban rejlik, hogy a korlátozott alkalmazásnak köszönhetően hatásos az új multirezisztens tuberkulózis törzsek ellen [14].

Meghatározzuk a hatóanyagot tartalmazó gyógyszerhordozó rendszer jellemző paramétereit, a kapszulázási hatékonyságot, és a hatóanyagtartalmat. Emellett szeretnénk megismerni a hatóanyag felszabadulás ütemét is.

Kísérleti rész

Felhasznált anyagok

PLGA 50/50, D,L-tejsav-glikolsav kopolimer, $M = 40\text{--}75$ kDa, tejsav/glikolsav arány: 1:1, Sigma-Aldrich

PLGA 75/25 D,L-tejsav-glikolsav kopolimer, $M = 90\text{--}126$ kDa, tejsav/glikolsav arány: 3:1 Sigma-Aldrich

PLA 100 D,L-politejsav, $M = 106$ kDa, Sigma-Aldrich

Pluronic F68, $M = 8400$ g/mol, poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli-(etilén-oxid) kopolimer, PEO/PPO/PEO arány: 80/27/80 ($HLB = 29$), $CMC = 25,2$ g/l [15], BASF Hungaria Kft.

Pluronic F108, $M = 14600$ g/mol, poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli-(etilén-oxid) kopolimer, PEO/PPO/PEO arány: 141/44/141 ($HLB > 24$), $CMC = 45$ g/l [15], BASF Hungaria Kft.

Pluronic F127 $M = 12600$ g/mol, poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli-(etilén-oxid) kopolimer, PEO/PPO/PEO arány: 101/56/101 ($HLB = 22$), $CMC = 7$ g/l [15], BASF Hungaria Kft.

4-amino-szalicilsav (PAS), $C_7H_7NO_3$, $M = 153,14$, $T_{olvadás} = 135\text{--}145$ °C, tisztaság: $> 95\%$, $\log P = 0,62 - 1,6$. Fluka (Sigma-Aldrich), Németország

Aceton, 99,95% (A.r.), Molar Chemicals Kft., Magyarország

Tetrahidrofurán (THF), 99,9%, (HPLC tisztaság) Merck, Németország

Kétszer desztillált víz, vezetőképessége < 5 μS , felületi feszültsége $23,0 \pm 0,5$ °C-on $> 72,0$ mNm⁻¹

NaCl, ($M = 58,44$ g/mol), tisztaság: $\geq 99,8\%$ (A.r.), Sigma-Aldrich, Németország

Na₂HPO₄ ($M = 141,96$ g/mol), tisztaság: min. 99% (A. r.), Sigma-Aldrich, Németország

KH₂PO₄ ($M = 136,09$ g/mol), tisztaság: min. 99,5% (A. r.), Sigma-Aldrich, Németország

Sörensen-puffer: 174 ml 11,866 g/l Na₂HPO₄ és 60 ml 9,073 g/l KH₂PO₄ forralt, kétszer desztillált vizes oldata, pH: 7,4

NaOH ($M = 40,01$ g/mol), tisztaság: min. 99%, Reanal, Magyarország

Nanorészecskék előállítása

A különböző polimerekből (PLA, PLGA50, PLGA75) 10 g/l-es szerves oldószeres (acetonos, vagy THF-es) oldatokat készítettünk ($T=23\pm0,5^{\circ}\text{C}$.) Az oldatok 1,5 ml-ét digitális folyadékadagoló (Hamilton MicroLab P) segítségével 3 $\mu\text{l/s}$ -os sebességgel injektáltuk 15 ml 0,1 g/l Pluronic-ot (F68, F108, vagy F127) tartalmazó vizes oldatokba állandó mágneses kevertetés mellett (szerves-vizes fázis aránya: 1:10). Összehasonlításként elkészítettük a stabilizátor Pluronic-ot nem tartalmazó PLGA kolloidokat is. Az így előállított szuszpenziókat folyamatos kevertetés mellett 12 órán át párologni hagytuk, melynek során a szerves oldószer (aceton, THF) eltávozott. A folyamat során elpárolgott vizet tömegmérés alapján pótoltuk.

A hatóanyag tartalmú nanorészecskék előállítása során a szerves fázis a 10 g/l PLGA mellett 1; 2,5 ; 5; 10; 20 g/l 4-aminoszalicisavat (PAS) tartalmazott.

Az elkészült nanorészecskéket 2×15 percig, $12000 \times g$ gyorsuláson történő centrifugálással (Hettich Mikro 22 R), 23°C -on tisztítottuk. A művelet során a nem adszorbeálódott felületmódosító szer felesleget, illetve a szabad, oldatban maradt hatóanyag-felesleget távolítottuk el a felülúszóval. A tisztított nanorészecske-üledéket 5 perces ultrahangozás során (ultrahang típusa: VWR USC 200TH, 45 kHz-en, 60 W-on) rediszpergáltuk kétszer desztillált vízben. Ezután a még mindig aggregálódott részecskéket kis fordulatszámon ($1000 \times g$, 5 perc) történő centrifugálással távolítottuk el a rendszerből.

A minták tartósítását a fagyasztva szárítás (liofilizálás) módszerével végeztük. A liofilizálás klasszikus módja a gyógyszerek tartósításának, és kiválóan alkalmas gyógyszerhordozó nanorészecskék vízmentes formában való tárolására is. Liofilizálás során a mintát szárazjég segítségével lefagyasztják, víztartalmát vákuumkamrában szublimáció útján eltávolítják. Ezáltal a részecskék szerkezete nem sérül, az eljárás vízben könnyen rediszpergálható szárazanyagot eredményez. Ezzel a módszerrel biztosítható a nanorészecskék stabilitásának, fizikai-kémiai tulajdonságainak megőrzése, illetve a részecskék rediszpergálhatósága [16, 17]. A módszer előnye a magas hőmérsékleten történő szárítással szemben, hogy hőérzékeny anyagok tartósítása is lehetővé válik. A liofilizálás sikeressége számos körülménytől függ. A hordozó polimer és a felületaktív anyag minősége, utóbbi mennyisége, illetve a felületmódosítás hatása mind befolyásolja, hogy a liofilizált minta megőrzi-e a nanorészecskék tulajdonságait. A módszer alkalmazása közben gyakran előfordul a részecskék aggregációja. Ennek elkerülésére lioprotektáns szert adagolnak a liofilizálandó

mintához. Jelen kutatásban a Pluronic felületmódosító alkalmazásával olyan mértékű stabilizáló hatást tudtunk elérni, hogy a liofilizálást követő rediszpergálás során sem történt aggregáció, emiatt nem volt szükség lioprotektáns szer hozzáadására [5].

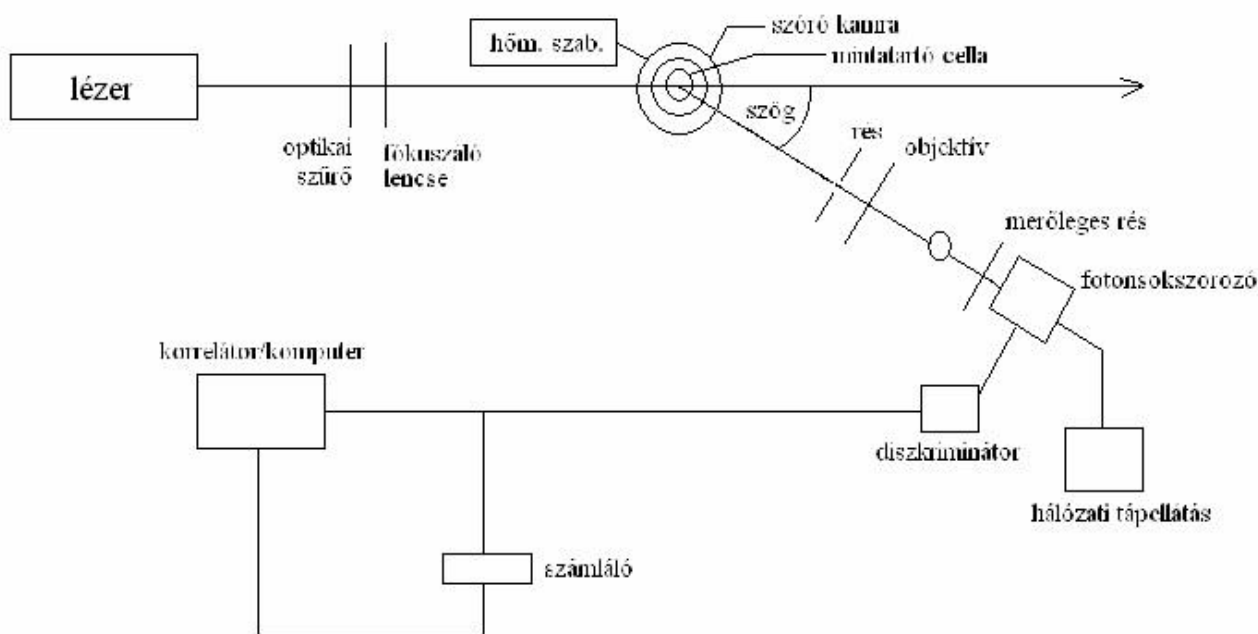
A szárazanyagtartalom meghatározására a hatóanyag kapszulázási hatékonyságának meghatározásához volt szükség. A minták 3 ml-ét szárítószekrényben, 105 °C-on szárítottuk be.

Méretmeghatározás dinamikus fényszórásméréssel

A fényszórás mérése kiválóan alkalmas a részecskeméret vizsgálatára amiatt, hogy a kolloid rendszerről szóródó fény intenzitása, polarizációja és szögeloszlása függ többek között a szóró részecskék méretétől és alakjától. A méreteloszlás (polidiszperzitás) is meghatározható ezzel a módszerrel, mivel az érzékelt részecskék száma igen nagy, ez lehetővé teszi a polidiszperz minták reprezentatív mintavételezését [18].

A részecskék hidrodinamikai átmérőjét és diszperzitásfokát dinamikus fényszórásméréssel határoztuk meg. A mérés eszköze egy Brookhaven gyártmányú fényszórásmérő berendezés, BI-200 SN típusú goniométerrel és BI- 9000-AT digitális kollerátorral felszerelve, a fényforrás egy vertikálisan polarizált Ar - lézer (típusa: OmniChrome 543 AP). A szórt fény intenzitását 488 nm-es hullámhosszon, 90°-os szögben detektáltuk.

Mintánként három párhuzamos mérést végeztünk el. A részecskeméretet és a diszperzitásfokot a tisztítás előtt és után is meghatároztuk.



4. ábra: Fényszóródásmérő berendezés elvi vázlata.

(Borsos, A.: Elektromosan töltött polimer nanogél részecskék vizsgálata. TDK dolgozat, ELTE Fizikai- Kémiai-Tanszék, Budapest, 2007)

Stabilitásvizsgálat

UV-fotometriás módszerrel mérhető a kolloid rendszerek relatív turbiditása, így a stabilitás változása nyomon követhető lesz. A kolloid rendszerek fényszórása miatt az oldaton átbocsátott fénysugár átmenő intenzitása csökkenni fog. Ezt spektrofotométerben mérve látszólagos abszorbanciaként tapasztaljuk. A részecskék aggregációjával a szórt fény intenzitása nő, megnő a látszólagos abszorbancia (turbiditás.) Ez lehetővé teszi a kolloid rendszerekben a méretváltozás nyomon követését, és ezáltal a kolloidstabilitás megszűnésének meghatározását.

A részecskék stabilitásának vizsgálatát különböző koncentrációjú NaCl-elektrolitban végeztük 37 °C-on. A vizsgált nanorészecske-rendszerekhez különböző koncentrációjú NaCl-oldatokat adtunk úgy, hogy a NaCl- végkoncentráció 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 M értékeket érjen el. A kapott szuszpenziók turbiditását 15 perc termosztálást és összerázást követően mértük meg, 400 nm-es hullámhosszon, Metertech SP-830 Plus típusú spektrofotométerrel.

Hatóanyag tartalom meghatározása

A részecskék hatóanyagtartalmát UV-spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Ennek alapja, hogy a vizsgált anyagon átbocsátott UV (150-400 nm-es hullámhosszú) fény komponenseit a molekulák elnyelik. A folyamat során elektronátmenettel járó gerjesztés történik a molekulában, (egy vegyértékelektron alapállapotból gerjesztett állapotba kerül.) A gerjesztéshez szükséges energiát a besugárzó fény egy elnyelt fotonja biztosítja. Azt, hogy ez melyik hullámhosszú fény fotonja lesz, az érintett elektronpályák közti energiaszintkülönbség határozza meg [19].

A méréshez a hatóanyag tartalmú PLGA-nanorészecskéket 1 M NaOH- oldat hozzáadásával feloldottuk úgy, hogy a NaOH- végkoncentráció 0,05 M legyen. A hatóanyag koncentrációt a kapott oldatból határoztuk meg 298,8 nm-es hullámhosszon mért kalibrációs egyenlet segítségével. (Analytik Jena Specord 40)

Hatóanyag felszabadulás

A hatóanyag felszabadulását a PAS₅ rendszeren vizsgáltuk (5. táblázat). A vizsgálathoz a 1,5 ml-es párhuzamos mintákat 37 °C-on, pufferezt közegben (pH=7,4) inkubáltuk. Az adott időközönként kivett mintákat +4 °C-on centrifugáltuk 20 percig. A termosztálás során felszabadult hatóanyag mennyiségét a felülúszóból, UV-spektrofotométer segítségével mértük meg. A koncentrációkat kalibráló görbe alapján határoztuk meg, 300,8 nm-es hullámhosszon.

Eredmények

Nanoszuszpenziók előállítása és jellemzése

A 5. ábra elkészülése után mutat egy vizes közegű nanoszuszpenziót. PLGA-polimerből készült, az átlagos részecskeméret 150 nm, koncentrációja ~1 g/l.

Látható, hogy az elkészült szuszpenzió opálos, ugyanakkor áttetsző.



5. ábra: PLGA-ból készült vizes közegű nanoszuszpenzió (átlagos részecskeátmérő: 150 nm, koncentráció: 1 g/l)

A biodegradábilis polimerekből (PLA100, PLGA75, PLGA50) vizes közegben nanoszuszpenziót állítottunk elő. A vizes közeg Pluronic stabilizátort tartalmazott 0,1 g/l koncentrációban. Az egyébként azonos körülmények között előállított minták részecskeméretét (d) és polidiszperzitását (PD) az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: Különböző polimer és stabilizátor alkalmazásával készült szuszpenziók átlagos részecskeátmérője és polidiszperzitása acetonban készítve

	stabilizátor nélkül		F68		F108		F127	
	d / nm	PD	d / nm	PD	d / nm	PD	d / nm	PD
PLGA50	148	0,08	136	0,08	130	0,08	141	0,09
PLGA75	178	0,08	196	0,06	198	0,08	200	0,07
PLA100	193	0,1	232	0,12	252	0,11	255	0,1

A méretet és méreteloszlást dinamikus fényszórásméréssel határoztuk meg. Az 1. táblázatból jól látszik, hogy a részecskék átlagos mérettartománya 100 és 300 nm közötti. Az 1. táblázatában szerepelnek a stabilizátor nélküli, tisztán desztillált vizet tartalmazó minták.

A PLGA tejsav tartalmának növekedésével egyértelmű méretnövekedés figyelhető meg. Ez a stabilizátor nélküli rendszerben 150 nm körüli értékről 200 nm körüli átlagos átmérő értékre való növekedést jelent. Hasonló, vagy ennél nagyobb mértékű a növekedés a Pluronic stabilizátort tartalmazó rendszerekben. Minden esetben a tiszta PLA-ból képződtek nagyobb méretű részecskék, amelyek átlagos átmérője eléri a 250 nm-t.

A stabilizátor hatását a részecskeméretre szintén az 1. táblázatból láthatjuk. A PLGA 50 polimer esetében a Pluronic-kal stabilizált rendszerek valamivel kisebb átlagos részecskeméretet mutatnak. a nagyobb PLA-tartalmú részecskék esetében ez a hatás fordított, jelentős, 20%-ot is meghaladó részecskeméret-növekedés látható az alkalmazott Pluronic-koncentráció mellett.

A részecskeméret-eloszlásra a polidiszperzitás értéke ad információt. Mind a stabilizátort nem tartalmazó, mind a Pluronic-tartalmú rendszerekben a polidiszperzitás 0,1 körüli érték, ami viszonylag szűk méreteloszlásnak felel meg. (Általánosan elfogadott, hogy ha a polidiszperzitás értéke meghaladja a 0,3-at, a rendszer polidiszperznek tekinthető).

A tiszta PLA-rendszerekben igaz az, hogy némi polidiszperzitás-növekedés tapasztalható a stabilizált rendszerekben.

A minta elkészítése után a feldolgozás első lépése a tisztítás volt, amikor a vizes közegben oldott komponenseket kívántuk eltávolítani. Ehhez centrifugálást és többszöri rediszpergálást alkalmaztunk. Elsősorban a stabilizátor fölös mennyiségét távolítottuk így el, ezért tisztítás után is meghatároztuk minden minta részecskeméretét és méreteloszlását, hogy az esetleges aggregációról képet kapjunk.

A második táblázat foglalja össze a tisztítás utáni részecskeméret és polidiszperzitás adatokat, ugyanazon rendszerekre, mint amelyek az első táblázatban láthatók közvetlenül a készítés után.

2. táblázat: Különböző polimer és stabilizátor alkalmazásával készült szuszpenziók átlagos részecskeátmérője és polidiszperzitása tisztítás után acetonban készítve

	F68		F108		F127	
	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>
PLGA50	136	0,18	144	0,1	142	0,06
PLGA75	205	0,13	204	0,08	201	0,07
PLA100	241	0,13	253	0,1	256	0,012

Általánosan elmondható, hogy jelentős, aggregációra utaló részecskeméret-növekedést a rendszerek többségénél nem találtunk. Egyedül a Pluronic 68-cal stabilizált PLGA50 és PLGA75 polidiszperzitása növekedett meg, de még így sem éri el a 0,2-es értéket, miközben a részecskeméret-átlag gyakorlatilag változatlan. Leginkább még az F68-as Pluronic-hordozó rendszer diszperzításfoka nőtt, bár ez sem számottevően. Ebből azonban következtethetünk arra, hogy a legrövidebb PEO-lánccal rendelkező F68-as felületmódosító képes mind közül a legkevésbé stabilizálni a nanorészecskéket. Ezek az eredmények megalapozzák azt, hogy a későbbi elektrolitos stabilitásvizsgálatokhoz jól definiált rendszert használjunk, amit az itt leírt tisztítással állítottunk elő.

Az eddigi rendszerekben a szerves oldószer aceton volt. A THF is alkalmas a nanoprecipitációs előállításra, mivel oldószere a biodegradábilis polimereknek, és elegyedik a vizes fázissal. Azokat a rendszereket, amelyeknek méret adatait az 1. és 2. táblázat tartalmazza, aceton helyett tetrahidrofuránt használva is előállítottuk. Ezeket az eredményeket foglalja össze a minták előállítása után a 3. táblázat, és tisztítása után a 4. táblázat.

3. táblázat: Különböző polimer és stabilizátor alkalmazásával készült szuszpenziók átlagos részecskeátmérője és polidiszperzitása THF -ben készítve

	stabilizátor nélkül		F68		F108		F127	
	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>
PLGA50	178	0,06	176	0,06	183	0,07	181	0,07
PLGA75	251	0,13	277	0,15	287	0,14	311	0,11
PLA100	299	0,19	283	0,19	368	0,19	315	0,18

4. táblázat: Különböző polimer és stabilizátor alkalmazásával készült szuszpenziók átlagos részecskeátmérője és polidiszperzitása tisztítás után THF -ben készítve

	F68		F108		F127	
	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>	<i>d</i> / nm	<i>PD</i>
PLGA50	181	0,15	181	0,15	180	0,2
PLGA75	265	0,18	267	0,15	318	0,18
PLA100	272	0,23	305	0,23	485	0,24

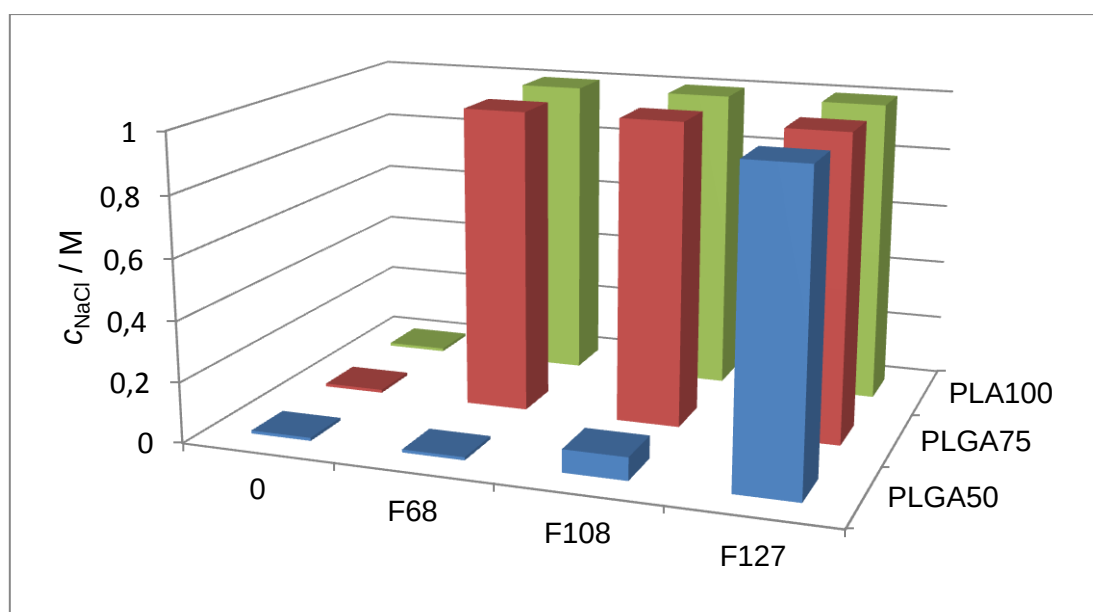
A THF-ben készült részecskék átmérője minden esetben nagyobb volt, mint az acetonban készült mintáknál. A biodegradábilis polimer összetételének, vagyis a glikolsav tartalomnak a hatása ugyanolyan tendenciát mutat a stabilizátort nem, vagy a Pluronic stabilizátort tartalmazó minden rendszernél, függetlenül attól, hogy aceton vagy THF a szerves oldószer. Ugyanakkor jelentős különbség, hogy az átlagos részecskeméretetek sokkal nagyobbak, és ehhez esetenként nagyobb polidiszperzitás is társul. a stabilizátort nem tartalmazó rendszer átlagos átmérője 180-300 nm, és megint csak tiszta PLA100 alkalmazásával kapjuk a nagyobb méretű részecskéket. A stabilizátor minőségének a PLGA50 esetében nem volt méretmódosító hatása, de a másik két polimer esetében az átlagos részecskeméret meghaladja a 300 nm-es átmérőt.

A THF szerves fázissal készült nanorészecskék mérete szintén nem nőtt számottevően a tisztítás során, bár a részecskék diszperzitásfoka erősebben nőtt, mint az acetonban készült minták esetében láthattuk.

Nanoszuszpenziók kolloid stabilitása

A különböző polimerekből stabilizátor nélkül, illetve a 3 stabilizátor egyikével előállított nanoszuszpenziók stabilitását a hozzáadott elektrolit-koncentráció függvényében jellemeztük. Az elektrolit NaCl volt, és olyan koncentráció-tartományt választottunk, hogy ez magába foglalja a fiziológias NaCl-koncentrációt is. (Növeltük a NaCl koncentrációt a nanorészecskék közegében, és meghatároztuk a zavarosságot.)

A turbiditás mérések eredményeiből megállapítottuk azt a maximális NaCl-koncentrációt, melynél még nem következik be a rendszerek aggregációja. Az acetonos rendszeren mért eredményeket a 6. ábrán ábrázoltuk.



6. ábra: Maximális NaCl-koncentráció, melynél még nem következik be a rendszerek aggregációja

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a tiszta PLGA és PLA részecskék stabilizátor nélkül nem alkalmazhatóak biológiai közegben, mert már 0,01 M-os NaCl koncentráció fölött aggregálódtak. A rendszernek kismértékű stabilitást vízben a felületen lévő, láncvégi karboxil csoportoktól származó elektrosztatikus kölcsönhatás ad. Az ionerősség növekedésével a részecskéket stabilizáló negatív töltések árnyékolódnak, csökken az elektrosztatikus taszítás, és aggregáció lép fel. A sztérikus stabilizálás tehát mindenképpen szükséges.

A különböző Pluronicok alkalmazásával a részecskék kolloid stabilitása rendkívüli mértékben megnőtt. A PLGA75 és PLA100 esetében mind az F68, mind az F108 használatával 1 M-os elektrolit- koncentráció felett is megmaradt a részecskék kolloid stabilitása. A Pluronic F127 alkalmazásával mindhárom polimert 1 M-os NaCl- koncentráció felett is stabilizálni tudtuk.

A PLGA50-F68 rendszer esetében a turbiditás mérés során 0,01 M NaCl-koncentráció fölött zavarosságnövekedést tapasztaltunk, ami a kismértékű aggregáció jele.

Hasonló eredményeket kaptunk a PLGA50-F108 rendszer esetében is, de az a maximális elektrolit koncentráció, ami még nem okoz aggregációt, itt már elérte a 0,075 M-os értéket.

A fenti eredmények egyértelműen alátámasztják a felületmódosító Pluronic sztérikus stabilizáló szerepének jelentőségét.

A stabilitásvizsgálatot elvégeztük szerves oldószerként acetont helyett THF-et tartalmazó rendszereknél is.

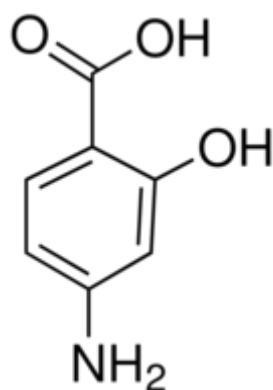
Itt is megfigyelhető volt, hogy a PLGA 50 polimerből előállított nanoszuszpenzió stabilitása megegyezett az acetont alkalmazásával előállított megfelelő rendszerével. A PLGA 75 sorozat tagjai itt kisebb NaCl-koncentráció hatására aggregálódtak az acetonos rendszerhez képest, kevésbé stabilak. Az adódott továbbá, hogy az F68 kisebb stabilizáló hatása minden THF-fel készült mintánál is megfigyelhető volt. A THF-et alkalmazó előállítási módnál több olyan stabilizátor- polimer- kombináció fordult elő, amely érzékeny volt a NaCl-koncentráció növekedésére, mint az acetont használata esetén. Ennek okát pontosan nem tudjuk, mivel a nanoprecipitáció során a polimer részecske kialakulása a stabilizátor jelenlétében összetett folyamat, de feltehető, hogy a szerves oldószerek közötti polaritás különbség hatással van arra, hogy a részecske felülete milyen polaritású lesz, illetve a jelenlévő stabilizátor mennyire épül be a részecskébe, illetve mennyire adszorbeálódik a felületén.

Hatóanyagtartalom

Az eddigi vizsgálatok alapján kiválasztottunk egy polimer-stabilizátor rendszert, ami a legalkalmasabb arra, hogy hatóanyag jelenlétében is modellezzük a hordozó viselkedését.

A szerves fázisként acetont tartalmazó minták átmérője minden esetben kisebb volt, mint a THF-ben készült mintáké. A stabilitásvizsgálat eredményéből arra következtethettünk, hogy az acetontban készült rendszerek stabilitása nagyobb. Ezen eredmények alapján a PLGA 50 – F127 rendszert választottuk a hatóanyag kapszulázására. A modell hatóanyag a 4-amino-szalicilsav volt, ami tuberkulózis kezelésére régóta használt hatóanyag.

Ez a vegyület közepesen hidrofób jellegű (a logP érték alapján), emiatt azt vártuk, hogy alkalmas lesz arra, hogy a szintén hidrofób PLGA hordozóba zárjuk.



7. ábra: 4-amino-szalicilsav (PAS) szerkezeti képlete



8. ábra: Hatóanyag tartalmú szuszpenziók előállítását követően (1), tisztítás után (2), liofilizált formában (3), és rediszpergálva (4)

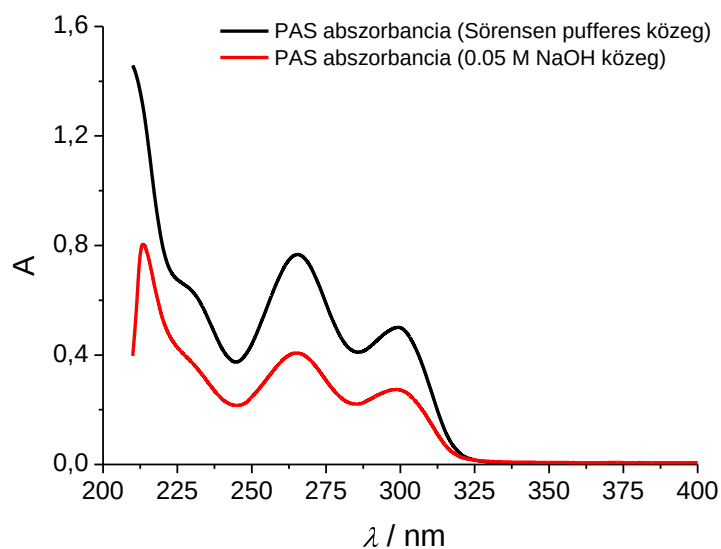
Gyógyszer hatóanyagok jellemzésében meghatározó jelentőségű az illető molekula logP értéke. Azt fejezi ki, milyen egy hatóanyag polaritásának, hidrofilitásának mértéke, ami összefügg a vegyület sejtmembránon való átjutásának valószínűségével. A logP a vegyület oktanol-víz rendszerben való megoszlási hányadosának logaritmus. A megoszlási hányados kísérleti meghatározása mellett elméleti közelítésekből származó adatok is előfordulnak. Az elméleti és a mért logP értékek igen tág tartományban változnak: $\log P = 0,62 - 1,6$ [20, 21].

A kiválasztott rendszerbe kapszuláztuk a PAS hatóanyagot oly módon, hogy a hatóanyag koncentrációja 1 g/l-től 20 g/l-ig koncentráció- tartományban változott. A kapszulázási hatékonyságot és a hatóanyagtartalmat minden rendszerre meghatároztuk, melyek definíciója a következő:

$$(\text{Hatóanyag tartalom} \text{ } \%) = \frac{(\text{mért hatóanyag mennyiség} \text{ } / \text{g} \cdot \text{dm}^{-3})}{(\text{szárazanyag tartalom} \text{ } / \text{g} \cdot \text{dm}^{-3})} \cdot 100\%$$

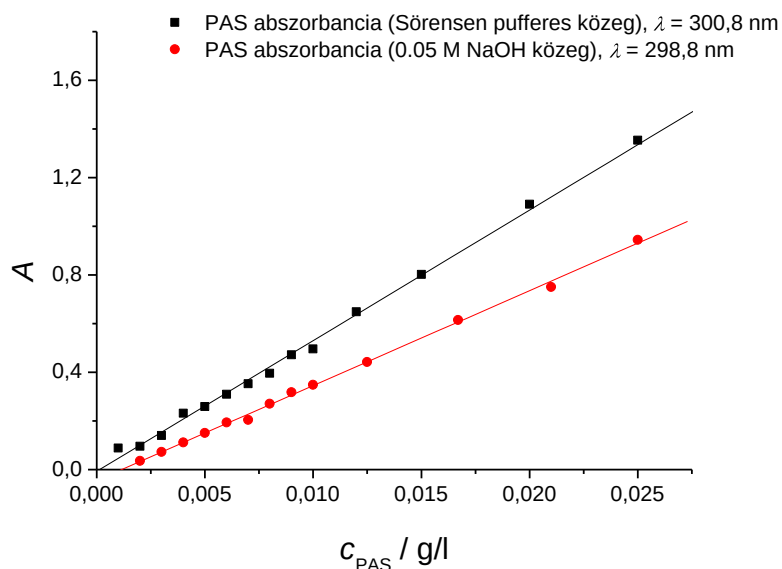
$$(Kapszulázási\ hatékonyság\ /\%) = \frac{(mért\ hatóanyag\ mennyiség\ /\text{g} \cdot \text{dm}^{-3})}{(bevitt\ hatóanyag\ mennyiség\ /\text{g} \cdot \text{dm}^{-3})} \cdot 100\%$$

A hatóanyag mennyiségi meghatározása UV-spektroszkópiával történt. A 9. ábra mutatja a hatóanyag spektrumát a minták vizsgálatához felhasznált 2 közegben. A mennyiségi meghatározást a 300 nm-hez közeli csúcs alapján végeztük, mivel ez az a hullámhossz, ahol sem a Pluronic, sem a polimer degradációs termékeinek elnyelésével nem kell számolni.



9. ábra: PAS abszorbanciaspektruma 0,05 M-os NaOH-ban illetve Sørensen-pufferban

A 10. ábra tünteti fel a PAS mennyiségi meghatározásához használt kalibrációs egyeneseket.



10. ábra PAS kalibrációs egyenesek a meghatározáshoz használt közegekben

A 10. ábrán feltüntetett kalibrációs egyenes egyenlete 0,05 M NaOH-ban:

$A_{298,8} = -0,044 + 38,962 \cdot C_{PAS}$, a regressziós együttható pedig $R^2 = 0,9984$. A pufferes közegben a kalibrációs egyenes egyenlete:

$A_{300,8} = -0,069 + 53,677 \cdot C_{PAS}$, a regressziós együttható értéke $R^2 = 0,998$.

A hatóanyag tartalom és kapszulázási hatékonyság adatokat az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: Hatóanyag tartalom és kapszulázási hatékonyságok a vizsgált rendszerekben

Minta	Hatóanyag koncentráció a szerves fázisban (g/l)	Hatóanyag tartalom / %	Kapszulázási hatékonyság / %
PAS ₁	1	0,28	2,77
PAS _{2,5}	2,5	0,75	2,89
PAS ₅	5	1,53	2,78
PAS ₁₀	10	2,95	2,54
PAS ₂₀	20	4,82	2,40

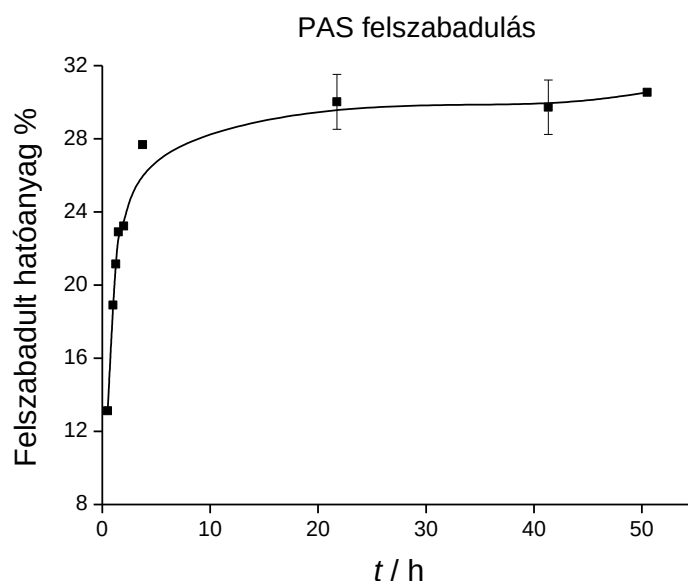
Az eredményekből látszik, hogy a hatóanyagtartalom növekszik a rendszerbe bevitt hatóanyag mennyiségével, legnagyobb értéke az 5%-ot közelíti. A kapszulázási hatékonyság értéke 2,5-3% körüli. Ebből arra következtethetünk, hogy a hatóanyag nagy része a nanorészecske előállítása során inkább a vizes fázisban halmozódik fel, csak kis része kerül be a PLGA

nanorészecskébe. Bár az itt kapott hatóanyagtartalom nem nagy érték (néhány %), ez jó eredménynek számít, mivel a hatóanyag nagy diszperzitásfokú rendszerként van jelen, és gyors kiürülését megakadályozza a kapszulázás.

Ezeket az eredményeket érdemes összehasonlítani korábbi mérésekben használt anti-tuberkotikus hatóanyaggal végzett vizsgálatokkal. Isoniazid esetében, amelynek logP értéke -1,14, kisebb hatóanyagtartalmú rendszert sikerült előállítani (max. 0,5%). Mivel a PAS logP értéke ennél jóval nagyobb, azt vártuk, hogy ebben az esetben nagyobb lesz a rendszer hatóanyagtartalma. Ez teljesült is, csaknem a tízszeresét sikerült bekapszulázni. Ha ennél nagyobb hatóanyagtartalmú rendszerre van szükség, ez a molekula módosításával, esetleg hidrofób molekula konjugálásával érhető el [12, 13, 22]

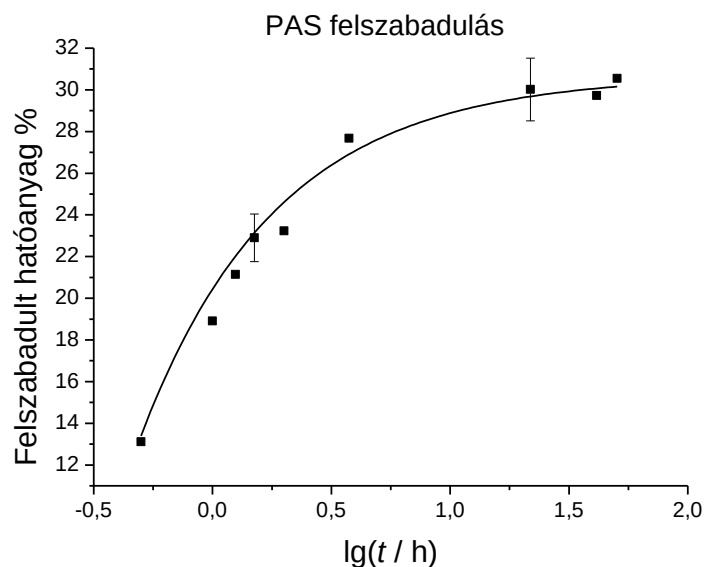
Hatóanyag felszabadulás

A hatóanyag felszabadulását a PAS₅ rendszeren vizsgáltuk (5. táblázat). A hatóanyag felszabadulásának vizsgálatát pufferban (pH=7,4), 37 °C-on végeztük, így modelleztük az emberi szervezet körülményeit. Az oldatba került hatóanyag mennyiségét a nanorészecskéktől való elválasztás után spektrofotometriás mérés alapján határoztuk meg. A hatóanyag pufferban mért spektruma a 9. ábrán van feltüntetve. A méréshez használt kalibráló egyenes a 10. ábrán látható. A felszabadult hatóanyag mennyiségét a minta hatóanyag tartalmára vonatkoztattuk, és az így kapott százalékos értékeket tüntettük fel a 11. ábrán.



11. ábra: A felszabadult hatóanyag mennyisége a minta hatóanyag tartalmára vonatkoztatva

Az 50 óra időtartam alatt a kapszulázott hatóanyagnak kb. 30%-a jut oldatba az adott körülmények között. A felszabadulás kinetikájára jellemző, hogy egy kezdeti, gyors felszabadulást követően a kioldódás sebessége nagyon lecsökken a 10. és 50. óra között. A kezdeti gyors felszabadulás részletesebben megjeleníthető logaritmikus ábrázolásban, ami a 12. ábrán látszik.



12. ábra: A felszabadult hatóanyag mennyisége a minta hatóanyag tartalmára vonatkoztatva, logaritmikus időskálán ábrázolva

Az eredmény azt mutatja, hogy a felszabadulás vizsgálatot mindenképpen ki kell terjeszteni hosszabb időtartamra. A felszabadulás sebességének ilyen változása arra utal, hogy több folyamat határozza meg a hatóanyag szabaddá válását. A kezdeti gyors felszabadulás következhet abból, hogy a hatóanyag egy része a hordozó felületén van megkötve, illetve a hordozó részecske duzzadás által hirtelen szabaddá válik. A hatóanyag többi része feltehetően csak a hordozó degradációjának útján tud felszabadulni, amihez az általunk vizsgált időtartamnál hosszabb időre van szükség.

Összefoglalás

Munkámban nanoprecipitációval állítottam elő biodegradábilis polimerekből gyógyszerhordozó nanorészecskéket. Tanulmányoztam, milyen hatása van a polimer összetételének (tejsav-glikolsav arány) a képződő, nanorészecskéket tartalmazó vizes szuszpenzió fontos fizikai-kémiai tulajdonságaira. A nanoszuszpenzió előállításához adalékként Pluronic kopolimert használtam. Ennek kettős szerepe van: biztosítja a nanorészecskék sztérikus stabilizálását, és hozzájárul felületi biokompatibilitásuk növeléséhez. Összehasonlítottam a különböző felépítésű Pluronic molekulák hatását a szuszpenzió stabilizálására. A nanorészecskék előállítását két különböző szerves oldószer, acetone és tetrahidrofurán felhasználásával végrehajtottuk.

Az acetont alkalmazó esetekben azt találtuk, hogy a nanorészecskék a különböző polimerből, különb. stabilizátorral előállított nanorészecskék mérete a 150-250 nm-es tartományba esik, és a polidiszperzitásuk is kicsi. A polimer összetételének hatása egyértelmű tendenciát mutatott: kisebb méretű, részecskék keletkeztek a glikolsav- tartalom növekedésével. A részecskeméret a stabilizátor minőségétől is függött. Az így feltárt összefüggések lehetővé teszik, hogy ezen paraméterek megválasztásával tervezett méretű nanorészecskéket állítsunk elő az adott tartományban.

Amikor szerves oldószerként tetrahidrofuránt használtunk, hasonló tendenciát figyeltünk meg a polimer és a stabilizátor minőségétől függően, de a részecskeméret-tartomány 350 nm-ig eltolódott és a szuszpenziók valamivel nagyobb polidiszperzitást mutattak. Az előállított szuszpenziók elektrolittal szembeni stabilitását jellemeztük, és azt találtuk, hogy a legtöbb rendszer esetében 1 M-os NaOH- koncentráció sem okozott aggregációt.

A Pluronic-kal elért sztérikus stabilizálás abban is megmutatkozott, hogy a mintafeldolgozáskor alkalmazott körülmények (tisztítás, liofilizálás) között is megmaradt a diszperzitásfok, és a jellemző átlagos részecskeméret sem változott.

Az eddig tanulmányozott rendszerek közül egyet kiválasztva tuberkulózis elleni hatóanyagot, PAS-t kapszuláztunk. A hatóanyag mennyiségétől függően 0,3 és 5% közötti hatóanyagtartalmú nanorészecskéket kaptunk.

Módszert dolgoztunk ki a hatóanyag-felszabadulás követésére. Azt tapasztaltuk, hogy a bezárt hatóanyag körülbelül negyede néhány óra alatt oldatba jut, ezt további lassú felszabadulás követi. Az eddigi első eredmények arra utalnak, hogy érdemes hosszabb ideig követni a

hatóanyag-felszabadulást, ezáltal a kinetika és a hatóanyag szerkezete közötti összefüggésre derülhet fény.

Az általunk előállított rendszer előnye, hogy jól definiált, nanométeres méretű részecskéket tartalmaz, amelyek szűk méreteloszlásúak, a méret az előállítás paramétereivel szabályozható, nagyfokú kolloidstabilitással rendelkezik, és ezt korábbi vizsgálatokhoz képest minimális mennyiségű stabilizátorral értük el. Egy közepesen hidrofób hatóanyagot eredményesen kapszuláztunk, és azt tapasztaltuk, hogy késleltetett hatóanyag-felszabadulás valósul meg.

Irodalomjegyzék

- [1] Kiss Éva: *Gyógyszerhordozó nanorészecskék*. Fizikai Szemle 413-417., (2011/12)
- [2] Middleton, J. C, Tipton, A. J.: *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 21, 2335-2346 (2000)
- [3] Gunatillake, P. A., Adhikari, R.: *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. European Cells and Materials, 5, 1-16 (2003)
- [4] Loo, S. C. J. ,Tan, W. L. J., Khoa, S. M., Chia, N. K., Venkatraman, S., Boey, F.: *Hydrolytic degradation characteristics of irradiated multi-layered PLGA films*. Int. Journ. of Pharm., 360, 228-230 (2008)
- [5] Hans, M .L., Lowman, A.M.: *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 6, 319-327 (2002)
- [6] Faragó Eszter: *A vér-agy gát szelektivitásának molekulaszervezeti alapjai és nanotechnológiai hasznosításuk a permeabilitás elősegítésére*. Diplomamunka, ELTE Fizikai- Kémiai- Tanszék, Budapest (2011)
- [7] M. Deli, M. Kálmán: *Vér-agy gát: kölcsönhatás gliasejtek és az agyi endothelsejtek között*. In: Szerk. Zs. Huszti, M. Kálmán: Glia, Akadémiai Kiadó, Budapest, 351-367 (2008)
- [8] P. Ballabh., A. Braun, M. Nedergaard: *The blood –brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications*. Neurob. of Dis., 16, 1-13 (2004)
- [9] Mora-Huertas, C.E. Fessi, H., Elaissari, A.: *Polymer-based nanocapsules for drug delivery*. Int. Journ. Pharm. 385, 113-142 (2010)
- [10] Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, Benita, S., *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. Int. Journal of Pharm. 55, R1-R4 (1989)
- [11] Ravi Kumar, M. N. V., Bakowsky, U., Lehr, C.M.: *Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers*. Biomaterials 25, 1771-1777 (2004)

- [12] Gyulai, G., Péntes, Cs.B., Mohai, M., Lohner, T., Petrik, P., Kurunczi, S., Kiss, É.: *Interfacial properties of hydrophilized poly(lactic-co-glycolic acid) layers with various thicknesses*. J. Colloid Interface Sci. 362(2) 600-606 (2011)
- [13] Kiss, É., Schnöller, D., Pribranská, K., Hill, K., Péntes, Cs. B., Horváti, K., Bősze, Sz.: *Nanoencapsulation of Antitubercular Drug Isoniazid and Its Lipopeptide Conjugate*, Journal of Dispersion Science and Technology 32:12, 1728-1734 (2011)
- [14] <http://www.koranyi.hu/modszertan/tbcprotokoll.htm>
- [15] V. M. Nace: *Nonionic surfactants- Polyoxyalkylene Block Copolymers*. Marcel Dekker, 1996. New York
- [16] Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H.: *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. Advanced Drug Delivery Reviews 58, 1688–1713, (2006)
- [17] Konan, Y. N. Gurny, R., Allémann, E.: *Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics 233, 239–252 (2002)
- [18] Shaw, D. J. Bevezetés a kolloid- és felületi kémiába, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1986. 45-46.
- [19] Dr. Kucsman Árpád: Szerves kémia I. ELTE, 1976.
- [20] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4649>
- [21] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00233>
- [22] Pribransky Kinga: *Tuberkulózis elleni hatóanyag- és hatóanyag-konjugátum nanokapszulázása*. TDK dolgozat, ELTE Fizikai- Kémiai- Tanszék, Budapest (2010)

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a lehetőséget, hogy TDK dolgozatomat az ELTE Fizikai Kémiai Tanszék Határfelületek és Nanoszerkezetek Laboratóriumában készíthettem el.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kiss Éva tanárnőnek szakmai segítségét, támogatását és biztatását. Köszönöm konzulensemnek, Gyulai Gergőnek a tanácsokat, iránymutatásokat, és a fáradhatatlan segítséget. Köszönöm mindkettőjüknek a türelmet, és azt, hogy bármikor hozzájuk fordulhattam kérdéseimmel.

Szeretném megköszönni az ELTE Határfelületek és Nanoszerkezetek Laboratóriuma minden dolgozójának, köztük Hórvölgyi Zoltánné Pető Idának és Pénzes Csanád Botondnak a mindenkori szíves segítséget és támogatást.

Köszönöm az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport tagjainak, Dr. Bősze Szilviának és Kiskó Máriának a liofilizáláshoz nyújtott szíves segítségét.

Köszönet illeti továbbá családomat és páromat türelmükért és támogatásukért.