

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet

Kémia Doktori Iskola



**Gyógyszerhatóanyag hordozó rendszerek szerkezete és a  
hatóanyag leadás kinetikája**

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Varga Noémi

Témavezető  
Dr. Dékány Imre  
egyetemi tanár, akadémikus

**Szeged  
2015**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Az értekezés célkitűzései .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>7</b>
3.1. Gyógyszerhatóanyag-szállító rendszerek .....	7
3.1.1. A fehérjék szerkezete .....	11
3.2. A hatóanyagok célba juttatásának módszerei .....	14
3.3. A hatóanyag leadás kinetikája, kinetikai modellek .....	16
<b>4. Kísérleti rész .....</b>	<b>20</b>
4.1. Felhasznált anyagok .....	20
4.2. Vizsgálati módszerek elvi alapjai, a kísérleti körülmények .....	21
4.2.1. Részecske töltés titrálás (Mütek) .....	21
4.2.2. Fajlagos felület meghatározása .....	22
4.2.3. UV-látható spektrofotometria (UV-vis) .....	22
4.2.4. Oldatadszorpciós mérések .....	22
4.2.5. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) .....	23
4.2.6. Termoanalitika .....	23
4.2.7. Sűrűségmérés .....	23
4.2.8. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) .....	23
4.2.9. Cirkuláris Dikroizmus (CD) .....	23
4.2.10. Fényszórásmérés (LS) .....	24
4.2.11. Fluoreszcencia (FL) .....	25
4.2.12. Röntgendiffrakció (XRD) .....	27
4.2.13. Kiszcögű röntgenszórás (SAXS) .....	27
4.2.14. Liofilizálás .....	27
4.2.15. <i>In vitro</i> hatóanyag leadás vizsgálata.....	27
4.3. Kísérleti módszerek .....	28
4.3.1. Mezopórusos szilika előállítása .....	28
4.3.2. SiO <sub>2</sub> -alapú kétrétegű mag-héj kompozit előállítása pH = 5,5-ön .....	28
4.3.3. BSA-oldatsorozat készítése pH = 2 és 12 között .....	29
4.3.4. BSA-ligandum oldatsorozat készítése pH = 3-on és pH =7-en.....	29
4.3.5. BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozit előállítása pH = 3-on.....	29
4.3.6. BSA-alapú egyrétegű mag-héj kompozit előállítása pH = 7,4-en .....	29

4.3.7. BSA/NaDS biokonjugátum előállítása pH = 3-on .....	30
4.3.8. BSA/IBU/NaDS kompozit előállítása pH = 3-on .....	30
<b>5. Eredmények és értékelésük .....</b>	<b>31</b>
5.1. SiO <sub>2</sub> -alapú kétrétegű mag-héj kompozitok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája .....	31
5.2. BSA konformációjának vizsgálata fizikai-kémiai módszerekkel .....	46
5.3. BSA-ligandum kölcsönhatás vizsgálata .....	54
5.4. BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozitok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája .....	59
5.5. BSA-alapú egyrétegű mag-héj kompozitok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája .....	71
5.6. BSA/NaDS biokonjugátumok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája .....	79
<b>6. Összefoglalás .....</b>	<b>87</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>91</b>
<b>8. Irodalom jegyzék .....</b>	<b>95</b>
<b>9. Függelék .....</b>	<b>103</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>105</b>

## Rövidítések jegyzéke

ANS	8-anilino-naftalén szulfonsav
BSA	marhaszérum-albumin (bovine serum albumin)
CD	cirkuláris dikroizmus
Chit	kitozán
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
DLS	dinamikus fényszórás mérés
FL	fluoreszcencia spektroszkópia
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
IBU	ibuprofen
KP	ketoprofen
KYNA	kinurénsav
LS	fényszórás mérés
Műtek	részecske töltés meghatározó detektor
NaDS	nátrium-dodecil-szulfát
PAH	poli(allilamin-hidroklorid)
PBS	foszfát-puffer (pH=7,4)
PEI	polietilén-imin
PSS	nátrium-poli(sztírol-szulfonát)
SAXS	kisszögű röntgenszórás
TEOS	tetraetoxi-szilán
UV-vis	ultraibolya-látható spektroszkópia
XRD	röntgendiffrakció

## 1. Bevezetés

A nanoszerkezetű anyagok- és a nanokompozitok előállítása, szerkezetük pontos jellemzése és gyakorlati alkalmazásuk a modern kolloidkémia egyik legintenzívebben kutatott területe. A nanotechnológia egyre több területen jelenik meg, úgymint a környezetvédelem, a mezőgazdaság, az elektronika, a fizika, az informatika, a gyógyszeripar és a nanomedicina területén. [1]. A nano-mérettartományba eső ( $\leq 100$  nm) anyagok egyszerű előállítása, kedvező tulajdonságai, valamint alkalmazási lehetőségei, mind hozzájárultak a nanotechnológia növekvő térhódításának. Kulcsfontosságú tulajdonságuk a nagy fajlagos felület, a kis méret, a könnyű funkcionálizálhatóság, illetve a biomolekulákkal való konjugáció lehetősége [2]. A nanoszerkezetű anyagok alkalmazásával lehetőség nyílik a biokémiai folyamatok mechanizmusainak feltérképezésére, terápiás alkalmazások során a betegségek okainak felkutatására, kezelésére (orvos diagnosztika), valamint sejtek újjáépítésére is [3].

A megváltozott tulajdonságok mellett, a célzott specifikusság és a membránokon való megnövekedett permeabilitás tette vonzóvá a nanorészecskék/kompozitok használatát hatóanyag-szállító rendszerekként [4,5]. Számos terápiás vegyület alkalmazása a szervezetben korlátozott, mivel olyan tulajdonságokkal rendelkeznek (szerkezet, méret, hidrofób jelleg, töltés, stabilitás, stb), amelyek megakadályozzák a hatóanyagok célzott helyre jutását, megkötődését [6]. Továbbá, a gyógyszer hatékonyságát enzimatis hasítás, adszorpció vagy egy nem-célzott helyen történő akkumulálódás is gátolhatja [7]. Ezen akadályok kiküszöbölhetőek, megfelelő módosításokkal, kölcsönhatások kialakításával, specifikus transzporterek vagy kompozitok alkalmazásával [8]. A nanorészecskék igen nagy hátránya, hogy általában toxikusak: minél kisebb méretűek, annál károsabbak a szervezetre nézve, így például az Au nanorészecskék 15 nm, míg az Ag és a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék 100 nm mérettartományig mutatnak nagyfokú toxicitást [9]. További hátrányuk, hogy akkumulálódhatnak és a szervezet nem rendelkezik olyan funkcióval, amely ezen anyagok kiürüléséért felelősek [1]. A biokonjugátumok, illetve a kompozitok, azon belül is a mag-héj kompozitok jelenthetik erre a megoldást. Előnyük a nanorészecskékkel szemben, hogy jobb biokompatibilitással rendelkeznek: növelik a bio-és citokompatibilitást [10], nagyfokú diszperzitást és jobb konjugációt mutatnak más bioaktív molekulákkal, valamint javítják a hő,- és kémiai stabilitást [11]. Az aktív komponenst tartalmazó magot/hordozót burkoló legkülső héj/konjugátum szerepe nemcsak a toxikusság kiküszöbölésében rejlik, növelheti a

rendszer hidrofil jellegét, stabilizálhatja a kompozitot, elősegítheti a célzott helyre való kötődést és a szabályozott hatóanyag leadást [12]. Az ideális hatóanyag hordozó rendszerek 100 nm alatt vannak [13], valamint nagyfokú stabilitást mutatnak a vérben, amely megakadályozza a hatóanyag idő előtti kiürülését a szervezetből [14]. Legfontosabb kritériumok, ezekkel a rendszerekkel szemben, hogy a célzott helyen és egy meghatározott időintervallumban adják le a hatóanyagot a megfelelő koncentrációban [15]. Ezen követelmények alapvető fontosságúak, ugyanis a túl kis mennyiségű hatóanyag hatástalan, míg a túl nagy dózisban történő hatóanyag leadás rövid időintervallumban káros lehet az emberi szervezetre [16]. A megfelelő nanoszerkezetű anyagok előállítása és biológiai hatásuk vizsgálata tehát, számos tudományterületet érintő összetett feladat.

## 2. Az értékezés célkitűzései

Biológiai rendszerekben alkalmazható hatóanyag-szállító rendszerek fejlesztése és előállítása nagy kihívást jelent a kutatók számára, ugyanis ezen rendszerek működését, hatékonyságát befolyásolja a gyógyszer formája (tabletta, injekció), a célzott terület, valamint a hatóanyag, a komponensek és azok együttes tulajdonságai is. Ezért, működésük és hatékonyságuk megértéséhez, elengedhetetlen feltétel a kompozitok/biokonjugátumok fizikai-kémiai paramétereinek (pl. méret, töltés, szerkezet, stb) pontos jellemzése, valamint a hatóanyag kioldódás mechanizmusának ismerete.

Munkám során olyan hatóanyag-szállító rendszerek előállítását tűztem ki célul, amelyek nyújtott és szabályozott hatóanyag-leadást biztosítanak fiziológias körülmények között. Mind a rendszerek tervezésénél, mind az előállításnál elsődleges szempontnak vettem a biokompatibilis és nem-toxikus anyagok alkalmazását. A szervezetben történő akkumulálódás kiküszöböléséhez másodlagos kötőerők (pl. elektrosztatikus kölcsönhatások) létrehozásával állítottam elő a kompozitokat. Vizsgálataimhoz, a nem-szteroid gyulladásgátló szerek, valamint a neurotranszmitterek csoportjából választottam, így egy széles körben vizsgált hatóanyag, az ibuprofen (IBU), valamint egy a központi idegrendszerre ható gyógyszer, a kinurénsav (KYNA) kapszulázását végeztem el. Ennek megfelelően célom a következő rendszerek előállítása és jellemzése:

1. Mezopórusos szilika ( $\text{SiO}_2$ ) hordozó előállítása és jellemzése hatóanyag szállítása céljából.
2. A marha szérum albumin (BSA) szerkezetének átfogó fizikai-kémiai vizsgálata pH = 2 és 12 között a pH-függvényében, só nélkül és 150 mM NaCl-oldatban.
3. Új típusú hatóanyag-hordozó rendszerek előállítása:
  - a.) két polielektrolit héjjal „burkolt”  $\text{SiO}_2$ -alapú mag-héj kompozit IBU kapszulázására.
  - b.) két polielektrolit héjjal „burkolt” BSA-alapú mag-héj kompozit az IBU kapszulázására.
  - c.) egyrétegű BSA-alapú mag-héj kompozit a KYNA vér-agy gáton történő átjuttatására.
  - d.) BSA/NaDS biokonjugátumok az IBU kapszulázására.
4. Az előállított rendszerek hatóanyag kioldódás mechanizmusának tanulmányozása empirikus és a mechanisztikus kinetikai modellek segítségével.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Gyógyszerhatóanyag szállító rendszerek

A gyógyszerkutatásban, az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb hangsúlyt kapnak az olyan hordozó rendszerek, amelyek segítségével a terápiás szer a célzott helyen a megfelelő hatékonysággal időben szabályozott kioldódási sebességet eredményez.

A hatóanyag-szállító rendszerek története az 1950-es években kezdődött, ekkor jelentek meg az első generációs típusaik [17]. Különböző kioldódási mechanizmusokat értelmeztek, így az oldódáson, a diffúzió, az ozmózis és az ion-cserén alapú folyamatokat. Ebben az időben fejlesztettek ki a bőrön keresztül felszívódó hatóanyagot tartalmazó tapaszokat, amelyeket naponta vagy hetente elég volt alkalmazni, míg tabletták formájában napi egyszeri vagy kétszeri bevétele szükséges volt [18].

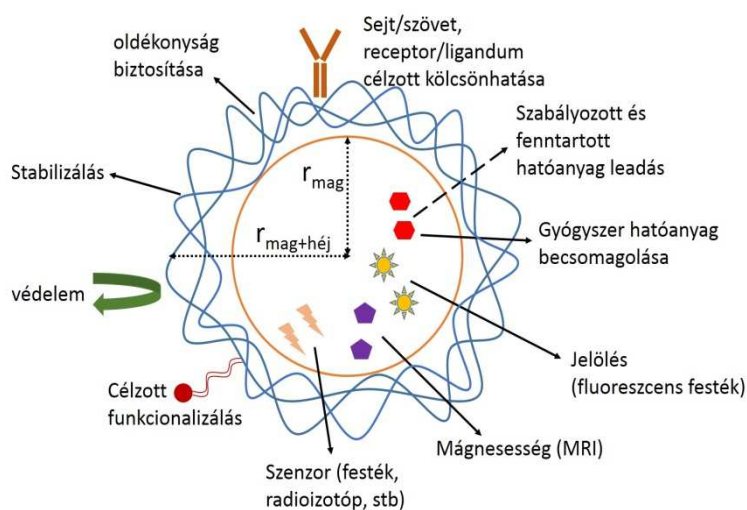
A második generációs hatóanyag-szállító rendszerek, azaz az úgynevezett „intelligens” hordozó rendszerek az 1980-as évektől jelentek meg [19]. Ezzel párhuzamosan született meg az az elképzelés, miszerint ezen rendszereknek, egy nulladrendű kioldódás kinetikát kell követniük, ahhoz hogy egy állandó hatóanyag koncentrációt tartsanak fenn a vérben. Ezt az elgondolást összekötötték azzal, hogy minél síkabb/laposabb rendszert (pl. filmet) fejlesztenek ki, annál inkább követik ezt a mechanizmust. Az évtized végére rájöttek, hogy egy szabályozott, fenntartott hatóanyag kioldódáshoz nem szükséges egy nulladrendű kinetikát követni. Vannak olyan, hatóanyagok (agyalapi mirigy hormonok, inzulin), amelyek esetében nincs szükség egy állandó koncentráció fenntartására a vérben, elégséges, ha a hatékony szintet biztosítja, tehát a minimális hatásos és a maximális biztonságos szint közé eső koncentráció szintet szolgáltatja [20]. Ezek az ismeretek voltak szükségesek ahhoz, hogy a hatóanyag-hordozó rendszerek tervezése, fejlesztése változatosabb összetételben és morfológiában is megvalósuljanak. A második generációs rendszerek közé tartoznak a hidrogélek, polimerek, amelyek a környezetükben bekövetkező változások hatására adják le a hatóanyagot, mint például a pH, a hőmérséklet vagy a glükóz szint megváltozására [21]. Erre az időszakra tehető az implantátumok megjelenése peptidek és fehérjék szállítására, majd a nanotechnológián-alapuló hatóanyag-szállító rendszerek is megjelentek; legfőképpen gén-, vagy tumor-célzott terápiás kezelésekre [22].

A hatóanyag-szállító rendszerek legnagyobb ütemben fejlődő területe a nanorészecskék/kompozitok alkalmazása. A kolloid-mérettartományban előállított rendszerek előnyei a korábban használt rendszerekhez képest abban mutatkozik meg, hogy közvetlenül a



vérbe juttathatók, valamint a megfelelő kis méret és a nagy fajlagos felület mellett különböző módosításokkal célzott hatóanyag szállítás érhető el [23,24]. Nanohordozók, amelyek képesek adott időben és adott helyen kontrolláltan leadni a hatóanyagot, növelik a terápiás hatékonyságot, csökkentik a mellékhatásokat és a szedési gyakoriságot is [25,26]. További előnyük, hogy csökkentik a hatóanyagszint flokkulálást a vérben, valamint a kompozitok alkalmazása növeli a gyógyszer hatékonyságát, permeabilitását pl. tumor-ellenes terápiákban.

Az utóbbi évtizedekben a hatóanyag-szállító rendszerek közül a mag-héj kompozitok kutatása kiemelkedő területté vált a sokoldalú felhasználási lehetőségeinek köszönhetően [27-29]. A mag tulajdonságaitól függően hidrofil vagy hidrofób hatóanyagok, festékmolekulák/jelölők, mágneses nanorészecskék, radioizotópok egyaránt kapszulázhatók, amelyek a kompozit felhasználási lehetőségeit növelik (**3.1. ábra**). A héj szerepe nemcsak a „kapszulázott” molekula kioldódását kontrollálja, hanem védelmi és/vagy stabilizáló funkciót is elláthat, valamint a kívánt hidrofil/hidrofób arány is beállítható, a megfelelő anyagok és koncentrációk helyes megválasztásával. A legkülső héj funkcionálisával célzott kötődés érhető el, így például célzott antitest/antigén vagy receptor/ligandum kölcsönhatás is megvalósítható. Ennek köszönhetően olyan területeken kezdték el őket használni, mint a bioképzés [30], a szabályozott hatóanyag leadás [31], a tumor terápia [32], a szövet sebészet [33] és így tovább. Az irodalomban számos módszerről olvashatunk mag-héj struktúrák/biokonjugátumok előállítására [34-36]; a kompozit összetétele, az előállítás paraméterei, mint pl. a hőmérséklet, a pH, mind meghatározzák a kompozitok tulajdonságait (méret, felületi tulajdonságok, szerkezet), ezáltal nagyszámú, változatos rendszer előállítható. A továbbiakban az általunk vizsgált szervetlen,- és szerves-alapú hatóanyag-szállító rendszerekről lesz szó bővebben.



**3.1.ábra** A mag-héj kompozitok alkalmazási lehetőségei

Rendezett szerkezetű, szabályozott pórusátmérővel és térfogattal rendelkező szilika részecskék alkalmazása az utóbbi húsz évben nagymértékben elterjedt [37]. Tulajdonságaiknak köszönhetően alkalmazhatóak a katalízis, az elválasztás technika, a szenzorika és a bioorvoslás területén is [10]. Előnyük, hogy rendkívül nagy mennyiségű - fajlagos felülettől függően - anyagot képesek felvenni és raktározni. A szilika részecskék két csoportját különböztethetjük meg, a nem-pórusos és a pórusos szilika részecskéket, ez utóbbit gyakran nevezik mezopórusos szilikának is (pórusátmérő: 2-50 nm) [38]. Kivételesen nagy fajlagos felületüknek köszönhetően, ami 1000 m<sup>2</sup>/g körüli is lehet, hatóanyagok csomagolására, szállítására is elterjedten alkalmazzák. Ezen szervetlen részecskék biológiai rendszerekben való alkalmazását biokompatibilitása teszi alkalmassá [39], habár egyes cikkekben a szilika biokompatibilitását a morfológiájához kötik [40]. Zhu és mtsai egy szilikával bevont félvezető quantum dotot állított elő, amely nemcsak nagy stabilitással és kémiai ellenállóképességgel, hanem biokompatibilitással is rendelkezett, amely egy kritikus pontja a biológiai rendszerekben való alkalmazásnak [41]. Továbbá, a szilika növelheti egyes anyagok biokompatibilitását, így például a mágneses nanorészecskék, a biopolimerek és a micellák biokompatibilitását is [42-44]. Az irodalomban számos módszert találhatunk szintézisükre. A 60-as évek végén közöltek egy szol-gél szintézis módszert, amellyel egy nem-pórusos és kis fajlagos felületű, úgynevezett Stöber-szilikát sikerült szintetizálni a kolloid mérettartományban, [45] a tetraetil-ortoszilikát (TEOS) hidrolízisével etanolos közegben és ammónia jelenlétében. 1992-ben jelent meg egy közlemény, egy szintézis módszerről, amelyben tenzidet alkalmaztak [46]. Az MCM-41-nek nevezett szilika egységes pórusmérettel és nagy fajlagos felülettel (> 1000 m<sup>2</sup>/g) rendelkezett. Előnyös tulajdonságaikkal ellentétben 2000-ig, nem található irodalom hatóanyag-szállító rendszerként való alkalmazásukról. Ennek egyik oka az lehet, hogy a szintézissel a morfológiát és a méretet még nem tudták szabályozni [47].

A nagy áttörést a méret szabályozása hozta meg, a víz, a prekursor és a tenzid egymáshoz viszonyított molarányának, valamint a reakcióidő és a hőmérséklet változtatása változatos paraméterekkel rendelkező szilika részecskéket eredményezett [48]. A nagy fajlagos felületű, viszonylag monodiszperz pórusátmérőjű (2 nm < d<sub>pórus</sub> < 10nm), valamint a nagy pórustérfogatú (> 0,9 cm<sup>3</sup>/g) MCM-41 és az SBA-15 elnevezésű szilika használata terjedt el leginkább [49]. Kezdetben, vízben rosszul oldódó gyógyszer-molekulák csomagolását [50], majd kemoterápiás ágensek kapszulázásával rákos sejtek elpusztítását célozták meg [51]. A szilika részecskék nagy felvevő képessége miatt az élelmiszer-kémiai kutatásokban is megjelentek, ugyanis antibakteriális szerek kapszulázása, az ételekben

fellelhető kórokozók, pl. Szalmonella, vagy az E-coli baktérium pusztulását eredményezve az élelmiszer-biztonságot növelik [52].

A hatóanyag-szállító rendszerek legnagyobb csoportját a szerves-alapú kompozitok alkotják; alkalmaznak biokompatibilis polimereket [24], poliszacharidokat [53], peptideket, fehérjéket [54], lipideket [55], dendrimereket [56], vagy egyéb más szintetizált biológiai-utánzó rendszereket [57]. A liposzómák (amelyek egy vagy több lipid kettősréteget tartalmaznak) alkalmazásával azt használják ki, hogy a vízdékony hatóanyag molekulákat a hidofil magba zárják be, míg a hidrofób hatóanyagokat a lipidrétegbe, ezáltal több, eltérő tulajdonsággal rendelkező hatóanyag együttes szervezetbe juttatása lehetséges [58]. A liposzómákhoz hasonlóan, a micellák is alkalmasak gyógyszerek „kapszulázására”, szállítására [59]. Az önrendeződő folyamat által, vizes közegben a viszonylag monodiszperz micella szolubilizálja a hidrofób hatóanyagot, amellyel megnövekedett mennyiségű hatóanyag vihető oldat formájába, míg szerves oldószerben hidofil molekulák „kapszulázása” válik lehetővé. A hidrogélek szerkezete, mérete, sűrűsége és az összetétele határozza meg a hatóanyag kioldódás kontroll folyamatát (duzzadás, bomlás vagy diffúzió-kontrollált); gyakran egy külső vagy belső ingerre indul meg a kioldódás, ilyen a pH, az ionerősség vagy akár lehet hidrolitikus vagy enzimatis hasítás eredménye is [60]. A dendrimer egy központi magból kiinduló, elágazó szerkezetű molekula, amelynél a hatóanyag kovalens kötéssel kapcsolódhat a láncvégekhez, illetve a mag belsejébe csomagolhatóak hidrogén-kötés, hidrofób- vagy elektrosztatikus kölcsönhatások által [61]. A polimer nanorészecskékből (fehérjék, dextrán, poliszacharidok, szintetikus polimerek: PLGA, PLA, PEG, PVA, PEI) a hatóanyag kioldódása a polimer mátrix bomlása és/vagy a hatóanyag diffúziója révén valósulhat meg [62]. A fehérjék közül, kiemelkedő jelentőséggel bírnak az albuminok, mind terápiás, mind diagnosztikai hatóanyag-hordozó rendszerben való alkalmazásuknak. Ezt előnyös tulajdonságaiknak köszönhetik, ugyanis nem-toxikus, nem-immunogén, biokompatibilis és biológiailag lebomló anyagok [63], továbbá számos kötőhellyel rendelkeznek, ami nagy mennyiségű hatóanyag molekula felvételét biztosítja [64,65]. Az albuminokban található nagyszámú töltött aminosav (arginin, lizin, aszparaginsav, glutaminsav) jelenléte lehetőséget ad elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására különböző töltésű molekulákkal (pl. oligonukleotidok, sejtek) [66]. Specifikus, célzott hatóanyag-szállítás a funkciós csoportok segítségével valósítható meg; a felület módosításával a kívánt sejthez/szövethez köthető a részecske, így a gyógyszer a megfelelő helyen fejti ki hatását [67]. Alkalmazásukat az is erősíti, hogy a tumorsejtek fokozott felvételt mutatnak az albuminokra, így a rákos sejtek elpusztítására ígéretes megoldást jelenthetnek [68,69]. Erre egy példa, hogy

kifejlesztettek egy albumin-paclitaxel nanorészecske-tartalmú (130 nm) terméket, amely Abraxane® néven 2005 óta van forgalomban mellrák kezelésére [68]. A hepatitis C ellen az interferon- $\alpha$ -2b (INF $\alpha$ -2b) molekulát használják albuminhoz kötve, amely Albuferon® néven 180 millió ember életét érinti világszerte [70]. A további fejlesztések legfőképpen a gyógyszeradagolás gyakoriságának csökkentésére irányulnak. Az albuminok különböző hatóanyag molekulák vér-agy gáton való átjuttatására is eredményesnek bizonyultak [71]. Ulbrich és munkatársai egy vér-agy gáton nem átjutó hatóanyagot (loperamid) kötöttek egy albumin-antitest konjugátumhoz, amellyel a hatóanyag sikeresen bejutott a központi idegrendszerbe [72].

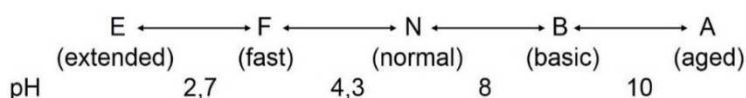
A tenzidek alkalmazása a bio-tudományok területén egyre nagyobb mértékben terjed, köszönhetően annak, hogy a tenzidek képesek a foszfolipid rétegek természetes, hidrofób környezetét leutánozni in vivo körülmények között [73]. A tenzidek polimerekkel való együttes alkalmazása hatóanyag-szállító rendszerként új és előnyös tulajdonságokat biztosít. Ezen rendszerek jellemzői (pl. méret, hidrofilitás) szabályozhatóak az alkil-lánc hosszával, a poláris csoport méretével, a koncentrációval, a só koncentrációval, a hőmérséklettel, a pH-val és egyéb anyagok jelenlétével [74].

A polimerek egyik válfaja, a poliszacharidok igen változatos szerkezettel és tulajdonságokkal rendelkeznek. A természetes poliszacharidok funkciós csoportjai (karboxil, amino, hydroxyl) lehetőséget nyújtanak mind kémiai, mond biokémiai módosításokra, melyekkel számos származék előállíthatására nyílik lehetőség [75]. A természetes biomolekulákhoz hasonlóan, a poliszacharidok is hidrofíl, nagy stabilitású, biokompatibilis és nem-toxikus anyagok [76,77]. A hialuronsav (HA) megtalálható a szövetekben, a testfolyadékban és a bőrben is [78], így a HA ideális alkotóeleme a kozmetikumoknak, az orvosi,- és a gyógyászati alkalmazásoknak is; a reumatológiában és az urológiában is sikeresen alkalmazott hatóanyag [79,80]. A HA-alapú rendszerek egyik legelterjedtebb alkalmazása során a hatóanyag felszívódást bőrön keresztül valósítják meg [54,81]. Az utóbbi időkben a kutatások a térhálósított és a módosított HA-t tartalmazó rendszereken alapuló rákellenes gyógyszer-szállító rendszerek fejlesztésére irányulnak [82-84].

### *3.1.2. A fehérjék szerkezete*

Az előző fejezetben láthattuk, hogy igen gyakori, hogy a hatóanyag-szállító rendszerek hordozójaként fehérjét alkalmaznak. Ismeretes, hogy a fehérjék szerkezete számos körülmény hatására megváltozik, így például a pH, a hőmérséklet, az elektrolitok vagy egyéb molekulákkal való kölcsönhatás hatására is [85,86]. Ezen hatásokra a fehérje reverzibilis vagy

irreverzibilis konformáció-változást szenvedhet. Erősen savas közegben ( $\sim \text{pH} = 2$ ), a fehérje még úgynevezett „olvadt gombolyag” állapotban van, ahol a másodlagos szerkezeti elemek már kialakulhattak, de a harmadlagos szerkezet még nem [87]. 2,7 alatti pH-n a fehérje kitekeredett állapotban van, ezt nevezzük E-formának (extended) [88]. Növekvő pH-val a fehérje egyre közelít az ideális állapotához, ezt hívjuk F-állapotnak (fast) [89]. 4,3 és 8-as pH között a fehérje felveszi a természetes (natív) állapotának megfelelő struktúráját [90]. Lúgosabb pH-n egy N-B (basic) átmenet valósul meg [87]. Erősen lúgos közegben ( $> \text{pH} = 12$ ) a fehérje egy viszonylag stabil szerkezettel rendelkezik, amelyet A (aged)- állapotnak nevezünk [91]. A kitekeredés/felgombolyodás folyamata a körülmények változtatásával követhető, viszont drasztikus körülmények fenntartásával a fehérje végleges visszafordíthatatlan változást szenved [92].



**1. ábra** A fehérje konformációs állapotainak megnevezése a pH-függvényében (a továbbiakban csak az egy betűs rövidítéseket fogom használni)

A fehérje szerkezetének a meghatározására leggyakrabban infravörös (FT-IR) és cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiát alkalmaznak. Biopolimerek esetében az infravörös színekben kilenc karakterisztikus csoport különül el (amid A és B, valamint I-VII), amelyek a polimert felépítő ismétlődő egységektől származnak [93,94]. A polipeptid lánc két legdominánsabb sávja, az amid I és amid II sáv. Az amid II az N-H hajlítók, valamint a C-N kötések vegyértékrezgéseiből tevődik össze, amely kevésbé érzékeny a szerkezeti változásokra [95]. Ezzel szemben, az amid I sáv ( $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ), amely a C=O rezgésekhez rendelhető, nagyon érzékeny a fehérje szerkezetében bekövetkező változásokra [96]. Ezen sáv dekonvolúciójával meghatározható a különböző másodlagos szerkezeti elemek százalékos tartalma. Az  $\alpha$ -hélix sávja  $1660\text{-}1652 \text{ cm}^{-1}$ , a  $\beta$ -redő  $1642\text{-}1628 \text{ cm}^{-1}$ , a  $\beta$ -kanyar  $1678\text{-}1670 \text{ cm}^{-1}$ , a random szerkezet  $1648\text{-}1644 \text{ cm}^{-1}$ , míg az aggregált forma  $1620\text{-}1610 \text{ cm}^{-1}$  közötti hullámszám tartományban jelenik meg [97-99]. A többi, amid sáv rezgése nagyon összetett, számos tényező befolyásolja, így ezek kiértékelése nagy gyakorlatot igényel [100].

A fehérjék az  $\alpha$ -hélix szerkezetüknek megfelelően a távoli UV-tartományban karakterisztikus jelet szolgáltatnak, ezt használja ki a CD-spektroszkópia. Az  $\alpha$ -hélix két negatív sávval jellemezhető: a 220 nm-nél található gyenge negatív sáv az  $n\pi^*$  átmenettől származik, amely intenzitása nem függ a hélix hosszúságától [101]. A  $\pi\pi^*$  átmenet 208 nm-nél hoz létre egy

szintén negatív sávot, amely intenzitása a peptidlánc hosszúságától erősen függ [102]. A fő másodlagos szerkezeti elem meghatározása a 208 nm-nél mért ellipticitási értékből történik, a következő egyenlet segítségével:

$$MRE_{208} = \frac{\theta_{208}}{10 \cdot n \cdot l \cdot c} \quad ([\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}], \quad (1)$$

ahol  $c$  a koncentráció,  $l$  az optikai úthossz és  $n$  az aminosavak száma. Ebből az  $\alpha$ -hélix tartalom számolható:

$$\alpha - \text{hélix}\% = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \cdot 100 \quad (2)$$

A 4000 a  $\beta$ -redő és a random szerkezet, míg a 33000 a tiszta  $\alpha$ -hélix MRE értéke 208 nm-nél [103,104]. Számos tanulmány használja ki a módszer előnyét (gyors, pontos, könnyű minta előkészítés) a fehérje-ligandum kölcsönhatások vizsgálatára [105-107].

A fluoreszcencia az egyik legérzékenyebb spektroszkópai módszer a fehérjék 3 dimenziós vizsgálatára. A fehérjékben található aromás csoportok (fenil-alanin (Phe), tirozin (Tyr), triptofán (Trp)) emissziója érzékeny a mikrokörnyezetében bekövetkező változásokra, így ez a módszer alkalmas a fehérjék konformációjának jellemzésére. A fluoreszcenciás kísérletek során a Tyr- sokkal kevésbé érzékeny a környezeti változásokra- és a Trp emissziója vizsgálható, ugyanis ezek esetében van elég nagy kvantumhasznosítási tényező (emittált foton/ gerjesztett foton), ami elengedhetetlen egy jól mérhető fluoreszcens jelhez [108]. Ezen aromás csoportok emissziója változik a felgombolyodás/kitekeredés folyamán. Natív állapotban ezek a csoportok a fehérje magjában helyezkednek el, míg kitekeredett állapotban ki vannak téve az oldószer hatásának [109]. Ez tükröződik az emissziós intenzitás értékekben is; hidrofób környezetben nagy a kvantumhasznosítási tényező, így nagy az emissziós intenzitás is. Ezzel ellentétben egy hidrofilebb környezetben az emissziós intenzitás lecsökken [110]. Ezen felül a Trp emissziós maximumának helye változik a harmadlagos szerkezet változásával, ugyanis a Trp igyekszik, úgy rendeződni, hogy minél hidrofóbabb környezetet találjon magának. A konformációs változások a natív szerkezetet fenntartó, stabilizáló kölcsönhatások (hidrogén-kötések, elektrosztatikus kölcsönhatások, hidrofób kölcsönhatások) felbomlásával, átrendeződéssel valósulnak meg. Kitekeredett állapotú fehérje létrehozása leggyakrabban egy kaotróp ágenssel (urea, guanidín hidroklorid), pH-változtatással vagy hőmérséklet növelésével érhető el [111]. A ligandum – fehérje kölcsönhatás során, a fehérje kioltási folyamata két csoportba sorolható [112]. Statikus kioltásról beszélhetünk, ha egy alapállapotú komplex jön létre a fluorofór és a kioltó között. Ez a típusú kioltás befolyásolhatja a fehérje másodlagos szerkezetét és a fiziológiás aktivitását is. Egy gerjesztett állapotú fluorofór és a kioltó ütközése sugárzás nélkül dinamikus kioltást

idéz elő, amely nincs hatással a fehérje konformációjára [113,114]. A kioltás mechanizmusának mennyiségi leírására a Stern-Volmer egyenlet [115] mellett számos módszert találhatunk az irodalomban kvantitatív információk kinyerésére, ilyen például a módosított Stern-Volmer [116,117], a Scatchard [115], valamint a Lineweaver-Burk-egyenlet, amelyekről bővebben a 4. pontban fogok írni.

### *3.1. A hatóanyagok célba juttatásának módszerei*

A különböző betegségek kezelésére az új, potenciálisan alkalmazható gyógyszerhatóanyag molekulák száma folyamatosan nő a kutatásoknak köszönhetően. Ezek felhasználása azonban legtöbbször korlátozott alacsony biohasznosulásuknak köszönhetően [118]. Ennek oka, hogy vízben alig vagy egyáltalán nem oldódnak. A beadást követően, (pl. tabletta formájában) ezek a típusú hatóanyagok gyakran már a gyomor-bél traktusban kiválasztódnak (nem képesek feloldódni), így nem képesek a véráramba jutni [119,120]. Ennek eredményeképpen általában vagy nagyon kis koncentrációban, a terápiás szint alatt vagy egyáltalán nem kerülnek a véráramba, így semmilyen hatást nem tudnak kifejteni. Megoldást egy nagyobb mennyiségű hatóanyag beadása jelent, hogy kellő mennyiségű gyógyszer kerüljön hasznosulásra. Ez a nagy mennyiség azonban nemcsak drága, és sűrű beszédési gyakoriságot is igényel, de növeli a mellékhatások kockázatát is. A problémát leginkább az oldékonyság növelésével vélték megoldani, így például a szolubilizációt, a komplexképződést, egy hidrofil anyaggal való módosítást, vagy a hatóanyag egy származékát használták fel a jobb biohasznosulás érdekében [121,122]. Manapság nanorészecskék vagy kompozitok alkalmazásában látnak potenciális lehetőségeket [123-126], amelyek egy lassú hatóanyag kioldódási folyamat lejátszódását is képesek megvalósítani, ugyanis ha állandó vagy közel állandó a hatóanyag leadás, azaz folyamatos oldódás megy végbe, akkor hatékony felszívódás érhető el.

A hatóanyagok szállítása a központi idegrendszerbe (CNS) nagy kihívást jelent a kutatók számára a vér-agy gát védekező mechanizmusa miatt. A központi idegrendszerre ható gyógyszerek közel 98%-a nem képes átjutni a vér-agy gáton a megfelelő terápiás koncentrációban [127]. Ennek leküzdésére számos módszert dolgoztak ki a kutatók, például zavart okoztak a vér-agy gát működésében, intracerebrális injekciók,- implantátumok, vagy prekursorok használatával jutatták be a hatóanyagot a központi idegrendszerbe [6]. Az első módszer nagy hátránya, hogy az eljárás közben nem csak a kívánt molekula tud bejutni a CNS-be, hanem minden egyéb káros anyag is átjuthat, amely további károsodást okozhat. Ilyenek a vérben található fehérjék, amelyek toxikusak az agysejtekre nézve [6]. A közvetlen

agyba való injekciózás, valamint az implantátumok előnye, hogy közvetlenül a célzott helyre juttatható az aktív komponens a megfelelő koncentrációban. Ez a módszer helyi kezelésekre kiválóan alkalmazható, működésképtelenné teheti például az agydaganatot is [128]. A prekursorok esetén, amelyek eredetileg a hatóanyag valamilyen származéka, a szervezetben kémiai vagy enzimátikus biotranszformáción keresztül átalakul az aktív hatóanyaggá. Használatának előnye, hogy az átalakulás folyamán sokkal hidrofílebb vegyület/ molekula keletkezik, amely elősegíti a transzportot a vér-agy gáton keresztül [129]. Ennek egy kifinomultabb változata, amikor például egy receptor, egy gén vagy valamilyen hordozó segítségével juttatjuk be a prekuzort a célzott helyre [130]. Az imént felsorolt módszerek használata azonban, nem növeli közvetlenül a hatóanyag vér-agy gáton történő jobb hatékonyságú bejuttatását, valamint még számos mellékhatással is kell számolni ezek alkalmazásánál. Néhány esetben a hosszú távú alkalmazás igen káros a szervezetre nézve, így a cél, egy olyan módszer kidolgozása, amellyel a hatóanyag mellékhatások nélkül átjut a vér-agy gáton, valamint a betegeknek egy fájdalommentesebb, megfelelőbb kezelés kidolgozása. A nano-mértettartomány skálájára eső anyagok alkalmazása, új utakat, lehetőséget nyitnak meg a hatóanyag-szállító rendszerek fejlesztése területén, például hatékonyabb és szelektívebb gyógyszer bejuttatás érhető el az agyba, akár meglevő, akár újabb hatóanyagok alkalmazása esetében. Kreuter és munkatársai [131,132] magyarázták meg, miért is juthat be egy nanorészecskével az aktív ágens a CNP-be: a nanorészecske több ideig tartózkodik a kapillárisokban, ezáltal megnövekedik a hajszálerek falára adszorbeálódott részecskék száma. Ez a folyamat egy nagyobb koncentráció gradienst indukál, amely megnöveli a hatóanyag szállítását az endotél sejtek rétegei között, amely így egy hatékonyabb gyógyszer szállítást eredményez. A nanorendszerek alkalmazásával egy nem-invazív módszert sikerült kifejleszteni, amely egyértelműen segíti a betegségek humánusabb kezelését. Számos hatóanyag-szállító rendszerről olvashatunk az irodalomban, így például liposzóma, polimer, dendrimer vagy micella-alapú kompozitokat is előállítottak [133-135]. Nem ritka egy adott hatóanyag tartalmú nanoemulzió vagy nanoszuszpenzió előállítása sem [136,137]. Az ilyen rendszerek megtervezésénél figyelembe kell venni, a kívánt beadási formát, a célzott területet és tulajdonságait, különös tekintettel a pH-ra, valamint a szükséges terápiás mennyiségre. A hatóanyagok injekció által történő bejutatásánál különösen fontos, hogy a hatóanyag a véráramban elég ideig tartózkodjon, azaz ne ürüljön ki idő előtt a szervezethől.



### 3.2. *A hatóanyag leadás kinetikája, kinetikai modellek*

A hatóanyag-szállító rendszereket jellemző legfontosabb adat, a hatóanyag kioldódás időbeli sebessége. Ez több okból is jelentős; fontos, hogy a hatóanyag koncentrációját adott ideig fenntartsuk a vérben vagy a célzott szövetben, méghozzá a terápiás mennyiségben. Ezen megfontolások könnyen beláthatóak, ha a hatóanyag egy nagy dózisban egyszerre oldódik ki, a hatóanyag szintje a kritikus, toxikus koncentráció fölé emelkedik, majd gyorsan a minimum hatékony koncentráció alá esik [25]. Többszöri, vagy folyamatos hatóanyag kioldódás csökkenti a hatóanyagszint ingadozását a vérben, ami a kívánt hatás elérését segíti elő [138]. Ezért fontos tehát, hogy egy állandó kioldódás sebességet érjünk el és tartsunk fel adott ideig, viszont a hatóanyag leadás sebességének túlzott gátlása veszélyezteti a terápiás kezelés hatékonyságát.

A gyógyszer kioldódását számos tényező befolyásolja, így például a kompozit összetétele (hordozó, hatóanyag, egyéb komponensek) azok arányai, a közöttük kialakuló fizikai és/vagy kémiai kölcsönhatások és az előállítás körülményei is. A kioldódás mechanizmusa négy fő kategóriába sorolható: diffúzió, oldószer, kémiai reakció- vagy valamilyen belső vagy külső inger által kiváltott folyamat lehet [137,139].

A diffúzió-kontrollált mechanizmus, olyan kapszula-típusú rendszerekre jellemző, amikor a hatóanyag diszpergálódás útján kioldódik a magból, majd a magot körülvevő rétegen átdiffundál (pl: mag-héj kompozitok) vagy amikor egy mátrix-típusú „nanogömbben” jól diszpergált hatóanyag molekula kidiffundál a rendszert körülvevő közegbe [140]. Ez utóbbi esetben, mivel a mátrixon kívül nincs további gátlása a diffúzió sebességének, rendszerint a kioldódás nagy sebességgel indul meg, amelyet egy csökkenő kioldódási sebesség követ.

Az oldószer-szabályozott kioldódás magába foglalja az ozmózis,- és a duzzadás-szabályozott kioldódást is. Az ozmózis-által szabályozott kioldódás esetében a víz hordozóba való diffundálásával, egy állandó koncentráció gradienst hoz létre [141]. Ha egy duzzadásra alkalmas polimer (pl. hidrogél) rendszert vizes közegbe helyezünk, a víz bediffundál a rendszerbe, amely a polimer duzzadását idézi elő, hatóanyag leadási folyamatot indukálva, melynek sebességét a víz diffúziója és a polimer láncok szolvatációja befolyásolja [142].

Biológiailag lebomló polimerekből álló hordozó rendszerek (poliészterek, poliamidok, poli(aminosavak), poliszacharidok), hidrolitikus és/vagy enzimatisz folyamatok útján lebonthatóak [143]. Vannak olyan mátrixok, amelyek már tömbi fázisban kezdenek bomlani (pl. PLGA, PLA) és vannak, amelyek esetében egy felületi bomlás indul meg először, ilyenkor a polimer bomlása gyorsabb a víz mátrixba történő diffúziójánál. A hatóanyag

kinetikáját a bomlás sebessége befolyásolja, amely függ a moláris tömegtől, a funkciós csoportoktól, monomer minőségétől és a kristályossági foktól [144].

Az ingerek által kiváltott hatóanyag leadást előidézheti hőmérséklet, pH, ionerősség, ultrahang, elektromos vagy akár mágneses mező is [145]. Tumor-specifikus hatóanyag-szállító rendszerek fejlesztései során legtöbbször, egy nanohordozóhoz kapcsolt pH-érzékeny linkert alkalmaznak, amely a tumor gyenge savas pH-jának köszönhetően célzott kötődését biztosít [146]. Valójában azonban több mint egy folyamat befolyásolja a kioldódás sebességét, de általában egy döntő folyamat az, ami meghatározza a kioldódás kinetikáját.

A hatóanyag-hordozó rendszerek gyors ütemben való fejlődése megkövetelte, hogy a hatóanyag kioldódás sebessége *in vivo* körülmények között előre megjósolható legyen. A hatóanyag kioldódás kinetikáját, tehát a rendszerre leginkább jellemző folyamat befolyásolja, ilyen például a diffúzió (egy inert mátrixon, egy membránon vagy egy hidrofíl gélen keresztül), az ioncsere, az erózió, vagy éppen a koncentrációtól-függő vagy független kioldódási folyamat. A fő kioldódási mechanizmus a diffúzió, ugyanis ez játszik szerepet különböző mértékben a kémiai, és a duzzadás-szabályozott folyamatokban is [147].

Elsőként (1961-ben) a matematikai modellek „atyjának”, nevezett, Professor Takeru Higuchi nevéhez fűződik a hatóanyag kioldódás kvantitatív kiértékelése [148,149]. Feltételezte, hogy az általa vizsgált kenőcsben a hatóanyag diffúz eloszlásban van jelen és a kioldódás egyensúlyi állapotban valósul meg, így született meg az első egyenlet diffúzió-kontrollált folyamatok matematikai leírása.

$$c_t = k_H \sqrt{t}, \quad (3)$$

ahol  $c_t$  a hatóanyag mennyisége a kompozitban  $t$  idő elteltével és  $k_H$  a kioldódás sebessége.

Ezt követően a 60-as évek végén megjelent egy cikk [150], amely hozzájárult ahhoz a felismeréshez, hogy két látszólag független mechanizmusa van a transzport folyamatoknak, a Fick-diffúzió és a case II transzport folyamat. Legtöbbször az utóbbi folyamat játszik legnagyobb szerepet a hatóanyag kioldódás folyamatában. Az előző mechanizmust a Fick-törvény írja le, míg utóbbi tükrözi a polimer láncok „mozgását is a mátrixban. Ezt követően Fu és munkatársai 1976-ban [151] közöltek egy cikket, ahol a hatóanyag kioldódás leírására mechanisztikus modellt használtak. Feltételezték, hogy a hengeres geometriájú hordozóban a hatóanyag homogénen oszlik el, a kioldódás során a geometria állandó, valamint a hatóanyag molekulák között nincs kölcsönhatás.

1985-ben Peppas vezetett le először egy fél-empirikus egyenletet (hatványfüggvénynek is nevezik) a hatóanyag kioldódásra polimer hordozóból [152]. Az egyenlet alakja, a következő:

$$\frac{c_t}{c_0} = k_{KP} + t^n \quad (4)$$

A  $c_0$  és  $c_t$  a hatóanyag mennyisége a kompozitban  $t=0$  és  $t$  időpontban,  $k_{KP}$  a kioldódás sebessége, míg  $n$  a „diffúziós kitevő”, ami kapcsolatban van mögöttes folyamatokkal is [153]. Ha az  $n > 0,5$ , a diffúziós folyamat úgynevezett, nem Fick-féle diffúziót (anomális transzport) követ, míg ha  $n = 0,5$ , akkor Fick-diffúziós mechanizmusról beszélhetünk. Case II transzport esetén (szabályozott duzzadás), ha  $n$  értéke 1, akkor a kioldódás (hidrogélből vagy síkfelületről lehetséges - akkoriban ezt gondolták) nulladrendű mechanizmust követ [154]. Az  $n$  értéke, nemcsak a mechanizmusra utal, következtethetünk belőle a geometriára is. Diffúzió-kontrollált mechanizmus esetén, az  $n=0,5$ ,  $0,45$  és  $0,43$  értékekhez rendre sík, henger, valamint gömb alak rendelhető. Duzzadás-kontrollált folyamatnál (a hatóanyag leadás gyorsabb, mint ahogy a hordozó duzzadni képes) az  $1,0$ ,  $0,89$  és a  $0,85$   $n$  értékek szintén, a sík, a henger és a gömb geometriájú hordozóhoz tartozik [153]. Azonban vannak olyan esetek, mikor nem beszélhetünk szabályos geometriájú hordozó rendszerekről. Ebben az esetben, ha az  $n$  értéke  $0,42$  és  $0,5$  között van, akkor diffúzió-kontrollált, míg ha  $0,85$  és  $1,0$  között van, akkor duzzadás-gátolt mechanizmusról beszélhetünk [154].

A Korsmeyer-Peppas modellhez hasonló leírást ad a módosított Freundlich modell. Ebben az esetben a kioldódás sebességét az ioncsere és a diffúzió szabályozza [155].

$$\ln \left( 1 - \frac{c_t}{c_0} \right) = \ln k_{mF} + \alpha \ln t \quad (5)$$

A  $k_{mF}$  a sebességi állandó,  $\alpha$  a Korsmeyer-Peppas modellből ismert  $n$  index-szel azonos, de a jelentése az irodalomban még nem tisztázott [155].

Láthatjuk, hogy a hatóanyag kioldódás kinetikájának leírására a matematikai modellek két csoportját különböztethetjük meg: empirikus/fél-empirikus, valamint mechanisztikus modelleket. Az első esetben semmilyen reális fizikai, kémiai és/vagy biológiai folyamatot nem vesznek figyelembe, azaz a mögöttes folyamatokról nem vagy minimális információt nyerhetünk ki [156]. Empirikus modellre példa, a Weibull modell, amely számos hatóanyag kioldódási kinetikájához igazítható, míg a fél-empirikusra a korábban látott Korsmeyer-Peppas modell. Ezek a modellek képesek egyaránt leírni vízdékony és vízben rosszul oldódó gyógyszerek kioldódás kinetikáját, de alkalmazásukhoz mindenképpen egy kioldódási vizsgálatot kell elvégezni. Ezzel szemben a mechanisztikus matematikai módszerek valós folyamatokon alapulnak, mint például diffúzió-, duzzadás-, erózió (a hordozó rendszer szétesése, fellazulása)-, kicsapás- és/vagy degradáció folyamatain [157,158]. Ezen modellek segítségével a rendszerre jellemző specifikus paramétereket nyerhetünk ki, melyek révén mélyebb betekintést nyerhetünk a háttérfolyamatokba is. Ezeket a típusú modelleket gyakran

csak diffúzió-kontrollált modelleknek nevezik, ilyen, mint korábban láttuk a Higuchi, valamint a Hixon-Crowell modell is [159]. Előnyük, hogy ezekkel a modellekkel, előre is meg lehet jósolni a hatóanyag kioldódási profilját, bizonyos fizikai paraméterek ismeretében, úgymint az oldhatóság, sűrűség, diffundáló képesség, amelyek egyéb kísérletekben meghatározhatóak.

Hixon és Crowell 1931-ben ismerték fel, hogy egy részecske szabályos területe arányos egy kocka térfogatának a négyzetgyökével [160], amely alapján levezettek egy egyenletet, amelyből a Hixon-Crowell sebességi állandó ( $k_{HC}$ ) meghatározható.

$$3\sqrt{c_0} - 3\sqrt{c_t} = k_{HC}t \quad (6)$$

Az egyenlet olyan rendszerekre alkalmazható, ahol a fajlagos felület és a részecske vagy a tabletta mérete változik a kioldódás folyamán [160].

Az ideális hatóanyag kioldódás nulladrendű kinetikát követ; ebben az esetben, állandó hatóanyag koncentráció szint tartható fenn egy bizonyos időintervallumban. Ez azonban csak bizonyos gyógyszerek esetében követelmény, ilyenek például a szív,- és vérnyomás szabályozók, fájdalomcsillapítók, antibiotikumok és antidepresszánsok. A nulladrendű kinetikát a következő egyenlet írja le [161], ahol  $k_0$  a nulladrendű sebességi állandó.

$$c_t = c_0 + k_0t \quad (7)$$

A modell egy lassú szabályozott kioldódást ír le, ahol a sebesség független a hatóanyag koncentrációjától, azaz bármekkora a bevitt mennyiség, azonos időközönként, azonos mennyiségű hatóanyag oldódik ki. A modell jól alkalmazható például transzdermális tapasznál, valamint tablettáknál, amely rossz vízdékonyságú hatóanyagot tartalmaz, vagy ozmózisnyomást kihasználó rendszereknél [162].

Az elsőrendű modell bizonyos hatóanyagok abszorpcióját és/vagy eliminációját írja le; vízben jól oldódó hatóanyagok oldódására alkalmazható különböző gyógyszerformákból, illetve pórusos rendszerekből [163]. Az egyenlet linearizált formája a következő:

$$\ln\left(\frac{c_t}{c_0}\right) = -k_d t \quad (8)$$

A  $c_0$  és  $c_t$  már ismert mennyiségek,  $k_d$  az elsőrendű sebességi állandó. A modell kimondja, hogy a kioldódás sebessége a hatóanyag koncentrációtól függ, azaz minél nagyobb a hatóanyag koncentrációja, annál gyorsabb kioldódást tapasztalunk [164].

## 4. Kísérleti rész

### 4.1. Felhasznált anyagok

A felhasznált anyagok analitikai tisztaságúak voltak, így további tisztásnak nem vettem alá őket. Az oldatokat, illetve a kompozitokat minden esetben nagy tisztaságú, kiforralt és kinitrogénezett MilliQ-vízben (Millipore, MilliQ Integral 3, vezetőképesség: 18,2 mS/cm) készítettem el.

#### McIlvaine puffer készítéséhez (pH=3)

- ◆ Citromsav-1-hidrát ( $C_6H_8O_7 \times H_2O$ ,  $M_r=210,14$  g/mol, Molar Chemicals)
- ◆ Dinátrium-hidrogén-foszfát dodekahidrát ( $HNa_2O_4P \times 12H_2O$   $M_r=358,14$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Nátrium-klorid (NaCl,  $M_r= 58,44$  g/mol, Molar Chemicals)

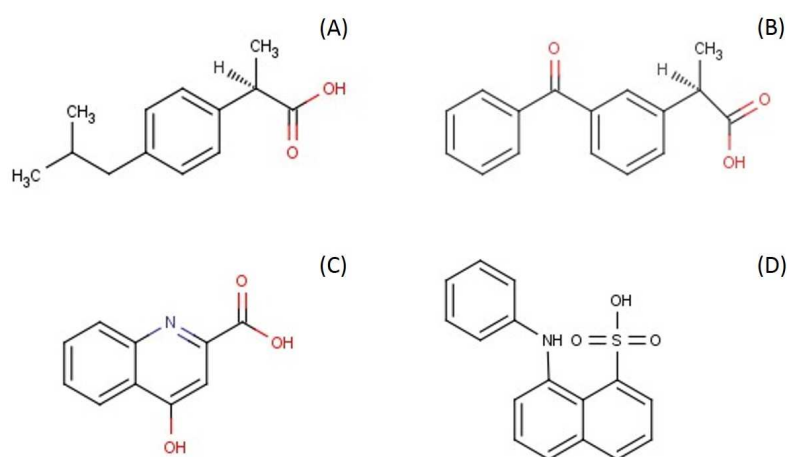
#### Foszfát-puffer készítéséhez (pH=7,4)

- ◆ Nátrium-dihidrogén-foszfát monohidrát ( $H_2NaO_4P \times H_2O$ ,  $M_r=137,99$  g/mol)
- ◆ Dinátrium-hidrogén-foszfát dodekahidrát ( $HNa_2O_4P \times 12H_2O$   $M_r=358,14$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Nátrium-klorid (NaCl,  $M_r= 58,44$  g/mol, Molar Chemicals)

#### További vizsgálatokhoz, illetve a hatóanyag szállító rendszerek előállításához

- ◆ 8-anilino-naftalén-szulfonát (ANS,  $C_{10}H_9NO_3S$ ,  $M_r=223,25$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Ecetsav ( $C_2H_4O_2$ , 99,9%,  $M_r=60,05$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES,  $C_8H_{18}N_2O_4S$ ,  $M_r=238,3$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Hexadecil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB,  $C_{19}H_{42}BrN$ ,  $M_r=364,45$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Hidrogén-klorid (HCl, 37%, Sigma-Aldrich)
- ◆ Ibuprofen nátrium-só (IBU,  $C_{13}H_{17}O_2Na$ ,  $M_r=228,26$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Kitozán (Chit,  $(C_8H_{13}NO_5)_n$ , közepes molekulatömegű, Sigma-Aldrich)
- ◆ Ketoprofen (KP,  $C_{16}H_{14}O_3$ ,  $M_r=254,28$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Kinurénsav (KYNA,  $C_{10}H_7NO_3$ ,  $M_r=189,168$  g/mol, Sigma-Aldrich)

- ◆ Marha szérum albumin (BSA, V.fraction,  $M_w = 66000$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Nátrium-hidroxid (NaOH,  $M_r = 39,99$  g/mol, Molar Chemicals)
- ◆ Nátrium-szulfát ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $M_r = 142,04$  g/mol, Molar Chemicals)
- ◆ Nátrium-dodecil-szulfát (NaDS,  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ,  $M_r = 288,37$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Poliallilamin (PAH,  $(\text{C}_3\text{H}_7\text{N})_n$ ,  $M_w = 58000$  g/mol Sigma-Aldrich)
- ◆ Polietilénimin (PEI,  $(\text{C}_5\text{H}_5)_n$ , Sigma-Aldrich)
- ◆ Poli(nátrium-sztirénszulfonát) (PSS,  $(\text{C}_8\text{H}_7\text{NaO}_3\text{S})_n$ ,  $M_w = 70000$  g/mol, Sigma-Aldrich)
- ◆ Tetraetil-ortoszilikát (TEOS,  $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$ ,  $M_r = 208,33$  g/mol, Molar Chemicals)



**4.1.1. ábra** A felhasznált hatóanyagok képletei (MarvinSketch): ibuprofen (IBU) **(A)**, ketoprofen (KP) **(B)**, és a kinurénsav (KYNA) **(C)**, valamint a 8-anilino-naftalén szulfonsav (ANS) szerkezete **(D)**

## 4.2. Vizsgálati módszerek elvi alapjai, a kísérleti körülmények

### 4.2.1. Részecske töltés detektor

A polimerek és a részecskék töltésének meghatározására részecske titráló detektort alkalmaztam (Mütek PCD-04). A kiindulási mintát ellentétes és ismert fajlagos töltéssel rendelkező ( $q_2$ , mmol/g) polielektrolittal titrálva számolható a töltéskompenzáció eléréséhez szükséges mennyiség, a következő képlet alapján:

$$q_1 = \frac{V_2 0,01 c_2 q_2}{c_1 V_1 M_1}, \quad (9)$$

ahol  $V_2$  a töltéskompenzációhoz szükséges térfogat ( $\text{cm}^3$ ),  $c_2$  a titráló anyag koncentrációja ( $\text{g}/100\text{cm}^3$ ),  $c_1$  a titrálandó oldat koncentrációja ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ), míg  $M_1$  a moláris tömege. A

számolt mennyiség alapján, nemcsak a felület töltését tudjuk semlegesíteni, de többszörös mennyiség hozzáadására a felület áttölthető, így több váltakozó töltésű réteg kialakítására van lehetőség.

#### 4.2.2. Fajlagos felület meghatározása

A fajlagos felület és a pórusméret eloszlás meghatározása (BJH módszer) nitrogén adszorpció/desorpció módszerrel történt 77 K-en Micromeritics Gemini 2375 szorptométerrel.

#### 4.2.3. UV-vis spektrofotometria

A hatóanyagok koncentrációjainak meghatározása UV-vis spektrofotométerrel (Shimadzu, UV-1800) felvett abszorbancia spektrumuk alapján történt. A szilika felületén és pórusaiban adszorbeált IBU mennyiségét, valamint a KYNA stabilitását kvarc küvettában 190 és 600 nm között határoztam meg. A kioldódási vizsgálatokat, valamint a hatóanyag koncentrációjának meghatározásához az előzetes kalibrációt a fotométerbe helyezett TSU/Sipper egységben végeztem el (kioldódási kísérleteknél lásd bővebben).

#### 4.2.4. Oldatadszorpció mérések

A szilikába „csomagolt” IBU mennyiségét szakaszos oldategyensúlyi vizsgálatokkal határoztam meg. Azonos mennyiségű szilikához (0,1 g), állandó térfogatot tartva (10 ml) növekvő mennyiségben adagoltam a hatóanyagot, a következő koncentrációkban: 0,005; 0,02; 0,06; 0,1; 0,17 és 0,2 M. Az egyensúly beállításához az oldatokat szobahőmérsékleten, 20 órán keresztül kevertettem. A nem kötött IBU mennyiségének meghatározásához, a felülúszót centrifugálással (Hermle Z36HK) távolítottam el az SiO<sub>2</sub>/IBU rendszertől. Az IBU-ban található aromás csoport jelenléte biztosítja, a molekula UV-elnyelését 272 nm-nél. Az adszorbeált IBU mennyiségét egy gramm szilika felületére vonatkoztatva a következő egyenlet segítségével határoztam meg:

$$n^s = V^0(c_0 - c_e)/m, \quad (10)$$

ahol  $V^0$  az oldat térfogata,  $c_0$  és  $c_e$  az hatóanyag kiindulási és az egyensúlyi koncentrációja és  $m$  az adszorbens tömege. Az adszorpció kapacitás számolásához ( $n_m^s$ ) a Langmuir-egyenletet alkalmaztam ( $b$  a Langmuir-állandó). A számolt adszorbeált mennyiség hibája  $\pm 30$  mg/g.

$$\frac{c_e}{n^s} = \frac{c_e}{n_m^s} + \frac{1}{n_m^s b} \quad (11)$$

#### 4.2.5. *Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)*

Az előállított mag-héj kompozitok alakját és méretét transzmissziós elektronmikroszkóppal (FEI Tecnai G2 20 X-Twin típusú, CCD kamera) készített felvételek alapján jellemeztem. A részecskeméret eloszlást Image J nevű program segítségével határoztam meg.

#### 4.2.6. *Termoanalitika*

A termoanalitikai vizsgálatokat Mettler Toledo TGA/SDTA 841° és Mettler Toledo 822° típusú készülékekkel végeztem el. A termogravimetriás (TG) mérések 25 és 600 °C között, 5°C/perc fűtési sebességgel, míg a differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) mérések 1°C/perc fűtési sebességgel, 25 és 150°C között történtek.

#### 4.2.7. *Sűrűségmérés*

A SiO<sub>2</sub>-és a BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozitok esetén a magok és az első polielektrolit héjak sűrűségét vizes közegben DMA 58 típusú (Anton Paar) készülékkel határoztam meg.

#### 4.2.8. *Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)*

Az infravörös spektroszkópia elvi alapja, hogy elektromágneses sugárzás hatására a molekulák rezgési és forgási átmenetei gerjesztődnek, eközben a minta a rezgéseire jellemző frekvenciájú komponenseket elnyeli, ami lehetőséget ad különböző anyagok azonosítására, funkciós csoportok kimutatására, kötések létrejöttének a bizonyítására. Fehérjék analízisekor lehetőségünk van a másodlagos szerkezeti elemek tartalmának a meghatározására az 1700-1600 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál megjelenő, amid I sáv dekonvolúciójával.

Gyengített teljes reflexió esetén a fénysugár olyan szögbe lép be a kristály és a minta közé, ahol teljes reflexiót szenved, így a sugarak a belső reflexió megsokszorozásával jutnak a detektorba, ami megnövekedett abszorpciót eredményez. Az előállított (liofilizálva) minták infravörös spektrumait ATR (Attenuated Total Reflectance) feltétellel ellátott Biorad FTS-60A készülékkel készítettük. A mérések kiértékelése GRAMS II szoftver segítségével történt.

#### 4.2.9. *Cirkuláris Dikroizmus (CD)*

A módszer alapja, hogy a síkban polarizált fény két cirkuláris komponense különböző mértékben nyelődik el királis mintán való áthaladásakor. A módszerrel a kromofór csoportok egymásházhoz viszonyított helyzetéről, azaz a molekula szerkezetéről ad információt. Ezt használtuk ki a folyadék fázisú BSA; BSA/KYNA; BSA/PAH, valamint a BSA/KYNA/PAH



kompozitok hordozóját képező fehérje szerkezeti vizsgálatainál. A CD méréseket Jasco J-815 CD típusú műszerrel vettem fel 190 és 250 nm hullámhossz tartományban 100 nm/perc sebességgel.

#### 4.2.10. Fényszórásmérés (LS)

Dinamikus fényszórásméréseket (DLS) végeztem (Horiba, SZ-100) a kiindulási anyagok és a szintetizált kompozitok hidrodinamikai méretének ( $d_{DLS}$ ) és a zeta potenciáljainak ( $\zeta$ ) a meghatározására. A mérések során a részecskék által szórt fény időbeli változását rögzítjük, amely fluktuáció a Brown mozgásból ered. Az ebből eredő mozgási sebesség a részecskék méretével függ össze; minél nagyobb a részecskeméret, annál lassabb a Brown mozgás, ezt írja le a Stokes-Einstein egyenlet:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_T}, \quad (12)$$

ahol  $R_H$  a hidrodinamikai átmérő,  $k_B$  a Boltzmann állandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $\eta$  a viszkozitás és  $D_T$  a diffúziós állandó. A méret mellett információt kaphatunk a méreteloszlásáról is a PDI index segítségével. A módszer előnye, hogy nem-invazív, nagy érzékenységgű (0,1 mg/ml alatti koncentrációjú fehérjék vizsgálatára is alkalmas), valamint kis térfogatú minták mérésére is jól alkalmazható. A mért átlagos átmérők hibái 5%-on belül vannak.

Bizonyos nanorészecskék vagy kolloid részecskék szuszpenzióban felületi töltéssel rendelkeznek. Ha elektromos mezőt alkalmazunk, a részecskék áramlanak (elektroforézis), amely iránya és sebessége a részecske töltésétől, a közegtől, valamint az elektromos mező erősségétől függ. A részecske sebesség mérése a Doppler-effektuson alapul, azaz a szórt fény frekvencia eltolódásán:

$$U = \frac{\lambda n \Delta \nu}{2E n \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad (13)$$

Az  $U$  a mozgékonyosság,  $\lambda$ , a lézer hullámhossza,  $\Delta \nu$  a frekvencia eltolódás  $\theta$  szögnél,  $E$  az elektromos mező erőssége,  $V$  a részecske sebessége,  $n$  a törésmutató. A  $\zeta$ -potenciál a részecske valós felszíne és a folyadék belseje közötti, úgynevezett nyírási sík határán megjelenő felületi potenciál. A  $\zeta$ -potenciál függ a részecskék közötti kölcsönhatásoktól, így a stabilitástól is, amely számolható az oldószer dielektromos állandójának ( $\epsilon$ ), a viszkozitásnak ( $\eta$ ) és a Henry koefficiensnek  $f(\kappa\alpha)$  az ismeretében.

$$\zeta = \frac{U\mu}{\epsilon f(\kappa\alpha)} \quad (14)$$

Az SZ-100 készülék alkalmas statikus fényszórás mérésre is kis részecskék, polimerek, fehérjék molekulatömegének ( $M_w$ ) a meghatározására. A szórt fény méréséből (a meghatározott szögnél ( $90^\circ\text{C}$ ) és a koncentrációk ( $c$ ) ismeretében a Debye-egyenlet segítségével a molekulatömeg és a második viriál együttható ( $A_2$ ) meghatározható.

$$\frac{Kc}{\Delta R} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c, \quad (15)$$

ahol  $K$  a Debye állandó és  $\Delta R$  a többlet Rayleigh arány (a szórt intenzitásokból számolható). A Debye állandó a következő képlet alapján számolható:

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda^4 N_A}, \quad (16)$$

ahol  $n$  az oldószer törésmutatója,  $dn/dc$  a törésmutató növekedés,  $\lambda$  a fény hullámhossza vákuumban és  $N_A$  az Avogadro-állandó. A legtöbb esetben ezek az értékek függetlenek a molekulatömegtől.

A második viriál együttható ( $A_2$ ) a molekula és oldószer közötti kölcsönhatás erősségét írja le. Ha az  $A_2$  értéke nagyobb, mint 0, akkor a molekula jól szolvatáló oldószerben van, ha ez az érték nulla, akkor a molekula-oldószer és a molekula-molekula kölcsönhatások erőssége megegyezik, ekkor a fehérje theta ( $\theta$ ) állapotban van. Ha az  $A_2 < 0$ , akkor a molekula rosszul szolvatáló oldószerben van, a molekulák közötti kölcsönhatások kerülnek előtérbe, ekkor a molekulák gyakran aggregálódnak.

#### 4.2.11. Fluoreszcencia spektroszkópia (FL)

A fluoreszcencia módszerét a fizika és a kémia mellett egyre elterjedtebben használják a biofizikai,- a biokémiai,- és az orvosi kutatásokban is. Egy kromofór csoportot tartalmazó molekulát/vegyületet megfelelő fénnel gerjesztve (szingulett gerjesztett állapot), az alapállapotba való visszatérést (szingulett alapállapot), a két állapot közötti energia különbséggel arányos sugárzás kíséri. Az emissziós intenzitás nyomon követésével nemcsak szerkezeti változásokra következtethetünk, de termodinamikai információt is nyerhetünk a módszer alkalmazásával. Az általunk alkalmazott fehérjében található Trp csoportok gerjesztése 280 nm-en Horiba Yvon Fluoromax-4 spektrofluorométerrel történt.

Számos folyamat vezethet a fluoreszcenciás intenzitás csökkenéséhez. Ezeket a folyamatokat két nagy csoportba sorolhatjuk. Az első az ütközéses kioltás (dinamikus), amikor a gerjesztett állapotú fluorofór ütközik egy másik oldatban található molekulával (például ionokkal, más fluorofórokkal, vagy önmagával, ezt nevezzük önkioltásnak), amely hatására visszatér az

alapállapotba. A statikus kioltásnál alapállapotban a fluorofór komplexet alkot a kioltóval, diffúziós vagy molekuláris ütközések nélkül. A legegyszerűbb esetben az ütközéses kioltásra a Stern-Volmer egyenlet alkalmazható.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (17)$$

Az  $F_0$  és  $F$  a fluoreszcenciás intenzitás a kioltó jelenléte nélkül és jelenlétében,  $Q$  a kioltó koncentrációja,  $K_{SV}$  és  $K_q$  a Stern-Volmer kioltási állandó és a bimolekuláris sebességi állandó, amely jellemzi a fluorofór és a kioltó transzportját és hozzáférhetőséget, valamint  $\tau_0$  a fluorofór élettartama a kioltó jelenléte nélkül. Ha az  $\frac{F_0}{F}$  a kioltó koncentrációjában egy egyenest ad, akkor dinamikus kioltásról beszélhetünk. A lineáris Stern-Volmer egyenlet eredetileg a fluorofórok egy csoportját jelzi, azaz egyenlő hozzáférhetőségű fluorofórokat a kioltó számára. Az egyenestől való eltérést okozhatja a kioltás nagy mértéke, vagy a két folyamat együttes hozzájárulása a kioltás folyamatához.

Egy nagy biomolekula kis molekulával való kölcsönhatásakor egy módosított egyenlet használható. Ebben az esetben a kioltó szempontjából hasonló és független kötőhelyek találhatók a makromolekulán (Scatchard-egyenlet).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_B + n \log [Q], \quad (18)$$

ahol  $K_B$  az asszociációs kötési állandó,  $n$  pedig a kötőhelyek száma. A módosított Stern-Volmer egyenlet alkalmazásával információt kaphatunk a hozzáférhető fluorofórok arányáról ( $f_a$ ), valamint a meredekségből megkaphatjuk a módosított Stern-Volmer kötési állandót ( $K_a$ ), amely analóg az asszociációs kötési állandóval.

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{[Q]f_a K_a} \quad (19)$$

A Lineweaver-Burk egyenlettel közvetlenül a disszociációs állandó ( $K_D$ ) határozható meg, amely az asszociációs kötési állandó ( $K_a$ ) reciproka.

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{K_D}{F_0 [Q]} \quad (20)$$

$$(K_a = 1/K_D) \quad (21)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (22)$$

Valamely egyenlet alapján számított asszociációs kötési állandó ( $K$ ), valamint az egyetemes gázállandó ( $R$ ) és a  $T$  hőmérséklet (298 K) ismeretében a szabad entalpia értéke a 22. számú egyenlet alapján meghatározható.

#### 4.2.12. Röntgendiffrakció (XRD)

A röntgen diffraktogramokat 1 és 20  $2\theta$  között 5°/perc sebességgel, Bruker D8 Advance típusú röntgen diffraktométerrel készítettem (Cu anód;  $K\alpha$  sugár; 40 kV generátor feszültség; 30 mA generátor áramerősség).

#### 4.2.13. Kiszögű röntgenszórás (SAXS)

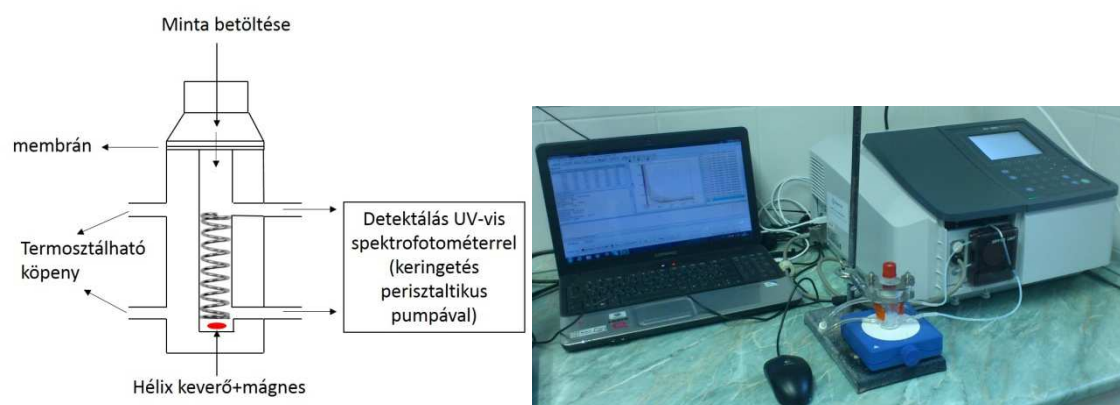
Az előállított minták szerkezeti és morfológiai tulajdonságainak jellemzésére a kiszögű röntgenszórás módszerét alkalmaztuk. A SAXS szórásgörbéket egy Philips PW 1820 típusú generátorral előállított  $CuK\alpha$  sugárzással ( $\lambda = 0,154$  nm, 40 kV, 30 mA) mértük meg KCEC/3 típusú kompakt Kratky-kamera alkalmazásával. A szórt sugárzás intenzitását egy PDS 50M (M. Braun AG, München) típusú helyérzékeny detektorral rögzítettük  $2\theta = 0,05-8^\circ$  szögtartományban. A kapott szórásfüggvényből a háttér szórását kivonva alkalmas a módszer szerkezeti paraméterek számítására. A számításokhoz ATSAS Gnom szoftvert használtunk.

#### 4.2.14. Liofilizálás

Liofilizáló (fagyasztva szárítás) készüléket alkalmaztam a gyógyszerhatóanyag-szállító rendszerek hosszú idejű tárolásának biztosítására egy Christ-Alpha 1-2 LD típusú készülékkel. A mintákat 24 órás víztelenítési eljárásnak vettem alá ~4 mbar nyomás alkalmazásával.

#### 4.2.15. *In vitro* kioldódási vizsgálatok

Az *in vitro* kioldódási kísérleteket egy vertikális diffúziós cella – az irodalomban Franz-cellaként ismert- segítségével végeztem el. A cella magassága 61 mm, a térfogata 4 ml, míg a mintatartó egység térfogata 1,5 ml. A bemérendő kompozitot, a hatóanyag tartalma szerint, előzetes kalibráció alapján úgy választottam meg, hogy a mérendő komponens abszorbanciája ne haladja meg a 1,5-es abszorbancia értéket, akkor sem, ha az összes hatóanyag kioldódik 500 perc elteltével. A cellában a mintát egy membrán, esetünkben egy cellulóz membrán választja el a tiszta oldószertől. A közeget egy mágneses keverő és egy perisztaltikus pumpa folyamatos áramlásban tartja. A hatóanyag detektálásához a cellát egy UV-1800 spektrofotométerrel zárt rendszerben kapcsoltam össze. A cella egy külső köpeny segítségével termosztálható. A mintavétel 500 percig folyamatos detektálást jelent; az első órában 10 percenként, majd óránként egy mintavétel történt. A mérési eredmények reprodukálhatósága 2,5%-os hibahatáron belül volt.



**4.2.1. ábra** a Hanson-cella sematikus ábrája és az *in vitro* kísérleti berendezés fotója

### 4.3. Kísérleti módszerek

#### 4.3.1. Mezopórusos szilika előállítása

A szintézist vizes közegben, egy szerkezet-irányító ágens, egy kationos tenzid, a CTAB segítségével hajtottam végre. 240 ml vízben 2,74 mmol tenzidet feloldottam, majd 10 mmol 2 M-os NaOH-oldattal lúgosítottam a tenzid-oldatot. A hőmérsékletet 80°C-ra állítottam és fél óra folyamatos kevertetés után 6,05 ml TEOS-t csepegtettem az oldathoz. További két óra kevertetés után a terméket centrifugálással (Hermle Z36HK, 14000 rpm fordulatszámmal, 15 percig), majd desztillált vízzel való mosogatással (3x) nyertem ki. A templát eltávolításához a terméket két órán át 140°C-on szárítottam, majd öt órán keresztül 550°C-on kalcináltam. A kapott termék, fehér finomszemcsés por.

#### 4.3.2. SiO<sub>2</sub>-alapú kétrétegű mag-héj kompozit előállítása

A szintetizált mezopórusos szilikát (0,1 g) 7,5 ml MilliQ-vízben, fiziológias oldatban (150 mM NaCl jelenlétében) diszpergáltam, majd folyamatos keverés mellett 11,5 mg/ml koncentrációjú, IBU-oldattal elegyítettem. A diszperzió pH-ját 5,5-re állítottam be (Metrohm 827 pH lab). 10-12 óra kevertetés után a mintát 14000 fordulatszámmal 15 percig centrifugáltam. Az SiO<sub>2</sub>/IBU rendszert 17 mg/ml koncentrációjú 15 ml PEI oldatba diszpergáltam és egy óra kevertetés után centrifugáltam. A PSS-oldattal (3 mg/ml) ugyanígy jártam el. A centrifugálással az el nem reagált anyagot távolítottam el. Minden egyes lépésben mintát vettem a további vizsgálatokhoz, valamint fotométerrel mértem a felülúszót, a megkötött hatóanyag mennyiségének a meghatározásához. A termékeket liofilizáltam és -80°C-on tároltam a további vizsgálatok elvégzéséig.

#### 4.3.3. BSA-oldatsorozat készítése $pH = 2$ és $12$ között

A fehérje-oldatok koncentrációját minden esetben 3 mg/ml-re állítottam be, míg a só-tartalmú oldatokban, a NaCl koncentrációja 150 mM volt. A pH-t 0,1 M-os HCl és 0,1 M-os NaOH-oldatokkal állítottam be.

#### 4.3.4. A BSA-ligandum oldatsorozatok készítése

A fehérje-ligandum kölcsönhatás vizsgálatokhoz a BSA-hoz növekvő koncentrációban adtam a megfelelő hidrofób molekulát, így a KP-t 0 és 5, míg az ANS-t 0 és 10 molarány tartományban adagoltam a fehérjéhez. A BSA/KP 1:1 molarányú keverékéhez szintén 5-szörös molarány feleslegig adagoltam az ANS molekulát. A pH állításhoz 0,1 M HCl vagy 0,1 M NaCl-oldatot használtam.

#### 4.3.5. BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozit előállítása $pH = 3$ -on

39 mg/ml koncentrációjú BSA-t  $pH = 3$ -as pufferben (McIlvaine-puffer) fiziológiás körülmények között (150 mM NaCl) feloldottam, majd 1:10 molarányban hozzáadtam a savas közegben rosszul oldódó IBU molekulát. Miután egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, 2M-os  $Na_2SO_4$ -oldattal precipitáltam. A BSA/IBU kompozitot centrifugálással (9000 rpm, 20 perc) nyertem ki. A mintát 3 mg/ml koncentrációjú PSS-oldatba diszpergáltam, majd egy óra kevertetés után centrifugáltam. A Chit-t oldhatósági korlátai miatt (3 mg/ml) ecetsavban (4 térfogat%-os) oldottam fel. A következő lépések megegyeznek az előzőekkel. Minden lépésben mintát vettem a későbbi vizsgálatokhoz, valamint fotométerrel mértem a felülúszók abszorbancia spektrumait, a megkötött hatóanyag mennyiségének a meghatározásához. A termékeket ebben az esetben is liofilizáltam és  $-80^{\circ}C$ -on tároltam a további vizsgálatok elvégzéséig.

#### 4.3.6. BSA-alapú egyrétegű mag-héj kompozit előállítása $pH = 7,4$ -en

A kompozit előállítását ebben az esetben  $pH = 7,4$ -en végeztem el fiziológiás körülmények között. A 60 mg/ml-es BSA-t MilliQ-vízben 150 mM NaCl mellett feloldottam, majd 1 a 0,5 tömegarányban hozzáadtam a KYNA molekulát. A hatóanyag lúgos közegben oldódik jól, így 1 M NaOH csepegtetésével addig kevertettem, míg a hatóanyag teljesen feloldódott. Ezt követően 2,4 mg/ml koncentrációjú PAH-ot adtam a BSA/KYNA kompozitához. A térfogatot 3 ml-re, a pH-t pontosan 7,4-re állítottam be (lúgosabb közegben a PAH kicsapódik). Az elkészült kompozitokat  $-80^{\circ}C$ -os fagyasztóban tároltam a további vizsgálatok elvégzéséig.

#### *4.3.7. BSA/NaDS komplex előállítása pH = 3-on*

7 ml 150 mM NaCl-oldatban (McIlvaine-puffer, pH = 3) 5 mg/ml koncentrációjú BSA-t feloldottam, majd ehhez adagoltam 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 2,7 és 3 ml 150 mM NaCl-t tartalmazó 20 mg/ml koncentrációjú NaDS-oldatot. A térfogatokat minden esetben 10 ml-re egészítettem ki, puffer (pH = 3) hozzáadásával. A minták jelölése a koncentráció növelésével, a következőképpen alakult: c0-BSA/NaDS, c1-BSA/NaDS, c2-BSA/NaDS...és végül c10-BSA/NaDS.

#### *4.3.8. BSA/IBU/NaDS kompozit előállítása pH = 3-on*

Az kompozitok előállítása során a BSA, az NaDS és a NaCl koncentrációját minden esetben állandó értéken tartottam, amelyek rendre a következők voltak: 5 mg/ml, 6,3 mg/ml (a kritikus micella képződési koncentráció 2,7-szerese) és 150 mM (McIlvaine-puffer, pH = 3). A mintákban az IBU-koncentrációját változtattam, amely eredményekből kettőt fogok részletezni: az 1,1 mg/ml-es (c11-BSA/IBU/NaDS) és a 2,0 mg/ml-es (c13-BSA/IBU/NaDS)) IBU koncentrációjú kompozitokat. Az üres BSA/NaDS komplexek mellett szintetizáltam IBU/NaDS kompozitot is, amelyben az NaDS 6,3 mg/ml, míg az IBU 2,0 mg/ml koncentrációban van jelen.

## 5. Eredmények

### 5.1. SiO<sub>2</sub>-alapú kétrétegű mag-héj kompozitok szerkezete és a hatóanyag kioldódás kinetikája

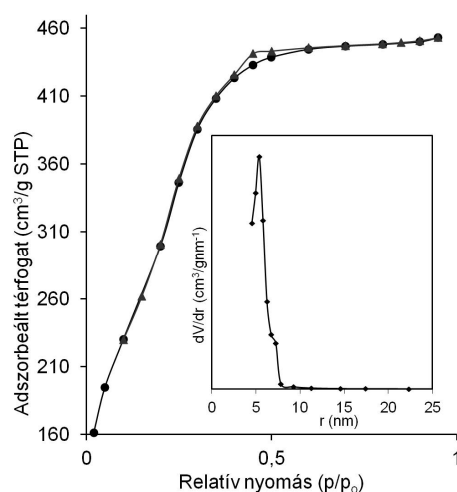
Elsőként, olyan mag-héj kompozitok előállítását tűztük ki célul, amelyek nagy mennyiségű hatóanyag „becsomagolására” alkalmasak, valamint a hatóanyag kioldódás sebessége szabályozható a héjak számával. Kísérleteimet tehát a pórusos szerkezettel rendelkező mezopórusos szilika részecskék szintézisével kezdtem, amelyet a hordozó rendszer magjának választottunk. Az irodalomban számos recept található, amelyből kiválasztottunk hármat, amelyet magam is elvégeztem. Az első receptet összehasonlításként alkalmaztam, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy tenzid nélkül tömör, kis fajlagos felületű Stöber-szilika részecskék keletkeznek [45]. Az **5.1.1. táblázat** tartalmazza az alkalmazott szintézis módszerek paramétereit, valamint a termékek fajlagos felületének ( $a^s$ ) értékeit.

**5.1.1. táblázat** A Stöber,- valamint a mezopórusos szilika szintézisének paramétereit, valamint a termékek fajlagos felülete

Szintetizált minták	CTAB (g)	TEOS (ml)	2 M NaOH (ml)	MilliQ (ml)	T <sub>szintézis</sub> (°C)	t <sub>szintézis</sub> (h)	T <sub>száritás</sub> (°C)	T <sub>kalcinálás</sub> (°C)	a <sup>s</sup> <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)
Stöber szilika [45]	0	1,2	1,7	97,1	25	2	25	550 (1h)	9
Mezopórusos szilika szintézis [48]	2,5	15,3	10,5	74,2	110	96	25	540 (24h)	1030
Mezopórusos szilika szintézis [49]	0,4	2,4	2	95,6	80	2	140	550 (5h)	1250

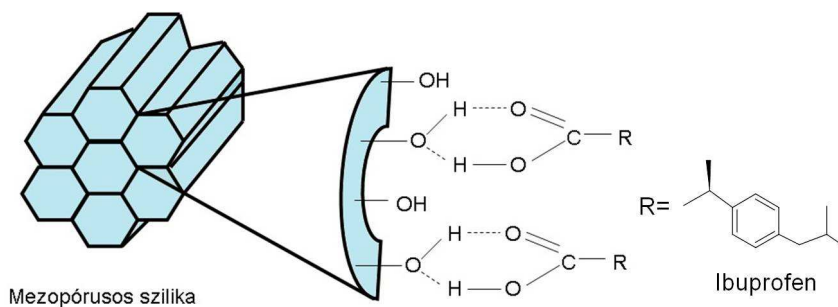
Az előállított részecskék fajlagos felületének a meghatározása nitrogén adszorpció/deszorpció mérésekkel történt (**5.1.1. ábra**). Az eredmények alapján látható, hogy tenzid nélkül valóban kis fajlagos felülettel rendelkező, tömör szilika részecskék szintézise lehetséges. A tenzid alkalmazásával, az eltérő arányok, a szintézis idő és a különböző hőmérséklet ellenére a kapott részecskék fajlagos felülete igen hasonló értéket mutatott: mindkét esetben 1000 m<sup>2</sup>/g feletti fajlagos felületű részecskéket sikerült szintetizálni. A további vizsgálatokhoz és a mag-héj kompozitok előállításához az 1250 m<sup>2</sup>/g felülettel rendelkező részecskéket alkalmaztam.





**5.1.1. ábra** Az 1250 m<sup>2</sup>/g fajlagos felületű szilika N<sub>2</sub> adszorpció/deszorpció izotermája és az átlagos pórusátmérő eloszlása

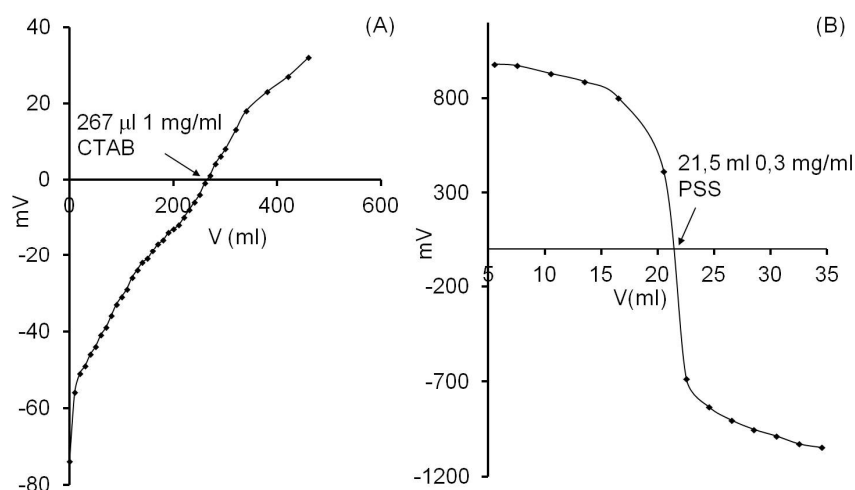
A választott szintézis alapján az 1250 m<sup>2</sup>/g felületű szilika részecske (reprodukálható) az irodalomban is igen jónak számít, ennél csak kisebb fajlagos felülettel rendelkező szilika részecskékről olvashatunk. A mezopórusos elnevezést az átlagos 3,3 nm-es pórusátmérő igazolja. A relatív „nagy” pórusátmérővel rendelkező szilika csatornáiba, így az ibuprofen (d≈1 nm) képes bediffundálni és a szilanol csoportokkal (felületen lévőekkel is) kölcsönhatásokat kialakítani (**5.1.2. ábra**). A továbbiakban ezt a részecskét SiO<sub>2</sub> rövidítéssel fogom jelölni.



**5.1.2. ábra** Az IBU kölcsönhatásának lehetséges módja a szilanol csoportokkal

Töltéstitrálásokat végeztem a felhasznált anyagok áramlási potenciáljainak meghatározására a pH függvényében (lásd a függelékben; **F1. ábra**), valamint meghatároztam a töltéskompenzáció eléréséhez szükséges polielektrolitok mennyiségeit. Az SiO<sub>2</sub> negatív töltéssel rendelkezik 2,3-as pH felett, míg a PEI pozitív töltéssel rendelkezik 9-es pH-ig. A PSS áramlási potenciáljára végig negatív töltést mértem (pH = 13,5-ig mértük), így ellentétes

töltése révén alkalmas az  $\text{SiO}_2/\text{IBU}/\text{PEI}$  kompoziton egy második polielektrolit héj kialakítására. A szilika töltéskompenzációjához szükséges mennyiség meghatározását CTAB-dal (5.1.3.(A) ábra) és PEI-nel is elvégeztem. Ahol az áramlási potenciál görbéje 0 mV értéket vesz fel, az a pont, amelynél adott mennyiségű tenzid vagy polielektrolit a szilika töltését leárnyékolja, 0-ra csökkenti. Ez az érték 0,073 mmol/g-nak adódott, ha CTAB-ot alkalmaztam a töltéskompenzáció meghatározásához.

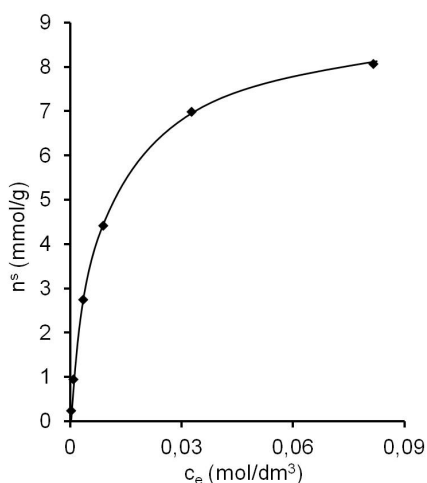


**5.1.3. ábra** Az  $\text{SiO}_2$  (1,0 mg/ml) részecskék titrálása CTAB-dal (1,0 mg/ml) (A) és 0,1 mg/ml koncentrációjú PEI titrálása 0,3 mg/ml koncentrációjú PSS-tal (B)

Mivel a szilika magot polielektrolitokkal terveztük „beburkolni”, így a szilika részecskéket PEI-nel is megtitráltam. A számolások alapján a CTAB mennyiségéhez viszonyítva csupán tized annyi (0,009 mmol/g) PEI szükséges a töltéskompenzáció eléréséhez. Ezt is vártuk, hiszen a PEI egy elágazó láncú nagy térkitöltéssel rendelkező molekula számos aminocsoporttal, így már kis mennyiségű polielektrolit képes az  $\text{SiO}_2$  potenciálját 0 mV-ra csökkenteni. Annak érdekében, hogy a felület potenciáját áttöltsük, azaz hogy egy újabb ellenkező töltésű héjat tudjunk kialakítani, a kompozitok előállításánál a számított mennyiség 10-szeresét adtam a szilikához. A következő lépésben a PEI-polimerre szükséges PSS mennyiségét határoztam meg (5.1.3.(B) ábra). A titrálási görbéből a töltéskompenzációhoz szükséges PSS mennyisége 0,031 mol/g-nak adódott. A számított PSS koncentrációval a második héj nem alakult ki a kompoziton, sőt az egyrétegű kompozit is szétesett, ezért kisebb koncentrációjú negatív töltésű polielektrolit hozzáadásával kísérleteztem. A kísérletek során a 3 mg/ml koncentrációjú PSS-oldattal elvégzett kísérletek bizonyultak sikeresnek, melynek oka az lehet, hogy egy PEI monomer egységen nem minden

töltés hozzáférhető a PSS számára. A továbbiakban ezt a sikeresen előállított kompozitot fogom részletesen bemutatni.

A szilika hatóanyag-feltevő képességét oldatadszorpciós mérésekkel vizsgáltam. A kísérletet pH = 5,5-ön hajtottam végre, amely pH-n a kompozitok előállítását terveztük (töltéstitrálások alapján- **F1. ábra**, valamint a PEI legnagyobb hatóanyag feltevő képességét ehhez a pH-hoz kötik). Az izoterma alapján (**5.1.4. ábra**) a szilika igen nagy mennyiségű IBU felvételére alkalmas, szám szerint 1600 mg/g, azaz 8 mmol/g IBU megkötésére alkalmas. A nagy mennyiség arra enged következtetni, hogy az IBU nemcsak a pórusokban kötődött meg, hanem a szilika felületére is adszorbeálódott. Ennek megfelelően a számított mennyiség 1,035-szorosát adtam az SiO<sub>2</sub> részecskékhez a maximális IBU adszorpciójának az eléréséhez.



**5.1.4. ábra** Az IBU oldatadszorpciós izotermája 1 g szilika adszorbensen 5,5-ös pH-n vizes közegben

Az XRD diffraktogramok segítségével a részecskék szerkezetére következtethetünk (**5.1.5.(A) ábra**). 1 és 20  $2\theta$  szög között egy éles csúcs jelent meg 2,5°-nál, míg két gyengébb intenzitású 4 és 5° között. Ezek rendre az (100), az (110) és a (200) reflexiókhoz tartoznak, amelyek az irodalomban fellelhető értékekkel azonosságot mutatnak.

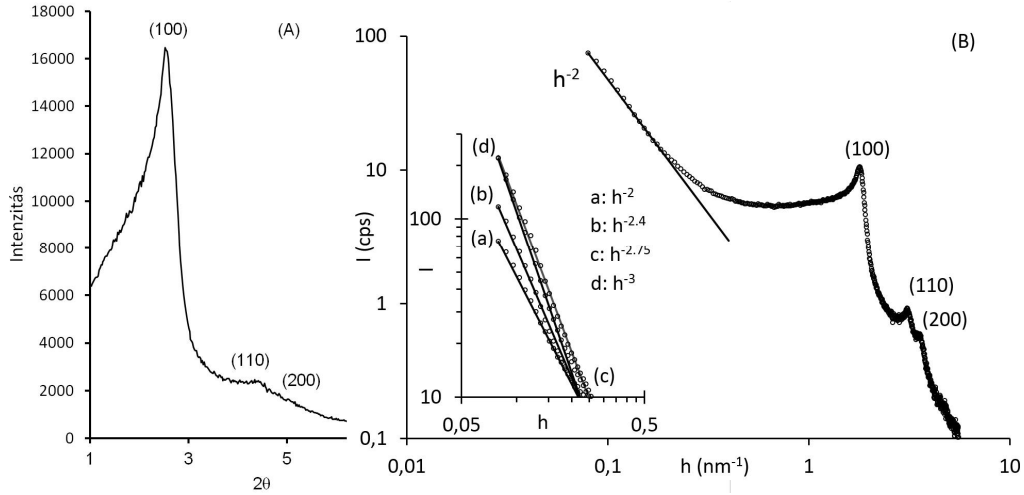
A kisszögű röntgenszórás (**5.1.5.(B) ábra**) ugyanezt az eredményt mutatta. A szabályos kétdimenziós mezopórusos hexagonális szerkezetre jellemző csúcsok itt is megjelentek [165]. Az XRD diffraktogramban megjelent reflexiók értékei: 2,52°, 4,34° és 5,02°, míg a SAXS mérések esetén a szóródott szög értékeket a  $h$  értékekből számolva a reflexiók szögei csak a második tizedesben különböztek: 2,56°, 4,34° és 5,07°, amelyek aránya: 1: $\sqrt{3}$ :2. A  $d$  távolságokat a  $h$  szórás értékekből számolva kaphatjuk meg a következő egyenlet alkalmazásával.

$$d = 2 \pi / h \quad (23)$$

Az (100) csúcsra számolt  $d$  érték 3,46 nm, amelyből az elemi cella paramétere számolható a

$$c = 2 d_{100} / \sqrt{3} \quad (24)$$

egyenlettel, amely 3,99 nm-t eredményezett.



**5.1.5. ábra** Az SiO<sub>2</sub> XRD diffraktogramja a hexagonális szerkezetre jellemző reflexiókkal

(A), valamint a SAXS szórásgörbe a fraktál meredekség értékekkel (B) (a) SiO<sub>2</sub>, (b)

SiO<sub>2</sub>/IBU, (c) SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI, (d) SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS

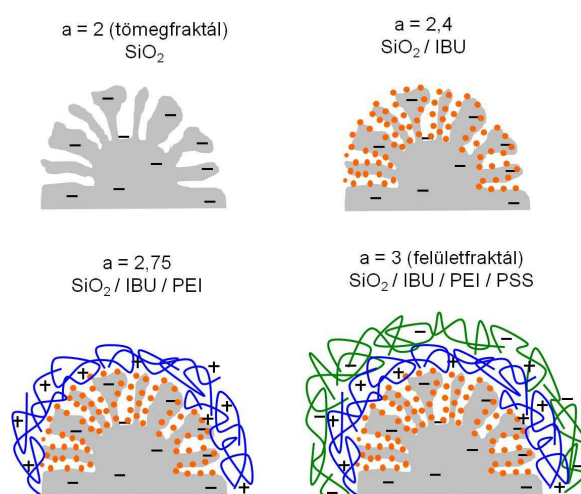
A mag-héj kompozitok SAXS méréseit is elvégeztük. A karakterisztikus (100) csúcs intenzitása folyamatosan csökkent, mind az IBU, mind a polielektrolitok hozzáadására. Ez az intenzitás csökkenés a pórusok fala, a pórusok belső felülete, valamint a pórusok betöltöttsége közötti szórás kontrasztnak tulajdonítható, azaz a hatóanyag hozzáadásával a pórusok telítődtek. Ez bizonyítja, hogy az IBU valóban képes az SiO<sub>2</sub> csatornáiba diffundálni és kölcsönhatásokat kialakítani. A korábban említett elemi cella méretének növekedése is bizonyítja, a hatóanyag, valamint a héjak megkötődését, ugyanis a  $c$  értékére 4,16 nm-t kaptunk a kétrétegű mag-héj kompozit esetében.

A SAXS mérésekből további eredmények is kinyerhetők. Az intenzitást ( $I$ ) a szórás függvényében ábrázolva egy egyenest kapunk, amelyet hatványfüggvénynek is neveznek (power law) [166,167].

$$[I(h)] = C h^a \quad (25)$$

A függvény használatával a  $C$  állandó mellett a fraktál dimenzió értékei ( $a$ ) meghatározhatóak, amely a felület morfológiájával hozható összefüggésbe (5.1.6. ábra). Ha a fraktál meredeksége 4, akkor a felület sima, míg 3 és 4 között, felületfraktál jellemző a

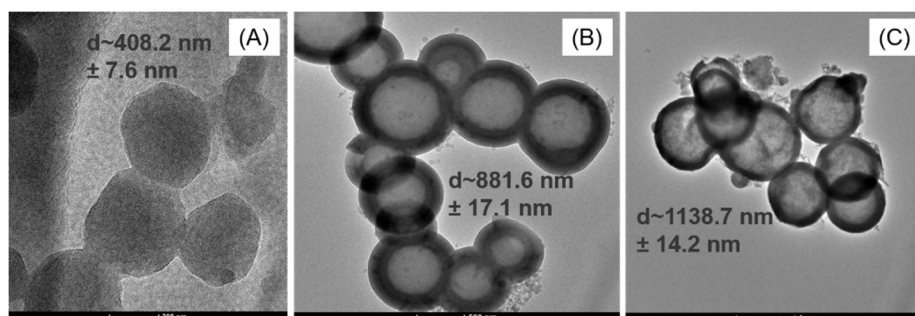
rendszerre, ami egy érdes, csipkézett felületet jelent. Ha az  $a$  értéke 1 és 3 között van, akkor a tömegfraktál a meghatározó, amely dendrimeres, csatornás rendszerekre, valamint klaszterekre jellemző. A mi esetünkben, az  $a$  értéke a szilikára nézve 2, amely tömegfraktált jelent, ami bizonyítja a mezopórusok jelenlétét. A kompozit folyamatos kiépülésével a fraktálmerekség folyamatosan nőtt, egyre inkább a felületfraktál lett a jellemző a rendszerre. Tehát az  $a$  értékei is igazolják, hogy az IBU telítette a pórusokat, és az  $\text{SiO}_2$  felületére is adszorbeálódott. A héjak kialakításával, a polielektrolitoknak köszönhetően egyre inkább egy egyenetlen felülettel rendelkező kompozit alakult ki, az „egyedi” szilika részecskéhez viszonyítva.



**5.1.6. ábra** Az  $\text{SiO}_2$  és az  $\text{SiO}_2$ -alapú mag-héj kompozitok fraktáldimenziói

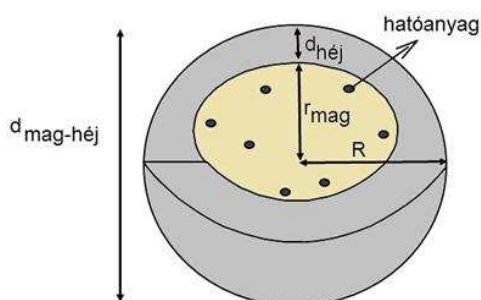
Az **5.1.7. ábra** mutatja az  $\text{SiO}_2$ , valamint a hatóanyag-tartalmú mag-héj kompozitok elektronmikroszkópos képeit. A TEM képek alapján, az  $\text{SiO}_2$  részecskék átlagos mérete 408 nm ( $408,1 \pm 7,6$  nm). A héjak kiépülésével, egyre nagyobb méretű mag-héj kompozitok keletkeztek: az egyrétegű  $\text{SiO}_2/\text{IBU}/\text{PEI}$  kompozit körülbelül 880 nm ( $881,6 \pm 17,1$  nm), míg a kétrétegű  $\text{SiO}_2/\text{IBU}/\text{PEI}/\text{PSS}$  mag-héj kompozit már az 1000 nm-t is meghaladta ( $\sim 1138,7 \pm 14,2$  nm). A növekedés arra enged következtetni, hogy nem egy polielektrolit réteg alakult ki az  $\text{SiO}_2/\text{IBU}$ , illetve az  $\text{SiO}_2/\text{IBU}/\text{PEI}$  kompozitok felületén, hanem több polielektrolit egymáshoz kapcsolódva építette fel a héjakat a mag körül. A kísérletek során egy harmadik héj kialakítását is megpróbáltam kivitelezni, egy újabb PEI réteggel – az első PEI héj koncentrációjával azonos mennyiségben – de a polielektrolit hatására az addig kiépített mag-héj kompozit is szétesett. Fontos még hangsúlyozni, hogy mivel a második héj kialakítása már mikronos nagyságrendű részecskéket eredményezett, ezért nem is volt célunk további

kísérletek elvégzése a héjak számának növelésére, ugyanis ez a méret már az élő szervezetben való alkalmazásnak is gátat szab. Az  $\text{SiO}_2$  nagy mérete és gyors ülepedő képessége miatt DLS mérésekkel nem tudtam a részecskék méretét meghatározni, így a méreteket tekintve kizárólag a TEM eredményekre hagytam.



**5.1.7. ábra** A  $\text{SiO}_2$  (A), az  $\text{SiO}_2/\text{IBU}/\text{PEI}$  (B), valamint az  $\text{SiO}_2/\text{IBU}/\text{PEI}/\text{PSS}$  (C) kompozitok TEM képei az átlagos részecskeméretük és azok hibáinak feltüntetésével

A mag-héj kompozitok méretének meghatározásához geometriai közelítéseket alkalmaztam, szférikus szerkezetet feltételezve. A TEM képek alapján az  $\text{SiO}_2$  átmérőjének ismeretében (408 nm), valamint a kompozitok előállítása során alkalmazott mennyiségek felhasználásával ( $m_{\text{SiO}_2} = 0,1 \text{ g}$ ;  $c_{\text{SiO}_2} = 0,667 \text{ g}/100\text{cm}^3$ ;  $\rho_{\text{SiO}_2} = 0,99742 \text{ g}/\text{cm}^3$ ;  $m_{\text{PEI}} = 0,225 \text{ g}$ ;  $c_{\text{PEI}} = 1,7 \text{ g}/100\text{cm}^3$ ;  $\rho_{\text{PEI}} = 1,0254 \text{ g}/\text{cm}^3$ ) a mag-héj kompozitok átmérője, valamint a héj vastagsága számolható. A mag-héj kompozitok sematikus ábráját az **5.1.8. ábra** mutatja.



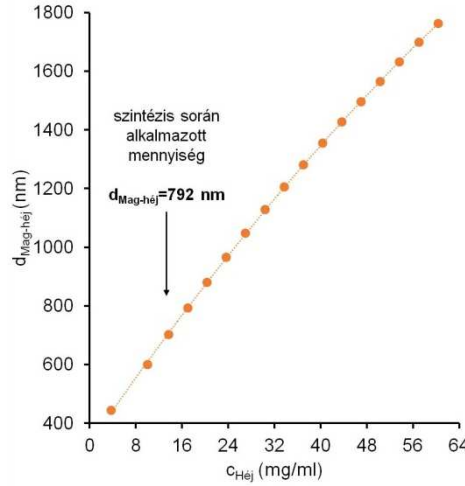
**5.1.8. ábra** A mag-héj kompozit sematikus ábrája a mag sugarának ( $r_{\text{Mag}}$ ), a héj vastagságának ( $d_{\text{Héj}}$ ), a mag-héj kompozit átmérőjének ( $d_{\text{Mag-héj}}$ ) és a sugarának ( $R$ ) a megadásával

*a.) A szférikus mag-héj modell*

Elsőként a kompozit átmérőjének előzetes meghatározását kíséreltem meg a 26. számú egyenlet felhasználásával, amelyet Hodak és munkatársai az Au/Ag mag-héj nanorészecskék

átmérőjének meghatározására alkalmaztak [168]. A számolás során az állandó  $d_{Mag}$  (408 nm) értéke mellett, a héj tömegét és így koncentrációját változtatva az **5.1.9. ábrán** látható függvényt kaptam, a kompozitok előállítása során alkalmazott  $c_{Héj}$  megjelölésével.

$$d_{Mag-héj} = d_{Mag} \sqrt[3]{\left(1 + \frac{m_{Héj} c_{Héj} \rho_{Mag}}{m_{Mag} c_{Mag} \rho_{Héj}}\right)} \quad (26)$$



**5.1.9. ábra** A mag-héj kompozit ( $\text{SiO}_2/\text{PEI}$ ) átmérőjének a változása a héj (PEI) koncentrációjának függvényében a 26. számú egyenlet alapján

Az **5.1.9. ábrán** látható, hogy a héj koncentrációjának a növelésével nem lineárisan nő a mag-héj kompozit mérete. Az előállítás során alkalmazott mennyiségekkel a számított  $d_{Mag-héj} = 792$  nm, az ebből kapott átlagos héjvastagság 192 nm. A számított sugár értékek ismeretében a kompozit, a mag és a héj térfogata a következő képletek alapján számolhatóak:

$$V_{Mag-héj} = \frac{4}{3} \pi (R^3) \quad (27)$$

$$V_{Mag} = \frac{4}{3} \pi (r_{Mag}^3) \quad (28)$$

$$V_{Héj} = \frac{4}{3} \pi [(R^3) - (r_{Mag}^3)] \quad (29)$$

A 29. számú egyenlet felírható a következőképpen is, ugyanis az  $R^3 - r_{Mag}^3 = d_{Héj}^3$ :

$$V_{Héj} = \frac{4}{3} \pi d_{Héj}^3 \quad (30)$$

A 26. számú egyenletből kapott átmérő (792 nm) és így a héjvastagság (192 nm) ismeretében a 29. számú egyenletből számított héjtérfogat  $2,25 \cdot 10^8 \text{ nm}^3$ -nek adódott.

Amint azt korábban láttuk a mért (TEM) átlagos  $d_{Mag-héj} = 882$  nm. A TEM képek alapján látható, hogy nem monodiszperz mag-héj kompozitok keletkeztek, így a polidiszperzitás lehet az oka a számolt és az átlagos méret közötti ~90 nm eltérésnek (10%).

A mért héj térfogata ebben az esetben  $3,21 \cdot 10^8 \text{ nm}^3$  (29. számú egyenlet szerint), amely alapján a kompozit térbeli kiterjedése 1,4-szer nagyobb a számított értéknél, feltehetőleg tehát, a polielektrolit nem egy tömör réteget hozott létre a szilika gömb körül, azaz a PEI láncai jól szolvatálódtak.

*b.) Mag-héj modell a sűrűségek ismeretében*

A következő módszert először a mikroemulziókra alkalmazták [169], amelyben monodiszperz és gömb-alakú micellák létrejöttét feltételezték, valamint azt, hogy az összes tenzid a határrétegben helyezkedik el. A módszer segítségével közvetlenül a  $d_{héj}$  vastagsága határozható meg, amelyhez először definiálnunk kell a mag tömegét, korrigálva a sűrűségével:

$$m_{Mag} = \frac{4}{3} \pi r_{Mag}^3 \rho_{Mag} \quad (31)$$

Ugyanezen, megfontolás alapján, a héj tömege a 32. számú egyenlet alapján adható meg:

$$m_{Héj} = \frac{4}{3} \pi d_{Héj}^3 \rho_{Héj} \quad (32)$$

A módszer a micella belsejében lévő víz tömegét egyenlőnek veszi a határrétegben lévő tenzid tömegével, így a két egyenlet hányadosával (31/32. számú egyenlet) megadható a határfelületi réteg vastagsága:

$$d_{Héj} = \sqrt[3]{\frac{r_{Mag}^3 \rho_{Mag}}{\rho_{Héj} \frac{m_{mag}}{m_{héj}}}} \quad (33)$$

A mi esetünkben egy állandó mag tömeghez növekvő mennyiségű polielektrolit adagolva, a mért mag sugarának az ismeretében a  $d_{Héj}$  értéke számolható a 33. számú egyenletet alkalmazva, amely függvénye az **5.1.10.(A) ábrán** látható. A módszerrel a héj vastagsága 276 nm-nek adódott, amely így nagyobb átlagos átmérőt is eredményezett: 960 nm-t (eltérés 8,9%). Ezzel a módszerrel láthatóan nagyobb átmérőt kaptunk, a mért értékhez képest, azaz ez a módszer az elágazó láncú PEI molekula nagyobb térkitöltését feltételezi, amely térfogatban  $4,29 \cdot 10^8 \text{ nm}^3$ -t jelent a 29. számú egyenlet alapján.

*c.) Mag-héj modell a mag koncentrációjának ismeretében*

A kompozit előállítása folyamán, a  $\text{SiO}_2$  mag (6 mg/ml) kis koncentrációjának köszönhetően, a sűrűsége alig tér el a víz sűrűségétől, így egységnyi tömegre vonatkoztatva a mag és az oldat térfogata (a héj esetében is) egyenlőnek tekinthető. Ebből a feltételezésből kiindulva a 33. számú egyenletbe behelyettesítve és az egyszerűsítéseket elvégezve a 34. és a



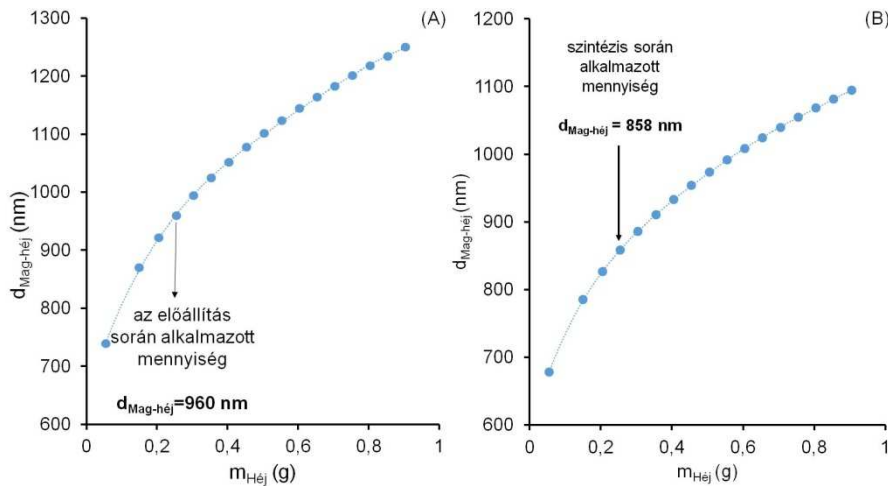
35. számú egyenletet kapjuk meg ( $\rho_{H\acute{e}j}=m_{H\acute{e}j}/V_{H\acute{e}j}$ ;  $\rho_{Mag}=m_{Mag}/V_{Mag}$ ;  $m_{H\acute{e}j}=n_{H\acute{e}j}M_{H\acute{e}j(monomer)}$ ;  $m_{Mag}=n_{Mag}M_{Mag}$ ;  $c_{Mag}=n_{Mag}/V_{oldat}$ ;  $c_{H\acute{e}j}=n_{H\acute{e}j}/V_{oldat}$ ).

$$d_{H\acute{e}j} = \sqrt[3]{\frac{r_{Mag}^3 c_{Mag} m_{Mag} m_{H\acute{e}j} n_{H\acute{e}j}}{m_{Mag} n_{Mag} c_{H\acute{e}j} m_{H\acute{e}j}}} \quad (34)$$

A 34. számú egyenlet egyszerűsítései mellett a  $V_{H\acute{e}j}=n_{H\acute{e}j}/c_{H\acute{e}j}$  képletet alkalmazva a héj vastagsága a következő egyenlettel adható meg:

$$d_{H\acute{e}j} = \sqrt[3]{\frac{r_{Mag}^3 c_{Mag}}{n_{Mag}}} * V_{H\acute{e}j} \quad (35)$$

A  $d_{H\acute{e}j}$  értéke a szintézis mennyiségében 225 nm-nek adódott, amely alapján a mag-héj kompozit átmérője 885 nm **(5.1.10.(B) ábra)**. Ez a módszer a TEM képek alapján meghatározott átmérővel tökéletes egyezést mutatott, amely térfogata ( $V_{H\acute{e}j} = 2,95 \cdot 10^8 \text{ nm}^3$ ) is 1%-os hibán belül megjósolja a mért értéket.



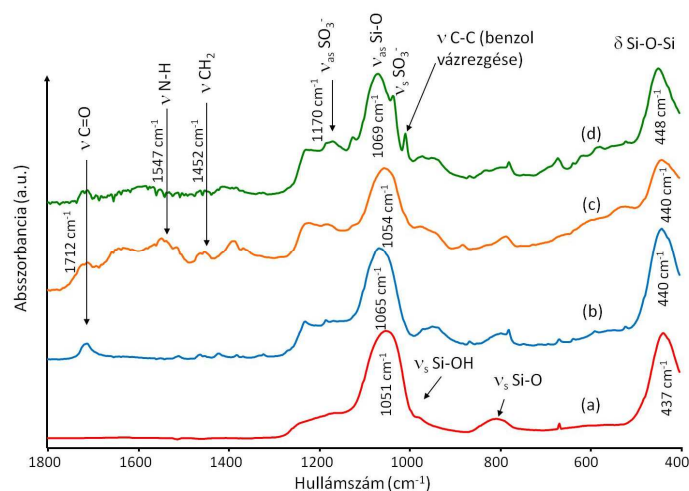
**5.1.10. ábra** A  $d_{Mag-héj}$  értékének meghatározása a 33. **(A)** és a 34. számú **(B)** egyenlet alapján, a héj tömegének változtatásával

Az eredmények alapján a javasolt egyenletek alkalmasak az  $r_{Mag}$  és a koncentrációk ismeretében a héjvastagság és a mag-héj kompozit átmérőjének az előzetes becslésére. A mért és a számított héjvastagságok, valamint a térfogatok értékeit a következő táblázat **(5.1.2. táblázat)** tartalmazza.

**5.1.2. táblázat** A mért és a számított mag-héj kompozit átmérője ( $d_{\text{Mag-héj}}$ ) héjvastagság ( $d_{\text{Héj}}$ ) és a héjtérfogat ( $V_{\text{Héj}}$ ) értékei.

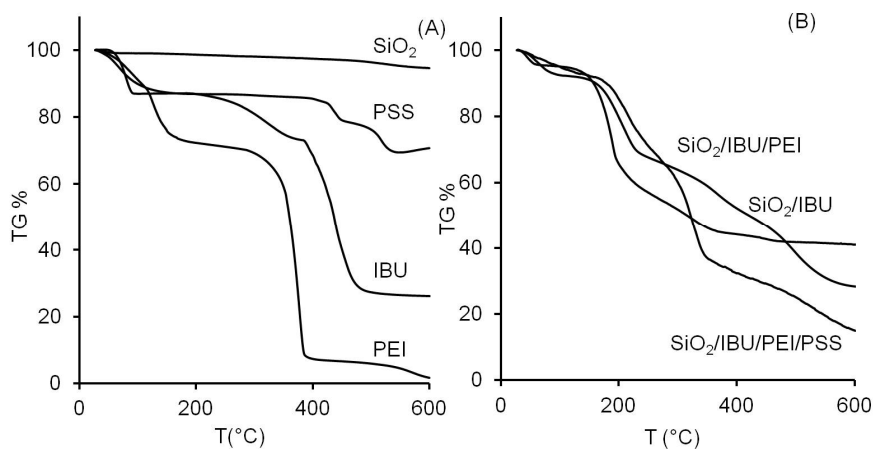
Egyrétegű mag-héj kompozit		$d_{\text{Mag-héj}}$ (nm)	$d_{\text{Héj}}$ (nm)	$V_{\text{Héj}}$ (nm <sup>3</sup> )
Számított	Szférikus mag-héj modell (26. számú egyenlet)	792	192	$2,25 \cdot 10^8$
	Mag-héj modell a sűrűségek ismeretében (33. számú egyenlet)	960	276	$4,28 \cdot 10^8$
	Mag-héj modell a mag koncentrációjának ismeretében (35. számú egyenlet)	885	225	$2,95 \cdot 10^8$
Mért	TEM képek alapján	880	236	$3,21 \cdot 10^8$

Mivel az  $\text{SiO}_2$  az elektromágneses sugárzás abszorpciójával jellegzetes rezgési átmeneteket eredményez, így az FT-IR jól alkalmazható mind a szilika azonosítására, mind tisztaságának ellenőrzésére. Az  $1050 \text{ cm}^{-1}$  és a  $806 \text{ cm}^{-1}$ -nél megjelent sáv az Si-O kötés aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgéseire rendelhető (5.1.9. ábra). Az Si-O-Si kötésben az oxigén deformációs rezgése  $437 \text{ cm}^{-1}$ -nél jelenik meg. A felületen lévő OH-csoportok jelenlétét a  $960 \text{ cm}^{-1}$ -nél megjelenő Si-OH vegyértékrezgési sávja igazolja. További sávok nincsenek jelen a spektrumban, így a kationos tenzid bármilyen mennyiségben való jelenlétét is kizártnak tekintettem. A hatóanyag megkötődését az IBU-ban található C=O rezgési sávjának a megjelenése bizonyítja  $1712 \text{ cm}^{-1}$ -nél. Az első pozitív töltésű polielektrolit, a PEI számos karakterisztikus csúccsal rendelkezik az ujjlenyomat tartományban. Az amin, valamint a  $\text{CH}_2$  csoport rezgései  $1547$  és  $1452 \text{ cm}^{-1}$ -nél jelentek meg. Az  $1090$  és az  $1010 \text{ cm}^{-1}$ -es csúcsok, a második héjként hozzáadott PSS benzol gyűrűjének a vázrezgéseire köthető. A szulfát-csoportok aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgési sávjai rendre,  $1170$  és  $1037 \text{ cm}^{-1}$ -nél találhatóak. A szilika fő sávjának ( $1050 \text{ cm}^{-1}$ ) folyamatos eltolódása, a hozzáadott anyagok karakterisztikus sávjainak megjelenésén túl, bizonyítja a kölcsönhatások kialakulását, mind a hatóanyag, mind a polielektrolitok esetében.



**5.1.9. ábra** A szilika-alapú mag-héj kompozitok FT-IR spektrumai, (a) SiO<sub>2</sub>, (b) SiO<sub>2</sub>/IBU, (c) SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI, (d) SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS

Termogravimetriás méréseket alkalmaztam a liofilizált minták szerves, - valamint szervesanyag-tartalmának a meghatározására (**5.1.10. ábra**). A 200° alatti tömegcsökkenés a fizikailag kötött víz, felületről való „eltávozásának” tulajdonítható. A mérést 600°-ig végeztem, amely hőmérséklet nem elegendő a szerves anyag bomlásához, így a tiszta SiO<sub>2</sub> esetében az összes tömegcsökkenés csak a vízvesztésnek tulajdonítható (~5,4%). A SiO<sub>2</sub>/IBU kompozit 15%-nyi tömegcsökkenést mutatott 230-380° között. A héjak számának növelésével azt tapasztaltam, hogy egyre kevesebb adszorbeált vizet tartalmaztak a kompozitok. A két héj termikus bomlása két elkülönülő lépcsőhöz rendelhető: a PEI 290 és 418°C, míg a PSS 418 és 570°C között bomlott el. Az IBU adszorbeált mennyiségét, a szilika felületén 1618 mg/g-nak állapítottam meg, amely igen jó egyezést mutatott az oldatadszorpciós mérés eredményével, a különbség csupán 48 mg/g.

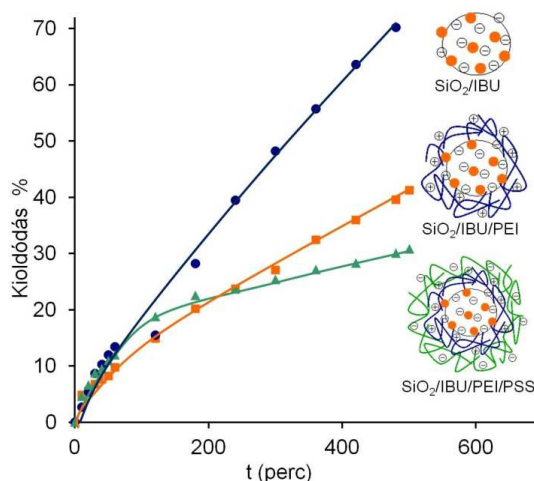


**5.1.10. ábra** Termogravimetriás görbék a kiindulási anyagokra (A) és az SiO<sub>2</sub>-alapú kompozitokra (B)

A PBS-pufferbe diszpergált kompozitból a hatóanyag időbeli kioldódását követtem nyomon UV-spektrofotometriával 272 nm-en (**5.1.11. ábra**). A vizsgálatot megelőzően meghatároztam a kompozitok pontos IBU-tartalmát, amely alapján a „kapszulázási” hatékonyságot a következő egyenlet alapján számoltam:

$$\% = \frac{M_i}{M_t} * 100, \quad (36)$$

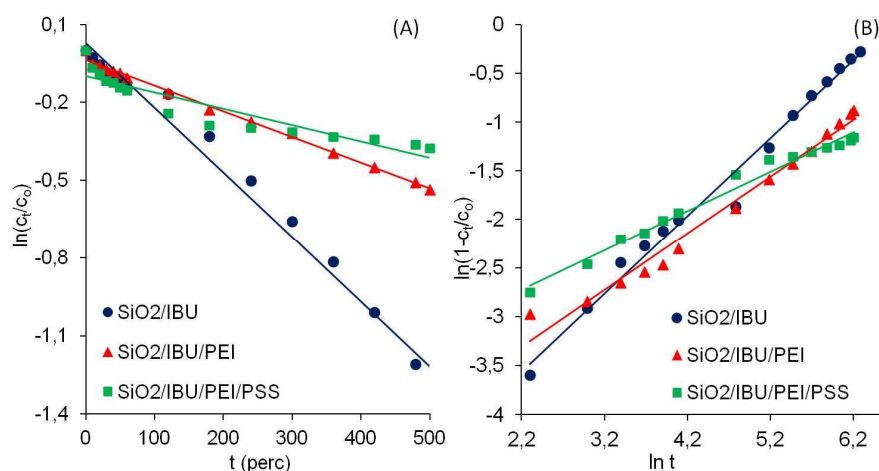
ahol az  $M_t$  az IBU mennyisége a kompozitban, míg  $M_i$  a teljes bemért IBU tartalom az előállítás során. A kapott „kapszulázási” hatékonyság értékek rendre az SiO<sub>2</sub>/IBU, az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI és az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS kompozitokra nézve 96,5; 79,2 és 70,3%. Az IBU-tartalom folyamatos csökkenése arra utal, hogy az előállítás során, azaz a héjak kialakítása folyamán a kompozit folyamatosan veszített hatóanyag-tartalmából.



**5.1.11. ábra** Az IBU kioldódási profiljai az SiO<sub>2</sub>-alapú kompozitokból 25°C-on (kör-SiO<sub>2</sub>/IBU, négyzet-SiO<sub>2</sub>/IBU/PSS, háromszög-SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS)

A kioldódási vizsgálatok során, a pontos IBU-tartalommal számolva a következőket tapasztaltam: A héj nélküli kompozit esetében a kioldódás ~70%-os volt 500 perc elteltével. Az első polielektrolit réteg is már szignifikáns csökkenést okozott a hatóanyag kioldódás sebességében. A 40% kioldódott hatóanyag mennyisége tovább csökkent (30%) a második héj lassító hatásának köszönhetően. Ha megvizsgáljuk a kioldódási profilokat látható, hogy a kétrétegű mag-héj kompozitból és a héj nélkül részecskékből a hatóanyag kioldódás sebessége összemérhető az első egy órában. Ez arra utal, hogy az IBU nemcsak a pórusokban van jelen, hanem a felületen, valamint a polielektrolit rétegekben is megtalálható. Ez az eredmény nem meglepő, ugyanis ahogy az UV mérésekből is kitűnik, a héjak kialakítása folyamán a

hatóanyag folyamatosan oldódik ki a magból, így a kétrétegű mag-héj kompozit esetén már nemcsak a szilika magban található hatóanyag, hanem a héjak között, azok felületén is.



**5.1.12. ábra** Az elsőrendű (A) és a módosított Freundlich modell az IBU kioldódására a szilika-tartalmú kompozitokból

A kioldódás mechanizmusára a korábban bemutatott kinetikai modellek alkalmazásával következtethetünk. Ahogy azt, az előzményekben már részleteztem, a kioldódás sebességét több folyamat is befolyásol(hat)ja, azonban a kinetikai modellekkel a döntő folyamat meghatározható. A továbbiakban hat kinetikai modellt mutatok be, a hatóanyag kioldódás folyamatának kvantitatív leírására. Az **5.1.3. táblázat** tartalmazza a kinetikai modellekből nyert paramétereket az egyes minták esetében. Az alkalmazott egyenlet „jóságát” a korrelációs koefficiens ( $R^2$ ) értéke adja meg. Az IBU kioldódására (37°C-on lásd az 5.6.6. ábrán) a Higuchi modell alkalmazható, ezt is várjuk, hiszen az IBU kioldódása csupán a membránon keresztüli diffúzió képességétől függ. Az SiO<sub>2</sub>-alapú kompozitokra alkalmazott kinetikai modellek közül kettő, az elsőrendű és a módosított Freundlich modell reprezentációja látható az **5.1.12. ábrán**. Az IBU kioldódását az SiO<sub>2</sub> részecskékből a nulladrendű sebességi modell írja le a legpontosabban, amely fontosságát már a bevezetőben láttuk (egyes gyógyszerhatóanyagok esetében). Az eredmény alapján, tehát a szilika pórusaiból a kioldódás egy lassú, jól kontrollált folyamat. Az egyrétegű mag-héj kompozitból történő hatóanyag leadás a hatóanyag koncentrációjától függő kinetikával jellemezhető, amelyet az elsőrendű sebességi modell  $R^2$  (0,995) értéke mutat. A kétrétegű mag-héj kompozit esetében a módosított Freundlich és a Korsmeyer-Peppas modell adja a legjobb illeszkedést, azaz az ioncsere, a diffúzió és az erózió folyamatainak együttese a döntő a kioldódás sebességének a szabályozásában. Az utóbbi módszer tartalmaz egy exponenst - amint azt a bevezetőben már részleteztem - amely információkat hordoz, mind a

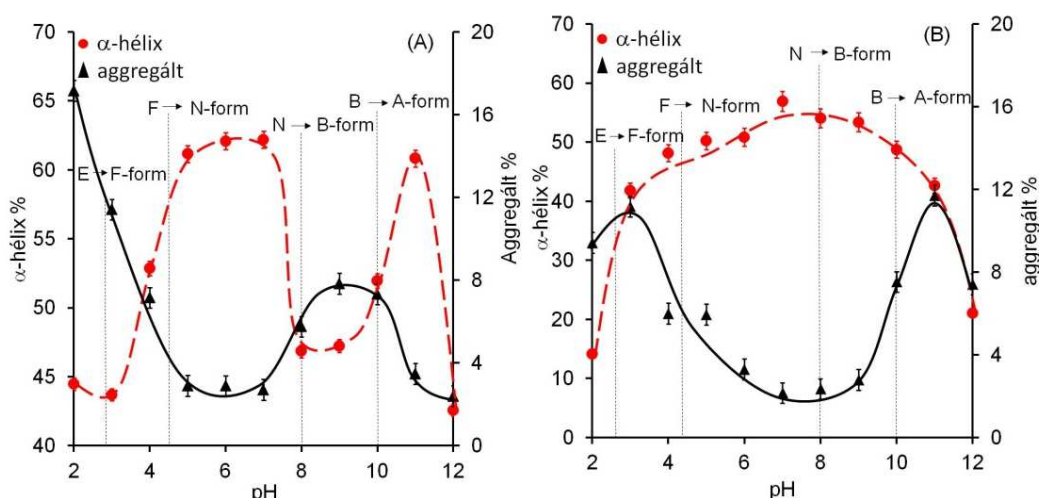
mechanizmusról, mind a geometriáról. Az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS mag-héj kompozit esetében ennek az állandónak az értéke 0,405, amely a gömb geometriára jellemző értéket közelíti meg leginkább. A sebességi állandók tanulmányozásával láthatjuk- habár nem minden esetben kaptam jó illeszkedést minden rendszerre, minden modell alkalmazásával- hogy mind a nulladrendű, mind az elsőrendű modell alapján egy nagyságrendi csökkenést tapasztalhatunk a kioldódás sebességében a héjak számának a növelésével. Így a nulladrendű kinetikai modell alapján kapott  $k_0$  értéke az SiO<sub>2</sub>/IBU kompozitra  $1,4 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ , míg az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS mag-héj kompozitra  $5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ -ra csökkent. Ez mutatja, hogy a polielektrolitoknak milyen szerepük van, mennyire befolyásolja az adott héj milyensége vagy éppen a héjak száma a kioldódás mechanizmusát, így a sebességét is.

**5.1.3. táblázat** Az IBU kioldódási profiljaira alkalmazott kinetikai modellek alapján kapott paraméterek

25°C		IBU	SiO <sub>2</sub> /IBU	SiO <sub>2</sub> /IBU/PEI	SiO <sub>2</sub> /IBU/PEI/PSS
<b>Nulladrendű [161]</b> (a hatóanyag koncentrációjától független a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,860	0,992	0,988	0,833
	$k_0 (\text{s}^{-1})$	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 0,0027$	$1,4 \cdot 10^{-1} \pm 0,0003$	$7,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,0061$	$5,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,0015$
<b>Elsőrendű [163]</b> (a hatóanyag koncentrációjától függ a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,936	0,984	0,995	0,863
	$k_d (\text{s}^{-1})$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$	$2,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,000001$	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$	$6,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0000001$
<b>Higuchi [148]</b> (diffúzió-kontrollált kioldódás)	$R^2$	0,968	0,958	0,963	0,961
	$k_H (\text{s}^{-1/2})$	$2,7 \cdot 10^0 \pm 0,0666$	$3,5 \cdot 10^0 \pm 0,0076$	$1,8 \cdot 10^0 \pm 0,1497$	$1,3 \cdot 10^0 \pm 0,0302$
<b>Hixon-Crowell [160]</b> (a hordozó fajlagos felülete vagy a mérete változik a kioldódás során)	$R^2$	0,786	0,935	0,926	0,746
	$k_{HC} (\text{s}^{-1/3})$	$2,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,0004$	$4,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,00007$	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,0009$	$1,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,0009$
<b>módosított Freundlich [155]</b> (ioncsere- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,919	0,986	0,980	0,983
	$k_{mF} (\text{s}^{-1})$	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 0,0009$	$4,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,000003$	$1,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,0011$	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,0046$
	$a$	0,511	0,799	0,582	0,405
<b>Korsmeyer-Peppas [152]</b> (erózió- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,919	0,986	0,980	0,983
	$k_{KP} (\text{s}^{-n})$	$2,9 \cdot 10^0 \pm 0,1934$	$4,9 \cdot 10^{-1} \pm 0,0004$	$1,0 \cdot 10^0 \pm 0,0060$	$2,7 \cdot 10^0 \pm 0,4567$
	$n$	0,511	0,800	0,582	0,405

## 5.2. A BSA konformációjának vizsgálata fizikai-kémiai módszerekkel

Az SiO<sub>2</sub>-alapú mag-héj kompozitok sikeres előállítása és vizsgálata után, a szerves-alapú mag-héj kompozitok előállításához a biológiai rendszerekben is előforduló BSA-t választottuk. A mag-héj kompozit előállításához azonban elengedhetetlen feltétel a fehérje tulajdonságainak ismerete különböző kísérleti körülmények között. Így elsőként vizsgálataimat a BSA fizikai-kémiai tulajdonságainak a tanulmányozásával kezdtem meg pH = 2 és 12 között MilliQ-vízben, valamint fiziológias oldatban (150 mM NaCl).



5.3.1. **ábra** A BSA  $\alpha$ -hélix és az aggregált forma százalékos tartalma a pH-függvényében só nélkül (A) és 150 mM NaCl jelenlétében (B)

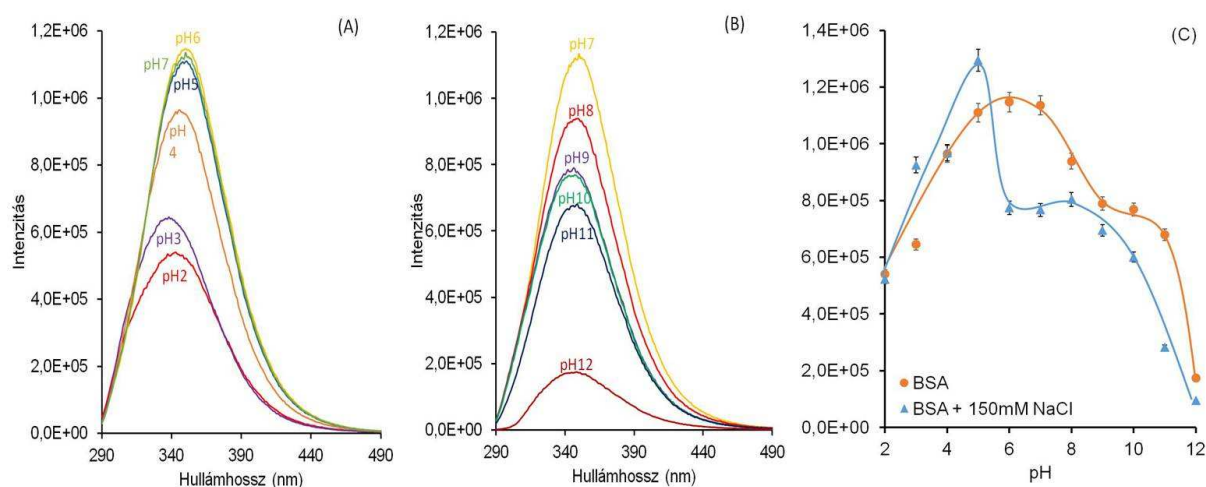
A fehérje másodlagos szerkezetét FT-IR spektroszkópia segítségével vizsgáltam. Az amid I csúcs dekonvolúciója, lehetőséget ad a másodlagos szerkezeti elemek százalékos meghatározására. Az **5.2.1. ábra** mutatja az  $\alpha$ -hélix ( $\sim 1652\text{ cm}^{-1}$ ) és az aggregált forma tartalmának ( $\sim 1618\text{ cm}^{-1}$ ) változását a pH-függvényében só nélkül és 150 mM NaCl jelenlétében. A BSA, N-állapotban nagy  $\alpha$ -hélix tartalommal ( $\sim 62\%$ ) rendelkezik. Ha a fehérje konformációs változásokon megy keresztül, akkor a fő másodlagos szerkezeti elem csökkenését tapasztaltam. F-állapotban az  $\alpha$ -hélix tartalom 52%-ra csökkent, míg E és a B-formában közel 44%-ra redukálódott. Lúgos tartományban, pH = 10 és 11 körül egy kis növekedést tapasztaltam az  $\alpha$ -hélix tartalomban, ez utóbbi pH-t az irodalomban a fehérje egy stabilabb állapotához kötik [91]. 12-es pH-n közel 42%-ra csökkent a BSA  $\alpha$ -hélix tartalma. Az aggregált forma jelenléte fordítottan változik az  $\alpha$ -hélix tartalommal, azaz nagyobb  $\alpha$ -hélix tartalom mellett kisebb az aggregált forma jelenléte a fehérje szerkezetében. Például az



N-állapotban lévő fehérje 2,7%-ban tartalmaz aggregált szerkezetet, míg pH = 3-on a 44% fő másodlagos szerkezeti elem mellett, 11% aggregált forma jelenlétét tapasztaltam.

150 mM NaCl jelenlétében (**5.2.1.(B) ábra**) kisebb százalékban tartalmaz a fehérje  $\alpha$ -hélix szerkezeti elemet a só nélküli oldathoz képest, azaz körülbelül 51%-ot. Savasabb, illetve lúgosabb tartományban is folyamatos csökkenést tapasztaltam a fő másodlagos szerkezeti elem tartalmában. Az aggregált állapot ebben az esetben is fordítottan változott az  $\alpha$ -hélix szerkezettel; nagyobb  $\alpha$ -hélix tartalommal kevesebb aggregált forma párosul. Így N-formában tapasztaltam a legkisebb aggregált tartalmat (2,5%), míg kitekeredett állapotban a legnagyobbat (12%).

A BSA harmadlagos szerkezetében bekövetkező változásokat, a fehérjében található aromás csoportok emissziós tulajdonságainak vizsgálataival követtem nyomon 280 nm-es gerjesztés mellett, amely a legnagyobb kvantumhasznosítási tényezővel rendelkező triptofántól (Trp) származik. Az **5.2.2.(A) és (B) ábra** mutatja az emissziós spektrumok változásait a pH-függvényében só nélkül, valamint 150 mM NaCl jelenlétében.

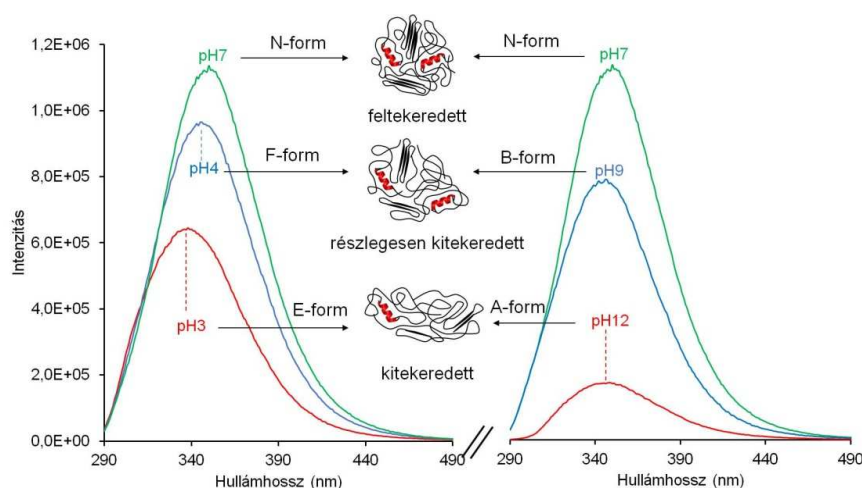


**5.2.2. ábra** A BSA (3 mg/ml) emissziós spektrumainak a változása pH = 2 és 7 között (**A**), és pH = 7 és 12 között (**B**), valamint az intenzitás maximumok változása a pH-függvényében (**C**)

A fehérje legkisebb stabilitású állapota az izoelektromos pont (i.e.p.) közelében van, ahol a pozitív és a negatív töltések száma megegyezik. Ennek a pontnak a közvetlen környezetében mértem a legnagyobb intenzitású emissziós csúcsot. Ez azzal magyarázható, hogy ebben az állapotban erős intermolekuláris kölcsönhatások tartják össze a fehérjét, úgymint a hidrofób, van der Waals, hidrogén, diszulfid, valamint az ion-és sóhíd kötések. Ekkor a Trp a legkedvezőbb környezetben van (a lehető leghidrofóbabb környezetben van,



amely a legnagyobb kvantumhasznosítási hatásokkal párosul). Ha változtatjuk a pH-t, akkor a Trp kevésbé hidrofób környezetbe kerül, így egy szerkezeti átrendeződés megy végbe, oly módon, hogy a Trp ideális hidrofób környezetet találjon magának. Ezt igazolják a fluoreszcenciás intenzitások is: N-állapotban mértem a legintenzívebb emissziós csúcsot, majd a pH eltolásával, egyre kisebb intenzitásokat kaptam a hidrofilebb környezetnek köszönhetően. pH = 2-es oldatban, majd folyamatos pH növekedés mellett vörös eltolódást észleltem (338 nm-ről tolódik 350 nm-re), amely arra utal, hogy egy inter-domain szeparáció következett be, mivel a Trp egyre hidrofóbabb környezetben helyezkedik el a fehérje mátrixban. Másrészt a BSA pozitívan töltött molekula savas közegben (~4,5 alatt), amely az arginintól, lizintől és hisztidintől származik. Ezek az aminosavak, illetve a felszín poláros (amid kötések, aszparagin, glutaminsav) és a nempoláros részei gyengén hidratált állapotban vannak [109]. Az eredeti másodlagos kötőerők, amelyek a fehérje szerkezetét stabilizálják, a kitekeredés folyamatának köszönhetően felbomlanak és újak keletkeznek, viszont a kitekeredést gátolja a rosszul hidratálható funkciók csoportok jelenléte a felületen.

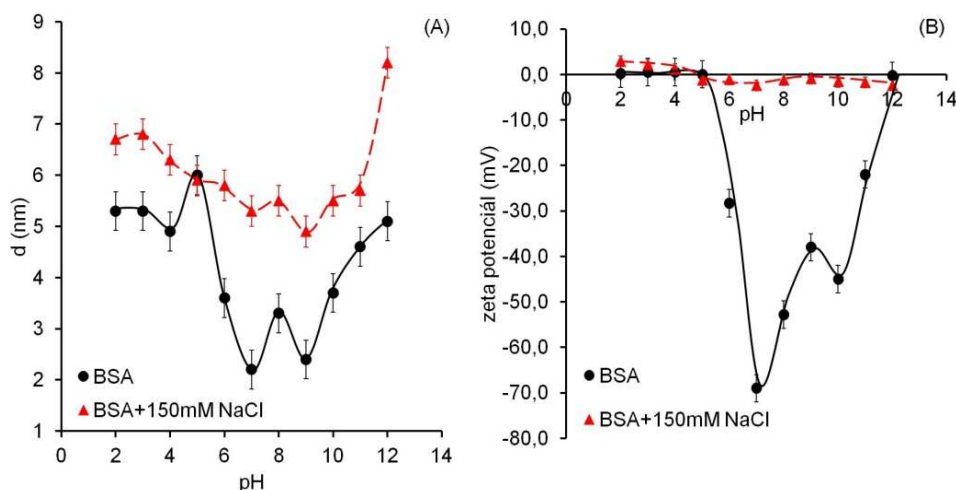


**5.2.3. ábra** A fluoreszcenciás mérések összefoglalása a pH-függvényében ( $c_{BSA} = 3 \text{ mg/ml}$ )

Bázikus közegben az emissziós maximumok kék eltolódást (350 nm-ről 347 nm-re) mutatnak, amely szintén egyre hidrofilebb környezetre utal a Trp körül. Ebben a pH-tartományban a BSA negatív töltése az erősen hidratált karboxilcsoportoktól ered, amely az aszparagin és a glutaminsav oldalláncokban található meg [110]. Így ebben az esetben a kitekeredés folyamatát nem gátolja semmi, nagyobb mértékű szerkezeti átalakulás ment végbe, így nagyobb intenzitás csökkenést észlelhetem, mint savas pH-n. 150 mM NaCl jelenlétében az intenzitás szintén az i.e.p. közelében a legnagyobb. Az emissziós spektrumok

összehasonlításával azt tapasztaltam, hogy savas pH-n a Trp környezetének átrendeződése erősen függ a só jelenlététől, míg lúgos közegben független attól.

Az emissziós intenzitások visszatükrözik a fehérje harmadlagos szerkezetét (**5.2.3. ábra**), azaz ha az emissziós csúcs éles és keskeny, akkor a fehérje felgombolyodott állapotban van. A pH csökkenésével vagy növelésével a fehérje láncai kitekeredtek, az emissziós intenzitások kisebbek lettek (**5.2.2.(C) ábra**). Erősen savas vagy lúgos közegben a fehérje egy erős konformációs változáson megy keresztül, azaz a BSA teljesen kigombolyodott formában van jelen. Az intenzitás különbségek a korábban említettekhez vezethetők vissza, azaz hogy savas és lúgos pH-n a felületen lévő funkciós csoportok hidratáltsága eltérő, így a szerkezeti változások is különböző mértékűek (pl. 4-es és 9-es pH-n).



**5.2.4. ábra** A BSA (3 mg/ml) hidrodinamikai átmérője (**A**) és a zeta potenciál (**B**) értékei a pH-függvényében MilliQ-vízben, valamint 150 mM NaCl jelenlétében

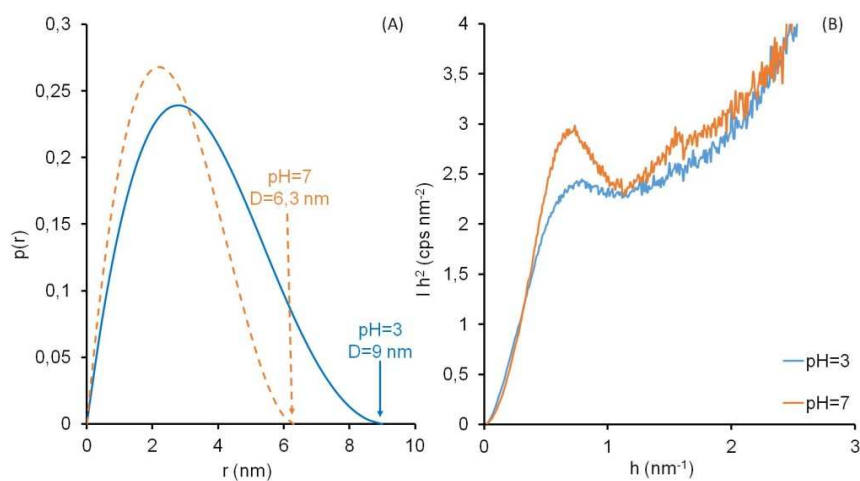
A BSA-oldatsorozat tagjainak (fényszórásméréssel), elsőként a hidrodinamikai átmérőjét ( $d_{DLS}$ ) és a zeta potenciálját ( $\zeta$ ) határoztam meg. A PDI indexek alapján a sót nem tartalmazó oldatban a legmonodiszperzebb mintát pH = 12-n ( $PDI = 0,119$ ), míg a legpolidiszperzebb mintát pH = 3-on ( $PDI = 0,547$ ) kaptam. 150 mM NaCl jelenlétében viszont pH = 3-on volt a legkisebb a  $PDI$  index (0,162), míg pH = 12-n (0,357) a legnagyobb. Az **5.2.4.(A) ábra** alapján megállapítható, hogy a fehérje kisebb átmérővel rendelkezik só jelenléte nélkül. A maximum értéket az i.e.p. körül tapasztaltam (pH = 5), ezen a pH-n a fehérje oldhatósága a legkisebb, ezáltal instabil is, ugyanis az elektrosztatikus taszítás a „zéro” töltésnek köszönhetően megszűnt, amely a fehérje aggregációját idézte elő. Mivel só

nélkül és só jelenlétében is azonos méreteket kaptam, így megállapítható, hogy ebben az esetben a só jelenléte nem befolyásolja a BSA szerkezetét.

A legkisebb  $d_{DLS}$  értékeket a fehérje saját pH-ján mértem (pH = 7). Ebben az állapotban, a BSA N-formában van jelen, amit az irodalomban egy szférikus alakkal rendelkező rendkívül kedvező formának írnak le. NaCl jelenlétében az elektromos kettősréteg szerkezete is befolyásolja a méretet, és a stabilitást, amelyről a  $\zeta$  értékek nyújtanak információt (**5.2.4.(B) ábra**). A  $\zeta$  értékek a BSA felületi töltését mutatják, amelyek a funkciócsoportok disszociációjából és/vagy ionok adszorpciójából származik. Az i.e.p.-ban a BSA nem stabil, közel 0 mV körüli felületi potenciál értékkel rendelkezik, míg savas tartományban a gyengén hidratálható funkciócsoportok, kis pozitív felületi töltést biztosítanak a fehérjének. Lúgos közegben só nélkül a BSA nagy negatív felületi potenciállal rendelkezik ( $\zeta = -28 - -69$  mV), azaz rendkívül stabil az oldatban, nem aggregál. A karboxilcsoportok jó hidratálhatóságának köszönhetően, az azonos töltésű csoportok között a taszítás jelentősen lecsökkent, a savas tartománnyal ellentétben, ahol az intermolekuláris taszítások erősebbek. 12-es pH-n a  $\zeta$  értéke újra 0 mV körüli értéket vett fel, amely azt sugallja, hogy ezen a pH-n is egy „olvadt gombolyag” szerkezet van jelen, éppúgy, mint a 2-es pH-jú oldatban, azaz a másodlagos szerkezeti elemek már kialakulhattak, de harmadlagos szerkezet még nem. 150 mM NaCl jelenlétében a  $\zeta$ -potenciál az i.e.p. minimális eltolódását is mutatja, alacsonyabb pH-n vált egyenlővé a pozitív és a negatív töltések száma. Ahogy só nélkül is, ha pH = 2-ről növeltem a pH-t az i.e.p.-ig, csökkent a potenciál, bár ebben az esetben kissé nagyobb értékeket kaptam. Az oldatban jelenlevő ionok egy kompakt elektromos kettősréteget hoznak létre a biopolimer körül, amely a BSA instabilis állapotát okozta. A BSA negatív töltését, amely a karboxilcsoportoktól származik, a nátrium-ionok leárnyékolják, így sokkal kisebb potenciálokat figyelhetünk meg, az egyértékű-ionokat nem tartalmazó oldathoz képest. Így a tömör elektromos kettősrétegnek köszönhetően a BSA aggregációja figyelhető meg.

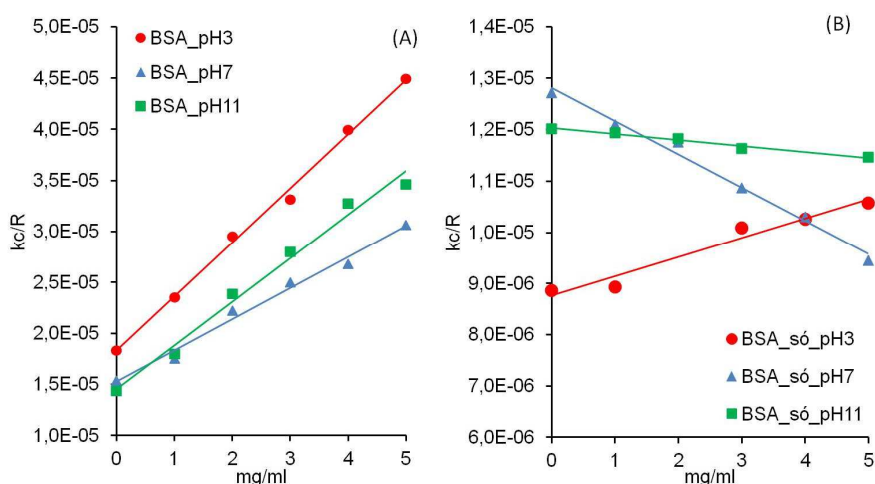
A fehérje méretét és alakját SAXS mérésekkel is vizsgáltuk a pH függvényében. A pátkorrelációs függvények (**5.2.5.(A) ábra**) is bizonyítják, hogy a fehérje N-állapotban (pH = 7) kisebb kiterjedéssel ( $D = 6,3$  nm) rendelkezik, mint E-állapotban (pH = 3,  $D = 9$  nm), ahol a fehérje láncok kigombolyodása, a BSA nagyobb térbeli kiterjedését okozza. Másrészt, a függvény alakja sem azonos pH = 3 és pH = 7 érték esetében, amely a fehérje geometriájában bekövetkező változásokkal hozható összefüggésbe. A Kratky-egyenlet ábrázolásával (**5.2.5.(B) ábra**) szerezhethetünk részletesebb információt a fehérje térbeli konformációjáról, azaz alakjáról. A fehérje N-állapotában, azaz pH = 7 értéknél szférikus struktúrára jellemző

görbét kaptunk, míg  $\text{pH} = 3$ -nál a görbe alakjának megváltozása a fehérje láncok kitekeredését bizonyítja.



**5.2.5. ábra** A párkorrelációs függvény (A) és a Kratky-egyenlet ábrázolása (B) a BSA-ra a  $\text{pH}$  függvényében

A kereskedelmi forgalomban kapható BSA molekulatömegéről a gyártó csak közelítő információt szolgáltat, ezért volt fontos számunkra a pontos érték meghatározása. Továbbá, a fehérjék  $M_w$  értékére nincs adat az irodalomban, hogy hogyan változik a  $\text{pH}$  vagy a só hatására. Ennek meghatározására tettem kísérletet három  $\text{pH}$ -t kiválasztva MilliQ-vízben és fiziológias oldatban egyaránt (5.2.6. ábra).



**5.2.6. ábra** A Debye-egyenlet a BSA molekulatömeg meghatározására a  $\text{pH}$ -függvényében MilliQ-vízben (A) és 150 mM NaCl (B) jelenlétében

A BSA saját pH-ja 7, így először ezen a pH-n végeztem el a mérést. Az eredmény jól megközelíti a Sigma-által megadott értéket (~66 kDa); a BSA molekulatömege 65,3 kDa. A pH csökkentésével, ahol a BSA pozitív felületi töltéssel rendelkezik (pH = 3), a molekulatömeg ~10 kDa-nal lecsökkent: 54,6 kDa értéket mértem. A kapott tömegek alapján a fehérje monomer formában van jelen, ahogy pH = 11-en is ( $M_w = 68,6$  kDa). 150 mM NaCl jelenlétében nagyobb  $M_w$  értékeket kaptam. A fehérje-fehérje kölcsönhatások sokkal erősebbek fiziológias közegben, ennek eredményeképpen több BSA molekula lesz dimer formában. pH = 3-on egy extrém nagy  $M_w$  értéket mértem, közel duplája lett a só jelenléte nélküli  $M_w$  értékhez képest, szám szerint 114,0 kDa. Az ok az előzőekkel megegyezik, azaz a makromolekulák közötti belső kölcsönhatások sokkal erősebbek az oldószer-fehérje kölcsönhatások erősségénél, így a BSA nagy valószínűséggel szinte kizárólag dimer formában van jelen. Lúgos tartományban a molekulatömeg értékek (pH = 7:  $M_w = 78$  kDa; pH = 11: 83 kDa) megnövekedett dimer forma jelenlétét igazolják. Az  $M_w$  mérésével további információkat is szerezhethetünk, ha megvizsgáljuk a biopolimer hidratáltságától és stabilitásától függő második viriál együttható ( $A_2$ ) értékeit is (**5.2.1. táblázat**). MilliQ-vízben növekvő pH-val (pH = 3, 7 és 11) a következő  $A_2$  értékeket kaptam: 2,68, 1,43 és  $2,19 \cdot 10^{-3}$  mlmol/g<sup>2</sup>. Ezekben az esetekben a fehérje jól szolvatált állapotban van, azaz az oldószer-fehérje kölcsönhatások kedvezőbbek a biopolimer molekulák közötti kölcsönhatásoknál. Fiziológias közegben (150 mM NaCl) a mért  $A_2$  értékei egy nagyságrenddel kisebbek. Lúgos tartományban ezek az értékek negatívvá váltak, azaz kompakt elektromos kettősréteg jött létre, amely a BSA aggregációjához vezetett.

Az  $M_w$  értékekből további kvantitatív információkat nyerhetünk ki, ha figyelembe vesszük a BSA alakját és a kiterjedését, azaz a dimenzióját. A molekuláris térfogatot ( $V_m$ ) megkaphatjuk a fehérje sűrűségének ( $\rho = 1,35$  g/cm<sup>3</sup>), és a molekulatömegének (adott pH-n mért értékeket felhasználva) ismeretében, az Avogadro-szám ( $N_A$ ) felhasználásával [170].

$$V_m = \frac{M}{\rho N_A} \quad (37)$$

Ha ismerjük a  $V_m$  értékeket, akkor az ekvivalens sugár ( $R_{ekv}$ ) a következő egyenlet alapján számolható.

$$R_{ekv} = \sqrt[3]{\frac{3V_m}{4\pi}} \quad (38)$$

Az **5.2.1. táblázatban** foglaltam össze a kapott eredményeket. Az  $R_{ekv}$ -ből számolt  $D_{ekv}$  értékeket tüntettem fel, amelyek igen jó egyezést mutattak, a fényszórásmérésből kapott átmérőkkel.

**5.2.1. táblázat** A BSA fizikai-kémiai jellemzői a fényszórás mérések alapján, valamint a számított ekvivalens sugár értékei a BSA-ra pH = 3, 7 és 11 esetén só jelenléte nélkül és 150 mM NaCl jelenlétében

A BSA fizikai-kémiai jellemzői	pH=3	pH=3 + 150 mM NaCl	pH=7	pH=7 + 150 mM NaCl	pH=11	pH=11 + 150 mM NaCl
$M$ (kDa)	54,6	114	65,3	78	68,6	83,1
$A_2$ (mlmol/g <sup>2</sup> )	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$-3,2 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$-6,8 \cdot 10^{-5}$
$\zeta$ (mV)	0,5	2,1	-69	-2,4	-22	-1,8
$V_m$ (nm <sup>3</sup> )	67,4	140,8	80,6	96,3	84,7	102,6
$D_{ekv}$ (nm)	5,0	6,5	5,4	5,7	5,4	5,8
$d_{(DLS)}$ (nm)	5,3	6,8	2,2	5,3	4,6	5,7

A 37. számú egyenlet alapján a számolt térfogatokat tekintve (só jelenléte nélkül), a  $V_m$  értékei a pH-val folyamatosan nőttek, míg 150 mM NaCl jelenlétében pH = 3-on egy kiugróan magas értéket kaptam. A negatív töltésű BSA közel azonos  $V_m$  értékkel rendelkezik 7-es és 11-es pH-n 150 mM NaCl jelenlétében. Az irodalmi adatok alapján a BSA térfogata N-állapotban 82,4 nm<sup>3</sup> [169], amelyet az irodalomban szférikus geometriához (szív-alak) rendelnek. Az általunk számolt térfogatok só nélkül 67,4, 80,6 és 84,7 nm<sup>3</sup> 3-as, 7-es és 11-es pH-jú BSA molekulára nézve. Ezen értékeink alapján a fehérje só nélkül, jó közelítéssel visszaadja az irodalmi adatot, azaz ezeken a pH-kon a BSA jó közelítéssel gömb szerkezetűnek tekinthető, kivétel pH = 3-on, ahol a  $V_m$  értéke elnyúltabb szerkezetet sejtet. Só jelenlétében a  $V_m$  értékek azonban jelentősen nagyobbak lettek: 140,8 (pH = 3), 96,3 (pH = 7) és 102,6 nm<sup>3</sup> (pH = 11). Ez arra utal, hogy a fehérje dimenziója, így alakja is megváltozott só jelenlétében.

Az irodalomban a fehérje geometriájához különböző dimenziókat társítanak, amely alapján a térfogat ( $V$ ) számolható. Az irodalomban a fehérjék prolát geometriájához 14,1 x 3,8 x 3,8 nm-es kiterjedést társítanak, melynek térfogata a következő egyenlet alapján számolható:

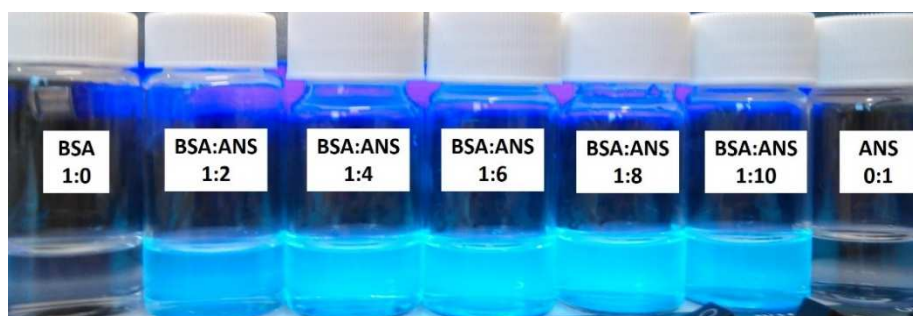
$$V = \frac{4\pi a_s^2 b_s}{3}, \quad (39)$$

ahol  $a^s$  (3,8 nm) és  $b^s$  (14,1 nm) a BSA alakját leíró geometriához tartozó féltengelyek. A képlet alapján a fehérje térfogata (prolát) 106 nm<sup>3</sup>, míg az oblát ellipszoid alak esetében a 8,8 x 3,4 x 3,4 nm-es dimenzióval számolva, a BSA térfogata 138 nm<sup>3</sup> [171]. Ezek alapján, 150

mM NaCl jelenlétében 3-as pH-n a BSA geometriája oblát geometriával, míg 7-es és 11-es pH-n a BSA prolát ellipszoid alakkal jellemezhető.

### 5.3. A BSA-ligandum kölcsönhatások vizsgálata

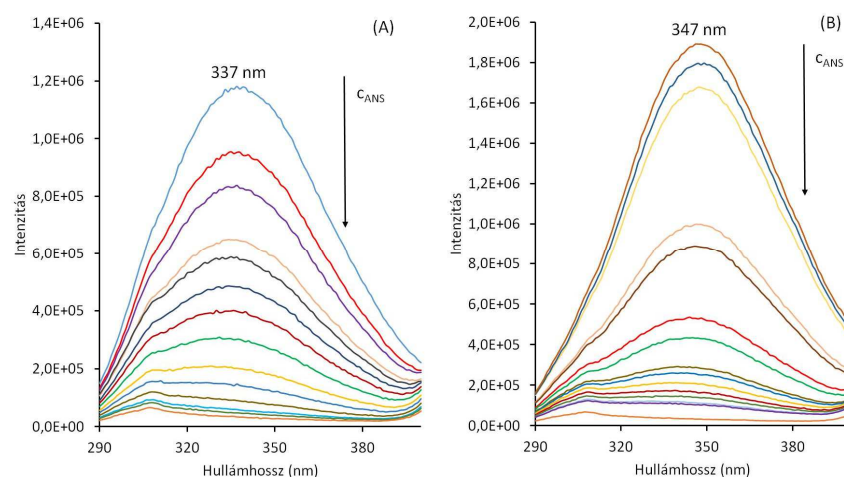
A fluoreszcencia spektroszkópia az egyik legszélesebb körben elterjedt módszer a fehérje-ligandum kölcsönhatás tanulmányozására. A kioltási kísérletekből információkat nyerhetünk a kioltási folyamat típusáról, a kötési állandókról, a kötőhelyek számáról, valamint termodinamikai paramétereket is meghatározhatunk. A kioltási folyamatok kiértékelése, a bevezetőben bemutatott egyenletek alapján, akkor lehetséges, ha az emisszió maximum helye nem változik a folyamat során. Ezért kísérleteimben, sem az eddig bemutatott IBU, sem a későbbiekben alkalmazott KYNA molekula nem használható erre a célra. Ezért olyan molekulákat választottunk, amelyek csak az intenzitásban okoznak változást. Az egyik ilyen molekula a ketoprofen (KP), amely az IBU-hoz hasonlóan egy nemszteroid-gyulladáscsökkentő és kis vízdoldékonyságú molekula [172,173]. A másik molekula, az irodalomban már igen régóta alkalmazott molekula, fehérjék vizsgálatakor hidrofób próbaként, amely a fehérjén található/hozzáférhető hidrofób kötőhelyek számát/arányát adja meg. Ez a molekula az 1-anilino-8-naftalén szulfonsav (ANS), amely a nem-poláris anilinaftalén-csoportjával kötődik a BSA nem-poláros, azaz hidrofób felszínéhez [174]. A BSA és az ANS kölcsönhatásából keletkező komplex UV-fény hatására világoskék színben fluoreszkál, amely az **5.3.1. ábrán** látható.



**5.3.1. ábra** A BSA, az ANS és a különböző molarányú keverékeknek képe (pH = 3) UV-lámpa alatt

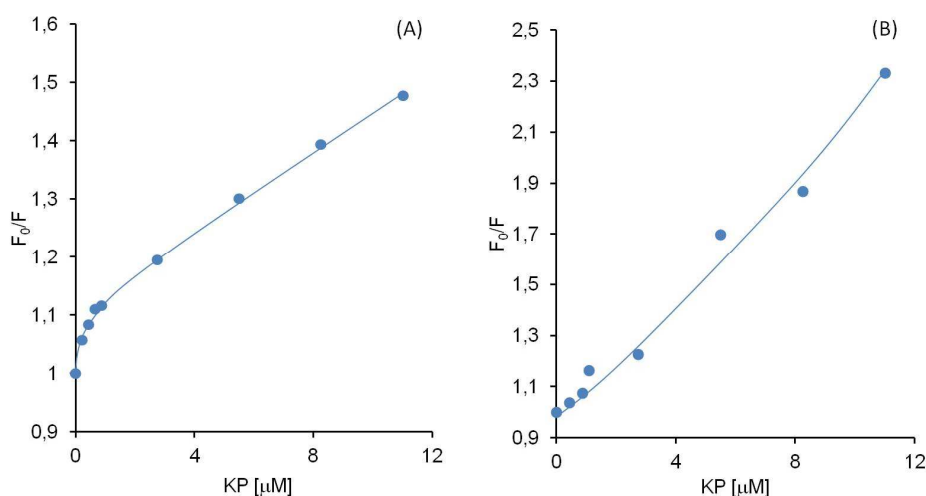
Vizsgáltam, a BSA/KP és a BSA/ANS kölcsönhatást, majd legvégül tanulmányoztam, hogy mi történik, ha a BSA és a KP, 1:1 molarányú keverékéhez adom a hidrofób

tulajdonságú ANS-molekulát. A kísérleteket pozitív és negatív töltésű BSA-val is elvégeztem, azaz az egyik esetben pH = 3-on, míg a másik esetben fiziológias pH-n, azaz 7,4-en. A BSA/KP komplex emissziós spektrumában bekövetkező változásokat a növekvő koncentrációjú ANS molekula hatására 3-as és 7,4-es pH-n az **5.3.2. ábra** mutatja.



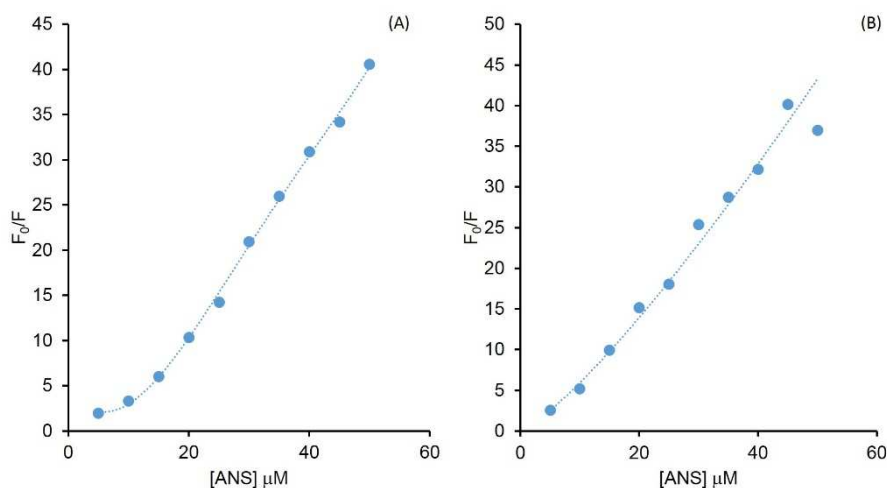
**5.3.2. ábra** A BSA/KP komplex emissziós intenzitásának csökkenése a növekvő koncentrációban hozzáadott ANS hatására pH = 3-on (A) és pH = 7-en (B)

A különböző rendszerekre a Stern-Volmer egyenletet alkalmazva, egyik pH-n sem kaptam egyenest, tehát nem csak az egyik kioltási folyamat dominál, azaz a dinamikus és a statikus kioltás mechanizmusa is szerepet játszik a kioltás folyamatában. A Stern-Volmer egyenletet kielemezve láthatjuk, hogy savas és lúgos pH-n is más típusú görbéket kaptunk a KP-nel való kvencselés hatására (**5.3.3. ábra**).



**5.3.3. ábra** A Stern-Volmer egyenlet a BSA kioltására KP-nel pH = 3-on (A) és pH = 7-en (B)





**5.3.4. ábra** A Stern-Volmer egyenlet a BSA kioltására ANS-tal pH = 3-on (A) és pH = 7-en (B)

Az eredményekből két típusú görbét mutatok be, amelyet a KP-nel való kioltási kísérletekből nyertem: az első esetben (pH = 3) egy telítésbe hajló görbét kaptam (5.3.3.(A) ábra), amely arra utal, hogy a rendszerben két típusú fluorofór van jelen a kioltó szempontjából: egy hozzáférhető, illetve egy hozzáférhetetlen. Fiziológias pH-n (5.3.3.(B) ábra) a dinamikus és a statikus kioltás együttes jelenlétére jellemző görbét regisztráltam.

**5.3.1. táblázat** A fluoreszcencia mérésekből a Scatchard egyenlet alapján nyert paraméterek a BSA+KP, a BSA+ANS és a BSA/KP+ANS rendszerre pH = 3-on és pH = 7,4-en

A vizsgált rendszerek		Scatchard egyenlet			
		R <sup>2</sup>	n	K <sub>b</sub> [M <sup>-1</sup> ]	ΔG (kJ/mol)
BSA+KP	pH=3	0,995	0,52	1,28 · 10 <sup>5</sup>	-29,13
	pH=7,4	0,993	1,12	8,70 · 10 <sup>4</sup>	-28,18
BSA+ANS	pH=3	0,993	1,77	4,29 · 10 <sup>4</sup>	-26,42
	pH=7,4	0,994	1,47	1,55 · 10 <sup>5</sup>	-29,60
BSA/KP+ANS	pH=3	0,993	1,98	3,99 · 10 <sup>5</sup>	-31,95
	pH=7,4	0,996	1,24	5,68 · 10 <sup>4</sup>	-27,12

A hidrofób próbaként alkalmazott ANS hatására az  $F_0/F-Q$  görbe sem lineáris, mindkét típusú kioltási folyamat jellemzi a Trp kioltását (5.3.4.(A) és (B) ábra). A BSA/KP 1:1 molarányú keverékénél ugyanezt tapasztaltam, azaz egyik esetben sem lehetséges kötési állandót meghatározni a Stern-Volmer egyenlet alkalmazásával. A Stern-Volmer egyenlet tehát, ezekben az esetekben nem szolgáltatott kvantitatív információkat, így egyéb (módosított

Stern-Volmer, Scatchard, Lineweaver-Burk) módszereket is alkalmaztam a kioltási folyamatok kiértékelésére. Az ezekből kapott eredményeket a következőkben együtt tárgyalom.

Elsőként a Scatchard egyenletet mutatom be (**F2. ábra**), amely alkalmazásával a kötési állandókon túl, a kötőhelyek száma is meghatározható. Viszont az ebből kapott kötőhelyek száma nem egyenlő az összes kötőhely számával, hanem a kioltó számára egyenrangú, azaz egyformán hozzáférhető kötőhelyek számát adja meg. A log-log ábrázolás igen jó illeszkedést mutat az összes rendszerre mindkét pH-n, az  $R^2$  0.99 feletti értékei jól mutatják az egyenlet alkalmazhatóságát (**5.3.1. táblázat**). Ha megvizsgáljuk a kötőhelyek számát, látható, hogy pH = 3-on a KP számára érhető el a legkevesebb kötőhely (amint a Stern-Volmer összefüggés is mutatta csak az egyik fluorofór hozzáférhető a kioltó számára), míg a legtöbb az ANS számára a BSA/KP komplexen pH = 7,4-en. Mivel pH = 3-on a BSA pozitív töltéssel rendelkezik, a fehérje láncok kitekередtek, a hidrofób részek kerültek a felszínre, amely a hidrofób molekulák megkötődésének kedvez. A meghatározott kötőhelyek száma 0,5 és 2 közötti értékeket vett fel. Az egy körüli értékek esetében egyféle hozzáférhető kötőhely áll rendelkezésre a kioltó számára, míg ha ez az érték kettőhöz tart, akkor már kétféle kötőhellyel számolhatunk. A kötési állandók alapján megállapítható, hogy igen nagy kötési affinitást mutatnak a hatóanyagok a fehérjéhez, azaz pH = 3-on a KP ( $K_b = 1,28 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), valamint a BSA/KP komplex esetében az ANS ( $K_b = 3,99 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), valamint pH = 7,4-en szintén az ANS mutat nagyobb affinitást ( $K_b = 1,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) a fehérjéhez. A legnagyobb energiát a BSA/KP-hoz adott ANS esetén tapasztaltam pH = 3-on, míg a legkisebb affinitást a BSA és az ANS rendszerre mértem szintén savas pH-n ( $K_b = 4,29 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). Mint tudjuk, az élő szervezetben a terápiás hatékonyságot csak a szabad, azaz a nem-kötött gyógyszermolekula képes kifejteni, ezért fontos a  $K_b$  állandók ismerete. Kis kötési állandók esetében nagy szabad koncentrációban van jelen a hatóanyag, míg nagy affinitású kötődések esetében kis mennyiségben van jelen szabad gyógyszermolekula a rendszerben. Másképpen minél kisebb a kötési állandó, annál jobb terápiás hatékonyság érhető el a hatóanyag-szállító rendszer segítségével. A  $\Delta G$  értékek minden esetben -27 és -32 kJ/mol között voltak, azaz a BSA-ligandum kölcsönhatások önként végbemenő folyamattal jellemezhetők.

A következő módszer, a módosított Stern-Volmer egyenlet (**F3. ábra**), amely kiküszöböli a Stern-Volmer hibáját, azaz hogy nem minden kioltási folyamatra kapunk egyenest. A módszer alkalmazásával ( $R^2 \geq 0,98$ ) az elérhető fluorofórok arányáról ( $f_a$ ) szerezhetünk információt (**5.3.2. táblázat**). A kapott értékek igen jó egyezést mutatnak az előző módszerrel meghatározott kötőhelyek számával. pH = 3-on a 0,24 azt mutatja, hogy a

KP számára az elérhető fluorofórok csupán egynegyede elérhető, viszont ez párosul a legnagyobb kötési energiával, így a legnagyobb affinitást ebben az esetben kaptunk savas pH-n ( $K_a = 1,24 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Az egy vagy az egynél nagyobb  $f_a$  értékek azt mutatják, hogy a kioltó számára az összes fluorófor elérhető. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a KP számára a 7,4-es pH, míg az ANS számára a savas tartomány biztosítja a nagyobb arányú kötődést. A BSA/KP komplex esetén a hatóanyag már elfoglalt bizonyos kötőhelyeket, így az ANS számára kevesebb elérhető kötőhely maradt. 7,4-es pH-n a KP mutatja a legkisebb affinitást a fehérjéhez, a kötési állandó csupán  $5,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

**5.3.2. táblázat** A módosított Stern-Volmer egyenlet alapján kapott paraméterek a BSA+KP, a BSA+ANS és a BSA/KP+ANS rendszerre pH = 3-on és pH = 7,4-en

A vizsgált rendszer		módosított Stern-Volmer egyenlet			
		$R^2$	$f_a$	$K_a [\text{M}^{-1}]$	$\Delta G \text{ (kJ/mol)}$
BSA+KP	pH=3	0,984	0,24	$1,24 \cdot 10^6$	-34,76
	pH=7,4	0,999	1,54	$5,36 \cdot 10^4$	-26,98
BSA+ANS	pH=3	0,990	1,14	$1,57 \cdot 10^5$	-29,64
	pH=7,4	0,980	1,08	$2,79 \cdot 10^5$	-31,07
BSA/KP+ANS	pH=3	0,991	1,10	$3,89 \cdot 10^5$	-31,89
	pH=7,4	0,990	1,24	$1,85 \cdot 10^5$	-30,05

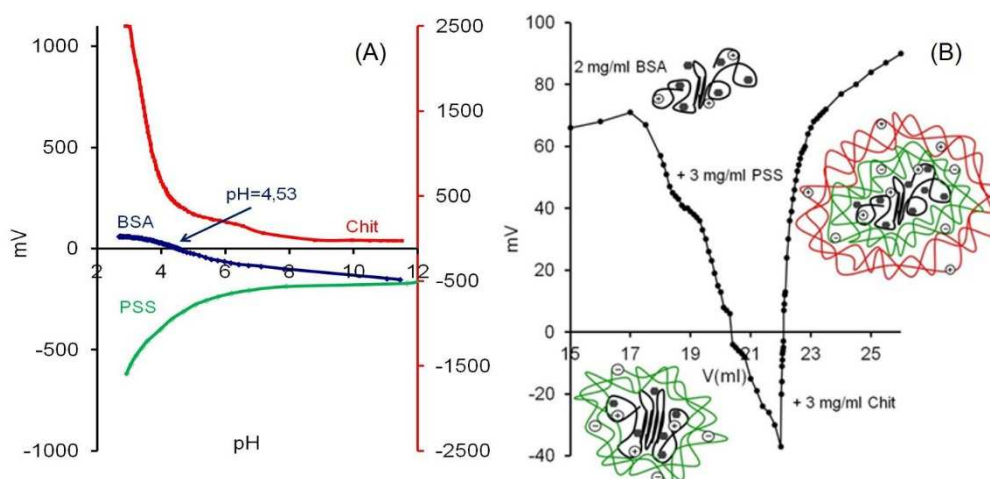
A Lineweaver-Burk egyenlet alkalmazásával (**F4. ábra**) közvetlenül a disszociációs állandó határozható meg, amelyből az asszociációs állandó számolható. A  $\Delta G$  értékek ebben az esetben változtak a legnagyobb mértékben, -12 és -36 kJ/mol közötti értékeket kaptam (**5.3.3. táblázat**). A kötési állandók összehasonlításával látható, hogy míg az ANS igen kis affinitással kötődik a fehérjéhez ( $\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$ ), addig a BSA/KP komplex esetében az ANS-tal való kölcsönhatása során, 3-4 nagyságrenddel nagyobb  $K_a$  értékek adódtak ( $\sim 10^5$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ), tehát a kioltó molekulák között erős kölcsönhatások alakultak ki. Ha a fehérje többféle gyógyszermolekulát is tartalmaz, akkor a nagyobb kötési állandóknak köszönhetően a rendszer kisebb terápiás hatékonysággal jellemezhető. Ezzel ellentétben az ANS kötődése a BSA-hoz mindkét pH-n nagyon kis affinitásokat mutat, a KP-hez hasonlóan, de ez utóbbi esetben egy-két nagyságrenddel nagyobb kötési állandókat mértem.

**5.3.3. táblázat** A Lineweaver-Burk egyenlet alapján kapott paraméterek a BSA+KP, a BSA+ANS és a BSA/KP+ANS rendszerre 3-as és 7,4-es pH-n

A vizsgált rendszer		Lineweaver-Burk egyenlet			
		R <sup>2</sup>	K <sub>D</sub> [M <sup>-1</sup> ]	K <sub>a</sub> [M <sup>-1</sup> ]	ΔG (kJ/mol)
BSA+KP	pH=3	0,984	1,60 · 10 <sup>-4</sup>	6,25 · 10 <sup>3</sup>	-21,65
	pH=7,4	0,999	6,00 · 10 <sup>-5</sup>	1,67 · 10 <sup>4</sup>	-24,08
BSA+ANS	pH=3	0,991	6,00 · 10 <sup>-3</sup>	1,67 · 10 <sup>2</sup>	-12,68
	pH=7,4	0,980	1,80 · 10 <sup>-3</sup>	5,56 · 10 <sup>2</sup>	-15,66
BSA/KP+ANS	pH=3	0,991	2,80 · 10 <sup>-6</sup>	3,57 · 10 <sup>5</sup>	-31,68
	pH=7,4	0,990	5,00 · 10 <sup>-7</sup>	2,00 · 10 <sup>6</sup>	-35,95

**5.4. BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozit szerkezet és a hatóanyag leadás kinetikája**

A BSA fizikai-kémiai jellemzése után, az eredményeket felhasználva, a hidrofób molekulák kötési affinitásának pH-függése alapján, az IBU molekula „becsomagolását”, és így a mag-héj kompozit előállítását is savas közegben, azaz pH = 3-on végeztem el. Elsőként a kiválasztott biokompatibilis anyagok áramlási potenciálját határoztam meg a pH-függvényében Műtek készülék segítségével.



**5.4.1. ábra** A kiindulási anyagok (BSA, PSS, Chit) áramlási potenciál változása a pH-függvényében (A), valamint az áramlási potenciál változása a mag-héj kompozit kialakulása folyamán (B)

Az **5.4.1.(A) ábráról** leolvasható, hogy a BSA töltés semleges állapota 4,53-nál van. A vizsgált pH tartományban, azaz pH = 2 és 12 között sem a PSS, sem a Chit nem rendelkezik

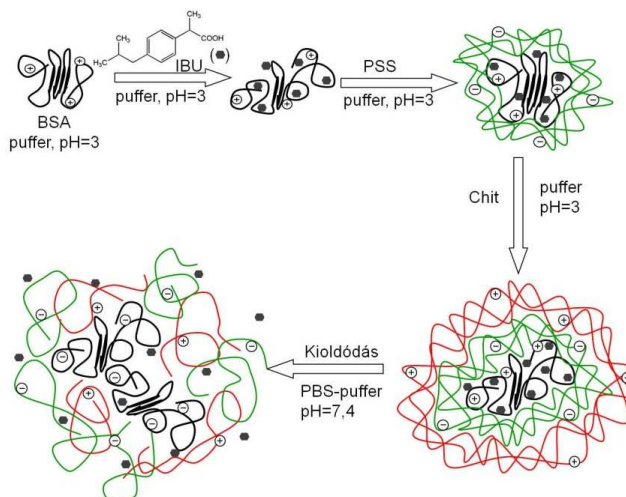
inflexiós ponttal, azaz a PSS az egész pH tartományban negatív, míg a Chit pozitív töltéssel rendelkezik. A következő lépésben, miután meghatároztam, hogy milyen sorrendben építsem fel elektrosztatikusan a mag-héj kompozitot, elvégeztem a következő kísérletet: először 20 mg/ml-es BSA-t titráltunk 3 mg/ml-es PSS-sel, majd az így kialakult BSA/PSS kompozithoz adagoltam 3 mg/ml-es Chit-t (**5.4.1.(B) ábra**). A töltéstitrálások alapján, a BSA töltését 1,48 mmol/g PSS, míg 1 g BSA/PSS rendszer töltését 0,041 mmol/g pozitív töltésű kitozán kompenzálja. Az így kapott eredmények alapján, a felület áttöltéséhez a mért értékek 10-szeresét alkalmaztam a kompozitok előállítása során.

A fehérje koncentrációjának kiválasztásában fontos szerepet játszott, hogy olyan töménységű rendszert válasszunk, amely viszonylag nagyobb mennyiségű hatóanyagot képes felvenni, emellett fontos szempont volt a hidrodinamikai átmérő ( $d_{DLS}$ ) értéke, amely mint tudjuk a fehérjék esetében pH- és koncentrációfüggő. Ezért készítettem 3-as és 7,4-es pH-n is egy-egy oldatsorozatot 39 - 60 mg/ml koncentráció tartományban, a méret tanulmányozására.

**5.4.1. táblázat** A BSA átmérője, valamint a PDI indexek értékei a koncentráció, valamint a pH-függvényében

$c_{BSA}$ (mg/ml)	pH=3		pH=7,4	
	$d_{DLS}$ (nm) $\pm$ 2,5%	PDI $\pm$ 5%	$d_{DLS}$ (nm) $\pm$ 2,5%	PDI $\pm$ 5%
39	7,2	0,235	5,2	0,296
42	5,7	0,384	4,6	0,297
46	6,2	0,658	4,8	0,291
50	7,8	0,318	3,8	0,347
52	7,6	0,332	3,8	0,314
55	7,2	0,624	4,3	0,344
60	8,2	0,221	3,8	0,361

A DLS mérés eredményeit az **5.4.1. táblázat** tartalmazza. A méreteket összehasonlítva látható, hogy fiziológias közegben kisebb méretű a BSA molekula. Ez nem is meglepő, ugyanis egy feltekeredett fehérje (natív állapotban) térkitöltése kisebb, egy kigombolyodott fehérjéhez képest. Mivel a méretekből nagy különbségeket nem észleltem, így a PDI index értékeire hagytam. Minél monodiszperzebb rendszer létrehozására törekedtem, így a legkisebb töménységű, a 39 mg/ml-es koncentrációjú oldatot ( $d_{DLS} = 7,2 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$ ),  $PDI = 0,235$ ) választottam a további kísérletek elvégzéséhez.



**5.4.2. ábra** A BSA-alapú mag-héj kompozit előállításának, valamint a kioldódás folyamatának a sematikus ábrája

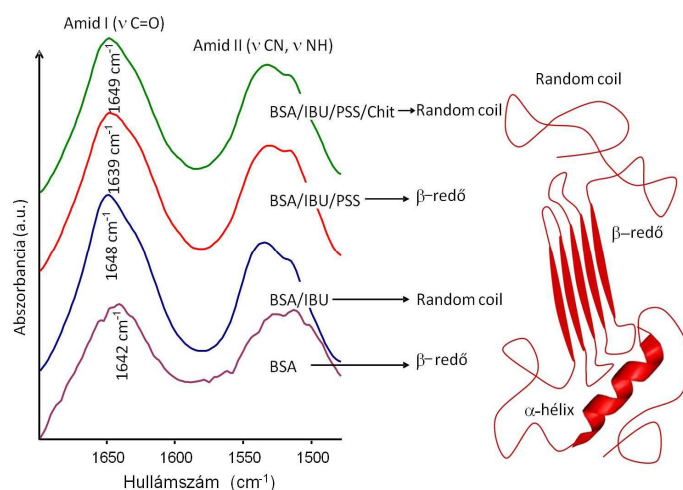
Az áramlási potenciálmérés és a DLS eredmények alapján a BSA-alapú mag-héj kompozitok előállítása az **5.4.2. ábrán** látható folyamat szerint ment végbe. A pozitív töltésű BSA-magba először az IBU-t „csomagoltam be”- a fehérje kicsapásával-, majd kialakítottam az első és a második polielektrolit héjat elektrosztatikus kölcsönhatások révén. Az utolsó lépésben feltüntettem a kioldódás folyamatát is, amely során a kompozit szétesik az pH eltolásának (pH = 3-ról pH = 7,4-re) következményeképpen, azaz egy pH-érzékeny rendszert állítottam elő, vízben rosszul oldódó hatóanyag molekulák kapszulázására.

**5.4.2. táblázat** A BSA-alapú mag-héj kompozitok IBU-tartalma, valamint a kapszulázási hatékonyság értékei

A vizsgált rendszerek	bemért IBU mennyisége (mg)	IBU mennyisége a kompozitban (mg)	Kapszulázási hatékonyság %
BSA/IBU	20,60	19,29	93,65
BSA/IBU/PSS	19,29	15,86	76,97
BSA/IBU/PSS/Chit	15,86	14,29	69,35

A kompozit előállításának egyes lépéseiben rögzítettem a felülűzők abszorbancia spektrumait a megkötött IBU mennyiségének a meghatározására. Az **5.4.2. táblázat** tartalmazza az előállítás folyamán bemért teljes IBU mennyiségét, a kompozit végső IBU tartalmát és a kapszulázási hatékonyságot (36. számú egyenlet alapján). A kapszulázási hatékonyság mutatja, hogy a bemért mennyiség majdnem 94%-a maradt a BSA-hoz kötve. Ez

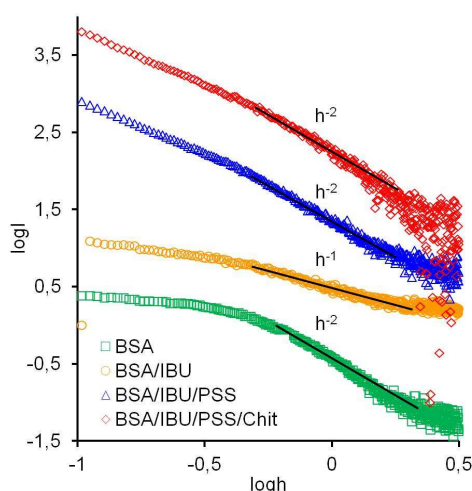
igen nagy számnak tekinthető, hiszen az irodalomban 1:3 sztöchiometriai kötődésről olvashatunk, míg a szintézis során 1:10 molarányban adtam a hatóanyagot a hordozóhoz. Ez azt jelenti, hogy pH = 3-on több, kisebb/nagyobb affinitású hely válik elérhetővé az IBU számára, mint pH = 7,4-en, amelyet az irodalomban rendszerint vizsgálnak. Továbbá az IBU kis vízdékonysága ellenére (0,021 mg/ml [171]) a többszörösét alkalmaztam az előállítás folyamán (~60-szorosát), amely megnövekedett oldhatóságra utal. Ezt az IBU „kapszulázási” hatékonysága is mutatja, ugyanis minél több hatóanyag kötődik a fehérjéhez, annál több tud feloldódni, így megnövelhető a bevitt hatóanyag mennyisége. Az első héj kialakításakor jelentős IBU mennyiség oldódott ki, 77%-a maradt a kompozitban az első lépésben hozzáadott mennyiséghez képest. A Chit réteg kialakításakor további IBU molekulák oldódtak ki a kompozitból, bár a csökkenés mértéke kisebb, köszönhetően az első héj lassító hatásának, amely már az előállítás folyamán is kitűnik. Ezeket az eredményeket az *in vitro* kioldódási kísérletek kiértékelése során használtam fel.



**5.4.3. ábra** A BSA, valamint a BSA-alapú kompozitok infravörös spektrumai 1700-1480 cm<sup>-1</sup> hullámszám tartományban

A mag-héj kompozitok kialakulását ebben az esetben is FT-IR spektroszkópiával ellenőriztem. A fehérjékre jellemző karakterisztikus sávok közül, a másodlagos szerkezeti változásokra érzékeny, amid I sáv helyét vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a BSA pH=3-as oldatban, majd liofilizálva is megőrzi kitekeredett struktúráját, ugyanis a sáv maximum helye 1642 cm<sup>-1</sup>-nél található, amely egyértelműen a β-redős szerkezeti elemre jellemző abszorpciós maximum. Az IBU kötődése ennek a rendezett szerkezeti elemnek a részleges csökkenést okozta, rendezetlen (random) szerkezet lett a meghatározó. Az IBU kötődésekor, a kevésbé

érzékeny, amid II sáv helye is változott, ami arra utal, hogy a hatóanyag a C=O, C-N és az N-H funkciós csoportokhoz is kötődött; azaz hidrogén-kötések alakulhattak ki az IBU karboxilcsoportjai és a fehérje amino,- illetve karboxilcsoportjai között. Az első polielektrolit héj megkötődésekor a fehérje újra rendezettebb szerkezetet vett fel, azaz a PSS „beburkolta” a fehérjét, amely így egy részleges felgombolyodást eredményezett. A Chit hozzáadására újra egy rendezetlenebb szerkezet lett a meghatározó. Az amid I sáv változását és a hozzátartozó másodlagos szerkezeti elemeket az **5.4.3. ábra** mutatja.



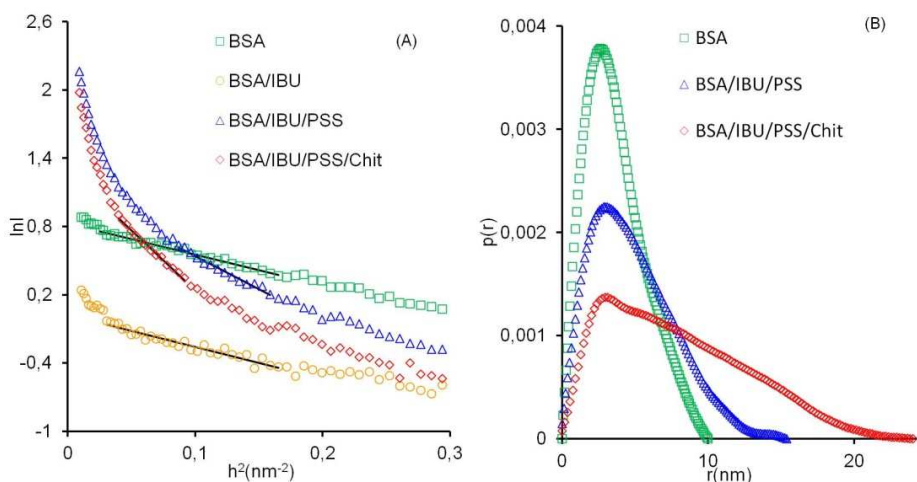
**5.4.4. ábra** A BSA és a BSA-alapú mag-héj kompozitok szórásgörbéi a fraktál meredekség értékekkel

A szerkezeti tulajdonságok meghatározására kisszögű röntgenszórást alkalmaztunk. Amint azt az SiO<sub>2</sub>-alapú mag-héj kompozitoknál is tettük, ebben az esetben is meghatároztuk a fraktáldimenziókat. A szórásgörbék log-log ábrázolását és a fraktál meredekség értékeket az **5.4.4. ábra** mutatja. A BSA fraktál meredekség értéke 2, amelyre a szilikához hasonlóan, a tömegfraktál a jellemző. Viszont, a szilikával ellentétben a mag-héj kompozit kialakítása során, itt nem nőtt folyamatosan a fraktál meredekség, hanem egy állandó értéket tartott, azaz  $a = 2$  értéket mértünk az egy,- és a kétrétegű kompozitokra is. Egyedül a BSA/IBU esetében észleltünk némi eltérést, a fraktál dimenzió értékére ( $a = 1$ ), amely egy lánc-szerű struktúrát jelöl, azaz a fehérje egy jelentős frakciójában bekövetkező szerkezeti változásoknak köszönhetően, a random szerkezet lett a meghatározó, ami jó összhangban van az infravörös eredményekkel.

A Guinier egyenletet alkalmazva a rendszer aggregált/nem aggregált állapotát vizsgálhatjuk (**5.4.5.(A) ábra**). Az eredmények alapján a BSA és a BSA/IBU rendszerre



egyedi szórócentrumokat állapítottunk meg, míg az egy-és kétrétegű mag-héj kompozitok esetében aggregátumok jelenléte igazolt. Ezt az eredményt a  $h \cdot R_g$  szorzata mutatja, tehát ha ez az érték kisebb, mint 1,3, akkor egyedi részecskék vannak jelen a rendszerben, míg ha nagyobb, mint 1,3, akkor a rendszer aggregált.



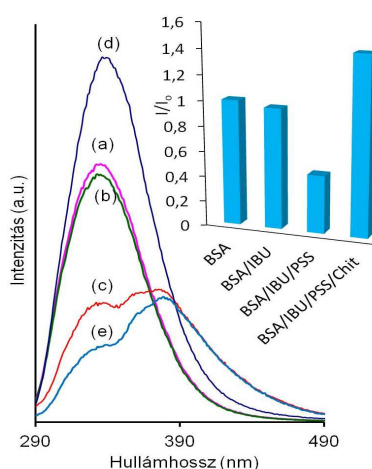
**5.4.5. ábra** A Guinier (A),- és a párkorrelációs függvény (B) a BSA-ra és a fehérje-alapú kompozitokra

ATSAS Gnom szoftverrel értékeltük ki a részecske távolság eloszlási függvényt, azaz a  $p(r)$  függvényt (**5.4.5.(B) ábra**). A  $r$  maximuma nem változott a kompozit felépülése során, viszont egyre nyújtottabb és laposabb görbéket kaptunk a héjak számának a növelésével. A BSA  $p(r)$ - $r$  függvényének alakja a fehérje szférikus geometriájára utal. Ez a geometria folyamatosan változott, egyre inkább ellipszoid alakúvá vált. A szerkezettel összefüggésbe hozva, ez azt jelenti, hogy a fehérje részlegesen megtartotta eredeti szerkezetét, míg egy jelentős frakciója átalakult; azaz a fehérje láncok kitekeredtek. A görbékől az is leolvasható, hogy a méretek folyamatosan nőttek a kétrétegű mag-héj kompozitok kialakulásával. A SAXS a belső szerkezetről ad információt, a szórásvektor reciprokanak megfelelő mérettartományt vizsgálva, így ez nem lehet azonos a fényszórásmérés alapján kapott hidrodinamikai átmérőkkel. A SAXS mérésekkel meghatározott átmérők így csak, a fehérje (BSA) méretére vonatkoznak, amely értékek azt mutatják, hogy a hatóanyag beépül a fehérje mag belső struktúrájába, valamint a héjak „beburkolják” a BSA/IBU kompozitot.

**5.4.3. táblázat** A BSA és az IBU-tartalmú kompozitok jellemzői a TEM, a DLS és a SAXS mérések alapján

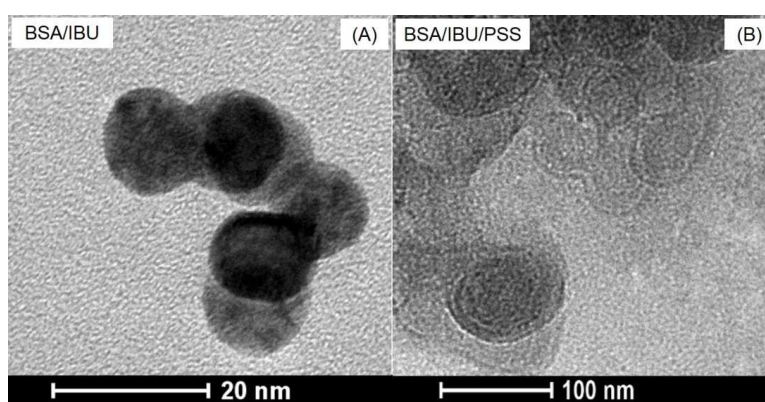
Fizikai-kémiai jellemzők	BSA	BSA/IBU	BSA/IBU/PSS	BSA/IBU/PSS/Chit
$d_{(TEM)}$ [nm]	7,5	13,1	138	223
$d_{DLS}$ [nm]	7,2	8,2	134	231
$\zeta_{(DLS)}$ [mV]	2,5	5,1	-10,3	6,1
$R_g$ (SAXS) [nm]	2,9	3,0	4,3	5,6
$a_{(SAXS)}$ -	2,0	1,0	2,0	2,0

Fluoreszcencia spektroszkópiát alkalmaztam a fehérje szerkezetében bekövetkező változások követésére a Trp emissziójának mérésével (**5.4.6. ábra**). A BSA emissziós intenzitása kis csökkenést mutatott a hatóanyag hozzáadására, ami arra utal, hogy az IBU a Trp környezetébe kötődött. A kitekeredett fehérjével több IBU molekula képes kölcsönhatásokat kialakítani, amely hatására szerkezeti változások mentek végbe a BSA szerkezetében, ugyanis a Trp igyekszik magának minél hidrofóbabb környezetet találni. A PSS két erős emissziós csúccsal rendelkezik ennél a gerjesztésnél. Az egyrétegű mag-héj kompozitot vizsgálva, azt tapasztaltam, hogy a PSS sávjai teljesen elfedik a BSA emisszióját, ami bizonyítja feltevésünket, azaz hogy a polielektrolit beburkolja a BSA/IBU kompozitot. Chit hatására az emissziós intenzitás kissé megnőtt, ami azt valószínűsíti, hogy egy újabb szerkezeti átrendeződés ment végbe a második héj kialakítása során. Fontos még hangsúlyozni, hogy sem az IBU, sem a Chit nem rendelkezik emisszióval az alkalmazott gerjesztési hullámhossz hatására, így ezek nem befolyásolják a mérési eredményeket.



**5.4.6. ábra** A BSA-alapú mag-héj kompozitok emissziós spektrumai (a) BSA, (b) BSA/IBU, (c) BSA/IBU/PSS, (d) BSA/IBU/PSS/Chit, (e) PSS

A kompozitok méreteit DLS és TEM mérésekkel határoztam meg. Az eredmények alapján a BSA molekula és a BSA/IBU nanokompozit is egyaránt 10 nm körüli átlagos átmérővel rendelkezik. A PSS hozzáadására igen nagymértékű növekedést tapasztaltam, ~138 nm-re nőtt a kompozit mérete. A második réteg kialakítása további száz nm-es növekedést okozott, így a kompozit mérete már 220 nm körüli lett. A méreteloszlási függvényeket a DLS mérések alapján az **F6. ábra** szemlélteti. A TEM felvételek igazolják a mag-héj struktúra kialakulását (**5.4.7. ábra**), valamint a méretek jó egyezést adtak a DLS módszerrel meghatározott átmérőkkel. Az **5.4.3. táblázat** tartalmazza a méret, a zeta potenciál, a girációs sugár, valamint a fraktál meredekség értékeket a DLS, a TEM és a SAXS mérések alapján.



**5.4.7. ábra** A BSA/IBU és a BSA/IBU/PSS mag-héj kompozit TEM felvételei.

A kompozitok jellemzésekor a méret mellett különösen fontos az elektrokinetikai potenciál ( $\zeta$ ) meghatározása a rendszer stabilitásának jellemzése szempontjából. Az **5.4.3. táblázatban** látható, hogy a kompozit kiépülése folyamán hogyan változik a  $\zeta$  értéke, amelynek töltését mindig a legkülső héj határozza meg. A BSA, az i.e.p.-ja alatt (~4,5) pozitív töltéssel rendelkezik ( $+2,5 \pm 0,5$  mV), míg ha a hatóanyagot hozzáadtam, akkor azt tapasztaltam, hogy az IBU elősegíti a fehérje láncok kitekeredését, disszociációját, így egy kissé megnőtt a  $\zeta$  értéke ( $+5,1 \pm 0,7$  mV). PSS hozzáadásakor a töltéskompenzáció eléréséhez szükséges mennyiség 10-szeresét adtam a BSA/IBU rendszerhez, amely során a  $\zeta = -10,3 \pm 1,5$  mV lett, azaz a PSS áttöltötte a felületet. A Chit esetében is ugyanezt tapasztalhatjuk, pozitív töltésű lett a kompozit ( $+6,1 \pm 1,0$  mV), ami az élő szervezetben való alkalmazásnál rendkívül előnyös, ugyanis a sejtek negatív töltésével elektrosztatikus kölcsönhatások kialakíthatóak.

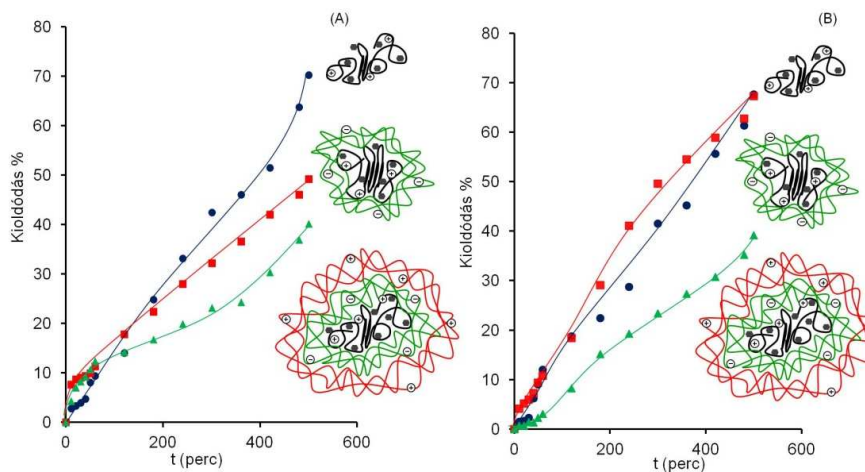
A BSA-alapú kompozitok esetében is végeztem elméleti számításokat a héjvastagság meghatározására. A DLS mérések és a TEM képek alapján is a BSA makromolekula 7 nm

körüli átlagos átmérővel rendelkezik, míg a BSA/IBU/PSS mag-héj kompozit már 134-138 nm-es átlagos átmérőjű. Ennek alapján azzal a feltételezéssel számoltam, hogy nem egy BSA monomer van a magban, hanem több fehérje összekapcsolódik, és ezt veszi körül a polielektrolit. Az **5.1.8. sematikus ábra** alapján és a 33. számú egyenlet átrendezésével, a kompozit előállításánál alkalmazott mennyiségeket felhasználva ( $m_{BSA} = 0,585\text{g}$ ;  $\rho_{BSA} = 1,00671\text{ g/cm}^3$ ;  $m_{PSS} = 0,045\text{g}$ ;  $\rho_{PSS} = 1,01599\text{ g/cm}^3$ ) a héjtávolságok változtatásával határoztunk meg egy reális magméretet.

$$r_{Mag} = \sqrt[3]{\frac{d_{Héj}^3 \rho_{Héj} m_{Mag}}{\rho_{Mag}}} \quad (40)$$

A kapott  $r_{Mag}$  értékek a 10, 20, 30, 40, 50 és 60 nm-es héj vastagsággal számolva rendre, 23,58; 47,17; 70,75; 94,34; 117,93; 141,51 és 165,09 nm a 40. számú egyenlet alapján. A DLS és a TEM mérésekből kapott átmérő értéket felhasználva választottam ki a rendszerünkre a legvalószínűbb összetételt. A ~47 nm-es gombolyagot körülbelül 10 nm-es sugárral rendelkező héj veszi körül, amely ~134 nm-es átmérőjű kompozitot eredményez, amely tökéletesen megegyezik a mért értékekkel.

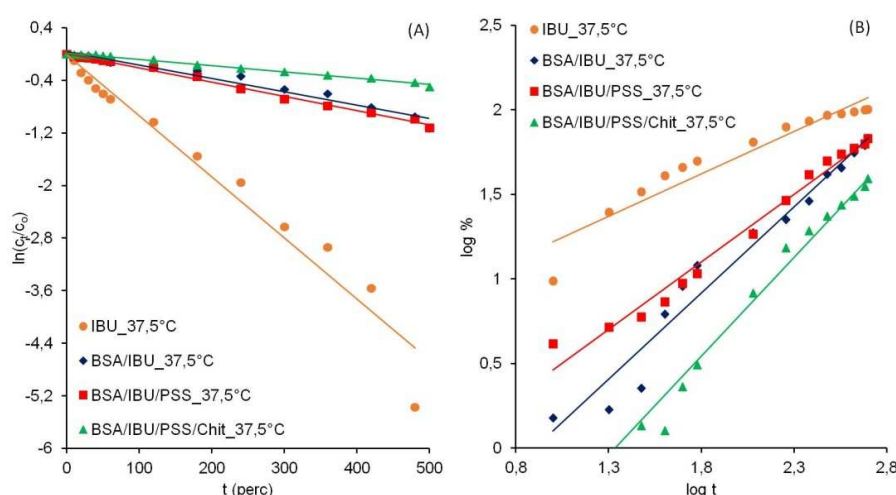
A számított sugár érték alapján, a  $V_{mag-héj} = 1,27 \cdot 10^6\text{ nm}^3$  (27), a  $V_{Mag} = 4,4 \cdot 10^5\text{ nm}^3$  (28), míg a  $V_{Héj} = 8,3 \cdot 10^5\text{ nm}^3$  (29). Így a számított mag-héj kompozit összetételét tekintve 65%-át a héj, azaz a PSS, míg 35%-át a mag, azaz a BSA alkotja.



**5.4.8. ábra** Az IBU kioldódási profiljai a BSA-alapú mag-héj kompozitokból 25°C-on (A) és 37,5°C-on (B)

A BSA az UV-tartományban két elnyelési csúccsal rendelkezik. Az első 220 nm körül van, amely a polipeptid láncok és a láncvégi karboxilcsoportoktól származik. Ennél az

abszorpciónál, az IBU is rendelkezik elnyeléssel, így ez nem használható a hatóanyag koncentrációjának meghatározására. A második csúcs 280 nm-nél a Trp és a Tyr funkciós csoportok elnyeléséből ered. Az IBU mennyiségi meghatározása a BSA mellett, 264 nm-nél lehetséges, ahol a fehérje nem zavarja az IBU elnyelését [175]. Ennek ismeretében készítettem egy koncentráció sorozatot, amely csak az IBU-t tartalmazza, és olyan sorozatot, amelyben az IBU mellett a BSA is jelen van. A kioldódott hatóanyag mennyiségét így a megfelelő kalibrációs egyenes alkalmazásával határoztam meg.



**5.4.9. ábra** Az elsőrendű (A) és a Korsmeyer-Peppas (B) modell ábrázolása 37,5°C-on az IBU kioldódására a BSA-alapú mag-héj kompozitokból

A kompozitok IBU-tartalmát ebben az esetben is UV-vis spektrofotometriás mérésekkel határoztam meg. A kompozit előállításánál 1:10 molarányban adtam az IBU-t a fehérjéhez, amely esetben igen nagy kapszulázási hatékonyságot értem el, 93,7%-ot. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az IBU ezen a pH-n nemcsak a nagy affinitású helyekhez - az irodalomban 1:1 és 1:3 molarányú sztöchiometriai kötődésről írnak - képes kötődni, hanem egyéb, kisebb affinitású helyekhez is. Másrészt az IBU 60-szorosa oldódott fel, az irodalomban írt oldhatósági korláthoz képest. A héjak kialakítása során a hatóanyag-tartalom folyamatosan csökkent, hiszen az előállítás során a kompozit diszpergálása a polielektrolit-oldatban az IBU kioldódását idézte elő. Az egyrétegű mag-héj kompozit esetén, a kapszulázási hatékonyság 77%, míg a kétrétegű kompozit esetében további csökkenést tapasztaltam (69,4%). Ez a kisebb csökkenés, azzal is magyarázható, hogy az egyrétegű kompozitból való kioldódás sebességét a héj gátolja, míg a BSA-ból való kioldódás szabadon, minden akadály nélkül lehetséges.

Az *in vitro* kísérletek pH = 7,4-en valósultak meg, szemben a kompozit kialakításának körülményeivel (pH = 3), amely az elektrosztatikai viszonyok megváltozását vonta maga után, így a koncentráció gradiensen túl, a kompozit szétesése is biztosította a kioldódás folyamatát. Másik előnye a folyamatnak, hogy a szervezetbe juttatva, a kompozit alkotórészeire esve nem halmozódik fel a szervezetben, ugyanis biológiailag lebomló anyagokat alkalmaztunk, amelyet így a szervezet védekező rendszere el tud távolítani, míg az IBU megfelelő koncentrációban való bevitele biztosított a kompozit alkalmazásával.

**5.4.4. táblázat** Az IBU kioldódási profiljaira alkalmazott kinetikai modellek eredményei 25°C-on

25°C		IBU	BSA/IBU	BSA/IBU/PSS	BSA/IBU/PSS/Chit
<b>Nulladrendű [161]</b> (a hatóanyag koncentrációjától független a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,860	0,993	0,987	0,958
	$k_0 (s^{-1})$	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 0,0027$	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 0,0202$	$8,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,0099$	$7,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,0076$
<b>Elsőrendű [163]</b> (a hatóanyag koncentrációjától függ a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,936	0,960	0,992	0,953
	$k_d (s^{-1})$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$	$2,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,0011$	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$	$8,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0001$
<b>Higuchi [148]</b> (diffúzió-kontrollált kioldódás)	$R^2$	0,968	0,933	0,974	0,945
	$k_H (s^{-1/2})$	$2,7 \cdot 10^0 \pm 0,0666$	$3,1 \cdot 10^0 \pm 0,5860$	$2,12 \cdot 10^0 \pm 0,2415$	$1,6 \cdot 10^0 \pm 0,1814$
<b>Hixon-Crowell [160]</b> (a hordozó fajlagos felülete vagy a mérete változik a kioldódás során)	$R^2$	0,786	0,973	0,984	0,957
	$k_{HC} (s^{-1/3})$	$2,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,0004$	$4,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,0001$	$2,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,0015$	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,0016$
<b>módosított Freundlich [155]</b> (ioncsere- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,919	0,979	0,948	0,970
	$k_{mF} (s)$	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 0,0009$	$2,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,0002$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,0021$	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,0000001$
	$\alpha$	0,511	0,894	0,525	0,499
<b>Korsmeyer-Peppas [152]</b> (erózió- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,919	0,979	0,948	0,971
	$k_{KP} (s^{-n})$	$2,9 \cdot 10^0 \pm 0,1934$	$2,4 \cdot 10^{-1} \pm 0,0204$	$1,6 \cdot 10^0 \pm 0,2104$	$1,4 \cdot 10^0 \pm 0,0143$
	$N$	0,511	0,894	0,525	0,501

A kioldódási profilok (5.4.8. ábra) alapján látható, hogy a héjak szabályozó szerepe egy óra után mutatkozik meg igazán. 25°C-on a BSA/IBU kompozitból 70%, az egyrétegű kompozitból 40%, míg a kétrétegű mag-héj kompozitból csupán 32% IBU oldódott ki 500 perc elteltével. 37,5°C-on a hőmérséklet megnövelte a kioldódás sebességét. A kioldódott



hatóanyag mennyisége 67%, mind a héj nélküli, mind az egyrétegű kompozit esetén. A BSA/IBU/PSS/Chit mag-héj kompozit esetében látható, hogy a hőmérséklet nem befolyásolta a kioldódás sebességét, csupán 1%-kal növelte meg a kompozitból kioldódott hatóanyag mennyiségét, tehát a PSS/Chit héj jól kontrollálja az IBU kioldódását. Ha tovább vizsgáljuk a kioldódási profilokat láthatjuk, hogy ez a BSA/IBU rendszerre is elmondható, ugyanis az IBU kioldódása közel 70% mindkét hőmérsékleten. Az egyrétegű mag-héj kompozit esetében már tapasztaltam némi különbséget. Szobahőmérsékleten indul meg gyorsabban a kioldódás, de utána folyamatos lassulás figyelhető meg, így 500 perc elteltével 18%-kal maradt kevesebb IBU a kompozitban 37,5°C-on, mint szobahőmérsékleten.

**5.4.5. táblázat** Az IBU kioldódási profiljaira alkalmazott kinetikai modellek eredményei  
37,5°C-on

37,5°C		IBU	BSA/IBU	BSA/IBU/PSS	BSA/IBU/PSS/Chit
<b>Nulladrendű [161]</b> (a hatóanyag koncentrációjától független a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,827	0,992	0,985	0,995
	$k_0 (s^{-1})$	$1,7 \cdot 10^{-1} \pm 0,0006$	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 0,0124$	$1,4 \cdot 10^{-1} \pm 0,0173$	$7,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,0094$
<b>Elsőrendű [163]</b> (a hatóanyag koncentrációjától függ a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,959	0,971	0,995	0,994
	$k_d (s^{-1})$	$9,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,0015$	$2,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0004$	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,0004$	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$
<b>Higuchi [148]</b> (diffúzió-kontrollált kioldódás)	$R^2$	0,957	0,945	0,967	0,944
	$k_H (s^{-1/2})$	$4,6 \cdot 10^0 \pm 0,0147$	$3,1 \cdot 10^0 \pm 0,2922$	$3,3 \cdot 10^0 \pm 0,4224$	$1,9 \cdot 10^0 \pm 0,2262$
<b>Hixon-Crowell [160]</b> (a hordozó fajlagos felülete vagy a mérete változik a kioldódás során)	$R^2$	0,768	0,946	0,952	0,956
	$k_{HC} (s^{-1/3})$	$3,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,0001$	$4,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,0028$	$3,9 \cdot 10^{-2} \pm 0,0026$	$3,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,0023$
<b>módosított Freundlich [155]</b> (ioncsere- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,914	0,960	0,925	0,976
	$k_{mF} (s)$	$5,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,0002$	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,0004$	$3,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,0004$	$3,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,00002$
	$\alpha$	0,502	1,019	0,808	1,168
<b>Korsmeyer-Peppas [152]</b> (erózió- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,914	0,963	0,981	0,976
	$k_{KP} (s^{-n})$	$5,2 \cdot 10^0 \pm 0,0213$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 0,0354$	$4,6 \cdot 10^{-1} \pm 0,0592$	$2,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,0023$
	$n$	0,502	1,019	0,798	1,168

A kinetikai modelleket ebben az esetben is a teljes 500 perces intervallumra alkalmaztam, hogy a hatóanyag kioldódására a 0. perctől egészen a vizsgálat végéig az összes végbemenő folyamat figyelembevételével, a legmeghatározóbb folyamatot meghatározzam.

Az IBU kioldódási profiljaira alkalmazott elsőrendű és a Korsmeyer-Peppas modell illeszkedését az **5.4.9. ábrán** mutatom be.

Az IBU kioldódását, amint azt már korábban említettem, csakis a diffúzió (Higuchi modell) befolyásolja 25 (**5.4.4. táblázat**) és 37,5°C-on (**5.4.5. táblázat**) is, azaz csak a membránon keresztüli diffúziójától függ. A BSA fehérje hordozóból az IBU kioldódási mechanizmusának a leírására 25 és 37,5°C-on is a nulladrendű sebességi modell alkalmazható, ami arra utal, hogy a fehérjéhez való kötődésével, egy lassú, szabályozott hatóanyag leadás valósul meg. Ezzel szemben, koncentráció-függő kioldódás a meghatározó az egyrétegű mag-héj kompozit esetében (elsőrendű kinetikai modell), 25 és 37°C-on is.

A kétrétegű mag-héj kompozit esetén kaptam eltérő eredményeket a hőmérséklettől függően. Szobahőmérsékleten a Korsmeyer-Peppas modell írja le legpontosabban a mechanizmust, amely alapján az  $n$  értéke 0,5, amelyet a modell névadói pontosan definiáltak, úgymint egy diffúzió-kontrollált mechanizmust, sík geometriájú hordozóból. Ezt a SAXS mérésekből kapott fraktál dimenziókkal lehet magyarázni, ugyanis a BSA-t tömegfraktál jellemzi, amely a hatóanyag hozzáadásával, valamint a héjak épülésével folyamatosan a felületfraktál felé tolódott el, amely egy érdes, csipkézett felülettel párosul. Ha a kompozit szétesik – a pH változtatásnak köszönhetően – és a hatóanyag folyamatosan oldódik ki a kompozitból, egyre simább felületet kapunk, visszajutunk a kezdeti kompozitához, amelyre a tömegfraktál, ami egy viszonylag sima felülettel párosul, a jellemző. 37,5°C-on a kioldódás kinetikája a nulladrendű modellel írható le, azaz fiziológiai körülmények között a kompozit egy jól-szabályozott hatóanyag-leadó rendszerként jellemezhető. A héjak szerepe itt is a lassítás/szabályozás folyamatában játszik szerepet, amelyet a sebességi állandók csökkenése mutat a héjak számának a növelésével (BSA/IBU/PSS,  $k_0 = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; BSA/IBU/PSS/Chit,  $k_0 = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

## **5.5. BSA-alapú egyrétegű mag-héj kompozitok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája**

Mivel az előzőekben sikeresen állítottam elő mag-héj kompozitokat, így a továbbiakban szeretnék volna még inkább tökéletesíteni a rendszert és a biológiai rendszerekben alkalmazhatóbb kompozitokat fejleszteni. Amint azt már az irodalmi előzményekben is említettem manapság igen nagy akadályt jelent a kutatók számára a

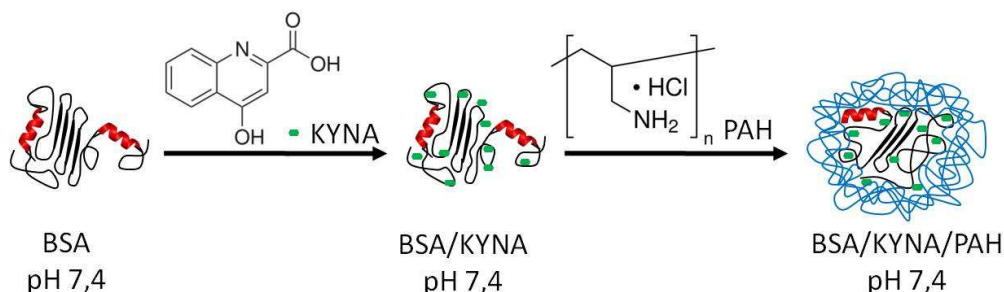


központi idegrendszerre ható gyógyszermolekulák vér-agy gáton történő átjuttatása. További problémát jelent a gyógyszerformulák kis hatóanyag-tartalma, amely nem elégséges a hatékony koncentráció eléréséhez, ezért a továbbiakban a kutatásaink erre a területre összpontosultak. A választott hatóanyag a kinurénsav (KYNA) volt, amely oldatban instabil vegyület, így a kísérleteimet stabilitás vizsgálatokkal kezdtem meg.

A stabilitási vizsgálatokat pH = 3 és 8 között végeztem el MilliQ-vízben sóval és anélkül, valamint PBS,- és HEPES-pufferben. Az oldatok pH-ját 0,1 M HCl és 0,01 M NaOH-oldattal állítottam be, míg a pufferek pH-ja állandó, 7,4 volt. A hatóanyag stabilitását 96 óráig vizsgáltam UV-abszorbancia spektrumok felvételével. A mérések között a mintákat szobahőmérsékleten, természetes és mesterséges fénytől elzárva (de nem sötétben) tároltam. A KYNA stabilitása MilliQ-vízben só nélkül igen jó stabilitást mutatott, 48 óráig minden pH-n stabil, míg 3-as, 5-ös és 8-as pH-n több napig is eltartható a hatóanyag vizes oldatban. A KYNA molekula nátrium-só formájában is nagyfokú stabilitást mutatott minden pH-n, kivéve pH = 5-ön. A PBS és a HEPES-puffer fiziológias mennyiségben tartalmazza a NaCl-dot, így további sót nem adtam a rendszerhez. A mérések során azt tapasztaltam, hogy az oldatban jelenlevő különböző ionok (pl. foszfát-ionok) rontják a KYNA stabilitását, egy napig sem állandó a KYNA mérhető koncentrációja oldatban, folyamatosan bomlik és csak az első egy órában tekinthető stabilnak. Ennek tudatában a kompozitokat fiziológias pH-n (pH = 7,4) MilliQ-vízben állítottam elő, ugyanis az így előállított minták több napig szobahőmérsékleten tartva is reprodukálható mérési eredményeket biztosítanak.

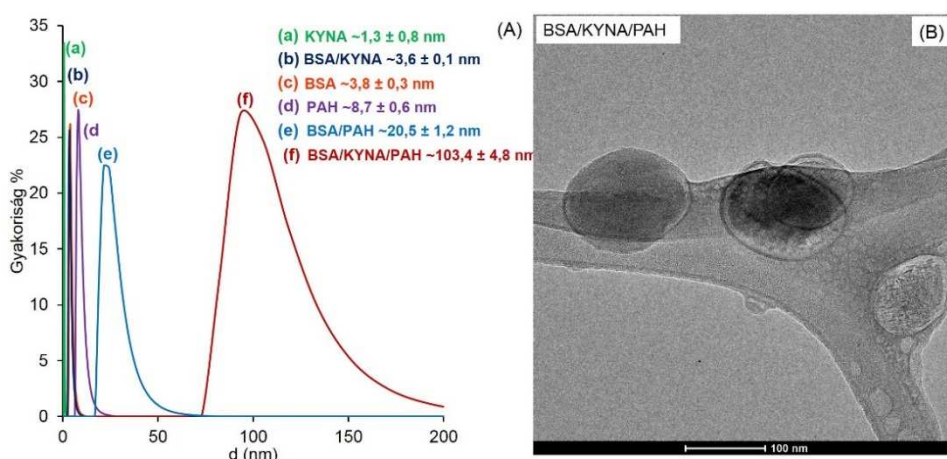
A kísérleteket a választott komponensek savval, illetve lúggal való titrálásával kezdtem meg, azaz végigpásztáztam a komponensek áramlási potenciálját az egész pH-tartományban. A BSA töltés semleges állapota, azaz a 0 mV áramlási potenciálja pH = 4,53-nél található, amely igen jól megközelíti az irodalomban megadott töltés semleges állapot értéket (~4,7). Ezzel szemben a polielektrolit, a PAH magasabb pH-n (pH = 5,42) mutatott zérus áramlási potenciál értéket. A titrálások alapján fiziológias pH-n a BSA és a PAH között elektrosztatikus kölcsönhatások nem jöhetnek létre, viszont egyéb (pl: hidrogén-kötések és hidrofób) kölcsönhatások kialakulhatnak. További vizsgálataim során, a BSA makromolekulát és a BSA/KYNA kompozitot titráltam a hatóanyaggal a töltéskompensáció elérése céljából, valamint a megkötött hatóanyag mennyiségének a meghatározásához. Az eredmények alapján 1 g BSA fehérjéhez és 1 g BSA/PAH kompozithoz 410 és 425 mg KYNA szükséges a töltéskompensáció eléréséhez. A kompozitok előállítása során 1,22 és 1,18-szeres feleslegben adtam a hatóanyagot a hordozóhoz és/vagy a mag-héj kompozitokhoz, amely tömegarányban  $m_{BSA}:m_{KYNA} = 1:0,5$ -t jelent. Amint azt korábban már említettem, a

sikeres előállítás mellett a megfelelő hatóanyag tartalommal is kell, hogy rendelkezzen a hordozó rendszer, így az **5.4.1. táblázat** alapján a pH = 7,4-en mért méretek és a PDI indexek alapján kiválasztottam egy tömény BSA-oldatot (60 mg/ml) a KYNA nagy koncentrációban való megkötésére. Az előállítás sematikus ábrája az **5.5.1. ábrán** látható.



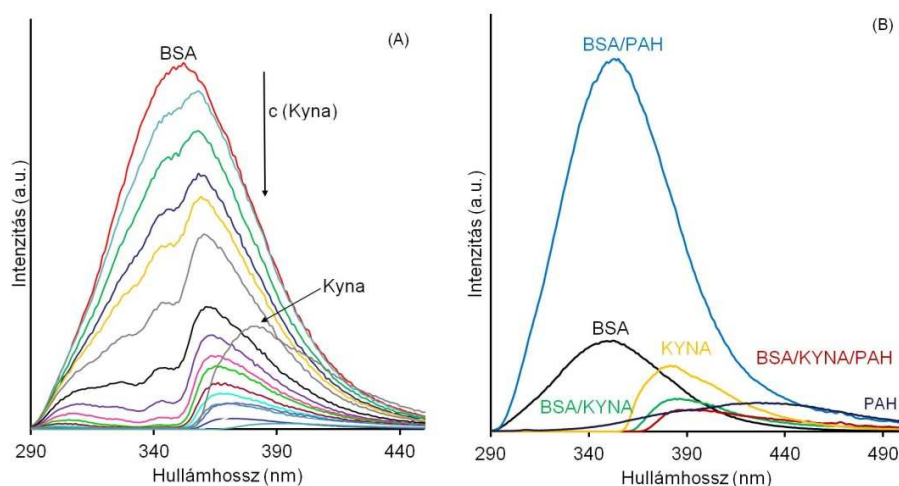
**5.5.1. ábra** A BSA/KYNA/PAH mag-héj nanokompozit előállításának sematikus ábrája

A kiindulási és az előállított kompozitok méretét (**5.5.2.(A) ábra**) és  $\zeta$ -potenciálját ebben az esetben is DLS mérésekkel határoztam meg. 7,4-es pH-n mind a BSA, mind a BSA/KYNA kompozit 4 nm körüli átmérőt mutatott. Ha egy polielektrolit réteget hoztam létre a kompozit körül a méretre 103 nm-es átlagos átmérőt kaptam. Hatóanyag nélkül, a PAH viszont nem növelte meg ennyire a kompozit méretét, csupán 20 nm lett, ami szintén alátámasztja, hogy a mag és a héj között nem alakultak ki erős kölcsönhatások, azaz csak kisebb mennyiségű polielektrolit képes kötődni a fehérjéhez. A KYNA jelenléte viszont megnövelte a kompozit méretét, a hatóanyag és a polielektrolit közötti kölcsönhatások kialakulásának köszönhetően.



**5.5.2. ábra** A kiindulási anyagok és a kompozitok méreteloszlási függvényei a DLS mérések alapján (A) és a BSA/KYNA/PAH mag-héj nanokompozit TEM képe (B)

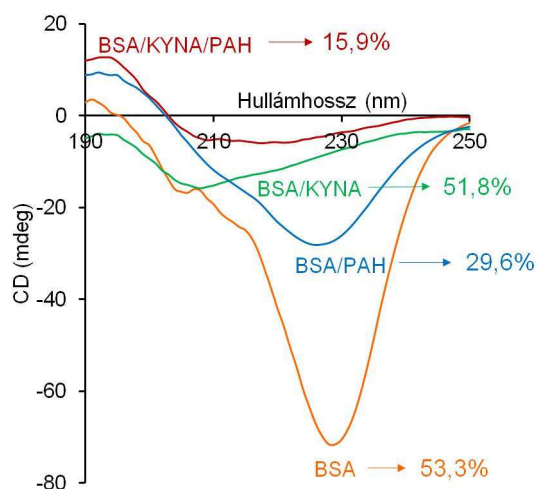
Az N-állapotban lévő 60 mg/ml-es koncentrációjú BSA makromolekula kis negatív felületi töltéssel rendelkezik ( $-1,1 \pm 0,2$  mV), amely a hatóanyag hatására lecsökkent  $-11,1 \pm 0,4$  mV-ra. A polielektrolit héj hatására (BSA/KYNA/PAH) a felület potenciálja kis növekedést mutatott ( $-6,5 \pm 0,3$  mV). A PAH felületi töltése 0-hoz közeli érték ( $0,3 \pm 0,2$  mV) pH=7,4-en. A  $\zeta$  értékek alapján azonban elektrosztatikus kölcsönhatások is kialakulhattak a BSA és a PAH között. A két módszerrel (Műtek és DLS) mért értékek különbségének oka feltehetőleg a titrálás során a hozzáadott lúg (1M NaOH) hatására megnövekedett ionerősségnek tulajdonítható. Az elektronmikroszkópos (TEM) felvétel az egyrétegű mag-héj nanokompozitról nemcsak a struktúra kialakulását bizonyítja (**5.5.2.(B) ábra**), de az ebből meghatározott méret is jó egyezést mutatott a DLS mérés eredményével.



**5.5.4. ábra** A BSA emissziójának változása növekvő koncentrációjú KYNA hozzáadására **(A)**, valamint a kiindulási anyagok és a kompozitok emissziós spektrumai **(B)** ( $\lambda_{gerj} = 280$  nm)

Fluoreszcenciás méréseket végeztem, a kompozit felépülése folyamán a BSA szerkezetében bekövetkező változások nyomon követésére. A BSA-ban található Trp emissziós maximuma 347 nm-nél található. Növekvő koncentrációjú KYNA molekula hozzáadására (**5.5.4.(A) ábra**), az aromás csoport emissziós sávja folyamatosan tolódik a magasabb hullámhosszak felé, az intenzitás folyamatos csökkenése mellett. A vörös eltolódás 383 nm-ig jelentkezett, amely megegyezik a KYNA emissziós sávjának a maximumával. A maximális eltolódást 1 a 0,38 tömegaránynál észleltem. A kompozit előállításánál az alkalmazott KYNA mennyisége ezt meghaladta, ez az oka, annak, hogy a Trp emissziós csúcsa teljesen eltűnt és csak 383 nm-nél jelent meg egy emissziós sáv (**5.5.4.(B) ábra**). A PAH hozzáadására (amely nem rendelkezik emisszióval ezen a gerjesztési hullámhosszon) az

emissziós intenzitásban csökkenést tapasztaltam, azaz a PAH „beburkolta” a kompozitot. KYNA nélkül a polielektrolit hatására jelentős intenzitás növekedést tapasztaltam, amely a fehérje szerkezetében végbemenő jelentős változásokra utal.

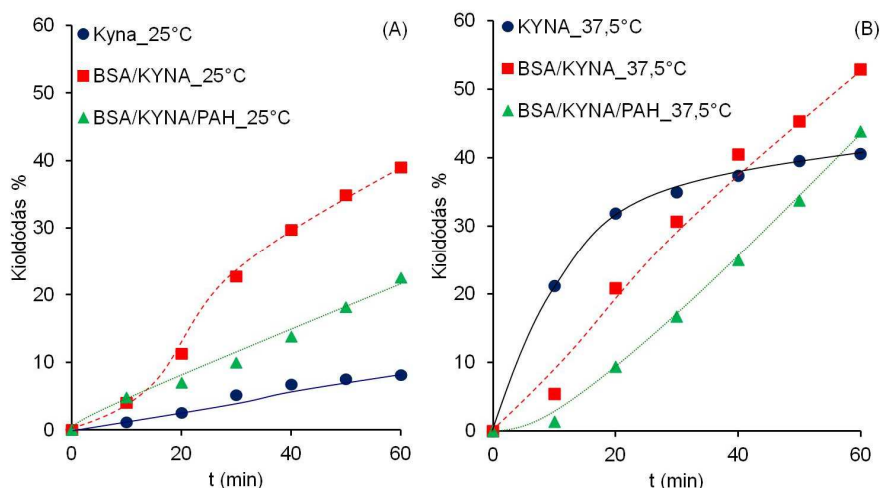


**5.5.5. ábra** A BSA, valamint a kompozitok CD-spektrumai, valamint  $\alpha$ -hélix tartalmuk

CD spektrumok felvételével határoztam meg a fehérje  $\alpha$ -hélix tartalmát vizes közegben (**5.5.5. ábra**). A BSA N-állapotban 53,3%  $\alpha$ -hélix tartalommal rendelkezik, amely jó egyezést ad az IR spektrumokból számolt értékkel 150 mM NaCl jelenlétében (~51%-os  $\alpha$ -hélix). Láthatjuk, hogy a további komponensek hozzáadására a CD-spektrumok alakja jelentősen változott. KYNA hozzáadására az  $\alpha$ -hélix tartalomban kis csökkenést tapasztaltam, 51,8%-ra csökkent, viszont a polielektrolit jelentős perturbációt okozott a fehérje szerkezetében, a fő másodlagos szerkezeti elem szignifikáns csökkenést mutatott, 15,9%-ra redukálódott. Hatóanyag nélkül, azaz az üres kompozit esetében nem észleltem ilyen drasztikus csökkenést, közel 30,0%  $\alpha$ -hélixet mértem, azaz a KYNA és a PAH kölcsönhatása okoz nagyobb szerkezeti változást a fehérje struktúrájában. Ez jó összhangban van az előzőekben elmondottakkal, ugyanis ha nincs hatóanyag, akkor kisebb mennyiségű polielektrolit képes kötődni a fehérjéhez, így kisebb szerkezeti változások mentek végbe, míg a KYNA és a PAH együttes jelenléte jelentős szerkezeti változásokat okozva jelentősen megnövelte a kompozit méretét.

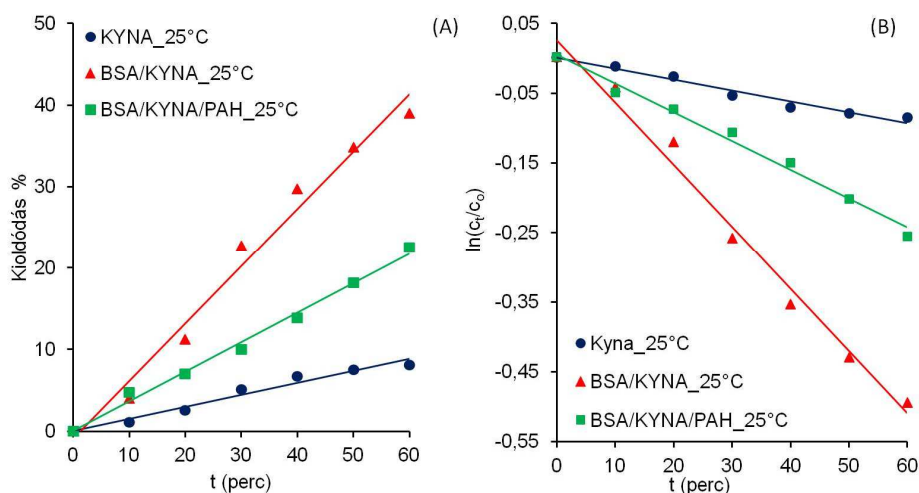
*In vitro* kioldódási kísérleteket végeztünk 25 és 37,5°C-on (**5.5.6.(A) és (B) ábra**). Amint arra már a stabilitási vizsgálatoknál is rámutattam, a KYNA nem stabil PBS-ben, ezért a kioldódási profilokat csak az első egy órában mutatom be, amíg a KYNA stabilnak tekinthető. Láthatjuk, hogy 25°C-on a KYNA kioldódása volt a leglassabb. Mivel a kioldódása csakis a diffúziójától függ más akadályozó hatás nincs, így sokkal gyorsabban

került a PBS-pufferbe, így bomlása valószínűleg gyorsabban megindult. Ha a hatóanyag a BSA-magba vagy a mag-héj kompozitba van „becsomagolva”, akkor a PBS-be késleltetve diffundált át, így valamivel később indult meg a bomlás folyamata.



**5.5.6. ábra** A KYNA kioldódási profiljai 25 (A) és 37,5°C-on (B)

Magasabb hőmérsékleten is hasonló eredményre juthatunk. Viszont, a bomlástól eltekintve is láthatjuk, hogy a héj szabályozó szerepe hogyan befolyásolja a kioldódás sebességét: 25°C-on a KYNA kioldódása a BSA/KYNA kompozitból közel 40%, míg a BSA/KYNA/PAH mag-héj kompozitból csupán 23%. 37,5°C-on nagyobb kioldódási mennyiségeket figyelhetünk meg: 53 és 44% a kioldódott hatóanyag mennyisége 60 perc elteltével a BSA/KYNA, valamint a BSA/KYNA/PAH mag-héj nanokompozitból. Az előzőeknek megfelelően a kinetikai modelleket is csak az első egy óra kioldódására alkalmaztam, amíg a KYNA viszonylag stabilnak tekinthető. Az **5.5.1.** és az **5.5.2. táblázat** tartalmazza a kinetikai modellekből kapott  $R^2$ , a  $k$ , az  $a$ , valamint az  $n$  értékeit rendre, 25 és 37,5°C-on. A nulladrendű és az elsőrendű sebességi modell illeszkedésére 25°C-on az **5.5.7. ábrán** mutatok példát. A KYNA esetében mindkét hőmérsékleten a Higuchi modell adja a legjobb illeszkedést, amit már korábban az IBU esetében is láttunk, azaz a kioldódás sebessége csakis a membránon keresztüli diffúzió sebességétől függ. A BSA/KYNA rendszer kioldódási kinetikáját szintén a diffúzió-kontrollált mechanizmust leíró, Higuchi modell jellemzi 25 és 37,5°C-on egyaránt ( $R^2=0,989$  és  $0,996$ ).



**5.5.7. ábra** A nulladrendű (A) és az elsőrendű (B) sebességi modell alkalmazása a KYNA kioldódási profiljaira 25°C-on

**5.5.1. táblázat** A kinetikai modellek eredményei a KYNA kioldódási profiljaira 25°C-on

25°C		KYNA	BSA/KYNA	BSA/KYNA/PAH
<b>Nulladrendű [161]</b> (a hatóanyag koncentrációjától független a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,967	0,981	0,991
	$k_0 (s^{-1})$	$1,5 \cdot 10^{-1} \pm 0,0010$	$7,0 \cdot 10^{-1} \pm 0,0609$	$3,6 \cdot 10^{-1} \pm 0,0247$
<b>Elsőrendű [163]</b> (a hatóanyag koncentrációjától függ a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,969	0,986	0,986
	$k_d (s^{-1})$	$1,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$	$8,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,0011$	$4,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,0005$
<b>Higuchi [148]</b> (diffúzió-kontrollált kioldódás)	$R^2$	0,975	0,989	0,943
	$k_H (s^{-1/2})$	$1,6 \cdot 10^0 \pm 0,0640$	$8,0 \cdot 10^0 \pm 0,4005$	$3,9 \cdot 10^0 \pm 0,1242$
<b>Hixon-Crowell [160]</b> (a hordozó fajlagos felülete vagy a mérete változik a kioldódás során)	$R^2$	0,909	0,929	0,999
	$k_{HC} (s^{-1/3})$	$1,1 \cdot 10^{-1} \pm 0,0172$	$2,6 \cdot 10^{-1} \pm 0,0357$	$1,6 \cdot 10^{-1} \pm 0,0245$
<b>módosított Freundlich [155]</b> (ioncsere- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,973	0,977	0,972
	$k_{mF} (s)$	$8,6 \cdot 10^{-4} \pm 0,0003$	$2,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,0022$	$5,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,0040$
	$\alpha$	1,149	1,298	0,873
<b>Korsmeyer-Peppas [152]</b> (erózió- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,973	0,977	0,972
	$k_{KP} (s^{-n})$	$8,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,0333$	$2,3 \cdot 10^{-1} \pm 0,2000$	$5,7 \cdot 10^{-1} \pm 0,3999$
	$n$	1,149	1,298	0,884



### 5.5.2. táblázat A kinetikai modellek eredményei a KYNA kioldódási profiljaira 37,5°C-on

37,5°C		KYNA	BSA/KYNA	BSA/KYNA/PAH
<b>Nulladrendű [161]</b> (a hatóanyag koncentrációjától független a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,841	0,968	0,997
	$k_0 (s^{-1})$	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,0482$	$2,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,0981$	$3,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,1381$
<b>Elsőrendű [163]</b> (a hatóanyag koncentrációjától függ a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,870	0,992	0,982
	$k_d (s^{-1})$	$5,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,0009$	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,0020$	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,0019$
<b>Higuchi [148]</b> (diffúzió-kontrollált kioldódás)	$R^2$	0,917	0,996	0,971
	$k_H (s^{-1/2})$	$4,0 \cdot 10^0 \pm 0,4244$	$1,0 \cdot 10^1 \pm 0,7096$	$9,1 \cdot 10^0 \pm 1,5308$
<b>Hixon-Crowell [160]</b> (a hordozó fajlagos felülete vagy a mérete változik a kioldódás során)	$R^2$	0,810	0,901	0,971
	$k_{HC} (s^{-1/3})$	$9,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,0068$	$2,8 \cdot 10^{-1} \pm 0,0322$	$3,1 \cdot 10^{-1} \pm 0,0009$
<b>módosított Freundlich [155]</b> (ioncsere- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,973	0,948	0,968
	$k_{mF} (s)$	$1,0 \cdot 10^0 \pm 0,0018$	$3,8 \cdot 10^{-3} \pm 0,0019$	$2,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,0093$
	$\alpha$	1,149	1,246	0,904
<b>Korsmeyer-Peppas [152]</b> (erózió- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,937	0,948	0,968
	$k_{KP} (s^{-n})$	$1,0 \cdot 10^0 \pm 0,1836$	$3,9 \cdot 10^{-1} \pm 0,2000$	$2,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,09332$
	$n$	0,351	1,242	1,868

Az egyrétegű mag-héj kompozitok kioldódására 25°C-on a Hixon-Crowell modell ad egy igen pontos eredményt ( $R^2=0,999$ ). Ekkor a hatóanyag-szállító rendszer fajlagos felülete változik a kioldódás során. Ez annak tulajdonítható, hogy a kémiai potenciálkülönbségnek köszönhetően meginduló hatóanyag kioldódás hatására, a polielektrolit is „eltávozik” a fehérje felületéről. Ezt láttuk a DLS és a CD mérések alapján is, ugyanis KYNA nélkül a mag kevesebb polielektrolitot képes megkötni. 37,5°C-on viszont egyértelműen a nulladrendű kinetika jellemzi a rendszert ( $R^2=0,997$ ), azaz a kioldódás mechanizmusa a hatóanyag koncentrációjától függetlenül egy jól kontrollált, lassú KYNA felszabadulással jellemezhető ( $k_0 = 3,0 \cdot 10^{-4} s^{-1}$ ). Ha megvizsgáljuk a  $k$  értékeit, akkor láthatjuk, hogy az egy polielektrolit héj nem okoz olyan számottevő csökkenést a sebesség értékekben az első egy óra kioldódási profilok alapján. Viszont az eredmények együttes figyelembevételével, egy PAH héjjal is egy jól szabályozható hatóanyag felszabadulásra alkalmas mag-héj kompozitot sikerült előállítani, amely a többi paraméterével együtt biológiai rendszerekben a jövőben egy jól-működő hatóanyag-szállító rendszerré válhat.

## 5.6. BSA/NaDS komplexek szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája

A tenzidek alkalmazása különböző területeken nem új keletű, használják őket kozmetikumokban, ételekben stabilizátorként, tisztítószerekben, valamint gyógyszerkészítményekben is. A fehérje-tenzid kölcsönhatás tanulmányozása is igen széleskörű, viszont a kísérletek pH = 7,4-en, az élő szervezetekre jellemző körülményekre irányulnak. A munkámban az újszerűség az, hogy a fehérje-tenzid komplexek előállítását savas pH-n (pH = 3) végeztem el a pozitív töltésű BSA és a negatív töltésű anionos tenzid, a nátrium dodecil szulfát, azaz az ismertebb nevén az NaDS alkalmazásával, gyógyszerhordozás céljából.

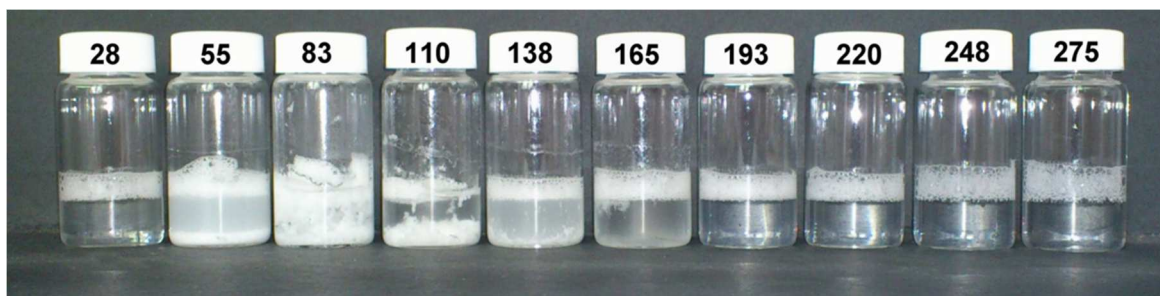
**5.6.1. táblázat** A BSA/NaDS komplexek átmérői, zeta potenciáljai, valamint a PDI indexek a DLS mérések alapján

kompozitok jelölése	$mg_{(NaDS)}/g_{(BSA)}$	$n_{(NaDS)}/n_{(BSA)}$	d (nm) $\pm$ 5%	PDI	$\zeta$ -potenciál (mV) $\pm$ 5%
<i>c0-BSA/NaDS</i>	0	0	6,4	0,428	8,7
<i>c1-BSA/NaDS</i>	121	28	6,6	0,674	5,0
<i>c2-BSA/NaDS</i>	239	55	17,3	0,363	-0,1
<i>c3-BSA/NaDS</i>	360	83	134	0,282	-8,9
<i>c4-BSA/NaDS</i>	477	110	153	0,562	-5,6
<i>c5-BSA/NaDS</i>	599	138	459	0,104	-3,3
<i>c6-BSA/NaDS</i>	716	165	9,4	0,363	-16,4
<i>c7-BSA/NaDS</i>	837	193	9,4	0,252	-26,2
<i>c8-BSA/NaDS</i>	954	220	9,4	0,406	-26,2
<i>c9-BSA/NaDS</i>	1076	248	9,4	0,320	-26,2
<i>c10-BSA/NaDS</i>	1193	275	9,4	0,269	-26,2

Powers és munkatársai [176] számos módszert alkalmaztak nanorészecskék, komplexek, kompozitok karakterizálására és a DLS-t egy jól alkalmazható módszernek írták le, mind a méret, mind a mérteloszlás, mind a  $\zeta$ -potenciál meghatározására oldatfázisban. A  $d_{DLS}$  és a  $\zeta$ -potenciál értékeket a BSA/NaDS különböző molarányú komplexeire határoztam meg, amelyet az **5.6.1. táblázatban** foglaltam össze. A PDI indexek 0,104 és 0,428 között változtak, azaz viszonylag monodiszperz mintákat sikerült előállítani. Kicsivel nagyobb PDI értékeket a 28 és 110  $n_{NaDS}/n_{BSA}$  molarányokra mértem ( $PDI = 0,674$  és  $0,562$ ). A méreteket tekintve a komplexek átmérője az NaDS koncentrációjának növelésével egy darabig nőtt,

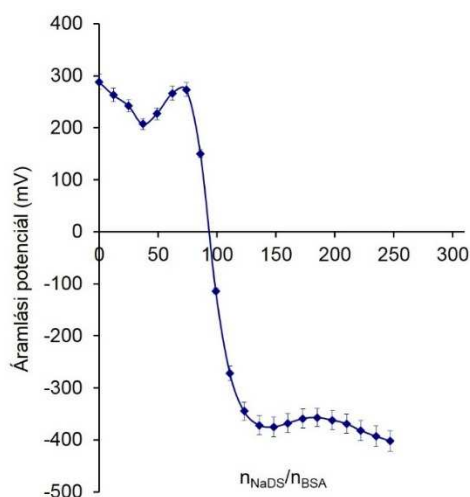


majd újra 10 nm alá csökkent, amely a tenzid mennyiség növelésének ellenére is állandó értéken maradt. Ez a tenzid kritikus micella képződési koncentrációjával magyarázható (cmc), ugyanis a kísérletek során a c4-BSA/NaDS összetételtől kezdődően az NaDS koncentrációja meghaladja, a tenzid 8 mM cmc [177] értékét.



**5.6.1. ábra** Az  $n_{\text{NaDS}}/n_{\text{BSA}}$  különböző molarányú keverékeinek fotója

A  $\zeta$ -potenciál változása a vártaknak megfelelően alakult, azaz a tenzid árnyékoló hatást fejt ki a BSA pozitív töltésére. Az elektrosztatikus kölcsönhatásnak megfelelően, a növekvő koncentrációjú NaDS hatására, a fehérjének egyre kevesebb pozitívan töltött funkciós csoportja maradt szabad, így egyre kisebb  $\zeta$  értékeket mértem. A tenzid mennyiségének növelésével a felület áttölthető és egy közel stabil rendszer állítható elő (-26,2 mV). A méret, a  $\zeta$  és a PDI indexek alapján a c7-BSA/NaDS elnevezésű kompozittól kezdve egy viszonylag stabil, monodiszperz és kis méretű, azaz 10 nm alatti átmérővel rendelkező komplexek keletkeztek.

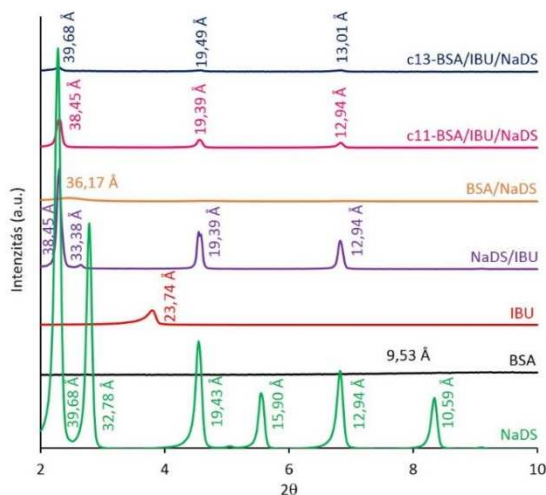


**5.6.2. ábra** Az áramlási potenciál változása az  $n_{\text{NaDS}}/n_{\text{BSA}}$  molarány növelésével

A BSA/NaDS különböző molarányú komplexeiről készített fotó alapján (5.6.1. ábra) kolloid jelenséget figyelhetünk meg. A BSA N-állapotban szférikus struktúrával rendelkezik,

valamint körülbelül 51%  $\alpha$ -hélix tartalommal. Ha savasítjuk a közeget ( $\text{pH} = 3$ ), akkor a fehérje láncok kitekerednek, veszt a fő másodlagos szerkezeti tartalmából, ami közel 40%-ra csökken. Ebben az állapotban a BSA hidrofób részei az oldószer felé, azaz kifelé fordulnak, amelyekkel a tenzidek alkilláncai kölcsönhatásba lépnek. Így a tenzidek „fejcsoportjai” az oldószer felé orientálódnak, amely egy hidrofíl rendszer keletkezéséhez vezet. A tenzid molekulák számának növelésével az újabb tenzid réteg hatására, a hidrofób alkilláncok kerülnek a felszínre, azaz hidrofóbizálódik a rendszer, amely vizuálisan is megnyilvánul, a rendszer zavaros lett; a fehérje aggregálódott. További tenzid hozzáadására az oldat kitisztult, mivel egy újabb réteg vízdékony rendszert eredményezett.

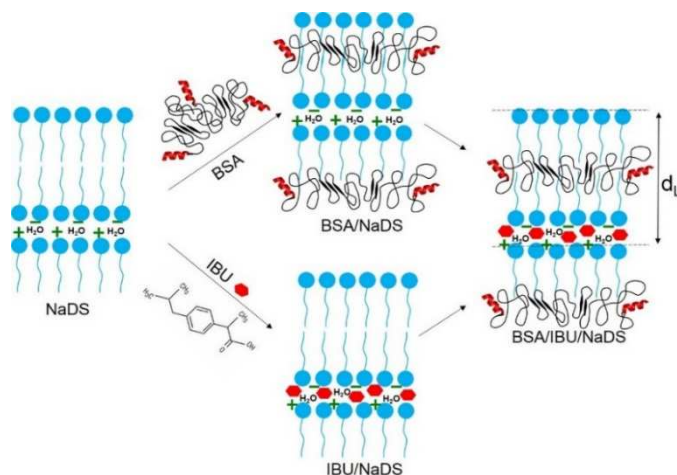
Töltéstitrálással (**5.6.2. ábra**) meghatároztam a töltéskompenzációnak megfelelő tenzid koncentrációt, amely molarányban a következőt jelenti:  $n_{\text{NaDS}}/n_{\text{BSA}} = 94$ , azaz 1 mol BSA töltését 0,0106 mol NaDS képes kompenzálni. A görbét megfigyelve látható, hogy az  $n_{\text{NaDS}}/n_{\text{BSA}} = 150$  molaránytól, a tenzid koncentrációjának növelésével, az áramlási potenciál értéke éppúgy egy közel állandó értéket vett fel, mint amit korábban megfigyelhettünk akár a méret, akár a zeta potenciál értékeknél is. Az eredmények alapján az  $n_{\text{NaDS}}/n_{\text{BSA}} = 278$  molaránynál állítottam elő IBU-tartalmú kompozitokat, amelyek közül kettőt mutatok be a c11-BSA/IBU/NaDS elnevezésű kompozitot, amelyben a  $c_{\text{IBU}} = 1,1 \text{ mg/ml}$  és a c13-BSA/IBU/NaDS kompozitot, amelyben a  $c_{\text{IBU}} = 2,0 \text{ mg/ml}$ .



**5.6.3. ábra** A kompozitot alkotó komponensek, valamint a biokonjugátumok diffraktogramjai a  $d_L$  értékek feltüntetésével

A minták stabilitását DSC mérésekkel ellenőriztem (**F6. ábra**). A kapott görbékből kitűnik, hogy annál a rendszernél, amely BSA-t és NaDS-t is tartalmaz, a denaturáció

nagyobb hőmérséklet felé tolódik a csak BSA-t tartalmazó rendszerhez képest. Ez a magasabb denaturációs hőmérséklet szerkezeti változásoknak köszönhető, amely változás egy növekvő hőstabilitást eredményezett. IBU-t adva a rendszerhez további eltolódást észleltünk a hőmérsékletben, amely arra utal, hogy a hatóanyag növeli a rendszer stabilitását, azaz egy kompaktabb szerkezet jön létre.



**5.6.4. ábra** A BSA/IBU/NaDS rendszer előállításának a sematikus ábrája

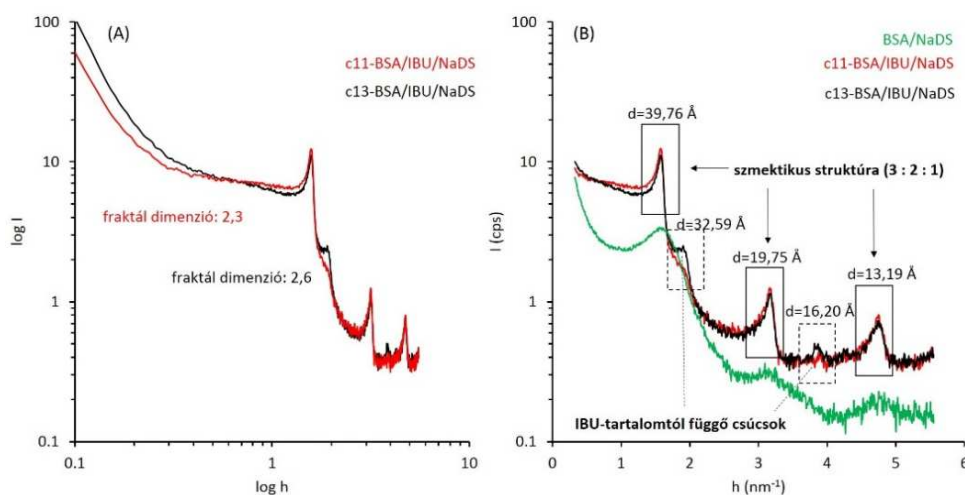
A tenzidek, ahogy az irodalomban jól ismert, szabályos szerkezetet vehetnek fel, amely röntgendiffrakcióval vizsgálható. A BSA nem mutat rendezettséget, egy amorf lapos csúcs jelenik meg  $9,56 \cdot 2\theta^\circ$ -nál (**5.6.3. ábra**). A többi komponens részéről viszont éles reflexiókat tapasztaltunk jelezvén, hogy folyadékkristályos szerkezet van jelen az oldatban. Az NaDS/víz rendszerben meghatározható a lamellák közötti távolságot ( $d_L$ ), a következő egyenlet segítségével:

$$d_L = 1,54 n_c + 1,5, \quad (42)$$

ahol  $n_c$  a szénatomok kötéseinek száma a tenzid molekulában, 1,54 (Å) két szénatom távolsága és 1,5 (Å) a tenzid fejcsoportjának a mérete. Az önszerveződő folyamatnak köszönhetően két tenzid réteg kapcsolódik össze, így a  $d_L$  távolság 36,88 Å. Ha a hidratációt is figyelembe vesszük, akkor a  $d_L$  értéke 39,68 Å-re nő. Ez az érték tökéletes egyezést ad a mért  $d_L$  értékkel. Ha az NaDS-hez BSA-t adtam, akkor ez az érték 36,17 Å-ra csökkent, amely egy vízmolekula „kiesését” jelenti. Ez a folyamat az alkilánok „összecsiszását” valószínűsíti, amely a rendezettség nagyfokú csökkenését vonta maga után. Ha IBU-t is tartalmazott a rendszer (c13-BSA/IBU/NaDS), akkor visszakaptam a kezdeti számolt és mért értéket, azaz az IBU stabilizálja az NaDS folyadékkristályos szerkezetét és feltehetőleg a BSA csak, mint egy hordozó van jelen a rendszerben. Habár ezzel együttvéve az intenzitás jelentősen lecsökkent, azaz a tenzid jelentős mértékben veszített a rendezettségi fokából. Ha a

kompozitához 1,1 mg/ml koncentrációjú IBU-t adtam, akkor a  $d_L$  értéke 38,45 Å-re csökkent, de a rendezettség foka jelentős maradt. A kapott diffraktogramokból feltételeztem, hogy az IBU molekulák a tenzid molekulák hidrofil fejcsoportjai között helyezkednek el, valamint a fehérjéhez kötődnek, amelynek sematikus ábrázolása az **5.6.4. ábrán** látható. Megfelelő mennyiségű hatóanyag hozzáadásával nem változik a  $d_L$  értéke, azaz az IBU nincs hatással az önszerveződő folyamatra, a szmektikus folyadékkristályos szerkezet megmaradt.

A SAXS, mint korábban láthattuk a belső nanostruktúra, valamint a felszín morfológiai tulajdonságainak vizsgálatára egyaránt alkalmas. Az önszerveződő folyamatnak köszönhetően, a szórásgörbén karakterisztikus csúcsok jelentek meg különböző  $h$  értékeknél (**5.6.5. ábra**). A szórásgörbe kezdeti szakaszából nyert fraktál meredekségeket a hatóanyag tartalmú kompozitokra az **5.6.5.(A) ábra** mutatja. A hatóanyag-szállító rendszer kisebb IBU tartalma mellett, a fraktál meredeksége 2,3, amely a korábban már bemutatott tömegfraktálra jellemző érték. Az IBU koncentrációjának növelésével 2,6-ra változott az  $a$  értéke, azaz egyre inkább tolódik a felületfraktál felé, amely egyre kompaktabb szerkezet kialakulását bizonyítja az IBU hozzáadására.

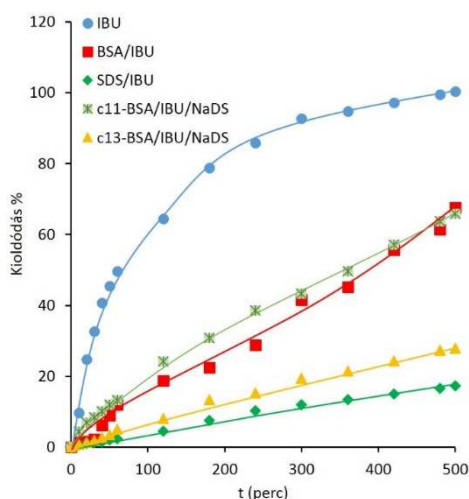


**5.6.5. ábra** A szórásgörbe log-log ábrázolása a fraktál meredekségek **(A)**, valamint a szmektikus struktúrára jellemző csúcsok **(B)** megjelölésével

A  $h$  értékekből számolt  $d$  értékek aránya ( $d = 2\pi/h$ ) 3:2:1, amely egy szmektikus folyadékkristályos szerkezetre utal (**5.6.5.(B) ábra**). Ezek a  $d$  értékek (39,76, 19,75, és 13,19 Å) igen jó összhangban vannak az XRD-alapján kapott  $d_L$ -értékekkel. A SAXS görbéken megjelenő két csúcs (32,59 Å, 16,20 Å) intenzitása erősen függ a rendszerben jelenlevő IBU mennyiségétől, azaz a koncentráció növekedésével a csúcsok intenzitása is nő. A hatóanyag

jelenléte nélkül, ezek a csúcsok hiányoztak a szórásgörbékről, amely szintén azt igazolja, hogy az IBU biztosítja a jól-rendeztet folyadékkristályos szerkezet stabilitását.

A BSA-alapú gyógyszer-szállító nanohibrid rendszert a fehérje pH = 3-on történő kicsapásával állítottam elő. A kicsapott BSA képes a hatóanyagot „bezárni”, amelyet jelen esetben tenzid molekulákkal „feldíszítve” egy kontrollált hatóanyag felszabadulást biztosító rendszerként, szintén az IBU kapszulázására használtam fel.



**5.6.6. ábra** Az IBU kioldódási profiljai az egyes kompozitokból 37,5°C-on

Az IBU kioldódási profiljai mutatják (**5.6.6. ábra**), hogyan csökkent az IBU százalékos kioldódása a tenzid jelenlétében az idő előrehaladtával. Míg az IBU kioldódása 100% 500 perc elteltével, addig a BSA mellett (BSA/IBU) 67%-ra csökken. Az NaDS/IBU esetében ez a kioldódás jelentősen lecsökkent, csupán 17% oldódott ki a kompozitból a vizsgált időintervallumban. A BSA (c13-BSA/IBU/NaDS) mellett nem olyan jó hatásfokkal szabályozható a kioldódás, 28%-ra változott (c13-BSA/IBU/NaDS) a leadott hatóanyag mennyisége.

A kinetikai modelleket ebben az esetben is a teljes 500 perces időintervallumra alkalmaztam, amelyek eredményeit az **5.6.1. táblázatban** foglaltam össze. Az IBU kioldódásáról már volt szó korábban, hogy egy diffúzió-kontrollált kioldódási folyamat jellemző rá ( $n = 0,5$  is igazolja), míg a BSA/IBU folyamat esetén egy szabályozott jól kontrollált lassú folyamat ment végbe. Habár a Korsmeyer-Peppas modell nem írja le jól a kioldódás mechanizmusát, az  $n$  értéke nagyobb, mint egy, amely nulladrendű kinetikára jellemző, így ez is alátámasztja a koncentráció-független kioldódást a BSA molekulából (nulladrendű:  $R^2 = 0,992$ ). Az NaDS/IBU esetén a legtöbb gyógyszerformára jellemző

elsőrendű kinetika ( $R^2 = 0,994$ ) a jellemző, tehát a hatóanyag leadás annál gyorsabb, minél nagyobb koncentrációban van jelen a hatóanyag a hordozó rendszerben. A módosított Freundlich és a Korsmeyer-Peppas modell is igen jól alkalmazható az IBU kioldódási profiljára az NaDS/IBU rendszer esetében. A „diffúziós exponens” értéke ( $n = 0,89$ ) henger geometriát feltételez, amely megfelelhet annak a feltételezésnek, hogy az IBU kioldódása a tenzid „hosszú” alkiláncai közötti térrészből valósul meg.

### 5.6.1. táblázat A kinetikai modellek eredményei az egyes kompozitokra 37,5°C-on

37,5°C		IBU	BSA/IBU	NaDS/IBU	c11- BSA/IBU/NaDS	c13- BSA/IBU/NaDS
<b>Nulladrendű [161]</b> (a hatóanyag koncentrációjától független a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,827	0,992	0,991	0,990	0,991
	$k_0$ ( $s^{-1}$ )	$1,7 \cdot 10^{-1} \pm 0,0006$	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 0,0124$	$3,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,00099$	$1,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,00099$	$5,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,01378$
<b>Elsőrendű [163]</b> (a hatóanyag koncentrációjától függ a kioldódás sebessége)	$R^2$	0,900	0,971	0,994	0,994	0,996
	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,0015$	$2,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0004$	$4,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,000001$	$2,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,000566$	$7,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,000212$
<b>Higuchi [148]</b> (diffúzió-kontrollált kioldódás)	$R^2$	0,957	0,945	0,956	0,981	0,971
	$k_H$ ( $s^{-1/2}$ )	$4,6 \cdot 10^0 \pm 0,0147$	$3,1 \cdot 10^0 \pm 0,2922$	$8,5 \cdot 10^{-1} \pm 0,02291$	$3,1 \cdot 10^0 \pm 0,4607$	$1,4 \cdot 10^0 \pm 0,3369$
<b>Hixon-Crowell [160]</b> (a hordozó fajlagos felülete vagy a mérete változik a kioldódás során)	$R^2$	0,768	0,945	0,952	0,954	0,938
	$k_{HC}$ ( $s^{-1/3}$ )	$3,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,0001$	$4,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,0028$	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,000282$	$3,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,0025$	$2,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,00126734$
<b>módosított Freundlich [155]</b> (ioncsere- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,914	0,960	0,993	0,993	0,945
	$k_{mF}$ ( $s^{-1}$ )	$5,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,0002$	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,0004$	$6,7 \cdot 10^{-4} \pm 0,89475$	$7,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,000011$	$8,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,000236$
	$\alpha$	0,502	1,019	0,895	0,707	0,945
<b>Korsmeyer-Peppas [152]</b> (erózió- és diffúzió-kontrollált)	$R^2$	0,526	0,963	0,993	0,998	0,994
	$k_{KP}$ ( $s^{-n}$ )	$5,2 \cdot 10^0 \pm 0,0213$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 0,0354$	$6,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,002452$	$7,9 \cdot 10^{-1} \pm 0,1481$	$8,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,023561$
	$n$	0,502	1,019	0,894	0,707	0,945

A c11-BSA/IBU/NaDS kompozitból az IBU kioldódását az erózió és a diffúzió együttese határozza meg (Korsmeyer-Peppas modell). Az  $n$  értéke (egyhez közeli) az IBU-tartalmú biokonjugátumoknál, azt mutatja, hogy a kioldódás sebessége gyorsabb a hordozó (kompozit) rendeződésénél. A nagyobb IBU koncentráció tartalmú rendszerre (c13-BSA/IBU/NaDS) az

elsőrendű modell alkalmazható, azaz a hatóanyag koncentrációjától függő kioldódást mérhetünk. A BSA/IBU/NaDS kompozitok esetében az  $n$  értékei nem rendelhetők az irodalomban megjelölt egyik értékhez sem (a c11-BSA/IBU/NaDS ( $n = 0,707$ ) és a c13-BSA/IBU/NaDS ( $n = 0,945$ ) kompozitok esetén), így a hordozó rendszer nem jellemezhető egy szabályos geometriával. Ez alátámasztja az XRD mérésekből kapott feltételezésünket, azaz a BSA hatására a rendezettség fok csökken, amely geometriai változásokat von maga után. Összességében tehát elmondható, hogy a fehérjéhez viszonyítva a tenzidnek jelentősebb szerepe van a hatóanyag kioldódás sebességének szabályozásában; alkalmazása egy nyújtott hatóanyag-leadású rendszer létrejöttét biztosította.



## 6. Összefoglalás

Napjainkban egyre több betegség hatékony kezelése, valamint gyógyítása új típusú hatóanyag-szállító rendszerek alkalmazásában rejlik. A nem-célzott hatóanyag bejuttatás, a gyógyszer idő előtti kiürülése, a hirtelen túl nagy vagy éppen túl kis koncentrációban való adagolása mind rontja a kezelés hatékonyságát. Ezért doktori munkám során olyan mag-héj kompozitok, valamint biokonjugátumok előállítását tűztük ki célul, amelyek olyan hatóanyagok „becsomagolására” alkalmasak, amelyek hatékonyságának az oldhatóság (IBU) vagy éppen a szervezet védekező rendszere szab határt (KYNA). Célunk volt az is, hogy a „kapszulázott” hatóanyag kioldódási tulajdonságait *in vitro* vizsgáljuk, valamint a kioldódás mechanizmusát szabályozó folyamatot jellemezzük fiziológias körülmények között. A doktori munkám során kapott legfontosabb eredményeket a következőkben foglalom össze.

1. Mezopórusos szilikát szintetizáltam a TEOS hidrolízisével és egy szerkezetirányító ágens alkalmazásával, vízben rosszul oldódó fájdalomcsillapító, az IBU szállítására. A mag nagy fajlagos felületének és a mezopórusos szerkezetének köszönhetően nagy mennyiségű (1,6 g IBU/ g SiO<sub>2</sub>) hatóanyag „kapszulázása” lehetséges. A mag-héj kompozitok méretei a kolloid mérettartománytól egészen a mikronos tartományig (~400 – 1140 nm) terjedhetnek a polielektrolit héjak számának növelésével, amelyek elektrosztatikus kölcsönhatások révén a megfelelő koncentrációban a mag-héj kompozitot felépítik. A mag átmérőjének ismeretében, valamint a bemért mennyiségek felhasználásával, modellszámolásokkal előre megjósolható, mind a kompozit mérete, mind a héj vastagsága. A héjak számának növelésével az IBU kioldódási sebességének a csökkenése mellett a kioldódást befolyásoló folyamatok is eltérő kinetikát követnek. Míg az IBU kioldódását csak a diffúzió befolyásolja, addig az SiO<sub>2</sub>/IBU kompozitból a kioldódás nulladrendű kinetikát követ, azaz a kioldódás sebessége független a hatóanyag koncentrációjától. Az egyrétegű mag-héj kompozitból az IBU kioldódása koncentráció-függő, míg a kétrétegű kompozitból a kioldódást az erózió,- és a diffúzió- (Korsmeyer-Peppas modell) szabályozza.

2. A fehérje-alapú mag-héj kompozitok előállításához, vizsgáltam a BSA mag (3 mg/ml) másodlagos,- és harmadlagos szerkezetét a pH függvényében, só nélkül, valamint fiziológias körülmények között. A fehérje kitekeredett/felgombolyodott állapota megjósolható a Trp FL emissziós intenzitásának mérése alapján, azaz N-állapotban (4,3 < pH < 8,0) rendelkezik a legnagyobb intenzitással, míg E (2,7 < pH < 4,3),- vagy B-állapotban (8,0 < pH < 10,0) alacsonyabb intenzitású emissziós csúcsok jellemzik a fehérje kigombolyodott állapotát. Az N-állapotban lévő fehérje  $\alpha$ -hélix tartalma a legnagyobb (~62% só nélkül; ~51%



150 mM NaCl jelenlétében), míg az aggregált formáé a legkisebb százalékban (~2,5%) van jelen. A pH eltolása savasabb vagy lúgosabb tartományba a fő másodlagos szerkezeti elem csökkenését, míg az aggregált szerkezet növekedését okozza. 150 mM NaCl nélkül a BSA nagy stabilitással és kis hidrodinamikai átmérővel rendelkezik, míg só jelenlétében a stabilitás csökkenésével, a méret növekedése tapasztalható. A molekulatömeg értékei a BSA monomer formáját igazolja a sót nem tartalmazó oldatban, míg 150 mM NaCl hatására nő a dimer forma aránya. Ezt igazolják a második viriál együttható negatív értékei is, ugyanis só nélkül jól hidratált fehérje jelenléte igazolt, míg só jelenlétében a negatív  $A_2$  értékei aggregált fehérje jelenlétét bizonyítják.

3. A BSA és a hatóanyagok között kialakuló kölcsönhatásokat fluoreszcencia spektroszkópiával tanulmányoztam. A kioltási folyamatok vizsgálatára két, hidrofób molekulát választottam, amelyek csak emissziós intenzitásban okoznak változást, ilyen a KP és az ANS molekula is. A fluoreszcenciás intenzitásokra felírt egyenlet, a Stern-Volmer reprezentálása alapján a statikus és a dinamikus kioltás együttes jelenléte okozta a BSA emissziós intenzitásának a csökkenését mindkét molekula alkalmazásakor, ezért további egyenleteket alkalmaztam kvantitatív információk ( $k$ ,  $n$ ,  $f$ ,  $\Delta G$ ) megállapítására. A hidrofób molekulák nagyobb megkötődést mutatnak E-formában (pH = 3) (a fehérje hidrofób részei kifelé fordulnak) a natív-állapothoz viszonyítva (pH = 7), amely viszont nagyobb kötési energiával párosul. A  $\Delta G$  negatív értékei, önként, nagy affinitással végbemenő folyamatokról tanúskodnak, melynek értékei -15 és -33 kJ/mol közé esnek, a pH,- valamint az alkalmazott molekulától függően.

4. A kigombolyodott állapotú biopolimert (BSA, E-állapot, pH = 3,0) szintén az IBU molekula „csomagolására” használtam fel. A biokompatibilis anyag alkalmazásával megnövekedett a hatóanyag oldékonysága, ugyanis a megkötött IBU számának a növelésével folyamatosan nőtt az oldott molekulák száma is. A kompozit előállításánál az IBU oldhatóságához viszonyítva (0,021 mg/ml) 65-szörös mennyiséget alkalmaztam, amelynek 93,65%-a maradt a BSA/IBU kompozitban, amely mennyiség 1,286 mg/ml koncentrációjú IBU molekulának felel meg. Ezzel együtt a fehérje is nagyobb szerkezeti változáson ment keresztül az IBU hatására; a SAXS mérések egy lánc-szerű struktúra kialakulását igazolták. A kompozit mérete (fehérje mag = ~10 nm alatti) a két polielektrolit (PSS, Chit) alkalmazásával is a kolloid mérettartományban maradt (BSA/IBU/PSS = ~130 nm, BSA/IBU/PSS/Chit = ~230 nm). Az elméleti számolások alapján több BSA molekula összekapcsolódása alkotja a magot, amelynek mérete ~47 nm, míg a héj vastagsága ~20 nm. Ezt a SAXS mérések is igazolták, ugyanis, mind az egyrétegű, mind a kétrétegű mag-héj kompozit esetében

aggregátumok jelenlétét bizonyítottuk. A legkülső Chit héj pozitív töltése ( $\sim +6$  mV) a sejtekhez (negatív töltésűek) való célzott kötődést biztosíthatja. A héjak jól szabályozzák a kioldódás sebességét, 30%-kal több hatóanyag maradt a kompozitban az 500 perces kioldódási vizsgálat végén a héj nélküli kompozithoz képest. A kinetikai modellek eredményei is visszatükrözik a héjak szerepét, a kioldódási sebességek nagyságrendekkel kisebbek a polielektrolit hájak számának növelésével. A BSA/IBU/PSS/Chit kompozit esetében nulladrendű kioldódással jellemezhető a hatóanyag leadás kinetikája, azaz egy jól-szabályozott koncentrációtól független folyamat megy végbe.

5. Az N-állapotban ( $\text{pH} = 7,4$ ) lévő fehérjét egy a központi idegrendszerre ható gyógyszer, a KYNA „kapszulázására” használtam fel. A vér-agy gáton történő átjutás feltétele a 100 nm körüli vagy alatti méret, így a kísérleteimet egy polielektrolit héjjal, a PAH-nal végeztem el. Mivel ennek az mag-héj nanokompozitnak a mérete elérte ezt a határt, így további réteg kialakítását nem kíséreltem meg. A hatóanyagot nem tartalmazó, azaz az üres kompozit mérete csupán 20 nm, így feltehetőleg a hatóanyag és a PAH között jön létre erősebb kölcsönhatás, amelyet megerősítenek a CD-spektrumok és a belőlük számolt  $\alpha$ -hélix tartalmak. A KYNA stabilitási vizsgálatainak megfelelően, az *in vitro* kioldódási vizsgálatok első egy óra mérési eredményei szolgálnak alapul a kinetikai számolásoknak, ahol a KYNA PBS-pufferben még stabilnak tekinthető. A BSA/KYNA/PAH mag-héj kompozit hatóanyag kioldódására a legjobban illeszkedő ( $R^2 = 0,997$ ) kinetikai modell, a nulladrendű sebességi modell, azaz adott időintervallum alatt azonos mennyiségű hatóanyag felszabadulást tapasztalunk a koncentrációtól függetlenül. A PAH réteg alkalmazásával tehát, a KYNA kioldódására egy jól szabályozott, lassú kioldási folyamat valósítható meg.

6. Fehérje-tenzid (NaDS) komplexeket állítottam elő 3-as pH-n, ahol szintén a komponensek ellentétes töltéseit használtam ki a kölcsönhatások létrehozásához. A BSA NaDS-tal való kicsapása ad lehetőséget a hatóanyag (IBU) „becsomagolására”. A tenzid rendezettségi foka a BSA jelenlétében jelentősen lecsökkent, a  $d_L$  távolságok az alkilláncok „összecsúszására” következtek. Az NaDS/IBU, valamint a BSA/IBU/NaDS kompozitok esetében a tenzid szmektikus folyadékkristályos szerkezete megmaradt, azaz a hatóanyag stabilizálja a kompozit szerkezetét. Az IBU koncentrációjának növekedésével a rendezettség növekedést mutat, amelyet a SAXS szórásgörbén megjelenő, egyre nagyobb intenzitású csúcsok mutatnak. A BSA szerkezetére ( $\text{pH} = 3$ , kitekeredett) jellemző tömegfraktál az IBU hatására a felületfraktál irányába tolódik, amely a közöttük létrejövő kölcsönhatás létrejöttét bizonyítja. A kioldódás folyamatát a koncentráció gradiensen túl, a pH-változása idézi elő. A kioldódási profilok azt mutatják, hogy a tenzid nagyobb fokú visszatartást jelent az IBU

szabályozott leadásban, mint fehérje jelenlétében: az IBU kioldódása a c13-BSA/IBU/NaDS kompozitból 28%, míg az NaDS/IBU kompozitból 17% 500 perc elteltével, amely rendszerekre koncentráció-függő kioldódás jellemző. A kisebb koncentrációjú IBU-tartalmú kompozitból a hatóanyag kioldódás kinetikáját az erózió,- és a diffúzió szabályozza ( $R^2 = 0,998$ ). A tenzid tartalmú kompozitok esetében - amelyek XRD mérésekkel bizonyítottan rendezett szerkezetűek - a BSA perturbációt okoz a folyadékkristály rendezettségében, amely hatására gyorsabb hatóanyag kioldódás ment végbe. Az eddigi rendszerekhez képest egy jóval inkább szabályozott, kis kioldódási sebességgel (c13-BSA/IBU/NaDS;  $k_d = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) jellemezhető rendszert kaptunk, amely igen ígéretes lehet a jövőre nézve.

## 7. Summary

Application of drug delivery systems may be the solution for treatment of more and more diseases recently. Non-targeted drug delivery, too early excretion of the drug, sudden injection of a too high or too low concentration of the drug may all decrease the efficiency of the treatment. That is the reason why our goal was to develop such core-shell nanocomposites and bioconjugates that would encapsulate drug molecules that have solubility limits (IBU) or they are hindered by the defence system of the human body (KYNA). We also wanted to examine the release of the encapsulated drug *in vitro* and to characterize the controlling process of the release mechanism under physiological circumstances. The most important information acquired during my dissertation shall be summarized.

1. Mesoporous silica has been synthesized by the hydrolysis of TEOS with the application of a structure controlling agent for transporting IBU which is a nonsteroidal anti-inflammatory drug that poorly dissolves in water. The encapsulation of a great amount of drug (1.6 g IBU / g SiO<sub>2</sub>) is available due to the huge surface area and mesoporous structure of the core. The size of the core-shell composites can vary from colloid to micron range (from around 400 to 1140 nm) depending on the number of the polyelectrolyte shells which build up the core-shell composites through electrostatic interactions in a proper concentration. Knowing the diameter of the core and the amount of substances used it is possible to predict both the size of the composite and the thickness of the shell with model calculations. Increasing the number of shells not only slows the release of the IBU down but causes the processes controlling the release to follow different kinetic mechanisms. While the release of the IBU is only controlled by diffusion, the release from the SiO<sub>2</sub>/IBU composites has a zero-order kinetic mechanism meaning the release rate of the drug is independent from the drug concentration. The release of the IBU from one-layered composites is concentration dependent while its release from two-layered composites is controlled by erosion and diffusion (Korsmeyer-Peppas model).

2. Secondary and tertiary structures of the BSA core (3 mg/ml) in dependence of the pH in the absence and presence of salt have been examined for preparation of protein-based core-shell composites. The folded/unfolded states of the protein can be predicted by the intensity of the fluorescence emission of Trp: the highest intensity was measured in N-form (4.3 < pH < 8.0) while lower emission intensity in E- (2.7 < pH < 4.3) or B-form (8.0 < pH < 10.0) suggests an unfolded shape of the protein. The protein has the highest  $\alpha$ -helical content

in N-form (~62% without salt, ~51% in 150 mM NaCl solution) while the aggregated form has the lowest amount (~2.5%). Shifting of the pH towards acidic or basic range results in the decrease of the main secondary structure and increase in the aggregated form. The BSA has high stability and low hydrodynamic diameter in the absence of 150 mM NaCl while in the solution mentioned it has lower stability and increased size. The molecular weight values of the BSA solution without the salt imply monomer form while the dimer form ratio is increased with the presence of 150 mM NaCl. The negative values of the secondary virial coefficients support this statement since the presence of well hydrated protein is proven without salt while the negative  $A_2$  values indicate that the protein is in an aggregated form in the presence of the salt.

3. The interactions between the BSA and the drug were studied by fluorescence spectroscopy. Two hydrophobic molecules were chosen for the quenching processes which cause change only in the emission intensity. They were the KP and the ANS molecules. Based on the Stern-Volmer equations used for the fluorescence intensities, the presence of both static and dynamic quenching processes causes the decrease in the emission intensity of the BSA with the application of both molecules so further equations were used for acquisition of quantitative information ( $k$ ,  $f$ ,  $n$ ,  $\Delta G$ ). The hydrophobic molecules seem to have higher binding in E-form (pH = 3) (the hydrophobic parts of the molecules are turned outside) compared to the native-state (pH = 7) which comes with higher binding energy. Negative values of the Gibbs free energy, implying spontaneous processes with high affinity, are between -15 and -33 kJ/mol depending on the pH and the applied molecule.

4. The biopolymer in unfolded form (BSA, E-form, pH = 3) was used for targeting the IBU molecules as well. The solubility of the drug increased with the application of the biocompatible substance since the number of dissolved molecules continuously increased as the number of the bound drug molecules was risen. During the preparation of the composites 65-fold of the solubility limit (0.021 mg/ml) was used, 93.65% of which remained in the BSA/IBU composite which is equivalent to a concentration of 1.286 mg/ml IBU molecules. The protein also went through a greater structural change due to the IBU: SAXS measurements verify the formation of a chain-like form. The size of the composites (protein core < 10 nm) stays in colloid range even with the application of the two polyelectrolytes (PSS, Chit) (BSA/IBU/PSS around 130 nm, BSA/IBU/PSS/Chit around 230 nm). Based on theoretical calculations the core is created by the connection of more BSA molecules (the size of the core and the thickness of the shell are around 47 nm and 20 nm, respectively) which is supported by SAXS measurements since the presence of aggregates is proven both in the case

of one and two-layered composites. The positive charge (around +6 mV) of the outermost Chit shell can provide targeted binding to the cells (negatively charged). The release rate is well controlled by the shells: 30% more drug molecules remained in the composite after 500 minutes of release experiment compared to composite without a shell. Results from the kinetic models represent the role of the shells, the release rate increases by orders of magnitude with the number of shells. The dissolution of the drug can be characterized by zero-order rate model in the case of BSA/IBU/PSS/Chit composites: a well-controlled process takes place which is independent from its concentration.

5. The protein in N-form (pH = 7.4) was used to encapsulate a central nervous system active agent, called KYNA. Crossing the blood-brain barrier requires a particle size of maximum 100 nm or less so the experiments were carried out with one polyelectrolyte shell, the PAH. Since the size of this core-shell nanocomposite reached the limit, no attempts were executed for creating further shells. The size of the “empty” composite, the one not containing the drug, is merely 20 nm so a strong interaction is believed to be present between the drug and the PAH which is supported by the CD spectra and the  $\alpha$ -helix content derived from the spectra. The results of the first hour of the *in vitro* release experiments were used for kinetic calculations accordingly with KYNA stability tests where the KYNA is considered to be stable in PBS-buffer. The zero-order rate model fits best ( $R^2 = 0.997$ ) for the drug release from the BSA/KYNA/PAH core-shell composite meaning that same amount of drug release was experienced in a same time interval, independent from the drug concentration. A well-controlled, slow release of the KYNA can be acquired by the application of a PAH shell.

6. Protein-surfactant (NaDS) complexes were synthesized at pH = 3 where the oppositely charges of the components were used to create interactions. Precipitation of the BSA by NaDS gives opportunity for the encapsulation of the drug molecules. The crystallization degree of the surfactant decreases in presence of BSA, the distance values of  $d_L$  suggest cross-sliding of the alkyl chains. The smectic liquid crystal structure of the surfactants remains in the case of NaDS/IBU and BSA/IBU/NaDS composites meaning that the drug stabilizes the structure of the composites. The crystallization degree seems to rise with the increase of IBU concentration which is supported by the continuously increasing intensity peaks appearing on the SAXS scattering curve. The mass fractal, which is characteristic for the structure of the BSA (pH = 3, unfolded), shifts towards surface fractal due to the presence of IBU which proves the development of interactions between them. The process of the release is caused by the change of the pH besides the concentration gradient. Release profiles show that the surfactant has a higher retention in the controlled release of the IBU compared

to the protein: release of the IBU from the c13-BSA/IBU/NaDS composite is 28% while release of the IBU from NaDS/IBU composite is 17% after 500 minutes and the release for both composite types is concentration dependent. The kinetics of the drug release from the composite with the lower IBU concentration is controlled by erosion and diffusion ( $R^2 = 0,998$ ). In the case of composites containing surfactants which, proven by XRD measurements, have ordered structure; the BSA causes perturbation so the release rate of the drug becomes higher. A composite with better controlled, low release rate (c13-BSA/IBU/NaDS;  $k_d = 7.0 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ) was acquired compared to the composites synthesized so far which can be really promising in the future.

## Irodalom jegyzék

- [1] K. Chatterjee, S. Sarkar, K.J. Rao, S. Paria, Core/shell nanoparticles in biomedical applications, *Adv. Colloid Interface. Sci.* 209 (2014) 8–39.
- [2] N. Sanvicens, M.P. Marco, Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 425–433.
- [3] J.M. Wilkinson, Nanotechnology applications in medicine. *Med. Device Technol.* 14 (2003) 29–31.
- [4] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 505–515.
- [5] W. Schärfl, Current directions in core–shell nanoparticle design. *Nanoscale* 2 (2010) 829–843.
- [6] R. Gabathuler, Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases, *Neurobiology of Disease* 37 (2010) 48–57.
- [7] D. Bennet, S. Kim, Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery, *Nanotechnology and Nanomaterials "Application of Nanotechnology in Drug Delivery* (2014)
- [8] L. Juillerat-Jeanneret, The targeted delivery of cancer drugs across the blood–brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles, *Drug Discov. Today.* 13 (2008) 23–24
- [9] L. Shang, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters, *J. Nanobiotechnology.* 12 (2014) 5.
- [10] X. Lin, N. Zhao, P. Yan, H. Hu, F.-J. Xu, The shape and size effects of polycation functionalized silica nanoparticles on gene transfection, *Acta Biomater.* 11 (2015) 381–392.
- [11] S. Papadimitriou, D. Bikiaris, Novel self-assembled core–shell nanoparticles based on crystalline amorphous moieties of aliphatic copolyesters for efficient controlled drug release. *J. Control. Release* 138 (2009) 177–184.
- [12] D.B. Shenoy, M.M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer, *Int. J. Pharm.* 293 (2005) 261–270.
- [13] E. Gullotti, Y. Yeo, Extracellularly activated nanocarriers: A new paradigm of tumor targeted drug delivery, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1041–1051
- [14] S. Bhaskar, F. Tian, T. Stoeger, W. Kreyling, J.M. Fuente, V. Grazú, P. Borm, G. Estrada, V. Ntziachristos, D. Razansky, Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging, *Part. Fibre Toxicol.* 7 (2010) 3.
- [15] G. Zhou, Y. Lu, H. Zhang, Y. Chen, Y. Yu, J. Gao, D. Sun, G. Zhang, H. Zou, Y. Zhong, A novel pulsed drug-delivery system: polyelectrolyte layer-by-layer coating of chitosan–alginate microgels, *Int. J. Nanomedicine*, 8 (2013) 877–887.
- [16] M.C. Berg, L. Zhai, R.E. Cohen, M.F. Rubner, Controlled drug release from porous polyelectrolyte multilayers, *Biomacromolecules*, 7 (2006) 357–364.
- [17] Smith, Kline & French, “The Remarkable New Preparation [Dexamyl advertisement],” *Am. J. Med. Sci.* 220 (1950) 6.
- [18] H. Wen, K. Park, Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice, (Wiley) New York (2010) 363.
- [19] Y. Yun, B.K. Lee, K. Park, Controlled drug delivery systems: the next 30 years, *Front. Chem. Sci. Eng.* 8 (2014) 276–279.
- [20] K. Park, Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *J. Control. Release* 190 (2014) 3–8.
- [21] L. Brannon-Peppas, N.A. Peppas, Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanisms of drug release from pH-sensitive swelling-controlled systems, *J. Control. Release* 8 (1989) 267–274.
- [22] D. Bermudes, B. Low, J. Pawelek, Tumor-targeted salmonella. Highly selective delivery vectors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 465 (2000) 57–63.
- [23] P.M. Tiwari, K. Vig, V.A. Dennis, S.R. Singh, Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications, *nanomaterials* 1 (2011) 31–63.
- [24] M.L. Hans, A.M. Lowman, biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6 (2002) 319–327.



- [25] R.A. Siegel, M.J. Rathbone, Overview of controlled release mechanisms. In: J. Siepmann, R.A. Siegel, M.J. (Rathbone, Eds.) *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. Springer, New York (2012) 19–43.
- [26] H.M. Mansour, M. Sohn, A. Al-Ghananeem, P.P. De Luca, Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 3298–3322.
- [27] S.K. Sahoo, V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today* 8 (2003) 1112–1120.
- [28] S. Chen, L. Wang, S.L. Duce, S. Brown, S. Lee, A. Melzer, Engineered biocompatible nanoparticles for in vivo imaging applications, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 15022–15029.
- [29] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1357 (2014) 36–52.
- [30] E. von Haartman, H. Jiang, A.A. Khomich, J. Zhang, S.A. Burikov, T.A. Dolenko, J. Ruokolainen, H. Gu, O.A. Shenderova, I.I. Vlasov, J.M. Rosenholm, Core-shell designs of photoluminescent nanodiamonds with porous silica coatings for bioimaging and drug delivery I: fabrication, *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013) 2358–2366.
- [31] M.A. Trojer, Polymeric Core-Shell Particles: Physicochemical properties and controlled release, in *encyclopedia of surface and colloid science*, 2<sup>nd</sup> Ed. (2014)
- [32] A.S. Wadajkar, Z. Bhavsar, C.-Y. Ko, B. Koppolu, W. Cui, L. Tang, K.T. Nguyen, Multifunctional particles for melanoma-targeted drug delivery, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2996–3004.
- [33] P. Agarwal, J.K. Choi, H. Huang, S. Zhao, J. Dumbleton, J. Li, X. He, A biomimetic core-shell platform for miniaturized 3D cell and tissue engineering, *Part. Part. Syst. Charact.* 32 (2015) 809–816.
- [34] K. Sparnacci, M. Laus, L. Tondelli, L. Magnani, C. Bernardi, Core-shell microspheres by dispersion polymerization as drug delivery systems, *Macromol. Chem. Phys.* 203 (2002) 1364–1369.
- [35] K.M. Ho, W.Y. Li, C.H. Wong, P. Li, Amphiphilic polymeric particles with core-shell nanostructures: emulsion-based syntheses and potential applications, *Colloid Polym. Sci.* 288 (2010) 1503–1523.
- [36] J. Zhanga, P.X. Ma, Core-shell structured nanoassemblies based on  $\beta$ -cyclodextrin containing block copolymer and poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) via host-guest complexation, *Polymer* 52 (2011) 4928–4937.
- [37] M. Bottini, F.D. Annibale, A. Magrini, F. Cerignoli, Y. Arimura, M.I. Dawson, E. Bergamaschi, N. Rosato, A. Bergamaschi, T. Mustelin, Quantum dot-doped silica nanoparticles as probes for targeting of T-lymphocytes. *Int. J. Nanomed.* 2 (2007) 227 - 233.
- [38] L. Tang, J. Cheng, Nonporous Silica Nanoparticles for Nanomedicine Application, *Nano Today*. 8 (2013) 290–312.
- [39] F. Tang, L. Li, D. Chen, Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery, *Adv. Mater.* 24 (2012) 1504–1534
- [40] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance and biocompatibility in vivo, *ACS Nano* 5 (2011) 5390–5399.
- [41] M.Q. Zhu, J. H. Jason, D.Q. Li Alexander, CdSe/CdS/SiO<sub>2</sub> core/shell/shell nanoparticles, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2007) 2343–2348.
- [42] K. Dormer, C. Seeney, K. Lewelling, G. Lian, D. Gibson, M. Johnson, Epithelial internalization of superparamagnetic nanoparticles and response to external magnetic field, *Biomater.* 26 (2005) 2061–2072.
- [43] J. Allouche, M. Boissiere, C. Helary, J. Livage, T. Coradin, Biomimetic core-shell gelatine/silica nanoparticles: a new example of biopolymer-based nanocomposites, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 3120–3125.
- [44] Q. Huo, J. Liu, L.-Q. Wang, Y. Jiang, T.N. Lambert, E. Fang, A new class of silica cross-linked micellar core-shell nanoparticles, *J. Amer. Chem. Soc.* 128 (2006) 6447–6453.
- [45] W. Stober, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62–69.
- [46] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, *Nature* 359 (1992) 710–712.

- [47] I.I. Slowing, J.L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1278–1288.
- [48] H. Chen, Y. Wang, Preparation of MCM-41 with high thermal stability and complementary textural porosity, *Ceram. Int.* 28 (2002) 541–547.
- [49] H. Wanyika, E. Gatebe1, P. Kioni, Z. Tang, Yan Gao, Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica nanoparticles with tunable physical properties by varying molar composition of reagents, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5 (2011) 2402–2410.
- [50] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R. P. del Real, J. Pérez-Pariente, A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater.* 13 (2001) 308–311.
- [51] J. Lu, M. Liong, J.I. Zink, F. Tamanoi, Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs, *Small* 3 (2007) 1341–1346.
- [52] M. Ruiz-Rico, C. Fuentes, É. Pérez-Esteve, A.I. Jiménez-Belenguer, A. Quiles, M.D. Marcos, R. Martínez-Mañez, J.M. Barat, Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles, *Food Control.* 56 (2015) 77–85.
- [53] S. Berkó, M. Maroda, M. Bodnár, G. Erős, P. Hartmann, K. Szentner, P. Szabó-Révész, L. Kemény, J. Borbély, E. Csányi, Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 2511–2517.
- [54] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *J. Control. Release* 157 (2012) 168–182.
- [55] C.J.H. Porter, N.L. Trevaskis, W.N. Charman, Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 231–248.
- [56] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today*, 10 (2005) 35–43.
- [57] J.-W. Yoo, D.J. Irvine, D.E. Discher, S. Mitragotri, Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 521–535.
- [58] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48.
- [59] V. Hornok, T. Bujdosó, J. Toldi, K. Nagy, I. Demeter, C. Fazakas, I. Krizbai, L. Vécsei, I. Dékány, Preparation and properties of nanoscale containers for biomedical application in drug delivery: preliminary studies with kynurenic acid, *J. Neural. Transm.* 119 (2012) 115–21.
- [60] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1638–1649.
- [61] G.A. Hughes, Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.* 1 (2005) 22–30.
- [62] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385 (2010) 113–142.
- [63] F. Kratz, Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *J. Control. Release*, 132 (2008) 171–183.
- [64] G.V. Patil, Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery, *Drug Dev. Res.* 58 (2003) 219–247.
- [65] K. Yamasaki, V.T. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 5435–5443.
- [66] K. Ren, A. Dusad, R. Dong, L. Quan, Albumin as a Delivery Carrier for Rheumatoid Arthritis, *J. Nanomed Nanotechnol* 4 (2013) 4.
- [67] Q.-S. Tang, D.-Z. Chen, W.-Q. Xue, J.-Y. Xiang, Y.-C. Gong, L. Zhang, C.-Q. Guo, Preparation and biodistribution of 188Re-labeled folate conjugated human serum albumin magnetic cisplatin nanoparticles in vivo *Int. J. Nanomedicine*, 6 (2011) 3077–3085.
- [68] B. Elsadek, F. Kratz, Impact of albumin on drug delivery-New applications on the horizon, *J. Control. Release* 157 (2012) 4–28.
- [69] K. Park, Albumin: A versatile carrier for drug delivery, *J. Controlled Release* 157 (2012) 3.
- [70] R. Flisiak, I. Flisiak, Albinterferon-alpha 2b: a new treatment option for hepatitis C, *Expert Opin. Biol. Ther.* 10 (2010) 1509–1515.

- [71] M. Dadparvar, S. Wagner, S. Wien, J. Kufleitner, F. Worek, H. von Briesen, J. Kreuter, HI 6 human serum albumin nanoparticles—development and transport over an in vitro blood–brain barrier model, *Toxicol. Lett.* 206 (2011) 60–66.
- [72] K. Ulbrich, T. Hekmatara, E. Herbert, J. Kreuter, Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 251–256.
- [73] L. Pocivavsek, R. Dellsy, A. Kern, S. Johnson, B. Lin, K. Yee, C. Lee, E. Cerda, Stress and Fold Localization in Thin Elastic Membranes, *Science*, 320 (2008) 912–916.
- [74] R. Nagarajan, Polymer-surfactant interactions. in “new horizons: detergents for the new millennium conference invited papers”, published by American Oil Chemists Society and Consumer Specialty Products Association, Fort Myers, Florida (2001).
- [75] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1650–1662.
- [76] M. Maroda, M. Bodnár, S. Berkó, J. Bakó, G. Erős, E. Csányi, P. Szabó-Révész, J.F. Hartmann, L. Kemény, J. Borbély, Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system, *Carbohydr Polym.* 83 (2011) 1322–1329.
- [77] T. Halasová, J. Krouská, F. Mravec, M. Pekar, Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques, *Colloids Surf. A* 391 (2011) 25–31.
- [78] R. Ionov, A. El-Abed, M. Goldmann, P. Peretti, Interactions of lipid monolayers with the natural biopolymer hyaluronic acid, *Biochim. Biophys. Acta* 1667 (2004) 200–207.
- [79] R.J. Petrella, Hyaluronic acid for the treatment of knee osteoarthritis: long-term outcomes from a naturalistic primary care experience, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 84 (2005) 278–283.
- [80] P. Caione, N. Capozza, Endoscopic treatment of urinary incontinence in pediatric patients: 2-year experience with dextranomer/hyaluronic acid copolymer, *J. Urol.* 168 (2002) 1868–1871.
- [81] M. Brown, S. Jones, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 19 (2005) 308–318.
- [82] S. Arpicco, C. Lerda, E.D. Pozza, C. Costanzo, N. Tsapis, B. Stella, M. Donadelli, I. Dando, E. Fattal, L. Cattel, M. Palmieri, Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine, *European J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 373–380.
- [83] J.-H. Park, H.-J. Cho, H.Y. Yoon, I.-S. Yoon, S.-H. Ko, J.-S. Shim, J.-H. Cho, J.H. Park, K. Kim, I.C. Kwon, D.-D. Kim, Hyaluronic acid derivative-coated nanohybrid liposomes for cancer imaging and drug delivery, *J. Control. Release* 174 (2014) 98–108.
- [84] J. Huang, H. Zhang, Y. Yu, Y. Chen, D. Wang, G. Zhang, G. Zhou, J. Liu, Z. Sun, D. Sun, Y. Lu, Y. Zhong, Biodegradable self-assembled nanoparticles of poly (D,L-lactide-coglycolide)/hyaluronic acid block copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer, *Biomaterials* 35 (2014) 550–566.
- [85] L. Shang, Y. Wang, J. Jiang, S. Dong, pH-dependent protein conformational changes in albumin: gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study, *Langmuir* 23 (2007) 2714–2721.
- [86] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *Journal of Biotechnology* 79 (2000) 259–268.
- [87] M. Dockal, D.C. Carter, F. Ruker, Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3042–3050.
- [88] J.J. Babcock, L. Brancalion, Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength, *International Int. J. Biol. Macromolec.* 53 (2013) 42–53.
- [89] A.K. Shaw, S.K. Pal, Spectroscopic studies on the effect of temperature on pH-induced folded states of human serum albumin, *J. Photochem. Photobiol.* 90 (2008) 69–77.
- [90] L.R.S. Barbosa, M.G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff, R. Itri, The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle x-ray scattering study, *Biophys. J.* 98 (2010) 147–157.
- [91] P. Sen, B. Ahmad, G. Rabbani, R.H. Khan, 2,2,2-Trifluoroethanol induces simultaneous increase in -helicity and aggregation in alkaline unfolded state of bovine serum albumin, *Int. J. Biol. Macromolec.* 46 (2010) 250–254.
- [92] T. Kosa, T. Maruyama, N. Otagiri, Species differences of serum albumins: II chemical and thermal stability, *Pharm. Res.* 15 (1998) 449–454.

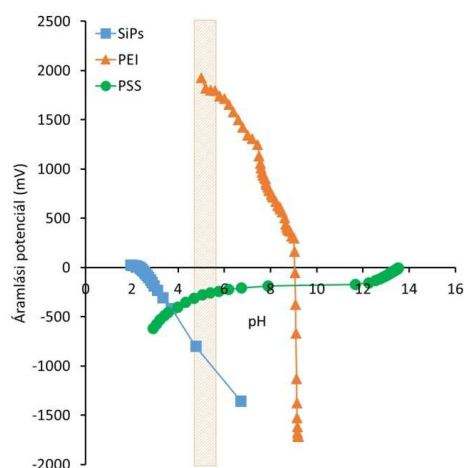
- [93] S. Krimm, J. Bandekar, Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38 (1986) 181–364.
- [94] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 1073–1101.
- [95] A. Barth, C. Zscherp, What vibrations tell us about proteins, *Q. Rev. Biophys.* 35 (2002) 369–430.
- [96] J. Kong, S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta. Biochim. Biophys. Sinica* 39 (2007) 549–559.
- [97] D.M. Byler, H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. *Biopolymers* 25 (1986) 469–487.
- [98] J.T. Pelton, L.R. McLean, Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, *Anal. Biochem.* 277 (2000) 167–176.
- [99] D. Agudelo, P. Bourassa, J. Bruneau, G. Bérubé, É. Asselin, H.A. Tajmir-Riahi, Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and n-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins, *PLoS One*. 7 (2012) 43814.
- [100] J. Banker, Amide modes and protein conformation. *Biochim Biophys Acta* 1120 (1992) 123–143.
- [101] L.Z. Zhao, R.T. Liu, X.C. Zhao, B.J. Yang, C.Z. Gao, X.P. Hao, Y.Z. Wu, New strategy for the evaluation of CdTe quantum dot toxicity targeted to bovine serum albumin, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 5019–5023.
- [102] C. Zheng, H. Wang, W. Xu, C. Xu, J. Liang, H. Han, Study on the interaction between histidine-capped Au nanoclusters and bovine serum albumin with spectroscopic techniques, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 118 (2014) 897–902.
- [103] D. Wu, J. Yan, J. Wang, Q. Wang, H. Li, Characterisation of interaction between food colourant allura red AC and human serum albumin: Multispectroscopic analyses and docking simulations, *Food Chem.* 170 (2015) 423–429.
- [104] H. Xu, N. Yao, T. Wang, G. Li, Z. Li, Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 14185–14203.
- [105] S.R. Martin, M.J. Schilstra, G. Siligardi, Chapter 7: circular dichroism. In: A. Podjarmy, A. Dejaegere, B. Kieffer (eds) *Biophysical approaches determining ligand binding to biomolecular targets, detection, measurement and modelling*. RSC Publishing, Cambridge, (2011) 226–246.
- [106] G. Siligardi, R. Hussain, Biomolecules interactions and competitions by non-immobilised ligand interaction assay by circular dichroism, *Enantiomer*, 3 (1998) 77–87.
- [107] G. Siligardi, R. Hussain, S.G. Patching, M.K. Phillips-Jones, Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 34–42.
- [108] L.A. Munishkina, A.L. Fink, ‘Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins’, *Biochim. Biophys. Acta*, 1768 (2007) 1862–1885.
- [109] P.L. Gentili, F. Ortica, G. Favaro, Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV–visible absorption and fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 16793–16801.
- [110] S. Neelam, M. Gokara, B. Sudhamalla, D.G. Amooru, R. Subramanyam, Interaction studies of coumaroyltyramine with human serum albumin and its biological importance. *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 3005–3012.
- [111] A.G. Rocco, L. Mollica, P. Ricchiuto, A.M. Baptista, E. Gianazza, I. Eberini, Characterization of the protein unfolding processes induced by urea and temperature, *Biophys J.* 94 (2008) 2241–2251.
- [112] M. van de Weert, L. Stella, Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology, *J. Mol. Struct.* 998 (2011) 144–150.
- [113] A.E. Johnson, Fluorescence Approaches for Determining Protein Conformations, Interactions and Mechanisms at Membranes, *Traffic* 6 (2005) 1078–1092.
- [114] S. Soares, N. Mateus, V. De Freitas, Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 6726–6735.
- [115] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 3<sup>rd</sup> ed. (Springer) New York, (2006).
- [116] Y.-J. Hu, Y. Liu, Z.-B. Pi, S.-S. Qu, Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 6609–6614.

- [117] C.B. Murphy, Y. Zhang, T. Troxler, V. Ferry, J.J. Martin, W.E. Jones, Probing Förster and Dexter Energy-Transfer Mechanisms in Fluorescent Conjugated Polymer Chemosensors, *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004) 1537-1543.
- [118] R.H. Müller, S. Schmidt, I. Buttle, A. Akkar, J. Schmitt, S. Brömer, SolEmuls-novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 293-302.
- [119] B.Y. Shekunov, P. York, Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. *J. Cryst. Growth*, 211 (2000) 122-136.
- [120] E. Merisko-Liversidge, G.G. Liversidge, E.R. Cooper, Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 113-120.
- [121] M. Sarkari, J. Brown, X. Chen, S. Swinnea, R.O. III. Williams, K. P. Johnston, Enhanced drug dissolution using evaporative precipitation into aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 243 (2002) 17-31.
- [122] D.B. Beten, A.J. Moës, Controlled-release coevaporates of dipyridamole prepared with acrylic polymers. *Int. J. Pharm.* 103 (1994) 243-251.
- [123] H. Cohen, R.J. Levy, J. Gao, I. Fishbein, V. Kousaev, S. Sosnowski, S. Slomkowski, G. Golomb, Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 7 (2000) 1896-1905.
- [124] E. Allémann, E. Doelker, R. Gurny, Drug loaded poly(lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39 (1993) 13-18.
- [125] M. Bival-Benita, S. Romeijn, H. E. Juninger, G. Borchard, PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 1-6.
- [126] H.-J. Krause, A. Schwarz, P. Rohdewald, Polylactic acid nanoparticles, a colloidal delivery system for lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 27 (1985) 145-155.
- [127] W.M. Pardridge, Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* 12 (2007) 54-61.
- [128] L.K. Fung, M.G. Ewend, A. Sills, E.P. Sipos, R. Thompson, M. Watts, O.M. Colvin, H. Brem, W.M. Saltzman, Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain, *Cancer Res.* 58 (1998) 672-684.
- [129] D.D. Allen, P.R. Lockman, K.E. Roder, L.P. Dwoskin, P.A. Crooks, Active transport of high-affinity choline and nicotine analogs into the central nervous system by the blood-brain barrier choline transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 (2003) 1268-1274.
- [130] S. Wohlfart, S. Gelperina, J. Kreuter, Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles, *J. Control. Release* 161 (2012) 264-273
- [131] J. Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug. Del. Rev.* 64 (2012) 213-222,
- [132] J. Kreuter Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug. Del. Rev.* 47 (2001) 65-81.
- [133] H. Chen, Y. Qin, Q. Zhang, W. Jiang, L. Tang, J. Liu, Q. He, Lactoferrin modified doxorubicin-loaded procationic liposomes for the treatment of gliomas. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 164-173.
- [134] W. Ke, K. Shao, R. Huang, L. Han, Y. Liu, J. Li, Y. Kuang, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated polyethyleneglycol modified polyamidoamine dendrimer, *Biomaterials* 30 (2009) 6976-6985.
- [135] K. Shao, R. Huang, J. Li, L. Han, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain, *J. Control. Release* 147 (2010) 118-126.
- [136] M. Kumar, A. Misra, A.K. Mishra, P. Mishra, K. Pathak, Mucoadhesive nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of olanzapine for brain targeting. *J Drug Target.* 16 (2008) 806-814.
- [137] B. E. Rabinow, Nanosuspensions in drug delivery, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3 (2004) 785-796.
- [138] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 1088-1118.
- [139] R. Langer, N. Peppas, Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. *J. Macromol. Sci. Part C.* 23 (1983) 61-126.
- [140] E. Cauchetier, M. Deniau, H. Fessi, A. Astier, M. Paul, Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 273-281.

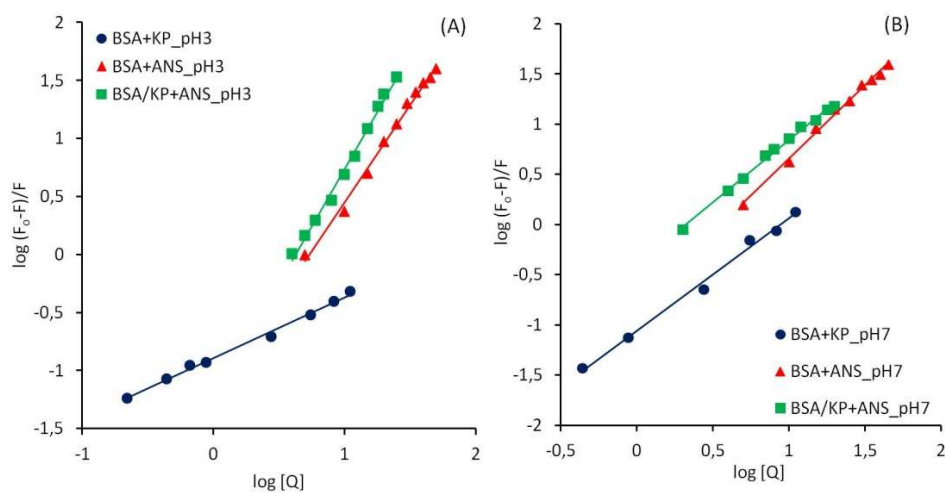
- [141] S. Herrlich, S. Spieth, S. Messner, R. Zengerle, Osmotic micropumps for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1617-627.
- [142] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 27-46.
- [143] H.S. Yoo, T.G. Park, Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer, *J. Control. Release* 70 (2001) 63-70.
- [144] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, A. Axelsson, The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review. *Int. J. Pharm.* 415 (2011) 34-52.
- [145] S.A. Abouelmagd, H. Hyun, Y. Yeo, Extracellular lyactivatable nanocarriers for drug delivery to tumors. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11 (2014) 1601-1618.
- [146] M. Talelli, M. Iman, A.K. Varkouhi, C.J.F. Rijcken, R.M. Schiffelers, T. Etrych, K. Ulbrich, C.F. van Nostrum, T. Lammers, G. Storm, W.E. Hennink, Core-crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped doxorubicin, *Biomaterials* 31 (2010) 7797-7804.
- [147] A. Dokoumetzidis, P. Macheras, A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System, *Int. J. Pharm.* 321 (2006) 1-11.
- [148] T. Higuchi, Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 11 (1961) 85-97.
- [149] T. Higuchi, Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions. *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 874-875.
- [150] T.T. Wang, T.K. Kwei, H.L. Frisch, Diffusion in glassy polymers. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 7 (1969) 2019-2028.
- [151] J.C. Fu, C. Hagemer, D.L. Moyer, Unified mathematical model for diffusion from drug-polymer composite tablets. *J. Biomed. Mater. Res.* 10 (1976) 743-758.
- [152] N.A. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60 (1985) 110-111.
- [153] Z. Wu, H. Joo, T.G. Lee, K. Lee, Controlled release of lidocaine hydrochloride from the surfactant-doped hybrid xerogels, *J. Control. Rel.* 104 (2005) 497-505.
- [154] S. Wang, Ordered mesoporous materials for drug delivery, *Micropor. Mesopor. Mater.* 117 (2009) 1-9.
- [155] Z. Gu, A.C. Thomas, P. Xu, J.H. Campbell, G.Q. Lu, In vitro sustained release of LMWH from MgAl-layered double hydroxide nanohybrids. *Chem Mater.* 20 (2008) 3715-3722.
- [156] J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 328-343.
- [157] B. Narasimhan, Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 195-210.
- [158] V. Lemaire, J. Bélair, P. Hildgen, Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int. J. Pharm.* 258 (2003) 95-107.
- [159] A.W. Hixson, J.H. Crowell, Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation, *Ind. Eng. Chem.* 23 (1931) 923-931.
- [160] S. Chen, J. Zhu, J. Cheng, Preparation and in vitro evaluation of a novel combined multiparticulate delayed-onset sustained-release formulation of diltiazem hydrochloride. *Pharmazie* 62 (2007) 907-913.
- [161] B. Narasimhan, S.K. Mallapragada, N.A. Peppas, Release kinetics, data interpretation. in: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. Eds, (Wiley), New York (1999) 921.
- [162] M.N. Freitas, J.M. Marchetti, Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 201-211.
- [163] M. Gibaldi, D. Perrier, 2<sup>nd</sup> Edition. *Pharmacokinetics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Marcel Dekker, Inc, New York and Basel 15 (1982).
- [164] M. Grassi, G. Grassi, Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems, *Curr. Drug Deliv.* 2 (2005) 97-116.
- [165] X. Wang, X. Ma, C. Song, D.R. Locke, S. Siefert, R.E. Winans, J. Möllmer, M. Lange, A. Möller, R. Gläser, *Micropor. Mesopor. Mater.* 169 (2013) 103-111.
- [166] M.V. Petoukhov, D. Franke, A.V. Shkumatov, G. Tria, A.G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H.D.T. Mertens, P.V. Konarev, D.I. Svergun, *J. Appl. Cryst.* 45 (2012) 342-350.

- [167] L.A. Feigin, D.I. Svergun, *Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York, **1987**.
- [168] J.H. Hodak, A. Henglein, M. Giersig, G.V. Hartland, Laser-induced inter-diffusion in AuAg core-shell nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 104 (**2000**) 11708-11718.
- [169] D. Fennell Evans, Håkan Wennerström, *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*, 2<sup>nd</sup> Edition, (**1999**)
- [170] B. Jachimiska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk, Characterization of globular protein solution by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements, *Langmuir* 24 (**2008**) 6866-6872.
- [171] C. Leggio, L. Galantini, N.V. Pavel, About the albumin structure in solution: cigar Expanded form versus heart Normal shape, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (**2008**) 6741-6750.
- [172] J. Salonen, L. Laitinen, A.M. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen, V.-P. Lehto, Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs, *J. Control. Release* 108 (**2005**) 362-374.
- [173] C.A. García-González, M. Jin, J. Gerth, C. Alvarez-Lorenzo, I. Smirnova, Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery, *Carbohydrate Polymers* 117 (**2015**) 797-806
- [174] D. Matulis, C.G. Baumann, V.A. Bloomfield, R.E. Lovrien, 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate as a Protein Conformational Tightening Agent, *Biopolymers*. 49 (**1999**) 451-458.
- [175] A. Jasinska, A. Ferguson, W.S. Mohamed, T. Szreder, The study of interactions between ibuprofen and bovine serum albumin, *Food Chem. Biotechnol.* 73 (**2009**) 15-24.
- [176] K.W. Powers, S.C. Brown, V.B. Krishna, S.C. Wasdo, B.M. Moudgil, S.M. Roberts, Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation, *Toxicol. Sci.* 90 (**2006**) 296-303.
- [177] A.E. Kaifer, A.J. Bard, Effects of sodium dodecyl sulfate at concentrations near the critical micelle concentration on the first cyclic voltammetric wave of methylviologen, *J. Phys. Chem.* 91 (**1987**) 2006-2007.

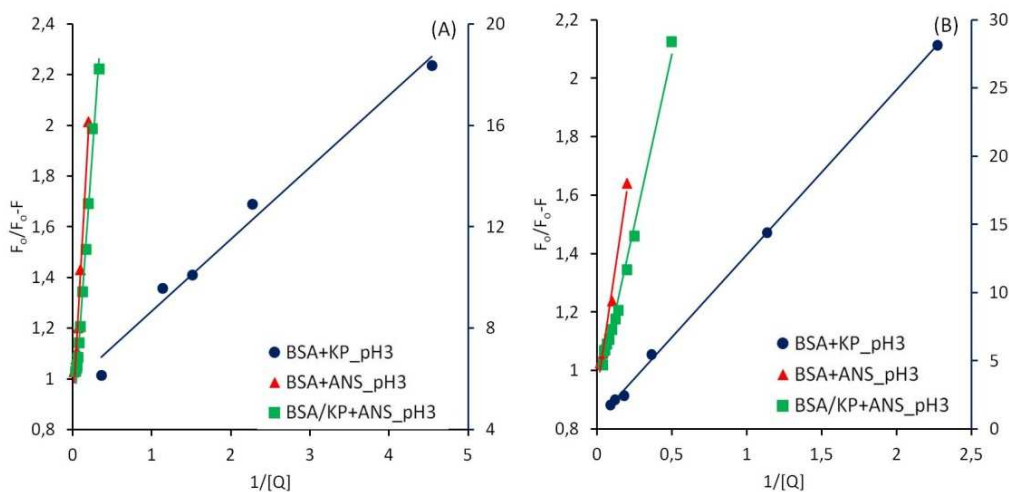
## 8. Függelék



**F1. ábra** Az SiO<sub>2</sub>, a PEI és a PSS áramlási potenciálja a pH függvényében

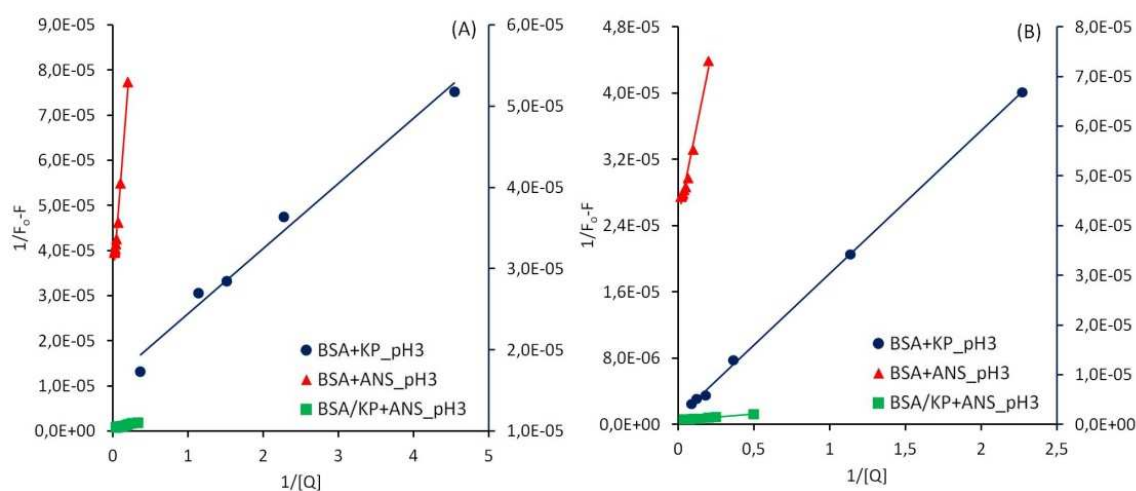


**F2. ábra** A Scatchard-egyenlet ábrázolása az egyes rendszerekre

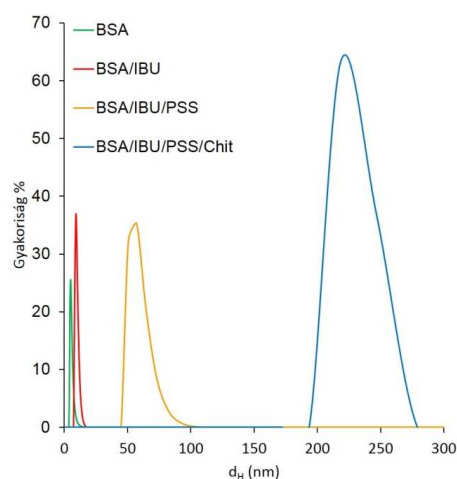


**F3. ábra** A módosított Stern-Volmer-egyenlet ábrázolása az egyes rendszerekre

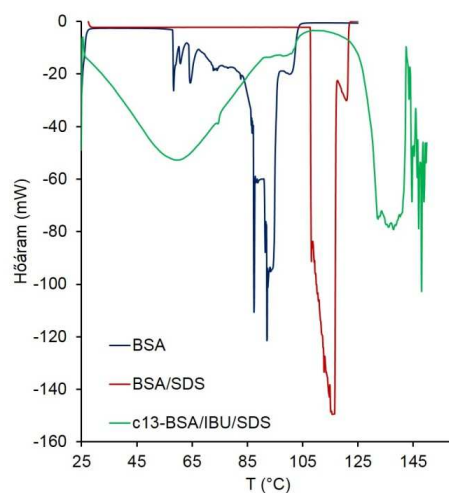




**F4. ábra** A Lineweaver-Burk-egyenlet ábrázolása az egyes rendszerekre



**F5. ábra** A BSA, valamint a BSA-alapú mag-héj kompozitok méreteloszlási függvényei a DLS mérések alapján



**F6. ábra** A BSA, a BSA/NaDS és a c13-BSA/IBU/NaDS kompozitok DSC görbéi

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Erdőhelyi Andrásnak és Prof. Dr. Tóth Ágotának a Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék korábbi és jelenlegi vezetőjének, hogy lehetőséget adtak a Tanszéken a doktori munkám elvégzésére.

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, Prof. Dr. Dékány Imrének tartozom szakmai tanácsaiért, a sok segítségéért és az állandó ösztönzéséért.

Szeretném megköszönni Dr. Berkesi Ottónak az FT-IR spektrumok kiértékelésében, valamint Dr. Sebők Dánielnek és Juhász Ádámnak a SAXS mérések kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségét. Hálával tartozom továbbá Dr. Janovák Lászlónak, Szokolai Hajnalkának és Ráczné Kuhn Klárának a mérések terén nyújtott segítségéért.

Köszönöm a munkatársaimnak, a Kolloidok és Nanoszerkezetű Anyagok, valamint az MTA-SZTE Szupramolekuláris és Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak a szakmai tanácsokat és az állandó biztatást dolgozatom megírásában. Közölük is szeretném kiemelni Dr. Benkő Máriát, Bohus Gabriellát, Veres Ágnest, Varga Viktóriát, Ménesi Juditot és Lagdáné Szélpál Évát.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni páromnak, szüleimnek és a testvéremnek, hogy mindvégig támogattak és nyugodt háttérrel biztosítottak.