



Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**Hatóanyag-hordozó polimer nanoszálak fejlesztése és  
összehasonlítása egytűs és fúvóka nélküli elektrosztatikus  
szálképzési módszerek esetében**

**Dr. Uhljar Luca Éva**

okleveles gyógyszerész

Témavezető:

Dr. habil Ambrus Rita Ph.D.

**SZEGED**

**2023**

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Vezető: Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc.

Képzési program: Gyógyszertechnológia Program  
Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó Ph.D., tanszékvezető egyetemi tanár

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet  
Témavezető: Dr. habil Ambrus Rita Ph.D.

**Dr. Uhljar Luca Éva**

**Hatóanyag-hordozó polimer nanoszálak fejlesztése és összehasonlítása egytűs és fűvóka nélküli elektrosztatikus szálképzési módszerek esetében**

**Komplexvizsga-bizottság:**

**Elnök:** Prof. Dr. Szabó-Révész Piroska D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,  
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

**Tagok:** Prof. Dr. Zelkó Romána D.Sc., Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési  
Intézet, Semmelweis Egyetem  
Dr. Berkó Szilvia Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és  
Gyógyszerfelügyeleti Intézet

**Bíráló bizottság:**

**Elnök:** Prof. Dr. Zupkó István D.Sc., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és  
Biofarmáciai Intézet

**Bírálók:** Prof. Dr. Zelkó Romána D.Sc., Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési  
Intézet, Semmelweis Egyetem

Prof. Karin Kogermann Ph.D., Institute of Pharmacy, University of Tartu

**Titkár:** Dr. Szakonyi Gerda Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai  
Intézet

**Tag:** Dr. Benkő Ria Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Klinikai Gyógyszerészeti  
Intézet

**SZEGED**

**2023**

## 1. BEVEZETÉS

A nanotechnológiát a XXI. század egyik legígéretesebb technológiájaként tartják számon, megjelenése több tudományterületen, így az orvostudományban is áttörést jelentett. A nanotechnológia, mint tudomány nagyon kiterjedt, többféle tudományterületet foglal magába. Jelen disszertáció a hatóanyag-hordozó nanoszálakat és azok előállítási módjait vizsgálja.

A nanoszálak hosszanti irányban megnyúlt, azaz szálal, nanoméretű átmérővel rendelkező struktúrák. Számos kedvező tulajdonság (pl. nagy fajlagos felület, nagy porozitás, változatos összetétel, szabályozható morfológia) teszi vonzóvá a nanoszálakat több különböző alkalmazásban a textilipartól kezdve az elektronikai iparon át az orvosbiológiai felhasználásig. Utóbbihoz sorolhatjuk többek között a hatóanyag-hordozó rendszereket, a transzplantációhoz használható szövetszerkezeti vázakat, a sebkötszereket, az arcmaszkokat és más védőruházatokat és a bioszenzorokat.

A nanoszálak előállításának legelterjedtebb módja az ún. elektrosztatikus szálképzés (elektrospinning; ES), mivel ez egy egyszerű, költséghatékony, mindemellett sokoldalú és praktikus módszer. A nanoszálak többségét ES-gel állítják elő, így gyorsan növekvő szakirodalom áll rendelkezésre. A legtöbbet használt adatbázisok szerint 2022-ben összesen 141 tudományos cikk jelent meg a biomedicinális alkalmazásra szánt nanoszálakról és 5505 cikket publikáltak az ES eljárásokkal kapcsolatban.

A területen folyó intenzív kutatások ellenére az ES modellezésére nagyon kevés figyelmet fordítanak, az ES paraméterek pontos előrejelzésére még nem dolgoztak ki általánosan elfogadott szimulációs modellt. Emiatt a nanoszál-képzés többsége empirikus adatokra támaszkodik. Éppen ezért fontos a különböző ES technikák további tanulmányozása és optimalizálása, amellyel több információt nyerhetünk az egyes technikák előnyeiről és korlátaikról. Érdekes vizsgálni a ES beállítási paramétereit (beleértve az oldat tulajdonságait, a folyamat- és a környezeti tulajdonságokat), a reprodukálhatóságot és a méretnövelési lehetőségeket. Ez a megközelítés segít az ES-folyamat jobb megértésében és szabályozásában, valamint optimalizált előállítási protokollok kidolgozásában.

---

**Rövidítések:** ANOVA – analysis of variance, CaCo-2 – humán kolorektális karcinóma sejtvonala, CIP – ciprofloxacín, DL – hatóanyag tartalom, DSC – differenciális pásztázó kalorimetria, EE – bezárási hatékonyság, ES – elektrosztatikus szálképzés, FTIR – Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia, HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, MTT – 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid, NF – fúvókamentes elektrosztatikus szálképzéssel előállított minta, PBS – foszfát puffer oldat, PVP – Polivinil pirrolidon,  $R^2$  – regressziós koefficiens, SEM – pásztázó elektronmikroszkóp, SN – egytűs elektrostatikus szálképzéssel előállított minták, UV-Vis – ultraviola és látható spektroszkópia, XRPD – Porrántgen diffrakció

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munka célja olyan ciprofloxacin (CIP)-tartalmú polivinil-pirrolidon (PVP) nanoszálak fejlesztése, vizsgálata és összehasonlítása volt, amelyeket fűvókás és fűvóka nélküli ES módszerrel állítottunk elő. A végső cél egy optimalizált előállítási protokoll leírása volt, amely hozzájárul a potenciálisan gyógyszerként felhasználható, innovatív hatóanyag-hordozó nanoszálak képzési módjának bővítéséhez.

A kutatómunkát a következő lépések szerint végeztük el:

**I)** A kísérletes munka megkezdése előtt, a kutatási terv felállításához szükség volt egy alapos szakirodalmi áttekintésre az ES mechanizmusával, az ES típusaival és a nanoszálak tulajdonságait befolyásoló előállítási paraméterekkel kapcsolatban.

**II)** A kísérletes munka első célkitűzése a megfelelő morfológiájú és fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező CIP-tartalmú nanoszálak előállítása volt hagyományos, egytűs ES módszerrel. Ebben az első fázisban célunk volt egy olyan nanoszálak formuláció előállítása, amely megfelelő kiinduló pontként szolgálhat az optimalizálási lépéshez.

**III)** A következő lépés célja az egytűs ES optimalizálása volt aképpen, hogy a nanoszálak hatóanyag-tartalmát növelni tudjuk, miközben változatlanul megmaradnak az előző lépésben bizonyított megváltozott fizikai-kémiai sajátságok.

**IV)** A kísérleti munka harmadik lépésében a cél az ES kitermelési hozamának növelése volt, amihez egy újabb, fűvókamentes ES-technológiára való áttérés volt szükséges. A CIP-nal inkorporált nanoszálakat egy kooperációs partnerünk által épített tűmentes, merülő hengeres ES berendezésben állítottuk elő. Fontosnak tartottuk a technológiaváltás nanoszálakra gyakorolt hatásának vizsgálatát.

**V)** Végül az egytűs és a fűvóka nélküli ES technikákat összehasonlítottuk az előállított nanoszálak morfológiája, fizikai-kémiai tulajdonságai, in vitro citokompatibilitása és stabilitása szempontjából. A két technika előnyeit és hátrányait kiemelve egy könnyebb áttekintést biztosítottunk a kétféle ES technikáról és az előállított nanoszálak formulációról, mint innovatív hatóanyag-leadó rendszerről.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Anyagok

A hatóanyag-hordozó nanoszálak esetében a hatóanyag a polimer mátrixban van diszpergálva. Jelen doktori munkában a CIP-t (Teva Gyógyszergyár Kft., Debrecen, Magyarország) nagy molekulásúlyú PVP-be ( $M_w = 1\,300\,000$ ; Alfa Aesar, Heysham, Egyesült Királyság) integráltuk. Az ES oldatok oldószerei kloroform (Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság), etanol (Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság) és ecetsav (Sigma-Aldrich, Hamburg, Németország) voltak.

Az *in vitro* hatóanyag-kioldási vizsgálatok esetében pH 7,4 foszfát puffer oldat (PBS) volt a kioldó közeg, illetve egy kereskedelmi forgalomban kapható, 250 mg CIP-t tartalmazó, filmbevonatú *per os* tablettát használtunk referenciaként.

#### 3.2 Módszerek

##### 3.2.1. Az előállításhoz használt különböző elektrospinning módszerek

***Első lépésként a célunk az volt, hogy hibamentes, gyorsan kioldódó nanoszálakat állítsunk elő egytűs ES technikával.*** E cél elérése érdekében az ES oldat összetételét (SN-0 – SN-1,5 minták) és áramlási sebességét (SN-F0,5 – SN-F4 minták) változtattuk, hogy különböző formulációkat kapjunk. A hatóanyagot kloroformban, a polimert etanolban oldottuk fel, majd a megfelelő arányban elegyítettük a kívánt hatóanyag-tartalom (w/w%) eléréséhez. A viszkozitás mérése után (Haake Rheostress 1 Rheometer; Karlsruhe, Németország) az elkészített ES-oldatokat rozsdamentes acél, 20 G méretű tűvel ellátott 2 ml-es fecskendőbe töltöttük. Az alkalmazott potenciálkülönbség 24 kV volt, és a tű-kollektor távolságot 10 cm-en tartottuk. A kamra hőmérséklete 23 °C, a relatív páratartalom pedig 36-42% volt. Az egytűs ES eljáráshoz egy kereskedelmi forgalomban kapható, vertikális beállítású ES készüléket (IME Medical Electrospinning, Waalre, Hollandia) használtunk.

***A második optimalizálási lépésben a CIP oldószerét két okból változtattuk meg.*** Egyrészt ***a cél a hatóanyag-tartalom növelése volt***, ezért a CIP jobb oldószerére volt szükség a koncentráltabb oldat előállításához. Másrészt a kloroform nem tekinthető zöld oldószernek, ezért is kívánatos volt ecetsavval helyettesíteni. Az ES berendezés paraméterei a következők voltak: 24 kV feszültség, 1 ml/h pumpálási sebesség, 20 G tű, 2 ml-es fecskendő, 15 cm tű-kollektor távolság, szobahőmérséklet, 31-36%-os relatív páratartalom. Ebben a lépésben NF-5 és NF-10 formulációt állítottunk elő (1. táblázat).

**1. Táblázat** Az előállított nanoszálás formulációk jellemzése

| Minta név | CIP oldat<br>(konc. +<br>oldószer) | CIP-<br>tartalom<br>(w/w%) | ES típusa                      | Áramlási<br>sebesség<br>(ml/h) | ES oldat<br>viszkozitása<br>(mPa s) |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| SN-0      | -                                  | 0                          | single-<br>needle ES           | 2                              | 103 ± 6                             |
| SN-F0.5   |                                    | 1                          |                                | 0,5                            | 148 ± 32                            |
| SN-F1     |                                    | 1                          |                                | 1                              | 148 ± 32                            |
| SN-1      |                                    | 1                          |                                | 2                              | 148 ± 32                            |
| SN-F2     | 1 mg/ml<br>(kloroform)             | 1                          | single-<br>needle ES<br>(20 G) | 3                              | 148 ± 32                            |
| SN-F3     |                                    | 1                          |                                | 4                              | 148 ± 32                            |
| SN-F4     |                                    | 1                          |                                |                                |                                     |
| SN-1.3    |                                    | 1,3                        |                                | 2                              | 201 ± 2                             |
| SN-1.5    |                                    | 1,5                        |                                | 2                              | 283 ± 45                            |
| SN-5      | 20 mg/ml                           | 5                          | single-<br>needle ES           | 1                              | 336 ± 19                            |
| SN-10     | (ecetsav)                          | 10                         | (20 G)                         | 1                              | 79 ± 2                              |
| NF-5      | 20 mg/ml                           | 5                          | roller ES                      | -                              | 336 ± 19                            |
| NF-10     | (ecetsav)                          | 10                         |                                | -                              | 79 ± 2                              |

A következő lépésben áttértünk egy újszerű, fúvóka nélküli ES berendezésre, melyet kooperatív partnerünk, Radácsi Norbert kutatócsoportja tervezett és állított össze az Edinburgh-i Egyetemen. Ez az ES berendezés egy olyan forgó tűskelektrodát tartalmazott, amely félig az ES oldatba merült, így szabad felületet biztosított a Taylor-kúpok keletkezéséhez és a sugarak kilövelléséhez. A tűskelektrodra kapcsolt feszültség +30 kV volt. A fém kollektor 15 cm-rel az ES oldat kádja fölött helyezkedett el és alumíniumfóliával volt borítva. Az alkalmazott potenciálkülönbség +45 kV volt, közel kétszerese az egytűs ES módszerénél használt feszültségnek. A készülék termosztálva volt, a kísérleteket 21,9 °C-on és 33% relatív páratartalom mellett végeztük.

### 3.2.2. A fizikai keverékek előállítása

Az *in vitro* vizsgálatok egy részénél fizikai keverékeket is használtunk referenciaként. Ezek előállításához a PVP-t és a kezeletlen CIP porkeverékét ellenőrzött körülmények között (50 rpm, 10 perc) és megfelelő arányban (5% és 10%) egy rázókeverővel homogenizáltuk (Turbula System Schatz; Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Basel, Svájc).

### 3.2.3. A nanoszálak karakterizálása

#### 3.2.3.1. Mikrometria i sajátságok vizsgálata

A különböző nanoszálás szövedékek morfológiáját 10 kV-on pásztázó elektronmikroszkóppal (**SEM**; Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokió, Japán)

vizsgáltuk. A szálátmérőt és a szálátmérő eloszlását a SEM felvételek alapján az ImageJ 1.44p szoftverrel (Bethesda, MD, USA) határoztuk meg. Az átlagos szálátmérőt minden egyes készítmény esetében 50-100 nanoszál méretéből számoltuk ki.

### 3.2.3.2. *Szerkezetvizsgálat*

A minták közép-IR spektrumát a 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  hullámszámtartományon AVATAR 330 FT-IR spektrométerrel (**FTIR**; Thermo Nicolet AVATAR 330, Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) vettük fel. A spektrális felbontás 4  $\text{cm}^{-1}$  volt, a mérés 128-szor lett megismételve.

A differenciális pásztázó kalorimetria (**DSC**; Mettler Toledo 821e DSC; Mettler Inc, Schwerzenbach, Svájc) vizsgálatok során kb. 3-5 mg mintát vizsgáltunk 30-300 °C között, 5 °C/perc fűtési sebesség mellett. Minden eredményt normalizáltunk a mintatömegre.

A porröntgen-diffraktogramokat BRUKER D8 Advance diffraktométerrel (**XRPD**; BRUKER AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) vettük fel. A  $K\alpha_2$  sugárzást a diffraktogramból eltávolítottuk, háttérkorrekciót, simítást és a kiértékelést a DIFFRACT plus EVA szoftver (Karlsruhe, Németország) segítségével végeztük.

A nanoszálas szövetdékek homogenitásának meghatározására **Raman spektroszkópiát** alkalmaztunk (Thermo Fisher DXR Dispersive Raman mikroszkóp, Waltham, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A kollektor széléről és közepéről összegyűjtött mintadarabok Raman térképeit vettük fel és hasonlítottuk össze.

### 3.2.3.3. *In vitro vizsgálatok*

A **hatóanyag-tartalmat** és a **bezárási hatékonyságot** UV spektrofotometriával (ABL&E-Jasco UV/VIS spektrofotométer V-730, Budapest, Magyarország) határoztuk meg. Az UV abszorbanciát megfelelő hígítás után  $\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$ -en mértük, és a CIP koncentrációját kalibrációs görbe ( $y = 0,1391x$ ,  $R^2 = 1$ ) segítségével számoltuk ki. Emellett a DL és EE adatokat használtuk a szálaplanok homogenitásának vizsgálatára is.

Az **in vitro oldhatósági** vizsgálatokat pH 6,3 kémhatású desztillált vízben és pH 7,4 PBS-ben végeztünk. A CIP kiindulási hatóanyagot, a fizikai keveréket és a CIP-tartalmú nanoszálas formulációt 24 órán keresztül kevertünk szobahőmérsékleten 3 ml oldószerben. A mintákat UV spektrofotometriával mértük (ABL&E-Jasco UV/VIS spektrofotométer V-730, Budapest, Magyarország). A méréseket háromszor végeztük el.

Az **in vitro CIP kioldódási** vizsgálatot forgólapátos kioldókészülékben (Hanson Research SR8-Plus Release Device; Hanson Research, Chatsworth, USA) végeztük 37 °C-on, 50 ml pH 7,4 PBS közegben. A nanoszálakat kezeletlen CIP-nal, fizikai keverékekkel, illetve

250 mg CIP-tartalmú tablettával hasonlítottuk össze. A lapátot 100 fordulat/perc sebességgel forgattuk. 0,5 ml-es mintákat vettünk 5, 10, 15, 30, 60 és 90 perc után. A mintavétel után a kivett térfogatot friss PBS-sel visszapótoltuk.

Az adott mintában lévő hatóanyag-koncentrációt két különböző módon határoztuk meg. A munka kezdetén *UV spektrofotometriát* alkalmaztunk, majd később *nagy teljesítményű folyadékkromatográfiára (HPLC)* váltottunk.

A *CIP kioldódásának kinetikáját* is meghatároztuk, melyhez öt különböző matematikai modellt (nulladrendű, elsőrendű, Hixson–Crowell, Higuchi és Korsmeyer–Peppas modell) alkalmaztunk. Görbeillesztés után az  $R^2$  értékek alapján fogadtuk el a legpontosabb modellt.

Az *in vitro citotoxicitási tesztet* (MTT teszt) a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológia és Immunbiológia Tanszékénál dolgozó kooperációs partnereink végezték el. A minták citotoxicitását Caco-2 (Humán vastagbél adenokarcinóma) sejteken tesztelték, minden koncentrációban négy párhuzamos mérést végezve.

#### **3.2.3.3. Hosszú távú tárolási stabilitási vizsgálatok**

A nanoszálás mintákat exsikkátorban tároltuk szobahőmérsékleten (22 °C) és fénytől védve. A tárolás után 3, 5, 8, 16 és 26 hónappal megvizsgáltuk a formulációk stabilitását SEM és XRPD módszerekkel. A kritikus minták *in vitro* hatóanyag felszabadulását is mértük.

#### **3.2.3.4. Az eredmények statisztikai értékelése**

Az adatok közötti szignifikáns különbség megállapítása érdekében statisztikai elemzést végeztünk. A kutatás elején az oldódási és hatóanyag felszabadulási eredményeket hasonlítottuk össze kétmintás t-próbával. Ezt követően a szálatmérő és CIP-kioldódás eredményein egytényezős ANOVA-t post hoc Tukey HSD teszttel végeztünk. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük azokat az eredményeket, ahol a p érték <0,05 vagy <0,01 volt.

## **4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK**

### **4.1 Egytűs electrospininggel előállított nanoszálak jellemzése**

A PhD munkának a kezdetén CIP-tartalmú PVP alapú nanoszálak előállítását és vizsgálatát tűztük ki célul. Az előállítás optimalizálása érdekében különböző összetételeket és áramlási sebességeket alkalmaztunk (1. Táblázat 1-8. sor). A minták morfológiáját, fizikai-kémiai sajátságait, valamint *in vitro* tulajdonságait vizsgáltuk meg.

A kísérletes munkát megelőző irodalmi áttekintés során azt találtuk, hogy a PVP-alapú nanoszálak esetében az áramlási sebesség 0,2 és 2 ml/h között változott, és a különböző formulációk átlagos szálatmérője nagymértékben eltért. Ezért a kísérletek tervezése során az

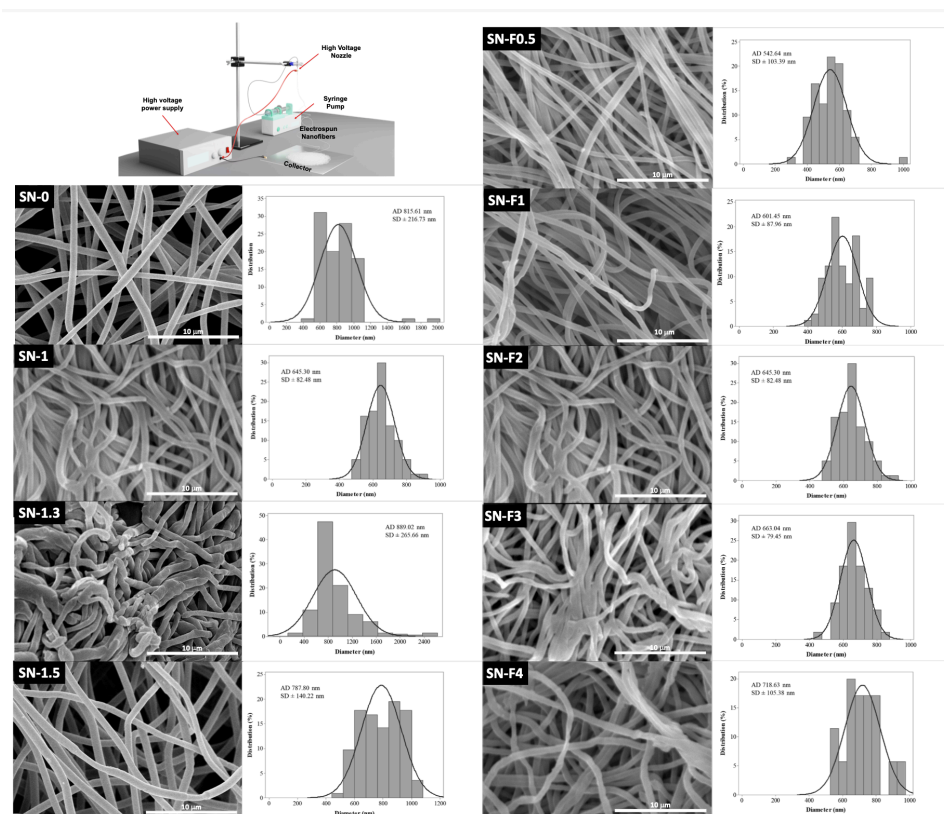


áramlási sebességet 0,5, 1, 2, 3 és 4 ml/h értékekre terveztük, a többi előállítási paraméter állandósága mellett (SN-F0.5 - SN-F4).

Ezenkívül ismert, hogy az ES oldat összetétele és viszkozitása befolyásolja a nanoszálak tulajdonságait. Ennek tanulmányozása érdekében különböző arányú összetételeket vizsgáltunk, így az ES oldat előállítása során különböző PVP:CIP térfogatarányokat használtunk (SN-0 - SN-1.5).

#### 4.1.1. Az összetétel és az áramlási sebesség hatása a mikrometrikus tulajdonságokra

A nanoszálak morfológiáját SEM képek felvétele után vizsgáltuk, az átlagos szálátmérőt az ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg (1. ábra). Az optimalizációs folyamat során a minél vékonyabb, sima felszínű, folytonos nanoszál előállítását szerettük volna elérni.



1. ábra Egytűs ES-eljárással előállított nanoszálak SEM képei és szálátmérő-eloszlása

Avizsgált ES oldatból sikeresen állítottunk elő folytonos, sima felszínű nanoszálakat. Egyedül az SN-1.3 formuláció nem bizonyult megfelelőnek, ugyanis az elektronmikroszkópos felvételek rövid, vastagodott, hajlott nanoszálakat mutattak, melyek átmérője is nagymértékben változó volt ( $889 \pm 265$  nm).

A hatóanyag nélküli PVP nanoszálak (SN-0) átlagos átmérője  $815 \pm 216$  nm volt. A folytonos nanoszálak esetében a CIP hozzáadása csökkentette a szálátmérőt, melynek feltételezett oka az ES oldat vezetőképességének növekedése.

Emellett megállapítható, hogy az áramlási sebesség növelésével az átlagos szálátmérő is nőtt, valamint a nagyobb áramlási sebességgel előállított szálak morfológiája nem volt megfelelő (SN-F3 és SN-F4). Mindezeket figyelembe véve az SN-1/SN-F2 formulációt (1% CIP tartalom, 2 ml/h áramlási sebesség) találtuk optimálisnak, ezért ezt használtuk az *in vitro* vizsgálatokhoz.

#### 4.1.2. Fizikai-kémiai tulajdonságok

A kristályszerkezet meghatározása **XRPD** és **DSC** mérésekkel történt, mely során vizsgáltuk mind a kezeletlen CIP és PVP mintákat, a fizikai keverékeket és az összes előállított CIP-tartalmú nanoszálát. Megfigyelhető volt, hogy míg a kezeletlen CIP és a fizikai keverékek mutatták a hatóanyagra jellemző csúcsokat, a nanoszál diffraktogramja és termodiagramja lapos maradt. Tehát az oldószer pillanatszerű elpárolgása amorfizálta a CIP-t.

A **FT-IR** spektrumokon megfigyelhető eltolódások és szélesedések azt mutatták, hogy a CIP sikeresen beépült a nanoszál polimer mátrixába.

#### 4.1.3. Megnövekedett *in vitro* oldhatóság és hatóanyag-felszabadulás

A nanoszálak **hatóanyag-tartalmát** és **bezárási hatékonyságát** UV spektroszkópia alapján állapítottuk meg. Az SN-F2 minta esetében a CIP-tartalom  $0,92 \pm 0,08$  w/w%-nak bizonyult. A kutatás első fázisában még nem volt célunk a magas CIP-tartalom elérése. A teoretikus CIP-tartalom 1% , így a bezárási hatékonyság  $92 \pm 8\%$  volt.

A CIP izoelektromos pontja 7,42, oldhatósága pH-függő, U-alakú. Savas (pH < 5) és lúgos (pH > 10) közegben jól oldódik, azonban semleges kémhatáson rosszul. Emiatt az **oldhatóság** teszteléséhez desztillált vizet (pH 6,3) és a pH 7,4 PBS-t használtunk.

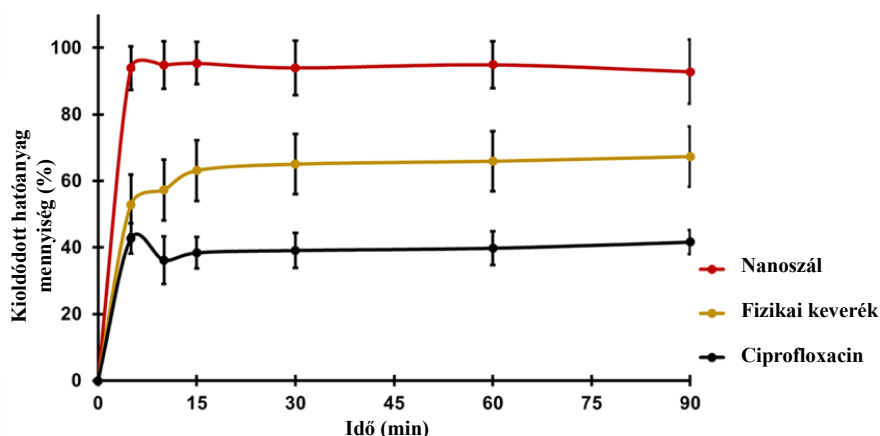
Mindkét oldószer esetén azt találtuk, hogy a fizikai keverék kissé jobban, míg a nanoszálás formuláció szignifikánsan jobban oldódott, mint a kiindulási CIP (2. Táblázat). A nanoszálak esetén a PVP mátrix nemcsak a CIP nedvesíthetőséget javítja, hanem stabilizálja is az amorf hatóanyagot. Ez a megállapítás tehát korrelál a szerkezeti jellemzés eredményeivel.

**2. Táblázat** A minták oldhatósági adatai. A ciprofloxacin (CIP) oldódásakor a pH 6,3-ról 7,1-re nőtt a desztillált vízben. Statisztikai elemzés: Kétmintás t-próba (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).

| Minta           | Oldhatóság - tisztított víz<br>[mg/ml] (pH 6,3 → pH 7,1) | Oldhatóság [mg/m] - PBS<br>(pH 7,4) |
|-----------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| CIP             | $0,071 \pm 0,001$                                        | $0,099 \pm 0,001$                   |
| Fizikai keverék | $0,182 \pm 0,035$                                        | $0,123 \pm 0,001$                   |
| Nanoszál        | $0,862 \pm 0,074$                                        | $0,629 \pm 0,186$                   |

A megnövekedett oldódás miatt az *in vitro* **hatóanyag-kioldódás** is szignifikánsan nőtt a nanoszálalá formulálással (2. ábra). 90 perc alatt a kezeletlen CIP  $41 \pm 3\%$ -a oldódott fel, és a hatóanyag  $67 \pm 12\%$ -a szabadult fel a fizikai keverékből. Ezzel szemben a nanoszálból kioldódott CIP mennyiség minden mérési ponton szignifikánsan nagyobb volt. Bár a kioldódás sebessége minden minta esetén gyors volt, a nanoszálak esetén volt a leggyorsabb, a CIP  $94 \pm 6\%$ -a szabadult fel mindössze 5 perc alatt. A gyors kioldódás oka lehet a nanoszálak minták jellemzői: a nagy fajlagos felület, a nagymértékű nedvesíthetőség és az amorf hatóanyag.

A nanoszálak minták **hatóanyag-kioldódás kinetikáját** leginkább a Korsmeyer-Peppas-modell jellemezte ( $R^2 = 0,9993$ ). A modell egy polimer mátrixból történő hatóanyag-felszabadulást ír le, mely egyszerre többféle mechanizmust is figyelembe vesz (pl. a polimer mátrixba történő víztranszportot, a duzzadást és a polimer feloldódását).



2. ábra. A CIP *in vitro* kioldódása a nanoszálból, a fizikai keverékből és a kezeletlen CIP esetén

## 4.2 Nagyobb hatóanyag-tartalmú nanoszálak előállítása és jellemzése

A kutatómunka második lépéseként 5 és 10 m/m% CIP-tartalmú PVP-alapú nanoszálakat állítottunk elő az első lépésben is használt egytűs ES berendezéssel (1. táblázat. 9-10. sor). A nagyobb hatóanyag-tartalom elérése érdekében változtatnunk kellett az ES oldat összetételén, ugyanis a CIP oldószerét kloroformról ecetsavra kellett cserélni.

### 4.2.1. A viszkozitás hatása a mikrometriai tulajdonságokra

A tapasztalatok alapján a CIP mennyiség növelése nem volt hatással a szálak morfológiájára, mindkét összetételből folytonos, sima felületű nanoszálak képződtek. Az ES oldatok eltérő viszkozitása azonban befolyásolta a szálátmérő egységességét, mind a teljes mintát, mind az egyedi szálakat tekintve. A viszkozitás növekedésével az átlagos szálátmérő is nőtt:  $SN-5_{visc.} = 336 \pm 19$  mPa s,  $SN-5_{diam.} = 735 \pm 91$  nm, és  $SN-10_{visc.} = 79 \pm 2$  mPa s,

SN-10<sub>diam.</sub> =  $323 \pm 51$  nm. Ezen felül az SN-10 minta esetén több nagyméretű gyöngy és zsák alakú kiboltosulás volt látható, ami az ES oldat nem megfelelő viszkozitására utalt.

#### 4.2.2. Szerkezeti jellemzés

Az előzőekben leírt eredményekkel megegyezően az elvégzett **DSC** és **XRPD** bizonyították, hogy az ES módszerrel amorf szilárd diszperziókat állítottunk elő.

#### 4.2.3. Fokozott *in vitro* hatóanyag-kioldódás

Mindkét formuláció **hatóanyag-tartalma** és **bezárási hatékonysága** kellően magas volt. Továbbá a nanoszálás formulációk gyors és teljes CIP-felszabadulást mutattak. A nanoszálakat és a 250 mg-os tablettákat összehasonlítva a kioldott hatóanyag mennyisége minden mérési ponton szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.4. Citokompatibilitási vizsgálat

Az ***in vitro* citotoxicitás** meghatározására MTT-tesztet alkalmaztunk. A referenciaként alkalmazott CIP oldat 163 µg/ml koncentrációban citotoxikusnak bizonyult, míg az 5% és 10% CIP-tartalmú nanoszálak oldatai nem voltak letálisak a CaCo-2 sejtekre.

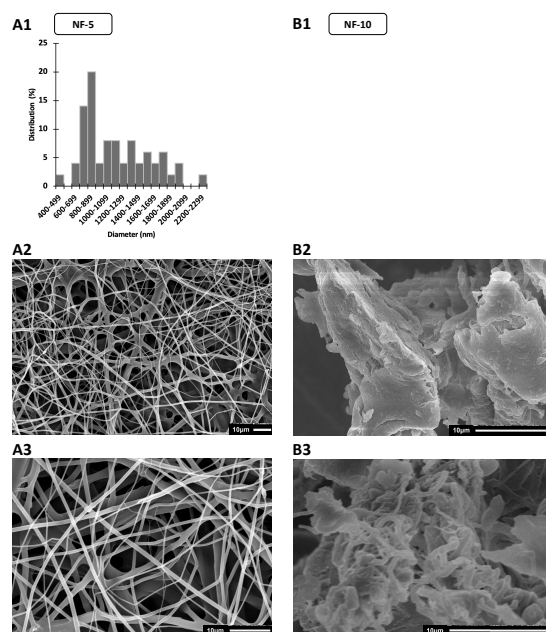
### 4.3 A fúvókamentes eljárással előállított nanoszálak jellemzése

A kutatómunka harmadik lépésében a termelékenység javíthatóságát tanulmányoztuk. Ehhez az előző lépésben is használt 5% és 10% ES oldatokból állítottunk elő nanoszálakat egy fúvóka nélküli, forgótestes ES-berendezés segítségével (1. táblázat. 11-12. sor). Megfigyeltük, hogy az 5%-os oldat esetén a korábbinál nagyobb feszültségre volt szükség a szálképzéshez. A 10%-os oldatból, valószínűleg a túl alacsony viszkozitás miatt, nem sikerült nanoszálakat képezni. A minta fuzionált szálakból, polimer filmből állt, amint azt a 3. ábra mutatja. Ezért a szálátmérő meghatározást és az NF-10 mintával végzett további vizsgálatokat mellőztük.

#### 4.3.1. Habitus és mikrometriai tulajdonságok

Az NF-5 minta esetében a szabad felszínről történő ES sikeres volt, és folytonos, sima felületű nanoszálak keletkeztek. Az átlagos szálátmérő  $1167 \pm 415$  nm volt, ami 3,6-szor nagyobb, mint az SN-5 formuláció esetén mért. A szálak átmérője széles skálán mozgott, az átmérő eloszlása polidiszperz volt. A hisztogram azt mutatta, hogy a mért nanoszálak 42%-a 600 és 1000 nm között, 34%-a pedig 700 és 900 nm között volt. A módusz tehát az SN-10 minta átlagértékének ( $735 \pm 91$  nm) közelében volt.

A nem egyenletes szálátmérő-eloszlás a fűvóka nélküli ES elvével magyarázható. A forgó elektroda felületén lévő vékony folyadékréteg több pontján szimultán alakulnak ki a Taylor-kúpok, így az ES egyszerre több sugárban történik.



3. ábra SEM képek és szálátmérő eloszlás a fűvókamentes ES-gel előállított minták esetén. **A.** NF-5 minta, **B.** NF-10 minta. Az NF-10 minta nem volt szálas, így a szálátmérő nem volt mérhető, és az eloszlás nem volt értelmezhető.

#### 4.3.2. Szerkezeti jellemzés

Az előző szakaszokban láttuk, hogy a CIP amorfizálódott az egytűs ES során. A szerkezeti jellemzés célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy ugyanez igaz-e a fűvókamentes ES technika esetében is. A kapott eredmények alapján az ES módszer nem befolyásolta a hatóanyag viselkedését, és elősegítette az amorfizálódást.

#### 4.3.3. Megnövekedett *in vitro* hatóanyag-kioldódás

Az NF-5 mintában a számított **hatóanyag-tartalom**  $4,55 \pm 0,36$  m/m% volt, a **bezárási hatékonyság** pedig  $90,1 \pm 0,7\%$ . Így megállapítható, hogy a fűvókamentes ES módszerrel kellően magas bezárási hatékonyságot értünk el.

A vízdoldható polimer, az amorfizált hatóanyag és a korábbi tapasztalatok alapján gyors **hatóanyag-kioldódás** volt várható, melyet az eredmények igazoltak. Az első 5 percben a CIP  $75 \pm 7\%$ -a, majd a 10. percig a hatóanyag teljes mennyisége kioldódott a formulációból. Emellett a CIP **oldhatósága** a nanoszálás formulációban nőtt, a kereskedelmi forgalomban kapható tablettákhoz képest két és félszeresére, a kezeletlen CIP porhoz képest ötszörösére.

Az NF-5 formuláció esetén a **kioldódás kinetikáját** a Korsmeyer–Peppas és elsőrendű model írta le legjobban.

#### 4.3.4. A citotoxicitási vizsgálat eredménye

Az *in vitro* **citotoxicitást** az előző lépéshez hasonlóan CaCo-2 sejteken vizsgáltuk. A nanoszálás formuláció minden vizsgált koncentrációban citokompatibilisnek bizonyult.

#### 4.4 Az egytűs és a tűmentes elektrospinninggel előállított nanoszálak összehasonlítása

Munkánk egyik célja volt a hagyományos egytűs és a fűvókamentes ES technkák összehasonlítása. Az eddigiekben bemutattuk az előállított nanoszálak morfológiáját, kristályosságát, hatóanyag-tartalmát és bezárási hatékonyságát, *in vitro* oldhatóságát és kioldódását és *in vitro* citotoxicitását. E vizsgálatok eredményei az ES típusától függetlenül hasonlóak voltak. A hatóanyageloszlás és a hosszú távú stabilitás azonban a két esetben eltérő eredményeket mutatott.

##### 4.4.1. A nanoszál paplanok homogenitása

A CIP-eloszlás homogenitásának vizsgálatára a szálpaplan egészét tekintve kétféle megközelítést (Raman- és UV-spektroszkópia) alkalmaztunk. Mindkét esetben a kollektor közepéről és széléről vett mintadarabokat vizsgáltunk.

A **Raman-térképezést** először az egytűs mintákon végeztük el. Mind a centrális, mind az SN-5 szélső minták közepesen magas, de mintadarabon belül is változó CIP-tartalmat mutattak. Az SN-10 szélső mintában a hatóanyag-koncentrációja alacsonyabb volt. Ebből arra következtettünk, hogy az egytűs előállítási módszer nem biztosít homogén hatóanyag-eloszlást. Ezzel szemben a fűvókamentes mintadarabok esetén mind a kollektor közepéről, mind a széléről gyűjtött szövedékek magas hatóanyag-tartalmúnak bizonyultak. Az egyes Raman-térképek önmagukban is és a teljes nanoszál paplan egésze is homogénnek tekinthető.

A hatóanyag-tartalmat és az bezárási hatékonyságot **UV spektroszkópia** abszorbancia adataiból számoltuk ki. Az eredmények alátámasztották a Raman-térképezés következtetéseit.

Összegezve megállapítottuk, hogy a fűvókamentes ES eljárás homogénebb nanoszál paplant eredményezett. Ennek magyarázata az lehet, hogy a szabad felület lehetőséget biztosít egyszerre több Taylor-kúp létrejöttére, így a több sugárban történő szálképzésre. Ezáltal a sugarakból kialakuló nanoszálak a kollektor nem egyetlen pontján koncentrálnak, mint az egytűs ES esetében, hanem a fürdő több helyéről egyszerre szabadulnak fel.

##### 4.4.2. Hosszútávú tárolási stabilitás

A háromféle nanoszálás formuláció stabilitását 26 hónapon keresztül vizsgáltuk három különböző szempontból. A szálak morfológiájának változásait SEM felvételekkel tettük láthatóvá, az amorf-kristályos átalakulást XRPD-vel ellenőriztük, ezen kívül az *in vitro* kioldódást hasonlítottuk össze. Így teljesebb képet kaptunk, mint a szakirodalomban fellelhető

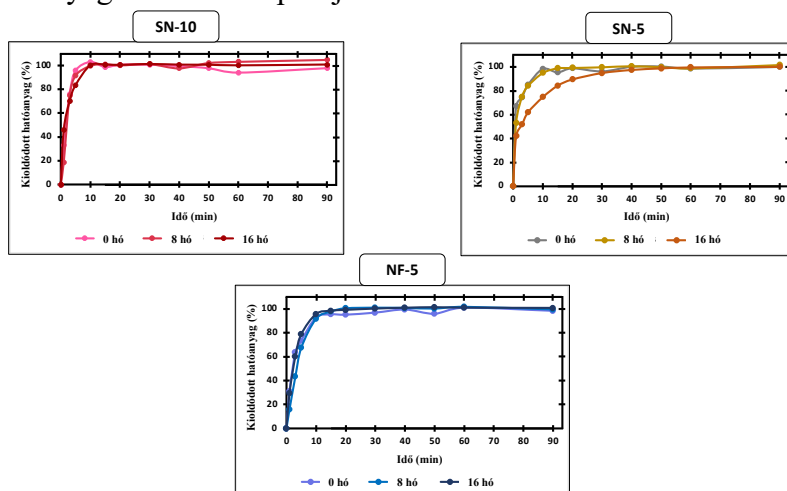
egyéb nanoszál stabilitási vizsgálatok, melyek csak a kristályosságot vizsgálták és legfeljebb egyéves tárolási időre terjedtek ki.

A **SEM képek** és a szálátmérő eloszlás vizsgálata után megállapítottuk, hogy az SN-10, az NF-5 és az SN-5 morfológiai stabilitása 8 hónap, 16 hónap, illetve több mint 26 hónap volt.

A CIP kristályosságát **XRPD**-vel vizsgáltuk. Az SN-10 nanoszálak esetében az 5 hónapos mintában kisebb, a 16 és a 26 hónapos mintában magasabb acetát csúcsokat láthattunk. Továbbá 8, 16 és 26 hónapnál megjelentek a CIP-re jellemző csúcsok, amely rekrisztallizációra utal. Ezek a csúcsok az SN-5 minta diffraktogramján 8 hónap után, 3 hónappal később jelentek meg, mint a 10%-os mintánál. A fűvókamentes ES jobb stabilitást biztosított a hatóanyag rekrisztallizációjával szemben, ugyanis a CIP a stabilitási vizsgálat után végéig amorf maradt.

Bár az SN-10 a SEM és az XRPD mérések alapján stabilitási problémákat mutatott, a **hatóanyag-kioldódást** ez nem befolyásolta, ugyanis a teljes CIP mennyiség 5 perc alatt kioldódott a nanoszálakból (4. ábra). Hasonló viselkedést figyeltünk meg az SN-5 esetében is 8 hónap elteltével. A CIP újrakristályosodása már látható volt az XRPD mintázatban, de a kioldódás változatlan volt. A 16 hónapig tárolt minta esetében azonban a CIP 90%-os kioldódása körülbelül háromszor hosszabb időt vett igénybe, mint a friss vagy a 8 hónapos minta esetében. A lassabb felszabadulás valószínűleg a CIP és a PVP molekulák közötti további H-kötések kialakulásával magyarázható. Ezzel szemben az NF-5 mintában a hatóanyag 26 hónap után is amorf maradt, valamint az *in vitro* hatóanyag-kioldódás nem változott.

Összességében a fűvókamentes ES módszerrel előállított nanoszálak stabilabbnak bizonyultak a hatóanyag-leadás szempontjából.



**4. ábra** Az egytűs (SN-10 és SN-5) és fűvókamentes (NF-5) elektrospinning eljárással előállított nanoszálak *in vitro* ciprofloxacin (CIP) felszabadulásának összehasonlítása friss minták esetén, illetve 8 és 16 hónapos tárolás után.

## 4.5 A szálképző módszerek összehasonlítása

Egytűs és tűmentes ES berendezésekkel vizsgáltuk az azonos 5%-os és 10%-os ES-oldatok elektrospinnelhetőségét. A két módszer általános és kifejezetten a kísérletes munkánk előnyeit és hátrányait a 3. táblázat mutatja be.

**3. táblázat** Az egytűs és a fűvókamentes elektrospinning technikák előnyei és hátrányai.

| Technika           | Előny                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Hátrány                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Egytűs ES</b>   | <p><i>Általános:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. egyszerű berendezés, könnyű kezelhetőség</li> <li>2. jobban ismert, publikált</li> <li>3. koaxiális vagy Janus ES</li> <li>4. multi-axiális ES</li> </ol> <p><i>Erre a munkára jellemző:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. szálképzés alacsony viszkozitású oldatból is (~80 mPa s)</li> <li>2. alacsonyabb feszültség (24 kV)</li> <li>3. magasabb bezárási hatékonyság (~90-95%)</li> </ol>                                            | <p><i>Általános:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. alacsony termelékenység</li> <li>2. a tű eldugulása</li> <li>3. szomszédos tűk és sugarak kölcsönhatása</li> </ol> <p><i>Erre a munkára jellemző:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. időigényes (1-2 mL/h)</li> <li>2. fixált kollektor (kisebb szálpaplanok)</li> <li>3. nanoszálak inhomogén eloszlása a kollektoron (középen több szál)</li> </ol>                                                                                                                                            |
| <b>Tűmentes ES</b> | <p><i>Általános:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. számos Taylor-kúp</li> <li>2. lehetőség a Taylor-kúpok számának kontrollálására (ES oldat vezetőképessége által)</li> <li>3. magas termelékenység</li> <li>4. nincs fűvóka (nem dugul el, nincs kölcsönhatás a szomszédos tűk között)</li> </ol> <p><i>Erre a munkára jellemző:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. gyorsabb előállítás</li> <li>2. forgó kollektor (nagyobb nanoszál paplan)</li> <li>3. homogénebb szálpaplan</li> </ol> | <p><i>Általános:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. nehezebb optimalizálni (kevésbé kontrollálható)</li> <li>2. egyetlen ES oldat használható (egyszerű szálak, nem lehetséges összetett szerkezet)</li> <li>3. oldószer párolgása a tárolóból (változó ES oldat koncentráció)</li> <li>4. nagyobb ES oldat veszteség</li> </ol> <p><i>Erre a munkára jellemző:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. nagyobb viszkozitást igényel (nem képződött szál ~80 mPa s viszkozitású ES oldatból)</li> <li>2. magasabb feszültséget igényel (45 kV)</li> </ol> |

Az előállított nanoszálak minták morfológiáját, fizikai-kémiai tulajdonságait és *in vitro* tulajdonságait is vizsgáltuk. Ezen eredmények összefoglalása a 4. táblázatban látható.

**4. táblázat** Az egytűs és a fűvókamentes, ciprofloxacinnal töltött nanoszálak tulajdonságai.



| Minta | Technika         | Morfológia                         | Szálátmérő                 | Szálátmérő eloszlás         | Stabilitás - morfológia         |
|-------|------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| SN-5  | Single-needle ES | folytonos, sima felszínű           | 735 ± 91 nm                | monodiszperz                | 26 hónap                        |
| SN-10 | Single-needle ES | folytonos, sima felszínű, gyöngyök | 323 ± 51 nm                | monodiszperz                | 8 hónap                         |
| NF-5  | Nozzle-free ES   | folytonos, sima felszínű, hálós    | 1167 ± 415 nm              | polidiszperz                | 16 hónap                        |
| Minta | CIP-tartalom     | Bezárási hatékonyság               | Szálapaplan homogenitása   | CIP kristályossága          | Stabilitás - CIP kristályossága |
| SN-5  | 4,55 ± 0,93 w/w% | 90,9 ± 1,9%                        | inhomogén                  | amorf                       | 5 hónap                         |
| SN-10 | 9,56 ± 0,79 w/w% | 95,6 ± 0,8%                        | inhomogén                  | amorf                       | 3 hónap                         |
| NF-5  | 4,55 ± 0,36 w/w% | 90,1 ± 0,7%                        | homogén                    | amorf                       | 26 hónap                        |
| Minta | CIP oldhatóság   | CIP kioldódás                      | Stabilitás - CIP kioldódás | CIP kioldódás kinetikája    | Citotoxicitás                   |
| SN-5  | növekedett       | gyors (5 min), teljes              | 8 hónap                    | Korsmeyer–Peppas            | nem toxikus                     |
| SN-10 | növekedett       | gyors (5 min), teljes              | 16 hónap                   | Hixon-Crowell négyzetgyökös | nem toxikus                     |
| NF-5  | növekedett       | gyors (10 min), teljes             | 16 hónap                   | elsőrendű                   | nem toxikus                     |

Összefoglalva a kétféle ES módszer hasonló eredményeket hozott a következő szempontokból: a CIP oldhatósága és kioldódása jelentősen növekedett; a bezárási hatékonyság kellően magas volt; a hatóanyag minden formuláció esetén amorfizálódott. Emellett valamennyi nanoszál citokompatibilisnek bizonyult, nem volt toxikus a CaCo-2 sejtekre.

Ugyanakkor különbségeket is találtunk. Az egytűs ES egyenletesebb nanoszálakat tudott előállítani, lényegesen kisebb szálátmérővel és monodiszperz szálátmérő-eloszlással. A szálak egyedisége megtartott volt. Ezzel szemben a tűmentes ES hálószerű nanoszálás szövedéket eredményezett, erősen változó szálátmérővel és polidiszperz eloszlással. Másik oldalról viszont a fűvókamentes ES esetében, a nanoszál paplan egészét nézve, a CIP eloszlása homogénebb volt. Továbbá a 26 hónapos stabilitási eredmények azt mutatták, hogy az amorf hatóanyag jobban stabilizálódott a tű nélkül előállított nanoszálakban. Ez azonban nem befolyásolta az *in vitro* felszabadulást, mivel mind az SN-10, mind az NF-5 minták ugyanolyan felszabadulást mutattak 16 hónap tárolás után, mint a friss minták.

## 5. KONKLÚZIÓ

A nanoszálak habitusukból kifolyólag olyan pozitív fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, melyeket a természettudományok számos területén hasznosítani lehet. Előállításukra többféle módszer alkalmazható, amelyek közül az elektrosztatikus szálképzés a leggyakrabban használt. Bár az ES eljárás több mint egy évszázada ismert, érdemes alapkutatási szinten is foglalkozni vele, hogy ismereteinket még tovább bővítsük. Azért fontos a különböző ES módszerek mechanizmusának további kutatása, mert az új eredmények elősegíthetik a technológiai folyamatok könnyebb tervezését és kontrollálását, amely kiszámíthatóbb folyamatokhoz és új funkciókkal rendelkező termékekhez vezethetnek.

Doktori munkám célja olyan CIP-tartalmú, PVP-alapú nanoszálak vizsgálata volt, melyek előállítása egytűs és fűvókamentes ES eljárással történt. Cél volt továbbá a két különböző típusú ES módszer optimalizálása, továbbá előnyeik és hátrányaik összefoglalásával a módszerek összehasonlítása.

A kutatómunka során kijelölt és a dolgozat elején megfogalmazott öt célt az alábbiak szerint teljesítettük:

**I.)** A nanoszálakkal kapcsolatos szakirodalom áttekintése után négylépcsős kutatási tervet állítottunk fel. Emellett egy összefoglaló tanulmány is publikálásra került a lehetséges alkalmazásokról és azok szabályozásáról.

**II.)** A kísérleti munka első lépéseként a hagyományos egytűs ES technikát használtuk jobb fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező nanoszálak előállítására. Vizsgáltuk az összetétel és az áramlási sebesség hatását, és optimalizáltuk a kezdeti folyamatot. Az 1:1 térfogatarányú PVP oldat : CIP oldatból (viszkozitás  $148 \pm 32$  mPa s) 2 mL/h áramlási sebességgel pumpált minta bizonyult a legjobbnak a nyolc vizsgált formuláció közül. Ezzel a mintával tisztított vízben tizenkétszeres, pH 7,4 PBS-ben hatszoros oldhatóságnövekedést értünk el. Az *in vitro* CIP kioldódás gyors és teljes volt. A bezárási hatékonyság kellően magas volt

( $92 \pm 8\%$ ), de a hatóanyag-tartalom növelését szükségesnek találtuk.

**III.)** Második lépésként ezért a CIP mennyiségét 5%-ra és 10%-ra növeltük a szálakban. A nagyobb hatóanyag-tartalom elérése érdekében a CIP oldószerét kloroformról ecetsavra kellett cserélni. Az acetát csúcsok megjelentek a röntgen diffraktogramon, de ez nem befolyásolta a CIP kioldódását, amely ezen formulációk esetén is gyors és teljes volt. A fizikai-kémiai tulajdonságok mellett a nanoszálak citokompatibilitását és stabilitását is vizsgáltuk. Összességében az összetétel megváltoztatása nem befolyásolta negatívan a

korábban elért eredményeket. Sőt, a készítmények nem bizonyultak toxikusnak a CaCo-2 sejtekre, és legalább 8 hónapig stabilak voltak a morfológia és a hatóanyag-kioldódás szempontjából.

**IV.)** A kutatás harmadik lépéseként egy innovatív, fűvókamentes ES berendezést teszteltünk. A formulációk könnyű összehasonlíthatósága érdekében a második lépésben használt ES oldat összetételekkel (5% és 10% CIP) dolgoztunk. A fűvókamentes módszerrel az 5%-os ES oldatból sikerült olyan nanoszálakat előállítanunk, amelyek minden követelménynek megfeleltek, és növelték a CIP *in vitro* oldhatóságát és kioldódását. Az eredmények alapján tárolási stabilitás 16 hónap volt, ami kétszer hosszabb, mint az egytűs minta esetében. A készítmény *in vitro* nem volt citotoxikus CaCo-2 sejtekre.

**V.)** Végezetül a két ES módszer összehasonlítására került sor. A fűvókamentes módszer fő előnye a gyorsabb előállítás és a nagyobb termelékenység volt, melyek magából az előállítási folyamatból következnek. Ezen kívül az előnyök közé sorolandó, hogy a CIP eloszlása homogénebb volt a teljes nanoszál paplan tekintetében. A módszer hátrányai között meg kell említeni, hogy nagyobb viszkozitású ES oldatot, illetve magasabb feszültséget igényelt. A ~80 mPa s ES oldatból nem sikerült szálakat képezni, illetve az egytűs ES-hez (24 kV) képest kb. kétszerakkora feszültséget kellett alkalmazni (45 kV). Továbbá egy másik különbséget is érdemes kiemelni: a különböző ES módszerekkel előállított nanoszál paplanok szálátmérő-eloszlása és struktúrája jelentősen eltért. Az egytűs ES esetén homogén szálátmérő-eloszlás és véletlenszerűen rendeződött, de egyediségüket megtartott szálak jelenléte jellemezte a mintákat. Ezzel szemben a fűvókamentes ES eljárás során az egyszerre futó több sugár átlagban vaskosabb, de változatos átmérőjű szálakat eredményezett. Jellemzője volt a hálószerű megjelenés, amelyről fontos kiemelni, hogy nem feltétlenül hátrányos, sőt pl. tissue engineering során kihasználható tulajdonság is lehet.

Összességében az eredmények és megállapítások bővítik a nanoszálakkal és előállítási módszerekkel kapcsolatos ismereteket. A bemutatott összehasonlítás segítségével szolgálhat mások számára is és a megfigyelések értékes alapot nyújthatnak a további fejlesztésekhez.

#### **A munka új eredményei és megállapításai:**

- Szükség van az ES-sel kapcsolatos kollektív ismeretek további bővítésére, ugyanis a nanoszálak előállítását empirikusan tervezik, nem lehet matematikailag modellezni. Éppen ezért minél több kutatási eredményt publikálnak, annál több információ áll rendelkezésre a nanoszálak orvosi biológiai területen történő fejlesztéséhez. Ez a dolgozat

is hozzájárulhat ehhez, mivel naprakész és rendszerezett ismereteket nyújt az egytűs és fűvókamentes ES-ről.

- A kísérletes munka során vizsgáltuk, optimalizáltuk és összehasonlítottuk a hagyományos, egytűs ES és az újszerű, hengeres ES technikákat, melyekkel CIP-tartalmú, PVP-alapú nanoszálakat állítottunk elő. A folyamat-paraméterek hatásának vizsgálata az adott összetételben először valósult meg a kétféle ES módszerrel.
- Általános igazság, hogy a kutatásban a sikertelen kísérlet is fontos információkkal szolgál. Ezt szem előtt tartva először publikáltuk a sikertelen nanoszálképzést a polimeroldat túl alacsony viszkozitása miatt a forgóhengeres ES esetében.
- Bizonyítottuk, hogy az előállított nanoszálás formulációk fizikai-kémiai sajátosságai javultak, pl. az *in vitro* CIP oldhatóság és kioldódás szignifikánsan nőtt. Emellett a formulációk citokompatibilisek, továbbá 8 és 16 hónapig stabilak voltak.
- A tárolási stabilitást három különböző szempontból (morfológia, kristályosság és hatóanyag-kioldódás) 26 hónapon keresztül vizsgáltuk. Ez volt az elsőként publikált stabilitási vizsgálat, amely ennyire átfogóan tesztelte a hatóanyag-hordozó nanoszálakat.
- A dolgozat végén az összes eredményt táblázatban foglaltuk össze, hogy megkönnyítsük a két ES módszer és az előállított nanoszálak összehasonlítását. Emellett a különböző ES eljárásokkal kapcsolatos észrevételeket és ajánlásokat is bemutattunk, bízva abban, hogy ez az alap sikeresen adaptálható lesz más nanoszálás formulációkhoz is.

### PUBLIKÁCIÓK (DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ)

- I. **Uhljar L. É.**, Ambrus R.: A sebkezelés jövője – avagy antibiotikum-tartalmú nanoszálak fejlesztése; *GYÓGYSZERÉSZET* 65 (2021) 29-35
- II. **L. É. Uhljar**, S. Y. Kan, N. Radacsi, V. Koutsos, P. Szabó-Révész, R. Ambrus: In Vitro Drug Release, Permeability, and Structural Test of Ciprofloxacin-Loaded Nanofibers; *PHARMACEUTICS* 13 (2021) 556; **Q1, IF: 6.525**  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040556>
- III. **L. É. Uhljar**, A. Alshweiat, G. Katona, M. Chung, N. Radacsi, D. Kókai, K. Burián, R. Ambrus: Comparison of Nozzle-Based and Nozzle-Free Electrospinning for Preparation of Fast-Dissolving Nanofibers Loaded with Ciprofloxacin; *PHARMACEUTICS* 14 (2022) 1559; **Q1, IF: 5.4**  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081559>
- IV. **L. É. Uhljar**, R. Ambrus: Electrospinning of Potential Medical Devices (Wound Dressings, Tissue Engineering Scaffolds, Face Masks) and Their Regulatory Approach; *PHARMACEUTICS* 15 (2023) 417; **Q1, IF: 5.4**  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020417>

### PUBLIKÁCIÓK (DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ NEM KÖTHETŐ)

- I. **L. É. Uhljar**, B. Kürtösi, R. Ambrus: Optimization of nanocapsule preparation protocols using solvent displacement method; *Tavaszi Szél 2022 / Spring Wind 2022 Tanulmánykötet III.* (2022) 66-74

### ELŐADÁSOK (DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ)

#### *Szóbeli előadások*

- I. **L. É. Uhljar**, R. Ambrus: Investigation of bottom-up prepared nanostructures; *II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science*, 23-24. January 2020. Szeged, Hungary
- II. **L. É. Uhljar**, A. Alshweiat, N. Radacsi, R. Ambrus: Investigation of polymer-based nanofibers to modify the physico-chemical properties of ciprofloxacin; *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Science 2020*, 17. October 2020. online
- III. **L. É. Uhljar**, S. Y. Kan, N. Radacsi, R. Ambrus: Preformulation studies of ciprofloxacin loaded PVP nanofibers; *III. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science*, 20-22. January 2021. online

- IV. **L. É. Uhljar:** Development of antibiotic-loaded electrospun nanofibers; *DOSZ OEO Science and Innovation Conference, 29-30. January 2021. online*
- V. **L. É. Uhljar, R. Ambrus:** Különböző szálképzési módszerekkel előállított polimeralapú nanoszálak vizsgálata; *Kárpát-medencei fiatal magyar kutatók konferenciája, 30-31. March 2021. online*
- VI. **L. É. Uhljar:** Ciprofloxacin-tartalmú polimer nanoszálak előállítása tűn keresztül, illetve szabad felszínről történő szálképzéssel; *XIV. Clauder Ottó Emlékverseny, 11-12. November 2021. Budapest, Hungary*
- VII. **L. É. Uhljar, R. Ambrus:** Process optimalization of the preparation of PVP-based nanofibrous drug carrier loaded with ciprofloxacin; *V. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, 18-20. January 2023. Szeged, Hungary*
- VIII. **Uhljar L. É., Ambrus R.:** Hatóanyag-hordozó nanoszálak fejlesztése eltérő elektrosztatikus berendezéssel; *MKE Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály Kerekasztal konferencia, 5-6. Juny 2023. Balatonszemes, Hungary*

#### ***Poszter előadások***

- I. **L. É. Uhljar, A. Alshweiat, S.Y. Kan, A. Esmail, N. Radacsi, R. Ambrus:** Preformulation studies of ciprofloxacin-loaded polymer-based electrospun nanofibers; *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI., 10-12. September 2020. online*
- II. **L. É. Uhljar, N. Radacsi, R. Ambrus:** Optimization of electrospun nanofiber production using ciprofloxacin as a model drug; *13<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 16-18. September 2021. Gdansk, Poland*
- III. **L. É. Uhljar, N. Radacsi, R. Ambrus:** Comparison of single-needle and nozzle-free electrospinning methods; *IV. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, 19-21. January 2022. Szeged, Hungary*

#### **ELŐADÁSOK (DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ NEM KÖTHETŐ)**

##### ***Szóbeli előadások***

- I. **Uhljar L. É., Ambrus R.:** Nanokapszula előállítási módszer kiterjesztése különböző hatóanyagokra faktoriális kísérlettervezéssel; *XXVI. Spring Wind Conference, 5-7. May 2023. Miskolc, Hungary*

### **Poszter előadások**

- I. **L. É. Uhljar**, P. Gieszinger, P. Szabó-Révész, R. Ambrus: Preformulation Studies of Polymeric Nanocapsules; *International Conference on Advances in Pharmaceutical Drug Development, Quality Control and Regulatory Sciences (DDRS 2021)*, 15-17. November 2021. Budapest, Hungary
- II. **L. É. Uhljar**, B. Kürtösi, R. Ambrus: Optimization of nanocapsule preparation protocols using solvent displacement method; *XXV. Spring Wind Conference*, 6-8. May 2022. Pécs, Hungary
- III. **L. É. Uhljar**, B. Kürtösi, R. Ambrus: Development of a preparation method for nanocapsules using factorial design; *9th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences - Pharma Sciences of Tomorrow*, 15-17. September 2022. Ljubljana, Slovenia

---

*A PhD munkát a Richter Gedeon Talentum Alapítvány és az Emberi Erőforrások Minisztériuma TKP 2020 és 2021 projekt támogatta. Emellett az észtországi szakmai gyakorlatot az Erasmus+ segítségével valósult meg.*

*Szeretnék köszönetet mondani minden szakmai és érzelmi támogatásért, bátorításért és segítségért témavezetőmnek, **Dr. Ambrus Ritának**. Továbbá szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Dr. Csóka Ildikónak**, a Gyógyszertechnológiai és Szabályozási Intézet vezetőjének, aki nagymértékben támogatott doktori tanulmányaim során. Hálás vagyok **Prof. Karin Kogermann-nak**, aki lehetővé tette, hogy a PRG 1507; GMVFA22059PR projekt keretében az ő kutatócsoportjában dolgozhassak. Sokat tanultam a Tartui Egyetemen. Köszönettel tartozom minden észt kollégának és ESN-tagnak az életre szóló emlékekért. Hálás vagyok **társszerzőimnek** is az együttműködésért és a segítségért. Nagy köszönettel tartozom a rengeteg segítségért, amit asszisztenseinktől kaptam, akik közül kiemelném **Lakatosné Fekete Piroskát**, **Feczkóné Boda Erikát** és **Béniám Balázst**, akik önzetlen segítségükkel mindig megkönnyítették a feladataimat. Hálás vagyok továbbá **TDK hallgatóimnak és szakdolgozóimnak** is. Köszönöm az **intézet minden tagjának** a mindennapi életben nyújtott segítségét és támogatását. Továbbá sok köszönettel tartozom csodálatos **családomnak**, nélkülük ez a teljesítmény nem lett volna lehetséges.*