

Doktori (Ph.D) Értekezés Tézisei

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

Varga Noémi

Témavezető

Dr. Dékány Imre  
egyetemi Tanár, akadémikus



Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani

Intézet

Szeged, 2015

## 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. 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 funkcionizálhatóság, illetve a biomolekulákkal való konjugáció lehetősége. 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.

A megváltozott tulajdonságok mellett, a célzott specifikusság és a membránokon való megnövekedett permeabilitás tette vonzóvá a nanorészecskék/kompozitok használatát hatóanyag-szállító rendszerekként. 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. Továbbá, a gyógyszer hatékonyságát enzimatis hasítás, adszorpció vagy egy nem-célzott helyen történő akkumulálódás is gátolhatja. Ezen akadályok kiküszöbölhetőek, megfelelő módosításokkal, kölcsönhatások kialakításával, specifikus transzporterek vagy kompozitok alkalmazásával. 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. További hátrányuk, hogy akkumulálódhatnak és a szervezet nem rendelkezik olyan funkcióval, amely ezen anyagok kiürüléséért felelősek. 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, nagyfokú diszperzitást és jobb konjugációt mutatnak más bioaktív molekulákkal, valamint javítják a hő,- és kémiai stabilitást. Az aktív komponens 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. Az ideális

hatóanyag hordozó rendszerek 100 nm alatt vannak, valamint nagyfokú stabilitást mutatnak a vérben, amely megakadályozza a hatóanyag idő előtti kiürülését a szervezetből. Legfontosabb kritériumok, ezekkel a rendszerekkel szemben, hogy a célzott helyen és egy meghatározott időintervallumban adják le a hatóanyagot a megfelelő koncentrációban. 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. 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 gyulladáscsökkentő 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 céloim 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” SiO<sub>2</sub>-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.

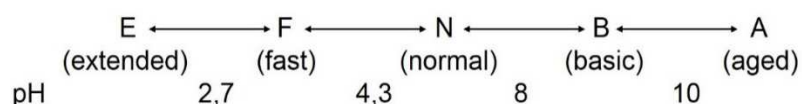
### 3. Kísérleti anyagok és módszerek

#### 3.1. Kísérleti anyagok

3.1.1. A mezopórusos szilika (SiO<sub>2</sub>) részecskék szintézisét a tetraetil-ortoszilikát (TEOS) hidrolízisével, egy szerkezetirányító ágens, a cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) segítségével végeztem el. A terméket centrifugálással (Hermle Z36HK) nyertem ki, amelynek tenzid tartalmát 550°C-os kalcinálással távolítottam el.

3.1.2. Az SiO<sub>2</sub>-alapú mag-héj kompozitok felépítése során, a szilika és az ibuprofen (IBU) közötti kölcsönhatások kialakítása után (pH = 5,5-ön), két ellentétes töltésű polielektrolittal, a polietilén-iminnel (PEI) és a nátrium-poli(sztírol-szulfonáttal) (PSS) „burkoltam be” az SiO<sub>2</sub>/IBU kompozitot elektrosztatikus kölcsönhatások kialakításával.

3.1.3. A fehérje-alapú mag-héj kompozitok alapjául a marha szérum albumint (BSA) választottam. A BSA konformációjának átfogó fizikai-kémiai vizsgálatához 3 mg/ml koncentrációjú oldatsorozatot készítettem pH = 2 és 12 között, só nélkül, valamint 150 mM NaCl-oldatban.



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

3.1.4. A fehérje-ligandum kölcsönhatások során a BSA koncentrációját állandó értéken tartva, a hidrofób molekulát (ketoprofen (KP) vagy 8-anilino-naftalén szulfonsav (ANS)) növekvő koncentrációban (1:0 - 10 molarány) adagoltam a fehérjéhez vagy a BSA/KP 1:1 molarányú komplexéhez.

3.1.5. A BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozit előállítását, a BSA/IBU kompozit kicsapásával pH = 3-as pufferben (McIlvaine-puffer) végeztem el. A kompozitot 3 mg/ml koncentrációjú negatív töltésű PSS-tal, majd egy pozitív töltésű poliszachariddal, a kitozánnal (Chit) (3 mg/ml) „burkoltam be”.

3.1.6. Az egyrétegű mag-héj nanokompozit előállításához pH = 7,4-en a BSA-hoz (60 mg/ml) 1:0,5 tömegarányban kötöttem a kirurénsavat (KYNA), majd 2,4 mg/ml koncentrációjú poli(allilamin-hidroklorid)-dal (PAH) „csomagoltam be” a BSA/KYNA kompozitot.

3.1.7. A BSA/NaDS komplexek előállítása során 5 mg/ml koncentrációjú BSA-oldathoz pH = 3-on növekvő koncentrációjú (0 - 6,3 mg/ml) anionos tenzidet (nárium-dodecil-szulfát, NaDS) adagoltam.

3.1.8. Az IBU-tartalmú kompozitok előállításához a BSA (5 mg/ml), az NaDS (6,3 mg/ml) és a NaCl (150 mM) koncentrációját állandó értéken tartva, az IBU koncentrációját (0 - 2 mg/ml) változtatva állítottam elő a hatóanyag-tartalmú kompozitokat.

### 3.2. Vizsgálati módszerek

A szilika részecskék fajlagos felületének, valamint pórusméret eloszlásának a meghatározására nitrogén adszorpció/deszorpció módszert alkalmaztam (Micromeritics Gemini 2375, 77K).

Töltéstitrálásokat végeztem a töltés ekvivalencia pont meghatározásának céljából, Mütek PCD-04 típusú részecske töltés titráló detektor alkalmazásával.

A fehérje molekulatömegét, a részecskék, valamint a kompozitok átlagos méretét és a zeta potenciálját fényszórásméréssel határoztam meg (Horiba SZ-100).

Az előállított minták méretének, valamint alakjának jellemzésére transzmissziós elektronmikroszkópos képeket (TEM, FEI Tecnai G2 20 X-Twin) készítettünk.

A BSA-tartalmú minták esetében fluorometriás méréseket végeztem, Horiba Yvon Fluoromax-4 típusú készülékkel ( $\lambda_{gerj} = 280 \text{ nm}$ ).

Bizonyos minták esetében meghatároztam a sűrűségeket DMA 58 (Anton Paar) típusú sűrűségmérő alkalmazásával, valamint termoanalitikai méréseket végeztem Mettler Toledo TGA/SDTA 851<sup>o</sup>, ill. Mettler-Toledo 822<sup>o</sup> típusú készülékekkel.

A mag-héj kompozitok kialakulását, valamint a fehérje szerkezetében bekövetkező változásokat infravörös (FT-IR, Biorad FTS-60A, ATR) és cirkuláris dikroizmus (CD, Jasco J-815) spektroszkópiával ellenőriztem.

A minták szerkezetvizsgálataihoz XRD (Bruker D8), valamint SAXS mérés technikákat (Philips PW 1820) alkalmaztunk.

Az *in vitro* hatóanyag-leadási kísérleteket Hanson-cella alkalmazásával, UV-vis spektrofotometriás detektálással követtem nyomon.

A liofilizáló készüléket (Christ-Alpha 1-2 LD) a fehérje szerkezetének a gyors „lefagyasztására”, valamint a szintetizált minták hosszú eltarthatósága céljából alkalmaztam.

## **4. Új tudományos eredmények**

### **4.1. SiO<sub>2</sub>-alapú kétrétegű mag-héj kompozitok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája**

**4.1.1.** Megállapítottam, hogy az 1250 m<sup>2</sup>/g fajlagos felületű és 3,3 nm-es átlagos pórusátmérőjű SiO<sub>2</sub> részecskék ( $d = 408$  nm) ~1600 mg/g IBU molekula megkötésére alkalmasak. A szilika részecskék szabályos hexagonális mezopórusos szerkezetét a SAXS mérések igazolták. A fraktáldimenzió értékek folyamatos növekedése ( $a = 2 - 2,75$ ) az IBU molekulák pórusokba való bediffundálást, illetve az SiO<sub>2</sub>/IBU kompozit körül kialakuló héjak (PEI, PSS) jelenlétét igazolja. A komponensek közötti kölcsönhatások kialakulását FT-IR spektroszkópiával is alátámasztottam, a komponensekre jellemző karakterisztikus sávok megjelenésével. [2]

**4.1.2.** Az SiO<sub>2</sub> átmérőjének (~408 nm), a bemért koncentrációk és a mért sűrűségek ismeretében, modellszámolásokkal meghatároztam az egyrétegű kompozit héj vastagságát, valamint a kompozit átmérőjét. A számított és a mért átmérők jó egyezést mutattak, a szférikus mag-héj modell 10%-os, míg a mag-héj modell a sűrűségek ismeretében 8,9%-os hibán belül megközelítette a mért átmérő értékét. A mag-héj modell a mag koncentrációjának ismeretében tökéletes egyezést adott a mért értékkel (a hiba  $\pm 1\%$ ). Tehát a javasolt egyenletek alkalmasak a tömegek, a koncentrációk, valamint a sűrűségek ismeretében a kompozit várható átmérőjének a meghatározására.

**4.1.3.** A hatóanyag-leadási kísérletek alapján az IBU kioldódott mennyisége szignifikáns csökkenést mutatott a héjak számának a növelésével: 500 perces vizsgálati idő alatt 40%-kal kevesebb hatóanyag oldódott ki a kétrétegű mag-héj kompozitból, mint a héj nélküli SiO<sub>2</sub>

részecskékből. A kioldódás mechanizmusának kvantitatív leírására az SiO<sub>2</sub>/IBU kompozitból a nulladrendű (a hatóanyag koncentrációjától-független), míg az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI kompozitból az elsőrendű (a hatóanyag koncentrációjától-függő) kinetikai modell alkalmazható. Az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS kompozit esetében a diffúzió mellett az erózió (a kompozit szétesése/fellazulása) folyamata szabályozza a kioldódás folyamatát (Korsmeyer-Peppas). Az IBU  $k_d$  értékei a héjak számával folyamatosan csökkennek, amely értékek rendre az SiO<sub>2</sub>/IBU, az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI,- és az SiO<sub>2</sub>/IBU/PEI/PSS sorrendnek megfelelően, hordozó nélkül:  $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; illetve a kompozitok esetében:  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  és  $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . [2]

## **4.2. A BSA másodlagos és harmadlagos szerkezetére vonatkozó fizikai-kémiai vizsgálati módszerek eredményei a pH- függvényében, valamint fiziológiás sóoldatban**

**4.2.1** A BSA másodlagos szerkezetében bekövetkező változásokat FT-IR mérésekkel igazoltam, a pH és a fiziológiás koncentrációjú NaCl-oldat hatására. A BSA natív (N)-állapotban (lásd 1. ábra) a legnagyobb százalékban,  $\alpha$ -hélix szerkezetet tartalmaz (~62% só nélkül; ~51% 150 mM NaCl jelenlétében), amely szerkezet kisebb hányadban fordul elő a pH csökkentésével (F,- E-állapot). A BSA, B és A-állapotban 40 - 55%  $\alpha$ -hélix szerkezettel rendelkezik, a pH-tól és a só jelenlététől függően. Aggregált szerkezet legnagyobb arányban (~12%) a legkisebb  $\alpha$ -hélix tartalommal rendelkező fehérje szerkezetében van jelen (E- és F-állapot), míg N-formában mindössze ~2,5%. [4]

**4.2.2.** A fehérje harmadlagos szerkezetét fluoreszcenciás mérésekkel jellemeztem. Igazoltam, hogy a fehérje natív, azaz felgombolyodott (szférikus) állapotában rendelkezik a legintenzívebb emissziós csúccsal, míg kisebb intenzitású és elnyúltabb emissziós csúcs kigombolyodott állapotú fehérje jelenlétére utal. Megállapítottam, hogy lúgos tartományban a szerkezeti átrendeződés nagyobb mértékű (a felszínen jól hidratálható karboxilcsoportok találhatóak), mint savas közegben (a felszínen nem-poláris és gyengén hidratálható aminosavak találhatóak). [4]

**4.2.3.** Kimutattam, hogy a fiziológiás sóoldat a BSA fehérje aggregációját okozta, amit a hidrodinamikai átmérő növekedése (mintegy kétszeresére) igazolt. Az izoelektromos pont körül (pH = 5) a só nem befolyásolta a fehérje gombolyag méretét, az átlagos átmérő 6 nm. A kigombolyodott BSA mérete nagyobb a natív állapotban lévő fehérje méretéhez képest, amelyet SAXS mérésekkel (pH = 3-nál  $D = 9 \text{ nm}$ ; pH = 7-nél  $D = 6,3 \text{ nm}$ ) is alátámasztottunk. A fehérje lúgos tartományban nagy stabilitást mutatott,  $\zeta = -28 - -69 \text{ mV}$ ), viszont NaCl jelenlétében

tömör elektromos kettősréteg alakult ki ( $\zeta = -0,9 - -2,4$ ), amely a fehérje aggregációjához vezetett. [4]

**4.2.4.** A statikus fényszórásmérés eredményei alapján megállapítottam, hogy a BSA pH = 3 (54,6 kD), pH = 7 (65,3 kDa) és pH = 11 (68,6 kDa) értéken főleg monomer formában van jelen. A második viriál együttható ismeretében megállapítható, hogy a só nélküli oldatban a BSA mindhárom pH-n jól szolvatált állapotban van. 150 mM NaCl hatására nagyobb átlagos molekulatömegeket mértem. Így pH = 3-nál ( $M_w = 114$  kDa) két fehérje molekula összekapcsolódásával főleg dimer szerkezet alakult ki, míg pH = 7-nél (78 kDa) és pH = 11-nél (83 kDa) az  $M_w$  értéke megnövekedett dimer forma jelenlétére utal. Az utóbbi két pH-n, az  $A_2$  negatív értékei fehérje aggregációt jeleznek, amelyek összhangban vannak a molekulatömegekre kapott értékekkel. A fehérje molekulatömegeinek ismeretében, a számított molekuláris térfogatokból az ekvivalens sugár értékei meghatározhatóak, amely értékek jó közelítést adtak a DLS mérés eredményeivel. A molekuláris térfogatok alapján igazolható, a natív állapotú fehérje szférikus struktúrája, míg savas (pH = 3) vagy lúgos pH tartományban (pH = 11) a fehérje egy elnyúltabb, ellipszoid alakkal írható le. [4]

### **4.3. BSA-alapú kétrétegű mag-héj kompozit szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája**

**4.3.1.** Megállapítottam, hogy az IBU molekula BSA-hoz való kötődésével (pH = 3), megnövekedett (kb. 60-szoros) oldhatóság érhető el. [1]

**4.3.2.** A kigombolyodott fehérje szerkezetében, pH = 3 értéknél a legnagyobb százalékban előforduló fő másodlagos szerkezeti elem a  $\beta$ -redő, amelyet az  $1642\text{ cm}^{-1}$  hullámszámnál megjelenő, amid I sáv (FT-IR) igazolt. A hatóanyag megkötődése szerkezeti változásokat okozott a fehérjében, azaz egy jelentős frakciója rendezetlen szerkezetté alakult (amid I sáv maximuma  $1648\text{ cm}^{-1}$ ). Az első polielektrolit héj, a negatív töltésű PSS hatására a BSA szerkezete újra rendeződött, ezt igazolta az amid I sáv eltolódása az alacsonyabb hullámhosszak felé ( $1639\text{ cm}^{-1}$ ). Az elágazó láncú, pozitív töltésű PEI hatására, a kétrétegű mag-héj szerkezet hordozója, a BSA láncai újra kitekeredtek ( $1648\text{ cm}^{-1}$ ). A hatóanyag fehérjéhez való kötődésekor jelentkező lánc-szerű struktúra megjelenését SAXS mérésekkel is alátámasztottuk. A fehérje, és a BSA/IBU kompozit esetében egyedi szórócentrumok, míg az egy,- és kétrétegű mag-héj kompozitok esetében aggregátumok jelenlétét igazoltuk. A párkorrelációs függvények a kompozit felépülésével egyre kiszélesedő függvényeket eredményeztek, amely a BSA



alakjában végbemenő változásokra utal, azaz a szférikus struktúra egyre inkább ellipszoid alakkal jellemezhető. [1]

**4.3.3.** Az egyrétegű mag-héj kompozit átlagos átmérője 130 nm ( $d_{TEM} = 138 \pm 18,0$  nm,  $d_{DLS} = 134 \pm 12,3$  nm, a BSA/IBU/PSS/Chit:  $d_{TEM} = 223 \pm 18,5$  nm,  $d_{DLS} = 231 \pm 9,6$  nm) [1], amely alapján azt feltételeztem, hogy nem egy BSA molekulát „burkol” be a PSS polielektrolit héj ~130 nm vastagságban. Megállapítottam, hogy a mag-héj modell a sűrűségek figyelembevételével tökéletesen leírja (a számolt átmérő 134 nm) a kísérletileg meghatározott méretet, a héjvastagság értékének a változtatásával a következő képlet alapján:  $r_{Mag} =$

$$\left( \frac{d_{Héj}^3 \rho_{Héj} m_{Mag}}{\rho_{Mag} m_{Héj}} \right)^{1/3}$$

**4.3.4.** A hatóanyag kioldódás a pH-változás hatására indul meg, ugyanis a BSA töltésének (pH = 3:  $\zeta = +2,5$  mV, pH = 7,4:  $-1,1$  mV) a megváltozása a kompozit szerkezetének a fellazulását/szétesését okozza. A két polielektrolit héj mintegy 40%-kal csökkentette a kioldódott IBU mennyiségét 500 perc elteltével. A BSA/IBU kompozit esetében a hőmérséklet nem befolyásolta lényegesen a kioldódott hatóanyag mennyiségét (~70%). A BSA/IBU/PSS/Chit kompozit hatóanyag leadását 25°C-on a diffúzió,- és az erózió szabályozza, míg fiziológias körülmények mellett, azaz 37,5°C-on a nulladrendű kinetikai modellt követve, egy jól-szabályozott (a hatóanyag koncentrációjától független) hatóanyag-leadás valósult meg. [1]

#### **4.4. BSA-alapú egyrétegű mag-héj nanokompozitok szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája**

A KYNA, a stabilitási vizsgálatok szerint, vizes oldatban pH = 7 értéknél stabil, míg puffer (PBS vagy HEPES) jelenlétében 24 óráig sem állandó a KYNA mérhető koncentrációja. Ennek tudatában a kompozit előállítását fiziológias körülmények között, puffer nélkül valósítottam meg. [5,6] A BSA-ligandum kölcsönhatások fluoreszcenciás vizsgálataiból megállapítottam, hogy pH = 7,4-en a karboxilcsoportot tartalmazó ligandum kötődése a fehérjéhez nagy affinitással és így nagy szabadenergia ( $\Delta G$ ) változással jár, amelyet a kötési állandók ismeretében a  $\Delta G = -RT \ln K$  egyenlet alapján számoltam.

**4.4.1.** A BSA és a polielektrolit között gyenge, míg a hatóanyag jelenlétében (500 mg KYNA/g BSA), a KYNA és a PAH között erős kölcsönhatások (pl. hidrogén-kötések, hidrofób kölcsönhatások) alakultak ki, amelyet a DLS mérések igazoltak: a BSA/PAH mérete  $20 \pm 1,2$

nm, míg az BSA/KYNA/PAH egyrétegű mag-héj kompozit mérete:  $103 \pm 4,8$  nm. A PAH megkötődését a BSA/KYNA kompozit körül, a Trp emissziós sávjának csökkenése is igazolta. [5,6]

**4.4.2.** A BSA  $\alpha$ -hélix tartalma 53,3%, amely a KYNA megkötődésével kismértékű csökkenést mutatott (51,8%) (CD). A polielektrolit a hatóanyag nélkül is jelentős változást okozott a fehérje szerkezetében, a BSA fő másodlagos szerkezeti elemének tartalma mindössze 29,6%. A KYNA-tartalmú egyrétegű mag-héj kompozit kialakításakor a PAH jelentős perturbációt okozott a BSA szerkezetében: az  $\alpha$ -hélix tartalom további, jelentős csökkenését tapasztaltam (15,9%), amely alátámasztotta a DLS mérésekből tett megállapításokat. [5,6]

**4.4.3.** Megállapítottam, hogy a kioldódási kísérletek során a KYNA PBS-ben csak az első órában tekinthető stabilnak, így a kinetikai modellek is csak ebben a tartományban alkalmazhatóak. A BSA/KYNA kompozitból a hatóanyag kioldódás mechanizmusát a diffúzió határozta meg 25 és 37,5°C-on is. A BSA/KYNA/PAH egyrétegű mag-héj nanokompozit esetében a nulladrendű sebességi modell adja a legjobb illeszkedést, amely alkalmazásával fiziológias körülmények között egy állandó KYNA koncentráció tartható fenn adott időintervallum alatt. [5,6]

## **4.5. BSA/IBU/NaDS kompozit szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája**

**4.5.1.** A pH = 3-on előállított BSA/NaDS komplexek különböző mólarányban való összeméréséből, meghatároztam azt a szükséges tenzid koncentrációt, amely egy stabil hidofil rendszer kialakításához szükséges az IBU szállítására:  $c_{BSA} = 5$  mg/ml és  $c_{NaDS} = 6,3$  mg/ml (1260 mg NaDS/g BSA). [3]

**4.5.2.** A tenzidek folyadékkristályos szerkezetét a lamellák távolságának meghatározásával igazoltam ( $d_L = 3,69$  nm). A hidratáció figyelembevételével, a számolt  $d_L$  értéke 3,97 nm-nek adódott. Az XRD mérések alapján a mért  $d_L$  érték, ezzel a számolt távolsággal tökéletes egyezést mutatott. Az IBU/NaDS rendszerben a folyadékkristályos szerkezet megmaradt, a  $d_L$  értékek (3,84 nm) jól közelítik az NaDS-re kapott távolság értékeket. Az NaDS folyadékkristályos szerkezetében a BSA részleges dezorientációt okozott, a fehérje hatására a  $d_L$  távolságok (3,62 nm) az alkiláncok „összecsúszására” következtetnek. A BSA/IBU/NaDS esetén a hatóagnak köszönhetően a jól definiált (szmektikus) szerkezet megmaradt; az IBU koncentrációjának növelésével a  $d_L$  értékek megegyeztek az NaDS-re mért értékekkel. [3]

**4.5.3.** Az IBU-tartalmú biokonjugátumok rendezett folyadékkristályos szerkezetét a SAXS mérések is igazolták. Az IBU-tartalmú kompozitoknál (220 mg IBU/g BSA; 400mg IBU/g BSA) a szórásgörbén megjelent két csúcs intenzitása annál nagyobb, minél nagyobb a hatóanyag koncentrációja. Megállapítható, hogy az IBU biztosítja a folyadékkristályos (szmektikus) szerkezet stabilitását. Feltehetően a BSA, mint hordozó van jelen a rendszerben, azaz a fehérje hidrofób részeivel a tenzid alkiláncai alakítanak ki kölcsönhatásokat, míg a poláris fejcsoportok összekapcsolódva alkotnak egy lamellás struktúrát. A BSA/IBU/NaDS kompozitban a hatóanyag valószínűleg a fehérjéhez kötődve, valamint a fejcsoportok között helyezkedik el. [3]

**4.5.4.** Megállapítható, hogy a tenzidnek (NaDS/IBU) jelentős lassító hatása van a kioldódási vizsgálatok alapján, ugyanis az 500 perc vizsgálati idő után az IBU kioldódott mennyisége csupán 17%. A c11-BSA/IBU/NaDS kompozit esetében a kioldódott IBU mennyisége (67%) megegyezik a BSA/IBU rendszerből kioldódott mennyiséggel. A nagyobb koncentrációban jelenlevő hatóanyag egy kompakt jól rendezett struktúrát képes létrehozni, amely hatására csekély mennyiségű IBU kioldódást tapasztaltam (28%). Az IBU kioldódás kinetikájára a hatóanyag koncentrációjától-függően más-más modell illeszkedik, így a kisebb koncentrációban IBU-t tartalmazó kompozitra az elsőrendű, azaz a koncentráció-függő kioldódás a jellemző. A nagyobb hatóanyag-tartalmú kompozit kinetikája a Korsmeyer-Peppas modellel jellemezhető, azaz ebben az esetben az erózió és a diffúzió határozza meg a kioldódás sebességét. [3]

## **5. Az eredmények alkalmazási lehetőségei**

Doktori munkám célja, olyan hatóanyag-szállító rendszerek előállítására és vizsgálatára irányultak, amelyek alkalmasak vízben rosszul oldódó vagy egyéb, például a szervezet védekező rendszere miatt nem hasznosuló gyógyszermolekulák „kapszulázására”, majd in vitro és in vivo szabályozott hatóanyag leadásra. A KYNA-tartalmú egyrétegű mag-héj kompozitokkal in vitro vér-agy gátas modell kísérleteket végeztek el a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban Krizbai István és munkatársai. A KYNA megnövekedett permeabilitásának köszönhetően, Toldi József és munkatársai (Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék) állatkísérletekkel bizonyították a hatóanyag célzott és hatékony bejuttatását a központi idegrendszerbe a mag-héj kompozit segítségével. A sikeres munkáról „Eljárás gyógyszerhatóanyagok vér-agy gáton való szabályozott átjuttatására mag-héj nanokompozitok alkalmazásával” címmel került egy szabadalom benyújtásra (ügyiratszám: P1500356, Varga

Noémi, Dr. Dékány Imre, Knapp Levente, Dr. Krizbai István, Dr. Majláth Zsófia, Dr. Toldi József, Dr. Vécsei László).

## **Tudományos közlemények**

*Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10047822*

*Az értékezés témájában megjelent tudományos dolgozatok:*

[1] N. Varga, M. Benkő, D. Sebők, I. Dékány, BSA/polyelectrolyte core–shell nanoparticles for controlled release of encapsulated ibuprofen, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123 (2014) 616–622.

Impakt faktor: **4,152**

[2] N. Varga, M. Benkő, D. Sebők, G. Bohus, L. Janovák, I. Dékány, Mesoporous silica core-shell composite functionalized with polyelectrolytes for drug delivery, *Microporous and Mesoporous Materials* 213 (2015) 134-141.

IF<sub>2014</sub>: **3,453**

[3] M. Benkő, N. Varga, D. Sebők, G. Bohus and I. Dékány, Bovine serum albumin-sodium alkyl sulfates bioconjugates as drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 130 (2015) 126–132.

IF<sub>2014</sub>: **4,152**

[4] N. Varga, I. Dékány, Structural changes of the BSA protein at various pH and physiological salt solution from Extended to Aged-form, *Int. J. Biol. Macromolec.* (közlésre benyújtva, IF<sub>2014</sub>: 2,85)

[5] N. Varga, E. Csapó, Z. Majláth, I. Ilisz, I. Krizbai, I. Wilhelm, L. Knapp, J. Toldi, L. Vécsei, Targeting of the kynurenic acid across the blood-brain barrier by core-shell nanoparticles, *Int. J. Pharm.* (közlésre benyújtva, IF<sub>2014</sub>: 3,65)

Az értékezés témájában benyújtott szabadalom:

[6] Varga N., Dékány I., Knapp L., Krizbai I., Majláth Z., Toldi J., Vécsei L., Eljárás gyógyszerhatóanyagok vér-agy gáton való szabályozott átjuttatására mag-héj nanokompozitok alkalmazásával (Ügyiratszám: P1500356)

$\cdot \Sigma_{IF} = 11,757$

Egyéb, az értékezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények:

[5] T. Szabó, Á. Veres, E. Cho, J. Khim, N. Varga, I. Dékány, Photocatalyst separation from aqueous dispersion using graphene oxide/TiO<sub>2</sub> nanocomposites, Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects 433 (2013) 230–239. .

IF: **2,354**

[6] A. Majzik, V. Hornok, N. Varga, R. Tabajdi, I. Dékány, Functionalized gold nanoparticles for 2-naphthol binding and their fluorescence properties, Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects 481 (2015) 244-251.

IF<sub>2014</sub>: **2,752**

[7] V. Hornok, E. Csapó, N. Varga, D. Ungor, D. Sebők, G. Laczkó, I. Dékány, Controlled syntheses and structural characterization of plasmonic and red-emitting gold-lysozyme nanohybrid dispersions, Colloid and Polymer Science (2015) DOI:10.1007/s00396-015-3781-7

IF<sub>2014</sub>: **1,865**

$\cdot \Sigma_{IF} = 6,971$

$\Sigma \Sigma_{IF} = 18,728$

### Konferencia részvételek

N. Varga, G. Bohus, M. Benkő, I. Dékány, Core-shell nanohybrid particles for controlled release of ibuprofen, Workshop on Functionalized Surfaces and Nanobiocomposites, 2013.05. 26-28., Szeged, Magyarország (poszter)

I. Dékány, N. Varga, M. Benkő, D. Sebők, Mesoporous silica core-shell nanoparticles for controlled release of ibuprofen, 6th International FEZA Conference 2014.09.08.–11., Lipcse, Németország (poszter)

Varga N., Benkő M., Sebők D., Janovák L., Dékány I., Mag-héj szerkezetű kompozitok előállítás és hatóanyag leadása, Kolloid Munkabizottsági Ülés, 2014.09.26., Eger, Magyarország (előadás)

N. Varga, M. Benkő, D. Sebők, I. Dékány, Core-shell nanoparticles for drug delivery, 6th Szeged International Workshop on Advances in Nanoscience, SIWAN6, 2014.10.15-18., Szeged, Magyarország (poszter)

N. Varga, I. Dékány, A kinurénsav nanokapszulázása és a hatóanyag leadása a véragy-gáton való átjutás modellezése céljából, Kinurenin Kerekasztal, 2014.11.25., Szeged, Magyarország (előadás)

I. Dékány, N. Varga, E. Csapó, D. Sebők, Self-assembled 2D and 3D nanoscale materials: core-shell nanoparticles for drug delivery, BIT's 4th Annual World Congress of Nano Science&Technology, 2014.10.29-31., Qingdao, Kína, (előadás)

I. Dékány, N. Varga, E. Csapó, V. Hornok, D. Ungor, Á. Juhász, D. Sebők, Self-assembled core-shell nanoparticles for drug delivery: structural properties and kinetic of the release process, 6th international congress, Bionanomed2015, 2015.04.08–10., Graz, Ausztria (előadás)

N. Varga, I. Dékány, Controlled release of encapsulated neurotransmitter from core-shell nanocomposites, 15th European Student Colloid Conference, 2015.06.08-11., Krakko, Lengyelország (poszter)

I. Dékány, N. Varga, E. Csapó, D. Sebők, Á. Juhász, L. Janovák, Syntheses and characterization of potential drug carrier nanocomposites, 11th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids, 2015.06.22-26., München, Németország (előadás)

Dékány I., Csapó E., Sebők D., Varga N., Juhász Á., A fény és a röntgensugarak kölcsönhatása szupramolekuláris rendszerekkel és plazmonikus nanoszerkezetű anyagokkal, MKE2. Nemzeti Konferencia, 2015.08-31-09.02., Hajdúszoboszló, Magyarország, (előadás)

N. Varga, I. Dékány, Mag-héj kompozitok fejlesztése célzott és szabályozott hatóanyag leadásra, TÁMOP Tudáspark projekt (TÁMOP-4.2.1.C-14/1/KONV-2015-0013): „A kinurenin program - szabadalmi lehetőségek”, 2015.10.27., Szeged, Magyarország (előadás)

N. Varga, I. Dékány, Gyógyszerhatóanyag szállító rendszerek szerkezete és a hatóanyag leadás kinetikája, Kolloid Munkabizottsági Ülés, 2015.11.06., Budapest, Magyarország, (előadás)