

Válaszok

dr. Kiss Éva bírálata

Mindenekelőtt szeretném megköszönni dr. Kiss Éva Professzor asszonynak, hogy elvállalta a PhD dolgozatom bírálatát, és hogy azt alaposan és nagy körültekintéssel végezte el. Észrevételeivel, hasznos tanácsaival és kérdéseivel segíti a későbbi szakmai munkámat.

A bírálatban feltett kérdésekre és a megjegyzésekre a válaszok és a megjegyzések idézete után válaszolok.

Megjegyzések, kérdések

1. Az értekezés hatalmas kísérleti anyagot dolgoz fel, számos vizsgálati technikát alkalmazva nyeri a következtetéseket. Ezek alátámasztására jó lett volna pl. a *Kísérleti részben* röviden megemlíteni a párhuzamos mérések számát, a mért adatok hibáját. Erre nem találtam utalást. Csak néhány ábrán (5.59-64), illetve táblázatban (5.13-16, 5.22) látható a mért adatoknál szórás feltüntetése, ami vélhetően arra utal, hogy nem egy mérés történt.

Válasz: Valóban egyes helyeken nem tüntettem fel a párhuzamos vizsgálatok számát.

A vezetőképesség méréseknél 3 és 4 párhuzamos mérés alapján számítottam a megadott adatokat. A 5.19-5.21 táblázatokban szereplő kapszulázási hatékonyság adatokat, a BSA kapszulázás körülményeinek kidolgozása során végzett nagyszámú kísérlethez, két-két párhuzamosból határoztam meg.

Az XRD mérésekből a közelítő összetételek csak a kristályos fázisra vonatkoznak és csak nagyságrendileg vehetők figyelembe.

A szemcseméret eloszlásoknál mind a Zetasizerrel, mind a Mastersizerrel végzett mérések esetében 5 ciklusmérés történik minden párhuzamosnál. Általában 3 párhuzamost mérünk, majd a szoftver átlagolja az eredményeket.

Az említett kiegészítéseket a válaszok utáni hibajegyzékben feltüntettem.

2. Egy általánosságban felmerülő kérdés, hogy a szférikus agglomerációval képződő szemcsék milyen mértékben kristályosak, illetve lehetnek-e amorfak a kiváló komponensek.

Válasz: A klasszikus, a tiszta hatóanyag szuszpenziójában történő szférikus agglomeráció esetében maga a hatóanyag kristályos formájú, gyakran tűs kristályokkal. Ezeknek a kristályoknak a folyási tulajdonságainak javítására fejlesztették ki Kawashima és mtsai a szférikus agglomeráció módszerét.

A PSS-kitozán-HSA rendszerben készült szemcsékre nem történtek röntgenmérések, de a polimerek a SEM felvételek alapján inkább amorfak a gyors precipitációnak köszönhetően.

A timsó agglomerátumok esetében pedig a röntgenfelvételek tanúsága szerint a különböző közegekben kivált timsó egy része amorf formában van jelen. A víz-etanol-diklórmétán rendszerben az SA mechanizmussal képződött szemcsék kristályosak. A feltételezett mechanizmus szerint a híd-folyadékban oldódik a szemcsék felülete, és ezek az oldódó részek kristályosítási gócként viselkedve kötik össze a szemcséket szférikus agglomerátumokká. A szemcsék különböző kristálylapok mentén történő agglomerálódása is megerősíti, hogy a

kötőhidaknak részben kristályos karakterűeknek kell lennie.

ESD mechanizmus: A timsó agglomerátumok esetében mind a TG, mind a XRD mérések amorf fázis jelenlétét mutatják. Mivel az emulziócseppen belüli kristályosodás nem kötőhidak révén összekapcsolt szemcsékből álló agglomerátumot eredményez, a kristályosodás sebessége és az adott oldószerrendszerben tapasztalható oldhatóságoktól függően különböző, amorf és kristályos komponensek válhatnak ki. Mennyiségük meghatározásához a röntgenmérésekhez belső standard-re, vagy az egyes fázisok kalibrációjára lenne szükség.

3. Az 5.1 fejezetben a HSA tartalmú kitozán-PSS polimer szemcsék előállítását tárgyalja. Milyen módon, milyen formában tárolható a kapott, fehérjetartalmú mikrogömböcskés rendszer?

Válasz: Fiolában és hűtőben tároltam a mintákat, de a fehérjetartalom időbeni változására nem végeztem vizsgálatokat.

4. Mi volt a hőmérséklet a felületi feszültség méréseknél? Ha a kísérleti részben szerepelne, akkor is célszerű feltüntetni a 5.13. táblázat címében.

Válasz: Szobahőmérsékleten végeztem a méréseket. Hibajegyzékben feltüntettem.

5. Az 5.13-as táblázatban miért hiányoznak a Tween 80 oldatok felületi feszültségének irodalmi adatai? Ezek is fellelhetők bőségesen, pl. K. Szymczyk et al. 2018 DOI: 10.1007/s10953-018-0823-z; S.C.Kothekar et al. 2007 DOI: 10.1080/01932690601108045; A. Bak, W. Podgorska 2016 DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.05.091.

Válasz: Professzor Asszonynak igaza van a Tween 80 esetében hiányoznak az irodalmi adatok, amivel összehasonlítható lenne a saját mérési eredmény. A cikk írásának idejében nem találtam elérhető cikket, ill. adatot a Tween 80-ra. Sok esetben az adatok csak grafikusan kerülnek közlésre, így számszerű adatot csak közelítőt lehetne leolvasni az ábrákról. Bíráló által idézett cikkek között is van, ahol csak grafikus adat van. Kothekar és munkatársai munkájában szerepel adat (38,13 mN/m) 1% Tween 80-ra 30 °C-on mérve. Ez jelentősen eltér az általam mért értéktől (46,16 mN/m). A folyadék-levegő határfelületi feszültség többféleképpen meghatározható, a mért adatok azonban ekkora eltérést valószínűleg nem mutatnának. A felületi feszültség hőmérséklet függő, de a szobahőmérséklet és a 30 °C nem olyan mértékű eltérés, hogy ekkora különbség legyen a mért értékek között. Azt gondolom a Tween 80 tisztaságától függhet ilyen mértékben a mért felületi feszültség. Az alábbi irodalmi adatok is erre engednek következtetni.

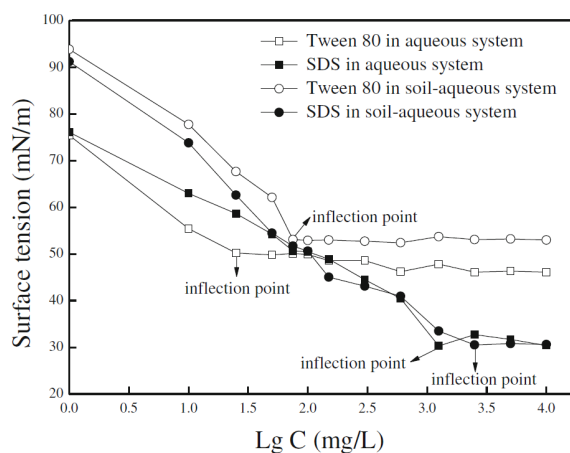


Fig. 2 Variation of surface tension with different concentrations of Tween 80 and SDS in aqueous and soil-aqueous system. Error bars represent standard errors of the means ($n = 3$)

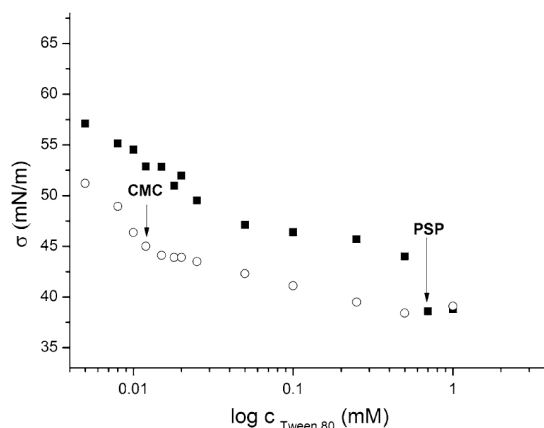
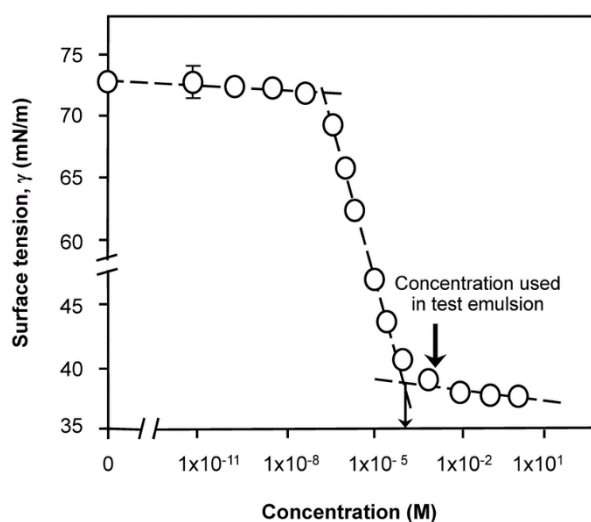


Fig. 7 Surface tension of pure Tween[®] 80 solutions (circles) and 0.06 % mixture of Carbopol[®] 940 with Tween[®] 80 (squares) vs. Tween[®] 80 concentration. CMC critical micelle concentration, PSP polymer saturation point

Tween 80 Hanschemical (Nantong, China),
Szobahőmérséklet 46-48 mN/m²

Tween 80 (TJ. Baker) 25 °C 38 mN/m¹



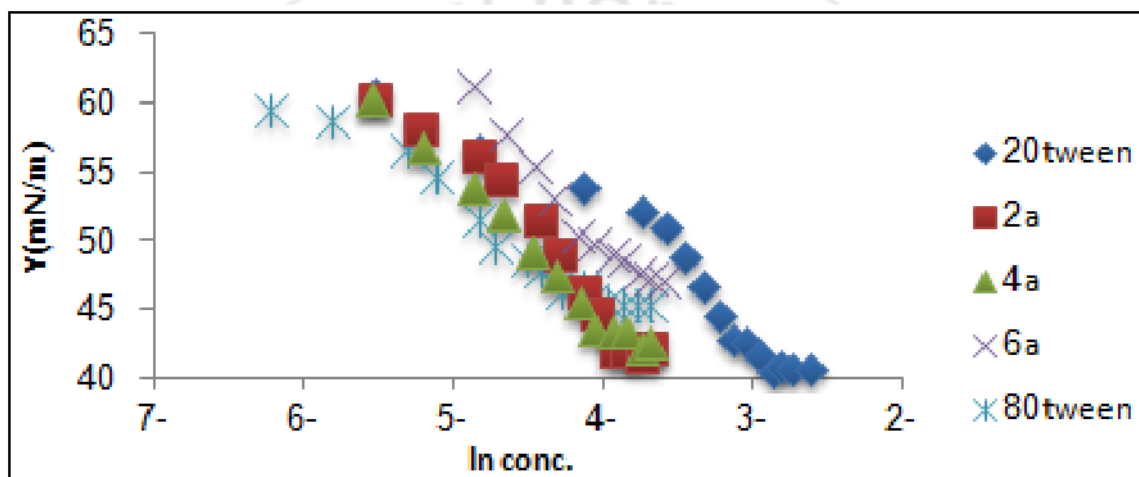
Surface tension for **purified Tween 80 solutions** at 20 °C as a function of increasing bulk concentration (where error bars are not shown they are of a smaller magnitude than the dimensions of the symbols; lines represent an aid to the eye to show the trend in the data). The arrow in the figure indicates the concentration used in test emulsion. All solutions used for samples were prepared from surface chemically pure 50 mM sodium phosphate buffered water, pH 7.0.

$c = 0,008 \text{ M kb. } 37 \text{ mN/m } 20 \text{ °C-on}^3$

¹ Milanović, M., Krstonošić, V., Dokić, L., Hadnađev, M. and Dapčević Hadnađev, T. (2015), Insight into the Interaction Between Carbopol[®] 940 and Ionic/Nonionic Surfactant. J Surfact Deterg, 18: 505-516. <https://doi.org/10.1007/s11743-015-1677-7>

² Xu, R., Zhang, Z., Wang, L. *et al.* Surfactant-enhanced biodegradation of crude oil by mixed bacterial consortium in contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res* **25**, 14437–14446 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1604-3>

³ Adu-Gyamfi, N.; Sarker, D.K. Interfacial Effects and the Nano-Scale Disruption in Adsorbed-Layer of Acrylate Polymer-Tween 80 Fabricated Steroid-Bearing Emulsions: A Rheological Study of Supramolecular Materials. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1612. <https://doi.org/10.3390/nano11061612>



l: Surface tension versus $\ln$ [surfactant] plots for TW-20 / TW-80 mixed surfactant s⁴

$\ln(0,008) = -4,83$ ehhez, kb. 48 mN/m érték tartozhat.⁴

6. A 5.15 és 5.16 táblázatokban feltüntetett minden polimer filmre a 32mN/m-es szilárd/levegő felületi feszültség értéket alkalmazta?

Válasz: Igen, Loxley-ékhoz hasonlóan a Polymer Handbookban az etil-cellulózra szereplő értékkel számoltam. A két kevert film adatnál ez jelenthet némi hibát. Ha a PMMA és EC film szilárd/levegő felületi feszültségének számtani átlagát vesszük, akkor a szétterülési együttható (S3) értékek jelentősen eltérnek ugyan, de az előjelük nem változik. Így a modell alapján feltételezett egyensúlyi morfológiában nincs változás. Ezek a minták a munka során nem kaptak nagy figyelmet, mert lyukacsos szemcsék képződtek. Szerencsésebb lett volna a táblázatokban nem felsorolni az eredményeket, hiszen nem is elemeztem azokat.

7. Az interferon-béta mikrokapszulázása során előkísérletként HSA-ból állított elő nanoszerkezetű szemcsét szférikus agglomerációval. Az interferon-béta kapszulázásához ugyanakkor az összetett emulziós módszert választotta. Mi ennek az oka?

Válasz: A szférikus agglomerációval természetes interferon kapszulázását céloztuk meg nanoszerkezetű kompozit gyógyszerformák formájában a hatékonyság növelés céljából. A szférikus agglomerációval a tablettában való felhasználás lehetőségében gondolkodtunk.

Az interferon-béta esetében elsősorban az injekciós felhasználás, illetve nyújtott hatás elérésével a betegek ritkább injekciózása volt a cél. Ehhez a feladathoz a fehérjék mikrokapszulázását szubmikronos méretben jó hatékonysággal alkalmazható összetett emulziós oldószer-elpárologtatásos módszert választottam.

⁴ Ali, S. (2017). Surface Properties of Mixed Adsorbed Surfactants Film of Tween 20 and Tween 80 on Liquid – Air Interfacial.

8. Az 5.4.2. fejezetben tárgyalja a kísérleti paraméterek hatását BSA nanorészecskék kialakulására. Ez elég összetett elemzés. Célszerű lett volna valamiféle ábrázolással megjeleníteni ezeket a relációkat, megkönnyítette volna az áttekinthetőséget.

Válasz: A kísérletek megkezdésekor arra gondoltunk, hogy a korábbi tapasztalatok elegendőek lesznek a kapszulázás megoldásához. Azonban a kis méretben való kísérletek az előállítási paraméterekkel kapcsolatban egyéb összefüggésekre is rámutattak. Célszerű lett volna kísérlettervezést alkalmazni, így az összefüggések grafikusán is ábrázolhatók lettek volna. Ez tapasztalat a jövőre nézve. Ha ilyen rendszerben szeretnénk dolgozni, az előkísérletek után érdemes mérlegelni a kísérlettervezés lehetőségét.

9. A PLGA és PEG-PLGA polimerbe kapszulázott BSA felszabadulásának mérésénél (eltérően az IFN-béta esetétől) a mintavétel után nem pótolta a közeget. Véleménye szerint ez milyen módon befolyásolta a kioldódás folyamatát?

Válasz: A leadási kinetika mérésnek többféle módját alkalmazzák. Az egyik közelítés szerint a mintavétel során eltávolított nanorészecskét tartalmazó közeget nem pótolják vissza. Ennek a kinetika mérésnek az a hátránya, hogy nagy koncentrációk alkalmazásánál a hatóanyag feldúsulhatna a közegben, telítődhetne és egy idő után nem lenne hajtóereje a további leadásnak.

A másik módszer a közeg frissítésén alapszik. A közeg frissítését is kétféleképpen lehet kivitelezni: vagy csak egy részét veszik ki a mintavételi időpontokban és ugyanannyi friss közeggel pótolják vagy a teljes közeget lecserélik, és teljesen friss közeggel pótolják vissza. Ezen módszerek közül mindhármat elterjedten alkalmazzák a leadási kinetika mérés területén.

A kioldási kísérleteimben a BSA oldhatóságánál nagyságrendekkel kisebb koncentrációt alkalmaztam, így a telítődés és a felszabadulás gátlása nem jöhetett szóba.

10. Az 5.4.3.1. fejezetben bemutatott, majd részletesen elemzett maximum jellegű fehérje felszabadulás görbék értelmezésében kevésbé tartom valószínűnek a bomlással való magyarázatot.

Válasz: A tapasztalt görbelefutások más modellel – mint a hatóanyag felszabadulása és annak valamilyen módon történő időbeni „eltűnése” – nem magyarázhatók. Az interferon-bétára is mértem időbeni koncentrációcsökkenést. Erre magyarázatként személy szerint a legvalószínűbbnek a bomlást tartom.

A fehérjék a proteolízis, az aggregáció és a nem optimális tárolási körülmények következtében veszíthetnek aktivitásukból.

Pavani és munkatársai munkája (Pannuru Pavani, Krishan Kumar, Anjeeta Rani, Pannuru Venkatesu, Ming-Jer Lee, The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions, Journal of Molecular Liquids, Volume 331, 2021, 115753, ISSN 0167-7322, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115753>.) megerősíti, hogy a PBS az egyik legjobb pufferrendszer a fehérjék stabilizálására. A következőket írják:

„Tanulmányunk megerősíti, hogy a fehérje stabilizáció hatékonysága a puffer típusától és koncentrációjától függ. Az eredmények azt mutatják, hogy a pufferkoncentráció jelentős hatással van a fehérje stabilitására. Például a TRIS, TAPS és TES pufferek magasabb pufferkoncentrációknál kissé megzavarták a fehérje (Lys és Hb) másodlagos szerkezetét. A PBS pufferoldat magasabb koncentrációjában azonban a Lys, a BM és a HSA stabilitása megnövekedett. Míg ugyanez a pufferoldat destabilizálja a Hb szerkezetét. Ez azt mutatja, hogy a pufferek fehérjerendszerenként eltérően viselkednek.”

Van Beers és munkatársai (van Beers, M.M.C., Sauerborn, M., Gilli, F. et al. Aggregated Recombinant Human Interferon Beta Induces Antibodies but No Memory in Immune-Tolerant Transgenic Mice. *Pharm Res* 27, 1812–1824 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0172-0>) vizsgálatokat végeztek a Biogen Idec Inc cég rekombináns humán interferon beta 1-a 0,27 mg/ml koncentrációjú oldatával, amely 100 mM foszfát puffert, 200 mM NaCl tartalmazott, és a pH-ja 7,2-es volt. A vizsgálataik alapján „ez az interferon-béta oldat monomer fehérje mellett kis mennyiségű heterodiszperz rhIFN β -1a aggregátumot tartalmaz, amelyek mérete a dimerektől a több mikrométeres aggregátumokig terjed. Az aggregátumok főként nem kovalens kötések és diszulfidkötések révén jöttek létre, és intakt (teljesen ép) epitópokat tartalmaztak. Emellett néhány kovalens, nem redukálható aggregátum is jelen volt, amelyeket a Western blottinghoz használt poliklonális antitest nem ismert fel”. Esetünkben is elképzelhető aggregálódás, de ennek sebessége gyorsabb kellene hogy legyen, mint amit a kimért sebességi állandó mutat.

Kalaji és munkatársai mérései alapján az FGF-2 növekedési hormonnak PBS-ben 5 °C-on és szobahőmérsékleten a lenti ábra szerint változik a szerzők szerint az aktivitása, bár a leírásuk szerint ELISA teszttel mérték a tartalmat. (Nader Kalaji, Alexander Deloge, Nida Sheibat-Othman, Olivier Boyron, Imad About, et al.. Controlled Release Carriers of Growth Factors FGF-2 and TGF 1: Synthesis, Characterization and KineticModelling. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2010, 6 (2), pp.106-116. 10.1166/jbn.2010.1102. hal-03552182)

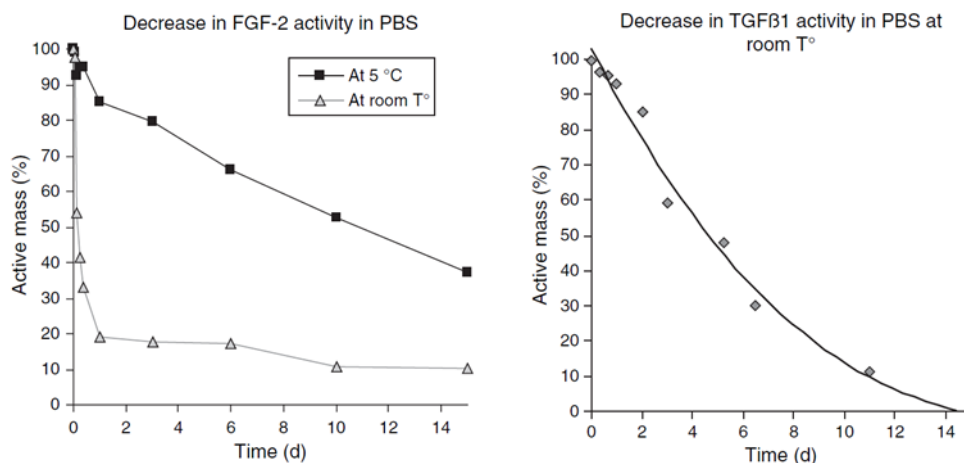


Fig. 3. Decrease in the activity of both growth factors in PBS, very fast decrease is shown at room temperature for both growth factors. At 5° slower decrease was remarked but is still fast comparing with culture medium.

Már szobahőmérsékleten is igen gyors a csökkenés, és én még ennél is nagyobb hőmérsékleten, 37 °C-on mértem a kioldódást. Tápoldatban stabilabb volt az FGF-2. Ebben a közegben határozták meg a leadási kinetikát. A mérési eredményeiket a bomlást és a diffúziót figyelembe véve illesztették.

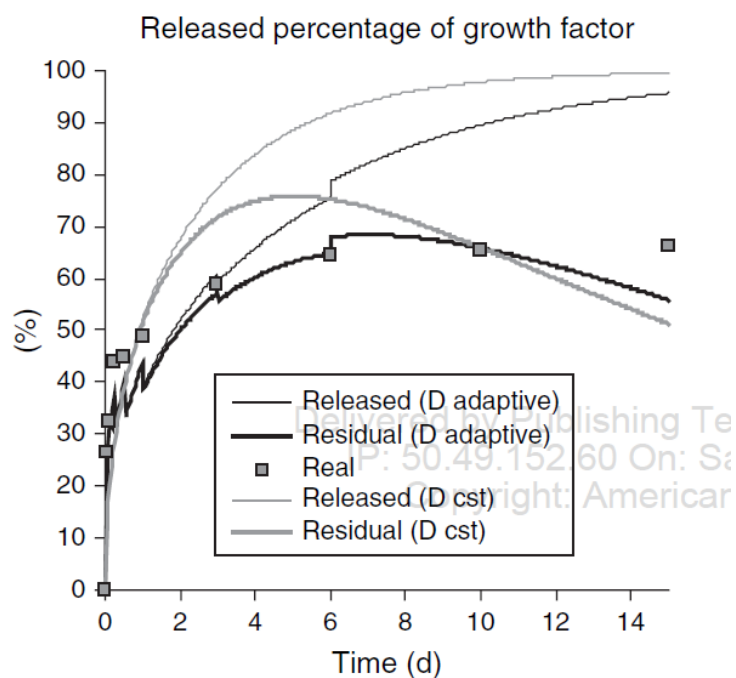


Fig. 11. At left, identification of D in experiment 2b. At right: Estimat of experiment 4a, bigger microspheres, goes from 6 to $0.3 \text{ ng}^2/\text{h}$). Adaj constant.

A fenti ábrán – egy illesztés eredményeként kapott D diffúziós koefficiens mellett – a szerzők által maradék görbének („Residual”) nevezett görbe írja le legjobban a mért kioldási eredményeiket. Kioldási görbének („Released”) nevezik azt a görbét, amit akkor kapnának, ha nem csökkenne a FGF2 mennyisége a kioldási vizsgálat alatt. A mért értékeket legjobban leíró maradék görbét a kioldódás és bomlás együttes figyelembevételével kapták.

A fenti görbe lefutása hasonlóságot mutat az általam mért interferon kioldódási görbével. Bár nem tudom egyértelműen, hogy miért csökken a kioldódási kísérlet alatt az interferon mennyisége, de a mért kioldódási görbének az illesztési eredményét más módon nem tudom értelmezni.

Alábbiakban csatolom a Hibajegyzéket.

Hibajegyzék

43. oldal 3 bekezdésben a következő mondat után az alábbi kiegészítést teszem.

„a lineáris (b) és a négyzetes tag (c) együtthatójából számítja a következő összefüggés alapján:
 $PdI = 2c/b^2$ [97].”

A szemcseméret eloszlásoknál mind a Zetasizerrel, mind a Mastersizerrel végzett mérések esetében 5 ciklusmérés történt minden párhuzamosnál. 3 párhuzamost mértem, majd a software átlagolta az eredményeket.

45. oldal, 4.9 fejezetben a következő mondat után az alábbi kiegészítést teszem.

„A mérés duplafalú, termosztálható mérőedényben történt 25 °C-on és 500 fordulat/perc keverés mellett. Az agglomerátumokból 10–15 mg mintát 100 g vízben feloldva mértem az agglomerátumok beoldódása közben és azt követően az oldat vezetőképességét.”

A vezetőképesség méréseknél 3 párhuzamos mérés alapján számítottam a megadott adatokat.

99. oldal 3 bekezdésben a következő mondat után az alábbi kiegészítést teszem.

„A meghatározás annál megbízhatóbb, minél inkább teljesül, hogy a mért nagyintenzitású csúcsok, de lehetőleg a referencia kártyán szereplő összes jelentős intenzitással bíró rácstávolságok (Å), a mérési hibákon belüli egyezést mutatnak a kísérleti értékekkel [121].”

Az XRD mérésekből a közelítő összetételek csak a kristályos fázisra vonatkoznak, és csak nagyságrendileg vehetők figyelembe.

106. oldal 5.13. táblázat címe így változik: *HD és a felületaktív anyagok folyadék-levegő határfelületi feszültsége szobahőmérsékleten mérve*

130. oldal első bekezdésben a következő mondat után az alábbi kiegészítést teszem.

„Az 5.19. táblázatban szereplő minták szemcseméret eloszlásai az 5.56. ábrán láthatók. Az átlagos szemcseméret 145–207 nm-ig változott, a kapszulázási hatékonyság minden esetben magas lett, nagyobb, mint 87 %.”

A kapszulázási hatékonyság adatokat, a BSA kapszulázás körülményeinek kidolgozása során végzett nagyszámú kísérlethez, két-két párhuzamosból határoztam meg.

Veszprém, 2024.02.13.

Fodorné Kardos Andrea