

Válaszok

dr. Varga Zoltán bírálataira

Mindenekelőtt szeretném megköszönni dr. Varga Zoltánnak, hogy elvállalta a PhD dolgozatom bírálatát, amit alaposan és nagy körültekintéssel végzett 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.

„A dolgozathoz kapcsolódó szakmai észrevételeimet és kérdéseimet a következőkben foglalom össze.

1. Az eredményeket bemutató rész első fejezete a HSA tartalmú kitozán-PSS polimer szemcsék előállítását és jellemzését mutatja be. Ezen részecskék jellemzése kapcsán több utalás is történik a szemcsék stabilitására, azonban a jelölt nem fejt ki, hogy ez milyen jellemzőre vonatkozik, illetve, hogy milyen módszerrel kapott eredmények alapján jellemzi a stabilitást.”

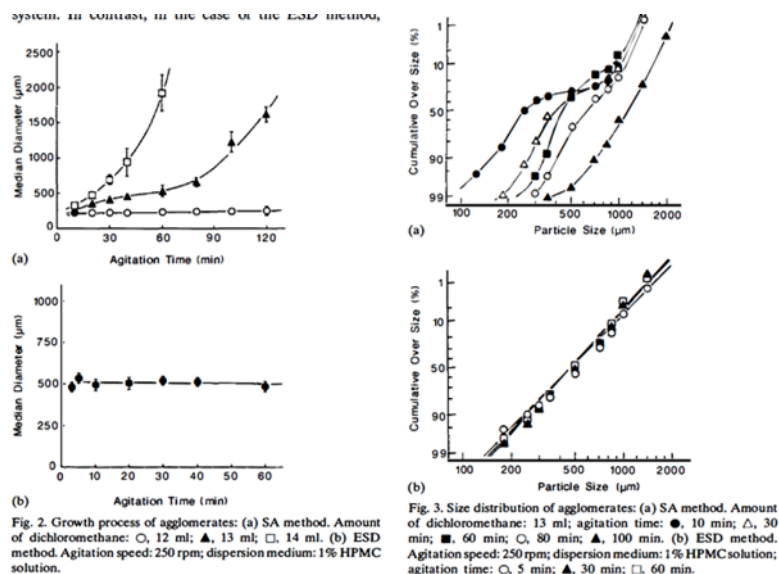
Válasz: Az agglomerátumok esetében a stabilitás a szemcsék aprózódásával szembeni stabilitást jelenti. Ezt legegyszerűbben a szemcseméret időbeli változásának mérésével lehet vizsgálni. Ennek konkrét módját a kísérleti részben a szemcseméret analízis leírásában a 4.2 fejezetben részleteztem. Azonban az agglomerátumok jellemzését leíró fejezetben röviden utalhattam volna a stabilitásnak a 4.2. fejezetben leírt kritériumára.

2. „Egyes minták esetén említésre kerül, hogy mállási törmelékek is megfigyelhetők, ami kapcsán felmerül a kérdés, hogy a szubmikronos mérettartományban találunk-e részecskéket ezen minták esetén?”

Válasz: A szemcseméret eloszlások alapján nincs szubmikronos szemcse, még a mállási törmelék szemcseméret eloszlásában sem. A SEM felvételeink között nincs olyan nagyítás, amely alapján ez eldönthető lenne. A meglévő felvételen látszó apró szemcséknek a térfogati eloszlásban nincs számottevő hozzájárulása.

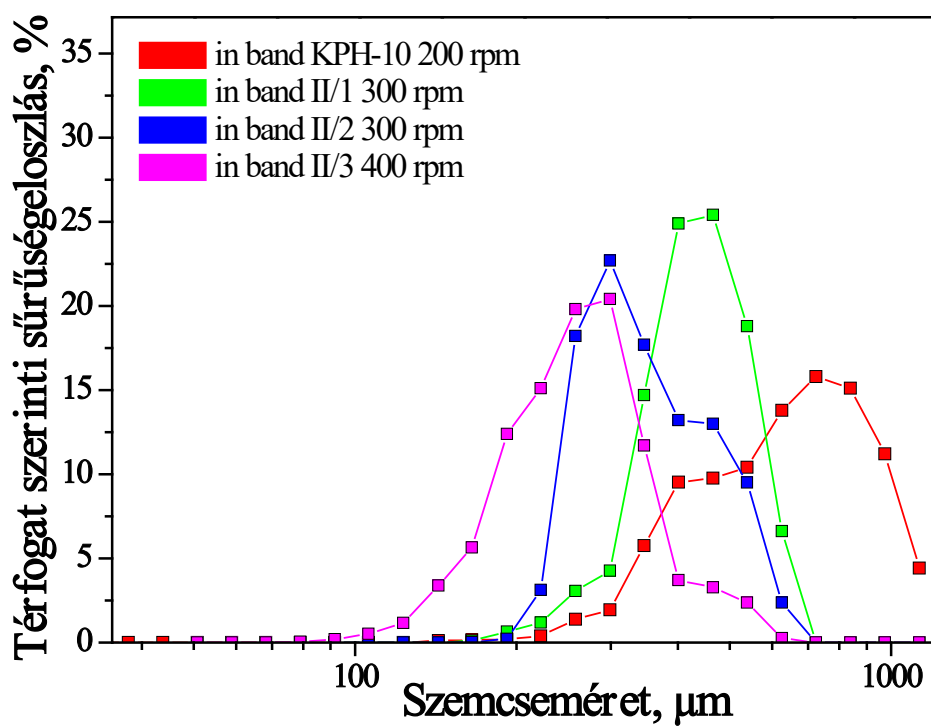
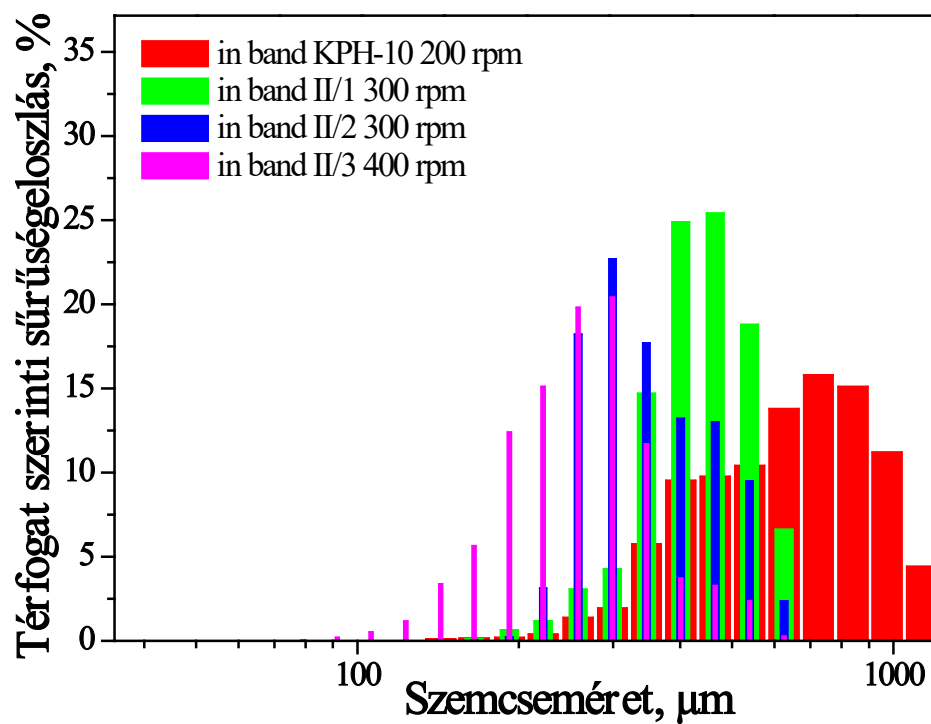
3. „Szintén ehhez a részhez kapcsolódó kérdésem, hogy mi indokolta, hogy egyes ábrákon térfogat szerinti sűrűségeloszlásokkal (pl. 5.8 ábra) mutatja be a méreteloszlásokat, más esetekben (pl. 5.11 és 5.12 ábrák) pedig kumulatív méreteloszlásokat használ? Így a méreteloszlások direkt összehasonlítása nehézkes. A bíráló véleménye szerint szerencsésebb lett volna egységesen sűrűségeloszlásokat bemutatni, és azok log-normális eloszlással való leírását, vagy éppen az attól való eltérést függvényillesztéssel demonstrálni.”

Válasz: Az 5.8 ábrán a jellemző minták szemcseméret eloszlását és azok eltérését mutattam be. A további ábrákon Morishima és munkatársai nyomán már a kumulált méreteloszlások összehasonlításával próbáltam következtetést levonni a mechanizmust illetően. Morishima és munkatársai cikkéből a 3. ábrán látszik, hogy SA mechanizmus esetében a keverési idő növelésével válik az eloszlás log-normal eloszlássá, míg az ESD mechanizmusnál kezdettől fogva egyenes illeszthető az adatokra. Az ábrák Origin szoftverrel készültek, és ennek a szoftvernek van egy olyan funkciója, amivel az y-tengelyen a kumulatív méreteloszlást egy speciális, úgynevezett valószínűségi skálán ábrázolja. A kumulatív Gauss-eloszlás esetén a méret alatti hányadot ekvidisztáns skálán ábrázolva szigmoid alakú görbét kapunk. Ez a görbe pedig valószínűségi skálán ábrázolva egyenesnek adódik. Az adatoknak ilyen tengelyen való ábrázolásával az adatok egyenestől való eltérése mutatja a log-normal eloszlástól való eltérést.



Morishima és munkatársai cikkében szereplő ábra

A HSA-kitozán-PSS részecskék szemcseméret analíziseit még egy régebbi Malvern készülékkel végeztem. Ez a készülék még kevés pontot mért, ezért korrektebb a pontok összekötése helyett a sűrűség adatokat oszlopdiagramon ábrázolni. A sűrűség adatok egymáson ábrázolása azonban átláthatatlanná teszi az ábrát (lásd alább).



A dolgozatban szereplő 5.11. ábra eloszlásai hagyományos sűrűségfüggvényekként ábrázolva, oszlopdiagramként, ill. burkológörbe formájában

4. „Az 5.2 fejezet a timsó agglomerátumok előállítását és jellemzését írja le. Az eredmények alapján a különböző mechanizmussal képződő kristályos és amorf agglomerátumok eltérő hőtároló kapacitással bírnak. A jelölt a 103. oldalon azt írja, hogy a felhasználás szempontjából a hőtartalom a fontosabb tulajdonság, azonban a kétféle részecske mérete között markáns az eltérés. A kérdésem, hogy milyen szerepe van a méretnek és a morfológiának a felhasználás szempontjából ezen szemcsés rendszerek esetén?”

Válasz: Munkámban $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ sóhidrát fázisváltó hőtároló anyagból szemcsét állítottam elő, amely a kapszulázása után a kapszula magját adhatja. A kapszulázás szempontjából a szférikus szemcsét könnyebb lehet egybefüggő filmréteggel bevonni, vagyis kapszulázni. A kapszulázást tekintve különböző módszereket alkalmazhatunk, ezek közül az előbb említett bevonás nagyobb szemcseméret esetén lenne megvalósítható pl. gördülőréteges granulálóban. Ehhez a kiindulási szemcseméret kb. 0,2-2 mm között változhat.

Másrészt oldószercserével történő koacerválással is lehetőség van a szemcsék bevonására. Ehhez a módszerhez is a szférikus mag a szerencsésebb. A kollégáim kidolgoztak egy módszert, amelyet a következő cikkben publikáltak: Tóth, J., Németh, B., Gyenis, J. “Formation of Microcapsulated Aluminium Potassium Sulfate Dodecahydrate by Phase Separation Method”, Periodica Polytechnica Chemical Engineering, 59(3), pp. 201–205, 2015. <https://doi.org/10.3311/PPch.7589>. A koacerváció előtt 1-2 mm-es szférikus magokat alakítottak ki $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ szemcsékből a fent említett gördülőréteges granulálóban. Esetemben a szférikus szemcséket lehetne ezzel az oldószercserés koacerválással bevonni.

Általánosabban nézve, pl. vakolatban alkalmazandó PCM esetén a kisebb szemcseméretű mikrokapszulák jobban megfelelnek a célnak, mivel a túl nagy szemcse elronthatja a vakolat textúráját. Egy hőtároló puffertartályban inkább a makrokapszulák számítanak gazdaságosabb megoldásnak, ahol fontos a jó térkitöltés és a makrokapszulázás olcsóbb megoldás a mikrokapszulázásnál. Hőátadó közegben számít talán a legkevésbé a szemcseméret és a morfológia. Ebben az esetben a szemcsék kopásállósága a legfontosabb szempont.

5. Az 5.4 fejezet az IFN-béta tartalmú PLGA és PEG_PLGA nanorészecskék előállítását mutatja be. A részecskék előállításához kapcsolódó kérdésem a diklórmétán (DCM) használatára irányul: A DCM besorolás szerint „valószínűsíthetően rákkeltő” hatású (IARC Group 2B). Felmerülhet-e, hogy a DCM akár nyomnyi mennyiségben a kész mintában megtalálható, és ha igen, ez mekkora problémát jelenthet az in vivo felhasználás során?”

Válasz: Nincs biztonságos szintje a rákkeltő anyagoknak való kitettségnek, ezért minden érintkezést a lehető legalacsonyabb szintre kell csökkenteni. Ha a mintakezelést nézzük és csak a DCM vízben való oldhatóságával számolunk, ill. a szemcséknek a többszöri mosásával, akkor néhány ppm-nyi maradhat a szuszpenziókban. In vivo felhasználás előtt természetesen mérni kellene a mennyiségét pl. gázkromatográfiával.

Kalanji és munkatársai (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 Kinetic Modelling. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2010, 6 (2), pp.106-116. 10.1166/jbn.2010.1102 hal-03552182) szintén gázkromatográfiával határozták meg PLGA mikroszemcsékük diklór-metán tartalmát, ami 150 ppm koncentrációnak adódott.

Kamali és munkatársai (Hossein Kamali, Mohsen Atamanesh, Ehsan Kaffash, Fatemeh Mohammadpour, Elham Khodaverdi, Farzin Hadizadeh, Elimination of residual solvent from PLGA microspheres containing risperidone using supercritical carbon dioxide, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 57, 2020, 101702, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101702>.) risperidont mikrokapszuláltak O/V emulzióból PLGA mikrorészecskékbe és gázkromatográfiával meghatározták a mikroszemcse diklór-metán tartalmát. Majd szuperkritikus CO₂-dal eltávolították a diklór-metán nagyrészét.

Maradék oldószer mennyisége a mikroszemcsében $4612 \pm 198 \mu\text{g/mL}$, míg a szuperkritikus CO₂ oldószerrel való eltávolítás után $22 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$. A szuperkritikus CO₂-dal való eltávolítás egy ígéretes módszer, mert a CO₂ 0 °C és 80 bar felett folyadék, oldószerként alkalmazható. Nem gyúlékony, nem toxikus, olcsó. A módszer az iparban is megvalósítható.

6. „Az elvégzett in vitro kioldódási vizsgálatokhoz kapcsolódóan a kérdésem: A megfigyelt fehérje degradációt a jelölt a PLGA bomlása során kialakuló savas mikrokörnyezetnek tulajdonítja. Ha ez így van, elképzelhető-e, hogy nagyobb pufferkapacitású oldatot használva ez a hatás csökkenthető?

7. Kapcsolódó kérdésem, hogy a PBS oldatban végzett vizsgálatok mennyire közelítik a plazmában tapasztalható körülményeket?”

Válasz: Az in vitro vizsgálatok közegének elterjedten alkalmazzák a PBS 10 mM foszfát puffert tartalmazó oldatát. A PBS-t nagy pufferkapacitású közegnek tartják, emellett a PBS alapvetően jól modellezi a vérben uralkodó sókoncentráció és pH viszonyokat, ezért alkalmazzuk az in vitro leadási kísérletekhez közegnek. Az in vitro kísérletek csak előzetes információval szolgálhatnak a szuszpenziók hatékonyságáról. Ez alapján mérlegelhetjük, hogy folytatjuk-e a tesztelést in vivo körülmények között. In vivo körülmények között a vér még nagyobb pufferkapacitással rendelkezik, mint a PBS, hiszen a vér összetett pufferrendszer, amiben a szénsav-bikarbonát pufferrendszeren kívül a fehérjepufferek is nagy jelentőséggel bírnak. A vörösvérsejtekben szénsavanhidráz enzim működik, ami a szénsav kialakulását segíti CO₂-ból. A kialakult szénsav protonját rögtön a vörösvértest fehérjéi veszik át. A teljes puffermennyiség 44-49 mEquival/l. (Az ekvivalens mennyiség azt jelenti, hogy hány mol bikarbonátnak felel meg a pufferkapacitás.)(https://sotepedia.hu/aok/targyak/orvosi_elettan_a-d/sav-bazis_i)

Közelítő számítások alapján a vérnek mind a sav-, mind a báziskapacitása kb. 3,3-szer nagyobb (SK: $0,01713 \text{ mol/dm}^3$, BK: $0,00171 \text{ mol/dm}^3$), mint a 10 mM foszfát puffert tartalmazó PBS oldaté. (SK: $0,00519 \text{ mol/dm}^3$, BK: $0,00052 \text{ mol/dm}^3$). A szervezetben tehát a nagyobb pufferkapacitás kiegyenlítheti a változásokat. Egy 30 mM koncentrációjú foszfátpuffert tartalmazó PBS oldattal közelíthetnénk a vérben uralkodó pufferkapacitást.

A PBS-hez képest a vérplazmában végzett kísérletek előnye, hogy a vérplazma összetétel szempontjából lényegében azonos a testben lévő szállítóközeg összetételével, azonban a testen kívül természetesen nem tud úgy funkcionálni, mint a testben.

8. „A PLGA részecskék in vivo vizsgálataihoz kapcsolódóan a kérdésem, hogy milyen lehetőséget lát a tapasztalt vesetoxicitási tünetek kiküszöbölésére?”

Válasz: Mivel feltételezéseink szerint a kisebb, az 50 nm alatti szemcsék okozhattak vesetoxicitási tüneteket, ezért a szemcsék preparálása során úgy változtatnám az előállítási paramétereket, hogy a szuszpenzióban elhanyagolható mennyiségben legyen jelen az 50 nm-nél kisebb részecske.

9. „Végezettül ehhez, és az 5.1 fejezetben tárgyalt kitozán-PSS polimer szemcsés rendszerhez együttesen kapcsolódó kérdésem: Mind az interferon-alfa, mind az interferon-béta mikrokapszulázási vizsgálatai során a jelölt ELISA tesztet alkalmazott, ami az interferon kimutatására alkalmas, de a fehérje aktivitásáról nem ad információt. Milyen módszert alkalmazna az interferon aktivitásának vizsgálatára, amennyiben lehetősége lenne folytatni a kísérleteket?”

Válasz: Több, különböző módszeren alapuló aktivitásmérési analízis ismert.

Az IFN-ek citokinek, amelyek antivirális, antiproliferatív és immunmoduláló hatással rendelkeznek. Az IFN-ek biológiai aktivitását olyan biológiai vizsgálati módszerekkel lehet meghatározni, amelyek e jellemzők bármelyikét mérik.

Kétféleképpen közelíthetjük a kérdést, amikor választani szeretnénk, hogy milyen analízis módszert alkalmazzunk az interferon aktivitásának meghatározásra. Egyrészt gondolkodhatunk úgy, hogy milyen módszert alkalmaz a többi szerző ezen a kutatási területen, és ennek megfelelően választunk, hogy az általunk kapott eredmények összehasonlíthatók legyenek az irodalomban leírtakkal. Másrészt kereshetünk olyan analízis módszert, ami annak a hatásnak a meghatározásán alapul, amit a konkrét részecske rendszerünktől várunk az adott betegség kezelésére.

A Trigon Biotechnológia Zrt., ahonnan annak idején a természetes interferont kaptuk, rendelkezett kenőccsel a herpes vírus kezelésére és ismerte annak hatékonyságát. A feladat a nanoszerkezetű mikroszemcsék előállításával a hatékonyság növelése volt. A herpes simplex vírusos citopátiás hatást kiváltó vírus. Így ebben az esetben az úgynevezett CPE (Cytopathic Effect Assay) tesztet választanám. Ez a módszer régi, sok tapasztalattal rendelkeznek a kiértékelését illetően és sok adat van, amelyek meghatározásánál ezt a módszert alkalmazták.

Citopátiás hatás vizsgálatán alapuló módszer

Az interferon (IFN) biológiai aktivitásának meghatározására használt standard biológiai vizsgálat magában foglalja a sejtek bizonyos vírusok citopátiás hatásával (CPE) szembeni védelmének mérését. A humán interferon mérésére a rendszerek szélesebb skáláját használják. Sok kutató az A549-es humán tüdőrákos sejtvonalat használja, mivel könnyen növekszik, és viszonylag nagy érzékenységet mutat a humán interferonok minden formájára. Ezeket a sejteket általában encephalomyocarditis vírussal (EMCV) támadják meg. A humán alfa-interferont a vesicularis stomatitis vírussal (VSV) megtámadott MDBK (Madin-Darby bovine kidney) szarvasmarha-vese vonal segítségével lehet vizsgálni. E rendszer egyik előnye, hogy a szarvasmarha-sejtek viszonylag érzéketlenek a humán IFN-béta és gamma enzimekre, ami némi szelektivitást biztosít. A humán IFN-béta mérhető a VSV-vel megtámadott Vero zöld majomvese-sejtvonalon is. Ennek a vizsgálatnak az az előnye, hogy a humán IFN-alfa sokkal kevésbé aktív ezekben a sejtekben, mint az IFN-béta.
(https://www.pbl assaysci.com/sites/default/files/document/2022-06/assay_services_brochure.pdf)

Az interferon-bétát tartalmazó szuszpenzió esetében, amit a szklerózis multiplexes betegek kezelésére szántunk, szintén alkalmazhatnánk a fenti módszert, hiszen a piacon ismert készítmények aktivitását is ezzel a módszerrel határozták meg, mint pl. Rebif és Avonex.

Veszprém, 2024.02.13.

Fodorné Kardos Andrea