

Nano- és mikroszálás gyógyszerhordozó rendszerek formulálása és a szálás struktúra topikális, terápiás alkalmazhatóságának *in vitro* és *in vivo* vizsgálata

Doktori értekezés

Sebe István

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelkó Romána az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Budai Livia, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., habil egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Homonnay Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
1. BEVEZETÉS (Irodalmi háttér)	9
1.1. A szabályozott hatóanyag-leadás gyógyszer technológiai megvalósításának lehetőségei	10
1.2. A szálas struktúrájú gyógyszerhordozó rendszerek és szöveti implantátumok	12
1.2.1. Nano-és mikroszálas struktúrák formulálása	13
1.2.1.1. A gyógyszerészeti és orvosi célú szálképzéshez használatos polimerek általános csoportosítása és jellemzése	16
1.2.1.2. Elektrosztatikus és elektrosztatikusan kombinált szálképzési technikák.....	19
1.2.1.3. Rotációs szálképzés	34
1.2.2. A hatóanyag tartalmú szálas struktúra szerkezete	36
1.2.3. A szálas struktúra tulajdonságai és terápiás jelentősége.....	38
1.2.3.1. A nano-és mikroszálas struktúrák működése és lehetséges felhasználási területei	41
1.2.3.2. A szálas struktúra topikális alkalmazásának jelentősége.....	46
1.3. Nano-és mikroszálas műszeres vizsgálatai	47
1.3.1. Mikroszerkezeti vizsgálatok	48
1.3.2. Makroszerkezeti vizsgálatok	53
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	54
3. MÓDSZEREK.....	55
3.1. Felhasznált hatóanyagok, új kémiai entitások	55
3.2. Felhasznált szálképző polimerek	57
3.3. Felhasznált segédanyagok	58
3.4. Felhasznált baktériumtörzsek	59
3.5. Felhasznált állatok	59
3.6. Mintakészítés.....	59

3.6.1.	Hidrogélek előállítása	59
3.6.2.	Mikroszálás szövetek előállítása egyedi tervezésű rotációs feltétellel ...	61
3.6.3.	Mikronizálás és tablettázás	62
3.6.4.	Multirétegű, nanoszálás sebfedő rendszer előállítása	65
3.6.4.1.	Nanostruktúrájú, hatóanyag tartalmú szálpaplan előállítása aszéptikus körülmények között	65
3.6.4.2.	Nanoszálás membrán előállítása (hőkezelés).....	66
3.6.5.	Mikroszálás szövetek előállítása saját fejlesztésű kontakt szálhúzó berendezéssel	67
3.7.	Vizsgálati módszerek	68
3.7.1.	<i>In vitro</i> fizikai és és fizikai-kémiai vizsgálatok	68
3.7.1.1.	Optikai, digitális mikroszkópos felvételek készítése	68
3.7.1.2.	Pasztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készítése	68
3.7.1.3.	Szálképző hidrogél optimalizálásának reológiai alapú követése	68
3.7.1.4.	Szálás szövetek mechanikai tűrőképességének jellemzése szakítószilárdság alapján	68
3.7.1.5.	Pozitronannihilációs élettartam spektroszkópiai mérések	69
3.7.1.6.	Mikroszál alapú tabletták kioldódás vizsgálata	70
3.7.1.7.	B ₁₂ -vitamin kvantitatív meghatározása HPLC-UV műszeres technikával.....	70
3.7.1.8.	Topikális felszívódást modellező hatóanyag felszabadulás vizsgálata egyedi tervezésű kioldócellában	71
3.7.1.9.	Kolisztin-szulfát kvantitatív meghatározása UPLC-MS műszeres technikával.....	71
3.7.2.	<i>In vitro</i> mikrobiológiai vizsgálatok.....	72
3.7.2.1.	Agar-diffúziós inhibíció vizsgálat az antibakteriális kapacitás jellemezésére	72
3.7.2.2.	Csíraszám számlálás kinetikai vizsgálathoz	73
3.7.3.	<i>In vivo</i> állatkísérletek	73
3.7.3.1.	Dorzális biopszia modell alkalmazása CD1 típusú egereken	73
3.7.3.2.	Testfelszíni termoanalízis hőkamerával a szöveti regeneráció követésére	74

3.7.3.3.	Egyszerűsített szövettani vizsgálat	74
3.7.3.4.	Kioltás szöveti homogenizátumból.....	74
3.7.4.	A hatóanyag kioldódás matematikai modellezése	75
3.7.4.1.	Weibull kioldódási modell.....	75
3.7.4.2.	Végeselem modellezés (FEM).....	75
4.	EREDMÉNYEK.....	77
4.1.	Egyedi kialakítású rotációs szálképző feltét fejlesztésének eredménye	77
4.2.	Mikroszálás struktúra formulálásának optimalizálása, makro-és mikroszerkezeti vizsgálata.....	83
4.3.	Saját fejlesztésű kontakt szálhúzó berendezés tervezése és prototípus készítése.....	91
4.4.	Mikroszálás polimer-hatóanyag mátrix tablettázása	95
4.5.	Hatóanyag tartalmú mikroszálás struktúra antibakteriális hatásának vizsgálata	100
4.6.	Topikális alkalmazású, multirétegű nanoszálás sebfedő rendszer fejlesztése.....	105
4.6.1.	A formulációs kísérletek eredménye	105
4.6.2.	Hatóanyag szabályozható felszabadulásnak vizsgálata egyedi tervezésű kioldócellában.....	108
4.6.3.	A hatóanyag szabályozható felszabadulásának <i>in silico</i> eredményei .	112
4.6.4.	A készítmény antibakteriális hatásának <i>in vitro</i> eredménye.....	118
4.6.5.	A készítmény szöveti regenerációt serkentő, valamint antibakteriális hatásának <i>in vivo</i> eredménye	119
5.	MEGBESZÉLÉS	124
5.1.	A centrifugális szálképző technika és a mikroszálak alkalmazhatósága gyógyszerhordozó rendszerek előállításához, valamint a szálak forma felhasználása tablettá, mint konvencionális gyógyszerforma formulálásához	124
5.2.	A szálak struktúra fizikai, fizikai-kémiai és egyéb, mikroszerkezeti vizsgálatának szerepe a szálképzés optimalizálásában, új szálképző eljárás kidolgozása.....	125

5.3.	A nanoszálás szövetékből készített, szabályozott hatóanyag-leadású topikális készítmény előállítására és jelentősége, valamint működésének, antibakteriális és szöveti regenerációt segítő hatásának vizsgálati módszerei.....	125
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	127
6.1.	Az értekezés új tudományos eredményei	127
6.2.	Az eredmények gyakorlati jelentősége és alkalmazhatósága	129
6.3.	Az értekezésben leírt kísérletes munka tapasztalatai és eredményei alapján megfogalmazott problémafelvetések	130
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	132
8.	SUMMARY	133
9.	IRODALOMJEGYZÉK	134
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	157
10.1.	Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények.....	157
10.2.	Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények.....	157
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	159

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2D	– 2 dimenziós
3D	– 3 dimenziós
A3-APO (APO)	– a család összes tagjára optimalizált polipeptid (<i>All Peptides Optimized</i>), A3: az eluáló oszlop sorszáma
AEL	– APO polipeptid-tartalmú nanoszálal réteg (<i>APO-loaded electruspun layer</i>)
AFM	– atomi erő mikroszkóp (<i>Atomic Force Microscope</i>)
Arg-Gly-Asp (RGD)	– arginin-glicin-aszparagin tripeptid (<i>Arginine-Glycine-Asparagine</i>)
ATCC	– amerikai tipizált törzsgyűjtemény (<i>American Type Culture Collection</i>)
B ₁₂	– B ₁₂ -vitamin, ciano-kobalamin (<i>cyanocobalamine</i>)
β-CD	– béta-ciklodextrin (<i>beta-cyclodextrin</i>)
BFP1	– csontképző peptid 1 (<i>Bone-Forming Peptide 1</i>)
Bq	– Becquerel, a radioaktív források aktivitásának mértékegysége
CA	– cellulóz-acetát (<i>cellulose acetate</i>)
CEL	– kolisztin szulfát-tartalmú nanoszálal réteg (<i>colistin-sulfate-loaded electrospun layer</i>)
CF	– centrifugális erő (<i>Centrifugal Force</i>)
CFU	– telepkező egység (<i>colony forming unite</i>)
CNC	– számítógéppel vezérelt eszterga (<i>Computer Numerical Control</i>)
CS	– kitozán (<i>chitosan</i>)
db	– darab
DNS	– dezoxiribonukleinsav
Dox-HCl	– doxorubicin sósavas sója (<i>doxorubicin hydrochloride</i>)
DSC	– differenciális pásztázó kalorimetria (<i>differential scanning calorimetry</i>)
e ⁻	– elektron
e ⁺	– pozitron (pozitív töltésű elektron, az elektron antirészecskéje)
ECM	– extracelluláris mátrix (<i>extracellular matrix</i>)
EKOL	– Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium
ESF	– elektrosztatikus erő (<i>electrostatic force</i>)
ESI	– elektroporlasztásos ionizáció (<i>electrospray ionization</i>)

FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FEM	– végeelem módszer (<i>finite element method</i>)
FIR	– távoli infravörös (<i>far infrared</i>)
FTIR	– Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (<i>Fourier transformation infrared spectroscopy</i>)
FWHM	– félértékszélesség (<i>full width at half maximum</i>)
GPa	– gigapascal: a nyomás mértékegysége SI-ben
H-híd	– hidrogénhíd: másodrendű kémiai kötés típus
HPC	– hidroxipropil-cellulóz (<i>hydroxypropyl cellulose</i>)
HPMC	– hidroxipropil-metil-cellulóz (<i>hydroxypropyl methylcellulose</i>)
IID	– <i>Inactive Ingredients Database</i>
kV	– kilovolt: elektromos feszültség mértékegysége ezres nagyságrendben
kVA	– kilovolt-amper: a teljesítmény feszültség és áramerősség szorzataként kifejezett mértékegysége
keV	– kiloelektronvolt: az energia magfizikában használatos, nem SI mértékegysége
MACI	– multirezisztens <i>acinetobacter baumannii</i>
MBL	– metallo-béta-laktamáz (<i>metallo beta laktamase</i>)
MDR	– több hatóanyaggal szembeni ellenállóképesség (<i>multidrug resistant</i>)
MEL	– nanoszálal membrán réteg (<i>membrane electrospun layer</i>)
MIR	– közép-infravörös (<i>middle infrared</i>)
MPa	– megapascal: a nyomás mértékegysége SI-ben
NIR	– közeli infravörös (<i>near infrared</i>)
NMR	– mágneses magrezonancia (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
ng	– nanogramm
ns	– nanoszekundum
o-Ps	– orto-pozitronium (azonos spinű pozitronból és elektronból álló részecske)
PALS	– pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (<i>positron annihilation lifetime spectroscopy</i>)
PCL	– poli(ϵ -kaprolakton) (poly(ϵ -caprolactone))
PD	– polidopamin (<i>polydopamine</i>)
PEG	– polietilén-glikol (<i>polyethylene glycol</i>)

PEO	– polietilán-oxid (<i>polyethylene oxide</i>)
PET	– pozitron-emissziós tomográfia (<i>positron emission tomography</i>)
PF	– pneumatikus erő (<i>pneumatic force</i>)
PGA	– poli(glikolsav) (<i>poly(glycolic acid)</i>)
PLA	– politejsav (<i>polylactic acid</i>)
PLCL	– poli(tejsav- ϵ -kaprolakton) (<i>poly(L-lactide-co-ϵ-caprolactone)</i>)
PLGA	– poli(tejsav-glikolsav) (<i>poly(lactide-co-glycolic acid)</i>)
PLLA	– PLA sztereokomplex: poli-L-tejsav (<i>poly-L-lactic acid</i>)
PVA	– poli(vinil-alkohol) (<i>polyvinyl alcohol</i>)
PVAc	– poli(vinil-acetát) (<i>polyvinyl acetate</i>)
PU	– poliuretán (<i>polyurethane</i>)
PVP	– polivinilpirrolidon (<i>polyvinylpyrrolidone</i>)
PVPVA	– polivinilpirrolidon-vinilacetát (<i>polyvinylpyrrolidone-vinyl acetate</i>)
p-Ps	– para-pozitronium: ellentétes spinű pozitronból és elektronból álló részecske
PS	– polisztirol (<i>polystyrene</i>)
PSMA	– poli(sztírol-maleinsav-anhidrid) (<i>poly(styrene-alt-maleic anhydride)</i>)
ps	– pikoszekundum
RCF	– relatív centrifugális erőt (<i>relative centrifugal force</i>)
RGC	– neuronális ganglion sejt (<i>neuron ganglion cell</i>)
RNS	– ribonukleinsav
RPM	– percenkénti fordulat (<i>revolution per minute</i>)
SA	– nátrium-alginát (<i>sodium alginate</i>)
SEM	– pásztázó elektronmikroszkóp (<i>scanning electron microscope</i>)
XRD	– Röntgen-diffrakció (<i>X-ray diffraction</i>)

1. BEVEZETÉS (Irodalmi háttér)

A generikus és originális gyógyszerfejlesztés aktuális gyógyszertechnológiai kihívásai közül kiemelendő a rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságának növelése, valamint a célzott és szabályozott hatóanyag-leadás iparilag és klinikai szempontból is reprodukálható, stabil és tervezhető megvalósítása. A kombinatorikus kémia kifejlődése sokat lendített a hatóanyagok szintjén a fejlesztés terápiás hatékonysága szempontjából megfelelő irányok kiválasztásában, de mindez továbbra sem tehermentesítette a gyógyszerforma fejlesztő technológusát az oldhatóság problémája alól, amelynek megoldása a generikus gyógyszerfejlesztés során is kvázi originális fejlesztői munkát igényel. A kihívásokra megoldást kereső innovatív, nem konvencionális gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése során a polimer alapú formulációs technikákat, valamint az előállított készítmények tulajdonságainak feltárásához a hatóanyag-segédanyag rendszer fizikai, fizikai-kémiai és biológiai paramétereit egyaránt vizsgálni kell. Optimalizálni és méret növelni szükséges az alkalmazott technológiát. A felhasznált polimer, hatóanyag és formulációs technika viszonylatában ismernünk és vizsgálnunk kell az előállított rendszer mikro-és makroszerkezeti sajátosságait, amelyek segítségével a készítményt jellemző egyéb mérési eredményekkel szemben felállított összefüggések megmutathatják a fejlesztés terápiás értékét, ipari implementálhatóságát és újszerűségét. Ezek birtokában lehet csak elkezdni a gyógyszeripari, klinikai irányelveknek és hatósági követelményeknek megfelelő továbbfejlesztést, optimalizálást.

A kutatás fázisába sorolható innovatív gyógyszerhordozó rendszerek formulálására alkalmas technikák közül a különböző metodikával előállított nano- és mikroszálás struktúrák gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazása a gyakorlati és ipari megvalósíthatóság küszöbén áll. A szálás rendszerek tulajdonságai a fejlesztésben széles mozgásteret biztosítanak. Ezek alapján olyan készítmények kialakítására is lehetőség nyílik, amelyek a rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságának és esetleges biohasznosulásának növelésével, az alkalmazandó dózis csökkentésével vagy meglévő kémiai entitások újrapozícionálásával a kialakított struktúrával együtt valódi gyógyszerkészítmények részét képezhetik a jövőben. Megvalósítható a szálás struktúra - szöveti regenerációt serkentő hatását kihasználva - sebgyógyulást segítő, felszívódó kötszerek és topikális készítmények formájában történő felhasználása is.

1.1. A szabályozott hatóanyag-leadás gyógyszer technológiai megvalósításának lehetőségei

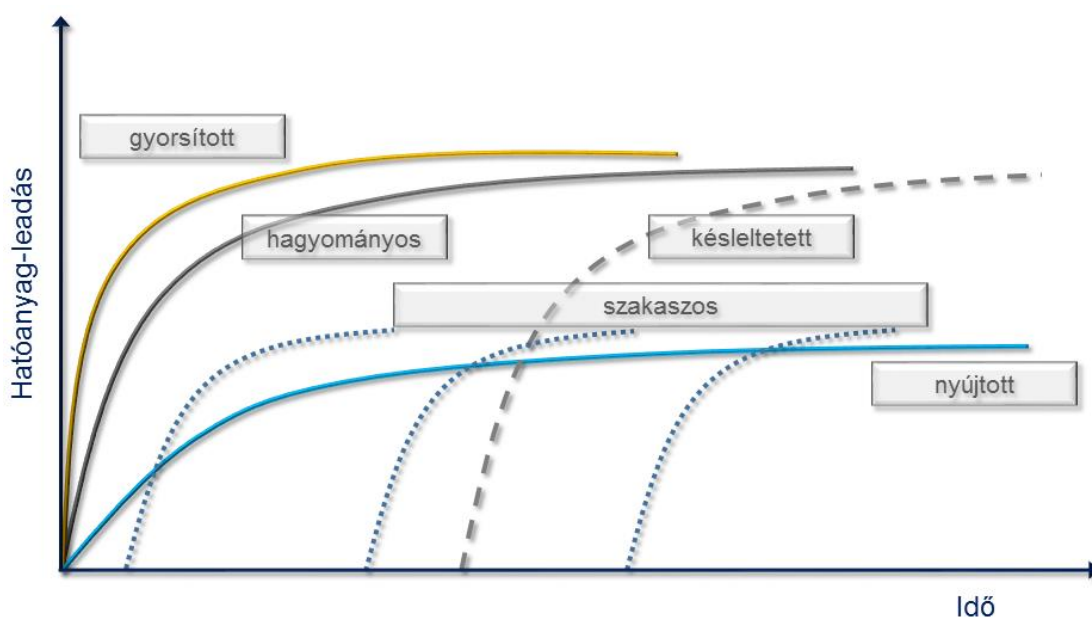
A szabályozott vagy módosított hatóanyag-leadású készítmények, mint anyagi rendszerek kifejlesztését, gyártását a betegek terápiás igényei és a hatóanyagok fiziológiás környezetben jellemző tulajdonságai hívták életre. Zaffaroni és munkatársai az 1960-as évek végén dolgozták ki a programozott hatóanyag-leadást biztosító készítmények előállításának koncepcióját [1]. Ezen anyagi rendszerek működésének fundamentális alapja csakúgy, mint a hagyományos hatóanyag-leadású rendszereknél, az oldódás és a diffúzió [2], de egyes esetekben a működés kiegészül ozmotikus hatásokkal is [3]. A különbség a hatóanyag módosított leadásának helye és kinetikája szerint adható meg, amelyek megvalósítását az egyre szélesebb skálán mozgó gyógyszer technológiai formulációs eljárások [4] és az egyre bővülő segédanyag rendszerek [5] biztosítják.

A szabályozott vagy módosított hatóanyag-leadás lehetővé teszi a szervezetben az optimális plazmakoncentráció elérését, bizonyos esetekben a *first pass* metabolizmus kikerülésével az alkalmazandó dózis csökkentését és mindezek eredményeként a vérszinttől függő mellékhatások csökkentését. Lehetőség nyílik az adagolási rend változtatására, így a beteg-együtműködés is javítható. A felszívódás helyének befolyásolásával a fenti előnyök mellett a hatóanyag fiziológiás körülmények között bekövetkező hátrányos eróziója, bomlása nagymértékben csökkenthető. A hatóanyag-leadás típusai szerint külön csoportot képeznek az önszabályozó és a célzott hatóanyag-leadású rendszerek. Együttesen véve a tárgyalt készítmények működési elv szerinti főbb típusait a gyógyszerkönyvi monográfiákkal (Ph.Hg.VIII. és -Ph.Eur.4.3-4.6) összhangban az **1. táblázat** foglalja össze, jellemző kinetikai profiljait pedig az **1. ábra** szemlélteti [1]. A hatóanyag szabályozott leadásának különböző kinetika szerinti kioldódásához és az alkalmazás, valamint a felszívódási hely célzott elérésének megvalósítására a gyógyszeripar eltérő gyógyszerformákat alkalmaz [6].

1. táblázat A hatóanyag-leadó rendszerek általános csoportosítása

a) A hatóanyag-leadás kinetikája szerint	b) A módosított hatóanyag-leadó rendszer működési elve szerint
Hagyományos	Előre programozott (<i>Rate-preprogrammed</i>)
Módosított	Aktiválható (<i>Activation-modulated</i>)
◦ <i>gyorsított</i>	Visszacsatolással működő (<i>Feedback-regulated</i>)
◦ <i>késleltetett</i>	Céltzott hatóanyag-leadást biztosító (<i>Site-targeting</i>)
◦ <i>nyújtott</i>	
◦ <i>szakaszos</i>	

Az originális készítmények originális jellegét nemcsak a hatóanyag kémiai minőségének újdonsága, hanem a gyógyszerforma típusa, működési mechanizmusa is meghatározza. A generikus gyógyszerfejlesztés jelentős szegmense az originális készítményhez viszonyított többlet értéket igyekszik létrehozni terápiás szempontból saját termékeiben a gyógyszer technológia eszköztárának segítségével úgy, hogy a termék a referens készítménnyel összehasonlítva, azzal bioekvivalens maradjon. Az ilyen gyógyszereket 'value added' (hozzáadott értékű) generikumoknak szokás nevezni annak ellenére, hogy a megnevezés nem egy hivatalos definíciót jelöl.



1. ábra A hatóanyag-leadás jellemző kinetikai görbéi [1]

Az innovatív hatóanyag-hordozó rendszerek formulálása terén végzett kutatások újabb lehetőségeket vetítenek előre. A hagyományos kis molekulák biofarmáciai osztályozási rendszere szerinti rossz oldhatósága folyamatos nehézséget jelent [7], amely hozzájárul a kezdetben potenciális farmakonnak ígérkező vegyületek terápiásan alkalmazható, tényleges hatóanyagok köréből történő nagyarányú kieséséhez, illetve az új hatóanyagok rossz biohasznosulásához [8]. Az új hatóanyagok - köztük a makromolekulák – egyre nagyobb molekulatömegűek [9], amely tendenciát összefoglalóan 'molekuláris elhízásnak' nevezünk és szoros összefüggésben van a mellékhatásokkal, toxicitással és a rossz orális felszívódással [10]. A terápiás hatás tekintetében ígéretes, nagyobb tömegű molekulák gyakran negatív következménye a rossz oldhatóság, amely formulációs megoldása a gyógyszertechnológiára hárul [11-13].

1.2. A szálás struktúrájú gyógyszerhordozó rendszerek és szöveti implantátumok

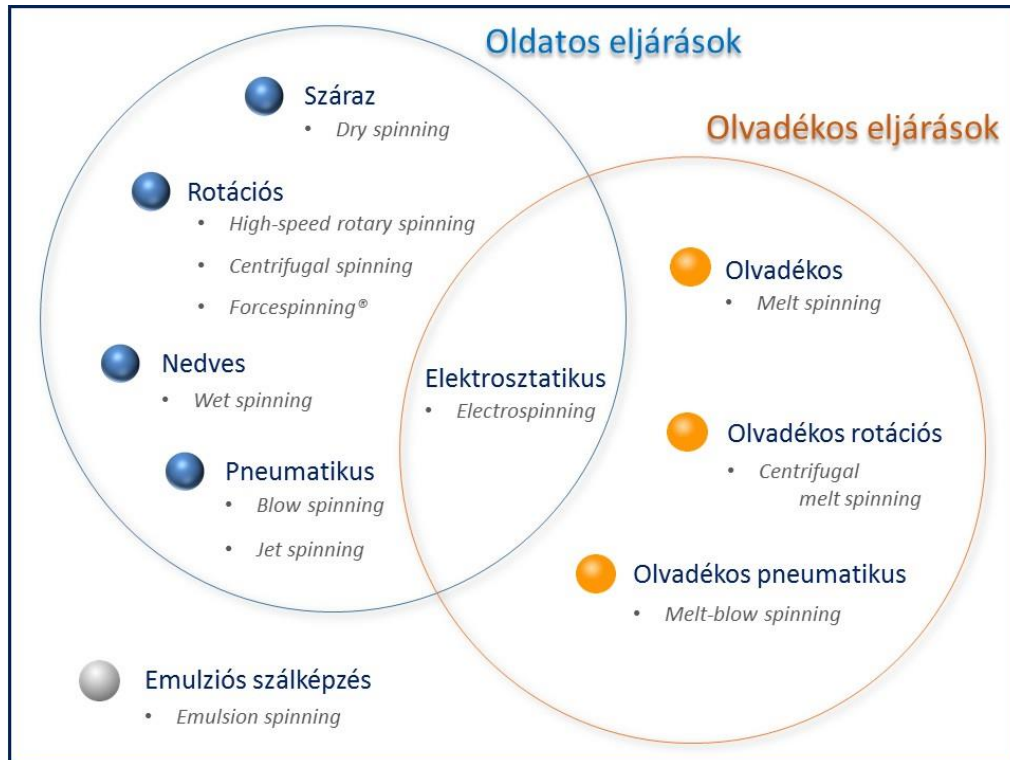
A szálás struktúra gyógyszerhordozóként vagy szöveti regenerációt célzó orvostechikai eszközként való felhasználásának közös alapja a rendszert felépítő, jellemzően polimer alapú anyagok különböző morfológiai sajátosságokkal jellemezhető szálás formája és a szálak előállítására szolgáló eljárások elvi háttere. A felhasználásból következő egyértelmű különbségeken kívül a lényeges eltérés az, hogy a gyógyszerhordozó rendszerek esetében a létrejövő szálás forma a segédanyag-hatóanyag rendszerrel szemben támasztott elvárások teljesítése érdekében választott technika jellemző formájú végterméke. A felfedezett molekulák többsége a megfelelő gyógyszerkészítmény kialakítása és farmakokinetikai viselkedése szempontjából kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságú. A molekulák gyakran rossz vízoldékonyságúak [14], levegőre és nedvességre érzékenyek, eltérő polimorf módosulataik változó termodinamikai stabilitásúak [15]. A nagy fajlagos felületű szálás formát eredményező technikák potenciálisan képesek létrehozni ezen tulajdonságokat kedvezően módosító anyagi rendszereket, amorf-szilárd diszperziókat [16]. A szálás implantátumok esetében a készítményt felépítő szálak vastagsága és orientáltsága [17], kémiai minősége, biodegradabilitása [18] azok a meghatározó sajátosságok, amelyekkel a kívánt tulajdonság elérhető, így ezekben az esetekben a megfelelő szálás struktúra

kialakítása az elsődleges cél [19]. Példaként hozható azon implantátumok csoportja, ahol a nanométer átmérőjű, arányaiban rendkívül hosszú individuális szálak képesek segíteni a hasonló nagyságrendű mérettartományba eső fibroblaszt sejtek növekedését és megtapadását [20] [21].

1.2.1. Nano-és mikroszálás struktúrák formulálása

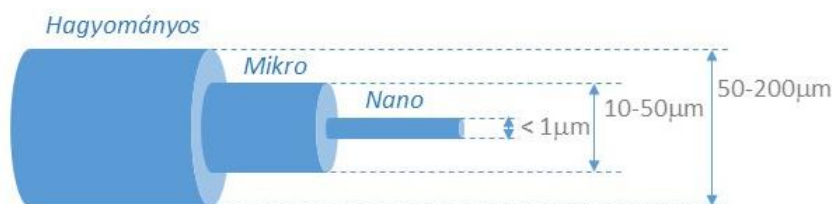
A szálás struktúrák előállításának és felhasználásának története régre nyúlik vissza. A szálképző technikák legelőször a műanyag, valamint a textiliparban honosodtak meg és szerepük napjainkban is jelentős. A nedves szálképzés a legrégebb óta használt technológia és a műselyem volt az első mesterséges polimerszál, amelyet 1855 körül *George Audemars* állított elő ezzel az eljárással, majd *Hilaire de Chardonnet* tett iparilag is gyárthatóvá [22]. Ezt követően sokféle, eltérő elvi alapokon nyugvó szálképzési eljárást dolgoztak ki, amelyek közül a leghangsúlyosabbak az oldószeres vagy olvasztásos technológiák. Ezeket a **2. ábra** foglalja össze. Az egyes folyamatok során keletkező anyagokat jellemzően makroszkópikus megjelenésük különbözteti meg egymástól. A létrehozható szálak átlagos szálvastagsága általánosságban nehezen definiálható, inkább csak a különböző szálképzési eljárásoknál tapasztalt jellemző mérettartomány adható meg a felhasznált anyagokkal összefüggésben. E látszólagos pontatlanság oka, hogy az individuális szálvastagság sok egyéb tényező mellett függ a szálát létrehozó erő típusától [23] és nagyságától, a szálképző anyag átlagos molekulatömegétől [24, 25], nedves eljárások esetében az oldószer típusától [26], valamint az oldat koncentrációjától. A szálvastagságot tovább specifikálják az alkalmazott berendezés műszaki paraméterei (pl. elektrosztatikus szálképzésnél az adagolófej típusa, kollektor típusa, a kollektor-tű távolság [27]). A szálképzési technikákat felhasználó számtalan közleményből az rajzolódik ki, hogy az elektrosztatikus eljárással előállított szálak vastagsága átlagosan a ~10 nm-től 2000 nm-ig terjedhet, de többségükben ~50-500 nm közé esnek [28-31]. Utóbbi tartomány 1000 nm-re történő tágításával, a tudományos közlemények alapján definiálhatjuk ezen struktúrákat nanoszálaknak [32], amelyek többségükben elektrosztatikus úton hozhatók létre. A rotációs és pneumatikus szálképzések esetében a tapasztalati skála szélesebb, ~100-12000 nm-es tartományt ölel fel [33, 34]. Mikroszálás rendszerek előállítására tehát leginkább a rotációs és pneumatikus eljárások alkalmasak ~1000-3500 nm közötti

szálvastagsággal jellemezve [35, 36]. Ahn és munkatársai 2006-ban megjelent közleményében a nano-és mikroszálak jellemző átmérőit $<1-50 \mu\text{m}$ közötti mérettartományban adják meg (**3. ábra**) [37].



2. ábra A szálképzési technikák általános csoportosítása

A gyógyszeripari és orvosi felhasználás szempontjából a szálképző módszereket az a felismerés teszi releváns eljárásokká, hogy a régóta fennálló oldhatósági és oldódási problémák kapcsán, valamint orvosi területen a szöveti regenerációval, sebgyógyulással foglalkozó készítmények fejlesztésében végzett, szálak formulálásán alapuló kutatások ígéretes eredményeket hoztak.



3. ábra A szálképzési eljárásokkal előállítható szálak osztályozása a jellemző átmérők alapján

Egy hatóanyag oldódási sebességének növelése legegyszerűbben őrléssel érhető el, amely az Ostwald-Freundlich egyenletnek megfelelően **(E1)** az oldhatóság növelését is eredményezheti [38]. Ez a gyógyszergyártásban ma is nélkülözhetetlen technológiai művelet, legyen szó hagyományos, nedves közegű vagy együtt őrlésről (*co-milling*).

$$\ln \frac{c_s}{c_{s0}} = \frac{2v\gamma}{rRT} = \frac{2M\gamma}{\rho rRT} \quad (\text{E1})$$

[39] ahol c_s az oldódó részecske felületén kialakuló telítési koncentráció, c_{s0} az oldott anyag sík felületen megjelenő telítési koncentrációja, M a részecskét alkotó molekula molekulatömege, γ a folyadék-szilárd határfelületi feszültség, ρ a részecske sűrűsége, r az oldódó részecske görbületi sugara, R a Regnault-állandó, T a hőmérséklet.

Amennyiben a hatóanyag szilárd fázisa lassan oldódik, akkor részecskeméretének csökkentésével a fajlagos felülete nagyságrendekkel növelhető [40], így a kémiailag változatlan minőségű anyag oldódási sebessége jelentősen megnő. Ennek termodinamikai összefüggéseit a Noyes-Whitney egyenlet mutatja **(E2)**, amely az oldódás kinetikáját írja le [41, 42].

$$\frac{dw}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{d(c)}{d(x)} \quad (\text{E2})$$

ahol w az oldott anyag mennyisége t időpillanatban, D ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a diffúziós együttható, A (m^2) a diffúziós határréteg felülete, c ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) az oldott anyag koncentrációja, x (m) a diffúziós rétegvastagság. Az oldódási sebesség dimenziója: $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{óra}^{-1}$.

Az oldódás sebessége fokozható még kémiai módosítással (pl. sóképzés), oldószeres (pl. porlasztva szárítás, fagyasztva szárítás) és olvasztásos eljárásokkal (pl. extrúzió, olvadékos granulálás). Az oldhatóság szintén növelhető extrúzióval, olvadékos granulálással és a gyógyszeripari alkalmazás küszöbén álló szálképzési technikákkal. Az oldhatóság növekedése ezekben az esetekben azáltal jöhet létre, hogy a kristályszerkezet formája és morfológiája megváltozik. Egészen pontosan előállhat teljesen vagy részben az az állapot, ahol a hatóanyag a magasabb energiájú amorf formába rendeződik vissza és a formuláláshoz használt segédanyagokkal amorf-szilárd diszperziót képez [43, 44]. A segédanyag segíti az amorf állapot

megőrzését, azonban a kialakult rendszer stabilitásának döntő szerepe van a gyógyszerkészítményekkel szemben támasztott elvárások teljesíthetőségében [15].

A gyógyszeripar szilárd diszperziók iránti affinitását mutatja az, hogy mára már több ilyen jellegű készítmény van forgalomban (**2. táblázat**) [45].

2. táblázat Példák a kereskedelmi forgalomban kapható szilárd diszperzió alapú gyógyszerkészítményekre

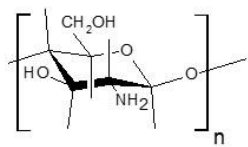

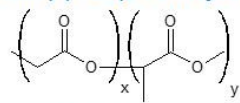
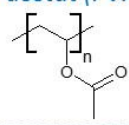
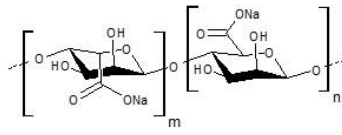
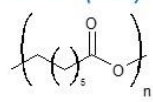
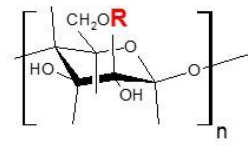
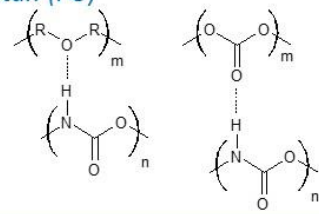
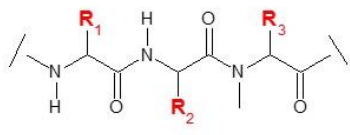
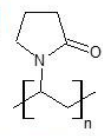
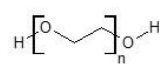
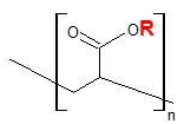
Készítmény neve (és gyártója)	Hatóanyag	Polimer segédanyag
Gris-PEG[®] (Pedinol Pharmacal INC)	Griseofulvine	PEG6000
Cesamet[®] (Valeant Pharmaceuticals)	Nabilone	PVP
Kaletra[®] (Abbott)	Lopinavir, Ritonavir	PVPVA
Sporanox[®] (Janssen Pharmaceutica)	Itraconazole	HPMC
Intelence[®] (Tibotec)	Etravirine	HPMC
Certican[®] (Novartis)	Everolimus	HPMC
Isoptin[®] SR-E (Abbott)	Verapamil	HPC/HPMC
Nivadil[®] (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.)	Nivaldipine	HPMC
Prograf[®] (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.)	Tacrolimus	HPMC
Rezulin[®] (Developed by Sankyo, manufactured by Parke-Davis division of Warner-Lambert)	Troglitazone	PVP

1.2.1.1. A gyógyszerészeti és orvosi célú szálképzéshez használatos polimerek általános csoportosítása és jellemzése

A gyógyszerészeti vagy orvosi célú, szálás struktúrájú készítmények előállításához alapvető fontosságú a megfelelő polimer segédanyag vagy segédanyagok kiválasztása. A kutató munka és a fejlesztés során felhasználni kívánt polimernek biokompatibilisnek

kell lennie, valamint oldatának vagy olvadékának rendelkeznie kell a megfelelő fizikai és fizikai-kémiai paraméterekkel, míg az előállított szálak anyagnak rendelkeznie kell a megfelelő mechanikai és biológiai tulajdonságokkal. A biokompatibilis polimerek esetében négy csoport különíthető el [46]: természetes eredetű, szintetikus, lebomló és nem lebomló polimerek. A csoportok kémiai minőség szerinti főbb típusait a **3. táblázat** mutatja. A megfelelő polimer kiválasztásának elméleti logikája szerint haladva tovább a fent említett igen tág halmazból azok az anyagok választhatók ki, amelyek oldatai vagy olvadékai jó szálképző tulajdonságúak. Ezen tulajdonságot egzaktul a fizikai-kémiai paraméterek alapján határozhatjuk meg. A nano-és mikroszálak készítésére leginkább alkalmas elektrosztatikus, centrifugális [33] és pneumatikus szálképzési [47] eljárások szempontjából a polimer oldat alábbi jellemzői a legmeghatározóbbak a szálképző képesség és a létrejövő szálak morfológiája szempontjából [26]: viszkozitás, polimer koncentráció, polimer molekulatömeg, felületi feszültség, oldószer illékonyaság [48]. Az elektrosztatikus technika esetében ezek a tulajdonságok kiegészülnek a vezetőképességgel és a dielektromos állandóval is. Az előbbi felsorolásból kiemelendő, hogy az oldat felületi feszültsége csak abban az esetben játszik meghatározó szerepet a szálak morfológiáját tekintve, amennyiben a polimer oldat/gél alacsony viszkoelaszticitású, amely jellemzően kis molekulatömegű polimer felhasználása vagy kis oldatkoncentráció esetén állhat elő [49]. A viszkozitás és a koncentráció növelésével a szálak vastagsága növelhető [50, 51], miközben a cseppesedés csökken. A cseppesedés jelensége minimalizálható nagyobb molekulatömegű polimer alkalmazásával is [52], míg a vezetőképesség növelésével a szálvastagság csökkenthető [53]. Amennyiben az előállítani kívánt anyagi rendszert a felhasználás jellege (szabályozott hatóanyag-leadás, hatóanyag hordozó, szöveti regeneráció) szempontjából vizsgáljuk, akkor a célra alkalmas polimer többnyire meghatározza számunkra azt, hogy mely szálképzési eljárást kell alkalmazzuk. Patrícia B. Malafaya és munkatársainak 2007-ben megjelent közleményében a szöveti regenerációban használható és elektrosztatikus úton előállítható, természetes alapú polimereket mutatják be [54]. Egy másik megközelítés szerint például Zheng-Ming Huang és munkatársai az elektrosztatikus szálképzéshez globálisan felhasználható főbb polimereket foglalták össze, elkülönítve az oldatos és olvadékos fázisból történő kiindulásra alkalmas anyagokat [55].

3. táblázat A szálképzéshez használatos biokompatibilis polimerek főbb csoportjai

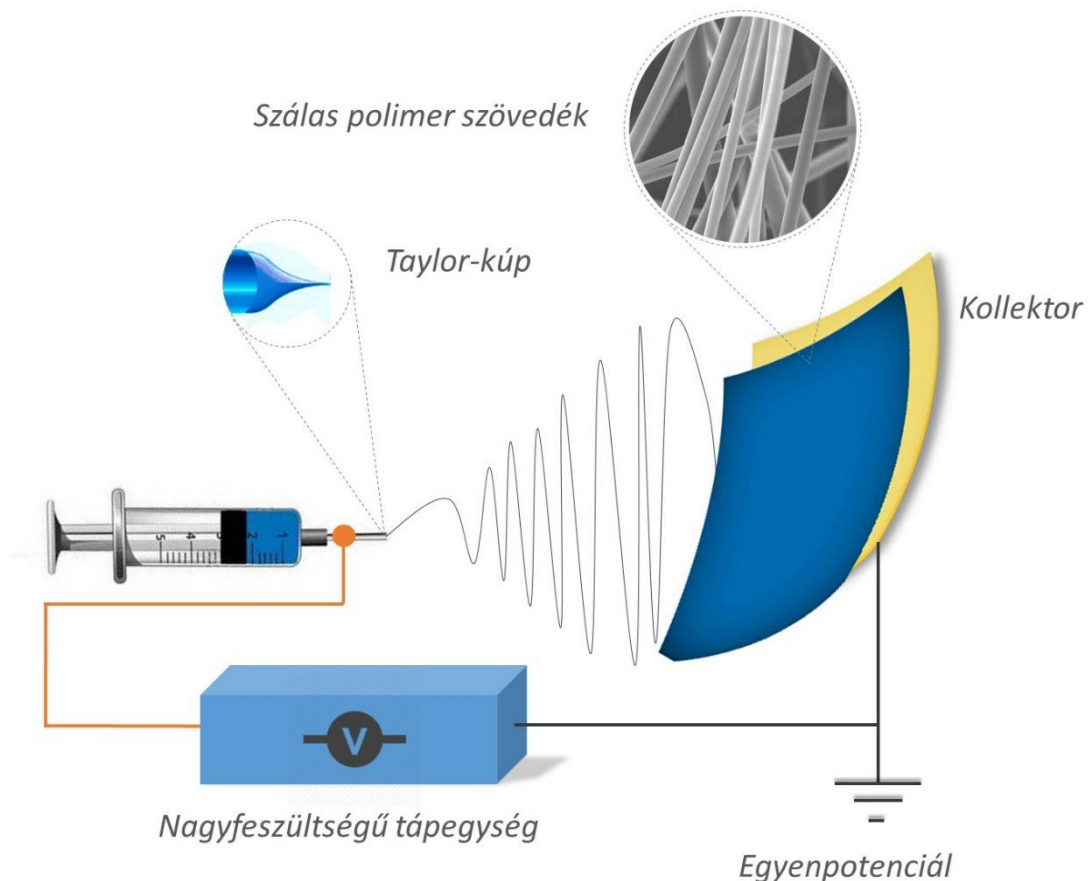
Biokompatibilis polimerek	
Természetes eredetű	Szintetikus
<p><i>Kitozán</i></p> 	<p><i>Lebomló</i></p> <p><i>Poli(vinil-alkohol) (PVA)</i></p> 
	<p><i>Poli(glikolsav) (PGA), Politejsav (PLC)</i></p> 
	<p><i>Polivinil-acetát (PVAc)</i></p> 
<p><i>Alginátok</i></p> 	<p><i>Polikaprolakton (PCL)</i></p> 
<p><i>Cellulóz származékok</i></p> 	<p><i>Poliuretán (PU)</i></p> 
<p><i>Polipeptidek</i></p> 	<p><i>Nem lebomló</i></p> <p><i>Polivinil-pirrolidon (PVP)</i></p> 
	<p><i>Polietilén-oxid (PEO)</i></p> 
	<p><i>Akrilátok</i></p> 

1.2.1.2. *Elektrosztatikus és elektrosztatikusan kombinált szálképzési technikák*

Az elektrosztatikus szálképzés megjelenése történetileg régre nyúlik vissza. 1899-ben J. F. Cooley [56] nyújtotta be szabadalmi igényét az eljárás kidolgozására. Említésre méltó, hogy mindez csupán 2 évvel az elektron felfedezésének tudománytörténetileg ismert éve, 1897 után történt. A szabadalmat végül 1902-ben tették közzé. W. J. Morton ugyanezen évben benyújtott szabadalmában szintén elektrosztatikus szálképzési eljárásáról ír [57]. Az ezt követő időszak tudományos és ipari lendülete a technológia további fejlődését eredményezte. Anton Formhals e témában 1931 és 1934 között 22 szabadalmára kapott oltalmat [58].

Az eljárás során a szálakat az elektrosztatikus erő (ESF) hozza létre, amely eredményeként a többnyire elektromosan jó vezetőképességgel rendelkező oldatból vagy olvadékból szilárd halmazállapotban összegyűjthető termék keletkezik (**4. ábra**). Ez a gyakorlatban úgy valósul meg, hogy az oldatot tartalmazó rezervoárból az anyagot meghatározott térfogati sebességgel a szálképző adagolófejbe, a legegyszerűbb elrendezésben fém tűbe áramoltatják, melyre nagyfeszültségű elektromos potenciált kapcsolnak. A tűvel szemben és a szálak gyűjtésére szolgáló, valamekkora távolságban elhelyezett és nagyobb felületű elektródot egyen potenciálra helyezik, így a két pont között kialakuló potenciálkülönbség következtében létrejön a megfelelő elektrosztatikus térerő. A potenciálkülönbség kiegyenlítődésképpen való törekvés a szálképződés hajtóereje, ahol az anyag a magasabb potenciálú pontból kiindulva halad az egyen potenciál (régebben földelés) felé. A működés megértését segíti, ha a folyamatot az egymást követő vagy részben szimultán zajló részfolyamatokra bontjuk. A nagyfeszültség alá helyezett tűbe áramló anyag a tű végpontján csepp formájában jelenik meg. A folyadékcsépp felületén folyamatosan felhalmozódó azonos töltések taszító ereje az anyag kollektor felé irányuló kicsúcsosodását eredményezi, amelyet a folyadékfelszín viselkedésének matematikai leírójáról Taylor-kúpnek neveznek [59]. A jelenség analóg a görbült felületű nagyfrekvenciás elektromos térerők esetében megfigyelhető csúcshatással, ahol a csúcsponton keresztül meginduló ionlavina látványos koronakisüléseket hoz létre (Tesla tekercs). Ennek megemlézése azért lényeges, mert a koronakisülés jelensége az elektrosztatikus szálképzéskor is létrejön és sokszor a gerjesztett levegő rekombinálódásakor keletkező jellegzetes kék fény is megfigyelhető. A töltött folyadékcsúcs vagy oszlop az erőhatások következtében tovább vékonyodik

és kezdetben a Coulomb erőknek megfelelően egyenesen, majd ostorozó mozgással halad a kollektor felé. A polimer oldat vagy olvadék viszkoelaszticitása segít abban, hogy az elvékonyodó anyagoszlop folytonos és szakadásmentes maradjon. Az elvékonyodás a fajlagos felület növekedését és egyben az egységnyi töltéseket hordozó felszín folyamatos csökkenését vonja maga után. A nagy fajlagos felületről az oldószer gyorsabban párolog, amit a leszakadó töltések tovább segítenek. A kollektorral már kellően oldószermentes vagy kellően lehűlt, szilárd halmazállapotú szálak, illetve a szálakból képződő szálaplan vagy lapka választhatók le. Az eljárás során zajló egyes folyamatok sztochasztikus jellege miatt a keletkező szálaplan véletlenszerűen orientált és egymással kapcsolódási pontokat tartalmazó szálakból épül fel. A szálak minőségét meghatározó összefüggések definiálására szolgál a Rayleigh-féle hasadási index [60]. A stabilitást jellemző érték a folyadék felületi feszültség és az elektrosztatikus erők paramétereinek hányadosa.



4. ábra Az elektrosztatikus szálképző berendezés általános, elvi összeállítása

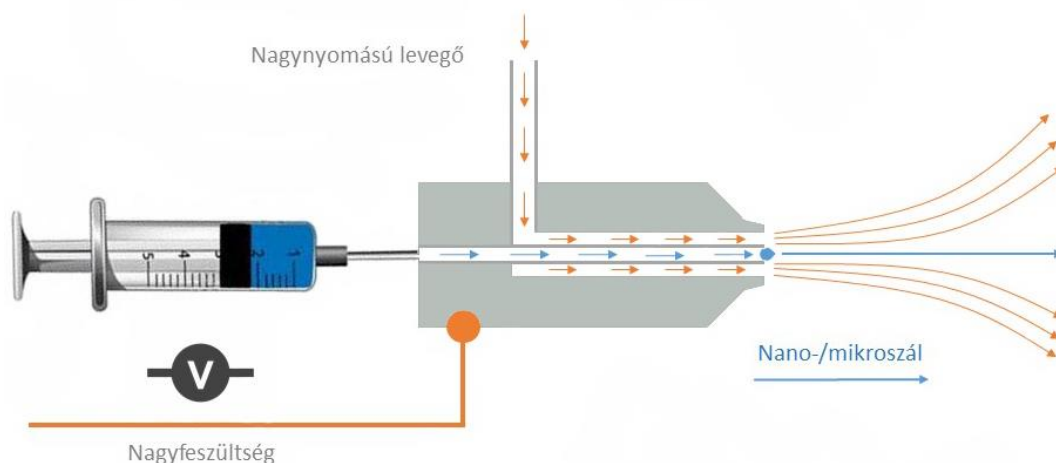
A polimereket tárgyaló fejezetben említésre került, hogy a keletkező szálak struktúráját és a szálak morfológiájának minőségét meghatározzák a polimerre és a polimer oldatra jellemző fizikai, fizikai-kémiai paraméterek. Szükséges azonban ezt az előállításához használt készülék műszaki adottságai, felépítése és beállításai szemszögéből is megvizsgálni. A szálak előállításakor az alábbi paraméterek változtatásával lehet a létrejövő szálak morfológiáját, vastagságát befolyásolni, optimalizálni: alkalmazott feszültség nagysága, feszültségforrás típusa (váltóáramú, egyenáramú), szálképző oldat áramlási sebessége, szálképző adagolófej típusakollektor-adagolófej távolsága, kollektor típusa és geometriája [61, 62]. A szálak minőségét tovább befolyásoló hatások közül külön csoportot alkotnak a környezeti tényezők, mint a hőmérséklet, a páratartalom és a nyomás [63]. Mindezen tényezők szálképzésre gyakorolt hatásait Antony L. Andrady 2008-ban megjelent [64] és Joerg Lahann 2010-ben kiadott [65] könyvei foglalják össze nagy részletességgel.

Az elektrosztatikus szálképzés az 1990-es évek végétől kezdődően egyre szélesebb körben vált részévé más tudományágakban végzett kutatásoknak, köztük a gyógyszertechnológiai és szöveti regeneráció témájú munkáknak. E folyamat pozitív hozadéka lett, hogy a módszer tovább differenciálódott, tökéletesedett. Az eltelt évtizedek folyamán más szálképzési megoldások is kifejlődtek, úgy mint a pneumatikus [66] vagy a rotációs szálképzés [35]. Ez utóbbiról a következő fejezetben írok bővebben. Az egyes szálképzési metodikák kombinációiból további új eljárások születtek. A fejlődés evolúcióját és eredményeit nehéz egységes rendszerbe foglalni, mégis ezen fejezetben szeretném röviden bemutatni az elektrosztatikus szálképzéshez tartozó jellemző eszközök főbb típusait. A létrejött fejlesztések többségükben a technológiára jellemző alacsony kitermelést [67], a szálak újabb tulajdonságokkal való felruházását, morfológiájának és szerkezetének egységesebb, reprodukálható előállítását célozták és célozzák napjainkban is. A rendszerezést a berendezések két legfőbb alkatrészének, (a) a szálképző oldatot adagoló és (b) szálgyűjtő egységének típusa, valamint működési elve alapján érdemes tekinteni. A kialakult technikák egy részénél a szálakat létrehozó elektrosztatikus erő mellett más típusú erő is domináns szerepet játszik a szálképződésben. Ilyen például a sűrített levegő (pneumatikus erő: PF) és az elektrosztatikus erőtér kombinációjából kifejlődött elektrosztatikus-pneumatikus (*electro-blowing*) [47] vagy az elektrosztatikus és a forgásból eredő centrifugális erőt (CF) együttesen

kihasználó centrifugális-elektrosztatikus szálképzés (*centrifugal electrospinning, rotary electrospinning, high speed electrospinning, electrocentrifugal spinning*) [68, 69]. Együttesen nevezhetjük ezeket elektrosztatikusan kombinált szálképzési eljárásoknak.

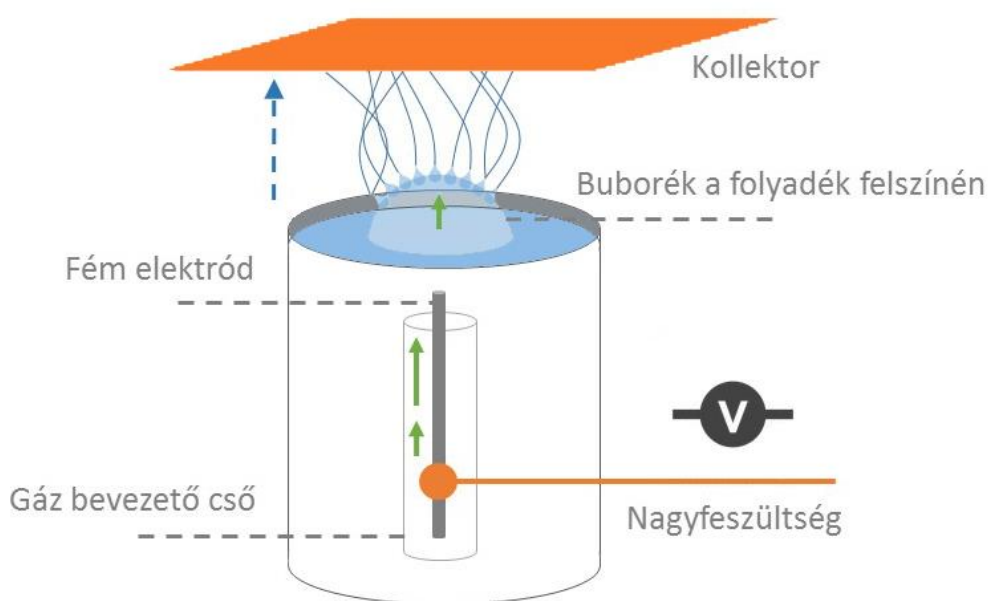
a) *A szálképző oldatot adagoló egység típusai és működési elvük*

Egységesebb morfológiájú szálak létrehozása érhető el úgy, ha az elektrosztatikus erő mellett nagy nyomású és sebességű, megfelelően fókuszált levegő, esetleg egyéb inert gáz áramoltatásával segítjük a folyadékkúp-szál átmenetet. Yong és munkatársai 2002-ben nyújtották be azon szabadalmi leírásukat, amelyben az erre alkalmas szálképző fej kialakítását és működését mutatják be [70]. A szabadalom jelenleg a DuPont cég tulajdonában van. A szálképző fej úgy van kialakítva, hogy az adagoló tűt külső köpenyként veszi körbe a levegő áramoltatásra szolgáló csatorna (**5. ábra**). Az elektrosztatikus-pneumatikus szálképzés során az oldatból vagy olvadékból [71] (*electro-blowing, gas-assisted electrospinning*) képződő struktúra egységességét befolyásoló tényezők a befúvatott levegő hőmérséklete és áramlási sebessége. A magasabb hőmérséklet az egységesebb forma kialakulásának kedvez [72]. 2002 után több olyan szabadalom is megjelent, amely ezen eljárásra épül. Előállíthatók így nanoszálak membránok és szűrők [73, 74], polimer alapú, szubmikronos méretű kerámiaszálak [75], de irodalomban találunk gyógyszer technológiai vonatkozású munkát is [76].



5. ábra Az elektrosztatikus-pneumatikus szálképző berendezés (*Electro-blowing*) adagolófeje

A magyarul buborékos elektrosztatikus szálképzésre fordítható *bubble electrospinning* egy másik olyan szálképzési technika, amelynek működéséhez levegő vagy egyéb inert gáz szükséges. Fontos különbség azonban, hogy az ilyen kialakítású készülékek esetében a gáz áramlása nem tekinthető szálképző erőnek. Működése közben a polimer oldatot tartalmazó tartályban elhelyezett és a folyadék felszíne alatt végződő gázbevezető csőből a gáz a folyadék tetején buborékot hoz létre. A buborék felszínén szerveződő Taylor-kúpokból indul meg az elvékonyodó anyagáram az elektrosztatikus erő hatására (**6. ábra**) [77].

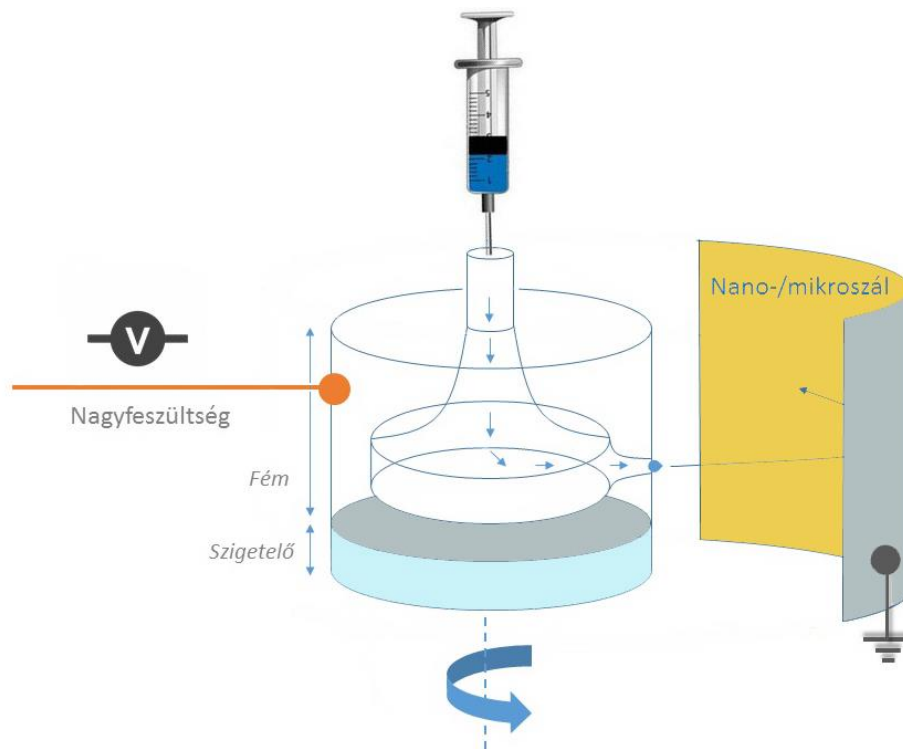


6. ábra A buborékos elektrosztatikus szálképző berendezés (*Bubble electrospinning*) elvi felépítése és működése

A technikát ismertető szabadalmat Jakapson és munkatársai nyújtották be 2007-ben [78]. Az eljárás nagy koncentrációjú oldatoknál, valamint olvadékoknál használható hatékonyan és akár 5 nm átmérőjű szálak is képezhetők vele [79].

A szálképző elektrosztatikus erő kombinálható a nagysebességű forgás révén kialakuló centrifugális erővel is. E két erőt együttesen felhasználó eljárást centrifugális-elektrosztatikus szálképzésnek nevezzük (*centrifugal electrospinning*). Az ilyen készülékekben a szálképző anyagot adagoló fej nagyfeszültségű áramköri kapcsolása azonos az egyszerű elektrosztatikus berendezésnél ismert megoldással. Szálképzéskor az áram alá helyezett adagoló fej gyors forgó mozgást végez. A két erő kombinálása

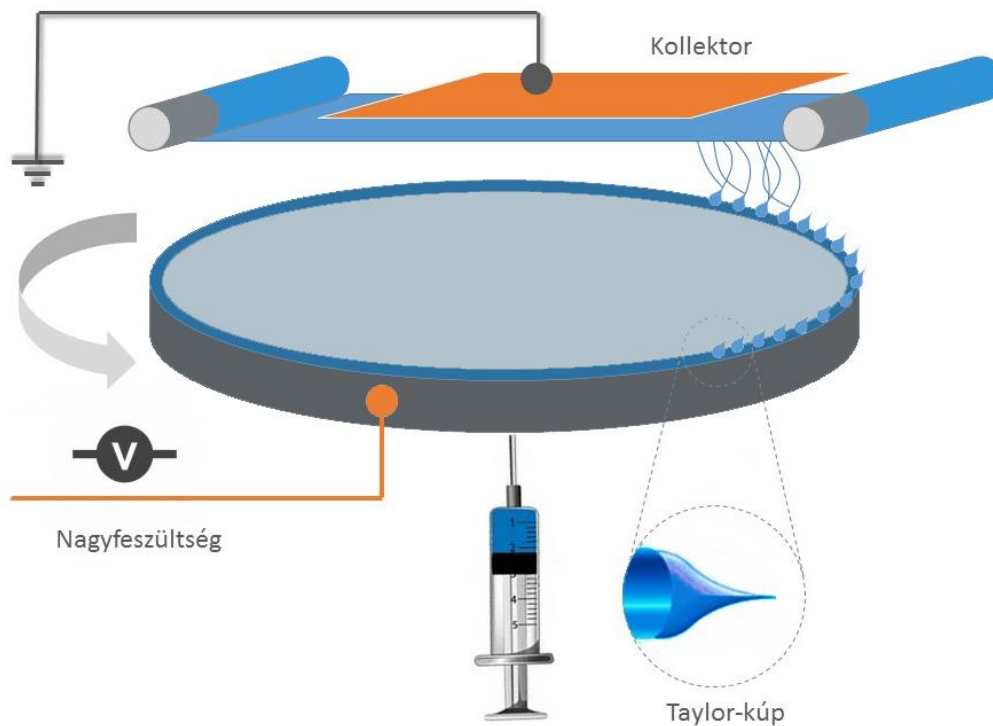
azzal az előnnyel jár, hogy az optimális szálképzéshez szükséges feszültség és forgási sebesség is kisebb lehet az elektrosztatikus és centrifugális eljárásoknál külön-külön alkalmazott értékeknél. Liu és munkatársai az említett paraméterek közötti összefüggést vizsgálták és arra jutottak, hogy a 10-30 kV és 4000-12000 RPM (*Revolutions Per Minute*) helyett elegendő 3-6 kV feszültség és 360-540 RPM forgási sebesség az optimális morfológiájú szál előállításához [80]. Előny az is, hogy egyes esetekben rendezettebb szerkezetű és jobb mechanikai tulajdonságú végtermék keletkezik [81]. A forgó alkatrész lehet tűs és tű nélküli (*needleless*). Lu és munkatársai 2010-ben publikált munkájuk során tű nélküli kúpos fémhuzal tekercsből készült adagolófejet használtak [82]. A **7. ábra** a tűs centrifugális-elektrosztatikus berendezés felépítésének sematikus rajzát mutatja.



7. ábra A tűs centrifugális-elektrosztatikus (*Centrifugal electrospinning*) szálképzés elvi felépítése

Külön kiemelendő Nagy és munkatársainak azon fejlesztése, amely rámutat arra, hogy a centrifugális-elektrosztatikus szálképzés a gyógyszeripar számára is egy potenciálisan méretnövelhető technológia lehet a jövőben. Olyan készüléket építettek,

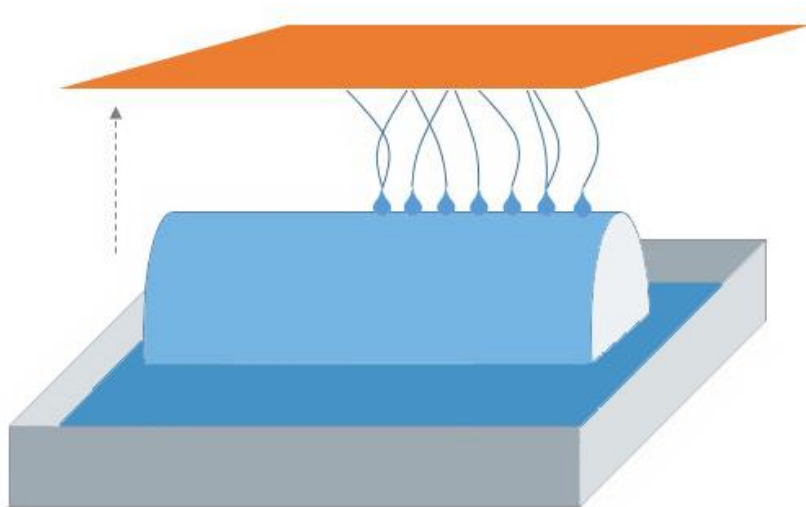
amelynél a tű nélküli adagolófej anyagkivezetése egy, a külső kerületen kialakított körkörös rés (*corona-electrospinning, high-speed electrospinning*) (8. ábra) [83]. A feszültség alá helyezett alkatrész szálképződéskor nagysebességgel forog, miközben a résnél önszerveződő Taylor-kúpok sokasága alakul ki. 50 kV feszültség és 40.000 RPM forgási sebesség mellett óránként ~ 450 g amorf-szilárd diszperziós termék (~10 kg/nap) állítható elő [16].



8. ábra A korona szálképző (*Corona electrospinning*) vagy nagysebességű elektrosztatikus szálképző berendezés (*High-speed electrospinning*) elvi felépítése

Egy másik tümentes elektrosztatikus eljárásban az adagolófej egy, a szálképző folyadékba félig elsüllyesztett forgó henger vagy korong (*roller electrospinning*), amelynek a felületére folyamatosan pótlódó folyadékfilmen jönnek létre az önszerveződő Taylor-kúpok (9. ábra) [84]. A műszaki megoldást a 2003-ban Oldrisch Jirsak és munkatársai által benyújtott szabadalom írja le [85]. Az eljárás Nanospider™ néven vált ismertté. Niu és munkatársai kutatásaik során azt tanulmányozták, hogy a forgó test formája és az alkalmazott feszültség hogyan befolyásolja a termék minőségét. Kísérleteikhez 8 cm átmérőjű, 20 cm hosszú hengert

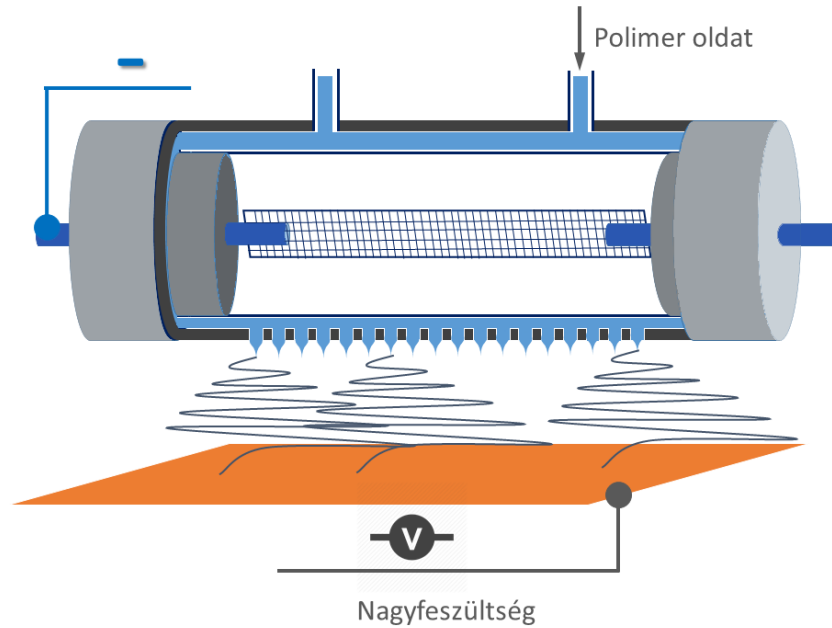
és 2 mm vastag korongot használtak. Mindkét kollektor forma esetén egységes szálak hozhatók létre, ahol a feszültség kritikus pontig terjedő növelése vékonyabb és szűkebb szálvastagság-eloszlású szilárd terméket eredményez. Amennyiben az előállítás paraméterein nem változtatunk, akkor a henger-korong összehasonlításban a koronggal vékonyabb minták készíthetők, illetve azonos minőségű szövetek gyártásához a korong esetében kisebb feszültség is elegendő [86]. A Nanospider technika szintén használható gyógyszer-tudományi vonatkozású kutatásokban.



9. ábra A forgó hengeres adagolású elektrosztatikus berendezés (*Roller electrospinning, NanospiderTM*) felépítése

El-Newehy és munkatársai metronidazol tartalmú PVA/PEO kompozit szálakat készítettek, amelyeket anaerob baktériumok elleni antibiotikus kezelésre használtak [87]. A hengeres adagolófejű elektrosztatikus szálképzés másik érdekes alkalmazásában poliaminsavból 143-470 nm átmérővel rendelkező szálalás réteget hőkezeléssel a gázkromatográfok kolonnáihoz is használt poliiimiddé alakítottak [88].

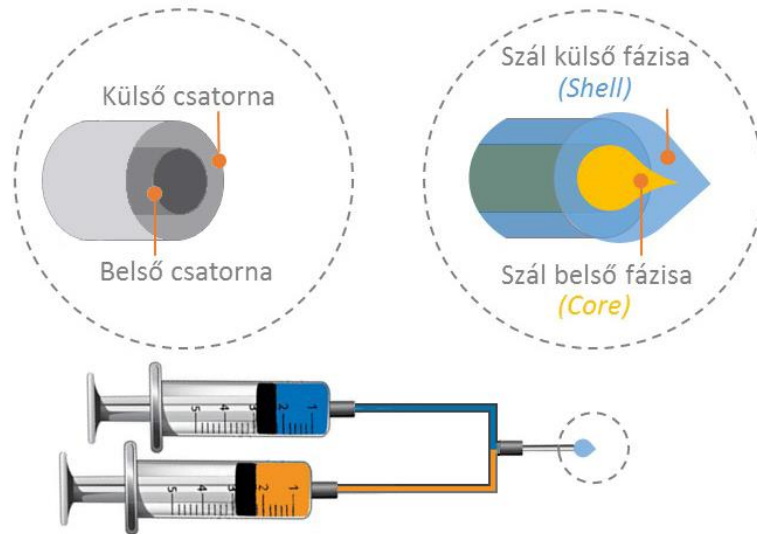
Hengeres kiképzésű az angolul *porous-hollow tubes electrospinning*-ként ismert elektrosztatikus eljárás adagolófeje is, ahol a duplafalú hengerpalástba fűrt lyukakon keresztül jut el a polimer oldat a henger felszínére. Ezt az összeállítást a **10. ábra** mutatja.



10. ábra A pórusos henger adagolófejű elektrosztatikus szálképző berendezés (*Porous-hollow tube electrospinning*) elvi felépítése

Az ilyen készülékek előnye, hogy az egytűs, hagyományos elektrosztatikus eljárás $\sim 0,04$ g/óra termelékenységével szemben akár 0,3-0,5 g/óra kihozatal is elérhető egy 20 furatú, 13 cm hosszú adagolófejű [67], de az irodalom 250-szeres termelékenységről is említést tesz [89].

A szabályozott és célzott hatóanyag-leadás, a szöveti regeneráció, a sebgyógyulás és az implantátumok fejlesztése területén végzett új kutatásokban egyre elterjedtebben használják a koaxiális (*coaxial*) vagy más néven mag-héj típusú (*core-shell*) elektrosztatikus szálképző eljárást [90, 91]. Az elnevezés a készülékeknél használatos szálképző tű felépítésére utal, ahol a polimer oldatok az anyagok kilépési pontjáig a tüben elszeparált kör keresztmetszetű és egymásba épített csatornákon haladnak a **11. ábrán** mutatott módon.



11. ábra A koaxiális vagy mag-héj típusú elektrosztatikus eljárás (*Coaxial* vagy *Core-shell electrospinning*) adagolófejének elvi felépítése

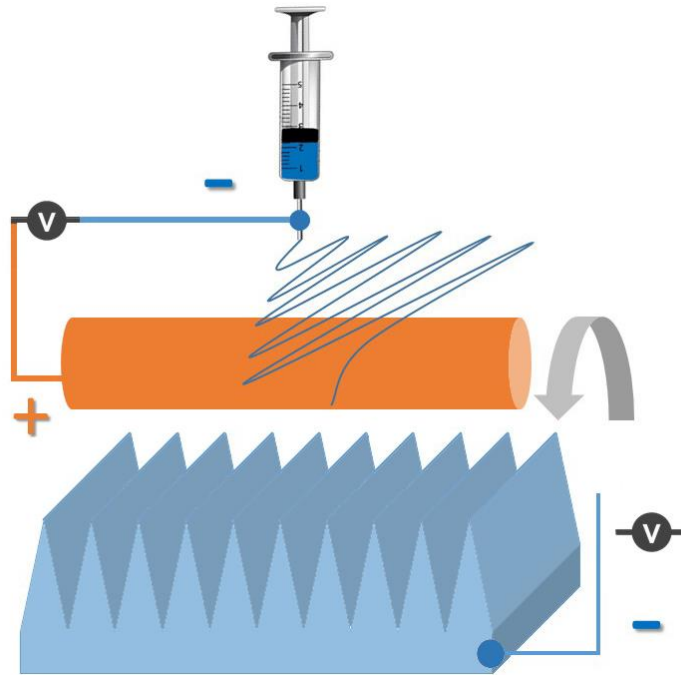
A tűk jellemzően kettő, egy belső és egy külső kapillárisból állnak, de léteznek ennél több csatornás kivitelek is [92]. A külső csatornán keresztül áramoltatott polimer oldat alkotja a szilárd szálak termék héj rétegét, amelynek belsejében helyezkedik el a belső csatornán keresztül adagolt mag fázis. Jiang és munkatársai biodegradábilis, mag-héj típusú struktúra előállításához külső fázisként polikaprolaktont (PCL), belső fázisként pedig polietilén-glikolt (PEG) használtak. A PCL oldat adagolását állandó nitrogén nyomás (40 mbar), míg a PEG oldat adagolását mechanikus pumpa segítségével oldották meg [93].

Az adagolófej típusainak osztályozásához tartozóan kell említést tenni a többszörös (*multiple*) típusú elektrosztatikus eljárásokról. Klasszikusan a megnevezést az egytűs elektrosztatikus technikákhoz viszonyítva szokás használni, ahol egy kollektorhoz tartozóan a szálképző tűk száma kettő vagy annál több, ami a méretnövelés legegyszerűbb módja [94]. A többszörözés nemcsak a méretnövelésre ad lehetőséget. Az egyes adagolófejekre különböző polimer oldatok vezethetők rá, valamint az egyedi egységek egymástól független szabályozásával, mozgatásával változatos struktúrájú és többrétegű készítmények hozhatók létre [95]. Könnyen belátható, hogy a fentebb ismertetett adagoló egységek többszörözésével a *multiple* elnevezés mára már tágabb értelmezést nyert.

b) *A szálgyűjtő vagy kollektor egység típusai és működési elvük*

Az elektrosztatikus szálképzés eszközeinek kulcsfontosságú alkatrésze a kollektor, amely nemcsak a szál gyűjtésére szolgáló felület, és ebben a szerepében meghatározó hatással van a kialakított szálak szövedék végső formájára, hanem egyben az elektromos áramkör zárását biztosító elem is. Formája és felülete determinálja a test körül kialakuló elektromos teret és így részben a hozzá érkező szálak orientációját, minőségét is. Jelen alfejezet az ismertebb kollektor típusokat rendszerezi felépítésük és működésük alapján. A kollektor szálképzésre, köztük a kialakuló szálak végső vastagságára, orientáltságára, a szálakból kialakult szerkezet formájára gyakorolt hatását jellemzően a geometriája, esetleges mozgatása, valamint az általa kialakuló elektromos mező profiljának befolyásolása és a feszültség nagysága, polaritása dönti el. A kollektorok másodlagos létrehozói a domináns szálképző elektrosztatikus erőnek, hiszen az elektromos potenciálkülönbség egyik végpontját biztosítják. A szálképzés végén kialakuló termék strukturáltsága, alakzata a szálpaplan funkciója szempontjából rendkívül fontos, ezért a felhasználás célja és jellege meghatározhatja, hogy mely készülékre van szükség a gyártáshoz.

A legáltalánosabban használt kollektor négyzet vagy téglalap alapterületű, elektromosan jól vezető lemez, sík lap (*plate collector, grounded static collector*), amely az adagoló fejhez képest merőlegesen helyezkedik el [24]. Megkülönböztetett funkciója nincs az ilyen elrendezésű eszközöknek. Hátránya, hogy a lemez felületén véletlenszerűen orientálódott szálakból felépülő lapka képződik, ami korlátozza a felhasználás lehetőségeit. A szálak szabályozott orientációjú gyűjtése az adagoló fejre merőleges síkban, egymással párhuzamosan elhelyezett és egyen potenciálra kapcsolt elektródokkal (*paralell electrodes collector*) oldható meg legegyszerűbben [96]. A szálak párhuzamosan orientált gyűjtése egyenáramú nagyfeszültséggel üzemelő elektrosztatikus eljárások esetén valósítható meg hatékonyan a kollektor térfelén elhelyezett, negatív potenciálra kapcsolt segédelektrodok használatával. A tárgyalt típusú kollektoroknak pontos magyar megnevezése nincs. Angolul leggyakrabban *knife-edge electrode*-ként említik (**12. ábra**). Dolgozatomban a rendszerezés érdekében magyarul a 'segédelektrod-kontrollált kollektor' kifejezést vezettem be.

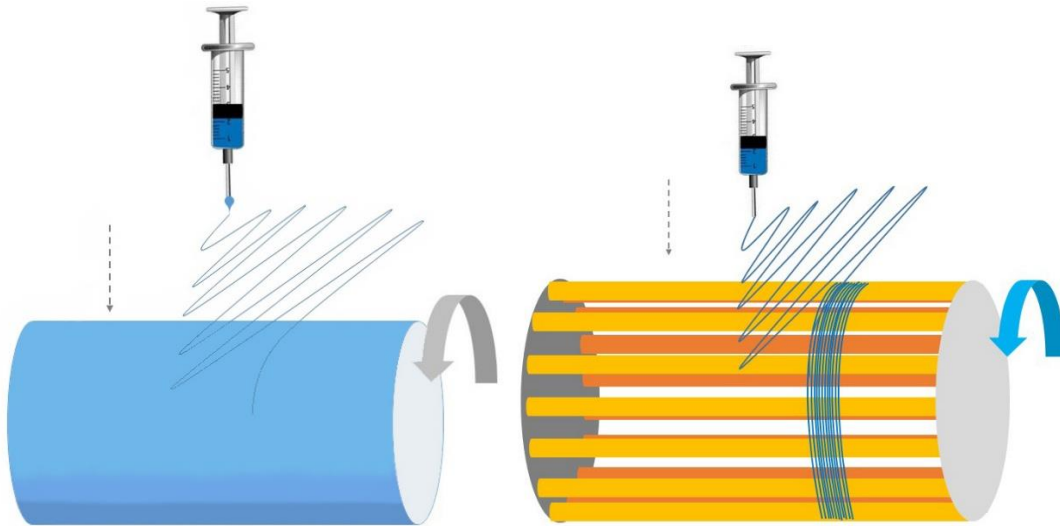


12. ábra A segédelektrod-kontrollált kollektorú elektrosztatikus szálképző berendezés (*Knife-edge collector*) elvi felépítése

Működése azon az elektrosztatikai jelenségen alapul, hogy a valamilyen polaritású egyenáramú sztatikus elektromos tér erővonalai kölcsönhatásba lépnek a másik elektrosztatikus tér erővonaláival. Az elektrosztatikus tér vagy mező geometriája a kölcsönhatás következtében megváltozik, deformálódik. Amennyiben a deformáció az erővonalak ismétlődően párhuzamos profilját hozza létre a kollektoron, akkor az a gyűjtendő szálak szintén párhuzamos orientációját eredményezi. A **12. ábrán** látható elrendezésben a külön áramkörrel táplált és negatív polaritású segédelektrod fogazott kialakítása és így a töltések csúcshatásnak megfelelő eloszlása miatt az elektromos mező a fent említett párhuzamos jellegű geometriát veszi fel és ezzel a forgó, pozitív polaritású kollektor elektromos mezejét is azonos módon deformálja [97, 98]. A gyűjtendő szálak kollektoron megjelenő eloszlása és orientációja úgy is megoldható, ha egy töltéssel nem rendelkező forgó kollektor mögött elhelyezett három egységből álló elektródasort egymástól eltérő polaritású egyenáramú feszültségre kapcsolunk [99].

Az irodalomban sok olyan közlemény található, amelyekben leírt kísérletekhez hengeres kialakítású fém kollektort (**13. a ábra**) használtak a szálak gyűjtésére (*drum collector*) [100]. A henger kialakítása többféle is lehet.

A legegyszerűbb kivitelben a henger palástja folytonos, míg más esetekben a palást helyén egymással párhuzamos fém huzalok találhatók (**13. b ábra**). Ez utóbbi megoldás esetén a cm szélességű lapkák deformáció nélkül választhatók le a dobról [101].

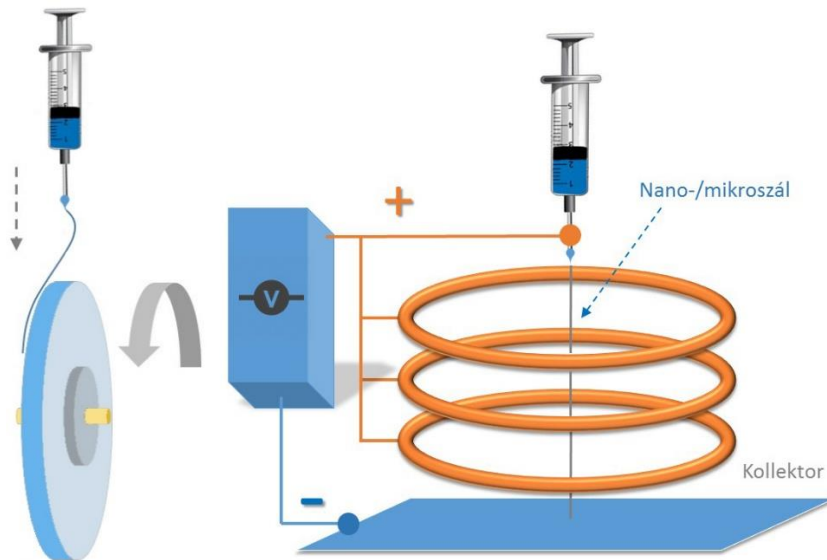


13. ábra A forgó hengeres kollektor (*Drum collector*) sematikus rajza a) fedett hengerpalástú és b) párhuzamos huzalozású kivitelben

A kollektor forgó mozgása miatt a szálak további vékonyodása következhet be. Chew és munkatársai szubmikronos méretű szálakból felépülő biofunkcionális szöveti szerkezetet készítettek így [102]. A hengeres kollektorok egy továbbfejlesztett változatával az orientált szálgyűjtés úgy valósul meg, hogy a műanyag forgó henger forgási tengelyénél egy horizontálisan mozgatható tűs, fém elektródot illesztenek az üreges test belsejébe. A tű aktuális pozíciójával azonos pontra érkezik a keletkezett szál a hengeren [103]. A forgó elektródok másik ismert kivitelezésében henger helyett fém korong a szálgyűjtő kollektor (*disk collector*) [104, 105], amelyet a **14. a) ábra** mutat.

A kollektor típusok igen szélessé vált palettájából megemlítenők még azok, amelyekkel a szálak fonalköteggé alakíthatók. Az úgynevezett gyűrű kollektorral (*ring collector*) nanoszálal fonal állítható elő, amely gyakran a szöveti tervezés fókuszú kutatásoknál használt szilárd forma [106]. A gyűrűs kollektorral párhuzamos szálalrendezésű szálpaplan is készíthető. Fonal formájú termék keletkezik akkor is, ha a kollektor elektródját olyan folyadékba süllyesztjük, amelyben a polimer nem oldódik. Ebben az esetben a folyadék felszínéről a nanoszálal fonallá tekercselve

gyűjthetők a kollektor forgó hengere segítségével [107]. Az elektrosztatikus berendezések egyik speciális kivitelében az elektromos térerő orientációra gyakorolt hatását nem csak az eszköz kollektor körüli térrészében használják fel. A többszörös töltésű (*multiple electric field*) eljárásnál a szálképző fej és a kollektor közötti szakaszon elektromosan fókuszáló lencsét, fém gyűrűket helyeznek el. Amennyiben a gyűrűket az adagolófejjel azonos polaritású feszültségre kapcsoljuk, akkor a kialakuló szimmetrikus erőter képes jelentősen csökkenteni a szálképződéskor jellemző kaotikus mozgást, így fókuszálva egy pontra a szállá vékonyodó anyagoszlopot (**14. b ábra**) [108].



14. ábra a) Forgó korong kollektor elvi felépítése, b) Elektromosan fókuszált vagy többszörös elektromos töltésű (*Multiple electric field*) elektrosztatikus berendezés elvi felépítése

Az elektrosztatikus és elektrosztatikusan kombinált szálképzési eljárásokból irodalmi kutatómunkám szerint bemutatott csoportosítás (**4. táblázat**) megmutatja azokat a főbb technikákat és működésüket, amelyek napjainkban jellemzik a szálképzésre épülő laboratóriumi és ipari munkák formulációs lehetőségeit. Fontos azonban megjegyezni, hogy a valóságban rendelkezésre álló eszköztár még ennél is tágabb, amelyet a fentebb tárgyalt két fő alkatrész, az adagolófejek és kollektorok kombinálhatósága is alátámaszt.

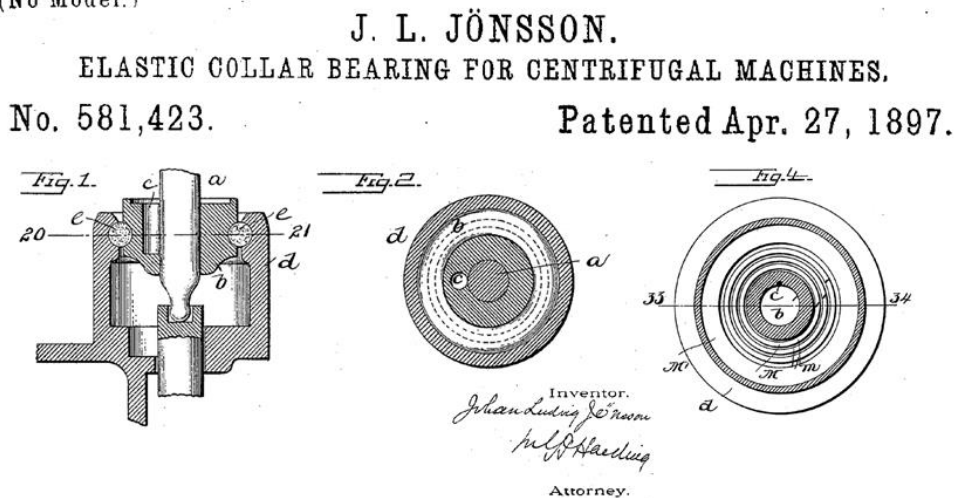
4. táblázat Az elektrosztatikus és elektrosztatikusan kombinált szálképzési eljárások csoportosítása

Elektrosztatikus és elektrosztatikusan kombinált szálképzési technikák általános csoportosítása		
		Az eljárás kiemelt tulajdonsága a szilárd termékre nézve
Jellemző megnevezés / A szálát létrehozó erő		
I. Szálképző adagolófej működési elve szerint		
Buborékos	/ESF <i>(Bubble electrospinning)</i>	Méretnövelhetőség
Elektrosztatikus-pneumatikus	/ESF, PF <i>(Electro-blowing)</i>	Ultravékony szálak
Forgóhengeres vagy forgó dobos	/ESF <i>(Roller electrospinning)</i>	Méretnövelhetőség
Nagysebességű elektrosztatikus, Korona-elektrosztatikus	/ESF, CF <i>(High-speed electrospinning, Corona-electrospinning)</i>	Gyógyszeripari méretnövelhetőség
Centrifugális-elektrosztatikus	/ESF, CF <i>(Centrifugal electrostatic)</i>	Méretnövelhetőség
Koaxiális	/ESF <i>(Coaxial / Core-shell type)</i>	Többfázisú szálak
Pórusos hengerű	/ESF <i>(Porous-hollow tube)</i>	Méretnövelhetőség
Többszörös	/ESF <i>(Multiple jet electrospinning)</i>	Méretnövelhetőség
II. Kollektor típusa szerint		
Lemez	<i>(Plate collector, Grounded static collector)</i>	Nincs
Párhuzamos	<i>(Parallel electrodes)</i>	Párhuzamos orientáció
Hengerdob kollektor	<i>(Drum collector)</i>	Szálak vékonyodása
• Huzal	<i>(Wire drum)</i>	Minta könnyű leválasztása
• Belső elektród	<i>(Drum with sharp pin inside)</i>	Szabályozható orientáció
Gyűrűs kollektor	<i>(Ring collector)</i>	Fonalképződés
Korong	<i>(Disk collector)</i>	Egységesebb felületű termék
Fonalas gyűjtő	<i>(Yarn collector)</i>	Fonalképződés
Segédelektrod-kontrollált kollektor	<i>(Knife-Edge collector)</i>	Nagyhatékonyságú orientáció
Többszörös töltésű vagy elektromosan fókuszált	<i>(Multiple field electrospinning)</i>	Egységesebb felületű termék

1.2.1.3. Rotációs szálképzés

A rotációs vagy centrifugális szálképzés gyakorlati szempontból egy igen egyszerű módja a szálak anyagi rendszerek előállításának. Története kevéssel régebbre nyúlik vissza az elektrosztatikus szálképzésénél. Johan Ludvig Jonsson 1897-ben közzétett szabadalmában egy olyan műszaki megoldást ismertet, amely már a szabadalma címében is nevesített centrifugális erőt hasznosítja a folyékony halmazállapotú anyagokból történő szálak kialakításához (**15. ábra**) [109].

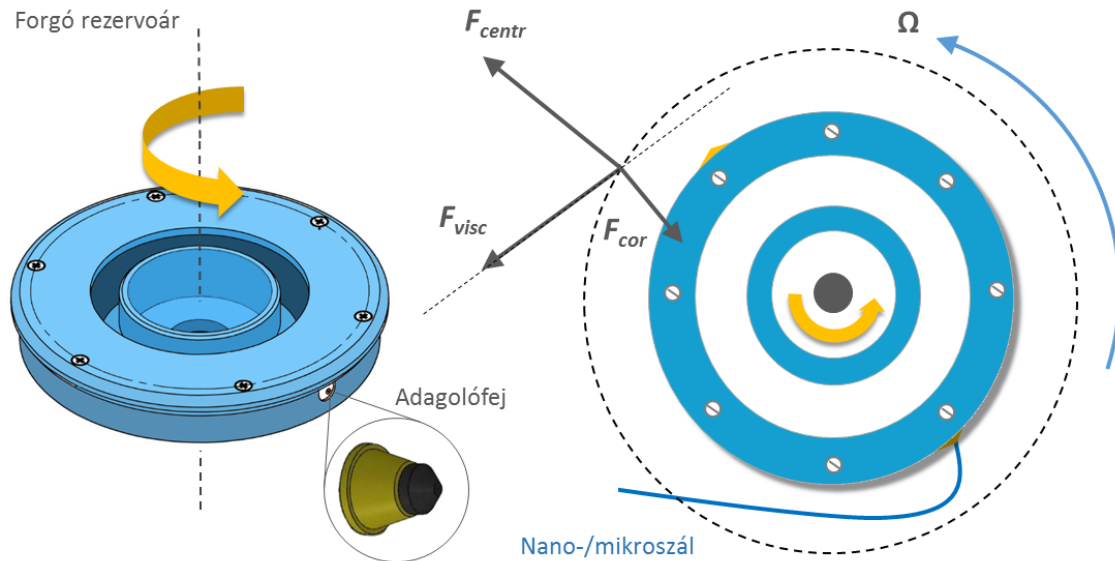
(No Model.)



15. ábra Részlet a centrifugális szálképzés 1897-ben közzétett szabadalmából [109]

A módszer a későbbiek folyamán a textil és a szilikát iparban honosodott meg csak úgy, mint az elektrosztatikus szálképzés, azonban gyógyszer technológiai és orvosi biológiai vonatkozású kutatások [110, 111] részét csak közel tíz éve képezi. Ezt mutatják azok az irodalmak is, amelyek e két említett vonatkozásában a technikáról találhatók. A globálisan rendelkezésre álló közleményekben ismertett eredmények jól mutatják az eljárás három alapvető előnyét az elektrosztatikus eljárással összehasonlításban. A centrifugális elven előállított szálakhoz használt polimer oldatnak nem kell elektromosan jól polarizálhatónak, töltéshordozónak lennie [35], a laborméretű gyártással nagyobb, 1 g/perc termelékenység is elérhető [112], valamint a kialakítható szálvastagság is szélesebb tartományba esik. Nano- és mikroszálak is készíthetők így [113, 114] oldatból [115] és olvadékból egyaránt [116]. A módszer elméleti háttere az, hogy a viszkózus oldatot vagy olvadékot tartalmazó rezervoár (**16. ábra**) nagysebességű

forgatása következtében az oldatra/olvadékra radiálisan kifelé irányuló tehetetlenségi erő hat, amely ennek következtében szintén kifelé irányuló mozgásra kényszeríti az anyagot. A centrifugális szálképzéshez használt adagolófejek többsége úgy van kialakítva, hogy a mozgásra kényszerített anyag a forgó test palástjánál végződő és elvékonyodó kapillárisba, csatornába tódul, végül a tehetetlenségéből eredően onnan kiszakadva halad tovább.



16. ábra A centrifugális szálképzés (*Centrifugal spinning, Rotary jet spinning, ForcespinningTM*) működési elvének sematikus ábrázolása

A centrifugális vagy rotációs szálképzésre alkalmas polimerek molekulatömege, a polimer oldatok viszkoelaszticitása, felületi feszültsége, az oldat koncentrációja és az alkalmazott oldószer illékonyasága azok a főbb tényezők, amelyek a leszakadó anyag folytonosságát, szállá történő elvékonyodását és morfológiáját meghatározzák [117]. Több olyan tanulmány is készült, amely ezen komplex rendszerek viselkedését, a viselkedés hátterében érvényesülő fizikai és fizikai-kémiai összefüggéseket írják le a megfelelő minőségű szál termékek előállításának érdekében [118, 119]. Az anyagra ható általános fizikai erők közül kiemelendő a dinamika alaptörvényeként ismert centrifugális erő (F_{centr}) (E3), a viszkózus erő (F_{visc}) és a Coriolis erő (F_{cor}) [120, 121].

$$F_{centr} = m \cdot \Omega^2 \cdot r \quad (\text{E3})$$

ahol m a test tömege, Ω a test forgásának szögsebessége, r a test súlypontjának tengelytől mért távolsága.

A centrifugális szálképző eszközök központi alkatrésze tehát a nagy sebességgel forgatható adagolófej és az azt hengerpalást-szerűen körülölelő kollektor [122]. Az alkalmazott fordulatszám jellemzően néhány ezer RPM [123]. Ahhoz, hogy a szálképződéshez a fizikai szempontból optimális feltételek előálljanak, megfelelő geometriájú és méretű adagolófejre [34, 124], valamint a forgási sebesség és a környezeti paraméterek szabályozhatóságára van szükség. A ForcespinningTM elnevezés a rotációs szálképzés azon műszaki megoldásának védjegye, amellyel egységes morfológiájú szálak állíthatók elő laborméretnek megfelelő kihozattal [125]. Kamal és munkatársai közleményükben a ForcespinningTM-re épülő, szoftveresen vezérelhető és mérnöki precízen kivitelezett eszköz prototípusát mutatják be [126]. A módszerrel készíthetők polimer alapú, kerámia, fém és szénszálak is [123, 127]. A centrifugális szálképzés kombinálható az elektrosztatikus szálképzéssel az előző fejezetben (1.2.1.2.) leírtak szerint.

1.2.2. A hatóanyag tartalmú szálak szerkezete

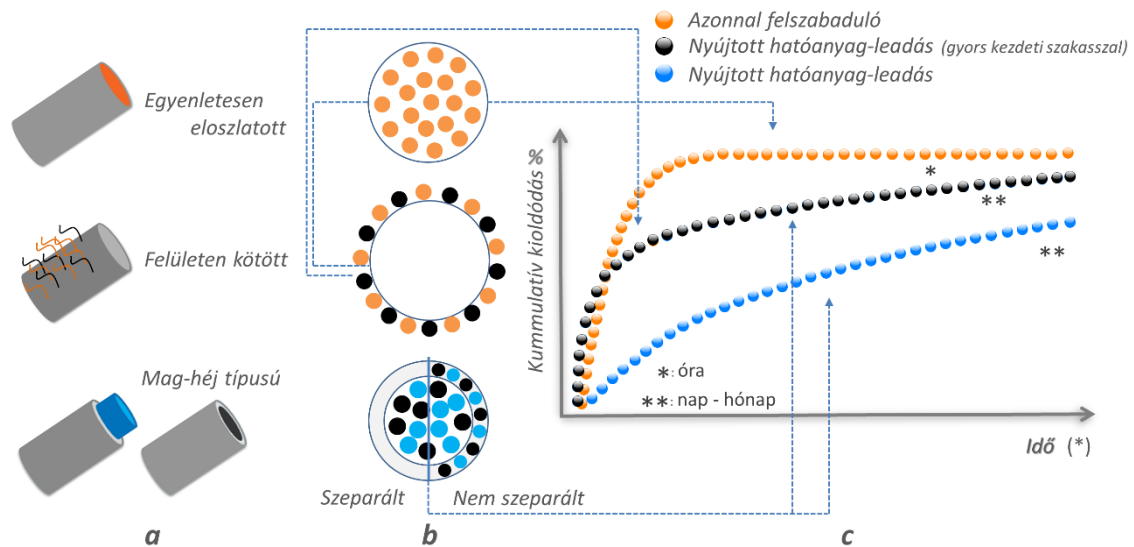
A létrehozható szálak szerkezetének és a szerkezetből eredő működésének ismerete szükséges ahhoz, hogy a kiválasztott alkalmazásban elvárt terápiás hatás feltételeihez igazodva tervezhessük meg anyagi rendszerünket. A korábbi fejezetekben (1.2.1) ismertetett kutatási eredményeket alapul véve elmondható, hogy a szálakat elsődlegesen makroszkópikus paramétereivel tudjuk jellemezni. Ezen makroszkópikus paraméterek az átlagos szálvastagság [37], a vastagság egységessége és eloszlása [128], a szálak egymáshoz viszonyított elrendeződése és kapcsolódási pontjai [129], valamint a szálak szövetek térbeli formája, geometriája [130]. Az individuális szálak egymáshoz viszonyított helyzete alapján megkülönböztethetünk véletlenszerűen [131] és szabályozottan orientált szöveteket [132], míg a szövetek térbeli elrendeződése szerint a szerkezet lehet két dimenziós (2D) [133] és három dimenziós (3D) [134]. Általánosságban a szálvastagság és így a fajlagos felület kivételével a makroszkópikus sajátságok definiálása a szöveti regenerációban nyer értelmet [135]. Pontosabb megközelítésben ez alól kivételt képeznek a dolgozat témájának részeként tárgyalandó topikális gyógyszerhordozó rendszerek [136]. Amennyiben a szálakat, mint potenciális gyógyszerhordozó rendszereket tekintjük, akkor a szerkezetet a hatóanyag és a polimer mátrix viszonyában kell tovább vizsgálnunk.

A hatóanyag-tartalmú szálak egyre kisebb részleteit nézve, a tulajdonságokat szupramolekuláris szinten meghatározó szerkezeti jellemzőkhöz jutunk, ahol a szál keresztmetszeti felépítése és a hatóanyag ehhez viszonyított pozíciója alapján három fő típus különböztethető meg: a szálban egyenletesen elosztatott (*blend type*) [137], a szál felületéhez kötött (*coated blend type, surface functionalized*) [138] és a mag-héj típusú (*core-shell type*) szálak [139] esetében a fázisokban szeparáltan (belső vagy külső fázisban megtalálható) és nem szeparáltan elosztatott (mindkét fázisban megtalálható). A képzeletbeli nagyítást tovább növelve eljutunk a hatóanyag-szál rendszer legkisebb releváns, molekuláris szintjére, ahol a hatóanyag-polimer kapcsolat kémiai minősége szerint a kémiai kötések két típusa adható meg: elsőrendű kémiai kötéssel rendelkező [140], másodrendű kémiai kötéssel rendelkező [141]. A rendszerezést összefoglalóan az **5. táblázat** mutatja.

5. táblázat A hatóanyag tartalmú szálak szerkezeti csoportosítása a szerkezeti jellemzők alapján

A hatóanyag tartalmú szálak szerkezeti csoportosítása szerkezet alapján		
Csoport szempontja	Csoport szerinti típus	A csoport szempontjának jelentősége az adott felhasználási területen
Molekuláris		
A polimer mátrix - hatóanyag kapcsolatának kémiai minősége	Elsőrendű kémiai kötésű	Gyógyszerhordozó rendszer
	Másodrendű kémiai kötésű	
Szupramolekuláris		
A hatóanyag pozíciója a polimer mátrixhoz képest	Egyenletesen elosztatott	Gyógyszerhordozó rendszer
	Mag-héj típusú <ul style="list-style-type: none"> • Szeparált • Nem szeparált 	
	Felületen kötött	
Makroszkópikus		
Az individuális szálak egymáshoz viszonyított elhelyezkedése	Véletlenszerűen orientált	Szöveti regeneráció
	Szabályozottan orientált	
A szálak szöveti térbeli elrendeződése, geometriája	2D	Szöveti regeneráció
	3D	

A szerkezeti sajátosságok közül tehát a hatóanyag molekuláris és szupramolekuláris szinten értelmezhető kapcsolata a polimerrel az, amely részben determinálja a szálak rendszer hatóanyag-leadó képességét és annak típusát. Természetesen a hatóanyag-felszabadulás végső kinetikáját a szálak esetleges további feldolgozásával kapott végleges gyógyszerforma [142], a fiziológiás körülmények között mutatott viselkedése és a hatóanyag kristályos vagy amorf állapota, tágabban fizikai-kémiai sajátossága határozza meg [143]. A **17. ábra** azt szemlélteti, hogy a szupramolekuláris szerkezeti tulajdonságok egyes típusaival jellemzően milyen profilú kioldódás érhető el [144].



17. ábra A szálak szerkezet hatóanyag-polimer mátrix viszonyának szupramolekuláris szinten megkülönböztetett típusainak jellemző kioldódási profiljai [144]

1.2.3. A szálak struktúra tulajdonságai és terápiás jelentősége

Irodalmi kutatásaim alapján arra a megállapításra jutottam, hogy a szálak struktúra orvosi biológiai jellegű kutatásainak kezdete az 1960-as évek második felére [145], míg gyógyszerészeti vonatkozású alkalmazásuk vizsgálata a 1980-as évek elejére tehető, amelyek azóta is növekvő tendenciát mutatnak. A sok kutatómunka, valamint a gyakorlati és egyben ipari megvalósíthatóságra való törekvés eredményei alapján megfogalmazható a szálak rendszerek terápiás értéke (**6. táblázat**), amely részben a struktúra **1.2.2. fejezetben** tárgyalt szerkezeti tulajdonságaiból és a hatóanyag szálképző mátrix között kialakuló kölcsönhatásokból ered.

a) A szálás struktúra, mint gyógyszerhordozó rendszer tulajdonságai és ebből eredő terápiás előnyei

Nagy és munkatársai a rossz vízdékonyságú itakonazol hatóanyag gyors, 10 percen belüli, 90 %-os kumulatív kioldódását érték el azáltal, hogy a kiválasztott szálképző polimerrel amorf-szilárd diszperziójú, nagy fajlagos felületű rendszert hoztak létre [16]. Természetesen egy amorf hatóanyag *intrinsic* oldhatósága nem feltétlenül változik a kristályos állapotú formához képest, azonban az amorf-szilárd diszperziós állapot lényegesen javíthatja a kioldódást és annak sebességét [14]. Ez azért lényeges eredmény, mert a gyors oldódás megteremti azt az alapot a fejlesztő technológus számára, hogy kialakítsa a kívánt terápiás hatású és megfelelő kioldódási profillal rendelkező végleges gyógyszerformát. Amennyiben a kialakuló amorf hatóanyag termodinamikai sajátságai az oldhatóság javulását is okozzák, akkor az a dózis csökkentésére is lehetőséget adhat akkor, ha a csökkentett mennyiséggel a megfelelő mértékű biohasznosulás érhető el [146]. A szálképzésre tekinthetünk úgy, mint például a granulálással azonos szintű technológiai műveletre, amely a készítmény gyártásának közti lépése. Tehát a szálás anyag további feldolgozásával előállíthatók a klasszikus gyógyszerformák [142, 147, 148]. Mindemellett kiemelt előnye a szálás struktúrának, hogy a kioldódás kinetikája közvetlenül is befolyásolható [149], szabályozható, amit a szálak szupramolekuláris és molekuláris szintű tulajdonságai, valamint a hatóanyag felszabadulásának ezen anyagi rendszerekre jellemző mechanizmusai tesznek lehetővé.

b) A szálás struktúra, mint szöveti regenerációt segítő rendszer tulajdonságai és ebből eredő terápiás előnye

A szálás struktúra a dolgozat témája szempontjából releváns másik alkalmazási és kutatási területe a szöveti regenerációban, tervezésben [150], sebgyógyulásban [151], műtéti és egyéb orvosi célú implantátumként [152], graftként [153] történő felhasználásában való szerepének, hatásának vizsgálata és fejlesztése. Ezen vonatkozásaiban a szálak szerkezetének makroszkópikus tulajdonságai és a szálképzésre alkalmas, jellemzően polimer anyagok kémiai minősége és biokompatibilitása teremtik meg a felhasználás alapját (**6. táblázat**).

6. táblázat A szálak struktúra tulajdonságaiból származó előnyök összefoglalása
a) gyógyszerhordozóként történő b) orvosbiológiai célú felhasználás szempontjából

A szálak struktúra tulajdonságaiból származó előnyök		
Szálak forma tulajdonsága	Tulajdonság jellemző következménye	Következmény terápiás értéke
a) Gyógyszerhordozó		
Nagy fajlagos felület	Hatóanyag oldódási sebességének növelése	A megfelelő terápiás hatáshoz szükséges kinetikájú kioldódással rendelkező készítmény formulálása
Amorf-szilárd diszperziójú állapot kialakítására való képesség	Hatóanyag oldódási sebességének növelése	
		Hatóanyag oldhatóságának növelése
Feldolgozhatóság	Felhasználás klasszikus gyógyszerforma készítéséhez	A terápiához szükséges gyógyszerforma kialakítása
Változatos szupramolekuláris és molekuláris tulajdonságok	Hatóanyag-felszabadulás szabályozása	Terápiás hatáshoz szükséges kinetikájú és helyű hatóanyag-felszabadulás
Változatos makroszkópikus tulajdonságok	Önálló gyógyszerformaként történő felhasználás	Önálló gyógyszerformaként történő alkalmazás: lapka, tapasz
b) Orvosbiológiai alkalmazás		
Nano-és mikrométer átmérőjű szálak	Sejtek hatékony adhéziója	Terápiához szükséges funkció biztosítása
Szálak orientálhatósága	Extracelluláris mátrixszerű tulajdonságok, csökkentett ellenreakció	
Szálak szövetek változtatható térbeli formája	2D és 3D szerkezet kialakítása	

Az individuális szálak nano-és mikrométer mérettartományba eső szálvastagsága az emberi szöveteket alkotó sejtek jellemző mérettartományával azonos [154], így potenciálisan alkalmas platformjai a sejtek adhéziójának, megtapadásának. A szálak által létrehozott struktúra pedig képes a sejteket összekötő extracelluláris mátrix (ECM) egyes funkcióit helyettesíteni [155], ezért a szöveti regenerációban, implantátumok készítésében rendkívül fontos tényező a szálak egymáshoz viszonyított elhelyezkedése, orientációja és távolsága [156]. Cao és munkatársai bizonyították, hogy az orientáció az implantátum biokompatibilitását, a szervezetben indukált ellenreakciót is döntően

befolyásolja. A szabályos orientáltságú és egységes elrendezésű, száltávolságú szövetek biokompatibilitása jobb a véletlenszerűen orientált szerkezethez képest [135]. A kísérletek és vizsgálatok eredményeiből tudjuk azt is, hogy a szálképzésre alkalmas anyagok jelentős hányada a szervezet számára biokompatibilis [157]. A felhasználást tovább differenciálja az, hogy ezen anyagok viselkedése fiziológiás körülmények között egymástól eltérő is lehet. Vannak idővel lebomló, felszívódó tulajdonságúak is [158], amelyek lebomlása első lépésben többnyire enzimikus úton történik [159].

1.2.3.1. A nano-és mikroszálas struktúrák működése és lehetséges felhasználási területei

A szálas forma szerkezeti tulajdonságainak ismeretében gyógyszerhordozó rendszerként és gyógyszerkészítményhez történő felhasználását a továbbiakban az határozza meg, hogy milyen típusú hatóanyag és hogyan építhető be a szálképző mátrixba, valamint a beépülő hatóanyag a rendszerből milyen módon szabadul fel. Ezzel összefüggésben szempont még, hogy a szálas rendszert közvetlenül vagy további feldolgozással más ismert gyógyszerforma részeként tudjuk-e hasznosítani.

a) A szálas struktúra felhasználása gyógyszerhordozóként

A szálas struktúrával eltérő időtartamú (7. táblázat) kioldódási profilok, eltérő kinetikájú hatóanyag-felszabadulások érhetők el. Ezt a variabilitást a hatóanyag tulajdonságai, a hatóanyag beépülésének módja, a hordozó mátrix összetétele és viselkedése tudja biztosítani. A szálas struktúrájú gyógyszerhordozó rendszerekbe kis-és makromolekulák egyaránt beépíthetők. Mindkét típusú molekulára vonatkozóan, azonos hordozó esetén a kioldódási profilt a hatóanyag oldhatósága és nedvesedési tulajdonságai befolyásolják. Zeng és munkatársai olyan PLA nanoszálakat készítettek, amelyek egy része doxorubicin (Dox) bázist, míg másik fele a hatóanyag közel azonos oldhatóságú HCl sóját (Dox-HCl) tartalmazta. A Dox-HCl-tartalmú rendszer jelentős kezdeti, lökészerű kioldódást mutatott, amit a hatóanyag PLA szálak felszínéhez közeli felhalmozódása eredményezett [160]. Tungprapa és munkatársai tanulmányában négy, hasonlóan rosszul oldódó hatóanyag cellulóz-acetát (CA) alapú nanoszálakból történő felszabadulását vizsgálta, amelynek során a naproxen szignifikánsan nagyobb sebességű kioldódását figyelték meg a többi anyaghoz képest. A jelenség a naproxen és a CA

közötti kölcsönhatásoknak tulajdonítható [161]. A szálvastagság csökkenése és így a fajlagos felület növelése szintén gyors hatóanyag-felszabadulást eredményez [162].

7. táblázat Néhány példa különböző hatóanyag tartalmú szálás formulációk hatóanyag-felszabadulásának időtartamaira a felhasznált polimer mátrix függvényében
(cellulóz-acetát (CA), ciklodextrin (CD), etilcellulóz (EC), kitozán (CS), polikaprolakton (PCL), polietilénoxid (PEO), politejsav (PLA), poli(tejsav-glikolsav) (PLGA), poliuretán (PU), polivinilalkohol (PVA), polivinilpirrolidon (PVP), nátrium-alginát (SA), zein)

Hatóanyag tartalmú nanoszálás formulációk		
Hatóanyag	Szálképző mátrix (polimer) / felszabadulás időtartama	
Itraconazol	HPMC	1 [163]
	PU	20 [164]
Paclitaxel	PLA	2,5 [160,165]
	CS, PEO	8,3 [166]
Naproxen	PCL, β-CD	10 [167]
	CA	24 [161]
Ibuprofen	CA	24 [161]
	Zein	12 [168]
	PEG-CS / PLGA	16 [140]
Metronidazol	PCL	5 [169]
	PVA, PVA/SA	8 [170]
	PLA	6 [170]
Doxorubicin	PLA	3,3 [160,165]
	PEG-PLA	12 [171]
Acetaminofen	PVP	2 [172,173]
	PLA	14 [174]
Ketoprofen	PVP	1 [175]
	PVP / EC	24 [175]
	EC	2 [175]
Benzoin	PVA	14 [176]
	PVP / PLA	30 [177]

A hatóanyag szálképző anyaghoz viszonyított arányának növelése pedig a felszabadulás sebességének növekedését [178] és csökkenését is egyaránt okozhatja [179]. A kioldódás kinetikáját leghatékonyabban eltérő oldhatósági és duzzadási tulajdonságú, vízben oldódó és nem oldódó polimerek segítségével lehet szabályozni. Eszerint meg kell különböztetnünk a diffúzió-kontrollált, erózió-kontrollált és a kombinált [180] hatóanyag-felszabadulási mechanizmussal működő rendszereket.

A szervezetben erodálódó politejsav (PLA) és poli(tejsav-glikolsav) (PLGA) összehasonlításakor megfigyelhető, hogy a PLA hatóanyag-leadási sebessége alacsonyabb a laktid egység lassabb degradációja miatt [181, 182]. PLGA alapú nanoszálakból például az ibuprofen felszabadulása ellenkező irányban, napokkal tovább elnyújtható, amennyiben a rendszer PEG-kitozán (CS) konjugátumot is tartalmaz [140]. A hatóanyag-leadás szabályozására lehetőség nyílt egyes esetekben a szálak szövődék fizikai [176] és kémiai [183, 184] utókezelésével vagy jellemzően kovalens kötések kialakításával is [140]. A mag-héj típusú szálképzés [185] pedig olyan szárfelépítésű hordozó kialakítására alkalmas, amelyben a fenti tulajdonságok fázisonként elszeparáltan kombinálhatók. Külön kiemelendők a munkám során is vizsgált, a hatóanyag nyújtott leadására képes, többrétegű hatóanyag-leadó rendszerek [136, 186].

b) A szálak struktúra szöveti regenerációt segítő és egyéb orvosbiológiai célú felhasználása

A makromolekulákat, mint hatóanyagokat tartalmazó szálak rendszerek tárgyalása átvezet a szöveti regenerációjú és egyéb orvosbiológiai célú alkalmazások területére. A kismolekulák többségének a klasszikus gyógyszeres terápiákban, alkalmazási/beviteli módokban, terápiás indikációkban van kiemelt szerepük, míg a makromolekulák egy része nem szokványos kezelések biológiai eredetű entitásai. A szöveti regenerációt és egyéb orvosi alkalmazást célzó kísérletek egy részénél a beépített makromolekula szabályozott felszabadulása ugyanolyan fontos, mint a kismolekulás gyógyszerhordozó rendszerek esetében. Ettől eltérően viszont megkülönböztethetjük azokat a rendszereket, amelyeknél a szálak makroszkópikus tulajdonságai közvetlenül felelősek a kívánt hatásért, valamint ezzel átfedésben azokat, ahol a makroszkópikus tulajdonságok biztosítása mellett a makromolekula teljes felszívódása csak a cél. A beépíthető makromolekulák közül a fehérjéknek, peptideknek, enzimeknek [187, 188] és a ribonukleinsav (RNS) / dezoxiribonukleinsav (DNS) molekuláknak van kiemelt szerepük. A szálak ezen anyagokat többségükben a felszínhez kapcsolva [189] vagy a mag-héj típusú szerkezetnek megfelelően elosztatva tartalmazzák. A peptidek terápiás funkciója alapján lehetnek szöveti regenerációt serkentő molekulák és antibakteriális

hatású anyagok. Ez utóbbiként a szervezetbe történő bejuttatásához a peptid, mint 'becsomagolt' komponens ismert kinetikájú, szabályozott, sokszor nyújtott leadására van szükség. Kim és munkatársai PLGA-PEG kopolimert primer aminocsoporttal láttak el, amelyhez az Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptidet kovalens kötással kapcsolták hozzá [190]. A peptidek szálból történő szabályozott felszabadulását valósította meg Eriksen és kutatócsoportja is [191]. Lee és munkatársai szöveti regeneráció témájú kísérleteik során ortopédiai és cranioma műtétekhez történő felhasználás céljából állítottak elő olyan oszteoinduktív PLGA szálakat, amelyek polidopamin (PD) rétegéhez kapcsolták hozzá a csontképző peptidet (*bone-forming peptide 1*) (BFP1). A koponyasérülésből a kezelt állatok ~44 %-a (PLGA) és ~58 %-a (PLGA-hoz kötött PD-BFP1) gyógyult meg, míg a kezeletlen csoport egyedeinek ~20 %-ánál volt teljes a gyógyulás [192].

Enzimek esetében sokszor a molekula lokális jelenlétének fenntartása a cél, ami a hordozó felülethez történő rögzítésükkel oldható meg. Az érzékeny makromolekulák védelmét a szálon belüli elosztatás segíti, azonban mindkét megoldás az enzim aktivitásának csökkenését eredményezheti. Wang és munkatársai a kataláz és peroxidáz enzimek aktivitását a szövetekbe beépített szén nanocsövekkel tartották fent, amely biztosította az aktivitáshoz szükséges elektron transzfert [193]. Nemcsak a szálképző mátrix anyaga, hanem ezzel összefüggésben a belőle kialakított struktúra is hatással lehet az enzimaktivitásra. Polisztirol (PS) és poli(sztiroil-maleinsav-anhidrát) (PSMA) kompozit szálak aktivitása szignifikánsan nagyobbak és hosszabban tartónak bizonyult az azonos összetételű filmhez képes [194]. Egyes enzim-tartalmú készítmények pedig segítik a sebek gyógyulását [195].

A szálak szövetek bizonyos esetekben ECM mimetikumként képesek viselkedni. Ez a tulajdonság erősíti a biológiailag aktív fehérjéket tartalmazó szálak formulációk szerepét a szöveti regenerációban. A fehérje lokalizációja a már említett módon lehet a szálképző mátrixon belül, valamint a felülethez kötötten [196, 197], de nem aktív formájuk egy része természetes polimerként önmagában is lehet szálképző anyag, mint például a kollagén vagy az elasztin [198-200]. A fehérjét a szál belsejében hatóanyagként tartalmazó rendszerek döntő többségének előállítására a koaxiális vagy mag-héj típusú szálképzési eljárás a legalkalmasabb, mert az így készült mintákban a fehérje hosszan megőrzi aktivitását [201, 202]. Ezekből a struktúrákból a hatóanyag

felszabadulásának szabályozása a kristályos jellemzők módosításával [203] és a nedvesíthetőséget javító komponensek, például PEG vagy poli(etilénimin) (PEI) hozzáadásával érhető el [204, 205]. Choi és munkatársai PEG tartalmú PCL szálak felszínéhez humán epidermális növekedési faktort kapcsoltak és diabetikus sebek gyógyulását modellezve vizsgálták a rendszer aktivitását egereken létrehozott dorzális sérüléseken. A szálas struktúrával végzett kezelés szignifikánsan jobb eredményt mutatott a csupán növekedési faktort tartalmazó oldattal történt kezeléssel összehasonlítva [196].

A nano- és mikroszálas formulálási technológiák új távlatokat nyithatnak a génterápiák területén is RNS és DNS [206] molekulák célzott bejuttatásával [207, 208], ahol az elsődleges cél a DNS/RNS transzfekció, illetve transzdukció hatékonyságának növelése a legkisebb immunreakció mellett. A kialakított speciális génhordozó struktúrák lehetséges antitumor [209] és csontszövet-regenerációs terápiák [210, 211] részét képezhetik a jövőben.

A szálas rendszerekkel szövetek, sejtek funkcionális regenerációja terén végzett kutatások az alábbi területekre koncentrálnak: bőr-, csont-, izomszöveti, idegsejt és érrendszeri regeneráció. A bőrszövet regenerálódása érdekében az alkalmazott készítményeknek ideális esetben kedvező hatást kell gyakorolniuk a gyógyulás homeosztázisos, gyulladással, migrációs, proliferációs és újraképződési fázisaira [212], valamint segíteniük kell a fibroblaszt sejtek megtapadását [213]. Az irodalomban már található olyan szabadalom is, amely a sebek nanoszálas lapkával történő *in situ* kezelésére alkalmas eszközt részletez [214].

Előállíthatók az emberi érrendszer kezelését érintő implantátumok, sztentek, szintetikus graftok is, amelyeknél a 3D-s tubuláris szerkezetnek [215, 216] és az antitrombotikus hatásnak [217] kiemelt jelentősége van. Liu és munkatársai elektrosztatikus szálképzéssel olyan kétrétegű, heparin tartalmú érrendszeri graftot állítottak elő, amelynél a heparin a belső rétegből szabadul fel [218]. A graft segít a varrat megtartásában, csökkenti a trombózis kialakulásának kockázatát és csökkenti a hiperpláziát. Bizonyított, hogy a beültetésre szánt szálas készítmények jobb hatást mutatnak akkor, ha előállításukhoz részben vagy teljes egészében természetes polimert használnak [219]. Az elmúlt években közzétett szabadalmak között nanoszálas réteggel bevont kardiovaszkuláris sztentekről [220] és szkleroterápiás ballonról szóló leírás is található [221].

Az emberi csontszövet traumás sérülésének vagy genetikai háttérű elváltozásának kezelésére, a csontszövet újraképződésére és funkcionális helyreállítására Ko és munkatársai nanoszálal alapú kezelési stratégiát dolgoztak ki [222]. A gyakorlatba átültetett humán alkalmazás azonban még nem létezik. A többnyire 3D struktúrájú anyagok bomlási sebességének szabályozhatónak kell lennie az új csontszövet megfelelő minőségű regenerációja, szerkezeti integritása [223] és az oszteoblasztok eredményes megtapadása érdekében [224].

A szálak terápiás alkalmazhatóságának másik ígéretes területe a szenzoros és motoros funkciók helyreállítását célzó neurodegeneratív medicina, ahol a funkcionális regenerálódás feltétele az axonok újránövekedése a Schwann sejtek által. Ilyen jellegű kutatásokhoz jó vezetőképességű szálképző polimerekre van szükség, mint például a polipirrol és a polianilin [225]. Poli(tejsav- ϵ -kaprolakton) (PLCL) alapú, mag-héj típusú nanoszálakkal 7 nap alatt a Schwann sejtek 78 %-os növekedését érték el [226]. A szálak hatékonysága szempontjából a szálorientációnak fontos szerepe van, ami azonban vegyes képet mutat. Gupta és munkatársai azt találták, hogy a hosszú idegsejtek áthidalására a véletlenszerűen orientált PCL/zselatin nanoszálak alkalmasabbak [227]. Ezzel ellentétben a rendezett orientációjú PLLA szálak a neuronális őssejtek növekedését jobban serkentették [228]. Kador és munkatársai olyan PLA nanoszálal szöveteket készítettek, amelyek segítik a neurális ganglion sejtekből (RGC) felépülő axonok sugárirányú képződését. A makula degeneráció kezelésében a jövőben ez lehet a ganglion sejttes réteget érintő sejtranszplantációs beavatkozások egyik alapja [229].

1.2.3.2. A szálal struktúra topikális alkalmazásának jelentősége

Az előzőekben külön kerültek tárgyalásra mindazok a szálal rendszerek, amelyek valamely hatóanyag szabályozott leadására képes hordozóként vagy a struktúrából eredő szöveti regenerációt segítő anyagként használhatók. Ez utóbbi esetben a szöveti regenerációban, mint tágan megfogalmazható terápiás indikációban, a jellemzően makromolekulal hatóanyagok szabályozott leadására való képesség szintén fontos tulajdonság. A dolgozatom témája szempontjából azonban szeretném kiemelni a nanoszálal rendszerből származó tulajdonságok szimultán felhasználásának előnyeit. Lehetséges olyan készítmény előállítás, amely a bőrszövet regenerációjával

párhuzamosan a szövetet érintő traumás, krónikus vagy posztoperatív sérülésekkel gyakran szükségszerűen együtt járó komplex kórkép topikális kezelését célozza. A sérülések gyakori és egyre nagyobb mortalitású következménye a bakteriális fertőzés. Ezt tovább súlyosbítja az a tény, hogy a környezetünkben, kiemelten a kórházi környezetben megtalálható baktériumok antibiotikumokkal szemben folyamatosan megjelenő rezisztenciája egyre nehezebben kezelhető probléma [230-232]. A multirezisztens baktériumok kiszelektálódva elszaporodnak és a kialakuló nozokomiális infekció leküzdéséhez mostanra már egyre kevesebb számban állnak rendelkezésre hatékony antibiotikumok. Az új antibiotikumok fejlesztése jelentősen visszaszorult, ezért a klinikai gyakorlatban egyre inkább rákényszerülnek a régi, szűk terápiás ablakkal rendelkező és igen toxikus vegyületek, mint például a kolisztin használatára. A problémára alternatív megoldások lehetnek más peptid alapú antibiotikumos kezelések, amelyeknél a vizsgálatok alapján ritkán tapasztalható rezisztencia-indukció [233]. Hátrányuk, hogy szisztémás alkalmazhatóságukat korlátozzák farmakokinetikai sajátosságai, így lokális felhasználásuk előnyösebb lehet [234]. A bőr sérülésekor (pl.: fekély, égés) sérül a terület vérellátása, ezért a szisztémásan bejuttatott antibiotikum lokálisan megjelenő hatása jelentősen csökken. Fontos tehát a szövet integritásának, funkciójának mielőbbi visszaállítása. A közvetlen lokális kezelés révén egy rossz vérellátású sebben is elérhető a megfelelő terápiás hatás [235, 236]. Ismert, hogy a seb gyógyulásához nedves környezetre van szükség, azonban a pangó váladék jó táptalaj a kórokozók számára [237]. A szálak szerkezetű topikális készítmények segíthetik az angiogenezis (erek újraképződése) folyamatát, miközben helyileg biztosítják az antibiotikum hosszabb tartózkodását. Mindemellett a szisztémás terhelés és az alkalmazandó dózis is minimalizálható.

1.3. Nano-és mikroszálak műszeres vizsgálatai

A szálak gyógyszerhordozó rendszerek, orvosi alkalmazású készítmények kutatásához és fejlesztéséhez szükséges az anyagszerkezeti jellemzők feltérképezése, mérése. Az előállított készítmény *in vitro* és *in vivo* körülmények között tapasztalt viselkedésére a mikro- és makroszerkezeti szinten kinyert információk segítségével találhatunk magyarázatot, legyen szó akár a hatóanyag kioldódásáról,

a készítmény stabilitásáról, mechanikai tűrőképességéről vagy éppen farmakokinetikai tulajdonságairól. A nevezett két kategóriában használatos műszeres vizsgálatok teszik lehetővé azon bonyolultabb összefüggések feltárását, amelyek ismeretében elvégezhetjük a kívánt hatás eléréséhez szükséges módosításokat anyagi rendszerünkön.

1.3.1. Mikroszerkezeti vizsgálatok

A szálalás forma esetében a mikroszerkezeti sajátságok alatt jellemzően a szálon belüli rendezettséget és kémiai állapotot, a szabad térfogatot, a szálképző mátrix által körülhatárolt, vele kölcsönhatásban lévő hatóanyag fizikai és fizikai-kémiai (amorf vagy kristályos) állapotát, valamint a hatóanyag mátrixon belüli eloszlását (homogén, inhomogén, fázisszeparált) értjük. A felsorolt jellemzők mérésére többségében olyan műszeres módszerek alkalmasak, amelyek az anyag atomi, molekuláris szintű kölcsönhatásaiból származó jelek detektálásán alapulnak, ezért a mikroszerkezeti jellemzők fogalma tágabban is értelmezhető. A röntgenkristallográfiában (*X-Ray Diffraction*) (XRD) használatos röntgen diffraktométerek potenciálisan alkalmasak arra, hogy a készítményekben lévő hatóanyag kristályszerkezetét feltérképezzük, illetve vizsgáljuk az esetleges amorf-szilárd átalakulás folyamatát, amely egyben megmutatja a készítmény stabilitását is [238]. A mérés elvi alapja a röntgensugárzás, annak hullámhosszával összemérhető méretű atomokon és atomi síkokon történő szóródása. A Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR) már a nagyobb hullámhosszú és a molekulák kötéseire jellemző nyújtási, rezgési (transzlációs, rotációs, vibrációs) frekvenciájával összemérhető elektromágneses sugárzás (frekvencia: $3 \cdot 10^{12}$ - $3 \cdot 10^{14}$ Hz, hullámszám: 10^2 - 10^4 cm^{-1}) sugár-anyag kölcsönhatásán és a sugárzás elnyelésén alapul. E módszer szintén alkalmas a polimorfia vizsgálatára [239]. A karakterisztikus jelek segítségével kötés-típusok és funkciós csoportok azonosíthatók. Az infravörös spektroszkópia alternatív változatai a közeli infravörös (NIR-*near infrared*), a közép-infravörös (MIR-*middle infrared*) és a távoli infravörös spektroszkópia (FIR-*far infrared*). Amennyiben a hatóanyag mátrixon belüli eloszlásáról, esetleges fázisszeparációjáról szeretnénk információt kinyerni, akkor erre az egyik legalkalmasabb technika a Raman spektroszkópia [240]. Segítségével az anyag egy kiválasztott területéről vehetünk fel felszíni és mélységi profilt. Az FTIR és a Raman spektroszkópia közötti alapvető különbség az, hogy ez utóbbi

esetében nem a fény abszorpciója révén keletkezik a detektálandó jel, hanem az anyagra sugárzott monokromatikus fény szóródása által. Az úgynevezett dinamikus kaloriméter szintén fontos műszeres technika, amely a röntgen diffraktométerhez hasonlóan képes a fázisátalakulások vizsgálatára. A mikroszerkezeti és makroszerkezeti módszerek csoportjába egyaránt sorolható műszeres mérés leggyakrabban használt típusa a DSC (*Differential Scanning Calorimeter*). A DSC az anyag hőelnyelése során közölt hő előállításához szükséges teljesítmények különbségével arányos jelet szolgáltat. A termodinamikai jellegű információ alapján azonosítható az anyag kristályos vagy amorf formája [241]. A mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR-*Nuclear Magnetic Resonance*) egy speciális változata, az NMR kiroporometria használatával egyes esetekben feltérképezhető az anyagon belüli üreges szerkezet [242], amely több más tulajdonság mellett a rendszer hatóanyag tároló kapacitásáról adhat hasznos információt. Az NMR alapjaiban egy olyan nem destruktív szerkezetvizsgálati módszer, amely molekuláris szintű információt ad szilárd- és oldatfázisú mintákról. Működése kvantummechanikai alapokon nyugszik. Amennyiben a részecskét erős mágneses térbe tesszük, akkor a létrejövő mágneses momentum képes a külső mágneses térrel kölcsönhatásba lépni, így különböző energiájú spin állapotok jöhetnek létre. Az állapotok közötti energiakülönbség karakterisztikus, ezért megfelelő elektromágneses impulzus hatására az állapotok közötti, atommag specifikus átmenet idézhető elő (Zeeman-effektus).

Pozitronannihilációs élettartam spektroszkópia (PALS – Positronannihilation Lifetime Spectroscopy)

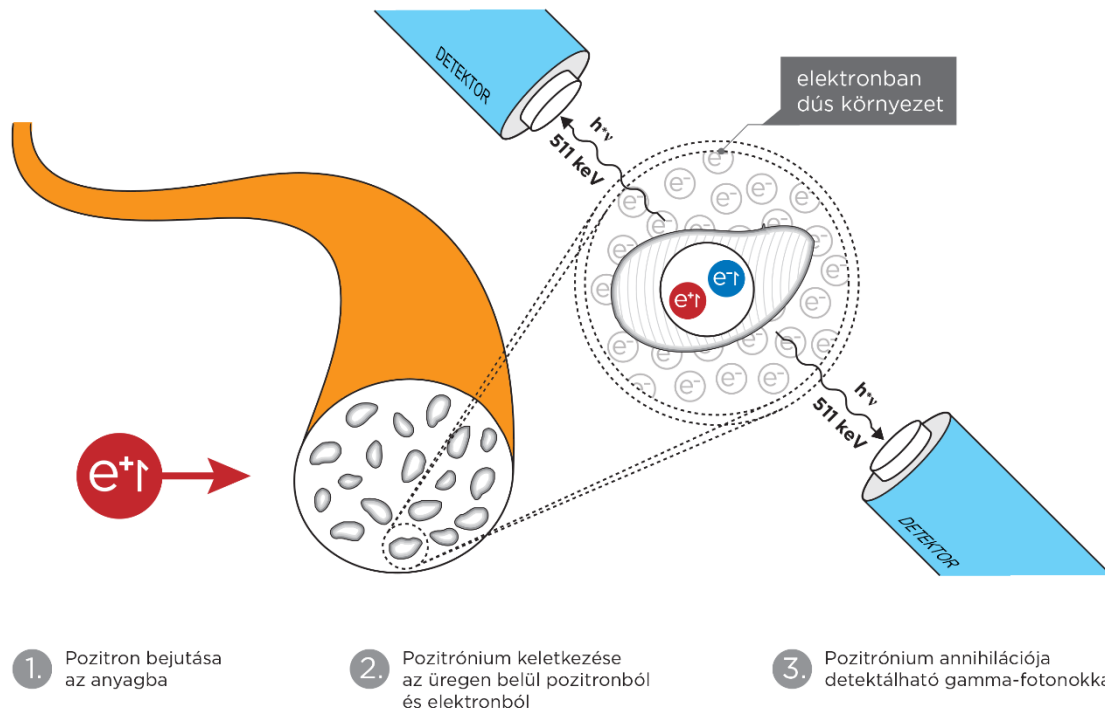
A mikroszerkezeti vizsgálati módszerek egy speciális típusa az úgynevezett pozitronannihilációs élettartam spektroszkópia (PALS). Az értekezésben bemutatandó kutatási eredményeim szempontjából is kiemelt eljárás az anyag szabad térfogatainak mérésén keresztül a gyógyszerhordozó rendszereket érintő több jelentős tulajdonságot és hatás vizsgálatát teszi lehetővé. A következőkben e módszert szeretném részletesebben ismertetni.

A nukleáris vagy izotópos szerkezetvizsgálatok csoportjába tartozó PALS története 1942-ben kezdődött. Működésének tudományos alapja az, hogy a Világegyetem szimmetria-sértő keletkezésekor az anyag került túlsúlyba az 'antianyaggal' szemben,

ami annyit jelent, hogy 1 milliárd db 'antianyag' részecskére eggyel több anyagi részecske jut. Carl David Anderson 1932-ben kísérleteivel bizonyította az elektronnal (e^-) azonos tömegű, de ellenkező töltésű antirészecske, a pozitron (e^+) létezését [243]. Az anyagi világ szükségszerű következményeként a pozitron sorsa a megsemmisülés. E folyamatban az anyag-antianyag teljes tömege az ismert $E=mc^2$ (m a részecske tömege, c a fénysebesség, E a felszabaduló energia) szerinti összefüggésnek megfelelően energiává, pontosabban tömeggel nem rendelkező fotonokká alakul, annihilálódik. Az e^-e^+ annihiláció jelenségén alapul az ismert orvos-diagnosztikai képalkotó eljárás is, a PET (*positron emission tomography*) [244]. Az annihilációs eseményt megelőző közbülső lépések egyike az, amikor a pozitron a Coulomb erők hatására egy másik elektronnal találkozáva kvázi hidrogén atomot, pozitroniumot (Ps) hoz létre. A 0,116 nm átmérőjű pozitronium [245] az elektron spinállapotától függően két különböző ideig létező (életidő) formában lehet jelen. Ellentétes spinű részecskék esetén para-pozitroniumról (p-Ps) beszélünk, amelynek életideje vákuumban 125 ps, míg az azonos spinű részecskék által alkotott orto-pozitronium (o-Ps) vákuumbeli életideje a tiltási szabály miatt 142 ns. A mérés szempontjából a hosszabb életidejű o-Ps-nak van jelentősége. Valamekkora elektronsűrűséggel jellemezhető anyagokban (például polimerek, hatóanyagok) keletkező o-Ps a minta üregiben úgynevezett *pick-off* annihilációt szenved [246] a környezetből felvett újabb elektron révén. Az o-Ps polimer szálon belül kialakuló állapotát és annihilációját a **18. ábra** szemlélteti, míg az egy mérési ciklus alatt lezajló folyamatot a **19. ábra** mutatja részletesen. A méréshez leggyakrabban használt pozitronforrás a 22-es tömegszámú nátrium [247, 248], amelyet $^{22}\text{NaCl}$ formájában (alkalmazott aktivitás: $\sim 10^5$ Bq) tartalmaz egy izoláltan kezelhető, 7 μm vastagságú Kapton fólia [249, 250]. A vékony fólia megakadályozza a pozitron mintán kívüli elnyelődését és biztosítja a pozitronium mintán belüli keletkezését. Méréskor a sugárforrást két oldalról körülölelő mintában a pozitron szabad pozitronként, o-Ps-ként és p-Ps-ként van jelen, de csak az o-Ps életideje igazán reprezentatív a mátrixon belüli szabad térfogatok méretére nézve. Az élettartam és a szabad térfogat közötti összefüggést az alábbi egyenlet írja le (**E4**):

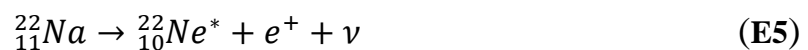
$$\tau_3^{-1} = \lambda \cdot \left[1 - \frac{R}{R+R_0} + \frac{1}{2\pi} \cdot \sin \left(\frac{2\pi R}{R+R_0} \right) \right] \quad (\text{E4})$$

[251], ahol τ_3 az o-Ps élettartama, $\lambda=2 \text{ ns}^{-1}$ a Ps átlagos annihilációs sebessége az elektronok alkotta rétegben, R az üregek átlagos sugara, R_0 az anyagcsoportra jellemző látszólagos falvastagság (porózus anyagok esetében $1,66 \text{ \AA}$, $0,166 \text{ nm}$).



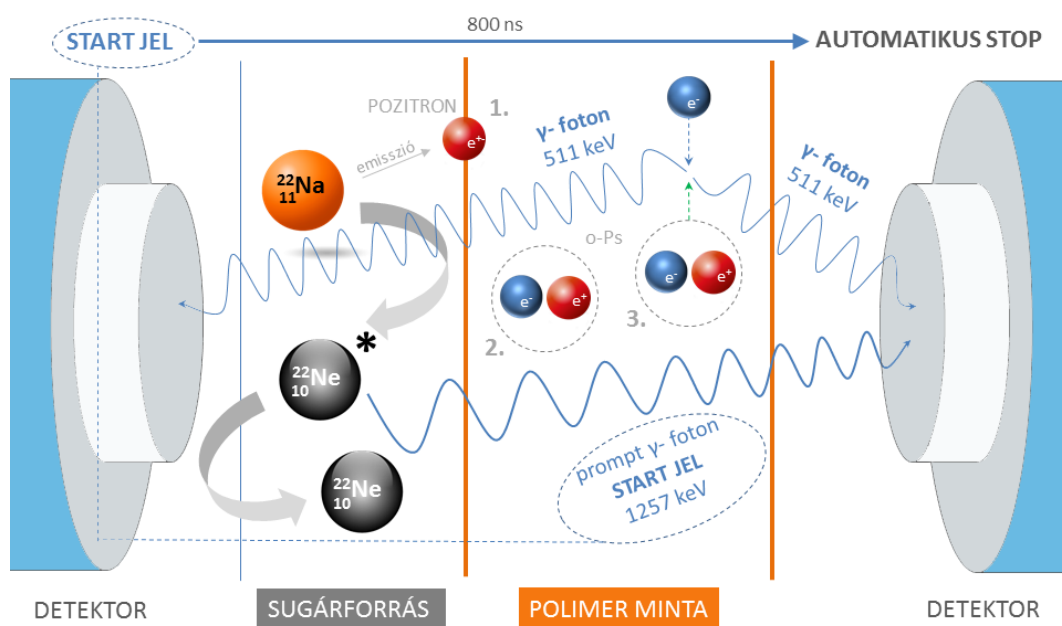
18. ábra Az orto-pozitronium (o-Ps) jelenlétének és a mátrixon belül bekövetkező annihilációjának szemléletes ábrázolása

Egy mérési ciklus időtartama általában 800 ns , ami megfelelő időkeretet ad az egy bomlási eseményből (E5) származó o-Ps *pick-off* annihilációjakor keletkező 511 keV -os fotonok detektálásához. Az annihiláció annál előbb következik be, minél kisebb a részecskét körülvevő szabad térfogat, azaz az o-Ps minél előbb ütközik az elektronban gazdagabb környezetbe.



A mérési ciklust a pozitron ${}^{22}\text{Na}$ -ból történő emittálódása indítja el azáltal, hogy az eseménykor keletkező gerjesztett állapotú neon legerjesztődése során startjelként

szolgáló, 1274 keV energiájú prompt gamma-fotont bocsát ki. A szcintillációs detektor kezdetben csak az ennek megfelelő energiára van érzékenyítve (kapuzva). Az elindított ciklus alatt a detektálás az 511 keV-os energiaszinten folytatódik tovább. A detektálási periódus 800 ns után zárul. A kirajzolódó spektrum a bomlási folyamat releváns időskálájának egyes időpontjaiban bekövetkező annihilációs események intenzitásaiból épül fel. Az intenzitás nagysága adott időpontban tehát arányos az esemény gyakoriságával, valószínűségével. A kiértékelt spektrum adatai a vizsgált anyag szupramolekuláris szerkezetéről adnak információt, amellyel lehetővé válik a különböző gyógyszerhordozókban, gyógyszerformákban bekövetkező változások nagy felbontású követése. Ezek alapján a PALS segítségével vizsgálható a készítmény tárolása során bekövetkező esetleges destabilizáció [252, 253], a hatóanyagot tartalmazó hordozórendszerek diffúzióra visszavezethető folyamatai (oldódás, duzzadás, nedvesedés, kristályosodás) [254, 255], valamint kiszűrhetők a formuláláshoz nem megfelelő segédanyagok is.



19. ábra A minta vizsgálatának egy mérési ciklus alatt bekövetkező bomlási és annihilációs lépései

1.3.2. Makroszerkezeti vizsgálatok

Egy anyag makroszerkezeti tulajdonságait döntően a mikroszerkezeti tulajdonságok determinálják és csak az anyag egészére vonatkoztatva értelmezhetők. Ezek alapján a mikroszerkezeti tulajdonságok ismeretében lehetséges a makroszerkezeti jellemzőket értelmezni és befolyásolni. A szálaló gyógyszerhordozó rendszerek legkisebb makroszerkezeti egysége a szövetékeket alkotó individuális szál, ahol annak vastagsága, színe, geometriája és felületi topográfiája, összefoglalóan morfológiai tulajdonságai [111] a legfőbb vizsgált paraméterek, de olykor a szilárdság és az olvadási tartomány ismerete is fontos. A tárgyalt struktúrák makroszerkezeti vizsgálata szempontjából kiemelt jelentőségű módszerek közé tartoznak a hagyományos optikai, a pásztázó elektronmikroszkópos (*Scanning Electron Microscope, SEM*) [256] és az atomi erő mikroszkópos (*Atomic Force Microscope, AFM*) műszeres technikák [257].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

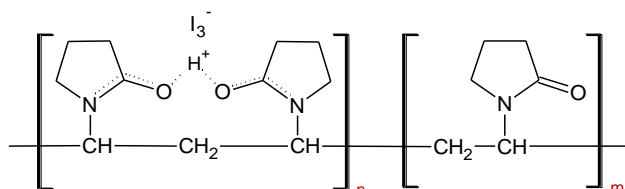
- gyógyszerkönyvi polimerek felhasználásával a laboratóriumi rotációs szálképzési technika műszaki optimalizálását morfológiailag egységes szerkezetű minták előállításához,
- a polimer gélek rotációs szálképző képességének, alapvető fizikai-kémiai feltételeinek megismerésén és műszeres monitorozásán keresztül, az előállított szálak struktúra mikro-és makroszerkezeti jellemzését,
- antibakteriális hatóanyag mikroszálba történő beépítését és *in vitro* vizsgálatát,
- a mikroszálak polimer struktúra-előállítás újszerű metodikájának (kontakt szálhúzás) és technikai feltételeinek kidolgozását,
- hatóanyag tartalmú polimer mikroszálak tablettává formulálását és kioldódásának vizsgálatát,
- elektrosztatikus úton előállított, APO (*All Peptide Optimized*) polipeptidet, mint új kémiai entitást tartalmazó nanoszálak, sebfedő készítmény antibakteriális és szöveti regenerációra gyakorolt hatásának *in vitro* és *in vivo* vizsgálatát,
- többrétegű, kolisztin-szulfát antibiotikum tartalmú nanoszálak sebfedő rendszer kialakítását,
- az előállított többrétegű topikális készítmény szabályozott és nyújtott hatóanyag-felszabadulásának vizsgálatát egyedi kialakítású kioldó cella segítségével,
- a többrétegű topikális készítmény antibakteriális és sebgyógyulásra gyakorolt hatásának vizsgálatát, terápiás alkalmazhatóságát,
- a többrétegű topikális készítmény hatóanyag-felszabadulásának matematikai modellezését.

3. MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált hatóanyagok, új kémiai entitások

1. Povidon-jód komplex (Braunol[®])

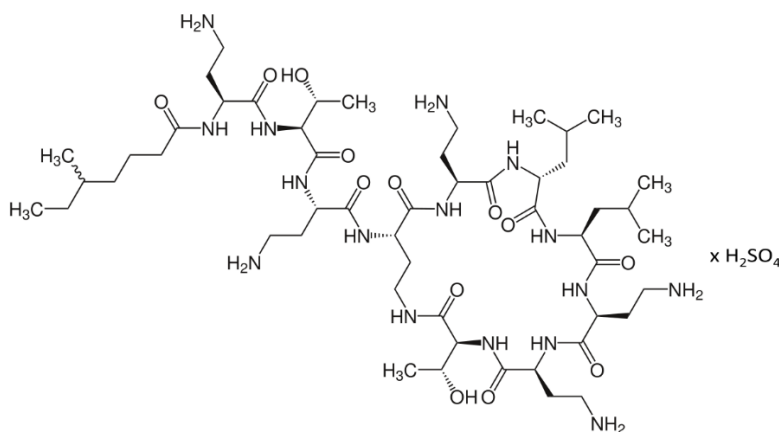
Enyhén jódszagú, sötét-barna folyadék, amely a közforgalomban Braunol[®] néven kapható, bőr és nyálkahártya fertőtlenítésére alkalmas készítmény. 100 g oldat 7,5 g povidon-jód komplexet és 6,8 g felületaktív anyagot, valamint nátrium-dihidrogén-foszfátot (NaH₂PO₄), nátrium-jodátot (NaIO₃) és nátrium-hidroxidot (NaOH) tartalmaz (B. Braun Medical AG, Svájc).



20. ábra Povidon-jód komplex szerkezeti képlete

2. Kolisztin-szulfát (Polymyxin E)

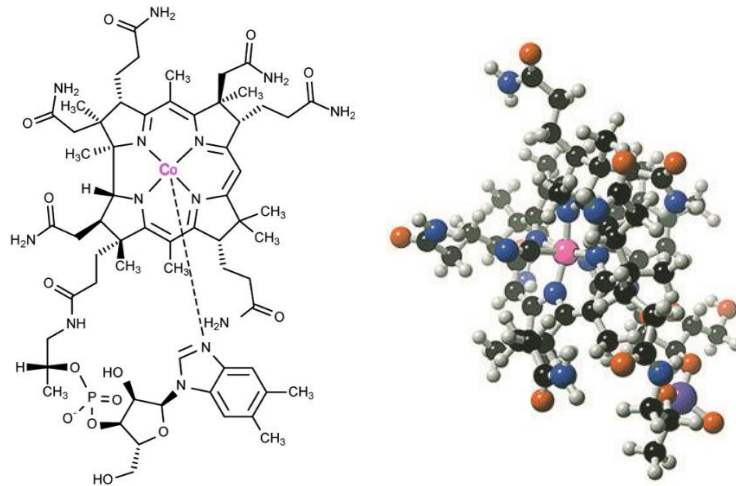
A fehér színű, vízben jól oldódó antibiotikum a *Bacillus polymyxa* nevű baktériumtörzs által termelt vagy más módon nyert ciklusos polipeptid szulfátjainak elegye. Jellemzően a Gram-negatív, kiemelten a multirezisztens baktériumok ellen hatásos vegyület, (CAS: 1264-72-8, Sigma-Aldrich Chemie, USA / Sigma-Aldrich Kft, Magyarország).



21. ábra Kolisztin-szulfát (Polymyxin E) szerkezeti képlete

3. B₁₂-vitamin (ciano-kobalamin)

A központi idegrendszer működésében, a vérképzésben és a sejtek anyagcseréjében szerepet játszó porfirinvázis vegyület, amelynek központi atomja a kobalt. A sötét-lila színű vegyület átlagos molekulatömege 1355,37 g/mol, (CAS: 68-19-9, Richter Gedeon Nyrt).



22. ábra A B₁₂-vitamin (ciano-kobalamin) szerkezeti képlete és 3D szerkezeti modellezése

4. A3-APO polipeptid

Prolinban gazdag, antibakteriális hatású, tervezett és szintetikus polipeptid [258-260]. A dimer molekula monomer egysége 20 aminosavból áll, amely 1,4-diamino-vajsav vázra épül fel. Az APO rövidítés (*All Peptides Optimized*) a prolingazdag antibakteriális peptidek összes előnyös tulajdonságára utal, míg az A3 jelölés az eluáló oszlop sorszáma. A szabadalommal védett új kémiai entitás klinikai vizsgálatok előtt áll. A vegyületet ifj. Ötvös László és munkatársai fejlesztették és bocsátották rendelkezésünkre kísérleteinkhez.

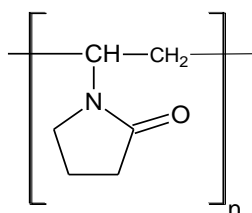
[(Chex-Arg-Pro-Asp-Lys-Pro-Arg-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Val-Arg)₂-Dab]

23. ábra A3-APO polipeptid aminosav szekvenciája

3.2. Felhasznált szálképző polimerek

1. Kollidon[®] 25 (PVP25) és Kollidon[®] 30 (PVP30)

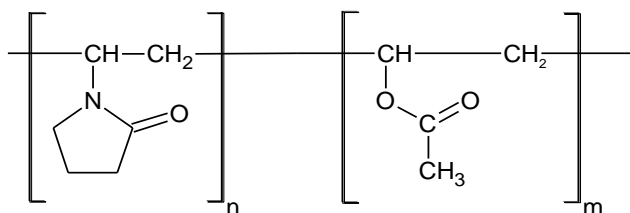
Vinilpirrolidon polimerizációjával előállított homopolimer (polivinilpirrolidon), ahol a PVP25 átlagos molekulatömege 30000 g/mol, míg a PVP30 esetében 50000 g/mol (BASF, Ludwigshafen, Németország).



24. ábra Kollidon[®] 25 (PVP25) szerkezeti képlete

2. Kollidon[®] VA 64 (PVPVA64)

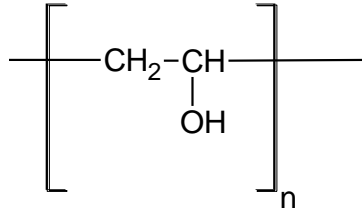
N-vinilpirrolidon és vinilacetát 6:4 tömegarányú polimerizációjával előállított vízoldható kopolimer, gyógyszerkönyvi segédanyag. Átlagos molekulatömege 45000-70000 g/mol, (BASF, Ludwigshafen, Németország).



25. ábra Kollidon[®] VA 64 (PVPVA64) szerkezeti képlete

3. Mowiol[®] 18-88 (PVA)

Poli-vinilacetát alkoholízisével előállított, vízben oldódó homopolimer, amelynek átlagos molekulatömege 130000 g/mol, (CAS: 9002-89-5, Sigma-Aldrich Chemie, USA / Sigma-Aldrich Kft, Magyarország).



26. ábra Mowiol® 18-88 (PVA) szerkezeti képlete

3.3. Felhasznált segédanyagok

A tablettázási és egyéb szájképzésen kívül végzett formulációs kísérleteinkhez az alábbiakban felsorolt segédanyagok kerültek felhasználásra.

1. Kollidon® CL-SF

Keresztkötéseket tartalmazó, vízben oldhatatlan polivinilpirrolidon homopolimer, amelyet a gyógyszertechnológiában jellemzően szétesést elősegítő (dezintegráns) anyagként használnak. Szemcsemérete 10-30 µm közötti, míg átlagos fajlagos felülete 3 m²/g (BASF, Ludwigshafen, Németország).

2. AEROSIL® 200 (szilícium-dioxid, SiO₂)

Nagy fajlagos felületű (175-225 m²/g), hidrofil SiO₂ (Novochem Kft., Magyarország).

3. VIVAPUR® 102 (mikrokristályos cellulóz)

Gyógyszerkönyvi segédanyag, 90 µm átlagos szemcseméretű poliszacharid (JRS Pharma, USA).

4. Magnézium-sztearát

Gyógyszertechnológiában használatos hidrofób lubrikáns, amelynek molekulatömege 591,27 g/mol (Molar Chemicals Kft., Magyarország).

3.4. Felhasznált baktériumtörzsek

Az *in vitro* antibakteriális hatás vizsgálatához öt különböző baktériumtörzset használtunk: *Bacillus subtilis* ATCC (*American Type Culture Collection*, amerikai tipizált törzsgyűjtemény) 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 30013, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Az *in vivo* szöveti regeneráció és sebfertőzéses modell tanulmányozására az MDR (*Multidrug-resistant*) *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-1805 és 1605, az ESBL (*Extended Spectrum Beta Lactamase*, kiterjedt spektrumú β -laktamáz) *Escherichia coli* ATCC 25922 és az MBL (*Metallo Beta-Laktamase*) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 törzsekből származó baktériumokat választottuk.

3.5. Felhasznált állatok

Az *in vivo* állatkísérleteket CD1 és C57/BL/6 típusú egereken végeztük. A 17-20 g súlyú állatok anesztéziája Na-barbiturát, dietil-éter és ketamin (Calipsol®), míg eutanáziája CO₂ gáz segítségével történt. Az altatáshoz használt anyagokat a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetének állatháza biztosította számunkra.

3.6. Mintakészítés

3.6.1. Hidrogélek előállítása

A centrifugális szálképzés optimalizációját célzó kísérleteim során a szálképző PVP polimer alapú géleket a **8. táblázatban** összefoglalt, víz-alkohol különböző arányú elegyének (98 %-os etanol és desztillált víz) felhasználásával készítettem.

8. táblázat A PVP30 alapú mikroszálak formulálásához készített gélek összetétele

Minta azonosítója	Alkohol-víz arány	PVP30 koncentráció (m/m %)
1.	1:0	55
2.	3:1	49
3.	1:1	45
4.	1:3	45
5.	0:1	43

A mikroszálás sebfedő lapkák struktúrával összefüggésben mutatott antibakteriális hatásának és kapacitásának vizsgálatához a **9. táblázatban** felsorolt PVP25 és PVPVA64 összetételű hidrogéleket állítottam elő. Antibakteriális hatóanyagként povidon-jód komplexet használtam, amelyet az oldószerként is szolgáló Braunol (7,5 m/m % povidon-jód komplex) hozzáadásával juttattam a rendszerbe.

9. táblázat A povidon-jód komplex tartalmú, PVP25 és PVPVA64 alapú mikroszálak formulálásához készített gélek összetétele

Minta azonosítója	Polimer koncentrációja (m/m %)		PVP25 - PVPVA64 arány	Povidon-jód komplex elméleti koncentrációja (m/m %)
	PVP25	PVPVA64		
6.	0	57	0:1	2,9
7.	18	36	1:2	3,1
8.	28	28	1:1	2,9
9.	38	19	2:1	2,9
10.	60	0	1:0	2,7

A mikroszálás szövetdek tablettázása az azonos összetételű (**10. táblázat**) szabadfilmek közül kiválasztott 12. mintával összehasonlításban történt. A B₁₂-vitamin modell hatóanyag 5 mg/ml koncentrációjú törzsoldata egyúttal a polimerek oldószerként is szolgált.

10. táblázat B₁₂-vitamin tartalmú, PVP alapú szabadfilmek öntéséhez készített gélek összetétele

Minta azonosítója	Felhasznált polimer	Polimer koncentráció (m/m %)
11.	PVP25	59
12.	PVP30	55
13.	PVPVA64	55

A **8-10. táblázatokban** jelölt számképző gélek készítésekor a polimereket szobahőmérsékleten, 15 percig tartó állandó keverés mellett oldottam fel. Az oldatok homogén állapotukban, a levegőzárványok megszűnése után kerültek felhasználásra. A szabadfilmek öntése 5 cm átmérőjű Petri csészékben történt, amelyeket előzőleg az alapterülettel megegyező méretű szilikon lapkával béleltem ki.

A filmrétegek az átlagosan 1,5 g tömegű gél oldószertartalmának, szobahőmérsékleten 48 óra alatt bekövetkező elpárolgása során keletkeztek (*solvent cast method*).

További kísérleteimhez 15 m/m % PVA (Mowiol® 18-88) tartalmú gélekből állítottam elő nanoszálás mintákat. A géleket kondenzációs hűtővel ellátott üvegedényben, 80°C-on kevertetem 4 órán át, majd ezután az alap gél egyik részletében kolisztin-szulfátot, míg a másik részében A3-APO polipetidet oldottam fel az összes oldott anyagra nézve 2 m/m %-nak megfelelő mennyiségben. Ezt követően a szobahőmérsékletű oldatokat 3 órán át kevertetem. A levegőzárványok megszűnését ultrahangos kezeléssel segítetttem. Egyes esetekben az aszeptikus környezet biztosítására FASTER Laminar BH-EN 2004 típusú lamináris fülkét, valamint az elvárt minőségnek megfelelő segédanyagokat, steril eszközöket használtam.

3.6.2. Mikroszálás szövedék előállítása egyedi tervezésű rotációs feltétellel

A mikroszálakat egyedi tervezésű rotációs feltétellel állítottam elő. A 80 ml belső térfogatú, poliamidból és rézből készített forgó alkatrész külső palástján két 0,5 mm átmérőjű anyagkivezető furat található. A feltétet egy olyan armatúrájú motor (WSE 602M, AEG, Berlin, Németország) segítségével hoztam forgásba, amelynek fordulatszáma a rákapcsolt váltóáramú feszültséggel arányban változik. A feszültséget egy 0,5 kVA teljesítményű, TRAKIS gyártmányú toroid transzformátorral szabályoztam és a **9. táblázatban** összefoglalt minták előállításakor 3500 RPM fordulatszámnak megfelelő értékre állítottam. A fordulatszámot lézeres számláló műszerrel (DT-10L, Voltcraft, Hirschau, Németország) kalibráltam és monitoroztam.

Későbbi kísérleteimhez saját tervezésű és a korábbi készülékhez képest módosított geometriájú rotációs alkatrészt használtam, amelynek hasznos belső térfogata 30 ml. Az alumíniumból és poliamidból készített forgástest falán 0,3 mm átmérőjű furatok találhatók. A **8. és 10. táblázatokban** mutatott minták előállításakor a fordulatszámot 3500 RPM értékre állítottam, ami ezekben az esetekben 411 relatív centrifugális erőnek felelt meg (RCF, *Relative Centrifugal Force*). A keletkező szálakat 5 cm átmérőjű, 18 cm hosszúságú és 200 RPM fordulatszámú forgó hengeres kollektorral gyűjtöttem.

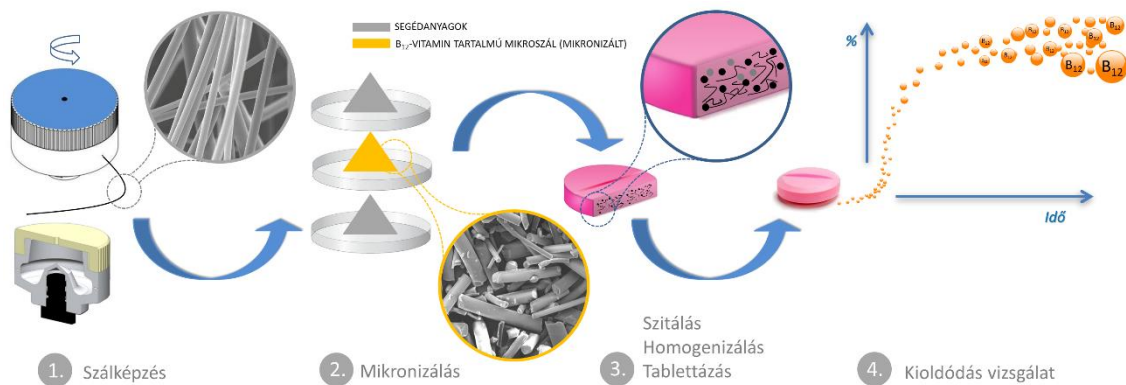
3.6.3. Mikronizálás és tablettázás

A hatóanyag tartalmú szálas rendszerek feldolgozhatóságának, tablettázhatóságának vizsgálatához a mikroszálakat először két lépésben, két különböző berendezés segítségével mikronizáltam. Az öntött filmek mikronizálása szintén két lépésben, de ugyanazon készülékben történt. A művelet előtt a mintákat 1,5 órán át szárítottam Binder ED53UL típusú szárítószekrényben, 50 °C-ra beállított hőmérsékleten a technológiai művelethez szükséges megfelelő nedvességtartalom eléréséhez. A szárított mikroszálakat Stefan UMC5 típusú készülékkel aprítottam kisebb részekre 2000 RPM fordulatszámon és 10 perces üzemidő alkalmazásával. A második mikronizálási lépéshez a mintát vibrációs golyós malomba vittem át (Retsch MM301, alkalmazott golyók száma és átmérője: 6db, 15 mm). A filmek őrlését a fent említett típusú vibrációs malommal hajtottam végre első lépésben 8 db, 10 mm átmérőjű, míg a második lépésben 30 db, 5 mm átmérőjű golyó használatával. A vibrációs mikronizálás egységesen 900 RPM-nek megfelelő frekvencián, 15 percig tartott mindegyik minta esetében. A filmeket előzetesen dörzsmozsárban kisebb lemezekre aprítottam. A tablettázás előtti utolsó műveleti lépésként elkészítettem a **11. táblázatban** mutatott összetételű véghomogenizátumokat úgy, hogy az anyagkeveréket 1 L-es műanyag tartályba öntöttem, majd kétszer 30 percen át, 34 RPM fordulatszámmal forgattam Turbula T2F excenteres homogenizáló készülékkel.

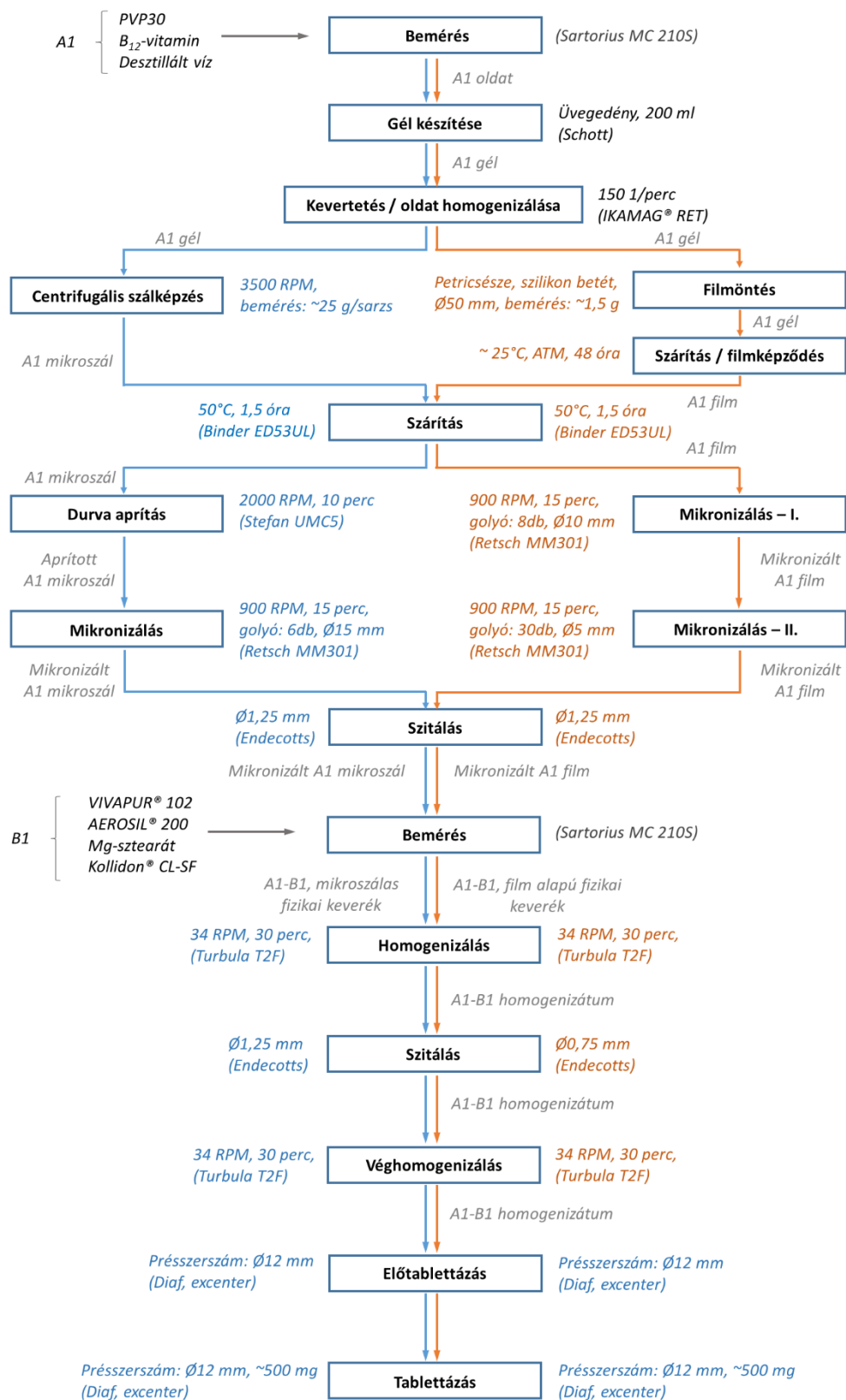
11. táblázat B₁₂-vitamin tartalmú, mikroszál és szabadfilm alapú különböző tablettá homogenizátumok összetételei

Segédanyagok és hatóanyag	Összetétel (m/m %)					
	I	II	III	IV	V	VI
B ₁₂ tartalmú PVP 30 mikronizált film	25,0	25,0	25,0	—	—	—
B ₁₂ tartalmú PVP 30 mikroszál	—	—	—	25,0	25,0	25,0
VIVAPUR® 102	72,8	70,8	68,8	72,8	70,8	68,8
AEROSIL® 200	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Magnézium-sztearát	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kollidon® CL-SF	1,0	3,0	5,0	1,0	3,0	5,0

Az egymástól összetétel arányaiban eltérő tablettákat direkt préssel készítem excenteres tablettázó géppel (Diaf, Slagesle, Dánia), a megfelelő törési szilárdság eléréséhez szükséges préserő és 12 mm átmérőjű présszerszám alkalmazásával. A matricafurat beállítását úgy változtattam, hogy ~500 mg tömegű tablettákat kapjak. A folyamat során két alkalommal végeztem szitálást Endecotts® típusú szitával, először a mikronizálás után közvetlenül (szitarés átmérője: 1,25 mm), majd a fizikai keverék két lépésben történő homogenizálási műveletének egyes szakaszai között (szitarés átmérője: 0,75 mm). A tablettázási kísérletek során alkalmazott technológiai műveleteket a **27. ábra** illusztrálja és **28. ábrán** bemutatott folyamatára foglalja össze.



27. ábra A mikroszálak tablettázásának és kioldódásának illusztrációja



28. ábra Hatóanyag tartalmú mikroszálás tablettá formulálásának folyamatábrája

3.6.4. Multirétegű, nanoszálás sebfedő rendszer előállítás

A hatóanyag tartalmú, többrétegű rendszereket elektrosztatikus eljárással, a **3.6.1. fejezetben** részletezett összetételű PVA gélek felhasználásával állítottam elő. A multirétegű sebfedő készítmény alapjául a szálképzés eredményeként közvetlenül keletkező nanoszálás PVA szálpaplan (CEL: *Colistin sulfate-loaded Electrospun Layer*, AEL: *APO-loaded Electrospun Layer*), valamint hatóanyagmentes változatának utólagos hőkezelésével készített membrán szolgált (MEL: *Membrane Electrospun Layer*). E két réteg a felhasználás szempontjából eltérő tulajdonságokkal és funkcióval rendelkezik. A kísérletek során az egyes rétegek különböző számú és kombinációjú összeállításait vizsgáltam (**12. táblázat**), amelyek egymáshoz rögzítését Specac[®] típusú kézi prés gép és egy 35 mm külső átmérőjű, 2 mm peremvastagságú présgyűrű segítségével hajtottam végre, 1 tonnának megfelelő préserő alkalmazásával.

12. táblázat A multirétegű sebfedő rendszer felépítése az egyes rétegek száma és egymáshoz viszonyított elrendezése szerint

Minta azonosítója	MEL és CEL rétegek elrendezése
A	MEL-CEL
B	MEL-MEL-CEL
C	MEL-MEL-MEL-CEL
D	MEL-CEL-MEL-CEL-MEL-CEL (alternáló elrendezés)

3.6.4.1. Nanostruktúrájú, hatóanyag tartalmú szálpaplan előállítása aszeptikus körülmények között

A PVA alapú nanoszálás rétegeket klasszikus, egytűs elektrosztatikus eljárással készítettem 22°C-on (± 2 °C) úgy, hogy a készülék egyes moduljait az aszeptikus környezetet biztosító FASTER Laminar BH-EN 2004 típusú lamináris fülkébe telepítettem (**29. ábra**). Az anyagok bemérése is ebben a térben történt. A nagyfeszültséget NT-35 típusszámú generátorral és a generátor hálózati betáplálását biztosító egyenáramú tápegységgel (MA2000) állítottam elő. A 20 ml-es fecskendőbe töltött szálképző gél áramlását egy Alaris GH[®] típusú pumpa biztosította 1,4 ml/óra áramlási sebességgel. A fecskendő tűs csatlakozásának meghosszabbításához 20 cm hosszú, hősterilizált szilikon csövet használtam, amely ellenkező oldalú végére

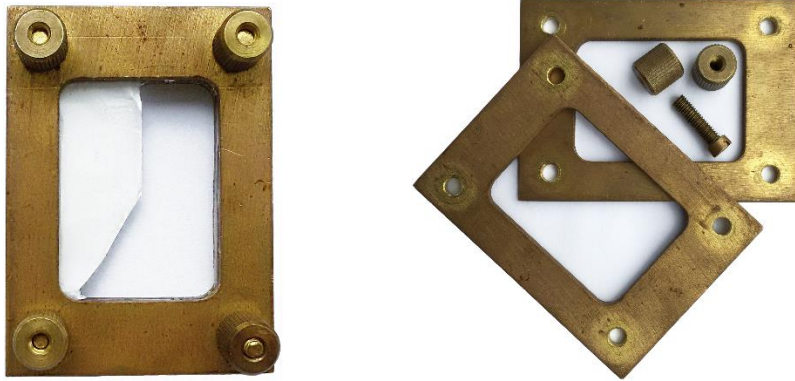
20 G jelű injekciós tűt (Medicor Neomed) illesztettem. A szálképzés egységesen 25,1 kV feszültségen, 1 óra alatt történt, amelynek során a kör alapterületű minta a tű végétől 15 cm távolságban elhelyezett, 25 cm x 25 cm alapterületű sík alumínium kollektoron képződött. A membránkészítés alapjául szolgáló minták esetében a szálképzés időtartama 10 perc volt.



29. ábra Lamináris fülkébe telepített egytűs elektrosztatikus készülék működés közben

3.6.4.2. Nanoszálás membrán előállítása (hőkezelés)

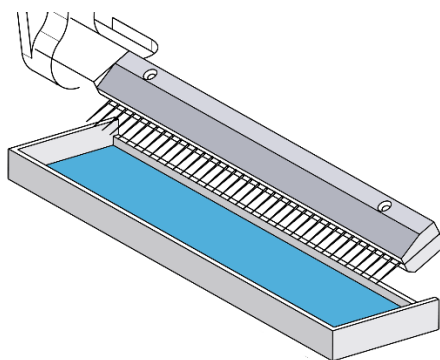
A membrán előállításához a **3.6.4.1. fejezetben** leírt módon készített nanoszálás és hatóanyagmentes szálpaplant használtam fel. A lapkát egyedileg készítettem, 45 mm x 35 mm szabad belső alapterületű réz keretek segítségével feszítettem ki (**30. ábra**). A keretek mintával érintkező oldalai és a minta közé megfelelő profilú szilikon lapkát illesztettem, majd 2 órán át történő hőkezelésnek vettem alá 180 °C-on, Binder ED53UL típusú szárítószekrényben.



30. ábra Nanoszálás membrán előállításához készített tartó keret

3.6.5. Mikroszálás szövedék előállítása saját fejlesztésű kontakt szálhúzó berendezéssel

A polimer alapú mikroszálak előállításának saját kidolgozású, újszerű metodikáját a dolgozat **4.2. fejezete**, valamint a P1400283 ügyiratszámú szabadalmi leírás és a 2015.08.28-án megjelent Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítő 120. évfolyamának 16. száma részletezi. Az eljárás alkalmazhatóságának vizsgálatára a metodikának megfelelően kidolgozott műszaki terv alapján prototípus készült. A szálképzéshez PVP 25 polimer 60 m/m % koncentrációjú vizes, viszkózus oldatát használtam. A polimer oldatba merülő tüskék (**31. ábra**) oszcilláló mozgását a hajtómű excenter tárcsájának forgása biztosította 25 RPM fordulatszámon.



31. ábra A kontakt szálhúzó berendezés műszaki rajzának szálhúzó tüskéit ábrázoló részlete

3.7. Vizsgálati módszerek

3.7.1. *In vitro* fizikai és és fizikai-kémiai vizsgálatok

3.7.1.1. *Optikai, digitális mikroszkópos felvételek készítése*

A szálakról és szálal mintákról készített optikai felvételeket egy 20-200-szoros nagyítási léptékű, digitális mikroszkóppal készítettem (Digimicro 2.0 Scale, DNT[®], Németország). A képeket és videofelvételeket a számítógépre telepített MicroCapture v2.0 szoftver használatával rögzítettem.

3.7.1.2. *Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készítése*

A mintákról készült többes nagyítású felvételeket (1000-10000-szeres) pásztázó elektronmikroszkóppal készítettem (SEM; JEOL 6380LVa, Tokyo, Japán). A képek segítségével meghatároztam az individuális szálak átlagos szálvastagságát és a szálak közötti átlagos távolságot, jellemzően 10 db és 50 db véletlenszerűen kiválasztott egyedi szál vizsgálatával. A minta kiválasztott részletét vezetőképes, szén ragasztószalaggal rögzítettem a mintatartón, majd vékony arany réteggel vontam be. A méréshez 15 kV és 20 kV nagyfeszültséget, valamint 10 mm és 12 mm munkatávolságot állítottam be.

3.7.1.3. *Szálképző hidrogél optimalizálásának reológiai alapú követése*

A centrifugális szálképzéshez készített PVP 30 tartalmú gélek polimer-oldószer arányának optimalizálását dinamikus viszkozitás meghatározásának segítségével követtem. A mérések Kinexus Pro (Malvern Instruments Ltd, Egyesült Királyság) készülékkel történtek, 25 °C-on ($\pm 0,1$ °C). A mérő geometria forgási sebessége 1 s^{-1} , míg a forgófej és a mintatartó réstávolsága 0,15 mm volt. A nyers adatokat az rSpace – Kinexus Pro 1.3 szoftverrel rögzítettem.

3.7.1.4. *Szálal szövetek mechanikai tűrőképességének jellemzése szakítószilárdság alapján*

Az előállított szálalplanok mechanikai tűrőképességét az anyag szakítószilárdságának meghatározásával vizsgáltam. A méréseket Zwick Z005

(Zwick Roell GmbH, Ulm, Németország) készüléken végeztem szobahőmérsékleten. A mintatartó egységbe közel azonos tömegű, 2,5-3 cm hosszúságú mintákat helyeztem. A szakításhoz beállított nyújtáshossz 25 mm, a szakító erőhatár 15 N, míg a szakítás sebesség 5 mm/ perc volt. A szakítószilárdság értékeket és a véletlenszerűen orientált szálas szövetek Young modulusait az alábbi egyenlet **(E6)** segítségével számítottam ki:

$$\sigma \left(Pa; \frac{N}{m^2} \right) = \frac{F_{max}(N) \cdot \rho \left(\frac{kg}{m^3} \right)}{TEX \left(\frac{kg}{m} \right)} \quad \text{(E6)}$$

ahol F_{max} a maximális erő, ρ a szálak átlagos sűrűsége, TEX a lineáris sűrűség (W/L , ahol W a szálak tömege, L a szálak hossza).

3.7.1.5. Pozitronannihilációs élettartam spektroszkópiai mérések

A kísérleti munkáim során előállított szilárd minták mikroszerkezeti vizsgálatához az anyagot jellemző szabad térfogatok és a szabad térfogatok anyagon belüli eloszlását pozitronannihilációs élettartam spektroszkópiával mértem. Pozitron forrásként úgynevezett hordozómentes, szilárd $^{22}\text{NaCl}$ forrást alkalmaztam, amelyet az izotóp oldat rendkívül vékony Kapton fóliára történő felcseppentésével és beszárításával készítettem el. A mérésekhez olyan, jellemzően $3 \cdot 10^5$ Bq aktivitás elérésére törekedtem, hogy a három egymást követő mérési periódusok egyenként 3600 -7200 s időtartama alatt a beütések száma 1,5 millió körüli érték legyen. A bomlási és annihilációs eseményekből származó fotonok észlelése BaF_2 egykristállyal felszerelt szcintillációs detektorral ($\text{BaF}_2/\text{XP2020Q}$) történt, míg a detektálásból származó elektromos jeleket a gyors-gyors koincidenziakörű Ortec[®] (Oak Ridge, TN) elektronika alakította át élettartam spektrummá egy 4096 csatornás analízátor kártya segítségével. A diszkrét élettartam spektrum adatokból, míg az élettartam eloszlásának kiértékelése MELT programmal történt. A méréshez a szálas mintákat úgy készítettem elő, hogy azokból nagyjából 1 cm x 1 cm alapterületű darabokat vágtam le és a sugárforrást kétoldali elrendezésben a lapkák közé zártam. Az egyes mintadarabok vastagsága legalább 0,5 mm volt és a sugárforrástól vékony Kapton fólia választotta el őket. A leírt elrendezésű mintát alufóliába csomagoltam és a két detektor közötti részben rögzítettem.

3.7.1.6. *Mikroszál alapú tabletták kioldódás vizsgálata*

A szabadfilm, valamint szálas alapú, B₁₂-vitamin tartalmú tabletták kioldódás vizsgálatát *Hanson SR8 PLUS* típusú kioldókészülékben, 'offline' üzemmódban végeztem. A mintavételi időpontokat az előzetes szétesési vizsgálatok alapján határoztam meg. Ennek megfelelően hatvan perc alatt tizenöt különböző időpontban vettem egyenként 2 ml mintát, amelyet az eredmények értékelésekor korrekcióval vettem figyelembe. A kioldó közegnek foszfát pufferrel beállított pH=6,8, 250 ml össztérfogatú vizes oldatot használtam. A kioldódást 37 °C-on, 50 RPM keverési sebességgel, lapátos keverővel hajtottam végre.

3.7.1.7. *B₁₂-vitamin kvantitatív meghatározása HPLC-UV műszeres technikával*

A PVP30 polimer alapú és a **11. táblázatban** mutatott segédanyag rendszerű tabletták kioldódásakor vett minták B₁₂ vitamin tartalmának mennyiségi meghatározása HPLC-UV (Agilent 1050 HPLC, Santa Clara, Kanada) folyadékkromatográfiás technikával történt, ahol a műszer főbb egységei a degasszer, a kvaterner pumpa, az automata mintavevő, az oszlop termosztát és a változtatható hullámhosszú detektor voltak. Az elválasztás során gradiens elúciót alkalmaztam 1 ml/perc áramlási sebességgel, ahol az 'A' eluens 0,05 V/V % koncentrációjú trifluoecetsavas, MilliQ készülékkel (Merck, Billerica, MA) előállított desztillált vizes oldat volt, míg a 'B' eluens acetonitril. Az elválasztás 1 percen át tartó, 10 %-os 'B' eluens arányú gradiens áramlással kezdődött, amelyet 4 perc időtartamú lineáris szakasz követett 90 % 'B' eluens aránnyal. Az áramlás utolsó periódusában a 'B' eluens arányát 10 %-ra csökkentettem. A következő minta injektálása 3 perc ekvilibrálás után következett. Injektálás előtt a mintákat 5 percen át centrifugáltam 3300 RCF-nek megfelelő fordulatszámmon, Hermle (Franklin, WI) típusú centrifugával. A minta injektálási térfogata 200 µl volt, amelyet 40 °C-ra temperált, 100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm Kinetex XB-C18 (Kinetex, Phenomenex, Hungary) *core-shell* típusú oszlopra vezettem rá. A detektálás hullámhossza 362 nm, míg a csúcshélesség 0,053 perc volt. A HPLC eljárást 50 ng/ml és 50 mg/ml közötti koncentráció tartományra validáltam. A méréseket az Eötvös Loránd Tudományegyetemen létesített és a Wessling Hungary Kft. által üzemeltetett EKOL

(Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium) laboratóriumában végeztem. A mérésekhez Bodai Zsolt nyújtott szakmai támogatást.

3.7.1.8. *Topikális felszívódást modellező hatóanyag felszabadulás vizsgálata egyedi tervezésű kioldócellában*

A **12. táblázatban** összefoglalt többrétegű, kolisztin szulfát tartalmú sebfedő rendszerek kumulatív kioldódás vizsgálatát külön erre a célra elkészített kioldó cella segítségével végeztem. Fontos kiemelni, hogy ezen topikális rendszernek számító mintákból a hatóanyag felszabadulásának vizsgálata nem a gyógyszerkönyv szerint definiált kioldódás vizsgálattal történt, hiszen ilyen gyógyszerhordozó rendszerek esetében nem beszélhetünk kioldódásról. A cella egyedi kialakítása azt a célt szolgálta, hogy modellezzük azon fiziológiás körülményt, valamint az alkalmazás jellegét, ahol a sebfedő rendszer a sérült, nedvedző testfelszínnel érintkezve aktiválódik. A 70,41 ml térfogatú, gömb geometriájú üveg kioldócella felépítését részletesen a **4.6.2. fejezetben** mutatom be. A vizsgálatkor a mintákat az eszköz tetején található, kör alapterületű és a sebfelszín jelképező folyadék-kontakt nyílására helyeztem, amelyet szilikon réteggel bevont üveglappal zártam le. Az edényzetet buborékmentesen töltöttem fel a kioldóközegként alkalmazott pH=6,8 vizes puffer oldattal. Az oldatot 25 °C-ra (± 2 °C) temperáltam és mágneses keverő segítségével 50 RPM fordulatszámon kevertetem a 240 perc időtartamú vizsgálat során végig. Az 1; 3; 5; 7; 10; 13; 16; 20; 25; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240 perces mintavételi időpontokban 1 ml mintákat vettem a cella falán kialakított, folyadékzáró mintavételi membránon keresztül, Hamilton fecskendővel. A kioldóközegből kivett minta azonnali utánpótlása a cellán kialakított és a mintavételkor nyitható puffer tartály segítségével, *in situ* történt, így biztosítva a cellába töltött folyadék állandó térfogatát és a rendszer buborékmentességét.

3.7.1.9. *Kolisztin-szulfát kvantitatív meghatározása UPLC-MS műszeres technikával*

A többrétegű sebfedő rendszer hatóanyag felszabadulásának vizsgálatokor vett mintákból a kolisztin szulfát mennyiségi meghatározása Waters Acquity UPLC H-Class folyadékkromatográfiás rendszerrel és pozitív ionizációs üzemmódra beállított,

ESI (Electrospray Ionization) ionforrással felszerelt WIAT Acquex QDa detektorral, valamint az adatgyűjtést és kiértékelést támogató Empower3 szoftver segítségével történt. A gradiens elválasztás 0,5 ml/perc áramlási sebességgel zajlott 40 °C-ra temperált Thermo Hypersil Gold C18 (30 mm x 2,0 mm x 1,9 µm) oszlopon. A mintákat 10 percig centrifugáltam 5500 RPM sebességgel, Hermle Z230A típusú készülékben. A HPLC minőségű vizet Direct-Q 5 (Millipore) rendszer biztosította. "A" eluensként 0,5 V/V % hangyasav tartalmú Direct-Q5 víz, míg "B" eluensként a 0,5 V/V % hangyasav tartalmú acetonitril oldószer szolgált. Az elválasztás 0,5 perces izokratikus szakasza 10 % "B" eluens arány mellett kezdődött. Ezután az eluens összetétel lineáris gradienssel 95 % "B" értékre változott 1,5 percen belül, 0,2 perc időtartamra, majd azonnal 10 % "B" arányra csökkent vissza. A következő injektálásra 1,2 perc ekvilibrálás után került sor. Az injektálási térfogat 0,5 ml és 50 ml volt. A detektálás a kvalitatív meghatározáshoz 1156, míg a kvantitatív meghatározáshoz 381.1 és 578,5 értékeken, egyedi ion detektálási módban (*Single Ion Monitoring*) történt 10 pont/másodperc mintavételi aránnyal, 600 °C-os szonda hőmérséklet és 1,0 kV kapilláris feszültség mellett. A méréseket az Eötvös Loránd Tudományegyetemen létesített és a Wessling Hungary Kft. által üzemeltetett EKOL (Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium) laboratóriumában végeztem. A mérésekhez Bodai Zsolt nyújtott szakmai támogatást.

3.7.2. *In vitro* mikrobiológiai vizsgálatok

3.7.2.1. Agar-diffúziós inhibíció vizsgálat az antibakteriális kapacitás jellemzésére

A jód tartalmú mikroszálás szövedékek antibakteriális hatásának vizsgálatához a **9. táblázatban** mutatott mintákat és az alábbi baktériumtörzseket használtam: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 30013, *Escherichia coli* ATCC 25922. A mérést azonos polimer összetételű, de hatóanyagot nem tartalmazó lapkákkal és azonos összetételű, jódot, valamint jódot nem tartalmazó gélekkel összehasonlításban végeztem el. Az egységes tömegű és korong formájú (átlagosan 13 mm átmérőjű és 1 mm vastagságú) mintákat és a géleket az egyes baktériumtörzsek 0,5 McFarland koncentrációjú oldatával előkészített Mueller-Hinton agar, míg a *Staphylococcus aureus* és *Streptococcus*

pyogenes baktériumok esetében 5 % juhvérrel kiegészített Mueller-Hinton agar táptalajokra (Biomérieux, Budapest, Hungary) helyeztem és 37 °C-on inkubáltam egy éjszakán át (CLSI, 2005). A korongokat Specac típusú kézi présgéppel, 1000 N préselő alkalmazásával állítottam elő. A kolisztin szulfát tartalmú nanoszálalás réteg inhibíciós képességét három különböző baktériumtörzsön vizsgáltam: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, MDR *Acinetobacter baumannii*. A **12. táblázatban** felsorolt többrétegű sebfedő készítmények antibakteriális kapacitásának meghatározását úgy végeztem, hogy ugyanazon mintát óránként új táptalajra helyeztem át, összesen 6 órán keresztül. Ezekben az esetekben, a minták eltávolítása után a táptalajokat 24 órás, 35,5 °C-os inkubációnak vettem alá.

3.7.2.2. Csíraszám számlálás kinetikai vizsgálathoz

A jódtartalmú mikroszálalás korongok, hatóanyag-leadás kinetikájával összefüggésben mutatott antibakteriális aktivitását úgynevezett ölési görbék (CLSI, 2005) felvételén keresztül határoztam meg. A vizsgálathoz 7,6 log₁₀ CFU/ml kezdeti koncentrációjú *Streptococcus pyogenes* ATCC 30013 baktériumtörzset használtam. A baktériumos törzsoldatban 21,38 mg/ml koncentrációnak megfelelő PVP 25 polimer alapú korongot, míg a törzsoldat egy másik részletében 21,5 mg/ml koncentrációnak megfelelő PVPVA64 polimer alapú korongot oldottam fel. A csíraszám számlálását 1, 3, 6, 12 és 25 órás inkubációs idő elteltével végeztem el a kioltott táptalajok 24 órás, 37 °C-os inkubálása után.

3.7.3. *In vivo* állatkísérletek

3.7.3.1. Dorzális biopszia modell alkalmazása CDI típusú egereken

Az A3-APO monomer és kolisztin szulfát tartalmú (11,8±0,4 µg) sebfedő készítmények antibakteriális és sebgyógyulást segítő hatásának *in vivo* vizsgálatához összesen 36 db CDI és C57/BL/6 típusú egeret használtam, amelyek előzőleg normál körülmények között akklimatizálódtak 2 héten át. A 17-20 g tömegű állatok hátán a bőrszövetet 8 mm átmérőjű területen eltávolítottam a kezelés előtt közvetlenül (dorzális bőrbíopszia).

A sebfedő ráhelyezése előtt 20 db egér sérült szöveti területét 10 µl *Acinetobacter baumannii* baktériumtörzs 10^9 CFU koncentrációjú foszfát puffer oldatával fertőztem be. Az így létrehozott fertőzött és nem fertőzött csoportok egyedei lettek további kisebb csoportokra felosztva a kísérlethez: kontroll, hatóanyagmentes mintával kezelt, kolisztin-szulfát tartalmú mintával kezelt, A3-APO monomer tartalmú mintával kezelt, kezeletlen. A sebfedő tapasztokat a kezelés negyedik napján távolítottam el. Ezt követően került sor a sebek vizsgálatára.

3.7.3.2. *Testfelszíni termoanalízis hőkamerával a szöveti regeneráció követésére*

A **3.7.3.1. fejezetben** leírt állatkísérletben részt vett egerek sebeiről kétirányú testfelszíni hőmérséklet profilt készítettem FLIR A325sc típusú hőérzékes kamerával és FLIR Research IR Max szoftver segítségével. Szobahőmérsékletnek 22 °C-os, míg a lencse hőmérsékletének 20 °C-os referencia hőmérséklet lett beállítva.

3.7.3.3. *Egyszerűsített szövettani vizsgálat*

Az *in vivo* kísérletbe bevont állatok sebeit a kezelés után kimetszéssel távolítottuk el a szövettani vizsgálathoz. A minták 24 órás, 10 %-os formaldehid pufferoldatban (pH=7) történő tárolását az etanollal és metil-benzoáttal végzett, 1 órás denaturálás követte, majd a szövetdarabokat a paraffinos beágyazás előtt xilolba helyeztük el. A fénymikroszkópos elemzéshez a 6 mikron vastagságú szövet-paraffin szakaszokat deparaffinezni kellett. A hematoxilinnel és eozinnal festett minták mikroszkópos vizsgálata kamerával felszerelt Zeiss mikroszkóppal, míg a statisztikai szignifikancia számolása a SlideWrite (Encinitas, USA) grafikai program segítségével és Student statisztikai próba alkalmazásával történt.

3.7.3.4. *Kioltás szöveti homogenizátumból*

Az egerekből kimetszett sebek bakteriális fertőzöttségének meghatározásához a sebekből készült homogenizátum Mueller-Hinton táptalajon került kioltásra, 24 órás inkubációs idővel.

3.7.4. A hatóanyag kioldódás matematikai modellezése

A többrétegű, membránokból (MEL, *Membrane Electrospun Layer*) és az elgélesedő, kolisztin-szulfát tartalmú rétegekből (CEL, *Colistin sulfate-loaded Electrospun Layer*) felépülő sebfedő rendszer kumulált hatóanyag-fel szabadulásakor a kioldótartályban kialakuló hatóanyag koncentráció időtől függő változását határoztam meg. A folyamatban szerepet játszó diffúziós jelenség leírásával és a rétegek tulajdonságainak, vastagságának, elrendezésének és számának függvényében felállított és ezeknek megfelelően paraméterezett matematikai korrelációk a készítmény tervezhetőségét és működésének egzakt értelmezését támogatják.

3.7.4.1. Weibull kioldódási modell

A kioldódási görbék kinetikai paramétereinek meghatározására számos modellfüggvény használatos. A különböző alakú kioldódási görbék matematikai leírására a Weibull-féle eloszlás függvényt alkalmaztam (E7) [261]:

$$M_t = M_\infty \left(1 - e^{-\frac{(t-t_0)^\beta}{\tau_d}} \right) \quad (\text{E7})$$

ahol M_t a t időpontig leadott hatóanyag-mennyiség, M_∞ a maximálisan leadható hatóanyag-mennyiség. A függvény alaki paraméterét β , a késleltetési időt t_0 és a közepes kioldódási időt (ahol a hatóanyag mennyiségének 63,2 %-a kioldódott) τ_d jelöli az egyenletben.

3.7.4.2. Végelem modellezés (FEM)

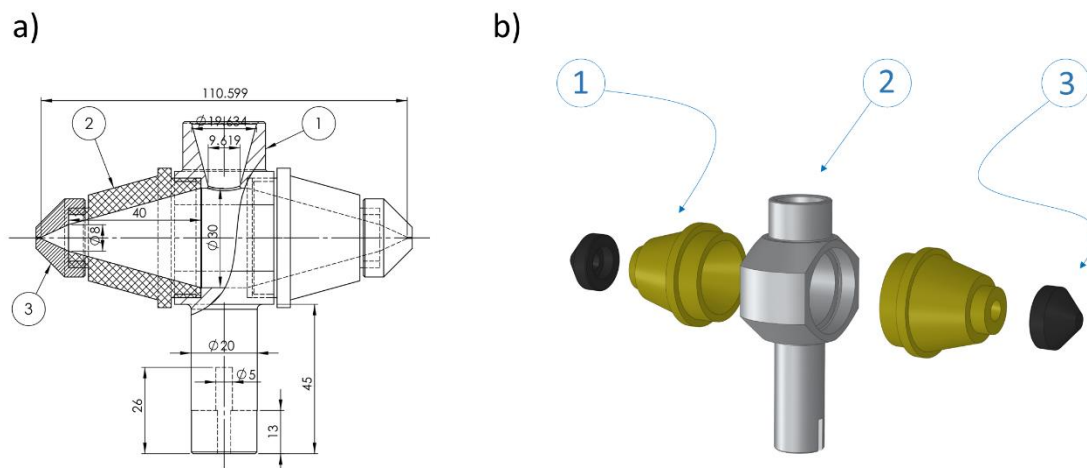
A többrétegű sebfedő rendszer CEL és MEL rétegeinek alternáló elrendezésénél végbemenő hatóanyag diffúziójának numerikus elemzése a műszaki számításokhoz kifejlesztett végelem módszerrel (FEM, *Finite Element Method*) történt. A végelem módszer a peremfeltételes parciális differenciálegyenletek olyan variációs elvű megoldása, ahol a keresett függvényt a tartományt lefedő véges elemeken, elemenként külön-külön létrehozott egyszerűbb függvényekkel helyettesítjük. Az elemekhez tartozó közelítő függvényeket a folytonossági feltételeket

kielégítve a teljes tartományra érvényes közelítő függvényekké egyesítjük. A függvények paramétereit egy szélsőérték számítás során nyert algebrai egyenletrendszerből határozhatjuk meg. A módszerre épülő programcsomagok (COSMOS/M, ANSYS) előkészítő és kiértékelő modulokat is tartalmaznak, amelyek a modellalkotásban és a számítás eredményeinek numerikus és grafikus kiértékelésében nyújtanak segítséget.

4. EREDMÉNYEK

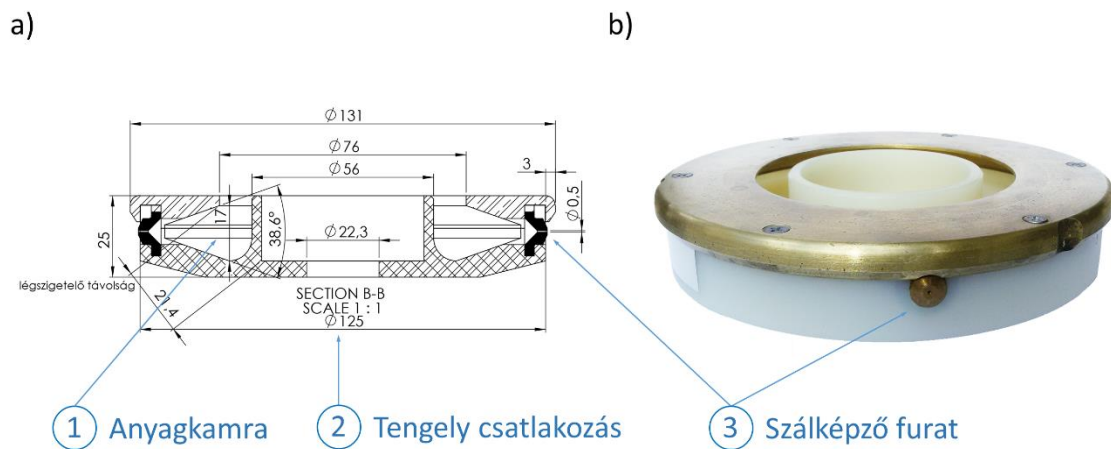
4.1. Egyedi kialakítású rotációs szálképző feltét fejlesztésének eredménye

A mikroszálás gyógyszerhordozó rendszerek formulálásához a kísérleti munkámat a megfelelő műszaki felépítésű centrifugális szálképző feltét megtervezésével és legyártásával kezdtem. A tervezés egyik fő szempontja az volt, hogy az irodalomban fellelhető adatok figyelembevételével laborméretű, jó kitermelést eredményező és biztonságos, valamint a telepítés és működtetés szempontjából egyszerűen kezelhető, szabályozható, könnyen tisztítható eszközt kapjak. A másik fő szempont a szálak reprodukálhatóan jó minőségben történő előállítása volt. A tervezés alap feltételül szabtam azt, hogy a forgó feltét kereskedelmi forgalomban kapható, a rákapcsolt feszültség függvényében változtatható fordulatszámú motorra legyen csatlakoztatható kompakt módon, illetve azt, hogy a motor beépíthető legyen olyan dobozba, amely a meghajtást megfelelően elszeparálja a mintatértől. A kézi rajzok műszaki rajzait a gödöllői Szent István Egyetem Gépészmérnöki Karának kollégái készítették CATIA® szoftver segítségével, míg a gyártás CNC-esztergával (*Computer Numerical Control*) történt. Az első elképzelés csak a műszaki rajz megvalósulásáig jutott (**32. ábra**), amit számítógépes elemzés alapján vetettünk el.

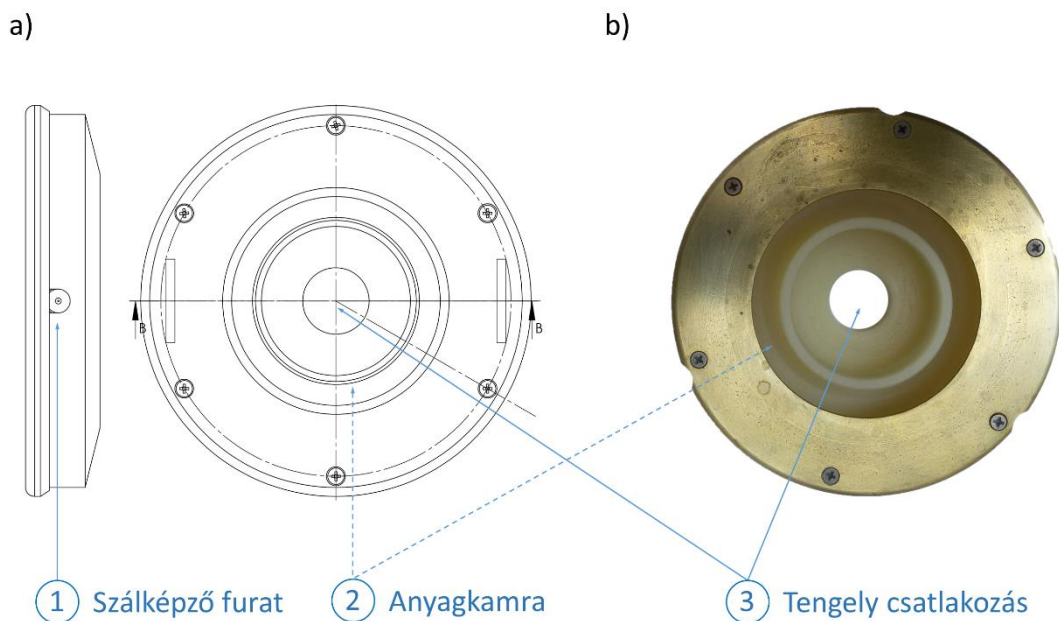


32. ábra Hexagonális kialakítású centrifugális szálképző feltét a) oldalnézetű, műszaki keresztmetszeti és b) 3D robbantott ábrája (1: oldalsó kamra, 2: anyagbetöltő nyílás és tengely csatlakozás, 3: szálképző furat)

Az első terv konklúzióit felhasználva olyan megoldást dolgoztunk ki, amelynél a **33. és 34. ábrán** látható körkamrás centrifugális feltét nem tartalmaz a meghajtásához szükséges tengelyhosszabbítást, valamint a szálképző polimer a forgástest kerületéhez közeli, a tengelykapcsolástól elszeparált körkörös anyagkamrába tölthető. Az anyagkamra térfogatát 80 ml-re növeltük. A forgótárcsa alapanyaga polietilén, amelynek felső pereméhez közel elhelyezett, összesen 2 db, egymással 180°-os szöget bezáró, 0,5 mm furatátmérőjű réz szálképző kúp (szálképző furat) található. A műanyag tárcsa lezárására széles peremű réz fedő gyűrűt használtunk.



33. ábra Körkamrás polietilén/réz centrifugális szálképző feltét a) oldalnézetű, műszaki keresztmetszeti és b) a legyártott munkadarab fényképes ábrája



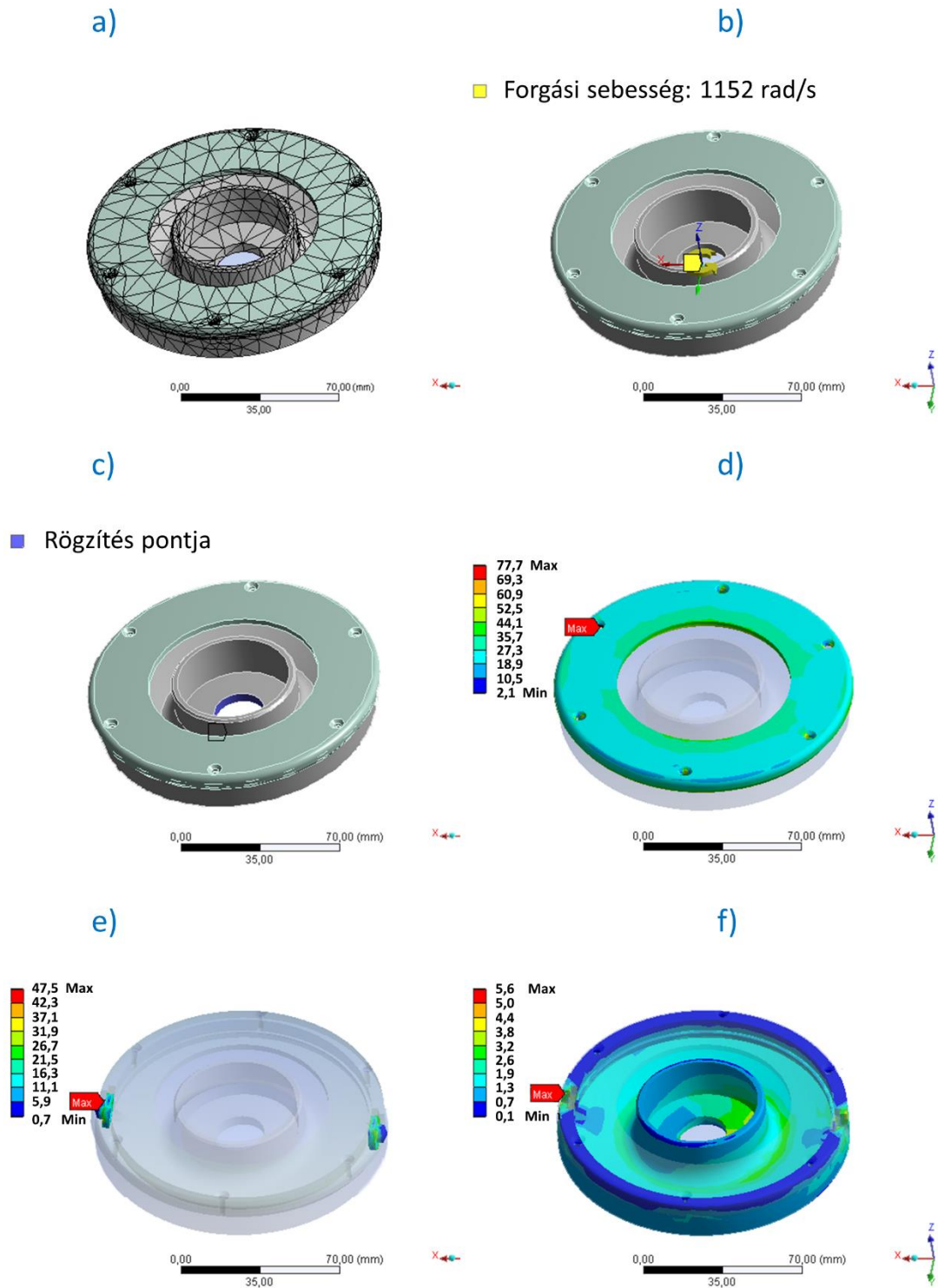
34. ábra Körkamrás polietilén/réz centrifugális szálképző feltét a) műszaki felülnézeti és b) a legyártott munkadarab felülnézeti fényképes ábrája

Az elkészített műszaki terveknek megfelelő prototípus legyártása előtt a geometriai forgástest szilárdság elemzését végeztük el végeelem modell és az ANSYS V12 szoftver felhasználásával a **13. táblázatban** felsorolt tulajdonságú anyagokra.

13. táblázat A végeelem modellhez felhasznált anyagok tulajdonságai

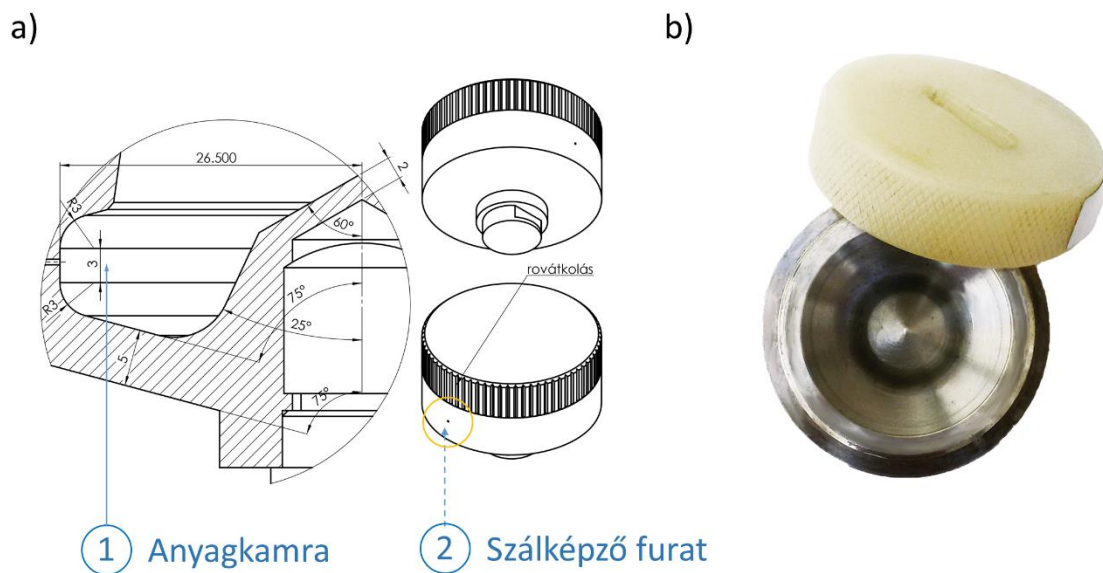
Anyagtulajdonságok			
Fizikai paraméterek	Anyag kémiai minősége		
	Acél	Réz	Polietilén
Rugalmassági modulus (E)	200 GPa	110 GPa	1,1 GPa
Poisson-tényező (ν)	0,30	0,34	0,42
Sűrűség (ρ)	7850 kg/m ³	8300 kg/m ³	950 kg/m ³

A végeelem háló elkészítéséhez 10 csomópontú tetraéder elemeket használtunk, így a modell 9946 elemből és 19520 csomópontból állt. A modell terhelései a 11000 RPM (1152 *rad/s*) fordulatszámú forgó mozgásból adódtak. A feltételezett legnagyobb excentricitás 0,2 mm volt. A test kényszereként a belső csatlakozó peremen befogást alkalmaztunk. A számított feszültségek a réz fedélen csak egyes érintkezési pontokban érték el a 77,7 MPa maximumot, míg a többi pontban nem haladta meg az 55 MPa értéket. Egy általános réz ötvözet folyáshatára 130 MPa. Megállapítottuk, hogy a réz fedél az adott terheléseket károsodás nélkül elviseli. A számított feszültségek maximuma az acél szálképző furatokban 47,5 MPa. Egy általános acél ötvözet folyáshatára 240 MPa. Megállapítottuk, hogy a szálképző furatok az adott terheléseket károsodás nélkül elviselik. A számított feszültségek maximuma a műanyag tárcsában 5,6 MPa. A polietilén folyáshatára 26 – 33 MPa, így kijelenthető, hogy a tárcsa az adott terheléseket károsodás nélkül elviseli. A modellezéskor alkalmazott kényszerítő és terhelési erők esetében kapott eloszlásokat a **35. ábra** szemlélteti. A körkamrás centrifugális feltétet alkalmasnak találtuk gyakorlati használatra, amit a későbbiekben ismertetett eredmények vissza is igazoltak.



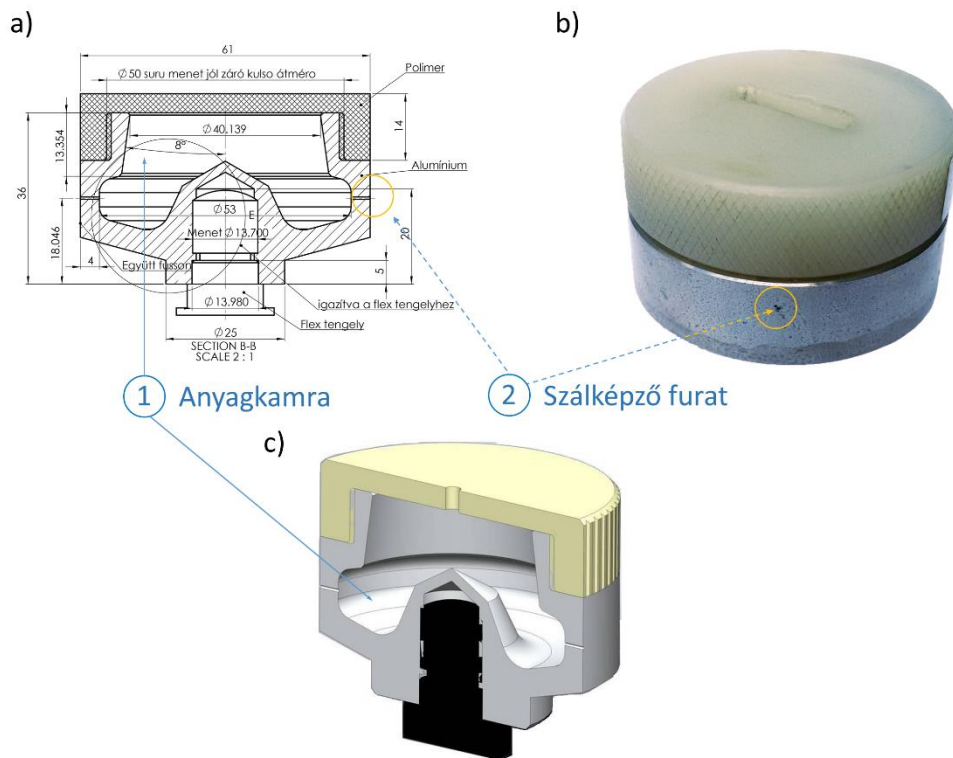
35. ábra Körkamrás polietilén/réz centrifugális szálképző feltét szilárdságának végeleemes elemzése eltérő csomópontok szerint, ahol a) végelelem háló, b) szögsebesség a modellen, c) befogás a modellen és MPa-ban megadott d) redukált feszültség a réz fedelén, e) redukált feszültség a szálképző furatban, f) redukált feszültség a műanyag tárcsában

A mikroszálak szálképzés optimalizálását és az előállított mikroszálak vizsgálatát célzó kísérletekkel párhuzamosan elvégeztük a körkamrás szálképző feltét méretcsökkentett (30 ml) és geometriájában tovább fejlesztett változatát (**36., 37. ábra**). E munkadarabnak a korábbihoz képest az az előnye, hogy a betölthető, kisebb ösztömögű szálképző oldat ellenére is képes felhasználni a centrifugális erő szálképzéshez ideális mértékű és irányú hatásait közel azonos fordulatszám mellett. További előnye még az, hogy az alkatrész alumínium anyaga könnyű és jól terhelhető. A kisebb töltetértéket lehetővé teszi, hogy kevesebb szálképző oldatból kiindulva készíthessünk egységes szálvastagságú vizsgálati mintákat, amely hasznos lehetőség drága beépülő hatóanyagok használata esetén.

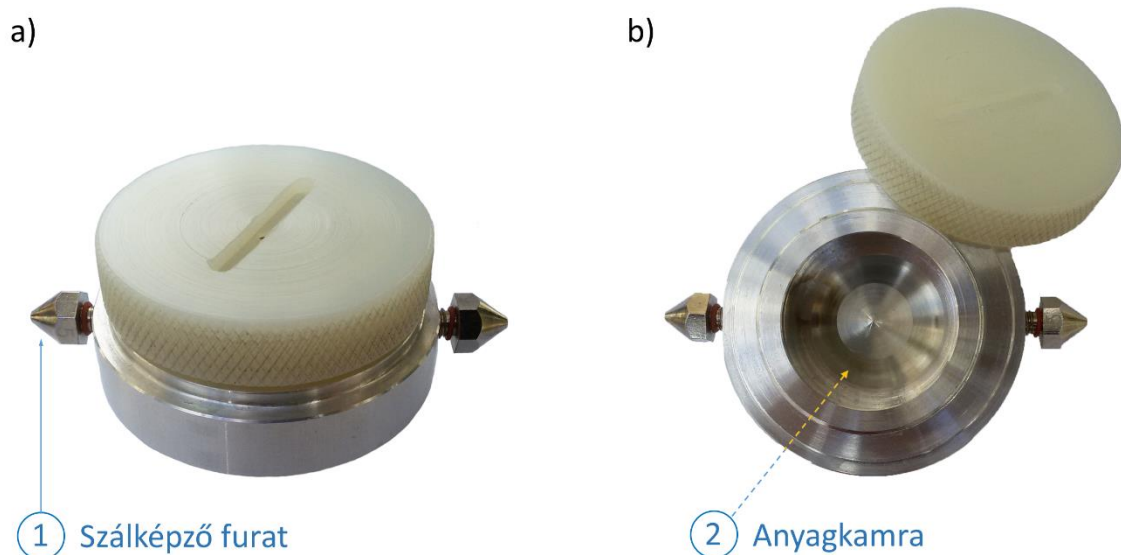


36. ábra Körkamrás alumínium/polietilén centrifugális szálképző feltét a) oldalnézetű, műszaki keresztmetszeti és b) a legyártott munkadarab nyitott, felülnézeti fényképes ábrája

A **38. ábrán** látható körkamrás centrifugális szálképző feltét a legyártott eszközök legutolsó változatát mutatja, amelynél a szálképző furatokat különálló, cserélhető alkatrész darabként helyeztünk el a hengersizmetrikus palást felületén. A fém kúpokot 0,2-0,4 mm furatokkal és 5 mm átmérőjű menetes csatlakozással gyártottuk le.



37. ábra Körkamrás alumínium/polietilén centrifugális szálképző feltét
 a) oldalnézetű, műszaki keresztmetszeti és b) a legyártott munkadarab zárt, felülnézeti fényképes, valamint c) 3D keresztmetszeti ábrája



38. ábra Körkamrás alumínium/acél/polietilén centrifugális szálképző feltét
 a) zárt b) és nyitott, felülnézeti fényképes ábrája

4.2. Mikroszálás struktúra formulálásának optimalizálása, makro-és mikroszerkezeti vizsgálata

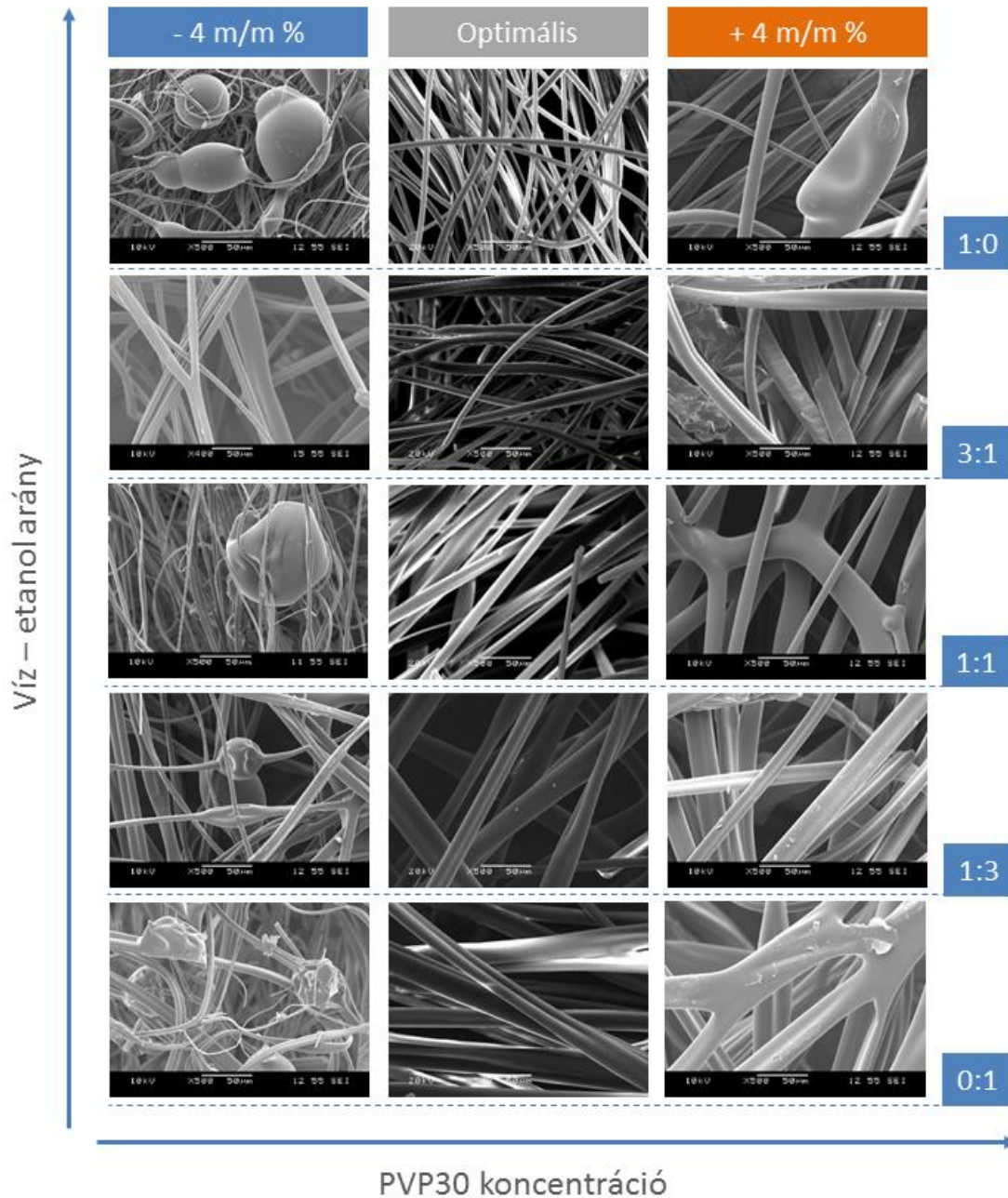
A következőkben bemutatott eredmények a **4.1. fejezetben** tárgyalt körkamrás polietilén/réz centrifugális feltét (**33-35. ábra**) gyakorlati alkalmazhatóságát, valamint a kiválasztott, különböző PVP polimer alapú minták fizikai és fizikai-kémiai tulajdonságainak vizsgálatával optimálható szálképzést hivatottak igazolni. Az eszköz használatakor a szálképző polimer oldatot tartalmazó feltét nagysebességű forgást végez. A forgás során kialakuló centrifugális erő oldalra gyakorolt hatása a szálképzés hajtóereje vagy tágabb értelemben az anyag mozgásának dinamikai és részben kinetikai eredője. Ismert geometriájú, ismert forgási sebességű feltét esetén az egységes minőségű és reprodukálható szálak keletkezését elsősorban az oldat viszkozitása és viszkoelaszticitása, a felületi feszültsége és ezeken keresztül az alkalmazott polimer kémiai minősége, koncentrációja, oldószere, valamint átlagos molekulatömege és polimerizáltsági foka határozza meg. A kísérleteimhez a **14. táblázatban** mutatott PVP25, PVP30 és PVPVA64 polimereket, valamint különböző víz-alkohol arányú oldószereket használtam. Az optimális polimer koncentrációt mindegyik esetben a polimer mennyiség először nagyobb, majd egyre kisebb léptékű változtatásával, empirikus úton és a mikroszálak morfológiai, pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) végzett elemzésével határoztam meg.

14. táblázat PVP tartalmú, alkohol-víz elegy, mint oldószer bázisú szálképző hidrogélek optimális polimer koncentrációi és jellemző szálvastagságai

Víz-alkohol arány	Optimális PVP összetételű mikroszálak					
	PVP koncentráció (m/m %)			Átlagos szálvastagság (μm)		
	PVP25	PVP30	PVPVA64	PVP25	PVP30	PVPVA64
1:0	59	55	55	$7,6 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,9$	$5,8 \pm 1,3$
3:1	55	49	53	$15,0 \pm 4,4$	$10,3 \pm 2,4$	$10,8 \pm 2,6$
1:1	53	45	51	$22,5 \pm 4,5$	$11,0 \pm 3,7$	$21,0 \pm 5,5$
1:3	47	45	51	$21,9 \pm 2,8$	$21,4 \pm 6,9$	$22,8 \pm 8,5$
0:1	43	43	49	$27,9 \pm 7,2$	$23,0 \pm 2,8$	$22,6 \pm 3,2$

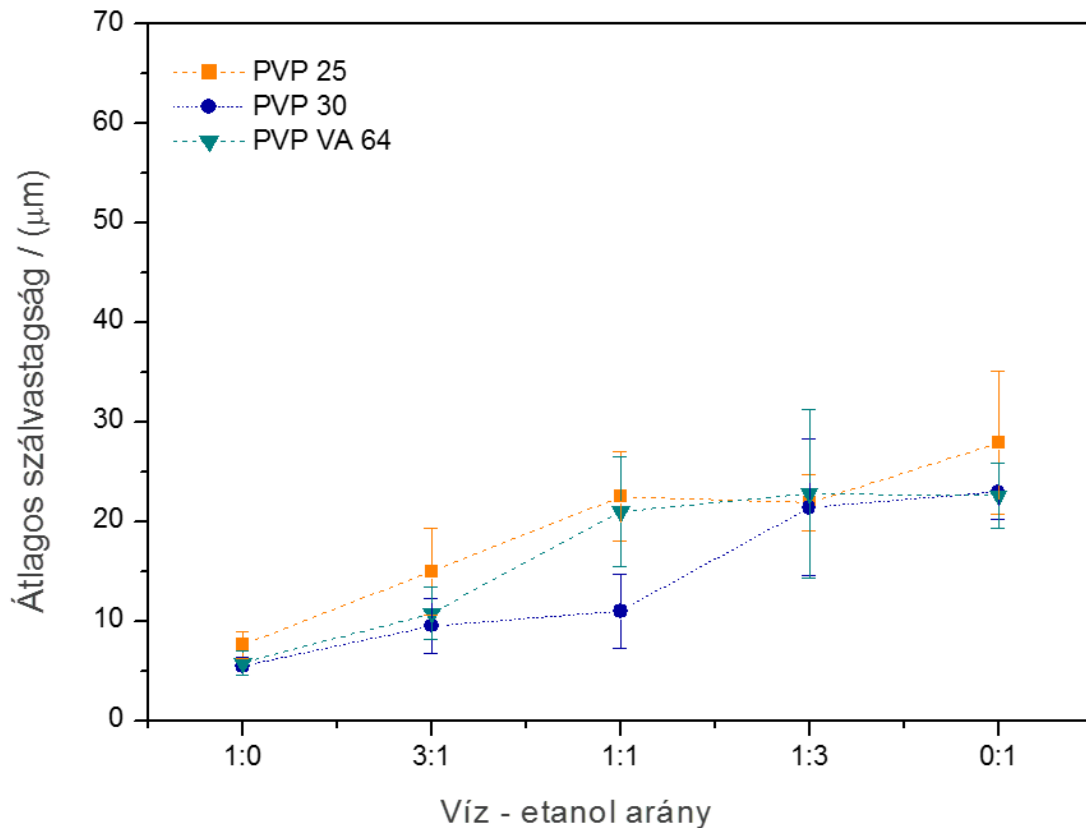
Az egyes mintáknál jól megfigyelhető volt az a jelenség, hogy az alacsonyabb koncentrációtól haladva a nagyobb PVP koncentráció felé a kezdetben kialakuló polimer cseppek (polimer gyöngyök) megszűnésével létrejönnek az egységes vastagságú szálak,

amelyekre jellemző koncentrációt tovább növelve a szálak közötti kapcsolódási pontokat, anyagsűrűsödéseket és heterogén szálvastagságú anyagi rendszereket kaptam. A **39. ábrán** az eltérő víz-alkohol arányok szerint csoportosított, optimális és az optimálishoz képest eltérő (± 4 m/m %) PVP koncentrációjú mikroszálak SEM felvételei láthatók.



39. ábra Az optimális és az optimálistól eltérő PVP koncentrációjú oldatokból előállított mikroszálak SEM felvételei (500-szoros nagyítás) az alkalmazott víz-alkohol arány és a polimer típusa függvényében

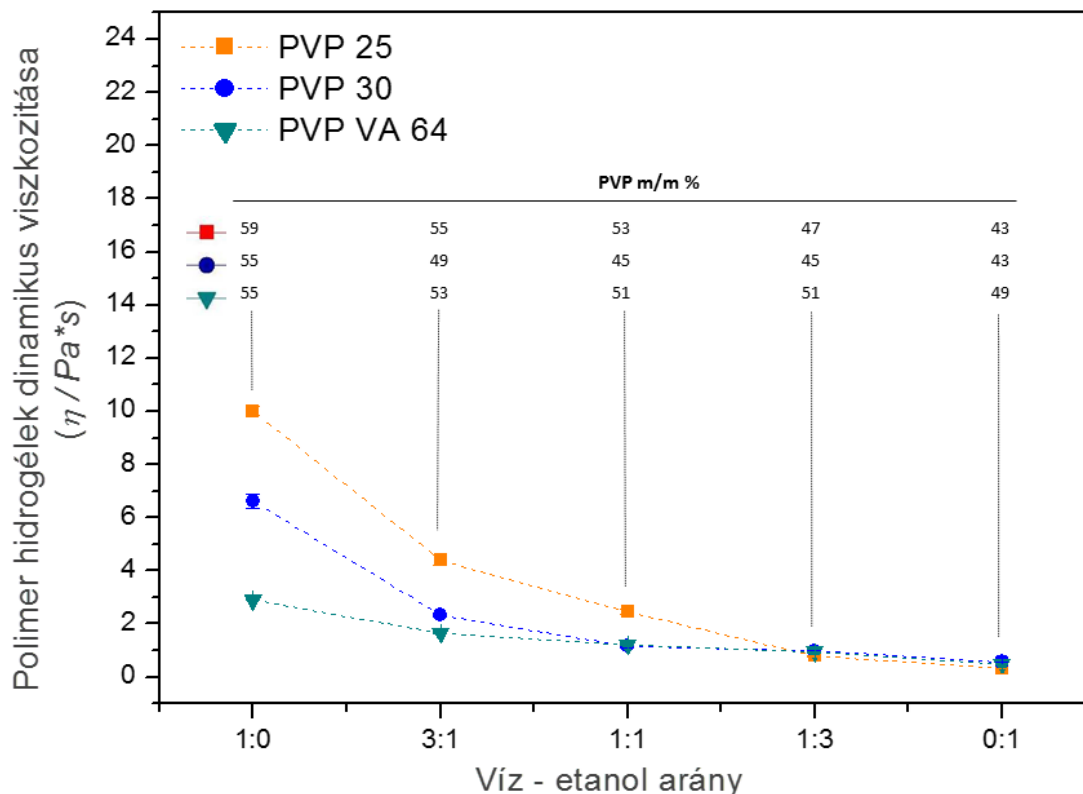
Az oldószer alkohol arányát növelve egyre kisebb az az optimális polimer mennyiség, amely esetében egységes és jó minőségű szövedéket kapunk, miközben a létrejött mikroszálak jellemző vastagsága megnő (**40. ábra**).



40. ábra Az eltérő víz-alkohol arányú PVP25, PVP30 és PVPVA64 polimerek optimális koncentrációjú oldataiból készített mikroszálak átlagos szálvastagsága

A tapasztalt tendenciára az a magyarázat, hogy a szálképződés során az alkohol párolgása intenzívebb a centrifugális feltét anyagkivezetési pontja és a kollektor közötti szakaszon a több vizet tartalmazó rendszerekéhez képest. Az oldószer gyors párolgása a gél viszkozitásának és viszkoelaszticitásának meredekebb növekedését eredményezi a folyamat során, amely a szálak elvékonyodásának ellenében ható erőként, és így a szálvastagság növekedésében nyilvánul meg. Ezen összefüggésre építve adódott a lehetőség, hogy a tárgyalt összetételű PVP polimer-oldószer rendszerekre viszkozításban megadott specifikációt határozzak meg. A specifikáció szerinti viszkozitás meghatározása egyben az előállításhoz használt készülék és annak beállításaihoz tartozó, a megfelelő minőségű szálképzésre nézve prediktív monitorozási

módszer is. Első lépéseként tehát megmértem a morfológiai eredményeknek megfelelő összetételű gélek dinamikus viszkozitását (**41. ábra**).

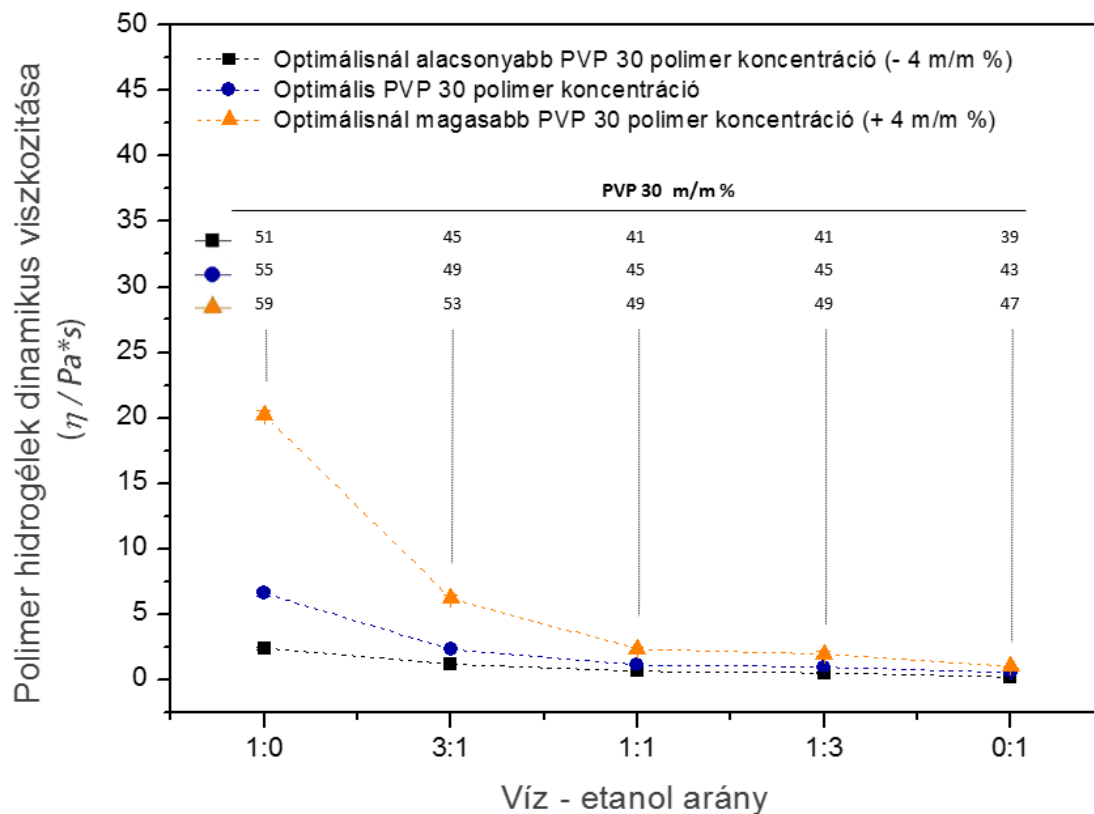


41. ábra Optimális PVP25, PVP30 és PVPVA64 összetételű hidrogélek dinamikus viszkozitása az oldószer víz-alkohol arányának függvényében

A grafikonon jól látszik, hogy az alkohol arányának növelése esetén egyre kisebb polimer koncentráció mellett hozható létre a megfelelő minőségű minta, illetve az, hogy a viszkozitás is ennek megfelelően csökken. A polimer koncentráció viszkozításra gyakorolt hatását a később tárgyalt kísérletekben is felhasznált PVP30 alapú szálképzéshez külön elvégzett optimalizáláson keresztül igazoltam (**15. táblázat, 42. ábra**). Jobban szemügyre véve a **41. ábrán** látható görbéket azonban látható az is, hogy adott oldószer arány mellett a viszkozitás értékek relatív különbsége egyre kisebb a növekvő etanol tartalom irányába haladva, ahol a legkisebb meredekségű csökkenést a PVPVA64 alapú gélek mutatják. Ezen tapasztalatot nem lehet csupán a koncentráció változásával indokolni, hiszen a csak vizes oldatok koncentrációja a PVP30 és PVPVA64 esetében megegyeznek.

15. táblázat Optimális összetételű, PVP30 tartalmú szálképző gélek dinamikus viszkozitás értékei és az előállított szálak átlagos szálvastagsága az alkalmazott oldószer függvényében

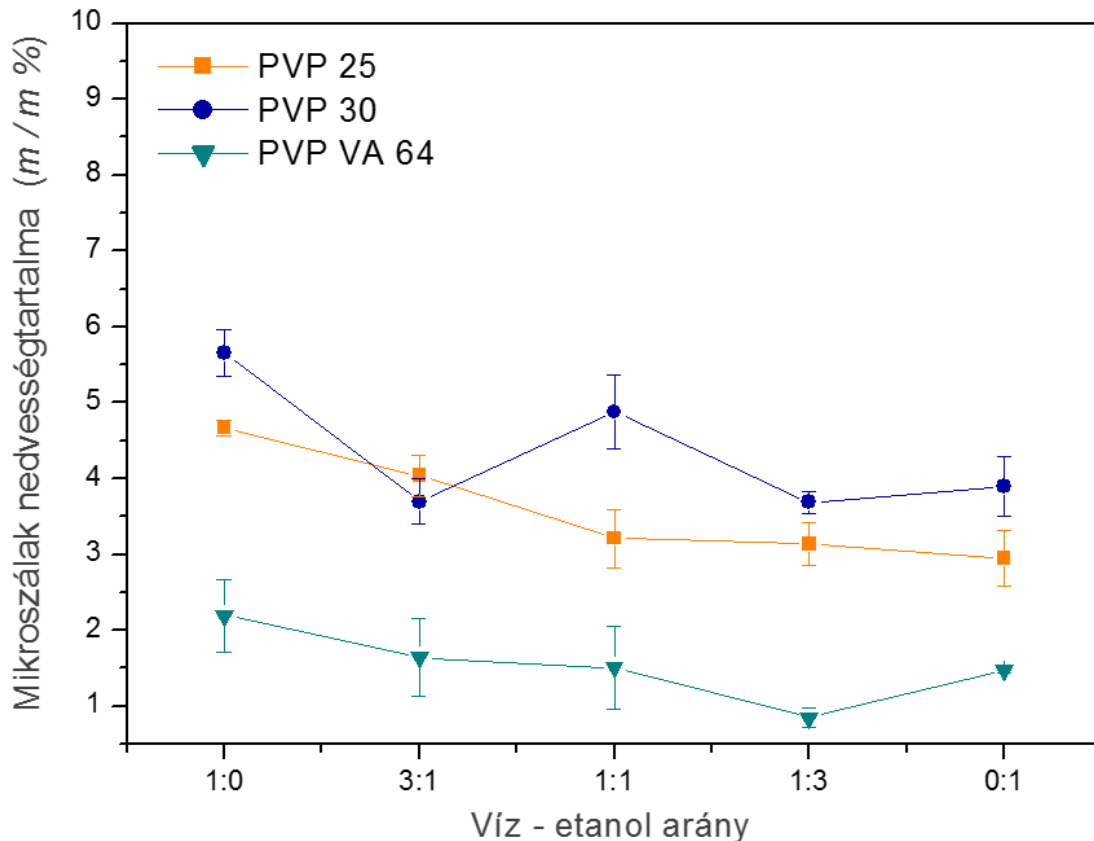
Minta azonosítója	Víz-alkohol arány	Optimális összetétel		
		PVP30 koncentráció (m/m %)	Dinamikus viszkozitás [η (Pa·s)]	Átlagos szálvastagság (μm)
1.	1:0	55	$6,62 \pm 0,27$	$5,5 \pm 0,9$
2.	3:1	49	$2,33 \pm 0,06$	$10,3 \pm 2,3$
3.	1:1	45	$1,16 \pm 0,05$	$11,0 \pm 3,7$
4.	1:3	45	$0,98 \pm 0,03$	$21,4 \pm 6,9$
5.	0:1	43	$0,56 \pm 0,02$	$23,0 \pm 2,8$



42. ábra Optimális és az optimálistól eltérő PVP30 polimer koncentrációjú szálképző gélek dinamikus viszkozitás értékeinek grafikus ábrázolása az alkalmazott oldószer függvényében

Az eltérés hátterében a molekulák polaritásának különbsége és a polimer láncok között kialakuló inter- és intramolekuláris, illetve a polimer-oldószer szupramolekuláris kölcsönhatásai állnak. Ezen utóbb felsorolt tényezők viszkozitást befolyásoló szerepe

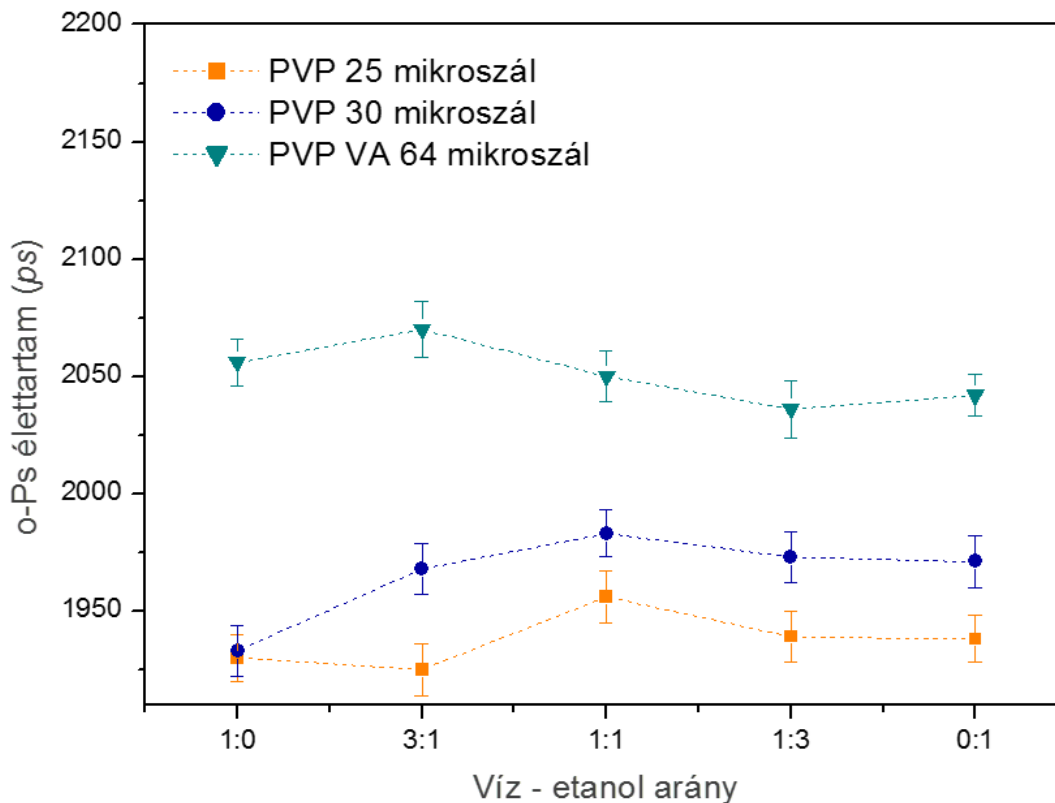
a víz mennyiségének csökkenésével egyre kisebb és a PVP25, PVP30 polimerek esetében a legjelentősebb. A PVPVA64 molekula monomer egységeiben apoláris, hidrofób vinilacetát molekularész található, amely részben gátolja a viszkozitás növekedését eredményező H-híd (hidrogénhíd) kötések kialakulását a láncok között, ami a szilárd minták alacsonyabb nedvességtartalmát is okozza (**43. ábra**).



43. ábra PVP25, PVP30 és PVPVA64 polimer alapú mikroszálak átlagos nedvességtartalma az alkalmazott oldószer függvényében

A H-híd kötések aránya és az átlagos nedvességtartalom tehát szignifikáns különbséget mutat a PVP25/PVP30 és a PVPVA64 polimer alapú szálaknál, ami a létrejövő mikroszerkezetben is megnyilvánul. Ezen mikroszerkezeti jellemzők feltérképezését pozitronannihilációs élettartam spektroszkópiai mérések (PALS) segítségével végeztem el, ahol az *o*-Ps meghatározott tartományban mért élettartam értékei arányosak a szálon belüli polimer láncok által kialakított szabad térfogatok méretével. Az így szerzett mikroszerkezeti adatok jelentősége az, hogy segítségével

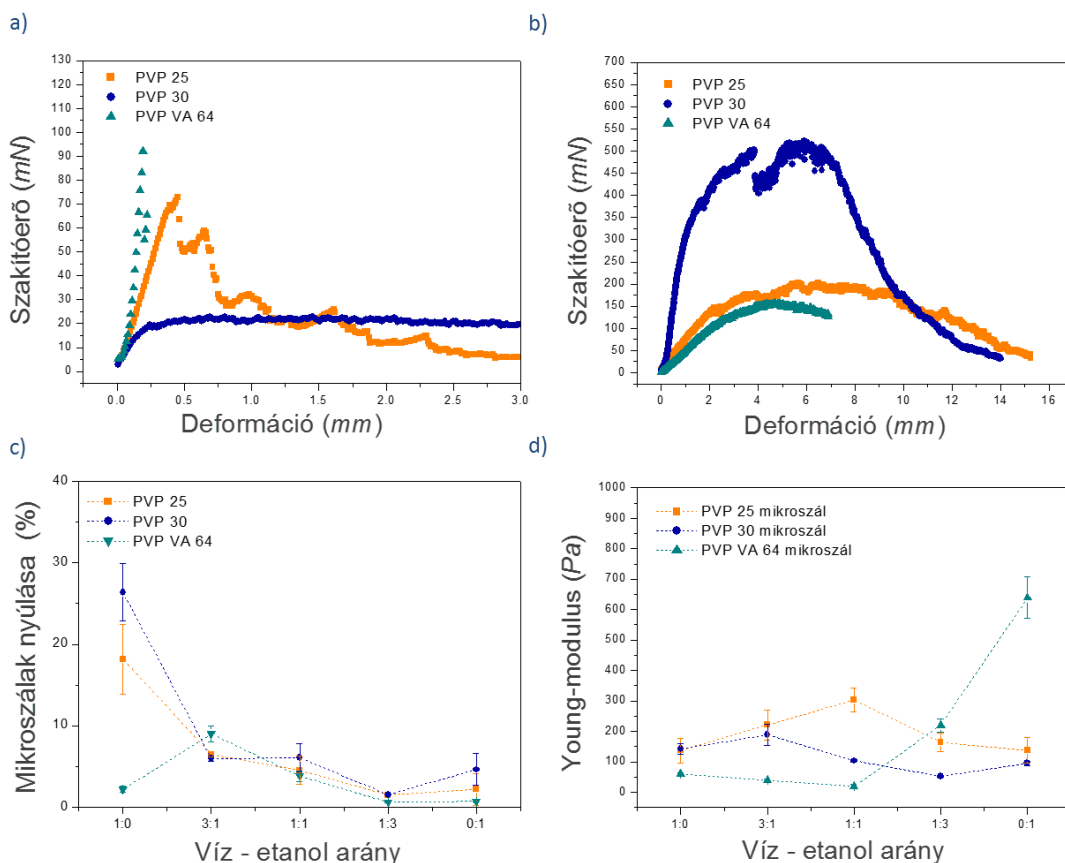
sorrend állítható fel a rendszer hatóanyag tároló kapacitásában, amely segíti a hatóanyag szempontjából legelőnyösebb segédanyag kiválasztását. A **44. ábrán** jól látható, hogy a PVPVA64 tartalmú minták jellemző szabad térfogatai nagyobbak a PVP25 és PVP30 tartalmú mintákénál. A PVP25 és PVP30 polimer láncai között víz molekulák által közvetített H-híd kötések jönnek létre, ami a láncok szorosabb kapcsolódását teszi lehetővé, így a szabad térfogat kisebb lesz. A PVPVA64 hidrofób vinilacetát molekularészei a polimer láncok közötti lazább kapcsolatot és nagyobb szabadtérfogatot eredményez, ami részben közvetlen szterikus, részben pedig a H-hidak kisebb arányú kialakulásának következményeként értelmezhető.



44. ábra PVP25, PVP30 és PVPVA64 polimer alapú mikroszálak esetében mért *o-Pos* élettartam értékek (szabad térfogatok) az alkalmazott oldószer függvényében

A mikroszálak nedvességtartalma nem csak a létrejövő mikroszerkezetet befolyásolja, hanem az anyag mechanikai tulajdonságait, mechanikai tűrőképességét és feldolgozhatóságát is. A **45. ábrán** az egyes mintákon elvégzett szakítószilárdság mérések grafikusán ábrázolt eredményei láthatók.

Megállapítható, hogy a vizes gélből készített mikroszálak szakítószilárdsága és nyújthatósága jelentősen nagyobb az alkohol alapú gélekből készületekhez képest, ami a víz lágyító szerepének és a H-híd kötések nagyobb arányának köszönhető. A víz mechanikai tulajdonságokra gyakorolt hatását mutatja az is, hogy a PVPVA64 és PVP25/PVP30 tartalmú minták nedvesség tartalom különbségei relatív viszonylatban is megmutatkoznak a szálak szilárdságában és deformálhatóságában.



45. ábra PVP25, PVP30 és PVPVA64 polimer alapú mikroszálak szakítószilárdág értékei (mN) a) etanol, b) víz oldószer alkalmazása estén, valamint a PVP25, PVP30 és PVPVA64 polimer mikroszálak, c) nyújthatósága és d) Young-modulus értékei az alkalmazott oldószer függvényében

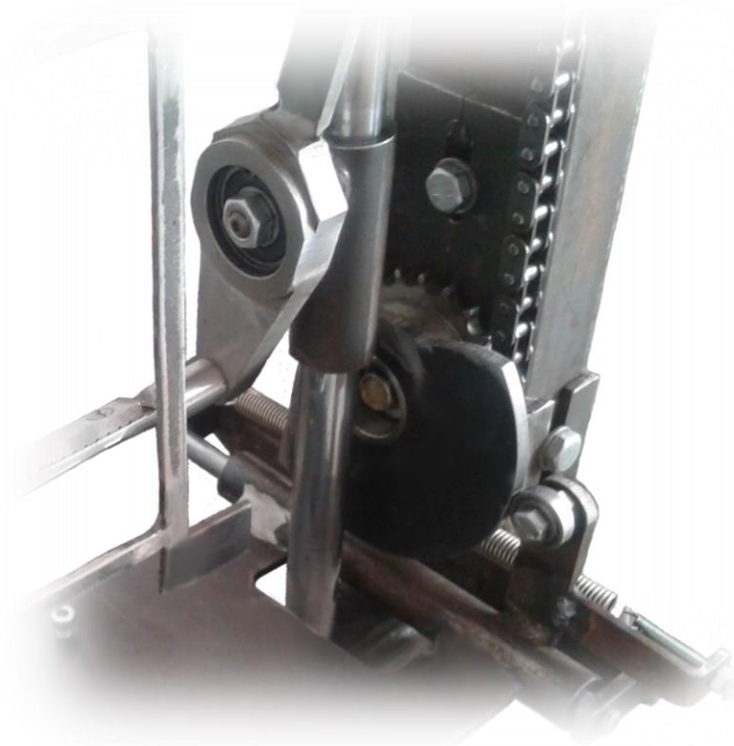
4.3. Saját fejlesztésű kontakt szálhúzó berendezés tervezése és prototípus készítése

Irodalmi kutatásaim és kísérleti munkáim, valamint az egyedi kivitelezésű centrifugális szálképző feltét tervezése során arra a megállapításra jutottam, hogy a mikroszálak előállítására legalkalmasabb centrifugális szálképzésnél még nem teljesen megoldott feladat a szálak kollektoron történő orientált gyűjtése, amely egyes esetekben ezen rendszerek végső formában (további feldolgozás nélkül), illetve szöveti regenerációban való felhasználásának fontos feltétele. A közös gondolkodás eredményeként született meg a mikroszálak újszerű metodikája szerinti előállításának ötlete. A találmányként bejelentett és kidolgozott ötletet a P1400283 ügyiratszámú szabadalmi leírás részletezi.

A gyógyszerészeti és orvosi alkalmazású kontakt szálhúzó berendezés (**46. ábra**) egy olyan, prototípussal rendelkező műszaki megoldás és kivitelezés, amellyel különböző polimer oldatokból orientált szálak struktúrájú, hatóanyagot tartalmazó lapkák állíthatók elő mechanikai erő segítségével, ahol összetett metodikájú mozgás során a szálhúzó fésű és az oldat kontaktusa révén keletkezik a szál. A szálhúzó gép önmagában oldat fázisból, vékony szálakból felépülő, a szálakat egymással párhuzamosan vagy egymásra merőlegesen tartalmazó lapkák előállítását biztosítja. A szálak képződés közbeni orientációját és rögzítését a hordozó keret belsejében elhelyezett, elektrosztatikusan feltöltött fémlemez segíti. A lapkák eltávolítása a hordozó keretről egyszerű kivágással történik.

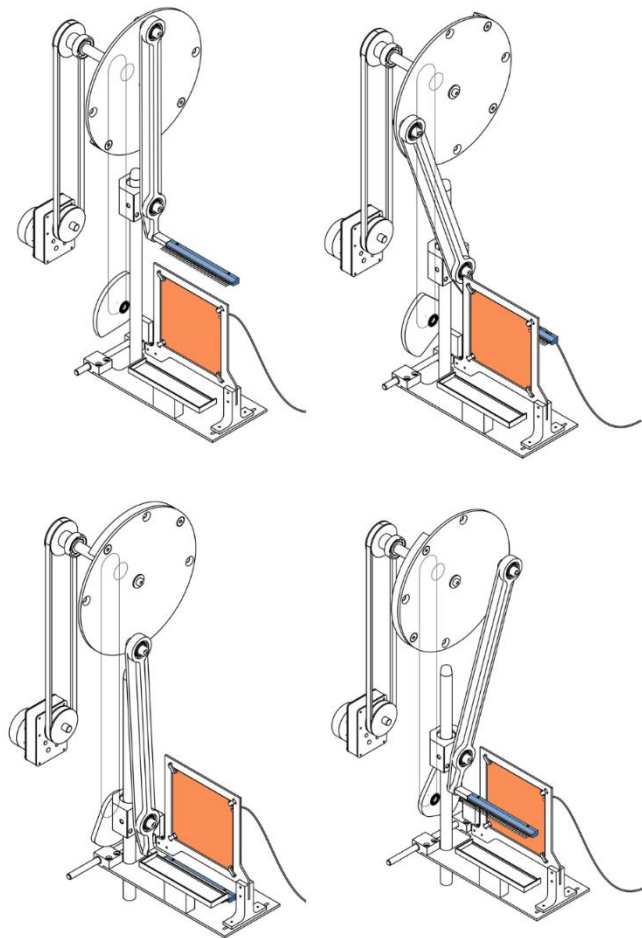
A szálhúzó gép mindazon területen felhasználható, különös tekintettel a gyógyszerészeti és orvos-biológiai alkalmazási területekre, ahol hatóanyag-tartalmú, szálak rendszerű lapkák vagy orientált szálirányú közti termékek készítése a cél, úgy mint mikroszálak gyógyszerhordozó rendszerekkel kapcsolatos kutatások, fejlesztések, valamint a polimer alapú közvetlen és közti terméken keresztül megvalósuló gyógyszerészeti készítmények (tabletták, kapszulák, sebfedő lapkák) és orvosi implantátumok kísérleti célú előállítása.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy a kontakt szálhúzó berendezés ciklikus mozgási metodikája révén (46., 47. ábra) képes folyadék fázisú, viszkózus polimer oldatokból szálát képezni és a létrejött szálakat a mozgással szinkronban működő keret segítségével lapkává formálni. A berendezés működtetésével a szálhúzó tüskéket tartalmazó fésűt és a szálszedő keretet hozzuk mozgásba. A szálak vastagsága a mozgás sebességével is szabályozható. A szálszedő keretbe helyezett sztatikus lap a szálakat magához vonzza és pozíciójukban rögzíti, így segíti a további ciklusokban képződő szálak egymáshoz viszonyított párhuzamos orientációját. A lapka mechanikailag stabil végső formája a szálszedő keret egy gyártási perióduson belül történő legalább egyszeri, síkjában 90°-os elforgatásával jön létre. Az elforgatás keresztirányú szálak keletkezését eredményezi. Az elkészült szövet a keretről könnyedén leválasztható olló vagy szike segítségével.

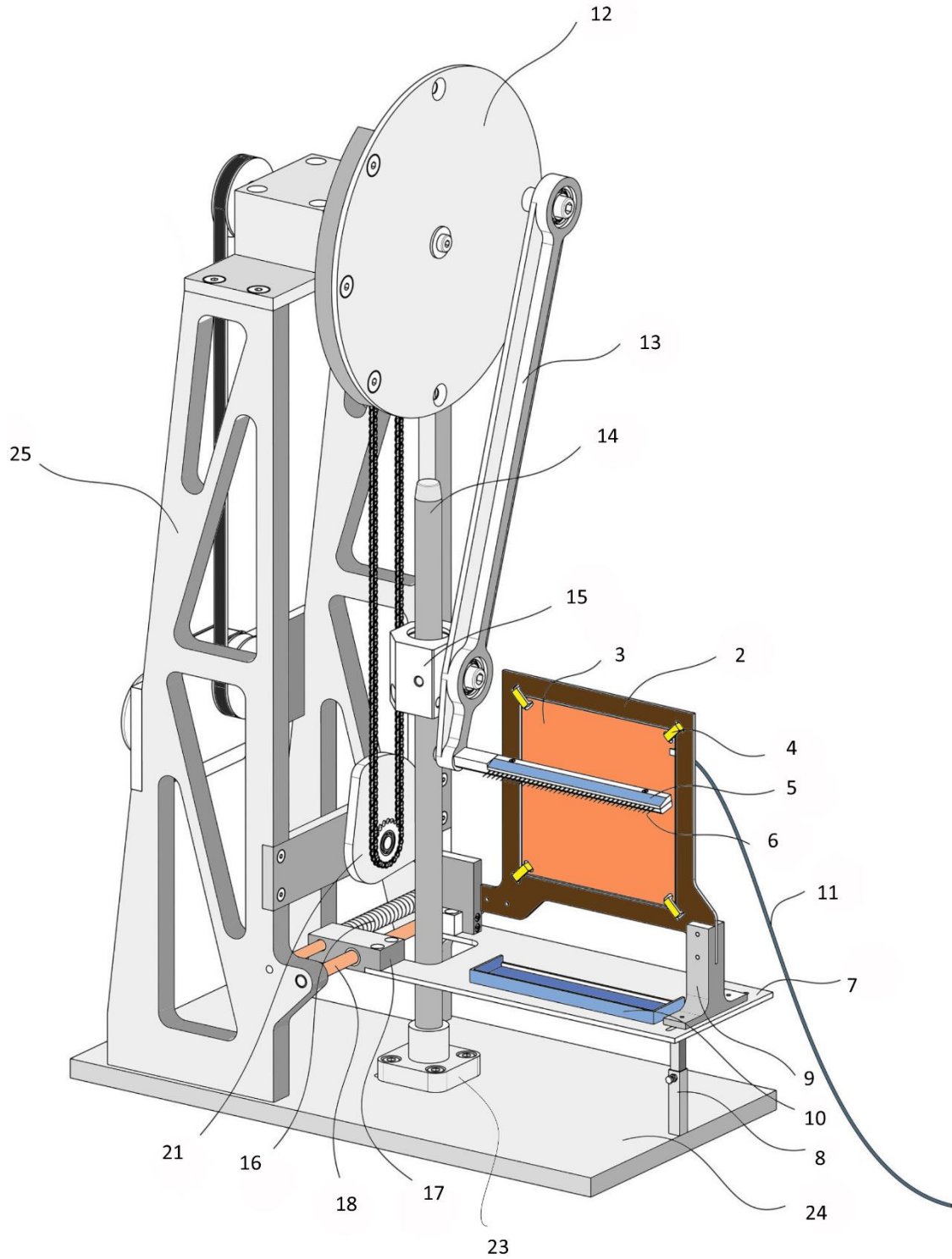


46. ábra A kontakt szálhúzó berendezés prototípusának ciklikus és oszcilláló mozgásáért felelős hajtóművéről készült digitális felvétel

A **48. ábrán** látható a szabadalom tárgyát képező kontakt szálhúzó berendezés bal oldali axonometrikus képe működési állapotban. Az (24) alaplap biztosítja az (25) állványt és a (23) talp közvetlen rögzítését. A (23) talphoz kapcsolódik a (14) vezető oszlop vertikálisan, amely a függőleges irányú, szálhúzásért felelős elmozdulás pályáját rögzíti. A (14) vezető oszlopon található a központos (16) csúszka, amelyet a csapágyas illesztésekkel ellátott (13) hajtórúd vezérel. A (13) hajtórúd (24) alaplapához közelebb eső végén, merőleges pozícióban található a (5) szálhúzó fésű, ami saját hosszirányú tengelye mentén tetszőlegesen elforgatható és rögzíthető. A (5) fésű leszerelhető előlapjában és hátlapjában kialakított süllyesztett bordák szolgálnak a (6) szálhúzó tüskék rögzítésére. A gép működése közben a (16) csúszka és a (13) hajtórúdon keresztül illeszkedő (5) fésű ciklikus mozgást végez. A (16) csúszka egyenes vonalú, míg a (5) fésű ellipszis pályán mozog.



47. ábra A kontakt szálhúzó berendezés bal oldali axonometrikus perspektívában ábrázolt mozgásának különböző fázisai

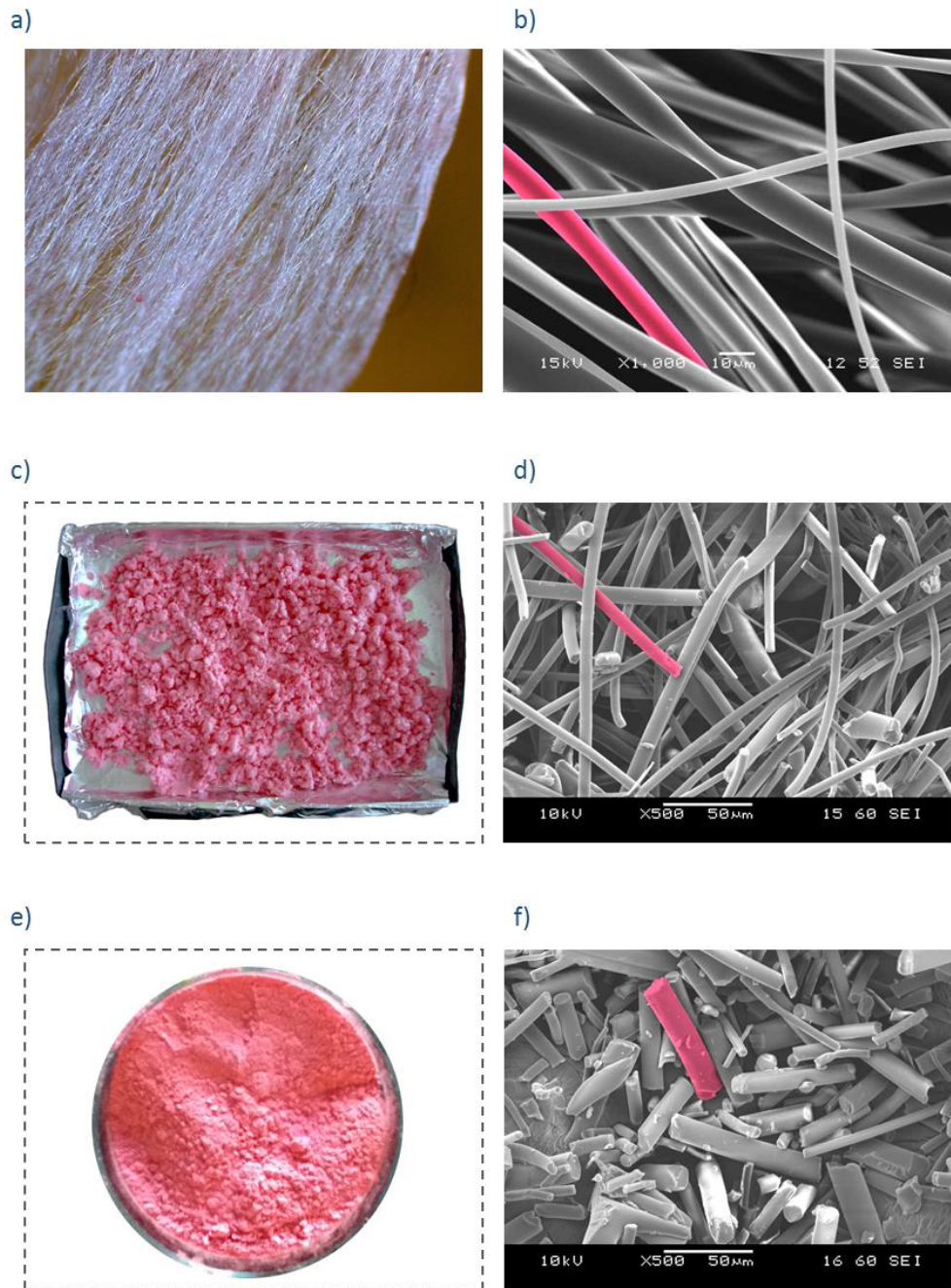


48. ábra A kontakt szálhúzó berendezés bal oldali axonometrikus képe működési állapotban

A kontakt szálhúzó berendezés és eljárás előnye, hogy a gyógyszerészeti és orvosi alkalmazású szálak kialakítására egy újfajta, egyszerű előállítási módot kínál. Orientált szálak struktúráját hoz létre egymástól szétválasztható individuális szálakból, amelyeket akár közvetlenül felhasználható lapkává formál. A humán szöveteket alkotó sejtek növekedésére bizonyítottan fokozott serkető hatással bíró mikrométer átmérőjű szálak készíthetők vele. A hatóanyagot akár heterogén diszperz rendszer formájában tartalmazó szuszpenziós gélekből is szálak képezhetők.

4.4. Mikroszálak polimer-hatóanyag mátrix tablettázása

A mikroszálak gyógyszeripari felhasználhatóságával kapcsolatos több fontos kérdés közül az egyik az, hogy ezen anyagi rendszerek alkalmasak-e olyan további feldolgozásra, amely révén a szálképzés beépíthető a klasszikus gyógyszer technológiai műveletek sorába és felhasználásukkal előállíthatók-e a klasszikus gyógyszerformák, mint például a tabletták. Ezen belül vizsgálendő az is, hogy a szükséges feldolgozási művelet destruktív-e a forma előnyös tulajdonságait részben determináló mikroszerkezeti struktúrára. A kérdés megválaszolására tett kísérleteim alapjára a tabletták formulálás egyszerűsített műveleti folyamatát állítottam össze, ahol a szálképzés a hatóanyag polimer mátrixba történő 'beépítését' szolgáló műveletként értelmezhető (pl. örvényáramú granulálás, fluid granulálás). A tablettázandó véghomogenizátum szempontjából az egységes szemcseméret és a megfelelő fizikai tulajdonságok elérése a cél, amely a valóságban természetesen kiegészül a megfelelő *in vitro* kioldódási eredmények és a megfelelő *in vivo* farmakokinetikai profil érdekében támasztott szemcseméret, valamint szemcseméret eloszlás kritériumokkal. A mikroszálak, arányaiban rendkívül nagy hossza miatt, az anyag aprítására és mechanikai úton történő mikronizálására van szükség, amely a makroszerkezetre nézve egyértelműen destruktív hatású. A **49. ábra** a B₁₂-vitamin tartalmú szálak mikronizálásakor elvégzett egyes lépések fázis termékeit, míg a **16. táblázat** a különböző segédanyag összetételű tabletták homogenizátumok fizikai tulajdonságainak mérési eredményeit mutatják.

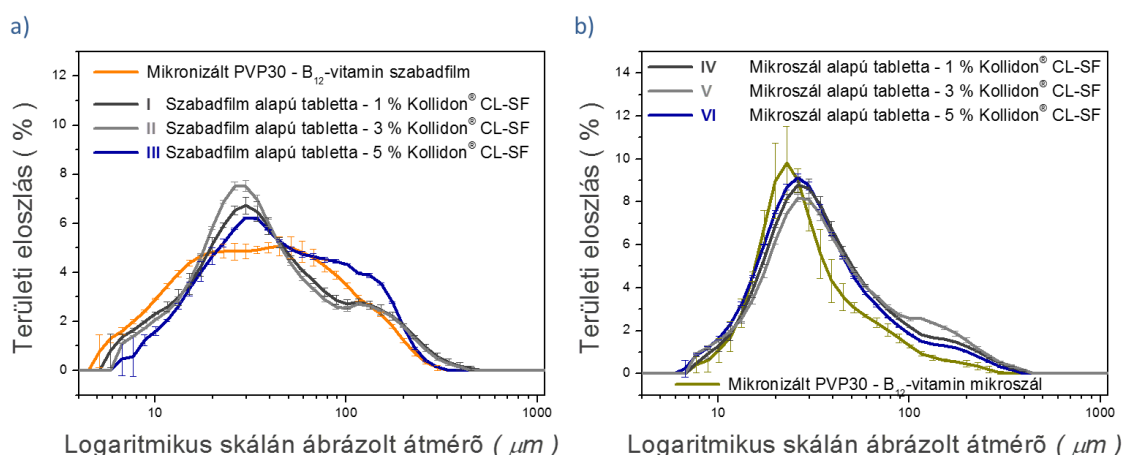


49. ábra A B₁₂-vitamin tartalmú mikroszálak mikronizálásakor keletkező fázistermékek, ahol a) a mikroszálakról készült digitális és b) SEM felvétel látható, c) a durva aprítás során keletkezett anyag digitális és d) SEM felvétele, míg e) a mikronizált minta digitális és f) SEM felvétele

16. táblázat A mikronizált szabadfilm, valamint mikronizált mikroszál és az egyes tableta homogenizátumok fizikai vizsgálati eredményei

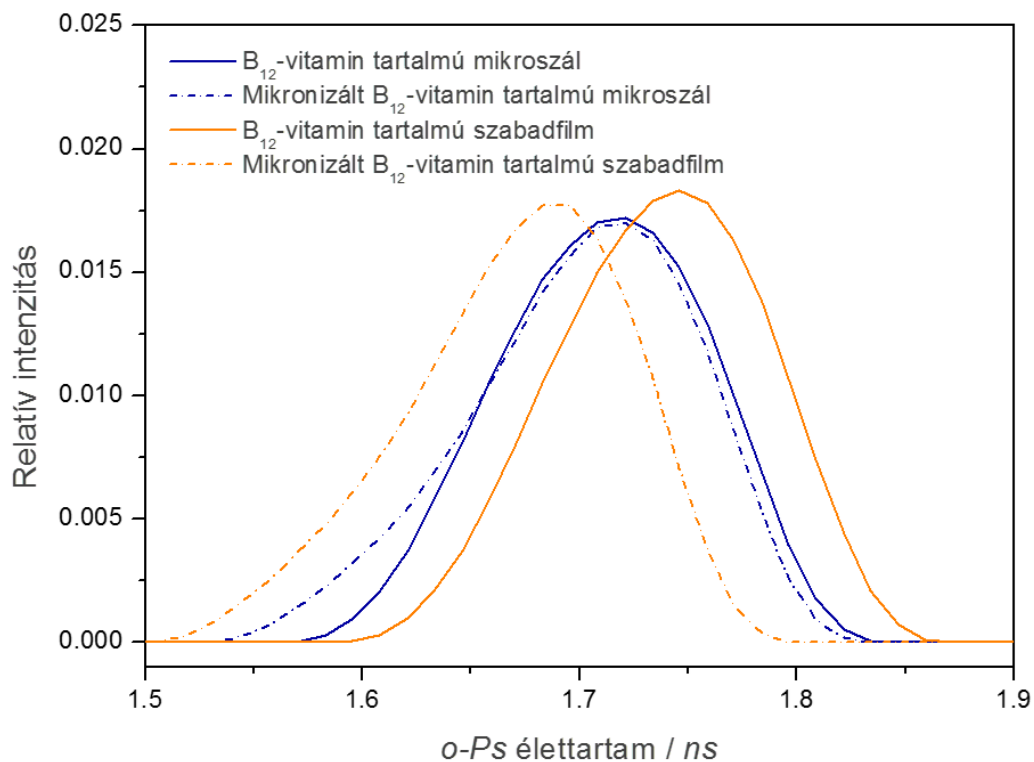
Homogenizátum azonosítója (Öntöttfilm alapú: I-III.) (Mikroszál alapú: IV-VI.)	Tömörítetlen térfogat (g/ml)	Tömörített térfogat (g/ml)	Hausner faktor	Carr index	Gördülékenység (s/10g)
Szabadfilm (mikronizált)	0,548 ± 0,005	0,633 ± 0,002	1,15	13,4	2,3 ± 0,2
Mikroszál (mikronizált)	0,338 ± 0,019	0,633 ± 0,018	1,87	46,5	_____
I	0,414 ± 0,005	0,534 ± 0,006	1,29	22,3	2,6 ± 0,0
II	0,393 ± 0,008	0,525 ± 0,001	1,33	25,0	6,4 ± 0,3
III	0,385 ± 0,009	0,511 ± 0,004	1,33	24,6	7,2 ± 0,5
IV	0,399 ± 0,006	0,534 ± 0,004	1,34	25,2	6,7 ± 0,6
V	0,382 ± 0,010	0,528 ± 0,001	1,38	27,7	7,7 ± 0,3
VI	0,369 ± 0,003	0,508 ± 0,003	1,38	27,4	10,1 ± 0,2

A felvételeken jól látható, hogy a mikronizálást követően az anyag szálás habitusát megőrizve töredezett apróbb darabokra. A művelet hatékonyságát kedvezően befolyásolja az, hogy a centrifugális szálképzés során sűrű kapcsolódási pontoktól mentes, individuális szálak keletkeznek. Referenciapontként a kísérleteket és méréseket párhuzamosan elvégeztem azonos összetételű, de öntött film alapú rendszereken is. A mikroszálás tableta homogenizátum esetében abszolút értékben is megfelelő, de az öntöttfilm alapú összetételhez képest is egységesebb, és a kioldódás szempontjából kedvezőbb szemcseméret-eloszlást tapasztaltam (**50. ábra**). Azonban várható módon, mindkét esetben megjelent az eloszlás bimodális jellege.



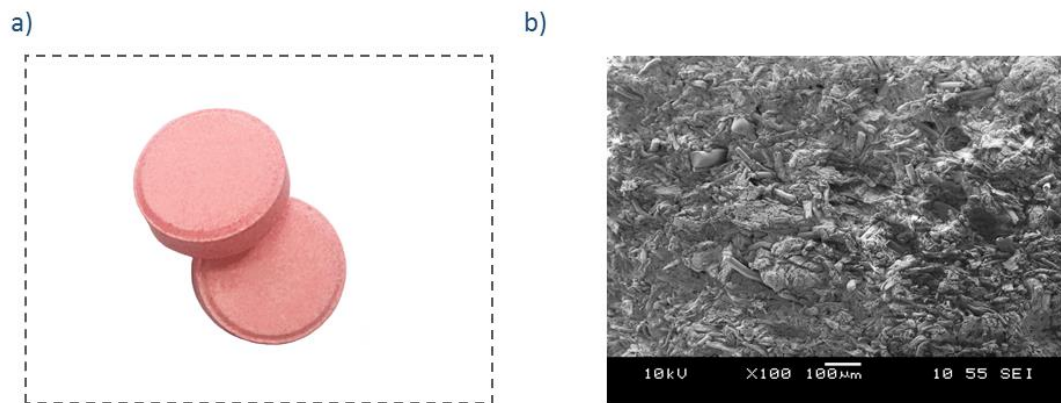
50. ábra A B₁₂-vitamin tartalmú a) mikronizált szabadfilm és az egyes tableta homogenizátumok, valamint b) a B₁₂-vitamin tartalmú mikronizált mikroszál és az egyes tableta homogenizátumok szemcseméret eloszlás görbéi

A polimer szálon belüli mikroszerkezet mikronizáláskor bekövetkező esetleges változásának vizsgálatát PALS műszeres technikával végeztem. Az **51. ábrán** látható, szabadtérfogattal arányos *o-Ps* élettartam értékek eloszlása a mikronizálatlan és mikronizált szálak esetén kvázi változatlan maradt, míg a szabadfilmek szabadtérfogát méreteinek eloszlása a mikronizálást követően eltolódott. A grafikusán ábrázolt eredmények alapján elmondható, hogy a szálak mikronizálása megvalósítható anélkül, hogy a rendszer kezdeti mikroszerkezeti struktúrája megváltozna. Specifikusan ezen anyagi rendszerre vonatkoztatható nem destruktív tulajdonság jelentősége az, hogy a tablettá formulálásához nélkülözhetetlen mikronizálás a fajlagos felület növelésén kívül nem jár a kioldódásra és a készítmény viselkedésére nézve további, feltehetően nem kontrollálható változással.

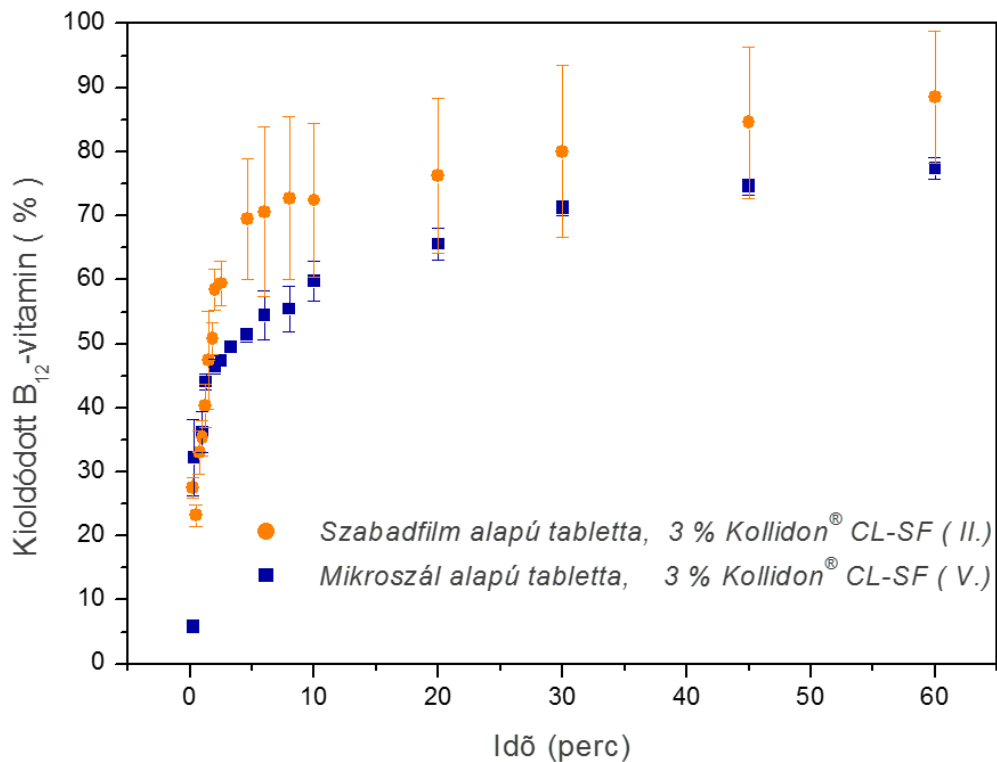


51. ábra A mikronizált és mikronizálatlan, B₁₂-vitamin tartalmú szabadfilmek, valamint mikroszálak *o-Ps* élettartam eloszlás görbéi

Az **52. ábrán** mutatott készítményből végzett kioldódás eredményei (**53. ábra**), az egyes mintavételi pontokban mutatott szórás értékek alátámasztják az előzőekben ismertetett konklúziót. A görbe által kirajzolt profil alapján kijelenthető, hogy a hatóanyag tartalmú mikroszálak potenciálisan felhasználhatók lehetnek klasszikus gyógyszerformák előállításához.



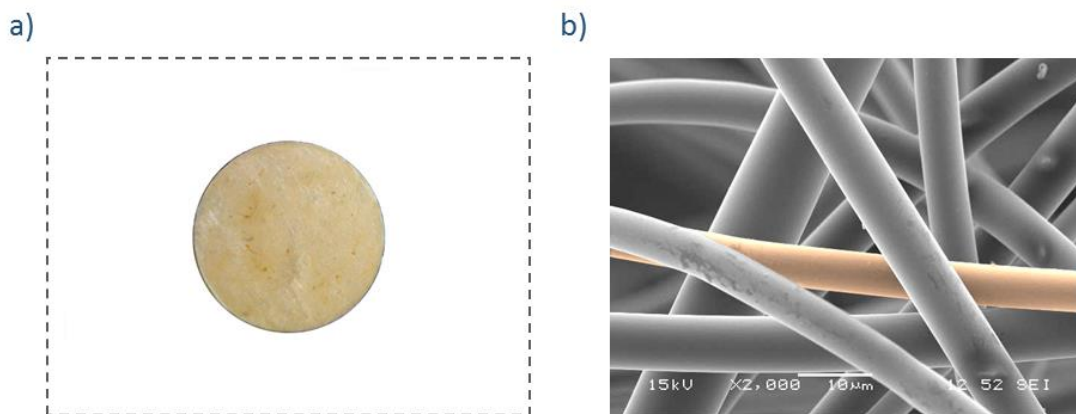
52. ábra B₁₂-vitamin tartalmú mikroszálak felhasználásával készített tabletta a) digitális, felülnézeti és b) keresztmetszeti SEM felvétele



53. ábra B₁₂-vitamin tartalmú mikroszál és szabadfilm alapú tabletták kioldódás görbéi

4.5. Hatóanyag tartalmú mikroszálak struktúra antibakteriális hatásának vizsgálata

A hatóanyag tartalmú mikroszálak gyógyszerészeti vonatkozású felhasználhatósága két fő típusra osztható. Az alkalmazás módja szerinti csoportosítás alapján az orálisan alkalmazandó készítmények közül a tablettává formulálhatóságot az előző fejezetben tárgyaltam (4.5.). A másik csoportot jelentő megközelítésben viszont a szálak szövetedékek közvetlenül is felhasználhatók topikális készítmények, sebkezelő lapkák vagy kötszerek formájában. A sebek kezelésének releváns célja a szöveti regeneráció elősegítése és a megfelelő antibakteriális hatás kifejtése, az infekció visszaszorítása és a szeptikus sokk kialakulásának megelőzése. Ezen utóbbi célt véve alapul olyan kísérleteket végeztem, amelyekkel a szálak struktúra antibakteriális hatású, topikális alkalmazhatóságát kívántam megvizsgálni. A mérésekhez az **54. ábrán** látható, povidon-jód komplexet tartalmazó, korong formájú mintákat készítettem.



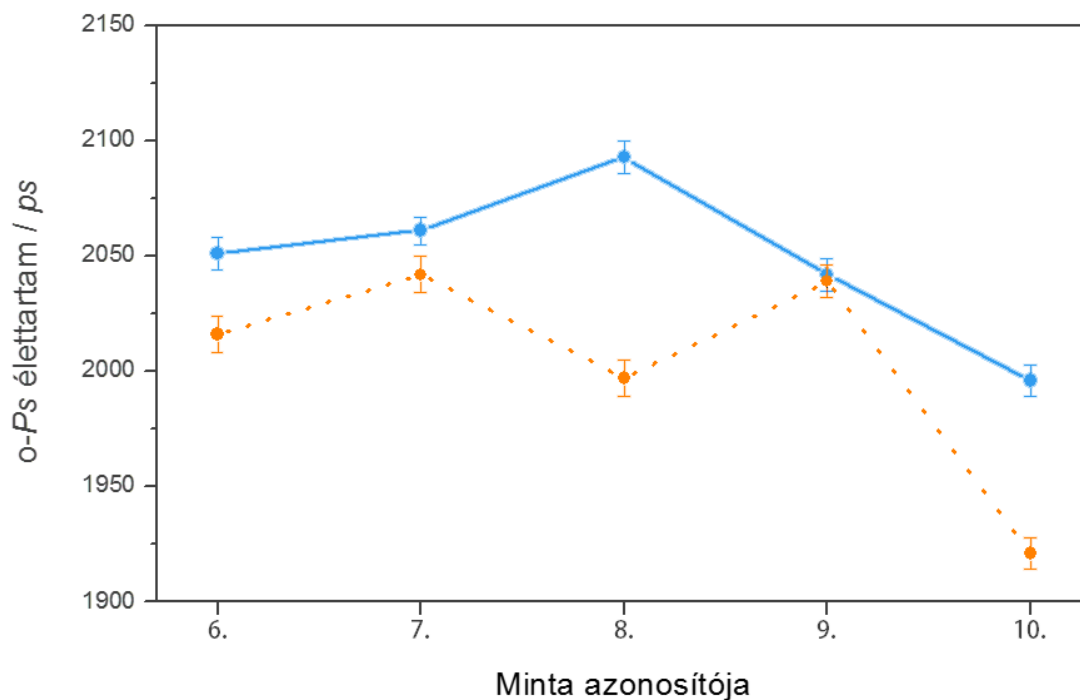
54. ábra Povidon-jód komplex tartalmú mikroszálak korong a) digitális és b) SEM felvétele

A különböző PVPVA64 – PVP25 (6-10. minták) polimer arányú mintákat alkotó individuális mikroszálak átlagos szálvastagságait és a korongok átlagos jódtartalmát a **17. táblázat** foglalja össze. Az adatok alapján a PVPVA64 alapú minták tartalmazták a legnagyobb mennyiségben jódot, míg a PVP25 alapú szövetedékek a legkevesebbet. Az átlagos szálvastagságokat tanulmányozva pedig egy olyan tendencia rajzolódik ki, ahol a polimerként csak PVPVA64-et tartalmazó mintáktól a kizárólag PVP25 polimer alapú minták felé haladva látható, hogy a kapott szálak vastagsága megnő.

17. táblázat Povidon-jód komplex tartalmú mikroszálal minták átlagos hatóanyag-tartalom és átlagos szálvastagság adatai

Minta azonosítója	PVP25 - PVPVA64 arány	Jód koncentráció (m/m %)	Átlagos szálvastagság (μm)	
			Jód nélkül	Jódtartalommal
6.	0:1	$2,7 \pm 0,04$	$2,49 \pm 0,18$	$4,34 \pm 0,11$
7.	1:2	$3,5 \pm 0,07$	$6,13 \pm 0,10$	$5,70 \pm 0,20$
8.	1:1	$2,2 \pm 0,12$	$6,04 \pm 0,21$	$6,21 \pm 0,08$
9.	2:1	$2,1 \pm 0,14$	$5,96 \pm 0,03$	$7,67 \pm 0,17$
10.	1:0	$0,6 \pm 0,07$	$6,42 \pm 0,14$	$6,08 \pm 0,15$

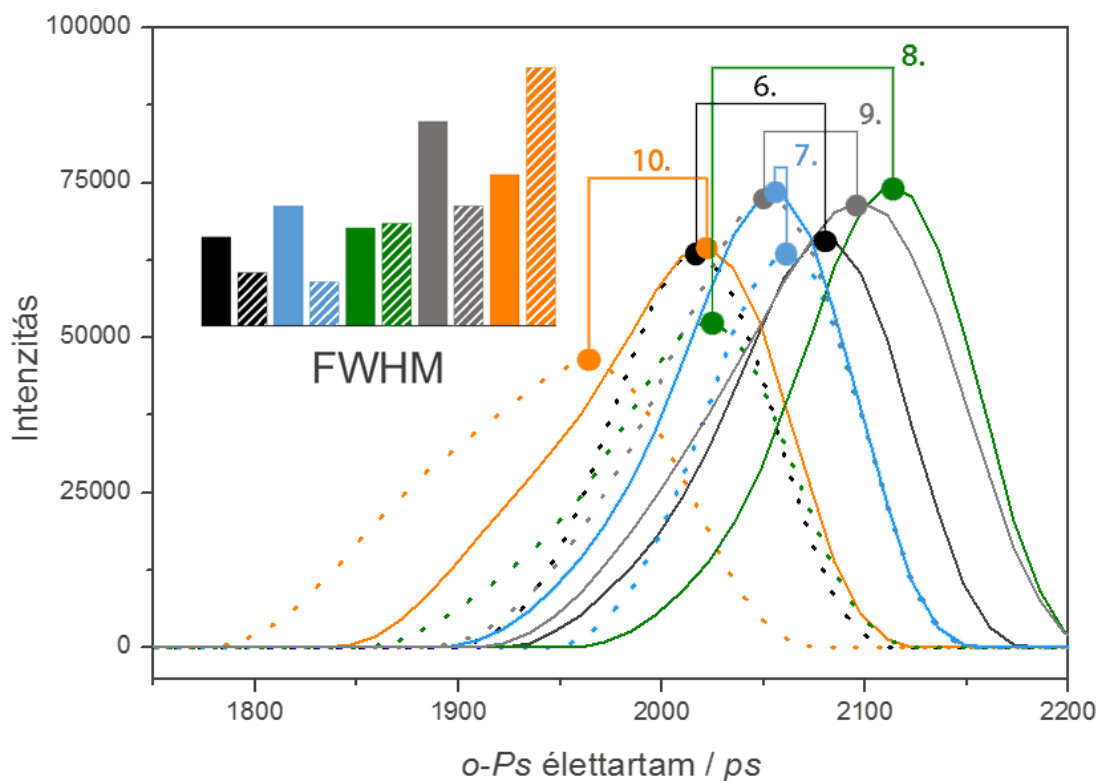
A jódot nem tartalmazó és jódtartalmú minták összehasonításával, a szálvastagságokban megjelenő különbség tendenciája ugyan nem egyértelmű, de az megmutatkozik, hogy a nagyobb hatóanyag-tartalom a szálvastagságot befolyásoló tényezőként lép fel. A szálvastagság polimerek arányával összefüggésben bekövetkező változása a szálképző oldat viszkozitására és a viszkoelaszticitásra visszaható, a szálképződés folyamatakor kialakuló szupramolekuláris viszonyokra vezethető vissza. A PVPVA64 polimer vinilacetát csoportjai miatt a szálakon belül létrejövő, víz közvetítette H-híd kötések kisebb arányban vannak jelen, mint a PVP25 polimert nagyobb mennyiségben tartalmazó szálakban. A vinilacetát molekuláriszerek pedig sztérikus tulajdonságaik miatt önmagukban is a láncok közötti nagyobb távolságot és lazább kapcsolódást eredményeznek. Ezzel együtt a PVPVA64 polimer rendszerek átlagos nedvességtartalma, vízmegtartó képessége szintén alacsonyabb a vinilacetátot nem tartalmazó PVP polimer rendszerekéhez képest (**4.4. fejezet**). Ezen tulajdonságok együttesen eredményezik azt, hogy a PVPVA64 polimer gél centrifugális erő ellenében ható viszkozitása és viszkoelaszticitása kisebb, ami a szálak elvékonyodásának kedvez és vékonyabb szálú végterméket eredményez. A szálak átlagos vastagsága ugyan növekvő tendenciát mutat a PVPVA64 – PVP25 (6-10. minták) sorrendben, de a mikroszerkezetet jellemző szabad térfogatok ezzel fordítottan arányosan csökkennek. Az **55. ábrán** látható, szabad térfogattal arányos *o- P_s* élettartamok e csökkenést bizonyítják, miközben látható az is, hogy a jód jelenléte a csökkenést tovább fokozza, részben a térkitöltés, részben pedig a polimer láncok közötti távolságra gyakorolt hatása révén.



55. ábra A 17. táblázatban felsorolt minták esetében mért *o*-Ps élettartamok, ahol a folytonos (kék) vonal a jódot nem tartalmazó mintákhoz, míg a szaggatott (narancssárga) a jódtartalmú mintákhoz tartozó értékeket jelölik

Az *o*-Ps élettartamok eloszlás görbéi (56. ábra) a polimer láncok között kialakuló szabad térfogati üregek méreteinek eloszlását, egységességét mutatják, ahol a görbék nagyobb szélessége az üregek méreteinek nagyobb diverzitását jelentik. Látható, hogy a PVPVA64 szálak 55. ábrán jelölt, relatívan nagyobb üregméretei szűkebb tartományban, egységesebben oszlanak el, ami a polimer láncok vinilacetát csoportok révén kialakuló egységes szupramolekuláris rendezettségére utal. Ezen mikroszerkezeti sajátosságok eredményezik azt, hogy a PVPVA64 polimert nagyobb arányban tartalmazó szövetek hatóanyag tároló kapacitása, átlagos jódtartalma is nagyobb a csak PVP25 polimert tartalmazó szövetekéhez képest. Külön kiemelendő azon megfigyelés, amely a polimer arányok szerepének alaposabb értékelésekor adódik. Megfigyelhető az, hogy a 7. mintánál alkalmazott polimer arány mellett a jódtartalom szignifikánsan magasabb a többinél, miközben a hozzá tartozó eloszlások karaktere és eltolódása szóráson belüli értékeket vesz fel. Ez arról tanúskodik, hogy a polimer láncok alkotta szupramolekuláris szerkezet a jód beépítése következtében csak

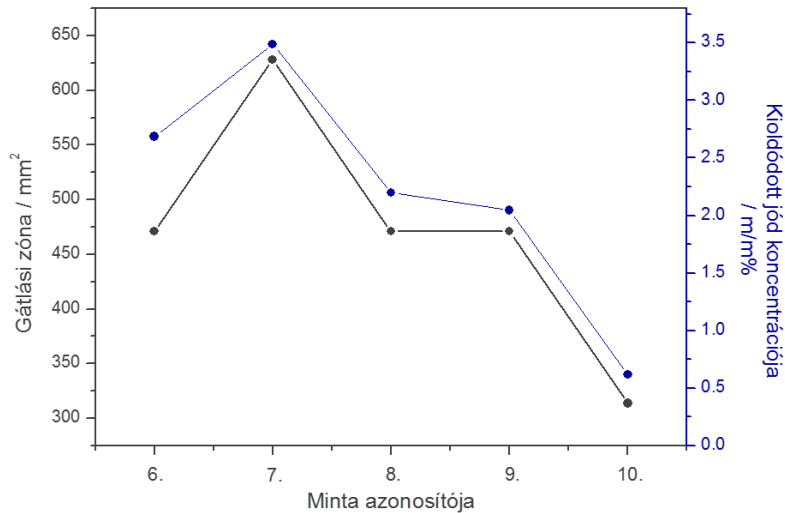
elhanyagolható mértékben változik meg, továbbá a molekuláris homogenitás is nagyobb. E feltételezések abban az esetben igazak, amennyiben a 7. minta polimer-jód anyagi rendszere szilárd oldat formájában van jelen, míg a többi esetben szilárd diszperzióként. Bár az értekezés és a jelen fejezet célkitűzése nem ennek vizsgálata volt, mégis döntő felismerés lehet a készítmény terápiás jelentősége és stabilitása szempontjából. Az előzőekben tárgyalt összefüggések antibakteriális hatását *in vitro* körülmények között, *Streptococcus pyogenes* ATCC 30013 baktérium törzsen végzett agar-diffúziós inhibíciós, valamint kinetikai méréssel vizsgáltam.



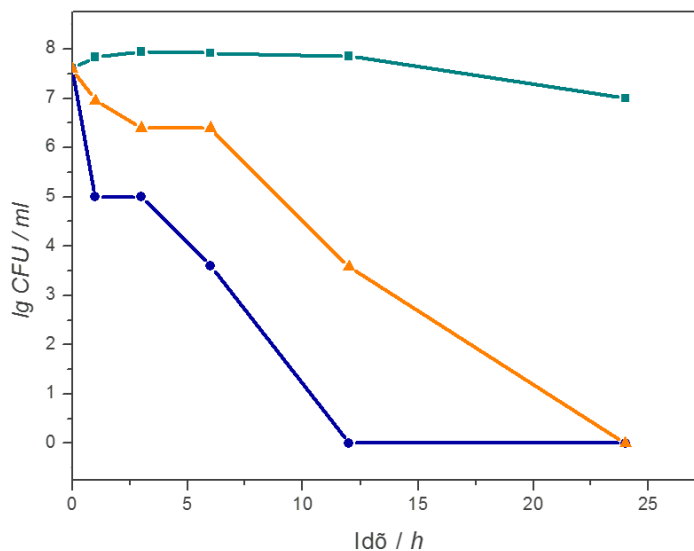
56. ábra A 17. táblázatban felsorolt minták esetében mért *o-Ps* élettartamok eloszlás görbéi, ahol a folytonos vonalak a jódot nem tartalmazó mintákat, míg a szaggatott vonalak a jód tartalmú mintákat jelölik (fekete: 6., kék: 7., zöld: 8., szürke: 9., narancssárga: 10.)

Az agar-diffúziós inhibíciós vizsgálat eredményei (57. ábra) azt igazolták, hogy a mikroszálás sebfedő korongok a jód tartalommal arányos gátlási zónát, illetve ezzel arányos antibakteriális hatást képesek kifejteni. A csak PVPVA64, valamint csak PVP25 polimer alapú készítményekkel végzett kinetikai vizsgálat eredménye (58. ábra)

szintén alátámasztja a polimer struktúrára és hatóanyag tároló kapacitásra vonatkozó megállapításokat. Összefoglalásul tehát elmondható, hogy a PVP polimer alapú mikroszálás rendszerek potenciálisan alkalmasak topikális felhasználásra és antibakteriális kezelésre, ezzel együtt azonban erősítik azt a kutatási irányt is, amely a szálas rendszerek közvetlen felhasználásával más egyéb, lokális vagy szisztémás hatást kifejtő készítmények fejlesztését célozzák.



57. ábra Különböző, PVP alapú mikroszálás minákkal végzett *in vitro* agar-diffúziós inhibíciós vizsgálat eredményeinek grafikus ábrázolása, ahol a fekete színű görbe a mintákhoz tartozó gátlási zónákat, míg a kék színű görbe az azonos mintákhoz tartozó jód koncentrációkat mutatja



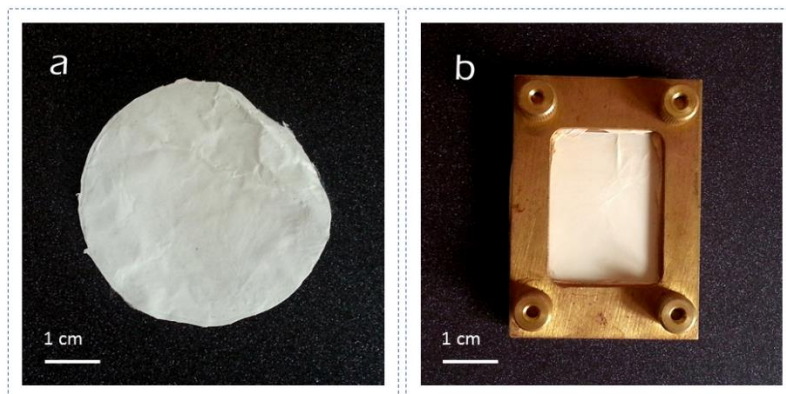
58. ábra A PVPVA64 (kék) és PVP25 (narancssárga) polimer alapú mikroszálás mintákkal, *S. pyogenes* baktériumtörzsen végzett kinetikai vizsgálat eredményének grafikus ábrázolása, ahol a zöld színű görbe a kontroll mintákat jelöli

4.6. Topikális alkalmazású, multirétegű nanoszálal sebfező rendszer fejlesztése

A hatóanyag-tartalmú és polimer alapú szálal rendszerek közvetlen felhasználásának egyik legkiemeltebb célja olyan készítmények előállítása és fejlesztése, amelyek a rendszer elönyös tulajdonságainak kihasználásával teszik lehetővé a topikális alkalmazást. Kutatómunkám utolsó kísérleteiben elektrosztatikus szálképzés segítségével multirétegű sebfező rendszereket állítottam elő azzal a céllal, hogy a lokálisan kezelni kívánt területen a hatóanyag időben nyújtott leadásának, valamint hosszú tartózkodásának biztosítása révén a sebek gyógyulását, a szövetek regenerációját, és bakteriális fertőzéseinek hatékony terápiás kezelését valósítsam meg (szabadalmi bejelentés ügyiratszám: P1600505/19).

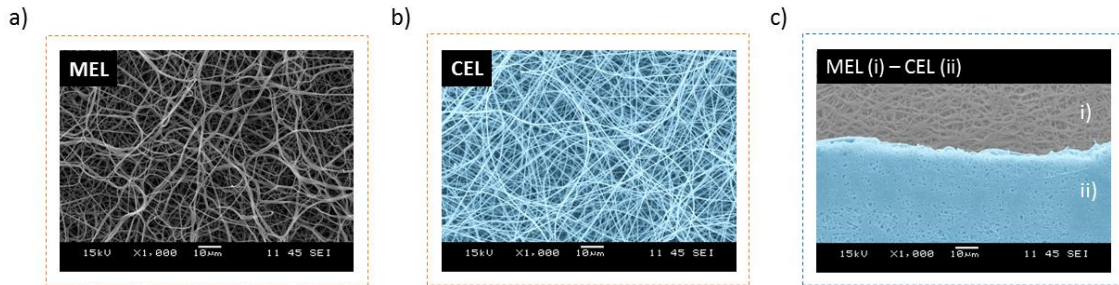
4.6.1. A formulációs kísérletek eredménye

A kísérletekhez elektrosztatikus szálképzéssel állítottam elő az **59. ábrán** látható hatóanyagmentes, valamint a kolisztin szulfát (CEL) és APO monomer tartalmú PVA szálalplanokat, aszeptikus körülmények között. A multirétegű vizsgálati mintákat két, funkciójában eltérő alapréteg, eltérő számú és elrendezésű összeillesztésével hoztam létre, ahol a hatóanyagmentes PVA szálalplan utólagos hőkezelésével jött létre a hatóanyag nyújtott leadását dominánsan befolyásoló membrán (MEL).



59. ábra Az elektrosztatikus szálképző eljárással előállított a) hatóanyag-tartalmú, nanoszálal szálalplan és b) a hatóanyagmentes rétegből hőkezelés útján keletkező membrán réteg digitális felvétele

Az egyes rétegekről készített SEM felvételeken (60. ábra) jól látható a szálak véletlenszerű elrendeződése és az, hogy az egységes szálvastagságú minta teljes egészében cseppmentes.



60. ábra A multirétegű, nanoszálal sebfező rendszer egyes rétegeinek SEM felvétele, ahol a) a membránréteg, b) a hatóanyag-tartalmú réteg és c) az összeillesztett a-b rétegek képe 1000-szeres nagyításban

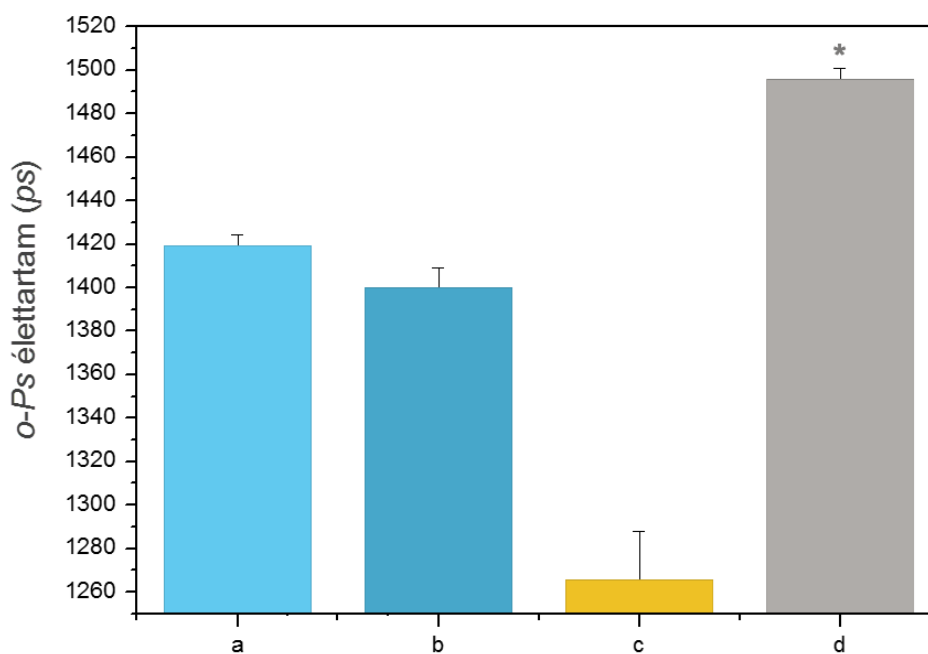
A szövedékeket alkotó szálak morfológiai vizsgálatának eredményeit a 18. táblázat foglalja össze. A CEL réteget alkotó szálak közel 20 %-al vastagabbak a MEL réteget alkotó szálakhoz képest, amely különbséget a nedvességtartalom és a hőkezelés során kialakuló keresztmetszések okozzák. Mindkét esetben látható, hogy a szálak közötti távolság 4-6-szorosa a szálátmérőnek.

18. táblázat A multirétegű, nanoszálal sebfező rendszer egyes rétegeinek morfológiai vizsgálati eredményeinek táblázatos összefoglalása

CEL		MEL			
Szálvastagság (μm)	Szálak közötti távolság (μm)	Szálvastagság (μm)	Szálak közötti távolság (μm)	Száraz membrán vastagsága (μm)	Nedves membrán vastagsága (μm)
0,5 ± 0,1	2,2 ± 0,4	0,4 ± 0,1	2,4 ± 0,8	101,3 ± 21,4	49,4 ± 3,9

A multirétegű sebfező rendszer, következő fejezetben részletezett működésének egyik feltétele a nedves környezet. E környezetre nézve reprezentatív módon megvizsgáltam, hogy a membrán réteg nedvesség hatására miként viselkedik. Az átlagosnál vékonyabb alufóliához hasonlítható merevségű membrán száraz állapotban jól tűri a mechanikai terhelést és enyhén rugalmas.

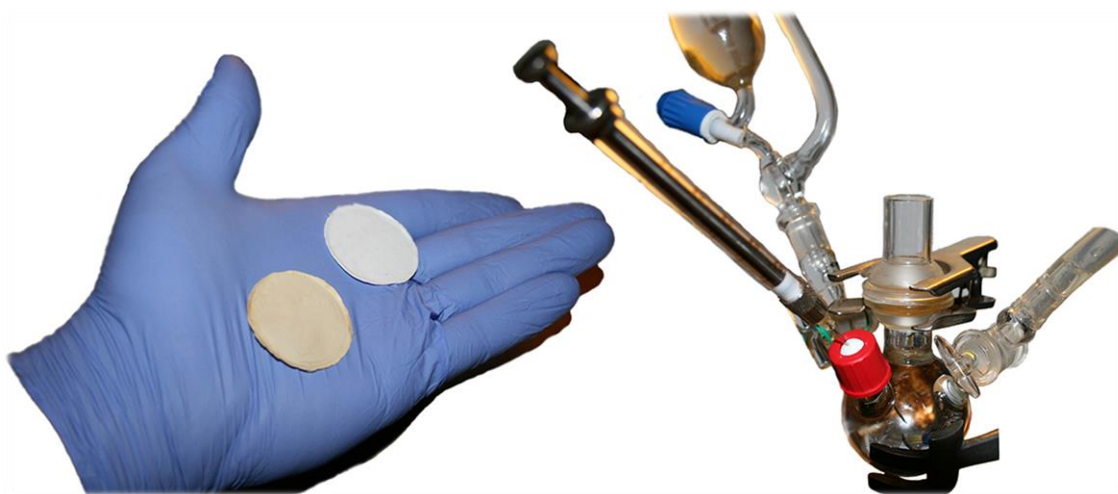
Összegyűrés hatására minimálisan nyeri csak vissza eredeti formáját, azonban nedvességgel érintkezve az anyag azonnal meglágyul. Vízrel teli edénybe ejtett és összegyűrt nanoszálalás membrán pillanatszerűen nyeri vissza eredeti állapotát, miközben a víz felszínén teljesen kifeszül. A száraz állapotú réteg megközelítőleg kétszer vastagabb a nedves állapotú mintához képest. Ezt követően az egyes szövetedékeket alkotó szálak mikroszerkezeti jellemzőit PALS módszerrel, az *o*-Ps élettartamok meghatározásával végeztem el (**61. ábra**). A hatóanyagmentes (a), valamint a CEL (b) és MEL (c) rétegek összehasonlításából megállapítható, hogy a membránt alkotta szálak polimer láncai szignifikánsabb kisebb szabad térfogatokat alkotnak a másik két réteg polimer láncaihoz képest, amely igazolja a láncok közötti keresztkötések kialakulását, valamint a keresztkötések és a nedvesség-tartalom elvesztése miatt bekövetkező szálvastagság csökkenését. Az is látható, hogy bár a hatóanyagmentes és CEL réteg nedvességtartalma feltételezhetően nagyobb a membránéhoz képest, ezzel együtt a nagyobb szabad térfogatuk egy lazább mikroszerkezeti elrendeződésre és potenciálisan nagyobb hatóanyag-tároló kapacitásra enged következtetni. A kolisztin szulfát részben szabad térfogatot kitöltő tulajdonságát az *o*-Ps élettartam csökkenése mutatja a hatóanyagmentes mintához viszonyítva.



61. ábra A multirétegű sebfedő rétegek *o*-Ps élettartamai, ahol a) a hatóanyagmentes réteg, b) a kolisztin szulfát tartalmú réteg (CEL), c) a membránréteg (MEL) és d) porított PVA alapanyag

4.6.2. Hatóanyag szabályozható felszabadulásnak vizsgálata egyedi tervezésű kioldócellában

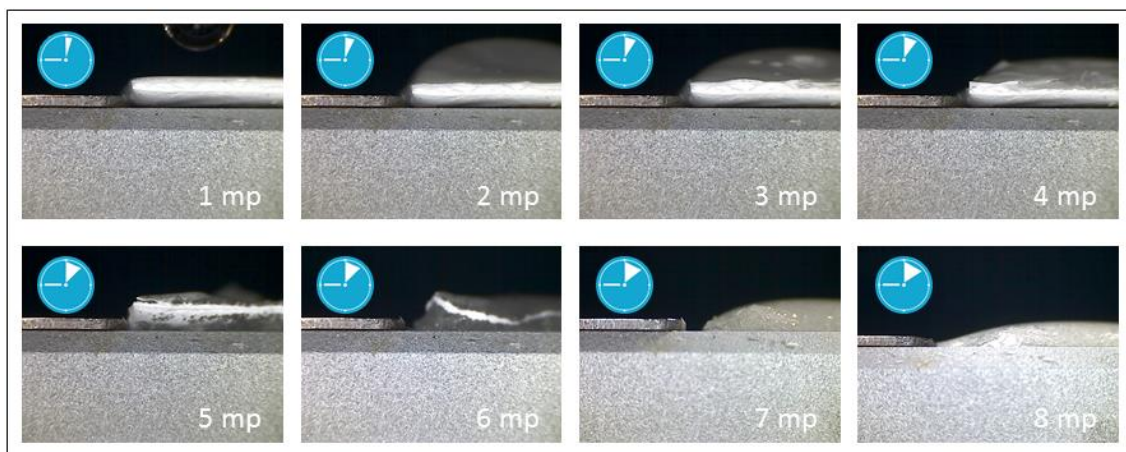
A CEL és MEL monorétegek együttesen alkotják (62. ábra) az elképzelt szerint létrehozott sebfedő készítményt. A hatóanyag leadásának szabályozása az egyes rétegek elrendezésének és a membrán vastagságának csökkentésével vagy növelésével valósítható meg. A hatóanyag optimális tartózkodási idejének és a felszabadulás megfelelő kinetikájának eléréséhez *in vitro* körülmények között vizsgáltam a sebfelületet jelentő folyadékfelszínnel közvetlenül érintkező membrán vastagságának és a rétegek alternáló elrendezésének kioldódásra gyakorolt hatását. Ehhez egy olyan kioldó cellát készítettem, amellyel a klasszikus gyógyszerformák kioldódásához használt berendezéseknél alkalmazott megoldással analóg módon tudtam vizsgálni a hatóanyag felszabadulását. A minta úgy helyezhető el a méréskor, hogy reprezentálni tudja a seb felületére tett minta folyadékkontakt viszonyait. A kidolgozott módszer és eszköz a sebfedő készítmény teljesítőképességének anyagi rendszer megközelítésű vizsgálatára alkalmas.



62. ábra A hatóanyag-felszabadulás vizsgálatához használt többrétegű sebfedő rendszert alkotó PVA rétegek (lent: membrán, fent: hatóanyag-tartalmú réteg) (bal oldal) és a vizsgálatához használt egyedi tervezésű kioldó cella (jobb oldal) fényképe

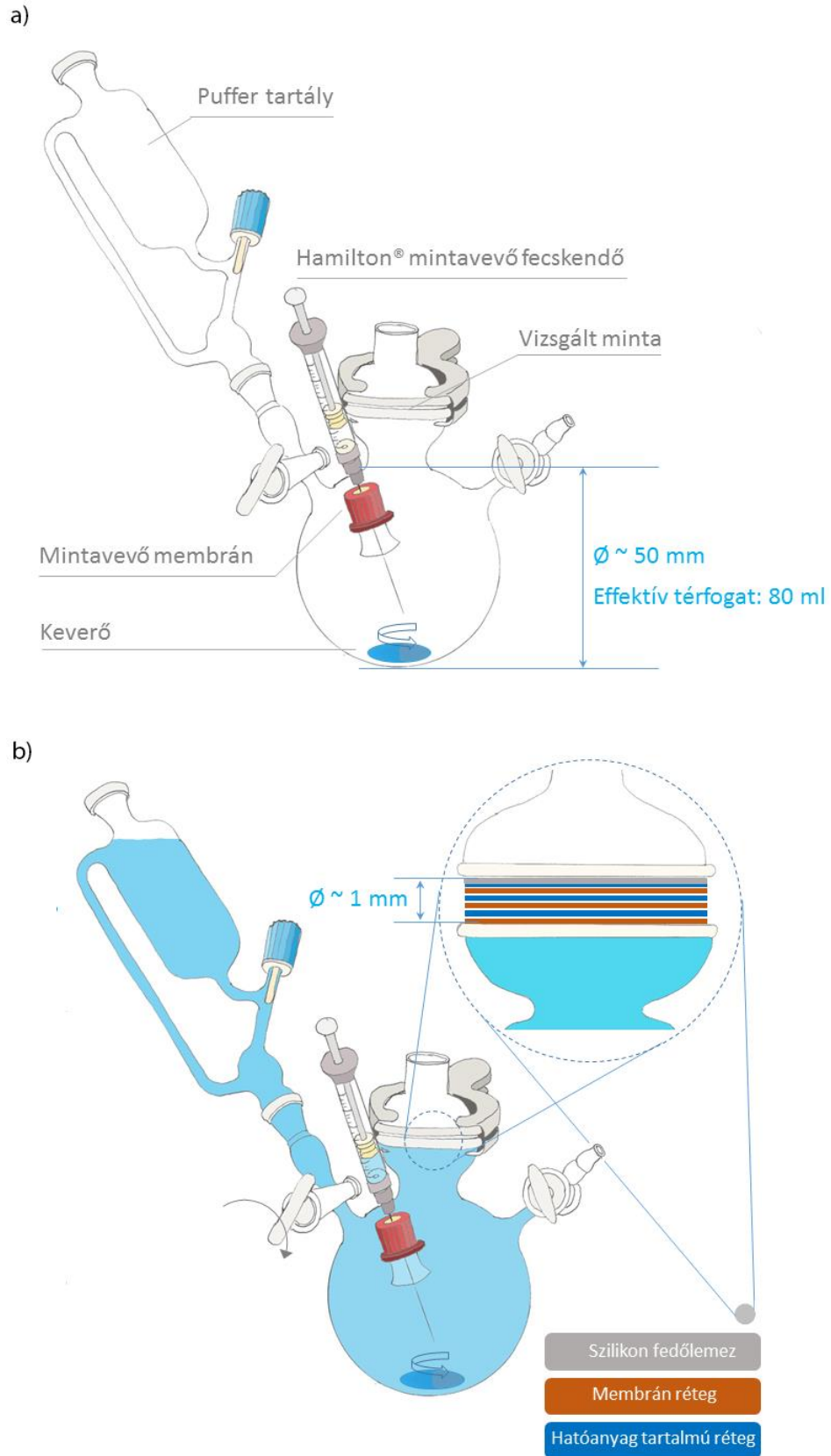
A kioldóközeggel légmentesen feltöltött, és a mérés alatt légmentesen tartott cella mintatartó részén a folyadék először a membránnal érintkezik, majd szinte azonnal eljut a hatóanyag-tartalmú PVA rétegig, amely pillanatszerűen géllé alakul (63. ábra).

A folyamat kaszkádszerűen terjed tovább a sebfedő teljes kiterjedésén. A folyadék érintkezése a CEL réteggel tehát, az a fizikai kontaktus, amely hatására a hatóanyag-felszabadulás folyamata megkezdődik.

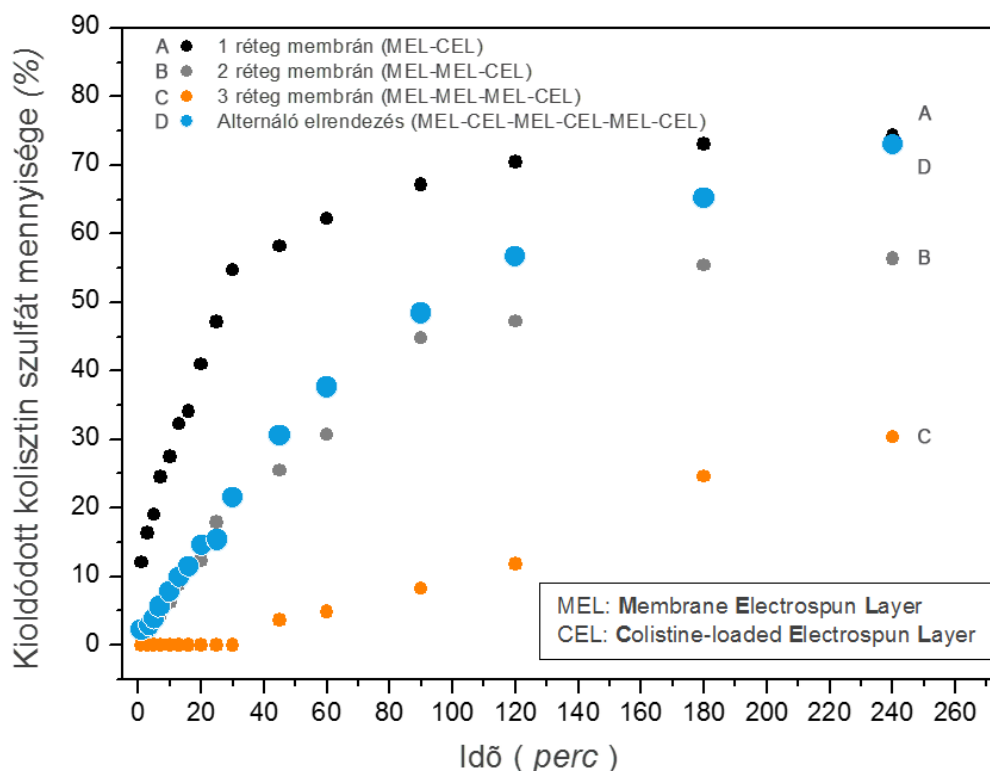


63. ábra Az elektrosztatikus szálképzéssel előállított nanoszálal réteg víz hatására bekövetkező gélesedésének sorozatfelvétele (1 db felvétel/másodperc)

A folyamatos koncentráció gradienst az arányaiban nagy kioldó térfogat, az egyenletes kevertetés és a mintavétel tartja fent. Az analitikai vizsgálathoz elegendő mennyiségű mintavétel az edényzet falán található mintavételi nyíláson és szeptumon keresztül történik. A folyadék *in situ* utánpótlását a puffer tartály biztosítja, a kivett minta térfogatával megegyező mennyiségben (64. ábra). A vizsgálatot négy különböző összeállítású multirétegű sebfedővel végeztem el: A (MEL-CEL), B (MEL-MEL-CEL), C (MEL-MEL-MEL-CEL), D (MEL, CEL, MEL, CEL, MEL, CEL). Az A-C minták a rétegvastagság változtatása szerinti variációk, míg a D minta az alternáló elrendezés szerinti összeállításnak megfelelően készült. A hatóanyag-felszabadulás profiljait a 65. ábra mutatja. Az A-C, növekvő membránvastagságú mintáknál a hatóanyag felszabadulása várható módon lelassult, amely a diffúziós hossz növekedése miatti diffúzió lassulását jelenti. Az eredmények azt igazolják, hogy a gyors kezdeti felszabadulás és a gyorsan bekövetkező telítődés kompenzálására nem elegendő az első réteg vastagságának növelése. A megfelelő kinetikájú profil eléréséhez a rétegpárok alternáló elrendezésére van szükség, ahol a legfőbb, sebbel határos felületen keresztül leadott hatóanyag a felsőbb rétegekből, kaszkádszerű diffúzióval pótlódik.



64. ábra Az egyedi kialakítású kioldó cella sematikus rajza a) üres és b) kioldóközeggel feltöltött állapotban



65. ábra Az eltérő rétegelrendeződésű és eltérő membránvastagságú sebfedő rendszer kioldódás görbéi, ahol **A: 1 réteg membrán (MEL-CEL)**, **B: 2 réteg membrán (MEL-MEL-CEL)**, **C: 3 réteg membrán (MEL-MEL-MEL-CEL)** és **D: alternáló elrendezés (MEL-CEL-MEL-CEL-MEL-CEL)**

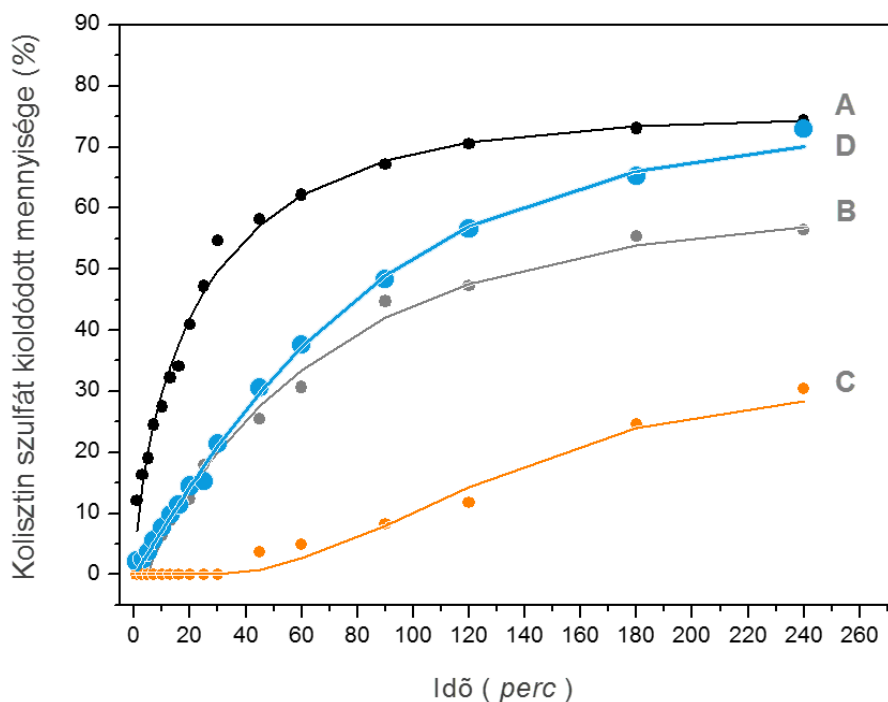
A kapott eredményeket felhasználva a multirétegű sebfedő rendszer újszerűségét abban látom, hogy a PVA alapú rétegek váltakozó elrendezésével képes olyan másodrendű kinetika szerinti hatóanyag-felszabadulás elérésére, amely a nedvességet expresszázó seb kezelésekor a hatóanyag hosszan tartó és optimális koncentrációjú jelenlétét tudja biztosítani. Külön terápiás előnynek gondolom azt, hogy a rendszer modulszerű felépítése a készítményt tervezhetővé teszi, működése szempontjából. Eltérő indikációjú (pl.: bakteriális fertőzés, szöveti regeneráció) hatóanyagok egymáshoz viszonyítva késleltetett felszabadulása hozható létre, és az egyes monorétegek hatóanyag koncentrációja is változtatható. A bemutatott eredményeket olyan alapnak gondolom, amelyre építve, további kísérletekkel a sebek gyógyulása során felszívódó készítmények, illetve más célú felhasználások vizsgálatára nyílik lehetőség.

4.6.3. A hatóanyag szabályozható felszabadulásának *in silico* eredményei

A modulszerű sebfedő rendszer tervezhetőségének támogatásához és annak jelzésére, hogy az egyes tényezők miként befolyásolják a hatóanyag-felszabadulás profilját, Weibull-féle eloszlás függvény alapján becsültem meg a kioldódás görbék kinetikai paramétereit. Ezen becsült paramétereket a **19. táblázat** tartalmazza, míg a megfelelő korrelációval illeszkedő görbék a **66. ábrán** láthatók.

19. táblázat A kolisztin szulfát hatóanyag, sebfedő rendszerből történő kioldódásának kinetikai görbéihez tartozó, Weibull-féle eloszlás szerinti paraméterei (β a függvény alaki paramétere, t_0 a késleltetési idő)

Minta azonosítója	t_0 (perc)	β	Korreláció (r)
A (MEL-CEL)	0	0,7010	0,9946
B (MEL-MEL-CEL)	5	0,8884	0,9969
C (MEL-MEL-MEL-CEL)	29	1,8033	0,9876
D (MEL-CEL-MEL-CEL-MEL-CEL)	0	1,0829	0,9989



66. ábra A kioldódás görbék mért (színnel kitöltött kör) és Weibull-féle eloszlással számított (folytonos vonal) értékeinek korrelációját szemléltető ábra, ahol A: 1 réteg membrán (MEL-CEL), B: 2 réteg membrán (MEL-MEL-CEL), C: 3 réteg membrán (MEL-MEL-MEL-CEL) és D: alternáló elrendezés (MEL-CEL-MEL-CEL-MEL-CEL)

A készítményből a hatóanyag-felszabadulás diffúziókontrollált. A különböző rétegszerkezetek végeelem -modellezésével (FEM) megmutatható, hogy az egyes mintákon belül kialakuló diffúziós viszonyok miként hozzák létre a jellemző felszabadulási profilt, illetve azt, hogy ezek hatására miként alakul a hatóanyag koncentrációja. Ez utóbbinál a hosszú tartózkodási időhöz szükséges kvázi-állandó érték elérése a cél. A FEM modell paramétereit a **20. táblázat** tartalmazza.

20. táblázat A FEM modellhez alkalmazott paraméterek

Paraméter típusa	CEL	MEL	KIOLDÓKÖZEG
l x irányú méret (mm)	1,48	0,04	1,00
A keresztmetszeti terület (mm ²)	707	707	70 420
D diffúziós tényező (mm ² /perc)	$8,2 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$1,32 \cdot 10^{-1}$
C koncentráció (mg/mm ³)	$1,15 \cdot 10^{-3}$	0	0

A diffúzió során általában a koncentráció a hely és az idő függvénye. A kioldó cellában azonban az állandó kevertetés a helytől való függést eliminálja (**E8**), azaz:

$$C_r(x,t) = C_r(t) \quad x \in l_r \quad (\mathbf{E8})$$

A modellezés a következőkben leírt elméleti megfontolásokra épül. A hatóanyag csak az x tengely irányába mozog, amelynek a leírásához a Fick II. diffúziós törvény (**E9**) alkalmazására van szükség, az i jelű szerkezeti egységre nézve.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2}, \quad t > 0 \quad (\mathbf{E9})$$

Amennyiben $i = 1, 2, 3$ és $(i-1) \cdot L < x \leq (i-1) \cdot L + l_c$, akkor az a CEL réteget jelöli, ahol $L = l_c + l_m$. Amennyiben $i = 4, 5, 6$ és $(i-3) \cdot L - l_m < x \leq (i-3) \cdot L$, akkor az a MEL réteget jelöli. Az $i = 7$ és $(i-4) \cdot L < x \leq (i-4) \cdot L + l_r$ a kioldó cellát jelöli. Az i feltételes relációk esetében a C_i (mg/mm³) az oldat koncentrációja, $t > 0$, D_i (mm²/min) a diffúziós állandó, l_c a hatóanyag-tartalmú réteg vastagsága, l_m a membrán vastagsága, l_r a kioldó közeg vertikális irányú hossza.

A problémához kapcsolódó kezdeti értékek:

$$C_{i0} = C_i(t=0), \quad i=1,2,3 \text{ és } 0 = C_i(t=0), \quad i = 4, 5, 6, 7 \quad (\mathbf{E10})$$

A peremfeltételek a következők:

$$\frac{\partial C_i}{\partial x} = 0, \quad x = 0, \quad x = 3 * L + l_r, \quad t \geq 0 \quad (\mathbf{E11})$$

A belső határfelületeken a peremre érkező és a peremről távozó anyag-áramsűrűség a Biot-feltételnek megfelelően megegyezik egymással.

$$-D_b \frac{\partial C_b}{\partial x} = -D_j \frac{\partial C_j}{\partial x} \quad (\mathbf{E12})$$

Jelen esetben az alsó index arra utal, hogy a cella a határfelület előtt (b), illetve utána (j) helyezkedik el. Az **E9** differenciálegyenlet-rendszert az **E10-12** feltételekkel, numerikus közelítő módszerekkel lehet megoldani. A megoldható problémák köre a különböző folyamatok közötti hasonlósági kapcsolatok révén nagymértékben növelhető, így analógia alapján a diffúziószámítás a hővezetésre kidolgozott eszköztárral végezhető el. Ennek feltétele, hogy a folyamatokat leíró differenciálegyenletek egymásba áttanszformálhatók legyenek, és ez az egyértelműségi feltételekre is teljesüljön:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{és} \quad \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \quad (\mathbf{E13, 14})$$

ahol a második egyenletben T (°C) a hőmérséklet, λ (mm²/min) az anyag hővezetési együtthatója. Amennyiben a Fick törvényben a $C \Rightarrow T$ és $D \Rightarrow \lambda$ cseréket elvégezzük, akkor a hőtani számítások eredményei a diffúziós probléma megoldásai lesznek.

A FEM modellhez alkalmazott kioldó cella vázlatos rajza és a FEM modell illusztrációja a **67. ábrán** látható, amin az alternáló elrendezésű sebfedő rendszer felületre merőleges, x tengely irányú szakaszát az A, B pontok jelölik, míg a B, C pontok a tartály azonos irányú szakaszának jelölései. A 70420 mm^3 térfogatú kioldó tartály 1 mm magasságú hengerrel modellezhető, amelyben a folyadék diffúziós tényezője a vízzel azonos. Ezzel a választással érhető el, hogy a természetes diffúzió során, a B és C pontokban, a számított koncentráció eltérése azonos időpontban $\sim 0,3 \%$, vagyis a kevertetéssel elért homogenizálást jól közelíti. A véges elemeket magába foglaló, egyesített közelítő függvények paraméterei szélsőérték számítással határozhatók meg. Jelen esetben az **E15** egyenlet variációs funkcionált extremizáló $C = C(x,t)$ függvény keresésének közelítő alakú megoldását számolja ki a program (**E16**).

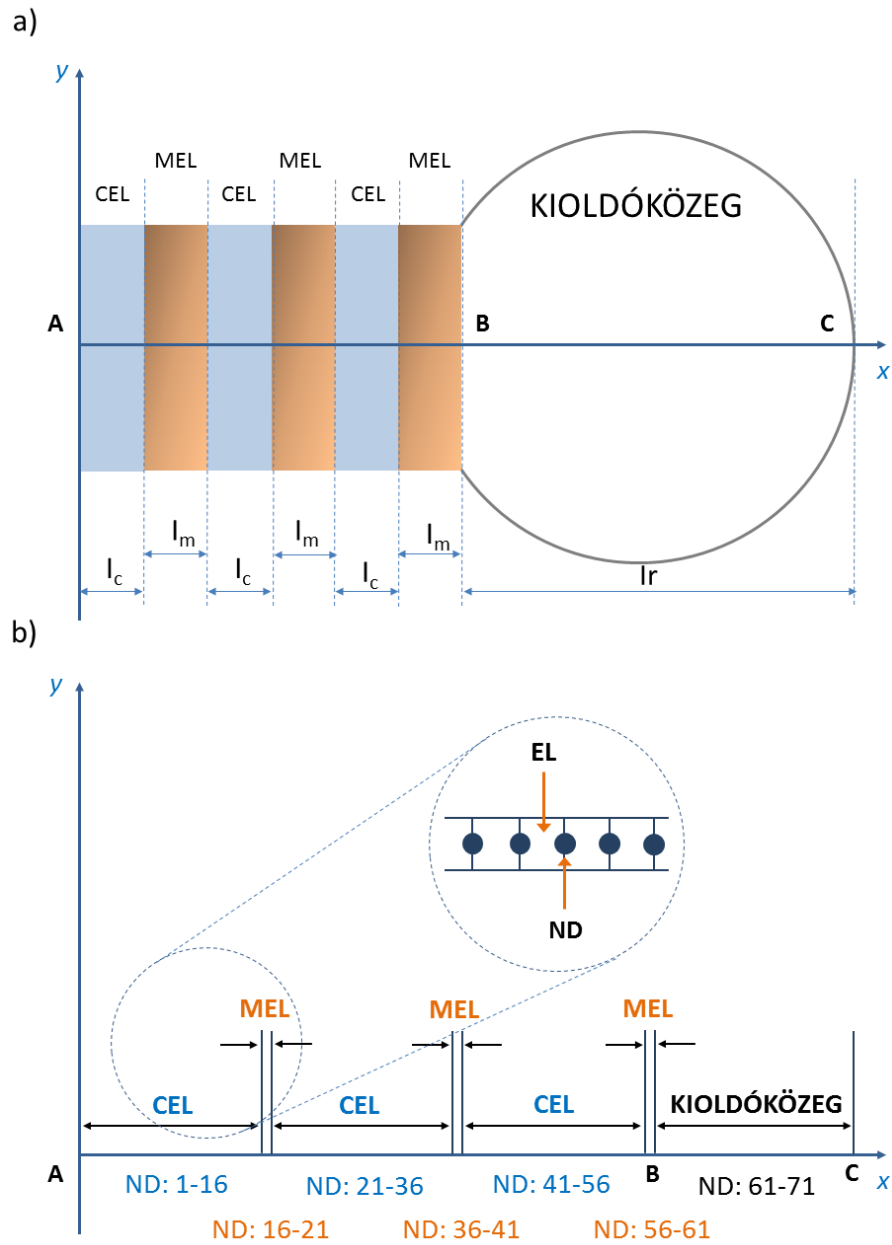
$$I = \int_{(L)} \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)^2 dx + \frac{d}{dx} \left[\int_{(L)} \left(\frac{1}{2} C^2 \right) dx \right] \quad (\text{E15})$$

$$\tilde{C}(x,t) = \sum_i \alpha_i(t) \Phi_i(x) \quad (\text{E16})$$

A számolt tartomány a szintén **67. ábrán** látható ABC vonal. Az egydimenziós tartományhoz **TRUSS 2D** (rúd) elemtípus tartozik. A megadható *anyagjellemzők* (**E17**):

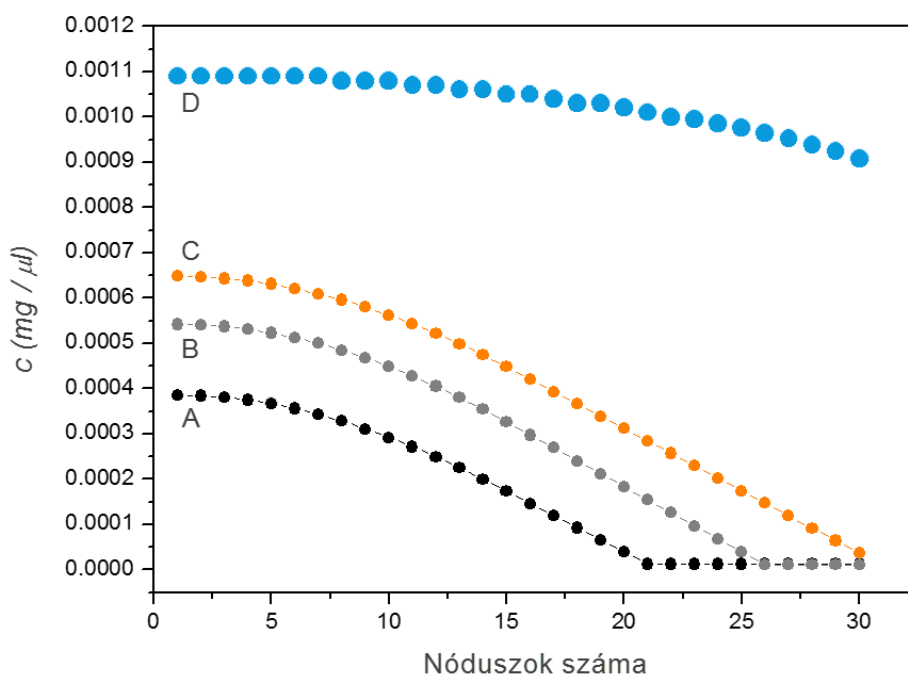
$$\lambda = \frac{K_x}{C \cdot \rho} \Rightarrow D \quad (\text{E17})$$

ahol C fajhő $=1$ és ρ sűrűség $= 1$ választással K_x hővezetési tényező $=D$. A megadható elemjellemző: $R_1 \Rightarrow A$, a rúdelem keresztmetszetének területe.



67. ábra Az alternáló elrendezésű sebfedő rendszer kioldódásának FEM modellét szemléltető ábrája, ahol: a) l_c a hatóanyag-tartalmú réteg vastagsága, l_m a membrán vastagsága, l_r a kioldó közeg vertikális irányú hossza, x a hatóanyag-felszabadulás gradienseinek vertikális iránya (A-C) és b) EL a kétcsuklós TRUSS2D rúdelem, ND a rúdelemek kapcsolódását jelentő nódusz

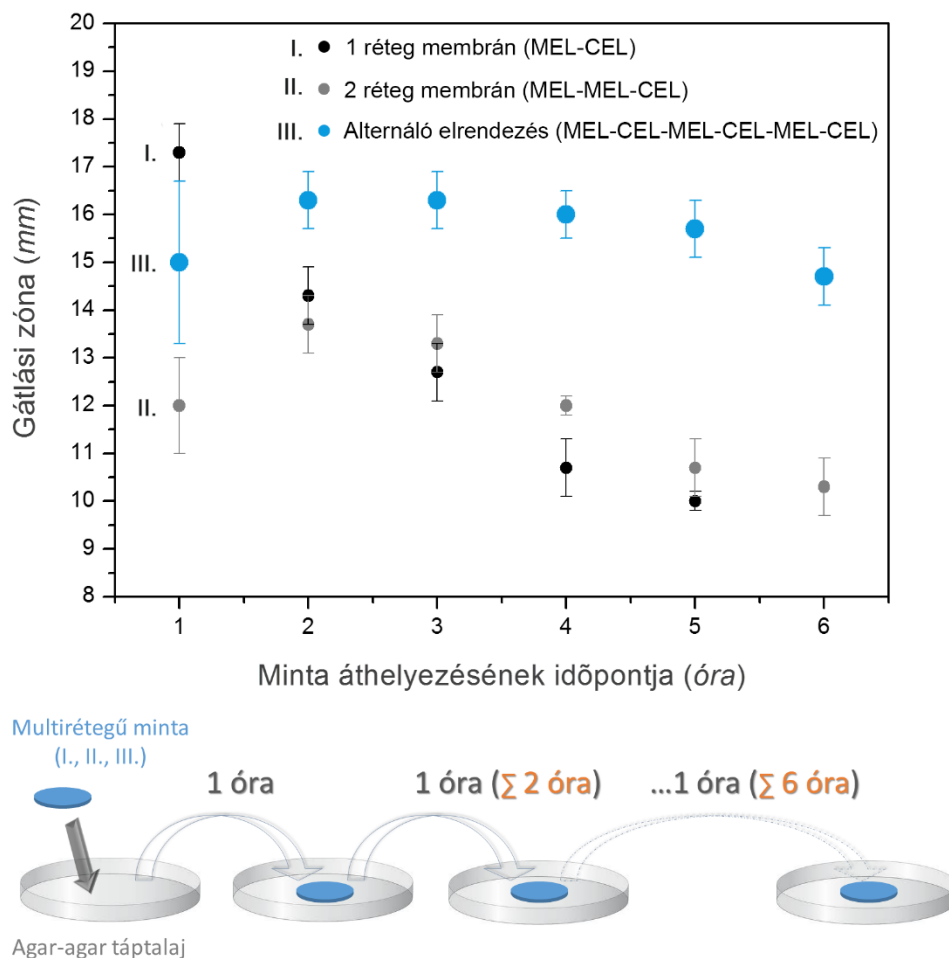
A **68. ábra** az alkalmazott FEM modell alapján számolt eredmények grafikus megjelenítése, amelyen látható, hogy a seb felületével közvetlenül érintkező membránréteg vastagságának növelésével arányosan megnő a réteg hatóanyag-koncentrációja a legtávolabbi rétegekben is, azonban a hatékony kezeléshez elérendő értéket nem tudják megfelelő időn át tartani, ami az utánpótlás gyorsabb lecsengését és a készítmény gyorsabb kimerülését eredményezi. Ezzel ellentétben áll az alternáló rendszer esetében számolt, valamint mért eredmény is, és megfigyelhető a rétegek terápiásan hatékony koncentrációjának közel azonos értéke, illetve hosszabb ideig tartó állandósága. E feltételek teljesülése szükséges ahhoz, hogy a sebbel közvetlenül érintkező rétegben, és a sebben található hatóanyag megfelelő koncentrációban legyen jelen, akár órákon át.



68. ábra Az eltérő rétegelrendeződésű és membránvastagságú sebfedő rendszer 280 perc időtartamú kioldódásakor kialakuló koncentráció-eloszlás FEM modell szerinti eredményének grafikus ábrázolása, ahol A: 1 réteg membrán (MEL-CEL), B: 2 réteg membrán (MEL-MEL-CEL), C: 3 réteg membrán (MEL-MEL-MEL-CEL) és D: alternáló elrendezés (MEL-CEL-MEL-CEL-MEL-CEL)

4.6.4. A készítmény antibakteriális hatásának *in vitro* eredménye

A hatóanyag-felszabadulás vizsgálatokhoz hasonló metodika szerint elvégeztem a készítmény antibakteriális hatásának vizsgálatát a dolgozat szempontjából kiemelt jelentőségű, MDR *Acinetobacter baumannii* baktériumtörzsön. Az agar-diffúziós kísérlet összesen hat órás időtartama alatt óránként áthelyeztem ugyanazon mintát egy újabb tenyésztetre és mértem a kialakuló gátlási zónát (**69. ábra**), valamint ezen keresztül a sebfedő rendszer antibakteriális kapacitását.

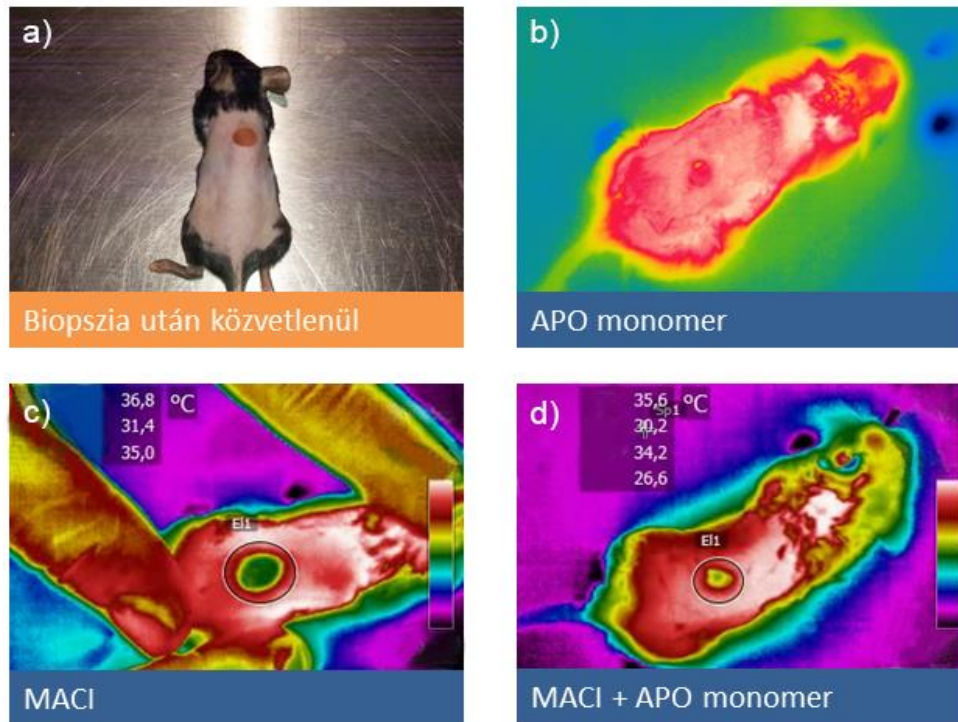


69. ábra Az eltérő rétegelrendeződésű és membránvastagságú sebfedő rendszer agar-diffúziós vizsgálatokor kapott eredményeinek grafikus ábrázolása (baktériumtörzs: MDR *Acinetobacter baumannii*)

Az antibakteriális kapacitás leírt ilyen, dinamikus jellegű meghatározásánál kapott adatok tendenciája megfeleltethető a **4.6.2. fejezetben** ismertetett *in vitro* kioldódási, és a **4.6.3. fejezetben** tárgyalt *in silico* matematikai számítási eredmények tendenciájával. A **69. ábrán** látható, hogy egy réteg membrán alkalmazáskor (I. MEL-CEL) egy meredeken csökkenő, közel lineáris hatáscsökkenés alakul ki, ahol a hatóanyag leadásának kezdeti sebessége olyan gyors, hogy két mérési pont közötti tartományon belül eléri a maximumát. A membrán vastagságának növelése késlelteti és elnyújtja a leadás telítési pontig terjedő, majd az azt követő szakaszát is, de nem képes hosszabb időn át azonos hatóanyag-koncentráció fenntartására. Az alternáló rétegezésű sebfező készítmény esetében mért gátlási zónák igazolták azt, hogy a MEL-CEL rétegpárok a hatóanyag-koncentráció állandó értéken tartásához szükséges utánpótlást tudják biztosítani.

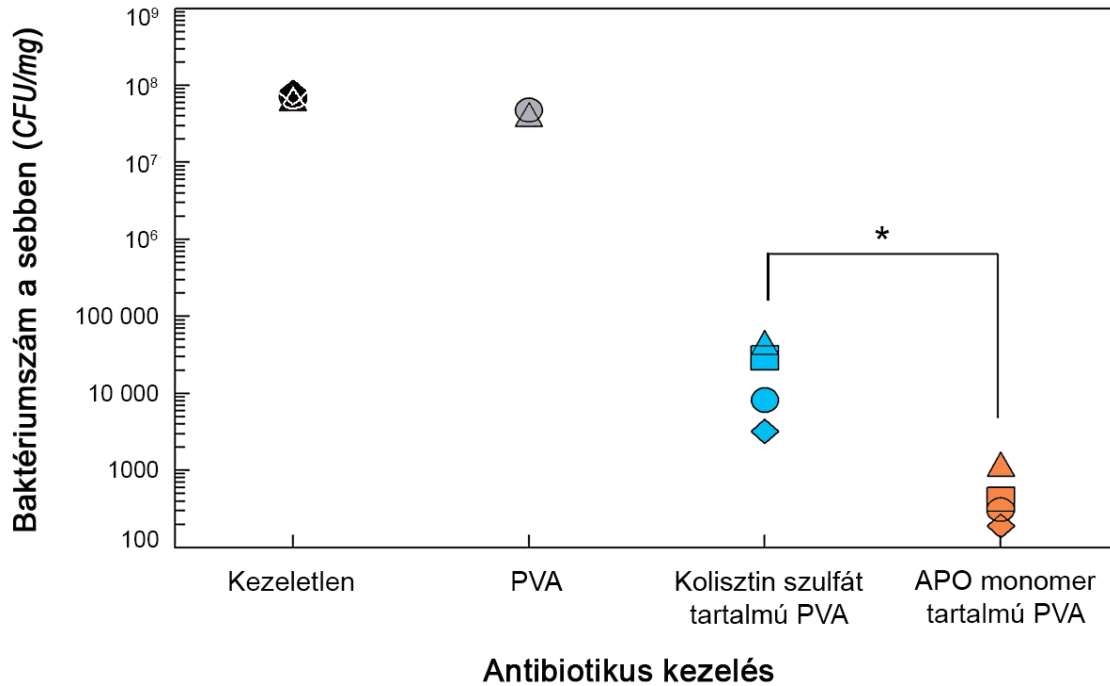
4.6.5. A készítmény szöveti regenerációt serkentő, valamint antibakteriális hatásának *in vivo* eredménye

Az előző fejezetekben bemutatott multirétegű, nanoszálal rendszer működésének, hatóanyag-leadásának és antibakteriális hatásosságának, összességében anyagi rendszer szempontú működésének *in vitro* vizsgálatai megerősítették azon feltevésemet, miszerint a készítmény fontos előnyökkel rendelkezik a sebek hatékonyabb gyógyulását és fertőzéseinek visszaszorítását célzó, lokális kezeléseknél. Az ilyen jellegű készítmények fejlesztésének, kutatásának kiemelten fontos részét képezik a preklinikai jellegű, *in vivo* állatkísérletek, amelyek a terápiás hatékonyság legreprezentatívabb képet adják a kísérletek korai fázisában. A PVA mátrixba beépített kolisztin szulfát és APO monomer hatóanyagok szálal formulációinak sebgyógyulásra és a seb bakteriális fertőzésre gyakorolt hatásait négy különböző csoportba osztott egereken vizsgáltuk. Az APO monomert tartalmazó monorétegekkel kezelt állatok négy napig tartó kezelése során azt tapasztaltuk, hogy a kezdeti, 8 mm átmérőjű sebek jelentősen összehúzódtak a baktériummal fertőzött és nem fertőzött állatok esetében egyaránt (**70. ábra**). Az említett állatoknál a sebgyógyulás látványosan előrehaladottabb állapotban volt a fertőzött, de APO monomer tartalmú réteggel nem kezelt egerek sebeihez képest, ami a formuláció gyors és hatékony, szöveti regenerációt segítő hatását igazolta.



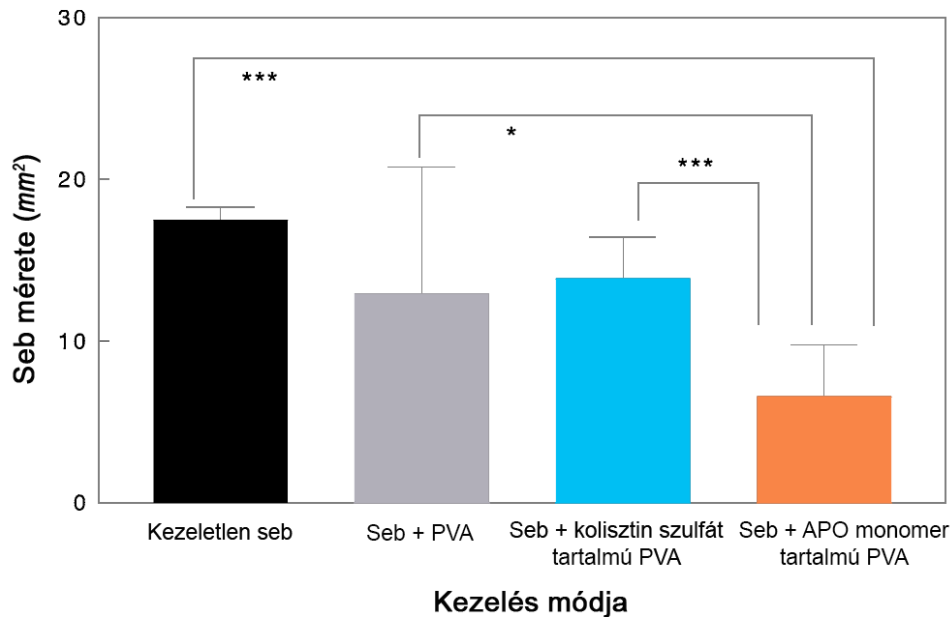
70. ábra Az egereken végzett *in vivo* vizsgálatok során készített testhőanalízis digitális felvételei, ahol a) a seb közvetlen biopsza utáni állapota, b) a nem fertőzött, APO monomerrel kezelt állat hőterképe, c) a MACI-val fertőzött, de nem kezelt állat hőterképe és d) a MACI-val fertőzött és APO monomer-tartalmú sebfezővel kezelt állat hőterképe a kezelés végén (b-d)

A kezelések végén az állatok sebeiből egységes területeket metszettünk ki, majd a homogenizátumaikból kioltásokat végeztünk a fertőzés szintjének megállapításához. Az MDR *Acinetobacter baumannii* baktériumtörzsszel fertőzött egerek különböző kezelése után mért baktériumszámokat a **71. ábra** mutatja, ahol látható, hogy ez a szám a kolisztin szulfát és APO monomer készítmények esetében nagyságrendekkel lecsökkent a kezeletlen, vagy csak PVA monoréteggel kezelt állatoknál mért értékekhez képest. Külön kiemelendő az a tapasztalat, hogy az APO monomer anibakteriális hatása megelőzi a kolisztin szulfátét. E megfigyelés jelentősége az, hogy egyes antibakteriális molekulák lassítják a szövetek regenerációját, tehát a szövetek regenerálódása és egy akut vagy krónikus fertőzés kezelésének szövetekre gyakorolt hatása gyakran két, egymással szembenálló változást eredményez.



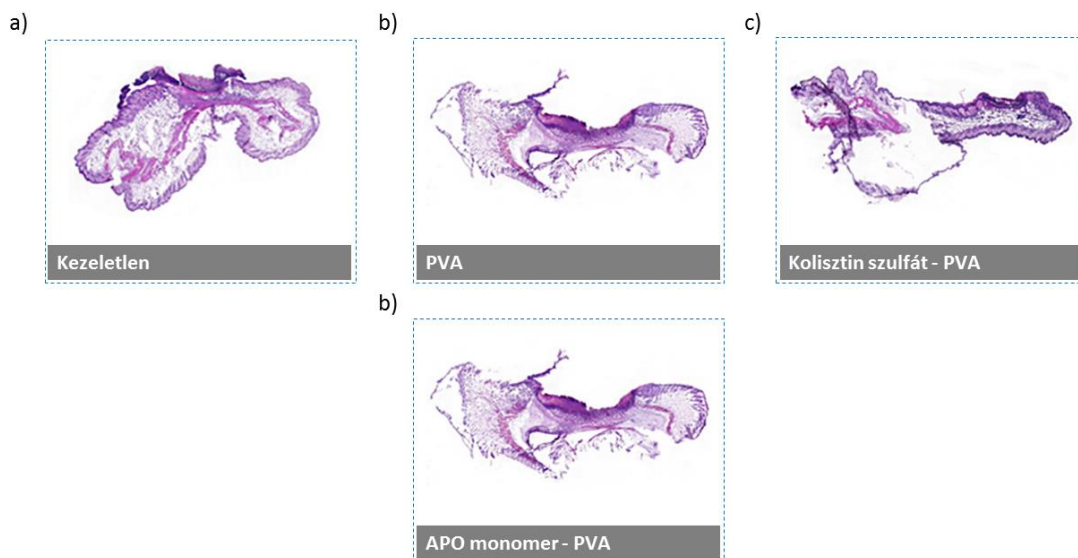
71. ábra Az egyes hatóanyagtartalmú és a hatóanyagmentes, többrétegű sebfedő rendszerrel kezelt, valamint kezeletlen állatok kimetszett sebeinek homogenizátumaival végzett mikrobiológiai vizsgálatának eredménye, grafikusán ábrázolva (*: Student-próba szerinti szignifikancia > 90 %)

Megvizsgáltuk mind a négy kezelt csoport fertőzött egyedeinek sebgyógyulását is, amelyre nézve informatív sebátmérő és területi adatok alapján vonhatók le konklúziók. A **72. ábrán** látható, hogy a legnagyobb kiterjedésű seb a kezeletlen állatok hátán maradt vissza, míg a legkisebb kiterjedés az APO monomer – PVA rendszer kezelés esetén volt tapasztalható. Az adatok relatív összehasonlításával megállapítható, hogy a nanométeres szálátmérőjű szálakból felépülő szövetek pozitív hatással van a regenerálódásra, amelyet a kolisztin szulfát lecsökkent.



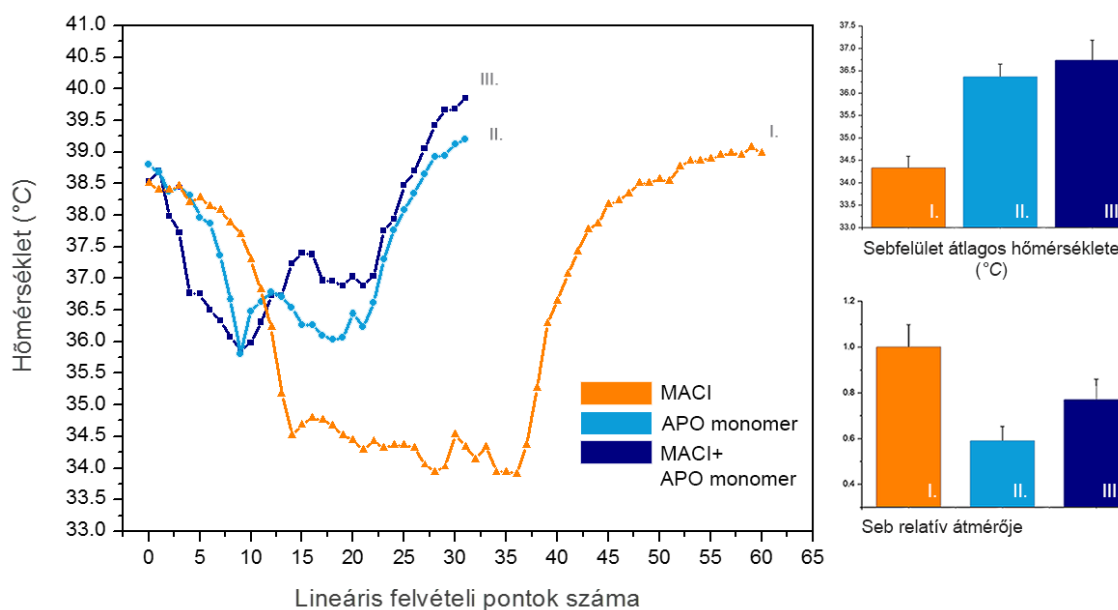
72. ábra Az egyes hatóanyagtartalmú és a hatóanyagmentes, többrétegű sebfedő rendszerrel kezelt, valamint kezeletlen állatok sebeinek mérete a kezelés végén (statisztikai szignifikancia * > 90 %, *** > 99 %)

A kimetszett sebek szövettani vizsgálata alapján (73. ábra) megállapítható volt a granulocytás infiltráció javulása a dermiszben, különösen azoknál az állatoknál, amelyek csak APO monomer tartalmú PVA sebfedővel voltak kezelve. Mindez összhangban van az előzőekben bemutatott eredményekkel.



73. ábra A kísérletekbe bevont fertőzött állatok sebeinek szövettani elemzéséhez készített metszetek fénymikroszkópos felvételei, ahol a) a kezeletlen, b) a hatóanyagmentes, c) a kolisztin szulfát-tartalmú, d) az APO monomer-tartalmú sebfedő rendszerrel kezelt állathoz tartozó minta

A testhőanalízis során felvett hőmérséklet profilok (74. ábra) elemzésével további értékes információk nyerhetők ki a sebek gyógyulásának aktuális állapotáról. A biopszia által a seb vérellátása is sérül, és bár a környező szövetekre a vérbőség lesz jellemző, a vérellátás hiánya miatt a felületen mérhető hőmérséklet alacsonyabb lesz az ép bőrszövetéhez képest. A gyógyulás egyes fázisai során a vérellátás fokozatosan áll vissza, miközben a szervezet a reepitalizáció révén igyekszik visszaállítani a kiszáradás és fertőzés ellen védő leghatékonyabb barriert, az ép hámszövetet. E folyamat a sérült terület ép bőrszövethez viszonyított hőmérséklet fokozatos kiegyenlítődének mérésével nyomon követhető. Az összefüggést felhasználva a 74. ábrán látható görbékből kiolvasható, hogy a fertőzött, de kezeletlen seb vérellátottsága rossz, valamint kiterjedése arányaiban nagy, ami a gyógyulás korai fázisát jelzi. Látható az is, hogy a fertőzött és nem fertőzött sebek APO monomer tartalmú szövetekkel történő kezelése után a vérellátás javult, a rossz vérellátású terület átmérője csökkent, ami a gyógyulás előrehaladott állapotára utal.



74. ábra A többrétegű sebfedő rendszerrel végzett kísérletekbe bevont állatok sebeinek hőmérséklet profilja, ahol I. a fertőzött, kezeletlen; II. a nem fertőzött, APO monomer-tartalmú sebfedővel kezelt és III. a fertőzött, APO monomer-tartalmú sebfedővel kezelt állathoz tartozó eredmény

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A centrifugális szálképző technika és a mikroszálak alkalmazhatósága gyógyszerhordozó rendszerek előállításához, valamint a szálak forma felhasználása tabletták, mint konvencionális gyógyszerforma formulálásához

A dolgozatban bemutatott centrifugális szálképző eljárás azon újszerű formulációs technikák közé tartozik, amelyekkel lehetőség nyílik olyan polimer mátrix alapú, mikrométer átmérőjű szálak előállítására, amikkel kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságú hatóanyagok, terápiás szempontból előnyösebb állapotba hozhatók, vagy a szálak struktúra sajátosságait kihasználva, orvosi biológiai szempontból releváns és hatékony készítmények fejleszthetők. Fontos megjegyezni, hogy a számtalan kísérletes eredmény mostanra érte el azt a mérföldkövet, amely peröntő a szálak struktúra gyakorlati alkalmazhatósága, ipari implementálhatósága terén. Ezen célok mentén haladva kiemelten fontos feladat precízen kidolgozni a szálképzés technikáit, akár csak laboratóriumi szinten úgy, hogy az általuk reprodukálható minőségben előállított anyagok jellemzőit, valódi gyógyszer technológiai hasznát, hitelt érdemlően lehessen vizsgálni. Ezt teljesítendő, munkám során, többszöri áttervezés eredményeként jutottam el a centrifugális szálképző feltét optimalis, laboratóriumi műszaki kiviteléhez. A mikroszálak szövetének felhasználása két fő formában lehetséges, közvetlenül vagy további feldolgozással tablettaként. A kívánt minőségű PVP mikroszálak birtokában tehát megvizsgáltam azok feldolgozhatóságát és a szálak mikroszerkezeti viszonyainak megőrzése mellett, tablettává formulálhatóságát, valamint a tabletták hatóanyag-leadását. Kísérleteim elején *in vitro* mikrobiológiai mérésekkel vizsgáltam a közvetlen felhasználású gyógyszerhordozó rendszerekre nézve reprezentatív hatóanyag-felszabadulást is, az antibakteriális povidon-jód komplex szubsztancia beépítését követően.

5.2. A szálás stuktúra fizikai, fizikai-kémiai és egyéb, mikroszerkezeti vizsgálatának szerepe a szálképzés optimalizálásában, új szálképző eljárás kidolgozása

A megfelelő minőségű, megfelelő morfológiájú és egyenletes szálvastagság-eloszlású szálak előállításához elégséges, de nem elegendő feltétel csupán a jó műszaki kivitelezésű szálképző eszköz megléte. Részben a technikával kapcsolatos gyógyszeripari tapasztalat hiányában a módszerek kidolgozása jelenleg még lényegesen összetettebb és lassabb iterációs folyamat. A szálak specifikációinak, a gyárthatóság feltételeinek kialakításához és önmagában a szálak tulajdonságainak alaposabb feltárásához gyakran nem szokványos analitikai és egyéb műszeres vizsgálatokra van szükség. Az oldatfázisú szálképző gélből kiinduló egyszerű centrifugális és elektrosztatikus szálképzés optimalizálásához elsőként a víz és etanol oldószerek, valamint a polimer koncentráció, szálak morfológiai minőségére gyakorolt hatásán keresztül dolgoztam ki a szálképző oldat egyszerűsített viszkozitás specifikációját. A létrehozott minták szakítószilárdsága a mechanikai tűrőképességről adott hiteles információt. A rendszer szupramolekuláris jellemzőinek feltérképezéséhez kiemelt haszonnal alkalmaztam a PALS műszeres technikát kutatómunkám során mindvégig. E módszernek kiemelt jelentőséget tulajdonítok, mert nem csupán a rendszer hatóanyag-tároló kapacitása jellemezhető vele, hanem a hatóanyagot tartalmazó hordozórendszer szupramolekuláris szerkezetváltozásának követésével a diffúzió jelenségére visszavezethető folyamatok (oldódás, kristályosodás, nedvesedés, duzzadás) kinetikájának változása előre jelezhető. Az anomális szerkezetváltozást mutató segédanyag kiszűrhető a formulációból, így a preformulálás optimalizálható.

5.3. A nanoszálás szövetékből készített, szabályozott hatóanyag-leadású topikális készítmény előállítása és jelentősége, valamint működésének, antibakteriális és szöveti regenerációt segítő hatásának vizsgálati módszerei

A későbbi, **6.3. fejezetben** leírt következtetéseim alapján a nanoszálás struktúrájú rendszerek közvetlen formában történő alkalmazását az egyik legelőnyösebb lehetséges módnak tartom. A topikális készítményként történő felhasználás kidolgozására tett kísérleteim eredményeként jutottam el egy olyan többrétegű, PVA alapú sebfedő rendszer

előállításához, amely traumás vagy krónikus sebek bakteriális kezelését és a szöveti regenerációt segítő lokális kezelést tesz lehetővé. Az általam multirétegű sebfedő rendszernek (*Tunable Multilayer Drug Delivery Tissue*) elnevezett készítmény olyan, egymástól eltérő funkciójú PVA monorétegekből áll, amelyek alternáló kombinációjával a hatóanyag nyújtott, szabályozható és tervezhető kinetikájú leadása valósítható meg. A készítmény felsorolt tulajdonságai a hatóanyag terápiásan legelőnyösebb koncentrációját képesek állandó értéken tartani, hosszabb időn át. A készítmény működésének anyagi rendszer megközelítésű feltérképezését és terápiás hatékonyságát *in vitro*, *in silico* és *in vivo* módszerekkel vizsgáltam.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. Az értekezés új tudományos eredményei

- A mikroszálak, mint potenciális gyógyszerhordozó rendszerek megfelelő minőségű és reprodukálható előállítására kifejlesztettük a centrifugális szálképző feltét laboratóriumi méretű, egyszerűen kezelhető műszaki kivitelét.
- A műszaki tervek szerint legyártott centrifugális feltét felhasználásával optimalizáltam a PVP polimer alapú mikroszálak előállítását, amelynek részeként vizsgáltam a víz-etanol oldószerkeverék és polimer koncentráció szálképzésre gyakorolt hatását. A kiindulási szálképző oldatok dinamikus viszkozitásának vizsgálatával meghatároztam a megfelelő morfológiájú szálak gyártásához tartozó specifikációkat, amiket pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) mérésekkel támasztottam alá. Az előállított minták PALS műszeres vizsgálataival feltérképeztem a polimer struktúra jellemző szupramolekuláris viszonyait és a hatóanyag-tároló kapacitásra nézve prediktív szabadterfogatokat. A PALS eredmények felhasználásával megállapítottam a szálak nedvességtartalma és mechanikai tűrőképessége közötti összefüggéseket. A felsorolt vizsgálatok során kapott eredmények és megállapítások alapul szolgálnak a PVP alapú mikroszálak felhasználásának megtervezéséhez.
- Az oldat fázisból kiinduló szálképzés újszerű és előnyös megoldásainak keresése során kidolgoztam a kontakt szálhúzó berendezés működő műszaki kivitelét, amely a szálképző fésű periodikus, kontakt-metodikájú mozgása révén hoz létre mikrométer átmérőjű szálakat. A párhuzamosan, valamint egymásra merőlegesen orientálódó szálak négyzet formájú szálpaplanként választhatók le az elektrosztatikus kollektorról. Az eszköz működését a P1400283 ügyiratszámú szabadalom írja le részletesen.

- A hatóanyag-tartalmú szálak valódi, az ipari gyógyszer technológia szempontjából releváns alkalmazhatóságának egyik lehetséges módja a nano- és mikroszálak további feldolgozásán keresztül előállítható tablettá vagy kapszula formulálása. Ezen felhasználhatóság kérdését megvizsgáló B₁₂-vitamin modell hatóanyagot tartalmazó PVP mikroszálakat készítettem és mikronizáltam, majd a szakirodalomban először közölt, egyszerűsített gyártási művelet mentén haladva, további segédanyagok hozzáadásával tablettákat készítettem belőle. Vizsgáltam a véghomogenizátum közvetlen préselésével előállított tabletták kioldódását. A mikronizált mikroszálás fázis termék PALS műszeres mérésével elemeztem a mikronizálás szálak struktúrára és szupramolekuláris viszonyaira gyakorolt hatását azzal a céllal, hogy bizonyítsam a technológiai művelet anyagi rendszerre gyakorolt, nem destruktív hatását és a struktúra tablettázásra való alkalmasságát.
- A polimer szálak másik potenciális felhasználási területe a létrehozott rendszerek közvetlen formában történő gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazása, ahol a hatóanyag felszabadulásának és kívánt terápiás indikációjában elért hatékonyságának vizsgálata az elsődleges cél. Ezekben az esetekben a szálképző gél összetétele, az előállítás módja és a kialakuló anyagi rendszer fizikai-kémia tulajdonságai a főbb meghatározói a hatóanyag kioldódás- vagy felszabadulás-kinetikájának, és a készítmény egyéb tulajdonságainak. Egy ilyen, antibakteriális kezelést célzó közvetlen alkalmazás vizsgálatára povidon-jód komplex tartalmú mikroszálás szálpaplanokat állítottam elő és *in vitro* mikrobiológiai mérésekkel vizsgáltam a rendszer antibakteriális kapacitását, illetve ezzel összefüggésben a szálakat jellemző mikroszerkezeti tulajdonságokat.
- A közvetlen felhasználás lehetőségeinek további feltérképezésével olyan PVA alapú, elektrosztatikus szálképzés útján előállított nanoszálak monorétegeket készítettem, amelyek alternáló elrendezésével a hatóanyag diffúziókontrollált, szabályozható és a kezelni kívánt területen közel állandó koncentrációja érhető el. A létrehozott többrétegű sebfedő rendszer tervezhető kinetikájú kioldódásának

vizsgálatára és optimalizálására *in vitro*, *in silico* és *in vivo* vizsgálati módszereket használtam fel. A lokálisan alkalmazandó topikális készítménybe a multirezisztens baktériumokkal szemben hatásos kolisztin szulfát hatóanyagot és a kísérleteink alapján a szöveti regenerációt is segítő APO monomer molekulát építettem be és vizsgáltam a kapott formulációk hatékonyságát. A készítmény felépítését és működését a P1600505/19 ügyiratszámú szabadalom is részletezi.

- A többrétegű sebfedő készítmény hatóanyag-felszabadulásának és teljesítőképességének anyagi rendszer megközelítésű vizsgálatához egyedi kialakítású kioldó cellát készítettem.

6.2. Az eredmények gyakorlati jelentősége és alkalmazhatósága

A nano-és mikroszálak alkalmazása számtalan bizonyított előnnyel járhat, mivel képes lehet egyes hatóanyagok kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságainak javítására, amorf-szilárd diszperziók és szilárd oldatok kialakítására. Ezek együttesen egy lehetséges megoldást nyújthatnak az említett vegyületek oldhatósági és oldódási problémáinak megoldására és új gyógyszerhordozó rendszerek, gyógyszerformák kialakítására, terápiás hatékonyságuk biztosítására.

Legyen szó nanométer, vagy mikrométer átmérőjű szálak előállítására potenciálisan alkalmas technikákról, fontos kritérium annak biztosítása, hogy a kísérletekhez, fejlesztéshez és a jövőben talán az ipari méretű gyártáshoz is rendelkezésre álló eszköz olyan műszaki kivitelezésű legyen, amellyel hatékonyan optimalizálható és reprodukálhatóan jó minőségben gyártható, méret növelhető a kívánt szálalás formára.

Csak így biztosítható a kutatások azon iránya is, amivel egyre közelebb kerülhetünk a tényleges gyakorlati megvalósításhoz. A rotációs szálképzés a mikroszálak egy ilyen lehetséges és ígéretes módszere. A szálalás fázis termék vagy végtermék minőségének biztosítását követően kaphatunk csak hitelt érdemlő vizsgálati eredményeket a rendszer gyógyszerhordozóként történő működéséről és terápiás hatékonyságáról.

A kutatások és akár az ipari szintű preformulációs vizsgálatok terén a PALS műszeres technikának valódi jelentősége van, mert segítségével beleláthatunk a polimer mátrix szupramolekuláris környezetébe és azok változásainak már korai fázisú

követésével a kioldódásról, stabilitásról, kompatibilitásról és öregedésről kaphatunk értékes információkat. Mindezekkel idő és fejlesztési költség takarítható meg az iparban, valamint segíti a fejlesztés helyes irányának kiválasztását.

A polimer szálak tablettázhatósága szintén fundamentális kérdés, ahol a szálak további feldolgozása során fontos megőrizni az eredeti mikroszerkezeti állapotot azért, hogy a fázis termék stabil formában továbbvihető legyen és a megfelelő kinetikájú kioldódást célzó egyéb technológiai műveletek hatását ne torzítsák.

A hatóanyag-tartalmú szálak szövetek közvetlen, topikális alkalmazása egy nagyon ígéretes felhasználási mód. A sebgyógyulásban, a rezisztens baktériumok ellen alkalmazott és szisztémásan megterhelő, szűk terápiás ablakú antibiotikumokkal történő kezelésben, de általánosságban is, a többrétegű sebfedő készítmény egy, az adagolási igény figyelembevételével tervezhető rendszer, ahol a hatóanyag-felszabadulás kinetikája változtatható. Biztosítható a hatóanyag akár több órán át történő tartózkodási ideje a kezelni kívánt területen, miközben gyorsítja a seb gyógyulását. Az ilyen jellegű készítmények *in vitro* hatóanyag-felszabadulásának vizsgálatára a dolgozatban leírt egyedi tervezésű kioldó cellát egy prediktív adatokat szolgáltató eszköznek és módszernek tartom.

6.3. Az értekezésben leírt kísérletes munka tapasztalatai és eredményei alapján megfogalmazott problémafelvetések

Az irodalmi kutatásaim és kísérletes munkám során megfogalmaztam néhány olyan kérdést, problémafelvetést, amelyek megválaszolását, vizsgálatait elengedhetetlennek gondolom ahhoz, hogy a nano- és mikroszál alapú gyógyszerhordozó rendszerek terén végzett igen ígéretes eredmények ténylegesen átültethetők legyenek a gyakorlatba.

A rossz oldhatóságú hatóanyagok kedvező irányú változása, a leírt esetek többségében, a vegyület amorf-szilárd állapotba hozásával érhető el. Ezekben az esetekben joggal merül fel a termodinamikai stabilitás kérdése, az amorf-szilárd átalakulás alaposabb vizsgálatának szükségessége, mert bár piacon lévő extrudált készítmények esetében találunk erre példát, de szálak alapú gyógyszerkészítmény még nem található meg forgalomban és hiteles szakirodalmi adatok is elenyésző mennyiségben fellelhetők.

A jelen megoldandó kihívásává vált az is, hogy a hatóanyag szálba történő beépítését követően annak eloszlása homogén legyen, a készítményben stabil maradjon és a szigorú

hatósági követelményeknek megfeleljen. Kérdéses az, hogy a leírt feltételek mellett a technológia miként lesz gazdaságosan méret-növelhető, vagy egyáltalán az iparba implementálható, akár az FDA (*Food and Drug Administration*) törekvései szerinti folyamatos üzem alapú, akár a jelenlegi sarzs alapú gyártás szemszögéből tekintjük.

A szálakba beépíthető hatóanyag mennyisége százalékosan alacsony, maximum ~10-20 %. Amennyiben a létrehozni kívánt gyógyszerforma a tablettá, úgy egy 200 mg dózisú készítmény esetében a szálak fázistermék mennyisége 1g lenne, amelyhez a további segédanyagok hozzáadásával egy a beteg számára nehezen lenyelhető méretű tablettához jutnánk. Mindemelllett a segédanyagok mennyiségének felhasználására vonatkozó hatósági iránymutatások (például az FDA IID: *FDA Inactive Ingredients Database*) alacsonyabb limiteket várnak el a jelenleg megvalósíthatónál. Ezen érvek alapján a szálak alapú gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazását tablettában csak alacsony dózisú (~1-10 mg) hatóanyagok esetében látom jelenleg relevánsnak, amely visszavezet a homogenitás kérdéséhez.

Fontos tovább folytatni a kísérleteket a szálak őrlése, mikronizálása terén a megfelelő szemcseméret elérése és a megfelelő tablettázhatóság érdekében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A nano- és mikroszálás rendszerek formulálása, kirajzolódó felhasználási módjai kiemelkedő és nagyon ígéretes területei az újfajta hatóanyag hordozó rendszerekkel és orvosi biológiai hasznosíthatóságukkal kapcsolatos kutatásoknak, fejlesztéseknek. Az ígéretesség egyik záloga a szálás polimer struktúrák azon tulajdonsága, amely potenciálisan megvalósíthatóvá teszi a rosszul oldódó kristályos vegyületek oldódási és oldhatósági tulajdonságainak javítását a vegyületek amorf formában tartásával. Kialakíthatók amorf-szilárd diszperziók és szilárd oldatok. Lehetőség nyílik a szálás szövetek közvetlen vagy további feldolgozást követő felhasználására is.

Értekezésem egyik célkitűzése ennek megfelelően a szálak előállításának optimalizált és reprodukálható előállítása, valamint a szálak makro- és mikroszerkezeti tulajdonságainak feltárása volt. További célként tűztem ki annak vizsgálatát, hogy a létrehozott szálak miként dolgozhatók fel a kioldódást jelentősen meghatározó mikroszerkezeti sajátságok megőrzése mellett, miként használhatók fel tablettá formulálásához, illetve feldolgozás nélkül létrehozható-e belőlük a hatóanyag tervezhető és szabályozott leadását biztosító, antibakteriális hatású és szöveti regenerációt serkentő, terápiásan hatékony topikális készítmény.

A kísérleti munka első szakaszában kialakítottam a laboratóriumi méretű, reprodukálhatóan jó minőségű mikroszálak előállítására szolgáló centrifugális szálképző feltét előnyös és könnyen kezelhető műszaki kivitelét. A legyártott centrifugális szálképző eszközzel optimalizáltam és specifikáltam a PVP alapú mikroszálak készítését. Elemeztem az oldószer, valamint a polimer koncentráció hatását a szálak mikroszerkezetére, amely a hatóanyag-leadásra nézve prediktív jelentőségű. Megállapítottam, hogy a szálás struktúra mikroszerkezeti károsodás nélkül feldolgozható és potenciálisan alkalmas a klasszikus tablettázáshoz tartozó technológiai műveletekbe történő integrálásra. Az *in vitro*, *in silico* és *in vivo* eredmények alapján megállapítottam, hogy az általam létrehozott PVA alapú, kolisztin szulfát és APO monomer tartalmú többrétegű sebfező készítmény képes a hatóanyag szabályozott leadására és a sebek antibakteriális fertőzéseinek hatékony kezelésére, valamint a szöveti regeneráció serkentésére. A készítményhez kidolgozott *in vitro* vizsgálati módszer hiteles adatokat szolgáltat a rendszer hatóanyag-leadásáról és jellemző kinetikájáról.

8. SUMMARY

The formulation and emerging uses of nano- and microfibrous systems are outstanding and very promising areas for research and development related to novel drug delivery systems and biomedical utilizations. The potential for their promising application derives from their polymeric structural properties, which enable the improvement of the solubility properties of poorly soluble crystalline drugs by keeping them in amorphous form. Amorphous solid dispersions and solid solutions can also be formed. The fibrous mats can be directly applied or further processed.

One of the main objectives of my thesis was the optimized and reproducible preparation of fibrous systems and the micro- and macrostructural characterization of the prepared samples. A further aim was to investigate whether the spun fibers can be further processed to tablets without destructing the advantageous microstructural properties that significantly improve the drug release, or whether they can be directly applied to therapeutically effective topical formulations with controlled and predictable drug release for antibacterial and tissue regeneration purposes.

In the first phase of the experiments, I developed an advantageous and easy-to-use technical version of centrifugal spinning device for laboratory-size, reproducible production of high quality microfibers. I have optimized and specified the preparation of PVP-based microfibers with the designed centrifugal spinning device. I had analysed the effect of the solvent and the polymer concentration on the microstructure of the fibers, which is predictive for the release of the active ingredient. I have found that the fiber structure can be processed without microstructural damage and is potentially suitable for integration into the technological operations of classical tableting.

Based on the *in vitro*, *in silico* and *in vivo* results, I found that my PVA-based multi-layered wound dressings containing colistin sulfate and APO monomer are capable for controlled release of the drugs and along with effectively treating the antibacterial infections of wounds, stimulating the tissue regeneration. The custom-made *in vitro* dissolution cell developed for the topical preparation provided authentic data on the drug release profile of the system.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Dévay A, Antal A. A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai. Medicina, Budapest, 2009: 183-207.
2. Siepmann J, Siepmann F. (2013) Mathematical modeling of drug dissolution. *Int J Pharm*, 453 (1): 12-24.
3. Liu L, Che B. (2006) Preparation of monolithic osmotic pump system by coating the indented core tablet. *Eur J Pharm and Biopharm*, 64 (2): 180-184.
4. Park K, Mersny RJ. (2000) Controlled drug delivery: present and future. ACS Symposium Series, Vol. 752 Chapter 1, pp 2-12.
5. Mansour HM, Sohn M, Al-Ghananeem A, DeLuca PP. (2010) Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. *Int J Mol Sci*, 11 (9): 3298-3322.
6. Ranade VV, Cannon JB. Drug delivery systems. CRC press, Boca Raton, 2011: 1-32.
7. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12 (3): 413-420.
8. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev*, 23 (1): 3-25.
9. Keserü GM, Makara GM. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. (2009) *Nat Rev Drug Discov*, 8 (3): 203-212.
10. Hann MM. (2011) Molecular obesity, potency and other addictions in drug discovery. *Med Chem Comm*, 2 (5): 349-355.
11. Pouton CW. (2006) Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci*, 29 (3): 278-287.
12. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. (2011) Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *Int J Pharm*, 420 (1): 1-10.
13. Krishnaiah YS. (2010) Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J Bioequiv Availab*, 2 (2): 28-36.

14. Brough C, Williams RO. (2013) Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *Int J Pharm*, 453 (1):157-166.
15. Singhal D, Curatolo W. (2004) Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliv Rev*, 56 (3): 335-347.
16. Nagy ZK, Balogh A, Démuth B, Pataki H, Vigh T, Szabó B, Molnár K, Schmidt BT, Horák P, Marosi G, Verreck G, Van Assche I, Brewster ME. (2015) High speed electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole. *Int J Pharm*, 480 (1): 137-142.
17. Murugan R, Ramakrishna S. (2007) Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Eng*, 13 (8): 1845-1866.
18. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, et al. (1994) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 12 (7): 689-693.
19. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. (2006) Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng*, 12 (5): 1197-1211.
20. Zhong S, Teo WE, Zhu X, Beuerman RW, Ramakrishna S, Yung LYL. (2006) An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J Biomed Mater Res A*, 79 (3):456-463.
21. Chandrasekaran AR, Venugopal J, Sundarrajan S, Ramakrishna S. (2011) Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. *Biomed Mater*, 6 (1): 015001.
22. Gupta V, Kothari V. *Manufactured fibre technology*: Springer Science & Business Media; Dordrecht, 2012:14-30.
23. Persano L, Camposeo A, Tekmen C, Pisignano D. (2013) Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: a review. *Macromol Mater Eng*, 298 (5): 504-520.
24. Koski A, Yim K, Shivkumar S. (2004) Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mater Lett*, 58 (3): 493-497.
25. Tao J, Shivkumar S. (2007) Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA. *Mater Lett*, 61 (11): 2325-2328.
26. Bhardwaj N, Kundu SC. (2010) Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*, 28 (3): 325-347.

27. Fridrikh SV, Jian HY, Brenner MP, Rutledge GC. (2003) Controlling the fiber diameter during electrospinning. *Phys Rev Lett*, 90 (14): 144502.
28. Beachley V, Wen X. (2009) Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Mater Sci Eng*, 29 (3): 663-668.
29. Greiner A, Wendorff JH. (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Edit*, 46 (30): 5670-5703.
30. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. (2002) Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35 (22): 8456-8466.
31. Reneker DH, Chun I. (1996) Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7 (3): 216.
32. Zhou FL, Gong RH. (2008) Manufacturing technologies of polymeric nanofibres and nanofibre yarns. *Polym Int*, 57 (6): 837-845.
33. Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LH. (2009) Solution blow spinning: A new method to produce micro-and nanofibers from polymer solutions. *J Appl Polym Sci*, 113 (4): 2322-2330.
34. Mîndru TB, Ignat L, Mîndru IB, Pinteala M. (2013) Morphological aspects of polymer fiber mats obtained by air flow rotary-jet spinning. *Fiber Polym*, 14 (9): 1526-1534.
35. Badrossamay MR, McIlwee HA, Goss JA, Parker KK. (2010) Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano Lett*, 10 (6): 2257-2261.
36. Golecki HM, Yuan H, Glavin C, Potter B, Mohammad R, Goss JA, Phillips MD, Parker KK. (2014) Effect of solvent evaporation on fiber morphology in rotary jet spinning. *Langmuir*, 30 (44): 13369-13374.
37. Ahn Y, Park S, Kim G, Hwang YJ, Lee CG, Shin HS, Lee JK. (2006) Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. *Curr Appl Phys*, 6 (6): 1030-1035.
38. Sun J, Wang F, Sui Y, She Z., Zhai W., Wang C., Deng Y. (2012) Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals. *Int J Nanomed*, 7 :5733-5744.

39. Jinno J-i, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, Toguchi H, Liversidge GG, Higaki K, Kimura T. (2006) Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release*, 111 (1): 56-64.
40. Galli C. (2006) Experimental determination of the diffusion boundary layer width of micron and submicron particles. *Int J Pharm*, 313 (1): 114-122.
41. Noyes AA, Whitney WR. (1897) The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc*, 19 (12): 930-934.
42. Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y. (2007) Nanosizing — Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv Drug Deliver Rev*, 59 (7): 631-644.
43. Lakshman JP, Cao Y, Kowalski J, Serajuddin AT. (2008) Application of melt extrusion in the development of a physically and chemically stable high-energy amorphous solid dispersion of a poorly water-soluble drug. *Mol Pharmaceut*, 5 (6): 994-1002.
44. Chiou WL, Riegelman S. (1971) Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J Pharm Sci*, 60 (9): 1281-1302.
45. Van den Mooter G. (2012) The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. *Drug Discov Today Technol*, 9 (2): 79-85.
46. Sebe I, Kallai-Szabo B, Zelko R, Szabo D. (2015) Polymers and formulation strategies of nanofibrous systems for drug delivery application and tissue engineering. *Curr Med Chem*, 22 (5): 604-617.
47. Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LHC. Solution blow spinning. Google Patents; 2014.
48. Jarusuwannapoom T, Hongrojjanawiwat W, Jitjaicham S, et al. (2005) Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *Eur Polym J*, 41 (3): 409-421.
49. Thompson C, Chase GG, Yarin A, Reneker D. (2007) Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*, 48 (23): 6913-6922.

50. Zhao Z, Li J, Yuan X, Li X, Zhang Y, Sheng J. (2005) Preparation and properties of electrospun poly (vinylidene fluoride) membranes. *J Appl Polym Sci*, 97 (2): 466-474.
51. Kim B, Park H, Lee S-H, Sigmund WM. (2005) Poly (acrylic acid) nanofibers by electrospinning. *Mater Lett*, 59 (7): 829-832.
52. Gupta P, Elkins C, Long TE, Wilkes GL. (2005) Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46 (13): 4799-4810.
53. Jiang H, Fang D, Hsiao BS, Chu B, Chen W. (2004) Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules*, 5 (2): 326-333.
54. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. (2007) Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 59 (4): 207-233.
55. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*, 63 (15): 2223-2253.
56. Cooley JF. Apparatus for electrically dispersing fluids. Google Patents; 1902.
57. Morton WJ. Method of dispersing fluids. Google Patents; 1902.
58. Tucker N, Stanger J, Staiger M, Razzaq H, Hofman K. (2012) The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. *J Eng Fiber Fabr*, 7: 63-73.
59. Taylor G. (1969) Electrically driven jets. *Proc Royal Society Lond A*, 313: 453-457.
60. Salata OV. (2005) Tools of nanotechnology: Electrospray. *Curr nanosci*, 1 (1): 25-33.
61. Heikkilä P, Harlin A. (2008) Parameter study of electrospinning of polyamide-6. *Eur Polym J*, 44 (10): 3067-3079.
62. Li Z, Wang C. *One-Dimensional Nanostructures*. Springer, Heidelberg, 2013: 15-28.

63. De Vrieze S, Van Camp T, Nelvig A, Hagström B, Westbroek P, De Clerck K. (2009) The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J Mater Sci*, 44 (5): 1357.
64. Andradý AL. Science and technology of polymer nanofibers. John Wiley & Sons, 2008:81-110.
65. Ramakrishna S, Fujuhara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. World Scientific Publishing Co. Plc. Ltd., Singapore, 2005:90-116.
66. Behrens AM, Casey BJ, Sikorski MJ, Wu KL, Tutak W, Sandler AD, Kofinas P (2014) In situ deposition of PLGA nanofibers via solution blow spinning. *ACS Macro Lett*, 3 (3): 249-254.
67. Varabhas JS, Chase GG, Reneker DH. (2008) Electrospun nanofibers from a porous hollow tube. *Polymer*, 49 (19): 4226-4229.
68. Khamforoush M, Asgari T. (2015) A modified electro-centrifugal spinning method to enhance the production rate of highly aligned nanofiber. *Nano*, 10 (02): 1550016-7.
69. Dabirian F, Ravandi SH, Pishavar A, Abuzade R. (2011) A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. *J Electrostat*, 69 (6): 540-546.
70. Kim YM, Ahn KR, Sung YB, Jang RS. Manufacturing device and the method of preparing for the nanofibers via electro-blown spinning process. Google Patents, 2009.
71. Zhao Y-X, Zhou X-H, Li L, Xu W, Kang W-M, Cheng B-W. (2016) Preparation of porous CeO₂/CuO/Al₂O₃ fibers via electro-blown spinning method. *Mater Lett*, 164: 460-463.
72. Um IC, Fang D, Hsiao BS, Okamoto A, Chu B. (2004) Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules*, 5 (4): 1428-1436.
73. Chu B, Hsiao BS, Fang D. Apparatus for electro-blowing or blowing-assisted electro-spinning technology and process for post treatment of electrospun or electroblown membranes. Google Patents, 2008.
74. Park JC. Multi-layered nanofiber medium using electro-blowing, melt-blowing or electrospinning, and method for manufacturing same. Google Patents, 2016.

75. Zhmayev E, Cho D, Joo YL. (2010) Nanofibers from gas-assisted polymer melt electrospinning. *Polymer*, 51 (18): 4140-4144.
76. Balogh A, Horváthová T, Fülöp Z, Loftsson T, Harasztos AH, Marosi Gy, Nagy ZsK. (2015) Electroblowing and electrospinning of fibrous diclofenac sodium-cyclodextrin complex-based reconstitution injection. *J Drug Deliv Sci Tech*, 26: 28-34.
77. Yang R, He J, Xu L, Yu J. (2009) Bubble-electrospinning for fabricating nanofibers. *Polymer*, 50 (24): 5846-5850.
78. Sunthornvarabhas J, Reneker DH, Chase GG. Bubble launched electrospinning jets. Google Patents, 2012.
79. Chen R-X, Li Y, He J-H. (2014) Mini-review on Bubbfil spinning process for mass-production of nanofibers. *Matéria (Rio J.)*, 19 (4): 325-343.
80. Liu S-L, Long Y-Z, Zhang Z-H, Zhang H-D, Sun B, Zhang J-C, Han W-P. (2013) Assembly of oriented ultrafine polymer fibers by centrifugal electrospinning. *J Nanomater*, 2013: 713275-9.
81. Liao C-C, Wang C-C, Chen C-Y. (2011) Stretching-induced crystallinity and orientation of polylactic acid nanofibers with improved mechanical properties using an electrically charged rotating viscoelastic jet. *Polymer*, 52 (19): 4303-4318.
82. Lu B, Wang Y, Liu Y, Duan H, Zhou J, Zhang Z, Wang Y, Li X, Wang W, Lan W, Xie E. (2010) Superhigh-Throughput Needleless Electrospinning Using a Rotary Cone as Spinneret. *Small*, 6 (15): 1612-1616.
83. Molnar K, Nagy ZK. (2016) Corona-electrospinning: needleless method for high-throughput continuous nanofiber production. *Eur Polym J*, 74: 279-286.
84. Cengiz F, Dao TA, Jirsak O. (2010) Influence of solution properties on the roller electrospinning of poly (vinyl alcohol). *Polym Eng Sci*, 50 (5): 936-943.
85. Jirsak O, Sanetnik F, Lukas D, Kotek V, Martinova L, Chaloupek J. Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. Google Patents, 2009.
86. Niu H, Lin T, Wang X. (2009) Needleless electrospinning. I. A comparison of cylinder and disk nozzles. *J Appl Polym Sci*, 114 (6): 3524-3530.

87. El-Newehy MH, Al-Deyab SS, Kenawy E-R, Abdel-Megeed A. (2012) Fabrication of electrospun antimicrobial nanofibers containing metronidazole using nanospider technology. *Fiber Polym*, 13 (6): 709-717.
88. Jirsak O, Sysel P, Sanetnik F, Hruza J, Chaloupek J. (2010) Polyamic acid nanofibers produced by needleless electrospinning. *J Nanomater*, 2010: 49.
89. Dosunmu O, Chase GG, Kataphinan W, Reneker D. (2006) Electrospinning of polymer nanofibres from multiple jets on a porous tubular surface. *Nanotechnology*, 17 (4): 1123-1127.
90. Chen R, Huang C, Ke Q, He C, Wang H, Mo X. (2010) Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloid Surface B*, 79 (2): 315-325.
91. Ma G, Fang D, Liu Y, Zhu X, Nie J. (2012) Electrospun sodium alginate/poly (ethylene oxide) core-shell nanofibers scaffolds potential for tissue engineering applications. *Carbohydr polym*, 87 (1): 737-743.
92. Ahmad Z, Zhang H, Farook U, Edirisinghe M, Stride E, Colombo P. (2008) Generation of multilayered structures for biomedical applications using a novel tri-needle coaxial device and electrohydrodynamic flow. *J R Soc Interface*, 5 (27): 1255-1261.
93. Jiang H, Hu Y, Li Y, Zhao P, Zhu K, Chen W. (2005) A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J Control Release*, 108 (2): 237-243.
94. Varesano A, Carletto RA, Mazzuchetti G. (2009) Experimental investigations on the multi-jet electrospinning process. *J Mater Process Tech*, 209 (11): 5178-5785.
95. Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T. (2005) Mesoscopic spatial designs of nano-and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*, 26 (1): 37-46.
96. Li D, Wang Y, Xia Y. (2003) Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano Lett*, 3 (8): 1167-1171.
97. Teo W, Ramakrishna S. (2005) Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibres over two fixed points. *Nanotechnology*, 16 (9): 1878.

98. Sahay R, Thavasi V, Ramakrishna S. (2011) Design modifications in electrospinning setup for advanced applications. *J Nanomater*, 2011: 317673-17.
99. Wu Y, Carnell LA, Clark RL. (2007) Control of electrospun mat width through the use of parallel auxiliary electrodes. *Polymer*, 48 (19): 5653-5661.
100. Lee K, Kim H, Khil M, Ra Y, Lee D. (2003) Characterization of nano-structured poly (ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, 44 (4): 1287-1294.
101. Katta P, Alessandro M, Ramsier R, Chase G. (2004) Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. *Nano Lett*, 4 (11): 2215-2218.
102. Chew SY, Wen J, Yim EK, Leong KW. (2005) Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules*, 6 (4): 2017-2024.
103. Sundaray B, Subramanian V, Natarajan T, Xiang R-Z, Chang C-C, Fann W-S. (2004) Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl Phys Lett*, 84 (7): 1222-1224.
104. Xu C, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. (2004) Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*, 25 (5): 877-886.
105. Zussman E, Theron A, Yarin A. (2003) Formation of nanofiber crossbars in electrospinning. *Appl Phys Lett*, 82 (6): 973-975.
106. Dalton PD, Klee D, Möller M. (2005) Electrospinning with dual collection rings. *Polymer*, 46 (3): 611-614.
107. Smit E, Büttner U, Sanderson RD. (2005) Continuous yarns from electrospun fibers. *Polymer*, 46 (8): 2419-2423.
108. Deitzel J, Kleinmeyer J, Hirvonen J, Tan NB. (2001) Controlled deposition of electrospun poly (ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 42 (19): 8163-8170.
109. Jonsson JL. For centrifugal machines. Google Patents, 1897.
110. Amalorpava Mary L, Senthilram T, Suganya S, Nagarajan L, Venugopal J, Ramakrishna S, Giri Dev VR.(2013) Centrifugal spun ultrafine fibrous web as a potential drug delivery vehicle. *Express Polym Lett*, 7 (3): 238-248.

111. Sebe I, Kállai-Szabó B, Kovács KN, Szabadi E, Zelkó R. (2015) Micro-and macrostructural characterization of polyvinylpyrrolidone rotary-spun fibers. *Drug Dev Ind Pharm*, 41 (11): 1829-1834.
112. McEachin Z, Lozano K. (2012) Production and characterization of polycaprolactone nanofibers via forcespinning™ technology. *J Appl Polym Sci*, 126 (2): 473-479.
113. Mukhopadhyay S. Microfibres—An overview. (2002) *Indian J Fibre Text Tes*, 27:307-314.
114. Weitz R, Harnau L, Rauschenbach S, Burghard M, Kern K. (2008) Polymer nanofibers via nozzle-free centrifugal spinning. *Nano Lett*, 8 (4): 1187-1191.
115. Zhang X, Lu Y. (2014) Centrifugal spinning: an alternative approach to fabricate nanofibers at high speed and low cost. *Polym Rev*, 54 (4): 677-701.
116. Chen HS, Miller CE. (1976) Centrifugal spinning of metallic glass filaments. *Mater Res Bull*, 11 (1): 49-54.
117. Ren L, Ozisik R, Kotha SP, Underhill PT. (2015) Highly efficient fabrication of polymer nanofiber assembly by centrifugal jet spinning: process and characterization. *Macromolecules*, 48 (8): 2593-2602.
118. Taghavi S, Larson R. (2014) Regularized thin-fiber model for nanofiber formation by centrifugal spinning. *Phys Rev E*, 89 (2): 023011.
119. Padron S, Fuentes A, Caruntu D, Lozano K. (2013) Experimental study of nanofiber production through forcespinning. *J Appl Phys*, 113 (2): 024318.
120. Xu H, Chen H, Li X, Liu C, Yang B. (2014) A comparative study of jet formation in nozzle-and nozzle-less centrifugal spinning systems. *J Polym Sci Part B: Pol Phys*, 52 (23): 1547-1559.
121. Divvela MJ, Ruo A-C, Zhmayev Y, Joo YL. (2017) Discretized modeling for centrifugal spinning of viscoelastic liquids. *J Non-Newton Fluid*, 247: 62-77.
122. Lu Y, Li Y, Zhang S, Xu G, Fu K, Lee H, Zhang X. (2013) Parameter study and characterization for polyacrylonitrile nanofibers fabricated via centrifugal spinning process. *Eur Polym J*, 49 (12): 3834-3845.
123. Lu Y, Fu K, Zhang S, Li Y, Chen C, Zhu J, Yanilmaz M, Dirican M, Zhang X.

- (2015) Centrifugal spinning: A novel approach to fabricate porous carbon fibers as binder-free electrodes for electric double-layer capacitors. *J Power Sources*, 273: 502-510.
124. Steel ML, Norton-Berry P. Centrifugal spinning. Google Patents, 1995.
 125. Lozano K, Sarkar K. Methods and apparatuses for making superfine fibers. Google Patents, 2009.
 126. Sarkar K, Gomez C, Zambrano S, Ramirez M, Hoyos E, Vasquez H, Lozano K. (2010) Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today*, 13 (11): 12-14.
 127. Yanilmaz M, Zhang X. (2015) Polymethylmethacrylate/polyacrylonitrile membranes via centrifugal spinning as separator in Li-ion batteries. *Polymers*, 7 (4): 629-643.
 128. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Tan NB. (2001) The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42 (1): 261-272.
 129. Yang D, Lu B, Zhao Y, Jiang X. (2007) Fabrication of aligned fibrous arrays by magnetic electrospinning. *Adv Mater*, 19 (21): 3702-3706.
 130. Thomas V, Zhang X, Vohra YK. (2009) A biomimetic tubular scaffold with spatially designed nanofibers of protein/PDS® bio-blends. *Biotechnol Bioeng*, 104 (5): 1025-1033.
 131. Meng Z, Wang Y, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng Y. (2010) Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Mater Sci Eng*, 30 (8): 1204-1210.
 132. Mathew G, Hong J, Rhee J, Leo D, Nah C. (2006) Preparation and anisotropic mechanical behavior of highly-oriented electrospun poly (butylene terephthalate) fibers. *J Appl Polym Sci*, 101 (3): 2017-2021.
 133. Ding B, Li C, Miyauchi Y, Kuwaki O, Shiratori S. (2006) Formation of novel 2D polymer nanowebs via electrospinning. *Nanotechnology*, 17 (15): 3685-3691.
 134. Cai S, Xu H, Jiang Q, Yang Y. (2013) Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study. *Langmuir*, 29 (7): 2311-2318.

135. Cao H, Mchugh K, Chew SY, Anderson JM. (2010) The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction. *J Biomed Mater Res A*, 93 (3): 1151-1159.
136. Sebe I, Ostorházi E, Bodai Z, Eke Z, Szakács J, Kovács NK, Zelkó R. (2017) In vitro and in silico characterization of fibrous scaffolds comprising alternate colistin sulfate-loaded and heat-treated polyvinyl alcohol nanofibrous sheets. *Int J Pharm*, 523 (1): 151-158.
137. Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. (2005) Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur Polym J*, 41 (3): 423-432.
138. Yoo HS, Kim TG, Park TG. (2009) Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 61 (12): 1033-1042.
139. Sun Z, Zussman E, Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A. (2003) Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Adv Mater*, 15 (22): 1929-1932.
140. Jiang H, Fang D, Hsiao B, Chu B, Chen W. (2004) Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes. *J Biomater Sci, Polym Edit*, 15 (3): 279-296.
141. Shao S, Li L, Yang G, Li J, Luo C, Gong T, Zhou S. (2011) Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. *Int J Pharm*, 421 (2): 310-320.
142. Sebe I, Bodai Z, Eke Z, Kállai-Szabó B, Szabó P, Zelkó R. (2015) Comparison of directly compressed vitamin B12 tablets prepared from micronized rotary-spun microfibers and cast films. *Drug Dev Ind Pharm*, 41 (9): 1438-1442.
143. Verreck G, Chun I, Rosenblatt J, Peeters J, Dijk AV, Mensch J, Noppe M, Brewster ME. (2003) Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J Control Release*, 92 (3): 349-360.
144. Sebe I, Szabó P, Kállai-Szabó B, Zelkó R. (2015) Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. *Int J Pharm*, 494 (1): 516-530.

145. Pan H, Jiang H, Chen W. (2008) The Biodegradability of Electrospun Dextran/PLGA Scaffold in a Fibroblast/Macrophage Co-culture. *Biomaterials*, 29(11): 1583–1592.
146. Kennedy M, Hu J, Gao P, Ali-Reynolds A, Chal B, Gupta V, Ma C, Mahajan N, Akrami A, Surapaneni S. (2008) Enhanced bioavailability of a poorly soluble VR1 antagonist using an amorphous solid dispersion approach: a case study. *Mol Pharm*, 5 (6): 981-993.
147. Brettmann BK, Cheng K, Myerson AS, Trout BL. (2013) Electrospun formulations containing crystalline active pharmaceutical ingredients. *Pharm Res*, 30 (1): 238-246.
148. Démuth B, Farkas A, Szabó B, Balogh A, Nagy B, Vágó E, Vigh T (2017) Development and tableting of directly compressible powder from electrospun nanofibrous amorphous solid dispersion. *Adv Powder Technol*, 28 (6): 1554-1563.
149. Zamani M, Morshed M, Varshosaz J, Jannesari M. (2010) Controlled release of metronidazole benzoate from poly ϵ -caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, 75 (2): 179-185.
150. Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D. (2007) Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng: C*, 27 (3): 504-509.
151. Chen J-P, Chang G-Y, Chen J-K. (2008) Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloid Surface A*, 313: 183-188.
152. Toshkova R, Manolova N, Gardeva E, Ignatova M, Yossifova L, Rashkov I, Alexandrov M. (2010) Antitumor activity of quaternized chitosan-based electrospun implants against Graffi myeloid tumor. *Int J Pharm*, 400 (1): 221-233.
153. Sell S, McClure MJ, Barnes CP, Knapp DC, Walpoth BH, Simpson DG, Bowlin GL. (2006) Electrospun polydioxanone–elastin blends: potential for bioresorbable vascular grafts. *Biomed Mater*, 1 (2): 72-80.
154. Bashur CA, Dahlgren LA, Goldstein AS. (2006) Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials*, 27 (33): 5681-5688.
155. Han D, Gouma P-I. (2006) Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomed-Nanotechnol*, 2 (1): 37-41.

156. Courtney T, Sacks MS, Stankus J, Guan J, Wagner WR. (2006) Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy. *Biomaterials*, 27 (19): 3631-3638.
157. Smith L, Ma P. (2004) Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloid Surface B*, 39 (3): 125-131.
158. Park BK. (2015) Biodegradable Polymers for Tissue Engineering. *J Biomed Eng Res*, 36 (6): 251-263.
159. Zeng J, Chen X, Liang Q, Xu X, Jing X. (2004) Enzymatic degradation of poly (L-lactide) and poly (ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Macromol Biosci*, 4 (12): 1118-1125.
160. Zeng J, Yang L, Liang Q, Zhan X, Guan H, Xu X, Chen X, Jing X. (2005) Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *J Control Release*, 105 (1-2): 43-51.
161. Tungprapa S, Jangchud I, Supaphol P. (2007) Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats. *Polymer*, 48 (17): 5030-5041.
162. Kim K, Luu YK, Chang C, Fang D, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. (2004) Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J Control Release*, 98 (1): 47-56.
163. Verreck G, Chun I, Peeters J, Rosenblatt J, Brewster ME. (2003) Preparation and characterization of nanofibers containing amorphous drug dispersions generated by electrostatic spinning. *Pharm Res*, 20 (5): 810-817.
164. Verreck G, Chun I, Rosenblatt J, Peeters J, Dijck AV, Mensch J, Noppe M, Brewster ME. (2003) Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J Control Release*, 92 (3): 349-60.
165. Zeng J, Aigner A, Czubayko F, Kissel T, Wendorff JH, Greiner A. (2005) Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules*, 6 (3): 1484-1488.

166. Ma G, Liu Y, Peng C, Fang D, He B, Nie J (2011) Paclitaxel loaded electrospun porous nanofibers as mat potential application for chemotherapy against prostate cancer. *Carbohydr Polym*, 86 (2): 505-512.
167. Canbolat MF, Celebioglu A, Uyar T. (2014) Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloid Surfaces B*, 115: 15-21.
168. Huang W, Zou T, Li S, Jing J, Xia X, Liu X. (2013) Drug-loaded zein nanofibers prepared using a modified coaxial electrospinning process. *AAPS Pharm Sci Tech*, 14 (2): 675-681.
169. Kataria K, Sharma A, Garg T, Goyal AK, Rath G. (2014) Novel technology to improve drug loading in polymeric nanofibers. *Drug Deliv Lett*, 4 (1): 79-86.
170. Reise M, Wyrwa R, Müller U, Zylinski M, Völpel A, Schnabelrauch M, Berg A, Jandt KD, Watts DC, Sigusch BW. (2012) Release of metronidazole from electrospun poly(l-lactide-co-d/l-lactide) fibers for local periodontitis treatment. *Dent Mater*, 28 (2): 179-188.
171. Xu X, Yang L, Xu X, Wang X, Chen X, Liang Q, Zeng J, Jing X. (2005) Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions. *J Control Release*, 108 (1): 33-42.
172. Yu DG, Branford-White C, White K, Li XL, Zhu LM. (2010) Dissolution improvement of electrospun nanofiber-based solid dispersions for acetaminophen. *AAPS Pharm Sci Tech*, 11 (2): 809-817.
173. Yu DG, Yang JM, Branford-White C, Lu P, Zhang L, Zhu LM. (2010) Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *Int J Pharm*, 400 (1-2): 158-164.
174. Cui W, Li X, Zhu X, Yu G, Zhou S, Weng J. (2006) Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly(DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation. *Biomacromolecules*, 7 (5): 1623-1629.
175. Huang LY, Branford-White C, Shen XX, Yu DG, Zhu LM. (2012) Time-engineered biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes. *Int J Pharm*, 436 (1-2): 88-96.

176. Kenawy ER, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE. (2007) Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Mater Sci Eng A*, 459 (1-2): 390-396.
177. Xu J, Jiao Y, Shao X, Zhou C. (2011) Controlled dual release of hydrophobic and hydrophilic drugs from electrospun poly (l-lactic acid) fiber mats loaded with chitosan microspheres. *Mater Lett*, 65 (17-18): 2800-2803.
178. Paaver U, Heinämäki J, Laidmäe I, Lust A, Kozlova J, Sillaste E, Kirsimäe K, Veski P, Kogermann K. (2015) Electrospun nanofibers as a potential controlled-release solid dispersion system for poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*, 479 (1): 252-260.
179. Wang Q, Hu X, Du Y, Kennedy JF. (2010) Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydr Polym*, 82 (3): 842-847.
180. Shen X, Yu D, Zhu L, Branford-White C, White K, Chatterton NP. (2011) Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *Int J Pharm*, 408 (1-2): 200-207.
181. Fathi-Azarbayjani A, Chan SY. (2010) Single and multi-layered nanofibers for rapid and controlled drug delivery. *Chem Pharm Bull*, 58 (2): 143-146.
182. Sóti PL, Nagy ZK, Sermeels G, Vajna B, Farkas A, Van Der Gucht F, Fekete P, Vigh T, Wagner I, Balogh A, Pataki H, Mezo G, Marosi Gy. (2015) Preparation and comparison of spray dried and electrospun bioresorbable drug delivery systems. *Eur Polym J*; 68: 671-679.
183. Meng ZX, Xu XX, Zheng W, Zhou HM, Li L, Zheng YF, Lou X. (2011) Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. *Colloid Surface B*, 84 (1): 97-102.
184. Meng ZX, Zheng W, Li L, Zheng YF. (2011) Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Mater Chem Phys*, 125 (3): 606-611.
185. Jiang YN, Mo HY, Yu DG. (2012) Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *Int J Pharm*, 438 (1-2): 232-239.
186. Okuda T, Tominaga K, Kidoaki S. (2010) Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes. *J Control Release*, 143 (2): 258-264.

187. Ye P, Xu ZK, Wu J, Innocent C, Seta P. (2006) Nanofibrous membranes containing reactive groups: Electrospinning from poly(acrylonitrile-co-maleic acid) for lipase immobilization. *Macromolecules*, 39 (3): 1041-1045.
188. Lee KH, Ki CS, Baek DH, Kang GD, Ihm D-W, Park YH. (2005) Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme. *Fiber Polym*, 6 (3): 181-185.
189. Kim TG, Park TG. (2006) Surface functionalized electrospun biodegradable nanofibers for immobilization of bioactive molecules. *Biotechnol Progr*, 22 (4): 1108-1113.
190. Kim TG, Park TG. (2006) Biomimicking extracellular matrix: Cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue Eng*, 12 (2): 221-233.
191. Eriksen THB, Skovsen E, Fojan P. (2013) Release of antimicrobial peptides from electrospun nanofibres as a drug delivery system. *J Biomed Nanotechnol*, 9 (3): 492-498.
192. Lee YJ, Lee JH, Cho HJ, Kim HK, Yoon TR, Shin H. (2013) Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 34 (21): 5059-5069.
193. Wang ZG, Ke BB, Xu ZK. (2007) Covalent immobilization of redox enzyme on electrospun nonwoven poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) nanofiber mesh filled with carbon nanotubes: A comprehensive study. *Biotechnol Bioeng*, 97 (4): 708-720.
194. Herricks TE, Kim SH, Kim J, Li D, Kwak JH, Grate JW, Kim SH, Xia Y. (2005) Direct fabrication of enzyme-carrying polymer nanofibers by electrospinning. *J Mater Chem*, 15 (31): 3241-3245.
195. Charernsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. (2012) Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. *Int J Pharm*, 427 (2): 379-384.
196. Choi JS, Leong KW, Yoo HS. (2008) In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials*, 29 (5): 587-596.

197. Ko S, Jang J. (2007) Protein immobilization on aminated poly(glycidyl methacrylate) nanofibers as polymeric carriers. *Biomacromolecules*, 8 (5): 1400-1403.
198. Boland ED, Matthews JA, Pawlowski KJ, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL. (2004) Electrospinning collagen and elastin: Preliminary vascular tissue engineering. *Front Biosci*, 9: 1422-1432.
199. Li M, Mondrinos MJ, Gandhi MR, Ko FK, Weiss AS, Lelkes PI. (2005) Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26 (30): 5999-6008.
200. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. (2002) Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3 (2): 232-238.
201. Ji W, Yang F, Van Den Beucken JJJP, Bian Z, Fan M, Chen Z, Jansen JA. (2010) Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning. *Acta Biomater*, 6 (11): 4199-4207.
202. Sahoo S, Ang LT, Goh JCH, Toh SL. (2010) Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*, 93 (4): 1539-1550.
203. Müller C, Ulrich J. (2012) The dissolution phenomenon of lysozyme crystals. *Cryst Res Technol*, 47 (2): 169-174.
204. Mareschek S, Greiner A, Kissel T. (2008) Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *J Control Release*, 127 (2): 180-187.
205. Puhl S, Li L, Meinel L, Germershaus O. (2014) Controlled protein delivery from electrospun non-wovens: Novel combination of protein crystals and a biodegradable release matrix. *Mol Pharm*, 11 (7): 2372-2380.
206. Liang D, Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Hadjiargyrou M, Chu B. (2005) In vitro non-viral gene delivery with nanofibrous scaffolds. *Nucleic Acids Res*, 33 (19): 1-10.
207. Kumbar SG, James R, Nukavarapu SP, Laurencin CT. (2008) Electrospun nanofiber scaffolds: Engineering soft tissues. *Biomed Mater*; 3:034002-15.
208. Kumbar SG, Nair LS, Bhattacharyya S, Laurencin CT. (2006) Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules. *J Nanosci Nanotechnol*, 6 (9-10): 2591-2607.

209. Achille C, Sundaresh S, Chu B, Hadjiargyrou M. (2012) Cdk2 Silencing via a DNA/PCL Electrospun Scaffold Suppresses Proliferation and Increases Death of Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7 (12).
210. Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. (2003) Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J Control Release*, 89 (2): 341-353.
211. Nie H, Wang CH. (2007) Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *J Control Release*, 120 (1-2): 111-121.
212. Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat SO, Jafari SH, Supaphol P. (2010) A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym Adv Technol*, 21 (2): 77-95.
213. Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, Lim CT. (2007) Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomater*, 3 (3 SPEC. ISS.):321-330.
214. Smith DJ, Reneker DH, McManus AT, Schreuder-Gibson HL, Mello C, Sennett MS. Electrospun fibers and an apparatus therefor. Google Patents, 2004.
215. Wu H, Fan J, Chu CC, Wu J. (2010) Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J Mater Sci - Mater M*, 21 (12): 3207-3215.
216. Xie J, Li X, Xia Y. (2008) Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research. *Macromol Rapid Comm*, 29 (22): 1775-1792.
217. Ratcliffe A. (2000) Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol*, 19 (4): 353-357.
218. Liu S, Dong C, Lu G, Lu Q, Li Z, Kaplan DL, Zhu H. (2013) Bilayered vascular grafts based on silk proteins. *Acta Biomater*, 9 (11): 8991-9003.
219. Lee SJ, Yoo JJ, Lim GJ, Atala A, Stitzel J. (2007) In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application. *J Biomed Mater Res A*, 83 (4): 999-1008.
220. Hall JW, Eller Z, Kellar RS, Simmons RL, Mower W, Radford RJ. Rotational spun material covered medical appliances and methods of manufacture. Google Patents, 2013.

221. Stamberg BE. Process of making a medical balloon. Google Patents, 2015.
222. Ko EK, Jeong SI, Rim NG, Lee YM, Shin H, Lee BK. (2008) In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and in vivo bone formation in composite nanofiber meshes. *Tissue Eng A*, 14 (12): 2105-2119.
223. Liu X, Ma PX. (2004) Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 32 (3): 477-486.
224. Paşcu EI, Stokes J, McGuinness GB. (2013) Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*, 33 (8): 4905-4916.
225. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. (2009) Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci*, 16: 108. doi: 10.1186/1423-0127-16-108
226. Kijeńska E, Prabhakaran MP, Swieszkowski W, Kurzydowski KJ, Ramakrishna S. (2014) Interaction of Schwann cells with laminin encapsulated PLCL core-shell nanofibers for nerve tissue engineering. *Eur Polym J*, 50 (1): 30-38.
227. Gupta D, Venugopal J, Prabhakaran MP, Dev VR, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. (2009) Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater*, 5 (7): 2560-2569.
228. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. (2005) Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26 (15): 2603-2610.
229. Kador KE, Montero RB, Venugopalan P, Hertz J, Zindell AN, Valenzuela DA, Uddin MS, Lavik EB, Muller KJ, Andreopoulos FM, Goldberg JL. (2013) Tissue engineering the retinal ganglion cell nerve fiber layer. *Biomaterials*, 34 (17): 4242-4250.
230. Levy SB, Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*, 10 (12s): S122.
231. Weber JT, Courvalin P. (2005) An emptying quiver: antimicrobial drugs and resistance. *Emerg Infect Dis*, 11 (6): 791.
232. Overbye KM, Barrett JF. (2005) Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today*, 10 (1): 45-52.

233. Ge Y, MacDonald DL, Holroyd KJ, Thornsberry C, Wexler H, Zasloff M. (1999) In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob Agents Ch*, 43 (4): 782-788.
234. Bush K, Macielag M, Weidner-Wells M. (2004) Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond phase 1. *Curr Opin Microbiol*, 7 (5): 466-476.
235. Katti DS, Robinson KW, Ko FK, Laurencin CT. (2004) Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*; 70 (2): 286-296.
236. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR (1998) Impediments to wound healing. *Am J Surg*, 176 (2): 39S-47S.
237. Field CK, Kerstein MD. (1994) Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg*, 167 (1): S2-S6.
238. Newman A, Engers D, Bates S, Ivanisevic I, Kelly RC, Zografí G. (2008) Characterization of amorphous API: Polymer mixtures using X-ray powder diffraction. *J Pharm Sci*, 97 (11): 4840-4856.
239. Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. (2007) A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*, 44 (3): 683-700.
240. Stewart S, Priore RJ, Nelson MP, Treado PJ. (2012) Raman imaging. *Ann Rev Anal Chem*, 5: 337-360.
241. Soares MFdLR, Soares-Sobrinho JL, de Silva KER, Alves LDS, Lopez PQ, Correia LP, Souza FS, Maceˆdo RO, Rolim-Neto PJ. (2011) Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. *J Therm Anal Calorim*, 104 (1): 307-313.
242. Strange JH, Mitchell J, Webber JBW. (2003) Pore surface exploration by NMR. *Magn Reson Imaging*, 21 (3): 221-226.
243. Anderson CD. (1933) The positive electron. *Phys Rev*, 43 (6): 491-494.
244. Ter-Pogossian MM. Positron emission tomography (PET). *Diagnostic Imaging in Medicine*. Springer; 1983: 273-277.
245. McCullagh C, Yu Z, Jamieson A, Blackwell J, McGervey J. (1995) Positron annihilation lifetime measurements of free volume in wholly aromatic copolyesters and blends. *Macromolecules*, 28 (18): 6100-6107.

246. Kobayashi Y, Haraya K, Kamiya Y, Hattori S. (1992) Correlation between the ortho-positronium pick-off annihilation lifetime and the free volume in molecular liquids and polymers. *Bull Chem Soc Japan*, 65 (1): 160-163.
247. Volkovitsky P, Unterweger M. (2012) Feasibility study of activity measurement of positron emitters based on gamma–gamma coincident detection by two NaI (TI) detectors. *Appl Radiat Isotopes*, 70 (9): 2037-2042.
248. Dutta D, Chatterjee S, Pillai K, Pujari P, Ganguly B. (2005) Pore structure of silica gel: a comparative study through BET and PALS. *Chem Phys*, 312 (1): 319-324.
249. Mincov I, Petkov M, Tsou P, Troev T. (2004) Porosity characterization of aerogels using positron annihilation lifetime spectroscopy. *J Non-Cryst Solids*, 350: 253-258.
250. Sato K, Murakami H, Ito K, Hirata K, Kobayashi Y. (2009) Positron age–momentum correlation studies of free volumes in polymers. *Radiat Phys Chem*, 78 (12): 1085-1087.
251. Paranhos CM, Soares BG, Machado JC, Windmüller D, Pessan LA. (2007) Microstructure and free volume evaluation of poly (vinyl alcohol) nanocomposite hydrogels. *Eur Polym J*, 43 (12): 4882-4890.
252. Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Effect of storage on microstructural changes of Carbopol polymers tracked by the combination of positron annihilation lifetime spectroscopy and FT-IR spectroscopy. *Int J Pharm*, 416 (1): 160-163.
253. Kiss D, Süvegh K, Marek T, Dévényi L, Novák C, Zelkó R. (2006) Tracking the physical aging of poly (ethylene oxide): A technical note. *Aaps Pharm Sci Tech*, 7 (4): E95-E8.
254. Szente V, Süvegh K, Marek T, Zelkó R. (2009) Prediction of the stability of polymeric matrix tablets containing famotidine from the positron annihilation lifetime distributions of their physical mixtures. *J Pharm Biomed Anal*, 49 (3): 711-714.
255. Kiss D, Süvegh K, Zelkó R. (2008) The effect of storage and active ingredient properties on the drug release profile of poly (ethylene oxide) matrix tablets. *Carbohydr Polym*, 74 (4): 930-933.
256. Wang Y, Jing X. (2008) Formation of polyaniline nanofibers: a morphological study. *J Phys Chem B*, 112 (4): 1157-1162.

257. Tan E, Lim C. (2005) Nanoindentation study of nanofibers. *Appl Phys Lett*, 87 (12): 123106.
258. Otvos L, Wade JD, Lin F, Condie BA, Hanrieder J, Hoffmann R. (2005) Designer antibacterial peptides kill fluoroquinolone-resistant clinical isolates. *J Med Chem*, 48 (16): 5349-5359.
259. Rozgonyi F, Szabo D, Kocsis B, Ostorházi E, Abbadessa G, Cassone M, Wade JD, Otvos L Jr. (2009) The antibacterial effect of a proline-rich antibacterial peptide A3-APO. *Curr Med Chem*, 16 (30): 3996-4002.
260. Sebe I, Ostorhazi E, Fekete A, Kovacs K.N., Zelko R., Kovalszky I., Li W., Wade J.D., Szabo D., Otvos L. (2016) Polyvinyl alcohol nanofiber formulation of the designer antimicrobial peptide APO sterilizes *Acinetobacter baumannii*-infected skin wounds in mice. *Amino Acids*, 48 (1): 203-211.
261. Langenbucher F. (1972) Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *J Pharm Pharmacol*, 24 (12): 979-981.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. Sebe I, Ostorhazi E, Bodai Zs, Eke Zs, Szakacs J, Kovacs NK, Zelkó R. (2017)
In vitro and in silico characterization of fibrous scaffolds comprising alternate colistin sulfate-loaded and heat-treated polyvinyl alcohol nanofibrous sheets. *Int J Pharm*, 523: 151-158.
2. Sebe I, Ostorhazi E, Fekete A, Kovacs NK, Zelko R, Kovalszky I, Li W, Wade JD, Szabo D, Otvos L Jr. (2016) Polyvinyl alcohol nanofiber formulation of the designer antimicrobial peptide APO sterilizes *Acinetobacter baumannii*-infected skin wounds in mice. *Amino Acids*, 48: 203-211.
3. Sebe I, Bodai Zs, Eke Zs, Kállai-Szabó B, Szabó P, Zelkó R. (2015) Comparison of directly compressed vitamin B12 tablets prepared from micronized rotary-spun microfibers and cast films. *Drug Dev Ind Pharm*, 41: 1438-1442.
4. Sebe I, Kállai-Szabó B, Kovács NK, Szabadi E, Zelkó R. (2015) Micro- and macrostructural characterization of polyvinylpyrrolidone rotary-spun fibers. *Drug Dev Ind Pharm*, 41: 1829-1834.
5. Sebe I, Szabó B, Nagy ZsK, Szabó D, Zsidai L, Kocsis B, Zelkó R. (2013) Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique. *Int J Pharm*, 458: 99-103.

10.2. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

1. Sipos E, Szabó ZI, Rédei E, Szabó P, Sebe I, Zelkó R. (2016) Preparation and characterization of nanofibrous sheets for enhanced oral dissolution of nebigolol hydrochloride. *J Pharmaceut Biomed*, 129: 224-228.

2. Csoban Zs, Kallai-Szabo B, Kallai-Szabo N, Sebe I, Gordon P, Antal I. (2015) Improvement of mechanical properties of pellet containing tablets by thermal treatment. *Int J Pharm*, 496: 489-496.
3. Krüger-Szabó A, Aigner Z, Balogh E, Sebe I, Zelkó R, Antal I. (2015) Microstructural analysis of the fast gelling freeze-dried sodium hyaluronate. *J Pharmaceut Biomed*, 104: 12-16.
4. Szabó P, Sebe I, Stiedl B, Kállai-Szabó B, Zelkó R. (2015) Tracking of crystalline-amorphous transition of carvedilol in rotary spun microfibers and their formulation to orodispersible tablets for in vitro dissolution enhancement. *J Pharmaceut Biomed*, 115: 359-367.
5. Kállai-Szabó B, Sinka M, Stiedl B, Sebe I, Antal I, Zelkó R. (2014) Tracking of the solubility enhancement and drug release stability of melt extrudates containing mebendazole. *J Drug Devliv Sci Tec*, : 514-518.
6. Szabó P, Kállai-Szabó B, Kállai-Szabó N, Sebe I, Zelkó R. (2014) Preparation of hydroxypropyl cellulose microfibers by high speed rotary spinning and the prediction of fiber forming properties of hydroxypropyl cellulose gels by texture analysis. *Cellulose*, 21: 4419-4427.
7. Szabó P, Kállai-Szabó B, Sebe I, Zelkó R. (2014) Preformulation study of fiber formation and formulation of drug-loaded microfiber based orodispersible tablets for in vitro dissolution enhancement. *Int J Pharm*, 477: 643-649.
8. Szabó B, Sebe I, Kállai N, Süvegh K, Zelkó R. (2013) Comparison of the micro- and macrostructural characteristics of biopolymer cast films. *Eur Polym J*, 49: 2422-2425.
9. Kovács G, Varga D, Sebe I, Hajdú M, Szabó P, Ostorházi E, Antal I. (2015) Korszerű tartósítási módszer fejlesztése magisztrálisan előállítható műkönnyhöz. *Acta Pharm Hung*, 85: 139-144.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném írásban is kifejezni őszinte hálámat és tiszteletemet, illetve egyben megköszönni mindennemű támogatását témavezetőmnek, **Prof. Zelkó Románának**, aki egyedülálló tudományos szemléletével, lendületével és tudásával segítette a munkámat. Ezt a segítséget túlzás nélkül nevezhetem egy olyan intenzív közös munkának, amelynek során ténylegesen megtapasztalhattam a valódi kutatói szabadság élményét és lehetőségeit, sikereit. Nagyon sokat tanultam mindezekből és sokat tanultam tőle.

Külön köszönettel tartozom Dr. Ostorházi Eszternek és Dr. Szabó Dórának, a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársainak a mikrobiológiai vizsgálatokban és állatkísérletekben nyújtott rendkívüli segítségéért és türeleméért, Dr. Bodai Zsoltnak a nélkülözhetetlen műszeres analitikai módszerek kidolgozásáért, a habszivacsért, amelyen éjszakánként aludtam a mérések során, Dr. Kállai-Szabó Barnabásnak és Dr. Süvegh Károlynak (ELTE) a PALS műszeres technika rejtelseibe történő bevezetésért, kreatív közös gondolkozásukért.

Köszönöm minden munkatársamnak, együttműködő partneremnek, mostanra részben barátaimnak, hogy az ötleteimnek, kutatási témámnak, nekem megelőlegezett bizalommal és legjobb tudásukkal jelentősen hozzájárultak az eredményeimhez, amelyeket csak ebben a kontextusban szabad a magaménak mondanom: Dr. Ötvös Lászlónak (SE) az A3-APO és APO monomer peptideket és az állatkísérletekben nyújtott támogatását, Dr. Kovács Norbert Krisztinának (BME), Dr. Nagy Zsombor Kristófnak (BME) és Szakács József doktorandusznak a morfológiai, szakítószilárdsági, testhőanalízis vizsgálatokban nyújtott segítségét és az eszközök használatának lehetőségét, a közös gondolkodást, Dr. Zsidai Lászlónak (Szent István Egyetem) és Kovács Istvánnak a szálképző eszközök tervezésében és műszaki kivitelezésében nyújtott segítségét, Dr. Eke Zsuzsannának (ELTE) az analitikai mérésekhez nyújtott szakmai segítségét, a műszereke használatának lehetőségét és azt, hogy számomra is mindig jutott oldószer, oszlop vagy éppen pipettahegy. Köszönöm dr. Fekete Áronnak, dr. Csorba Veronikának és dr. Miszori Veronikának, Petzke Máténak, hogy diplomamunkájuk részeként, ám annál nagyobb kitartással aktívan részt vettek a szálképzési és tablettázási kísérletekben, dr. Szabadi Enikőnek a viszkozitási mérésekben nyújtott segítségét, dr. Radnai Annának (Richter Gedeon Nyrt.) a szabadalmi

ügyeim kitartó gondozását és támogatását, Dr. Kocsis Bélának (SE) a mikrobiológiai mérésekben nyújtott és dr. Bartus Gábornak (SE) a steril minták készítésében nyújtott segítségét. Köszönöm dr. Kazsoki Adriennek (SE), dr. Szabó Péternek és Dr. Szakonyi Gergelynek (Richter Gedeon Nyrt.) a háttértámogatást.

Végezetül, de nem utolsó sorban köszönöm minden családtagomnak, szeretteimnek azt a támogató háttérrel, beszélgetéseket, kíváncsi érdeklődésüket, amellyel most is, és mindig is nagyban hozzájárultak a céljaim megvalósításához.