## Új típusú poli(aszpartamid) alapú hatóanyag konjugátumok és gélek kifejlesztése orvosi és gyógyszerészeti célokra

Doktori értekezés

## Juriga Dávid

Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zrínyi Miklós, MTA tagja, egyetemi tanár

Hivatalos Bírálók: Dr. Nemes Péter, DSc., egyetemi tanár Dr. Budai Marianna, PhD., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, DSc., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Klebovich Imre, DSc., egyetemi tanár Dr. Huszthy Péter, DSc., egyetemi tanár

Budapest 2018

### Tartalomjegyzék

RÖ	ÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE6
1	BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR8
	1.1 Biopolimerek biokompatibilitása és biodegradábilitása
	1.2 Polimer alapú hatóanyaghordozó rendszerek
	1.3 Polimer-hatóanyag konjugátumok 10
	1.4 Elektrosztatikus szálképzés és gyógyszerészeti alkalmazásai 12
	1.5 Polimer gélek és tulajdonságaik 15
	1.6 Szövetmérnökség, avagy hogyan építsünk mesterséges szövetet 17
	1.6.1 Mesterséges szövetépítés folyamatai 19
	1.6.2 Hidrogélek szövettámaszként való alkalmazhatósága 20
	1.7 A poli(szukcinimid) és a poli(aszparaginsav) 22
2	CÉLKITŰZÉSEK24
3	MÓDSZEREK25
	3.1 Felhasznált vegyszerek
	3.2 Poli(szukcinimid) szintézise
	3.3 Poli(szukcinimid) módosítása: Poli(aszpartamid) alapú polimerek
	szintézise
	3.3.1 Dopamin tartalmú poli(aszpartamid) alapú gyógyszerkonjugátumok
	előállítása
	3.3.2 PSI módosítása Arg-Gly-Asp (RGD) peptid szekvenciával
	3.4 A PSI és módosított PSI polimerek analízisei
	3.4.1 Kemiai szerkezet meghatarozasa Magneses Magrezonancia (NMR)
	spektroszkopiaval
	5.4.2 Kemiai szerkezet megnatarozasa Fourier-transzformacios iniravoros
	2 4 2 Tampa maximatriáa (TC) ás Differenciál Kalarimatriáa (DSC) márás
	5.4.5 Termogravimetrias (TG) es Differenciai Kalorimetrias (DSC) meres
	3.5 PSI-DA és PSI-DA-AE minták vizsgálata
	3.5.1 Dopaminnal módosított minták oldhatóságának és oldhatóság
	kinetikájának vizsgálata

3.5.2 D	Dopaminnal módosított minták lopifilitásának (lgP) meghatározása.					
3.5.3 D	opamin leszakadási kinetikájának és degradációjának					
meghatározása.						
3.5.4 D	opamin degradációjának tömegspektrometriás (MS) analízise 31					
3.6 PSI-I	DA és PSI-DA-AE alapú nanoszálas rendszerek készítése és					
vizsgálata						
361 N	Janoszálas rendszerek készítése elektrosztatikus szálhúzás					
(electrospinning	segítségével 32					
(electrospinning	lektrosztatikus szálhúzással készített szálak vizsgálata násztázó					
elektronmikrosz	kóppal (SEM)					
363 F	lektrosztatikus szálhúzással készített szálak vizsgálata Atomerő					
mikroszkóniáva	1 (AFM) 34					
3.6.4 E	lektrosztatikus szálhúzással készített szálak vizsgálata két foton					
mikroszkópiáva	1					
3.6.5 E	lektrosztatikus szálhúzással készített szálas rendszerek oldhatóság					
kinetikáiának m	eghatározása PBS-ben					
3.6.6 A	konjugátumok membrán permeábilitásának jellemzése Parallel					
Mesterséges Me	mbrán Permeábilitási (PAMPA) módszerrel					
3.6.7 P	olimer koniugátumok és szálas minták citotoxicitásának vizsgálata					
humán eredetű r	periodontális ligamentum (PDL) ősseitekkel					
2.7 Doli(	azukainimid) ás poli(aszperosinsey) elepú sálek szintázise					
5.7 FOII(	szukennind) és pon(aszparaginsav) alapú gelek szintezise					
3.7.1 K	ülönböző keresztkötőt tartalmazó PSI gélek előállítása 37					
3.7.2 R	GD tartalmú PSI gélek szintézise					
3.7.3 K	ülönböző mennyiségben tiol csoport oldalláncot tartalmazó PSI					
gélek szintézise						
3.7.4 D	Oopamint tartalmazó PSI gélek szintézise 40					
3.7.5 G	élek hidrolízise: Poli(aszparaginsav) alapú gélek előállítása 41					
3.7.6 D	Diszulfid hidak redukciója: Tiol oldallánc kialakítása a PASP					
gélekben						
3.8 PASI	P alapú gélek vizsgálata 43					

3.8.1

3.8.2

Különböző keresztkötő molekulát tartalmazó PASP gélek

degradációs vizsgálata ...... 44 Különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó gélek vizsgálata 3.8.3 Tiol csoport mennyiségének meghatározása Ellman reagens 3.8.4 segítségével 45 3.9 MG-63 oszteoblaszt-típusú és PDL őssejtek tenyésztése PASP alapú géleken 46 3.9.1 Sejtek életképességének vizsgálata PASP alapú géleken ...... 46 Sejtek morfológiájának vizsgálata fázis kontraszt mikroszkóp 3.9.2 segítségével 47 Sejtek eloszlásának és morfológiájának vizsgálata két foton 3.9.3 mikroszkóp segítségével...... 47 3.9.4 Sejtek oszteogén irányú differenciálódásának vizsgálata alkalikus 4 módosított poli(aszpartamid) alapú konjugátumok 4.1 Dopaminnal 4.1.1 A PSI és a dopaminnal módosított PSI kémiai szerkezetének vizsgálata 4.1.2 PSI-DA és PSI-DA-AE minták fizikai paraméterei: oldhatóság, 4.1.3 A dopamin leszakadás kinetikájának mérési és elméleti leírása..... 55 Dopamin módosított poli(aszpartamid) konjugátumok formulázása 4.2 elektrosztatikus szálhúzás segítségével ...... 66 szálhúzással előállított 4.2.1 Elektrosztatikus konjugátumok 

4.2.2 PSI-DA és PSI-DA-AE konjugátumokból elektrosztatikus
szálhúzással készített nanoszálas rendszerek kémiai szerkezetének vizsgálata
FTIR-ATR spektroszkópiával 71
4.2.3 Elektrosztatikus szálképzéssel előállított konjugátumok
oldhatóságának vizsgálata PBS-ben 72
4.2.4 Dopamin leszakadási kinetikájának vizsgálata GF=1 és GF=4 szálas
minták esetében PBS és α-Kimotripszin jelenlétében
4.2.5 Szálas konjugátumok parallel mesterséges membrán permeábilitási
(PAMPA) vizsgálatai
4.2.6 Konjugátumok in vitro biokompatibilitási és citotoxicitási vizsgálata
4.3 Poli(aszparaginsav) és módosított poli(aszparaginsav) alapú gélek
alkalmazhatóságának vizsgálata a szövetmérnökség területén
431 A módosított poli(aszparaginsav) gélek előállításához használt
polimerek kémiai szerkezetének vizsgálata
4.3.2 Különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó PASP gélek
fizikai és kémiai vizsgálata
4.3.3 Poli(aszparaginsav gélek stabilitásának és biodegradábilitásának
vizsgálata
4.3.4 MG-63 oszteoszarkóma sejtek in vitro tenyésztése különböző
kémiai és fizikai szerkezettel rendelkező PASP géleken
4.3.5 MG-63 oszteoszarkóma sejtek in vitro tenyésztése RGD-vel
módosított tiol tartalmú PASP géleken95
4.3.6 Humán foggyökérhártya eredetű őssejtek (PDLSC) tenyésztése
különböző kémiai és fizikai szerkezettel rendelkező PASP géleken
4.3.7 Humán PDL őssejtek tenyésztése különböző mennyiségben tiol
csoportot tartalmazó PASP géleken 100
4.3.8 Humán PDL őssejtek tenyésztése dopamin tartalmú PASP géleken
5 MEGBESZÉLÉS
5.1 Poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok szintézise és vizsgálata 107

	5.1.1 Különböző dopamin tartalmú konjugátumok fizikai és kémiai
	paramétereinek vizsgálata 107
	5.1.2 Hatóanyag leszakadás kinetikájának leírása rossz illetve jó
	vízoldhatósággal rendelkező konjugátumok esetében 108
	5.2 Nanoszálas poli(aszpartamid)-dopamin koniugátumok előállítása és
v	izsgálata
	5.2.1 Poli(aszpartamid)-dopamin nanoszalak eloallitasa 111
	5.2.2 Oldhatóság kinetikai, hatóanyag leszakadás kinetikai és
	permeábilitási vizsgálatok 113
	5.2.3 Citotoxicitási vizsgálatok por és szálas konjugátumok esetében 116
	5.3 PASP gélek alkalmazhatósága a szövetmérnökség területén 117
	5.3.1 Különböző összetételű és rugalmasságú PASP gélek
	biodegradábilitása és szövettámaszként való alkalmazhatósága MG-63 sejtek
	tenyésztésénél 118
	5.3.2 PDL őssejtek tenyésztése különböző összetételű PASP géleken 121
	5.3.3 PDL őssejtek tenyésztése dopamin tartalmú PASP géleken 124
6	KÖVETKEZTETÉSEK ÚLTUDOMÁNVOS EDEDMÉNVEK 126
0 7	ÖSSZEFOCI AL ÁS
8	SUMMARY 128
9	IRODALOMJEGYZÉK
10	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK147
	10.1 A disszertációhoz kapcsolódó nublikációk 147
	10.2 A disszertációhoz nem kancsolódó publikációk
	10.2 A dissectationol nem kapesolodo publikaciok
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS148

### Rövidítések jegyzéke

AE	-2-aminoetanol						
AFM	–Atomierő mikroszkópia						
ALP	–Alkalikus foszfatáz						
ATR-FTIR	–Gyengített Teljes Reflexiós Fourier Transzformációs Infravörös Spektroszkópia						
CYS	–Cisztamin						
CYSE	Ciszteamin						
DA	–Dopamin						
DAB	-1,4-diaminobután						
DBA	–N,N-dibutilamin						
DCC	–Diciklohexil-karbodiimed						
DMF	–Dimetil-formamid						
DMSO	–Dimetil-szulfoxid						
DMSO-d6	–Deutrált dimetil-szulfoxid						
$D_2O$	–Deutrált víz						
DSC	–Differenciál kalorimetria						
DTT	-D,L-ditiotreitol						
ECM	–Extracelluláris mátrix						
EDTA	-Etilén-diamin-tetraecetsav						
GF	–Graftolási fok						
КМН	-Kuhn-Mark-Houwink egyenlet						
α-ΜΕΜ	–Minimum eszcenciális médium (tápoldat)						
MS	–Tömegspektrometria						
NaDS	–Nátrium dodecil-szulfát						
NMR	–Mágneses Magrezonancia spektroszkópia						
PASP	–Poli(aszparaginsav)						
PASP-CYS	–Cisztaminnal keresztkötött poli(aszparaginsav) gél						
PASP-CYS-DAB	<ul> <li>–1,4-Diamonbutánnal és cisztaminnal keresztkötött poli(aszparaginsav) gél</li> </ul>						
PASP-CYSE-DAB	–Tiol csoport oldalláncot tartalmazó 1,4-Diamonbutánnal keresztkötött poli(aszparaginsav) gél						
PASP-DAB	-1,4-Diamonbutánnal keresztkötött poli(aszparaginsav) gél						
PASP-DA-CYS-DAB	ASP-DA-CYS-DAB –Dopamin tartalmú 1,4-Diamonbutánnal és cisztaminna keresztkötött poli(aszparaginsav) gél						

PASP-RGD-CYS-DAB	–RGD tartalmú 1,4-Diamonbutánnal és cisztaminnal keresztkötött poli(aszparaginsav) gél					
PBS	–Foszfát puffer					
PDL	–Periodontális ligamentum					
PEG	-Poli(etilén glikol)					
PSI	-Poli(szukcinimid)					
PSI-DA	-Dopaminnal módosított poli(szukcinimid)					
PSI-DA-AE	–Dopaminnal és 2-aminoetanollal módosított poli(szukcinimid)					
PSI-CYS	-Cisztaminnal keresztkötött poli(szukcinimid) gél					
PSI-CYS-DAB	-1,4-Diamonbutánnal és cisztaminnal keresztkötött poli(szukcinimid) gél					
PSI-DAB	-1,4-Diamonbutánnal keresztkötött poli(szukcinimid) gél					
PSI-DA-CYS-DAB	–Dopamin tartalmú 1,4-Diamonbutánnal és cisztaminnal keresztkötött poli(szukcinimid) gél					
PSI-RGD	-RGD peptidszekvenciával módosított PSI					
PSI-RGD-CYS-DAB	–RGD tartalmú 1,4-Diamonbutánnal és cisztaminnal keresztkötött poli(szukcinimid) gél					
PVA	–Poli(vinil alkohol)					
RGD	-Arg-Gly-Asp peptidszekvencia					
SEM	–Pásztázó Elektronmikroszkópia					
THF	-Tetrahidrofurán					
TF	–Térhálósítási fok					
TGA	-Thermal gravimetric analysis					
UV	–Ultraviola fény					
UT víz	–ultra tiszta víz					
WST-1 -2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium						

#### 1 Bevezetés és irodalmi háttér

A polimerek napjaink egyik legnagyobb mennyiségben gyártott és leggyakrabban alkalmazott anyagai közé tartoznak [1]. A polimerek térhódítása mindennapi életünkben is megfigyelhető, hiszen régi fém alapú technikai anyagainkat egyre inkább felváltják a különböző polimerekre épülő műanyagok. Éppen ezért nem meglepő, hogy az orvostudomány illetve a gyógyszerészet területén is egyre nagyobb teret hódítanak a polimerekre épülő anyagok.

A gyógyszerészet területén már régóta alkalmaznak különböző polimer molekulákat. A polimereket a gyógyszeripar, mint csomagoló anyagot, tablettázást elősegítő anyagot, kioldódást befolyásoló filmbevonatot, kapszulák alapanyagát valamint különböző kontrollált hatóanyag leadás elérését elősegítő anyagot is használja [2]. Azonban a legfontosabb polimerhez kapcsolódó gyógyszerészeti kutatások fő célja különböző személyre szabott, szabályozott illetve intelligens hatóanyaghordozó rendszerek kiépítése, amelyekkel csökkenthető az alkalmazott dózis mennyisége miközben növelhető a terápia hatékonysága [3, 4].

Polimerek orvosi, klinikai alkalmazására műanyag eszközöktől a különböző sztenteken át, egészen a komplex protézisekig találhatunk példákat [2]. Azonban orvosbiológiai kutatásokban egyre nagyobb előtérbe kerülnek olyan polimerek, amelyek alkalmazhatóak lehetnek különböző intelligens, lebomló implantátumok kiépítéséhez illetve mesterséges szövetek előállításához [2, 5].

Orvosbiológiai vagy gyógyszerészeti alkalmazhatóságukhoz a polimereknek biokompatibilisnek és/vagy biodegradábilisnek kell lennie. Ezen tulajdonságokkal rendelkező polimereket együttesen biopolimereknek nevezhetjük, és dolgozatom során a biopolimerek alatt ezen anyagokat fogom érteni.

#### 1.1 Biopolimerek biokompatibilitása és biodegradábilitása

A polimerek olyan hosszúláncú molekulák, amelyek egymáshoz kovalens kötéssel kapcsolódó ismétlődő egységekből épülnek fel. Eredetüket tekintve 3 csoportba sorolhatjuk őket: természetes polimerek (poli(szacharidok), nukleinsavak, aminosav alapú makromolekulák), természetben megtalálható anyagokból mesterségesen előállított polimerek (pl.: viszkóz, politejsav) illetve mesterséges alapanyagokból előállított szintetikus polimerek (pl.: poli(etilén), poli(vinil klorid). Függetlenül a polimer eredetétől, amennyiben az biokompatibilis, vagyis nem vált ki a szervezetből

immunválaszt, illetve biodegradábilis vagyis a szervezetben olyan anyagokra bomlik le amelyek biokompatibilisek, biopolimernek nevezhetjük [6, 7]. Csak biokompatbilis vagy egyben biokompatibilis és biodegradábilis polimerekre egyaránt találunk példákat. Az első csoportba tartozik például a poli(vinil-alkohol), poli(etilén-oxid), poli(etilénglikol) a másodikba pedig főleg a természetes eredetű például hialuronsav vagy kollagén. A második csoportba tartozó polimerek felhasználhatóságát azonban nagyban korlátozza a limitált hozzáférhetőségük illetve drága kinyerésük vagy előállításuk. Szintetikus polimerek ugyan nagy mennyiségben és olcsón elérhetőek, azonban ezek közül kevés, amelyik egyszerre biokompatiblis és biodegradábilis is. A kettő legismertebb a poli(tejsav) és a poli(kaprolakton) [8] Ezért kézenfekvő természetes polimerek szintetikus analogonjainak alkalmazása, mint például a poli(szacharid)-ok vagy a poli(amino sav)-ak.

#### 1.2 Polimer alapú hatóanyaghordozó rendszerek

Sok gyógyszerhatóanyag nagyon gyorsan ürül ki a szisztémás keringésből a vesék vagy a máj által, ezáltal nagyon kicsi a hasznosulásuk. Erre a problémára nyújthatnak megoldást a polimer alapú hatóanyag-hordozó rendszerek [9, 10]. Polimer hatóanyag-hordozó rendszerek felhasználásával emellett növelhetjük hatóanyag vízoldhatóságát vagy éppen lipofilitását, képesek vagyunk elérni a hatóanyag terápiás célponthoz való eljutását illetve ott a szabályozott leadását. Ennek segítségével csökkenthetjük az alkalmazott dózis mennyiségét miközben növeljük a terápia hatékonyságát és egy időben csökkentjük a hatóanyag által kiváltott mellékhatásokat is [4, 11, 12]. Ilyen rendszerek kiépítéséhez legtöbbször valamilyen biopolimert használhatunk, hiszen a polimer szervezetben történő lebomlásával szabályozhatjuk a hatóanyag felszabadulását. A polimer alapú hatóanyag-hordozó rendszereket aszerint, hogy a hatóanyag szabad formában, fizikailag "becsomagolva" található a hatóanyag hordozóban, vagy kémiailag hozzákötve a polimerhez fordul elő, fizikai vagy kémiai hatóanyag-hordozó rendszerekre oszthatjuk.

Az első csoportba tartoznak azok a hatóanyag-hordozó rendszerek, amelyek kisebb egységek, molekulák asszociációja útján jönnek létre és rendelkeznek egy hatóanyag-szállításra alkalmas üreggel (pl. polimerszóma). Ebbe a csoportba soroljuk a mikro-, illetve nanoméretű készítményeket, mint például a mikro- és nano-kapszulákat, részecskéket. A mikrokapszulázás szilárd, folyadék és gáz halmazállapotú anyagok

9

bezárására is alkalmas eljárás, de biológiai minták egyaránt formulázhatóak így. Az előállítási mód segítségével a kívánt hatóanyag-leadó profilú készítmény készíthető. Mikrokapszulák alkalmazásával lehetőség van a hatóanyag vérben történő akkumulálódásának elkerülésére, ezen felül a betegek igényeihez rugalmasan idomuló készítmény kifejlesztésére [13, 14].

Abban az esetben, ha egy hatóanyag kovalens kötéssel, kémiailag kapcsolódik egy polimer molekulához, polimer-hatóanyag konjugátumokról beszélünk.

#### 1.3 Polimer-hatóanyag konjugátumok

A polimer-hatóanyag konjugátumok elő-hatóanyag (prodrug) formulák, amelyek önmagukban inaktívak mindaddig, ameddig a megfelelő szervbe/szövetbe jutva valamilyen külső behatás nem aktiválja a hatóanyagot. Általánosan egy ideális polimerhatóanyag konjugátum a következő alkotóelemeket tartalmazhatja: (1) polimer molekula (lineáris vagy elágazó), (2) egy vagy több hatóanyag, (3) opcionálisan kapcsoló molekula, amely segítségével a hatóanyag kovalens kapcsolása történik a polimerhez, (4) célzó ágens, amely a célszövetbe juttatja a hordozót és (5) egy képalkotó ágens (opcionális) (1. ábra). A hatóanyag felszabadulását legtöbbször valamilyen normál metabolikus folyamat során egy enzim idézi elő, de megtörténhet a polimer bizonyos környezeti hatásra (pl.: pH, hőmérséklet) adott válaszreakciójaként egyaránt [15, 16].



1. ábra: lineáris (a) illetve a hiperelágazásos (b) polimer-hatóanyag konjugátumok sematikus ábrázolása.

A polimer-hatóanyag konjugátumok jó pár előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a kismolekulás hatóanyagokhoz képest: (1) megnövelhetik a rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságát, (2) megvédik a hatóanyagot a lebomlástól és inaktiválódástól, (3) elszállítják a hatóanyagot az adott szervbe, (4) csökkentik a hatóanyag által kiváltott antigén aktivitást, (5) lehetőséget biztosíthatnak a hatóanyag sejtbe jutásához mind aktív min pedig passzív transzporttal, illetve (6) felhasználhatóak további, komplex hatóanyaghordozó rendszer kialakításához [14, 17].

A nagy molekulatömegüknek és kémiai szerkezetüknek köszönhetően főleg a polimerek határozzák meg a készítmény fiziko-kémiai tulajdonságait (pl.: oldhatóság, lipofilitás). Az alkalmazott polimerrel szemben támasztott talán legfontosabb követelmény a biokompatibilitás illetve a biodegradábilitás [18]. Emellett fontos, hogy olyan reaktív csoportokkal rendelkezzen, amelyekhez a hatóanyag molekula vagy a kapcsoló ágens kovalensen kapcsolható. Jó pár polimer-hatóanyag készítményt találhatunk, amelyek már klinikai alkalmazásban is megtalálhatóak vagy kutatásuk a klinikai fázisban jár. Ezek főként poli(etilén glikol)-ra (PEG), Poli N-(2-hidroxipropil)metakrilamidra, vagy poli(glutamát)-ra épülnek, de természetesen találhatunk liposzomális készítményeket is [10, 17]. Mindezen készítmények mellett a poli(szacharidok), mint például a cellulóz, az alginát vagy a kitozán [19, 20], illetve proteinek ilyen jellegű alkalmazása is széles körűen kutatott terület [21, 22]. Tisztán természetes aminosavakból felépülő poli(aminosav)-ak ilyen jellegű alkalmazására viszonylag kevés példát találhatunk az irodalomban [23–25].

A hatóanyag hozzákapcsolása a polimer hordozóhoz legtöbbször nem egyszerű feladat, hiszen mind a polimer mind a hatóanyag tartalmazhat több reaktív csoportot is. A különböző reaktív csoportok védésével azonban szelektíven kapcsolhatjuk a hatóanyag molekulát a polimer lánchoz. A leggyakrabban használt eljárások közé tartozik а diciklohexil-karbodiimed (DCC) és 1-etil-3-(3dimetilaminopropil)karbodiimid, illetve az N-hidroxiszukcinimid észter, mint kapcsoló ágens használata [17]. A polimer és hatóanyag között fontos olyan kötés kialakítása, amely ugyan stabil marad megfelelő ideig a szervezetben, de képes felszakadni miután a készítmény eljutott a megfelelő szövetbe. Ilyen kötések például az észter, amid és a diszulfid kötések. Különféle kapcsoló ágensek felhasználásával megfelelő kötéseket alakíthatunk ki a polimer és a hatóanyag között, azonban megfelelő polimer kiválasztásával ezek alkalmazása nem feltétlenül szükséges. Napjainkban a legtöbb polimer-hatóanyag konjugátumot kemoterápiás szerek formulázáshoz alkalmazzák, hogy csökkentsék a szerek által okozott komoly mellékhatásokat [26, 27]. Emellett igen jelentős az alkalmazásuk hatóanyagok központi idegrendszerbe juttatása esetén is [14, 28, 29].

Polimer-hatóanyag konjugátumok további nano- vagy mikroformulázásával tovább növelhető a hatóanyag hasznosulása. Ezek közül az eljárások közül az egyik legújabb technika az elektrosztatikus szálképzés, amely segítségével olyan szálas készítmények állíthatóak elő, amelyek esetében a szálátmérő a mikro és/vagy nanomérettartományba esik. Másik ígéretes nanoformulázási eljárás, amikor ellentétes töltésű polielektrolitok spontán aggregációjával nanoméretű komplexeket állítanak elő [30]. Ezekbe fizikailag csapdázhatjuk a hatóanyagot vagy eleve használhatunk polielektrolitra épülő konjugátumot a nanokomplex kialakításához.

#### 1.4 Elektrosztatikus szálképzés és gyógyszerészeti alkalmazásai

Az elektrosztatikus szálképzés (angol: electrospinning) napjaink egyik leginkább használt és fejlődő technikája a nano- és mikrométer átmérővel rendelkező szálak előállításához [31]. Elektrosztatikus szálhúzáshoz használt készülék alapvetően 3 fő részből épül fel: egy fecskendőpumpából, egy nagyfeszültség tápegységből és egy földelt fém szálgyűjtő célpontból [32] (2. a ábra).



2. ábra: Elektrosztatikus szálhúzás során alkalmazott készülék sematikus rajza (a) [32], illetve a szálképződés három szakasza (b): a) Taylor kúp képződés, b) stabil zóna, c) ostorozó zóna.

Elektrosztatikus szálhúzás során a fecskendőtű hegyére általában 5-30 kV közötti egyenfeszültséget kapcsolunk és a pumpa segítségével folyamatosan áramoltatjuk a polimer viszkózus oldatát a tűn keresztül. A földelt szálgyűjtő lapot 15-30 cm távolságra helyezzük el a tű hegyétől. A folyamat során, a tű hegyén lévő folyadék csepp feltöltődik és ennek hatására egy elnyúlt alakot vesz fel ezt nevezzük Taylor kúpnak (2. b ábra, a rész). Amikor az elektrosztatikus vonzóerő elég nagy ahhoz, hogy legyőzze a folyadék felületi feszültségét egy vékony polimer szál indul el a földelt gyűjtőlap irányába (2. b ábra, b szakasz). A stabil zóna után ez a szál ostorozó mozgásba kezd az elektromos erőtér miatt (2. b ábra, c szakasz), és így a földelt szálgyűjtőn egy random szálhalmazt kapunk [33]. A repülés során, miközben az oldószer elpárolog, a szál folyamatosan megnyúlik, amelynek következtében a szál átmérője lecsökken akár néhány 10 nanométerig.

A szálak képződését, illetve a végső szálak paramétereit (pl.: átmérő, átmérőeloszlás, hibahelyek a szálakon stb,), az oldat viszkozitása, felületi feszültsége, konduktivitása, illetve dielektromos állandója nagymértékben befolyásolja. Emiatt a az elektrosztatikus szálképzés egyik kritikus pontja megfelelő oldószer kiválasztása. Az eljárás során fontos paraméter az alkalmazott feszültség, az oldat áramlási sebessége, illetve a tű és a szálgyűjtő távolsága. Mindezek mellett a környezet hőmérséklete, páratartalma is jelentősen befolyásolhatja a szálak tulajdonságait. Természetesen ezen paraméterek egymásra is hatással vannak, így nehéz megállapítani egy általános beállítást, amely minden polimer esetében használható [34, 35].

A szálak nagy fajlagos felületének és így a szálas membránok nagy porozitásának köszönhetően sokféle alkalmazással találkozhatunk egészen a levegőszűrésen át az orvosbiológiai felhasználásokig. Ezek közül is a két leginkább kutatott terület a szövetmérnökség [36] (lásd 1.6 fejezet) illetve a gyógyszermolekulák formulázása [37].

Gyógyszerészeti alkalmazásra sokféle polimer felhasználható, azonban ezeknek is hasonló tulajdonságokkal kell rendelkezniük, mint amelyekkel a polimer-hatóanyag konjugátumok készítésénél (1.3 fejezet). Hatóanyaggal rendelkező szálas rendszerek előállításához főleg 3 stratégia alkalmazható (3. ábra): (a) A hatóanyag adszorpciója a szálak felületén elektrosztatikus szálképzés után, (b) hatóanyag/polimer keverékének használata, illetve (c) koaxiális elektrosztatikus szálképzés segítségével mag-héj szerkezetű szálak előállítása [38]. A 1.3 fejezetben bemutatott polimer-hatóanyag konjugátumok is használhatóak lehetnek hatóanyag tartalmú szálak előállítására, azonban ilyen jellegű kutatást keveset találunk az irodalomban [39–41], de alapvetően ez is besorolható lehet a (b) stratégiába.

13



3. ábra: Hatóanyag tartalmú szálak előállításának stratégiái: a) hatóanyag adszorpciója a szálakon szálképzés után, b) hatóanyag/polimer keverékének használata az elektrosztatikus szálképzéshez, c) Koaxiális elektrosztatikus szálképzéssel mag-héj szerkezet előállítása [38].

Abban az esetben, ha a hatóanyagot utólag keverjük bele a polimer mátrixba két lehetőséget különböztethetünk meg: a hatóanyag fizikailag vagy kémiailag kötődik hozzá a szálhoz. A fizikai megkötődésnek fő előnye, hogy ugyanolyan mátrix használható különböző hatóanyagok formulázáshoz is, illetve nincs veszteség a formulázás során [42, 43]. A hátránya azonban hogy a hatóanyag felszabadulás nagyon gyorsan történik, így kontrollált hatóanyag leadás nem érhető el. Éppen ezért a hatóanyag kémiai vagy biokonjugációja a polimerhez nagyobb lehetőségekkel kecsegtet egy kontrollált hatóanyag leadó rendszer kiépítéséhez. Különböző növekedési faktorok immobilizálására több példát is találhatunk az irodalomban, amelyek jól használhatóak lehetnek a szövetmérnökség területén [44, 45].

A legtöbb publikáció ebben a témában a b) stratégiához kötődik. Ebben az esetben a hatóanyag a polimer szálba van csapdázva, emiatt annak tulajdonságainak

megválasztásával változtathatjuk a hatóanyag felszabadulásának a kinetikáját. Így akár pillanatszerű hatóanyag leadást [46] vagy diffúzió, illetve a szál oldódás kinetikája által kontrollált elnyújtott hatóanyag leadást érhetünk el [47]. Ezzel az eljárással nagymértékben megnövelhetjük rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságát, mivel a szálhúzás során a rendszer olyan gyorsan szilárdul meg, hogy a hatóanyag kristályos forma helyett amorf állapotot vesz fel [48]. Amennyiben biodegradábilis polimert használunk a formulázáshoz a hatóanyag felszabadulás kinetikáját a polimer szál degradációja fogja megszabni [49].

Koaxiális technika segítségével széles keretek között változtathatjuk a hatóanyag kioldódásának kinetikáját. Általában a hatóanyag a belső, mag szálban található, így a külső héj változtatásával befolyásolhatjuk a hatóanyag felszabadulás kinetikáját. Amennyiben permeábilis, pórusos héj szerkezetet hozunk létre a hatóanyag felszabadulás hajtó ereje a koncentráció gradiens lesz [50]. Nem permeábilis, de degradábilis polimer héj használatával pedig a polimer degradációjának kinetikája fogja meghatározni a hatóanyag felszabadulásának kinetikáját [51].

Az elektrosztatikus szálhúzással előállított szálas rendszerek nagy hasonlóságot mutatnak a polimer hidrogélekkel, amelyek szintén használhatóak lehetnek mind hatóanyaghordozó rendszerként, mind pedig a szövetmérnökség területén.

#### 1.5 Polimer gélek és tulajdonságaik

A polimer géleknek nevezzük egy háromdimenziós polimer váznak és benne lévő duzzasztószernek két- vagy többkomponensű elegyét [52]. A polimer térháló képes a folyadék spontán kifolyását megakadályozni, míg a folyadék kifeszíti a polimer térhálót. Ebből kifolyólag a polimer gélek rendelkeznek mind a szilárd (pl.: alaktartóak, deformálhatóak) mind pedig a folyadék halmazállapotú anyagok tulajdonságaival (pl: kis molekulás anyagok diffúziója). A gélekben a folyadék mennyisége akár több nagyságrenddel is meghaladhatja a térháló mennyiségét (4. a ábra) [53], így a kifejezetten merev gélektől [54] akár a lágy szöveti struktúrához hasonló, saját súlyuk alatt deformálódó puha géleket is képesek vagyunk előállítani [55, 56].

A géleket a polimer vázat összetartó erő alapján csoportosíthatjuk. Megkülönböztethetünk fizikai géleket, amennyiben a polimer térhálót másodlagos kötések (pl.: ionos kölcsönhatás, H-híd), vagy kémiai géleket, amennyiben a térhálót kovalens kötések tartják össze. Természetesen egyszerre mindkét típusú kötés jelen

15

lehet, amennyiben poli(elektrolit) (töltéssel rendelkező polimer) gélekről beszélünk. Ebben az esetben aszerint, hogy melyik a domináns összetartó erő beszélhetünk kémiaifizikai vagy fizikai-kémiai gélekről (4. b ábra).



4. ábra: Duzzadt és száraz (piros kör) PAMPS gél [53] (a) illetve a gélek csoportosítása a polimer térhálót összetartó kötések alapján (b) [52].

A fizikai gélek nagy hátránya, hogy nem ellenállóak a környezet paramétereinek megváltozásával szemben, így akár a pH akár a hőmérséklet megváltozásának hatására feloldódhatnak. Ezzel szemben a kémiai gélek sokkal ellenállóbbak a környezeti hatásokkal szemben és csak abban az esetben oldódnak fel, ha a polimer térhálóban lévő kötések valamilyen kémiai reakció folytán felhasadnak. A környezet különböző paramétereinek a megváltozására a legtöbb kémiai gél valamilyen válaszreakciót mutat, éppen ezért intelligens anyagoknak nevezzük őket. Ez a válaszreakció legtöbbször a gél térfogatának vagy más néven duzzadásfokának a megváltozása. A duzzadás fokot a gél duzzadt illetve száraz térfogatának (térfogat szerinti duzzadásfok) vagy tömegének (tömeg szerinti duzzadásfok) arányával adhatjuk meg. A polimer gél egy adott duzzasztószerben egyensúlyi állapotban van, ha a duzzasztószer kémiai potenciálja a gélen belül és kívül megegyezik [57, 58]. Ilyenkor az előzőekben említett polimer térháló rugalmassága illetve a duzzasztószer ozmózis nyomása kiegyenlítik egymást. Amennyiben a duzzasztószer valamilyen paramétere (hőmérséklet, ozmózis nyomás, pH, oldott anyag koncentráció) megváltozik, a gélbe vagy beáramlik a duzzasztószer, így a gél megduzzad, vagy kiáramlik a duzzasztószer, így a gél szinerizál [59].

A gél ilyen jellegű válaszreakcióját kiválthatja a környezet hőmérsékletének [60], fényintenzitásának [61], elektromos [62] és mágneses térerősségének [63] változása, de akár kémiai vagy biokémiai behatás is [64], amely magába foglalja a pH vagy ionerősség változást, illetve enzimek jelenlétét. Orvosbiológiai felhasználás szempontjából az utolsó csoportba tartozó gélek a legfontosabbak, hiszen ezek azok a paraméterek, amelyek eltérőek a szervezet különböző részein. Fontos kiemelni, hogy orvosi és gyógyszerészeti alkalmazásra hidrogéleket használhatunk, vagyis olyan géleket, amelyek esetében a duzzasztószer víz vagy valamilyen vizes oldat. Ilyen gélek előállításához használt szintetikus polimerek közül a poli(etilén-glikol) (PEG), poli(vinil-alkohol) (PVA), vagy a poli(2-hidroxietil metakrilát), illetve a természetes polimerek közül a kitozán, hialuron sav, agaróz, alginát a leginkább elterjedtek. Kihasználva a gél duzzadásfokának hőmérséklet vagy pH függését a polimer hidrogélek jól alkalmazhatóak a hatóanyagszállítás területén [60, 65].

Mivel a hidrogélek egy három dimenziós polimer térháló és nagy mennyiségű víz vagy vizes oldat elegyeként értelmezhetőek, ezért nagy hasonlóságot mutatnak a természetes, lágy szövetekkel. Ebből adódóan a másik legnagyobb alkalmazási területük az orvosbiológiában a mesterséges szövetépítés vagy más néven a szövetmérnökség területén található [66].

#### 1.6 Szövetmérnökség, avagy hogyan építsünk mesterséges szövetet

Az orvostudomány egyik legnagyobb kihívása a sérült szövetek, szervek helyreállítása vagy pótlása, hiszen a donor szervek limitált számban állnak rendelkezésre. Az orvostudomány mára sokféle mesterséges, illetve élő donorból származó implantátumot használ a probléma megoldására, azonban a másik nagy problémát ezen szervek vagy implantok kilökődése jelenti [67]. Az idegentest reakció illetve az implantált szerv kilökődésének elkerülésére a laboratóriumi körülmények között végzett szövetépítés vagy más néven szövetmérnökség nyújthat megoldást [68]. Ekkor a páciens saját reprodukcióra képes sejtjeinek izolálásával, majd szaporításával állíthatjuk elő a kívánt mesterséges szövetet, amelyet ezután implantálhatunk.

Az élő szervezetben a sejtek szaporodásához az adott sejttípusnak megfelelő sejt közötti állomány alakult ki, ez az extra celluláris mátrix (ECM) (5. ábra) [69]. Az extracelluláris mátrix egy természetes polimer térháló, amely főleg kollagén szálakból épül fel, amelyet nagy mennyiségű folyadék tölt ki. Kollagén mellett más típusú fehérjéket, hormonokat, növekedési faktorokat is tartalmaz, amelyek a sejtek megtapadásáért, differenciálódásáért és szaporodásáért felelősek [70]. Az ECM rugalmas, kis molekulák számára átjárható, illetve reagál a környezet változásaira, így nem csak támasztó szerepet tölt be, hanem információ és anyagáramlást (tápanyag,

17

bomlástermékek) biztosít a sejtek között [71]. A sejtek szaporodása során keletkező enzimek megemésztik a kollagén szálakat, így mintegy "utat vágva" maguknak a sejtek képesek a szövettámaszon belül mozogni [72]. Látható tehát, hogy mind a diffúziós, mind a mechanikai tulajdonsága a környezetnek nagy jelentőséggel bír a sejtek migrációja és szaporodása során, azonban ezen paraméterek felismeréséhez hosszú út vezetett az orvosbiológiai kutatások során.



5. ábra: Az extracelluláris mátrix sematikus felépítése [73].

A kezdetekben a laboratóriumi (*in vitro*) sejttenyésztést műanyag (polisztirol) felületen végezték [74]. A sejtkultúrák segítségével így lehetőség nyílt a sejtek morfológiájának illetve különböző molekulákra, növekedési faktorokra adott válaszainak a tanulmányozására [75]. Ennek azonban nagy hátránya, hogy csak kvázi kétdimenziós, egy sejtrétegből álló kultúra hozható létre, és így a sejtek morfológiája különböző lehet a természetes környezetükben megtalálhatótól. Az élő szervezethez hasonló több sejtrétegből álló komplex struktúra kialakításához háromdimenziós, a sejtek mozgását és szaporodását segítő támasztórendszerek, úgynevezett szövettámaszok használatára van szükség [74].

#### 1.6.1 Mesterséges szövetépítés folyamatai

A mesterséges szövetépítés megvalósításához elsődlegesen szükségünk van egy olyan mesterséges szövettámaszra, amely képes elősegíteni a sejtek letapadását, migrációját, proliferációját és esetleges differenciálódását [69].

A sejtek tápanyagszükségletét a tápoldat vagy médium biztosítja a sejttenyésztés során. Mivel a szövettámasznak tartalmaznia kell a tápoldatot, hogy a sejtek megfelelő mennyiségű tápanyaghoz jussanak akár a szövettámasz belsejében is, ezért fontos kritérium a szövettámaszok makroszkopikus vagy mikroszkopikus porozitása. Kereskedelmi forgalomban sokféle tápoldat érhető el, így a tenyészteni kívánt sejttípusnak megfelelőt használhatjuk. Az összetételek változóak, de minden médium tartalmaz aminosavakat, vitaminokat, fehérjéket, szervetlen sókat, glükózt, és piruvátot.

Ahhoz, hogy a sejtek bekerüljenek a mitózis állapotába, amely során a DNS állományuk megkettőződik és két egyenértékű utódsejtre váljanak szét, növekedniük kell. Ezt segíthetjük elő növekedési faktorok használatával. Minél nagyobb sejtszaporulat eléréséhez az adott sejtnek megfelelő növekedési faktort kell hozzáadnunk a tápoldathoz vagy beépítenünk a szövettámasz struktúrájába [70].

A másik kritikus paraméter a megfelelő sejtvonal kiválasztása. A legtöbb lehetőség az őssejtek tenyésztésében rejlik, hiszen ezek a sejtpopulációk korlátlan önmegújító képességgel rendelkeznek, és differenciálódásuk irányításával különböző szövetek állíthatóak elő [74]. Őssejteket sokféle szervből izolálhatunk, például felnőtt őssejt bölcsességfogból, csontvelőből; embrionális őssejt pedig köldökzsinórból, köldökzsinórvérből vagy placentából nyerhető [76].

A mesterséges szövetépítés sematikus folyamatábrája a 6. ábrán látható. A szervezetből izolált sejteket először két dimenzióban felszaporítják, hogy megnöveljék a sejtek számát. Ezután ezeket felviszik a tápoldatban duzzasztott szövettámasz felszínére vagy integrálják őket a szövettámaszba. A folyamat során a szaporodó sejtek képesek mozogni a szövettámaszban, így több sejtrétegből álló komplex, natív struktúra alakulhat ki. Ez akár a teljes, funkcionális szövet kialakulása előtt is beültethető a szervezetbe, ahol az utolsó differenciálódás végbemehet, és így az új szövet könnyebben integrálódhat [77]. Amint az látható, a megfelelő szövettámasz előállítása a legkritikusabb része a folyamatnak.



6. ábra: A mesterséges szövetépítés sematikus folyamatábrája [78].

#### 1.6.2 Hidrogélek szövettámaszként való alkalmazhatósága

A szövettámaszok felépítésénél a legfontosabb szempont, hogy a szervezetben megtalálható ECM biológiai, kémiai összetételét illetve az adott ECM mechanikai tulajdonságait a legjobban mímeljék és stabil 3 dimenziós vázszerkezetet biztosítsanak a sejteknek a szaporodásuk során. Emellett nagyon fontos az alkalmazott anyagok biokompatibilitása, illetve biodegradábilitása, hiszen így a szöveti struktúra kialakulása során a sejtek képesek lebontani, megemészteni, illetve átalakítani a szövettámaszt [74]. Az irodalomban található szövettámaszokat alapvetően 4 csoportba sorolhatjuk: (1) decelluralizált szöveti mátrixok: páciens szervezetéből izolált sejtmentes szöveti struktúra, (2) pórusos szövettámaszok: előzetesen elkészített 3 dimenziós pórusos anyag, amely támogatja a sejtek szaporodását és visszaültethető a páciensbe, (3) páciensből kinyert sejtréteg ECM-al: több sejtréteg segítségével komplex szövet állítható elő, (4) injektálható hidrogélek: sejttel összekeverve injektálható a páciensbe, ahol, támogatja a sejtek osztódást [79]. Hidrogélek azonban nem csak injektálható formában használhatóak, hanem előzetes elkészítésükkel a (2) csoportba is sorolható szövettámaszok állíthatóak elő. Mivel a hidrogélek, hasonlóan az ECM-hez, egy 3 dimenziós polimer váz és duzzasztószer két- vagy többkomponensű elegye (lásd 1.5

fejezet), ezért szövettámaszként való alkalmazásukkal egyre több kutatócsoport foglalkozik.

A szövetmérnökségben használt hidrogélek általában biodegradábilisek, könnyedén előállíthatóak, mechanikai és strukturális tulajdonságaik nagy hasonlóságot mutatnak bizonyos szövetekkel és az ECM-al, valamint enyhe invazív beavatkozással beültethetőek. Mivel a fizikai gélek a környezet valamilyen tulajdonságának a dezintegrálódhatnak, érdemesebb megváltozására könnyedén ezért kémiai keresztkötéseket tartalmazó géleket használni. A kémiai keresztkötések száma jól kontrollálható a keresztkötő molekulák mennyiségének a változtatásával, amivel a gélek mechanikai tulajdonsága könnyedén szabályozható. Ebből kifolyólag, akár a nagyon lágy szövetek (1-10 Pa), vagy akár a nagyon merev szövetekhez (több száz kPa) hasonló rugalmassági modulusszal is rendelkezhetnek. Emellett fontos a hidrogél szabályozott degradációja, amely a megfelelő polimer illetve keresztkötő megválasztásával jól befolyásolható paraméter. A gél-sejt interakció is fontos paraméter, hiszen ez befolyásolja a sejtek letapadását, illetve migrációját. Azonban ez könnyedén elősegíthető különféle biológiai faktorok integrálásával a polimer térhálóba [70, 80, 81].

A szövettámaszként használt hidrogéleket két csoportra oszthatjuk aszerint, hogy természetes vagy szintetikus polimert használunk az elkészítésükhöz. A leginkább kutatott természetes polimerek közé tartozik a kollagén, a hialuronsav, az alginát és a kitozán [80]. A kollagén szinte minden emlős szövetben megtalálható, az ECM-ban található összes protein 25%-át teszi ki, éppen ezért ígéretes alapanyaga a mesterséges szövettámaszoknak. Hátránya, hogy előállítása főleg nagy tisztasággal igen költséges [82]. A hialuronsav a legegyszerűbb glükozamino-glikán és szinte minden emlős szövetben megtalálható. A polimer molekulák között keresztkötések hozhatók létre észteresítéssel vagy hidrazid származékokkal, így kémiai géleket szintetizálhatunk belőle [83, 84]. Kitozán széles keretek között alkalmazott alapanyag, mivel nagy hasonlóságot mutat az emberi szervezetben megtalálható glükozamino-glikánokkal, így biodegradábilis. Glutáraldehid alkalmazásával kémiai kötések hozhatóak létre a polimer molekulák között [85].

A szintetikus polimerek előnye, hogy kémiai szerkezetük és molekulatömegük kontrollálható, illetve pontosan reprodukálható. Emellett kémiai módosításukkal változtatható a biodegradábilitásuk, valamint növekedési faktorok kapcsolhatóak a polimer molekulákhoz. A leggyakrabban alkalmazott polimerek közé tartozik a poli(etilén-glikol), poli(etilén-oxid), poli(vinil-alkohol) vagy a poli(tejsav). Hátrányuk, hogy biokompatibilitásuk és biodegradábilitásuk is erősen megkérdőjelezhető, illetve alkalmazhatóságuk korlátozódik bizonyos sejtpopulációkra [77, 80]. Mindezeket összevetve, az ideális polimer szövettámasz kiépítéséhez egy természetes polimer mesterséges megfelelője lenne jól használható. Mesterséges poli(aminosav)-ak alkalmazhatóak lehetnének ilyen célra, azonban nagy molekulatömeggel történő előállításuk a legtöbb esetben időigényes és költséges folyamat. Éppen ezért szövettámaszok szintéziséhez illetve a 1.2 fejezetben bemutatott polimer hatóanyaghordozó rendszerek előállításához nyújthat alternatívát a könnyedén előállítható poli(szukcinimid) (PSI) illetve a poli(aszparaginsav) (PASP).

#### **1.7** A poli(szukcinimid) és a poli(aszparaginsav)

A poli(aszparaginsav) (PASP) egy szintetikus polimer, amelyben aszparaginsav monomer egységei peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz, biodegradábilitást kölcsönözve a polimernek. Ebből kifolyólag az elmúlt pár évben egyre inkább a figyelem középpontjába került különféle kutatási területeken egyaránt [86–104]. A PASP felhasználására különféle területekről találhatunk példákat: mivel egy anionos polielektrolitról beszélünk, ezért felhasználható lehet, mint diszpergáló szer vagy detergens [104], kiváló duzzadási tulajdonságainak köszönhetően használható lehet pelenkák abszorbenseként [87] vagy akár mint korrózió gátló anyag a fémion megkötési képessége miatt [86].

A PASP egy kétlépéses eljárással szintetizálható a leghatékonyabban és legnagyobb molekulatömeggel: először L-aszparaginsav termikus polikondenzációjával előállítjuk a poli(aszparaginsav) anhidridjét, a poli(szukcinimid)-et (PSI), majd ezt lúgos közegben elhidrolizáljuk poli(aszparaginsav)-á [91]. A PSI-t szintetizálhatjuk oldószerben [90], illetve oldószermentes közegben egyaránt foszforsav katalizátor jelenlétében [88, 105]. Az oldószermentes eljárással a PSI molekulatömege 10 és 70 kDa között mozog [92]. Az irodalomban található példa a PASP közvetlen szintézisére még a korábbi publikációk közül, azonban így a polimer jóval kisebb molekulatömeggel szintetizálható költségesebb eljárásban [103]. Mindemellett a PASP közvetlen szintézisének a másik hátránya, hogy a PSI-vel ellentétben a PASP nehezen vihető reakcióba, éppen ezért nehezen módosíthatóak a tulajdonságai. Ezzel szemben a PSI könnyedén reakcióba vihető primer amin csoportot tartalmazó vegyületekkel, aminek

következtében a polimer tulajdonságai széles keretek között változtathatóak: amennyiben dopamint kötünk a polimerhez képesek vagyunk öngyógyuló [93], vagy adhezív tapaszként használható gélt létrehozni [94], megfelelő kémiai módosítások után doxorubicint kapcsolhatunk a polimerhez polimer-hatóanyag konjugátumot szintetizálva [95], illetve különféle oldalláncokat létrehozva más és más funkciókat (pl.: pH függő oldhatóság, mukoadhezív tulajdonság) adhatunk a polimernek [96–100, 106]. Mindezek mellett bi- vagy multifunkciós aminokat használva keresztkötéseket hozhatunk létre a polimer szálak között, így már az előzőekben bemutatott géleket hozhatunk létre. A PSI egyetlen hátránya, hogy csak alkalmazásának dimetil-szulfoxidban illetve dimetil-formamidban oldódik, így a módosítási reakciókat illetve a gélek szintézisét csak szerves közegben végezhetjük. Azonban a megfelelő módosító molekulák használatával illetve a polimerek vagy gélek lúgos hidrolízisével könnyen vízoldhatóvá tehető a polimer, illetve a gél hidrogél formába vihető át.

PSI és PASP gélek szintézisére két lehetőség áll rendelkezésünkre: Az egyik a már előbb ismertetett módszer, PSI keresztkötése bi- vagy multifunkciós aminok használatával majd a gél lúgos hidrolízise [107-109]. Gyarmati és munkatársai szilárdfolyadék fázis szeparációs technika segítségével állítottak elő 1,4-diaminobutánnal keresztkötött szupermakropórusos kriogélt [110]. A második eljárás lényege, hogy előbb valamilyen funkciós csoportot alakítunk ki a polimeren, aztán hidrolízis segítségével PASP formát alakítunk ki, majd egy kémiai vagy fizikai behatás indukálja a gélesedést. Gyarmati és munkatársai sikeresen állítottak elő tiol oldalláncot tartalmazó PASP-ot, amelynél oldat fázisban a tiol oldalláncok oxidációjának következtében egy szol-gél átmenet játszódik le. Ennek köszönhetően ezek a rendszerek alkalmazhatóak lehetnek mind hatóanyag hordozó rendszerként mind pedig implantátumokként [111, 112]. Mivel a PASP egy polielektrolit, ezért a PASP alapú gélek duzzadásfoka nagymértékben változik a duzzasztószer pH értékével. Az aszparaginsav oldalláncában található karboxil csoport pKa értéke 4,35. Ennek köszönhetően a PASP gélek ennél alacsonyabb pH-n, a karboxil csoportok protonálódásának következtében összemennek, illetve nagyobb pH-n a protonálódás következtében megduzzadnak. Ezt kihasználva megfelelőek lehetnek hatóanyag hordozó rendszerekként, hiszen a hatóanyag diffúzióját nagymértékben meghatározza a gél duzzadásfoka [107, 109, 113]. Mindezeket összevetve a PSI származékok illetve a PASP gélek ígéretes alapanyagai lehetnek komplex hatóanyaghordozó rendszerek, illetve szövettámaszok kiépítéséhez.

#### 2 Célkitűzések

PhD kutatómunkám fő célja volt módosított poli(aszpartamid) polimerek gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazhatóságának feltérképezése. Ezen belül is kutatómunkám középpontjában állt a poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok vizsgálata a hatóanyag szállítás, valamint különböző poli(aszparaginsav) alapú gélek alkalmazhatósága a szövetmérnökség területén. Kutatómunkám 5 fő területre bontható:

- Poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok szintézise és kémiai, valamint fizikai tulajdonságainak vizsgálata. A dopamin leszakadási kinetikájának vizsgálata különböző enzimek jelenlétében.
- Ezen konjugátumok nano-formulázása elektrosztatikus szálhúzás alkalmazásával. A formulázás hatásának vizsgálata a dopamin leszakadás kinetikájára, illetve a szálas rendszerek *in vitro* citotoxicitásának vizsgálata..
- 3. Különböző kémiai összetételű és rugalmasságú poli(aszparaginsav) alapú hidrogélek szövettámaszként való alkalmazhatósága MG-63 oszteoblaszt típusú tenyésztéséhez. Α gélek seitek stabilitásának, illetve sejttenyésztés biodegradábilitásának vizsgálata során alkalmazott а körülmények között.
- 4. Az előzőekben használt gélek szövettámaszként való alkalmazhatósága humán periodontális ligamentum (PDL) eredetű őssejtek esetén. A kritikus paraméterek változtatása a sejtek életképességének növeléséhez.
- Dopaminnal módosított poli(aszpartamid) alapú gélek alkalmazhatósága humán PDL őssejtek tenyésztéséhez.

#### 3 Módszerek

#### 3.1 Felhasznált vegyszerek

#### 3.2 Poli(szukcinimid) szintézise

A poli(szukcinimid)-et L-aszparaginsav termikus polikondenzációjával állítottam elő magas hőmérsékleten és alacsony nyomáson (7. ábra).



A reakcióhoz 20 g o-foszforsavat és 20 g L-aszparaginsavat kevertem össze főzőpohárban, majd a keveréket egy 1 L-s csepplombikba töltöttem. A lombikot egy Ika RV10 rotációs bepárló készülékre helyeztem, majd a nyomást folyamatosan csökkentettem 0-5 mbar közé, miközben a hőmérsékletet folyamatosan 180 °C-ig növeltem. 7 órás reakció idő után végeredményül egy barna habot kaptam, amelyet 200 mL dimetil-formamidban (DMF) oldottam fel majd nagy mennyiségű vízben csaptam ki. Ezután a fehér precipitátumot semleges pH-ig vízzel mostam majd 40 °C-n két napig szárítottam így végeredményül egy fehér port kaptam (8. ábra). A PSI átlagos molekulatömege a viszkozitás mérések alapján 28500±3000 g/mol-nak adódott [105, 113, 114].



8. ábra: A poli(szukcinimid) szintézisének lépései [114].

#### 3.3 Poli(szukcinimid) módosítása: Poli(aszpartamid) alapú polimerek szintézise

A szukcinimid monomerek könnyen reakcióba vihetőek nukleofil csoportot tartalmazó vegyületekkel, így a poli(szukcinimid) elhidrolizálható lúgos környezetben poli(aszparaginsav)-vá illetve funkcionalizálható primer amin csoportot tartalmazó vegyületekkel. Ezen reakciók során poli(aszpartamid) alapú polimereket állíthatunk elő, amelyek fizikai és kémiai tulajdonságait nagyrészt a módosító molekula fogja meghatározni. Ebben a fejezetben az általam előállított poli(aszpartamid) alapú funkcionalizált polimerek szintézisét fogom bemutatni.

## 3.3.1 Dopamin tartalmú poli(aszpartamid) alapú gyógyszerkonjugátumok előállítása

A dopamin (DA) a primer amin csoportjával lép reakcióba a PSI-vel miközben peptid kötések alakulnak ki a polimer lánc és a dopamin között (9. ábra). Munkám során két különböző csoportba tartozó konjugátumot szintetizáltam: az egyik csoportban a poli(szukcinimid)-et különböző mennyiségben módosítottam dopaminnal (PSI-DA), míg a másik csoportban a dopamin mellett 2-aminoetanolt (PSI-DA-AE) is használtam módosító molekulaként (9. ábra). A módosítás mértékét a graftolási fok (GF) jellemzi, ami megadható a monomer és a polimerre kötött dopamin mólarányával.



9. ábra: PSI-DA illetve PSI-DA-AE konjugátumok szintézise.

A csak dopaminnal módosított poli(szukcinimmid) előállításához feloldottam a PSI-t, illetve a dopamin-hidrokloridot dimetil-szulfoxidban majd a reakció elegyhez dibutil-amint (DBA) adtam a hidroklorid megkötéséhez. Ezután a reakció elegyet 45 °C-n kevertettem 6 napig. A szintézisek során 1-es, 4-es, 10-es, 15-ös és 20-as graftolási fokú (GF=1, GF=4, GF=10, GF=15, GF=20) polimereket állítottam elő (1. táblázat). A másik csoport esetében a dopamin mellett különböző mennyiségű 2-

aminoetanolt (AE) adtam még a reakció elegyekhez majd ezeket is 6 napig 45 °C-n kevertettem. A szintézisekhez a DA-t és AE-t 1/1 illetve 1/2 mólarányban alkalmaztam úgy, hogy minden monomer módosítva legyen (GF=1). A kész polimereket az összetételtől függően különböző eljárással nyertem ki: a GF1-s illetve két vegyesen módosított polimer esetében a reakció elegyet desztillált vízzel szemben dializáltam, majd a vizes oldatot fagyasztva szárítottam, míg a nagyobb graftolási fokú polimereket vízben kicsaptam, mostam majd 45 °C-n szárítottam. Végtermékül különböző színű barna port kaptam. Az 1. táblázat a reakció elegyek pontos összetételét tartalmazza 1g polimer szintézise esetében.

színiezisenel illetve a konjugatumokon tatalnato aopamin koncentracioja								
	DA:AE arány	25m/m%-s PSI oldat (g)	DA*HCl (g)	DBA (mL)	DMSO (mL)	AE (mL)	c <sup>o</sup> <sub>PD</sub> (mmol/L)	
GF=1	1:0	4	1,96	1,74	25	-	4800	
GF=4	1:0	4	0,489	0,435	10	-	2230	
DA-AE 1:1	1:1	4	0,977	0,867	10	0,311	2941	
DA-AE 1:2	1:2	4	0,652	0,577	10	0,415	2120	

1. táblázat: A reakcióelegyek pontos összetétele PSI-DA és PSI-DA-AE konjugátumok szintézisénél illetve a konjugátumokon található dopamin koncentrációja

A leszakadási kinetika leírásánál fontos a szilárd konjugátumon lévő dopamin koncentrációja  $c_{PD}^{o}$  amely értékek az 1. táblázatban láthatóak. A koncentráció érték egységnyi dm<sup>3</sup> konjugátumon lévő dopamin anyagmennyiségét mutatja mmol-ban.

#### 3.3.2 PSI módosítása Arg-Gly-Asp (RGD) peptid szekvenciával

Az RGD tripeptidben található arginin szabad amin csoportja könnyedén reakcióba vihető a poli(szukcinimid)-el és így RGD funkcionalizált PSI állítható elő (PSI-RGD<sub>X</sub>, ahol X a graftolási fokot jelöli) melynek reakcióegyenlete a 10. ábrán látható.



10. ábra: Poli(szukcinimid) módosítása RGD tripeptid szekvenciával.

A reakcióhoz 10 mg RGD-t feloldottam 1,5 mL DMSO-ban (A oldat) majd 9,48 μL DBA-t adtam a reakcióelegyhez a pH beállításához. Ezután az oldatból különböző mennyiségeket kevertem össze PSI 25 m/m%-s DMSO-s oldatával, majd a reakció elegyeket 45 °C-n 1 hétig kevertettem. A reakció során 300-as, 500-as, 1000-s, 5000-s és 10000-s graftolási fokú (RGD<sub>300</sub>, RGD<sub>500</sub>, RGD<sub>1000</sub>, RGD<sub>5000</sub>, RGD<sub>10000</sub>) polimereket állítottam elő. Az RGD<sub>300</sub> minta esetében a polimert vízben csaptam ki, majd 45 °C-n 3 napig szárítottam a polimer szerkezetének meghatározásához. A későbbi munka során az RGD tartalmú gélek szintéziséhez (3.7.2 fejezet) a reakcióelegyeket használtam fel a módosított PSI kipreparálása nélkül. A reakció elegyek pontos összetételei a 2. táblázatban találhatóak.

	RGD <sub>300</sub>	RGD <sub>500</sub>	RGD <sub>1000</sub>	RGD <sub>5000</sub>	RGD <sub>10000</sub>
A oldat (µL)	378	227	114	23	12
PSI (g)	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
DMSO (mL)	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57

2. táblázat: PSI-RGD<sub>x</sub> polimerek előállításához használt reakcióelegyek összetétele

#### 3.4 A PSI és módosított PSI polimerek analízisei

# 3.4.1 Kémiai szerkezet meghatározása Mágneses Magrezonancia (NMR) spektroszkópiával

Az NMR spektrumok felvételéhez egy JEOL SC400 spektrométert (JEOL Ltd., USA) használtam. A mérésekhez 10-15 mg polimert oldottam fel 600 µL DMSO-d6ban illetve a PSI-DA-AE minták esetében D<sub>2</sub>O-ban majd az oldatokat 5 mm-s NMR csőbe töltöttem. A készülékhez egyszerre két mag manipulálására alkalmas inverz szélessávú mérőfej, pulzusforma generátor, és pulzus térgradiens meghajtó (PFG) csatlakozott.

Az <sup>1</sup>H-NMR spektrumot 3,2 s relaxációs idővel, 8 ismétléses méréssel, 400 MHz-s frekvenciával vettem fel.

A 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY NMR spektrumot 0,12 s relaxációs idővel, 256 ismétléses méréssel, 400MHz-s frekvenciával vettem fel.

### 3.4.2 Kémiai szerkezet meghatározása Fourier-transzformációs Infravörös Spektroszkópiával (FTIR)

A kísérleti munkámhoz minden esetben az alábbi készüléket és annak beállításait használtam: az FTIR méréséhez egy gyémánt Gyengített Totálreflexiós (ATR) (JASCO Ltd., ATR Pro ONE) fejjel és DTGS detektorral ellátott JASCO 4700A készüléket használtam. Az átlag spektrum felvételéhez 80 párhuzamos mérést végeztem, 4000-400 cm<sup>-1</sup> hullámhossztartományban, 4 cm<sup>-1</sup> felbontással. A mérések után a végső spektrumokat víz, CO<sub>2</sub> és alapvonal korrekció után kaptam meg.

#### 3.4.3 Termogravimetriás (TG) és Differenciál Kalorimetriás (DSC) mérés

A polimerek termikus stabilitásának vizsgálatához (TG) néhány mg polimert helyeztem egy TGA Q500 (TA Instruments, USA) készülékbe. A TG mérést 30 °C és 600 °C között végeztem 10 °C/perces felfűtési sebességgel, levegő atmoszférán. ADSC mérésekhez néhány mg polimert helyeztem egy DSC Q2000 (TA Instruments, USA) készülékbe. A mérést -40 °C és 200 °C között végeztem nitrogén atmoszférán 5 °C/perces fűtési/hűtési sebességgel 3 lépésben: először a mintát felfűtöttem 200 °C-ig majd lehűtöttem -40 °C-ig, majd ismét felfűtöttem 200 °C-ig.

#### 3.5 PSI-DA és PSI-DA-AE minták vizsgálata

## 3.5.1 Dopaminnal módosított minták oldhatóságának és oldhatóság kinetikájának vizsgálata

A minták oldhatóságának meghatározásához 0,1 g polimer-dopamin konjugátumot helyeztem 11 mL ultra-tiszta vízbe (UT víz) majd a rendszert mágneses keverőn kevertettem 24 és 48 óráig. Ezután az oldatokat 0,2 µm pórusátmérőjű polipropilén fecskendőszűrővel (VWR, Magyarország) szűrtem majd Agilent 8453 UV-VIS spektrofotométerrel (Agilent Technologies, USA) meghatároztam az abszorbanciájukat 280 nm-n, ahol a dopamin fényelnyelési maximum található. A koncentrációk meghatározásához kalibrációs oldatsorozatot készítettem dopaminnal ugyanolyan körülmények között 0-0,6 mmol/L koncentráció tartományban (egyenes egyenlete 11. ábra).



A PSI-DA GF=1 és GF=4 konjugátumok esetében meghatároztam a minták oldhatósági kinetikáját is. Ehhez 0.3 g polimer konjugátumot helyeztem 18 mL MQ vízbe és különböző időközönként mértem az oldatok abszorbanciáját 280 nm-n egészen 2 napig. A koncentráció meghatározásához a 11. a ábrán látható kalibrációs egyenes egyenletét használtam.

#### 3.5.2 Dopaminnal módosított minták lopifilitásának (lgP) meghatározása

A konjugátumok lgP értékeinek meghatározásához a klasszikus rázótölcséres módszert alkalmaztam. Ehhez először a konjugátumokból telített oldatot készítettem ultratiszta (UT) vízben, majd 10 mL-t egy rázótölcsérbe helyeztem. Ezután azonos térfogatú n-oktanolt adtam a rendszerhez, összeráztam, majd 24 órán keresztül állni hagytam. 24 óra elteltével mértem az oktanolos illetve a vizes fázis abszorbanciáját egyaránt Agilent 8453 UV-VIS spektrofotométerrel. Ezután az oldatokat visszatöltöttem a rázótölcsérbe, összeráztam majd 24 óra elteltével ismét elvégeztem a mérést. A koncentráció meghatározásához a kalibrációs mérést szabad dopaminnal elvégeztem n-oktanolban egyaránt 0-0,6 mmol/L-s koncentráció tartományban. Az UT vizes és oktanolos kalibrációs oldatsorozat illesztett egyenese a 11. ábrán látható.

A lgP értékeket a két fázisban mért koncentrációk arányaként adhatjuk meg az 1. egyenlet alapján:

$$lgP=lg(\frac{c_{oktanol}}{c_{viz}})$$
(1)

#### 3.5.3 Dopamin leszakadási kinetikájának és degradációjának meghatározása

A dopamin leszakadási kinetikájának meghatározásához a 0,1 g PSI-DA illetve PSI-DA-AE por konjugátumot töltöttem egy 3.5 kDa áteresztő képességű dialízis hártyába, hogy elválasszam a konjugátumot illetve a leszakadt kis molekulás dopamint egymástól. A dopamin leszakadási kinetikáját meghatároztam foszfát pufferben (PBS, pH=7.5 c=100 mM), illetve különböző enzimek: bromelain, illetve α-Kimotripszin jelenlétében. A dializáló hártyába 6 mL puffert vagy enzim oldatot töltöttem (3 mg/ml enzim koncentráció ugyanolyan PBS-ben), majd ezt a főzőpohárba helyeztem, amely minden esetben 60mL PBS-t tartalmazott. A reakció elegyet 37±1 °C-n termosztáltam és különböző időközönként mértem a külső oldat abszorbanciáját 2 napig az előzőekben említett Agilent 8453 UV-VIS spektrofotométer átfolyós küvetta segítségével. A leszakadt dopamin átlag koncentrációját a 11. a ábrán látható kalibrációs egyenes segítségével határoztam meg 3 párhuzamos mérésből. Mivel a dopamin a mérési körülményeken degradálódik, ezért meghatároztam a dopamin degradációjának kinetikáját a mérési körülményeken. Ehhez 0,1 mg/mL-s dopamin-hidroklorid oldatot készítettem és mértem az oldat abszorbanciájának csökkenését 280nm-n. Ezeket a méréseket a későbbiekben felhasználtam a dopamin pontos koncentrációjának meghatározásához. A mérés felépítése és a mérés során lejátszódó különböző kémiai és fizikai folyamatok a 25. ábrán láthatóak.

Az elektrosztatikus szálhúzással készített nanoszálas konjugátumoknál a dopamin leszakadás kinetikájának a méréséhez is ezt a mérési összeállítást használtam azzal a különbséggel, hogy 100 mg minta helyett 50 mg-ot mértem be. Emellett a méréseket csak PBS-ben és α-Kimotripszin jelenlétében végeztem a GF=1 és GF=4-es mintákkal.

#### 3.5.4 Dopamin degradációjának tömegspektrometriás (MS) analízise

A dopamin degradátumok jelenlétét és a kicsapódott fekete csapadék szerkezetét tömegspektrometriával (MS) határoztuk meg. A mérést egy Agilent 1200 Series HPLC rendszerrel végeztük, amelyhez egy gázmentesítő (Agilent 1260), egy bináris pumpa (Agilent 1290), egy automata mintaadagoló (Agilent 1260), egy kolonna termosztát (Agilent 1290) és egy tripla quadrupól spektrométer (QQQ) (Agilent 6460) kapcsolódott.

A méréshez a mintákat 1 V/V%-s ecetsav/UT vizes oldatával hígítottuk. Eluensként 40:60 arányú acetonitrile:UT vizet (1% ecetsav) használtunk. A mérésekhez 5 μl mintát injektáltunk a kolonnára és 0.3 mL/perc eluálási sebességet használtunk.

A tripla kvadrupól tömegspektrométerben a normál MS és tandem MS mérésekhez Jet Stream elektroporlasztásos ionforrást használtunk pozitív ionmódban. A kapilláris feszültséget 1950 V-ra míg a kapilláris hőmérséklet 300 °C-ra állítottuk. Porlasztó, köpeny és ütköző gázként nitrogén használtunk. A beállítási paraméterek a következőek voltak: gáz áramlási sebesség 10 min<sup>-1</sup>, porlasztó gáz áramlás 45 psi, köpeny gáz áramlása 11 min<sup>-1</sup>, hőmérskélete 250 °C, fragmentor feszültség 135 V. Az MS méréseket 50-500 Da m/z tartományban végeztük. A mérésekhez és a kiértékeléshez Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis szoftvert (verziószám: B.02.01) használtunk.

#### 3.6 PSI-DA és PSI-DA-AE alapú nanoszálas rendszerek készítése és vizsgálata

# 3.6.1 Nanoszálas rendszerek készítése elektrosztatikus szálhúzás (electrospinning) segítségével

Elektrosztatikus szálhúzáshoz egy általunk összeállított készüléket használtam, mely a 12. ábrán látható.

A dopaminnal módosított polimerek elektromos szálhúzásának a körülményeit az Isztambuli Műszaki Egyetemen Prof. Sezai A. Sarac témavezetése alatt dolgoztam ki. A polimer oldatot egy műanyag 2 mL össztérfogatú fecskendőbe töltöttem, amelyet egy G10-es tompa tűvel láttam el. Ezután a fecskendőt egy fecskendőpumpára (KD Scientific, KDS100) helyeztem, rögzítettem, majd a pozitív elektródot a tűhöz, míg a földet a fémgyűjtő laphoz csatlakoztattam. A szálhúzás során használt feszültséget egy GENVOLT 73030P egyenáramú tápegység biztosította. A szálhúzás során használt paraméterek és a 3. táblázatban láthatóak.

32



12. ábra: Elektrosztatikus szálhúzáshoz használt készülék összeállítása.

Amint az megfigyelhető a 3. táblázatban a GF=1 és 4-s minta esetén többféle paramétert használtam. A szálak fizikai megjelenésében és átmérőjében lévő különbséget a későbbi fejezetek során fogom ismertetni.

3. táblázat: PSI-DA és PSI-DA-AE polimerek elektromos szálhúzása során alkalmazott paraméterek

Minta neve	Oldószer (térfogat arány)	c (polimer) (V/V%)	U (kV)	Áramlási sebesség (ml/h)	Távolság (cm)	Páratartalom (%)
	DMF-ETOH 1-1	40	14	0,3	15	20
GF=1	DMF-ETOH- THF 2-1-1	35	14	0,3	15	20
CE-4	DMF	35	15	0,4	15	20
GF=4	DMF-THF 4-1	35	15	0,4	15	20
DA-AE 1-2	Víz	50	13	0.3	15	20

# 3.6.2 Elektrosztatikus szálhúzással készített szálak vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM)

A szálak mikroszkópos jellemzéséhez és átmérőjének meghatározásához egy Quanta 400F pásztázó elektronmikroszkópot használtam különböző nagyításban (Isztambuli Műszaki Egyetem, Isztambul, Törökország). 2-20 kV közötti gyorsító feszültséget alkalmaztam a képek felvételéhez és a jobb kontraszt érdekében a minták felületén arany bevonatot hoztam létre egy MCM-100 Model fémion szóró berendezés segítségével. A szálak átlagos átmérőjének meghatározását 100 szál méréséből végeztem az ImageJ képanalizáló program segítségével [115].

## 3.6.3 Elektrosztatikus szálhúzással készített szálak vizsgálata Atomerő mikroszkópiával (AFM)

A polimer szálak felületének vizsgálatához Cypher atomierő mikroszkópot (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) használtunk IgorPro 6 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) szoftverrel. A vizsgálatokhoz a szálakat ragasztóval rögzítetük egy tárgylemez felületére, hogy az AFM tűje ne mozdítsa el őket a vizsgálat közben. A szálakat levegőn mértük oszcillációs módban 0,2-1 Hz-s pásztázó frekvencián, 0,3-0,5 kV célértékkel. A mérések során  $3x3 \mu m^2$ -s területeket mértünk.

# 3.6.4 Elektrosztatikus szálhúzással készített szálak vizsgálata két foton mikroszkópiával

A szálak vizsgálatát Femtonics két foton mikroszkóppal (Femto2D, Femtonics, Hungary) végeztem. A poli(aszparaginsav) autofloureszcenciájának köszönhetően a szálak vizsgálatához nem volt szükség semmilyen flouroaktív jelölő használatához. A szálak gerjesztéséhez MaiTai DeepSee lézert (Spectra Physics, USA) használtam 800 nm-n. A felvételek rögzítéséhez 10X nagyítású objektívet, és MES4.4v programot használtam. A felvételek kontrasztjának és fényességének beállításához ImageJ programot használtam [115].

## 3.6.5 Elektrosztatikus szálhúzással készített szálas rendszerek oldhatóság kinetikájának meghatározása PBS-ben

A PSI-DA GF=1 és GF=4 szálak oldhatóság kinetikáját hasonló eljárással végeztem, mint a por minták esetében. A mérés során 50 mg szálas polimer konjugátumot helyeztem 10 mL PBS-be és kevertetés mellett mértem az oldat abszorbanciáját 280 nm-n különböző időközönként 2 napon át Agilent 8453 UV-VIS spektrofotométer segítségével. A polimer koncentrációjának meghatározásához az 11. a ábrán látható kalibrációs egyenes egyenletét használtam.

### 3.6.6 A konjugátumok membrán permeábilitásának jellemzése Parallel Mesterséges Membrán Permeábilitási (PAMPA) módszerrel

A vizsgálatokhoz 96 lyukú donor mikrotiter lemezt (EMD Millipore, USA) és egy bele illeszkedő 96 lyukú poli(vinilidén-difluorid) membránt (0,45 μm, EMD Millipore, USA) tartalmazó akceptor lemezt használtunk. A donor oldalra 0,5 mg szálas polimer konjugátum lapokat helyeztünk majd 330 μL 1 g/mL nátrium-dodecil-szulfát (NaDS)/PBS oldatot pipettáztunk. Kontrol mérésként ugyanilyen koncentrációjú dopamin-hidrokloridot illetve üres NaDS/PBS oldatot használtunk. Ezután a donor lemezre helyeztük a membránnal ellátott akceptor lemezt, amelybe előzőleg 5 μL 20 m/m%-s Izolecitin/dodekán elegyét pipettáztuk, amely a mesterséges membrán szerepét látja el a kísérletek során. Ezután a donor oldalra 150 μL 1 g/mL NaDS/PBS oldatot pipettáztunk majd a rendszert 4, illetve 28 órára állni hagytuk fénytől elzárva szobahőmérsékleten. 4 és 28 óra elteltével mértük az oldat abszorbanciáját a donor, illetve az akceptor oldalon egyaránt, NanoDrop 2000 UV-VIS spektrofotméterrel (Thermofischer, USA).

## 3.6.7 Polimer konjugátumok és szálas minták citotoxicitásának vizsgálata humán eredetű periodontális ligamentum (PDL) őssejtekkel

A citotoxicitás vizsgálatok során két különböző mérési sorozatot végeztünk a Semmelweis Egyetem Orálbiológia tanszékével együttműködésben. Az első vizsgálat során mértük különböző dopamin és konjugátum koncentráció esetén az életképes sejtek mennyiségét WST-1 reagens segítségével, míg a második mérésnél vizsgáltuk a különböző szálas konjugátumok közötti különbséget egy adott koncentráció mellett. Az első vizsgálatban a dopamin és a PSI-DA-AE 1:2 mintára kötött dopamin koncentrációját 1 µM-1 mM tartományban változtattuk. A kísérletek menetét egészen a sejtek kinyerésétől a következő fejezetekben ismertetem.

#### 3.6.7.1 PDL őssejtek passzálása

A sejtek impaktált humán felnőtt bölcsességfogakból történő izolálása után fagyasztásra kerültek. Az első kísérletsorozathoz két különböző páciensből származó PDL őssejteket olvasztottunk fel, azokat egyenként 2 db T75-s flaskába ültettük ki majd egy hétig felszaporítottuk őket inkubátorban (Orange Scientific, Belgium) szabvány körülmények között (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% páratartalom) 3 naponta tápoldatot cserélve.
A kísérletekhez α-MEM tápoldatot használtunk, amely 10 % fetális marha szérumot, 2 mM L-glutamint, 100 egység/mL penicilint és 100 mg/mL sztreptomicint is tartalmazott. A passzáláshoz a sejteket 1:5 arányú 0,05%-s Tripszin/EDTA oldattal távolítottuk el a tenyésztő edény aljáról.

# 3.6.7.2 Sejtek életképességének vizsgálata [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] WST-1 reagens segítségével

A vizsgálatokhoz 10000 sejt/cm<sup>2</sup> sejtsűrűséggel dolgoztunk minden egyes kísérleti lyukban egy 96 lyukú mikrotiter lemezen. A sejtek kiültetése után 1 nappal mértük az életképes sejtek mennyiségét WST-1 reagens segítségével. Ehhez a tápoldatot lepipettáztuk a sejtekről, majd 100 µL 1:20-as hígítású WST-1/PBS oldatot pipettáztunk a lyukakba. Ezután a reagens lemezeket 2 órán keresztül inkubáltuk és mértük a minták abszorbanciáját 450 nm-n egy BIO-RAD 3550 (Bio-rad Laboratories, Japan) mikrotiter lemezolvasó segítségével. A mérést a különböző páciensekből származó sejteknél 5 párhuzamossal végeztük és háttérként az ugyanabban a mérésben 655 nm-nél mért abszorbanciát használtuk. Ezután hozzáadtuk a sejtekhez a különböző koncentrációjú dopamin-hidroklorid, illetve PSI-DA-AE 1:2 tápoldatban készült oldatait, majd 1 és 3 nap elteltével mértük az életképes sejtek mennyiségét az előzőekben ismertetett módszer szerint.

Az elektrosztatikus szálképzéssel előállított minták esetében hasonlóan 10000 sejt/cm<sup>2</sup> sejtsűrűséggel dolgoztunk. A sejteket kör alakú mikroszkóp fedőlemezre ültettük ki. Ezután a sejtekre α-MEM tápoldatot pipettáztunk, majd hozzáadtuk az előre elkészített és ClO<sub>2</sub>-vel sterilizált mintákat. A sejtek életképességét 1 és 3 nap elteltével mértük WST-1 reagens segítségével az előbb ismertetett módon.

## 3.6.7.3 Sejtek morfológiájának vizsgálata fáziskontraszt mikroszkópiával

A sejtek morfológiáját a hatóanyag konjugátumok hozzáadása után 1 és 3nappal vizsgáltuk. Ehhez egy Nikon Eclipse TS100 inverz fázis kontraszt mikroszkópot (Nikon, Japan) használtunk. A felvételeket 10X nagyítású objektívvel, egy nagyfelbontású CCD kamera (COHU, USA) és Scion program segítségével rögzítettük.

## 3.6.7.4 Sejtek előkészítése két foton mikroszkópiás vizsgálatokhoz

A kétfoton mikroszkópiás vizsgálathoz Vybrant DiD festékkel még a kiültetés előtt megfestett sejteket használtunk. A PDL őssejteket egy kör alakú mikroszkóp

fedőlemezre ültettük ki, majd hozzáadtuk az előzőleg elkészített és sterilizált szálas konjugátumokat. 3 nap elteltével a mintákat lepipettáztuk és a sejteket 4%-s paraformaldehid oldattal fixáltuk a fedőlemezek felületén. A mikroszkópiás vizsgálatokhoz a 3.6.4 fejezetben ismertetett mikroszkópot és beállításokat használtam.

## 3.7 Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek szintézise

Mivel a PSI könnyen reakcióba vihető primer amin csoportot tartalmazó vegyületekkel, így kettő- vagy többfunkciós aminokkal keresztkötéseket hozhatunk létre a polimer molekulák között géleket szintetizálva. A gélek szintézise során kétféle keresztkötő molekulát, cisztamin-hidrokloridot (CYS) illetve diaminobutánt (DAB) használtam különböző mennyiségben. Gélek szintéziséhez mind a módosítatlan mind pedig a módosított polimereket egyaránt használtam.

#### 3.7.1 Különböző keresztkötőt tartalmazó PSI gélek előállítása

A gélek szintéziséhez a PSI 25m/m%-os oldatát különböző mennyiségű és összetételű keresztkötő molekula DMSO-s oldatával kevertem össze. Cisztamin keresztkötőt tartalmazó gélek esetében a reakció elegyhez DBA-t adtam a cisztamin-hidrokloridból származó hidroklorid megkötéséhez. 1 gramm gél szintéziséhez használt reakcióelegyek pontos összetétele a 4. táblázatban található.

Minto novo	25m/m% PSI oldat	DAB	CYS.2HCl	DBA	DMSO
winta neve	(mg)	(µL)	(mg)	(µL)	(µL)
PSI-DAB <sub>20</sub>	600	7,73	-	-	357,5
PSI-DAB <sub>40</sub>	600	3,87	-	-	360
PSI-CYS <sub>20</sub>	600	-	17,4	26,1	329,6
PSI-CYS <sub>40</sub>	600	-	8,7	13,1	346,6
PSI-CYS <sub>20</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	17,4	26,1	323,4
PSI-CYS <sub>40</sub> -DAB <sub>40</sub>	600	3,87	8,7	13,1	343,5
PSI-CYS <sub>80</sub> -DAB <sub>80</sub>	600	1,94	4,35	6,55	353,5

4. táblázat: PSI gélek előállításához használt elegyek összetétele

A keverékeket ezután különböző alakú keretbe öntöttem, így a további kísérleteknek megfelelő alakú gélt állítottam elő, és 1 napig hagytam gélesedni. A szintézisek során előállítottam csak DAB-al, CYS-al illetve DAB-al és CYS-al 1/1 arányban vegyesen keresztkötött géleket egyaránt (4. táblázat). A géleket minden

esetben 15m/m%-s kezdeti polimer koncentrációval illetve 10-es, 20-as és 40-s kezdeti térhálósítási fokkal (TF: monomerek és keresztkötő molekulák mólaránya) szintetizáltam. A keresztkötési reakciók a 13. ábrán láthatóak.

1 nap gélesedés után a kész géleket DMSO-ba helyeztem, hogy az elreagálatlan molekulákat kimossam, illetve a gél felvegye az egyensúlyi térfogatát. A mintákat ezt követően különböző kezeléseknek vetettem alá a további kísérletek előkészítéséhez.



13. ábra: PSI gélek előállítási reakciói különböző keresztkötővel.

## 3.7.2 RGD tartalmú PSI gélek szintézise

Az RGD tartalmú gélek szintéziséhez a 3.3.2 fejezetben leírt, RGD-vel módosított polimerek reakció elegyeit használtam fel, keresztkötőként DAB és CYS 1/1 mólarányú keverékét alkalmaztam. A 2. táblázatban található reakcióelegyeket (B oldat), a polimer kinyerése nélkül összekevertem a DAB és CYS DMSO-s oldatával és DBA-t adtam az elegyhez a CYS-ben található hidroklorid megkötéséhez. Ezután a keverékeket 0,75 mm vastag keretbe töltöttem és hagytam 1 napig gélesedni. A gélesedési reakció általános egyenlete a 14. ábrán látható.



14. ábra: PSI-RGD<sub>X</sub>-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélek szintézisének általános egyenlete.

A szintetizált gélekben az RGD mennyisége a 3.3.2 fejezetben leírtak alapján változott, vagyis minden 300., 500., 1000., 5000. és 10000. monomer tartalmazott RGD oldalláncot. A gélek pontos összetétele az 5. táblázatban található.

	PSI-RGD <sub>300</sub>	PSI-RGD <sub>500</sub>	PSI-RGD <sub>1000</sub>	PSI-RGD <sub>5000</sub>	PSI-RGD <sub>10000</sub>
B oldat (mg)	1256,5	1090,5	965,8	865,2	852,6
CYS.2HCl (mg)	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4
DAB (µL)	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9
DBA (µL)	36,6	36,6	36,6	36,6	36,6
DMSO (mg)	98	251	377	474	486

5. táblázat: PSI-RGD<sub>X</sub>-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélek pontos összetétele a gélesedés során

A különböző RGD tartalmú gélek ugyanolyan TF-el rendelkeztek, amely összetétel megfelel a 4. táblázat 5. sorának (kiemelt sor). Az 1 napos gélesedés után a gélfilmeket DMSO-ba helyeztem, hogy eltávolítsam az el nem reagált molekulákat és a gél felvegye az egyensúlyi térfogatát.

# 3.7.3 Különböző mennyiségben tiol csoport oldalláncot tartalmazó PSI gélek szintézise

A különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó gélek szintézisénél először különböző mennyiségű ciszteamint (CYSE) és a DAB-t feloldottam DMSO-ban majd összekevertem a PSI 25m/m%-s DMSO-s oldatával. A keverékeket ezután különböző formájú keretekbe töltöttem a későbbi felhasználásnak megfelelően majd hagytam 1 napig gélesedni. 1 nap után a géleket DMSO-ba helyeztem, hogy eltávolítsam az el nem reagált molekulákat és a gélek felvegyék az egyensúlyi duzzadásfokot. A gélek szintézisének általános reakcióegyenlete a 15. ábrán látható.



15. ábra: Különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó gélek szintézise.

Amint az a 16. ábrán is megfigyelhető, a gélek szintézise során a CYSE-ben található tiol csoportok egy része oxidálódik, és diszulfid hidak jönnek létre. Azért, hogy a diszulfid hidakat redukáljam tiol csoportokká ditiotreitol (DTT) oldatát alkalmaztam (lásd 3.7.6 fejezet). A különböző gélek szintézisénél a DAB mennyisége állandó volt, így a permanens TF minden minta esetben 20-nak adódott, ami a 4. táblázat 1. sorának megfelelő összetétel. Emellett a CYSE mennyiségét úgy változtattam, hogy minden 2., 5., 10., 20., 40., és 80. monomer legyen módosítva CYSE-vel. A különböző tiol csoportot tartalmazó gélek pontos összetétele 1 gramm gél szintézise esetén a 6. táblázatban látható.

Minta neve	25m/m%-s PSI oldat (mg)	DAB (µL)	CYSE (mg)	DMSO (µL)
CYSE <sub>2</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	60	303
CYSE <sub>5</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	24	335
CYSE <sub>10</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	12	346
CYSE <sub>20</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	6	352
CYSE <sub>40</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	3	355
CYSE <sub>80</sub> -DAB <sub>20</sub>	600	7,73	1,5	356

6. táblázat: PSI-CYSE<sub>X</sub>-DAB<sub>20</sub> gélek szintéziséhez használt elgyek összetétele

### 3.7.4 Dopamint tartalmazó PSI gélek szintézise

Különböző mennyiségben dopamint tartalmazó géleket a 3.3.1 fejezetben bemutatott 10-es, 15-s és 20-s graftolási fokú PSI-DA konjugátumokból állítottam elő. A PSI-DA konjugátumokból DMSO-ban először 25m/m%-s oldatot készítettem majd az oldatot összekevertem a CYS-t és DAB-t tartalmazó keresztkötők oldatával. A keverékhez DBA-t adtam a CYS-ből származó hidroklorid megkötéséhez. A

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

keresztkötők mennyisége mindegyik dopamin tartalmú gél esetében ugyanannyi volt és megegyezett a 4. táblázat 6. sorában található mennyiségekkel (PSI-DA<sub>X</sub>-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub>). A keverékeket ezután 0,75 mm vastag filmöntő keretbe töltöttem, majd 1 napig hagytam gélesedni. A gélesedés után a kész géleket DMSO-ba helyeztem, hogy eltávolítsam az elreagálatlan molekulákat és a gélek felvegyék az egyensúlyi duzzadásfokot. A gélek szintézisének egyenlete a 16. ábrán látható.



16. ábra: PSI-DA<sub>X</sub>-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélek előállításának általános egyenlete.

### 3.7.5 Gélek hidrolízise: Poli(aszparaginsav) alapú gélek előállítása

Mivel a poli(szukcinimid)-ben található imid gyűrűk könnyedén reakcióba lépnek nukleofil ágensekkel, ezért lúgos közegben elhidrolizálhatóak poli(aszparaginsav)-á. A gélek esetében ez hasonlóan lejátszódik, így a PSI gélek lúgos hidrolízisével PASP alapú géleket állíthatunk elő [107-109]. A PASP gélek szintéziséhez a DMSO-ban duzzasztott géleket lúgos imidazol pufferbe (pH=8, c=250 mM) helyeztem majd a puffert következő 3 napban naponta cseréltem, hogy a gélben a hidrolízis teljesen végbemenjen. Ezen a pH-n a keresztkötések stabilak, az amid kötések hidrolízise nem játszódik le. PASP gélek esetében a továbbiakban az elnevezésükben a PSI helyett a PASP kifejezést fogom használni így például a PSI-DAB<sub>20</sub> elnevezése PASP-DAB<sub>20</sub>-ra változik. A PSI gélek hidrolízisének általános egyenlete a 17. ábrán látható.



### 3.7.6 Diszulfid hidak redukciója: Tiol oldallánc kialakítása a PASP gélekben

A gélekben található diszulfid hidak reduktív környezetben tiol csoportokká alakíthatóak. Ehhez használhatunk például 1,4-ditiotreitolt (DTT) mivel a DTT redoxpotenciálja -950 mV míg a CYS-CYSE rendszernek -230 mV, így a DTT képes redukálni a gélekben található diszuflid hidakat miközben intramolekuláris diszulfid hidakat képez [116]. A tiol csoportok kialakításához a géleket pH=8-as imidazol pufferben készült 0,1 M-s DTT oldatba merítettem, amit 1 nap után lecseréltem az összes diszulfid híd felnyitásához. A gélekben a diszulfid-tiol átalakulás egyenlete a 18. ábrán látható.



PASP-CYS-DAB PASP-CYSE-DAB 18. ábra: Diszulfid hidak felnyitása DTT-vel a vegyesen keresztkötött PASP gélekben.

#### 3.8 PASP alapú gélek vizsgálata

#### 3.8.1 PASP gélek mechanikai tulajdonságainak jellemzése

A gélek mechanikai tulajdonságainak jellemzéséhez 1 cm átmérőjű és 1 cm magas PSI alapú gél hengereket készítettem. Ezután az előző fejezetekben leírt eljárásokkal PASP alapú géleket állítottam elő, valamint elvégeztem a diszulfid hidak felnyitását is a PASP-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub>, illetve PASP-CYS<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> minták esetében. Ezután a géleket PBS-ben duzzasztottam majd meghatároztam a geometriai paramétereiket egy tolómérő segítéségével (átmérő és magasság) valamint mértem az egyensúlyi tömegüket. A gélek rugalmassági moduluszát Instron 5942 (Inteszt kft., Magyarország) készülékkel mértem, egyirányú összenyomással, 1 mm/min összenyomási sebességgel, 25 °C-n, 3 N vagy 2 mm maximális összenyomásig. A mérés során a nyomóerőt (F) detektáljuk a deformáció függvényében ( $\Delta$ h). A nyomóerőből számíthatjuk a nominális feszültséget ( $\sigma_N$ ) 2. egyenlet alapján:

$$\sigma_{\rm N} = \frac{F}{\left(\frac{d_0}{2}\right)^2 * \pi}$$
(2)

,ahol d<sub>0</sub> a gél henger kezdeti átmérőjét jelenti.

A deformációból számíthatjuk a deformáció arányt ( $\lambda$ ) az alábbi egyenlet alapján:

$$\lambda = 1 - \frac{\Delta h}{h_0} \tag{3}$$

,ahol h<sub>0</sub> a gél kezdeti magasságát,  $\Delta h$  pedig a deformáció mértékét jelenti és abban az esetben igaz, ha  $\Delta h=h_0-h$ .

Ezután a 4. egyenlet alapján  $\lambda$ - $\lambda$ <sup>-2</sup> függvényében ábrázolva a  $\sigma_N$ -t az egyenes meredekségéből meghatározhatjuk a rugalmassági moduluszt (G) a Neo-Hooke törvénnyel:

$$\sigma_{\rm N} = -G^* D = -G^* \left( \lambda - \lambda^{-2} \right) \tag{4}$$

A rugalmassági modulusz ismeretében a Neo-Hooke törvény segítségével meghatározhatjuk a gél egységnyi száraz térfogatban lévő hálópontok mennyiségét ( $v^*$ ):

$$G = RTAv^* q_0^{-\frac{2}{3}} \phi^{\frac{1}{3}}$$
(5)

,ahol T a hőmérséklet, R az egyetemes gázállandó melynek értéke 8,314 kJ/mol\*K. "A" egy modell paraméter, amely a Flory elmélet szerint 1, míg a James-Guth és Staverman elmélet szerint 1/2 [57, 117, 118],  $\Phi$  a polimer térfogati törtje a gélben, q<sub>0</sub> pedig az un. memória faktor. A  $\Phi$  a gélben lévő polimer térfogati törtje, amely a gél térfogat szerinti egyensúlyi duzzadásfokának a reciprokaként számolható ki. A gél térfogat szerinti duzzadásfoka (D<sub>V</sub>) a duzzadt gél térfogatának és a száraz gél térfogatának arányából. Ennek meghatározásához mértem a gélek duzzadt tömegét a rugalmassági modulusz mérés előtt, majd a mérés után kiszárítottam a mintákat és ismét mértem a tömegüket. Ebből kiszámítható a tömeg szerinti duzzadásfok, amelyet ha megszorzunk a duzzadt és száraz gél sűrűségének arányával megkapjuk a térfogat szerinti duzzadásfokot. Ezen adatok ismeretében már meghatározható a v<sup>\*</sup>, amely a gél duzzadásfokától független mechanikai tulajdonságra jellemző mennyiség.

# 3.8.2 Különböző keresztkötő molekulát tartalmazó PASP gélek degradációs vizsgálata

A különböző keresztkötőt tartalmazó PASP gélek (3.7.1 fejezet) degradációs vizsgálatát két külön kísérletben végeztem. Az egyik kísérletben vizsgáltam a gélek stabilitását a későbbi sejttenyésztési kísérletekhez használt tápoldatban (α-MEM) a másik esetben pedig a sejttenyésztés során használt illetve a sejtek által termelt enzimek (Diszpáz II, Kollagenáz I illetve Tripszin-EDTA) jelenlétében.

Az első kísérletsorozatban 0,75 mm vastag PASP-CYS<sub>20</sub>, illetve PASP-CYS<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> filmeket készítettem, majd PBS-ben duzzasztottam. Ezután 3 cm sugarú gélkorongokat vágtam ki a filmekből, mértem a tömegüket majd a különböző enzimek PBS-s oldatába (0.05 % Tripszin-EDTA, 3 mg/mL Kollagenáz I és 4 mg/mL diszpáz II) merítettem őket. Emellett 2 gélkorongot negatív kontrollként PBS-ben tartottam a mérés teljes idejére. Ezután a következő 42 napban különböző napokon mértem a gélek tömegét egy analitikai mérleggel (Sartorius, Németország). A mintákon a 3., 10. és 24. napon cseréltem az enzim oldatokat. A méréseket 6 párhuzamos mintával végeztem.

A második kísérletsorozatban a vizsgálatokhoz a 3.8.1 fejezetben leírt módon gélhengereket készítettem, majd elhidrolizáltam és a DTT-vel kezeltem. Ezután a gélhengereknek mértem a geometriai paramétereit, tömegét valamint rugalmassági moduluszát. Ezután nagy mennyiségű α-MEM tápoldatba helyeztem a mintákat, majd 37 °C-n termosztáltam a mintákat. A következő 17 napban különböző napokon szintén meghatároztam a minták geometriai paramétereit, tömegét és rugalmassági moduluszát.

A kísérlet során a 3. és 10. napon cseréltem a géleken a tápoldatot, ami hasonló gyakoriság, mint sejttenyésztés esetében. A 17. nap után azokat a géleket, amelyek nem degradálódtak jelentős mértékben kiszárítottam majd mértem a száraz tömegét. Ebből meghatároztam a különböző napokon a gélek tömeg szerinti duzzadásfokát illetve ezen adatok és a rugalmassági modulusz ismeretében kiszámoltam a  $v^*$  értékét. A méréseket 3 párhuzamos mintával végeztem.

# 3.8.3 Különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó gélek vizsgálata FTIR-RAMAN és kétfoton mikroszkópiával

A különböző mennyiségben tiol oldalláncot tartalmazó gélek esetében vizsgáltuk a száraz gélek kémiai szerkezetét, illetve struktúráját FTIR-RAMAN és két foton mikroszkópia segítségével. Ehhez a DTT-vel kezelt PASP gélkorongokat UT vízzel mostam 1 hétig úgy, hogy az UT vizet minden nap cseréltem a mintákon. Ezután 45 °C-on szárítottuk, majd a száraz géleket egy mozsár segítségével felaprítottuk. A mérést a Lille-i egyetemen Professzor Abdenacer Idrissi segítségével végeztük egy Bruker 100/S FT-RAMAN (BRUKER, USA) készülékkel, amely egy folyékony nitrogénnel 77 K-re hűtött GE-dióda detektorral volt ellátva. A minták gerjesztéséhez egy YAG-ND lézert (1064 nm 500 W) használtunk 120 mW teljesítménnyel. A minták mérése előtt a lézersugarat a mintatartóra fokuszálva felvettük levegőn a hátteret. Ezután a mintákat a mintatartóba helyeztük és felvettük a minták RAMAN spektrumait 4 cm<sup>-1</sup> felbontással, 200-4000 cm<sup>-1</sup> hullámszám között, OPUS 5.5 szoftver segítségével. A megfelelő jel/zaj arány eléréséhez 1000 párhuzamos mérést végeztünk. A két foton mikroszkópiás mérésekhez a géleket fagyasztva szárítottam, majd a 3.6.4 fejezetben bemutatott két foton mikroszkópot használtam ugyanolyan beállításokkal.

### 3.8.4 Tiol csoport mennyiségének meghatározása Ellman reagens segítségével

A gélekben található szabad tiol csoportok mennyiségét Ellman reagens (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB) (Thermo Scientific) segítségével végeztük. Ehhez először L-cisztein segítségével kalibrációt készítettünk 0-1,5 mmol/L koncentráció tartományban a gyártó által megadott protokoll szerint [119]. A kalibrációs egyenes a 19. ábrán látható.



19. ábra: A gélekben található tiol csoport mennyiségi meghatározásához használt kalibrációs egyenes.

A tiol csoport mennyiségének a meghatározásához 10 mg szárított gél mintát helyeztünk 2,5 mL reakció pufferbe, majd 50 µL Ellman reagens oldatot (4 mg DTNB/mL reakció puffer) adtunk a mintákhoz. Ezután a mintákat 4 órán keresztül állni hagytuk majd mértük az abszorbanciájukat 415 nm-n Agilent 8453 UV-VIS spektrofotométer segítségével. A gélekben található tiol csoportok anyagmennyiségét a 19. ábrán található kalibráció egyenes egyenletéből határoztuk meg 3 párhuzamos mérésből.

### 3.9 MG-63 oszteoblaszt-típusú és PDL őssejtek tenyésztése PASP alapú géleken

# 3.9.1 Sejtek életképességének vizsgálata PASP alapú géleken

A sejtek életképességének vizsgálatához 6 mm átmérőjű 1 cm vastag gélkorongokat használtunk, mind az MG-63, mind pedig a PDL őssejtek esetében. A gélkorongokat először PBS-el kezeltük 1 hétig, majd pedig a sejttenyésztéshez használt tápoldatba helyeztük 1 órára, amelyet 30 perc után cseréltünk. Ezután a géleket felületkezelt, alacsony sejtmegkötő képességű 96 lyukú mikrotiter lemezbe (Sigma Aldrich, Magyarország) helyeztük és 1 órán át UV fénnyel kezeltük a bakteriális fertőzések elkerülése végett. A sterilizálás után minden gél felszínére 20000 MG-63 vagy PDL őssejtet pipettáztunk 200  $\mu$ L  $\alpha$ -MEM tápoldatban felszuszpendáltatva. MG-63 sejtek esetében a kiültetéstől számított 1., 3. illetve 6. napon, míg PDL őssejtek esetében az 1., 3., 7. és 14. napon mértük az életképes sejtek mennyiségét WST-1 reagens segítségével. A méréshez először lemostuk a géleket PBS-el, hogy a le nem tapadt sejteket eltávolítsuk, majd 100  $\mu$ L 1:20-as hígítású WST-1/PBS reagens

### DOI:10.14753/SE.2019.2213

pipettáztunk a mintákra, és 4 órán át 37 °C-n inkubáltuk őket. Ezután 90µL-t minden mintáról átpipettáztunk egy 96 lyukú mikrotiter lemezbe és mértük az abszorbanciát 450nm-n egy BIO-RAD 3550 (Bio-rad Laboratories, Japan) mikrotiter lemezolvasó segítségével. Referenciaként a 655 nm-en mért abszorbanciát használtuk. A kísérleteket minden esetben 5 párhuzamossal végeztük, PDL őssejtek esetében különböző páciensből kinyert sejtekkel egyaránt. Háttérként sejtek nélküli hidrogéleket használtunk. A mérések lebonyolításának sematikus ábrája a 20. ábra bal oldalán látható.



20. ábra: A sejtes kísérletek során végrehajtott kvantitatív és kvalitatív mérések sematikus ábrája.

# 3.9.2 Sejtek morfológiájának vizsgálata fázis kontraszt mikroszkóp segítségével

A sejtek morfológiájának vizsgálatához 40000 sejtet ültettünk 10 mm átmérőjű gélek felszínére 400 µL szuszpenzióban. A sejtek vizsgálatát azonos napokon végeztük mint az életképességi vizsgálatokat. A sejtek morfológiájának vizsgálatához Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japán) használtunk 10X-s nagyítású objektívvel. A felvételeket nagy felbontású CCD kamerával (COHU, USA) a SCION image szoftver segítségével készítettük.

# 3.9.3 Sejtek eloszlásának és morfológiájának vizsgálata két foton mikroszkóp segítségével

A két foton mikroszkópiás vizsgálatokhoz 10 mm átmérőjű géleket használtunk, amelyeket a 3.9.1 fejezetben leírtak szerint készítettünk elő. A géleket ezután 24 lyukú mikrotiter lemezbe helyeztük és 80000 Vybrant DiD festékkel megfestett sejtet ültettünk ki a felületükre 800 µL szuszpenzióban. A méréseket ugyanazokon a napokon

végeztük mint az életképességi és a fáziskontraszt vizsgálatokat. A sejtek vizsgálatához a géleket először PBS-el mostuk, majd 4 %-s paraformaldehid oldattal 2 óráig fixáltuk a sejteket. A vizsgálatokig a géleket PBS alatt 4 °C-n tároltuk. A vizsgálatokhoz a 3.6.4 fejezetben leírt mikroszkópot és beállításokat használtuk. A mérések lebonyolításának sematikus ábrája a 20. ábra jobb oldalán látható.

# 3.9.4 Sejtek oszteogén irányú differenciálódásának vizsgálata alkalikus foszfatáz (ALP) enzim aktivitás mérés segítségével

A sejtek differenciálódásának nyomon követéséhez ALP aktivitás mérést végeztünk a kiültetéstől számított 3., 7. és 14. napon. A méréshez a minták egyik csoportjánál a sejteket oszteogén differenciálódást elősegítő [120], a másik csoportnál az előzőekben említett standard tápoldattal kezeltük a kiültetést követően. Ennek segítségével megfigyelhettük, hogy a gélek indukálják-e a sejtek spontán csont irányú differenciálódását. A méréshez a mintákat először 2-amino-2-metil-1-propanol pufferel (pH=10,5, c=50mM) kezeltük, majd az alkalikus foszfatáz aktivitás méréshez Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System-t használtunk. A mérést a már korábban a Semmelweis Egyetem Orálbiológiai tanszékének munkatársai által publikált protokoll szerint végeztük [120]. Háttérként sejt nélküli gélkorongokat használtunk.

#### 3.9.5 Statisztikai Analízis

A számtani átlagok az életképességi és az ALP mérések esetében legalább 15-25 független mérésből lettek számítva. A statisztikai kiértékelést STATISTICA 10 szoftver segítségével végeztük melyben Kruskal-Wallis nem parametrikus ANOVA median tesztet használtunk. A mért adatok közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük ha p<0,05.

### 4 Eredmények

# 4.1 Dopaminnal módosított poli(aszpartamid) alapú konjugátumok alkalmazhatóságának vizsgálata a gyógyszerészetben

Vizsgáltuk a konjugátumok azon kémiai és fizikai tulajdonságait, amelyek befolyásolhatják gyógyszerészeti alkalmazhatóságukat. Emellett megvizsgáltuk a dopamin leszakadásának időfüggését, amely pontos leírásához egy kinetikai modellt dolgoztunk ki.

48

#### 4.1.1 A PSI és a dopaminnal módosított PSI kémiai szerkezetének vizsgálata

A kémiai reakciók lejátszódása után a pontos kémiai szerkezet meghatározásához FTIR-ATR és <sup>1</sup>H-NMR méréseket végeztünk. A szintézist követően a minták tisztításon estek át és minden mérés esetében ezeket a tisztított, por állagú mintákat vizsgáltuk. Célunk volt a tényleges és elméleti kémiai szerkezet összehasonlítása.

#### 4.1.1.1 FTIR-ATR mérések eredményei

A PSI, PSI-DA illetve PSI-DA-AE minták FTIR spektruma a 21. ábrán látható.



21. ábra: PSI és PSI-DA konjugátumok (a és b ábra) illetve PSI-DA-AE minták FTIR-ATR spektruma (c ábra).

A 3270 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál megjelenő kiszélesedett csúcs a 21. a és c ábrán a szekunder illetve primer –OH csoport asszimetrikus megnyúlási rezgéséhez tartozik. A módosítatlan PSI spektrumán (szürke spektrum) ez a csúcs nem figyelhető meg, míg a többi spektrum esetében jól látható, így ez bizonyítékul szolgál a dopamin illetve az aminoetanol oldallánc jelenlétére a polimeren. A csúcs intenzitása a GF=4 minta esetében kisebb, ami bizonyítja a kevesebb dopamin jelenlétét a polimeren. Az 1660 cm<sup>-1</sup> illetve 1540 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál megjelenő csúcsok az amid csoportban lévő vC=O és vC-N csoport megnyúlási gerjesztéséhez tartoznak, amelyek szintén bizonyítják a sikeres módosítást (21. b ábra). Az imid csúcsok jelenléte mindegyik spektrumon (21. a és b ábra) bizonyítja, hogy még a GF=1 minta esetében is maradt módosítatlan szukcinimid gyűrű a polimeren. A PSI-DA-AE minták spektrumánál (21. c ábra) ez a csúcs nem figyelhető meg, így ezeknél a polimereknél kijelenthető, hogy minden monomer módosítva lett és lényegi különbség nem Itáható a polimerek spektrumai között. A 2922 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál megjelenő vCH<sub>2</sub> asszimetrikus rezgési

illetve 2851 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál megjelenő vCH<sub>2</sub> szimmetrikus rezgési csúcsa bizonyítja az aminoetanol oldallánc jelenlétét a konjugátumokon (21. c ábra). A spektrumok jó egyezést mutatnak az irodalomban található spektrumokkal [121, 122].

### 4.1.1.2 NMR mérések eredményei

A PSI, PSI-DA és a PSI-DA-AE minták <sup>1</sup>H-NMR spektruma a 22. ábrán látható.

A PSI spektrumában (22. ábra) 5,3 ppm-nél megjelenő csúcs a szukcinimid gyűrűben található metin csoport hidrogénjéhez tartozik. A szukcinimid metilén csoportjában lévő két hidrogén 2,7 ppm-nél és 3,2 ppm-nél jelenik meg. A két hidrogén csúcsának a szétválása a metilén csoport mellett lévő metin csoport királis szénatomjának a következménye.

A 22. b és c ábra a PSI-DA GF=1 illetve GF=4 polimerek <sup>1</sup>H-NMR spektrumai láthatóak. A dopamin pirokatekol csoportjában található –OH csoportok hidrogénjei 8,7 ppm-nél míg a benzil csoport hidrogénjei 6,4 és 6,57 ppm-nél jelennek meg a spektrumokon.

A 0,85, 1,29 és 1,5 ppm-nél megjelenő csúcsok a DBA-ban található metilén és metil csoportokhoz tartoznak. Ezek jelenléte következhet abból, hogy a DBA is képes rákötni a polimerre, illetve abból, hogy a polimer tisztítása során nem sikerült az össze DBA-t eltávolítani. A 4,49 ppm-nél megjelenő csúcs a felnyílt, módosított szukcinimid gyűrű (aszpartamid monomer) metin csoportjához tartozik, míg a dopamin –CH<sub>2</sub> csoportjában található hidrogén csúcsa 2,84 ppm-nél látható.

A PSI-DA-AE minták <sup>1</sup>H-NMR spektrumai a 22. d és e ábrán láthatóak. A szukcinimid metin csoportjához tartozó csúcs teljes eltűnése mindkét spektrumban bizonyítja, hogy ezen minták esetében minden monomer módosítva lett. A dopamin pirokatekol csoportjára jellemző csúcsok (6,4, 6,57 és 8,22 ppm) bizonyítják a dopamin jelenlétét a mintákban. A dopamin és aminoetanol –CH<sub>2</sub> csoportjában található hidrogének csúcsai egyaránt 2,84 ppm-nél láthatóak. A mért spektrumok nagy hasonlóságot mutatnak az irodalomban találhatókkal [121, 122].



22. *ábra:* A PSI (*a*), PSI-DA GF=1 (*b*), PSI-DA GF=4 (*c*), PSI-DA-AE 1:1 (*d*) és a PSI-DA-AE 1:2 polimerek <sup>1</sup>H-NMR spektruma.

A tényleges graftolási fokot a 6,4 és 6,57 ppm-nél lévő dopamin benzil csoportjára jellemző, illetve a 4,49 és 5,3 ppm-nél megjelenő módosított és módosítatlan szukcinimidre jellemző valamint a 0,85 ppm-nél megjelenő DBA-ra jellemző csúcsok (amennyiben az a polimerre van kötve) csúcs alatti területének arányából határoztam meg (7. táblázat).

7. lablazai. A kalohoozo monomerek aranya az M-wink spekiramok alapjan							
Minta	Szukcinimid (SI)	Aszpartamid (ASP)	DA	DBA			
GF=1	1	7	6	1			
GF=4	15	-	5	1			
DA-AE 1:1	-	20	5	1			
DA-AE 1:2	-	20	4	1			

7. táblázat: A különböző monomerek aránva az  $^{1}$ H-NMR spektrumok alapián

A GF=1-s minta esetében látható hogy 8 monomerből 7 módosult ténylegesen, míg 1 monomer módosítatlan maradt. Ezen értékek a 4,55 ppm-nél (integrál: 1) és 5,03 ppm-nél (integrál: 0,15) található csúcsok csúcs alatti területe alapján lettek számolva. A dopaminhoz és DBA-hoz tartozó csúcsok integráljai alapján megállapítható hogy a 7 módosított monomerből 6 tartalmaz dopamint, míg 1 tartalmazhat DBA oldalláncot. Ez alapján ennek a mintának a tényleges graftolási foka dopaminra nézve 1,33. A GF=4-s minta esetében megfigyelhető, hogy a tényleges és elméleti graftolási fok megegyezik.

A PSI-DA-AE minták esetében a dopamin tényleges mennyiségét a dopamin benzil protonjaihoz és a módosított aszpartamid metin csoportjának protonjaihoz tartozó csúcsok arányából határoztuk meg. Ez alapján a dopamin mennyisége pont a fele az elméleti mennyiségnek. Az <sup>1</sup>H-NMR spektrumok eredményei jó egyezést mutatnak az előző fejezetben bemutatott FTIR-ATR spektrumokkal.

# 4.1.2 PSI-DA és PSI-DA-AE minták fizikai paraméterei: oldhatóság, oldhatóság kinetika, lipofilitás és termikus stabilitás

A konjugátumok oldhatósága és lipofilitása nagymértékben befolyásolja a készítmények sorsát (pl.: felszívódás, kiürülés, hatóanyag felszabadulás) az emberi szervezetben. A konjugátumok termikus stabilitása fontos paraméter a további formulázásuk során.

## 4.1.2.1 PSI-DA és PSI-DA-AE polimerek oldhatósága és oldhatóság kinetikája

A PSI önmagában egy vízoldhatatlan polimer. A módosítás során azonban a dopamin pirokatekol csoportjában és az aminoetanolban lévő –OH csoportok megnövelik a polimerek vízoldhatóságát. Mivel a polimerek különböző oldalláncokat különböző mennyiségben és arányban tartalmazzák, ezért a kémiai összetétel nagy hatással van az oldhatóságukra. A 8. táblázat a különböző polimerek oldhatóságát mutatja 24 és 48 óra után vízben.

8. táblázat: A PSI-DA és PSI-DA-AE polimerek koncentrációja vízben 24 és 48 órával a bemérés után

	GF=1	GF=4	DA-AE 1:1	DA-AE 1:2
koncentráció 24 óra után (mg/L)	151,6 ± 3,0	$67,2 \pm 0,1$	$2960,6 \pm 46,2$	nagyobb mint 50m/m%
koncentráció 48 óra után (mg/L)	150,4 ± 3,0	82,9 ± 0,9	$2953,8 \pm 17,4$	nagyobb mint 50m/m%

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

Amint az megfigyelhető az oldhatósága sokkal nagyobb a GF=1-s mintának, mint a GF=4-s mintának, ami a több pirokatekol oldalláncnak és így a több szekunder -OH csoportnak köszönhető. Az aminoetanol alkalmazásával, köszönhetően a primer –OH csoportoknak a polimereken, a minták oldhatósága jelentős mértékben megnövekszik,. Ez a PSI-DA-AE 1:2 minta esetében olyan jelentős, hogy a polimer oldhatósága az 50m/m%-t is meghaladja, ami jóval magasabb a normál gyógyszerészeti alkalmazás esetén használt koncentrációnál.

A 23. a ábra az oldott konjugátumon lévő dopamin koncentrációjának időfüggését, míg a 23. b ábra ugyanennek az idő négyzetgyökétől való függését mutatja PSI-DA GF=1 illetve GF=4 konjugátumok esetében.



23. ábra: A PSI-DA GF=1 (fekete négyszög) és GF=4 (kék háromszög) oldhatóságának idő (a) és gyök idő (b) függése.

Amint az a 23. ábrán megfigyelhető a konjugátomuk összetétele nem csak az oldhatóságra, de az oldhatóság időfüggésére is nagy hatással van. A GF=1-s minta már 5 óra után eléri a telítési koncentrációt, míg a GF=4-s konjugátum oldott koncentrációja 2 napon át folyamatosan növekszik és 2 nap után sem éri el a telítési koncentrációt.

A 23. b ábrán látható koncentráció-gyök idő függésének a későbbi kinetikai leírás során lesz jelentősége, ugyanis a kezdeti szakaszra illesztett egyenes meredekségéből meghatározható az oldódás kinetikai konstansa. A GF=4-s minta oldhatósága lineárisan függ az idő négyzetgyökétől a teljes megfigyelési időn át, míg a GF=1-s minta esetében ez csak az első 3 órára igaz.

#### 4.1.2.2 PSI-DA és PSI-DA-AE minták lipofilitása (lgP)

A konjugátumok lipofilitási értékei a 9. táblázatban láthatóak.

	GF=1	GF=4	DA-AE 1:1	DA-AE 1:2		
24 óra után	-1,33 ± 0,07	-0,73 ± 0,01	$-1,14 \pm 0,02$	$-2,20 \pm 0,03$		
48 óra után	$-1,37 \pm 0,03$	-0,71 ± 0,01	$-1,10 \pm 0,02$	$-2,20 \pm 0,05$		

9. táblázat: PSI-DA és PSI-DA-AE konjugátumok lipofilitási értékei

A lipofilitási adatok (9. táblázat) hasonló tendenciát mutatnak, mint az oldhatósági adatok. Mivel minden minta esetében a lgP adatok 0-nál kisebb értéket mutatnak, ezért elmondható hogy mindegyik konjugátum jobban oldódik vízben, mint oktanolban, így inkább hidrofilnek mondhatóak. Összehasonlítva a mintákat látható, hogy a GF=1 konjugátumnak kisebb a lipofilitása mint a GF=4 konjugátumnak. Az is megfigyelhető, hogy a primer –OH csoportok mennyisége a konjugátumon csökkenti a polimer lipofilitását (DA-AE 1:1 és 1:2 minta összehasonlítása). Ami érdekességet mutat, hogy a DA-AE 1:1 minta a GF=1-hez képest nagyobb vízoldhatósággal rendelkezik (8. táblázat) mégis lipofilebb karakterű (9. táblázat). A lipofilitási értékek nem változnak 24 és 48 óra között.

# 4.1.2.3 A konjugátumok termogravimetriás (TG) és differenciál pásztázó kalorimetriás (DSC) vizsgálata

A konjugátumok termikus stabilitását TG és DSC mérésekkel vizsgáltuk (24. ábra).



24. ábra: A PSI-DA és PSI-DA-AE minták TG (a) és DSC (b) görbéje. Az azonos színek azonos konjugátumokat jelölnek a két diagramon.

A 24. ábrán megfigyelhető, hogy minden konjugátum stabil 200 °C-ig. A kismértékű tömegveszteség 100 °C-ig a fizikailag megkötött víz párolgásának a következménye. Ezt a 24. b ábrán a DSC görbében látható első felfűtésben (szilárd

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

vonal) 50-100 °C között lévő endoterm hő változás is igazolja. Mivel sem hőváltozás (2. felfűtés DSC görbe) sem tömegveszteség (TG görbe) nem látható egészen 200 °C-ig ezért elmondható, hogy mindegyik konjugátum stabil 200 °C-ig. A 220-250 °C körül látható tömegveszteség a dopamin bomlásához [40], míg a 300 °C feletti további tömegveszteség pedig a polimer degradációjához köthető [114]. A minták teljes mennyisége 600 °C környékén elég

### 4.1.3 A dopamin leszakadás kinetikájának mérési és elméleti leírása

A hatóanyag leszakadás kinetikájának a leírásához pontosan ismernünk kell a folyamat során lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok időfüggését, amelyek a 25. ábrán láthatóak.



25. ábra: Dopamin leszakadási kinetikájának méréséhez használt kísérleti elrendezés: a) készülék sematikus ábrája b) a mérés során lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok.

Az első lépésben a szilárd polimer konjugátum (sötét barna részecske) beoldódik a reakció közegbe (25. ábra, barna nyíl). Abban az esetben, ha a konjugátum a dopamin mellet aminoetanol oldalláncot is tartalmaz (PSI-DA-AE konjugátumok) ez a lépés egyből lejátszódik, így az oldódás kinetika nem befolyásolja a dopamin leszakadási kinetikáját. A PSI-DA GF=4 minta esetében ezt a lépést a szukcinimid gyűrűk hidrolízise is befolyásolja, azonban ez az oldhatósághoz képest jóval lassabb folyamat, ezért nincs hatással a rövid távú dopamin leszakadásra. A következő lépésben a dopamin leszakad a polimer láncról a polimer és a dopamin között lévő amid kötés hidrolízisének köszönhetően (25. ábra, piros nyíl). Ezután a dopamin átjut a membránon (25. ábra, kék nyíl) és kikerül a külső térbe ahol feldúsul a külső tér 10-szer nagyobb térfogata miatt. A dopamin ezután egy oxidatív degradáció következtében 2-aminokrómmá (AC) alakul (25. ábra, zöld nyíl), amely ezután tovább polimerizálódik melanin származékokká (25. ábra, fekete nyíl). Ezen származékok fekete csapadékként jelennek meg a reakcióelegyben.

# 4.1.3.1 Dopamin degradációjának kinetikája és annak felhasználása a dopamin leszakadási kinetikájának korrekciójához

A dopamin leszakadási kinetikája a konjugátumok eltérő vízoldhatóságának köszönhetően két csoportra osztható: egy vízben jól és gyorsan, illetve egy vízben lassan oldódó csoportra.

Mindkét esetben szabad dopamin keletkezik, azonban a dopamin oxigén jelenlétében, főleg lúgos közegben tovább alakul különböző molekulákká. Ezen folyamat különböző kémiai lépései a 26. a ábrán láthatóak. A degradátumok kémiai szerkezetének igazolására tömegspektrometriás analízist végeztünk (26. b ábra). A tömegspektrometriás analízisek alátámasztják a 26. a ábrán látható kémiai degradátumok kémiai szerkezetét, amelyek nagy hasonlóságot mutatnak az irodalomban megtalálható eredményekkel [123–126].

A pontos kinetikai leíráshoz meg kell határoznunk a degradálódott és szabad dopamin koncentrációját egyaránt.

Ebben az esetben az anyagmérleg a következő módon írható fel: a kezdeti, konjugátumra kötött dopamin koncentrációját jelöljük  $c^{0}_{PD}$ -vel, míg a leszakadás során egy adott t időpillanatban a konjugátumon maradt dopamint  $c_{PD}$ -vel. Egy adott t időpillanatban a leszakadt szabad dopamin koncentrációjának jelöléséhez vezessük be a  $c_{D}$  jelölést. Mivel a dopamin degradálódik, ezért ez az érték a degradáció miatt elbomlott dopamint nem tartalmazza. Az elbomlott dopamin koncentráióját egy t időpillanatban jelöljük  $c_{d}$ -vel. Ez alapján a teljes anyagmérleg állandó térfogat esetén, az alábbi módon írható fel:

$$V_{DP}c_{PD}^{o} = V_{S}\left(c_{PD} + c_{D} + c_{d}\right) \tag{6}$$

,ahol a V<sub>DP</sub> jelöli a konjugátum, míg a V<sub>s</sub> a folyadék fázis térfogatát. Mivel a szabad dopamin degradálódik az adott reakciókörülmények mellett (26. a ábra), ezért a szabad dopamin koncentrációjának meghatározásához meg kell határoznunk a bomlás kinetikáját. Ehhez egy külön kísérletben tiszta dopamint oldottam fel a leszakadási

reakcióban is használt PBS-ben és 280 nm-n mértem az oldat elnyelésének a változását (26. c ábra).



26. ábra: (a) Dopamin átalakulása melanin származékokká [123, 126], (b) a degradációs termékek tömegspektruma és (c) a dopamin degradációjának kinetikája. Az egyenes illesztés a legkisebb négyzetek módszerével történt. A zöld vonalak a 95%-s konfidencia, míg a kék vonalak a 95%-s jóslási sávok határait jelölik.

Amint az a 26. c ábrán is megfigyelhető a dopamin koncentrációja a degradáció során lineárisan csökken az idő előre haladtával, ami arra utal, hogy a reakció 0-d rendű kinetika szerint játszódik le. Az egyenes meredeksége megadja a reakció konstanst (k<sub>d</sub>):

$$-\frac{dc_D}{dt} = \frac{dc_d}{dt} = 0.0888 \ mmol \ / \ L \cdot h \tag{7}$$

A 7. egyenlet mutatja, hogy a dopamin jelentős része degradálódik és lehetővé teszi, hogy meghatározzuk a dopamin koncentrációjának ( $c_D$ ) időbeli csökkenését. Ez alapján az összes felszabadult dopamin koncentrációja ( $c_T$ ) a következőképpen írható fel:

$$c_{T} = \frac{V_{DP}}{V_{S}} c_{PD}^{o} - c_{PD} = (c_{D} + c_{d}) = (c_{D} + k_{d}t)$$
(8)

A 27. ábra mutatja a szabad ( $c_D$ ) illetve összes dopamin ( $c_T$ ) leszakadásának időfüggését különböző reakció közegekben, a PSI-DA illetve a PSI-DA-AE konjugátumok esetében.



27. ábra: A szabad dopamin ( $c_D$ , bal oldali grafikonok) és az összes leszakadt dopamin ( $c_T$ , jobb oldali grafikonok) koncentrációjának idő függése a GF=1 (a), GF=4 (b), DA-AE 1:1 (c) illetve a DA-AE 1-2 minták esetében különböző reakció közegekben (fekete: PBS, piros: bromelain, kék:  $\alpha$ -Kimotripszin).

Az eredményekből látható, hogy minden minta esetében az enzimek jelenléte megnövelte mind a szabad, mind pedig az összes leszakadt dopamin koncentrációját. A 27. ábrán az is megfigyelhető, hogy szinte minden konjugátum esetében (kivéve PSI-DA-AE 1-1) az α-Kimotripszin nagyobb enzimaktivitást mutatott, mint a amelyhez hasonló eredményt találhatunk bromelain, az irodalomban poli(etilén-glikol)-dopamin konjugátumok esetében [127]. Az eredmények alapján elmondható, hogy a leszakadt dopamin mennyisége jóval nagyobb, ha a konjugátumon lévő dopamin mennyisége magasabb (27. a ábra összehasonlítása a b, c, illetve d ábrával). A dopamin degradációja nagymértékben csökkenti az aktuális időpontban a szabad dopamin mennyiségét (bal és jobb grafikonok összehasonlítása) amely az idő előre haladtával egyre jelentősebb. A magasabb oldhatóság (PSI-DA-AE minták) megnöveli a leszakadt dopamin mennyiségét a reakció kezdeti szakaszában. A leszakadt dopamin a polimer konjugátumon lévő dopamin 15-25 %-a, attól függően, hogy melyik polimerről és milyen körülményről beszélünk.

# 4.1.3.2 Dopamin leszakadási kinetika rendűségének meghatározása a PSI-DA-AE minták esetében

Mivel a leszakadás kinetikáját a reakció rendűsége határozza meg ezért a pontos kinetikai lesíráshoz meg kell határoznunk a dopamin leszakadási kinetikájának a rendűségét. Ehhez először megvizsgáltuk a dopamin leszakadásának időfüggését a jól oldható, PSI-DA-AE minták esetében. A reakció sebessége (*v*) megadható a polimerre

kötött dopamin koncentrációjának (c<sub>PD</sub>) a csökkenésével vagy a leszakadt dopamin (c<sub>T</sub>) időbeli növekedésével. Ez alapján a következő egyenletet írhatjuk fel:

$$v = -\frac{dc_{PD}}{dt} = \frac{dc_T}{dt}$$
(9)

Ha figyelembe vesszük, hogy a reakció abban az esetben történik, ha a reaktánsok és a konjugátumok egy fázisban vannak és találkoznak, akkor a sebességi egyenlet (9. egyenlet) általánosságban a következő formában írható:

$$v = -\frac{dc_{PD}}{dt} = kc_{PD}^{n}c_{X}^{m},$$
(10)

ahol k a reakciókonstans, n és m a reakció részrendjét mutatják,  $c_X$  pedig a reaktáns (OH<sup>-</sup> ionok) koncentrációját mutatja. Mivel a puffert nagy mennyiségben alkalmazzuk a konjugátumhoz képest és az enzimek koncentrációja sem változik az időben, ezért az egyenlet a következő formára egyszerűsíthető:

$$v = -\frac{dc_{PD}}{dt} = k_n c_{PD}^n,\tag{11}$$

ahol  $k_n$  az n-d rendű reakció reakciókonstansa, amely már magába foglalj a  $c_X^m$  koncentráció állandó értékét is. A  $c_{PD}$  helyett használhatjuk a leszakadt dopamin koncentrációját ( $c_T$ ) amelyet kifejezhetünk a 8. egyenlet alapján. Ezután a 11. egyenlet a következő alakban írható fel:

$$v = \frac{dc_T}{dt} = k_n \left(\frac{V_{DP}}{V_S} c_{PD}^o - c_T\right)^n$$
(12)

Abban a speciális esetben, ha a reakció elsőrendű, akkor a v reakció sebesség egyenesen arányos a  $c_T$ -vel. A reakció rendűségét a 12. egyenlet szerint  $c_T$  idő szerinti deriváltja adja meg, amely közelíthető a  $c_T$  differenciálhányadosával:

$$v = \frac{dc_T}{dt} \simeq \frac{\Delta c_T}{\Delta t}, \qquad (13)$$

minden idő intervallumon a  $\Delta c_T / \Delta t$  megadható a c<sub>T</sub>-t görbe érintőjével. A differenciálhányadost a  $\Delta t$  időintervallumok közötti koncentrációk különbségéhez tartozó egyenesek meredeksége adja meg. A 28. ábra mutatja a 13. egyenlet által meghatározott reakciósebesség függését a leszakadt dopamin koncentrációjának függvényében.



28. ábra: A reakciósebesség (c<sub>T</sub>) függése a leszakadt dopamin koncentrációjától (c<sub>T</sub>). Az egyenes illesztés a legkisebb négyzetek módszerével történt. A zöld vonalak a 95%-s konfidencia, míg a kék vonalak a 95%-s jóslási sávok határait jelölik.

A 28. ábra mutatja, hogy a nagy szórás értékek ellenére a reakciósebesség lineárisan függ a leszakadt dopamin koncentrációjától. Ez alapján megállapítható, hogy a dopamin leszakadás elsőrendű kinetika szerint játszódik le. Ezt figyelembe véve a 12. egyenlet a következő formában írható fel:

$$v = \frac{dc_T}{dt} = k_1 \left( \frac{V_{DP}}{V_S} c_{PD}^o - c_T \right)$$
(14)

A 28. ábrán látható piros egyenesek meredeksége megadja a reakciósebességi állandókat (k<sub>1</sub>), a tengelymetszetek pedig a  $b = k_1 \frac{V_{DP}}{V_S} c_{PD}^{o}$  értékkel egyenlők. Az

általunk használt mérési beállítás esetében a  $V_{DP}/V_S = 1.26 \cdot 10^{-3}$ , míg a  $\frac{V_{DP}}{V_S}c_{PD}^o = 6.04$ 

mmol/L-el volt egyenlő. A reakciósebességi konstansok a 10. táblázatban láthatóak. Megjegyezendő, hogy a  $V_{DP}/V_S$  érték kicsi, hiszen a bemért konjugátum mennyisége elhanyagolható a reakcióban használt puffer, illetve enzim oldatok mennyiségéhez képest. A  $c_{PD}^{o}$  értékek az 1. táblázatban láthatóak.

Ahhoz, hogy összehasonlítsuk a mintákat egymással és megállapítsuk a leszakadás kinetika jóságát, meghatároztuk a felezési időket ( $t_{1/2}$ ), amely jelen esetben azt az időt jelenti, ami ahhoz szükséges, hogy a konjugátumra kötött dopamin

mennyisége a felére csökkenjen. Mivel elsőrendű kinetika esetében a felezési idő független a kiindulási koncentrációtól ezért az alábbi egyenlettel írható fel:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1}$$
(15)

Ezen értékek a reakciókinetika konstanssal együtt a 10. táblázatban láthatóak.

10. táblázat: A homogén körülmények között lejátszódó dopamin leszakadási reakció reakciósebességi konstansa, illetve a felezési ideje.

-	ě	
Minta neve	$k_1 [h^{-1}]$	$t_{1/2}[h]$
DA-AE 1:1 PBS	<i>0,104±0,033</i>	6,6±0,10
DA-AE 1:1 Bromelain	0,159±0,012	4,3±0,11
DA-AE 1:1 α-Kimotripszin	0,144±0,011	4,8±0,12
DA-AE 1:2 PBS	<i>0,132±0,025</i>	5,3±0,08
DA-AE 1:2 Bromelain	<i>0,139±0,017</i>	5,0±0,09
DA-AE 1:2 α-Kimotripszin	$0.142{\pm}0.024$	4.9±0,08

Ahhoz hogy meghatározzuk a leszakadt dopamin koncentrációját egy adott időpillanatban a 14. homogén differenciál egyenletet kell megoldanunk, amelynek megoldása a következő formában írható:

$$c_{T}(t) = \frac{V_{PD}}{V_{S}} c_{PD}^{o} \left[1 - \exp(-k_{1}t)\right]$$
(16)

A 29. ábra a mért és a 16. egyenlet alapján számolt adatok korrelációját mutatja. A számolásokhoz a 10. táblázatban található reakciókinetikai konstansokat használtuk.



29. ábra: A mért és elméleti adatok összehasonlítása homogén dopamin leszakadás esetében. A piros görbe a 16. egyenlet alapján lett meghatározva.

29. ábra alapján elmondható, hogy a mérési bizonytalanság határain belül a 16. egyenlet jól leírja a dopamin leszakadásának kinetikáját.

# 4.1.3.3 Dopamin leszakadás kinetikájának leírása rossz vízoldhatósággal rendelkező polimereknél

Mivel a PSI-DA konjugátumok oldhatósága függ az időtől, így a dopamin leszakadási kinetikáját két, egymás után következő lépés szabhatja meg:

- 1. A konjugátum beoldódása a szilárd fázisból a folyadék fázisba
- 2. A dopamin leszakadása az oldat fázisban,

Míg az első lépés sebessége főleg a fizikai paraméterektől (reagens áram, viszkozitás, diffúzivitás) függ, addig a második lépést inkább a konjugátum kémiai összetétele és a reakciókörülmények határozzák meg. Így a pontos kinetikai leíráshoz mindkét lépést külön-külön kell megvizsgálnunk.

# 4.1.3.3.1 A PSI-DA konjugátumok oldódási kinetikája

A kinetika leírásánál azt az esetet vizsgáljuk, amikor a komponens egy szilárd felületen koncentrálódik. Ebben az esetben, ha a diffúzió hajtóereje a koncentráció gradiens, akkor a diffúzió x irányban játszódik le, merőlegesen a felületre. A hatóanyag oldhatóság kinetikájának leírására különböző formulákból több elmélet is rendelkezésre áll [128, 129]. Az általunk szintetizált konjugátumok esetében a kinetika leírásához a fizikai-kémiai mennyiségeket tartalmazó Higuchi elméletet használtuk, amely rosszul oldódó hatóanyag kioldódás kinetikájának leírására használható különböző mátrixok esetében [128]. Az oldhatóság kinetika sík, szilárd felületről az alábbi egyenlettel adható meg [130, 131]:

$$c_T = K_H \cdot t^{1/2}$$
 (17)

ahol K<sub>H</sub> a Higuchi konstans. Amennyiben a hatóanyag oldhatósága sokkal nagyobb, mint a konjugátumon lévő kezdeti koncentráció ( $c_{PD}^{o} << c_{PD}^{s}$ ) a Higuchi konstans az alábbi formában adható meg [130, 131]:

$$K_{H} = \frac{A_{s}}{V} \sqrt{2 \cdot D_{PD} \cdot c_{PD}^{o} \cdot c_{PD}^{s}}, \qquad (18)$$

ahol A<sub>s</sub> a szilárd konjugátum felületét, V pedig a kioldó közeg térfogatát jelöli. D<sub>PD</sub> a konjugátum diffúziós együtthatója, míg a  $c_{PD}^{o}$  és  $c_{PD}^{s}$  a hatóanyag kezdeti koncentrációját a szilárd hordozóban illetve a konjugátum telítési koncentrációját a folyadék fázisban jelöli. A Higuchi konstans meghatározásához a 23. b ábrán látható oldhatóság kinetikai adatokat használtuk fel, és a kezdeti szakasz meredekségéből határoztuk meg. A GF=1 minta esetében az oldhatóság kinetika kezdeti szakaszában, míg a GF=4 minta esetében a teljes mérési tartományban a koncentráció változás egyenesen arányos az idő négyzetgyökével (23. b ábra), amely alátámasztja a Higuchi kinetika használatát. A Higuchi paraméterek a 11. táblázatban láthatóak.

0 1					
Minta neve	$D_{PD} (10^{12} * m^2/s)$	$c^{o}_{PD}$ (mmol/L)	$c_{PD}^{s}$ (mmol/L)	$K_{H}_{(mmol*L*h^{-})}$	
GF=1/víz	2,25	4800	0,72	0,473	
GF=4 /víz	0,92	2230	0,61	0,141	

11. táblázat: Higuchi paraméterek a PSI-DA minták esetében

A  $D_{PD} \cdot c_{PD}^{o} \cdot c_{PD}^{s}$  értékek és a Higuchi konstans között jó egyezés figyelhető meg: minél nagyobb a  $D_{PD} \cdot c_{PD}^{o} \cdot c_{PD}^{s}$  értéke annál nagyobb a Higuchi konstans is.

Az összehasonlításhoz ismét határozzuk meg a felezési időt (t<sub>1/2</sub>), amely ez esetben azt az időt jelenti, amíg a szilárd konjugátum fele beoldódik a folyadék fázisba. Amennyiben M<sub>PD</sub> mennyiségű konjugátum található V<sub>PD</sub> térfogatban a kezdeti koncentráció az alábbi formában írható fel:  $c_{PD}^{o} = M_{PD} / V_{PD}$ . Amikor a konjugátum fele beoldódik a folyadék fázisba, akkor az oldott konjugátum koncentrációja a  $c_{PD}^{o} \cdot V_{PD} / 2V_{s}$  összefüggéssel adható meg, ahol a V<sub>s</sub> a folyadék térfogata. Amikor az oldott konjugátum koncentrációja eléri ezt az értéket, az alábbi egyenletet írhatjuk fel:

$$c_{PD}^{o} \frac{V_{PD}}{2V_{S}} = K_{H} t_{1/2}^{1/2}$$
(19)

ahonnan a felezési idő az alábbiakban fejezhető ki:

$$t_{1/2} = \frac{1}{4K_H^2} \left( c_{PD}^o \frac{V_{PD}}{2V_S} \right)^2$$
(20)

A kísérleteink során a  $V_{DP}/V_S = 1.26 \cdot 10^{-3}$  értéke konstans volt. A GF=1 minta esetében a  $c_{PD}^{o} = 4800 \text{ mmol}/L$ , a  $K_H = 0.473 \text{ mmol} \cdot L \cdot h^{-1/2}$ , míg a felezési idő  $t_{1/2} = 40$  órának adódott. A GF=4 minta esetében a felezési idő több mint a duplája  $t_{1/2} = 99.2$  óra, amely eredmény jó korrelációt mutat a 23. ábrán látható eredményekkel.

#### 4.1.3.3.2 Diffúzióval kapcsolt dopamin leszakadás kinetikájának leírása

Mivel a PSI-DA minták esetében az oldott konjugátum koncentrációja függ az időtől és a dopamin leszakadása az oldat fázisban lévő konjugátumról történik meg, ezért a leszakadt dopamin koncentrációjának időfüggése az alábbi differenciál egyenlettel adható meg:

$$\frac{dc_{PD}}{dt} = \frac{dc_{PD}}{dt} \bigg|_{diff} - \frac{dc_{PD}}{dt} \bigg|_{kem.}$$
(21)

A 9. egyenlet segítségével a 21. egyenlet az alábbi formában írható:

$$\frac{dc_T}{dt} = \frac{dc_T}{dt} \bigg|_{diff} - \frac{dc_T}{dt} \bigg|_{kem.}$$
(22)

A kinetika leírásánál a konjugátum oldódását a már előzőekben igazolt Higuchi oldhatósági kinetikával  $\left(\frac{dc_T}{dt}\Big|_{diffúzió}\right)$ , míg a dopamin leszakadást  $\left(\frac{dc_T}{dt}\Big|_{kem.}\right)$  elsőrendű kinetika szerint vesszük figyelembe. A Higuchi elmélet szerint a diffúzió általi c<sub>T</sub> időfüggő növekedése az alábbi egyenlet szerint adható meg:

$$\left. \frac{dc_T}{dt} \right|_{diff} = \frac{1}{2c_T} K_H^2$$
(23)

A teljes reakciósebesség a két különálló folyamatot figyelembe véve az alábbiak szerint írhatjuk fel:

$$v = \frac{dc_T}{dt} = \frac{K_H^2}{2c_T} - k_r c_T$$
(24)

ahol  $k_r$  az elsőrendű reakció kinetikai konstansa. Ezek alapján a 23. egyenlet megoldásával megkapjuk a leszakadt dopamin koncentrációjának időfüggését:

$$c_{T}(t) = \frac{K_{H}}{\sqrt{2k_{r}}} \left\{ 1 - \exp\left[-2k_{r}t\right] \right\}^{1/2}$$
(25)

Amennyiben végtelen időre írjuk fel a 25. egyenletet, akkor a koncentráció időfüggő részét elhanyagolhatjuk és az alábbi formába írható:

$$c_T \left( t \to \infty \right) = c_T^{\infty} = \frac{K_H}{\sqrt{2k_r}}$$
(26)

Ez alapján c<sub>T</sub> az alábbi formában fejezhető ki végtelen hosszú vizsgálati idő esetén:

$$c_T = c_T^{\infty} \left\{ 1 - \exp[-2k_r t] \right\}^{1/2}$$
(27)

A 27. egyenletet átrendezve az alábbi egyenletet kapjuk:

$$\ln\left[1 - \left(\frac{c_T}{c_T^{\infty}}\right)^2\right] = -2k_r t$$
(28)

A 28. egyenlet igazolására a leszakadás kinetikai adatokat ábrázoltuk a 30. ábrán. Fontos megemlíteni, hogy az egyenlet a mérések középső, körülbelül 5 óra utáni szakaszára lett illesztve, ugyanis a mintavételezés hibát okoz a kezdeti szakaszban, mint az a 30. ábrán is látható.



30. ábra: A dopamin leszakadás kinetikája rosszul oldódó konjugátumok esetében a 28. egyenlet szerint. Az egyenes illesztés a legkisebb négyzetek módszerével történt. A zöld vonalak a 95%-s konfidencia, míg a kék vonalak a 95%-s jóslási sávok határait jelölik.

A 30. ábrán látható egyenesek egyenlete megadja a  $-2k_r$  értéket, amennyiben hosszú távú leszakadási kinetikáról beszélünk, amiből a  $k_r$  már könnyedén meghatározható. A 12. táblázatban láthatóak a leszakadt dopamin telítési koncentrációja, illetve a reakciókinetikai konstansok.

12.	táblázat:	A	leszakadt dopamin	telítési	koncent	trációja	illetve	a real	kcióki	netikai
				konste	ansok					

Minta neve	$c_T^{\infty}$ (mmol/L)	$k_r(h^{-1})$
GF=1 PBS	0,95	0,020±0,002
GF=1 Bromelain	1,06	0,03±0,002
GF=1 a-Kimotripszin	1,32	0,054±0,010
GF=4 PBS	0,575	0,025±0,005
GF=4 Bromelain	0,79	0,045±0,005
GF=4 a-Kimotripszin	0,8	0,05±0,007

Fontos megemlíteni, hogy amennyiben nagyon gyors reakciót vagy nagyon rövid időket veszünk figyelembe a 25. egyenletben az exponenciális részt helyettesíthetjük az egyenlet 2. rendű sorba fejtésével és ebben az esetben a Higuchi féle kinetikát kapjuk vissza.

$$c_T(t \to 0) \simeq \frac{K_H}{\sqrt{2k_r}} \{1 - 1 - 2k_r t\}^{1/2} \to K_H t^{1/2}$$
(29)

Ha tiszta diffúziót veszünk figyelembe  $(k_r \rightarrow 0)$  szintén visszakapjuk a tiszta diffúzió által meghatározott felezési időt (20. egyenlet).

# 4.2 Dopaminnal módosított poli(aszpartamid) konjugátumok formulázása elektrosztatikus szálhúzás segítségével

Az előző fejezetben bemutatott konjugátumokat elektrosztatikus szálképzés segítségével formuláztuk. Ehhez a 3.6 fejezetben bemutatott készüléket illetve beállításokat használtuk. A formulázott, szálas konjugátumokkal kapcsolatos vizsgálatok során bemutatom a szálak morfológiáját illetve átmérőjét, amelyet különböző mikroszkópiás eljárásokkal határoztunk meg. Emellett ismertetem a formulázás hatását a konjugátumok oldhatóság kinetikájára illetve a dopamin leszakadás kinetikájára. Emellett ismertetem a konjugátumok modell membrán segítségével vizsgált permeációs tulajdonságait illetve humán PDL őssejtekre kifejtett hatásait.

# 4.2.1 Elektrosztatikus szálhúzással előállított konjugátumok mikroszkópos vizsgálata

Ahhoz hogy a szálak méreteloszlását, morfológiáját, felületét illetve egyéb tulajdonságait (pl.: autofloureszcencia) meghatározzuk, az elektrosztatikus szálképzéssel előállított mintákat pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM), atomerő mikroszkópiával (AFM), illetve kétfoton mikroszkópiával vizsgáltuk.

### 4.2.1.1 PSI-DA GF=1 minta mikroszkópos vizsgálata

Az elektrosztatikus szálhúzással különböző körülményeken (lásd 3. táblázat) előállított PSI-DA GF=1 mintáról különböző mikroszkópiás technikával készült felvételek, illetve a szálak méreteloszlása a 31. ábrán látható.



31. ábra: DMF-EtOH 1:1 (a és b) illetve DMF-EtOH-THF 2:1:1 (c és d) elegyéből elektromos szálhúzással készített PSI-DA GF=1 minták SEM felvételei. A DMF-EtOH-THF 2:1:1 elegyéből előállított szálak két foton (e), AFM (f) felvételei illetve a c) ábra alapján meghatározott szálátmérő eloszlás (g).

A 31. ábrán látható SEM felvételek jól mutatják a különbséget a kétféle oldószer keverékből előállított PDI-DA GF=1 szálak között. DMF-EtOH 1:1 arányú keverék esetén az elektrosztatikus szálképzés során a polimer oldat pulzálva jutott a tű hegyére és nem sikerült homogén szálképzéshez körülményeket kialakítani. Ennek következtében a folyamat során sok folyadék csepp repült át a földelt szálgyűjtőre, ami elfolyósodott, amorf szálakhoz vezetett (31. b ábra). Ezen kívül látható hogy a szálak felszíne töredezett (31. a ábra, jobb oldali szál). Azonban, ha az oldószer elegyet DMF-

EtOH-THF 2:1:1 arányú keverékére cseréltük a polimer oldat egyenletes térfogatárammal jutott a tű hegyére, így sikerült a szálképzéshez megfelelő körülményeket teremteni. Látható, hogy az így előállított szálas rendszer homogén, illetve a SEM és AFM képek (31. c, d és f ábra) alapján elmondható, hogy a szálak sima felülettel rendelkeznek. A szálas rendszerről készült két foton kép (31. e ábra) a szálak autofloureszcenciáját mutatja. A SEM képek alapján végzett átmérő analízis alapján (31. g ábra) a szálak átlagos átmérője 78±15nm-nek adódott.

# 4.2.1.2 PSI-DA GF=4 minta mikroszkópos vizsgálata

Az elektrosztatikus szálhúzással különböző körülményeken (lásd 3. táblázat) előállított PSI-DA GF=4 mintáról különböző mikroszkópiás technikával készült felvételek illetve a szálak méreteloszlása a 32. ábrán látható.

A 32. ábra SEM felvételei jól mutatják a különbséget a kétféle oldószerből előállított PSI-DA GF=4 szálak között. A nagyobb nagyítású felvételeken (32. a és c ábra) lényegi különbség nem látható a szálak szerkezetében, azonban a kisebb nagyításnál (32. b és d ábra) jól megfigyelhető, hogy DMF esetében a szálakon gömb illetve fánk alakú elváltozások jelentek meg. Ezzel ellentétben a DMF-THF 4:1 arányú elegy esetében a szálak hibahelyektől mentesek és homogének. Az is megfigyelhető, hogy az oldószer elegy használatával a szálak átmérője egy kicsit megnőtt, azonban a további vizsgálatokhoz a DMF-THF 4:1 arányú előállított mintákat használtuk, mivel ezek makroszkópikusan jobban kezelhetőek voltak. A két foton mikroszkópos felvételen (32. e ábra) látható a szálak autofloureszcens tulajdonsága ugyanúgy, mint a GF=1 minta esetében. Az AFM (32. f ábra) és SEM képek alapján elmondható, hogy a szálak sima felülettel rendelkeznek. A SEM képek alapján végzett átmérő analízis alapján (32. g ábra) a szálak átlagos átmérője 613  $\pm$  172 nm-nek adódott, ami jóval nagyobb érték, mint a GF=1-s minta esetében.



32. ábra: DMF (a és b) illetve DMF-THF 4:1 (c és d) elegyéből elektromos szálhúzással készített PSI-DA GF=4 minták SEM felvételei. A DMF- THF 4:1 elegyéből előállított szálak két foton (e), AFM (f) felvételei illetve a d) ábra alapján meghatározott szálátmérő eloszlás (g).

# 4.2.1.3 PSI-DA-AE 1:2 minta mikroszkópos vizsgálata

Az elektrosztatikus szálhúzással előállított PSI-DA-AE 1:2 szálakról készült különböző mikroszkópiás felvételek, illetve a szálak méreteloszlása a 33. ábrán látható.

A 33. a ábrán megfigyelhető a szálakon kisebb repedések, törések, amik a szálak törékeny jellegét mutatják. A 33. b ábrán látható, hogy 4 nap után a szálak összeolvadtak és az átmérőjük inhomogénné vált. Ez a változás annak lehet a következménye, hogy az oldalláncokon lévő –OH csoportok miatt a szálak megkötik a levegőben lévő nedvességet. A két foton mikroszkópos felvétel (33. c ábra) jól mutatja a szálak autofloureszcens tulajdonságát, míg az AFM felvétel (33. d ábra) alapján megállapítható a szálak sima felülete. A szálak méreteloszlásának vizsgálata alapján (33. e ábra) az átlagos szálátmérő 431 ± 46nm-nek adódott.



33. ábra: PSI-DA-AE 1:2 szálas minták SEM felvételei egyből a szálképzés (a) illetve 4 nappal a szálképzés (b) után. A szálakról készült két foton (c), AFM felvétel (d) illetve az a) ábra alapján készült szálátmérő eloszlás (e).

A 13. táblázat tartalmazza a szálak átlagos átmérőjét illetve az elektrosztatikus szálképzésnél használt oldatok felületi feszültségét.

	GF=1	GF=4	DA-AE 1:2
Átlagos szálátmérő (nm)	78±15	<i>613</i> ± <i>172</i>	431±46
Felületi feszültésg (mN/m)	26,7	31,6	46,7

13. táblázat: A szálak átlagos átmérője illetve az elektrosztatikus szálképzés során használt oldatok felületi feszültsége

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

Mivel a különböző szálak előállításához különböző oldószereket illetve oldószer elegyeket használtunk, ezért nehéz kapcsolatot találni a felületi feszültség és a szálátmérő között. Azonban megfigyelhető, hogy a szerves oldószer elegyek esetében (GF=1 és 4) a felületi feszültség növekedésével megnő a szálak átlagos átmérője is. A DA-AE 1:2 esetében a szálak előállítása tiszta vízből történt, ezért a szálátmérő kisebb lett, mint a GF=4-s minta esetében annak ellenére, hogy a felületi feszültség nagyobb. Azonban megfigyelhető, hogy a módosítás mértéke és az oldalláncok kémiai összetétele is befolyásolják a szálak átmérőjét. Fontos kiemelni, hogy más paraméterek is, mint az oldószerek illékonysága, illetve az oldatok viszkozitása is nagy hatással lehet a kialakult szálak átmérőjére.

# 4.2.2 PSI-DA és PSI-DA-AE konjugátumokból elektrosztatikus szálhúzással készített nanoszálas rendszerek kémiai szerkezetének vizsgálata FTIR-ATR spektroszkópiával

Annak igazolására, hogy a polimer konjugátumok nem szenvednek semmilyen kémiai változást az elektromos szálhúzás alatt, megvizsgáltuk a szálak kémiai szerkezetét FTIR-ATR spektroszkópiával. A por és szálas polimerek FTIR spektrumai a 34. ábrán láthatóak.



34. ábra: Az elektrosztatikus szálhúzással előállított (szaggatott vonal) illetve a kiindulásként használt por állagú minták (teljes vonal) FTIR spektruma (a) és a 0-2000 hullámszám között kinagyított rész (b).

Amint azt a 34. ábra mutatja, az elektrosztatikus szálképzés hatására nem történt változás a polimer konjugátumok illetve a PSI kémiai szerkezetében. Ha
összehasonlítjuk a szálas (szaggatott vonal) illetve por állagú mintákat (teljes vonal) azonos karakterisztikus csúcsok figyelhetők meg. Ezen karakterisztikus csúcsok megegyeznek a 4.1.1.1 fejezetben leírtakkal: a dopamin illetve az aminoetanol –OH csoportjára jellemző csúcs 3270 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál, az amid kötésre jellemző csúcsok 1660 cm<sup>-1</sup> illetve 1540 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál míg az imid gyűrűre jellemző csúcsok 1700 cm<sup>-1</sup>, 1390 cm<sup>-1</sup> illetve 1160 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál jelennek meg. Mindemellett megfigyelhető, hogy az imid gyűrűre jellemző csúcsok intenzitása nagyobb a GF=4-es minta esetében, ami igazolja a kisebb mértékű módosítást. Az aminoetanol –CH<sub>2</sub> csoportjára jellemző aszimmetrikus rezgési csúcs 2922 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál, míg a szimmetrikus rezgési csúcs 2825 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál látható.

# 4.2.3 Elektrosztatikus szálképzéssel előállított konjugátumok oldhatóságának vizsgálata PBS-ben

Mivel a DA-AE 1:2 konjugátum por formában szinte korlátlanul és pillanatszerűen oldódik vízben, így a szálas konjugátum oldhatósága sem tér el ettől. A GF=1 és 4-s szálas minta oldhatóságának időfüggése PBS-ben a 35. ábrán látható.



35. ábra: A szálas PSI-DA GF=1 (fekete négyszög) és GF=4 (kék háromszög) PBS-ben való oldhatóságának függése az időtől (a) és az idő négyzetgyökétől (b).

Mivel a PSI-DA GF=1 és GF=4 szálas minta oldhatósága PBS-ben függ az időtől, ezért befolyásolja a dopamin leszakadását is a konjugátumról (lásd 4.1.3 fejezet). A 35. b ábrán megfigyelhető, hogy a GF=1 és GF=4–s minta oldhatósága az első 10 órában az idő négyzetgyökével közel lineárisan változik (35. b ábra, kinagyított grafikon). 10 óra elteltével a GF=4-s minta koncentrációja ugrásszerűen megemelkedik, ami a szabad szukcinimid gyűrűk hidrolízisére utal. Emellett 26 óra elteltével mindkét minta esetében látható egy ugrásszerű növekedés, ami a szálak szerkezetének

meglazulására, esetleges szétesésére enged következtetni. Mivel a GF=1-s minta esetében nincsenek a polimer konjugátumon szabad szukcinimid gyűrűk ezért a koncentráció függése az idő négyzetgyökétől lineárisan függ az első 26 órában.

## 4.2.4 Dopamin leszakadási kinetikájának vizsgálata GF=1 és GF=4 szálas minták esetében PBS és α-Kimotripszin jelenlétében

Mivel a dopamin leszakadásának kinetikáját jelentősen meghatározza a konjugátumok oldhatósága, illetve oldhatóság kinetikája, ezért a 3.5.3 és 4.1.3 fejezetben bemutatott dopamin leszakadási vizsgálatokat elvégeztük a GF=1 és GF=4 szálas konjugátumok esetében is. A szabad, illetve összes leszakadt dopamin koncentráció változásának az időfüggése a GF=1 és GF=4-es minta esetében a 36. ábrán látható.



36. ábra: A szabad dopamin ( $c_D$ , a és c ábra) illetve az összes dopamin ( $c_T$ , b és d ábra) koncentrációjának idő függése a GF=1 (a és b) illetve GF=4 (c és d) szálas konjugátumok esetében különböző közegekben (fekete PBS, kék  $\alpha$ -Kimotripszin/PBS).

Az eredmények alapján megfigyelhető, hogy a dopamin leszakadásának a kinetikája hasonlóan játszódik le (36. ábra), mint a por állagú minták esetében

(27. ábra), azonban jelentős különbségek is megfigyelhetőek. Mindkét típusú (por illetve szálas) konjugátum esetében az enzim jelenlétében jóval nagyobb és gyorsabb leszakadást figyelhetünk meg. Ez igaz függetlenül a konjugátum kémiai összetételétől. A két szálas mintát összehasonlítva látszik, hogy míg PBS-ben a leszakadt dopamin mennyisége között nincs nagymértékű különbség, addig α-Kimotripszin jelenlétében a GF=1-s mintáról sokkal nagyobb mennyiségben és gyorsabban szakad le a dopamin. Az igazán szembetűnő különbség a leszakadási kinetikában a por illetve szálas minták között 30 óránál figyelhető meg. Ekkor a koncentráció hirtelen megemelkedik a szálas minták esetében és nem követi az addigi tendenciát. Ez PBS esetében kisebb léptékű, míg α-Kimotripszin jelenlétében jelentős koncentrációnövekedést okoz. Ezután a leszakadt dopamin koncentrációja minden esetben 35 óra körül éri el a telítési koncentrációt és továbbiakban a dopamin degradációjának ellenére sem változik.

A reakciókinetikai konstansok meghatározásához a 4.1.3.3.2 fejezetben levezetett 28. egyenletet használhatjuk. A 28. egyenlet alapján meghatározott reakciókinetikai adatokat ábrázoltuk az idő függvényében (37. ábra).

Mint az már a 36. ábrán is látható volt, a dopamin a szálas minták esetében két lépcsős kinetikával szakadt le: az első lépcső körülbelül 26 óráig tartott, amikor is a szálas rendszer makroszkópikusan szétesett és emiatt a leszakadt dopamin koncentrációja hirtelen megemelkedett. Ez az ugrás a PBS-ben a GF=1 minta esetében azonban olyan kismértékű volt, hogy a 28. egyenletből a reakció kinetikai konstans egyszerűen meghatározható volt (37. a és b ábra).



37. ábra: A dopamin leszakadás kinetikája GF=1 (a,c és d) és GF=4 (b, d és f) szálas konjugátumok esetében a 28. egyenlet szerint. Az egyenes illesztés a legkisebb négyzetek módszerével történt. A zöld vonalak a 95%-s konfidencia, míg a kék vonalak a jóslási sávok határait jelölik.

α-Kimotripszin esetében a szálak hirtelen feloldódása két szakaszra osztja a dopamin leszakadási kinetikájának a leírását, ami szépen megfigyelhető a 37. c és d ábra. A két lépcsős leírás esetében a telítési koncentrációként ( $c_T^{\infty}$ ) az 50 óra utáni telítési koncentrációt használtuk. Ez alapján a két szakaszra illesztett egyenes meredeksége nagymértékben eltér egymástól és megfigyelhető, hogy a reakciókinetikai konstans értéke nagymértékben megnő a szálas konjugátum feloldódása után (14. táblázat). Amennyiben csak az első lépcsőt vesszük figyelembe, meghatározhatjuk a reakciókinetikai konstanst csak erre a lépésre (37. e és f ábra). Ebben az esetben telítési koncentrációnak az első lépcső telítési koncentrációját vettük figyelembe. A reakciókinetikai konstansokat illetve a számolásokhoz használt telítési koncentrációkat a 14. táblázat tartalmazza.

Közeg	PBS		α-Kimotripszin					
Minta	CE 1	GF=4	GF=1		GF=4		GF=1	GF=4
neve	GF=1		két lépcsős		két lépcsős		1. lépcső	1. lépcső
$c_T^{\infty}$ (mmol/L)	0,47	0,42	1,09		0,82		0,78	0,4
$k_r(h^{-1})$	0,017	0,019	0,014	0,160	0,005	0,10	0,074	0,075

14. táblázat: A telítési koncentrációk illetve a reakciókinetikai konstansok a GF=1 és GF=4 szálas konjugátumok esetében

## 4.2.5 Szálas konjugátumok parallel mesterséges membrán permeábilitási (PAMPA) vizsgálatai

Ahhoz, hogy információhoz jussunk arról, hogy a konjugátumok képesek-e passzív transzporttal átjutni a sejtmembránon, elvégeztük a minták parallel mesterséges membrán permeábilitási (PAMPA) vizsgálatait (metodikai leírás 3.6.6 fejezet). Ennek eredményei a 38. ábrán láthatóak.



38. ábra: A konjugátumok illetve a szabad dopamin koncentrációja a donor (a) és az akceptor
(b) oldalon 4 és 28 órával a mérés megkezdése után. Ezekből számolt megoszlási hányadosok
(c) illetve a minták elrendezése a 96 lyukú lemezen 4h óra után (d).

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

A 38. ábrán megfigyelhető, hogy a beoldódott konjugátumok illetve a dopamin koncentrációja mindegyik esetben kismértékben megnövekedett 4 óráról 28 órára. Ez a GF=1 és 4-s minta esetében volt a legjelentősebb, amely eredmény egybevág az előzőekben bemutatott oldhatósági és dopamin leszakadási kinetikával egyaránt. Az akceptor oldalon (38. b ábra) minden minta koncentrációja jelentős, 5-szörös mértékben megnövekedett 4 óráról 28 órára. Ez a koncentráció azonban a DA-AE 1:2 illetve a szabad dopamin esetében jóval alacsonyabb az akceptor oldalihoz képest, amíg a GF=1 és GF=4 minta esetében közel azonos koncentrációt jelent. A megoszlási hányadosokat (38. c ábra) figyelembe véve látható, hogy míg a DA-AE 1:2 illetve a szabad dopamin csak nagyon kis mértékben képes átjutni a membránon, addig a GF=1-s minta 20%-a míg a GF=4-s 25%-a jut át az akceptor oldalra (38. c ábra). Ez az eredmény magyarázható a 9. táblázatban található lipofilitási értékekkel, ahol a GF=4-s a leginkább, míg a DA-AE 1:2 a legkevésbé lipofil. A koncentrációkat, illetve a megoszlási hányadosokat a 15. táblázatban foglaltam össze.

Minta neve		Koncer	Megoszlási hányados [%]					
	4 óra	28 óra	4 óra	28 óra	4 óra	28 óra		
	Donor		Akc	eptor	Akceptor Donor arány			
GF=1	0,130	0,273	0,052	0,052	39,6	19,1		
GF=4	0,065	0,249	0,017	0,062	25,3	25,1		
DA-AE 1:2	0,772	0,949	0,011	0,055	1,4	5,8		
DA	1,381	1,434	0,007	0,053	0,5	3,7		

15. táblázat: A PAMPA vizsgálatok eredményei 4, illetve 28 óra után

#### 4.2.6 Konjugátumok in vitro biokompatibilitási és citotoxicitási vizsgálata

A minták citotoxicitási vizsgálatait két lépésben végeztük: az első lépésben megvizsgáltuk a minták citotoxicitásának koncentráció függését, a második lépésben pedig a különböző szálas mintákat vizsgáltuk az első mérés alapján meghatározott koncentráció alapján. Az első lépésben különböző koncentrációban szabad dopamint, illetve azonos mennyiségben a PSI-DA-AE 1:2 konjugátumra kötött dopamint adtunk PDL őssejtekhez. Az első kísérlet eredményei a 39. ábrán láthatóak.

### DOI:10.14753/SE.2019.2213

Az életképességi adatok (39. a ábra) alapján elmondható, hogy kis koncentrációban (1-100 µM) sem a dopamin sem a PSI-DA-AE 1:2 konjugátum nincs káros hatással a sejtek növekedésére. Ugyan a sejtek életképessége kis mértékben lecsökken 1 napról 3 napra, de ez még nem haladja meg a 20%-os csökkenést a kontrollhoz képest. Ezeket az eredményeket a fáziskontraszt képek is alátámasztják (39. b ábra). Tovább növelve a koncentrációt látható, hogy 250 és 500 µM-s koncentrációban a szabad dopamin esetében az életképes sejtek mennyisége a 3. napra nagy mértékben lecsökken, míg a konjugátum esetében a sejtek életképessége az 1. napon azonos a kontrolléval majd a 3. napra közel 40%-al megnő. Ezen eredményeket a fáziskontraszt képek (39. b ábra) is alátámasztják, ahol a dopamin esetében 3. napra nem látható egészséges morfológiájú sejt míg a konjugátum esetében egy konfluens sejtréteg figyelhető meg a tenyésztő edény alján. Nagyobb koncentrációban 750 µM felett az életképes sejtek mennyisége mindkét hatóanyag esetében nagymértékben lecsökken. Azonban, dopamin esetében a fáziskontraszt felvételek egészségtelen morfológiájú, halott morfológiájú sejteket mutatnak, addig a konjugátum esetében kis mennyiségben találhatóak élő, hosszabb nyúlványokkal egymáshoz kapcsolódó sejtek. Ez a fajta morfológia az őssejtek idegi irányú differenciálódására enged következtetni, amely feltevés igazolását további kísérletekben tervezzük.



39. ábra: Relatív életképességi mutatók (a) illetve a lemezek alján lévő sejtekről készült fázis kontraszt mikroszkóp képek (b) 1, illetve 3 nappal a hatóanyagok hozzáadása után különböző koncentrációjú dopamin illetve PSI-DA-AE 1:2 minták esetében. A fáziskontraszt mikroszkóp felvételek ugyanolyan nagyítással készültek.

A második kísérletben a különböző szálas minták citotoxicitását vizsgáltuk PDL őssejteken. A sejtekhez adott szálas minták mennyiségét az előző kísérlet alapján úgy határoztuk meg, hogy a teljes minta beoldódása után se haladja meg a konjugátumra kötött dopamin koncentrációja a 250 µM-t. Az eredmények a 40. ábrán láthatóak.

Az életképességi mutatók alapján elmondható (40. a ábra), hogy a szálas minták jelenlétében az életképes sejtek száma közel hasonló volt, mint a kontroll esetében. A

### DOI:10.14753/SE.2019.2213

PSI-DA-AE 1:2 minta esetében az életképességi mutatók kisebbek voltak, mint a kontroll esetében mért értékek, azonban ez az eltérés még nem mutatja, hogy a minták citotoxikusak lennének. Az értékekből látható, hogy az életképesség mindegyik minta esetében megemelkedett a 3. napra az első naphoz képest. A kétfoton mikroszkópiás felvételeken (40. b, c, d és e ábra), minden minta esetében egészséges, fibroblaszt morfológiájú sejtek láthatóak, hasonlóan a kontrollhoz képest.



40. ábra: PDL őssejtek relatív életképességi mutatója 1. és 3. napon a kiültetést követően a különböző szálas minták jelenlétében (a) illetve a 3. napon a sejtekről készült két foton mikroszkópiás felvételek (b,c,d és e).

### 4.3 Poli(aszparaginsav) és módosított poli(aszparaginsav) alapú gélek alkalmazhatóságának vizsgálata a szövetmérnökség területén

A következő fejezetekben ismertetem azon eredményeket, amelyek a különböző kémiai és fizikai tulajdonságú PASP gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságát igazolják.

# 4.3.1 A módosított poli(aszparaginsav) gélek előállításához használt polimerek kémiai szerkezetének vizsgálata

#### 4.3.1.1 PSI-DA GF=10, 15 és 20 FTIR-ATR vizsgálata

A 4.1.1.1 illetve a 4.1.1.2 fejezetekben már igazoltuk FTIR-ATR, illetve NMR spektroszkópia segítéségével, hogy a PSI sikeresen módosítható dopaminnal, illetve dopamin/aminoetanol keverékével. A módosított poli(aszparaginsav) gélek előállításához kétféle módosító molekulát használtunk: az egyik a már ismertetett dopamin volt (graftolási fok 10, 15 illetve 20), a másik pedig a 3.3.2 fejezetben bemutatott RGD peptid szekvencia volt. Mivel a módosítások mértéke ezen polimerek esetében jóval kisebb volt ezért az FTIR-ATR és <sup>1</sup>H-NMR mérések mellett <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumokkal is igazoltuk a módosítás sikerességét.

A 10-es, 15-ös illetve 20-as graftolási fokú dopaminnal módosított minták FTIR-ATR felvétele a 41. ábrán látható.



41. ábra: A 10-es, 15,-ös illetve 20-as graftolási fokú PSI-DA polimerek FTIR-ATR spektruma.

A kisebb mértékben dopaminnal módosított polimerek FTIR-ATR spektrumában ugyanazok a jellemző csúcsok jelennek meg, amelyeket a 22. ábrán is megfigyelhettünk. A 3604 cm<sup>-1</sup>-nél a láncvégi aszparaginsav hidroxil-csoportjának v<sub>OH</sub> rezgése, míg 2952 cm<sup>-1</sup>-nél a lánc másik végén lévő –CH<sub>3</sub> csoport asszimmetrikus rezgése látható minden spektrum esetében. A módosítatlan imid gyűrűre jellemző csúcsok: 1707 cm<sup>-1</sup>-nél a v<sub>CO</sub> aszimmetrikus, 1384 cm<sup>-1</sup>-nél a C=O csoport delta, mellyel kvázi összeolvadva jelenik meg a C-N  $v_{CN}$  rezgése. A (C=O)–NH csoport vCN rezgése 1207 cm<sup>-1</sup>-nél látható, míg 1160 cm<sup>-1</sup>-nél megjelenő csúcs a (C=O)-NR-(C=O) csoportot mutatja. A dopamin tartalmú minták esetében azonban látható a módosított aszpartamid monomerekre jellemző csúcs 1525 cm<sup>-1</sup>-nél, illetve megfigyelhető, hogy a 3000 cm<sup>-1</sup> feletti csúcs kiszélesedik. Ezekből a módosítás sikerességére következtethetünk.

# 4.3.1.2 PSI-DA és PASP-DA GF=10, 15, 20, illetve PSI-RGD<sub>300</sub> polimerek NMR vizsgálata

A dopaminnal módosított minták <sup>1</sup>H-NMR spektrumai a 42. ábrán láthatóak. Mivel a PASP géleket a PSI gélek lúgos hidrolízisével állítottuk elő, ezért vizsgáltuk a PASP-DA polimerek kémiai szerkezetét is, ezzel igazolva, hogy a dopamin jelen van a polimereken a hidrolízis után is. A PSI-DA minták közül csak a legnagyobb, 10-es graftolási fokú polimer analízisét végeztük el.



42. ábra: PSI-DA GF=10 illetve PASP-DA GF=10, 15 és 20<sup>1</sup>H-NMR spektrumai.

A PSI-DA GF=10-s polimer NMR spketrumán (42. a ábra) a csúcsok ugyanolyan kémiai eltolódásnál találhatóak, mint a kisebb graftolási fokú minták esetében (23. ábra). A dopaminra jellemző csúcsok 6,44-6,61 ppm között (benzil csoport hidrogénjei) illetve 8 ppm felett (katekol csoport –OH csoportjai), míg a szukcinimidre jellemző csúcsok 2,69; 3,19 illetve 5,26 ppm-nél láthatóak. A benzil csoport 6,44 ppm-nél illetve a szukcinimid 5,26 ppm-nél lévő csúcsának arányából megállapítható, hogy az elméleti és valós graftolási fok megegyezik. A PASP-DA polimerek esetén (42. b ábra) a dopaminra jellemző csúcsok 6,6 és 6,8 ppm között ugyanúgy megtalálhatóak, mint a PSI-DA minta esetében. A PSI-hez hasonlóan itt is két helyen, 2,8 és 3,15 ppm-nél jelentkezik a metilén csoport két csúcsa, illetve kis

intenzitással 5,29 ppm-nél megjelenik a monomer gyűrűk kapcsolódási pontjában lévő metin csoport hidrogénjének a jele is. Ebből arra következtethetünk, hogy a poli(aszparaginsav) még mindig tartalmaz szukcinimid gyűrűt. A spektrumokban viszont látható két új csúcs 4,96 és 4,59 ppm-nél, amelyek a felnyílt gyűrűk kapcsolódási pontjában lévő metin csoport hidrogénjének a jelei. A spektrumon jól látható, hogy a felnyílt szukcinimid csúcsok intenzitása a graftolási foknak megfelelően csökken illetve, lúgos hidrolízis után a polimerek tartalmaznak dopamint.

Az RGD-vel módosított, illetve a sima PSI <sup>1</sup>H-NMR spektrumai a 43. ábrán láthatóak. Mivel minden 300. monomer tartalmazott RGD oldalláncot (PSI-RGD<sub>300</sub>), ezért a módosítás sikerességének a bizonyításához az intenzitásokat megnöveltem a spektrumok különböző részein a jobb összehasonlíthatósághoz.

A módosítatlan PSI spektrumában jól láthatóak a 4.1.1.2 fejezetben már bemutatott csúcsok 2,67; 3,21, illetve 5,23 ppm-nél. A kinagyított spektrumokon (43. d és f ábra) a PSI esetében nem láthatóak más, a módosított monomerekre vagy oldalláncokra jellemző csúcsok. Mivel a módosítás mértéke kicsi így a 43. a és b ábra között lényegi különbség nem figyelhető meg csak kis intenzitású csúcsokat láthatunk 0,85-1,5 ppm között, amik a reakcióban használt DBA jelenlétét mutatják. Az RGD-re jellemző csúcsok azonosításához a 43. a ábrán látható spektrumot kinagyítottam 3,5-5, illetve 6,5-9 ppm között. A kinagyított spektrumon (43. c és e ábra) látható a módosított szukcinimid metin csoportjára jellemző csúcs 4,49 ppm-nél. A 3,59; 4,07 és 4,21 pmnél látható csúcsok (43. c ábra) az RGD-ben található szerin illetve aszparaginsav metilén csoportjához tartoznak, míg a módosítatlan PSI spektruma nem tartalmaz ebben a tartományban semmilyen csúcsot. Az RGD-ben található arginin guainidin csoportjára jellemző csúcsok a 43. e ábrán 6,96; 7,1, illetve 7,3 ppm-nél láthatóak. A különböző aminosavak összekapcsolódásánál lévő amid csoportok -- NH hidrogénjeire jellemző csúcsok 8,01; 8,2; 8,5, illetve 8,8 ppm-nél láthatóak a 43. e ábrán. Mivel a PSI ezen tartományokban egyáltalán nem tartalmaz csúcsokat így elmondható, hogy a PSI sikeresen módosítható RGD peptid szekvenciával.



43. ábra: PSI-RGD<sub>300</sub> (a, c és e) illetve a sima PSI (b, d, és f) <sup>1</sup>H-NMR spektruma

Ahhoz hogy igazoljuk, hogy a módosító molekulák kémiai kötéssel kapcsolódnak a polimer lánchoz és nem csak fizikailag vannak jelen, felvettük a PSI, PSI-DA GF=10 illetve a PSI-RGD<sub>300</sub> <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumait (44. ábra). A PSI <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumához (44. a ábra) képest a módosított polimerek esetében (44. b és c ábra) látható új keresztcsúcsok megjelenése, amelyeket piros körökkel jelöltem. Dopaminnal módosított polimer esetében ezek korrelációt mutatnak a szukcinimid metilén és a dopamin benzil (6-6,5 ppm), -OH (8 ppm), illetve -CH<sub>2</sub> (2,5 ppm-nél lévő nagyobb csoport) csoportjaiban lévő hidrogénekkel. PSI-RGD<sub>300</sub> esetén a korreláció az RGD-ben található aminosavak –CH<sub>2</sub> csoportjai és a szukcinimid metin csoportja között fedezhető fel. Ezen csúcsok kisebb intenzitása a kisebb mennyiségű oldalláncból

(nagyobb graftolási fok) adódik. Ezen eredmények bizonyítják, hogy a módosító molekulák kovalens kötéssel kötődnek a polimerhez.



44.  $\dot{a}bra:PSI(a)$ . PSI-DA GF=10 (b)  $\dot{e}s$  PSI-RGD<sub>300</sub> (c) 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektruma.

## 4.3.2 Különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó PASP gélek fizikai és kémiai vizsgálata

A különböző mértékben ciszteaminnal módosított gélek kémiai szerkezetét FTIR-RAMAN spektroszkópiával, míg a fagyasztva szárított minták fizikai szerkezetét kétfoton mikroszkópiával vizsgáltuk (45. ábra).



45. ábra: Különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó PASP gélek FTIR-RAMAN spektrumai (a) illetve a fagyasztva szárított gélekről készült két foton mikroszkópos felvételek (b).

A raman spektrumokon megfigyelhető, hogy a szukcinimid/aszpartamid monomerekre jellemző csúcsok minden minta spektrumában jelen vannak (-CH, -C=O és –C-C-). Emellett látható, hogy a –C-S kötésre jellemző csúcsok intenzitása a mintában található ciszteamin mennyiségével csökken és a CYSE<sub>80</sub>-DAB<sub>20</sub> mintában teljesen eltűnik. Annak ellenére, hogy ezen minták mindegyike kezelve volt DTT-vel, a nagyobb ciszteamin tartalmú mintákban látható a diszulfid hidakra (-S-S-) jellemző csúcs 509 cm<sup>-1</sup> relatív hullámszámnál. A fagyasztva szárított gélek két foton mikroszkópiás felvételein (45. b ábra) jól látható a gélek zöld autofloureszcens tulajdonsága, illetve a ciszteamin mennyiségének csökkenésével a géleken egyre nagyobb átmérőjű lyukak figyelhetőek meg.

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

A szabad tiol csoportok mennyiségét Ellman reagens segítségével is meghatároztuk mind DTT-s kezelés előtt illetve után (16. táblázat).

	$CYSE_2$	$CYSE_5$	$CYSE_{10}$	$CYSE_{20}$	$CYSE_{40}$	$CYSE_{80}$	
DTT előtt (µmol)	0,02±0,02	0,04±0,03	0,04±0,02	0,03±0,01	0,05±0,02	0,02±0,01	
DTT után (µmol)	1,95±0,04	1,41±0,05	0,71±0,08	0,30±0,02	0,16±0,02	0,02±0,01	
Elméleti (µmol)	18,6	7,4	3,7	1,85	0,92	0,46	

16. táblázat: 10mg szárított gélben lévő tiol csoportok anyagmennyisége Ellman meghatározás alapján

A 16. táblázat adatai alapján elmondható, hogy a gélek szintézise során a ciszteaminban található tiol csoportok szinte teljesen oxidálódnak és diszulfid hidak jönnek létre. Ezen diszuflid hidak a DTT-s kezelés hatására felnyílnak és újra tiol csoportokká alakulnak, amelyeknek a mennyisége a gélben nő a szintézis során alkalmazott ciszteamin mennyiségének növelésével.

#### 4.3.3 Poli(aszparaginsav gélek stabilitásának és biodegradábilitásának vizsgálata

A természetes extracelluláris matrix (ECM) folyamatos lebomlása és újjáépülése befolyásolja a sejtek életciklusát és szaporodását. Mivel a szövettámaszként használt gélek mechanikai tulajdonságai nagy hatással vannak a sejtek szaporodására, ezért fontos a gélek stabilitásának, illetve degradációs kinetikájának ismerete. Mivel a sejttenyésztés során alkalmazott, illetve a sejtek által termelt enzimek (diszpáz, Tripszin-EDTA, kollagenáz I), illetve tápoldat összetevői indukálhatják a gélek lebomlását, ezért vizsgáltuk a különböző keresztkötőt (CYS illetve CYS-DAB) tartalmazó PASP gélek stabilitását ezekben a közegekben (46. ábra). Mivel a polimer térhálóban bekövetkező degradáció a gélek duzzadását és ezzel a tömegük növekedését okozza ezért az első kísérletben a gélkorongok tömeg- és alakváltozását követtük nyomon.

A PASP-CYS gélkorongokat először 2 hétig PBS-ben tároltuk, ami nem okozott sem tömegváltozást, sem degradációt (46. a ábra). Ezután a PBS-t különböző enzim oldatokra cseréltük, illetve pár mintát továbbra is PBS-ben hagytunk negatív kontrollként. Amint az látható a minták 42 nap után is stabilak voltak PBS-ben (46. a ábra, fekete jelölő).

Tripszin-EDTA és diszpáz jelenlétében a gélkorongok tömege monoton növekedett a teljes kísérlet időtartama alatt (46. a ábra, piros és kék jelölő). Ez a tömegnövekedés az első két hétben csak kisebb mértékű volt, majd az enzim oldat cseréje után (21. nap) a gélek tömegnövekedése nagymértékben felgyorsult a tripszin-EDTA esetében. Ez a változás kisebb mértékben a diszpáz esetében is megfigyelhető. Habár mindkét enzim jelentős mértékű duzzadást okozott a mintákon, a gélkorongok alakja mégis változatlan maradt (46. c ábra).

Kollagenáz I jelenlétében (46. a ábra, zöld jelölő) a gélkorongok nagymértékben megduzzadtak, a tömegük jelentősen megnövekedett már az első hét után. A gélkorongok deformálódtak, amorf alakot vettek fel (46. c ábra). 1 nappal az enzim oldat cseréje után a polimer térháló teljesen szétesett és a gélkorongok feloldódtak.

Hogy kiderítsük melyik kötés szakad fel a polimer térhálóban a kollagenáz I hatására, vizsgáltuk vegyesen keresztkötött (PASP-CYS-DAB) gélek tömegváltozását kollagenáz I jelenlétében. Ugyan a PASP-CYS-DAB tömege és térfogata kollagenáz I jelenlétében folyamatosan növekedett a 41 napos megfigyelés alatt (46. b ábra), a minták nem deformálódtak és nem oldódtak fel (46. c ábra). Mivel az előző kísérletben használt gélek csak diszulfid tartalmú keresztkötőt tartalmaztak ezért ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a kollagenáz I a polimer térhálóban lévő diszulfid hidakat szakítja fel.



46. ábra: PASP-CYS gélek degradációja különböző enzimek jelenlétében (a), PASP-CYS illetve PASP-CYS-DAB degradációja Kollagenáz I jelenlétében (b), illetve a gélkorongokról különböző napokon készült felvételek (c). A skála a képeken 5mm hosszú. A jelzi az enzim oldatok cseréjét.

A második kísérlet sorozatban a különböző gélek degradációját és stabilitását vizsgáltuk a sejttenyésztés során használt tápoldatban. Ehhez gélhengereket készítettünk, amelyeket tápoldatba helyeztünk és mértük a gélek rugalmassági moduluszát és tömegét különböző időközönként. A 4. és 5. egyenlet segítségével

meghatározható a gélek rugalmassági modulusza és egységnyi térfogatba eső hálólánc mennyisége ( $v^*$ ), amelyek időbeli változása a különböző gélek esetében a 47. ábrán látható.



47. ábra: 20-as (a és c) illetve 40-es térhálósítási fokú (b és c) gélhengerek egységnyi térfogatba eső hálólánc mennyiségének és tömeg szerinti duzzadásfokának (Q<sub>m</sub>) időbeli változása tápoldatban. Különböző gélhengerekről különböző napokon készített felvételek (d). A d) ábrán lévő skála 1cm. Az a,b és c ábrán a jelzi a tápoldatok cseréjét.

Az eredmények mutatják, hogy a különböző, csak DAB keresztkötőt tartalmazó hidrogélek stabilak maradtak tápoldatban a 17 napos megfigyelés alatt. A kis növekedés a v\* értékekben a tápoldat összetevőinek a gélmátrixba történő diffúziójának a következménye (47. a és b ábrán fekete míg a c ábrán fekete és zöld négyzet jelölők). A tiol tartalmú PASP-CYSE<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> gélek esetében a mérések hasonló eredményt mutatnak (47. a és b ábra, kék rombusz jelölők). A 47. d ábrán látszik, hogy sem a gélek alakja sem a mérete nem változott a teljes megfigyelési idő alatt. A PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélhenger szintézise nem volt kivitelezhető, mivel a PSI gélhenger széttört a hidrolízis alatt bekövetkezett méretváltozástól. Azonban a kémiai szerkezete azonos a

PASP-CYSE<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> mintáéval, így feltételezhetően hasonló eredményeket mutatna. A csak cisztamin (PASP-CYS<sub>X</sub>) gélhengerek alakja nagymértékben deformálódott 5 nap tápoldatban töltött idő után (47. d ábra). A hidrogélek először deformálódtak és nagymértékben megduzzadtak az első pár napban, majd később teljesen feloldódtak (47. a és b ábra világoskék kerek, c ábra világoskék és sárga háromszög jelölők).

A vegyesen keresztkötött PASP-CYS<sub>X</sub>-DAB<sub>X</sub> gélekben a v\* (47. a és b ábra piros kerek jelölők) monoton csökkenést, míg a  $Q_m$  (47. c ábra piros és magenta kerek jelölők) monoton emelkedést mutatnak az idő függvényében. Ezek a minták nem oldódtak fel a megfigyelés ideje alatt azonban nagymértékben megduzzadtak és deformálódtak (47. d ábra). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a tápoldat tartalmaz olyan összetevőt, például L-ciszteint, amely képes a gélekben lévő diszulfid hidakat tiol csoportokká redukálni. Ezen feltételezés igazolására a vegyesen keresztkötött PASP-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélkorong duzzadását vizsgáltuk 0,1 M L-cisztein/PBS oldatban (48. ábra).



48. ábra: PASP-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélkorong tömeg és méretváltozása 0,1M L-cisztein/PBS oldatban. A skála 5mm.

Amint az a 48. ábrán látható a gélkorong nagymértékben megduzzadt és a tömege több mint a 3-szorosára emelkedett 2 óra után. Ebből arra következtethetünk, hogy a tápoldatban lévő L-cisztein képes felnyitni a gélekben található diszulfid hidakat.

### 4.3.4 MG-63 oszteoszarkóma sejtek *in vitro* tenyésztése különböző kémiai és fizikai szerkezettel rendelkező PASP géleken

Ezekben a kísérletekben szerettük volna meghatározni, hogy a PASP gélek kémiai összetétele és mechanikai tulajdonsága milyen hatással van a felületükre ültetett MG-63 oszteoszarkóma sejtek életképességére és morfológiájára. Ehhez a már előzőekben ismertetett DAB, CYS, CYS-DAB és CYSE-DAB géleket használtuk kétféle térhálósítási fok mellett (TF= 20 és 40) (3.7.1 fejezet). A 47. ábrán összehasonlítva látható, hogy a különböző térhálósítási fok nagymértékű különbséget eredményez a v\* értékben (közel 7-szeres különbség), amely minél nagyobb annál merevebb a gél. Ezek alapján 8 különböző géltípust használtunk a kísérletekhez, amelyeken a sejtek életképessége 1 és 3 nap után, illetve morfológiája a 49. ábrán látható.

l nappal a kiültetést követően (49. a ábra, kék oszlop) a legnagyobb életképességi mutatókat a vegyesen keresztkötött, 20-as térhálósítási fokú géleken mértük. Ebből arra következtethetünk, hogy a gél merevségének növelése (47. ábra), illetve a tiol csoportok jelenléte elősegíti a sejtek megtapadását a gélek felületén. A 3. nap elteltével hasonló eredményeket mértünk azzal a különbséggel, hogy a PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintán mért életképességi mutató szignifikánsan magasabb volt a CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintán mérthez képest. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a tiol csoportok jelenléte nem csak a sejtek letapadását, de a sejtek proliferációját is elősegíti.

A sejtek morfológiájának és elhelyezkedésének ábrázolásához fázis kontraszt (49. b ábra), illetve kétfoton mikroszkópos felvételeket (50. ábra) készítettünk. A csak CYS vagy DAB keresztkötőt tartalmazó géleken minden sejt egészségtelen, gömb alakot vet fel, ami mutatja, hogy ezek a sejtek csak gyengén kötődnek a gélek felületéhez (49. b ábra). Ebből kifolyólag a sejtek nem képesek a proliferációra ezeken a géleken, amit az életképességi vizsgálatok is alátámasztanak. Azonban, a vegyes keresztkötésű (PASP-CYS-DAB) és tiol tartalmú (PASP-CYSE-DAB) géleken a sejtek egészséges fibroblaszt típusú morfológiát vettek fel. Ebből kifolyólag ezen gélek felületén a sejtek képesek voltak erősen megtapadni és proliferálni amely eredmény korrelációban van az életképességi vizsgálatokkal. A mikroszkópos analízesek alapján nagyobb mennyiségű életképes sejt volt található a PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintákon, amely szintén alátámasztja a WST-1 életképességi vizsgálatok eredményeit.

92



49. ábra: MG-63 oszteoszarkóma sejtek életképességi mutatója 1 és 3 nappal a PASP gélek felületére történt kiültetés után (a) illetve a 20-as térhálósítási fokú gélek felületén lévő sejtekről készül fáziskontraszt mikroszkóp felvételek (b) 2 nappal a kiültetés után.
\*p < 0.05 mutatja a CYSE-DAB<sub>20</sub> gélhez, +p < 0.05 mutatja az 1. naphoz viszonyított szignifikáns különbözőséget. A mikroszkópos felvételeken a skála 100 μm.</li>

A felületekről készült kétfoton mikroszkópos felvételek (50. a ábra) szintén alátámasztják az előzőekben leírt eredményeket. A sejtek fibroblaszt típusú morfológiája illetve a sejtek közötti kapcsolat jól látható a felvételeken. A kétfoton mirkoszkópos felvételek alapján is megállapítható az életképes sejtek számának növekedése a 3. napra. A zöld szín a poli(aszparaginsav) zöld autofloureszcenciájának köszönhető és mutatja, hogy a sejtek és a gélmátrix azonos síkban találhatóak.



50. ábra: Kétfoton mikroszkóppal készített felvételek a Vybrant DiD fluorofórral jelölt MG-63 sejtekről a PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> illetve a PASP-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélek felületén 1 és 3 nappal a kiültetés után (a) illetve a PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélben elhelyezkedő sejtek 3 dimenziós két foton mikroszkópos képe 3 nappal a kiültetést követően (b). A 3 dimenziós kép a gél felső 70 μm-ét ábrázolja.

A 3 dimenziós képen megfigyelhetőek a gélbe (zöld autofloureszcenica) ágyazódott sejtek (piros gömb alakok) (50. b ábra). Ez alapján elmondható, hogy a sejtek nem csak a gélek felszínén tapadnak meg, de képesek bejutni a gél mátrixba miközben megemésztik azt. A gél sima felületének megváltozása is alátámasztja az előző állítást.

# 4.3.5 MG-63 oszteoszarkóma sejtek *in vitro* tenyésztése RGD-vel módosított tiol tartalmú PASP géleken

Az RGD a természetes ECM-ben is előforduló, illetve a mesterséges sejttenyésztés terén használt szövettámaszokban is előszeretettel alkalmazott tripeptid szekvencia, amely elősegíti a sejtek letapadását [132, 133]. Azért, hogy tovább növeljük a sejtek letapadási képességét, illetve vizsgáljuk az RGD mennyiségének hatását a sejtek életképességére és morfológiájára, a PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> géleket különböző mértékben módosítottuk RGD-vel (lásd 3.7.2 fejezet). Az MG-63 sejtek életképességi mutatói 1 és 6 nap után illetve a gélek felületén lévő sejtekről készült fázis kontraszt képek 51. ábrán láthatóak.



51. ábra: MG-63 sejtek életképességi mutatója különböző mennyiségben RGD-t tartalmazó PASP-RGD<sub>X</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> géleken (a) illetve a sejtekről készült fáziskontraszt mikroszkópos képek (b). \*p < 0.05 a kontrolhoz (RGD<sub>0</sub>), +p < 0.05 az első naphoz viszonyított szignifikáns különbséget mutatja. A fáziskontraszt mikroszkópos képeken lévő skála 100 μm.

Az életképességi vizsgálatok alapján elmondható, hogy 1 nap után nem volt szignifikáns különbség a PASP-RGD<sub>X</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> között (51. a ábra). A statisztikai analízis alapján a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns különbséget egyedül az RGD<sub>500</sub> minta mutatott az 1. napon. A következő 5 napban az életképes sejtek mennyisége szignifikánsan emelkedett minden minta esetében, függetlenül az RGD mennyiségétől.

A 6. napon készült fáziskontraszt mikroszkópos felvételeken egészséges, fibroblaszt típusú, szorosan összekapcsolódott sejtek láthatóak (51. b ábra). A sejtek erősen kapcsolódnak egymáshoz, nagy sejt sűrűségű klaszterekbe rendeződtek mindegyik RGD tartalmú hidrogél felületén. Ezen eredmények igazolják, hogy az RGD jelenléte függetlenül a mennyiségétől elősegítheti az MG-63 sejtek klaszterekbe rendeződését.

A kétfoton mikroszkópos felvételeken hasonlóan egészséges morfológiájú, egymással és a gélekkel kapcsolatban lévő sejtek láthatóak (52. ábra). A 3 dimenziós kép (52. b ábra) esetében látható, hogy a sejtek beágyazódnak a gélmátrixba. A gél felszíne nem egyenletes, amely abból következik, hogy a sejtek migrációjuk és proliferációjuk során képesek bejutni a hidrogél belsejébe, épp úgy mint az RGD-t nem tartalmazó gélek esetében. Az 50. ábrán illetve az 52. ábrán látható 3 dimenziós szerkezet bizonyítja, hogy a sejtek a PASP gélekben található peptid kötéseket képesek felbontani és ez által a gél belsejébe bejutni.



52. ábra: Kétfoton mikroszkóppal készített felvételek a MG-63-as sejtekről a különböző PASP-RGD<sub>X</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> géleken (a) illetve a PASP-RGD<sub>300</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gél 3 dimenziós szerkezete 3 nappal a kiültetést követően. A 3 dimenziós kép a gél felső 60 μm-ét mutatja.

## 4.3.6 Humán foggyökérhártya (PDL) őssejtek tenyésztése különböző kémiai és fizikai szerkezettel rendelkező PASP géleken

A humán PDL őssejtekkel végzett kísérletek során a 4.2.4 fejezetben bemutatott géleken vizsgáltuk a sejtek életképességét, morfológiáját, illetve 2 és 3 dimenziós elhelyezkedését (53. ábra).

Az 53. ábra alapján elmondható, hogy a PDL őssejtek hasonlóan viselkednek a különböző PASP géleken, mint az MG-63-as sejtek. Az első napon a legnagyobb életképesség a merevebb és tiol tartalmú (CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub>) gélen volt mérhető. Emellett a DAB<sub>20</sub>, illetve a CYSE<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> minta esetében is magas életképességi mutatókat mértünk, amely alapján elmondható, hogy a PDL őssejtek életképességét a gél rugalmassági moduluszának növekedése és a tiol csoportok jelenléte a gélben megnöveli. Ezen eredmények egyezést mutatnak az MG-63-as sejtek esetében mért eredményekkel. A jelentős különbség azonban a két sejttípus között, hogy a PDL őssejtek életképessége a 3. napra lecsökkent szinte minden minta esetében. Ez a csökkenés ugyan jelentős, de az 1. napon legnagyobb életképességet mutató 3 gél közül csak a CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében szignifikáns. Ahhoz, hogy információt kapjunk arról, hogy ez a csökkenő tendencia hosszú távú sejttenyésztés esetén is fenn áll-e, vizsgáltuk a sejtek életképességét a kiültetéstől számított 14. napig, az előzőekben említett 3 gél típus esetében (53. b ábra).



53. ábra: PDL őssejtek 1 és 3 napos relatív életképességi mutatója 8 különböző PASP gélen (a) illetve a 3 legnagyobb életképességi mutatóval rendelkező gél hosszú távú eredményei (b). A gélek felületéről készült fáziskontraszt és két foton mikroszkópos felvételek (c) és a gélek felső 70 µm-réről készült 3 dimenziós kép (d) 14 nap után. A fáziskontraszt mikroszkópos képek ugyanolyan nagyításban készültek. A géleken mért életképesség a CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélen mért 1. napi életképességhez van viszonyítva (100%). CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélhez képest a szignifikáns különbséget a \*p < 0.05 mutatja az adott mérési napon. A szignifikáns különbséget a napok között a +p < 0.05 mutatja.

A 53. b ábrán megfigyelhető, hogy ugyan az életképes sejtek mennyisége az első naphoz képest mindhárom minta esetében lecsökken, a 7. napra nagyobb értéket mutat mint az 1. napon. Ez az emelkedő tendencia a DAB<sub>20</sub> minta esetében szignifikánsan

megmaradt a 14. napra, de a CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében is látható. A CYSE<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> minta esetében az életképességi mutató kismértékben lecsökkent azonban a statisztikai elemzés nem mutatott szignifikáns különbséget. A mikroszkópos vizsgálatok (53. c ábra) alátámasztják az életképességi vizsgálatok eredményeit. A két foton képeken mindhárom minta esetében egészséges morfológiájú sejtek figyelhetőek meg már a 3. napon, amelyek száma nagymértékben megnövekedett a 14. napra. Két hét elteltével a sejtek a gélek felületén összefüggő, konfluens réteget alkotnak mindhárom minta esetében. A fáziskontraszt mikroszkópos képeken 3 illetve 14 nap után is egészséges morfológiájú, egymással kapcsolatban álló sejtek láthatóak. Az 53. c és d Ábrákon látható, hogy a sejtekből származó piros jel beágyazódik a gélmátrix zöld autofloureszenciájából származó jelbe. Ebből arra következtethetünk, hogy 14 nap után a sejtek nem csak a gélek felületén helyezkednek el, hanem képesek bejutni a hidrogél belsejébe és a természeteshez hasonló morfológiával rendelkeznek. Mivel ez csak úgy lehetséges, ha a sejtek megemésztik a háromdimenziós polimer mátrixot, így ez az eredmény is igazolja a gélek biokompatibilitását és biodegradábilitását.

### 4.3.7 Humán PDL őssejtek tenyésztése különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó PASP géleken

Mivel az előző kísérletek eredményei rámutattak arra, hogy a tiol csoportok jelenléte előnyös hatással van mind az MG-63 mind pedig a PDL őssejtek életképességére, ezért különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó géleket készítettünk (3.7.3 fejezet). Ezután, az előzőekben bemutatott módon, vizsgáltuk PDL őssejtek életképességét, morfológiáját és elhelyezkedését 14 napon keresztül illetve tanulmányoztuk a sejtek spontán és speciális sejt médiummal indukált csont irányú differenciációját a különböző géleken. Az eredmények az 54. ábrán láthatóak.



54. ábra: PDL őssejtek életképességének (WST-1 mérés) (a), illetve differenciációjának (ALP mérés) (b) vizsgálata különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó PASP géleken. Az ALP mérésben használt géleken található sejtek morfológiájának vizsgálata fáziskontraszt mikroszkóp (c), illetve a különböző tápoldat esetében a sejtek elhelyezkedése a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> illetve a CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub> géleken két foton mikroszkóp (d) segítségével. A fáziskontraszt mikroszkópos képek ugyanolyan nagyításban készültek. A géleken mért életképesség a CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélen mért 1. napi életképességhez van viszonyítva (100%). CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> gélhez képest a szignifikáns különbséget a \*p < 0.05 mutatja az adott mérési napon. A szignifikáns különbséget a napok között a +p < 0.05 mutatja.

#### DOI:10.14753/SE.2019.2213

A 54. a ábrán megfigyelhető, hogy a két legnagyobb mennyiségben tiol csoportot tartalmazó mintán mért életképességi értékek jóval meghaladják a többi mintán mért értékeket. Ez alapján elmondható, hogy a tiol csoportok mennyiségének növelése jótékony hatással van az életképes sejtek mennyiségére. Ez a növekedés a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében az adott napon a már előzőekben is bemutatott CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintához képest közel 600%-s volt. A sejtek életképességének változása a 14 nap során hasonló tendenciát mutat, mint az előző kísérletben, vagyis először a 3. napra lecsökken majd a 14. napig folyamatosan növekszik. A fáziskontraszt mikroszkópos felvételeken (54. c ábra) egészséges morfológiájú sejtek figyelhetőek meg, amelyek a 14. napra a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> illetve a CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub> géleken összefüggő, konfluens réteget alkotnak.

Az 54. b ábrán látható a PDL őssejtek alkalikus fosztáz enzim aktivitása 3, 7, illetve 14 nappal a kiültetést követően a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub>, CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub>, CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub>, illetve a DAB<sub>20</sub> géleken. A minták két csoportra oszthatóak aszerint, hogy oszteogén differenciálódást elősegítő (bal oldali csoport) vagy kontroll (jobb oldali csoport) tápoldatot használtunk. Megfigyelhető, hogy a DAB<sub>20</sub> gélek esetében sem a kontroll sem az oszteogén tápoldat használatának hatására nem indult el a PDL őssejtek oszteogén irányú differenciációja. Ellenben a tiol tartalmú gélek esetében, amikor oszteogén tápoldatot használtunk mindhárom minta esetében jelentős alkalikus foszfatáz enzim aktivitás volt mérhető, amely a sejtek oszteogén irányú differenciációjára utal. Az eredmények nagyrészt egyezést mutatnak az életképességi vizsgálatokkal, vagyis a legmagasabb ALP aktivitás a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> sejten volt mérhető. Emellett nagyon fontos kiemelni, hogy amíg a többi minta esetében a kontroll médiummal kezelt géleken nem volt számottevő ALP aktivitás, addig a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> gél esetében oszteogén tápoldat használata nélkül is mértünk differenciálódott utódsejteket.

A sejtek elhelyezkedését, illetve struktúráját 14 nap után mind a kontroll mind pedig az oszteogén tápoldat esetében az 54. c ábrán látható 2 dimenziós képek mutatják. A géleken nagy mennyiségű, egymással kapcsolatban lévő, egészséges morfológiájú sejt figyelhető meg. A CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében teljesen tömör, konfluens részek figyelhetők meg mind a kontroll, mind pedig az oszteogén táp esetében, amely a sejtek csont irányú differenciálódására utal. A 3 dimenziós képeken látható, hogy a sejtek éppúgy, mint az előző kísérletekben, beágyazódnak a gélmátrixba. A CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub>

gélek esetében egy teljesen összefüggő sejtréteg figyelhető meg a 3 dimenziós felvételen is.

#### 4.3.8 Humán PDL őssejtek tenyésztése dopamin tartalmú PASP géleken

Amint az a 4.1.9 fejezetben bemutatott eredményekből látható, a dopaminnal módosított konjugátumok egyáltalán nem voltak citotoxikus hatással PDL őssejtekre, sőt bizonyos esetekben még elő is segítették az életképes sejtek mennyiségének a növekedését. Ezen okból kifolyólag szerettük volna megvizsgálni, hogy a dopamin tartalmú géleknek van-e bármilyen hatása a sejtek letapadására, migrációjára illetve proliferációjára. Ehhez a 3.7.4 fejezetben bemutatott géleket használtuk, amelyek minden 10., 15. illetve 20. monomeren tartalmaztak dopamin oldalláncot, illetve minden 20. monomeren tiol csoportot. Az életképességi és fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok eredményei az 55. ábrán láthatóak.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a nagyobb mennyiségű dopamin csökkenti az életképes sejtek mennyiségét (55. a ábra). Ennek oka az, hogy a dopamin citotoxikus koncentráció felé emelkedett (lásd 4.2.6. fejezet). A dopamin csökkenésével azonban megfigyelhető, hogy az életképes sejtek mennyisége a DA15-CYSE20-DAB20 minta esetében kis mértékben, míg a DA20-CYSE20-DAB20 minta esetében már jelentős mértékben megnövekszik. Az életképes sejtek mennyiségének változása hasonló tendenciát mutat, mint a dopamin nélküli gélek esetében, vagyis a 3. napra lecsökken, majd utána tovább növekszik. A fáziskontraszt mikroszkópos képeken egészséges morfológiájú fibroblaszt sejtek láthatóak. А DA<sub>15</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> és DA<sub>20</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében is egy egybefüggő, konfluens sejtréteg figyelhető meg a 7., illetve 14. napon egyaránt. Ezek alapján elmondható, hogy a megfelelő mennyiségű dopamin jelenléte a gélekben nem csökkenti az életképes sejtek mennyiségét illetve a sejtek képesek megtapadni a gélek felületén és egészséges morfológiát felvenni. A sejtek eloszlását a gélek felületén a különböző napokon két foton mikroszkópia segítségével vizsgáltuk (56. ábra).



55. ábra: PDL őssejtek életképességi mutatója a különböző mennyiségben dopamin oldalláncot tartalmazó géleken (a) illetve a gélek felületéről a különböző napokon készített fáziskontraszt mikroszkópos felvételek (b). A mikroszkópos felvételek azonos nagyítással készültek.

Az 56. ábrán látható kétfoton felvételek hasonló eredményt mutatnak, mint az életképességi illetve a fáziskontraszt mikroszkóp felvételek. Látható, hogy a DA<sub>20</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében a 14. napra egy teljesen egybefüggő sejtréteg alakult a gél felületén. A sejtek 3 dimenziós elrendeződésének vizsgálatához 3 illetve 14

napon felvettük a gélek Z-stack felvételeit hasonlóan az előző típusú gél mintákhoz (57. ábra)



56. ábra: Kétfoton mikroszkópos felvételek a különböző mennyiségben dopamin oldalláncot tartalmazó gélek felületén található sejtekről a kiültetéstől számított 1, 3, 7 és 14-dik napon.

Az 57. ábrán megfigyelhető, hogy 3 nappal a kiültetés után a sejtek főleg a gélek felületén találhatóak, nem hatolnak be a gélmátrixba. Azonban 14 nap elteltével a  $DA_{15}$ -CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetén 1-2 sejtréteg vastagságig (1 sejtréteg körülbelül 30 µm), míg a  $DA_{20}$ -CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetén egészen 5-6 sejtréteg vastagságig behatolnak a gélmátrix belsejébe. A sejtek képesek megemészteni a dopamin tartalmú hidrogélt, amit az 57. ábra jobb alsó sarkában található felvételen lévő zöld mélyedések is igazolnak.



57. ábra: A DA<sub>15</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> illetve DA<sub>20</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintákról készült 3 dimenziós két foton felvétel 3 illetve 14 nappal a kiültetést követően.

#### 5 Megbeszélés

Biokompatibilis, illetve biodegradábilis polimerre épülő polimer-hatóanyag konjugátumok, illetve hidrogélek napjaink egyik leginkább kutatott anyagai közé tartoznak a gyógyszerészeti és az orvosbiológia területén. Poli(aminosavak) ilyen célú alkalmazása kézenfekvő lenne, azonban az irodalomban mégis kevés ilyen jellegű kutatási eredményt találunk. Ennek fő oka valószínűleg a nagy molekulatömegű poli(aminosav)-ak nehéz és költséges előállítása. A poli(szukcinimid), illetve a poli(aszaparginsav) és a belőlük származtatható poli(aszpartamid) származékok ilyen jellegű alkalmaztatoságára kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Kutatómunkám során először alkalmaztuk a poli(aszparaginsav) géleket, mint szövettámaszt humán eredetű őssejtek tenyésztéséhez illetve az irodalomban először készítettünk egy részletes leírást a hatóanyag leszakadási kinetikájának jellemzésére kovalens polimer-hatóanyag konjugátumok esetében.

#### 5.1 Poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok szintézise és vizsgálata

### 5.1.1 Különböző dopamin tartalmú konjugátumok fizikai és kémiai paramétereinek vizsgálata

Polimer-hatóanyag konjugátumok kémiai összetétele, oldhatósága, lipofilitása, illetve stabilitása nagymértékben befolyásolja a konjugátum sorsát a szervezetben, illetve a hatóanyag leszakadásának időbeli lefutását. Túlnyomó részt a polimer határozza meg a konjugátum fizikai és kémiai paramétereit [17], azonban mint azt láthattuk az előző fejezetekből (4.1.2, 4.1.3, 4.2.1, 4.2.3, 4.2.4 fejezet) a PSI esetében ez másképp van. Amint azt a 4.1.2, illetve 4.1.3 fejezetben bemutattam, mind a konjugátumok oldhatósága és lipofilitása, mind pedig a hatóanyag felszabadulásának időbeli lefutása befolyásolható a PSI különböző módosításaival. A PSI esetében nem a megfelelő polimer megválasztásán van a hangsúly, mint más az irodalomban széleskörűen használt polimerek esetében [17, 134], hiszen későbbi módosításokkal a végső felhasználásnak megfelelően tudjuk hangolni a konjugátumok tulajdonságait. Munkám során a különböző mennyiségű dopamin mellett 2-aminoetanolt használtam, hogy befolyásoljam a konjugátumok vízoldhatóságát, illetve oldhatóság kinetikáját. A dopamin az alacsony vér-agy gát permeábilitása [135], illetve gyors degradációja [136] miatt önmagában nem használható hatóanyagként gyógyszeres terápiában. A
konjugátumok célja a dopamin degradációjának megakadályozása, illetve az elnyújtott hatóanyagleadás biztosítása.

Az előállított konjugátumok kémiai szerkezetét <sup>1</sup>H-NMR, illetve FTIR-ATR segítségével igazoltuk. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy mind dopaminnal, mind pedig dopamin-2-aminoetanol elegyével a PSI enyhe körülmények között módosítható. Az <sup>1</sup>H-NMR vizsgálatok alapján a szintetizált konjugátumok kémiai összetétele nagy hasonlóságot mutat az elméleti összetétellel és az irodalomban megtalálható adatokkal [121, 137]. Az oldhatósági illetve a lipofilitási adatok alapján elmondható, hogy mindkét paraméter nagymértékben függ a polimerre kötött dopamin mennyiségétől, illetve az aminoetanol oldallánc alkalmazásától (8. táblázat). A PSI önmagában egy vízben oldhatatlan polimer. A dopaminban található katekol csoport növeli a polimer oldhatóságát, éppen ezért a polimerre kötött dopamin mennyiségének a növelésével nő a konjugátumok oldhatósága. Az aminoetanol alkalmazásával a konjugátumok vízoldhatósága tovább növekszik, mivel az aminoetanolban található primer -OH csoport tovább növeli a konjugátum hidrofilitását. A GF=1 és DA-AE minták fizikailag oldódnak vízben mindenféle kémiai változás nélkül. A GF=4-s minta esetében azonban a szabad szukcinimid gyűrűk lassan elhidrolizálnak és ezzel folyamatosan nő a polimer oldhatósága. Ez magyarázza a polimer nagyobb oldhatóságát 48 óra után. Ez a folyamat vízben azonban nagyon lassan játszódik le, ezért a polimer oldhatósága még így is kisebb a GF=1-s vagy a DA-AE mintákénál. A lipofilitási adatok szintén hasonló tendenciát mutatnak, vagyis az aminoetanol oldalláncot is tartalmazó konjugátumok logP értéke negatívabb, mint a csak dopaminnal módosított mintáké (9. táblázat), alátámasztva a hidrofilebb jelleget. A TG, illetve DSC eredmények (lásd 4.1.2.3 fejezet) alapján elmondható, hogy a konjugátumok termikusan stabilak és egészen 200 °C-ig nem történik semmilyen változás a szerkezetükben. Ezt a hőmérsékletet elérve azonban a dopamin degradációja megkezdődik [40], majd pedig a PSI degradációja következik be 300 °C felett [114].

## 5.1.2 Hatóanyag leszakadás kinetikájának leírása rossz illetve jó vízoldhatósággal rendelkező konjugátumok esetében

A hatóanyag hasznosulását az elő szervezetben nagymértékben befolyásolja a hatóanyag felszabadulásának kinetikája a készítményből. Mivel a dopamin esetében egy elnyújtott hatóanyag leadású konjugátum előállítása volt a célunk, ezért vizsgáltuk a hatóanyag leszakadásának időfüggését különböző közegekben (PBS, enzimek). Azonban az irodalomban csak néhány olyan eset található, amikor kovalens polimerhatóanyag konjugátumról vizsgálták a hatóanyag leszakadását [138, 139], azonban ezekben az esetekben sem arra fókuszáltak, hogy egy messzemenő, részletes kinetikai leírást dolgozzanak ki. Éppen ezért vizsgálataink során kidolgoztunk egy részletes kinetikai leírást, amely használható lehet más, kovalens polimer-hatóanyag konjugátumok esetében is a hatóanyag leszakadás kinetikájának leírására. Ehhez a már előzőekben ismertetett oldhatósági különbségek alapján a konjugátumokat két csoportba soroltuk: az egyikben a rosszul és időfüggő oldhatósággal rendelkező csak dopamint tartalmazó konjugátumok voltak, míg a másik csoportba a jó vízoldhatósággal rendelkező aminoetanol oldalláncot is tartalmazó konjugátumok kerültek.

A leírás során először a dopamin leszakadás rendűségét határoztuk meg az aminoetanol tartalmú konjugátumok vizsgálatával. A mérésekből látható, hogy a dopamin leszakadása egy elsőrendű kinetika szerint játszódik le a különböző reakcióközegekben, mivel a koncentráció változása exponenciálisan függ az időtől <sup>(27, ábra).</sup> Mindemellett a mérések körülményei között a dopamin degradálódik, így a pontos kinetikai leíráshoz ennek a reakciónak a rendjét is meg kellett vizsgálnunk. A mérések alapján a dopamin koncentrációja a degradációja során lineárisan csökken az idővel, ami 0. rendű kinetikára enged következtetni. Ezen adatok megegyeznek az irodalomban megtalálható adatokkal, ahol szintén 0. rendű kinetikával írták le a dopamin degradációját eltérő körülmények között [123, 140].

A dopamin koncentrációjának a csökkenését a konjugátumokon a számolások alapján a 14. egyenlettel írhatjuk le. Az elméleti leírást összehasonlítva a mérési adatokkal (29. ábra) jó egyezést kapunk, amely alátámasztja a kinetikai leírás helyességét. A hatóanyag leszakadási gyorsaságának a jellemzéséhez meghatároztuk a konjugátumon lévő dopamin mennyiségének a felezési idejét. A jó vízoldhatósággal rendelkező minták esetében a felezési idők minden esetben meghaladják a 4 órát (10. táblázat), amely értékek alapján a konjugátum egy elnyújtott dopamin leadást tesz lehetővé.

Mivel a dopamin leszakadása oldatfázisban történik meg, ezért a rosszul oldódó konjugátumok oldhatóságának időfüggését is figyelembe kell vennünk a kinetikai leírásnál. Éppen ezért a kinetika leírásához egy diffúzióval összekapcsolt elsőrendű kinetikai modellt alkalmaztunk. Az első lépésben a polimer diffúzióval jut be a szilárd

109

felületről az oldatfázisba ahol a dopamin leszakadása megtörténik. A diffúziós lépés leírásához a Higuchi modellt alkalmaztuk [141], amely rosszul oldódó komponensek esetén használható, ha a komponens koncentrációja a formulában meghaladja az oldhatóságát. Összhangban a Higuchi modellel, a több kötött dopamin épp úgy, mint a konjugátum nagyobb telítési koncentrációja növeli a Higuchi paraméter értékét (11. táblázat).

A Higuchi modellel meghatározott paramétereket figyelembe véve tettünk kísérletet, egy diffúzióval egybekötött elsőrendű kinetikai modell kidolgozására, hogy megbecsülhessük a leszakadt dopamin koncentrációjának időfüggését (25. egyenlet). A 25. egyenlet esetében két szélső esetet vizsgáltunk meg. Nagyon rövid mérési idők esetében (első 1-2 óra) a pusztán diffúziós Higuchi modellt kapjuk vissza, míg végtelen hosszú időben a limitáló tényező a leszakadt dopamin telítési koncentrációja. Ha a 25. egyenletet hosszú reakcióidőkre felírjuk, megkapjuk a 27. egyenletet, amely segítségével meghatározhatjuk a leszakadási reakciókinetikai konstansát (30. ábra, 12. táblázat). Összevetve ezen értékeket a jó vízoldhatóságú konjugátum esetében meghatározottakkal látható, hogy ezek az értékek jóval kisebbek, amely a hosszabb, elnyújtott hatóanyagleadást támasztja alá. Mivel ezekben az esetekben a diffúzió a sebesség meghatározó lépés, a hatóanyag leszakadásnak felezési ideje is nagyobb. A 20. egyenlet alapján a felezési idő a GF=1 minta esetében 40 óra, míg a GF=44 minta esetében 99,2 óra. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy egy elnyújtottabb hatóanyagleadás érhető el, ha a konjugátum oldhatósága lassabb. Mivel így a konjugátum lipofilitása is nagyobb, amely nagyobb felszívódást jelenthet a szervezetben, a hatóanyag hasznosulása tovább növekedhet [17].

Leírásunkat alkalmaztuk különböző enzimek által katalizált esetben is, hogy megvizsgáljuk az enzimek hatását a dopamin leszakadás kinetikájára. Az eredmények alapján elmondható, hogy az  $\alpha$ -Kimotripszin kimagaslóan szignifikáns (p≤0,01), míg a bromelain szignifikáns (p≤0,05) hatással volt a dopamin leszakadás kinetikájára (27. ábra). A statisztikai elemzések alapján elmondható, hogy az  $\alpha$ -Kimotripszin szignifikáns hatással (p≤0,05) bírt a bromelainhoz képest 3,5 óra után. Így levonhatjuk azt a következtetést, hogy ha nagyobb a koncentráció a polimeren illetve nagyobb a konjugátum oldhatósága, nagyobb a dopamin telítési koncentrációja és gyorsabb a jelentősen befolyásolja a dopamin leszakadás kinetikáját, amely alátámasztja katalitikus aktivitásukat is [127].

# 5.2 Nanoszálas poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok előállítása és vizsgálata

A dopamin leszakadási kinetikájának leírásánál láthattuk, hogy a konjugátum oldhatóságának és oldhatóság kinetikájának nagy hatása van a dopamin leszakadás kinetikájára. Éppen ezért a konjugátumok további formulázásához olyan eljárást szerettünk volna használni, amely megnöveli a konjugátumok fajlagos felületét valamint egy jobban kezelhető készítményt eredményez. A nanoszálas konjugátumok előállításához az elektrosztatikus szálhúzás (electrospinning) technikáját alkalmaztuk. Az irodalomban számos publikáció található különböző elektrosztatikus szálhúzással előállított hatóanyag hordozó rendszerekről [37, 38. 142]. Nanoszálas hatóanyaghordozó rendszerek előállításához legtöbbször a hatóanyag molekulákat fizikailag csapdázzák a polimer szálakba [43, 143, 144], esetleg utólagosan adszorbeálják a szálakban [44, 45, 145], vagy abszorbeálják a szálak felületén [146, 147], illetve valamilyen nanorészecske felületére kötött hatóanyagot csapdáznak a polimer szálakba [148–150]. Azonban kovalens polimer-hatóanyag konjugátumok utólagos elektrosztatikus szálhúzással történő formulázására viszonylag kevés irodalom áll a rendelkezésünkre [39, 41, 151].

## 5.2.1 Poli(aszpartamid)-dopamin nanoszálak előállítása

Az elektrosztatikus szálképzés esetében a polimer és az oldószer fizikai kémiai paraméterei nagymértékben befolyásolják a kialakult szálak méretét, homogenitását és szerkezetét. A legfontosabb paraméterek a polimer koncentrációja és a vele párhuzamban lévő viszkozitás, az alkalmazott feszültség és áramlási sebesség, a polimer oldat felületi feszültsége, valamint a páratartalom, hőmérséklet és a céltárgy távolsága [152]. Mivel ezek közül az oldószer a polimer oldat viszkozitására és a felületi feszültségére hatással van, ezért a megfelelő oldószer alkalmazása fontos paraméter [153]. A csak dopamin tartalmú konjugátumok oldhatósága limitált, és főleg DMF-ben vagy DMSO-ban oldhatóak, így oldószer keverékek alkalmazásával juthatunk a kívánt szálas szerkezethez [153].

### DOI:10.14753/SE.2019.2213

A konjugátumok esetén látható, hogy különböző oldószerek, illetve oldószer keverékek alkalmazása esetén más és más méretű, illetve szerkezetű szálakat kapunk. A GF=1-s minta esetében a DMF-EtOH 1:1 arányú keverékét használva a polimer oldat pulzálva távozott a tű hegyéről, így hibahelyekkel terhelt, amorf szálakat sikerült csak előállítani (32. a és b ábra). Ennek valószínűsíthető oka lehetett az oldat magas felületi feszültsége, illetve az erős kölcsönhatás a polimer és oldószer molekulák között. Ahhoz hogy csökkentsük a felületi feszültséget THF-t adtunk az oldószer elegyhez és így egy hármas oldószerelegyet, DMF-THF-EtOH 2:1:1 keverékét alkalmaztuk. Az elegyben a DMF felelős az oldhatóság növeléséért, míg a THF és EtOH csökkentik a polimer-oldószer kölcsönhatást és a felületi feszültséget [154]. Ilyen körülmények között már szűk szálátmérő eloszlással állíthattunk elő polimer szálakat, amelyek átmérője kisebb 100nm-nél (32. c és d ábra, 13. táblázat).

Mivel a GF=4-s minta kevesebb dopamint tartalmaz és így kevesebb hidrofil oldalláncot, ezért már tisztán DMF-ből is képezhetünk szálakat elektrosztatikus szálhúzással. Azonban ilyen körülmények között a polimer oldat időben nem egyenletesen jut a tű hegyére és egy pulzáló szálképzés játszódik le. Ennek következményeképpen a szálak átmérője inhomogénebb lesz illetve golyószerű hibák jelennek meg a szálakon, mely szálképzési hiba jól ismert az irodalomból (33. b ábra) [44]. Ahhoz hogy csökkentsük az oldat felületi feszültségét, amely hatással van a szálakon lévő hibahelyek kialakulására [154], DMF-THF 4:1 keverékét alkalmaztuk. A 33. ábrán látható, hogy így hibahely mentes szálakat tudtunk előállítani homogén szálátmérővel és a szálak átlagos átmérője sem haladta meg az 1 µm-t (13. táblázat). Ha összevetjük a GF=1-es és 4-es konjugátumból készített szálakat látható, hogy GF=1-es minta esetében a szálak jóval kisebb átlagos átmérővel rendelkeztek. Ez a polimer oldat kisebb felületi feszültségének köszönhető [34].

Mivel a DA-AE 1:2 konjugátum vízoldhatósága nagyobb, mint 50 m/m% (8. táblázat), ezért alkalmazhattuk a konjugátumok vizes oldatát a szálak előállításához. A konjugátum vizes oldatából homogén, 400 nm-s átlagos szálátmérővel rendelkező szálakat tudtunk előállítani (13. táblázat). Fontos kiemelni, hogy a szálak nagy hidrofilitása miatt a levegőben található nedvességet megkötik, melynek során a szálak összeolvadnak (34. b ábra), így későbbi alkalmazás szempontjából törekedni kell a nedvességmentes tárolási körülményekre.

A szálak FTIR-ATR spektroszkópiás vizsgálatából kiderül, hogy kémiai szerkezetükben semmiféle változás nem következik be a szálhúzás során a por állapotú mintákhoz képest, amely eredmény megegyezik korábbi kutatómunkánk során mért eredményekkel [155].

# 5.2.2 Oldhatóság kinetikai, hatóanyag leszakadás kinetikai és permeábilitási vizsgálatok

A por állagú minták esetében láthattuk, hogy a konjugátumok oldhatósága illetve oldhatóság kinetikája nagymértékben befolyásolja a hatóanyag leszakadás kinetikáját (27. ábra). Mivel az elektrosztatikus szálképzéssel a konjugátumok fajlagos felülete nagymértékben megnövekszik, így várhatóan az oldhatóságuk is meggyorsul (lásd Higuchi kinetika leírása 17. egyenlet). Ha összevetjük a sima por állagú minták oldhatóság kinetikáját (24. ábra) az elektrosztatikus szálhúzással előállított szálas mintákéval (35. ábra), megfigyelhető, hogy a szálas minták oldhatósága gyorsabb, mint a por állagú mintáké. Ez azonban nem csak a minták fajlagos felületének különbözőségéből következik, hiszen a szálas minták esetében a méréseket PBS-ben végeztük. A szálas minták esetében a mérési eredményekből levontuk a leszakadt dopamin mennyiségét, a dopamin leszakadási kinetikai méréseket használva, így a 35. ábra ténylegesen csak a beoldódott konjugátumon lévő dopamin mennyiségét mutatja. Megfigyelhető, hogy míg a GF=1 szálas minta koncentrációjának időfüggése az első 26 órában egy telítési görbe szerint változik, addig a GF=4 minta esetében az 5. óra után egy ugrásszerű koncentrációnövekedés játszódik le. Ez annak köszönhető, hogy a szabad szukcinimid gyűrűk lúgos hidrolízise elindul, így a polimer vízoldhatósága nagymértékben megnő. Ez az érték jó egyezést mutat az irodalomban megtalálható adatokkal, ahol poli(szukcinimid) alapú gélek hidrolízis kinetikáját vizsgálva hasonló értékeket írtak le [91]. A szálak oldhatóság kinetikájában 26 óra után egy újabb ugrásszerű növekedés figyelhető meg, amely a szálak szétesésének tudható be. Ennek hatására a hatóanyag felszabadulás meggyorsul az oldott konjugátum koncentrációjának hirtelen megemelkedése miatt. Ez a GF=4-s minta esetében szintén jelentősebb a szabad szukcinimid gyűrűk teljes hidrolízise miatt. Mivel a hidrolízis az első 5-6 órában nem befolyásolja a konjugátumok oldhatóságát, így ezen szakaszból meghatározható a por állagú konjugátumoknál is meghatározott Higuchi konstans. Összehasonlításként a por

### DOI:10.14753/SE.2019.2213

illetve szálas konjugátumok esetén meghatározott Higuchi konstanst illetve a polimerek telítési koncentrációját a 17. táblázatban tüntettem fel.

miguchi konstans es tettest koncentracio										
Minta neve	GF=1 por	GF=1 szál	GF=4 por	GF=4 szál						
$K_H(mmol^*L^*h^{-1/2})$	0,47	0,26	0,141	0,342						
$c_{PD}^{s}$ (mmol/L)	0,72	2,43	0,61	6,99						

17. táblázat: A vízben rosszul oldódó por illetve szálas konjugátumok esetén számított Higuchi konstans és telítési koncentráció

Megfigyelhető, hogy GF=1-s minta esetében a Higuchi konstans lecsökkent, azonban nem szabad elfelejteni, hogy a bemért konjugátum mennyisége fele akkora volt, mint a por állagú mintáé. GF=4-s minta esetében azonban jelentős növekedés látható a szálas minta esetében, amely részben a megnövekedett felületnek részben a szabad szukcinimid gyűrűk hidrolízisének köszönhető.

A hatóanyag leszakadás kinetikai mérések eredményei alátámasztják azt a feltételezést, hogy az oldhatóság kinetika, illetve a szálak oldhatósága nagy hatással van a hatóanyag leszakadás kinetikájára [41, 156, 157]. Ha összevetjük a dopamin leszakadás kinetikáját por, illetve szálas minták esetében látható, hogy amíg por minták esetében a leszakadt dopamin koncentrációja egy telítési görbe szerint növekszik, addig a szálas minták esetében egy hirtelen koncentrációnövekedés figyelhető meg 26 óra után. Ez a szálak makroszkopikus szétesésének és így egy hirtelen konjugátum koncentrációnövekedésnek tudható be, amely már az oldhatóság kinetika esetén is megfigyelhető volt (35. ábra). Ebből kifolyólag a kinetika leírásánál a hatóanyag leszakadást két szakaszra bonthatjuk (37. ábra): arra a szakaszra, amikor a szálak még nem esnek szét makroszkopikusan, illetve ami után már a szálak feloldódnak. Látható, hogy a feloldódás nagymértékben meggyorsítja a hatóanyag leszakadását (14. táblázat).

A leszakadás kinetika egyszerűbb összevetéséhez a por és szálas minták között a telítési koncentrációkat illetve a kinetikai konstansokat a 18. táblázatban találhatjuk. Megfigyelhető, hogy ha a két lépcsős leírást használjuk a szálas mintáknál  $\alpha$ -Kimotripszin jelenlétében és a reakciókinetikai konstansokat a végső, 2. lépcső utáni telítési koncentrációkkal határozzuk meg, az első lépcső reakciókinetikai konstansa jóval kisebb lesz, mintha az 1 lépcsős leírást alkalmaznánk. Ha külön kezeljük a két lépcsőt abban az esetben az 1. lépcső esetében a  $k_r$  érték megnő és jóval nagyobb értéket mutat, mint PBS vagy az előző leírás esetében. A  $k_r$  értékek alapján elmondható, hogy a szálas minta hirtelen szétesése nagymértékben meggyorsítja a dopamin leszakadásának

a sebességét. PBS esetén a két konjugátum között kis különbség figyelhető meg a GF=1 javára, ez azonban az α-Kimotripszin esetében jóval jelentősebb, amely eredmény szintén alátámasztja az enzim katalitikus aktivitását.

Közeg	minta	GF=1			GF=4		
		Por	Szál		Por	Szál	
PBS	$k_r(h^{-1})$	0,020	0,017		0,025	0,019	
	$c_T^{\infty}$ (mmol/L)	0,95	0,47		0,575	0,42	
a-Kimotripszin	$k_r(h^{-1})$	0,054	1. lépcső 0,014	2. lépcső 0,16	0,05	1. lépcső 0,005	2. lépcső 0,10
	$c_T^{\infty}$ (mmol/L)	1,32	1,09		0,8	0,78	

18. táblázat: Reakció kinetikai konstansok illetve telítési koncentrációk

Látható, hogy PBS esetében a reakciókinetikai konstansok hasonló értékeket mutatnak, míg a telítési koncentráció mindkét konjugátum esetében a szálas mintánál kisebb. Azonban a pontos összehasonlításhoz figyelembe kell vennünk, hogy a szálas minták esetén fele annyi konjugátumot mértünk be ugyanolyan térfogatú kioldó közegbe. Ennek fényében elmondható, hogy a szálas minták meggyorsítják a hatóanyag leszakadását már PBS-ben, is illetve a GF=4-s minta esetében növelik a leszakadt dopamin telítési koncentrációját. Amennyiben a reakcióelegyben az α-Kimotripszin is jelen van, a különbség a por illetve szálas minták között jóval számottevőbb. Ha megvizsgáljuk a telítési koncentrációkat látható, hogy a szálas minták esetében a fele mennyiségű konjugátumok ellenére közel azonos a leszakadt dopamin mennyisége 48 óra után. Emellett megfigyelhető, hogy a szálak hirtelen feloldódása után, a reakció kinetikai konstansok majdnem a duplájára emelkednek, mint a por minták esetében. Az eredmények jól mutatják, hogy az elektrosztatikus szálképzés nagymértékben befolyásolja a hatóanyag leszakadás kinetikáját kovalens polimer-hatóanyag konjugátumok esetében. Ezen eredmények egybe vágnak E.-R. Kenawy és munkatársai által publikált eredményekkel különböző PVA-ketoprofen szálas és film konjugátumok esetében [157]. Azonban fontos megemlíteni, hogy részletes összehasonlítása a por, illetve szálas kovalens polimer-hatóanyag konjugátumoknak reakciókinetikai szempontból még nem található az irodalomban.

Mint már előzőekben említettem a dopamin könnyen degradálódik és kicsi a membrán permeábilitási képessége. A poli(aszpartamid) konjugátumok esetében azonban látható, hogy a dopamin védve van a degradációtól és alkalmazásukkal egy elnyújtott hatóanyag leadás érhető el. A nagy molekulatömegükből adódóan azonban a vér-agy gáton való átjutásuk passzív transzporttal valószínűleg nem lehetséges [158]. A dopamin vér-agy gáton keresztüli szállításához több hatóanyag szállító rendszer megtalálható az irodalomban [159–161], azonban ezen esetekben mindig fizikailag tartalmazta a hatóanyag szállító rendszer a dopamint. Éppen ezért vizsgáltuk PAMPA eljárással, hogy a konjugátumok, illetve kisebb leszakadt dopamin-aszparagin konjugátumok beoldódásuk során képesek-e valamilyen mértékben passzív transzporttal átjutni egy mesterséges membránon. PAMPA mérések segítségével modellezhetjük, hogy egy hatóanyag vagy formula képes-e passzív transzporttal átjutni bármilyen sejtmembránon. A 38. ábrán látható eredmények alapján elmondható, hogy mind 4 mind 28 óra elteltével az akceptor oldalon hasonló dopamin koncentráció mérhető mindegyik minta esetében. Azonban megvizsgálva a donor oldalt, a beoldódott konjugátum és így a dopamin mennyisége jóval alacsonyabb, ami magasabb megoszlási hányadost eredményez az akceptor/donor oldal között. Ebből ugyan nem jelenthetjük ki a konjugátumok modell membránon keresztüli permeábilitását, viszont elmondható, hogy a lipofilebb konjugátumok esetében már kisebb koncentráció is elégséges ugyanakkora membránpermeábilitás eléréséhez.

### 5.2.3 Citotoxicitási vizsgálatok por és szálas konjugátumok esetében

Polimer alapú hatóanyag szállító rendszerek citotxicitása nagymértékben befolyásolja alkalmazhatóságukat terápiás célra a klinikumban [162]. A dopamin önmagában 150 µM koncentráció felett citotoxikusnak bizonyult *in vitro* vizsgálatoknál több sejttípus esetén is [163, 164]. Éppen ezért először vizsgáltuk a szabad dopamin illetve a PSI-DA-AE 1:2 konjugátumra kötött dopamin citotoxikus hatását PDL őssejteken különböző koncentrációban. A 39. ábra eredményei alapján belátható, hogy a szabad dopamin hasonlóan más sejtekhez, PDL őssejtek esetén is citotoxikusnak bizonyult 100 µM-os koncentráció felett. A PSI-DA-AE 1:2 konjugátumra kötött dopamin azonban még 500 µM-os koncentrációban sem okozott citotoxikus hatást, sőt megnövelte az életképes sejtek mennyiségét a 3. napra. Ez abból következik, hogy a konjugátumról a dopamin lassan szabadul fel, így a dopamin koncentrációja nem éri el a

citotoxikus koncentrációt. Az eredmények azonban arra is rámutatnak, hogy a poli(aszpartamid)-dopamin konjugátum önmagában nem citotoxikus. Ezt a különböző szálas konjugátumokkal elvégzett kísérletek is igazolják (40. ábra). Mindkét kísérlet során a mikroszkópos képek egészséges fibroblaszt morfológiájú sejteket mutatnak, amely szintén egyezést mutat az életképességi kísérletek eredményeivel. A PDL őssejtek emellett képesek neurogén irányba differenciálódni [120, 165], amelyet a dopaminerg közeg képes indukálni [166]. Ehhez hasonló morfológiájú sejtek 39. b ábrán található fáziskontraszt mikroszkópos képeken is láthatóak, amelyből arra következtethetünk, hogy a PSI-DA-AE 1:2 konjugátum elindíthatja a PDL őssejtek neurogén irányú differenciációját.

### 5.3 PASP gélek alkalmazhatósága a szövetmérnökség területén

Poli(szukcinimid), illetve poli(aszparaginsav) gélekkel kapcsolatos publikációk száma nagymértékben megnövekedett az elmúlt 10-15 évben. A gélek pH [91, 107, 108], redox potenciál [106, 109, 111, 112] változására adott válaszreakcióját széles már, körűen tanulmányozták azonban а biokompatibilitásáról, illetve biodegradábilitásáról viszonylag kevés irodalom áll a rendelkezésünkre [167-169]. Éppen ezért a poli(szukcinimid) könnyű funkcionalizálhatósága, illetve a teljes irodalom hiánya a PASP gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságáról vezetett minket arra, hogy vizsgáljuk a PASP gélek kémiai összetételének és fizikai tulajdonságainak a hatását különféle sejtek viselkedésére. Ezen munka alapvetően 3 részre osztható: Az első részben vizsgáltuk a különböző összetételű PASP gélek stabilitását biológiailag releváns környezetben, illetve alkalmazhatóságát MG-63 oszteoblaszt típusú sejtek tenyésztésénél. Emellett vizsgáltuk a gélbe beépített RGD peptid szekvencia hatását a sejtek morfológiájára és életképességére. A második kísérletsorozatban az MG-63 sejtvonal helyett PDL humán őssejtet alkalmaztunk, illetve az előző kísérleteink alapján változtattuk a gélekben található tiol csoport mennyiségét és vizsgáltuk ennek hatását a sejtek morfológiájára, proliferációjára, illetve csont irányú differenciálódására. A harmadik részben a már előzőekben bemutatott dopaminnal módosított polimerekből szintetizáltunk géleket és ezeket alkalmaztuk szövettámaszként PDL őssejtek tenyésztésénél.

## 5.3.1 Különböző összetételű és rugalmasságú PASP gélek biodegradábilitása és szövettámaszként való alkalmazhatósága MG-63 sejtek tenyésztésénél

A munka ezen részében vizsgáltuk a PASP gélek kémiai összetételének (különböző keresztkötő molekulák, tiol illetve RGD oldallánc jelenléte) és mechanikai tulajdonságainak hatását MG-63 sejtek adhéziójára és proliferációjára. Kémiai keresztkötőként a természetben is előforduló putreszcint (1,4-diaminobután), illetve egy aminosav származékot, cisztamint használtunk (14. ábra).

A PSI használatának az egyik fő oka az volt, hogy könnyedén módosítható primer amin csoportot tartalmazó vegyületekkel, így különböző, a sejtek számára hasznos molekulák építhetők be a gélmátrixba. Ezt kihasználva, a PSI láncot módosítottuk különböző mértékben RGD (Arg-Gly-Asp) peptid szekvenciával, amely a szervezetben mediálja a sejtek adhézióját [170], éppen ezért széles körűen használt sejtek megtapadásának elősegítéséhez különféle felületeken [80, 81, 171–173]. Azonban a polimerek módosítása RGD-vel nehézkes, általában több reakció lépést igénylő feladat amelyeknél a legtöbb esetben a polimerre kötött RGD mennyisége nehezen szabályozható [173–176]. Kutatómunkánk során az RGD-t sikeresen kötöttük a poli(szukcinimid)-hez egy lépéses reakcióban enyhe reakciókörülmények között (10. ábra), amelyet az <sup>1</sup>H-NMR felvételek is igazolnak (43. ábra). Emellett a polimerre kötött RGD mennyisége könnyedén szabályozható volt a polimer/RGD aránnyal a reakció elegyben és az RGD tartalmú gélek szintéziséhez a reakció elegy egyszerűen felhasználható volt, különösebb tisztítási lépés beiktatása nélkül.

A gélek stabilitása illetve degradációja a sejttenyésztés alatt a szövettámaszként használt gél egyik legfontosabb tulajdonsága [80, 81, 177, 178]. Éppen ezért vizsgáltuk a különböző keresztkötőket tartalmazó PASP gélek degradációját tripszin, diszpáz és kollagenáz I jelenlétében (46. ábra). A kísérletek során a PASP-CYS minták stabilnak bizonyultak tripszin, illetve diszpáz jelenlétében azonban teljesen feloldódtak kollagenáz I hatására (46. a ábra). Galler és munkatársai hasonló eredményeket írtak le multidomain peptid hidrogélek esetében, amelyek teljesen feloldódtak 2 hét alatt kollagenáz I jelenlétében [179]. Azok a gélek amelyek vegyesen CYS és DAB keresztkötőt tartalmaztak azonban nem oldódtak fel kollagenáz I jelenlétében csak megduzzadtak. Ebből arra következtethetünk, hogy a kollagenáz I vagy a cisztamin-polimer peptid kötéseket bontja a gélekben, vagy a diszulfid hidak szakadnak fel a jelenlétében. Fontos megemlíteni, hogy a diszulfid hidak nagyon érzékenyek a környezet redox potenciál változására, amelyet a kollagenáz I befolyásolhat [180], azonban az irodalomban nem található olyan közlemény, amely konkrétan a kollagenáz I diszulfidbontó hatását leírná. Ebből kifolyólag valószínűsíthető, hogy a cisztamin melletti amid kötéseket bontja, hiszen a kollagénben is nagy mennyiségű diszulfid híd található.

A gélek mechanikai tulajdonsága nagy hatással van a sejtek megtapadására és proliferációjára. Az elasztikusan aktív hálóláncok koncentrációjának növekedésével, a gél "merevebbé" válik, amely elősegítheti a keményszöveti sejtek megtapadását és proliferációját [181]. Emiatt vizsgáltuk a gélek tömeg szerinti duzzadásfokának és az elasztikusan aktív hálóláncok koncentrációjának a változását a sejtek tenyésztése során használt tápoldatban (47. ábra). Mivel a PASP gélek térhálósítási foka (TF) széles keretek között változtatható a keresztkötők és a poli(szukcinimid) arányával így a kísérletekben két féle térhálósítási fokú (20-as és 40-es) gélt használtunk. Az eredményeink alapján elmondható, hogy a keresztkötők elméleti kétszeres változása 5-8 szoros különbséget eredményezett az elasztikusan aktív hálóláncok koncentrációjában (47. a és b ábra). A diszulfid hidakat tartalmazó gélek esetében (PASP-CYS-DAB és PASP-CYS) az elasztikusan aktív hálóláncok koncentrációja nagymértékben lecsökkent a tápoldatban, amelyet valószínűsíthetően a diszulfid hidak felszakadása okozott. Habár a PASP-CYS<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> minta esetében a gél tartalmazott permanens DAB keresztkötőt a gél 12 nap után teljesen szétesett és feloldódott. Ez annak köszönhető, hogy a diszulfid hidak felnyílása után a gél olyan kevés keresztkötőt tartalmazott, hogy a tápoldat ozmotikus nyomása szétroncsolta a polimer térhálót. A csak DAB keresztkötőt tartalmazó gélek (PASP-DAB és PASP-CYSE-DAB) esetében nem történt semmilyen változás a gélek mechanikai tulajdonságában a teljes megfigyelési idő alatt. Ezen eredmények indirekt bizonyítják az előző állítást, hogy ezen körülményeken a diszulfid hidak bomlanak csak fel a térhálóban. Emellett fontos megemlíteni, hogy a tápoldat különböző antioxidánsokat tartalmaz, mint például az L-cisztein, amelyek okozhatják a diszulfid hidak felnyílását. Amint azt a 48. ábra is mutatja, a vegyesen keresztkötött gélek nagymértékű tömegváltozáson mennek keresztül L-cisztein jelenlétében, amely a tiol-diszulfid csere következménye a cisztamin és az L-cisztein között.

Az MG-63 sejtek viselkedésének a nyomon követésére a PASP géleken WST-1 életképességi (kvantitatív analízis), illetve fázis- és kétfoton mikroszkópiát (kvalitatív analízis) alkalmaztunk. Az eredmények alapján elmondható, hogy az elasztikusan aktív

koncentrációjának növekedésével az életképes hálóláncok sejtek száma is szignifikánsan megemelkedett, amely eredmény összhangban van az irodalomban leírtakkal [182]. Emellett a WST-1 eredmények alapján elmondható, hogy a szabad tiol csoportok jelenléte elősegíti a sejtek letapadását, illetve proliferációját (49. ábra). A sejttenyésztés során használt tápoldatban lévő L-cisztein redukálja a diszulfid hidakat tiol csoportokká (48. ábra), ennek következtében a PASP-CYS<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintában szabad tiol csoportok jönnek létre, amelyek okozhatják a megnövekedett életképességet a 3. napra (49. ábra). A csak CYS vagy DAB keresztkötőt tartalmazó, illetve lágyabb gélek esetében (TF=40) az életképességi mutatók szignifikánsan kisebbek voltak mind az 1. mind a 3. nap után. Habár sok tiol tartalmú polimert használnak szövettámaszok készítéséhez [183-185], a tiol csoportok hatása a szövettámaszokban a sejtek proliferációs aktivitására még nincs pontosan leírva. Bae és munkatársai kísérleteik során megnövekedett életképességet mutattak ki MC3T3-E1 sejteknél, ha tiol tartalmú kitozán alapú szövettámaszt használtak sima kitozán helyett, ami egybevág az általunk leírt eredményekkel [184]. A megnövekedett életképesség oka lehet, hogy a sejtmembránban található transzport fehérjékben található L-cisztein szabad tiol csoportjai [186] és a gélben lévő szabad tiol csoportok között intermolekuláris diszulfid hidak jönnek létre.

A szabad tiol csoportot tartalmazó géleket tovább módosítottuk RGD szekvenciával, hogy növeljük a sejtek adhézióját és így az életképes sejtek mennyiségét. Érdekes, hogy az RGD jelenléte és mennyisége nem volt szignifikáns hatással az életképes sejtek mennyiségére (51. ábra). Grigore és munkatársai hasonló eredményekre jutottak alginát alapú szövettámasz esetében [187]. Mindemellett, az RGD jelenléte elősegítette az MG-63 sejtek kompakt klaszterekbe való szerveződését (51. ábra), amely csoportosulás az RGD-t nem tartalmazó PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minták esetében nem volt megfigyelhető (49. ábra). Ez a fajta viselkedés nélkülözhetetlen lehet ahhoz, hogy a sejtek megtartsák oszteoblaszt funkciójukat, mint ahogy azt T. Re'em és munkatársai leírták RGD-vel módosított alginát szövettámaszok esetében [188].

A mikroszkópos vizsgálatok alapján elmondható, hogy a gélek felületén található MG-63 sejtek natív morfológiával rendelkeznek, hasonlóan Chien és munkatársai által publikált eredményekhez [189]. Mind a fáziskontraszt (49. ábra) mind pedig a kétfoton mikroszkópos (50. ábra) felvételek egyértelmű bizonyítékkal szolgálnak arról, hogy az MG-63 sejtek képesek voltak megtapadni a gélek felületén.

120

Az RGD-vel módosított gélek esetében a sejtek kör alakú klaszterekbe rendeződtek (51. ábra) hasonlóan az irodalomban megtalálható esethez egyéb rákos sejtvonal esetében [190]. A különböző napokon készített kétfoton mikroszkópos képek (50. ábra) szintén alátámasztják a megnövekedett sejtek mennyiségét 1-ről 3 napra. A kétfoton vizsgálatok során tapasztalt PASP gélekhez tartozó zöld autofloureszcenciát először publikáltuk az irodalomban. Ennek segítségével a zölden emittáló gél mátrix könnyedén megkülönböztethető a pirosan emittáló festett sejtektől. Ezt kihasználva a gélek 3 dimenziós szerkezetét vizsgálhattuk és bizonyítékot szerezhettünk arról, hogy a sejtek képesek-e bejutni a gél mátrixba. A vertikális tengely mentén készített felvételekből (Z stack) rekonstruált 3 dimenziós képek (50. ábra és 52. ábra), egyértelműen bizonyítják, hogy a sejtek és a gélmátrix ugyanabban a magasságban találhatóak. 3 nap elteltével a sejtek közel 30 µm mélyen képesek voltak behatolni a gél mátrixba, amely közel azonos egy sejtnek a méretével. Erre a gél sima felületének megváltozásából is következtethetünk. Ezen eredmények szintén alátámasztják, hogy a PASP gélek biodegradábilisek, hiszen a sejtek csak a gélmátrix megemésztésével képesek bejutni a gélek belsejébe.

### 5.3.2 PDL őssejtek tenyésztése különböző összetételű PASP géleken

Mivel hosszú távú célunk különböző mesterséges szövetek felépítése PASP gélek segítségével, ezért az előző kísérletekben használt MG-63-as oszteoszarkóma sejtvonalat human eredetű periodontális ligamentum (PDL) őssejtekre cseréltük. Az őssejtek korlátlan önmegújító képességgel rendelkeznek, illetve képesek különböző megfelelően differenciált utódsejtek létrehozására, így alkalmazhatóak а szövetmérnökség területén. Napjainkban a kutatások főként a felnőtt human őssejtekre fokuszálnak [191, 192], amelyek egyik ígéretes képviselője a peridontális ligamentum eredetű őssejt. Ezen sejtek hasonló differenciációs képességekkel rendelkeznek, csont, porc, zsír illetve idegsejt irányba, mint a csontvelő eredetű őssejtek, azonban izolációjuk jóval egyszerűbb feladat [120, 193-197]. Ezen tulajdonságok, előzetes ismereteink illetve a tény miatt, hogy ezen sejtek szövettámaszon való tenyésztésével foglalkozó irodalom elég hiányos [198-201], kezdtünk el foglalkozni PDL eredetű őssejtek PASP géleken való tenyésztésével.

Az első kísérlet sorozatban megvizsgáltuk, hogy a PDL őssejtek, hasonlóan az MG-63 sejtekhez, a merevebb és tiol csoportot tartalmazó géleken produkálják-e a

legmagasabb életképességi mutatót. Az 53. ábra alapján elmondható, hogy a PDL sejtek esetében is a legmagasabb életképesség a PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintán volt mérhető, azonban a tiol csoportot nem tartalmazó, de merevebb (PASP-DAB<sub>20</sub>) illetve a lágyabb de tiol csoportokat tartalmazó (PASP-CYSE<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub>) géleken is magas életképességet mértünk. Az MG-63 sejtektől eltérően azonban a PDL sejtek életképessége majdnem minden gél típus esetében lecsökkent a 3. napra, éppen ezért vizsgáltuk az életképesség változását 14 napig a 3 legjobb eredményt mutató géltípus esetében. Az 53. ábra alapján látható, hogy a 7. napra az életképes sejtek mennyisége nagymértékben megnövekedett, illetve a PASP-CYSE<sub>40</sub>-DAB<sub>40</sub> minta kivételével a 14. napra tovább nőtt. Ezen eredményeket a fáziskontraszt és két foton mikroszkópos képek is alátámasztották, amelyeken megfigyelhető, hogy a sejtek az irodalomban is megtalálhatóhoz [120, 195, 196, 202] hasonló egészséges fibroblaszt morfológiát vettek fel és a 14 napra szinte a gél teljes felületét beborították (53. ábra). A 3. napra történő életképesség csökkenés valószínűsíthető oka, hogy a sejtek izolálása során egy primer sejtkultúrát kapunk eredményül, amely többféle sejtvonalat tartalmaz [203]. Ebből kifolyólag a sejtvonalak között egy természetes szelekció játszódik le, amelynek következtében az életképes sejtek mennyisége lecsökken. Ezen állítást a mikroszkópos képek is alátámasztják, mivel a felvételeken többféle alakú sejt figyelhető meg. A kétfoton mikroszkóppal készített 3 dimenziós képen látható, hogy mindhárom gél típus esetén a sejtek képesek voltak bejutni a gélmátrixba hasonlóan az MG-63 sejtekhez. Ezen eredmények bizonyítják a PASP gélek biokompatibilitását és biodegradábilitását humán sejtek jelenlétében is.

Mivel látható, hogy PDL őssejtek esetén is a tiol csoportok jelenléte kedvező hatással van a PDL őssejtek életképességére, ezért a vizsgálatokat elvégeztük különböző mennyiségben tiol csoportot tartalmazó gélek esetén is. A vizsgálatok előtt azonban megvizsgáltuk, hogy a szabad tiol csoportok ténylegesen jelen vannak-e, és a mennyiségük eltérő-e a különböző mintákban. Az Ellman reagenssel történő meghatározás alapján elmondható, hogy a gélek szintézise során a ciszteaminban található tiol csoportok szinte teljesen oxidálódnak és diszulfid hidak jönnek létre (16. táblázat). Ezen diszuflid hidak a DTT-s kezelés hatására felnyílnak és újra tiol csoportokká alakulnak, amelyeknek a mennyisége a gélben nő a szintézis során alkalmazott ciszteamin mennyiségének növelésével. Az eredmények alapján az is elmondható, hogy a gyakorlatban mért tiol csoportok mennyisége lényegesen kisebb,

mint az elméleti mennyiség, ami a tiol csoportok egy részének diszulfid hidakká történő visszaalakulásával magyarázható a gélek szárítása során (16. táblázat). Ezt a feltevést a RAMAN mérések is alátámasztják, ahol a tiol csoportokra jellemző csúcs (-SH) intenzitásának csökkenése illetve teljes eltűnése már a CYSE<sub>10</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetén bekövetkezik (45. ábra). Azonban a szabad tiol csoportok oxidációja spontán nem tud bekövetkezni duzzadt gél esetében [111, 112, 204], így a sejttenyésztés során feltételezhetően jóval nagyobb a szabad tiol csoportok mennyisége.

Az sejttenyésztési eredmények azt mutatják, hogy a tiol csoport mennyiségének további növelése (PASP-CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> illetve PASP-CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub>) további kedvező hatással van a sejtek életképességére (54. ábra). Ez köszönhető a már előzőekben említett intermolekuláris diszulfid hidaknak illetve a nagyobb graftolási fok miatt lecsökkent negatív töltéseknek a polimer mátrixon [205]. A fáziskontraszt mikroszkóp felvételek (54. ábra) jó korrelációt mutatnak az életképességi adatokkal illetve megfigyelhető a sejtek egészséges fibroblaszt morfológiája [120, 195, 196, 202].

Mindemellett, vizsgáltuk a sejtek spontán, illetve indukált oszteogén differenciációs képességét a PASP-DAB<sub>20</sub>, PASP-CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub>, PASP-CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub> illetve PASP-CYSE20-DAB20 minták esetében. Amint az az 54. ábrán látható, az oszteogén tápoldat alkalmazásával elő tudtuk idézni a sejtek differenciációját a tiol tartalmú géleken. Megfigyelhető, hogy a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében nagyobb ALP aktivitást mértünk a többi mintához képest, ami a differenciálódott utódsejtek számának a növekedésére utal. Ez összhangban van az életképességi adatokkal is, hiszen nagyobb sejtszám esetén több sejt képes differenciálódni. Emellett látható, hogy tiol csoport tartalmú minták esetében az idő előre haladtával a differenciálódott utódsejtek száma is monoton növekszik. Abban az esetben, amikor nem alkalmaztunk oszteogén differenciációt elősegítő tápoldatot csak a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében volt jelentős ALP aktivitás mérhető. Ezen a mintán a differenciálódott utódsejtek száma az idő előre haladtával monoton növekedett a 14-dik napig. Ebből arra következtethetünk, hogy a gél mátrix ilyen fokú tiol csoport tartalma önmagától indukálja a sejtek oszteogén irányú differenciációját. A CYSE2-DAB20 minta esetében készített két foton mikroszkópiás felvételeken mind a kontroll mind az oszteogén tápoldat esetében sűrű sejtcsoportosulások figyelhetőek meg. Ezen sejtcsoportosulások nagy hasonlóságot mutatnak az irodalomban publikált esetekkel, ahol PDL őssejtek oszteogén irányú differenciációját vizsgálták [206-209]. Megfigyelhető, hogy a csoportosulások mérete az oszteogén tápoldatnál nagyobb, amely szintén alátámasztja az ALP mérések eredményeit. A CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében a kontroll minta esetében készült felvételeken nem láthatóak ilyen jellegű sejtcsoportosulások, és az oszteogén táppal kezelt mintánál is csak kismértékben figyelhetők meg. Ha összehasonlítjuk a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> kontroll tápoldatban és CYSE<sub>5</sub>-DAB<sub>20</sub> oszteogén tápoldatban mért ALP aktivitás eredményeit látható, hogy közel azonosak. Ezen eredményeket a kétfoton felvételek hasonlósága is alátámasztja. A háromdimenziós felvételeken látható, hogy a CYSE<sub>2</sub>-DAB<sub>20</sub> oszteogén minta esetén szinte a gél teljes felületén egy konfluens, nagy sejtsűrűségű réteg alakult ki, amely szintén jó egyezést mutat az előző eredményekkel. Így vizsgálataink arra utalnak, hogy a gélekben található nagyobb tiol csoport mennyiség indukálja a PDL őssejtek oszteogén irányú differenciációját. Habár erre konkrét eredmény az irodalomban nem található, a PDL őssejtek H<sub>2</sub>S által indukált oszteogén differenciációját már korábban leírták [210, 211].

## 5.3.3 PDL őssejtek tenyésztése dopamin tartalmú PASP géleken

Előzetes vizsgálataink alapján látható, hogy a dopaminnal módosított PSI nem toxikus PDL őssejtekre, sőt bizonyos esetekben kedvező hatással volt a sejtek életképességének változására (40. ábra). Az irodalomban több olyan publikáció is található, ahol polidopamint használtak sejtek adhéziójának [212, 213], proliferációjának elősegítésére [214], illetve hogy indukálják idegi irányú differenciációjukat [215, 216]. A dopamin tartalmú PASP gélek különféle alkalmazását már vizsgálta több kutatócsoport is [122, 137], azonban szövettámaszként való alkalmazhatóságára még jelenleg nem található irodalmi adat. Mivel a PDL őssejtek képesek idegi irányú differenciációra [120, 166] ezért a már előzőekben vizsgált tiol tartalmú géleket tovább módosítottuk dopaminnal és vizsgáltuk PDL őssejtek életképességének és morfológiájának változását.

Az 55. ábra eredményei alapján elmondható, hogy a túlságosan nagy dopamin koncentráció a gélekben citotoxikus hatású. Ezen eredmények összhangban vannak előzetes eredményeinkkel, amikor is vizsgáltuk a dopamin tartalmú konjugátum koncentrációjának hatását a sejtek életképességére (39. ábra). Azonban látható, hogy a dopamin mennyiségének csökkentésével (DA<sub>15</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> és DA<sub>20</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub>) az életképes sejtek száma jelentős mértékben megnő. A fáziskontraszt felvételek alapján elmondható, hogy a 14. napra a gélek felületén egy

124

konfluens sejtréteg alakul ki egészséges, fibroblaszt típusú morfológiával. A felvételeken neuron sejt morfológiájú sejteket nem láthatunk, azonban ez még nem zárja ki az idegi irányú differenciációt. Ennek további vizsgálata későbbi kutatómunkánk témája. A dopamin jelenlétének jótékony hatása azonban a háromdimenziós kétfoton felvételeken látható (57. ábra). Megfigyelhető, hogy míg 3 nap elteltével a sejtek főleg a gélek felületén helyezkednek el, addig 14 nap eltelte után nagymértékben 100 illetve 170 µm mélyen behatolnak a gélmátrixba, mely a korábban említett gélek esetében az 1 sejtréteg (30 µm) vastagság többszörösét jelenti. Fontos kiemelni, hogy a felvételeken jól látható, hogy a sejtek megemésztették a gélt, mint egy gödröket ásva a gélek felszínébe. A sejtek méreteit (körülbelül 30 µm) összevetve ezen mélyedések mélységével elmondható, hogy a DA<sub>15</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> minta esetében mintegy 3, míg a DA<sub>20</sub>-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub> mintegy 5-6 sejtréteg mélységig hatoltak be a sejtek a gélekbe. Ezen eredmények igazolják, hogy a dopamin elősegíti a sejtek 3 dimenziós migrációját, illetve növeli a gélek biodegradábilitását.

## 6 Következtetések, új tudományos eredmények

Kutatómunkám főbb tudományos eredményei a következő pontokba foglalhatóak össze:

- Sikeresen állítottam elő olyan poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, amelyek elnyújtott hatóanyag leadást biztosítanak.
- Sikeresen dolgoztam ki egy hatóanyag leszakadási kinetikai leírást kovalens polimer-hatóanyag konjugátumokra, amely használható lehet mind rossz mind pedig jó vízoldhatóságú konjugátumok esetében
- 3. Sikeresen állítottam elő homogén, nano-szálas poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, amely formulázása nagy hatással van a hatóanyag leszakadás kinetikájára. Az irodalomban elsőként vetettem össze a hatóanyag leszakadás kinetikáját tömb, illetve szálas konjugátumok esetén.
- 4. Bebizonyítottam a poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok biokompatibilitását humán PDL őssejtek használatával.
- Meghatároztam poli(aszparaginsav) gélek azon paramétereit, amelyek növelik a stabilitásukat illetve csökkentik biodegradábilitásukat az *in vitro* sejttenyésztés körülményein.
- 6. Megállapítottam, hogy a gélek merevségének a növelése és a tiol csoportok jelenléte előnyös hatással van mind MG-63 mind pedig humán PDL őssejtek életképességére és morfológiájára. Bebizonyítottam, hogy az RGD peptid szekvencia nem csak a sejtek letapadását, de klaszterekbe való rendeződését is indukálja.
- 7. Rámutattam, hogy a tiol csoport mennyiségének a növelésével a gélekben előidézhető PDL őssejtek spontán oszteogén irányú differenciációja.
- Megállapítottam, hogy a dopamin beépítésével a gélekbe a PDL őssejtek horizontális migrációja előidézhető illetve növelhető a gélek sejtek általi degradációja.

### 7 Összefoglalás

Az orvosbiológiai és a gyógyszerészeti kutatások középpontjában egyre gyakrabban találkozhatunk különböző biopolimerekre épülő anyagokkal. Ilyen anyagokat használhatunk szövettámaszként a mesterséges szövetépítés területén illetve hatóanyag szállító rendszerekként. Poli(aminosav)-ak ilyen jellegű kutatásokhoz kiváló alapanyagok lehetnek, hiszen struktúrájuk nagymértékben hasonlít a szervezetben megtalálható fehérjékre. A poli(aszparaginsav), ellentétben a legtöbb poli(aminosav)-al, könnyedén szintetizálható nagy molekulatömeggel aszparaginsav termikus polikondenzációjával, ezért kutatásomban a poli(aszparaginsav) és származékainak az előzőleg említett alkalmazhatóságára fokuszáltam.

Sikeresen szintetizáltam különböző poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, változtatva a hatóanyag leadás szempontjából fontos fizikai (pl.: oldhatóság, lipofilitás) és kémiai tulajdonságokat. Elektrosztatikus szálképzéssel nano-szálas implantátumokat alakítottam ki a konjugátumokból. Meghatároztam a dopamin leszakadásának kinetikáját, illetve egy részletes kinetikai leírást dolgoztam ki a hatóanyag felszabadulásának jellemzésére. Citotoxicitási vizsgálatok alapján elmondható, hogy a konjugátumok kevésbé citotoxikusak mint a szabad dopamin, illetve előidézhetik PDL őssejtek idegi irányú differenciálódását.

Vizsgáltam különböző összetételű és mechanikai tulajdonságokkal rendelkező poli(aszparaginsav) gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságát először MG-63 oszteoszarkóma sejtvonallal. A gélekben a sejttenyésztés előtt kialakított tiol csoportok, illetve a gélek merevségének növelése nagymértékben megnövelik a sejtek letapadását, emellett a proliferációját. Sikeresen építettem be RGD peptidszekvenciát a polimer térhálóba, amely a sejtek spontán klaszterekbe való szerveződését indukálta. Humán PDL őssejtek 14 nap után integrálódnak a gélmátrixba és egészséges, fibroblaszt típusú morfológiát vesznek fel. A tiol csoportok mennyiségének növelésével a gélmátrixban indukálhatjuk a sejtek spontán oszteoblaszt irányú differenciációját. Amennyiben dopaminnal módosítjuk a géleket, elősegíthetjük a sejtek migrációját a gél belseje felé, így tényleges 3 dimenziós szöveti struktúrát létrehozva.

Eredményeim jól mutatják, hogy a poli(aszparaginsav), illetve származékai kiválóan alkalmazhatóak különböző, az orvosbiológia és a gyógyszerészet területén széleskörűen használt anyagok felépítéséhez, ezzel is új alternatívát nyújtva a kommerciális polimerek mellett.

127

#### 8 Summary

Nowadays, biopolymer based materials can be more often found in the focus of medical and pharmaceutical researches. These materials can be used as scaffolds in the field of tissue engineering or as drug delivery systems. Poly(amino acid)s are promising base materials for these applications due to their protein related structure, which provide them biocompatibility and biodegradability. Poly(aspartic acid), as opposed to other poly(amino acid)s, can be easily synthesized by thermal polycondensation of aspartic acid. In my research, I have focused on the application of the synthetically prepared poly(aspartic acid) and their derivatives as a drug delivery system or as a scaffold material.

I have successfully synthesized poly(aspartamide)-dopamine conjugates, changing their physical properties, such as solubility, lipophilicity and chemical constitution, which are affecting drug release. Nano-sized fibrous implants were prepared from the conjugates by electrospinning. The dopamine release from the conjugates was investigated and a detailed description for the kinetics of drug release was developed. The cytotoxicity measurements showed that the conjugates are less cytotoxic than free dopamine and would induce the neural differentiation of periodontal ligament (PDL) stem cells.

I have investigated the applicability of poly(aspartic acid) hydrogels with different chemical and mechanical properties as a scaffold material for MG-63 osterosarcoma cell cultivation. The presence of free thiol groups and increased toughness of the hydrogels significantly enhanced the attachment and the proliferation of cells. I have successfully modified the hydrogels with RGD tripeptide sequence, which induced the spontaneous cluster formation of cells. According the further results PDL stem cells were able to integrate in to the gel matrix after 14 days and obtain their native, fibroblast morphology. By increasing the amount of thiol groups in the hydrogels, the spontaneous osteogenic differentiation of the cells might be induced. The presence of the dopamine in the hydrogels might facilitate the cell migration in to the hydrogels, producing 3 dimensional tissue-like structures.

As a consequence, the poly(aspartic acid) and its derivatives can be used in different medical and pharmaceutical applications, by providing a promising alternative material instead of the commercial polymer molecules.

### 9 Irodalomjegyzék

- B. Iván (2006) Polimerek, mint a jövő másodlagos alapanyagai. Magy Kémiai Folyóirat 4:157.
- Kumbar S., Laurencin CT. (2014) Natural and Synthetic Biomedical Polymers, First Edit. Elsevier Inc., Burlington
- Ye J, Shin MC, Liang Q, He H, Yang VC (2015) 15 years of ATTEMPTS: A macromolecular drug delivery system based on the CPP-mediated intracellular drug delivery and antibody targeting. J Control Release 205:58–69.
- Hrubý M, Filippov SK, Štěpánek P (2015) Smart polymers in drug delivery systems on crossroads: Which way deserves following? Eur Polym J 65:82–97.
- Nair LS, Laurencin CT (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. Prog Polym Sci 32:762–798.
- Fonseca AC, Gil MH, Simões PN (2014) Biodegradable poly(ester amide)s A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications. Prog Polym Sci 39:1291–1311.
- Tabata Y (2009) Biomaterial technology for tissue engineering applications. J R Soc Interface 6:S311–S324.
- Kai D, Liow SS, Loh XJ (2015) Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. Mater Sci Eng C 45:659–670.
- Thatte S, Datar K, Ottenbrite RM (2005) Perspectives on: Polymeric drugs and drug delivery systems. J Bioact Compat Polym 20:585–601.
- Allen TM, Cullis PR (2003) DRUG DISCOVERY Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. 10388:1818–1823.
- Mathiowitz E (1999) Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, 2nd ed. Wiley, New York USA
- Park K (2014) Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. J Control Release 190:3–8.
- Maysingers D (1995) Review: Microparticles with neuroactive agents. J Microencapsul 12:343–362.
- Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC (2016) Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. Chem Rev 116:2602–2663.
- 15. Yang D, Lee JS, Choi CK, Lee HP, Cho SW, Ryu WH (2018) Microchannel system

for rate-controlled, sequential, and pH-responsive drug delivery. Acta Biomater 68:249–260.

- 16. Kang Y, Zhang X-M, Zhang S, Ding L-S, Li B-J (2015) pH-responsive dendritic polyrotaxane drug-polymer conjugates forming nanoparticles as efficient drug delivery system for cancer therapy. Polym Chem 6:2098–2107.
- Khandare J, Minko T (2006) Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. Prog Polym Sci 31:359–397.
- Kost J, Langer R (2012) Responsive polymeric delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 64:327–341.
- Gudadhe JA, Yadav A, Gade A, Marcato PD, Durán N, Rai M (2014) Preparation of an agar-silver nanoparticles (A-AgNp) film for increasing the shelf-life of fruits. IET Nanobiotechnology 8:190–195.
- Azevedo MA, Bourbon AI, Vicente AA, Cerqueira MA (2014) Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. Int J Biol Macromol 71:141–146.
- Solorio L., Zwolinski C., Lund W. A. MJFJPS (2010) Gelatinmicrospheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors. J Tissue Eng Regen Med 4:514–523.
- Montalbán M, Coburn J, Lozano-Pérez A, Cenis J, Víllora G, Kaplan D (2018) Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. Nanomaterials 8:126.
- Xu H, Yao Q, Cai C, Gou J, Zhang Y, Zhong H, Tang X (2015) Amphiphilic poly(amino acid) based micelles applied to drug delivery: The in vitro and in vivo challenges and the corresponding potential strategies. J Control Release 199:84–97.
- Lelle M, Kaloyanova S, Freidel C, Theodoropoulou M, Musheev M, Niehrs C, Stalla G, Peneva K (2015) Octreotide-Mediated Tumor-Targeted Drug Delivery via a Cleavable Doxorubicin-Peptide Conjugate. Mol Pharm 12:4290–4300.
- 25. Sun H, Meng F, Dias A a., Hendriks M, Feijen J, Zhong Z (2011) α-Amino acid containing degradable polymers as functional biomaterials: Rational design, synthetic pathway, and biomedical applications. Biomacromolecules 12:1937– 1955.
- 26. Satchi-Fainaro R, Wrasidlo W, Lode HN, Shabat D (2002) Synthesis and

characterization of a catalytic antibody-HPMA copolymer-conjugate as a tool for tumor selective prodrug activation. Bioorganic Med Chem 10:3023–3029.

- Tong R, Cheng J (2007) Anticancer polymeric nanomedicines. Polym Rev 47:345– 381.
- Li J, Sabliov C (2013) PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. Nanotechnol Rev 2:241–257.
- 29. Newman MJ (2000) Vaccines adjuvants. Expert Opin Ther Pat 10:297-314.
- Peyratout CS, D\u00e4hne L (2004) Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: From multilayers to smart containers. Angew Chemie - Int Ed 43:3762–3783.
- 31. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R (2006) Electrospun nanofibers: Solving global issues. Mater Today 9:40–50.
- Virág T, Balázs K (2014) Biopolimerek az orvostudományban Lebontható vázanyagok. 275–279.
- Baji A, Mai YW, Wong SC, Abtahi M, Chen P (2010) Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. Compos Sci Technol 70:703–718.
- 34. 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 (Guildf) 46:4799–4810.
- 35. S. Ramakrishna, K. Fujivara, W.-E. Teo, T.-C. Lim ZM (2005) An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, 1st ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore
- 36. Pham QP, Sharma U, Mikos AG (2006) Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. Tissue Eng 0:60509065116001.
- Hu X, Liu S, Zhou G, Huang Y, Xie Z, Jing X (2014) Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. J Control Release 185:12–21.
- Meinel AJ, Germershaus O, Luhmann T, Merkle HP, Meinel L (2012) Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. Eur J Pharm Biopharm 81:1–13.
- 39. Parwe SP, Chaudhari PN, Mohite KK, Selukar BS, Nande SS, Garnaik B (2014) Synthesis of ciprofloxacin-conjugated poly (L-lactic acid) polymer for nanofiber fabrication and antibacterial evaluation. Int J Nanomedicine 9:1463–1477.

- 40. Thakur VK, Yan J, Lin M-F, Zhi C, Golberg D, Bando Y, Sim R, Lee PS (2012) Novel polymer nanocomposites from bioinspired green aqueous functionalization of BNNTs. Polym Chem 3:962–969.
- 41. Jalvandi J, White M, Gao Y, Truong YB, Padhye R, Kyratzis IL (2017) Polyvinyl alcohol composite nanofibres containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release. Mater Sci Eng C 73:440–446.
- 42. Nie H, Beng WS, Fu YC, Wang CH (2008) Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery. Biotechnol Bioeng 99:223–234.
- 43. Bolgen N., Vargel I., Korkusuz P., Menceloglu Y. Z. EP (2007) In Vivo Performance of Antibiotic Embedded Electrospun PCL Membranes for Prevention of Abdominal Adhesions. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 81:530.
- Casper CL, Yamaguchi N, Kiick KL, Rabolt JF (2005) Functionalizing electrospun fibers with biologically relevant macromolecules. Biomacromolecules 6:1998– 2007.
- 45. Lu Y, Jiang H, Tu K, Wang L (2009) Mild immobilization of diverse macromolecular bioactive agents onto multifunctional fibrous membranes prepared by coaxial electrospinning. Acta Biomater 5:1562–1574.
- 46. Siafaka PI, Okur NÜ, Mone M, Giannakopoulou S, Er S, Pavlidou E, Karavas E, Bikiaris DN (2016) Two different approaches for oral administration of voriconazole loaded formulations: Electrospun fibers versus β-cyclodextrin complexes. Int J Mol Sci 17:1–15.
- 47. Chou SF, Carson D, Woodrow KA (2015) Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. J Control Release 220:584–591.
- 48. Balogh A, Farkas B, Faragó K, Farkas A, Wagner I, Van Assche I, Verreck G, Nagy ZK, Marosi G (2015) Melt-blown and electrospun drug-loaded polymer fiber mats for dissolution enhancement: A comparative study. J Pharm Sci 104:1767–1776.
- 49. Ranganath SH, Wang CH (2008) Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. Biomaterials 29:2996–3003.
- 50. Zhang YZ, Wang X, Feng Y, Li J, Lim CT, Ramakrishna S (2006) Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)encapsulated poly(ε-caprolactone) nanofibers for sustained release. Biomacromolecules 7:1049–1057.

- 51. 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 108:237–243.
- Rogovina LZ, Vasil'ev VG, Braudo EE (2008) Definition of the concept of polymer gel. Polym Sci Ser C 50:85–92.
- 53. Osada Y (1993) YOSHIHITO OSADA\* and JIANPING GONG t. 18:187–226.
- 54. Haider H, Yang CH, Zheng WJ, Yang JH, Wang MX, Yang S, Zrínyi M, Osada Y, Suo Z, Zhang Q, Zhou J, Chen YM (2015) Exceptionally tough and notchinsensitive magnetic hydrogels. Soft Matter 11:8253–8261.
- 55. Stirling T, Zrínyi M (2015) A novel method to determine the elastic modulus of extremely soft materials. Soft Matter 11:4180–4188.
- 56. Jiwei Cui , Mattias Björnmalm , Kang Liang , Chenglong Xu , James P. Best , Xuehua Zhang FC (2014) Super-Soft Hydrogel Particles with Tunable Elasticity in a Microfl uidic Blood Capillary Model Jiwei. Adv Mater 26:7295–7299.
- 57. Flory PJ, Rehner J (1943) Statistical Mechanics of Cross Linked Polymer Networks I. Rubberlike Elasticity. J Chem Phys 11:512.
- Flory PJ (1953) Principles of polymer chemistry, 1st ed. Cornell Universoty Press, Ithaca
- 59. Horkay F, Nagy M (1980) Elasticity of swollen polyvinyl alcohol and poly(vinyl acetate) networks. Polym Bull 3:457–463.
- Wu XS, Hoffman AS, Yager P (1992) Synthesis and characterization of thermally reversible macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. J Polym Sci Part A Polym Chem 30:2121–2129.
- 61. Tomatsu I, Peng K, Kros A (2011) Photoresponsive hydrogels for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev 63:1257–1266.
- Shiga T (1997) Deformation and Viscoelastic Behavior of Polymer Gels in Electric Fields. Adv Polym Sci 134:131–163.
- 63. Liu TY, Hu SH, Liu TY, Liu DM, Chen SY (2006) Magnetic-sensitive behavior of intelligent ferrogels for controlled release of drug. Langmuir 22:5974–5978.
- Rein V. Ulijn, Nurguse Bibi, Vineetha Jayawarna, Paul D. Thornton, Simon J. Todd, Robert J. Mart, Andrew M. Smith, Gough JE (2007) Bioresponsive hydrogels. Mater Today 10:40–48.
- 65. Khare AR, Peppas NA, Massimo G, Colombo P (1992) Measurement of the

swelling force in ionic polymeric networks I. Effect of pH and ionic content. J Control Release 22:239–244.

- 66. Guan X, Avci-Adali M, Alarçin E, Cheng H, Kashaf SS, Li Y, Chawla A, Jang HL, Khademhosseini A (2017) Development of hydrogels for regenerative engineering. Biotechnol J 12:1–19.
- 67. Cascalho M, Platt JL (2005) New technologies for organ replacement and augmentation. Mayo Clin Proc 80:370–378.
- 68. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue Engineering. Science (80-) 260:920-5.
- 69. Atala A (2012) Tissue engineering of reproductive tissues and organs. Fertil Steril 98:21–9.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science 324:1673–7.
- Rozario T, DeSimone DW (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. Dev Biol 341:126–40.
- Senger DR, Perruzzi CA (1996) Cell migration promoted by a potent GRGDScontaining thrombin-cleavage fragment of osteopontin. Biochim Biophys Acta -Mol Cell Res 1314:13–24.
- 73. M.W.King (2013) Integrative Medical Biochemistry Examination and Board Review, first. LANGE, Indiana
- 74. Santos E, Hernández RM, Pedraz JL, Orive G (2012) Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: Translation from 2D to 3D. Trends Biotechnol 30:331–341.
- 75. Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R, Peppas NA (2010) Bioinspired materials for controlling stem cell fate. Acc Chem Res 43:419–428.
- 76. Hall AK (1983) Stem cell is a stem cell is a stem cell. Cell 33:11–12.
- 77. Chan G, Mooney DJ (2008) New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. Trends Biotechnol 26:382–92.
- 78. Cools P, Ghobeira R, Van Vrekhem S, De Geyterand N, Morent R (2016) Nonthermal Plasma Technology for the Improvement of Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine - A Review. Plasma Sci Technol - Prog Phys States Chem React 201–240.
- 79. Pramanik S, Pingguan-Murphy B, Abu Osman NA (2012) Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: Bone tissue. Sci Technol Adv Mater. doi:

10.1088/1468-6996/13/4/043002

- Drury JL, Mooney DJ (2003) Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. Biomaterials 24:4337–4351.
- Lee KY, Mooney DJ (2001) Hydrogels for Tissue Engineering. Chem Rev 101:1869–1880.
- Lee CH, Singla A, Lee Y (2001) Biomedical applications of collagen. Int J Pharm 221:1–22.
- 83. Vercruysse KP, Marecak DM, Marecek JF, Prestwich GD (1997) Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid. Bioconjug Chem 8:686–694.
- Mensitieri M, Ambrosio L, Nicolais L, Bellini D, O'Regan M (1996) Viscoelastic properties modulation of a novel autocrosslinked hyaluronic acid polymer. J Mater Sci Mater Med 7:695–698.
- 85. Mi FL, Kuan CY, Shyu SS, Lee ST, Chang SF (2000) Study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. Carbohydr Polym 41:389– 396.
- Hasson D, Shemer H, Sher A (2011) State of the art of friendly "green" scale control inhibitors: A review article. Ind Eng Chem Res 50:7601–7607.
- Zohuriaan-Mehr MJ, Pourjavadi A, Salimi H, Kurdtabar M (2009) Protein- and homo poly(amino acid)-based hydrogels with super-swelling properties. Polym Adv Technol 20:655–671.
- Nakato T, Yoshitake M, Matsubara K, Tomida M, Kakuchi T (1998) Relationships between structure and properties of poly(aspartic acid)s. Macromolecules 31:2107– 2113.
- Matsubara K, Nakato T, Tomida M (1997) 1 H and 13 C NMR Characterization of Poly (succinimide) Prepared by Thermal Polycondensation of L -Aspartic Acid 1. 9297:2305–2312.
- 90. Nakato T, Kusuno A, Kakuchi T (2000) Synthesis of poly(succinimide) by bulk polycondensation of L-aspartic acid with an acid catalyst. J Polym Sci Part A Polym Chem 38:117–122.
- 91. Varga Z, Molnár K, Torma V, Zrínyi M (2010) Kinetics of volume change of poly(succinimide) gels during hydrolysis and swelling. Phys Chem Chem Phys

12:12670-5.

- 92. Horvát G, Gyarmati B, Berkó S, Szabó-Révész P, Szilágyi BÁ, Szilágyi A, Soós J, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Caramella C, Csányi E, Budai-Szucs M (2015) Thiolated poly(aspartic acid) as potential in situ gelling, ocular mucoadhesive drug delivery system. Eur J Pharm Sci 67:1–11.
- 93. Wang B, Jeon YS, Park HS, Kim YJ, Kim JH (2015) Mussel-mimetic self-healing polyaspartamide derivative gel via boron-catechol interactions. Express Polym Lett 9:799–808.
- 94. Lim S, Nguyen MP, Choi Y, Kim J, Kim D (2017) Bioadhesive Nanoaggregates Based on Polyaspartamide- g -C18/DOPA for Wound Healing. Biomacromolecules acs.biomac.7b00584.
- 95. Di Meo C, Cilurzo F, Licciardi M, Scialabba C, Sabia R, Paolino D, Capitani D, Fresta M, Giammona G, Villani C, Matricardi P (2015) Polyaspartamide-Doxorubicin Conjugate as Potential Prodrug for Anticancer Therapy. Pharm Res 32:1557–1569.
- 96. Sharma A, Kundu S, Reddy M A, Bajaj A, Srivastava A (2013) Design and Engineering of Disulfide Crosslinked Nanocomplexes of Polyamide Polyelectrolytes: Stability under Biorelevant Conditions and Potent Cellular Internalization of Entrapped Model Peptide. Macromol Biosci 13:927–937.
- 97. Sharma A, Srivastava A (2013) Pronounced influence of pH, metal-ion and solvent isotope on the thermoresponse of synthetic amphiphilic polypeptides. Polym Chem 4:5119.
- Németh C, Szabó D, Gyarmati B, Gerasimov A, Varfolomeev M, Abdullin T, László K, Szilágyi A (2017) Effect of side groups on the properties of cationic polyaspartamides. Eur Polym J 93:805–814.
- 99. Németh C, Gyarmati B, Abdullin T, László K, Szilágyi A (2017) Poly(aspartic acid) with adjustable pH-dependent solubility. Acta Biomater 49:486–494.
- 100. Craparo EF, Porsio B, Sardo C, Giammona G, Cavallaro G (2016) Pegylated Polyaspartamide-Polylactide-Based Nanoparticles Penetrating Cystic Fibrosis Artificial Mucus. Biomacromolecules 17:767–777.
- 101. Heo SB, Jeon YS, Kim YJ, Kim SH, Kim JH (2013) Bioinspired self-adhesive polymer for surface modification to improve antifouling property. J Coatings Technol Res 10:811–819.

- 102. Kim M, Shin SW, Lim CW, Kim J, Um SH, Kim D (2017) Polyaspartamide-based graft copolymers encapsulating iron oxide nanoparticles for imaging and fluorescence labelling of immune cells. Biomater Sci 5:305–312.
- 103. Harada K (1959) Polycondensation of Thermal Precursors of Aspartic Acid1. J Org Chem 24:1662–1666.
- 104. Thombre SM, Sarwade BD (2005) Synthesis and biodegradability of polyaspartic acid: A critical review. J Macromol Sci - Pure Appl Chem 42 A:1299–1315.
- 105. Zrinyi M, Gyenes T, Juriga D, Kim J-H (2012) Volume change of double crosslinked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. Acta Biomater. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.046
- 106. Gyarmati B, Némethy Á, Szilágyi A (2013) Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications. Eur Polym J 49:1268–1286.
- 107. Gyenes T, Torma V, Zrínyi M (2008) Swelling properties of aspartic acid-based hydrogels. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 319:154–158.
- 108. Gyenes T, Torma V, Gyarmati B, Zrínyi M (2008) Synthesis and swelling properties of novel pH-sensitive poly(aspartic acid) gels. Acta Biomater 4:733–44.
- 109. Zrinyi M, Gyenes T, Juriga D, Kim J-H (2013) Volume change of double crosslinked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. Acta Biomater 9:5122–31.
- 110. Gyarmati B, Mészár EZ, Kiss L, Deli M a., László K, Szilágyi A (2015) Supermacroporous chemically cross-linked poly(aspartic acid) hydrogels. Acta Biomater 22:32–38.
- 111. Gyarmati B, Krisch E, Szilágyi A (2014) In situ oxidation-induced gelation of poly(aspartic acid) thiomers. React Funct Polym 84:29–36.
- 112. Gyarmati B, Vajna B, Némethy Á, László K, Szilágyi A (2013) Redox- and pHresponsive cysteamine-modified poly(aspartic acid) showing a reversible sol-gel transition. Macromol Biosci 13:633–40.
- 113. Juriga D, Nagy K, Jedlovszky-Hajdú A, Perczel-Kovách K, Chen YM, Varga G, Zrínyi M (2016) Biodegradation and Osteosarcoma Cell Cultivation on Poly(aspartic acid) Based Hydrogels. ACS Appl Mater Interfaces 8:23463–23476.
- 114. Molnar K, Juriga D, Nagy PM, Sinko K, Jedlovszky-Hajdu A, Zrinyi M (2014) Electrospun poly(aspartic acid) gel scaffolds for artificial extracellular matrix.

Polym Int 63:1608–1615.

- 115. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 9:676–682.
- 116. Cleland WW (1964) Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups\*. Biochemistry 3:480–482.
- 117. Dušek K, Prins W (1969) Structure and elasticity of non-crystalline polymer networks. Fortschritte der Hochpolym. SE 1. Springer Berlin Heidelberg, pp 1–102
- 118. James M, Burak E (1988) Rubberlike elasticity: A molecular primer. John Wiley & Sons, Ltd, New York
- 119. Reagent E Ellman 's Reagent. 747:
- 120. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G (2009) Differentiation potential of stem cells from human dental origin promise for tissue engineering. J Physiol Pharmacol 60 Suppl 7:167–175.
- 121. Gong C, Lu C, Li B, Shan M, Wu G (2017) Dopamine-modified poly(amino acid): an efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for cancer therapy. J Mater Sci 52:955–967.
- 122. Gong C, Lu C, Li B, Shan M, Wu G (2017) Injectable Dopamine-Modified Poly(α,β-aspartic acid) Nanocomposite Hydrogel as Bioadhesive Drug Delivery System Chu. J Biomed Mater Res Part A 105:1000–10008.
- 123. Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L (2007) Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alphasynuclein. J Biol Chem 282:15597–605.
- 124. Wakamatsu K, Fujikawa K, Zucca FA, Zecca L, Ito S (2003) The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods. J Neurochem 86:1015– 1023.
- 125. Menter JM (2016) Melanin from a physicochemical point of view. Polym Int 65:1300–1305.
- 126. Paris I, Cardenas S, Lozano J, Perez-Pastene C, Graumann R, Riveros A, Caviedes P, Segura-Aguilar J (2007) Aminochrome as a preclinical experimental model to

study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Neurotox Res 12:125–134.

- 127. Zhang J, Liu Y, Bo L, Qiao C (2011) Synthesis of Poly (ethylene glycol)– Dopamine Conjugates and Their Controlled Drug-Release Behaviors. J Appl Polym Sci 121:1992–1998.
- 128. Siepmann J, Siepmann F (2013) Mathematical modeling of drug dissolution. Int J Pharm 453:12–24.
- 129. Costa P, Lobo JMS (2001) Modeling and comparison of dissolution profile. Eur J Pharm Sci 13:123–133.
- Siepmann J, Peppas N a. (2011) Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. Int J Pharm 418:6–12.
- Higuchi T (1961) Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. J Pharm Sci 50:874–875.
- 132. Yoon JJ, Song SH, Lee DS, Park TG (2004) Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method. Biomaterials 25:5613–20.
- 133. Williams DF (2011) The role of short synthetic adhesion peptides in regenerative medicine; the debate. Biomaterials 32:4195–7.
- 134. Duncan R, Vicent MJ (2013) Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning. Adv Drug Deliv Rev 65:60–70.
- 135. Goldstein N, Goldstein R, Terterov D, Kamensky AA (2012) Blood Brain Barrier Unlocked. 77:419–424.
- 136. Meiser J, Weindl D, Hiller K (2013) Complexity of dopamine metabolism. Cell Commun Signal 11:1–18.
- 137. Seo JH, Park SJ, Um SH, Nam SW, Kim YJ, Kim JH (2015) Swelling and Metal-Ion Adsorption Properties of Dopamine-Conjugated Polyaspartate Hydrogel. J Polym Environ 23:90–96.
- Pitt CG, Schindler A (1995) The kinetics of drug cleavage and release from matrices containing covalent polymer-drug conjugates. J Control Release 33:391– 395.
- 139. Ponta A, Fugit KD, Anderson BD, Bae Y (2015) Release, Partitioning, and Conjugation Stability of Doxorubicin in Polymer Micelles Determined by Mechanistic Modeling. Pharm Res 32:1752–1763.

- 140. Pham a. N, Waite TD (2014) Cu(II)-catalyzed oxidation of dopamine in aqueous solutions: Mechanism and kinetics. J Inorg Biochem 137:74–84.
- 141. Paul DR (2011) Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. Int J Pharm 418:13–17.
- 142. M. Prabaharan RJ, Nair SV (2012) Electrospun Nanofibrous Scaffolds-Current Status and Prospects in Drug Delivery. Adv Polym Sci 246:241–262.
- 143. Ngawhirunpat T, Opanasopit P, Rojanarata T, Akkaramongkolporn P, Ruktanonchai U, Supaphol P (2009) Development of meloxicam-loaded electrospun polyvinyl alcohol mats as a transdermal therapeutic agent. Pharm Dev Technol 14:70–79.
- 144. Ali A, Mehdi M (2016) Release of Tetracycline Hydrocholoride from Chitosan / Poly-caprolactone Electrospun Web. 1584–1589.
- 145. Sasikala ARK, Unnithan AR, Yun YH, Park CH, Kim CS (2016) An implantable smart magnetic nanofiber device for endoscopic hyperthermia treatment and tumor-triggered controlled drug release. Acta Biomater 31:122–133.
- 146. 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 29:587–596.
- 147. 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 Poly (vinyl alcohol ) Nanofibers by Electrospinning as a Protein Delivery System and the Retardation of. 1484–1488.
- 148. Beck-Broichsitter M, Thieme M, Nguyen J, Schmehl T, Gessler T, Seeger W, Agarwal S, Greiner A, Kissel T (2010) Novel "Nano in Nano" Composites for Sustained Drug Delivery: Biodegradable Nanoparticles Encapsulated into Nanofiber Non-Wovens. Macromol Biosci 10:1527–1535.
- 149. Nidhi K, Indrajeet S, Khushboo M, Gauri K, Sen DJ (2011) Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. Int J Drug Dev Res 3:26–33.
- 150. Park CH, Lee J (2010) One-step immobilization of protein-encapsulated core/shell particles onto nanofibers. Macromol Mater Eng 295:544–550.
- 151. Jiang H, Fang D, Hsiao B, Chu B, Chen W (2012) Preparation and characterization of ibuprofen- loaded poly ( lactide-co- glycolide )/ poly ( ethylene glycol ) -g-

chitosan electrospun membranes. J Biomater Sci, Polym Ed 37-41.

- 152. Feltz KP, Kalaf EAG, Chen C, Martin RS, Sell SA (2017) A review of electrospinning manipulation techniques to direct fiber deposition and maximize pore size. Electrospinning 1:46–61.
- 153. Luo CJ, Nangrejo M, Edirisinghe M (2010) A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. Polymer (Guildf) 51:1654–1662.
- 154. Haghi AK, Akbari M (2007) Trends in electrospinning of natural nanofibers. Phys Status Solidi Appl Mater Sci 204:1830–1834.
- 155. Molnar K, Jedlovszky-Hajdu A, Zrinyi M, Jiang S, Agarwal S (2017) Poly(amino acid)-Based Gel Fibers with pH Responsivity by Coaxial Reactive Electrospinning. Macromol Rapid Commun 38:1–5.
- 156. Davaran S, Rashidi M, Hanaee J, Hamidi A, Hashemi M (2006) Synthesis and hydrolytic behavior of ibuprofen prodrugs and their PEGylated derivatives. Drug Deliv 13:383–387.
- 157. 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 459:390–396.
- 158. Fagerholm U (2007) The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity. Drug Discov Today 12:1076–82.
- 159. Simpkins JW, Bodor N (1994) The brain-targeted delivery of dopamine using a redox-based chemical delivery system. Adv Drug Deliv Rev 14:243–249.
- 160. Lopalco A, Cutrignelli A, Denora N, Lopedota A, Franco M, Laquintana V (2018) Transferrin Functionalized Liposomes Loading Dopamine HCl: Development and Permeability Studies across an In Vitro Model of Human Blood–Brain Barrier. Nanomaterials 8:178.
- 161. Pahuja R, Seth K, Shukla A, Shukla RK, Bhatnagar P, Chauhan LKS, Saxena PN, Arun J, Chaudhari BP, Patel DK, Singh SP, Shukla R, Khanna VK, Kumar P, Chaturvedi RK, Gupta KC (2015) Trans-blood brain barrier delivery of dopamineloaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats. ACS Nano 9:4850–4871.
- 162. Han J, Zhao D, Li D, Wang X, Jin Z, Zhao K (2018) Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs. Polymers (Basel) 10:1–14.
- 163. Clement MV, Long LH, Ramalingam J, Halliwell B (2002) The cytotoxicity of

dopamine may be an artefact of cell culture. J Neurochem 81:414–421.

- 164. Tang Y, Cui Y, Luo F, Liu X, Wang X, Wu A, Zhao J, Tian Z, Wu L (2012) Cell viability and dopamine secretion of 6-hydroxydopamine-treated PC12 cells cocultured with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Neural Regen Res 7:1101–1105.
- 165. Király M, Porcsalmy B, Pataki Á, Kádár K, Jelitai M, Molnár B, Hermann P, Gera I, Grimm WD, Ganss B, Zsembery Á, Varga G (2009) Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. Neurochem Int 55:323–332.
- 166. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP (2014) Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. J Formos Med Assoc 113:956–965.
- 167. Kurland NE, Ragland RB, Zhang A, Moustafa ME, Kundu SC, Yadavalli VK (2014) pH responsive poly amino-acid hydrogels formed via silk sericin templating. Int J Biol Macromol 70:565–71.
- 168. Cai K, Yao K, Hou X, Wang Y, Hou Y, Yang Z, Li X, Xie H (2001) Improvement of the functions of osteoblasts seeded on modified poly (D,L-lactic acid ) with poly (aspartic acid). J Biomed Mater Res 62:283–91.
- 169. Alford D, Wheeler AP, Pettigrew C (1994) Biodegradation of thermally synthesized polyaspartate. J Environ Polym Degrad 2:225–236.
- 170. Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1986) Arg-Gly-Asp: A Versatile Cell Recognition Signal Minireview. Cell 44:517–18.
- 171. Gribova V, Gauthier-Rouvière C, Albigès-Rizo C, Auzely-Velty R, Picart C (2013) Effect of RGD functionalization and stiffness modulation of polyelectrolyte multilayer films on muscle cell differentiation. Acta Biomater 9:6468–80.
- 172. Cao FY, Yin WN, Fan JX, Tao L, Qin SY, Zhuo RX, Zhang XZ (2015) Evaluating the effects of charged oligopeptide motifs coupled with RGD on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. ACS Appl Mater Interfaces 7:6698– 6705.
- 173. Hersel U, Dahmen C, Kessler H (2003) RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Biomaterials 24:4385–4415.
- 174. Zhang Z, Lai Y, Yu L, Ding J (2010) Effects of immobilizing sites of RGD peptides in amphiphilic block copolymers on efficacy of cell adhesion.

Biomaterials 31:7873-7882.

- 175. Panda JJ, Dua R, Mishra A, Mittra B, Chauhan VS (2010) 3D cell growth and proliferation on a RGD functionalized nanofibrillar hydrogel based on a conformationally restricted residue containing dipeptide. ACS Appl Mater Interfaces 2:2839–2848.
- 176. Ingavle GC, Gehrke SH, Detamore MS (2014) The bioactivity of agarose-PEGDA interpenetrating network hydrogels with covalently immobilized RGD peptides and physically entrapped aggrecan. Biomaterials 35:3558–3570.
- 177. Lee F, Kurisawa M (2013) Formation and stability of interpenetrating polymer network hydrogels consisting of fibrin and hyaluronic acid for tissue engineering. Acta Biomater 9:5143–5152.
- 178. Calderon L, Collin E, Velasco-Bayon D, Murphy M, O'Halloran D, Pandit A (2010) Type II collagen-hyaluronan hydrogel--a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering. Eur Cell Mater 20:134–148.
- 179. Galler KM, Aulisa L, Regan KR, D'Souza RN, Hartgerink JD (2010) Selfassembling multidomain peptide hydrogels: Designed susceptibility to enzymatic cleavage allows enhanced cell migration and spreading. J Am Chem Soc 132:3217–3223.
- 180. Kühn K (1987) The Classical Collagens: Types I, II, and III. In: BURGESON RMEBT-S and F of CT (ed)Academic Press, pp 1–42
- 181. Santos E, Hernández RM, Pedraz JL, Orive G (2012) Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: translation from 2D to 3D. Trends Biotechnol 30:331–41.
- 182. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science 324:1673–1677.
- 183. Kast CE, Frick W, Losert U, Bernkop-Schnürch A (2003) Chitosan-thioglycolic acid conjugate: A new scaffold material for tissue engineering? Int J Pharm 256:183–189.
- 184. Bae IH, Jeong BC, Kook MS, Kim SH, Koh JT (2013) Evaluation of a thiolated chitosan scaffold for local delivery of bmp-2 for osteogenic differentiation and ectopic bone formation. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2013/878930
- 185. Fu Y, Xu K, Zheng X, Giacomin AJ, Mix AW, Kao WJ (2012) 3D cell entrapment in crosslinked thiolated gelatin-poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels.
Biomaterials 33:48–58.

- 186. Aubry S, Burlina F, Dupont E, Delaroche D, Joliot A, Lavielle S, Chassaing G, Sagan S (2009) Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. FASEB J 23:2956–2967.
- 187. Grigore A, Sarker B, Fabry B, Boccaccini AR, Detsch R (2014) Behavior of encapsulated MG-63 cells in RGD and gelatine-modified alginate hydrogels. Tissue Eng Part A 20:2140–50.
- 188. Re'em T, Tsur-Gang O, Cohen S (2010) The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGF??1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. Biomaterials 31:6746–6755.
- 189. Chien HW, Tan SF, Wei KL, Tsai WB (2011) Modulation of the functions of osteoblast-like cells on poly(allylamine hydrochloride) and poly(acrylic acid) multilayer films. Colloids Surfaces B Biointerfaces 88:297–303.
- 190. Deng L, Li D, Gu W, Liu A, Cheng X (2015) Formation of spherical cancer stemlike cell colonies with resistance to chemotherapy drugs in the human malignant fibrous histiocytoma NMFH-1 cell line. Oncol Lett 10:3323–3331.
- 191. Marofi F, Vahedi G, Biglari A, Esmaeilzadeh A, Athari SS (2017) Mesenchymal stromal/stem cells: A new era in the cell-based targeted gene therapy of cancer. Front Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2017.01770
- 192. Shafei AES, Ali MA, Ghanem HG, Shehata AI, Abdelgawad A., Handal HR, Talaat KA, Ashaal AE, Mostafa R, El-Shal AS (2017) Mesenchymal stem cells therapy: a promising cell based therapy for treatment of myocardial infraction. J Cell Biochem. doi: 10.1002/jcb.26637
- 193. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S (2009) Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. J Dent Res 88:792–806.
- 194. Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang C, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. 149–155.
- 195. Gay IC, Chen S, MacDougall M (2007) Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res 10:149– 160.
- 196. Zhou Y, Hutmacher DW, Sae-Lim V, Zhou Z, Woodruff M, Lim TM (2008)

Osteogenic and Adipogenic Induction Potential of Human Periodontal Cells. J Periodontol 79:525–534.

- 197. Inanç B, Arslan YE, Seker S, Elçin AE, Elçin YM (2009) Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. J Biomed Mater Res - Part A 90:186–195.
- 198. Ansari S, Diniz IM, Chen C, Aghaloo T, Wu BM, Shi S, Moshaverinia A (2017) Alginate/hyaluronic acid hydrogel delivery system characteristics regulate the differentiation of periodontal ligament stem cells toward chondrogenic lineage. J Mater Sci Mater Med. doi: 10.1007/s10856-017-5974-8
- 199. Park SH, Kwon JS, Lee BS, Park JH, Lee BK, Yun JH, Lee BY, Kim JH, Min BH, Yoo TH, Kim MS (2017) BMP2-modified injectable hydrogel for osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Sci Rep 7:1–15.
- 200. Diniz IMA, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, Shi S, Moshaverinia A (2015) Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. J Mater Sci Mater Med 26:1–10.
- 201. Mizutani N, Kageyama S, Yamada M, Hasegawa M, Miyamoto K, Horiuchi T (2014) The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. J Artif Organs 17:50–59.
- 202. Ji K, Liu Y, Lu W, Yang F, Yu J, Wang X, Ma Q, Yang Z, Wen L, Xuan K (2013) Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. J Periodontal Res 48:105–116.
- 203. Kawashima N (2012) Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? Arch Oral Biol 57:1439–58.
- 204. Krisch E, Messager L, Gyarmati B, Ravaine V, Szilágyi A (2016) Redox- and pH-Responsive Nanogels Based on Thiolated Poly(aspartic acid). Macromol Mater Eng 301:260–266.
- 205. Kumar D, Gittings JP, Turner IG, Bowen CR, Bastida-Hidalgo A, Cartmell SH (2010) Polarization of hydroxyapatite: Influence on osteoblast cell proliferation. Acta Biomater 6:1549–1554.
- 206. Hsieh W, Chen Y, Hung C, Huang T (2014) Osteogenesis differentiation of human periodontal ligament cells by CO 2 laser- treatment stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway. Laser Phys 115607.

- 207. Itaya T, Kagami H, Okada K, Yamawaki A, Narita Y, Inoue M, Sumita Y, Ueda M (2009) Characteristic changes of periodontal ligament-derived cells during passage. J Periodontal Res 44:425–433.
- 208. Orciani M, Trubiani O, Vignini A, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Salvolini E (2009) Nitric oxide production during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. Acta Histochem 111:15–24.
- 209. Wang WJ, Zhao YM, Lin BC, Yang J, Ge LH (2012) Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. Eur J Oral Sci 120:303–310.
- 210. Jiang Z, Hua Y (2016) Hydrogen sulfide promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via p38-MAPK signaling pathway under proper tension stimulation. Arch Oral Biol 72:8–13.
- 211. Cen SD, Yu W Bin, Ren MM, Chen LJ, Sun CF, Ye ZL, Deng H, Hu RD (2016) Endogenous hydrogen sulfide is involved in osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 68:1–8.
- 212. Kang SM, Choi IS (2013) Control of cell adhesion on a superhydrophobic surface by polydopamine coating. Bull Korean Chem Soc 34:2525–2527.
- 213. Beckwith KM, Sikorski P (2013) Patterned cell arrays and patterned co-cultures on polydopamine-modified poly(vinyl alcohol) hydrogels. Biofabrication. doi: 10.1088/1758-5082/5/4/045009
- 214. Zhang J, Peng C-A (2017) Poly(N-isopropylacrylamide) modified polydopamine as a temperature-responsive surface for cultivation and harvest of mesenchymal stem cells. Biomater Sci 5:2310–2318.
- 215. Kang K, Choi IS, Nam Y (2011) A biofunctionalization scheme for neural interfaces using polydopamine polymer. Biomaterials 32:6374–6380.
- 216. Bhang SH, Kwon SH, Lee S, Kim GC, Han AM, Kwon YHK, Kim BS (2013) Enhanced neuronal differentiation of pheochromocytoma 12 cells on polydopamine-modified surface. Biochem Biophys Res Commun 430:1294–1300.

## 10 Saját publikációk

## 10.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- Juriga D, László I, Ludányi K, Klebovich I, Chae CH, Zrínyi M, (2018) Kinetics of dopamine release from poly(aspartamide)-based prodrugs. Acta Biomaterialia 75:225-238
- Juriga D, Nagy K, Jedlovszky-Hajdú A, Perczel-Kovách K, Chen YM, Varga G, Zrínyi M (2016) Biodegradation and Osteosarcoma Cell Cultivation on Poly(aspartic acid) Based Hydrogels. ACS Appl Mater Interfaces 8:23463– 23476.

## 10.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

- Zrinyi M, Gyenes T, Juriga D, Kim J-H (2013) Volume change of double crosslinked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. Acta Biomater 9:5122–31.
- Molnar K, Juriga D, Nagy PM, Sinko K, Jedlovszky-Hajdu A, Zrinyi M (2014) Electrospun poly(aspartic acid) gel scaffolds for artificial extracellular matrix. Polym Int 63:1608–1615.

## 11 Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Zrínyi Miklós Professzor Úrnak, hogy 9 évvel ezelőtt lehetőséget biztosított kutatócsoportjában tudományos kutatómunkám elkezdéséhez. Szeretném neki megköszönni, hogy minden téren támogatott ezen időszak alatt, elősegítve szakmai fejlődésemet. Szeretnék köszönetet mondani a Nanokémiai kutatócsoport múltbéli és jelenlegi munkatársainak kifejezetten Simon Elzának, hogy segítették kutatómunkám előrehaladását, és hogy mindig egy jó kedélyű kutatócsoportnak lehettem a tagja. Különösképp szeretnék köszönetet mondani Jedlovszky-Hajdú Angélának illetve Molnár Kristófnak nem csak szakmai, hanem baráti támogatásukért. Köszönöm volt és jelenlegi diákjaimnak, Sipos Evelinnek, László Istvánnak, Szalkó Anettnek, Tóth Krisztinának és Laskawy Péternek, akik odaadó kutatómunkája nélkül ez a dolgozat nem születethetett volna meg.

Szeretnék köszönetet mondani azoknak a kutatóknak, akikkel együttműködésben dolgozhattam, mind a Semmelweis Egyetemen mind pedig külföldi egyetemeken. Nagy Krisztinának, Hegedűs Orsolyának és Varga Gábor Professzor Úrnak a Semmelweis Egyetem Orálbiológiai tanszékéről a sejttenyésztés során végzett kísérletekért, illetve Klebovich Imre Professzor Úrnak mentori támogatásáért és Ludányi Krisztinának a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetéből a hatóanyag leszakadás kinetikai mérések során nyújtott segítségéért. Yoshihito Osada Professzor Úrnak, hogy többször is lehetőséget biztosított kutatócsoportjában a RIKEN kutatóintézetben, Tokióban, ahol az NMR méréseket végeztem. Sezai A. Sarac Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított kutatócsoportjában az Isztambuli Műszaki Egyetemen, illetve Zeliha Gülernek és Timucin Balkannak segítségükért,

Végül, de nem utolsó sorban végtelenségig hálás vagyok családomnak és barátaimnak, hogy folyamatosan támogattak célom elérésében, a nehezebb és könnyebb időszakok során egyaránt. Édesanyámnak illetve testvéreimnek kifejezhetetlenül hálás vagyok a türelmükért, főleg azokban az időszakokban, amikor a rajtam lévő nyomást ők tapasztalták meg a legjobban. Szeretnék köszönetet mondani egyetemi baráti társaságomnak, hogy együtt élvezhettük az egyetemi lét könnyebbik oldalát és segítettük egymást a felkészülések során.

Külön köszönetet szeretnék mondani páromnak, Sinka Fruzsinának, hogy teljes odaadással és türelmével támogatott, különösképpen a dolgozat megírása alatt.