

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Bakó József

**Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására
alkalmas hidrogél és nanogél rendszerek előállítása és
vizsgálata**

**DEBRECENI EGYETEM
FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2016**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására alkalmas hidrogél és nanogél rendszerek előállítása és vizsgálata

Bakó József

Témavezető: Prof. Dr. Hegedűs Csaba



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3. CÉLKITŰZÉS	17
ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA.....	18
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
4.1 A szintézisek során használt anyagok és eljárások	19
4.1.1 Biokompatibilis (HEMA-PEGDMA) nanorészecskék (NP) előállítása	19
4.1.2 Biokompatibilis (HEMA-PEGDMA) hidrogélek és nanokompozit-hidrogélek előállítása	20
4.1.3 PGA-metakrilálás (MPGA-kialakítás)	21
4.1.4 Biodegradábilis MPGA-hidrogél előállítása	22
4.1.5 PGA keresztkötés és metakrilálás (MPGA-NP kialakítás)	22
4.1.6 MPGA-NP-alapú hidrogél (PGA-nanogél) szintézise	24
4.2 Előállított anyagok jellemzésére használt módszerek	25
4.2.1 PGA keresztkötési és metakrilálási reakciók jellemzése	25
4.2.1.1 Mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR)	25
4.2.2 Nanorészecskék mérettartományainak meghatározása	25
4.2.2.1 Dinamikus fényszórás fotometria (DLS)	25
4.2.3 Hidrogélek, nanogélek és nanokompozit-hidrogélek jellemzése	25
4.2.3.1 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	25
4.2.3.2 Mechanikai tulajdonságok vizsgálata	26
4.2.3.3 Duzzadási paraméterek meghatározása	26
4.2.3.4 Kioldódás vizsgálatok (kumulatív kioldódási eljárással)	27
4.2.4 Toxikológiai, biokompatibilitási és sejtmorfológiai vizsgálati eljárások.....	28
4.2.4.1 MTT- és LDH-tesztek	28
4.2.4.2 Sejtmorfológiai vizsgálatok	29
4.2.4.3 Alamar Blue teszt	29
4.2.4.4 Fluoreszcens és konfokális lézer szkennelés mikroszkópia	30
4.2.5 Statisztikai analízis módszerei.....	31
5. EREDMÉNYEK.....	32

5.1 Biokompatibilis (HEMA-PEGDMA) nanorészecskék (NP) hidrogélek és nanokompozit-hidrogélek (NCHG) jellemzése	32
5.1.1 HEMA-PEGDMA nanorészecskék (NP)	32
5.1.2 HEMA-PEGDMA-hidrogél és nanokompozit hidrogél (NCHG)	33
5.1.3 HEMA-PEGDMA hidrogél, és NCHG tulajdonságai	34
5.1.3.1 Mechanikai tulajdonságok	34
5.1.3.2 SEM felvételek	35
5.1.3.3 Duzzadás vizsgálat	36
5.1.3.4 Kioldódási tulajdonságok	37
5.2 Biodegradábilis (γ-PGA) módosításai, hidrogél és nanogél jellemzése	39
5.2.1 PGA módosításai (keresztalkotási és metakrilálási reakciók)	39
5.2.1.1 MPGA-NP részecskeméret meghatározás	40
5.2.2 MPGA-hidrogél és MPGA-NP alapú PGA-nanogél	41
5.2.3 MPGA-hidrogél jellemzése	42
5.2.3.1 Mechanikai tulajdonságok	42
5.2.3.2 Duzzadási paraméterek	42
5.2.3.3 Kioldódás vizsgálat	43
5.2.3.4 Biokompatibilitás és sejtmorfológiai vizsgálatok	44
5.2.4 PGA-nanogél jellemzése	46
5.2.4.1 Mechanikai tulajdonságok	46
5.2.4.2 Duzzadási paraméterek	47
5.2.4.3 Kioldódási profil	48
5.2.4.4 Biokompatibilitási és sejtmorfológiai vizsgálatok	50
6. MEGBESZÉLÉS	53
6.1 HEMA-PEGDMA alkotta rendszerek	53
6.2 γ-PGA módosításai által kialakított rendszerek	55
7. ÖSSZEFOGLALÁS	61
8. SUMMARY	62
IRODALOMJEGYZÉK	63
TÁRGYSZAVAK	76
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	77
FÜGGELÉK	78

1. BEVEZETÉS

A polimerek és polimer rendszerek alkalmazása világszerte folyamatosan növekvő tendenciát mutat. Ez rendkívül változatos tulajdonságaiknak, valamint a felhasználási igényeknek leginkább megfelelő módosítási lehetőségeinek köszönhető. A fogászat területén is széles körben alkalmazott anyagcsoportként számos felhasználási módjával találkozhatunk, melyek fejlődése az elmúlt évtizedek alatt egyre gyorsuló ütemet mutat. A növekvő elvárások, a lehető leggyorsabb és legesztétikusabb eredmények elérésének célja a kutatási eredmények egyre intenzívebb alkalmazását vonja maga után. A hagyományos eljárások fejlesztése, az újabb, a kor elvárásainak jobban megfelelő átalakítása számos területen megfigyelhetőek. A lenyomatvételre használatos anyagcsoportoktól kezdve, a tömőanyagok széles körén keresztül, az implantológiáig folyamatos a törekvés a legmodernebb anyagok, eljárások és technikák alkalmazására. Ez a megközelítés követhető nyomon az alapanyagok különböző fejlesztéseiben, a technológiai újításokban, illetve az újabb tudományterületek rohamos fejlődési ütemén.

Így kerül napjainkban egyre gyakrabban előtérbe a nanotechnológia, mint egy új, feltörekvő, rendkívül ígéretes tudományterület. Azok a rendszerek, melyek legalább egy komponensének legalább egy dimenziója nem haladja meg a 100 nm-t, olyan új tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek alkalmassá teszik őket a megnövekedett igények kielégítésére. Ez az út vezetett el a kezdetekben leginkább csak a tömőanyagok területén alkalmazott nanorészecskék felhasználásától addig, hogy napjainkban már a termékek széles körében felfedezhetőek a nanotechnológia nyújtotta előnyök. Így találhatók már a kereskedelmi forgalomban is elérhető lenyomatanyagok, bond-rendszerek generációi, valamint a tömőanyagok legkülönbözőbb mérettartományokat felvonultató változatai.

A mikro- és nanorendszerek alkalmazása a szájszészet és az implantológia területén is megjelentek különböző termékek formájában. A mesterséges csontpótló anyagok összetételén túl ugyanis a szemcseméret megfelelő megválasztása az egyik legkézenfekvőbb lehetőség az átépülés sebességének szabályozására. Több, a kereskedelmi forgalomban is elérhető termék fejlesztése során is megragadták ezen lehetőségeket a felmerülő igényeket kiszolgálására. Egy másik rendkívül intenzíven kutatott terület, ahol a nanotechnológia jelentős szerephez juthat a hatóanyag-leadó rendszerek. A kereskedelmi forgalomban még

csak részterületeken fedezhetőek fel eredményei, de a kísérleti fázisokban már számos potenciális jelölt található. Ezek nagy többségében a rákkutatással összefüggésben kerültek az érdeklődés középpontjába. Ezen a területen tekinthetőek legelőrehaladottabbaknak a kísérletek, különböző szinteken folynak már a vizsgálatok, s itt már találhatóak termékek, melyek a gyakorlatba ültetik át az elméleti megfontolások eredményeit. Az oldékonysági problémák javítását, a mellékhatások csökkentését, a hatóanyagok egyre jobb hasznosulását hozta magával a nanotechnológia alkalmazása. A fogászat területén hagyományosan megjelenő felhasználása - pl. az antibakteriális anyagok formulázására, szállítására - még a mikrogyöngyök alkalmazása sem nevezhető széleskörűen elterjedtnek, bár képviselőjét már felfedezhetjük, s tekinthetjük ezt az egyre kisebb mérettartományok meghódítása felé tett kezdeti lépésnek.

A hatóanyagok formulázásával és speciális célba juttatásával kapcsolatosan is fellelhetőek viszont kombinált rendszerek, mint a legújabb fejlesztések eredményei. Ezen rendszerek a különböző anyagtípusok előnyös tulajdonságait előtérbe helyezve, a kevésbé hasznos tulajdonságokat a komponensek megfelelő megválasztásával kompenzálják. Így alkalmazhatóak pl. polimer rendszerek biológiailag aktív molekulák szállító- és leadó rendszereként kristályos anyagokkal kombinálva, melyek a struktúra megfelelő mechanikai paramétereit képesek biztosítani. Ezen modellrendszerek megjelenésével a csontpótló anyagok területén már találkozhatunk, de a folyamatos fejlesztéseknek köszönhetően (pl. hosszú távú hatóanyag-leadóként alkalmazható nanorészecskékből álló polimer rendszerek előállítás) napjainkig az érdeklődés homlokterében található. Jól mutatja ezt például, hogy az MIT kutatói 2015-ben a Nature Communication folyóiratban mutatták be ezen témakörben végzett munkájukat [1].

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hidrogélek olyan háromdimenziós polimer struktúrák, melyek nagy mennyiségű víz megkötésére képesek, s ennek köszönhetően az extracelluláris mátrixhoz sok tekintetben hasonló tulajdonságokkal rendelkező rendszerek kialakítása lehetséges általuk [2, 3]. Megkülönböztethetünk természetes és mesterséges alkotókból felépülő rendszereket, melyek közös sajátossága a hidrofíl jelleg. A polimerek kémiai minősége, illetve a keresztkötések aránya nagymértékben képes befolyásolni az anyag porozitását, a duzzadási képességét illetve mechanikai tulajdonságait, melyek szükségesek a bioanyagként történő felhasználás feltételeinek megteremtéséhez.

A nemzetközi irodalomban többféle monomert és monomerrendszert vizsgáltak már, viszont a lehetőségek nagy száma, illetve az egyre újabb és kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező anyagok megjelenésének következtében ezeket a vizsgálatokat érdemes időről időre felújítani. A régi jól ismert anyagok ugyanis az új lehetőségekkel kombinálva új, a megváltozott igényeknek sokkal inkább megfelelő eszközökké válhatnak. Ezen az úton jutottunk el a szintetikus polimerek alkalmazásától a biogén körülmények között is alkalmazható biokompatibilis anyagok alkalmazásáig [4, 5]. Ez az út vezetett a biodegradábilis tulajdonságokkal is rendelkező új anyagokkal kapcsolatos fejlesztésekig, melyeket már nemcsak önmagában tolerál a szervezet, de meghatározott időn belül alkotóelemeire képesek bomlani, s ezek között sem találhatóak jelentős toxicitással rendelkező komponensek.

A szemészet területén alkalmazott kontaktlencsék fejlődése jó lehetőséget biztosít számunkra, hogy áttekintsük a gyakorlatban hogyan valósulhatott meg a kor biztosította lehetőségeket kihasználva az egyre jobb, egyre speciálisabb anyagok felhasználása. Már 1508-ban Leonardo da Vinci is készített feljegyzéseket a kontaktlencse alapelveivel kapcsolatosan, de csak az 1880-as években sikerült üveg alapú lencsét előállítani. Ezt követően viszont 1936-ig kellett várni, míg William Feinbloom szemésznek köszönhetően megjelenhettek az első polimer alapú kontaktlencsék. Ez a poli(metilmetakrilát) (PMMA) alapú rendszer még merev, és gáz-permeabilitás szempontjából rendkívül kedvezőtlen tulajdonságú, de bioinert így alapvetően használható anyagnak volt tekinthető. Ezt az 1960-ban publikált lágy poli(2-hidroxi-etil-metakrilát) (pHEMA), az első egészségügyi céllal előállított hidrogél válthatott, melyet 2-hidroxi-etil-metakrilát és etilén-dimetakrilát

kopolimerizációjával állítottak elő [6]. Ez az anyag mechanikai tulajdonságait tekintve már jól közelítette az eredeti szövetet, de más, még hidrofilebb monomereket, mint az N-vinil-pirrolidont (NVP) és a metakrilsavat (MMA) alkalmazva a kopolimerizáció során, még jobb duzzadási sajátságokkal és még jobb oxigén-permeabilitással rendelkező pHEMA volt előállítható. A napjainkban használatos hosszú ideig viselhető kontaktlencsék pedig már sziloxánok és hidrofil monomerek kopolimerjei, melyek a lencse belsejében képzett speciális mikrofázisoknak köszönhetően képesek egyedi tulajdonságaik elérésére. Hidrogéleket alkalmaztak már korábban is orvosi biológiai implantátumként, pl.: a poli(vinil-alkohol)-t (PVA), szivacs formában formaldehiddel keresztkötve [7]. Az anyagot 1949-ben hozták forgalomba Ivalon® márkanevvel, s ezt követően széleskörűen tanulmányozták a felhasználási lehetőségeit. Ennek megfelelően vizsgálták bőr vagy ízületi porc helyettesítése során alkalmazható anyagként, csontpótlás során történő vázanyagként, érprotézisként, tuberkulózis kezelése során, vagy embolikus anyagként felmerülő felhasználási lehetőségeit is [8-14]. Hatóanyag-leadó és -szállító anyagként történő felhasználását is vizsgálták, melynek során duzzadásra képes porformát állítottak elő a szabályozhatóság megteremtésére, bár ezen a területen a vízdoldható cellulóz származékok voltak az első úttörő anyagrendszerek, melyeket a bioeródálható természetes anyagok egész sora, mint a módosított kitin, dextrán, keményítő, zselatin és polipeptidek követtek [15-16]. Ezek az anyagrendszerek már bizonyos fokú reagálási képességgel rendelkeztek a környezetük irányába a duzzadási sajátságaikon és az erodáción keresztül, és jól példázzák a fejlődési irányvonalakat az egyébként nagyon sikeres, a legtöbb szerv esetében jól alkalmazható Ivalon® szivacs statikus bioinert felhasználásától a körülmények változásait dinamikus követni képes rendszerek irányába. Ennek megfelelően számos egyéb polimer felhasználásával képeztek már hidrogéleket, melyeket az egészségügy különböző területein alkalmazhatnak [2]. A lista természetesen nem lehet átfogó jellegű, csak néhány jeles képviselő bemutatására alkalmas (1. táblázat).

1. táblázat. Orvosi biológiai célra alkalmazható hidrogélek [2].

Felhasználási terület	Felhasználható alapanyag
Szabályozott hatóanyag-leadásra alkalmas rendszerek	Cellulóz [15]
	Poli(vinil-alkohol) (PVA)[16]
	Kitozán [17]
	Dextrán [18]

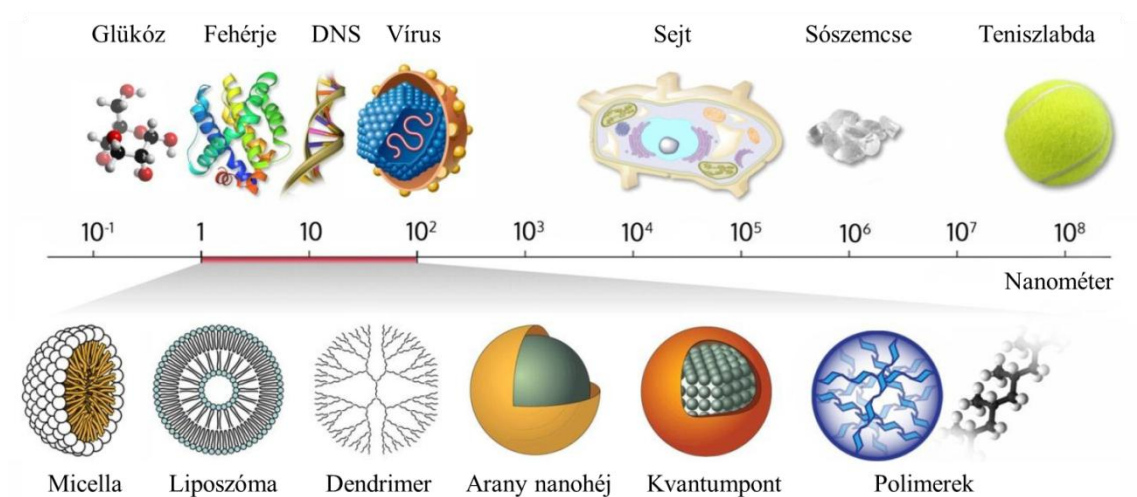
	Polimetakrilsav (PMA)[19-20] Poliakrilsav (PAA)[21] Poli(N-izopropil-akrilamid) (PNIPAAm)[22-25]
Kontaktlencse	Poli(hidroxietil-metakrilát) (PHEMA)[6,26] Poli(N-vinil-pirrolidon) (PNVP) [27] Polimetakrilsav (PMA)[27] Poli(butil-metakrilát) (PBMA)[26] Poli(metil-metakrilát) (PMMA)[28]
Vérrel-érintkező hidrogélek	Pol(vinil-alkohol) (PVA)[29-31] Poliakrilamid (PAAm)[32] Poli(etilén-glikol) (PEG)[27, 32, 33] Cellulóz [34]
Mesterséges bőr	Poli(vinil-alkohol) (PVA)[8] Poli(hidroxietil-metakrilát) (PHEMA)[27]
Mesterséges porc	Poli(vinil-alkohol) (PVA)[9-10] Poli(N-izopropil-akrilamid) (PNIPAAm)[35] Poli(etilén-glikol)-Poli(propilén-glikol) (PEG-PPG) [36-37]
Mesterséges vese	Cellulóz-acetát [32] Poli(vinil-alkohol) (PVA)[30] Poli(etilén-glikol) (PEG)[38] PEG-Poli(etilén-tereftalát) (PEG-PET)[38]

Ezen előnyöknek köszönhető, hogy a hidrogélekhez köthető publikációk száma az 1990-es évek néhány százas mértékéről a 2010-es évekre a több ezres nagyságrendet is elérte. A nanokompozit hidrogélek esetében is hasonló mértékű növekedés volt tapasztalható, a 2000-es évek alig néhány publikációja a 2010-es évekbeli több százas nagyságrendre változott. Ez a trend várhatóan nem is fog megváltozni, figyelembe véve például, hogy az Amerikai Egyesült Államok piaca a fejlett hatóanyag-leadó rendszerek területén a 2001-es 75 millió dollárról, a 2010-es évekre 121 milliárd dollárra növekedett [39]; illetve hogy az éves világméretű piac polimer alapú hatóanyag-leadó rendszerek tekintetében a becslések szerint 2010-re önmagában elérheti a 60 milliárd dollárt [40-41].

A polimer rendszerek alkalmazása a fogászat területén is általánosnak tekinthető. A fogpótlásban a részleges és teljes foghiányok kezelése, ideiglenes koronák, hidak készítése,

valamint fémhidak leplezése során is találkozhatunk képviselőikkel. [42] A szájsebészet területén traumák, fejlődési rendellenességek korrekciója során, illetve tumor eltávolítását követő rehabilitációval kapcsolatosan jelennek meg a gyakorlati alkalmazásban [43-45]. Az esztétikus tömőanyagok térhódításának köszönhetően használatuk a konzerváló fogászat esetében is mindennaposnak tekinthető. A biodegradábilis polimerek alkalmazási lehetőségei is egyre gyakrabban kerülnek a vizsgálatok középpontjába. Egyre fontosabb felhasználási terület a parodontológia, ahol például a fogágy egyes megbetegedéseinek kezelésekor alkalmazhatóak ezen anyagok [46-48]. Ilyen például a PerioChip® (Dexcel Pharma Technologies Ltd, Izrael) mely előre kicsomagolt formában tartalmazza a klórhexidin-diglükonátot (CHX) hatóanyagként [49-50]. Az ATRISORB®-D FreeFlow™ (TOLMAR Inc, USA.) rendszere egy fecskendő formájában kiszerelt termék, amelyben a hordozó biodegradábilis polimer bioadszorbeálódó képességét kihasználva, az alkalmazandó hatóanyag (doxiciklin) mennyiségének szabályozására is lehetőség nyílik. Az ARESTIN® (OraPharma, Valeant Pharmaceuticals North America LLC. OH/OR/14/0003(1)) az alkalmazott polimer hordozó egy további szabályozási lehetőségére építve mikro-kapszulák formájában tesz lépéseket a hatóanyag (minociklin) lokális és szabályozott felszabadulására. Ezek a példák is mutatják, hogy a fogászat területén folyamatos a törekvés a hatóanyagok minél pontosabb és minél szabályozottabb célba juttatására [51-52].

Alapvetően ezen a téren is nagy jelentőségre tehet szert a nanotechnológia, illetve az általa biztosított anyagok kombinációjával kialakítható nanokompozitok. Az először 1959-ben Richard P. Feynman Nobel-díjas fizikus által leírt technológia újdonsága, az általa létrehozott anyagok tulajdonságainak a magyarázata a méretben keresendő. Ezen anyagoknak ugyanis legalább egyik dimenziójuk az 1-100nm-es mérettartományba esik, mely a mikro- és makro világra jellemző tulajdonságoktól eltérő sajátságok megjelenését okozza. A mérettartomány szemléltetésére, illetve néhány jeles képviselő bemutatására szolgál az 1. ábra.



1. ábra. A nano mérettartomány elhelyezkedésének szemléltetése, és ezen mérettartomány jeles képviselőinket bemutatása (alul) [53].

A nano mérettartomány sokszínűségét jól mutatja, hogy ide tartoznak a biodegradábilis polimer nanorészecskéktől kezdve, a micellákon át, a kvantumpontokon, a szerves és szervetlen nanorészecskéken keresztül, a dendrimerekig számos már jól ismert, vagy még most is vizsgálat alatt álló struktúrák [53]. Ebbe a mérettartományba sorolhatóak a nanoméretű struktúrák alkotta hidrogélek, az ún. nanogélek is, vagy a szintén hasonló méretű komponenseket is magukba foglaló nanokompozitok széles köre. A nanogélek, vagy a mikro-, illetve nanostruktúrált hidrogélek jelentősége folyamatosan növekszik a speciális szállító- és leadórendszerekkel szembeni növekvő elvárásokkal párhuzamosan [54]. A nanoméretű struktúrákkal formulázott biológiailag aktív molekulák/hatóanyagok lehetőségének előnye, hogy így csökkenthető a toxicitás és a mellékhatások kialakulásának veszélye, illetve növelhető a hatékonyság, a specificitás és a tolerabilitás, azaz a hatóanyag terápiás indexének az egésze javítható [55-58]. Ennek megfelelően a gyógyító orvoslás számos területén jelentek már meg képviselőik. A rákellenes készítmények között számos képviselőjével találkozhatunk, többek között az első FDA engedélyezett szer, a Doxil® (USA területén) vagy Caelyx® (az USA területén kívül), mint egy liposzómába csomagolt doxorubicin, vagy egy nemrég engedélyt kapott forma a Genexol-PM (Samyang Biopharmaceuticals Corporation, Dél-Korea), ami egy nanorészecske-formulázott (monometoxi-PEG-blokk-poli(D,L-tejsav kopolimer) (mPEG-PDLLA)) paclitaxel készítmény [59-61]. Autoimmun betegségek kezelése során immunszuppresszánsként mikofenol-savat formuláltak már nanogélbe, valamint kimutatták ezen forma nagyobb hatékonyságát, illetve a szemészet területén is fellelhető már poli(vinil-pirrolidon)-poliakrilsav nanogél, mint pilokaprin

elnyújtott leadására alkalmas vivőanyag [62-63]. Cukorbetegség esetében patkánykísérletek során sikerült már inzulinnal töltött nanogélek alkalmazásával elérni a vér glükózsintjének a jelentős csökkenését és a szabad formához képest jobb szabályozását [64]. Sikerrel alkalmaztak már nanogéleket hatóanyagoknak a vér-agy-gáton történő nagyobb arányú átjuttatására, vérzéscsillapító fehérjék formulázására, vagy pl. politejsav-ko-glikolsav és kitozán elegyének olajsavval módosított nanorészecskéit, amely gyulladáscsökkentő hatást kifejtő rendszerként hasznosítható. A fogászat területén is számos felhasználási kísérlettel találkozhatunk. A parodontológia az egyik legígéretesebb alkalmazási területnek számít, úgy a gyulladásos folyamatok gátlása és visszaszorítása, mint a helyi érzéstelenítés ígéretes lehetőségekkel kecsegtetnek. A nanogélek alkalmazásával például sikerült már Pluronic-gél felhasználásával hőmérséklet-változásra érzékeny, in-situ gélesedő rendszert kialakítani, mellyel mepivakain leadására optimalizált parodontális érzéstelenítőrendszert hoztak létre [65]. Ezen kísérleti fázisokban lévő nanogéleken túl a nanotechnológia számos eredménye természetesen már a kereskedelmi forgalomban is megtalálható. A hagyományos anyagokon és anyagrendszereken túl lényegében már talán nincs is olyan fogászati terület, ahol valamilyen formában ne jelent volna meg valamely képviselőjén keresztül. Erre nyújt egy szemléletes példát a 2. táblázat, mely a különböző területeken már forgalomban lévő termékeket mutat be [66].

2. táblázat. Kereskedelmi forgalomban található nano komponensű alkotót tartalmazó termékek [66].

Alkalmazási terület	Elérhető anyagok
Konzerváló/ helyreállító fogászat	Ketac™ (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), Ketac N100; Nano-ionomers (3M ESPE), Filtek Supreme XT (3M ESPE), Fuji IX GP (GC, Leuven, Belgium), Nano-primer, Premise™ (Kerr/Sybron, Orange, CA, USA), Adper™ Single bond plus Adhesive (3M ESPE), Ceram X™ (DENTSPLY International, Milford, CT, USA).
Regeneratív fogászat ill. Szövettervezés és regeneráció	Ostim® (Osartis GmbH, Elsenfeld, Germany), VITOSSO™ (Orthovita-Inc, Malvern, PA, USA), Nano-Bone® (ARTOSS, Rostock, Germany).

Parodontológia	Arestin® (Valeant, Bridgewater, MA, USA), Nanogen® (Orthogen, Springfield, IL, USA).
Megelőző fogászat	NanoCare® Gold (Nano-Care, Saarwellingen, Germany).
Fogsabályzás	Ketac™ N100 Light Curing Nano-Ionomers (3M ESPE), Filtek Supreme Plus Universal (3M ESPE).
Fogpótlás	Nanotech elite H-D plus (Zhermack, Badia Polesine, Italy), GC OPTIGLAZE color® (GC).
Implantológia	Nanotite™ Nano-coated implant (BIOMET 3i, Palm Beach Gardens, FL, USA).
Endodoncia	AH plus™ (DENTSPLY International), Epiphany (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT, USA), Gutttaflow® (Coltène, Altstätten, Switzerland).

A polimerek alkalmazási lehetőségeinek szempontjából meghatározó jelentőséggel bírhat az iniciálás módja. Az előzetesen kialakított rendszerek esetében ezt a lépést leggyakrabban kémiai úton valósítják meg, napjainkban viszont egyre inkább előtérbe kerül a fotoiniciáció. Az előre kialakított rendszerek előnyei - mint a megbízható dozírozás és a jól definiálható fizikai paraméterek - mellett ugyanis mindig megjelenik ellenpontként, hogy az egyedi szitációk sajátosságait ezek kevésbé képesek követni. A fotopolimerizáció mint reális lehetőség, az ilyen helyzetekre adott válaszként jelenhet meg. Abban az esetben ugyanis, mikor speciális, egyedi változók állnak figyelmünk középpontjában, az in-situ kialakítható struktúrák alkalmazása lehetőséget nyújthat az egyedi igények figyelembevételére, szabálytalan formák előállítására, vagy az aktuális helyzetnek megfelelő dozírozás megtervezésére.

A polimerizációs reakció mechanizmusát tekintve, mind a kémiai mind pedig a fotopolimerizáció esetében a folyamatok három fő lépésen keresztül mennek végbe: a láncindítás, a láncnövekedés és a lánczáródás, ezenfelül pl. gyökös, ionos polimerizáció során láncátadás is előfordul. Fotopolimerizáció esetén a folyamatok sematikus összefoglalása az 2. ábrán látható [67]. A kezdeti lépés során az láncindítási arány (R_i) az iniciátor hatékonyságától, az iniciátor koncentrációjától és a fény intenzitástól is függ. Ezt követően a láncnövekedés során az el nem reagált kettős kötést tartalmazó monomerek képeznek hosszú láncokat, egészen addig, míg láncátadás, vagy a szabadgyökök megszűnése/terminációja véget nem vet a növekedésnek. A lánczáródási arány (R_t), mint bimolekuláris reakció, a

rendszerben fellelhető szabad gyökök koncentrációjának függvénye, míg a polimerizációs ráta (R_p) a reakció során elreagált kettős kötések arányát adja meg. Mivel ezen reakciók jelentős része a láncnövekedés során következik be, így az R_p mint másodrendű reakció közelíthető meg, amely a kettőskötések és a szabadgyökök koncentrációjának a függvénye. Pszeudo-egyensúlyi állapotot feltételezve, például ha $R_i = R_t$, így R_p az R_i , a monomer koncentráció ($[M]$), valamint a láncnövekedés (k_p) és a lánczáródás (k_t) kinetikai egyensúlyi állandóinak a függvényévé válik. Ha formailag egyszerűsítünk is a polimerizáció folyamata azért rendkívül összetett, mivel a k_p és a k_t is erősen függ a konverziótól, illetve a kialakult keresztkötésektől is [67].



2. ábra. Fotoiniciált polimerizációs reakció mechanizmusa. I_a az iniciáló fényintenzitásának, az iniciátor koncentrációjának és a moláris abszorpciós koefficiensnek a függvénye. A polimerizációs ráta egyenletei pszeudo-egyensúlyi állapotot feltételeznek [67].

Mindezen reakciók a különböző ipari alkalmazások során már rutinszerűen alkalmazott technikáknak tekinthetőek, mind a különböző bevonatok előállításakor, vagy a litográfiai eljárások során, de akár a 3D nyomtatott termékek gyártása is szemléletes példái a technológia széleskörű alkalmazhatóságának. Az eljárások nagy többségében viszont a gerjesztésre használt fényforrás az UV tartományba tartozik, mely az ipari alkalmazásoknál elfogadható alternatíva, de a különböző biológiai rendszerek esetében használata erős korlátokba ütközik. A látható tartományába eső hullámhosszakot, mint gerjesztő fényforrást a fogászat területén általánosan alkalmazzák, így kézenfekvő a törekvés, hogy kiindulási pontként ezen fényforrásokat tekintsük [68].

A poli- γ -glutaminsav egy anionos jellegű poliaminosav, mely felépítését tekintve akár több mint 10000 glutaminsav egységet is tartalmazhat. Előállítása elsősorban biotechnológiai úton történik, a *Bacillus subtilis* faj genetikai módosításain keresztül, és az idő előrehaladtával, a módszerek folyamatos fejlesztésével egyre tisztább, egyre nagyobb hozammal rendelkező előállítási utak váltak elérhetővé [69-74]. Felfedezése elsők között Kramar (1921), illetve Ivánovics és Erdős (1937) nevéhez köthető, bár magát az előállítására képes *Bacillus* törzset egy tradicionális japán ételből, a fermentált szójababból, a natto-ból Sawamura (1913) már korábban izolálta [75-79]. A polimer iránti növekvő érdeklődést és orvosbiológiai értékét az biztosítja, hogy biokompatibilis, biodegradábilis, emészthető biopolimer, mely a késleltetett felszívódású hatóanyag-leadó rendszerek előállításának lehetőségét is magában rejt. α -karboxil csoportján keresztül különböző módosításokra nyílik lehetőség [80]. Hidrogélek előállítására, nanorészecskék létrehozására és hatóanyag-polimer komplexek kialakítására is számos példát találhatunk PGA alapon [81-84]. A polimer felhasználási lehetőségei rendkívül széleskörűek, alkalmazhatóak úgy a szennyvízkezelésben, mint az orvostudományi vonalon, de az élelmiszeripar, a kozmetika, az agrárágazat területén is fellelhetőek hasznosítható tulajdonságai a PGA-alapú rendszereknek. A tisztítási eljárásokkal kapcsolatosan, mint flokkuláló szer alkalmazható vagy a nehézfémekhez, illetve festékekhez való nagy affinitását használják ki. Az orvostudomány területén is számos alkalmazási lehetőséget találhatunk, alkalmas lehet kelátképzőként, vagy kalcium-abszorberként történő felhasználásra. Mindemellett adhezívként, illetve hatóanyag-szállító és -leadó rendszerek alkotójaként is találkozhatunk vele, és a szövettervezéssel és regenerációval kapcsolatos legújabb anyagok között is fellelhetőek. Természetesen egyéb területeken is találkozhatunk képviselőikkel, ahol pl.: a PGA, mint antibiotikus polimer juthat szerephez, vagy a génterápiával kapcsolatos célbajuttatásoknál jelenhetnek meg, de a vírusgátláson át, a xerosztómia - szájszárazság - kezelése során is jól hasznosítható [74]. A molekulatömeg függvényében alakíthatóak ki hatóanyag-leadó rendszerek, rákellenes szerként alkalmazható paclitaxel (Taxol) esetében pl.: a 3×10^4 - 6×10^6 Da közti tartományt határozták meg Li és munkatársai, melynek segítségével in vitro eredményeik alapján sikerült sokkal jobb vízoldékonyságú, jelentősen stabilabb, és megnövekedett tumorelles hatékonysággal rendelkező konjugált rendszert kialakítani [85, 61]. A paclitaxel taxán formájából kiindulva Singer és munkatársai egy poliglumex elnevezésű konjugátumot hoztak létre. Ez a rendszer már preklinikai állat tumormodellel keresztül bizonyította a biodegradábilis polimer jótékony hatásait, aminek köszönhetően a jobb stabilitáson, valamint oldékonyságon túl hosszabb

tumor kitettség és csökkentett szisztémás terhelés volt elérhető. Ezzel jelentősen megnövelhetővé vált a hatóanyag farmakológiai profilja, s mind a szabad hatóanyaggal szemben, mind pedig az egyéb, nem degradálódó polimerformákkal szemben jobb eredmények, megnövekedett tumor szelektivitás, és eredményesebb tumor szöveti akkumuláció, illetve retenció volt elérhető [86].

A nagy molekulatömegű (2×10^6 Da) PGA-ról Kim és munkatársai mutatták ki egérkísérleteken keresztül, hogy orális alkalmazása esetén jelentősen növeli a sejt által közvetített tumorelles aktivitást. A jelenség hátterét, inkább a természetes ölü „natural killer” (NK) sejtek aktiválásának a növelésében látták, mint a direkt citotoxikus hatás kifejtésében. Eredményeik alapján a nagy molekulatömegű PGA legalább olyan mértékű, vagy nagyobb rákellenes hatással bírt a vizsgált tumortípus esetében, mint a β -glukan, ami egy ismert NK aktivációra képes immunmoduláns. Mindezek alapján a PGA potenciálisan szerepet kaphat a rákos megbetegedések immunoterápiás kezeléseiben [87]. PGA felhasználásával kialakított nanorészecskékre is számos példát találhatunk az irodalomban. Ryu és munkatársai a szemészet területén hasznosítható in-vitro, és in-vivo is alkalmazható dexametazone kezelést dolgoztak ki PGA L-fenilalaninnal alkotott nanorészecskék felhasználásával. A módszer nagy előnye, hogy az in-vivo immunszuppresszív kezelés segítségével minimalizálható a retina idegsejtjeire nézve toxikus szteroid kezelések mellékhatásai, azok háttérbe szorításával [88]. Ugyanezt az összetételt alkalmazva Shima és munkatársai, valamint Toita csoportja antigén specifikus immunválaszok manipulációira, illetve vakcinák nyomon követésére irányuló rendszereket alakítottak ki, melyekkel a jelölt részecskék egyre jobb detektálhatóságát, és az alkalmazott vakcinák hatékonyságának jelentős, akár 10-40-szeres növelését sikerült elérni [89-90].

A sejtek fejlődését és szaporodását elősegítő környezet kialakításának lehetősége, illetve a jó kombinálhatósága alkalmassá teheti a PGA-t különböző szövetpótlások, regenerációt elősegítő anyagrendszerek létrehozására, s így a szövettervezés és sebkötöző anyagok rendkívül ígéretes területként kerül az érdeklődés középpontjába [91-92].

3. CÉLKITŰZÉS

Kutatásaink során munkánk célja volt a fogászati gyakorlatban alkalmazott eszközök által kibocsátott „kék fény” (385-515 nm) hatására bekövetkező fotopolimerizáció útján térhálós szerkezetű polimerek előállítása, amelyek a fogászati gyakorlatban alkalmazott hatóanyagok szabályozott kibocsátására képesek.

Célkitűzéseinket különböző kutatási szakaszokon keresztül valósítottuk meg:

I. Biokompatibilis polimer (HEMA-PEGDMA) alapanyagok felhasználásával

- különböző térhálósűrűségű hidrogélek előállítása
- nanorészecskék (NP), és ezek felhasználásával nanokompozit hidrogélek (NCHG) szintézise
- a gélek mechanikai tulajdonságainak vizsgálata
- hatóanyagleadási tulajdonságok feltérképezése

II. Biodegradábilis polimer (γ -PGA) alapanyag alkalmazásával

- „kék fény” (385-515 nm) hatására polimerizálható metakrilált PGA (MPGA) szintézise
- „kék fény” hatására polimerizálható MPGA-polimerből hidrogélek (mátrix) előállítása
- a gélek mechanikai tulajdonságainak vizsgálata
- biokompatibilitás meghatározása
- duzzadási és -fogászatban alkalmazható - hatóanyagleadási tulajdonságok jellemzése

III. Biodegradábilis polimer (γ -PGA) alapanyag módosításain keresztül

- „kék fény” (385-515 nm) hatására polimerizálható nanorészecskék (MPGA-NP) kialakítása
- MPGA-NP felhasználásával nanorészecske-alapú hidrogél (nanogél) előállítása
- a gélek fizikai paramétereinek vizsgálata, optimalizálása
- sejtek életképességének, és morfológiai vizsgálatain keresztül történő biokompatibilitásának meghatározása
- a nanogélek jellemzése duzzadási és hatóanyagleadási tulajdonságaik alapján

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

AEM: 2-aminoetil-metakrilát hidroklorid

Alamar Blue teszt: Resazurin festék átalakításon alapuló életképesség vizsgálat

Amp: Ampicillin

CDI: 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilkarbodiimid hidroklorid

CHX: Klórhexidin-diglükonát

DLS: Dinamikus fényszórás fotometria

EDA: 2,2'-(Etiléndioxi)bisz(etilamin)

HaCaT: Immortalizált keratinocita sejtvonal

HEMA: 2-hidroxietyl-metakrilát

HPLC: Nagynyomású (vagy nagy teljesítményű) folyadékkromatográfia

Irgacure 2959: 2-hidroxi-4'-(2-hidroxiethoxy)-2-metilpropiofenon

KPS: Kálium-peroxo-diszulfát

LDH-teszt: Laktát-dehidrogenáz enzimaktivitáson alapuló citotoxicitási vizsgálat

Metr: Metronidazol

MPGA: Metakrilált-PGA

MPGA-NP: Metakrilált-PGA-nanorészecske

MTT-teszt: Tetrazolium-bromid/formazán átalakulásán alapuló életképesség vizsgálat

NCHG: Nanokompozit hidrogél

NMR: Mágneses magrezonancia vizsgálat

NP: Nanorészecske

PBS: Foszfát-puffer sóoldat (pH: 7,45)

PEGDMA: Poli(etilén-glikol)-dimetakrilát

PGA: Poli- γ -glutaminsav

PGA-nanogél: MPGA-NP alapú hidrogél

SAOS-2: Humán oszteoszarkóma eredetű sejtvonal

SDS: Nátrium-dodecyl-szulfát

SEM: Pásztázó elektronmikroszkópia

TEMED: N,N,N,N'-tetrametil-etylén-diamin

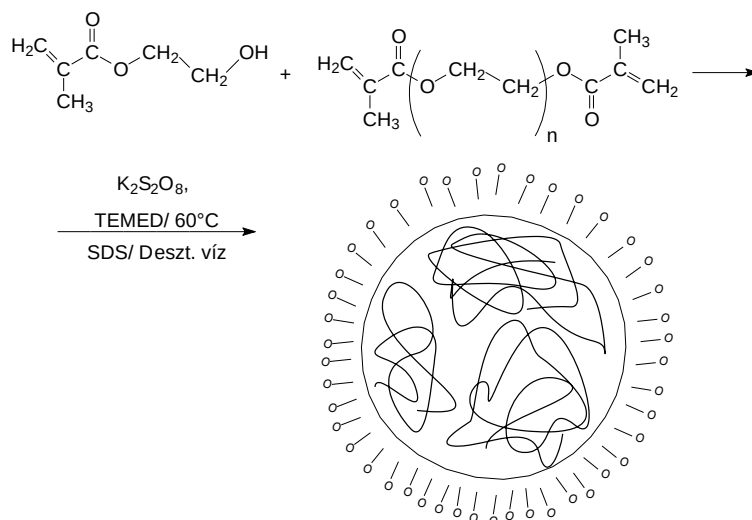
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A szintézisek során használt anyagok és eljárások

4.1.1 Biokompatibilis (HEMA-PEGDMA) nanorészecskék (NP) előállítása

Munkánk első szakaszában, a biokompatibilis nanorészecskék előállítása során szerves fázisként 2-hidroxietyl-metakrilát (97%-os, Sigma-Aldrich, Steinheim) (HEMA) monomer, poli(etilénglikol)-dimetakrilát (Mn: 550, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (PEGDMA) térhálósító, illetve n-butyl-alkohol (Spektrum 3D Kft, Magyarország) kerültek felhasználásra. A vizes fázis kialakítása során nátrium-dodecil-szulfátot (Spektrum 3D Kft) (SDS), kálium-peroxo-diszulfát (98%, Reanal Co., Budapest) (KPS) termoiniciátort, és N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin (99%-os, Sigma-Aldrich, Steinheim) (TEMED) katalizátort alkalmaztunk. A reakció során az anionos felületaktív anyagként alkalmazott SDS mellett kerültek a HEMA, és PEGDMA monomerek diszpergálásra desztillált vizes közegben (40ml). A teljes elegyre vonatkoztatott monomerkoncentráció 4 m/m%, míg az alkalmazott SDS mennyisége 2,4 m/m% volt. A HEMA és PEGDMA monomerek 50/50 arányban kerültek alkalmazásra. A reakció duplafalú lombikban, az oxigén kizárásával, nitrogén atmoszféra alatt, folyamatos keverés mellett, emulziós polimerizáció útján ment végbe. A szabadgyökös polimerizáció 60°C-os közegben 0,2 m/m% KPS alkalmazásával, 2 óra alatt játszódott le. A reakció sematikus bemutatását a 3. ábrán láthatjuk. A kapott reakcióelegyet jeges vizes hűtést követően 4 napig dializáltuk desztillált vízzel szemben, majd liofilizáltuk CHRIST ALPHA 1-2 készüléken -52°C-on.

A HEMA-PEGDMA 50-50 mol% összetételű nanorészecskéket a HEMA egy- és a PEGDMA két metakril-csoportja között kialakuló keresztkötések alakítják ki szabadgyökös polimerizáció során (3. ábra). Az NP-k méret-meghatározása során DLS, és SEM vizsgálatokat alkalmaztunk. A SEM felvételekhez a keresztkötött kopolimer kolloidoldatából, liofilizálás útján készített mintákat használtunk. Az oldat koncentrációja 50 µg/ml volt.



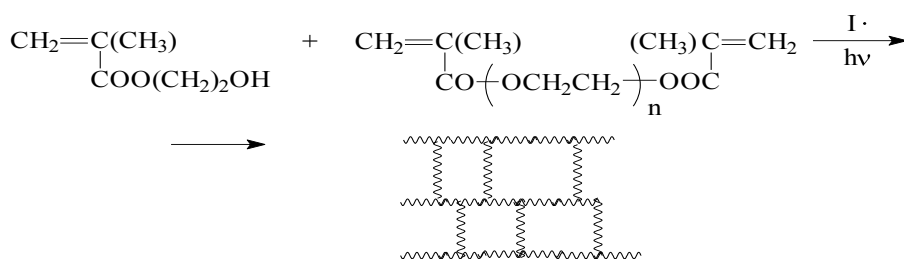
3. ábra. Emulziós polimerizáció elvi vázlat. 2-hidroxietil-metakrilát (HEMA) és poli(etilén-glikol)dimetakrilát (PEGDMA) monomerek, Na-dodecil-szulfát (SDS), mint tenzid oldatában, TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin) katalizátor, és K₂S₂O₈ iniciátor alkalmazásával 60 °C-on lejártszódó reakció esetében.

4.1.2 Biokompatibilis (HEMA-PEGDMA) hidrogélek és nanokompozit-hidrogélek előállítása

A hidrogélek és nanokompozit-hidrogélek (NCHG) előállításához fotoiniciátorként antrakinon-2-szulfonsav nátriumsóját (~99%, Fluka AG. Buchs SG) alkalmaztunk. Hatóanyagként a fogászatban is alkalmazott klórhexidin-diglükonátot (20%-os oldat, Spektrum 3D Kft, Magyarország) (CHX) használtunk. Minden anyagot további tisztítás nélkül alkalmaztunk. A HEMA/PEGDMA hidrogélek előállítása vizes oldatban történt, 30%-os monomerkoncentráció alkalmazása mellett. A monomerek aránya 90/10, 75/25, 50/50, 25/75 és 10/90 értékek szerint kerültek beállításra, 1 mol% monomerekre vonatkoztatott fotoiniciátor felhasználásával. Az elegyek homogenizálása kézi keverést követően ultrahangos fürdőben történt. A NCHG előállítása azonos módszerrel történt, 50/50 HEMA/PEGDMA mátrix hidrogél összetétel alkalmazása mellett 33 m/m% NP került diszpergálásra monomerek és fotoiniciátor tiszta, sárgás színű vizes oldatában. A NP-t nem tartalmazó mátrix hidrogél esetében a CHX vizes oldatát a polimerizáció előtt kevertük monomerek elegyéhez. A NP 48 órás duzzasztás útján előzetesen CHX-nel kerültek megtöltésre, melyből liofilizálással állítottuk elő a töltött részecskéket. A NCHG szintéziséhez ezen száraz, töltött NP rész került a monomerek és az iniciátor oldatában diszpergálásra.

Az így elkészített keverékek 9 mm átmérőjű, és 4, illetve 10 mm-es magasságú hengeres polipropilén formákba kerültek kiöntésre. Az oxigépenetráció és inhibíció megakadályozására az öntőformák tetejét üveglappal zártuk le. A fotopolimerizáció iniciációját Kulzer Palatray CU lámpa (~430 nm, 1,5 watt/cm²) alkalmazásával valósítottuk meg, a minták méretéből adódóan a reakcióidő 25 perc volt.

Munkám ezen szakaszának fő célkitűzése volt CHX-nel töltött NCHG előállítása, mely a mátrix kioldódási sajátságaihoz viszonyítva szabályozottabb módon bocsátja ki hatóanyagtartalmát. Figyelembe véve, hogy a hidrogélek belső struktúrája, porozitása egyike a kioldódást szabályozó legfontosabb tényezőknek, tanulmányom ezen részében több különböző összetételű hidrogélt állítottam elő. A reakciók elvi vázlatát a 4. ábra mutatja be.



Térhálós, biokompatibilis hidrogél

4. ábra. HEMA-PEGDMA hidrogél fotopolimerizációjának elvi vázlata.

Az előállítás során a szerves fázis 30%-volt, melyet vizes emulzióban oszlattunk szét SDS tenzid alkalmazása mellett. 2 g-os polimer oldatok összeállításával öt hidrogél előállítására volt lehetőség, melyekkel a párhuzamos vizsgálatokat végezhattük. A NCHG esetében alkalmazott összmonomer mennyiség állandó volt (0,6 g), míg a NP/hidrogél arány 33% / 66% volt (4. táblázat).

4.1.3 PGA-metakrilálás (MPGA-kialakítás)

Munkám második szakaszát képező biodegradábilis polimer alapú hidrogél szintéziséhez, a laboratóriumunkban bioszintetikus úton előállított poli- γ -glutaminsavat (PGA) ($M_w=1,2 \times 10^6$ Da, GPC) használtam alapanyagként [69]. A karboxil-csoportok reaktivitásának növeléséhez vízdoldékony 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilkarbodiimid hidrokloridot (CDI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmaztam. A fotopolimerizációhoz elengedhetetlen reaktív csoport kialakítását 24 órás intenzív keverés közben a reakcióelegyhez adagolt 2-aminoetil-metakrilát hidroklorid (AEM) (90%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmazásával értem el.

A polimerkoncentráció 10 mg/ml volt. A kapott polimer tisztítása tangenciális membránszűréssel történt Vivaflow 200 (MWCO 10000Da, PES, Sartorius AG, Németország) alkalmazásával, 5-10 szeres mennyiségű desztillált vizes mosás mellett. A kapott tisztított és koncentrált minta az előzőekben ismertetett körülmények között került liofilizálásra. Fogászati vonatkozással bíró hatóanyagként metronidazol (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), míg a fotopolimerizációs reakció iniciálására Irgacure 2959 (~99%, CIBA) került alkalmazásra. Ezen az úton kialakított metakrilált-PGA (MPGA) polimer a fogászati gyakorlatban használt látható tartományba eső „kék fény” (385-515 nm) hatására polimerizálható.

4.1.4 Biodegradábilis MPGA-hidrogél előállítása

Az MPGA-alapú hidrogél kialakítása foszfát-pufferes (pH: 7,45) (PBS) közegben, 30 m/m% polimerkoncentráció és 2 mol% (reaktív csoportra vonatkoztatva) fotoiniciátor alkalmazása mellett került kivitelezésre. A fotopolimerizációs reakció Dentacolor XS (435 nm, ~3 watt/cm²) (Kulzer, Németország) fotopolimerizációs ládában/fénykályhában zajlott, felvillanó (flash) üzemmódban, 90 másodperc reakcióidő alkalmazásával. Mintatartóként teflonból készült, 2 mm magasságú és 5 mm átmérőjű hengeres minták előállítására alkalmas eszközt alkalmaztunk.

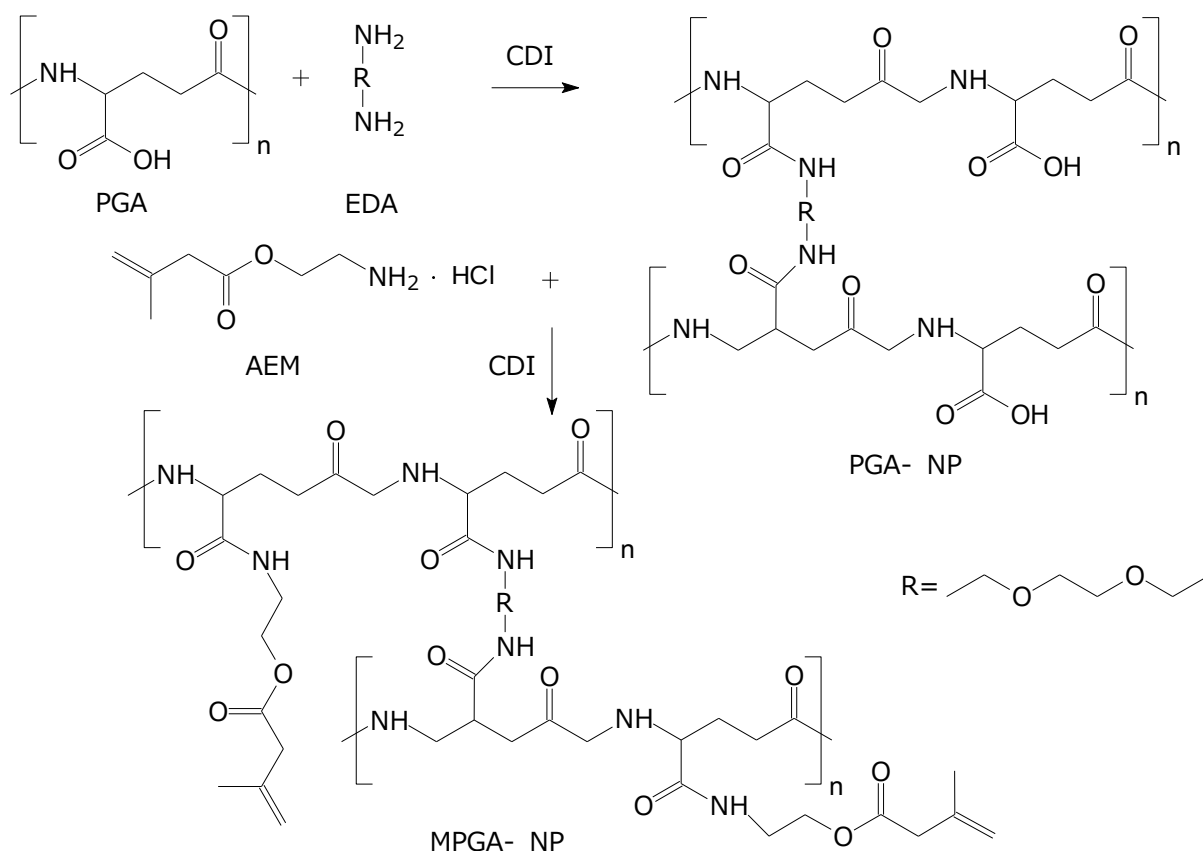
4.1.5 PGA keresztkötés és metakrilálás (MPGA-NP kialakítás)

Munkám harmadik szakaszában a PGA ($M_w \geq 1 \times 10^6$ Da, GPC-alapján) (Nanjing Saitaisi Biotechnology Co. Ltd, Nanjing, Kína) kétlépéses reakcióban került átalakításra. A reakciók során a korábban említett AEM került alkalmazásra. Vízoldékony karbodiimidként 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilkarbodiimid hidrokloridot (CDI) (Carbosynth Limited, Compton, Berkshire, UK), és keresztkötő ágensként 2,2'-(Etiléndioxi)bisz(etilamin)-t (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (EDA) használtam. Az alkalmazott fotoiniciátor szintén az Irgacure 2959 volt, fogászati gyakorlatban alkalmazott aktív komponensként viszont ampicillin-Na (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) került felhasználásra.

Az első lépésben a karboxil-csoportok 50%-nak CDI aktivációját követően EDA felhasználásával keresztkötéses reakció játszódik le, mely NP kialakítását eredményezi [93]. A következő lépésben a maradék karboxil-csoport újabb CDI aktiválásán keresztül, az AEM segítségével, a kialakított NP-k metakril-csoporttal történő módosítása zajlott le. A reakciók desztillált vizes közegben, 10 mg/ml polimer koncentráció mellett, lépésenként 24 óra alatt

mentek végbe. A minta tisztítása és liofilizálása az MPGA kialakítása részben vázolt eszközökkel, és körülmények között történt.

A biodegradábilis γ -PGA-alapú hidrogél és nanogél rendszerek kialakításához először az alap polimer módosításait kellett elvégezni. Ez MPGA esetében egy metakrilálási reakciót, MPGA-NP esetében pedig egy keresztkötéses reakciót követő metakrilálást jelentett. Az 5. ábra az MPGA-NP kialakítását célzó, két lépéses reakció elvi vázlatát mutatja be, mely a köztes lépés nélkül az MPGA reakciót is tartalmazza.



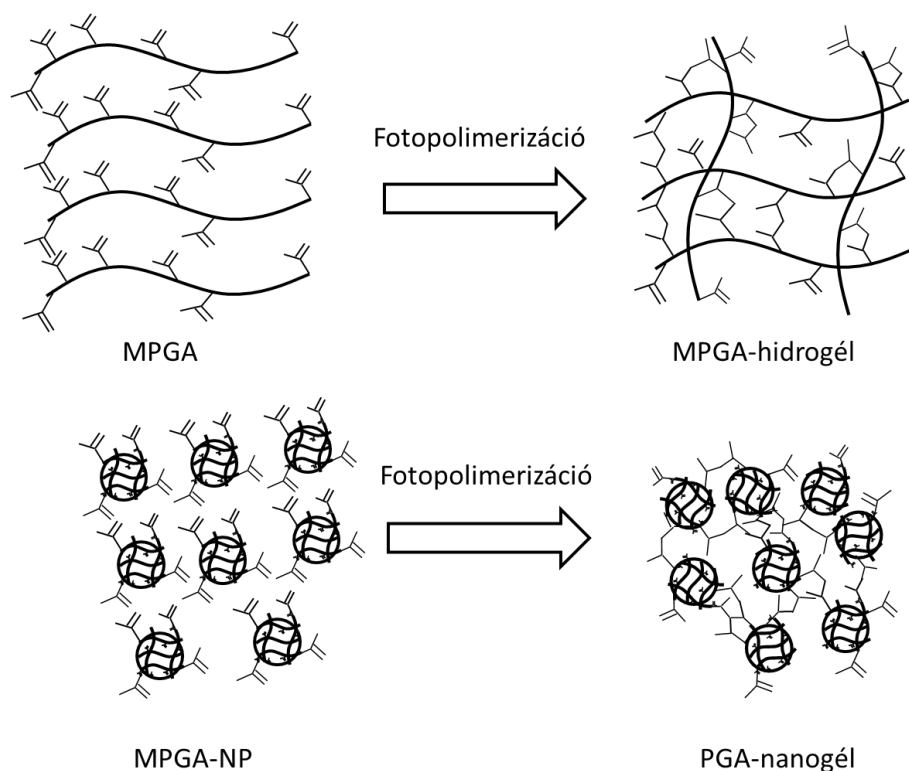
5. ábra. PGA módosítási reakcióinak sematikus ábrázolása. Az első lépés egy keresztkötéses reakció, ahol a karboxil-csoportok CDI-del történő aktivációját követően képez keresztkötéseket az EDA. 24 órával később a második lépésben egy metakrilálási reakciót hajtottunk végre, ahol a maradék karboxil-csoport CDI-es újraaktiválásán keresztül teremtettük meg a feltételeit az AEM kapcsolódásának. Ezen a kétlépéses reakción keresztül került a metakrilált PGA-nanorészecske (MPGA-NP) kialakításra. Az első keresztkötéses reakció elhagyásával metakrilált PGA polimert (MPGA) nyerhetünk egy lépésben.

Az így kialakított metakrilált PGA-nanorészecske (MPGA-NP) a fogászati gyakorlatban alkalmazott látható tartományba eső „kék” (385-515 nm) fényt kibocsátó fényforrások segítségével szintén polimerizálhatóak.

4.1.6 MPGA-NP-alapú hidrogél (PGA-nanogél) szintézise

Az MPGA-NP-alapú hidrogél (PGA-nanogél) szintézise az MPGA-hidrogél kialakításával azonos módon történt, kivéve, hogy a polimerkoncentráció ebben az esetben 33% volt, s közegként fiziológiás sóoldatot választottunk.

A keresztkötések kialakítása a 6. ábrán vázlatosan bemutatott séma szerint történt, 90 másodperc besugárzási idő alkalmazásával, fotopolimerizáció útján.



6. ábra. MPGA-alapú hidrogél és MPGA-NP-alapú PGA-nanogél előállításának sematikus ábrázolása.

4.2 Előállított anyagok jellemzésére használt módszerek

4.2.1 PGA keresztkötési és metakrilálási reakciók jellemzése

4.2.1.1 Mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR)

A módosított PGA-kat, mind a metakrilálási, mind a keresztkötést követő metakrilálási reakciókat követően Proton-mágneses magrezonancia spektroszkópiai módszerrel (^1H NMR) (Bruker 200SY, 200 MHz) jellemeztük. A mintákat 10 mg/ml koncentrációjú D_2O oldatában vizsgáltuk, eredményeinket 3-(trimetilszilil)-propionát- d_4 referencia jel alapján a kémiai eltolódás (ppm) alapján mutattuk be.

4.2.2 Nanorészecskék mérettartományainak meghatározása

4.2.2.1 Dinamikus fényszórás fotometria (DLS)

A kialakított NP hidrodinamikai átmérőjét - biokompatibilis és biodegradábilis formák esetében is - fényszórás fotometria (BI-200SM, Brookhaven Research Laser Light Scattering fotométer, NbYAG szilárd fázisú lézerrel, Brookhaven Instruments Co., USA) (DLS) segítségével határoztuk meg. Az átlagos részecskeméret-eloszlás meghatározása 25 °C-on 90°-os detektálási szög mellett, optikailag homogén henger alakú kvarc küvettában $\lambda_0=532$ nm hullámhossz alkalmazásával történt. A vizsgált minta a HEMA/PEGDMA NP esetében a dialízist követő reakcióelegy liofilizált formájából került kialakításra 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polimer-koncentráció alkalmazásával, míg MPGA-NP esetében a liofilizált minta 0,5 mg/ml koncentrációban került diszpergálásra.

4.2.3 Hidrogélek, nanogélek és nanokompozit-hidrogélek jellemzése

4.2.3.1 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A SEM vizsgálatok mintaelőkészítése során a biokompatibilis hidrogélek és nanokompozitok 110°C-on kerültek kiszárításra, majd kétszer 30 másodpercig 10-20 mPa nyomáson, 18-20 mA plazmaáram alkalmazása mellett 100-200 nm vastagságú arany bevonat kialakításra a felszíneken. A minták vizsgálata HITACHI S4300 CFE (Tokyo, Japán) készülékkel történt, 1,5 és 10 kV alkalmazott gyorsító feszültség alkalmazásával.

A PGA-nanogél esetében aceton/víz oldatsorral történő vízmentesítést követő CO₂ kritikus ponton végzett szárítást választottunk, s gyorsító feszültségként egyedül a 10 kV került alkalmazásra, a többi paraméter megegyezett a korábban alkalmazottal.

4.2.3.2 Mechanikai tulajdonságok vizsgálata

A kialakított különböző térhálósűrűségű hidrogélek és NCHG mechanikai tulajdonságai INSTRON 4302 (erőmérő cella: 0,1 kN, nyomási sebesség: 2 mm/perc) (Massachusetts, USA) univerzális mechanikai vizsgálókészülék segítségével kerültek összehasonlításra. Méréseinket az MSZ EN ISO 604:2003-as szabvány szerint végeztük. A nyomóvizsgálatok során a minták 9 mm átmérőjűek, és 4, illetve 9 mm magasságúak voltak. A mechanikai vizsgálatok a megbízható eredmények eléréséhez tíz minta párhuzamos mérésével kerültek kivitelezésre.

Az MPGA-hidrogélek és a PGA-nanogélek esetén a mechanikai paraméterek jellemzése INSTRON 5544 Univerzális mechanikai vizsgálókészülék (Instron, USA) segítségével történt. A nyomóvizsgálat paraméterei az előzőleg ismertetettel megegyeznek, a vizsgált hidrogélek és nanogélek dimenziói viszont hengeres testként 5 mm átmérő és 2 mm magasság szerint kerültek meghatározásra.

4.2.3.3 Duzzadási paraméterek meghatározása

A 9 mm átmérőjű, és 4 mm magasságú biokompatibilis gélek duzzadási paramétereit desztillált vizes közegben, tömegméréssel, a polimerizációt követően kialakult gél tömegéhez viszonyítva határoztuk meg az alábbi képlet alapján:

$$W_p = (W_s - W_d) / W_d \times 100;$$

ahol W_p a duzzadás mértéke százalékosan kifejezve, W_s a duzzadt gél tömege, és W_d a polimerizációt követően mért eredeti gél tömege. A méréshez a géleket meghatározott időpontokban a vízből eltávolítottuk, a felületén lévő folyadékot óvatosan szűrőpapírral leitattuk. A méréseket a tömegállandóság eléréséig folytattuk. A duzzadási sajátságok vizsgálata öt párhuzamos minta alkalmazásával történt a hidrogélek esetében, és három párhuzamos mérés az NCHG-nél. Az MPGA-hidrogélek és PGA-nanogélek ugyanezen módszerrel kerültek vizsgálatra, míg a hidrogélek esetében PBS, míg a nanogélek esetében fiziológiás sóoldat volt a duzzasztó közeg. A hidrogél, és nanogél minták paraméterei 5 mm átmérő, és 2 mm magasság voltak. A duzzadásvizsgálat kiértékelésekor öt párhuzamos mérés eredményei kerülnek bemutatásra, mind a metronidazollal töltött, mind pedig a hatóanyag nélküli gélek esetében.

4.2.3.4 Kioldódás vizsgálatok (kumulatív kioldódási eljárással)

A biokompatibilis gélek esetében kioldódási profilok meghatározásához 9 mm átmérőjű és 4 mm magasságú CHX-t tartalmazó rendszerek kerültek összeállításra a 4. táblázat adatai szerint. A vizsgálat során a különböző elhelyezkedésű hatóanyagok felszabadulásának mértéke került meghatározásra. Az NCHG1 minták esetében a CHX csak a mátrixba, az NCHG2 esetben csak az NP részbe töltve volt jelen, míg az NCHG3-nál mind a két komponens tartalmazta. A vizsgálat során a mátrix 15 mg, míg a NP rész 45 mg, így összesen 60 mg CHX-t tartalmazott. A mintákat folyamatos kevertetés mellett desztillált vízbe (35 ml) merítettük, és meghatározott időpontokban 0,5 ml vizsgálati mintát vettünk a kioldódási közegből. A CHX koncentrációjának meghatározása Merck-Hitachi LaChrom nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC, Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) készüléken, Nucleosil-C18 Nucleosil (5 µm) kolonna alkalmazásával, 257 nm-en UV-detektorral történt. A mobil fázis 35% acetonitrilt és 65% 20 mM acetát-puffert (pH: 3,8) tartalmazott, az áramlási sebesség 0,5 ml/perc volt.

Az MPGA-hidrogélek és a PGA-nanogélek esetében 3,33 mg/g gél koncentrációval alakítottunk ki metronidazol és ampicillin tartalmú rendszereket, melyeket az MPGA-hidrogélek esetében 25 ml PBS, míg PGA-nanogél esetében 20 ml fiziológiás sóoldat kioldó közegbe helyezve vizsgáltuk folytonos kevertetés közben. Az MPGA-hidrogélek vizsgálata során előre meghatározott időpontokban 0,3ml minta került eltávolításra, melyet Waters 600 HPLC (Waters Co., USA) készülék segítségével 275 nm-en UV-detektálás útján elemeztünk (545 UV-VIS detektor, Nucleosil-C18 kolonna, 5 µm). Mobil fázisként 25% acetonitrilt, és 75% PBS-t (pH:7,45) alkalmaztunk, 0,9 ml/perc áramlási sebességgel.

A PGA-nanogélekből történő ampicillin felszabadulást 0,2 ml eltávolított minta elemzésével végeztük, melyet Dionex Ultimate 3000 HPLC (Dionex Softron GmbH, Germeiring, Németország) készülék segítségével hajtottunk végre Accucore® aQ (C18, 2,6 µm) kolonnán, és 210 nm-en történő UV-detektálás útján. Mobil fázisként 40% acetonitrilt és 60% fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk, 0,4 ml/perc áramlási sebesség mellett. Eredményeinket az eredetileg alkalmazott hatóanyag-tartalom arányában, százalékosan került kifejezésre.

A szabad ampicillin oldat és a nanogélbe töltött forma hatásának összehasonlítását mikrobiológiai módszerrel végeztük. E. coli ER2738 (NEB) baktériumtörzzsel oltottunk be top agart, melyet LB lemezre öntöttünk ki. A PGA nanogélek ampicilinnel töltve és anélkül közvetlenül a kiöntést követően kerültek a top agarba. Az ampicillin oldatot, és a fiziológiás

sóoldatot (negatív kontroll) az agarban kialakított üregekbe pipettáztuk. Négy párhuzamos lemezen végeztük a kísérletet. Az ampicillin oldat és a PGA nanogél lemezenként azonos mennyiségű hatóanyagot tartalmazott. Canon EOS 70D (Canon Inc. Japán) digitális fényképezőgép segítségével 4., 6., 8., és 20. órában készítettünk fényképfelvételeket. A kialakult gátlási zónák területeit ImageJ szoftver segítségével mértük meg. A PGA-nanogélekkel kapcsolatos kísérletek során a folyamatok megbízható vizsgálataihoz minimum három párhuzamos minta szolgáltatja az adatokat, de a mikrobiológiai vizsgálatok $n=4$, duzzadási paraméterek $n=5$, illetve a mechanikai paraméterek jellemzése során $n=10$ párhuzamos mérést végeztünk.

4.2.4 Toxikológiai, biokompatibilitási és sejtmorfológiai vizsgálati eljárások

A biodegradábilis MPGA-hidrogélek esetében a biológiai rendszerekben történő felhasználhatósághoz a sejtekre gyakorolt hatásokat MTT-, és LDH-tesztekkel vizsgáltuk, illetve figyelemmel követtük hidrogéleken növekedő keratinocita sejtek morfológia változásait is.

4.2.4.1 MTT- és LDH-tesztek

A felhasznált CaCo-2 sejtvonalat a European Collection of Cell Cultures-től (ECACC), az LDH Cytotoxicity Detection Kit-et a Roche Diagnostics-tól (Németország, Mannheim), az MTT formazánt, 2-propanolt (99%) és sósavat (37%) a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A citotoxicitás vizsgálatokhoz 96-lyukú sejttenyésztő lemezben növesztettünk sejteket (10000 sejt/lyuk az MTT vizsgálatához, 2000 sejt/lyuk az LDH vizsgálatához) 37 °C-os inkubátorban, 5% CO₂ tartalom mellett, 7 (MTT), illetve 2 napig (LDH). Vizsgálataink során médiumcserét követően a sejtek a mintával 30 percig voltak inkubálva, majd a vizsgált anyag eltávolítását követően újabb 3 óra inkubációra került sor 0,5mg/ml MTT-t tartalmazó médiumban. A sötétkék formazánkristályok oldása savas izopropanol oldatban (izopropanol/sósav: 25/1) történt. Az abszorbancia mérés 570nm-en történt 690nm-es referencia hullámhosszal korrigálva, FLUOstar OPTIMA Microplate Reader (BMG LABTECH, Offenburg, Németország) alkalmazásával.

A laktát-dehidrogenáz (LDH) egy olyan enzim, ami minden sejt citoplazmájában megtalálható, és a sejtmembrán sérülése esetén gyorsan a sejttenyésztő oldatba kerül. A tesztanyaggal 30 percig kezeltük a sejteket, majd ezután mértük a sérült sejtekből történő LDH felszabadulást. A vizsgálatokat a gyártó ajánlása szerint végeztük az LDH Cytotoxicity Kit-tel. Az eredményeket a kezeletlen kontroll minták, valamint a 100%-ban sejtpusztító

hatású triton-X 100 abszorbancia értékeihez viszonyítva fejeztük ki. A megbízható eredmények eléréséhez három párhuzamos minta szolgáltatotta a mérési adatokat.

4.2.4.2 Sejtmorfológiai vizsgálatok

A festékkizárási vizsgálatokhoz immortalizált HaCaT keratinocita sejteket növesztettünk Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM), kiegészítve 10% fetal bovine szérummal (FBS), antibiotikummal és antimikotikummal (a gyártó mindegyik esetében az Invitrogen, St. Louis, MO, USA), valamint 0,4% tripánkék oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [94]. A sejtmorfológiai vizsgálatokhoz szilánnal (Ultradent® Silane, Ultradent Products Inc., USA) előkezelt, majd MPGA-hidrogéllal bevont, valamint kezeletlen kontroll fedőlemezeket használtunk. 12 lyukú sejtenyészítő lemezbe helyezve növesztettünk rajtuk sejteket, amiket 6 illetve 24 óra elteltével 0,4% tripánkék oldattal festettünk meg a gyártó leírása alapján. A sejtekről készült felvételeket egy Motic E21 invertált mikroszkóphoz csatlakoztatott Nikon Coolpix P 5100 digitális kamerával (Japán) rögzítettük. A vizsgálatához használt vegyszereket, reagenseket külön tisztítás nélkül használtuk fel.

4.2.4.3 Alamar Blue teszt

A PGA-nanogélek esetében az Alamar Blue (Invitrogen, DAL1100) sejtprolifерáció és életképesség vizsgálatához humán oszteoszarkóma eredetű SAOS-2 (ATCC, USA) sejtvonalat használtunk. 24 lyukú sejtenyészítő lemezen $9 \cdot 10^4$ sejtet szélesztettünk egy-egy lyukba, és négy órán át hagytuk őket letapadni. A letapadt sejteket szintelen DMEM tápfolyadékkal (Sigma Aldrich, D5921) mostuk, majd 2 órán át 5% CO₂-tartalom mellett 37°C-on inkubáltuk Alamar Blue-t tízszeres hígításban tartalmazó szintelen DMEM tápfolyadékban. A redukált Alamar Blue fluoreszcenciáját Hidex Sense Microplate Readerrel (Hidex Oy, Turku, Finnország) mértük 530 nm hullámhosszú gerjesztő fénnel. Az emittált fényt 590 nm-es szűrőt használva detektáltuk és meghatároztuk az átlagos fluoreszcencia intenzitást (nulladik napos minta az ábrán). A mérés után az Alamar Blue reagenst tartalmazó tápfolyadékot lecseréltük DMEM tápfolyadékra (Sigma Aldrich D6046), amibe a PGA-nanogélt (2 mm x 5 mm) tartalmazó sejtenyészítő kosárkát helyeztünk (Millipore 24 Well Millicell hanging cell culture inserts 0,4 µm PET; Millipore Co. Billerica, MA). A mérést 4, 24, 48 és 72 óra elteltével is megismételtük. A nanogélt tartalmazó kosárkákat minden mérés előtt eltávolítottuk, majd a mérés után visszahelyeztük, így ugyanazt a sejtenyészetet mértük

minden időpontban. Kontrollként kezeletlen SAOS-2 sejtenyészeteket használtunk. Az ábrán a három párhuzamos mintából származó szórást is feltüntettük.

4.2.4.4 Fluoreszcens és konfokális lézer szkennig mikroszkópia

A sejtek morfológiai és proliferációs sajátosságainak mikroszkópos vizsgálataihoz a PGA-nanogéleket kémiaiilag kötöttük fedőlemezekhez. A fedőlemezeket (13 mm átmérőjű #1.5 kör alakú fedőlemez; Thermo Scientific Menzel GmbH., Németország) 1:1 arányú 48 v/v%-os fluorsav (VWR International, ECR) és desztillált víz keverékével kezeltük 1 percig, majd kétszeri desztillált vizes és egyszeri acetonos mosás után szilánnal (Ultradent® Silane, Ultradent Products Inc., USA) módosítottuk a felszínüket. Levegőn történt szárítás után a PGA-nanogélt vékony filmrétegben vittük föl a fedőlemezek felületére, a kémiai kötés 90 másodperces fotopolimerizációval történt Dentacolor XS kamrában. Az így elkészített mintákat 24 lyukú sejtenyésztő lemezekbe helyeztük és 30 percig UV fény alatt fertőtlenítettük. Negatív kontrollként kezeletlen fedőlemezeket használtunk.

A proliferációs és életképességi vizsgálatokhoz a SAOS-2 sejteket CellTracker Green BODIPY (Molecular Probes, USA) festékkel jelöltük, majd szélesztettük őket a 24 lyukú lemezekben elhelyezett kezelt és kezeletlen fedőlemezekre (10^5 sejt/lyuk). A 24, 48, 72 és 168 órás mérésekhez minden mintát újra jelöltük a CellTracker Green BODIPY festékkel. Közvetlenül a mérés előtt a jelölőfestéket tartalmazó tápfolyadékot lecseréltük és propidium-jodidot adtunk hozzá, a halott sejteket jelölendő. Fluoreszcens inverz mikroszkóppal (Zeiss AxioVert A1; Zeiss, Németország) készítettünk felvételeket 6, 24, 48, 72 és 168 óra elteltével. A morfológiai vizsgálatokhoz szintén SAOS-2 sejteket szélesztettünk a 24 lyukú sejtenyésztő lemezekben elhelyezett kezelt és kezeletlen (kontroll) mintákra (10^5 sejt/lyuk), és 6, 24, 48, 72 és 168 óra után jelöltük. A sejtek jelöléséhez egy korábban már leírt protokoll módosított verzióját használtuk: a mintákat háromszor mostuk glükóz-HEPES pufferben (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$), majd 1%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk 10 percig [95]. Ezután ismét háromszori mosás következett glükóz-HEPES pufferben, majd A488-phalloidinnal és Hoechst-tel (Life Technologies, USA) jelöltük a sejteket 0,1% Triton X-100-at (Sigma, USA) tartalmazó glükóz-HEPES pufferben 30 percig, ezután ismét háromszori mosás következett, végül egy újabb fixálás 1%-os paraformaldehiddel. A jelölt mintákat Fluorescent Mounting Mediummal (DAKO, Dánia) fedve tárgylemezre helyeztük úgy, hogy a minta a tárgylemez és a fedőlemez között legyen. A konfokális képeket Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Németország) konfokális lézer szkennig mikroszkóppal készítettük.

4.2.5 Statisztikai analízis módszerei

Az MPGA-hidrogélek esetében a statisztikai vizsgálatokat (SigmaStat version 3.1; SPSS, Inc. San Jose, CA, USA) ONE WAY ANOVA/ egyutas ANOVA módszerrel, Tukey-féle post hoc teszt alkalmazásával végeztük, a szignifikancia/különbségszint $P < 0,05$ meghatározása mellett.

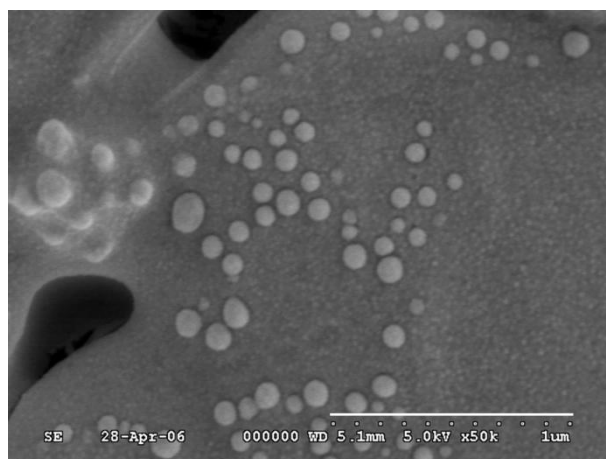
A PGA-nanogélek esetében a csoportok átlagainak és eloszlásuknak összehasonlítására független t-tesztet vagy Welch-féle tesztet alkalmaztunk a varianciák egyenlőségétől függően. Az időfüggés kérdéskör esetében Leven-féle F-tesztet használtunk. A kis mintaszámok, és az eredeti eloszlások normalizálásának esetleges hiánya miatt Mann-Withney tesztet is futtattunk, melyet a t-teszt egy nem parametrikus alternatívájaként tekinthetünk. ANOVA tesztet is végeztünk a tényezők befolyásának vizsgálatára. IBM SPSS Statistics 22 programot alkalmaztunk a statisztikai számításokhoz.

5. EREDMÉNYEK

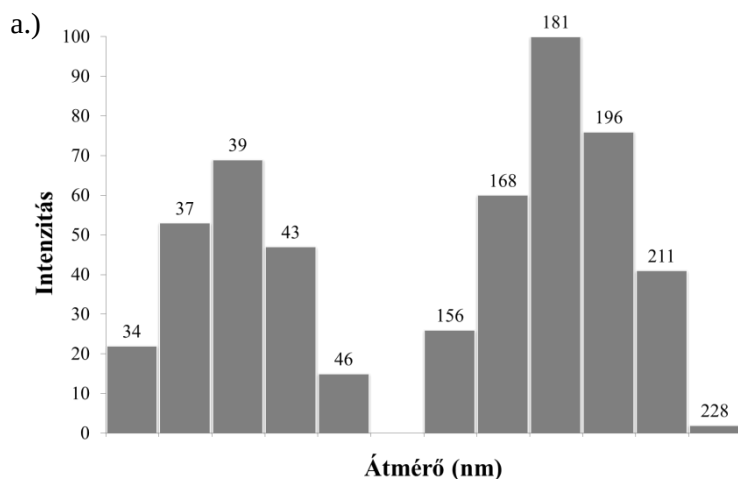
5.1 Biokompatibilis (HEMA-PEGDMA) nanorészecskék (NP) hidrogélek és nanokompozit-hidrogélek (NCHG) jellemzése

5.1.1 HEMA-PEGDMA nanorészecskék (NP)

A munkám első részében előállított HEMA-PEGDMA 50-50 mol% összetételű nanorészecskék mérete kiszárított állapotban, fedő aranyréteg alkalmazása mellett, 50-150 nm közötti mérettartományba esett a SEM felvétel alapján (7. ábra). A DLS mérések eredményei szerint az oldat formában 5-500 nm tartományon belül találhatóak részecskék (8. ábra).



7. ábra. SEM felvétel. 50/50 HEMA-PEGDMA nanorészecskék



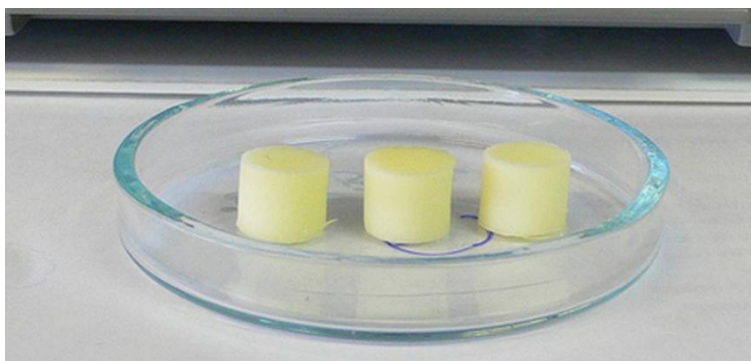
b.)

Megoszlás (%)	HEMA:PEGDMA 50:50	
	Kisebb méret	Nagyobb méret
Intenzitás	42	58
Térfogat	98	2
Szám	100	0

8. ábra. Dinamikus fényszórás fotometriás (DLS) mérés eredményeinek összefoglalása HEMA és PEGDMA 50-50% összetételű nanorészecske (100 µg/ml koncentrációjú oldatának vizsgálatából). a.) A nanorészecskék méreteloszlása. b.) A kis és nagy mérettartomány megoszlása a kapott jel alapján, intenzitás, térfogat és szám szerint (n=3).

5.1.2 HEMA-PEGDMA-hidrogél és nanokompozit hidrogél (NCHG)

Az előállított gélek henger alakúak, formatartóak, sárga vagy sárgás-fehéres színűek, rugalmas tapintásúak voltak (9. ábra). A gélek transzparenciája a keresztkötő PEGDMA arányának növekedésével együtt nőtt.



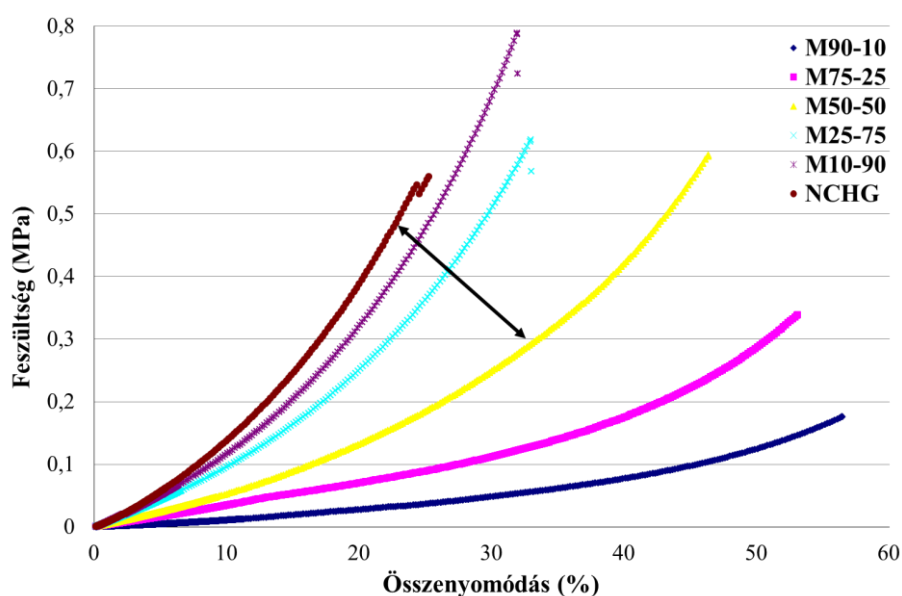
9. ábra. Fotopolimerizáció útján előállított biokompatibilis HEMA-PEGDMA hidrogélek.

Az előállított NCHG tömörebb, szilárdabb, rigidebb és transzparensabb gél alkotott, mint a hidrogél.

5.1.3 HEMA-PEGDMA hidrogél, és NCHG tulajdonságai

5.1.3.1 Mechanikai tulajdonságok

A hidrogéleket öt különböző összetétel szerint vizsgáltam (3. táblázat). Az 1. (HEMA-PEGDMA 90-10) mátrix gél esetében mért nyomószilárdság értéke 0,18 MPa-ról a 3. (HEMA-PEGDMA 50-50) összetétel esetében 0,59 MPa-ra változott, mely az 5. (HEMA-PEGDMA 10-90) mintánál 0,79 MPa értéknek adódott. Az 50-50 HEMA-PEGDMA mátrix gél és a NCHG nyomószilárdság értékek rendkívül hasonlóan alakultak: 0,59 MPa és 0,56 MPa. A gélek összenyomódás értékei a térhálósűrűség növekedésével fokozatosan csökkennek. Az 1. minta esetében mért 56,5%-os összenyomódás az 5. mintánál 32%-ra változik. Az NCHG esetében ez a csökkenés még kifejezettebb, s csak a 25,3%-os szintet éri el. A 10. ábrán a görbék lefutása követhető nyomon.



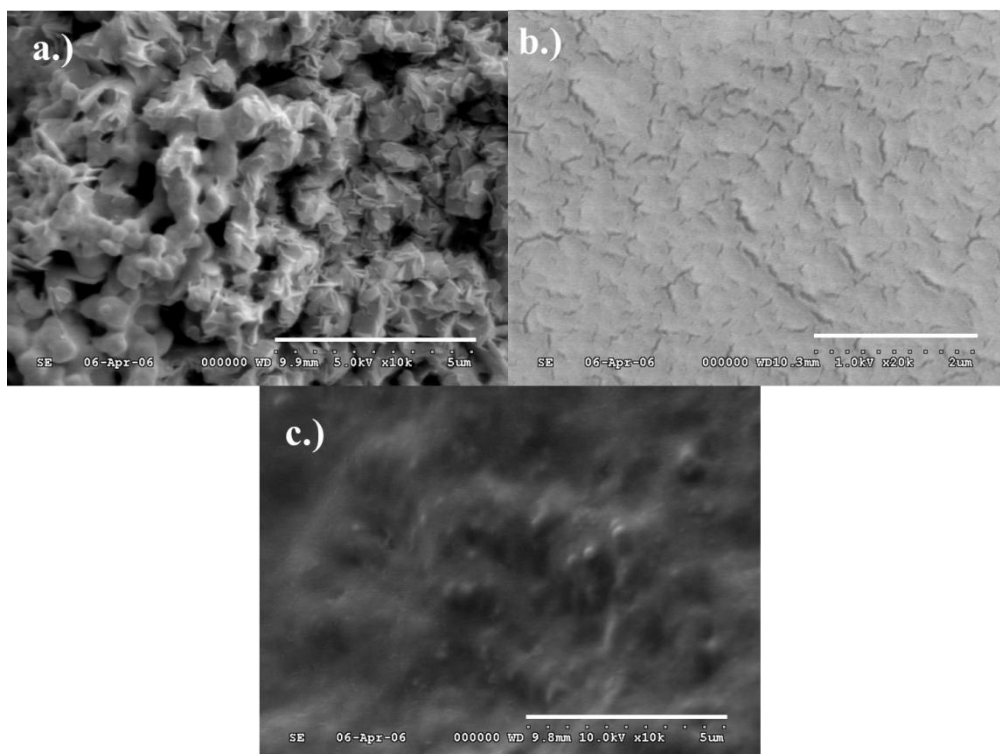
10. ábra. A HEMA-PEGDMA hidrogélek esetében a keresztkötő ágens arányának, illetve NCHG esetében a NP-k hatása a nyomószilárdság változására. A fekete nyíl mutatja az 50-50% HEMA-PEGDMA arányú hidrogél és az azonos összetételű mátrix 33%-NP-vel módosított változatát (n=10).

3. táblázat. Különböző összetételű mátrix hidrogélek (1-5) és NCHG nyomószilárdság-mérés során meghatározott feszültség és összenyomódás értékei (n=10).

Minta	1	2	3	4	5	NCHG
HEMA-PEGDMA	90-10	75-25	50-50	25-75	10-90	50-50+33%NP
Összenyomódás (%)	56,5	53,1	46,4	38,5	32,0	25,3
Feszültség (MPa)	0,18	0,34	0,59	0,61	0,79	0,56

5.1.3.2 SEM felvételek

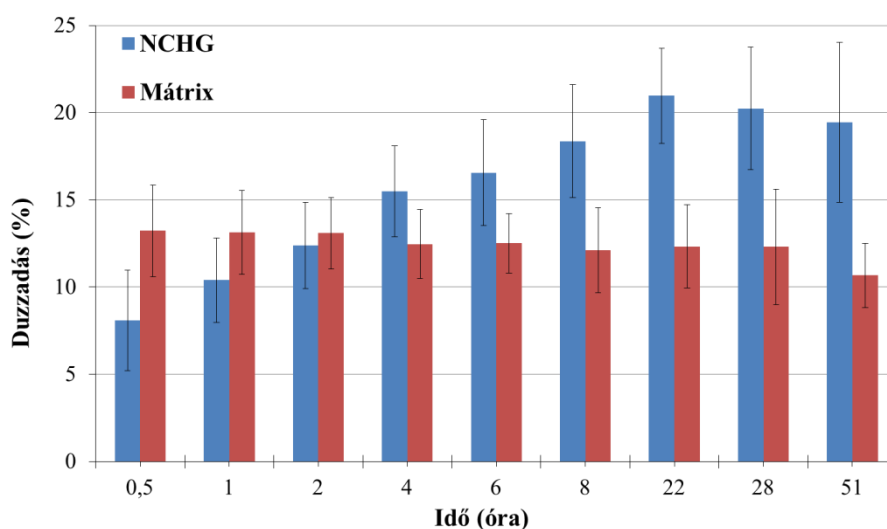
A hidrogélek és a NCHG-ek felvételei a 11. ábrán láthatóak. A hidrogélről készült felvétel (11. a.) ábra) bizonyítja, hogy a gél két különböző típusú felületből épül fel. Ezen felületek nem különböznek egymástól rendkívüli módon, s az egész hidrogélt felépítő struktúráknak tekinthetők. Az egyik egy szögletesebb rész, mely különböző kisebb szögletes alakzatokból épül fel, mely különböző göbolyúbb formákból álló környezetbe van beágyazva. Ez a kettős elrendezés általánosan jellemzi a teljes mátrix struktúráját. A NCHG felszint mutatja be a 11. b.) ábra. A képen 20000-szeres nagyításban is egy relatív sima felületet látható, melyen mindössze keskeny repedések fedezhetőek fel. A repedések mérete a 100-200 nm-es nagyságrendbe esik. Az 11. c.) ábrán a törött felszint látható, a képen a mátrixban szétosztatott NP-k fedezhetőek fel. A képen felismerhető részecskék gömb alakú, 200nm körüli objektumok, melyek a mátrixba vannak beágyazva.



11. ábra. SEM felvételek. a.) 50/50 HEMA/PEGDMA mátrix hidrogél felszíne b.) [66% HEMA/PEGDMA=50/50 és 33% NP] összetételű NCHG felülete. c.) [66% HEMA/PEGDMA=50/50 és 33% NP] összetételű NCHG tört felszíne.

5.1.3.3 Duzzadás vizsgálat

A duzzadási kinetika alakulását a hidrogélek és a NCHG viszonylatában is a 12. ábrán követhetjük nyomon. A grafikonon szembejövő, hogy a hidrogélek tömege a fotopolimerizációt követően nem változott jelentős mértékben az eredeti tömeghez viszonyítva, mindössze 13% körüli volt a növekedés az első fél órában, majd ezt követően az egyensúlyi állapot beállását figyelhettük meg. Ezzel szemben a NCHG duzzadása jelentősen különbözött. Ebben az esetben az első két órában lassabb duzzadást követhettünk nyomon, mely folyamat a 22. óráig tartott, amikor is a minták elérték egyensúly közeli állapotukat. A NCHG duzzadási kapacitása a hidrogélétől magasabb értéknek adódott (22% körül), mely vízfelvétel viszont időben elnyújtva következett be.



12. ábra. HEMA-PEGDMA 50-50 összetételű hidrogél (Mátrix), és [66% HEMA-PEGDMA 50-50 hidrogélbe ágyazott 33% 50-50 HEMA-PEGDMA-NP] összetételű NCHG duzzadási sajátságainak az összehasonlítása. A duzzadási sajátságok vizsgálata öt párhuzamos minta alkalmazásával történt a hidrogélek esetében, és három párhuzamos méréssel a NCHG-nél.

5.1.3.4 Kioldódási tulajdonságok

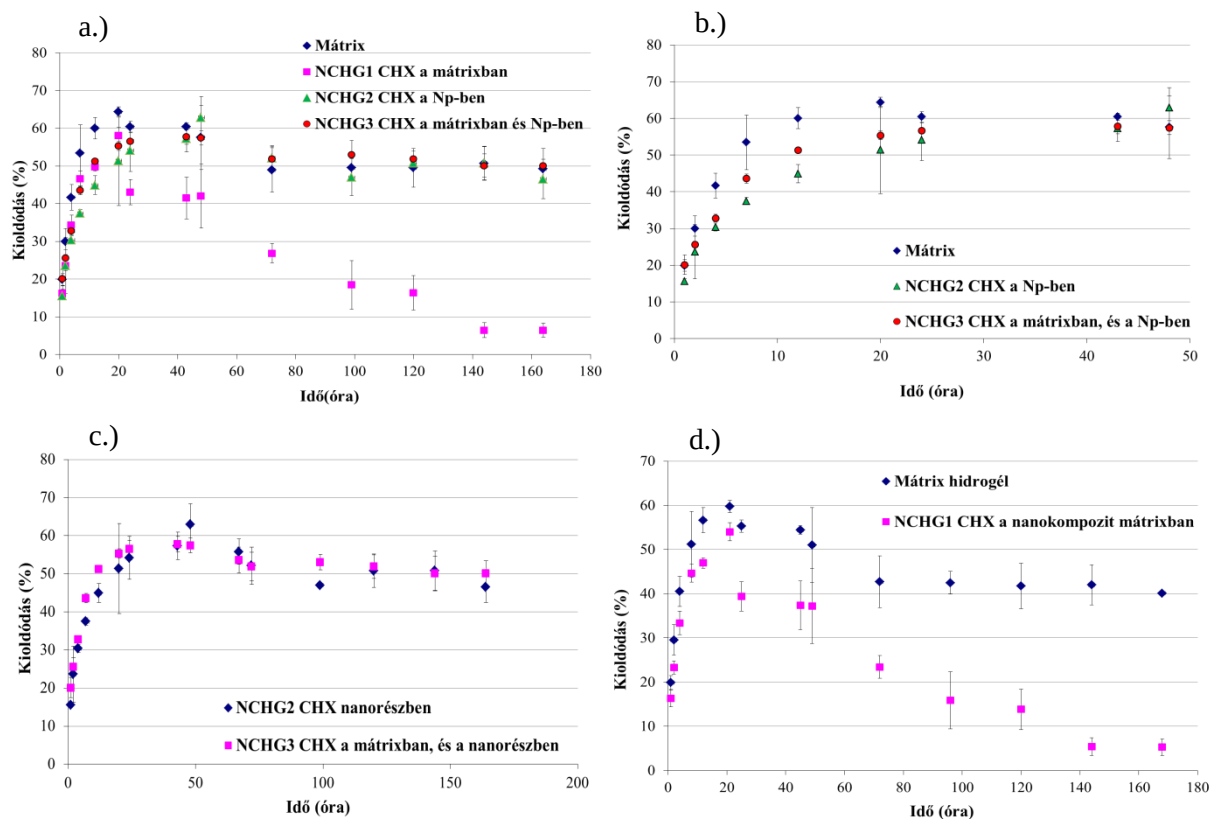
A kioldódási sajátságok vizsgálatához kialakított 50-50 HEMA-PEGDMA hidrogél, és különböző módon hatóanyaggal töltött NCHG összetételeit a 4. táblázat mutatja be.

4. táblázat. A kioldódás vizsgálatok végrehajtásához előállított hidrogélek összetétele. A mátrix hidrogél (50-50 HEMA-PEGDMA) 15mg CHX-t tartalmazott, míg a 66% 50-50 HEMA-PEGDMA alap, és 33% 50-50 HEMA-PEGDMA-NP összetételű NCHG-k esetében az NCHG1 15mg CHX-nel volt töltve a mátrixban, a NCHG2 45mg CHX-t tartalmazott, de csak a NP-részben, s a NCHG3 esetében 60mg CHX került alkalmazásra, 15mg a mátrixban, és 45mg a NP-ben (n=3).

Összetétel / Minta	HEMA (g)	PEGDMA (g)	Iniciátor (g)	NP (g)	CHX 20% (ml)	H ₂ O (g)
Mátrix	0,1069	0,4930	0,0051	0	0,075 (M)	1,32
NCHG1	0,1069	0,4930	0,0051	0,3	0,075 (M)	1,02
NCHG2	0,1069	0,4930	0,0051	0,3	0,225 (NP)	0,87

NCHG3	0,1069	0,4930	0,0051	0,3	0,075+0,225	0,795
-------	--------	--------	--------	-----	-------------	-------

13. ábrásor a CHX kioldódási görbéit mutatja be (50-50 HEMA-PEGDMA) hidrogél, és különböző töltésű NCHG-ek esetében. A mátrix, és a NCHG esetében a kioldódási profilok vizsgálata külön mintatartókban került kivitelezésre. A megbízható eredmények elérése végett, minden esetben legalább három minta párhuzamos vizsgálatát végeztük. A kapott eredmények, azt mutatják, hogy a bevitt CHX mennyiségének ~60%-a oldódott ki az általunk összeállított rendszerekből. A kioldódás sebessége viszont eltér a különböző elhelyezkedésű hatóanyagok függvényében. A leggyorsabb kioldódás a mátrix hidrogél esetében volt tapasztalható, melyet az NCHG1 rendszer követett, amikor is a hatóanyag a nanokompozit mátrix részében helyezkedett el (13. ábra a.) és c.) részei). A nanorészecskék szabályozó hatása a 13 ábra a.) részén, illetve az első 48 óra kinagyítva a b.) diagramon követhető figyelemmel. Látható a NP-k hatása a NCHG3 esetben is, ahol mind a mátrix- mind a nano rész töltve volt, de jelentősebb akkor, ha - mint a NCHG2 esetében történt - csak a NP-k kerültek töltésre CHX-nel. Az NCHG1 rendszer kioldódása során szokatlan jelenséget figyeltünk meg, mivel a kezdeti viszonylag gyors kiáramlást követően a kioldódott hatóanyag szintje elkezdett csökkenni, és a vizsgálati idő végére az 55% közeli szintről 5% környékére csökkent.



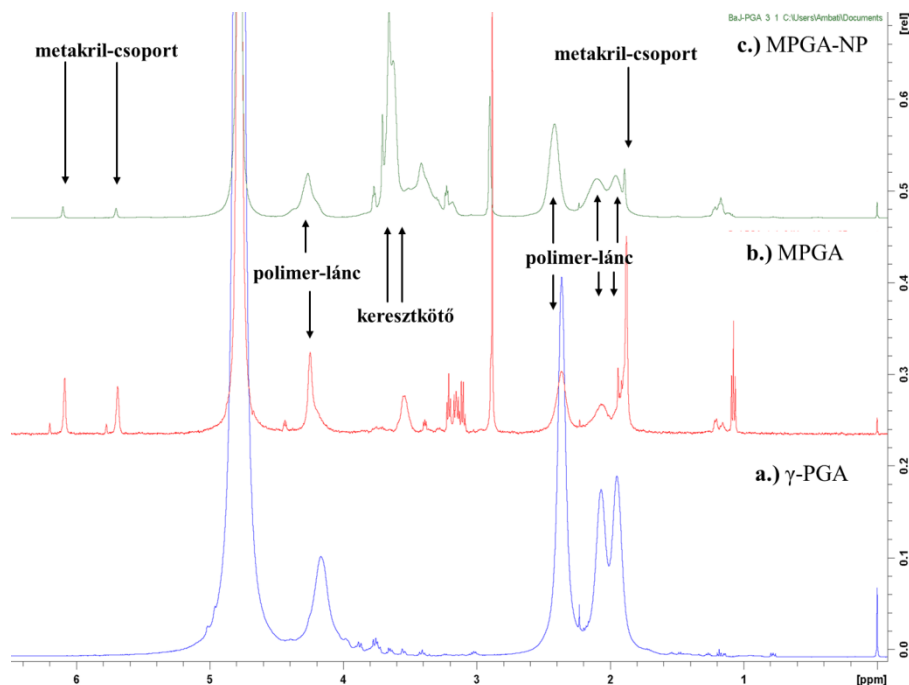
13. ábra. 50-50 HEMA-PEGDMA hidrogél, valamint a [66% 50-50 HEMA-PEGDMA alap és 33% 50-50 HEMA-PEGDMA-NP] összetételű NCHG kioldódási tulajdonságai különböző elhelyezkedésű CHX alkalmazásával. a.) Az összes rendszer teljes vizsgálati idejének a bemutatása. b.) A CHX-töltött NP-k hatásának összehasonlítása a mátrix hidrogéllal, külön kiemelve az első 48 órát. c.) NCHG2 és NCHG3 összehasonlítása. d.) Töltetlen NP-k hatásának bemutatása (n=3).

5.2 Biodegradábilis (γ -PGA) módosításai, hidrogél és nanogél jellemzése

5.2.1 PGA módosításai (keresztalkotési és metakrilálási reakciók)

A kialakított MPGA szerkezetének jellemzésére NMR spektroszkópia segítségével került sor. Az NMR eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a metakril-csoportok kapcsolódása a polimerláncához sikeres volt. A spektrum csúcsainak azonosítása a $\delta=4,2$ ppm (α -CH) kémiai eltolódású jel alapján történt (14. ábra). A PGA polimerláncra jellemző jelek a $\delta=2,4$ ppm (γ -

CH₂) és $\delta=1,9$, illetve $2,1$ ppm (β és β' -CH₂) eltolódásoknál voltak azonosíthatóak. A metakril-csoport jellemző csúcsait $\delta=5,7$, $6,1$ és $2,0$ ppm kémiai eltolódás értékeknél találhatjuk.



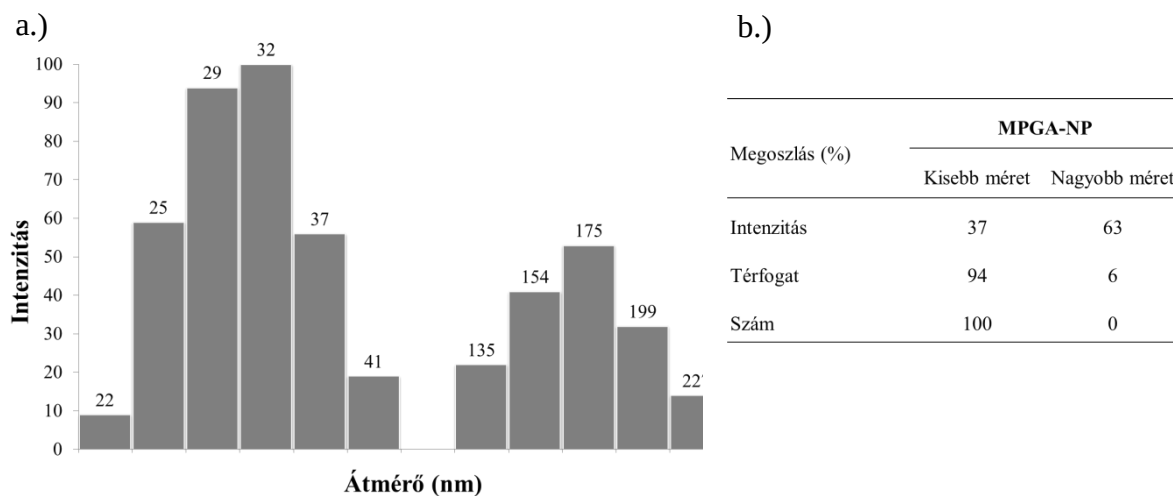
14. ábra. a.) γ -PGA, b.) MPGA és c.) MPGA-NP ¹H NMR spektrumok összehasonlítása. A kémiai eltolódás értékek a metakril-csoportokra vonatkozóan $\delta=6,09$, $5,70$, $1,88$, és $\delta=3,23$, $3,62$, $3,70$ (-CH₂) a keresztlikőtre vonatkozóan. Az alapanyag kémiai eltolódásai $\delta=4,2$ ppm (α -CH), $\delta=2,4$ ppm (γ -CH₂), és $\delta=2,09$, illetve $1,95$ ppm (β és β' -CH₂).

Az MPGA-NP a PGA keresztlikőési és metakrilálási reakcióit követő termék NMR spektrumát szintén a 14. ábrán láthatjuk. A spektrumban mind a keresztlikő, mind pedig a metakril-csoportok jeleit megtalálhatjuk. A csúcsok asszignációja a $\delta=4,2$ ppm (α -CH) csoport jele alapján történt. Továbbá a polimerlánc jelei fedezhetőek fel $\delta=2,4$ ppm (γ -CH₂), és $\delta=2,09$, $1,95$ ppm (β és β' -CH₂), valamint $\delta=3,23$, $3,62$, $3,70$ ppm (-CH₂ csoportok) utalnak az EDA keresztlikő ágens kötésére. A metakril-csoport jeleit $\delta=6,09$, $5,70$ és $1,88$ ppm kémiai eltolódásnál találhatjuk.

5.2.1.1 MPGA-NP részecskeméret meghatározás

A kialakított MPGA-NP részecskeméret-eloszlását DLS mérések segítségével állapítottuk meg. A meghatározott mérettartományok a néhány tíz- ($20-40$ nm) és a néhány száz-

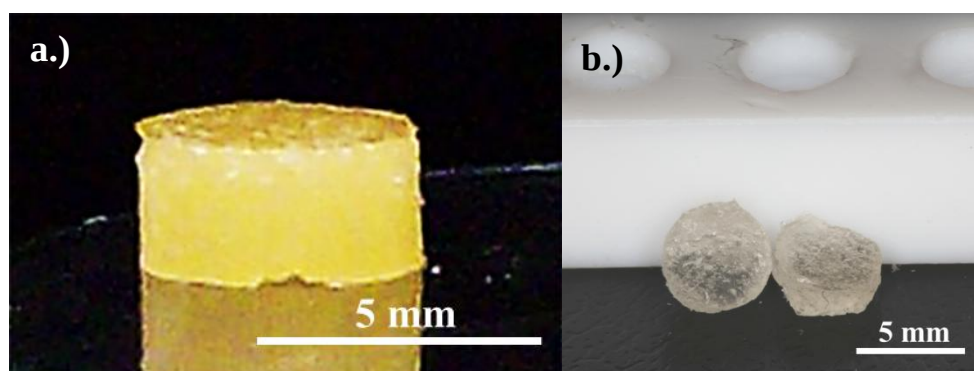
nanométeres (100-200 nm) tartományokba estek (13. a.) ábra). Az átlagos részecskeméret 80 nm-körül adódott a különböző mérések alapján.



13. ábra. a.) A nanorészecskék méreteloszlási profilja a DLS eredmények alapján. b.) Az MPGA-NP-k intenzitás-, térfogat, és szám szerinti eloszlása a DLS eredmények alapján (alacsonyabb 22-41 nm, míg a magasabb 135-227 nm mérettartományokat jelentenek) (n=3).

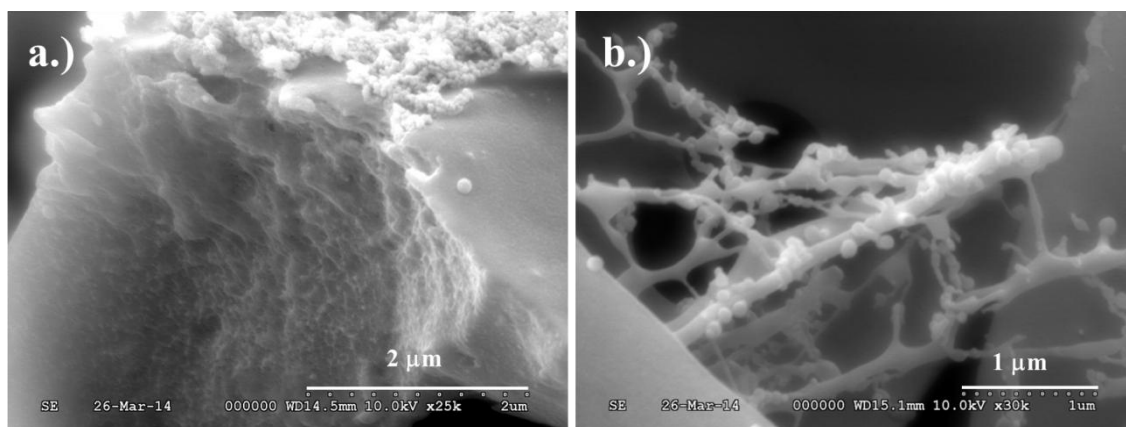
5.2.2 MPGA-hidrogél és MPGA-NP alapú PGA-nanogél

Fotopolimerizáció útján, 90 másodperc besugárzási idő alkalmazásával, 2 mm magasságú, és 5 mm átmérőjű hidrogéleket és nanogéleket alakítottunk ki (14. ábra). A gélek a később bemutatásra kerülő mechanikai vizsgálatok és az empirikus tapasztalat alapján is rugalmas, alaktartó, kifejezett struktúrával rendelkező anyagként voltak jellemezhetőek.



14. ábra. a.) MPGA hidrogél, és b.) metakrilált-PGA-nanorészecskékből felépülő hidrogél (PGA-nanogél) fényképfelvételei. A jól definiált forma és a teljesen polimerizált élek mutatják a reakció teljes végbemenetelét.

A PGA-nanogél esetében a nanrészecskék alkotta struktúrákat SEM segítségével is vizsgáltuk. A kapott képeken a hidrogélek mélyebb régióiban és a tört felszínen is különböző nanoméretű objektumokat fedezhetünk fel (15. ábra). Az ábra a.) része mutatja be a PGA-nanogél felületén felszínt kialakító struktúrákat. A nanogélek a felvételen látható 200 nm-től kisebb méretű részecskékből épülnek fel. A tört felszínről készült kép a 15. ábra b.) részén látható. Ezen különböző hálós szerkezetek figyelhetők meg a nanogélben, mely struktúrák szintén a nano mérettartomány dimenziójába esnek. A szálak és a részecskék mérettartománya is az 50-100 nm között található.



15. ábra. A PGA-nanogél a.) felületének és b.) tört felszínének a SEM felvételei. Az a.) kép nagyítása 25000-szeres, míg a b.) kép nagyobb 30000-szeres nagyítással készült.

5.2.3 MPGA-hidrogél jellemzése

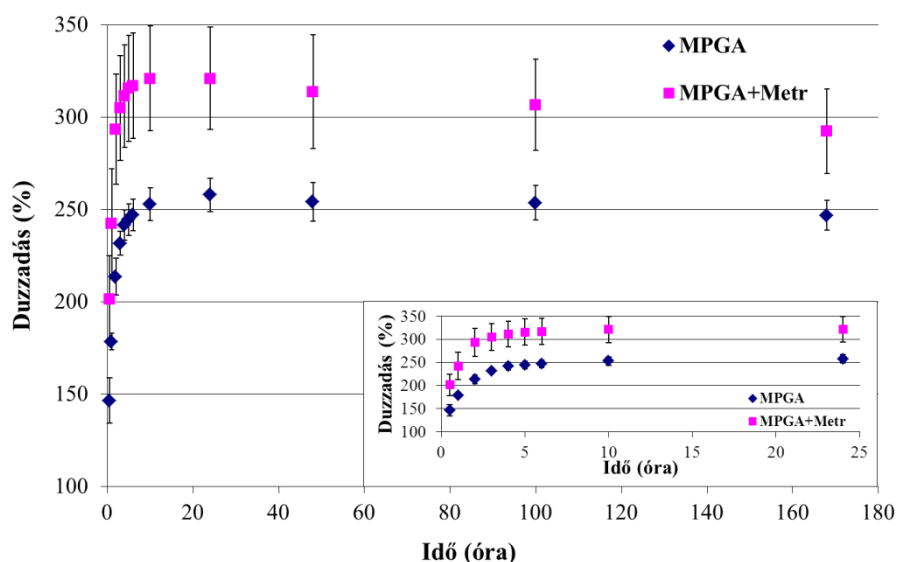
5.2.3.1 Mechanikai tulajdonságok

A 14. a.) ábrán is látható MPGA-hidrogélek mechanikai vizsgálata során arra az eredményre jutotunk, hogy a 90 másodperces megvilágítást követően kapott, viszonylag rigid gélek 12,99 N (SD:5,14) erőhatás elviselésére voltak képesek a törés pillanatáig, s mindeközben 0,94 mm/mm (SD: 0,16) volt a mért összenyomódás. A próbatestekben a nyomóvizsgálat során ébredt feszültség 0,77 MPa (SD: 0,27) volt, míg a Young-modulus 0,36 MPa-nak (SD: 0,06) adódott. A méréseket minimum három párhuzamos ismétléssel végeztem.

5.2.3.2 Duzzadási paraméterek

A duzzadási kinetika a 16. ábrán kerül bemutatásra. A polimerizációt követően PBS közegbe merítve a mintákat gyors tömegnövekedés következett be, mely a hatóanyagot nem tartalmazó minták esetén 150%-hoz közeli, míg metronidazolt tartalmazó gélek esetében 200%-ot

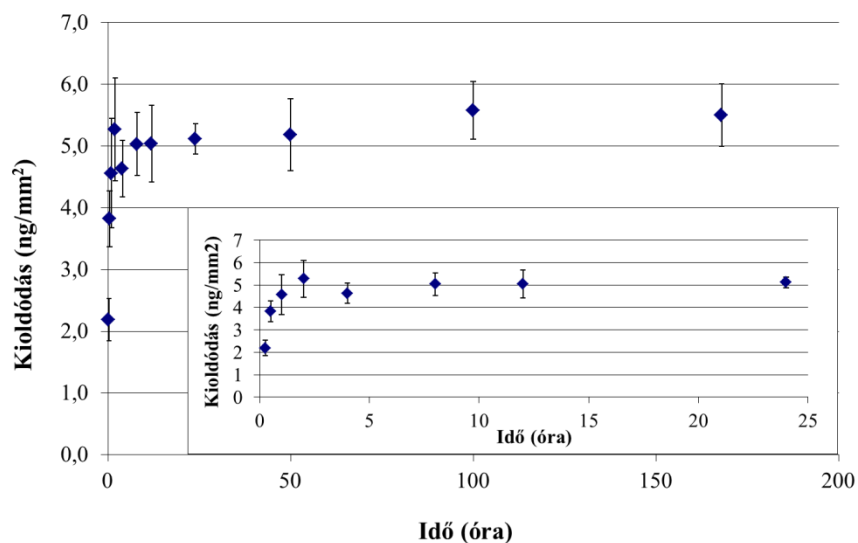
meghaladó mértéket ért el az első fél órában. Ez a gyors duzzadási folyamat az ezt követő 2 órában is fenn állt, így a hatóanyag nélküli gél esetében 200%-nál is nagyobb, míg a hatóanyaggal töltött mintáknál közel 300%-os mértéket ért el. Az egyensúlyi szintet a 4. és az 5. órára érték el a minták, mely a töltetlen esetben 250%-körüli, míg a metronidazzal töltött esetben 310%-hoz közeli mértéknél következett be (16. ábra belső nagyított rész).



17. ábra. MPGA-hidrogélek duzzadási tulajdonságai metronidazol hatóanyag alkalmazásával, illetve nélküle; a belső diagram az első 24 óra nagyított képét mutatja (n=5).

5.2.3.3 Kioldódás vizsgálat

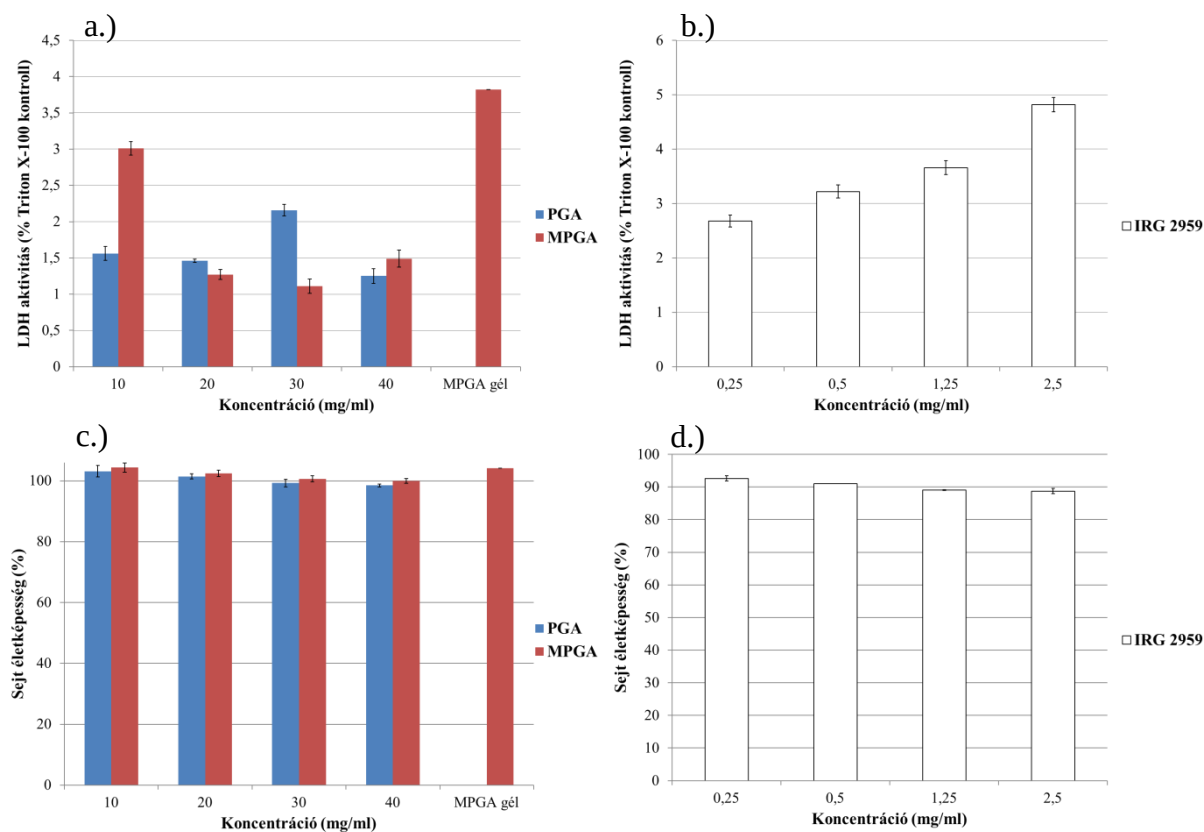
Az MPGA-hidrogélek kioldódási sajátságainak vizsgálatához egy általánosan alkalmazott antibakteriális hatóanyagot a metronidazolt választottuk. A kioldódás folyamata a duzzadással összhangban zajlik, s az első két órában ugyanazon gyors változás bekövetkezését figyelhettük meg, mint az előző esetben. Ez idő alatt a mintákból kioldódó hatóanyag mennyisége elérte az 5 ng/mm²-es szintet, mely kezdeti gyors, robbanásszerű kioldódást (“burst effect”) követően a következő 6 óra alatt beállt egy egyensúlyi szintre.



18. ábra. MPGA-hidrogélekből történő metronidazol hatóanyag felszabadulásának vizsgálata (kumulatív kioldódási módszerrel); a belső diagram az első 24 óra nagyított képét mutatja (n=5).

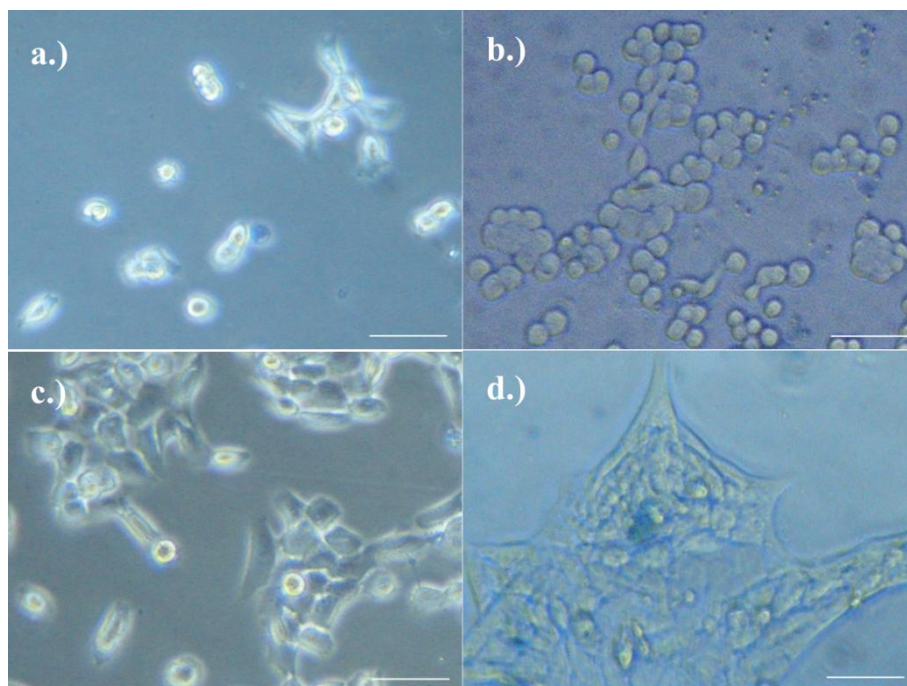
5.2.3.4 Biokompatibilitás és sejtmorfológiai vizsgálatok

Vizsgálataink során az alap polimer, az elkészített hidrogél és a fotoiniciátor toxikológiai sajátosságait határoztuk meg. Elsőként a γ -PGA-t és a módosított (MPGA) polimert vizsgáltuk az MTT-, az LDH-tesztek segítségével. A 19. ábrán bemutatott eredmények alapján kijelenthető, hogy a polimer jelenléte nem csökkentette jelentősen a sejtek életképességét, a citotoxicitás nem emelkedett 4% fölé. A teszteredmények a jelentős vízdékonysággal rendelkező fotoiniciátor esetében 5% alatti citotoxicitási értékeket mutattak, az életképesség pedig 90%-hoz közelített. A fotopolimerizáció útján elkészített MPGA-hidrogélek esetében is kijelenthetjük, hogy toxikus hatás nem tapasztalható. Az LDH-teszt 3,82%-os citotoxicitást mutatott, míg az MTT-teszt 100% feletti értéket adott (104,2%).



19. ábra. a.) A fő komponensek és az elkészített hidrogél citotoxicitása, b.) LDH-aktivitás fotoiniciátor jelenlétében, c.) életképesség vizsgálatok eredményei γ -PGA, MPGA-polimer, és polimerizált MPGA-hidrogél esetében valamint d.) sejtéletképesség-vizsgálat különböző koncentrációjú fotoiniciátor jelenlétében (MTT-teszt) (n=3).

A sejt morfológiai vizsgálatok jól mutatják (20. ábra), hogy a HaCaT sejtek letapadtak a kezeltetlen kontroll fedőlemezekre (6 óra elteltével), és az MPGA-hidrogéllal bevont fedőlemezekre egyaránt (24 óra elteltével). A sejtek morfológiájában nem volt jelentős különbség tapasztalható a kontroll (a.) és c.) és az MPGA hidrogéllal (b.) és d.) bevont fedőlemezek között. A korábbi életképességi vizsgálatok eredményeivel megegyező módon ezek a megfigyelések is azt mutatják, hogy az MPGA hidrogélek minimális mértékben befolyásolják a különböző sejtvonalak alapvető tulajdonságait, vagyis az életképességet és a morfológiát. Az MPGA hidrogél nem gátolta meg a HaCaT sejtek kitapadását, és nem változtatta meg a megszokott, keratinocitaszerű morfológiájukat.



20. ábra. HaCaT sejtek keratinocitaszerű morfológiáját bemutató mikroszkópos felvételek. Az a.) és b.) képeken, kontroll felületen és MPGA hidrogélen 6 órán át növesztett sejtek láthatók. A c.) és d.) képek 24 órás növesztés után készültek. Lépték: 50 μm .

5.2.4 PGA-nanogél jellemzése

5.2.4.1 Mechanikai tulajdonságok

A PGA-nanogélek esetében is a relatív rövid - 3 perces - fotopolimerizáció elegendő a rugalmas és stabil gél szerkezet kialakulásához. A mechanikai vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a PGA-nanogél megnyúlása az MPGA-hidrogéltől magasabb értéket ért el (4. táblázat). A különbségek a modulus és a feszültség paraméterekben mutatkoznak meg szembetűnőbben, mivel az MPGA-hidrogél jelentősen magasabb értékeket mutatott ezeken a területeken. A feszültség értéke (1,48 MPa) több mint a duplája volt a nanogél által elért (0,73 MPa-nak). A Young-modulus esetében még kifejezettebb volt a különbség a PGA-nanogél esetében mért 0,93 MPa, az MPGA-hidrogél esetében 4,32 MPa-nak adódott, ami több mint négyszeres érték. A statisztikai analízis egyértelműen jelezte, hogy a Young-modulus átlag (és az eloszlás) értékei, az MPGA-hidrogél és a PGA-nanogél esetében szignifikánsan különböztek egymástól (5. táblázat).

4. táblázat. Az MPGA-hidrogél és a PGA-nanogél mechanikai paramétere (n=10).

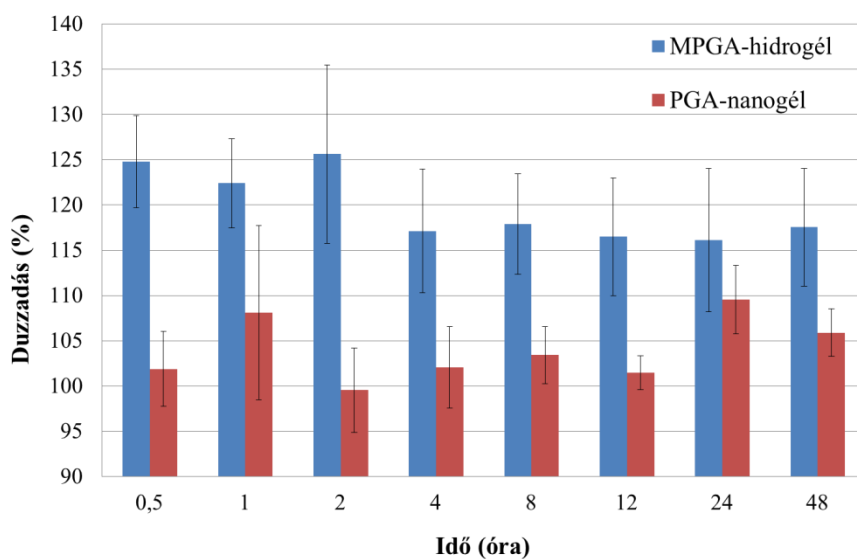
	Összenyomódás (mm/mm)	Nyomószilárdság (MPa)	Young-modulus (MPa)
MPGA-hidrogél	0,452±0,086	1,484±0,503	4,321±1,364
PGA-nanogél	0,529±0,124	0,730±0,363	0,926±0,433

5. táblázat. A hidrogélek Young-modulus értékeinek statisztikai elemzése.

	N	Átlag	Átlagok Std. hibái	Std. Deviá- ció	Leven-féle F-teszt statisztika (P-érték)	Welch-féle t-teszt statisztika (df, P-érték)	Mann- Whitney teszt statisztika (P-érték)
MPGA- hidrogél	10	4,321	0,431	1,364	7,252 (0,015)	7,500 (df=10,792, P < 10 ⁻⁴)	-3,704 (P < 10 ⁻³)
PGA- nanogél	10	0,927	0,137	0,433			

5.2.4.2 Duzzadási paraméterek

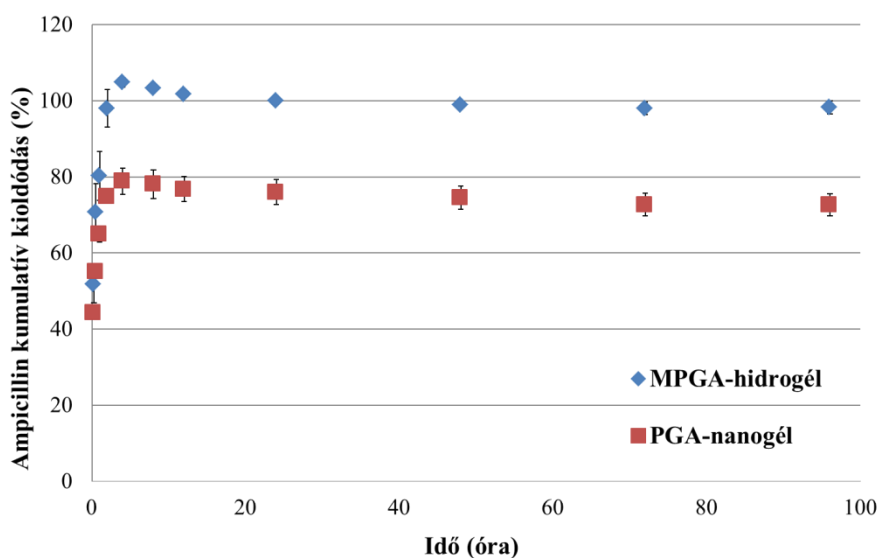
A hidrogélek duzzadási tulajdonságai szerkezeti sajátásaikkal szoros összefüggést mutatnak (21. ábra.). Ezzel magyarázható, hogy a fiziológiás sóoldattal készült gélek saját anyagukkal azonos közegben vizsgálva kisebb mértékű, az MPGA-hidrogél esetében 125%-os duzzadást, míg a PGA-nanogél esetében mindössze 110%-os tömegnövekedést ért el. Ezt a kismértékű duzzadást viszont rendkívül rövid idő alatt eléri a gélek, melyek az első fél órát követően lényegi változáson már nem esnek át.



21. ábra. Az MPGA hidrogél, és a PGA-nanogél duzzadási tulajdonságai (n=5).

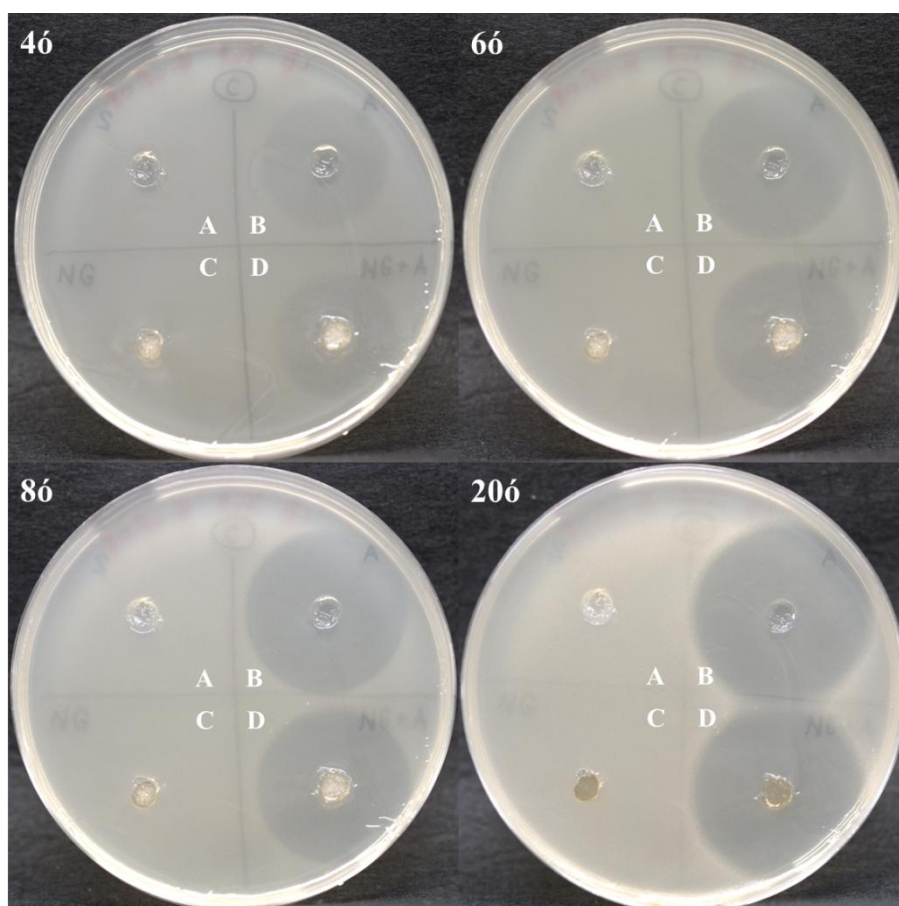
5.2.4.3 Kioldódási profil

A PGA-nanogél kioldódási sajátosságának a vizsgálatához egy általánosan alkalmazott antibiotikumot az ampicilint választottam modellvegyületként. A kioldódás kinetikája elsődleges robbanásszerű kiáramlást (“burst effect”) mutatott, mely maximumát a 4. órára érte el, ezt követően 24 órán belül mind a PGA-nanogél, mind pedig az MPGA-hidrogél esetében beállt az egyensúlyi állapotot, mely a későbbiekben már jelentősen nem változott (22. ábra).



22. ábra MPGA-alapú hidrogél és nanogél rendszerek ampicillin kioldódási tulajdonságok vizsgálatai (n=3).

A PGA-nanogélben formulázott és a szabad ampicillin oldat antibiotikus hatását mikrobiológiai módszerrel is összehasonlítottuk (23. ábra, és 6. táblázat). Eredményeink azt mutatják, hogy az ampicillin diffúziója a nanogél esetében szemmel látható, és számokban is kifejezhetően kisebb (90-95%) gátlási területet alakított ki a vizsgált időszakban, mint az oldatforma.



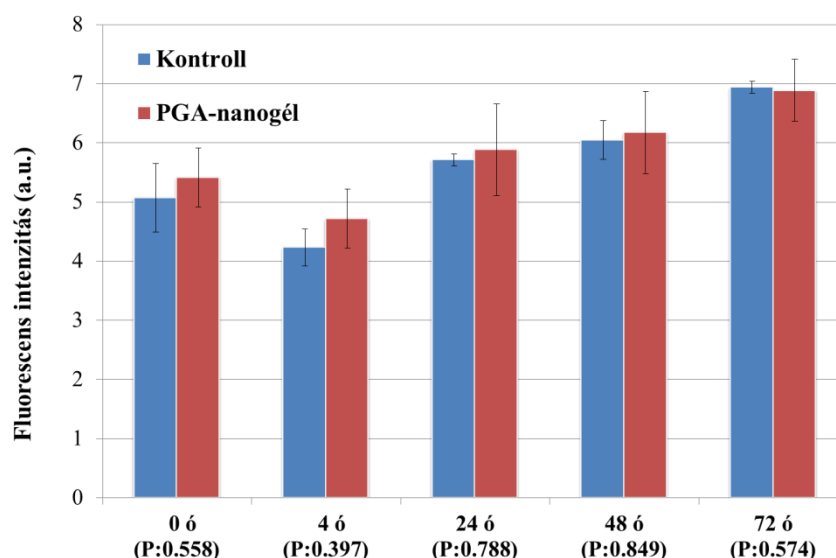
23. ábra. Az ampicillin különböző formáinak hatása *E. coli* ER2738 baktériumtörzsre. A: Fiziológiás sóoldat, B: Ampicillin oldat, C: PGA-nanogél hatóanyag nélkül, D: Ampicillinnel töltött PGA-nanogél.

6. táblázat. A gátolt területek összehasonlítása (n=4).

A gátolt terület (mm ²)	4ó	6ó	8ó	20ó
Ampicillin oldat	514,83 ±5,09	767,257 ±8,06	875,316 ±13,46	1184,310 ±21,36
Ampicillinnel töltött nanogél	483,051 ±12,19	694,131 ±6,67	798,014 ±9,86	1093,164 ±21,33

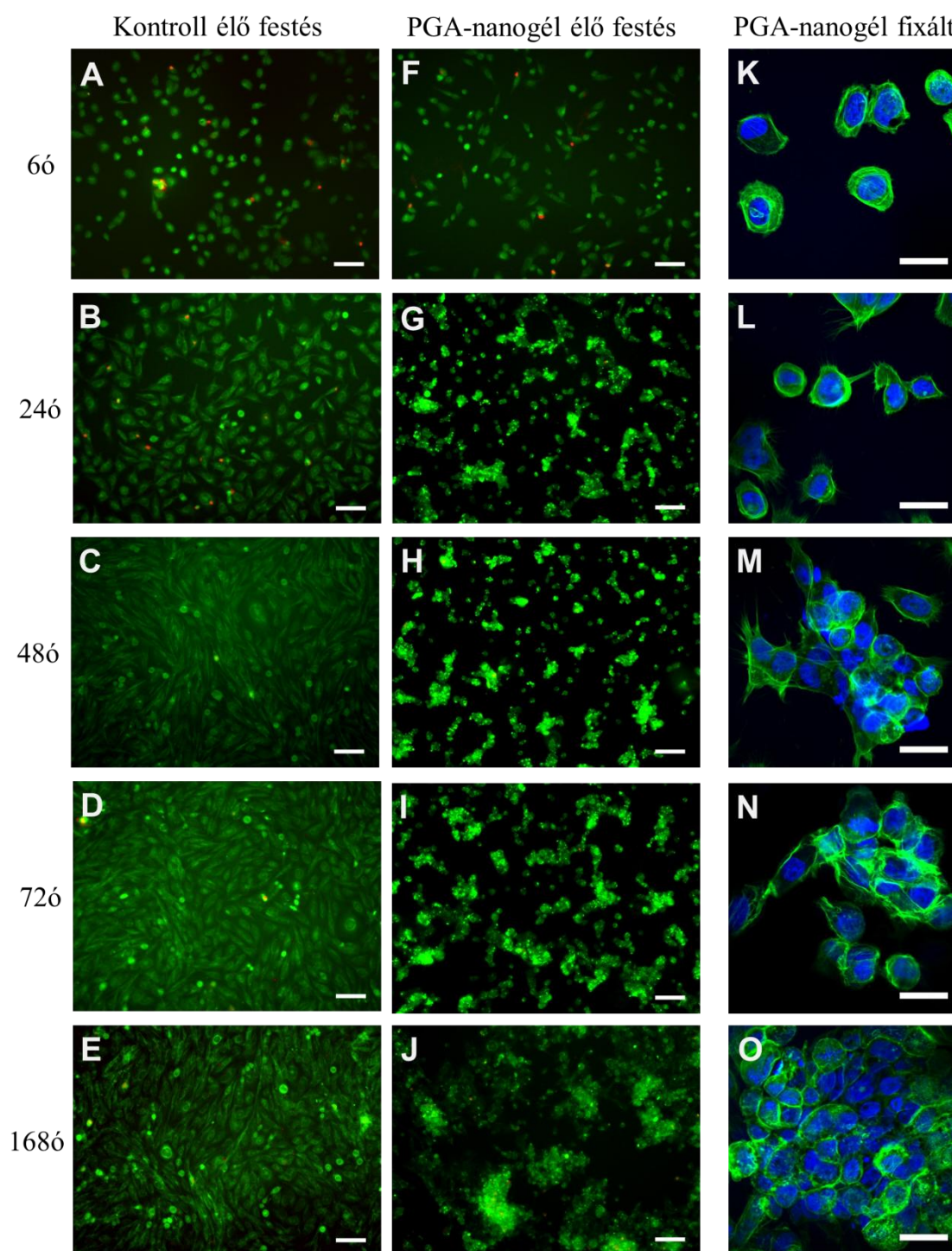
5.2.4.4 Biokompatibilitási és sejtmorfológiai vizsgálatok

A PGA nanogélek biokompatibilitását Alamar Blue tesztel vizsgáltuk SAOS-2 humán oszteoszarkóma eredetű sejtvonalak életképességén keresztül. Ebben a vizsgálatban a PGA-nanogélt Millicell sejtenyésztő kosárcákban helyeztük a tápfolyadékba. Minden Alamar Blue kezelés előtt a kosárcákat eltávolítottuk, majd a mérés után visszahelyeztük, így a kísérlet során végig ugyanazt a sejtpopulációt vizsgáltuk, a tápfolyadékot minden mérésnél cseréltük. Három-három párhuzamos mérést végeztünk mind a PGA nanogélek, mind a kezeletlen kontroll minták esetében. Eredményeink azt mutatják, hogy nincs szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt minták életképessége és proliferációja között. A t-teszt alapján a különböző időpontokban számolt átlagértékek között nincs szignifikáns különbség. A t-teszt P-értékei az ábrán zárójelben kerültek bemutatásra. A Mann-Whitney teszt ugyanerre az eredményre vezetett, nevezetesen a P-értékek 10%-nál is nagyobbak voltak. Az ANOVA az idő (óra) és csoport (kontroll és PGA nanogél) faktorokkal szintén arra az eredményre vezetett, hogy a csoportok között nincs szignifikáns különbség (P-érték > 0,8), de szignifikáns különbség tapasztalható a különböző időpontokhoz tartozó értékek között.



24. ábra. PGA-nanogélek biokompatibilitásának vizsgálata Alamar Blue teszt segítségével és zárójelben a P-értékek. Kontrollként 2D tenyésztett SAOS-2 sejteket használtunk nanogél nélkül.

Kontroll és PGA-nanogéllel kezelt sejtek összehasonlítása, ahol a fluoreszcencia értékek a nanogél tömegéhez lettek normalizálva.



25. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek SAOS-2 sejtekről kontroll fedőlemezen (A-E) és PGA-nanogélen (F-J) tenyésztve, valamint konfokális lézer szkennig mikroszkópos felvételek SAOS-2 sejtekről PGA nanogél felszínén (K-O). A lépték 100 μm (A-J) és 30 μm (K-O).

A sejtek kitapadása a nanogél felszínére a biokompatibilitás egyik fontos tényezője. A biokompatibilitáson túl a SAOS-2 sejt vonal felhasználásával morfológiai és proliferációs vizsgálatot is végeztünk fluoreszcens és konfokális lézer szkennig mikroszkópiás technikákkal. A 25. ábrán látható, hogy a hat órás mintán hasonló mennyiségű élő sejt tapadt a PGA-nanogél és a kezeletlen fedőlemez felszínéhez is (25. ábra A és F). A Green Tracker festés az élő sejteket mutatja zöld színnel, míg a propidium-jodid festés a halott sejteket vörössel. Miközben a sejtek egyenletesen nőnek be a kontroll fedőlemez felszínét (25. ábra A-E), a hidrogélen csoportokat alkotnak, ahogy az korábban más 3D-s környezetben már több helyen is bemutatásra került [107-109]. Ezen csoportok mérete a SAOS-2 sejtek osztódásával növekszik (25. ábra F-J). A csoportok növekvő mérete és az igen kevés halott sejt alátámasztja az Alamar Blue teszt eredményét, miszerint ez a PGA nanogél nem citotoxikus. A sejtek morfológiája a hidrogélen hasonló a természetes környezetükben felvett gömbszerű alakhoz, ami 3D környezetben normális, és ezek a sejtek csoportokba rendeződnek (25. ábra F-J) [110], ellentétben a fedőlemez kontrollal, ahol a sejtek 2D-ben nőnek és ellapult, orsószerű fenotípust mutatnak (25. ábra A-E). Ez az oka annak, hogy a fedőlemez felszínén a sejtek sűrűsége, míg a hidrogél felszínén a sejtcsoportok mérete növekszik. Az Alexa488-cal konjugált falloidinnal történt festés után készített nagyobb nagyítású konfokális képek megmutatták a nanogélhez kitapadt sejtek természetes gömbszerű morfológiáját és a sejtcsoportoknak a 2D tenyésztett sejtektől eltérő felépítését.

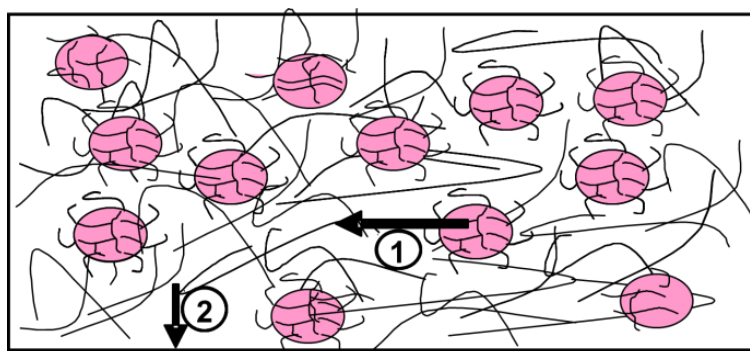
6. MEGBESZÉLÉS

6.1 HEMA-PEGDMA alkotta rendszerek

A kutatás megalapozásaként, könnyebben elérhető, és egyszerűbben kezelhető modell megalkotását tűztük ki feladatul. Ehhez ideális jelöltnek bizonyultak a HEMA, és a PEGDMA, mely alapanyagok felhasználásával lehetőségünk nyílt emulziós-polimerizáció útján nanorészecskék kialakítására. Az NP-k 50-50 HEMA-PEGDMA összetétel szerint kerültek kialakításra, az NP-en belül a keresztkötések arányának változtatása egy, a jövőben kiaknázható szabályozási lehetőséget nyújt számunkra. A kialakított NP-k mérettartományait DLS és SEM vizsgálatok segítségével határoztuk meg. Mindkét módszer bizonyította a nano mérettartományú objektumok jelenlétét, melyeket további vizsgálataink során nanokompozit rendszer kialakításához használhattunk fel. Ennek eléréséhez öt különböző térhálósűrűségű HEMA-PEGDMA hidrogélt alakítottunk ki 10-90% arányban, és az 50-50 HEMA-PEGDMA hidrogélt módosítottuk 1/3 rész, előzőleg kialakított NP-vel, így létrehozva a NCHG-t. A kialakított hidrogél és nanokompozit különböző paramétereit összevetve, a mechanikai paraméterek tekintetében volt legszembetűnőbb a változás. Alapvetően a térhálósító arányának növekedésével a nyomószilárdság monoton növekedése volt tapasztalható. Így kijelenthető, hogy ez a növekedés a térhálósűrűség növekedésével áll összefüggésben, mely a 10% PEGDMA tartalmú mintát a 90%-os hidrogéllal összehasonlítva meghaladta a 400%-ot. Azonban a megnyúlás mértéke jelentősen eltért a különböző minták esetébe; míg a 10%, és 25% PEGDMA tartalmú minták rendkívül lágyak voltak, addig az 50, 75, vagy 90% esetében a minták törékenyekké váltak. A gélek a térhálósító arányának a növelésével jelentősen keményebbekké és rigidebbekké váltak. A NCHG esetében a nyomószilárdság értékében jelentős változás nem volt tapasztalható a mátrix hidrogéllal összehasonlítva, de a rugalmasság csökkenése szembetűnő volt. Ez az alkalmazott nanorészecskék következménye, melyek kompaktabb és keményebb struktúraként erősíthették a mátrixot, ennek következtében a feszültség-megnyúlás görbe lefutása során a NCHG minden egyes pontja a hidrogél mátrix fölött található. Azaz a nanokompozit esetében a stressz emelkedése gyorsabb volt, mint akár a 90%-os térhálósűrűségű hidrogél esetében. A nanorészecskék mátrixszal történő kombinációja viszont a rendszer inhomogenitását vonja maga után, mely a nagyobb törési hajlamban fejeződik ki. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a nanorészecskék alkalmazása jelentősen befolyásolta a mechanikai tulajdonságokat, növelve a hidrogél szilárdságát. A mechanikai tulajdonságokkal szemben a duzzadási sajátságok vizsgálata során a mátrix-

hidrogél már az első fél órában elérte az egyensúlyi állapotra jellemző tömeget, míg a NCHG esetében ehhez 22 órára volt szükség. A tömegnövekedést az alap gél esetében 13%-os szinten állapodott meg, míg a kompozitnál 22%-os mértéket öltött. Ezen figyelemre méltó duzzadási sajátságok a felhasználási igényeknek megfelelőek lehetnek, s kijelenthető, hogy a fogászati gyakorlatban jól hasznosíthatóak, alkalmas jelöltté teheti a géleket parodontális tasakban történő alkalmazásra, vagy filmként történő felhasználásra, melyet valamely fertőzött nyálkahártyára lehet helyezni.

Vizsgálataink fókuszában a kialakított rendszerek hatóanyag-leadó tulajdonságai álltak. Ennek megfelelően minden esetben gyakorlati relevanciával bíró modellvegyületet választottunk ezen sajátság felderítéséhez. A CHX rutinszerűen alkalmazott hatóanyag a parodontális megbetegedések kezelésére, bár helyi alkalmazása során - pl. oldatos átmosás - gyorsan eliminálódik. A CHX polimermátrixban történő formulázása gyakorlati bizonyítékok szerint alkalmas a kioldódás lassítására, és a hatékonyság növelésére, így a NP-k hatásának vizsgálatára megfelelő lehetőséget biztosít [50-52]. Az NCHG alkalmazása esetén kialakítható kioldódási séma a 26. ábrán látható. Ebben az esetben a hatóanyaggal töltött NP-k plusz szabályozó szerepet tölthetnének be azáltal, hogy először az általuk képzett gáton kell az alkalmazott anyagnak átjutni.



26. ábra. NCHG rendszer elméleti kioldódási modellje. 1: a NP-kból megvalósuló hatóanyag felszabadulás, 2: a mátrix-hidrogél által kontrollált hatóanyag-felszabadulás.

Az alap hidrogélhez viszonyítva a nanorész, illetve a mátrix hatóanyaggal történő töltése, azt az eredményt hozták, hogy ha csak a mátrix, vagy csak a nanorész volt töltve, akkor egyik a másik töltetlenségéből kifolyólag kioltotta egymás hatását. Mikor viszont a nano- és a mátrix-rész is töltve volt és ezt hasonlítottuk az alap gélhez. Egy bizonyos mértékű elnyújtó hatás volt, tapasztalható a kioldódás profiljában, s ez a kezdeti szakaszban - az első 48 órában - volt megfigyelhető. Az első 4 órában a különbség nem volt számottevő, bár ezt követően a 7.

órában már jelentős eltérés volt tapasztalható. A hidrogélek esetében megfigyelt kioldódás gyorsabb volt, mint abban az esetben mikor a NCHG mátrixban volt elhelyezve a hatóanyag (10. ábra a.)). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a NP szerepe a kezdeti szakaszt követően jelenhet meg. Ezen szabályozott kioldódás folyamatos volt a 48. óráig, melyet követően a leadott hatóanyag szintje állandósult (az első szakasz kinagyítva a 10. ábra b.) része). A kioldódott hatóanyagok mennyisége minden esetben meghaladta az eredetileg alkalmazott 60%-át, alapvető különbség az ezen szint eléréséhez szükséges időtartamban volt tapasztalható. Mindezek mellett váratlan kioldódási profilt tapasztaltunk mikor az NCHG1 minta esetében, amikor a hidrogél mátrix töltve volt hatóanyaggal, és az NP-k pedig nem. A vizsgálat első szakaszában a CHX kiáramlása megindult, de ezt követően a koncentrációja csökkenni kezdett. A NP-k a hatóanyag egy részét megköthették. A jelenség oka nem tisztázott teljes egészében, csak, mint kísérleti tapasztalat jelent meg.

Az általunk vizsgált monomerek térhálósításával olyan gél szerkezet alakítható ki, amely fizikai paramétereit tekintve alkalmas lehet jövőbeni gyakorlati felhasználások társításához. Ennek megfelelően HEMA monomer, PEGDMA térhálósító, illetve antrakinon-2-szulfonsav nátriumsójának, mint iniciátornak felhasználásával, fotoiniciált gyökös kopolimerizáció során egy ígéretes, rendkívül sokoldalúan változtatható tulajdonságokkal rendelkező hidrogélt sikerült kialakítani.

6.2 γ -PGA módosításai által kialakított rendszerek

A biokompatibilis modellrendszert követően biodegradábilis tulajdonságokkal is rendelkező alapanyag segítségével kívántam fényre polimerizálható, hatóanyagot elnyújtva kibocsátani képes rendszer előállítani. Ehhez először a kiválasztott PGA-t reaktív metakril-csoporttal kellett módosítani. A reakció sikerességét NMR vizsgálatokkal igazoltuk, mely spektrumok bizonyították, hogy a számított 50% reaktív csoport kötődése nem következett be, de a reakció eredményessége meghaladta a 10%-ot. A reaktív csoport ezen mennyisége elegendőnek bizonyult, hogy egy új iniciátor, az Irgacure 2959 alkalmazásával elérjük a fogászatban használatos eszközök által kibocsátott "kék fény" hatására is 90 másodperc alatt bekövetkező polimerizációt, ami számunkra a gyakorlati felhasználhatóság egyik feltételeként kitűzött célparaméter volt ebben az esetben. A kialakított hidrogélek mechanikai tulajdonságait vizsgálva azt találtam, hogy a nyomószilárdság és a Young-modulus értékei is elég magasnak adódtak (0,77 MPa és 0,36 MPa) ami jelzi, hogy egy rendkívül rugalmas, de stabil struktúrát sikerült előállítani. A hidrogélek duzzadási kinetikáját PBS közegben, a

hatóanyagot nem tartalmazó és a hatóanyaggal töltött esetben párhuzamosan vizsgáltam tömegmérés útján. Az volt a tapasztalat, hogy az első fél órában végbemenő jelentős tömegnövekedés - közel 150% a töltetlen, és több mint 200% a töltött gélek esetében - üteme a továbbiakban csökkent. A második órára a töltetlen gélek több mint 200%-os duzzadása, s a töltöttek esetében megjelenő közel 300% a 4-5. órára érték el az egyensúlyi állapotot, amely töltetlen géleknél 250%, míg metronidazollal töltött esetben 310% közelében volt. A vizsgált rendszereink között az MPGA-hidrogél duzzadása volt a legnagyobb, melyet a hatóanyag jelenléte csak még tovább növelt. A duzzadási profil felvételét követően a kioldódási sajátságok vizsgálatát végeztem el. Hatóanyagot nem tartalmazó kontroll minták ellenében 3,33 mg/g metronidazolt tartalmazó gélek kerültek 25 ml kioldó közegbe (PBS). A kioldódás dinamikája a duzzadással párhuzamosan alakult. Az első két órában egy 5ng/mm^2 szintet elérő „kirobbanó-effektus” volt megfigyelhető, melyet követően a rendszer a következő hat óra alatt érte el az egyensúlyi állapotot. Ezen PGA-alapú hatóanyag-leadó rendszer további felhasználhatósága szempontjából elengedhetetlen volt a biokompatibilitás bizonyítása is. Ezt CaCo-2 sejtvonalon végrehajtott MTT-formazán (életképesség) és LDH (citotoxicitás) vizsgálat segítségével demonstráltuk mind az alapanyagokra, mind pedig az elkészült gélek esetében. Ezen túlmenően pedig immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonal morfológiai tulajdonságainak megfigyelésével vizsgáltuk a gél sejtekre gyakorolt hatásait. Az MTT-tesztrel az alapanyagok között vizsgáltuk az alap PGA-t, a módosított polimert (10-40 mg/ml konc. tartományban) és az iniciátort is (0,25-2,5 mg/ml között), illetve magát az elkészült hidrogélt. A tapasztalat az volt, hogy jelentős változást a sejtek életképességében, egyik esetben sem lehetett kimutatni, a változások az elhanyagolható 2%-os csökkenést sem érték el. Ugyanezen koncentrációtartományokban került sor a citotoxicitás vizsgálatokra is. Az előző tapasztalatokhoz hasonlóan, ez a vizsgálat is azt mutatta, hogy az anyagok említésre méltó citotoxicitással nem rendelkeznek, 4%-nál nagyobb érték nem volt mérhető sem az alapanyagok, sem az elkészített polimerek esetében. A sejtmorfológiai vizsgálatok is előzetes megfigyeléseinkkel összhangban arra az eredményre vezettek, hogy a kontrollként használt kezeletlen felületre letapadt sejtekhez hasonlóan a géllal bevont felületen növekedő sejtek alakja nem változott meg számottevően. A 6 és 24 órás megfigyelést követő felvételek alapján kijelenthetjük, hogy a metakril-csoporttal módosított PGA-alapú hidrogélek nem toxikusak, biokompatibilis jellegük megerősítést nyert azáltal, hogy a normál keratinociták morfológiai tulajdonságait sem befolyásolják jelentős mértékben. Az eredmények tükrében

megállapíthatjuk, hogy az előállított metakrilált polimer a közleműltben megjelent hasonló típusú rendszerekkel összevethetően felhasználható hatóanyag-leadó rendszerként [96-99].

A hidrogélek széleskörű irodalmában fellelhető rendkívül szerteágazó polimerizációs technikák között a fotopolimerizáció elég kis részesedéssel rendelkezik, de még ez a jelenlét is tovább csökken, ha látható fény hatására bekövetkező polimerizációs technikákat keresünk. Különösen igaz ez, ha a fogászati gyakorlatban alkalmazott „kék fényt” hasznosítani képes rendszereket nézzük [111-114]. Az általunk kialakított hidrogél újdonsága, hogy egy jelentős vízzoldékonysággal és biokompatibilitással rendelkező fotoiniciátor segítségével képes rövid idő alatt rugalmas, de szilárd struktúrát kialakítani. Így távlati célként egyéb hatóanyagok vagy biológiai aktivitással bíró komponensek formulázására, esetlegesen különböző sejtek, akár összejtek szállításra, támogatására is alkalmas rendszer alapját képezheti ezen hidrogél. Az in-situ fotopolimerizáció lehetőségén keresztül elérhető lokális alkalmazhatóság növelheti az adott hatóanyag terápia indexét a szisztémás adagolással szemben.

Az előzőleg vázolt előnyös tulajdonságok ötvözését az alapozta meg, hogy a PGA változtatatosan módosítható, és a kémiai reakciók összekapcsolásával fotopolimerizációra önmagában is képes nanorészecske nyerhető. Ennek megfelelően a munkám záró szakaszában a PGA keresztkötési és metakrilálási reakciójának kombinációjával állítottam elő a fogászati gyakorlatban alkalmazott eszközök által kibocsátott „kék fényt” hatására polimerizálható NP-keket, melyek felhasználásával PGA-nanogél struktúra kerülhetett kialakításra. A polimer módosításainak eredményeit NMR vizsgálattal ellenőriztük, s a spektrumban fellelhető jelek azt mutatják, hogy az első keresztkötési, majd az ezt követő metakrilálási reakció is sikeresen lezajlott. A metakril-csoport jelintenzitása alacsonyabb (~10%) a számított (50%-os) mértéknél, de a kialakult reaktív csoportok ezen mennyisége is elegendő a gyors fotopolimerizáció megvalósításához. A jelenség nem ismeretlen az irodalomban, Zeng és munkatársai is hasonló eredményekről számolnak be hasonló PGA-alapú rendszerrel kapcsolatosan [91]. A kialakított részecskék méreteloszlását DLS méréssel vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy átlagosan 80 nm körüli átmérővel rendelkeztek. A reakciók során bekövetkezhettek inter- és intramolekuláris kapcsolódások is, nagy valószínűség szerint ezzel magyarázható a részecskék bimodális jellege. A két méretcsoport egyike sem haladja meg a néhány száz-nanométeres tartományt. A térfogat szerinti bimodális jellegű eloszlás arányai is jól mutatják, hogy a két csoport közül, a kisebb méretű csoport (22-41nm) reprezentálta a kialakított NP-k túlnyomó többségét (14. b. ábra). Egyedül az intenzitás szerinti eloszlás különbözött ettől, de ebben az esetben a számítás alapját képező formula sajátossága, hogy a

nagyobb méretű részecskék jelentősen torzíthatják a kapott eredményt. Alapvetően megállapítható viszont, hogy a kapott részecskék mérete - mindkét csoportot alapul véve - a nano mérettartományba esett. MPGA-NP-k felhasználásával, az előzőleg már ismertetett Irgacure 2959 fotoiniciátor alkalmazása mellett 3 perc reakcióidő beállításával alakítottam ki PGA-nanogéleket. A 15. ábrán látható a PGA-nanogélek képe, ahol a jól kivehető éles szélek jelenléte a 2 mm mélységben is teljes mértékben lejátszódó polimerizáció bizonyítékának tekinthető. Napjainkra már sikerült az előző kísérletektől eltérő módon Bluephase 20i (Ivoclar Vivadent AG) kézi polimerizációs lámpa alkalmazásával (2000mW/cm^2) 1 perc fotopolimerizáció hatására is formatartó gél létrehozni. A korábbi kísérletes eredményeink során előállított PGA-nanogélek mechanikai paramétereinek vizsgálatai során megállapításra került, hogy az MPGA-hidrogélhez képest kisebb teherbírású, de rugalmasabb gél szerkezetet sikerült előállítani. A mechanikai stabilitását tekintve a képződött gél szerkezet elég erős, elég stabil ahhoz, hogy egy valós szituációban, pl. a szájban alkalmazható legyen [100-102]. A mechanikai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a metakrilált-nanorészecskék kapcsolódásai nem olyan teljes mértékűek, mint azt az MPGA-hidrogélek esetében tapasztalhattuk. Ennek ellenére az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy az MPGA-NP-k is képesek dimenzióstabíl struktúrát alkotni. A legfontosabb tény viszont az, hogy ezek a nanorészecskék alkotta hidrogél által elért mechanikai paraméterek is megfelelőek lehetnek az alkalmazás követelményeinek. Ezek az értékek is biztosítják, hogy a PGA-nanogél megtartsa 3D-s struktúráját, és megfelelő lehessen a fogászati gyakorlatban történő felhasználásra (pl.: a fog mellett kialakuló tasakokban történő felhasználásra a fog, és az íny közötti rész kitöltésére) [103-104]. Az általunk elért mechanikai paraméterek összehasonlíthatóak voltak, illetve néhány esetben akár jobb eredményeket is értek el, mint az egyéb, ezekkel összehasonlítható PGA-alapú hidrogélek [91-92]. A mechanikai paraméterek felvételét követően a duzzadási kinetikát vizsgáltam, s a tapasztalat az volt, hogy egy relatív gyors, az első órában lejátszódó növekedést, és ezt követően közvetlenül az egyensúlyi állapot elérését figyelhettük meg. Ezt a különbséget a részecskék alkotta rendszer kompaktabb struktúrája rejti magában, mely az alkalmazás oldaláról tekintve egy kedvező sajátosság, figyelembe véve a tényt, hogy pl. egy fog melletti tasakban a dimenzióváltozások lehetősége korlátozott, egy nagyobb mértékű duzzadás nemkívánatos jelenséggé vetődne fel. A PGA-nanogél kioldódási sajátosságait ampicillin alkalmazása mellett vizsgáltam. Tapasztalatként levonható volt, hogy nanogél esetében is elég gyors a hatóanyag kiáramlása ugyanúgy, mint az MPGA-hidrogél esetében. A nanorészecskék alkotta rendszer - a PGA-nanogél - és az

MPGA-hidrogél közötti fő különbség, hogy a nano-struktúra esetében egy bizonyos mértékű visszatartó hatás volt felfedezhető, mely a későbbiek során szabályozási lehetőségként kiaknázzható. A fennmaradó ~20%-a a hatóanyagnak pl. a PGA biodegradációján - mint az anyagra jellemző természetes folyamaton - keresztül válhat mobilizálhatóvá az alkalmazás körülményei között. Figyelembe kell vennünk viszont, hogy ezen in vitro eredmények 20 ml kioldóközegbe helyezett ~40 mg-os hidro/nanogélek vizsgálatából származnak. Más körülmények között, ahol pl. a kioldóközeg minősége vagy a mennyisége különböző lehet, a kioldódási profil is jelentősen eltérő képet mutathat, pl.: egy parodontális tasakban, ahol csak egy rendkívül kis mennyiségű szulkuszfolyadék folyamatos cserélődése zajlik, ez a folyamat alapvetően más dinamikával játszódhat le. Eredményeinket mikrobiológiai módszerrel is sikerült megerősíteni, mivel bizonyítást nyert, hogy habár a nanogélbe csomagolt ampicillin antibiotikus hatása a szabad oldathoz hasonló mértéket mutat, a nanogél esetében tapasztalható egy bizonyos mértékű visszatartó hatás.

Az irodalomban különböző hatóanyagokat találhatunk, melyeket a klinikai gyakorlatban a parodontális megbetegedések kezelése során önállóan, vagy a kezelés részeként alkalmaznak. Ezen hatóanyag-leadó rendszerek használata már jól megalapozott és elfogadott [105]. Felhasználásukra a klinikai helyzetnek megfelelően különböző módokon van lehetőségünk. Az oldatformától kezdve, a kenőcsök alkalmazásán át, vagy más esetekben a polimer mátrixba ágyazott hatóanyag forma, esetleg a szálas szerkezetek használata mind az aktív komponens kioldódási profiljának a megváltoztatását, szabályozásának a lehetőségét teremti meg. Jhinger és munkatársai két hatóanyag-leadó rendszer hatékonyságát hasonlították össze: a mikrogyöngyöket alkalmazó Arestin® rendszert a klasszikus keresztkötött polimermátrixba ágyazott hatóanyaggal [51]. Ez a mikro-formulázási rendszer egyike a legújabb a kereskedelmi forgalomban is fellelhető koncepcióknak. Parodontális kezelések során alkalmazható nanoméretű komponenseket felvonultató hatóanyag-leadó rendszerek még nem érhetőek el, bár a nanotechnológia nyújtotta előnyök számos egyéb területen már régóta megjelentek, és bizonyítottak [106]. Ezen gondolatmenet alapján a PGA-nanogélekhez kapcsolódó in-vitro tanulmányunk egy új hatóanyag-leadó rendszer kialakítása felé tett első lépések egyike lehet, mely koncepció egy a parodontális megbetegedések kezelése során a jelenleginél hatékonyabb kezelést lehetővé tevő gyógyszerformulázási módként jelenhet meg. Koncepciónk újdonságát biztosítja, hogy a nanotechnológiában rejlő lehetőségeket kombinálja a fogászat területén általánosan alkalmazott in-situ felhasználást biztosító „kék fény” hatására bekövetkező fotopolimerizáció előnyeivel.

A kialakított PGA-nanogél biokompatibilitása és sejtekre gyakorolt csekély hatása Alamar Blue teszten kívül fluoreszcens és konfokális lézer szkennning mikroszkópiai módszerekkel is bizonyításra került. Mindezek alapján kijelenthető, hogy az általunk előállított nanogél alkalmas lehet különböző hatóanyagok, bioaktív faktorok vagy akár sejtek kapszulázására, felhasználhatóságuk vagy hatékonyságuk növelésére. A fotoreaktív nanorészecskék nagy előnye lehet még a kombinációk lehetősége, melynek segítségével akár szervetlen komponensek alkalmazásával csontpótlásra, akár különböző egyéb morfológia kialakításával - pl.: elektrospinning- extracelluláris mátrixhoz hasonló szerkezet előállítására lehet alkalmas jelen anyagrendszer.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám első részében sikerült HEMA-PEGDMA alapú hidrogélt, nanorészecskét és nanokompozit rendszert szintetizálni. A gélek a fogászati gyakorlatban alkalmazott „kék fény” (385-515 nm) hatására fotopolimerizáció útján kerültek kialakításra. A nanokompozit hidrogél mechanikai tulajdonságai a mátrixét jelentősen meghaladták. Kioldódás vizsgálat során bizonyítást nyert, hogy a nanorészecskék alkalmazásával a CHX leadása az alap, néhány órás profil helyett, akár 48 órás, elnyújtott hatóanyag kibocsátás érhető el in-vitro.

A kutatás második részében biodegradábilis PGA-polimer metakril-csoporttal történő módosításán keresztül került sor „kék fényel” (385-515 nm) polimerizálható hidrogél előállítására. Irgacure 2959 alkalmazásával sikerült elérni a 90 másodperces reakcióidőt, amelyet a gyakorlati alkalmazás egyik alappilléreként tekinthetünk. A kialakított MPGA-hidrogél mechanikai tulajdonságai és duzzadási sajátságai, megfelelőek lehetnek a szájon belüli alkalmazáshoz. A hidrogél kioldódási tulajdonságait tekintve a metronidazol hatóanyag leadása a kísérlet körülményei között elég gyorsnak volt tekinthető. Ez a jövőben egyéb anyagcsoportokkal történő kombináció, vagy az alkalmazás helyén fennálló körülmények következtében jelentősen megváltozhat. A rendszer biokompatibilitását az MTT- és az LDH-teszt eredményei is bizonyították, mind az alapanyagok, mind pedig a polimerizált gél tekintetében. HaCaT sejtvonal morfológiai vizsgálata is ezzel azonos eredményre vezetett a 6 és 24 órás megfigyelést követően. Így a MPGA-hidrogél potenciális jelöltként tekinthető biológiai környezetben - szájbán fogágy betegségek kezelésében - illetve alkalmas lehet felületmódosított implantátumok integrációját elősegítő eszközként történő felhasználásra.

Tanulmányom záró szakaszában PGA módosításaival sikerült a fogászati eszközökre jellemző „kék fény” (385-515 nm) hatására polimerizálható nanorészecskét (MPGA-NP), és ezek felhasználásával PGA-nanogélt előállítani. A kialakított gél mechanikai tulajdonságairól és duzzadási sajátsága bizonyítottuk, hogy az alkalmazás feltételeinek megfelelnek. A PGA-nanogél biokompatibilitását, sejtekre gyakorolt semleges hatását Alamar Blue teszt, fluoreszcens és konfokális lézer szkennning mikroszkópia segítségével is igazoltuk egy hetes időtartamban. Kioldódási sajátságai in-vitro körülmények között még fejlesztésre szorulnak, de bizonyos (20%) mértékű visszatartó hatás kimutatható volt MPGA-hidrogélhez viszonyítva. In-situ polimerizálható hatóanyag-leadó rendszerként történő alkalmazása számos előnyt rejthet magában, melyek további kutatások alapját képezhetik.

8. SUMMARY

In the first part of my work HEMA-PEGDMA based hydrogel, nanoparticles and nanocomposite systems were successfully synthesized. These gels were created “blue light” photopolymerization that is used in dentistry. The mechanical properties of the nanocomposites were considerably better than the base hydrogel. The application of nanoparticles resulted in slower CHX release in-vitro: the nanocomposite reaches the equilibrium state in 48 hours instead of 4 hours, as in the case of the hydrogel.

In the second part a biodegradable PGA was modified with methacryloyl groups to create “blue light” (385-515 nm) photopolymerizable polymer and hydrogel. Using Irgacure 2959 resulted in a 90-second polymerization time, which is one of the key parameters of practical applicability. The mechanical and swelling properties of MPGA-hydrogels could be appropriate for application in the mouth. The release of metronidazole under the conditions of the experiment was fast. This could be changed in the future by combining the gels with other components. Release dynamics could also be influenced by different conditions at the place of application. The biocompatibility of the base materials and the prepared gels was proven by MTT and LDH tests, and it was also demonstrated by the morphological investigation of HaCaT cells after 6 and 24 hours. These results show that MPGA-hydrogels could be potential candidates for drug delivery in biological environments - e.g. next to a tooth in a pocket - or for surface modification to improve the integrations of implants.

In the final part of the study PGA-nanoparticles were created that can be polymerized by “blue light” (385-515 nm) used in the dental practice. Using these, PGA-nanogels were produced by photopolymerization. The swelling and mechanical properties of the prepared nanogel were suitable for application in the mouth. The biocompatibility and the neutral effect of this gel on cells were proven by Alamar Blue test, fluorescent and confocal laser scanning microscopy on samples taken at different time points during a one week period. Although the in vitro release properties of the nanogel require improvement, a certain degree of retentive effect (20%) was observed. The application of this system as an in situ polymerizable drug delivery device can provide many benefits, and could be the basis of further studies.

IRODALOMJEGYZÉK

Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Appel EA, Tibbitt MW, Webber MJ, Mattix BA, Veisheh O, Langer R. Self-assembled hydrogels utilizing polymer-nanoparticle interactions. *Nat Commun.* 2015;6:6295. doi: 10.1038/ncomms7295.
2. Kirschner CM, Anseth KS. Hydrogels in Healthcare: From Static to Dynamic Material Microenvironments. *Acta Mater.* 2013;61(3):931-944.
3. Peppas NA, Khare AR. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv Drug Deliv Rev.* 1993;11(1-2):1-35.
4. Lacevic A, Vranic E, Zulic I. Endodontic-periodontal locally delivered antibiotics. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004;4(1):73-8.
5. Doner F, Sari I. Facial wound closure with 2-cyanoacrylate. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2003;14(4):359-71.
6. Wichterle O, Lim D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature.* 1960;185:117.
7. Peppas NA, Merrill EW. Crosslinked PVA Hydrogels as Swollen Elastic Networks. *J Appl Polym Sci* 1977;21:1763-1770.
8. Hogeman KE, Gustafson G, Bjorlin G. Ivalon surgical sponge used as temporary cover of experimental skin defects in rats. A preliminary report. *Acta Chir Scand.* 1961;121:83-9.
9. Bray JC, Merrill EW. Poly(vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular cartilage material. *J Biomed Mater Res.* 1973;7(5):431-43. 10.
10. Peppas NA, Merrill EW. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *J Biomed Mater Res.* 1977;11(3):423-34.
11. Lewin-Epstein J. Polyvinyl sponge (ivalon) as a scaffold for bone. *Br J Oral Surg.* 1964;2(2):115-9.
12. Harrison J. H. Synthetic materials as vascular prostheses. II. A comparative study of nylon, dacron, orlon, ivalon sponge and teflon in large blood vessels with tensile strength studies. *Am J Surg.* 1958;95(1):16-24.
13. Hurst A. Grow J. B. Levine S. Perlmutter H. M. The use of plastic sponge in the surgical treatment of pulmonary tuberculosis; a preliminary report. *Dis Chest.* 1951;20(2):134-8.

14. Tadavarthy SM, Moller JH, Amplatz K. Polyvinyl alcohol (Ivalon)--a new embolic material. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1975;125(3):609-16.
15. Lapidus H, Lordi NG. Drug release from compressed hydrophilic matrices. *J Pharm Sci.* 1968;57(8):1292-301.
16. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: effect of entrapped air. *J Pharm Sci.* 1983;72(10):1189-91.
17. Srinivas NR. The Interesting Case of Acyclovir Delivered Using Chitosan in Humans: Is it a Drug Issue or Formulation Issue? *Pharm Res.* 2016;33(3):543-7. doi: 10.1007/s11095-015-1811-2.
- 18 Badugu R, Lakowicz JR, Geddes CD. A glucose-sensing contact lens: from bench top to patient. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(1):100-7.
19. Klier J, Scranton AB, Peppas NA. Self-associating networks of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol). *Macromolecules* 1990;23(23):4944-4949. doi: 10.1021/ma00225a011
20. Kim B, Peppas NA. Synthesis and characterization of pH-sensitive glycopolymers for oral drug delivery systems. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2002;13(11):1271-81.
21. Garbern JC, Hoffman AS, Stayton PS. Injectable pH- and temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers for delivery of angiogenic growth factors. *Biomacromolecules.* 2010;11(7):1833-9. doi: 10.1021/bm100318z.
22. Brazel CS, Peppas NA. Synthesis and Characterization of Thermo- and Chemomechanically Responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) Hydrogels. *Macromolecules* 1995;28(24):8016-8020. doi: 10.1021/ma00128a007
23. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):37-51.
24. Meenach SA, Anderson KW, Hilt JZ. Synthesis and characterization of thermoresponsive poly(ethylene glycol)-based hydrogels and their magnetic nanocomposites. *J Polym Sci A Polym Chem.* 2010;48:3229–3235. doi:10.1002/pola.24087
25. Satarkar NS, Zach Hilt J. Hydrogel nanocomposites as remote-controlled biomaterials. *Acta Biomater.* 2008;4(1):11-6.
26. Nicolson PC, Vogt J. Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials.* 2001;22(24):3273-83.
27. Tighe BJ. The design of polymers for contact lens applications. *Br Polym J.* 1976;8(3):71–77. doi: 10.1002/pi.4980080302

28. Wang B, Lin Q, Shen C, Tang J, Han Y, Chen H. Hydrophobic modification of polymethyl methacrylate as intraocular lenses material to improve the cytocompatibility. *J Colloid Interface Sci.* 2014 1;431:1-7. doi: 10.1016/j.jcis.2014.05.056.
29. Goosen MF, Sefton MV. Properties of a heparin-poly(vinyl alcohol) hydrogel coating. *J Biomed Mater Res.* 1983;17(2):359-73.
30. Merrill EW, Salzman EW, Wong PS, Ashford TP, Brown AH, Austen WG. Polyvinyl alcohol- heparin hydrogel "G". *J Appl Physiol.* 1970;29(5):723-30.
31. Cholakis CH, Zingg W, Sefton MV. Effect of heparin-PVA hydrogel on platelets in a chronic canine arterio-venous shunt. *J Biomed Mater Res.* 1989;23(4):417-41.
32. Browning MB, Guiza V, Russell B, Rivera J, Cereceres S, Höök M, Hahn MS, Cosgriff-Hernandez EM. Endothelial cell response to chemical, biological, and physical cues in bioactive hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(23-24):3130-41. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0602.
33. Gombotz WR1, Wang GH, Horbett TA, Hoffman AS. Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(12):1547-62.
34. Nakabayashi N, Iwasaki Y. Copolymers of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) as biomaterials. *Biomed Mater Eng.* 2004;14(4):345-54.
35. Sá-Lima H, Tuzlakoglu K, Mano JF, Reis RL. Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose hydrogel as a three-dimensional extracellular matrix for cartilage-engineered applications. *J Biomed Mater Res A.* 2011;15;98(4):596-603. doi: 10.1002/jbm.a.33140.
36. Frisman I, Shachaf Y, Seliktar D, Bianco-Peled H. Stimulus-responsive hydrogels made from biosynthetic fibrinogen conjugates for tissue engineering: structural characterization. *Langmuir.* 2011;27(11):6977-86. doi: 10.1021/la104695m.
37. Lee H, Choi B, Moon HJ, Choi J, Park K, Jeong B, Han DK. Chondrocyte 3D-culture in RGD-modified crosslinked hydrogel with temperature-controllable modulus. *Macromol Res.* 2012;20(1):106-111. doi. 10.1007/s13233-012-0074-6.
38. Lyman DJ, Loo BH, Crawford RW. New synthetic membranes for dialysis. I. A copolyether-ester membrane system. *Biochemistry.* 1964;3:985-90.
39. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):478-90.
40. Zhang L, Pornpattananangku D, Hu CM, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem.* 2010;17(6):585-94.

41. Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):104-20.
42. Bukovinszki K, Szalóki M, Hegedűs Cs, Borbély J. Kompozitok alkalmazhatósága a fogászatban. *Műanyag és gumi.* 2003;40(8):254-257.
43. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2005;72(2):136-45.
44. Tams J, Van Loon JP, Otten B, Bos RR. A computer study of biodegradable plates for internal fixation of mandibular angle fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59(4):404-7; discussion 407-8.
45. Isobe M, Yamazaki Y, Oida S, Ishihara K, Nakabayashi N, Amagasa T. Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer. *J Biomed Mater Res.* 1996;32(3):433-8.
46. Daneshmand N, Jorgensen MG, Nowzari H, Morrison JL, Slots J. Initial effect of controlled release chlorhexidine on subgingival microorganisms. *J Periodontal Res.* 2002;37(5):375-9.
47. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials.* 2002;23(6):1461-9.
48. Ahuja A, Rahman S, Ali J, Chaudhry R. Effect of dental films containing amoxycillin and metronidazole on periodontal pathogens: microbiological response. *Pharmazie.* 2003;58(10):716-20.
49. John P, Lazarus F, George JP, Selvam A, Prabhuji ML. Adjunctive Effects of A Piscean Collagen-Based Controlled-Release Chlorhexidine Chip in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Clinical and Microbiological Study. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(5):ZC70-4. doi: 10.7860/JCDR/2015/11534.5965.
50. Frühauf N, Dannewitz B, Weis C, Tu YK, Chang HJ, Faggion CM Jr. Cost-effectiveness of non-surgical peri-implantitis treatments. *J Clin Periodontol.* 2015;42(5):470-7. doi: 10.1111/jcpe.12402.
51. Jhinger N, Kapoor D, Jain R. Comparison of Periochip (chlorhexidine gluconate 2.5 mg) and Arestin (Minocycline hydrochloride 1 mg) in the management of chronic periodontitis. *Indian J Dent.* 2015;6(1):20-6. doi: 10.4103/0975-962X.151697.
52. Yadav SK, Khan G, Mishra B. Advances in patents related to intrapocket technology for the management of periodontitis. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2015;9(2):129-45.

53. Prasad K, Vijay G, Jayakumari NK, Dhananjaya A, Valliyil L. Nanogel As A Smart Vehicle For Local Drug Delivery In Dentistry. *American Journal of Pharmacy & Health Research* 2015;3(1):19-30.
54. Kabanov AV, Vinogradov SV. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(30):5418-29. doi: 10.1002/anie.200900441.
55. Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lyass O, Henderson R, Berry G, Gabizon A. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann Oncol.* 2000;11(8):1029-33.
56. Joseph MM, Aravind SR, George SK, Pillai RK, Mini S, Sreelekha TT. Co-encapsulation of Doxorubicin with galactoxyloglucan nanoparticles for intracellular tumor-targeted delivery in murine ascites and solid tumors. *Transl Oncol.* 2014;7(5):525-36. doi: 10.1016/j.tranon.2014.07.003.
57. Hwang SR, Kim K. Nano-enabled delivery systems across the blood-brain barrier. *Arch Pharm Res.* 2014;37(1):24-30. doi: 10.1007/s12272-013-0272-6.
58. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008;5(4):505-15. doi: 10.1021/mp800051m.
59. Oerlemans C1, Bult W, Bos M, Storm G, Nijssen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res.* 2010;27(12):2569-89. doi: 10.1007/s11095-010-0233-4.
60. Werner ME, Cummings ND, Sethi M, Wang EC, Sukumar R, Moore DT, Wang AZ. Preclinical evaluation of Genexol-PM, a nanoparticle formulation of paclitaxel, as a novel radiosensitizer for the treatment of non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;86(3):463-8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.02.009.
61. Stirland DL, Nichols JW, Miura S, Bae YH. Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice. *J Control Release.* 2013;172(3):1045-64. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.026.
62. Look M, Stern E, Wang QA, DiPlacido LD, Kashgarian M, Craft J, Fahmy TM. Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1741-9.

63. Abd El-Rehim HA¹, Swilem AE, Klingner A, Hegazy el-SA, Hamed AA. Developing the potential ophthalmic applications of pilocarpine entrapped into polyvinylpyrrolidone-poly(acrylic acid) nanogel dispersions prepared by γ radiation. *Biomacromolecules*. 2013;14(3):688-98. doi: 10.1021/bm301742m.
64. Wu Z, Zhang X, Guo H, Li C, Yu D. An injectable and glucose-sensitive nanogel for controlled insulin release. *J Mater Chem* 2012; 22: 22788-96. doi: 10.1039/C2JM34082H
65. Daithankar AV, Shiradkar MR. Thermoreversible anesthetic gel for periodontal intra-pocket delivery of mepivacaine hydrochloride. *Der Pharmacia Lettre* 2012; 4(3): 889 - 96.
66. Khurshid Z, Zafar M, Qasim S, Shahab S, Naseem M, AbuReqaiba A. Advances in Nanotechnology for Restorative Dentistry. *Materials*. 2015; 8(2):717-731.
67. Ifkovits JL, Burdick JA. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng*. 2007;13(10):2369-85.
68. Zhou D, Ito Y. Visible light-curable polymers for biomedical applications *Science China Chemistry*. 2014;57(4):510-21.
69. Krecz A, Pócsi I, Borbély J. Preparation and chemical modification of poly- γ -L-glutamic acid. *Folia Microbiol*. 2001;46(3):183-6.
70. Richard A, Margaritis A. Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett*. 2003;25(6):465-8.
71. Bajaj IB, Singhal RS. Enhanced production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009;159(1):133-41. doi: 10.1007/s12010-008-8427-5.
72. Pereira CL, Antunes JC, Gonçalves RM, Ferreira-da-Silva F, Barbosa MA. Biosynthesis of highly pure poly- γ -glutamic acid for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(7):1583-91. doi: 10.1007/s10856-012-4639-x.
73. Lee NR, Lee SM, Cho KS, Jeong SY, Hwang DY, Kim DS, Hong CO, Son HJ. Improved production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* D7 isolated from Doenjang, a Korean traditional fermented food, and its antioxidant activity. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(4):918-32. doi: 10.1007/s12010-014-0908-0.
74. Ogunleye A, Bhat A, Irorere VU, Hill D, Williams C, Radecka I. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*. 2015;161(Pt 1):1-17. doi: 10.1099/mic.0.081448-0.
75. Sawamura S. On *Bacillus natto*. *J Coll Agric*. 1913;5:189–191.
76. Kramar E. *Zentr Bakteriell Parastitenk. Abt 1*. 1921;87:401.

77. Ivanovics G, Bruckner V. Chemical and immunologic studies on the mechanism of anthrax infection and immunity. The chemical structure of capsule substance of anthrax bacilli and its identity with that of the *B. mesentericus*. *Z. Immunitaetsforsch.* 1937a;90:304–318.
78. Ivanovics G, Bruckner V. The chemical nature of the immuno-specific capsule substance of anthrax bacillus. *Naturwissenschaften* 1937b;25:250.
79. Yoshimitsu Hamano ed. *Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010:78-93. ISBN 978-3-642-12452-5, DOI 10.1007/978-3-642-12453-2.
80. Bajaj I, Singhal R. Poly (glutamic acid)--an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresour Technol.* 2011;102(10):5551-61. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.047.
81. Akao T, Kimura T, Hirofuji YS, Matsunaga K, Imayoshi R, Nagao J, Cho T, Matsumoto H, Ohtono S, Ohno J, Taniguchi K, Kaminishi H. A poly(γ -glutamic acid)-amphiphile complex as a novel nanovehicle for drug delivery system. *J Drug Target.* 2010;18(7):550-6. doi: 10.3109/10611861003599453.
82. Akagi T1, Shima F, Akashi M. Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials.* 2011;32(21):4959-67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.049.
83. Bhat AR, Irorere VU, Bartlett T, Hill D, Kedia G, Morris MR, Charalampopoulos D, Radecka I. *Bacillus subtilis natto*: a non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria. *AMB Express.* 2013 Jul 5;3(1):36. doi: 10.1186/2191-0855-3-36.
84. Zia Q, Khan AA, Swaleha Z, Owais M. Self-assembled amphotericin B-loaded polyglutamic acid nanoparticles: preparation, characterization and in vitro potential against *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:1769-90. doi: 10.2147/IJN.S63155. eCollection 2015.
85. Li C, Yu DF, Newman RA, Cabral F, Stephens LC, Hunter N, Milas L, Wallace S. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res.* 1998;58(11):2404-9.
86. Singer JW. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): a macromolecular taxane. *J Control Release.* 2005;109(1-3):120-6.

87. Kim TW, Lee TY, Bae HC, Hahm JH, Kim YH, Park C, Kang TH, Kim CJ, Sung MH, Poo H. Oral administration of high molecular mass poly-gamma-glutamate induces NK cell-mediated antitumor immunity. *J Immunol.* 2007;179(2):775-80.
88. Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J Control Release.* 2011;151(1):65-73. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.029.
89. Shima F, Akagi T, Uto T, Akashi M. Manipulating the antigen-specific immune response by the hydrophobicity of amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles. *Biomaterials.* 2013;34(37):9709-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.064.
90. Toita R, Nakao K, Mahara A, Yamaoka T, Akashi M. Biodistribution of vaccines comprised of hydrophobically-modified poly(γ -glutamic acid) nanoparticles and antigen proteins using fluorescence imaging. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(21):6608-15. doi: 10.1016/j.bmc.2013.08.024.
91. Zeng W, Hu W-K, Li H, Jing Y-H, Kang H, Jiang Q, Zhang C. Preparation and characterization of Poly(γ -glutamic acid) hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. *Chinese J Polym Sci.* 2014;32(11):1507-14.
92. Shi L, Yang N, Zhang H, Chen L, Tao L, Wei Y, Liu H, Luo Y. A novel poly(γ -glutamic acid)/silk-sericin hydrogel for wound dressing: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;48:533-40. doi: 10.1016/j.msec.2014.12.047.
93. Radu JEF, Novak L, Hartmann JF, Beheshti N, Kjoniksen AL, Nystrom B, Borbély J. Structural and dynamical characterization of poly-gamma-glutamic acid-based cross-linked nanoparticles. *Colloid Polym Sci.* 2008;286:365–76.
94. Bíró T, Szabó I, Kovács L, Hunyadi J, Csernoch L. Distinct subpopulations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(5):270-6.
95. Petrás M, Lajtos T, Friedländer E, Klekner A, Pintye E, Feuerstein BG, Szöllosi J, Vereb G. Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin- β 1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt-mediated in vitro radioresistance. *Neuro Oncol.* 2013;15(8):1027-40. doi: 10.1093/neuonc/not046.

96. Bae SR, Park C, Choi JC, Poo H, Kim CJ, Sung MH. Effects of ultra high molecular weight poly-gamma-glutamic acid from *Bacillus subtilis* (chungkookjang) on corneal wound healing. *J Microbiol Biotechnol.* 2010;20:803-8.
97. Sung MH, Park C, Kim CJ, Poo H, Soda K, Ashiuchi M. Natural and edible biopolymer poly-gamma-glutamic acid: synthesis, production, and applications. *Chem Rec.* 2005;5:352-66.
98. Chaterji S, Kwon IK, Park K. Smart Polymeric Gels: Redefining the Limits of Biomedical Devices. *Prog Polym Sci.* 2007;32:1083-122.
99. Hornok V, Bujdosó T, Toldi J, Nagy K, Demeter I, Fazakas C, Krizbai I, Vécsei L, Dékány I. Preparation and properties of nanoscale containers for biomedical application in drug delivery: preliminary studies with kynurenic acid. *J Neural Transm.* 2012;119:115-21. doi: 10.1007/s00702-011-0726-2.
100. Tronci G, Grant CA, Thomson NH, Russell SJ, Wood DJ. Multi-scale mechanical characterization of highly swollen photo-activated collagen hydrogels. *J R Soc Interface.* 2015;12(102):20141079. doi: 10.1098/rsif.2014.1079.
101. Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S6-12. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.019.
102. Moutos FT, Guilak F. Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(4):1291-301. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0480.
103. Garg T, Goyal AK. Biomaterial-based scaffolds--current status and future directions. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11(5):767-89. doi: 10.1517/17425247.2014.891014.
104. Gaudet ID, Shreiber DI. Characterization of methacrylated type-I collagen as a dynamic, photoactive hydrogel. *Biointerphases.* 2012;7(1-4):25. doi: 10.1007/s13758-012-0025-y.
105. Da Rocha HA, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, De Magalhães D. Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *J Int Acad Periodontol.* 2015;17(3):82-90.
106. Narang RS, Narang JK. Nanomedicines for dental applications-scope and future perspective. *Int J Pharm Investig.* 2015;5(3):121-3. doi: 10.4103/2230-973X.160843.
107. Müller WE, Schröder HC, Feng Q, Schlossmacher U, Link T, Wang X. Development of a morphogenetically active scaffold for three-dimensional growth of bone cells: biosilica-

alginate hydrogel for SaOS-2 cell cultivation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):E39-50. doi: 10.1002/term.1745.

108. Place ES, Rojo L, Gentleman E, Sardinha JP, Stevens MM. Strontium- and zinc-alginate hydrogels for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(21-22):2713-22. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0059.

109. Trojani C, Weiss P, Michiels JF, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carle GF, Rochet N. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials*. 2005;26(27):5509-17.

110. Ravi M1, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26. doi: 10.1002/jcp.24683.

111. Tiwari A1, Grailer JJ, Pilla S, Steeber DA, Gong S. Biodegradable hydrogels based on novel photopolymerizable guar gum-methacrylate macromonomers for in situ fabrication of tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater*. 2009;5(9):3441-52. doi: 10.1016/j.actbio.2009.06.001.

112. Ji QX, Zhao QS, Deng J, Lü R. A novel injectable chlorhexidine thermosensitive hydrogel for periodontal application: preparation, antibacterial activity and toxicity evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(8):2435-42. doi: 10.1007/s10856-010-4098-1.

113. Wang JJ, Liu F. Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on silicone hydrogels for reducing protein adsorption. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(12):2651-7. doi: 10.1007/s10856-011-4452-y.

114. Hu J, Hou Y, Park H, Choi B, Hou S, Chung A, Lee M. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2012;8(5):1730-8. doi: 10.1016/j.actbio.2012.01.029.



Nyilvántartási szám: DEENK/160/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bakó József
Neptun kód: SG9XWE
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036858

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

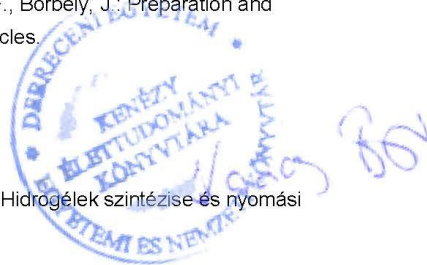
1. **Bakó, J.**, Kerényi, F., Hrubí, E., Varga, I., Daróczy, L., Dienes, B., Csernoch, L., Gáll, J., Hegedűs, C.: Poly-[gamma]-Glutamic Acid Nanoparticles Based Visible Light-Curable Hydrogel for Biomedical Application.
J. Nanomater. 2016, 1-10, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7350516>
IF:1.644 (2014)
2. **Bakó, J.**, Vecsernyés, M., Ujhelyi, Z., Bácskay, I., Borbíró, I., Bíró, T., Borbély, J., Hegedűs, C.: Composition and characterization of in situ usable light cured dental drug delivery hydrogel system.
J. Mater. Sci.-Mater. Med. 24 (3), 659-666, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4825-x>
IF:2.379
3. **Bakó, J.**, Szepesi, M., Veres, A.J., Cserháti, C., Borbély, Z.M., Hegedűs, C., Borbély, J.: Synthesis of biocompatible nanocomposite hydrogels as a local drug delivery system.
Colloid Polym. Sci. 286 (3), 357-363, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-007-1793-7>
IF:1.736





További közlemények

4. **Bakó J.**, Kelemen M., Szalóki M., Vitályos G., Radics T., Hegedűs C.: Fogsor alaplemezből kioldódó allergének kötődésének vizsgálata Fourier-Transzformációs Felületi Plazmon Rezonancia (FT-SPR) módszerrel.
Fogorv. Szle. 107 (1), 13-18, 2015.
5. Bukovinszky K., Molnár L., **Bakó J.**, Szalóki M., Hegedűs C.: Folyékony kompozitok és töltetlen kompozit gyanta polimerizációs zsugorodásának összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 106 (4), 3-8, 2014.
6. Kuttor, A., Szalóki, M., Rente, T., Kerényi, F., **Bakó, J.**, Fábián, I., Jenei, A., Lázár, I., Hegedűs, C.: Preparation and application of highly porous aerogel-based bioactive materials in dentistry.
Front. Mater. Sci. 8 (1), 46-52, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11706-014-0231-2>
IF:1
7. Katona B., Daróczi L., Jenei A., **Bakó J.**, Hegedűs C.: Implantátumok felületi sajátosságainak összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 106 (4), 135-143, 2013.
8. Maroda, M., Bodnár, M., Berkó, S., **Bakó, J.**, Erős, G., Csányi, E., Szabó-Révész, P., Hartmann, J.F., Kemény, L., Borbély, J.: Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system.
Carbohydr. Polym. 83 (3), 1322-1329, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.039>
IF:3.628
9. Bodnár, M., Daróczi, L., Batta, G., **Bakó, J.**, Hartmann, J.F., Borbély, J.: Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles.
Colloid Polym. Sci. 287 (8), 991-1000, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-009-2061-9>
IF:2.057
10. Szepesi M., **Bakó J.**, Márton S., Borbély J., Hegedűs C.: Hidrogélek szintézise és nyomási szilárdságuk vizsgálata.
Fogorv. Szle. 100 (1), 27-32, 2007.





11. **Bakó J.**, Szepesi M., Márton I., Borbély J., Hegedűs C.: Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására alkalmas nanorészecskék szintézise.
Fogorv. Szle. 100 (3), 109-113, 2007.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,444

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,759

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.06.16.



TÁRGYSZAVAK

poli- γ -glutamin sav, hidrogél, nanorészcske, nanogél, nanokompozit, fotopolimerizáció, kék-fény, hatóanyag-leadó rendszer, klórhexidin, metronidazol

poly- γ -glutamic acid, hydrogel, nanoparticle, nanogel, nanocomposite, photopolymerization, blue-light, drug-delivery system, clorhexidine, metronidazole

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani, témavezetőmnek Professzor Dr. Hegedűs Csabának támogatásáért, iránymutatásáért, valamint a kutatás feltételeinek biztosításáért.

Külön köszönöm, a Fogorvostudományi Doktori Iskola vezetőjének Professzor Dr. Márton Ildikónak, hogy a doktori iskola keretei között biztosította a dolgozat elkészítésének lehetőségét.

Köszönet illeti Dr. Borbély Jánost, a polimerekkel kapcsolatosan nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsaiért.

Köszönöm minden jelenlegi, és korábbi kollégámnak, mind a közlemények, mind pedig a dolgozat elkészítése során nyújtott közreműködését, és segítségét.

Köszönettel tartozom szüleimnek, a tanulmányaim elvégzéséhez szükséges háttér megteremtéséért, és az élet minden területén megnyilvánuló támogatásukért.

S végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, feleségemnek, és lányomnak, Annának valamint fiamnak, Dávidnak végtelen türelmükért és támogatásukért, mellyel biztosították a szükséges háttérrel, hogy ez a munka elkészülhessen.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



FÜGGELÉK

Az értekezést magalapozó publikációk: