



BIOPOLIMER ALAPÚ NANORENDSZEREK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

doktori (PhD) értekezés

Bodnár Magdolna

Témavezető:
Dr. Borbély János
egyetemi docens

Debreceni Egyetem
Kolloid- és Környezatkémiai Tanszék
Debrecen, 2008.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémia Doktori Iskola Makromolekuláris és Felületi Kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2008. 01. 03.

Bodnár Magdolna

Tanúsítom, hogy Bodnár Magdolna doktorjelölt 2003-2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola Makromolekuláris és Felületi Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2008. 01. 03.

Dr. Borbély János
egyetemi docens

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Borbély János egyetemi docens úrnak munkám irányításáért, útmutatásáért, oktató-nevelő szándékú segítségéért, szakmai tanácsaiért.

Köszönetemet fejezem ki Keczánné Üveges Andrea PhD hallgatónak, Szalóki Melinda tudományos segédmunkatársnak és Hajdu István vegyészhallgatónak, akik a felmerülő problémák megvitatásában és a jó munkahelyi légkör megteremtésében segítettek.

Köszönettel tartozom Schriffertné Denyicska Ildikó és Szatmári Mihály vegyésztechnikusoknak a munkám során nyújtott odaadó segítségükért és baráti támogatásukért.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Batta Gyula egyetemi magántanárnak és Dr. Kövér Katalin tudományos tanácsadónak a kétdimenziós NMR spektrumok elkészítéséért, illetve Balla Sára vegyésztechnikusnak a rutin NMR mérésekért.

Köszönet illeti Dr. Daróczy Lajos egyetemi adjunktust a TEM felvételek elkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm a Kolloid- és Környezatkémiai Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy a munkámban támogattak, valamint mindazoknak, akik hozzájárultak e dolgozat elkészítéséhez.

Köszönöm Dr. Tóth Zoltánnak a segítséget és a barátságát.

Munkámhoz az anyagi támogatást a RET-06/2004 pályázat biztosította.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	9
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. Biopolimerek és jelentőségük	11
2.1.1. A kitozán és jelentősége	11
2.1.1.1. A kitozán	11
2.1.1.2. A kitozán tulajdonságai	12
2.1.1.3. A kitozán molekulatömege, degradációja	13
2.1.1.4. A kitozán jelentősége	14
2.1.2. A hialuronsav és jelentősége	14
2.1.2.1. A hialuronsav.....	14
2.1.2.2. A hialuronsav tulajdonságai	15
2.1.2.3. A hialuronsav molekulatömege, degradációja	16
2.1.2.4. A hialuronsav jelentősége	17
2.1.3. A poli- γ -glutaminsav és jelentősége.....	18
2.1.3.1. A poli- γ -glutaminsav	18
2.1.3.2. A poli- γ -glutaminsav tulajdonságai.....	20
2.1.3.3. A poli- γ -glutaminsav jelentősége.....	20
2.2. Biopolimerek módosításai	21
2.2.1. A kitozán módosítása, térhálósítása	21
2.2.1.1. Kitozán oldhatóságának növelése	21
2.2.1.2. Kitozánból előállítható hidrogélek típusai	23
2.2.1.3. Hidrogélek előállítása a kitozán kis molekulákkal történő térhálósításával	24
2.2.1.4. Módszerek térhálós kitozán részecskék előállítására	26
2.2.1.5. Részecskék előállítása a kitozán térhálósításával	28
2.2.2. A hialuronsav térhálósítása.....	29
2.2.2.1. Hidrogélek előállítása a hialuronsav térhálósításával	30
2.2.2.2. Részecskék előállítása a hialuronsav térhálósításával.....	31

2.3. Biopolimerek önrendeződése.....	32
2.3.1. Polielektrolitok önrendeződése	32
2.3.2. Önrendeződő rendszerek kitozánból	33
2.4. Savamidkötés kialakítása karbodiimiddel	35
3. Célkitűzés.....	38
4. Kísérleti rész	39
4.1. Felhasznált anyagok és eszközök	39
4.2. Vizsgálati módszerek.....	41
4.2.1. Mágneses magrezonancia spektroszkópia.....	41
4.2.2. Fényszórás fotometria.....	41
4.2.3. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	41
4.2.4. Ultraibolya spektroszkópia.....	42
4.2.5. Elektrokinetikai mérések	42
4.3. Kísérleti módszerek	42
4.3.1. Kitozán térhálósítása.....	42
4.3.1.1. Kitozán térhálósítása rövid szénláncú karbonsavakkal	42
4.3.1.2. Kitozán térhálósítása poli-(etilén glikol)bisz-	
(karboximetil)éter)-rel	43
4.3.2. Kitozán degradációja	44
4.3.3. Hialuronsav degradációja	45
4.3.4. Hialuronsav térhálósítása 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal	45
4.3.5. Kitozán és hialuronsav önrendeződése.....	46
4.3.6. Kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződése	46
5. Eredmények és értékelésük.....	48
5.1. A kitozán térhálósítása.....	48
5.1.1. Kitozán térhálósítása rövid szénláncú dikarbonsavakkal	48
5.1.1.1. Térhálós kitozán nanorészecskék előállítása.....	48
5.1.1.2. A térhálós kitozán szerkezetének vizsgálata	49
5.1.1.3. A térhálós kitozán részecskéket tartalmazó vizes rendszerek	
transzmittanciájának vizsgálata.....	54
5.1.1.4. A térhálós kitozán részecskék hidrodinamikai mérete	56

5.1.1.5. A térhálós kitozán részecskék vizsgálata transzmissziós elektron- mikroszkóppal	59
5.1.2. Különböző molekulatömegű kitozán térhálósítása PEG α,ω -dikarbonsav oligomerrel.....	61
5.1.2.1. Térhálós kitozán nanorészecskék előállítása.....	61
5.1.2.2. A kitozán degradációja.....	61
5.1.2.3. A térhálósított kitozán szerkezetének vizsgálata	62
5.1.2.4. A térhálós kitozán részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata.....	66
5.1.2.5. A térhálós kitozán részecskék hidrodinamikai mérete	67
5.1.2.6. A térhálós kitozán részecskék vizsgálata transzmissziós elektron- mikroszkóppal	69
5.2. Hialuronsav térhálósítása.....	71
5.2.1. Térhálós hialuronsav nanorészecskék előállítása	71
5.2.2. A hialuronsav degradációja	72
5.2.3. A térhálós hialuronsav szerkezetének vizsgálata	73
5.2.4. A térhálós hialuronsav részecskéket tartalmazó vizes rendszerek relatív viszkozitásának vizsgálata.....	77
5.2.5. A térhálós kitozán részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata	78
5.2.6. A térhálós hialuronsav részecskék hidrodinamikai mérete	81
5.2.7. A térhálós hialuronsav részecskék vizsgálata transzmissziós elektron- mikroszkóppal	82
5.3. Önrendeződés.....	84
5.3.1. A kitozán és a hialuronsav önrendeződése.....	84
5.3.2. A kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződése	86
5.3.2.1. Önrendeződő nanorészecskék előállítása	86
5.3.2.2. Az önrendeződő részecskék stabilitása	86
5.3.2.3. Az önrendeződő részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata.....	89

5.3.2.4. Az önrendeződő részecskék elektroforetikus mobilitásának vizsgálata	91
5.3.2.5. Az önrendeződő részecskék hidrodinamikai mérete	93
5.3.2.6. Az önrendeződő részecskék vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal	96
6. Összefoglalás	99
7. Summary	102
8. Irodalomjegyzék	105
9. Tudományos közlemények és konferencia-részvételek.....	109
9.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények	109
9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia-részvételek	110
9.3. Egyéb publikációs tevékenység	112
9.4. Egyéb konferencia-részvétel	113
9.5. Szabadalom	114

Rövidítések jegyzéke

M_v	Viszkozitás szerinti átlagos molekulatömeg
CH	Kitozán, $M_v = 320$ kDa
DCH1	Degradált kitozán, $M_v = 190$ kDa
DCH2	Degradált kitozán, $M_v = 100$ kDa
DCH3	Degradált kitozán, $M_v = 55$ kDa
HA (0h)	Hialuronsav, $M_v = 800$ kDa
HA 3h	Degradált hialuronsav, $M_v = 210$ kDa
HA6h	Degradált hialuronsav, $M_v = 100$ kDa
HA9h	Degradált hialuronsav, $M_v = 50$ kDa
PGA	Poli- γ -glutaminsav
CDI	1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodid
PEG α,ω dikarbonsav	Poli-(etilén glikol)bisz(karboximetil)éter

1. Bevezetés

Napjaink dinamikusan fejlődő tudományterülete a nanotudomány. Egyre növekvő figyelem övezi a nanoanyagokat, nanotechnológiát. Életünk különböző területein találkozunk a nanoanyagokkal foglalkozó tudományos kutatások vívmányaival, az informatikától az orvostudományig, az élelmiszeripartól a gyógyszeriparig.

Szükséges behatárolni a nano szó jelentését. A nano előtag az SI mértékegységrendszerében 10^{-9} szorzótényezőt jelent. Az 1 nanométer a kolloid mérettartomány alsó határa.

Nincs általános érvényű, nemzetközileg elfogadott definíció arra, mit nevezünk nanorészecskének. A nanorészecske elnevezés újkeletű. Néhány évtizeddel ezelőtt a kolloid mérettartományba (1-500 nm) eső részecskéket tartották nanorészecskéknak. A tudomány és a technika fejlődésével a mérettartomány szűkült. Napjainkban azokat a részecskéket tartjuk nanorészecskéknak, amelyek mérete legalább egy dimenzióban 100 nm alatt van. A nanorészecskék újszerű tulajdonságokat hordoznak, melyek megjelenése általában egy kritikus méret alatt jelentkezik, mely méret 100 nm körüli. A nano- és a nem nanorészecskék között nem húzható éles határ. Az újszerű, általában mérettől függő tulajdonságok megjelenése anyagi minőség függvénye is, ezért a mérethatár 100 nm-től jóval nagyobb, esetleg kisebb is lehet.

A tudomány és a technika fejlődésével növekvő igény mutatkozik a mikro-, majd a nanorendszerek tervezésére, létrehozására. Ezzel párhuzamosan, a környezettudatos magatartás kialakulásával a bioanyagokból, biopolimerekből előállítható rendszerek kifejlesztése került előtérbe. Hétköznapi életben bio mindaz, ami biológiai eredetű – azaz amit növényi, állati, illetve emberi szervezetek állítanak elő, és az emberi szervezetre nézve nem mérgező. Tudományos értelemben a bioanyag jelentése széleskörű, értelmezése tudományterülettől is függ.

A sebészetben, tág értelemben véve egyaránt bioanyagnak tekintik biokompatibilis szintetikus és természetes anyagokat. Szűkítve az értelmezést: az élő szervezetek által termelt, biológiai eredetű anyagok tekinthetők bioanyagnak, pl. humusz, pamut, gyapjú, kitin,...stb. Az értelmezést tovább szűkítve: a bioanyagok az élő szervezetek

által termelt olyan anyagok, amelyek biodegradábilis tulajdonsággal rendelkeznek, azaz az élő szervezetben enzimatis úton lebomlanak.

Napjaink biopolimerekre épülő kutatásainak egyik alapvető célja olyan nanorendszerek létrehozása, amelyek nagy hatékonysággal használhatók gén, illetve gyógyszer-hatóanyagok célba juttatására, szabályozott kioldódására, valamint szövetregenerálásra. Tudományos értékük abban rejlik, hogy biokompatibilis rendszerek, nem váltanak ki immunreakciót a szervezetben, és biodegradábilisak, azaz biológiai úton lebonthatók.

Funkciós csoportokkal rendelkező biopolimerek alkalmasak lehetnek arra, hogy fizikai, illetve kémiai módosítással, térhálósítással nanoméretű részecskéket alkossanak. Ezen elgondolás alapján választottuk az aminocsoportokkal rendelkező kitozán és a karboxilcsoportokkal rendelkező hialuronsav poliszacharidokat térhálós nanorészecskék előállítására. Kutatásaink során e két biopolimerből, kovalens kötéssel térhálósított, nano mérettartományba eső stabilis részecskéket állítottunk elő kondenzációs reakcióban szobahőmérsékleten. Kutatómunkánk keretében tanulmányoztuk a kitozán és különböző természetes eredetű polikarbonsavak (hialuronsav, poli- γ -glutaminsav) közötti ion-ion kölcsönhatáson alapuló önrendeződéssel előállítható nanorendszereket is. Vizsgáltuk a részecskék stabilitását, oldhatóságát, szerkezetét és méretét.

2. Irodalmi áttekintés

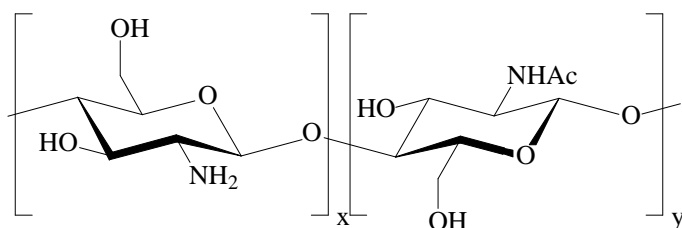
2.1. Biopolimerek és jelentőségük

2.1.1. A kitozán és jelentősége

2.1.1.1. A kitozán

A kitozán a természetben nagy mennyiségben előforduló megújuló agyagnak, a kitinnek a származéka. Rákok páncéljából állítják elő, a kitin tömény nátrium-hidroxid oldatban történő főzésével. A kitozán egy gyűjtőnév. Jelenti mindazon poliszacharidokat, amelyek a kitin részben dezacilezett származékai. A dezacilezettség mértéke általában 40-99% között van.

A kitozán lineáris poliszacharid, funkciós aminocsoportokkal rendelkezik. Eredetéből adódóan szerkezete hasonló a kitinéhez, monomeregységei β -D-glükóz egységekre vezethetők vissza.



1. ábra

A kitozán szerkezetének vázlatos rajza

A különböző mértékű dezacilezettség miatt a kitozán a β -[1 \rightarrow 4]-2-acetamido-2-dezoxi-D-glükopiranoz és a 2-amino-2-dezoxi-D-glükopiranoz kopolimerjének tekinthető (1. ábra). A szakirodalomban számos elnevezést használnak a kitozánra: poli- β -[1 \rightarrow 4]-2-amino-2-dezoi-D-glükopiranoz, poli-D-glükózamin, poli-N-acetil-D-glükózamin.

2.1.1.2. A kitozán tulajdonságai

A kitozán nem mérgező, biokompatibilis, biodegradábilis, antibakteriális tulajdonságú, és a szervezetben nem vált ki immunreakciót. Ezen speciális tulajdonságai mellett a kitozán megújuló természetes anyag, nagy mennyiségben hozzáférhető, és olcsó.

A biológiai szempontból kiváló tulajdonságú kitozán széleskörű alkalmazásának határt szab azonban rossz oldhatósága.

A kitozán nem oldódik lúgos vizes közegben, alkoholokban, valamint a legtöbb szerves oldószerben. Reaktív aminocsoportjai révén jól oldódik savas közegben, oldódása során nagy töltéssűrűségű, pozitívan töltött poliszacharid keletkezik. Legjobb oldószerei a sósav, valamint a szerves savak, pl. az ecetsav, hangyasav, tejsav, glutaminsav.

A cellulózhoz és a kitinhez hasonlóan a kitozán is nagy kristályossági fokkal rendelkezik. Ez is hozzájárul ahhoz, hogy kevés oldószere van és azokban is, nehezen oldódik fel.

A kitozán savas oldata viszkózus, a viszkozitást a hőmérséklet, a koncentráció, valamint a dezacilezettség mértéke is befolyásolja.^{1,2} A koncentráció növelésével nő a kitozán oldat viszkozitása, míg a hőmérséklet növelése fokozza a poliszacharid lánc flexibilitását, a viszkozitás lineáris csökkenését okozva. A dezacilezettség mértéke elsősorban a poliszacharid lánc konformációját befolyásolja, ami kihat az oldat viszkozitására. Nagy mértékű dezacilezettség mellett a protonált aminocsoportok taszító hatása miatt a makromolekula kigombolyodik, a viszkozitás nő. Kis dezacilezettség esetén, a kis töltéssűrűség miatt a molekulák statisztikus gombolyag alakot vesznek fel, ami kisebb viszkozitást eredményez.

Oldatban a kitozánmolekulák konformációját intra- és intermolekulás hidrogénkötések stabilizálják. Az intermolekuláris hidrogénkötések miatt a kitozán könnyen képez filmet. A képződő film ridegségét, merevségét a dezacilezettség mértéke befolyásolja.^{2,3}

A poliszacharidokra jellemző hidrogénkötések jelenlétére utal azon tulajdonsága is, hogy melegítés hatására degradálódik, mielőtt megolvadna.

2.1.1.3. A kitozán molekulatömege, degradációja

A dezacilezettség mellett a molekulatömeg nagymértékben befolyásolja a kitozán tulajdonságait. A kitinből nyert kitozánok általában nagy molekulatömegű biopolimerek, nehezen oldódnak, oldatuk viszkózus már kis koncentrációban is. Számottevő igény mutatkozott kis molekulatömegű kitozánokra a tulajdonságok optimalizálása, valamint az alkalmazhatósági kör kiszélesítése érdekében.

A kis molekulatömegű kitozánok előállítására számos degradációs eljárást fejlesztettek ki.⁴⁻⁶ A szakirodalomban vizsgált eljárások közül a legelterjedtebb a savas közegben végrehajtott oxidatív degradáció.

Savas közegben a degradációt kiválthatjuk H_2O_2 vagy $NaNO_2$ reaktánsokkal, de tömény sósavas közegben a hőmérséklet növelése is degradációt eredményez⁴, melyet termikus degradáció néven jegyez a szakirodalom.

Hidrogén-peroxiddal kiváltott degradáció során azt tapasztalták⁵, hogy a dezacilezettség elősegíti a lánctüredéződést. A nagyobb dezacilezettségi fokú kitozánok degradációja gyorsabban végbemegy. A publikáció szerzői arra a következtetésre jutottak, hogy ebben az esetben az aminocsoport N-atomján keresztül támadja meg a H_2O_2 -molekula a gyűrűt, a láncot, és aktív gyök képződik. A leírt eljárás szobahőmérsékleten is végbemegy, de a hőmérséklet növelésével a folyamat meggyorsítható. A hőmérséklet emelésének hátránya, hogy a keletkező frakció polidiszperzitása nagyobb, oligomerek is képződhetnek.

A nátrium-nitrittel végrehajtott degradáció legnagyobb előnye, hogy szobahőmérsékleten tökéletesen végbemegy, a reakcióelegy könnyen kezelhető. A szakirodalomban közzétett vizsgálatok megállapítják⁶, hogy a kitozán molekulatömege lineárisan csökken a kitozán/ $NaNO_2$ arány növelésével és logaritmikusan a reakcióidővel. A kutatási eredmények igazolják, hogy a degradáció a glikozidos kötés mentén történik. A degradáció mértéke független a kitozán dezacilezettségi fokától, viszont rendkívül érzékeny a kiindulási poliszacharid molekulatömegére és koncentrációjára. Azt tapasztalták, hogy minél kisebb volt a kitozán kezdeti koncentrációja, illetve minél nagyobb a molekulatömege, annál érzékenyebb volt a makromolekula a degradációra.

2.1.1.4. A kitozán jelentősége

A kitozán felhasználása három évtizedes múltra tekint vissza. Kezdetben víztisztításra használták, elsősorban zsírmegkötő tulajdonsága miatt. Vizes közegben adszorbeálja a zsírokat, olajokat, nehézfémeket, valamint egyéb potenciálisan mérgező anyagot.

Biológiai szempontból kiváló tulajdonságai miatt, a kitozánt széles körben használja a gyógyszer technológia⁷ és az orvosbiológia⁸. Kitozánból mikro- és nanorészecskéket fejlesztettek ki, gyógyszerhatóanyag szabályozott kibocsátása, valamint célbajuttatása érdekében^{7,9}. A térhálós kitozán gélek nagy hatékonysággal alkalmazhatók szövetregenerálásra¹⁰, implantátumok készítésére¹¹.

Napjainkban intenzív kutatások folynak a kitozán biológiai alkalmazhatóságának kiszélesítésére, tökéletesítésére. A gének töredezésmentes szállítására¹², az enzimek immobilizációjára^{13,14} alkalmas kitozán rendszerek kifejlesztése nagy kihívás.

A kitozán jó fémmegkötő tulajdonsága miatt víztisztításra is használható.¹⁵ Napjainkban is intenzív kutatások folynak a kitozán fémmegkötő tulajdonságának feltárására, leírására, fejlesztésére. Számos közlemény számol be a kitozán, valamint térhálós kitozán adszorpciók kapacitásáról, szelektivitásáról.^{16,17}

A kitozánt széles körben alkalmazzák az ipar számos területén. Antioxidáns, illetve gombaölő tulajdonsága miatt a kozmetikai ipar és az élelmiszeripar is nagy mennyiségben használja adalékanyagként.¹⁸ Mindemellett találkozunk kitozánnal a fényképésztől a papírgyártásig, az élet különböző területein.¹⁹

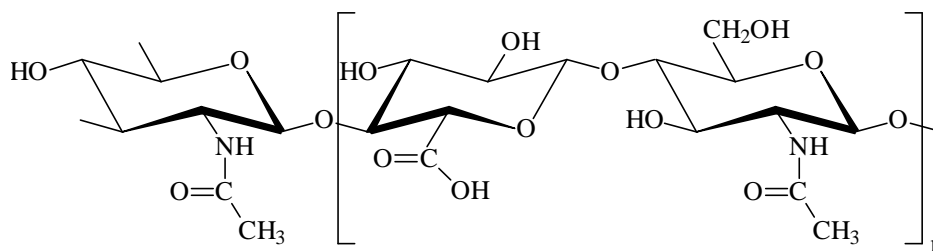
2.1.2. A hialuronsav és jelentősége

2.1.2.1. A hialuronsav

Karl Meyer és munkatársai 1936-ban reumás betegeken folytattak kísérleteket a New York-i Columbia Egyetemen. A reumás betegek duzzadt ízületeiből egy aktív anyagot sikerült izolálniuk, amelyet hialuronsavnak neveztek el savi hatása és lokalizációja miatt (hialin = porc). A negyvenes években sikerült a hialuronsavat gyakorlatilag minden állatfajból izolálni és az ötvenes években rájöttek arra, hogy a hialuronsav

számos fontos betegséggel hozható kapcsolatba, például a reumás arthritisszel, degeneratív arthritisszel, rákkal és néhány bőrbetegséggel is.

A hialuronsav lineáris poliszacharid, funkciós karboxilcsoportokkal rendelkezik. Az elágazások nélküli poliszacharid lánc véletlenszerűen feltekeredik és egy kicsit merev. Szerkezete β -[1 \rightarrow 3]-2-acetamido-2-dezoxi-D-glükopiranoz és β -[1 \rightarrow 4]-D-glükuronsav diszacharidegységekből áll. A hialuronsav tekinthető a két monoszacharid egység szigorúan altarnáló kopolimerjének is. (2. ábra)



2. ábra

A hialuronsav polimerlánc ismétlődő egységének kémiai szerkezete

2.1.2.2. A hialuronsav tulajdonságai

A hialuronsav az élő szervezetben is előforduló, biokompatibilis, biodegradábilis poliszacharid, a szervezetben nem vált ki immunreakciót. A hialuronsav megújuló természetes anyag, nagy mennyiségben előállítható, illetve kinyerhető.

A kereskedelemben kapható hialuronsavat gyakran kakastaréjból vagy biotechnológiai úton állítják elő; ezek közül az előbbi a gyakoribb forrás. A kakastaréj több mint 100 g-os súlyig növeszthető, melynek kb. 1%-a a hialuronsav. A kakastaréjból előállított hialuronsav nagy molekulatömegű, de kis mennyiségben – óhatatlanul – más madár-eredetű fehérjékkel (Avis protein) szennyeződhet, így allergiát válthat ki az arra érzékeny szervezetekben. A hialuronsav másik forrása a bakteriális fermentációval történő előállítás. E módszer előnye a baktériumok könnyű szaporítása, a kinyert hialuronsav kémiaileg egységes volta és mentessége a szennyeződéstől, valamint az, hogy nagyobb mennyiségben is előállítható.

A hialuronsav molekulatömege – eredetétől függően – 1×10^4 és 2×10^7 Da között változik. Molekulatömegétől függetlenül a hialuronsav széles pH-tartományban jól oldódik vizes közegben.

A hialuronsav polielektrolit, oldatbeli viselkedése pH-függő.²⁰ Vizes oldatát vizsgálva megállapították, hogy reológiai viselkedése széles pH tartományban (2,8-12) közel változatlan. Viskozitásának hőmérsékletfüggése elhanyagolható, a koncentráció-függése közel lineáris. Ezen eredmények valószínűsítik, hogy a hialuronsavban a poliszacharid láncok között nincs erős kölcsönhatás. 2,5 pH-érték körül a makromolekula töltése, töltéssűrűsége lecsökken, intermolekuláris kölcsönhatások, hidrogénkötések hálózata alakul ki a poliszacharid láncok között, a hialuronsav termoreverzibilis gélként viselkedik. Erősebb savas közegben (pH = 1,6) a biopolimer oldat viszkozitása csökken, reverzibilis pH-függő szol-gél átalakulás következik be. Erősen lúgos közegben (pH > 12) a hialuronsav viszkozitása csökken. Bekövetkezik a hidroxilcsoportok disszociációja, megbomlik a hidrogénkötések hálózata, csökken a polimerlánc merevsége, ami a viszkozitásban is megmutatkozik.

A hialuronsav molekulatömege befolyásolja a reológiai viselkedést. A makromolekula közepes csavarodottsága és a molekulatömeg között lineáris az összefüggés. Ezzel szemben a határviszkózus – molekulatömeg görbének egyértelmű hajlata van. Az eredmények figyelembevételével a hialuronsav molekulatömege alapján három csoportot különböztethetünk meg: $M_v < 100$ kDa, 100 kDa $> M_v > 1$ MDa, $M_v > 1$ MDa. A különböző csoportokhoz tartozó más-más értékű Mark-Houwink együtthatók lehetővé teszik a molekulatömeg pontosabb meghatározását a határviszkózus értékek alapján.²¹

2.1.2.3. A hialuronsav molekulatömege, degradációja

A hialuronsav általában nagy molekulatömegű biopolimer, vizes közegben jól oldódik, de oldata pH-tól függően viszkózus már kis koncentrációban is. Számottevő igény mutatkozott kis molekulatömegű hialuronsav előállítására.

A kis molekulatömegű hialuronsav előállítására számos degradációs eljárást fejlesztettek ki. A szakirodalomban fellelhető ultrahangra^{22,23}, mikrohullámra épülő degradáció²⁴, illetve a termikus eljárás²⁴ is elterjedt.

Az ultrahanggal kiváltott degradáció egyszerű eljárás. A degradáció vizes közegben, szobahőmérsékleten kivitelezhető. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a pH nem befolyásolja számottevő mértékben a folyamatot. Savas, semleges és lúgos közegben egyaránt kb. 1 óra alatt megtörténik a degradáció, a molekulatömeg kb. ötödrészére csökken. A folyamat gyorsítható a hőmérséklet emelésével, valamint különböző oxidálószerrel (H_2O_2 , NaOCl) hozzáadásával.²⁴

A mikrohullámmal kiváltott degradáció vizes közegben történik, magas hőmérsékleten ($T > 90^\circ C$). A molekulatömeg – reakcióidő összefüggés exponenciálisan csökkenő görbe, amely erős pH-függést mutat. Savas közegben a degradáció megtörténik az első 30 percben, a molekulatömeg kb. ötöd részére csökken, míg semleges és lúgos közegben 60 perc alatt a molekulatömeg csak feleződik.²⁴

A hialuronsav savas hidrolízise magas hőmérsékleten, sósavas vagy kénsavas közegben kivitelezhető. A közeg pH-ja, valamint a hőmérséklet változtatásával befolyásolható a degradáció sebessége. Minél kisebb a közeg pH-ja, valamint minél nagyobb az alkalmazott hőmérséklet, annál gyorsabb a degradáció.

A magas hőmérsékleten végrehajtott degradációs eljárások összehasonlításából megállapítható, hogy a mikrohullám gyorsítja a degradációs folyamatot savas közegben.

2.1.2.4. A hialuronsav jelentősége

A hialuronsav természetes poliszacharid, amely minden szövetben megtalálható és ott a szintézise vagy bejuttatása után pár nap alatt lebomlik. Az emberi testben többek között vízmegkötő, illetve az ízületekben és izmokban síkosító szerepet tölt be. A hialuronsav eloszlása a szervezetben: 56 % a bőrben; 35 % az izmokban és csontokban; 9 % máshol, például az ízületi folyadékban, köldökzsinórban, vérben, nyirokrendszerben.

A hialuronsav anyagának szövetbarát jellege lehetőséget ad arra, hogy számtalan gyógyszerészeti termék része legyen. Megtalálható bőrápolószerekben, szemsebészeti vagy ízületi gyulladással kapcsolatos termékekben.

A hialuronsavat különleges gyógyszerekben használják, mint például a szemműtékekhez szükséges viszkoelasztikus folyadékokban és ortopédiai betegségek gyógyításához használt viszkózus termékekben.

A viszkosebészetben, hialuronsav-tartalmú implantátumok alkalmazhatók szövetvédőkként és mechanikai eszközök nedvesítésére, hogy az érzékeny sejteket óvják a mechanikai károsodástól. Magából a hialuronsavból is lehet készíteni puha sebészeti eszközöket a szövetek, szervek mozgatására, törmelék eltávolítására, vérzések lokalizálására és összenövések szétválasztására. Ezek az implantátumok a beavatkozás helyén hagyva csökkentik az operáció utáni vérzést, szövetnedvkiáramlást és a hegképződést. A szervek felszínén a hialuronsav réteget képezve meggátolja az összenövések kialakulását, ami a normális működés feltétele.

A hialuronsavból és a hialuronsav-származékokból előállított gélek kifejlesztése új lehetőségeknek nyitott utat a vízben nem oldódó, de magas víztartalmú szövetbarát implantátumok orvosi alkalmazásában.²⁵ Ezek a poliszacharid-mátrixok alapot biztosítanak a szövetregeneráció irányítására²⁶, szövetrések kitöltésére.²⁷ Mivel nem váltanak ki immunreakciót a szervezetben, a hialuronsavból készített implantátumokat a szervezet befogadja.²⁸

Kiváló biológiai tulajdonságai miatt a hialuronsav-részecskék, -mikrogélek alkalmasak gyógyszerhatóanyagok célba juttatására.^{29,30} Testfelszínre vagy sebekre, illetve erek mellé helyezve alkalmas a szomszédos szövetekbe és a vérbe gyógyszerek bejuttatására.²⁶

2.1.3. A poli- γ -glutaminsav és jelentősége

2.1.3.1. A poli- γ -glutaminsav

A mikrobiológus Ivánovics György és a szerves kémikus Bruckner Győző 1937-ben publikálták a természetes poliglutaminsav izolálását, amely γ -peptidkötést tartalmazott. Ivánovics és Bruckner virulens lépfenebacilusok tokanyagából, valamint a szerológiailag rokon *Bacillus subtilis* (korábban *Bac. mesentericus*) táptalajából elsőként nyerték ki a kémiailag tiszta poliglutaminsavat, melyről rövidesen

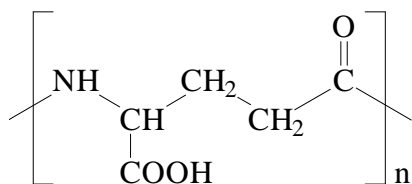
bebizonyosodott, hogy ez a szerológiai rokonságért felelős, félantigén (haptén) sajátosságú anyag.³¹

A vegyület addig ismeretlen, egyedülálló sajátossággal rendelkezett, polipeptidnek bizonyult, noha nem adta a polipeptidekre jellemző biuret-reakciót, viszont sósavas hidrolízissel belőle egyetlen aminosav, a glutaminsav keletkezett, a vegyület tehát ún. monoton polipeptid.

A lépfene-bacillus tokanyagából izolált peptidből (anthrax-polipeptid) nyert glutaminsav D-konfigurációjú volt, tehát ellentétes a fehérjékben található glutaminsavval, míg a táptalajból izolált polimer (subtilis-polipeptid), a D-glutaminsav mellett több-kevesebb L-módosulatot is tartalmaz. A vegyület molekulatömege 7000 körül volt.

A csupa γ -glutamil kötésekkel álló polipeptid minden egysége egy α -karboxil-csoportot, minden α -glutamil kötésű egység pedig egy γ -karboxil csoportot tartalmaz szabadon, reakcióképes állapotban. Ezeket Hofmann- vagy Curtius-lebontást alkalmazva, majd az így átalakított polimert savasan elhidrolizálva minden α -kötésű glutaminsav egységből α,γ -diamino-vajsav, minden γ -kötésűből pedig β -formilpropionsav keletkezik.

A *Bacillus subtilis* kultúrából nyert poliglutaminsav (3. ábra) teljes hidrolízise során³², a hidrolizátumból csak a γ -glutamil kötésre jellemző β -formil-propionsavat tudták izolálni, az esetleges α -glutamil kötésekkel képződő α,γ -diamino-vajsavat azonban még kimutatni sem sikerült.



3. ábra

A poli- γ -glutaminsav szerkezeti egysége

2.1.3.2. A poli- γ -glutaminsav tulajdonságai

A poli- γ -glutaminsav (PGA) az élő szervezetekre, valamint a környezetre nézve nem mérgező anyag, biokompatibilis, biodegradábilis polipeptid³³, a szervezetben nem vált ki immunreakciót.³⁴ A fehérjékben leggyakrabban előforduló α -amidkötéssel szemben, e polimer láncát γ -kötések adják, amely a biokompatibilitás megtartásával viszonylag lassú lebonthatóságot kölcsönöz a molekulának.

Bakteriális fermentációval nagy mennyiségben előállítható.^{35,36,37} Molekulatömege 10 kDa és 1000 kDa között változik. A PGA rendkívül hidrophil, anionos jellegű biopolimer. Molekulatömegétől függetlenül vízben széles pH-tartományban jól oldódik.

2.1.3.3. A poli- γ -glutaminsav jelentősége

Kedvező tulajdonságai miatt, intenzív kutatások folynak a PGA alkalmazhatósági lehetőségeinek feltárására. A PGA-t széles körben alkalmazzák az ipar számos területén, az élelmiszeripartól a kozmetikai ágazatig, a gyógyásztól a víztisztításig.³⁸

Az élelmiszeriparban elsősorban gyümölcslevek sűrűsítő anyagaként használják, de péksüteményekben és tésztákban szerkezetjavító adalékanyagként van jelen.

Jó fémmegkötő és flokkuláló tulajdonsága miatt víztisztításra is használható.³⁹ Számos közlemény számol be a PGA, valamint származékai fémmegkötő tulajdonságáról, adszorpciós kapacitásáról, szelektivitásáról.^{40,41}

A PGA-t és hidrogéljeit kiváló vízmegkötő tulajdonsága miatt elterjedten alkalmazzák hidratáló anyagként a kozmetikai iparban. Tömegének több százszorosát képes megkötni vízből. Alkalmos lehet a sejtek dehidratációjának meggátolására, funkcionálizálhat extracelluláris vízközvetítő anyagként.

A PGA biopolimert, és származékait kiváló biológiai tulajdonságai miatt, széles körben használja a gyógyszer technológia⁴² és az orvosbiológia⁴³. Mikro- és nanorészecskék kifejlesztésével, alkalmas gyógyszerhatóanyagok szabályozott kibocsátására, valamint célbajuttatására.^{44,45} Térhálós hidrogéljei nagy hatékonysággal alkalmazhatók szövetregenerálásra, implantátumok készítésére.^{46,47}

2.2. Biopolimerek módosításai

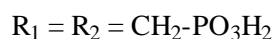
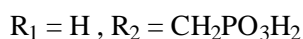
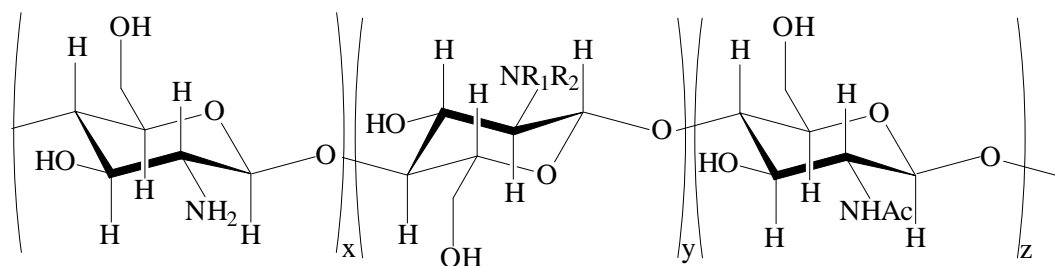
2.2.1. A kitozán módosítása, térhálósítása

A kitozán módosításával a szakirodalomban számos közlemény foglalkozik. A módosítás eredményezheti új oldalláncok kapcsolását, térhálós rendszerek létrejöttét, ionos vagy kovalens kötés kialakításával.

2.2.1.1. Kitozán oldhatóságának növelése

A kitozán alkalmazhatóságának határt szab rossz oldhatósága. Számos kutatás tűzte ki célul a kitozán oldhatóságának javítását. A kitozán lineáris láncához, általában a reaktív aminocsoportokon keresztül, oldalláncokat kapcsolnak, elősegítve a kitozán jobb szolvatációját pl. hidroxil-,⁴⁸ foszfát-,^{49,50,51} vagy szulfátvegyületekkel⁵².

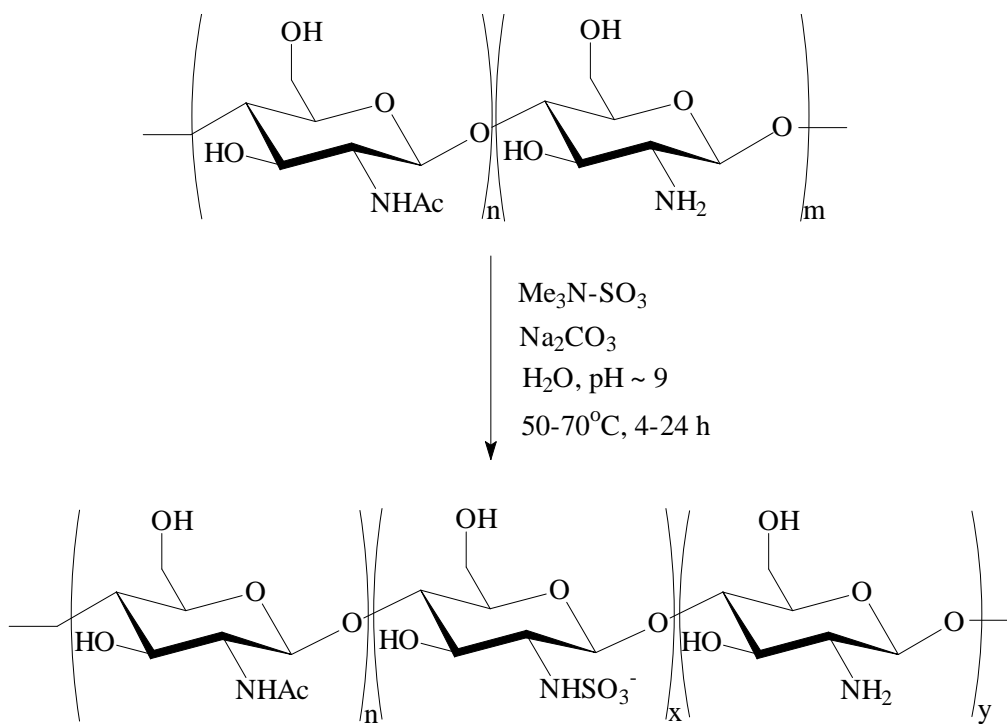
Foszfát tartalmú oldallánc kapcsolásával több közlemény is foglalkozik.⁴⁹⁻⁵¹ Egylépéses eljárásban, magas hőmérsékleten, formaldehid jelenlétében foszforsavval reagáltatva, a kitozán aminocsoportjának hidrogénjeit $-\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ -csoportokra cserélték le (4. ábra). Az átalakulás mértéke nem függ sem a kitozán molekulatömegétől, sem a dezacilezettségétől, csak a reakcióidőtől. Az oldhatósági vizsgálatok alátámasztják a módosítás eredményességét, ugyanis a foszfáttal módosított kitozán vízben és enyhén lúgos közegben oldhatóvá válik, valamint kis viszkozitású gélt képez etanolban, acetonban.



4. ábra

Foszfáttal módosított kitozán kémiai szerkezete

A trimetil-amin – kén-trioxid szelektíven N-szulfonálja az amino-alkoholokat.⁵² Ezen ismeretre alapozva végezték el a kitozán módosítását. A N-atomon keresztül szulfát-tartalmú oldalláncot kapcsoltak a lineáris poliszacharid lánchoz (5. ábra). A reakció kivitelezése lúgos közegben történt, magas hőmérsékleten. A módosított kitozán oldhatósága vízben, valamint enyhén lúgos közegben javult, de savas közegben kevésbé oldódott.



5. ábra

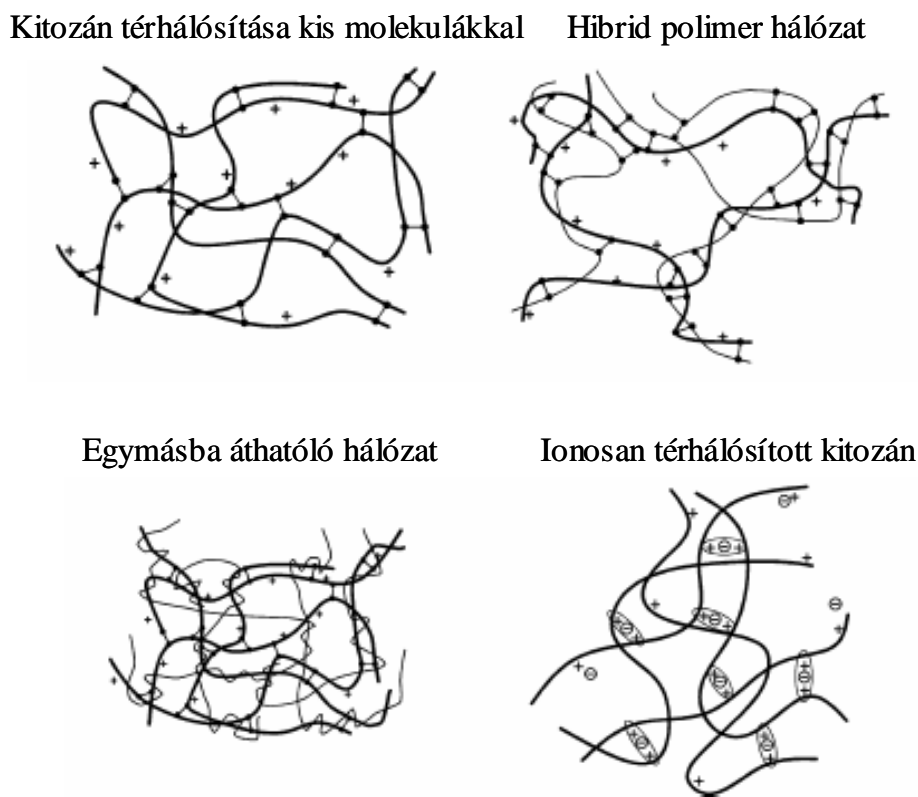
N-szulfonált kitozán előállítása

A kitozán oldhatóságát nagymértékben javíthatjuk polietilén-glikol (PEG) oldallánc kapcsolásával.^{53,54} Aldehid végcsoportú PEG-gel való reakció során a keletkező módosított kitozán jól oldódik savas, semleges, valamint lúgos közegben is. A szakirodalomban fellelhető eredmények szerint az így előállított módosított kitozán oldhatósága a szubsztitúció mértékétől, a kitozán dezacilezettségétől, valamint a PEG molekulatömegétől is függ. Az oldhatósági vizsgálatok kivitelezése különböző pufferoldatokban történt. Kiemelendő, hogy a származék a biológiai rendszerekben elterjedten használt foszfát pufferben (PBS, pH = 7,2) is jól oldódik.

2.2.1.2. Kitozánból előállítható hidrogélek típusai

A kitozán térhálósítására számos módszert fejlesztettek ki, melyek többségében gélek, hidrogélek előállítását tűzték ki célul. Szükséges megkülönböztetni fizikai⁵⁵ és kémiai géleket^{56,57}. A kémiai gélek irreverzibilis kovalens kötések eredményeként jönnek létre, míg a különböző reverzibilis kötések, pl. ionos kölcsönhatás, másodlagos kötések, fizikai hidrogélek kialakulásához vezetnek.

A térhálós hidrogélekben intermolekulás kölcsönhatás alakul ki a polimer lánc és a térhálósító között, ezáltal létrehozva egy háromdimenziós struktúrát.



6. ábra

Kitozánból előállítható hidrogélek szerkezeteinek vázlatos rajza

(\longleftrightarrow kovalens térhálósító; + a kitozán pozitív töltése, --- kitozán; --- másik polimer;
 \ominus töltéssel rendelkező ionos térhálósító; \circ ionos kölcsönhatás)

A kovalensen térhálósított kitozán hidrogélek három csoportját különböztetjük meg: a kitozán térhálósítása kis molekulákkal, hibrid polimer hálózat (hybrid polymer

network), valamint egymásba áthatoló polimer hálózat (semi-interpenetrating polymer network) kialakítása.(6. ábra)

A legegyszerűbb struktúrát a kitozán kis molekulákkal való térhálósítása eredményezi.^{56,57} Ebben az esetben a kovalens keresztkötések kialakítását valamely kis molekulájú térhálósítóval hajtjuk végre. A térhálósítás történhet intramolekulárisan, ugyanazon kitozánmolekula szegmensei között, vagy intermolekulárisan, különböző kitozánláncok között.

A hibrid polimer hálózat kialakítása során a kovalens keresztkötés általában a kitozán és valamely más polimer lánc szegmensei között alakul ki, de a láncon belüli kötések jelenléte sem zárható ki.⁵⁸

Az egymásba áthatoló polimer hálózat kialakításához a térhálósítás előtt egy nem-reaktív polimert adnak a kitozánhoz, amely polimer-polimer kölcsönhatás révén kerül kölcsönhatásba poliszacharid láncsal. Ezt követően a kitozán kovalens térhálósításával alakítják ki a végleges térhálós szerkezetet.⁵⁹

Mindhárom típus esetén a kovalens kötés játssza a döntő szerepet a hidrogél kialakításában, de a másodlagos kölcsönhatások szerepe sem elhanyagolható.

A kitozán polikation, anionokkal, polianionokkal ionos kötést létesít. Az anionos jellegű, negatívan töltött térhálósító, illetve polimer és a kitozán makromolekula pozitív töltésű funkciós csoportjai között alakul ki az ionos kölcsönhatás, ami térhálós rendszer létrejöttét eredményezi.

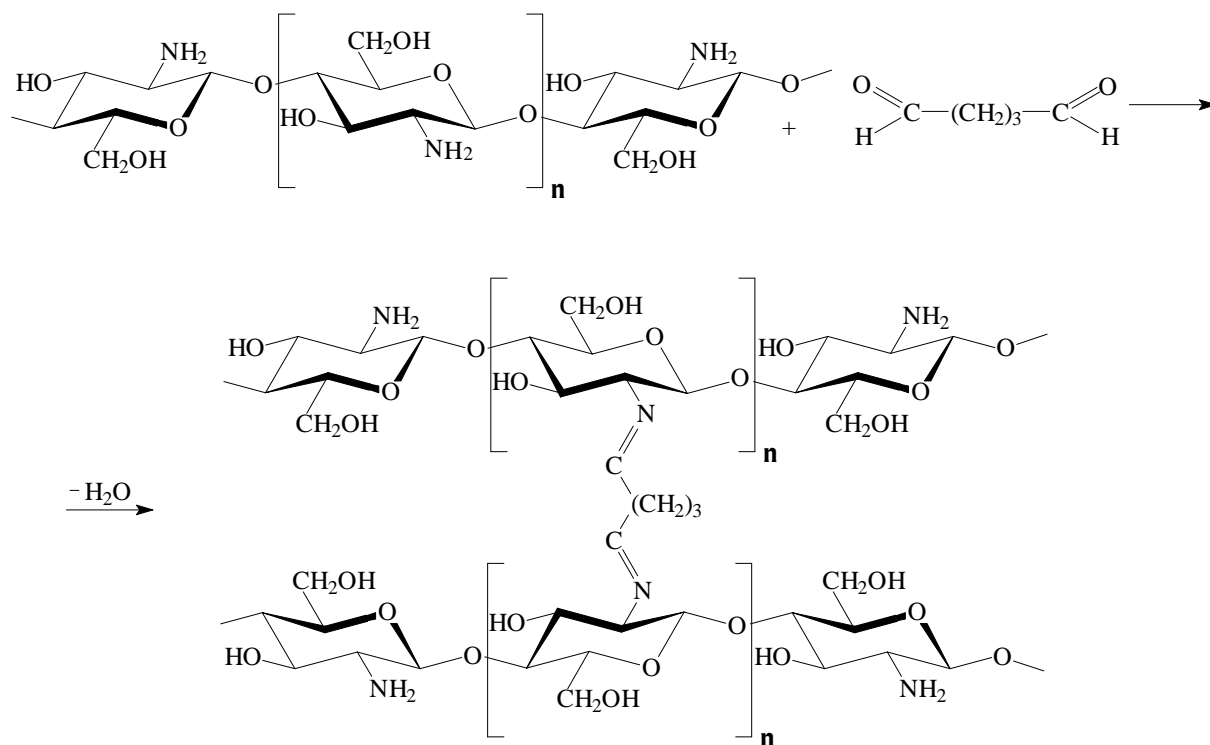
2.2.1.3. Hidrogélek előállítása a kitozán kis molekulákkal történő térhálósításával

A szakirodalomban számos közlemény jelent meg kitozán térhálósítása tárgyában. A legalább két reaktív funkciós csoportot tartalmazó kismolekulák hidat képeznek a polimerlánc funkciós csoportjai között, ezáltal keresztkötést hozva létre.

A leggyakrabban alkalmazott térhálósítók az aldehidek⁵⁶, cianátok⁵⁷, epoxidok⁶⁰, de számos más vegyület^{61,62} is alkalmas a kitozán térhálósítására.

A legelterjedtebb térhálósító komponens a pentán-1,5-dial (glutáraldehid).(7. ábra) A térhálósítási reakció emulziós közegben történik⁹, a kitozán és a térhálósító összekeverésével. A térhálósítási reakciókat, a reakciókörülmények hatását, azok

optimalizálását a glutáraldehiddel térhálósított kitozán esetében tanulmányozták a legszélesebb körben.



7. ábra

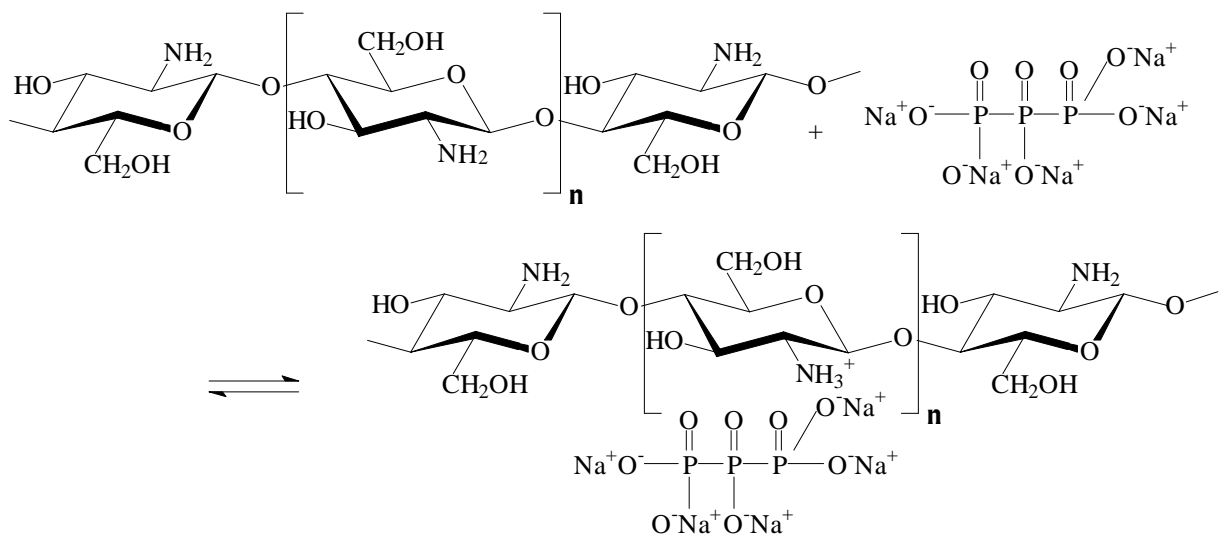
Kitozán térhálósítása glutáraldehiddel

Mi és munkatársai vizsgálták a kitozán gélesedésének kinetikáját, a lánc-relaxációt, valamint ezek hatását a mikrorészecskék keletkezésére és a gyógyszerhatóanyag-kibocsátási tulajdonságaira.⁶³ Megállapították, hogy a kitozán molekulatömege, koncentrációja, valamint a térhálósítás hőmérséklete mellett a kis molekulájú térhálósító koncentrációja döntő mértékben befolyásolja a gélképződést. Kioldódás-vizsgálatokkal támasztották alá azon kijelentésüket, hogy a térhálós kitozán mikrogélek térhálósági fokának növelésével csökken a duzzadóképeség, s ezzel együtt a mikrogél gyógyszerhatóanyag-kibocsátási sebessége. Ez lehetővé teszi olyan térhálós kitozán rendszerek kifejlesztését, amelyek alkalmasak lehetnek gyógyszerhatóanyag szabályozott kibocsátására.

2.2.1.4. Módszerek térhálós kitozán (részecskék) előállítására

Kitozán részecskék előállítására számos módszer áll rendelkezésre. A szakirodalomban nagyszámú publikáció részletezi és foglalja össze a módszerek alkalmazhatóságát, előnyeit, hátrányait.⁶⁴

Az ionos gélképződés (ionotropic gelation) a kitozán aminocsoportjai, valamint különböző anionok között létrejövő ionos kölcsönhatáson alapszik. Megkülönböztetünk kis molekulatömegű, hidrofób jellegű, valamint nagy molekulatömegű térhálósító anionokat. A legjelentősebb a tripolifoszfáttal (TPP) történő térhálós kitozán részecske előállítása.^{14,65,66} (8. ábra) A folyamat során a kitozán savas oldatát a TPP-oldatba csepegtetik, majd a keletkező gélcseppeket szűréssel távolítják el. A módszer egyszerűen kivitelezhető, nagyobb méretű részecskék keletkezését eredményezi. Mikroszkópos felvételek bizonyítják, hogy a térhálós kitozán részecskék mérete néhány 100 µm-től 1-2 mm-ig terjedhet.



8. ábra

Kitozán térhálósítása TPP-tal

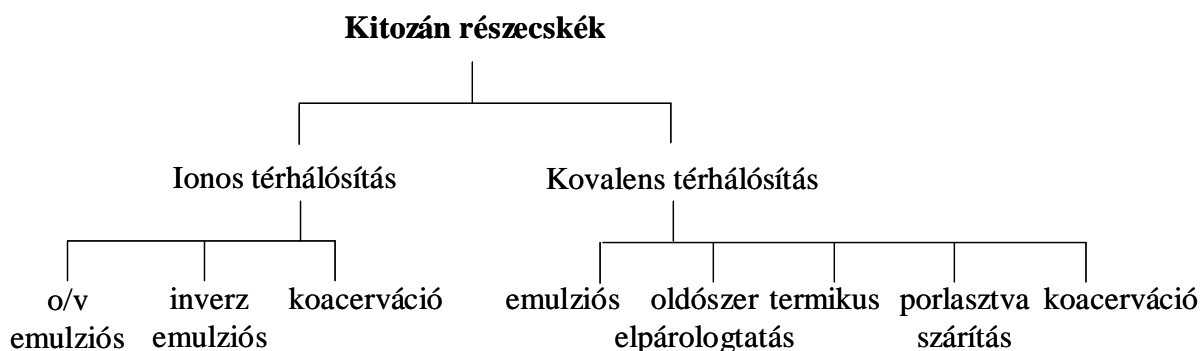
Az ionos gélképződést gyakran v/o emulzióban hajtják végre.^{67,68} A módszer előnye, hogy a részecskeméret kontrollálható az emulziós cseppek méretével. Ezen módszerrel előállított részecskék mérete néhány mikrométer. A részecskék méreteloszlása széles, de szűkebb az eredeti ionos gélképződési módszerrel előállított részecskékhez képest.

Kisméretű, szűk méreteloszlású kitozán nanorészecskéket fordított micelláris közegben állítanak elő.^{9,69} Az inverz emulzió termodinamikailag instabilis rendszer; további hátránya, hogy tartalmaz vizes, valamint szerves fázist és tenzidet is.

Az ionos gélképződés másik típusa a koacerváció.⁷⁰ A módszer lehetővé teszi szerves oldószerek használatát is. Általában vízben rosszul oldódó kitozán származékot állítanak elő ezen módszerrel, és nátrium-szulfát adagolásával segítik elő a kitozán származék kicsapódását.

A kovalens kötéssel térhálósított kitozán nanorészecskék előállítására is számos módszer közül választhatunk. Az ionos gélképződés során említett módszerek mindegyike alkalmazható kovalensen térhálósított kitozán részecskék előállítására is. Egyszerű emulzióban könnyen kivitelezhető a vízben nem, vagy rosszul oldódó térhálósító adagolása.⁷¹ Komplex emulzióban, egy lépésben megvalósítható a hidrofób jellegű hatóanyag bejuttatása a térhálósodó kitozánrészecskébe. A kicsapódáson alapuló koacervációs módszert elterjedten használják kovalensen térhálósított részecskék előállítására.⁷²

Kovalens térhálósítás kivitelezésére számos, eddig nem említett módszer található a szakirodalomban. (9. ábra) A hőmérséklet hatására történő termikus térhálósítás egyszerű módszer, de magas hőmérséklet szükséges a folyamat végrehajtásához.⁷³ Micelláris közegben, általában o/v emulzióban történő térhálósítás után az oldószert gyakran elpárologtatják magas hőmérsékleten. A porlasztva szárítás elterjedt módszer a térhálós kitozán részecskék előállítására.⁷⁴ Az eljárás során porlasztás, szárítás, valamint térhálósítás történik. A részfolyamatok felcserélhetők. A szakirodalomban olvashatók olyan közlemények, amelyekben a kitozánoldatot porlasztják, szárítják, ezt követően hozzáadagolják a térhálósítót, de fellelhetők olyanok is, amelyekben a térhálós kitozán részecskéket tartalmazó oldatot vagy emulziót porlasztják.⁷⁵ Ezen módszerrel néhány mikrométer átmérőjű térhálós részecskék állíthatók elő.



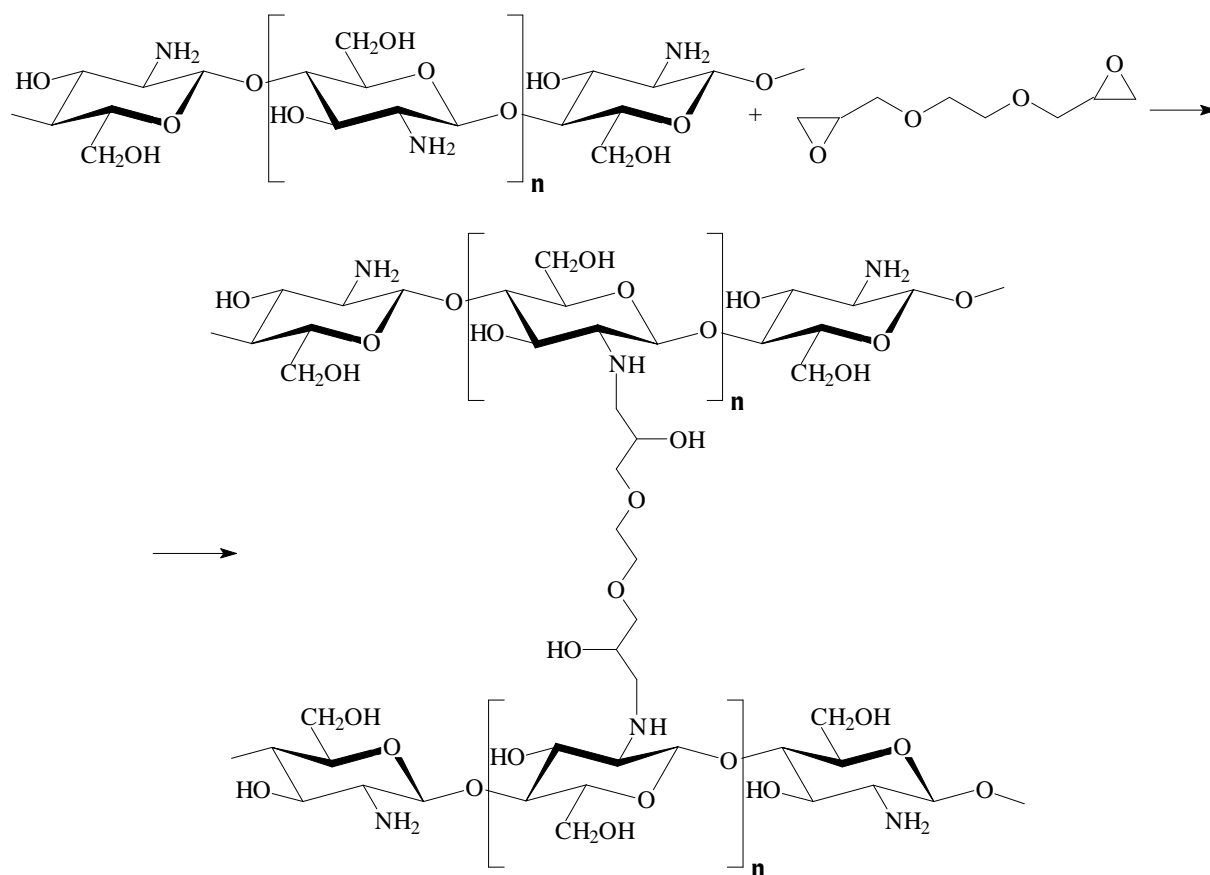
9. ábra

Térhálós kitozán részecskék előállításának lehetséges módszerei

2.2.1.5. Részecskék előállítása a kitozán térhálósításával

A szakirodalomban több átfogó közlemény jelent meg, összefoglalva a kitozánból előállítható nanorészecskékkel kapcsolatos ismereteket. Különböző módszerekkel, kovalens vagy ionos módosítással, koloid részecskék állíthatók elő kitozánból.⁶³⁻⁶⁶ A térhálós részecskék szerepe szállítóeszközként (delivery system) jelentős. Alkalmas nyálkahártyán keresztül, gyomorban, ill. vastagbélben felszívódó hatóanyagok, makromolekulák, pl. proteinek, peptidek, valamint géntovábbításra, oligonukleotidok szállítására.⁸

Térhálós kitozánrészecskék előállítása általában egyszerű, egylépéses reakciókban történik. A leggyakrabban tripolifoszfáttal (TPP)^{14,65,66}, vagy glutáraldehiddel^{69,71} történik a térhálósítás. A TPP-tal történő ionos gélképződés az oldatok összekeverésével megtörténik. Egyszerű, tiszta, gyors módszer, ionosan térhálósított részecskéket eredményez. A glutáraldehiddel történő térhálósítás sem igényel vízelvonószert, de a reakció emulzióban, ill. fordított micelláris (reverse micellar) közegben megy végbe, nanoméretű térhálós részecskéket eredményezve. Ismert olyan térhálósítási folyamat is, amelyben a kitozánt glutáraldehiddel^{69,71}, epiklorohidrinrel⁷⁶, ill. etilén-glikol-diglicidil éterrel⁷⁷ térhálósítják (10. ábra), a kitozán egyszerű szuszpendálásával, magasabb hőmérsékleten. A folyamat jellegéből adódóan nagyméretű részecskéket, mikrogéleket eredményez.



10. ábra

Kitozán térhálósítása etilén-glikol-diglicidil éterrel

A térhálós kitozán nanorészecskék előállítása, fejlesztése biológiai alkalmazásuk miatt fontos. A nanorészecskék alkalmasak hatóanyagok kapszulázására, annak szabályozott kibocsátására. A tulajdonságaik vizsgálata mellett számos kutatás térképezi fel és igazolja a kitozán nanorészecskék hatékonyságát pl. doxorubicin ⁹, ammónium-glicirrhizinát ⁷⁸, vagy marha serum albumin ⁷⁹ szállítása céljából.

2.2.2. A hialuronsav térhálósítása

A hialuronsav térhálósításával számos közlemény foglalkozik. A módosítás eredményezheti hidrogélek ^{26,80,81}, filmek ^{82,83}, illetve mikro-⁷⁵ vagy nanorészecskék ⁸⁴ létrejöttét ionos vagy kovalens kötés kialakításával.

2.2.2.1. Hidrogélek előállítása a hialuronsav térhálósításával

Széleskörű kutatások folynak a hialuronsav-alapú hidrogélek előállítására és vizsgálatára. Hidrogélek állíthatók elő hialuronsavból fizikai⁸⁵ vagy kémiai^{86,87} térhálósítással: két vagy többfunkciós térhálósítók alkalmazásával; illetve más makromolekulákkal való kölcsönhatás révén: egymásba áthatoló térhálók (interpenetrating network) létrejöttével.

Kovalens kötéssel térhálósított hidrogélek előállítása során a leggyakrabban alkalmazott térhálósítók az aldehidek⁸³, tiolok⁸⁰, hidrazidok⁸⁶, illetve epoxidok⁸⁷. A térhálósítási reakciók egyszerűen kivitelezhetők, a vizes közegben vagy emulzióban végrehajtott reakciók után a hidrogél centrifugálással, vagy szűréssel elválasztható a reakcióelegytől.

A hialuronsav-alapú hidrogélek kifejlesztésének hajtóereje a biológiai alkalmazás, azon belül a szövetregenerálás céljára történő felhasználás. Az alkalmazhatóság egyszerűsítése érdekében *in situ*-⁸⁸, illetve fotopolimerizálható rendszereket^{26,89,90} fejlesztenek ki. Ezek a rendszerek a hialuronsav, és valamely fotopolimerizáció szempontjából aktív csoportokkal rendelkező makromolekula – általában akrilát – egymásba áthatoló hálózata. A kovalens térhálósítást kék fényel történő megvilágítással hajtják végre.

Az akrilátok és más kis molekulájú térhálósítók esetében a maradék monomerek toxikus jellege gátolja a hidrogélek biológiai felhasználását. Ezen akadály elkerülése végett egyre több olyan polimer-hálózatot fejlesztenek ki, amelyben a hialuronsav biokompatibilis makromolekulákkal, pl. cellulózzal⁹¹, kollagénnel⁹², vagy zselatinnal⁹³ képez hálózatot hidrogélt eredményezve. A hidrogéleket felépítő makromolekulákat ionos kölcsönhatás, illetve kovalens kémiai kötés tartja össze.

A kollagén és a hialuronsav közötti térhálósítást eredményező kovalens kötés kialakítását vízben jól oldódó karbodiimiddel hajtották végre.⁹⁴ A hialuronsav vizes oldatában diszpergált kollagént lefagyasztották, majd az így nyert porózus membránt a karbodiimid etanolos oldatába merítették. A karbodiimid vízelvonással, amid- és észterkötés kialakításával kapcsolja össze a két makromolekulát funkciós csoportjaikon keresztül.

2.2.2.2. Részecskék előállítása a hialuronsav térhálósításával

Kiváló tulajdonságai és biológiai hatása miatt a hialuronsavra irányuló kutatások elsősorban szövetregenerálásra alkalmas hidrogélek⁹³, valamint filmek⁸³, membránok⁹⁵ kifejlesztését tűzték ki célul.

A szakirodalomban csak néhány közlemény mutat be hialuronsavból előállított részecskéket. A mikrorészecskék kialakítása emulziós közegben történik^{75,85}, általában v/o típusú emulzióban, mivel a cseppek mérete határt szab a keletkező részecskék méretének. A hialuronsav, valamint az egyéb szükséges anyagok vizes oldatát valamilyen hidrofób fázisban diszpergálják, felületaktív anyagokat használva az emulzió stabilizálására.

Emulzióban oldószer elpárologtatás, porlasztva szárítás, valamint koacervációs módszerekkel⁷⁵ is előállíthatók hialuronsavrészecskék.⁹⁶

Kitozán és hialuronsav ionos kölcsönhatásán alapulva részecskéket állítottak elő koacervátumok képzésével. A hialuronsav erősen lúgos kémhatású (pH = 13,35) oldatába csepegtették a kitozán oldatot. A módszer kivitelezéséből adódóan a részecskék mérete nagy, 590 – 1550 µm között változott, valamint mag-héj szerkezet jött létre.⁹⁷

Emulzióból, oldószer elpárologtatással 20-30 µm-es részecskéket állítottak elő, melyeket a kitozán hidroglutamát és a hialuronsav közötti ionos kölcsönhatás tart össze. A rendszer kialakítása azért jelentős, mert alkalmazásával a részecskékhez kötött gentamicin, mint gyógyszerhatóanyag hatékonysága megnövelhető. A gentamicin biológiai hozzáférhetősége 10-15-szörösére nőtt, amennyiben a kifejlesztett mikrorészecskékhez kapcsolták.⁹⁸

Kis molekulával, adipinsav-dihidraziddal térhálósított, 5-20 µm átmérőjű hialuronsav mikrorészecskék is előállíthatók v/o típusú emulzióban. A vizes közegben végrehajtott térhálósítást vízoldható karbodiimiddal hajtották végre, a részecskék méretét az emulziós cseppek méretével befolyásolták. A hialuronsav térhálósításával DNS szállítására alkalmas mikrorészecskéket állítottak elő. In vitro és in vivo kísérletekkel igazolták, hogy kb. 2 hónapig folyamatos a DNS kioldódása.⁸⁴

2.3. Biopolimerek önrendeződése

2.3.1. Polielektrolitok önrendeződése

Vizes közegben a funkciós csoporttal (pl. $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$) rendelkező hidrofil polimerek, makromolekulák polielektrolitként viselkednek. Funkciós csoportjaik minőségétől, számarányától, ill. a közeg kémhatásától függően lehetnek polianionok, polikationok, esetleg amfolit vagy töltés nélküli makromolekulák. Az ellentétes töltésű funkciós csoportok közötti vonzó kölcsönhatás következtében a polimerek önrendeződnek, melynek eredményeként stabilis kolloid rendszerek keletkeznek.

A polielektrolitok önrendeződésével előállítható rendszerek számos új lehetőséget rejtenek különböző biológiai eszközök kifejlesztésére ^{42,46,99,102}. Az önrendeződés folyamatának tanulmányozása, a létrejövő rendszerek vizsgálata és alkalmazhatósága új távlatokat nyit meg a kolloidkémia területén. A polielektrolitok önrendeződése rendkívül érzékeny rendszereket eredményez. Természetesnek tűnik, hogy a polielektrolitok minősége, töltéssűrűsége, molekulatömege, valamint az önrendeződő polielektrolitok aránya és koncentrációja hatással van a kialakuló rendszer szerkezetére, részecskeméretére, stabilitására. Mindemellett a közeg pH-ja, az összeöntés sorrendje, valamint a keverés és az adagolás sebessége is befolyásolja a keletkező rendszert.

A polielektrolitok elektrosztatikus kölcsönhatásán alapuló önrendeződése különböző kolloid rendszerek létrejöttét eredményezheti: filmek ⁹⁹, hidrogélek ⁵⁵, ill. kolloid diszperz rendszerek ⁹⁷ keletkezhetnek. A biológiai felhasználást részesítve előnyben a filmek főként membránként ⁹⁵ hasznosulnak, míg a hidrogélek szerepe elsősorban szövetregenerálásban ²⁵ jelentős.

A polielektrolitok önrendeződésével létrejövő kolloid diszperz rendszerek nano- vagy mikrorészecskéket tartalmaznak vizes közegben, melyeket polielektrolit komplex néven jegyez a szakirodalom. ^{97,100} A makromolekulák közötti ionos kölcsönhatás tartja össze és stabilizálja a részecskéket.

Polielektrolit komplexeket elsősorban hordozóként, hatóanyagok szállítására fejlesztnek ki. ^{9,43,47,78} Számos újszerű hordozórendszer ismert, melyek alkalmasak

gyógyszerhatóanyagok^{9,78}, proteinek⁴⁷ vagy gének⁴³ szállítására. A koloid mérettartományba eső hordozó-szállító eszközök egyik legfontosabb típusát alkotják a biopolimerekből előállított önrendeződő rendszerek, mert ezen részecskékben a biopolimerek biokompatibilis és biogegradábilis jellege nem módosul, megtartják eredeti tulajdonságaikat, mindemellett stabilis nanorészecskékké formálódnak.

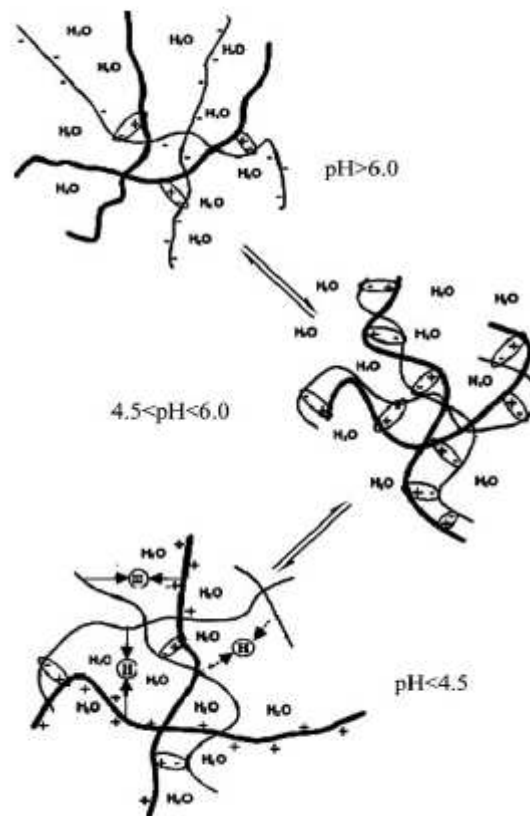
2.3.2. Önrendeződő rendszerek kitozánból

Savas közegben a kitozán polikationként viselkedő poliszacharid, a szakirodalomban számos önrendeződési folyamatáról számolnak be.

A kitozán és a hialuronsav önrendeződésével⁹⁷ keletkező 0,6-1,2 μm átmérőjű részecskék széles pH tartományban stabilisak, a hialuronsav hidratációja elősegíti a kitozán oldódását lúgos közegben. A duzzadási tulajdonságok vizsgálatával alapozzák meg, valamint előzetes kioldódás vizsgálatokkal támasztják alá a rendszer gyógyszerhatóanyag szállító és -kibocsátóként való felhasználhatóságát.

Számos kutatás alapoz a kitozán és különböző DNS molekulák önrendeződésére.¹² A létrejövő polielektrolit komplex vizsgálata során megállapítást nyert¹⁰¹, hogy a DNS és a kitozán közötti kölcsönhatás erőssége pH-függő: lúgos közegben gyenge kapcsolat alakul ki a makromolekulák között, míg savas közegben a DNS erősen kötődik a pozitív töltésű kitozánhoz. Ez az erős kölcsönhatás bizonyos mértékig meggátolja a génexpressziót a sejtmagban. Kimutatták azt is, hogy a töltésviszonyok határozzák meg döntő mértékben a komplex morfológiáját, bár a létrejövő rendszerben a tipikus toroid szerkezet nem lelhető fel, ami feltehetően a polielektrolitok közötti erős kölcsönhatás következménye.

Kitozán és glükomannan önrendeződésével pH-érzékeny polielektrolit gyöngyöket állítottak elő.¹⁰² Kísérletileg igazolták, hogy a pH függvényében a részecskék duzzadása minimumgörbe szerint változik, a minimális duzzadás azon pH érték mellett figyelhető meg, ahol az ellentétes töltésű funkciós csoportok száma megegyezik. Kioldódás-vizsgálatokkal bizonyították a kioldódás sebessége és a duzzadóképeség, s ezáltal a pH közötti kapcsolatot.



11. ábra

Önrendeződő polielektrolitok duzzadásának vázlatos rajza

(— polikation (kitozán); — polianion; ⊕ ionos kölcsönhatás; ⊖^H hidrogén kötés)

Kitozán és poli- γ -glutaminsav (PGA) önrendeződésével kompozit mátrixot alakítottak ki szövetregenerálás céljára.⁹⁶ A keletkező szilárd, porózus mátrix összefüggő pórusrendszerrel rendelkezik, átlagos pórusmérete 30-100 μm között van. Megállapították, hogy a mátrix szerkezetének, mechanikai tulajdonságainak, protein-adszorpciós képességének, és ezáltal citokompatibilitásának kialakításában a PGA mennyisége játszik döntő szerepet. A PGA részarányának növelésével a polielektrolitok közötti hidrogénkötések, valamint egyéb másodrendű kölcsönhatások szerepe megnő, sűrűsödik a mátrix szerkezete, ezáltal nő a szilárdsága. A PGA mennyiségének növelésével a kompozit mátrix proteinmegkötő képessége is növekszik, amely meghatározza a citokompatibilitását is, ami rendkívül fontos a szövetregenerálás céljára történő felhasználás során.

Kitozán és poli- γ -glutaminsav önrendeződésével nanorészecskék is előállíthatók. Lin és mtsai ¹⁰³ ionos gélképződésnek nevezett módszerrel 110-150 nm méretű részecskéket állítottak elő. A polielektrolit-oldatok összeöntésével keletkező részecskéket centrifugálással tisztították. In vivo kísérletekkel mutatták be, hogy a nanorészecskékhez kapcsolt inzulin hatékonyan csökkenti a vér glükóztartalmát, alkalmas orális inzulin-bevitelre. Másik közleményükben ¹⁰⁴ in vitro kísérletekkel támasztották alá azt, hogy ezen nanorészecskék képesek megnyitni a sejtek közötti szoros záró kapcsolatokat (tight junction), ezáltal hatékonyan alkalmazhatók peptidek, proteinek, valamint hidrofil makromolekulák intesztinális szállítására.

2.4. Savamidkötés kialakítása karbodiimiddel

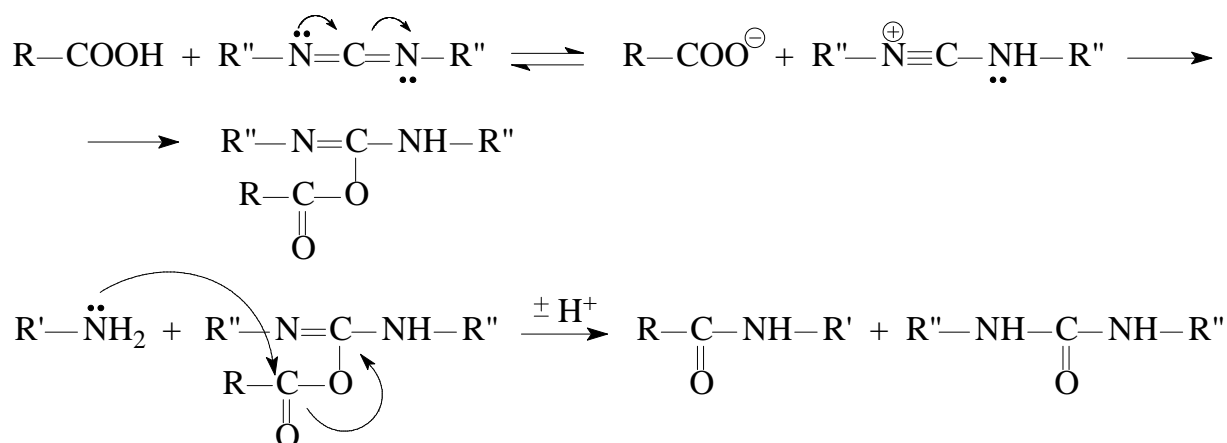
A karbodiimid ($\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$) a ciánamid tautomer alakjából vezethető le. ¹⁰⁵ A peptidszintézis során a karbodiimid N, N'-diszubsztituált származékai játszanak fontos szerepet. Leggyakrabban használt karbodiimid reagensek az N,N'-diciklohexil karbodiimid, N,N'-diizopropil karbodiimid, valamint 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid. Vizes közegben a vízben jól oldódó 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid használatos, amely 4,0-7,0 pH-tartományban alkalmazható.

A peptidkötés kialakításának egy addig új módszerét dolgozta ki Sheehan és Hess 1955-ben: az aminocsoportján védett aminosav és valamely aminosav-észter N,N'-diszubsztituált karbodiimid segítségével összekapcsolhatók, és kondenzációs reakcióban dipeptid keletkezik. (12. ábra) A peptidkötés kialakulása során a kihasadó víz hatására a diszubsztituált karbodiimidből karbamidszármazék képződik. ¹⁰⁶

Sheehan és munkatársai számos karbodiimid-származékkal ki tudták váltani ezt a kondenzációs reakciót, szerves oldószerekben, illetve vizes alkoholban oldódó karbodiimidek felhasználásával.

A reakció mechanizmusát Khorana (1955) derítette fel. ¹⁰⁷ Lényege az, hogy a diszubsztituált karbodiimid egyik N-atomja a karboxilcsoportról ledisszociált protont megköti. A pozitív töltést nyert másik N atom elektronvonzása folytán a szomszédos C-atom elektronsűrűsége lecsökken, ezért a karboxilátanion ide kapcsolódhat. A képződő addíciós köztitermék egy O-acilezett izokarbamidnak, vagy egy aktív függő

csoporttal rendelkező karbonsavészternek tekinthető. E köztitermék karbonilcsoportjának C-atomja kis elektronsűrűsége miatt nukleofil reakciókra érzékeny, így egy aminosavészter aminocsoportjával való reakciója könnyen kiváltható.¹⁰⁸



12. ábra

A karbodiimiddel kiváltott savamidkötés kialakításának reakciómechanizmusa

3. Célküzés

Kutatómunkám során célul tűztem ki nanorészecskék előállítását szabad funkciós csoportokkal rendelkező biopolimerekből.

Kovalens kötéssel (amidkötéssel) térhálósított, nano mérettartományba eső stabilis részecskéket kívántam előállítani a kitozán és a hialuronsav biopolimerekből. Az intramolekuláris térhálósítást vizes közegben, vízoldható karbodiimid felhasználásával terveztem végrehajtani. Célom volt a részecskék szerkezetének, méretének és oldatbeli viselkedésének vizsgálata, valamint a térhálós részecskék tulajdonságait befolyásoló tényezők feltárása.

Kutatómunkám további célja volt a kitozán és a hialuronsav biopolimerek funkciós csoportjai között kialakuló ion-ion kölcsönhatás eredményeként létrejövő önrendeződő nanorészecskék előállítása és vizsgálata. A létrejövő érzékeny rendszer tanulmányozását a kitozán és a poli- γ -glutaminsav biopolimerek önrendeződésének vizsgálatával kívántam kiegészíteni. Célom volt az önrendeződő részecskék méretének, felületi töltésének, oldatbeli viselkedésének feltárása, valamint e tulajdonságokat befolyásoló tényezők felderítése.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok és eszközök

Kitozán: (Sigma-Aldrich) 2%-os ecetsavoldatban oldottuk, szűrtük, desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd a szilárd anyagot liofilizálással nyertük ki. A kitozán határviszkozitását Ostwald-féle viszkoziméterrel határoztuk meg 0,1 M ecetvav/ 0,2 M NaCl oldatban $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A határviszkozitás érték felhasználásával a viszkozitás szerinti átlagos molekulatömeget a Mark-Houwink egyenlet alapján számítottuk, $K = 1,81 \times 10^{-3}\text{ ml/g}$ és $a = 0,93$ koeficiensek felhasználásával.¹⁰⁹ A kitozán viszkozitás szerinti átlagos molekulatömege $M_v = 320\text{ kDa}$.

A kitozán dezacilezettségének mértékét (DD) a kitozán $^1\text{H-NMR}$ spektrumából, a jelek intenzitás értékeiből számítottuk a

$$\text{DD}(\%) = \left(1 - \left(\frac{1}{3} \text{HAc} / \frac{1}{6} \text{H}_2\text{-}6 \right) \right) \times 100$$
 képlet alapján.¹¹⁰¹¹¹ A dezacilezettség mértéke: 88%.

Hialuronsav: (Richter Gedeon Nyrt, analitikai tisztaságú) tisztítás nélkül használtuk fel. A hialuronsav határviszkozitását Ostwald-féle viszkoziméterrel határoztuk meg 0,1 M NaCl oldatban $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A viszkozitás szerinti átlagos molekulatömeget a Mark-Houwink egyenlet alapján számítottuk, $K = 3,36 \times 10^{-2}\text{ ml/g}$ és $a = 0,79$ koeficiensek felhasználásával.¹¹² A hialuronsav viszkozitás szerinti átlagos molekulatömege $M_v = 800\text{ kDa}$.

Poli- γ -glutaminsav: előállítása fermentációval történt glutaminsavból, *Bacillus licheniformis* termelő baktériumok segítségével. Az átlagos molekulatömegének meghatározása vizes méretkizárásos kromatográfiával (SEC), Waters Ultrahydrogel Linear (300 \times 7,8 mm) vizes SEC oszlopon történt. Molekulatömeg kalibrációként lineáris poliakrilsavat, detektálásra UV spektrofotometriát használtunk ($\lambda=210\text{ nm}$). Eluensként 50 mM LiClO_4 + 20 mM LiH_2PO_4 (pH=4,6)-t alkalmaztunk, a mérést $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 0,7 ml/perc áramlási sebesség mellett végeztük. A poli- γ -glutaminsav tömeg szerinti átlagos molekulatömege $M_w = 1\text{ MDa}$.

Borostyánkősav: (Sigma-Aldrich) tisztítás nélkül használtuk fel.

Almasav: (Sigma-Aldrich) tisztítás nélkül használtuk fel.

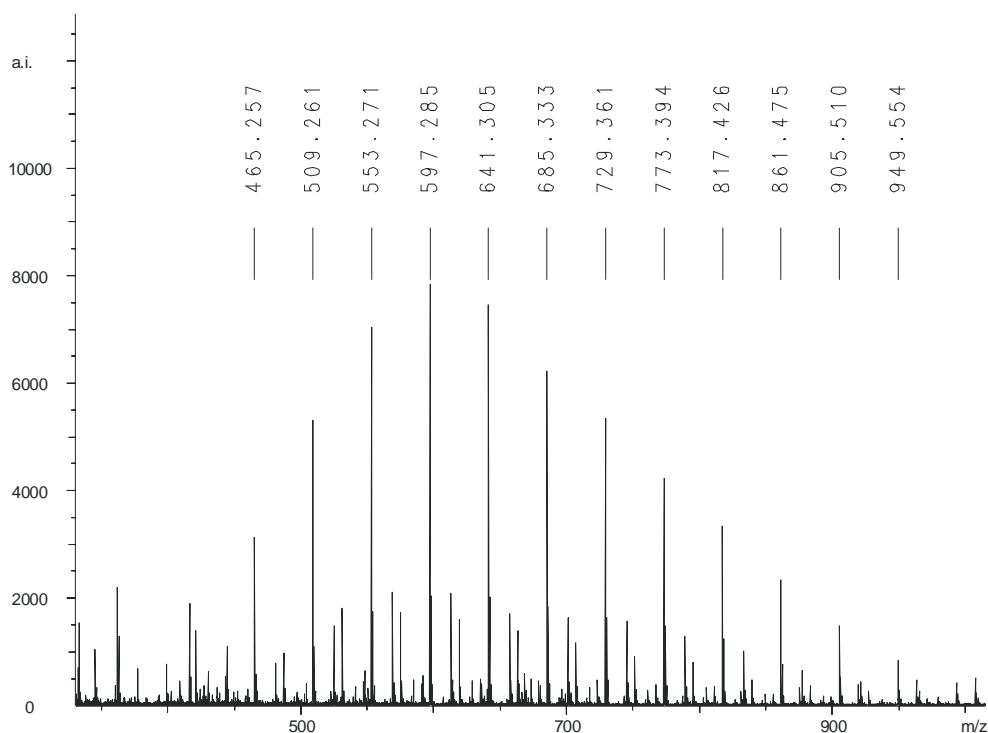
Borkősav: (Sigma-Aldrich) tisztítás nélkül használtuk fel.

Citromsav 1-hidrát: (Sigma-Aldrich) tisztítás nélkül használtuk fel.

1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodid: (Sigma-Aldrich) tisztítás nélkül használtuk fel.

2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin): tisztítás nélkül használtuk fel.

Poli-(etilén glikol)bisz(karboximetil)éter (PEG α,ω -dikarbonsav): (Sigma-Aldrich) tisztítás nélkül használtuk fel. Az alkalmazott térhálósító egy PEG α,ω -dikarbonsav oligomer, amely polimer homológok sorozata. A MALDI tömegspektrumán (13. ábra) a szomszédos csúcsok közötti távolság 44 Da, amely megegyezik a monomeregység (-CH₂CH₂O-) tömegével. A PEG α,ω -dikarbonsav spektrum alapján számított szám szerinti átlagos molekulatömege: $M_n = 600$ g/mol.



13. ábra

A térhálósítóként használt PEG α,ω – dikarbonsav oligomer MALDI-TOF MS spektruma

(A spektrumon megjelenő intenzív sorozatok az $[M+Na]^+$ adduktokhoz tartoznak, mátrixként 2,5-dihydroxi-benzoésavat (DHB) használtunk, a. i.: abszolút intenzitás)

Cellulóz dialízis membrán (Sigma-Aldrich; M_w : 12400)

Heraeus Biofuge 22R hűtőcentrifuga: (Németország)

Bruker BIFLEX IIIITM tömegspektrométerrel (Bruker Daltonik GmbH, Németország)

CHRIST ALPHA 1-2 liofilizáló berendezés (Németország)

Ostwald-féle kapilláris viszkoziméter

4.2. Vizsgálati módszerek

4.2.1. Mágneses magrezonancia spektroszkópia

A poliszacharidok térhálósodásának mértékét, valamint a térháló nanorészecskék szerkezetét ^1H -NMR és ^{13}C -NMR spektroszkópiával vizsgáltuk. Az ^1H -NMR és ^{13}C -NMR spektrumokat Bruker SY 200 (200 MHz) spektrométerrel, valamint Bruker AM 500 (500MHz) spektrométerrel rögzítettük. Az ^1H - ^1H korrelációs (COSY), valamint az ^1H - ^{13}C HETCOR méréseket Bruker AM 500 (500MHz) készüléken végeztük 298 K-en. Az oldószerként deuterált vizet, illetve deuterált sósavat használtunk. A kémiai eltolódás referencia csúcsa a tetrametil-szilán (TMS) jele ($\delta = 0$ ppm) volt.

4.2.2. Fényszórás fotometria

A részecskék hidrodinamikai átmérőjét dinamikus fényszórás fotometriával határoztuk meg. A méréseket Nd:YAG lézerrel felszerelt ($\lambda_0 = 532$ nm) Brookhaven Research BI-200SM fotométerrel végeztük, $T = 25$ °C - on, 90° -os detektorszögénél. A mérési eredményeket NNLS (non negative constrained least squares/legkisebb négyzetek) módszerrel értékeltük ki.

4.2.3. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A száradt, szilárd állapotú részecskék vizuális megjelenítéséhez, valamint azok méretének meghatározásához transzmissziós elektronmikroszkópiát használtunk. A felvételeket JEOL2000 FX-II készüléken készítettük. A mintákat szénréteggel bevont G2400C típusú rézhálóra cseppentettük. A felvételek alapján készült részecskeméret-eloszlásokat SPSS 11.0 programmal értékeltük ki.

4.2.4. Ultraibolya spektroszkópia

A részecskéket tartalmazó vizes kolloid rendszerek transzmittancia értékeit Unicam SP 1800 fotométerrel határoztuk meg $\lambda = 480$ nm, illetve $\lambda = 500$ nm hullámhosszon, optikailag homogén kvarcküvetében.

4.2.5. Elektrokinetikai mérések

Az elektroforetikus mozgékonytságot Brookhaven ZetaPALS zeta potenciálmérő készülékkel végeztük (BME, Fizikai Kémiai Tanszék), AQ-517 típusú mérőcella és Peltier fűtőelem felhasználásával. A nanorészecskék mobilitását 1,0 mM-os KCl inert elektrolit jelenlétében határoztuk meg, a rendszerek előállításához nagytisztaságú MILLIQ vizet használtunk.

4.3. Kísérleti módszerek

4.3.1. Kitozán térhálósítása

A kitozánt dikarbonsavakkal (borostyánkősav, almasav, borkősav, poli-(etilén glikol)bisz (karboximetil)éter), valamint trikarbonsavval (citromsav) térhálósítottuk. A reakciókat vizes közegben végeztük, vízoldató karbodiimid (CDI) reaktáns jelenlétében.

4.3.1.1. Kitozán térhálósítása rövid szénláncú karbonsavakkal

21 mg (0,155 mmol) almasavat bemértünk egy 10 ml-es főzőpohárba, és 4 ml desztillált vizet adtunk hozzá. Az oldat pH-ját 0,1 M NaOH oldattal 6,5-re állítottuk be.

92 mg (0,31 mmol) karbodiimidet bemértünk egy penicillines üvegbe és 1 ml desztillált vizet adtunk hozzá.

A karbonsavoldatot lehűtöttük 4 °C-ra jeges hűtés alkalmazásával, és kevertetés közben lassan hozzásepegtettük a karbodiimid oldatot. A reakcióidő 30 perc, az alkalmazott hőmérséklet 4 °C volt.

Mágneses keverővel ellátott gömblombikba bemértünk 100 mg (0,62 mmol) kitozánt és 90 ml desztillált vizet adtunk hozzá. A poliszacharid oldódását 0,1 M sósav

adagolásával segítették. A feloldódott kitozán savas oldatának pH-ját 6,5-re állítottuk be 0,1 M NaOH oldattal.

A kitozánoldathoz (pH = 6,5) kevertetés közben hozzácepegettük az almasav-karbodiimid reakcióelegyet. A térhálósítási reakció ideje 24 óra, szobahőmérsékleten.

A térhálós részecskéket tartalmazó kolloid rendszert dialízissel tisztítottuk, a szilárd anyag kinyerése liofilizálással történt.

A térhálósítási reakciók kivitelezése a leírt eljárás alapján történt minden rövid szénláncú karbonsav esetében, a különböző térhálósítási arányoknak megfelelően változtatva a bemért karbonsav, illetve karbodiimid mennyiségeket. Az 1. táblázat foglalja össze a szükséges változtatásokat.

1. táblázat

Reakciókörülmények a kitozán térhálósításához

(a bemérendő mennyiségek 100 mg (0,62 mmol) kitozánra számított értékek, t = 24 h)

Karbonsav	Térhálósítás mértéke	Karbonsav mennyisége (mg)	CDI mennyisége (mg)
borostyánkősav	25%	9	46
	50%	18	92
	100%	37	184
almasav	25%	10	46
	50%	21	92
	100%	42	184
borkősav	25%	12	46
	50%	23	92
	100%	47	184
citromsav	25%	16	46
	50%	33	92
	100%	65	184

4.3.1.2. Kitozán térhálósítása poli-(etilén glikol)bisz (karboximetil)éter)-rel

Mágneses keverővel ellátott gömblombikba bemértünk 100 mg (0,62 mmol) kitozánt és 90 ml desztillált vizet adtunk hozzá. A poliszacharid oldódását 0,1 M sósav adagolásával segítették. A feloldódott kitozán savas oldatának pH-ját 6,5-re állítottuk be 0,1 M NaOH-oldattal.

500 mg (0,83 mmol) poli-(etilén glikol)bisz (karboximetil)éter)-t (PEG α,ω -dikarbonsavat) mérőlombikban 100 ml-re hígítottuk, pH-ját 0,1 M NaOH-oldattal 6,5-re állítottuk be.

92 mg (0,31 mmol) karbodiimidet bemértünk egy penicillines üvegbe és 1 ml desztillált vizet adtunk hozzá.

A kitozán oldathoz szobahőmérsékleten hozzácsepegtettünk 18,4 ml (0,16 mmol) PEG α,ω -dikarbonsav oldatot. 30 perc kevertetés után a reakcióelegyet lehűtöttük 4 °C-ra jeges hűtés alkalmazásával, és kevertetés közben lassan hozzácsepegtettük a karbodiimidoldatot. A térhálósítási reakció ideje 24 óra, melynek első 4 órája alatt folyamatosan biztosítottuk a jeges hűtést.

A térhálós részecskéket tartalmazó kolloid rendszert dialízissel tisztítottuk, a szilárd anyag kinyerése liofilizálással történt.

2. táblázat

Reakciókörülmények a kitozán PEG α,ω -dikarbonsavval történő térhálósításához

(t = 24 h)

Kitozán (mg)	Térhálósítás mértéke	PEG α,ω- dikarbonsav mennyisége (ml)	CDI mennyisége (mg)
100	25%	9,2	46
100	50%	18,4	92
100	100%	36,8	184

4.3.2. Kitozán degradációja

Kis molekulatömegű kitozánt oxidatív degradációval állítottunk elő szobahőmérsékleten.

Mágneses keverővel ellátott gömblombikba bemértünk 100 mg (0,62 mmol) kitozánt és 100 ml 1% (m/m) ecetsavoldatot adtunk hozzá. A kitozán teljes feloldódása után az oldathoz 3 ml 0,1 M NaNO₂ oldatot csepegtettünk. A degradációt 1 M NaOH oldat hozzáadásával állítottuk le. A lúgos közegben kicsapódott kitozánt centrifugáltuk, desztillált vízzel mostuk. A szilárd kitozánt liofilizálással nyertük ki.

4.3.3. Hialuronsav degradációja

Kis molekulatömegű hialuronsavat oxidatív degradációval állítottunk elő magas hőmérsékleten.

Mágneses keverővel ellátott gömblombikba bemértünk 1000 mg (2,6 mmol) hialuronsavat és 100 ml desztillált vizet adtunk hozzá. A hialuronsav teljes feloldódása után az oldat pH-ját 2,0 értékre állítottuk be 6,0 M sósavval.

A degradációt mágneses keverővel és visszafolyó hűtővel ellátott duplafalú lombikban hajtottuk végre 70 °C-on. A degradációs reakció ideje 3, 6, és 9 óra volt. A degradált hialuronsavat szobahőmérsékletre hűtöttük jeges hűtés alkalmazásával, pH-ját 6,0-ra állítottuk be 1,0 M NaOH oldattal. A degradációt 4-szeres térfogatú hűtött etanollal állítottuk le. A kicsapott hialuronsavat etanollal mostuk, szárítottuk.

4.3.4. Hialuronsav térhálósítása 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal

A különböző molekulatömegű hialuronsavakat 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal térhálósítottuk. A reakciókat vizes közegben végeztük, vízoldató karbodiimid reaktáns jelenlétében.

Mágneses keverővel ellátott gömblombikba bemértünk 100 mg (0,26 mmol) hialuronsavat és 90 ml desztillált vizet adtunk hozzá. A hialuronsav oldat pH-ját 6,5-re állítottuk be 0,1 M NaOH oldattal.

1,0 ml (6,8 mmol) diamint mérőlombikban 100-szoros térfogatra hígítottuk, a pH-ját 6,5-re állítottuk 0,1 M sósavval.

40 mg (0,13 mmol) karbodiimidet bemértünk egy penicillines üvegbe és 1 ml desztillált vizet adtunk hozzá.

A hialuronsavoldathoz szobahőmérsékleten hozzácsepegtettünk 0,94 ml (0,065 mmol) diaminoldatot. 30 perc kevertetés után a reakcióelegyet lehűtöttük 4 °C-ra jeges hűtés alkalmazásával, és kevertetés közben lassan hozzácsepegtettük a karbodiimidoldatot. A térhálósítási reakció ideje 24 óra, melynek első 4 órája alatt folyamatosan biztosítottuk a jeges hűtést.

A térhálós részecskéket tartalmazó kolloid rendszert dialízissel tisztítottuk, a szilárd anyag kinyerése liofilizálással történt.

3. táblázat

Reakciókörülmények a hialuronsav térhálósításához

(t = 24 h)

Hialuronsav (mg)	Térhálósítás mértéke	Diamin mennyisége (ml)	CDI mennyisége (mg)
100	25%	0,47	20
100	50%	0,94	40
100	100%	1,88	80

4.3.5. Kitozán és hialuronsav önrendeződése

A kitozánt és a hialuronsavat desztillált vízben, szobahőmérsékleten oldottuk fel, az oldatok pH-ját 0,05 M-os HCl oldattal állítottuk be pH=3,0 értékre. A nanorészecskék előállítását az azonos koncentrációjú oldatok összeöntésével történt, szobahőmérsékleten, intenzív kevertetés mellett. Vizsgálataink során változtattuk a biopolimerek arányát és összeöntésének sorrendjét, és tanulmányoztuk a koncentrációfüggést.

A HA-CH 1:2 jelölés jelentése: 1 térfogatrész hialuronsavoldathoz adagoltunk 2 térfogatrész kitozánoldatot. Az önrendeződő nanorészecskék kialakulása a biopolimerek között létrejövő ionos kölcsönhatás következménye.

4.3.6. Kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződése

A poli- γ -glutaminsavat (PGA) és a kitozánt (CH) desztillált vízben, szobahőmérsékleten oldottuk fel, az oldatok pH-ját 0,05 M-os HCl-oldattal állítottuk be pH = 3,0 értékre. A nanorészecskék előállítását az azonos koncentrációjú oldatok összeöntésével történt, szobahőmérsékleten, intenzív kevertetés mellett. Vizsgálataink során változtattuk a biopolimerek arányát és összeöntésének sorrendjét, tanulmányoztuk a koncentráció- és a pH-függést.

A PGA-CH 1:2 jelölés jelentése: 1 térfogatrész PGA-hoz adagoltunk 2 térfogatrész CH-t. Az önrendeződő nanorészecskék kialakulása a biopolimerek között létrejövő ionos kölcsönhatás következménye.

5. Eredmények és értékelésük

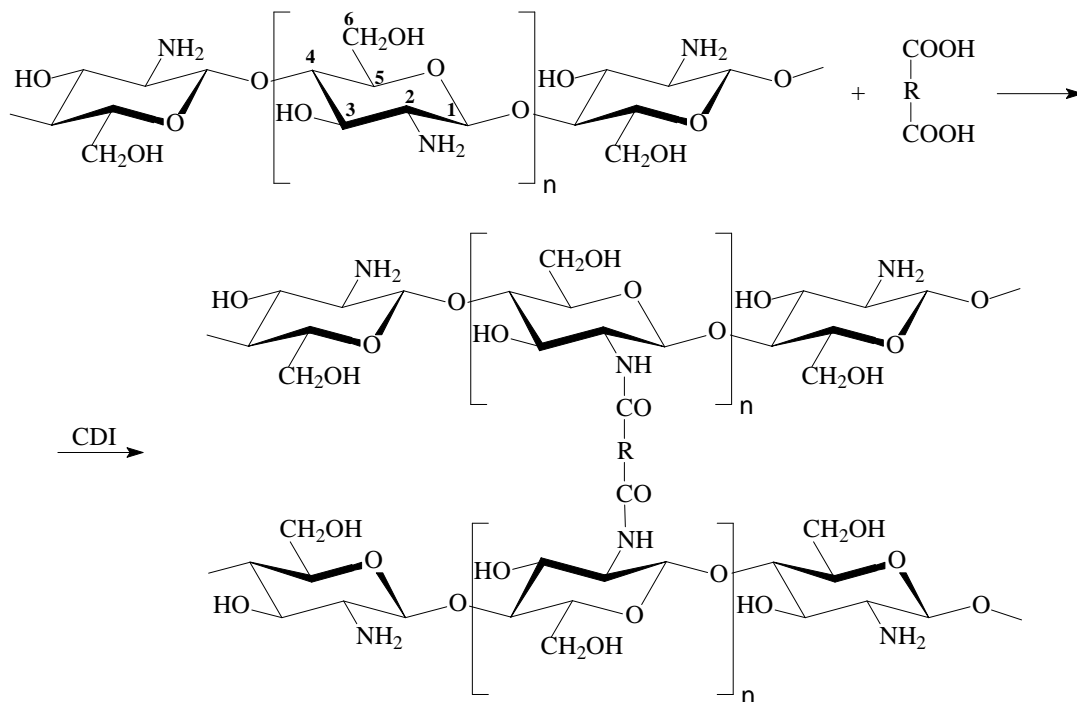
5.1. A kitozán térhálósítása

5.1.1. Kitozán térhálósítása rövid szénláncú dikarbonsavakkal

5.1.1.1. Térhálós kitozán nanorészecskék előállítása

Vizes közegben, vízben oldódó karbodiimid alkalmazásával kondenzációs reakcióban, savamid kötés alakítható ki amino- és karboxilcsoportok összekapcsolásával. A savamidkötés kialakulása során a kihaladó víz hatására a diszubsztituált karbodiimidból karbamidszármazék képződik, amely dialízissel eltávolítható a rendszerből.

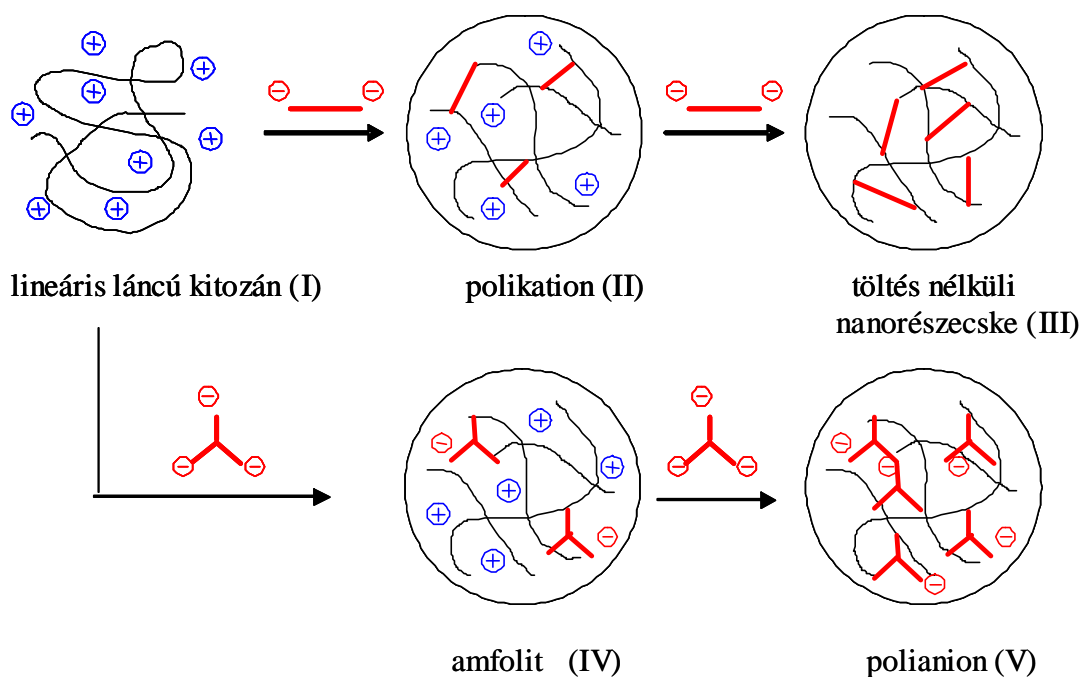
Kutatómunkánkban a kitozán aminocsoportjai és a térhálósító többértékű karbonsavak karboxilcsoportjai között savamid kötet alakítottunk ki a vízben jól oldódó 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodid (CDI) felhasználásával, és ezáltal térhálós kitozán részecskéket állítottunk elő vizes közegben, szobahőmérsékleten.^{113,114} (14. ábra)



14. ábra

A kitozán térhálósításának mechanizmusa

A térhálósítási reakció elviekben eredményezhet (15. ábra) polikationt (II), polianiont (V), poliamfolitot (IV) vagy töltés nélküli térhálós részecskéket (III). A térhálósítás mértékével, az alkalmazott karbonsav értékűségével szabályozhatók a keletkező nanorészecskék töltésviszonyai. A térhálósítás mértékének növelésével a kitozán szabad aminocsoportjainak száma csökken, ami a polikation (II) jelleg megszűnését eredményezheti. Amennyiben a térhálósítás mértéke 100%, töltés nélküli részecskék (III) vagy polianionok (V) is keletkezhetnek, a térhálósító karbonsav értékűségétől függően.



15. ábra

Kitozánból előállítható térhálós polielektrolitok vázlatos rajzai

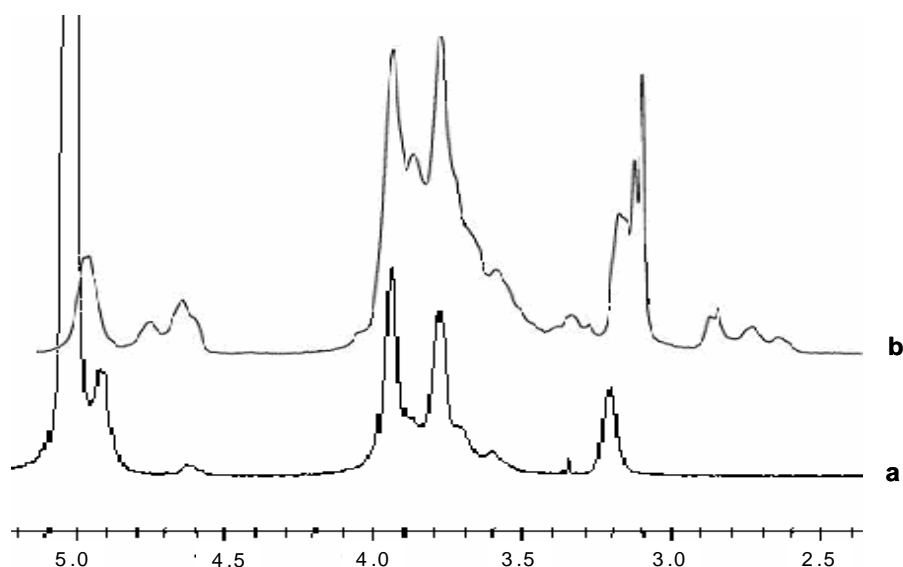
5.1.1.2. A térhálós kitozán szerkezetének vizsgálata

A térhálós kitozán szerkezetének meghatározásához, valamint a térhálósítás mértékének kiszámításához NMR spektroszkópiát használtunk.

A kitozán ^1H és ^{13}C -NMR spektrumában a jelek kémiai eltolódása a következő:

^1H -NMR (DCI/ D_2O): $\delta = 4,9$ (1-H_D dezacilezett), $\delta = 4,7$ (1-H_Ac acilezett), $\delta = 3,2$ (2-H), $\delta = 3,3\text{-}4,2$ (3-H , 4-H , 5-H , 6-H), $\delta = 2,2$ (NCOCH_3).

^{13}C NMR (DCI/ D_2O): $\delta = 96,80$ (1-C_Ac), $\delta = 96,56$ (1-C_D), $\delta = 56,21$ (2-C), $\delta = 70,80$ (3-C), $\delta = 76,11$ (4-C), $\delta = 74,08$ (5-C), $\delta = 60,05$ (6-C).



16. ábra

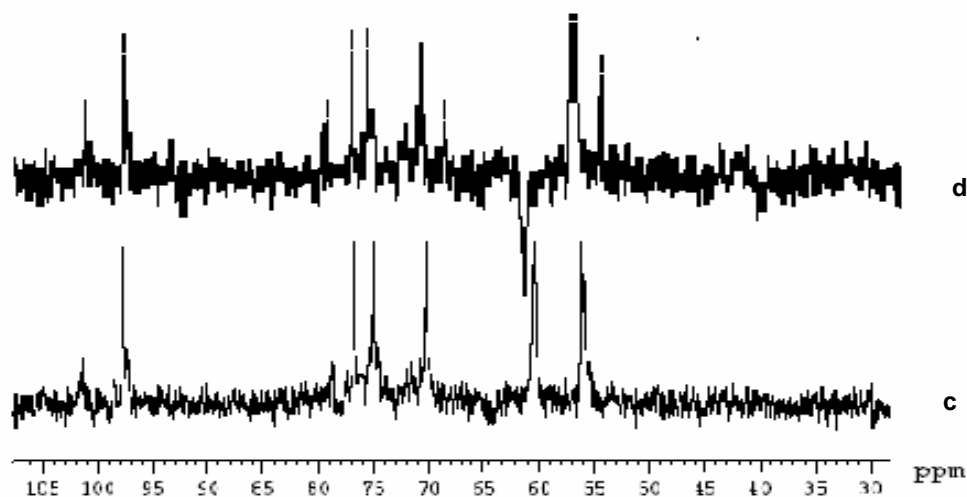
A kitozán (a), valamint almasavval 50%-ban térhálósított kitozán (b) ^1H -NMR spektruma (500 MHz)

(alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)

Az almasavval 50%-ban térhálósított kitozán ^1H NMR és ^{13}C NMR asszignációi a következők:

^1H -NMR ($\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 4,85\text{-}5,00$ (két izomer, 1-H_D), $\delta = 4,70\text{-}4,80$ (1-H_Ac), $\delta = 4,60\text{-}4,65$ és $4,55\text{-}4,65$ (két izomer, 1-H_Ma almasavval módosított), $\delta = 3,75\text{-}3,85$ (2-H_Ma), $\delta = 3,70\text{-}3,75$ (2-H_Ac and 2-H_D), $\delta = 3,6\text{-}4,1$ (3-H , 4-H , 5-H , 6-H), $\delta = 2,1$ (NCOCH_3 nem látható), $\delta = 4,6$ (CH_Ma) és $\delta = 2,9$ (CH_2Ma).

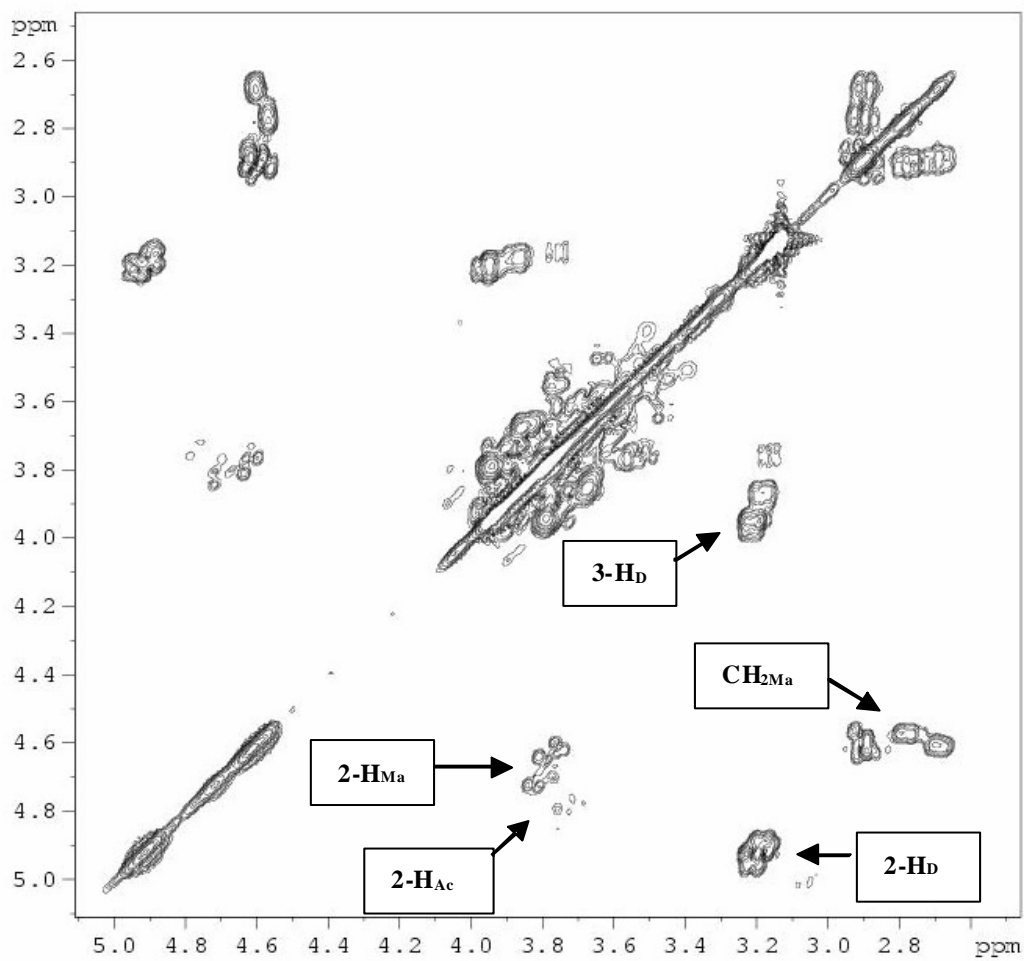
^{13}C -NMR ($\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 97,61$ (1-C_D), $\delta = 101,21$ (1-C_Ac and 1-C_Ma), $\delta = 56,15$ (2-C), $\delta = 70,30$ (3-C), $\delta = 79,03$ (4-C), $\delta = 76,80$ (5-C), $\delta = 60,54$ (6-C), és az almasav jelei: $\delta = 68,50$ (CH_Ma) és $\delta = 39,08$ ($\text{CH}_2\text{-MA}$).



17. ábra

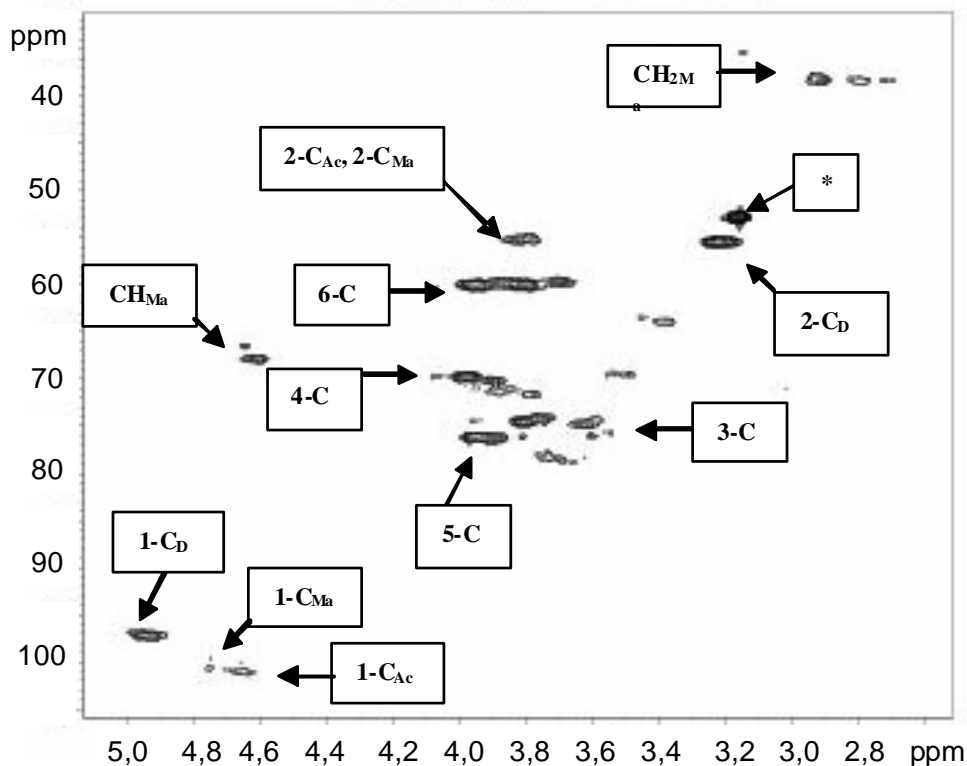
A kitozán (c), valamint almasavval 50%-ban térhálósított kitozán (d) ^{13}C -NMR spektruma (500 MHz)
(alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)

A térhálósított kitozán nanorészecskék szerkezetének részletesebb megismerése érdekében felvettük és azonosítottuk az almasavval 50%-ban térhálósított kitozán ^1H , ^1H - ^1H COSY (18. ábra), valamint a ^{13}C , és ^1H - ^{13}C HETCOR NMR (19. ábra) spektrumokat. A jelek kémiai eltolódása összhangban van a szakirodalomban publikált kitin, kitozán és ezek oligomerjeinek eltolódásával.^{115,116,117}



18. ábra

Almasavval 50%-ban térhálósított kitozán ^1H - ^1H COSY NMR spektruma (500 MHz)
 (alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)



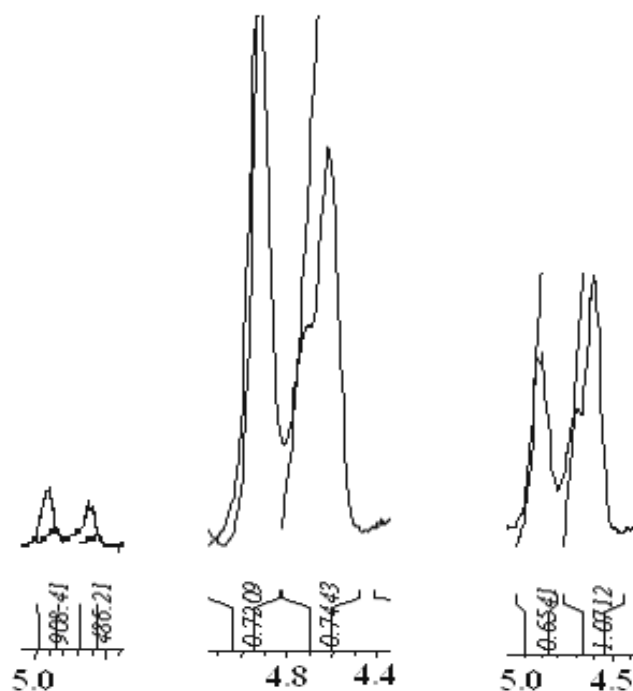
19. ábra

Almasavval 50%-ban térhálósított kitozán ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektruma (500 MHz)
(alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)

A térhálós kitozán nanorészecskék elnevezése és vizsgálata során a sztöchiometriai térhálósítási arányokat használjuk. A valódi térhálósítási arányokat a minták ^1H -NMR spektrumából, a jelek integrál intenzitásainak arányából számítottuk. Az értékek a kitozán 1-H acilezett és dezacilezett protonjai intenzitásának összehasonlításából származnak. (20. ábra)

Az eredmények azt mutatják, hogy 25%-os sztöchiometriai térhálósítás esetén a valódi arány 20-25% között van, 50%-os sztöchiometriai térhálósítás esetén az arány 32-44%, és 100% esetében 45-70% közötti.

Megállapítható, hogy a térhálósítási arány mértékének növekedésével a valódi térhálósítási arány értékek egyre jobban eltérnek a sztöchiometriai értékektől, ami a kitozán poliszacharid láncának konformációjával, valamint a térhálósítóként használt karbonsavak rövid szénláncával magyarázható.



20. ábra

25%-ban, 50%-ban és 100%-ban almasavval térhálósított kitozán $^1\text{H-NMR}$ integráljai

(Alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)

5.1.1.3. A térhálós kitozán részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata

A kitozán, a glükózamin egységek jelenléte miatt vizes közegben gyenge bázisként viselkedik, pK_b értéke 6,2-7,0 között van. Lúgos közegben nem oldódik, semleges közegben rosszul, savas közegben az aminocsoportok protonálódása révén jól oldódik, és polikationná alakul.

A kitozán térhálósításával keletkező nanorészecskék oldhatóságára, duzzadási tulajdonságaira, illetve hidratáltságára következtethetünk a transzmittancia értékekből.

A rövid szénláncú karbonsavakkal térhálósított kitozán részecskék vizes közegben, kisebb-nagyobb mértékben opálos kolloid rendszereket alkotnak, de a térhálósítás mértékének növelésével kicsapódást is megfigyeltünk. (4. táblázat)

4. táblázat

Rövid szénláncú karbonsavakkal térhálósított kitozán nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittancia adatai

(Mérési körülmények: az oldatok koncentrációja $c = 1$ mg/ml kitozánra nézve, $\text{pH} = 6,5$)

Karbonsav	Térhálósítás mértéke	Oldat	Transzmittancia
borostyánkősav	25%	opálos	76%
	50%	kicsapódott	-
	100%	kicsapódott	-
almasav	25%	opálos	85%
	50%	opálos	80%
	100%	opálos	71%
borkősav	25%	tiszta	99%
	50%	tiszta	92%
	100%	opálos	88%
citromsav	25%	opálos	38%
	50%	opálos	38%
	100%	kicsapódott	-

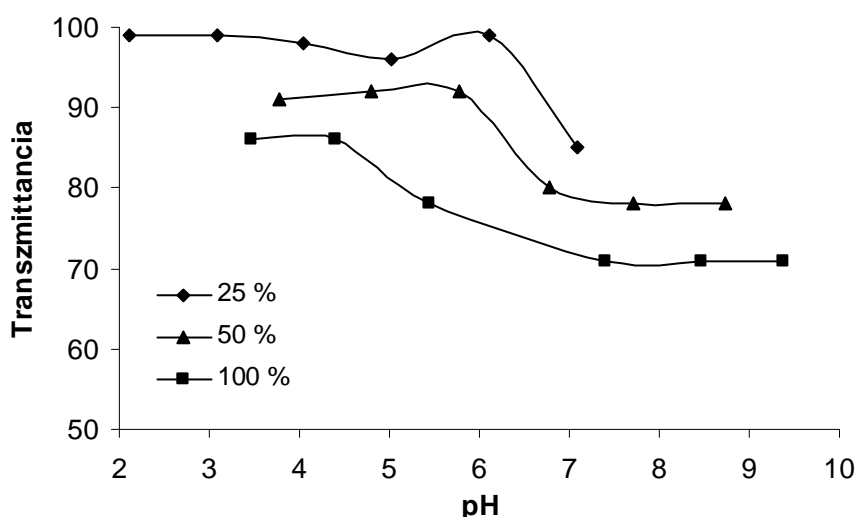
Az eredmények alapján megállapítható, hogy a térhálósítás mértékének növelésével egyre tömörebbek a részecskék, egyre opálosabb kolloid rendszerek keletkeznek, a transzmittancia értékek csökkennek. Emellett a térhálósítás mértékének növekedésével csökken a kitozán szabad aminocsoportjainak száma, ami a kitozán oldhatóságának csökkenését jelenti.

A térhálósító karbonsavak összehasonlításából megállapíthatjuk, hogy a térhálósító karbonsav hidrofil jellege is befolyásolja a keletkező kolloid rendszerben a nanorészecskék oldhatóságát: minél hidrofilebb a térhálósító, annál tisztább oldat keletkezik. Ennek megfelelően a borkősavval való keresztkötés eredményezi a legtisztább kolloid rendszert, míg a borostyánkősavval való reakció már kis mértékű térhálósítás esetén is kicsapódást eredményez.

A citromsav esetében tapasztalt kiválás azzal magyarázható, hogy a citromsav háromfunkciós karbonsav és ennek megfelelően vesz részt a térhálósítási folyamatokban.

Az almasavval térhálósított kitozán nanorészecskék transzmittanciájának pH függését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a pH csökkentésével egyre tisztább kolloid rendszerek keletkeznek, a nanorészecskék hidratáltsága nő, ami a kitozán szabad aminos csoportjainak protonálódására, ezáltal a térhálós rendszerek duzzadásának mértékére vezethető vissza. (21. ábra)

Megállapítottuk, hogy a térhálósítás mértéke széles pH tartományban befolyásolja a kolloid rendszerek opálosságát. A térhálósítás mértékének növelésével egyre opálosabb rendszerek keletkeznek a közeg pH-jától függetlenül, ami a kitozán szabad aminos csoportjai számának csökkenésével magyarázható.



21. ábra

Almasavval térhálósított kitozán nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának pH függése

(az oldatok koncentrációja $c = 1 \text{ mg/ml}$ kitozánra nézve)

5.1.1.4. A térhálós kitozán részecskék hidrodinamikai mérete

A nanorészecskék hidrodinamikai átmérőjét fényszórás fotometriai mérésekkel állapítottuk meg.

A térhálós kitozán nanorészecskék effektív átmérői 290 nm és 340 nm között változtak. (5. táblázat) Rövid szénláncú dikarbonsavakat használtunk a térhálósításhoz, ami magyarázatot adhat a hasonló hidrodinamikai méretekhez az egyes térhálósítási arányok esetében. A hidrodinamikai méretet nem befolyásolta sem a térhálósítás

aránya, sem a térhálósító hidrofíliájának változása. A mért adatokban számottevő különbséget nem tapasztaltunk.

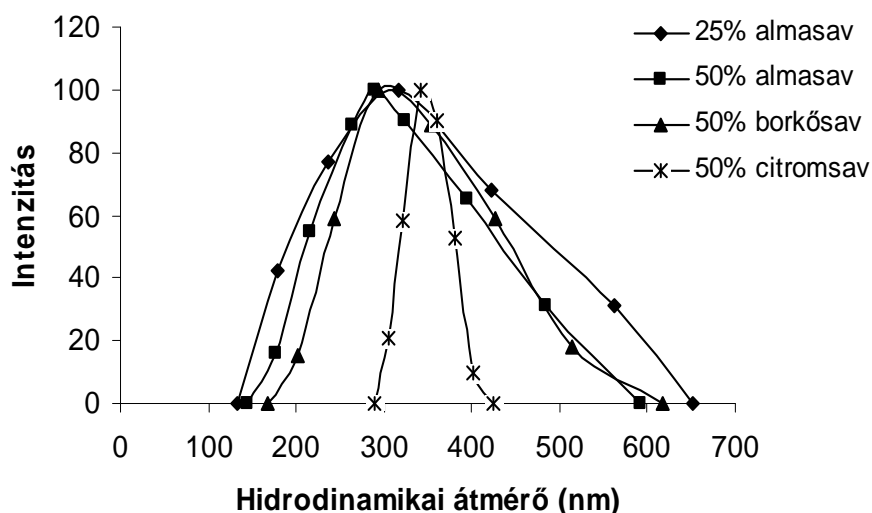
5. táblázat

Térhálós kitozán nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérő adatai

(Mérési körülmények: 0,2 M nátrium-acetát puffer, pH = 6,5, c = 100 µg/ml kitozánra nézve)

Térhálósítás mértéke	Effektív hidrodinamikai átmérő (nm)			
	Borostyánkő-sav	Almasav	Borkósav	Citromsav
25%	290±30	310±20	330±20	320±40
50%	-	300±25	290±20	340±40
100%	-	300±60	300±25	-

Az effektív hidrodinamikai átmérő adatok teljessé tételéhez szükséges a méreteloszlások bemutatása. (22. ábra) Megállapítható, hogy az almasavval, valamint a borkósavval térhálósított kitozán részecskék széles méreteloszlásúak: 120 – 650 nm közötti mérettel rendelkeznek.



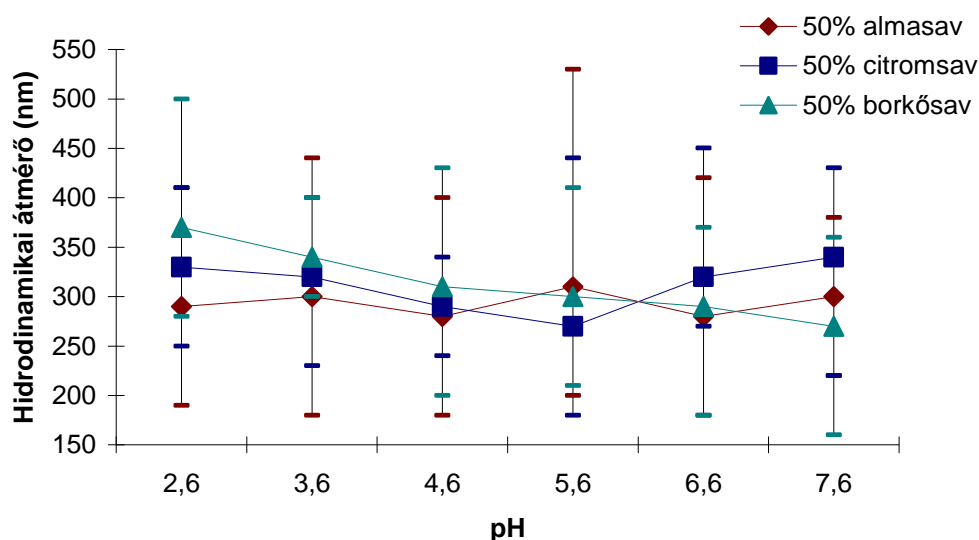
22. ábra

Rövid szénláncú karbonsavakkal térhálósított kitozán nanorészecskék intenzitás szerinti hidrodinamikai méreteloszlása

(Mérési körülmények: 0,2 M nátrium-acetát puffer, pH = 6,5, c = 100 µg/ml kitozánra nézve)

A citromsav esetében szűkebb méreteloszlás figyelhető meg. Az átlagos méret hasonló a dikarbonsavakkal térhálósított nanorészecskék méretéhez, de nem találhatók sem a kisebb, sem a nagyobb mérettartományba eső részecskék. A keletkező térhálós kolloidok valószínűleg intermolekulás térhálósítás következtében, több kitozán molekula összekapcsolásával jöttek létre. A citromsav háromfunkciós jellegének köszönhetően ezek a rendszerek erősen térhálósak, ami magyarázza a viszonylag szűk méreteloszlást.

Vizsgáltuk a hidrodinamikai átmérők pH függését. (23. ábra) A mérési eredmények alapján megállapítottuk, hogy a térhálósítás eredményeként széles méreteloszlású részecskék keletkeztek, a hidrodinamikai méretek széles intervallumban változnak, a mérési eredmények szóródnak, pH-tól függetlenül.



23. ábra

Rövid szénláncú karbonsavakkal térhálósított kitozán nanorészecskék hidrodinamikai átmérő adatainak pH függése

(Mérési körülmények: 0,2 M nátrium-acetát puffer, $c = 100 \mu\text{g/ml}$ kitozánra nézve)

A borkősavval térhálósított kitozán nanorészecskék esetén megfigyelhető, hogy a pH növelésével az átlagos hidrodinamikai átmérő csökken. A kitozán savas közegben protonált szabad amino funkciós csoportjai fokozatosan deprotonálódnak, a szegmensek közötti taszítás és ezzel együtt a részecskék mérete csökken.

Citromsavval való térhálósítás esetén az átlagos hidrodinamikai méret minimumgörbe szerint változik. Erősen savas közegben a kitozán szabad aminocsoportjai protonálódnak, polikation keletkezik. A pH növelésével ezen csoportok deprotonálódása mellett a citromsav szabad karboxilcsoportjai deprotonálódnak, polianion keletkezik. A részecske töltéssűrűsége, a szegmensek közötti taszítás befolyásolja a méretet.

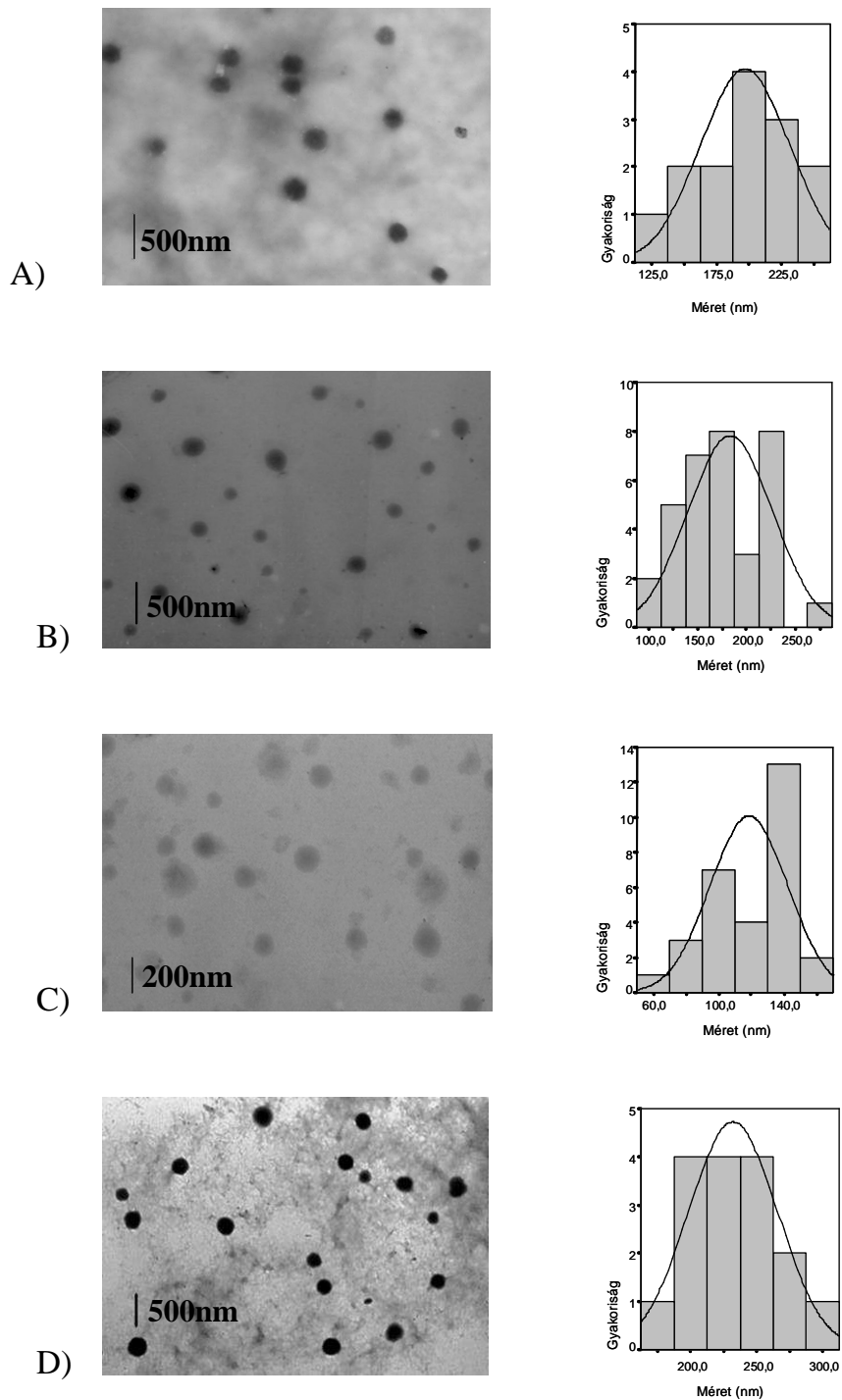
Almasav esetén számottevő tendencia nem volt megfigyelhető.

5.1.1.5. A térhálós kitozán részecskék vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

A kitozán térhálósításával különálló gömbszerű részecskéket kívántunk előállítani. A TEM felvételek alkalmasak annak igazolására, hogy mekkora méretű és milyen formájú részecskék maradnak vissza a vizes rendszerből szárítás után. (24. ábra)

Megállapítható, hogy a rövid szénláncú karbonsavakkal térhálósított kitozán nanorészecskék gömb alakúak, a részecskék mérete 60 nm – 300 nm között változik. A részecskeméret eloszlást bemutató hisztogramok minden esetben széles méreteloszlást tükröznek.

Az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy stabilis térhálós, kolloid mérettartományba eső részecskéket állítottunk elő kitozánból. A térhálós kitozán rendszerek széles pH-tartományban stabilisak; a stabilitás, illetve a részecskéket tartalmazó vizes rendszer opálosságát a térhálósítás mértékével, a térhálósító hidrofilitásával, valamint a közeg pH-jával befolyásolható. A részecskék hidrodinamikai mérete 270 nm és 370 nm között volt, a közeg pH-jától függően.



24. ábra

Térhálós kitozán nanorészecskék TEM felvételei és méreteloszlása

A: almasavval 25%-ban, B: almasavval 50%-ban, C. borkősavval 50%-ban,

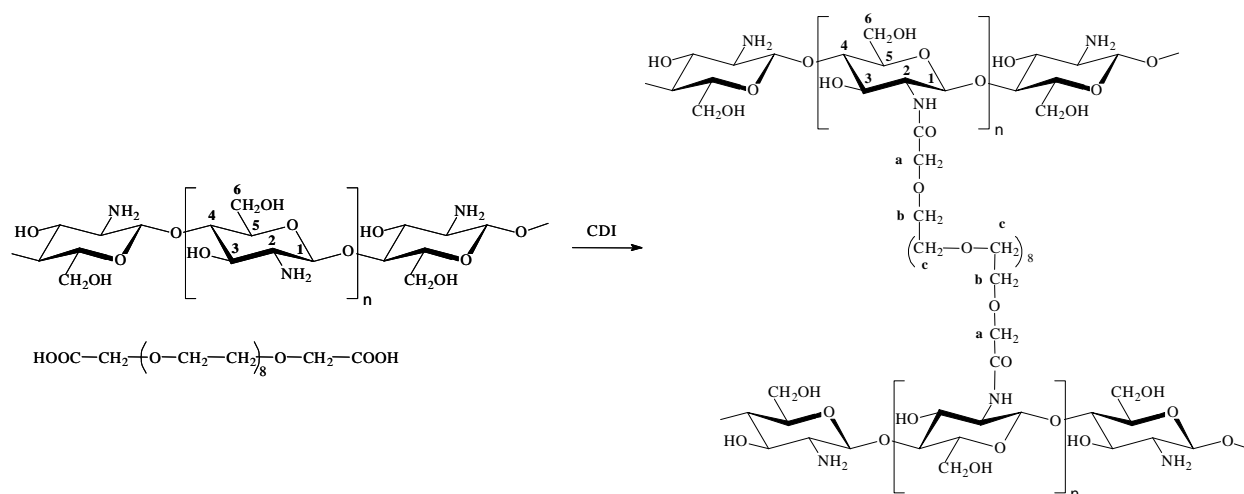
D: citromsavval 50%-ban

(Mérési körülmények: $c = 100 \mu\text{g/ml}$ oldatot csepeztünk, szobahőmérsékleten szárítottuk)

5.1.2. Különböző molekulatömegű kitozán térhálósítása PEG α,ω -dikarbonsav oligomerrel

5.1.2.1. Térhálós kitozán nanorészecskék előállítása

Kutatómunkánk második fejezetében vizsgálni kívántuk, milyen hatással van a kitozán molekulatömege a képződő nanorészecskék méretére, stabilitására, hidratáltságára. A kitozán degradációja révén különböző molekulatömegű makromolekulák térhálósítására nyílt lehetőség. Az eddig alkalmazott rövid szénláncú dikarbonsavak helyett egy PEG α,ω -dikarbonsav oligomert, a poli-(etilén glikol)bisz(karboximetil)étert használtunk térhálósítóként.¹¹⁸ (25. ábra) Az α,ω -dikarbonsav hosszú, flexibilis láncú, hidrofil oligomer molekula, alkalmazásával kívántuk elősegíteni a térhálósítás sztöchiometriai és valósi mértékének közelítését.



25. ábra

A kitozán poli-(etilén glikol)bisz(karboximetil)éterrel történő térhálósításának mechanizmusa

(A jelölések, számozások felhasználása az NMR spektrumok elemzésénél történik.)

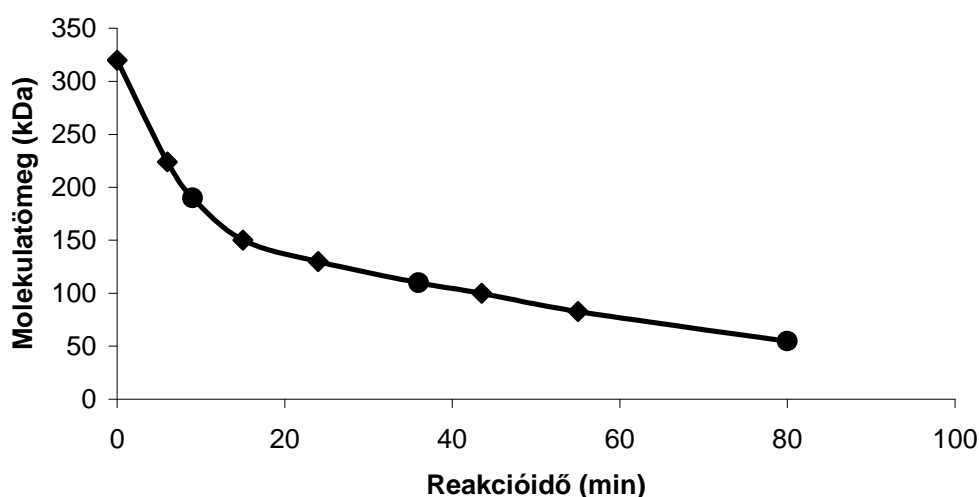
5.1.2.2. A kitozán degradációja

A kísérleti részben leírt degradációt követően a keletkező kitozánok viszkozitás szerinti átlagos molekulatömegét Ostwald-féle viszkoziméterrel határoztuk meg. A mérésekhez 0,10 M CH₃COOH/0,20 M NaCl oldószerkeletet használtunk, a rendszert 25 °C-ra termosztáltuk. A molekulatömeget a Mark-Houwink egyenlet ($[\eta] = K \cdot \overline{M}_v^a$)

alapján a határviszkozitás értékekből számítottuk ki. Az adott oldószerkelet esetén az egyenletben szereplő együtthatók értéke: $K = 1,81 \cdot 10^{-3}$ ml/g és $a = 0,93$.

A degradáció során azt tapasztaltuk, hogy a kitozán molekulatömege exponenciálisan csökken a reakcióidővel. A degradáció az első 15 percben jelentős, majd a folyamat fokozatosan lelassul. (26. ábra)

A degradációval előállított kisebb molekulatömegű kitozánok közül hármat választottunk ki annak tanulmányozására, hogy a molekulatömeg milyen hatással van a képződő nanorészecskék tulajdonságaira. Ezek a következők: DCH1: $M_v = 190$ kDa, DCH2: $M_v = 100$ kDa, and DCH3: $M_v = 55$ kDa.



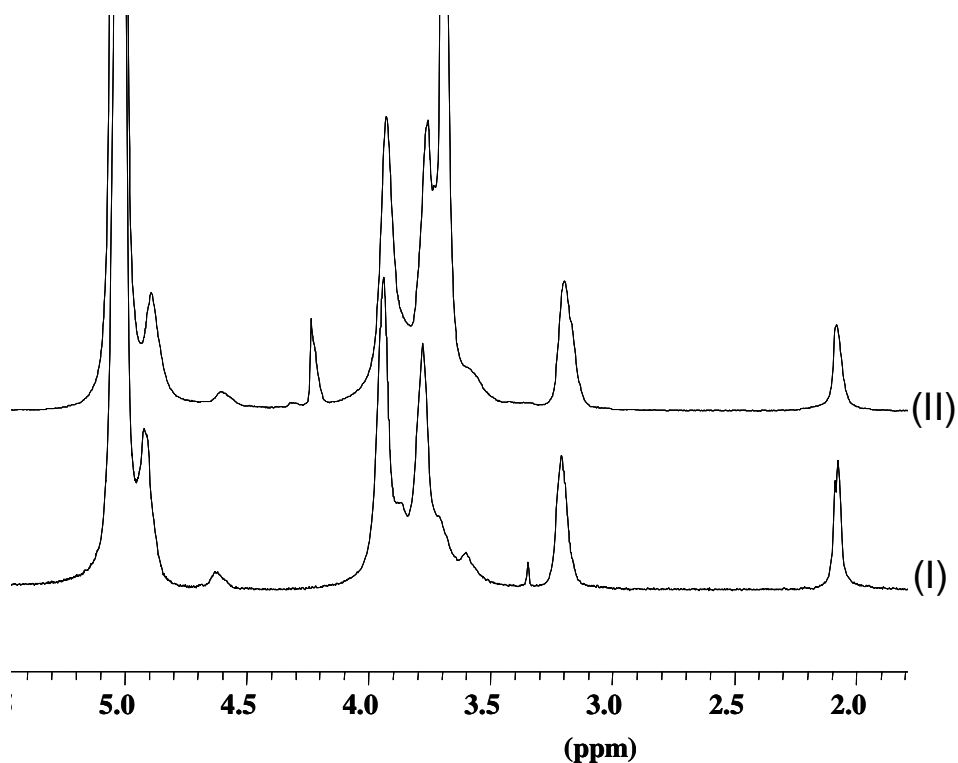
26. ábra

A degradációs folyamat reakcióidejének hatása a kitozán molekulatömegére
(Kísérleti körülmények: [kitozán] = 1 mg/ml, [ecetsav] = 1% (m/m), [NaNO₂] = 3 mM, T = 298 K)

5.1.2.3. A térhálósított kitozán szerkezetének vizsgálata

A részecskék szerkezetének tanulmányozására, a térhálósítás mértékének meghatározására NMR spektroszkópiát használtuk.

A kitozán és a térhálósított nanorészecske ¹H-NMR spektrumainak összehasonlításából a különbség jól észlelhető. (27. ábra)



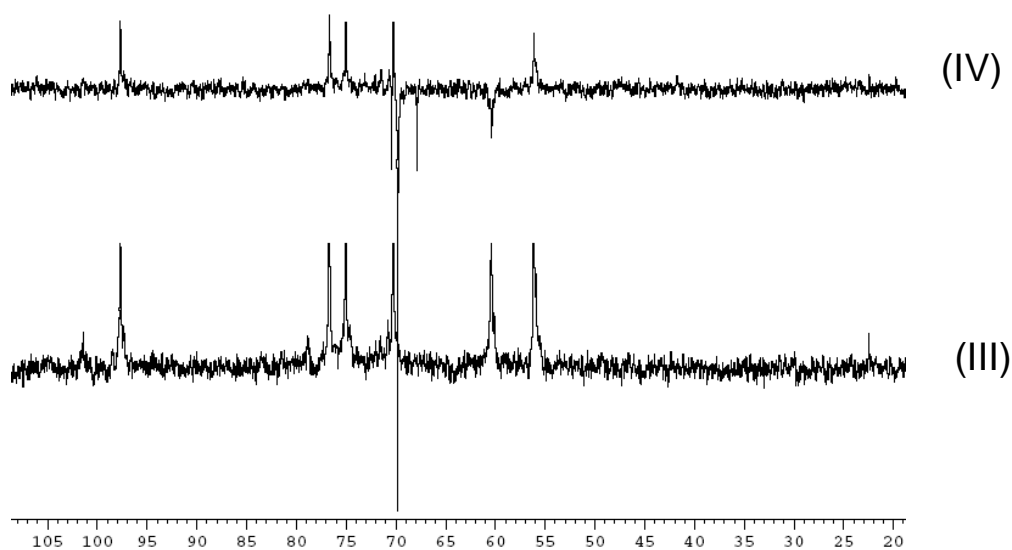
27. ábra

A DCH3 degradált kitozán (I), valamint a PEG α,ω -dikarbonsavval 50%-ban térhálósított DCH3 kitozán (II) ^1H NMR spektruma (500 MHz)

(Alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$)

A kémiai eltolódások a következők: DCH3 kitozán: ^1H -NMR ($\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 4,92$ (1- H_D dezacilezett), $\delta = 4,63$ (1- H_Ac acilezett), $\delta = 3,21$ (2-H), $\delta = 3,47\text{-}4,18$ (3-H, 4-H, 5-H, 6-H), $\delta = 2,08$ (NCOCH_3). PEG α,ω -dikarbonsavval 50%-ban térhálósított DCH3 kitozán: ^1H -NMR ($\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 4,90$ (1- H_D , dezacilezett), $\delta = 4,61$ (1- H_Ac maradék NCOCH_3 és PEG oligomerrel acilezett), $\delta = 3,19$ (2-H), $\delta = 3,45\text{-}4,15$ (3-H, 4-H, 5-H, 6-H), $\delta = 2,06$ (NCOCH_3), $\delta = 3,65\text{-}3,75$ (c- CH_2 és b- CH_2 PEG oligomer), $\delta = 4,24$ (a- CH_2 PEG oligomer).

A térhálósított kitozán ^1H NMR spektrumában megfigyelhető, hogy a PEG oligomerre jellemző csúcsok is szélesek, ami igazolja, hogy a térhálósító beépült, hozzákapcsolódott a kitozán lánchoz.



28. ábra

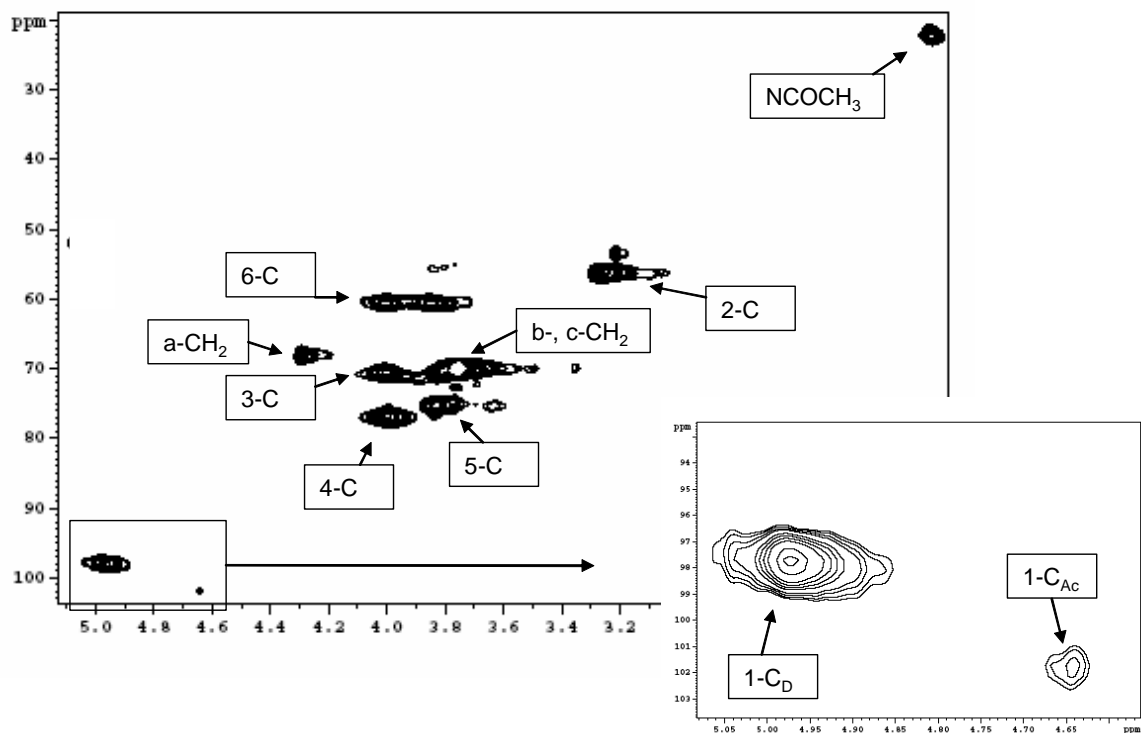
A DCH3 degradált kitozán (III), valamint a PEG α,ω -dikarbonsavval 50%-ban térhálósított DCH3 kitozán (IV) ^{13}C -NMR spektruma (500 MHz)

(Alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$)

A kitozán és a térhálósított nanorészecske ^{13}C -NMR spektrumaiban összehasonlítva a jelek kémiai eltolódását, a PEG-ra jellemző jelek jól azonosíthatók a térhálós kitozán nanorészecske spektrumában. (28. ábra)

A kémiai eltolódások a következők: DCH3 kitozán: ^{13}C -NMR ($\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 101,33$ (1- C_{Ac}), $\delta = 97,70$ (1- C_{D}), $\delta = 56,15$ (2-C), $\delta = 70,28$ (3-C), $\delta = 76,71$ (4-C), $\delta = 75,06$ (5-C), $\delta = 60,42$ (6-C). PEG α,ω -dikarbonsavval 50%-ban térhálósított DCH3 kitozán: ^{13}C -NMR ($\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 97,67$ (1- C_{D}), $\delta = 56,13$ (2-C), $\delta = 70,26$ (3-C), $\delta = 76,68$ (4-C), $\delta = 75,04$ (5-C), $\delta = 60,39$ (6-C), a PEG α,ω -dikarbonsavra jellemző eltolódások $\delta = 69,83$ (c- CH_2), $\delta = 70,42$ (b- CH_2) és $\delta = 67,90$ (a- CH_2).

Az egydimenziós NMR spektrumok kiegészítésére és a pontosabb szerkezetazonosítás érdekében 2D NMR vizsgálatokat végeztünk. A korrelációs spektrumon jól elkülönülnek a kitozánhoz és a PEG-hez tartozó jelek. (29. ábra)



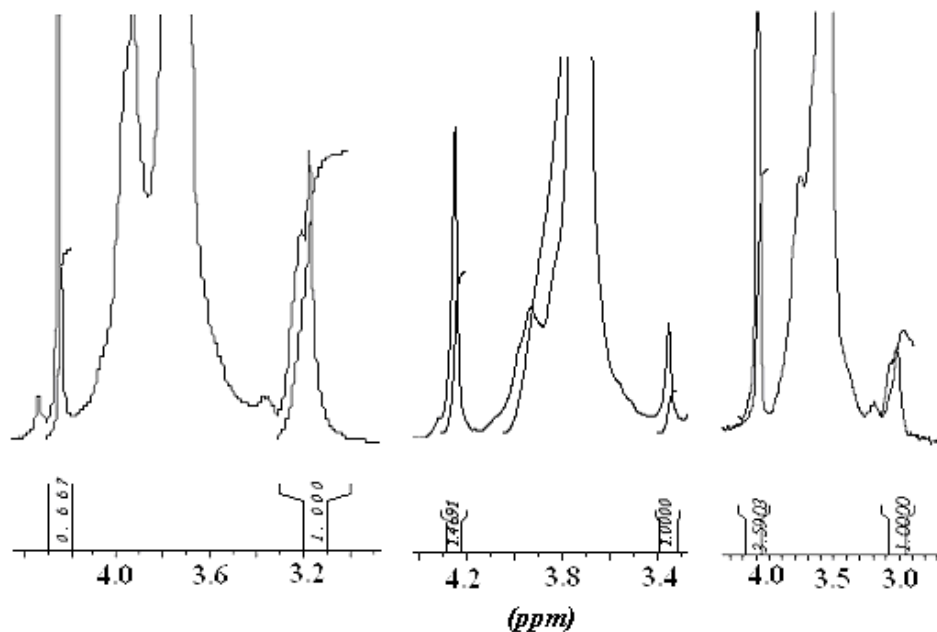
29. ábra

PEG α,ω -dikarbonsavval 50%-ban térhálósított DCH3 kitozán

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC NMR spektruma (500 MHz)

(Alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$)

A kitozán nanorészecskékben a térhálósítás valódi mértékét a ^1H -NMR spektrumok alapján számítottuk. (30. ábra) Az értékek a kitozán 2-H és a PEG dikarbonsav a- CH_2 protonjai intenzitásának összehasonlításából származnak. Az eredmények azt mutatják, hogy 25%-os sztöchiometriai térhálósítás esetén a valódi térhálósság 15-25% között van. 50%-os sztöchiometriai arány mellett a valódi térhálósság mértéke 23-40%, míg 100% esetén 31-90%. Megállapíthatjuk, hogy a sztöchiometriai aránnyal nő a valódi térhálósság aránya is, de a két érték közötti különbség a térhálósítás mértékének növelésével egyre jelentősebb.



30. ábra

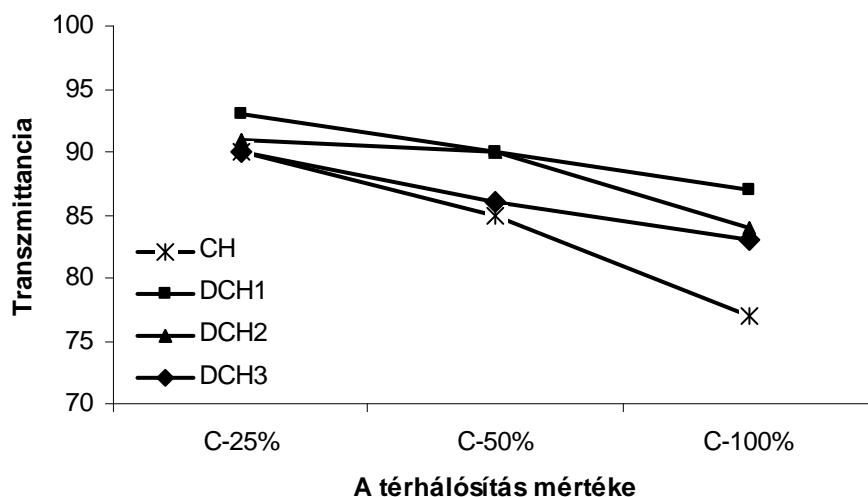
25%-ban, 50%-ban és 100%-ban PEG α,ω -dikarbonsavval térhálósított kitozán ^1H -NMR integráljai

(Alkalmazott oldószer: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)

5.1.2.4. A térhálós kitozán részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata

Minden előállított nanorendszer vizes közegben stabilis kolloid rendszert alkot, kiválást nem tapasztaltunk. Az eredményt a PEG erősen hidrofil, valamint oligomer jellegének tulajdonítottuk.

Transzmittancia adatok alapján a térhálós kitozán nanorészecskék oldatbeli stabilitását, hidratáltságát vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a molekulatömeg hatása a transzmittancia adatokra vonatkozóan elhanyagolható. Kis mértékű térhálósítás esetén a vizsgált kolloid rendszer tiszta. Nagyobb mértékű térhálósítás esetén a nanorészecskék egyre tömörebbek, a vizes rendszer egyre opálosabb. Adott térhálósítás esetén a transzmittancia adatokban nem mutatkozik számottevő különbség, a különböző molekulatömeg hatása nem érzékelhető. (31. ábra)



31. ábra

A térhálós kitozán nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciája a térhálósítás függvényében

(Mérési körülmények: az oldatok koncentrációja $c = 1$ mg/ml kitozánra nézve, $\text{pH} = 6,5$)

5.1.2.5. A térhálós kitozán részecskék hidrodinamikai mérete

A térhálós kitozán nanorészecskék hidrodinamikai átmérő adatait fényszórás fotometriával határoztuk meg. Vizsgáltuk a különböző molekulatömegű kitozánok különböző mértékben térhálósított részecskéinek méreteit vizes közegben. (6. táblázat)

A térhálósítóként alkalmazott PEG-oligomer hosszabb, flexibilis láncá révén lehetőség nyílt lazább szerkezetű térhálós részecskék előállítására. A kitozán poliszacharid gyűrűjének konformációja szintén befolyásolja a térhálós részecskék szerkezetét, méretét, duzzadását.

A fényszórás fotometriai mérési eredmények a térhálós kitozán részecskék bimodális eloszlását mutatják. A szám szerinti megoszlásban a kisebb méretű részecskék túlsúlya figyelhető meg, de mellette a nagyobb méretű részecskék is előfordulnak. A kisebb méretű térhálós részecskék effektív hidrodinamikai átmérője 50 nm és 120 nm között van. Adott molekulatömegű kitozán esetén határozott tendencia nem figyelhető meg a térhálósítás mértéke és ezen hidrodinamikai méretek között. A legkisebb molekulatömegű kitozán esetén pedig fordított tendencia figyelhető meg, ami az intermolekulás térhálósítást valószínűsíti.

6. táblázat

A PEG α,ω -dikarbonsavval térhálósított kitozán nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérő adatai

(Mérési körülmények: pH = 6,5; c = 100 $\mu\text{g/ml}$ kitozánra nézve)

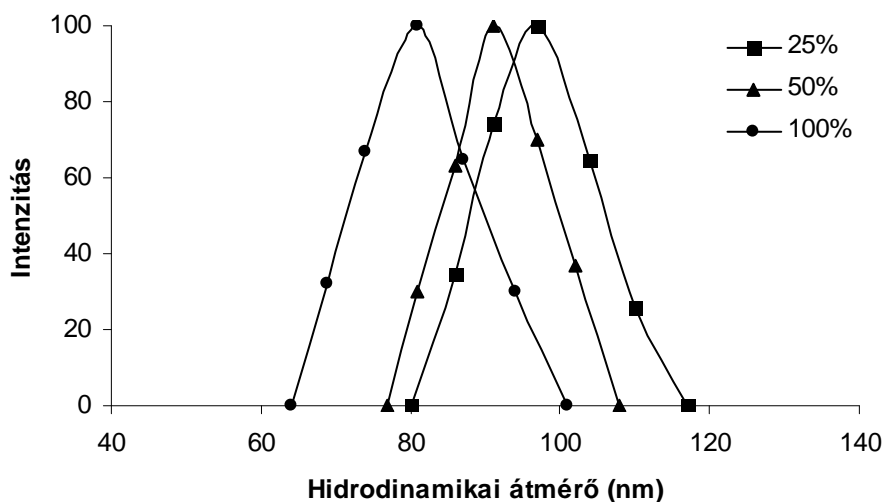
Kitozán	Térhálósítás mértéke	I. csúcs (nm)	II. csúcs (nm)
CH	25%	108 \pm 12	430 \pm 40
	50%	105 \pm 15	300 \pm 20
	100%	100 \pm 15	570 \pm 60
DCH1	25%	92 \pm 15	420 \pm 20
	50%	92 \pm 10	280 \pm 20
	100%	60 \pm 12	340 \pm 20
DCH2	25%	98 \pm 9	340 \pm 20
	50%	89 \pm 12	270 \pm 20
	100%	80 \pm 10	320 \pm 20
DCH3	25%	73 \pm 14	290 \pm 30
	50%	78 \pm 13	200 \pm 20
	100%	80 \pm 12	280 \pm 30

A kitozán molekulatömegének hatását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy biopolimer molekulatömegének változtatásával befolyásolható a keletkező térhálós részecske mérete. A kitozán molekulatömegével csökken a térhálós részecskék mérete. Matematikai összefüggést azonban nem tudtunk felállítani a kitozán molekulatömege és a térhálós nanorészecskék mérete között.

A nagyobb méretű részecskék jelenléte minden esetben kimutatható volt. Kialakulásuk intermolekulás térhálósítás vagy másodlagos kölcsönhatások eredménye lehet. Az előbbi állítást támasztja alá az, hogy fényszórással mérhető volt a jelenlétük pl. ultrahanggal való kezelés után is, viszont a TEM felvételek ezt nem támasztották alá. Az eredményeket összefoglalva megállapítottuk, hogy a fényszórás-mérés során előforduló intenzitást adó nagy méretű részecskéket, a kis számuk miatt, a TEM felvételek készítésénél elkerülhettük.

Az átlagos hidrodinamikai átmérő adatok teljessé tételéhez szükséges a méreteloszlások bemutatása. A 32. ábra alapján megállapítható, hogy szűkebb méreteloszlású részecskéket állítottunk elő, mint a rövid szénláncú karbonsavakkal

történt térhálósítás során. A méreteloszlás nem változik jelentősen a térhálósítással, de az átlagos méret és a mérettartomány eltolódik a térhálósítás változtatásával.



32. ábra

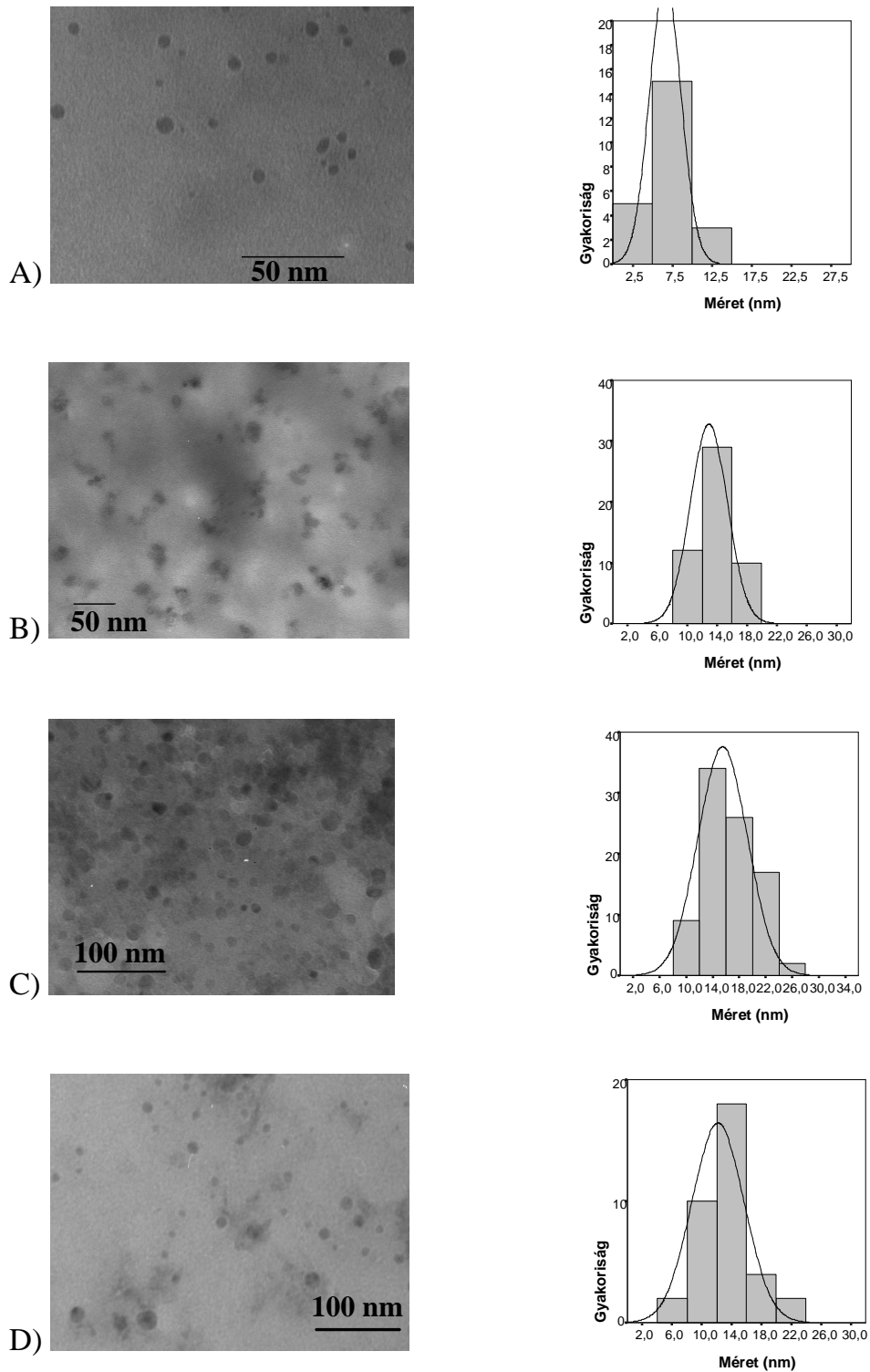
A DCH2 kitozán PEG α,ω -dikarbonsavval térhálósított részecskéinek intenzitás szerinti méreteloszlása. A részecskék mérete 65 nm és 115 nm között van, az effektív méret 80 nm és 100 nm között.

(Mérési körülmények: pH = 6,5; c = 100 $\mu\text{g/ml}$ kitozánra nézve)

5.1.2.6. A térhálós kitozán részecskék vizsgálata transzmissziós elektron-mikroszkóppal

A TEM felvételek igazolják a különálló részecskék keletkezését. Szilárd állapotban a térhálós részecskék mérete 25 nm alatt van, valódi nanorészecskék. A fényszórás során mért nagy méretű részecskéket nem tudtuk kimutatni. (33. ábra)

Nagy különbség mutatkozik a szilárd és a duzzadt állapotú részecskék méretében. A jelenség a térhálósító PEG oligomer hosszabb, flexibilis láncának jelenlétével magyarázható, amely befolyásolja a térhálós molekula nagyobb mértékű duzzadását.



33. ábra

PEG α,ω -dikarbonsavval térhálós kitozán nanorészecskék TEM felvételei és méreteloszlása

A: DCH3 25%-ban, B: DCH1 25%-ban, C: DCH3 100%-ban, D: DCH2 100%-ban

(Mérési körülmények: $c = 100 \mu\text{g/ml}$ oldatot cseppentettünk, szobahőmérsékleten szárítottuk)

Az eredményeket összegezve megállapítható, hogy a PEG α,ω -dikarbonsavval térhálósított nanorészecskék vizes közegben jól duzzadnak, a térhálósító hosszú, flexibilis lánc meghatározza a térhálós részecske duzzadási tulajdonságait. A nanorészecskék mérete a kitozán molekulatömegével is befolyásolható. Mindemellett a térhálósítás mértékének változtatásával a kolloid rendszer opálössága változtatható, de számottevő méretbeni különbség nem érhető el.

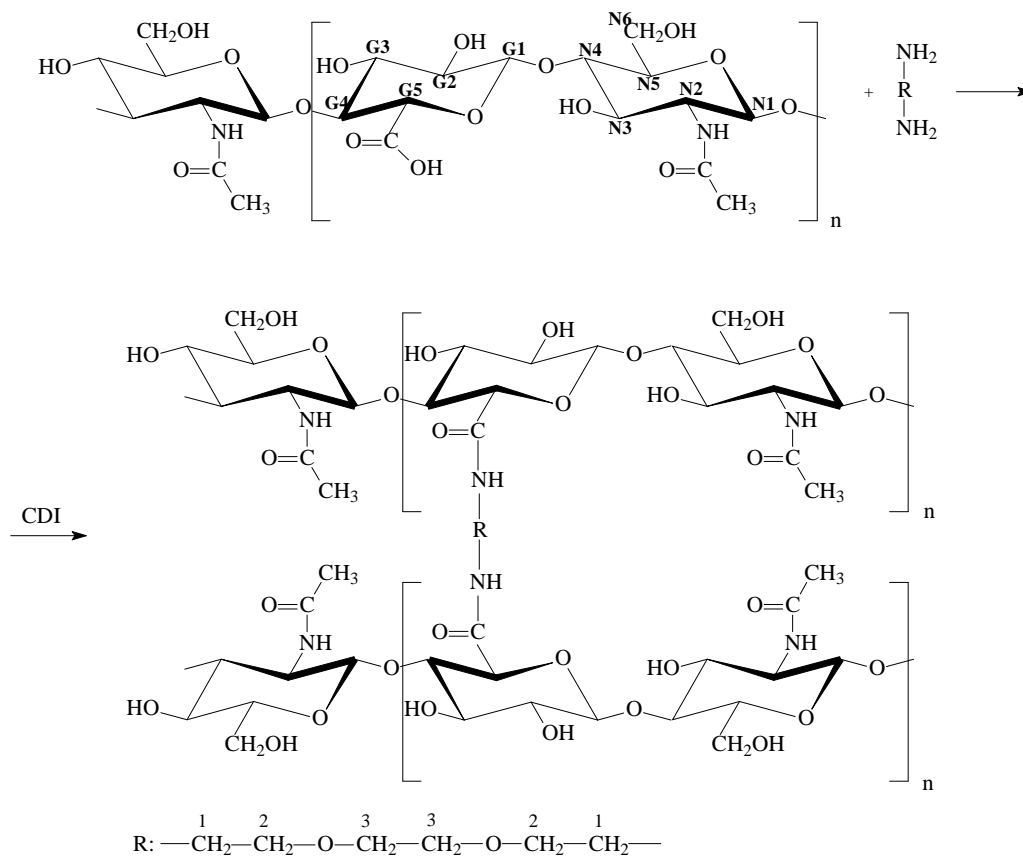
5.2. Hialuronsav térhálósítása

5.2.1. *Térhálós hialuronsav nanorészecskék előállítása*

Kutatómunkánk első részében egy poliszacharidot, a kitozánt térhálósítottuk vizes közegben. A vízben jól oldódó karbodiimid kondenzációs reakcióban, savamid kötést alakít ki a kitozán poliszacharid aminocsoportjai és a térhálósító karboxilcsoportjai között, térhálós kitozán részecskéket eredményezve. A térhálós kitozán nanorészecskék előállításának és vizsgálatának eredményeit alapul véve, kutatómunkánk következő fejezetében vizsgálni kívántuk egy polikarbonsav térhálósítási reakcióit. Vizsgálatainkhoz a hialuronsav polikarbonsavat választottuk, amely a karboxilcsoportok jelenléte miatt vizes közegben gyenge savként viselkedik, széles pH-tartományban rendkívül jól oldódik, és a karboxilcsoportok deprotonálódása révén polianionná alakul. Térhálósítóként egy hosszabb szénláncú diamint, a 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)-t választottuk, mellyel elősegíteni kívántuk a térhálósítás sztöchiometriai és valós mértékének közelítését.

Kutatómunkánk során a hialuronsav karboxilcsoportjai és a térhálósító 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin) aminocsoportjai között alakítottunk ki savamid kötést a vízben jól oldódó 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodid felhasználásával, és ezáltal térhálós hialuronsav részecskéket állítottunk elő vizes közegben, szobahőmérsékleten. (34. ábra)

Minden előállított nanorendszer vizes közegben stabilis kolloid rendszert alkot, csapadék-kiválást nem tapasztaltunk.



34. ábra

A hialuronsav 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal történő térhálósításának mechanizmusa

5.2.2. A hialuronsav degradációja

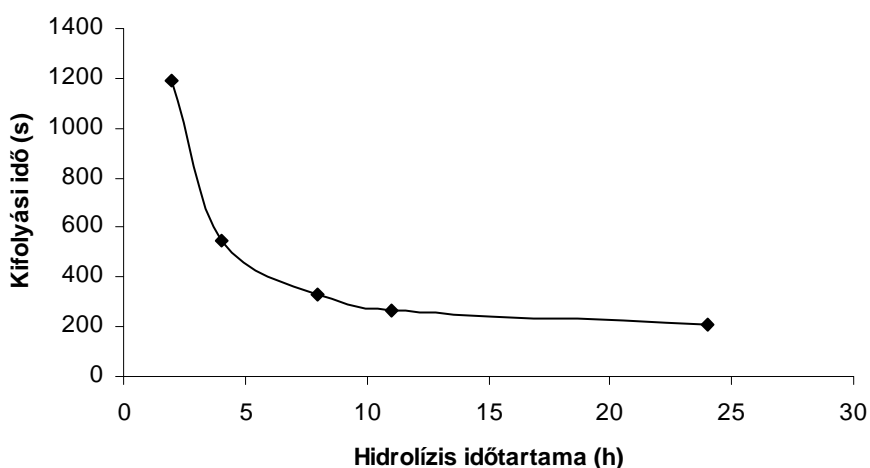
Tanulmányozni kívántuk, hogy milyen hatással van a hialuronsav kiváló oldhatósága és molekulatömege a képződő nanorészecskék méretére, stabilitására, hidratáltságára. Ezen megfontolásból oxidatív degradációval kisebb molekulatömegű poliszacharidokat állítottunk elő egy $M_v = 800$ kDa molekulatömegű hialuronsavból.

A kísérleti részben leírt degradációt követően a keletkező makromolekulák viszkozitás szerinti átlagos molekulatömegét Ostwald-féle viszkoziméterrel határoztuk meg. A viszkozitás-méréseket 0,10 M NaCl oldatban végeztük, a rendszert 25 °C-on termosztáltuk. A molekulatömeget a Mark-Houwink egyenlet ($[\eta] = K \times \overline{M}_v^a$) alapján a

határviszkozitás értékekből számítottuk ki. Az adott oldószer esetén az egyenletben szereplő együtthatók értéke: $K = 3,36 \cdot 10^{-2}$ ml/g és $a = 0,79$.

A degradáció során azt tapasztaltuk, hogy a hialuronsav molekulatömege exponenciálisan csökken a reakcióidővel. A degradáció az első 5 órában jelentős, majd a folyamat fokozatosan lelassul. (35. ábra)

A degradáció révén különböző átlagos molekulatömegű hialuronsav térhálósítására nyílt lehetőség. A degradációval előállított kisebb molekulatömegű hialuronsavak közül hármát választottunk ki annak tanulmányozására, hogy a molekulatömeg milyen hatással van a képződő nanorészecskék tulajdonságaira, méretére. Ezek a következők: HA 3h: $M_v = 210$ kDa, HA 6h: $M_v = 100$ kDa, and HA 9h: $M_v = 50$ kDa.



35. ábra

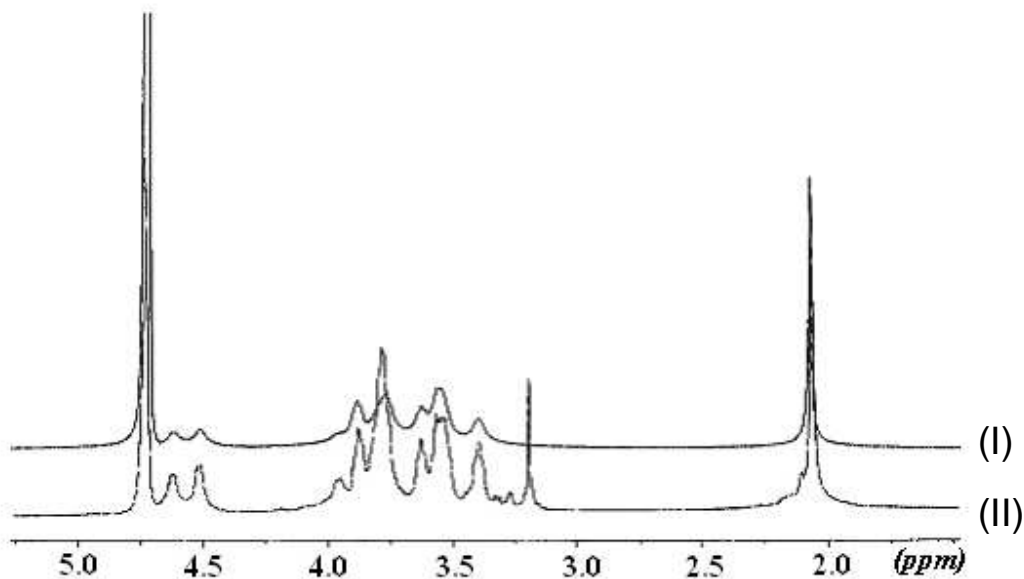
A degradációs folyamat reakcióidejének hatása a hialuronsav molekulatömegére

(Reakciókörülmények: [hialuronsav] = 10 mg/ml, pH = 2,0, T = 70 °C)

5.2.3. A térhálós hialuronsav szerkezetének vizsgálata

A keletkező térhálós rendszerek szerkezetének tanulmányozására, a térhálósítás mértékének meghatározására NMR spektroszkópiát alkalmaztunk.

A hialuronsav és a térhálósított nanorészecske $^1\text{H-NMR}$ spektrumainak összehasonlításából a különbség jól észlelhető. (36. ábra)

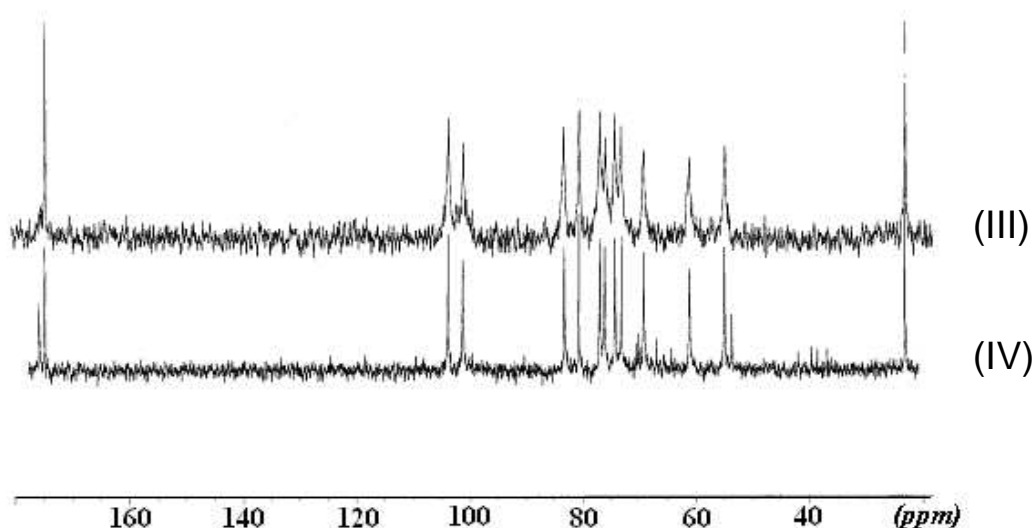


36. ábra

A HA 3h degradált hialuronsav (I), valamint az 50%-ban diaminnal térhálósított HA 3h hialuronsav (II) $^1\text{H-NMR}$ spektruma (500 MHz)
(Alkalmazott oldószer: D_2O)

A kémiai eltolódások a következők: HA 3h hialuronsav: $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 4,51$ (G1), $\delta = 4,61$ (N1), $\delta = 3,40$ (G2), $\delta = 3,92$ (N2), $\delta = 3,63$ (G3), $\delta = 3,74-3,85$ (N3, N6, G4, G5), $\delta = 3,51-3,62$ (N4, N5), $\delta = 2,07$ (NCOCH_3). Diaminnal 50%-ban térhálósított Ha 3h hialuronsav: $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 4,51$ (G1), $\delta = 4,62$ (N1), $\delta = 3,39$ (G2), $\delta = 3,96$ (N2), $\delta = 3,63$ (G3), $\delta = 3,70-3,84$ (N3, N6, G4, G5, C1, C2), $\delta = 3,49-3,60$ (N4, N5), $\delta = 2,07$ (NCOCH_3), $\delta = 3,19$ (C3).

A hialuronsav és a térhálósított hialuronsav nanorészecske $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumaiban összehasonlítva a jelek kémiai eltolódását, a diaminra jellemző jelek jól azonosíthatók a térhálós hialuronsav nanorészecske spektrumában. (37. ábra)

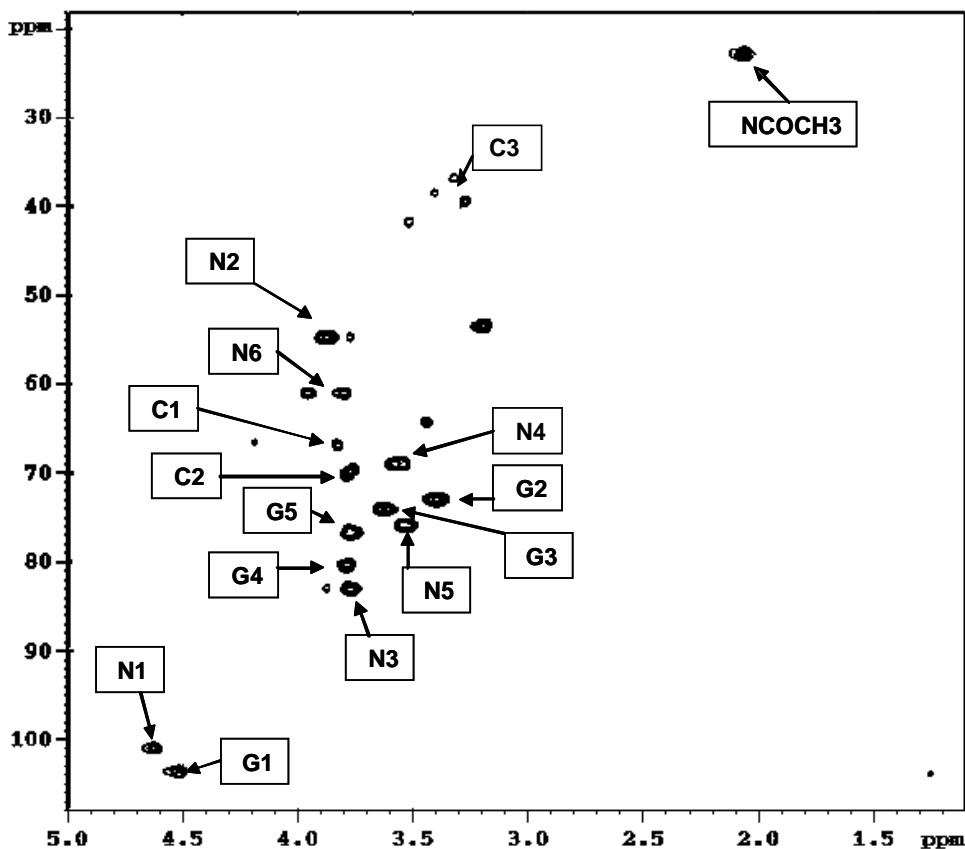


37. ábra

A HA 3h degradált hialuronsav (III), valamint a diaminnal 50%-ban térhálósított HA 3h hialuronsav (IV) ^{13}C -NMR spektruma (500 MHz)
(Alkalmazott oldószer: D_2O)

A kémiai eltolódások a következők: HA 3h: ^{13}C -NMR (D_2O): $\delta = 103,71$ (G1), $\delta = 101,05$ (N1), $\delta = 73,08$ (G2), $\delta = 54,82$ (N2), $\delta = 74,17$ (G3), $\delta = 83,28$ (N3), $\delta = 80,48$ (G4), $\delta = 69,07$ (N4), $\delta = 76,88$ (G5), $\delta = 75,91$ (N5), $\delta = 61,10$ (N6), $\delta = 174,58$ (COO^-), $\delta = 23,04$ (NCOCH_3). Diaminnal 50%-ban térhálósított HA 3h: ^{13}C -NMR (D_2O): $\delta = 103,63$ (G1), $\delta = 101,02$ (N1), $\delta = 73,01$ (G2), $\delta = 54,83$ (N2), $\delta = 74,14$ (G3), $\delta = 80,10$ (N3), $\delta = 80,47$ (G4), $\delta = 69,02$ (N4), $\delta = 76,77$ (G5), $\delta = 75,92$ (N5), $\delta = 61,10$ (N6), $\delta = 174,52$ (COO^-), $\delta = 23,03$ (NCOCH_3), a diamin térhálósítóra jellemző eltolódások $\delta = 66,93$ (C1), $\delta = 70,18$ (C2) és $\delta = 40,57$ (C3).

Az egydimenziós NMR spektrumok kiegészítésére és a pontosabb szerkezetazonosítás érdekében felvettük és azonosítottuk a térhálós hialuronsav ^1H - ^{13}C HSQC (Hetero Single Quantum Correlation) spektrumát. (38. ábra) A korrelációs spektrumon jól elkülönülnek a poliszacharidhoz és a térhálósítóhoz tartozó jelek.

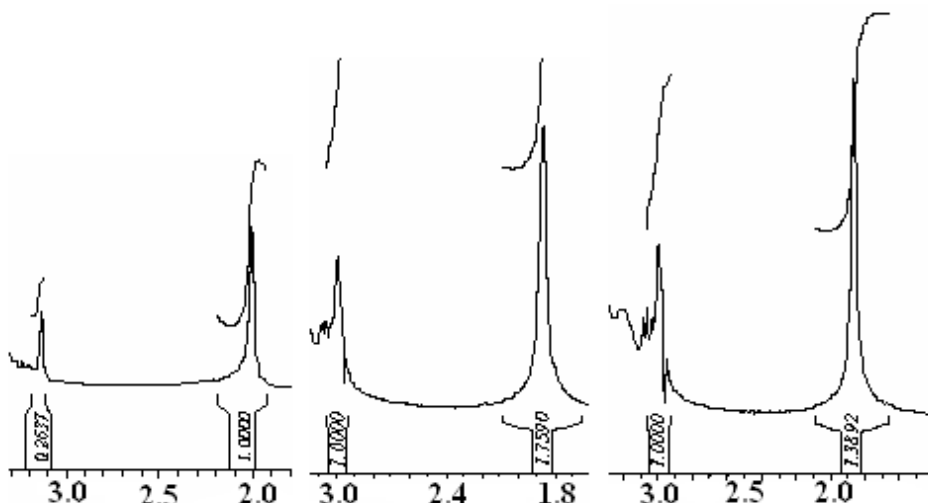


38. ábra

50%-ban diaminnal térhálósított HA 3h hialuronsav ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektruma
(500 MHz)

(Alkalmazott oldószer: D_2O)

A hialuronsav nanorészecskékben a térhálósítás mértékét a ^1H -NMR spektrumok alapján, a jelintenzitás integrál értékeiből számítottuk.(39. ábra) Az értékek a térhálósító diamin C3 protonjai és a hialuronsav NCOCH_3 protonjai intenzitásának összehasonlításából származnak. Az eredmények azt mutatják, hogy 25%-os sztöchiometriai térhálósítás esetén a valódi térhálósság 15-25% között van. 50%-os sztöchiometriai arány mellett a valódi térhálósság mértéke 30-45%, míg 100% esetén 54-68%. Megállapíthatjuk, hogy a sztöchiometriai aránnyal nő a valódi térhálósság aránya is, de a két érték közötti különbség a térhálósítás mértékének növelésével egyre jelentősebb, hasonlóan a kitozán térhálósítása során tapasztalt eredményekhez.



39. ábra

25%-ban, 50%-ban és 100%-ban térhálósított hialuronsav $^1\text{H-NMR}$ integráljai

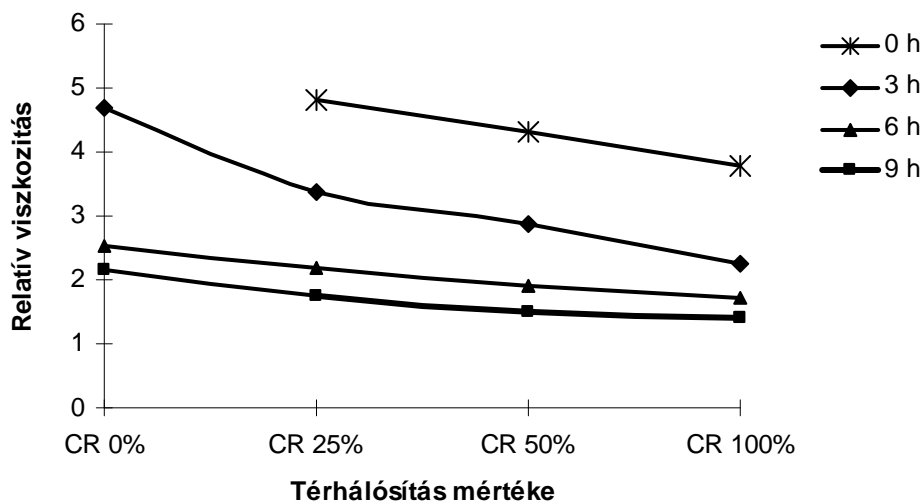
(Alkalmazott oldószer: D_2O)

5.2.4. A térhálós hialuronsav részecskéket tartalmazó vizes rendszerek relatív viszkozitásának vizsgálata

A végbement térhálósodási reakciók tanulmányozását teszi lehetővé a reakcióelegy kifolyási idejének mérése. Adott paraméterek mellett ($\text{pH} = 7$, $c = 1 \text{ m/m\%}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$), a kifolyási idők, a reakcióelegyek viszkozitásának egymáshoz való viszonya számos információt rejt. (40. ábra)

A kiindulási lineáris hialuronsav oldata viszkózus, de az oldatok kifolyási ideje és viszkozitása csökken a hialuronsav molekulatömegének csökkenésével. Oldatban a lineáris makromolekulák összegabalyodnak, az oldat viszkózus. Nagy molekulatömegű makromolekulák esetében ez a folyamat hangsúlyos, jelentősen befolyásolja a viszkozitást.

Adott molekulatömegű hialuronsav esetén a térhálósítás mértékének növelésével a kifolyási idő csökken, egyre kisebb, tömörebb részecskék keletkeznek. Ez a tendencia a molekulatömeg csökkenésével egyre kevésbé jelentős. A hialuronsav oldatának viszkozitása nagyobb molekulatömeg esetén mutat számottevő különbséget a térhálós nanorészecskékhez képest, ugyanis a méretváltozás ebben az esetben a legszámottevőbb.



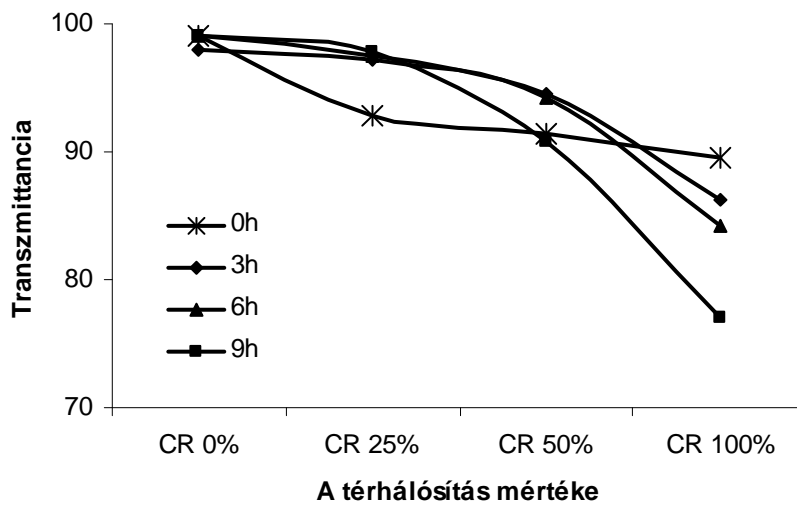
40. ábra

A hialuronsav és a térhálós hialuronsav nanorészecskékat tartalmazó vizes oldatok relatív viszkozitása a térhálósítás mértékének és a hialuronsav molekulatömegének a függvényében

(Mérési körülmények: pH = 7, c = 1 m/m%, T = 25 °C;
HA 0h relatív viszkozitás értéke 79)

5.2.5. A térhálós hialuronsav részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata

A nanorészecskéket tartalmazó vizes kolloid rendszerek stabilitására, valamint a térhálós részecskék hidratáltságára következtethetünk a transzmittancia értékekből. A kiindulási hialuronsavoldatok víztiszták, a transzmittanciájuk ~100%. A térhálósítás mértékének növelésével egyre tömörebb, kompakt részecskék, egyre opálosabb rendszerek keletkeznek.(41. ábra) Ez a tendencia mind a négy különböző molekulatömegű hialuronsav esetében megfigyelhető. A nagy molekulatömegű hialuronsav (HA 0h) térhálósítása során a transzmittancia értékek nem változnak jelentősen. Az eredmény alátámasztja azt a feltételezést, hogy intermolekuláris kölcsönhatások alakulnak ki a térhálósítás során, ami összefügg a makromolekula nagy molekulatömegével. A hatalmas molekulák lassan mozognak, lassan diffundálnak, összegabalyodnak, és intermolekulás térhálósodás alakul ki.



41. ábra

Térhálós hialuronsav nanorészecskéket tartalmazó oldatok transzmittanciája a térhálósítás mértékének és a hialuronsav molekulatömegének a függvényében

(Mérési körülmények: az oldatok koncentrációja $c = 1$ mg/ml hialuronsavra nézve;
 $\text{pH} = 6,5$; $\lambda = 500$ nm)

A transzmittancia értékek a molekulatömeg függvényében azonos tendencia szerint változnak minden térhálósítási arányban. Számottevő különbség 100%-os térhálósítási aránynál figyelhető meg, a legopálosabb a legkisebb molekulatömegű térhálós hialuronsav nanorészecskéket tartalmazó rendszer. A transzmittancia értékek ezen változása összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a makromolekulák molekulatömegének csökkenésével nő a molekulák mozgékonyasága és az intermolekulás térhálósítás valószínűsége.

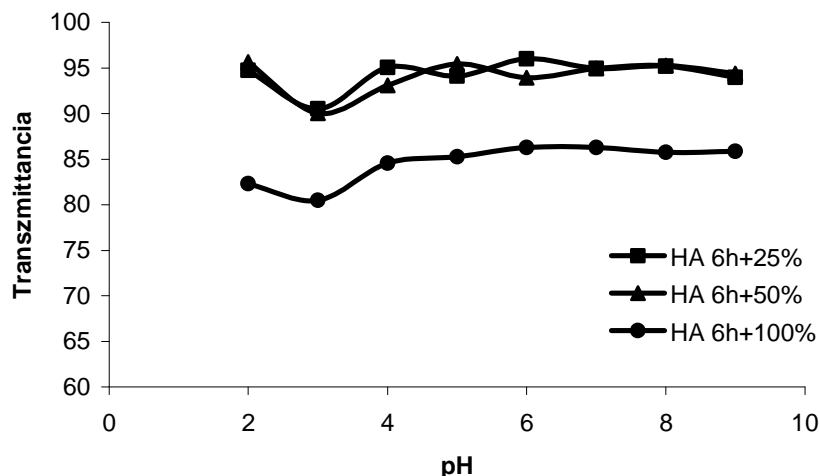


42. ábra

HA 9h hialuronsavból 100%, 50%, illetve 25%-ban térhálósított nanorészecskéket tartalmazó oldatok

(Körülmények: az oldatok koncentrációja $c = 1$ mg/ml hialuronsavra nézve, $\text{pH} = 6,5$)

A nanorészecskéket tartalmazó kolloid rendszerek transzmittancia adatainak pH függését tanulmányozva számottevő különbség, illetve tendencia nem figyelhető meg. (43. ábra) Az értékek változása mérési hibahatáron belül van, a középértéktől való eltérés nem haladja meg a ± 3 értéket. Minden rendszernél, a térhálósítás mértékétől függetlenül, a legopálosabb kolloid rendszer $\text{pH} = 3$ körüli értéknél figyelhető meg, ami megfelel a hialuronsav pK_s értékének ($\text{pK}_s \sim 3,2$).



43. ábra

Térhálós hialuronsav nanorészecskéket tartalmazó oldatok transzmittancia értékei a pH és a térhálósítás mértékének függvényében

(Mérési körülmények: az oldatok koncentrációja $c = 1$ mg/ml hialuronsavra nézve, $\lambda = 500$ nm)

5.2.6. A térhálós hialuronsav részecskék hidrodinamikai mérete

A térhálós nanorészecskék hidrodinamikai átmérőjét fényszórás fotometriával határoztuk meg. Vizsgáltuk a különböző molekulatömegű hialuronsavak különböző mértékben térhálósított részecskéinek méreteit vizes közegben. (7. táblázat)

7. táblázat

Térhálós hialuronsav nanorészecskék effektív hidrodinamikai méretei

(Mérési körülmények: pH = 6,5; c = 100 µg/ml hialuronsavra nézve)

Hialuronsav	A térhálósítás mértéke	I. csúcs (nm)	II. csúcs (nm)
HA 0h	25%	160±20	500±70
	50%	150±30	420±80
	100%	150±30	580±80
HA 3h	25%	110±20	310±15
	50%	90±20	370±40
	100%	80±15	390±40
HA 6h	25%	80±10	210±20
	50%	70±20	280±30
	100%	50±20	350±20
HA 9h	25%	70±10	270±20
	50%	50±15	350±20
	100%	60±15	350±20

A fényszórás fotometriai mérési eredmények a térhálós hialuronsav részecskék bimodális eloszlását mutatják. A számszerinti megoszlásban a kisebb méretű részecskék túlsúlya figyelhető meg, de mellette a nagyobb méretű részecskék is előfordulnak, utalva az esetleges intermolekuláris térhálósodásra. A kisebb méretű részecskék effektív hidrodinamikai átmérője 30 nm és 180 nm között van. Adott molekulatömegű hialuronsav esetén a térhálósítás mértékének növelésével csökken a részecskék hidrodinamikai mérete, egyre térhálósabb, kompakt részecskék keletkeznek.

A hialuronsav molekulatömegének hatását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a molekulatömeggel csökken a térhálós részecskék mérete. A biopolimer molekulatömegének változtatásával befolyásolható a keletkező térhálós részecske

mérete, de a két változó mennyiség között általános érvényű összefüggés ezekből az adatokból nem állítható fel.

Hasonlóan a kitozán térhálósítása során tapasztalt eredményekhez, nagyobb méretű részecskék jelenléte minden esetben kimutatható volt. Kialakulásuk intermolekulás térhálósítás vagy másodlagos kölcsönhatások eredménye lehet. Az előbbi állítást támasztja alá az, hogy fényszórással mérhető volt a jelenlétük pl. ultrahanggal való kezelés után is, viszont a TEM felvételek ezt nem támasztották alá. Összetapadt részecskék az 50%-ban térhálósított hialuronsavak TEM felvételein figyelhetők meg, a 100%-ban térhálósított hialuronsav részecskék egymástól elkülönülnek.

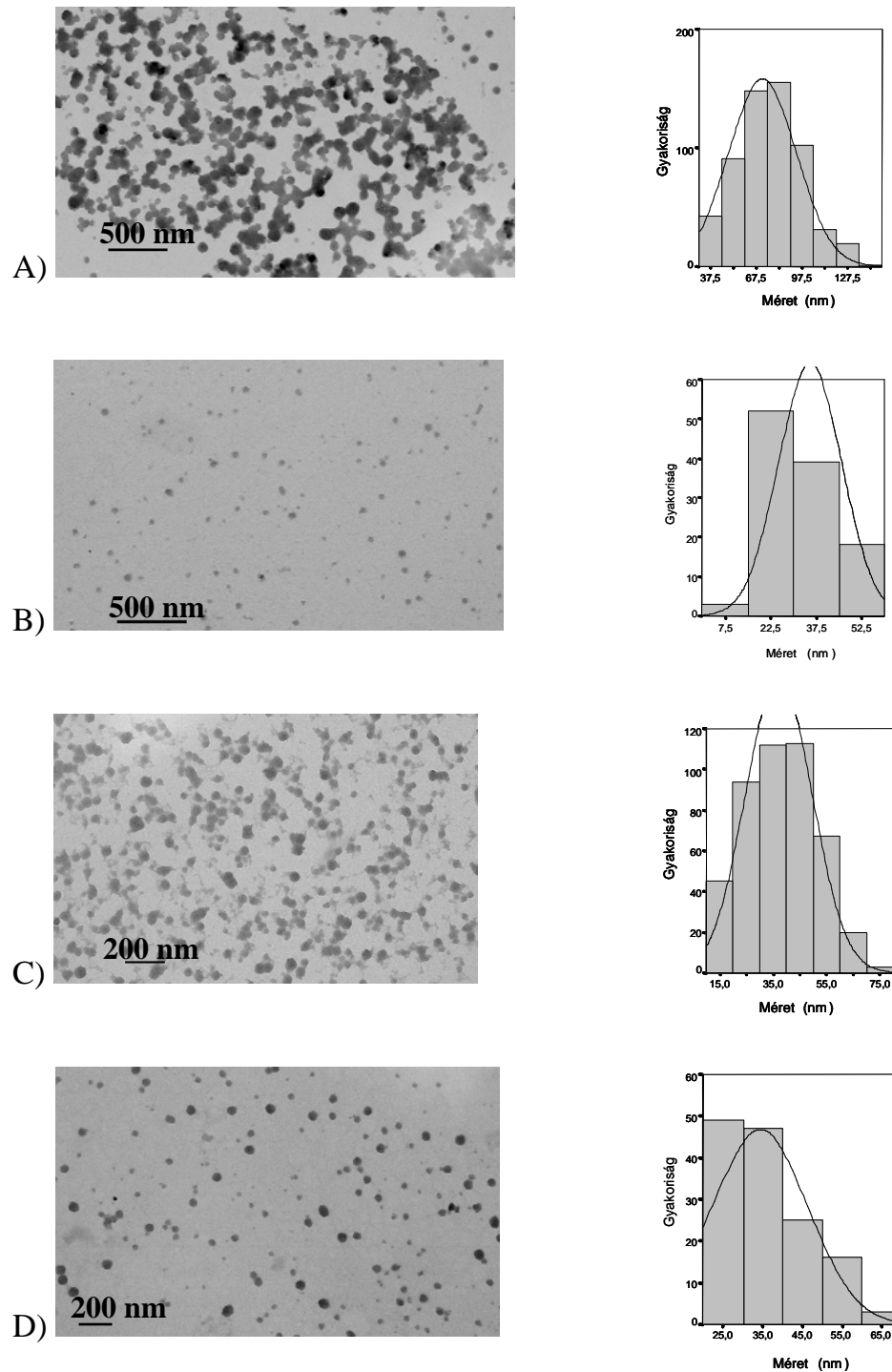
5.2.7. A térhálós hialuronsav részecskék vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

A hialuronsav térhálósításával különálló gömbszerű részecskéket kívántunk előállítani. A TEM felvételek alkalmasak annak igazolására, hogy mekkora méretű és milyen formájú részecskék maradnak vissza a vizes rendszerből szárítás után.

A TEM felvételek alapján a szilárd térhálós hialuronsav részecskék mérete 150 nm alatt van. (44. ábra) A részecskeméret-eloszlást bemutató hisztogramok adatai igazolják, hogy a térhálósítás mértéke befolyásolja a szilárd részecskék méretét: az 50%-ban térhálósított hialuronsav részecskék mérete nagyobb, mint a 100%-ban térhálósított részecskéké. A kétdimenziós felvételek alapján a poliszacharid molekulatömegének hatását vizsgálva megállapítható, hogy molekulatömeg nem befolyásolja számottevő mértékben a keletkező részecskék méretét: 100%-os térhálósítás esetén változik a méret a molekulatömeggel, 50%-os térhálósítás esetén a méreteloszlás szélesebb, összefüggés nem állapítható meg.

Az eredményeket összegezve megállapítható, hogy a 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal térhálósított hialuronsav nanorészecskék vizes közegben jól duzzadnak, stabilis kolloid rendszert képeznek széles pH-tartományban. A térhálósítás mértékének növelésével a vizes rendszerek viszkozitása és transzmittanciája csökken. A duzzadt

részecskék átlagos mérete 25 nm és 160 nm között változik, és befolyásolható a hialuronsav molekulatömegével, valamint a térhálósítás mértékével.



44. ábra

Térhálós hialuronsav nanorészecskék TEM felvételei és méreteloszlása

A: HA 6h 50%-ban, B: HA 6h 100%-ban, C: HA 3h50%-ban, D: HA 3h 100%-ban

(Mérési körülmények: $c = 100 \mu\text{g/ml}$ oldatot csepeztettünk, szobahőmérsékleten szárítottuk)

5.3. Önrendeződés

Biopolimerek kovalens térhálósításával meghatározott méretű, - szerkezetű, és - duzzadási tulajdonságú részecskék állíthatók elő. A módosítás során természetes eredetű vagy szintetikus, biokompatibilis térhálósítók használata szükséges azért, hogy a keletkező térháló rendszer megőrizze az alkotórészek kedvező biológiai tulajdonságát. Mindezek ellenére a térháló részecskék, ezen belül a keresztkötések biokompatibilitása, illetve biodegradabilitása vitatott.

A probléma kiküszöbölésére olyan önrendeződő részecskék előállítása került előtérbe, amelyeket biopolimerek közötti ion-ion kölcsönhatás tart össze. Ezen részecskékben új kovalens kötés nem alakul ki, a biopolimerek kedvező biológiai tulajdonságaikat megőrzik. Az önszerveződés, önrendeződés lehetőséget nyújt különféle szerkezetek (pl. mag-héj) kialakulására, illetve a külső felület töltésének változtatására.

Kutatómunkánk ezen részében nanorészecskéket kívántunk előállítani a kitozán és a hialuronsav poliszacharidok, majd a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével. Vizes közegben a kitozán mint polikation, ionos kölcsönhatásba lép a hialuronsav, illetve a PGA polianionokkal és a biopolimerek stabilis részecskékké formálódnak.

5.3.1. A kitozán és a hialuronsav önrendeződése

A kitozán és a hialuronsav biopolimerek önrendeződésével nanorészecskéket kívántunk előállítani. Vizes közegben, a pH-tól függően a kitozán, mint poliamin, polikationként viselkedhet, míg a hialuronsav, mint polikarbonsav, polianionként. A poliszacharidokból különböző koncentrációjú oldatokat készítettünk, és összeöntésük után vizsgáltuk a létrejövő rendszerek tulajdonságait.

2 mM koncentrációjú kitozán-, illetve hialuronsavoldatot használva az önrendeződéshez, minden esetben csapadék kiválást tapasztaltunk, függetlenül az összeöntés sorrendjétől, valamint a polielektrolitok arányától.

A hialuronsav oldat koncentrációjának csökkentése sem eredményezett stabilitás-növekedést, így szükségessé vált mindkét polielektrolit koncentrációjának változtatása.

8. táblázat

A kitozán és a hialuronsav önrendeződésével létrejövő részecskék effektív hidrodinamikai sugara

(Kísérleti körülmények: pH = 3,0)

Minta c (mM)	HA-CH 1:2	HA-CH 1:1	HA-CH 2:1	CH-HA 2:1	CH-HA 1:1	CH-HA 1:2
CH: 1 HA: 0,4	-	166±60	-	-	-	-
CH: 1 HA: 0,2	-	170±40	-	-	-	-
CH: 1 HA: 0,1	160±50	190±110	-	230±70	130±40	-

A polielektrolitok koncentrációjának csökkentésével stabilis rendszerek állíthatók elő a polielektrolitok arányának megfelelő megválasztásával. A 8. táblázat adatai mutatják, hogy jellemzően a HA-CH 1:1 arány esetében keletkezik a legstabilabb rendszer, és amennyiben a kitozán aránya kisebb, a létrejövő rendszer kicsapódik, függetlenül a koncentrációktól.

A kialakuló részecskék hidrodinamikai méretének eloszlása rendkívül széles, mindemellett összefüggés nem állapítható meg sem az összeöntés sorrendje, sem a koncentrációk változtatása alapján.

A méretek csökkentése, valamint a méreteloszlások szűkítése érdekében a polielektrolitok koncentrációját tovább csökkentettük. A rendszerek stabilitása nem változott, viszont a részecskeméret nőtt, a méreteloszlás szélesedett.

Megállapítható, hogy az önrendeződő részecskék tanulmányozására a kitozán – hialuronsav rendszer nem megfelelő. Mindkét polielektrolit poliszacharid, melyben a gyűrűk konformációja miatt a szabad rotáció gátolt, ami kihatással lehet a létrejövő rendszer stabilitására.

5.3.2. A kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződése

5.3.2.1. Önrendeződő nanorészecskék előállítása

Az önrendeződő részecskék tanulmányozásának második lépésében a kitozán és a poli- γ -glutaminsav (PGA) biopolimerekből önrendeződő rendszereket állítottunk elő.¹¹⁹ Vizes közegben a kitozán polikationként, a poli- γ -glutaminsav polianionként viselkedhet. A polielektrolitok között kialakuló ionos kölcsönhatás stabilis nanorendszerek létrejöttét eredményezi a polimerek önrendeződésével.

A hialuronsav helyett használt PGA polipeptid, nem tartalmaz gyűrűket, a C–C kötések körül szabadabb a rotáció. A PGA flexibilis lineáris láncának konformációja pozitívan befolyásolja a keletkező részecskék stabilitását és méretét.

5.3.2.2. Az önrendeződő részecskék stabilitása

A lineáris PGA karboxilcsoportjai, és a lineáris kitozán aminocsoportjai közötti ion-ion kölcsönhatás révén hidrofil nanorészecskék jönnek létre. Az önrendeződés során kialakuló egyedi részecskék, vagy aggregátumok keletkezését nagymértékben befolyásolja a kitozán és PGA polielektrolitok koncentrációja, pH = 3,0-on.

Koncentráció-sorozatot készítve megvizsgáltuk a kialakult nanorendszerek stabilitását. A 9. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a biopolimerek koncentrációjának csökkentésével egyre stabilabb nanorendszerek keletkeznek; feltételezendő, hogy a koncentrációval együtt a nanorészecskéket alkotó biopolimer molekulák száma is csökken, egyre kisebb, egyre stabilabb részecskék keletkeznek.

9. táblázat

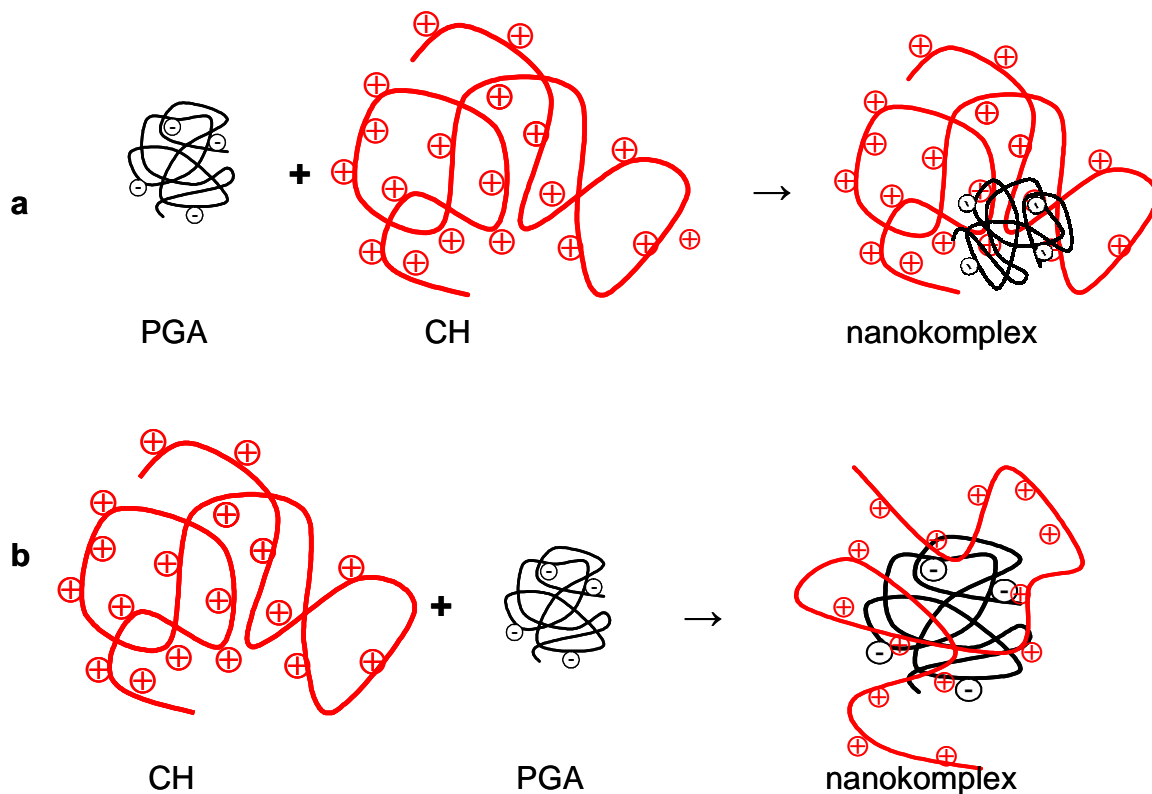
Az önrendeződő nanorendszerek stabilitása a koncentráció függvényében.

(Kísérleti körülmények: pH=3,0)

Minta	Az oldatok koncentrációja (mg/ml)			
	1.50	0.750	0.375	0.188
PGA-CH 1:2	kicsapódott	stabilis	stabilis	stabilis
CH-PGA 2:1	stabilis	stabilis	stabilis	stabilis
PGA-CH 1:1	kicsapódott	stabilis	stabilis	stabilis
CH-PGA 1:1	stabilis	stabilis	stabilis	stabilis
PGA-CH 2:1	kicsapódott	kicsapódott	stabilis	stabilis
CH-PGA 1:2	kicsapódott	kicsapódott	stabilis	stabilis

Alacsony töltéssűrűség esetén a polielektrolitok kisebb, kompaktabb formát, míg nagyobb töltéssűrűség esetén nagyobb, kiterjedtebb statisztikus gombolyag alakot vesznek fel. Savas közegben az enyhén negatívan töltött lineáris PGA összegombolyodott állapotban, míg az erősen pozitívan töltött kitozán kigombolyodott állapotban van. A polielektrolitok elegyítése során a PGA karboxil- és a kitozán aminocsoportjai között ion-ion kölcsönhatás alakul ki, amely a polielektrolitok nanorészecskékké történő önrendeződését eredményezi. A kialakuló nanorészecskéket a polielektrolitok szabad funkciócsoportjai stabilizálják.

A kitozán korlátozott mértékben oldódik savas közegben; semleges és lúgos vizes közegben, valamint a szerves oldószerekben nem oldódik. A PGA vizes közegben, széles pH-tartományban jól oldódik. Tapasztalataink szerint a kis mértékben oldódó kitozán szabad aminocsoportjai stabilizálják a kialakult nanorészecskét, mivel abban az esetben, ha a létrejövő ion-ion kölcsönhatás után nem maradnak szabad aminocsoportok, a kitozánnal együtt a kialakult nanorendszer is kicsapódik.



45. ábra

A PGA és a kitozán lineáris láncai között kialakuló önrendeződés vázlatos rajza
(pH = 3,0)

A 45. ábrán az önrendeződő polielektrolitoknak, a kialakuló nanorészecskén belüli lehetséges elrendeződését szemléltetjük. A polielektrolitok a közeg pH-jától, és ezzel együtt a töltéssűrűségüktől függően kigombolyodott állapotú konformációt, vagy összegombolyodott, kompaktabb struktúrát igyekeznek felvenni. Kigombolyodott, ellentétes töltésű polielektrolitok önrendeződése során egymásba áthatoló fizikai térháló alakul ki statisztikus gombolyagként. Amennyiben változik a pH, vele együtt változik a töltöttség, a töltéssűrűség, és a méret.

A kitozán és a PGA önrendeződése során a kialakuló rendszer szerkezetét az összeöntés sorrendje határozza meg. Abban az esetben, amikor a PGA oldathoz öntjük a kitozán oldatot (a), a PGA molekulák feleslegével kell számolni az összeöntés pillanatában. Feltételezhető, hogy a kigombolyodott kitozán köré, mint mag köré épülnek a PGA molekulák kompakt gömbjei mintegy koronaként. Ellenkező esetben,

amikor a kitozán oldathoz öntjük a PGA oldatot (b), az összeöntés pillanatában a kitozán molekulák vannak feleslegben. Egy mag-héj struktúra létrejötte valószínűsíthető, amelyben a PGA kompakt gömbjét, mint magot veszik körül a kigombolyodott kitozán molekulák.

5.3.2.3. Az önrendeződő részecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciájának vizsgálata

A biopolimerek összeöntését követő önrendeződés eredményeként tiszta vagy opálos vizes rendszerek keletkeztek, melyek szobahőmérsékleten több napig stabilisak maradtak. A különböző nanorészecskéket tartalmazó oldatok transzmittanciáját az 10. táblázat foglalja össze. Vizsgáltuk a polielektrolitok koncentrációjának és arányának a transzmittancia értékekre gyakorolt hatását, adott pH = 3,0 esetén, különböző összeöntési sorrend mellett. Azt tapasztaltuk, hogy a kitozán részarányával a részecskék oldhatósága és az oldatok transzmittanciája nő. A kitozán arányának és vele együtt az ionos kötésben részt nem vevő szabad aminocsoportok arányának csökkenésével, az oldatok transzmittanciája csökken. Ez azt a feltételezést támasztja alá, hogy a rossz oldhatóságú kitozán a fő tényező az önrendeződő nanorészecskék stabilitásának és oldhatóságának meghatározásában.

10. táblázat

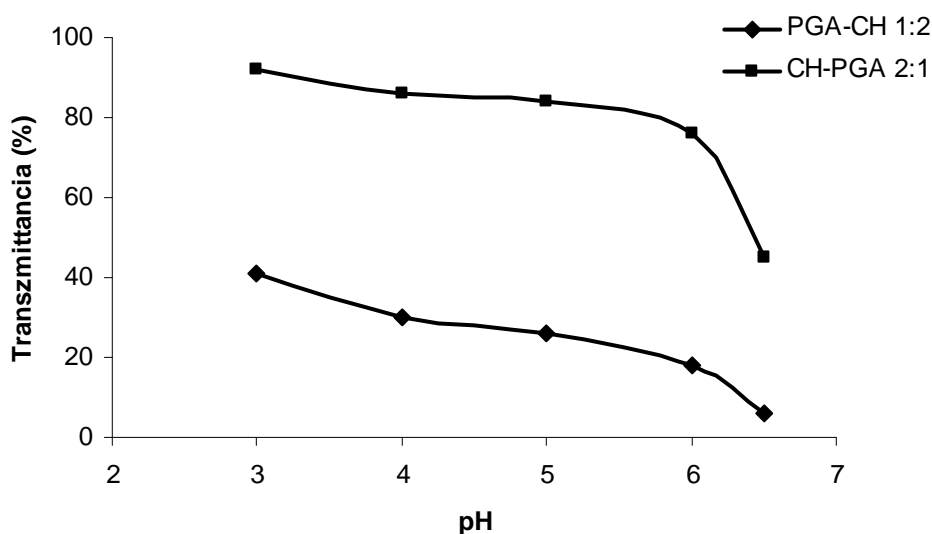
Az önrendeződő nanorészecskéket tartalmazó oldatok transzmittanciája

(Mérési körülmények: pH = 3,0; $\lambda = 500$ nm)

Minta Koncentráció (mg/ml)	Transzmittancia	PGA-CH	PGA-CH	PGA-CH	CH-PGA	CH-PGA	CH-PGA
		1:2	1:1	2:1	2:1	1:1	1:2
c=0,750		35%	33%	-	67%	54%	-
c=0,375		41%	29%	23%	92%	90%	60%
c=0,188		81%	69%	71%	99%	92%	88%

Számottevő különbség mutatkozik a transzmittancia értékek között az összeöntés sorrendjének függvényében. Abban az esetben, ha a kitozánt adagoltuk a PGA-hoz (PGA-CH minták) sokkal opálosabb rendszer keletkezett, a transzmittancia értékek kisebbek. Az összeöntés pillanatában a kitozán aminos csoportjai ion-ion kölcsönhatásba kerülnek a feleslegben lévő PGA karboxil csoportjaival, a szabadon maradó aminos csoportok száma kicsi. Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a kitozán szabad aminos csoportjai határozzák meg a PGA-kitozán nanorészecskék oldhatóságát.

A 46. ábra az oldatok transzmittanciájának pH függését mutatja, egy adott koncentráció és biopolimer-arány esetén. A kitozánnak maradnak szabad aminos csoportjai az összeöntés után, ennek tulajdoníthatóan a kialakult rendszer széles pH-tartományban stabilis. A pH növekedésével a szabad aminos csoportok protonálódása háttérbe szorul; a kitozán oldhatósága és vele együtt a transzmittancia csökken.



46. ábra

Az önrendező nanorészecskéket tartalmazó oldatok turbiditásának pH függése

(Mérési körülmények: $c = 0,375 \text{ mg/ml}$; $\lambda = 500 \text{ nm}$)

A teljes pH tartományban különbség mutatkozik az összeöntés sorrendjének függvényében is. Abban az esetben, ha a PGA-hoz adtam a kitozánt, opálosabb rendszer keletkezett, a kitozán aminos csoportjai kötve vannak. A PGA-CH 2:1 és CH-PGA 1:2

minták transzmittanciájának pH függését vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a rendszer pH=4-nél kicsapódik, a PGA-CH 1:1 és CH-PGA 1:1 minták esetében pedig pH=5-nél tapasztaltam kicsapódást. Ez az eredmény is igazolja azt a feltételezést, hogy a kisebb oldhatóságú kitozán határozza meg az önrendező nanorészecskék stabilitását, oldhatóságát, és a vizes rendszer transzmittanciáját.

5.3.2.4. Az önrendező részecskék elektroforetikus mobilitásának vizsgálata

Az elektroforetikus mobilitás a töltött részecskék mozgékonyágát írja le folyadékban, elektromos térben. Az ionok sebessége arányos az elektromos tér nagyságával és a töltéssel, a közöttük lévő arányossági tényező a mobilitás. Az elektroforetikus mobilitás a részecskék felületének töltöttségéről, a töltéssűrűségről ad információt. Gömbszerű részecskéket feltételezve, a mobilitás a részecskék hidrodinamikai sugarának négyzetével fordítottan arányos.

Az elektroforetikus mobilitás értékek alátámasztják (11. táblázat) azt a feltételezést mely szerint a keletkező nanorendszerekben a polielektrolitok orientálódnak. A kisebb mobilitás értékek abból adódnak, hogy a felület felé orientálódó polianion leárnyékolja a statisztikus gombolyag belseje felé orientálódó kitozán töltéseit. Ilyen hatás nem figyelhető meg abban az esetben, ha a kitozánhoz csepegtetjük a PGA-t. A nagyobb mobilitás értékek azt támasztják alá, hogy ebben az esetben kitozán orientálódik a nanorészecske felszíne felé.

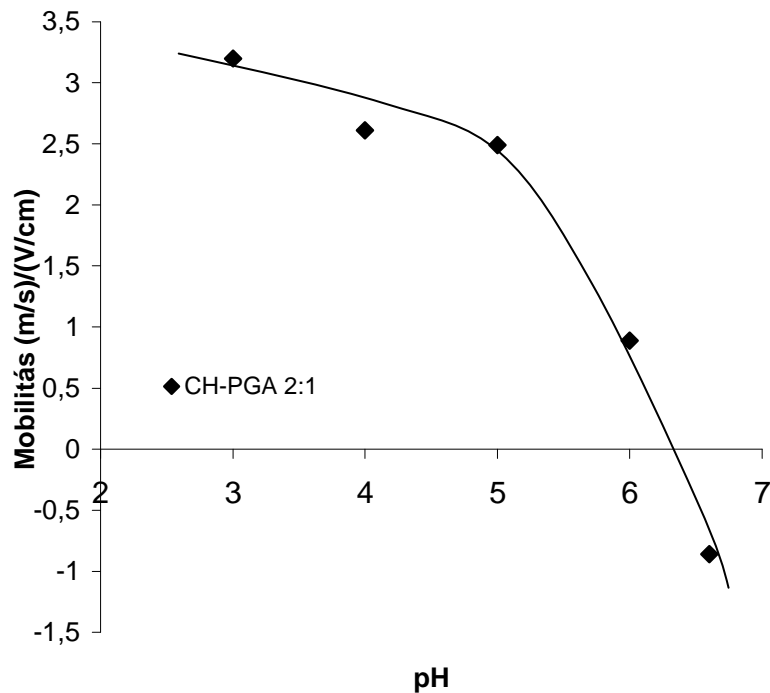
11. táblázat

Az önrendező nanorészecskék elektroforetikus mobilitása

(Mérési körülmények: pH = 3,0; c = 0,375 mg/ml)

Minta	PGA-CH 1:2	PGA-CH 1:1	PGA-CH 2:1	CH-PGA 2:1	CH-PGA 1:1	CH-PGA 1:2
Mobilitás (m/s)/(V/cm)	+2.84	+2.56	+1.91	+3.20	+2.36	+1.63

A 47. ábrán a mobilitás értékek pH függése látható. Míg pH=3,0-nál a kitozán aminocsoportjai protonált állapotban vannak, a biopolimer erősen pozitívan töltött (mobilitás: +1,93), addig a PGA gyengén negatívan töltött állapotban van (mobilitás: -0,61). Ebből következik, hogy a CH-PGA 2:1 részecskék felülete erősen pozitívan töltött. A pH növelésével a kitozán aminocsoportjai és a PGA karboxilcsoportjai deprotonálódnak, ennek hatására változik az általuk kialakított nanorészecske felületi töltöttsége is. Az ábrán jól látható, hogy a mobilitás érték pH≈6,3-nál éri el a 0-t, a rendszer pedig pH=6,6-ig stabil. Az eredmény azt támasztja alá, hogy a kialakult nanorészecskéket a kitozán protonált aminocsoportjai stabilizálják. Amennyiben a pH-növelés hatására a kitozán aminocsoportjai teljes mértékben deprotonálódnak, a rendszer kicsapódik.



47. ábra

A CH-PGA 2:1 önrendeződő nanorészecskék elektroforetikus mobilitása a pH függvényében

(Mérési körülmények: $c = 0,375$ mg/ml)

5.3.2.5. Az önrendező részecskék hidrodinamikai mérete

A duzzadt részecskék méretének meghatározására fényszórás fotometriát használtunk. A nanorendszerek vizsgálata vizes közegben pH=3,0 értéken történt.

A 12. táblázat adatai azt mutatják, hogy a koncentráció csökkentésével csökken a kialakult nanorészecskék mérete. Ez azt valószínűsíti, hogy polimolekuláris önrendezés jön létre, s a koncentrációval csökken az egyes részecskéket alkotó makromolekulák száma.

12. táblázat

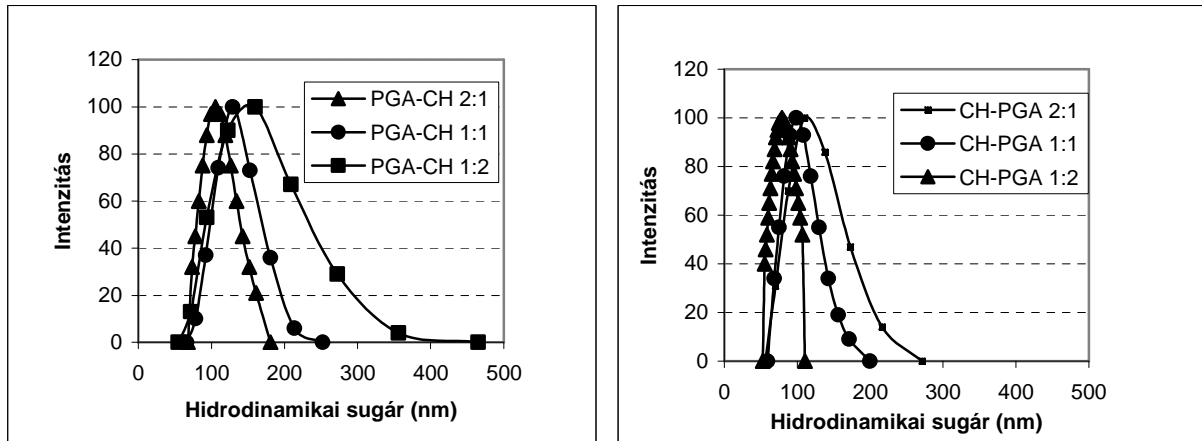
Az önrendező nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérője a koncentráció függvényében

(Mérési körülmények: pH=3,0)

Minta	Az oldatok koncentrációja (mg/ml)			
	1,50	0,750	0,375	0,188
PGA-CH 1:2	kicsapódott	379±80 nm	160±20 nm	138±5 nm
CH-PGA 2:1	480±10 nm	186±10nm	115±5 nm	71±3 nm
PGA-CH 1:1	kicsapódott	299±80 nm	135±10 nm	118±4 nm
CH-PGA 1:1	300±10 nm	147±10 nm	110±5 nm	92±3 nm
PGA-CH 2:1	kicsapódott	kicsapódott	105±10 nm	98±5 nm
CH-PGA 1:2	kicsapódott	kicsapódott	80±5 nm	62±2 nm

A 12. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a polielektrolitok koncentrációja mellett mind a polielektrolitok aránya, mind az összeöntés sorrendje befolyásolja a jellemző hidrodinamikai méreteket. Adott pH-n a kitozán mennyisége kulcstényező a részecskeméret kialakulásában; a kitozán részarányának csökkenésével általában csökken a részecskeméret is, ami a biopolimerek méretbeli különbségén alapszik. Az összeöntés sorrendjének vizsgálatakor megállapítható, hogy abban az esetben keletkeznek kisebb méretű részecskék, ha a PGA-t csepegtetjük a kitozánhoz. Az eredmények azt valószínűsítik, hogy a biopolimerek önrendezésével létrejövő statisztikus gombolyagon belül a polimerek orientációja meghatározott. A kisebb méretű részecskék esetén a PGA alkothatja a nanorendszer belső magját, melyet a

kitozán molekulák héjként vesznek körül. A nagyobb méretű részecskék esetén az összeöntés sorrendje, és ezzel együtt az orientáció is megfordul, a kitozán alkotja a nanorészecske belső magját és a PGA molekulák koronaként kapcsolódik köré.



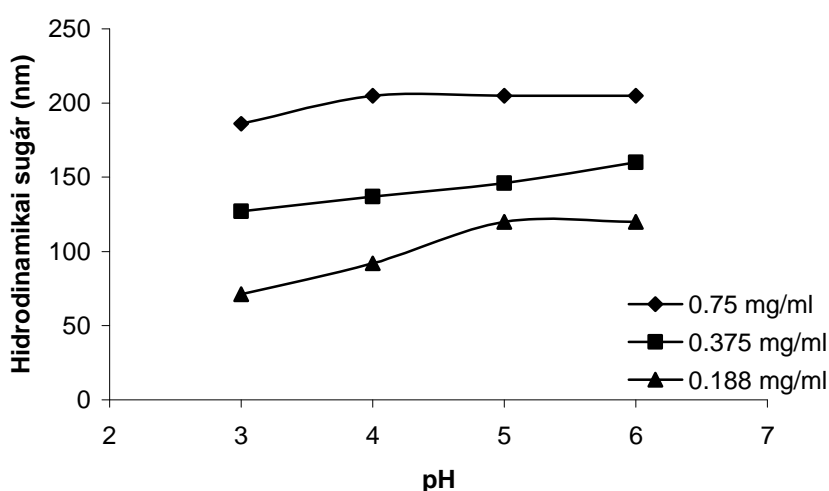
48. ábra

Az önrendeződő nanorészecskék intenzitás szerinti hidrodinamikai méreteloszlása, a polielektrolitok arányának függvényében
(Mérési körülmények: pH=3,0; c=0,375 mg/ml)

Az eloszlásgörbék utalnak a keletkező nanorendszerek méreteloszlására. A 48. ábrán jól összehasonlítható az eloszlás szélesedése a kitozán arányának növekedésével, ami azzal magyarázható, hogy a vizsgált körülmények között (pH = 3,0) a kitozán kigombolyodott formában, míg a PGA kompakt gömb alakban van jelen. Az önrendeződő részecske statisztikus gombolyagjának méretét, az azt alkotó biopolimerek mérete határozza meg. Az eloszlás szélességét nagymértékben befolyásolja az összeöntés sorrendje is. Abban az esetben, amikor a kitozánhoz adtuk a PGA-t, a nanorészecskék méreteloszlása sokkal szűkebb, szintén alátámasztva azon elgondolást, hogy a vizsgált körülmények között kompakt gömb alakot felvevő PGA alkotja a kialakult nanorészecske belső magját.

Az 49. ábra a CH-PGA 2:1 minta hidrodinamikai méreteit mutatja a pH függvényében. A nanorészecskék hidrodinamikai sugara növekszik a komponensek koncentrációjának függvényében, amely trend megmarad széles pH tartományban.

A biopolimerek koncentrációjának növekedésével nagyobb részecskék keletkeznek; nagyobb koncentrációnál több makromolekula alkot egy szeparált nanorészecskét, az önrendeződés polimolekuláris. A CH-PGA 2:1 minta esetén szabad funkció aminocsoportok maradnak, melyek az önrendeződés után savas közegben protonálódnak. Taszító kölcsönhatás alakul ki a kitozán lineáris láncának pozitív töltésű szegmensei között, amely meghatározza a hidrodinamikai méretet. Nagyobb pH-nál a kitozán szabad aminocsoportjai és a PGA karboxilcsoportjai deprotonálódnak, közöttük taszító kölcsönhatás alakul ki. Emellett a két biopolimer, mint polianion és polikation között vonzó kölcsönhatás jön létre. Így a vonzó és taszító kölcsönhatások együttes hatása alakítja ki a méretet. Nagyobb pH-nál a hidrodinamikai méret nő. Ez a trend független a koncentrációtól, vélhetően a biopolimerek konformációs változásából adódik. A poliszacharid gyűrű konformációja meghatározza, részben gátolja a szabad elhelyezkedést, szabad rotációt, és befolyásolja a kialakult nanorészecske duzzadását is. A PGA jobban tud gombolyodni, mint a gyűrűs kitozán, és ezáltal nagyobb pH-nál jobban tud duzzadni, így a nanorészecske is nagyobb lesz.



49. ábra

A CH-PGA 2:1 minta effektív hidrodinamikai méretei a koncentráció, és a pH függvényében

Az elektroforetikus mobilitás meghatározásához szükséges 1,0 mM KCl oldatot használtuk fel a sóhatás vizsgálatához. Számottevő különbséget KCl jelenlétében nem tapasztaltunk a méretek között, amennyiben a biopolimerek kiindulási koncentrációja 0,375 mg/ml volt. A koncentráció növelésével (13. táblázat) azonban jelentősen kisebb hidrodinamikai méreteket mértük KCl jelenlétében.

13. táblázat

Az önrendeződő nanorészecskék hidrodinamikai méretének változása 1,0 mM KCl oldatban

(Mérési körülmények: pH = 3,0)

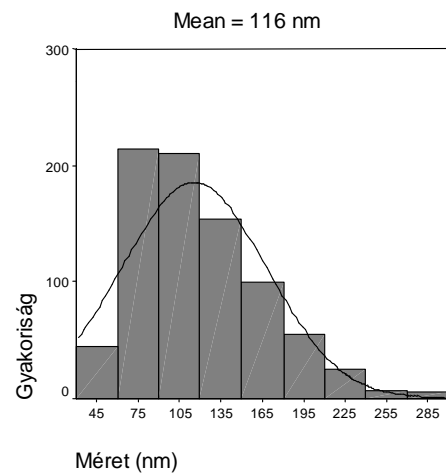
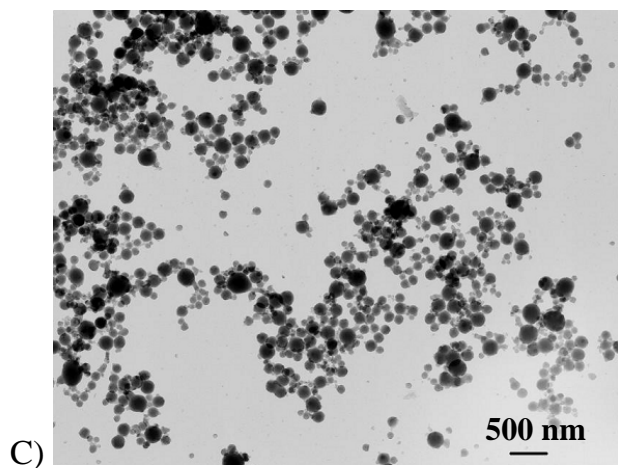
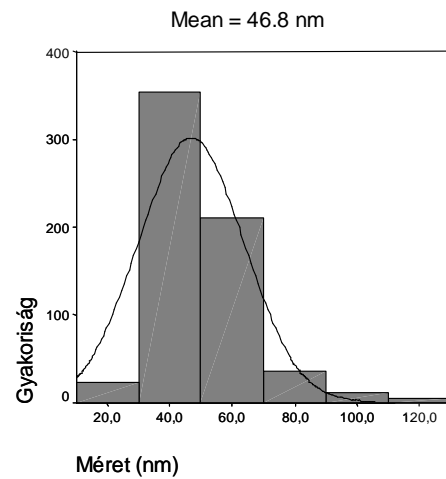
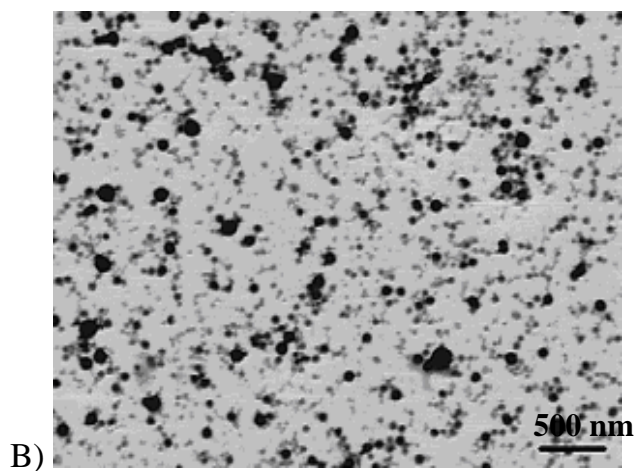
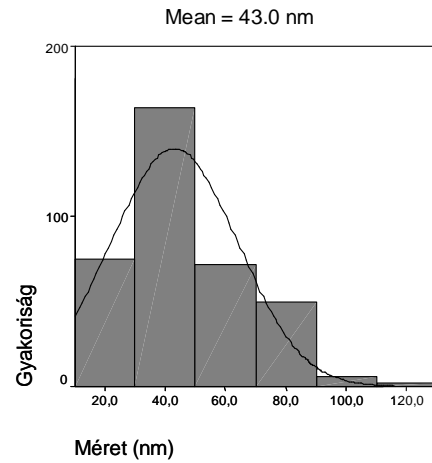
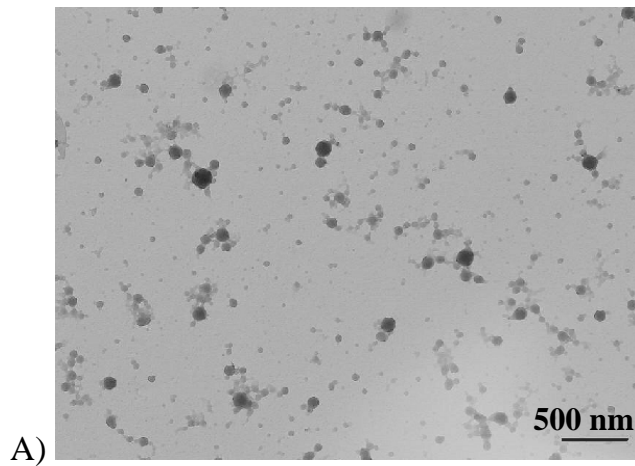
c (mg/ml)	Minta Hidrodinamikai sugár (nm)	PGA-	PGA-	PGA-	CH-	CH-	CH-
		CH 1:2	CH 1:1	CH 2:1	PGA 2:1	PGA 1:1	PGA 1:2
c = 0,375	Deszt. vízben	160±20	135±10	105±10	115±5	110±5	80±5
	KCl oldatban	158±15	141±15	124±20	110±15	107±5	76±5
c = 0,750	Deszt. vízben	379±80	299±80	-	186±10	147±10	-
	KCl oldatban	272±5	235±30	-	156±10	134±5	-

5.3.2.6. Az önrendeződő részecskék vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

A biopolimerek önrendeződése során jól elkülöníthető gömbszerű részecskék keletkeznek, melyek a TEM felvételeken jól láthatók (50. ábra).

A szilárd részecskék mérete kisebb, 20 nm és 290 nm között változik, méreteloszlása szűkebb a hidrodinamikai méretekhez viszonyítva. Az eredmények alátámasztják, hogy a lineáris biopolimerekből képződő részecskék vizes közegben nagymértékben duzzadnak.

A TEM felvételeken, illetve a hozzá kapcsolódó hisztogramokon is jól látható, hogy a komponensek összeöntésének sorrendje nagymértékben befolyásolja részecskék méretét és méreteloszlását is. Abban az esetben, amikor a kitozánhoz adjuk a PGA-t, kisebb méretű részecskék keletkeznek és a részecskék méreteloszlása is szűkebb, hasonlóan a fényszórás fotometriával meghatározott hidrodinamikai méretekhez.



50. ábra

Az önrendeződő nanorészecskék TEM felvételei és részecskeméret-eloszlása

A: CH-PGA 2:1, B: CH-PGA 1:1, C: PGA-CH 1:1

(Mérési körülmények: $c = 0,375$ mg/ml oldatot cseppentettünk, szobahőmérsékleten szárítottuk)

Az eredményeket összegezve megállapítható, hogy a kitozán és a PGA önrendeződésével stabilis nanorészecskék állíthatók elő vizes közegben, szobahőmérsékleten. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a kialakult részecskék oldhatóságát, méretét és felületi töltöttségét a biopolimerek koncentrációja, aránya, az összeöntés sorrendje, valamint az oldat pH-ja befolyásolja. Vizsgálataink alátámasztják, hogy a rossz oldhatóságú kitozán és az ionos kölcsönhatásban részt nem vevő aminocsoportok száma határozza meg döntő mértékben a kialakult önrendeződő rendszerek tulajdonságait. A szabad aminocsoportok számának csökkenésével a rendszer egyre opálosabb, csökken a részecskék oldhatósága, mérete, és természetesen a felületi töltöttsége. A pH növelésével nő a kialakult részecskék mérete, csökken az oldhatósága, és csökken a felületi töltöttség is. Megállapítottuk, hogy minél nagyobb a kialakult nanorészecskében a kitozán részaránya, annál stabilisabb rendszer keletkezik széles pH-tartományban.

6. Összefoglalás

Munkánk során megvalósítottuk a kitozán és a hialuronsav poliszacharidok intramolekuláris térhálósítását vizes közegben, vízoldható karbodiimid felhasználásával. A kitozán többértékű karbonsavakkal (borostyánkőssavval, almasavval, borkőssavval, citromsavval, poli-(etilén glikol)bisz(karboximetil)éterrel) végrehajtott térhálósítása során a kitozán aminocsoportjai reagálnak a térhálósító karboxilcsoportjaival; hialuronsav 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal történő térhálósítása során pedig a poliszacharid karboxilcsoportjai reagálnak a térhálósító aminocsoportjaival és savamid keresztkötés alakul ki. Megmutattuk, hogy a peptidszintézisek révén ismertté vált technika hatékonyan alkalmazható a kitozán és a hialuronsav poliszacharidok módosítására, térhálósítására savamid kötés kialakításával.

Megvizsgáltuk a képződött térhálós nanorészecskék tulajdonságait: szerkezetét, a térhálósság mértékét, oldatbeli viselkedését, méretét duzzadt és száraz állapotban.

A kitozán térhálósítása során megállapítottuk, hogy a térhálósítás mértéke, a térhálósító dikarbonsav hidrofil jellege, valamint a közeg pH-ja határozza meg a nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek opálosságát, transzmittanciáját. Meghatároztuk a térhálós kitozán nanorészecskék effektív átmérőjét, mely 290 nm és 340 nm között volt vizes közegben, és 60 nm – 300 nm között változott szilárd állapotban. A méretet nem befolyásolta jelentős mértékben sem a térhálósítás mértéke, sem a térhálósító hidrofil jellegének változása.

Megvizsgáltuk a kitozán molekulatömegének hatását a képződő nanorészecskék tulajdonságaira. Megállapítottuk, hogy a kitozán molekulatömegének csökkenésével hatékonyan csökkenthető a térhálós nanorészecskék mérete mind duzzadt, mind szilárd állapotban. Degradált kitozánból kiindulva sikerült 100 nm alatti effektív hidrodinamikai átmérőjű, valódi nanorészecskéket előállítani.

A hialuronsav térhálósítása során megállapítottuk, hogy a nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek opálossága, transzmittanciája független a hialuronsav molekulatömegétől és a közeg pH-jától, a térhálósítás mértéke határozza meg. Különböző molekulatömegű hialuronsavakból kiindulva megmutattuk, hogy a térhálós

hialuronsav nanorészecskék mérete hatékonyan csökkenthető a hialuronsav molekulatömegének csökkentésével és a térhálósítás mértékének növelésével. A fényszórás fotometriai mérések alapján megállapítottuk, hogy a részecskék méret szerinti eloszlása bimodális. Ez arra utal, hogy mind intra-, mind intermolekuláris kötések is létrejönnek a hialuronsav térhálósítása során. A szám szerinti megoszlást alapul véve azonban a nagy méretű részecskék száma elhanyagolható a kis méretűekéhez képest. Meghatároztuk a hialuronsav nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérőjét, mely 30 nm és 180 nm között változott vizes közegben, és 150 nm alatt volt szilárd állapotban.

Nanorészecskéket állítottunk elő a kitozán és a hialuronsav önrendeződésével vizes közegben (pH = 3,0), szobahőmérsékleten, a polielektrolit oldatok összeöntésével. Nagyobb polielektrolit-koncentrációk mellett csapadék-kiválást tapasztaltunk. Megmutattuk, hogy kis polielektrolit-koncentrációk mellett is a két poliszacharid önrendeződése nagy méretű, és széles méreteloszlású részecskék létrejöttét eredményezi. Mindkét polielektrolit poliszacharid, melyben a gyűrűk konformációja miatt a szabad rotáció gátolt, ami kihatással lehet a létrejövő rendszer stabilitására, méretére. Megállapítottuk, hogy az önrendeződő részecskék tanulmányozására a kitozán – hialuronsav rendszer nem megfelelő.

Nanorészecskéket állítottunk elő a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével vizes közegben, szobahőmérsékleten, a polielektrolit oldatok összeöntésével. Vizes közegben, a polielektrolitok funkcióscsoportjai között kialakuló ionos kölcsönhatás hidrophil nanorendszerek létrejöttét eredményezi a polimerek önrendeződésével. Megállapítottuk, hogy a rossz oldhatóságú kitozán szabad aminocsoportjai stabilizálják a kialakult nanorészecskéket, mivel abban az esetben, ha a létrejövő ion-ion kölcsönhatás után nem maradnak szabad aminocsoportok, a kitozánnal együtt a kialakult nanorendszer is kicsapódik. Megvizsgáltuk a képződött nanorészecskék tulajdonságait: oldatbeli viselkedését, méretét duzzadt és száraz állapotban, valamint elektroforetikus mobilitását. Megállapítottuk, hogy a biopolimerek koncentrációja, aránya, az összeöntés sorrendje, valamint a közeg pH-ja határozza meg nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek opálosságát. Meghatároztuk az önrendeződő nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérőjét, melyet a

polielektrolitok aránya, az összeöntés sorrendje, a sóhatás és a közeg pH-ja mellett a polielektrolitok koncentrációja is befolyásolja, ami igazolja a polimolekuláris önrendeződés kialakulását: a polielektrolitok koncentrációjával csökken az egyes részecskéket alkotó makromolekulák száma. Megmutattuk, hogy a kialakult nanorészecskék felületi töltöttségét döntő mértékben a kitozán szabad aminos csoportjai határozzák meg. Azon pH érték fölött, ahol a nanorészecske felületi töltöttsége negatív, a rendszer kicsapódik. Megállapítottuk, hogy a kialakult nanorészecskéket a kitozán protonált aminos csoportjai stabilizálják; pH-emelés hatására a kitozán aminos csoportjai deprotonálódnak, és a rendszer kicsapódik.

7. Summary

We have performed the intramolecular cross-linking of chitosan and hyaluronic acid polysaccharides in aqueous media by using carbodiimide. The cross-linking modification of chitosan was carried out by reacting polyvalent carboxylic acids (tartaric-, malic-, succinic-, citric acid, poly(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether). The cross-linker for the modification of hyaluronic acid was 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine). In the course of the cross-linking process, functional groups of polysaccharide and cross-linker can react to produce amide bonds. Thus, that the carbodiimide technique can be applied efficiently to form amide bonds for cross-linking modification of chitosan and hyaluronic acid polysaccharides.

Properties of cross-linked nanoparticles were investigated: their structure, ratio of cross-linking, properties in solution and their size in swollen and dried forms.

It was established in the course of cross-linking of chitosan, that the ratio of cross-linking, the hydrophilic character of dicarboxylic acids and the pH of the solution determined the opalescence and transmittance of the aqueous systems containing nanoparticles. The effective hydrodynamic diameter of cross-linked chitosan nanoparticles was measured and was found in the range of 290 nm to 340 nm in aqueous media, and varied between 60 nm and 300 nm in the dried state. The ratio of cross-linking and the hydrophilic character of cross-linker did not influence the size significantly.

The effect of molecular weight of chitosan on the properties of prepared nanoparticles was investigated. It was found that the size of nanoparticles in swollen as well as in dried state can be reduced efficiently by decreasing the molecular weight of chitosan. Nano-sized particles with a size under 100 nm were prepared successfully from degraded chitosan.

In the case of the cross-linking of hyaluronic acid, it was found that the opalescence and the transmittance of aqueous systems containing these nanoparticles were unaffected by the molecular weight of hyaluronic acid and the pH of the solution, but rather depended on the ratio of cross-linking. It was observed using hyaluronic acids with different molecular weight, that the size of hyaluronan nanoparticles was

dependent upon both the molecular weight and cross-linking ratio. The size distribution of nanoparticles was bimodal measured by light scattering. This fact suggests that intra- as well as intermolecular interactions can occur in the course of cross-linking of hyaluronic acid. The number of large particles formed intermolecular linkage is negligible comparing to the small particles calculated on the base of the size distribution by number values. Effective hydrodynamic diameter of hyaluronan nanoparticles was measured, it varied between 30 nm and 180 nm in aqueous media, and it was below 150 nm in the dried state.

Nanoparticles were prepared by self-assembly of chitosan and hyaluronic acid biopolymers in aqueous media (pH = 3.0), at room temperature by mixing the polyelectrolyte solutions. Precipitation was observed when polyelectrolyte solutions at high concentrations were used. It was shown, that self-assembly of these distribution, independent of the concentration of polyelectrolytes. polyelectrolytes are polysaccharides, The conformation of rings in the polysaccharide-based polyelectrolytes and the attractive and repulsive interactions between the polymer segments strongly influence the stability of the systems and the size of particles, respectively. It was concluded, that the chitosan – hyaluronic acid system is not appropriate to study the self-assembly of particles.

Stable nanoparticles were prepared by self-assembly of chitosan and poly- γ -glutamic acid in aqueous media at ambient temperature by mixing polyelectrolyte solutions. Hydrophilic nanoparticles can be obtained by self-assembly of these biopolymers based on the ion-ion interactions between functional groups of polyelectrolytes. It was detected that the residual amino groups of the poorly soluble chitosan stabilized the particulate systems. However the self-assembled nanosystem precipitated in the case when all of the amino groups of chitosan were bound. Properties of nanoparticles were investigated and these include: solution properties, size in swollen and dried state and electrophoretic mobility. It was established that the effective hydrodynamic diameter of self-assembled nanoparticles and the opalescence of aqueous systems containing nanoparticles can be influenced by the ratio of polyelectrolytes, order of addition, salt effect, pH of the solution and the concentration of polyelectrolytes. These results confirm the polymolecular self-assembly: the number of macromolecules involved in

the particles decreased by decreasing the concentration of polyelectrolytes. It was detected, that the residual amino groups of chitosan appreciably affected the surface charge of nanoparticles. At higher pH values, as the nanoparticles are negatively charged, unstable nanoparticles can form and the system can precipitate. At lower pH the amino groups of chitosan are positively charged, which stabilizes the system.

8. Irodalomjegyzék

- ¹ P. Sorlier, C. Viton, A. Domard, *Biomacromolecules* 3, 1336. (2002)
- ² C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, A. Domard, *Biomacromolecules* 4, 641. (2003)
- ³ G. Berth, H. Dautzenberg, M. G. Peter, *Carbohydr. Polym.* 36, 205. (1998)
- ⁴ Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida, *Carbohydr. Res.* 337, 561. (2002)
- ⁵ F. Tian, Y. Liu, K. Hu, B. Zhao, *Carbohydr. Polym.* 57, 31. (2004)
- ⁶ S. Mao, X. Shuai, F. Unger, M. Simon, D. Bi, T. Kissel, *Int. J. Pharm.* 281, 45. (2004)
- ⁷ V. Dodane, V. D. Vilivalam, *Pharm. Sci. Technol. Today* 6, 246. (1998)
- ⁸ R. Hejazi, M. Amiji, *J. Control. Release* 89, 151. (2003)
- ⁹ S. Mitra, U. Gaur, P. C. Ghosh, A. N. Maitra, *J. Control. Release* 74, 317. (2001)
- ¹⁰ J.-K. F. Suh, H. W. T. Matthew, *Biomaterials* 21, 2589. (2000)
- ¹¹ E. Khor, L. Y. Lim, *Biomaterials* 24, 2339. (2003)
- ¹² G. Borchard, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 52, 145. (2001)
- ¹³ B. Krajewska, *Enzyme Microb. Technol.* 35, 126. (2004)
- ¹⁴ S. S. Betigeri, S. H. Neau, *Biomaterials* 23, 3627. (2002)
- ¹⁵ V. M. Boddu, E. D. Smith: A composite chitosan biosorbent for adsorption of heavy metals from wastewaters, 23rd Army Science Conference, Orlando, FL, 2002.
- ¹⁶ R.-S. Juang, H.-J. Shao, *Water Res.* 36, 2999. (2002)
- ¹⁷ O. Gyliene, R. Rekertas, M. Salkauskas, *Water Res.* 36, 4128. (2002)
- ¹⁸ F. Shahidi, J. K. V. Arachchi, Y.-J. Jeon, *Trends Food Sci. Tech.* 10, 37. (1999)
- ¹⁹ Majeti N. V. Ravi Kumar, *React. Funct. Polym.* 46, 1. (2000)
- ²⁰ I. Gatej, M. Popa, M. Rinaudo, *Biomacromolecules* 6, 61. (2005)
- ²¹ R. Mendichi, L. Soltes, A. G. Schieron, *Biomacromolecules* 4, 1805. (2003)
- ²² T. Miyazaki, C. Yomota, S. Okada, *Polym. Degrad. Stabil.* 74, 77. (2001)
- ²³ E. Gura, M. Hüchel, P.-J. Müller, *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 297. (1998)
- ²⁴ E. Drímalova, V. Vladimír, V. Sasinkova, Z. Hromadkova, A. Ebringerova, *Carbohydr. Polym.* 61, 420. (2005)
- ²⁵ J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* 24, 4337. (2003)
- ²⁶ J. B. Leach, C. E. Schmidt, *Biomaterials* 26, 125. (2005)
- ²⁷ H. S. Yoo, E. A. Lee, J. J. Yoon, T. G. Park, *Biomaterials* 26, 1925. (2005)
- ²⁸ H. Li, Y. Liu, X. Z. Shu, S. D. Gray, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules* 5, 895. (2004)
- ²⁹ S. T. Lim, G. P. Martin, D. J. Berry, M. B. Brown, *J. Control. Release* 66, 281. (2000)
- ³⁰ Y. Luo, M. R. Ziebell, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules* 1, 208. (2000)
- ³¹ Medzihradszky Kálmán, *Magyar Kémikusok Lapja* 37 (10),
- ³² M. Ashiuchi, H. Nakamura, T. Yamamoto, T. Kamei, K. Soda, C. Park, M.-H. Sung, T. Yagi, H. Misono, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 23, 249. (2003)
- ³³ M. Obst, A. Steinbüchel, *Biomacromolecules* 5, 1166. (2004)
- ³⁴ W.-C. Lin, D.-G. Yu, M.-C. Yang, *Colloid. Surface. B.* 47, 43. (2006)
- ³⁵ X. Chen, S. Chen, M. Sun, Z. Yu, *Bioresour. Technol.* 96, 1872. (2005)
- ³⁶ I.-L. Shih, P.-J. Wu, C.-J. Shieh, *Process Biochem.* 40, 2827. (2005)
- ³⁷ H. Xu, M. Jiang, H. Li, D. Lu, P. Ouyang, *Process Biochem.* 40, 519. (2005)
- ³⁸ I.-L. Shih, Y.-T. Van, *Bioresour. Technol.* 79, 207. (2001)
- ³⁹ M. Taniguchi, K. Kato, A. Shimauchi, X. Ping, H. Nakayama, K.-I. Fujita, T. Tanaka, Y. Tarui, E. Hirasawa, *J. Biosci. Bioeng.* 99(3), 245. (2005)
- ⁴⁰ H. Yokoi, T. Arima, J. Hirose, S. Hayashi, Y. Takasaki, *J. Ferm. Bioeng.* 82(1), 84. (1996)
- ⁴¹ M. Taniguchi, K. Kato, A. Shimauchi, X. Ping, K.-I. Fujita, T. Tanaka, Y. Tarui, E. Hirasawa, *J. Biosci. Bioeng.* 99(2), 130. (2005)
- ⁴² T. Akagi, M. Baba, M. Akashi, *Polymer* 48, 6729. (2007)

-
- ⁴³ P.-W. Lee, S.-F. Peng, C.-J. Su, F.-L. Mi, H.-L. Chen, M.-C. Wei, H.-J. Lin, H.-W. Sung, *Biomaterials* 29, 742. (2008)
- ⁴⁴ T. Akagi, X. Wang, T. Uto, M. Baba, M. Akashi, *Biomaterials* 28, 3427. (2007)
- ⁴⁵ T. Akagi, T. Kaneko, T. Kida, M. Akashi, *J. Control. Release* 108, 226. (2005)
- ⁴⁶ M. Matsusaki, H. Yoshida, M. Akashi, *Biomaterials* 28, 2729. (2007)
- ⁴⁷ K. Y. Lee, S. H. Yuk, *Progr. Polym. Sci.* 32, 669. (2007)
- ⁴⁸ W. Xie, P. Xu, W. Wang, Q. Liu, *Carbohydr. Polym.* 50, 35. (2002)
- ⁴⁹ A. Heras, N. M. Rodríguez, V. M. Ramos, E. Agulló, *Carbohydr. Polym.* 44, 1. (2001)
- ⁵⁰ V. M. Ramos, N. M. Rodríguez, M. F. Díaz, M. S. Rodríguez, A. Heras, E. Agulló, *Carbohydr. Polym.* 52, 39. (2003)
- ⁵¹ V. M. Ramos, N. M. Rodríguez, M. S. Rodríguez, A. Heras, E. Agulló, *Carbohydr. Polym.* 51, 425. (2003)
- ⁵² K. R. Holme, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.* 302, 7. (1997)
- ⁵³ Y. Hu, H. Jiang, C. Xu, Y. Wang, K. Zhu, *Carbohydr. Polym.* 61, 472. (2005)
- ⁵⁴ M. Sugimoto, M. Morimoto, H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Shigemasa, *Carbohydr. Polym.* 36, 49. (1998)
- ⁵⁵ J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas, R. Gurny, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 19. (2004)
- ⁵⁶ O. A. C. Monteiro Jr., C. Airoidi, *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 119. (1999)
- ⁵⁷ S. Lin-Gibson, H. J. Walls, S. B. Kennedy, E. R. Welsh, *Carbohydr. Polym.* 54, 193. (2003)
- ⁵⁸ Y.J. Yin, F. Zhao, X.F. Song, K.D. Yao, W.W. Lu, J.C. Leong, *J. Appl. Polym. Sci.* 77, 2929. (2000)
- ⁵⁹ K.D. Yao, T. Peng, M.F.A. Goosen, J.M. Min, Y.Y. He, *J. Appl. Polym. Sci.* 48, 343. (1993)
- ⁶⁰ C. Qin, K. Xiao, Y. Du, X. Shi, J. Chen, *React. Funct. Polym.* 50, 165. (2002)
- ⁶¹ P. Mukoma, B. R. Jooste, H. C. M. Vosloo, *J. Power Sources* 136, 16. (2004)
- ⁶² G. Crini, *Prog. Polym. Sci.* 30, 38. (2005)
- ⁶³ F.-L. Mi, C.-Y. Kuan, S.-S. Shyu, S.-T. Lee, S.-F. Chang, *Carbohydr. Polym.* 41, 389. (2000)
- ⁶⁴ V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan, *Int. J. Pharm.* 274, 1. (2004)
- ⁶⁵ K. A. Janes, M. P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra, M. J. Alonso, *J. Control. Release* 73, 255. (2001)
- ⁶⁶ X. Z. Shu, K. J. Zhu, *Int. J. Pharm.* 201, 51. (2000)
- ⁶⁷ L. Y. Lim, L. S. Wan, P. Y. Thai, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23, 981. (1997)
- ⁶⁸ S. E. Kim, J. H. Park, Y. W. Cho, H. Chung, S. Y. Jeong, E. B. Lee, I. C. Kwon, *J. Control. Release* 91, 365. (2003)
- ⁶⁹ T. Banerjee, S. Mitra, A. K. Singh, R. K. Sharma, A. Maitra, *Int. J. Pharm.* 243, 93. (2002)
- ⁷⁰ A. Berthold, K. Cremer, J. Kreuter, *J. Control. Release* 39, 17. (1996)
- ⁷¹ S. R. Jameela, A. Jayakrishnan, *Biomaterials* 16, 769. (1995)
- ⁷² A. Aggarwal, S. Kaur, A. K. Tiwary, S. Gupta, *J. Microencapsul.* 18, 819. (2001)
- ⁷³ I. Orienti, K. Aiedeh, E. Gianasi, V. Bertasi, V. Zecchi, *J. Microencapsul.* 13, 463. (1996)
- ⁷⁴ P. He, S. S. Davis, L. Illum, *Int. J. Pharm.* 187, 53. (1999)
- ⁷⁵ S. T. Lim, G. P. Martin, D. J. Berry, M. B. Brown, *J. Control. Release* 66, 281. (2000)
- ⁷⁶ I. Simkovic, M. Hricovíni, L. Soltés, R. Mendichi, C. Cosentino, *Carbohydr. Polym.* 41, 9. (2000)
- ⁷⁷ X. Zeng, E. Ruckenstein, *J. Membr. Sci.* 148, 195. (1998)
- ⁷⁸ Y. Wu, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu, *Int. J. Pharm.* 295, 235. (2005)
- ⁷⁹ H. Zhang, M. Oh, C. Allen, E. Kumacheva, *Biomacromolecules* 5, 2461. (2004)

-
- ⁸⁰ X. Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M. C. Roberts, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules* 3, 1304. (2002)
- ⁸¹ K. S. Masters, D. N. Shah, L. A. Leinwand, K. S. Anseth, *Biomaterials* 26, 2517. (2005)
- ⁸² Y. Liu, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, *Biomaterials* 26, 4737. (2005)
- ⁸³ Y. Luo, K. R. Kirker, G. D. Prestwich, *J. Control. Release* 69, 169. (2000)
- ⁸⁴ Y. H. Yun, D. J. Goetz, P. Yellen, W. Chen, *Biomaterials* 25, 147. (2004)
- ⁸⁵ V. Dulong, S. Lack, D. Le Cerf, L. Picton, J. P. Vannier, G. Muller, *Carbohydr. Polym.* 57, 1. (2004)
- ⁸⁶ G. D. Prestwich, D. M. Marecak, J. F. Marecek, K. P. Vercruyssen, M. R. Ziebell, *J. Control. Release* 53, 93. (1998)
- ⁸⁷ T. Segura, B. C. Anderson, P. H. Chung, R. E. Webber, K. R. Shull, L. D. Shea, *Biomaterials* 26, 359. (2005)
- ⁸⁸ X. Z. Shu, Y. Liu, F. S. Palumbo, Y. Luo, G. D. Prestwich, *Biomaterials* 25, 1339. (2004)
- ⁸⁹ Y. D. Park, N. Tirelli, J. A. Hubbell, *Biomaterials* 24, 893. (2003)
- ⁹⁰ J. A. Burdick, C. Chung, X. Jia, M. A. Randolph, R. Langer, *Biomacromolecules* 6, 386. (2005)
- ⁹¹ A. Sannino, S. Pappada, M. Madaghiele, A. Maffezzoli, L. Ambrosio, L. Nicolais, *Polymer* 46, 11206. (2005)
- ⁹² S.-N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, H. Suh, *Biomaterials* 24, 1631. (2003)
- ⁹³ X. Z. Shu, Y. Liu, F. Palumbo, G. D. Prestwich, *Biomaterials* 24, 3825. (2003)
- ⁹⁴ S.-N. Park, J.-C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, H. Suh, *Biomaterials* 23, 1205. (2002)
- ⁹⁵ J. S. Mao, H. F. Liu, Y. J. Yin, K. D. Yao, *Biomaterials* 24, 1621. (2003)
- ⁹⁶ E. Esposito, E. Menegatti, R. Cortesi, *Int. J. Pharm.* 288, 35. (2005)
- ⁹⁷ S. Vasiliu, M. Popa, M. Rinaudo, *Eur. Polym. J.* 41, 923. (2005)
- ⁹⁸ S. T. Lim, B. Forbes, D. J. Berry, G. P. Martin, M. B. Brown, *Int. J. Pharm.* 231, 73. (2002)
- ⁹⁹ Q. Feng, G. Zeng, P. Yang, C. Wang, J. Cai, *Colloid. Surface. A.* 257-258, 85. (2005)
- ¹⁰⁰ C.-Y. Hsieh, S.-P. Tsai, D.-M. Wang, Y.-N. Chang, H.-L. Hsieh, *Biomaterials* 26, 5617. (2005)
- ¹⁰¹ W. Liu, S. Sun, Z. Cao, X. Zhang, K. Yao, W. W. Lu, K. D. K. Luk, *Biomaterials* 26, 2705. (2005)
- ¹⁰² J. Du, J. Dai, J.-L. Liu, T. Dankovich, *React. Funct. Polym.* 66, 1055. (2006)
- ¹⁰³ Y.-H. Lin, F.-L. Mi, C.-T. Chen, W.-C. Chang, S.-F. Peng, H.-F. Liang, H.-W. Sung, *Biomacromolecules* 8, 146. (2007)
- ¹⁰⁴ Y.-H. Lin, C.-K. Chung, C.-T. Chen, H.-F. Liang, S.-C. Chen, H.-W. Sung, *Biomacromolecules* 6, 1104. (2005)
- ¹⁰⁵ Furka Árpád: *Szerves kémia*, Tankönyvkiadó, Budapest (1991)
- ¹⁰⁶ Kovács Kálmán, Halmos Miklós: *A szerves kémia alapjai*, Tankönyvkiadó, Budapest (1974)
- ¹⁰⁷ Bruckner Győző: *Szerves kémia*, Tankönyvkiadó, Budapest (1961)
- ¹⁰⁸ Dr. Lempert Károly: *Szerves kémia*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1976)
- ¹⁰⁹ G. A. F. Roberts, J. G. Domszy, *Int. J. Biol. Macromol.* 4(6), 374. (1982)
- ¹¹⁰ K. M. Varum, M. W. Anthonsen, H. Grasdalen, O. Smidsrod, *Carbohydr. Res.* 211, 17. (1991)
- ¹¹¹ A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, *Polym. Bull.* 26, 87. (1991)
- ¹¹² W. E. Krause, E. G. Bellomo, R. H. Colby, *Biomacromolecules* 2, 65. (2001)
- ¹¹³ M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely, *Macromol. Symp.* 227, 321. (2005)
- ¹¹⁴ M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely, *Biomacromolecules* 6, 2521. (2005)
- ¹¹⁵ N. Kubota, N. Tatsumoto, T. Sano, K. Toya, *Carbohydr. Res.* 324, 268. (2000)

¹¹⁶ G. Crini, G. Torri, M. Guerrini, M. Morcellet, M. Weltrowski, B. Martel, *Carbohydr. Polym.* 33, 145. (1997)

¹¹⁷ H. Sugiyama, K. Hisamichi, K. Sakai, T. Usui, J.-I. Ishiyama, H. Kudo, H. Ito, Y. Senda, *Bioorgan Med. Chem.* 9, 211. (2001)

¹¹⁸ M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely, *Biomacromolecules* 7, 3030. (2006)

¹¹⁹ I. Hajdu, M. Bodnar, G. Filipcsei, J. F. Hartmann, L. Daroczi, M. Zrinyi, J. Borbely, *Colloid Polym. Sci.* (közlés alatt)

9. Tudományos közlemények és konferencia-részvételek

9.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Magdolna Bodnár, John F. Hartmann, János Borbély
Nanoparticles from Chitosan
Polymer Preprints **2004**, 45(2),307-308.
2. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from Chitosan
Macromolecular Symposia **2005**, 227, 321-326.
IF: 0,913
3. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles
Biomacromolecules **2005**, 6, 2521-2527.
IF: 3,618
4. Bodnár Magdolna, Daróczi Lajos, Borbély János
Térhálós kitozán nanorészecskék előállítása és jellemzése
Műanyag és Gumi, **2005**, 42(8), 316-319.
5. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles
Biomacromolecules **2006**, 7(11), 3030-3036.
IF: 3,618 (2005)
6. Magdolna Bodnar, Lajos Daroczi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Synthesis and study of crosslinked chitosan-N-poly(ethylene glycol) nanoparticles
Polymer Preprints **2006**, 47(1), 460-461.
7. Istvan Hajdu, Magdolna Bodnár, Genovéva Filipcsei, John F. Hartmann, Lajos Daróczi, Miklós Zrínyi, János Borbély
Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly- γ -glutamic Acid
Colloid and Polymer Science **2007**, (közlés alatt)
IF: 1,263 (2005)
8. Magdolna Bodnar, Istvan Hajdu, Genoveva Filipcsei, Lajos Daroczi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly-gamma-glutamic acid
Nanotech Conference Publications **2007**, (2), 143-146.

9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia-részvételek

1. Bodnár Magdolna, Borók Imre, Borbély János
Poliszacharidok módosítása
IX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, November 14-16 2003.
(előadás)
2. Fleischer Radu Judit Éva, Novák Levente, Rente Tünde, Bodnár Magdolna, Borbély János
Biopolimerek módosítása nanostruktúra kialakítása céljából
IX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, November 14-16 2003.
(előadás)
3. Üveges Andrea, Bodnár Magdolna, Borbély János
Makromolekulás nanorendszerek előállítása
Mechanoplast I. Országos Doktorandusz Konferencia, Budapest, Június 10 2004.
(előadás)
4. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from chitosan
17th Polymer Networks Group Meeting, Bethesda, MD, USA, August 15-19 2004.
(poszter)
5. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from chitosan
228th ACS National Meeting, Philadelphia, USA, August 22-26 2004.
(poszter)
6. Bodnár Magdolna, Borbély János
Nanorészecskék előállítása kitozánból
IX. Szemcseméret-analitikai, Környezetvédelmi és Porotechnológiai Szimpózium, Balatonfüred, Szeptember 5-7 2004.
(poszter)
7. Magdolna Bodnar, Melinda Szaloki, Veres Adrienn, Imre Borok, Janos Borbely
Synthesis of polymeric nanoparticles
2nd European Students Conference on Physical, Organic, and Polymer Chemistry, Bécs, Ausztria, September 15-17 2004.
(előadás)

-
8. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from chitosan
2nd European Students Conference on Physical, Organic, and Polymer Chemistry, Bécs, Ausztria, September 15-17 2004.
(poszter)
 9. Magdolna Bodnar, Janos Borbely
Chitosan-based crosslinked nanoparticles
International Symposium on Polymer Conetworks, Gels and Membranes, Budapest, September 11-13 2005.
(poszter)
 10. Magdolna Bodnar, Lajos Daroczi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Synthesis and study of crosslinked chitosan-N-poly(ethylene glycol) nanoparticles
231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, March 24-29 2006.
(poszter)
 11. Magdolna Bodnar, AL Kjřniksen, John F. Hartmann, B Nystrřm, Janos Borbely
Preparation and characterization of chitosan nanoparticles crosslinked with poly(ethylene glycol)
8th International Hydrocolloids Conference, Trondheim, Norway, June 18-22 2006.
(előadás)
 12. Tunde Rente, Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Hyaluronic acid-based crosslinked nanoparticles
8th International Hydrocolloids Conference, Trondheim, Norway, June 18-22 2006.
(előadás)
 13. M. Bodnar, I. Hajdu, G. Filipcsei, L. Daroczi, J. F. Hartmann, J. Borbely
Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly-γ-glutamic Acid
NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.
(poszter)
 14. Magdolna Bodnar, Istvan Hajdu, Genoveva Filipcsei, John F. Hartmann, Tamara Minko, Janos Borbely
Formation and characterization of polyelectrolyte complexes based on self-assembly of chitosan and poly-γ-glutamic acid
EPF, Portoroz, Slovenia, July 2-6 2007.
(előadás)

-
15. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Preparation and Characterization of Chitosan-based Nanoparticles
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Október 3-5 2007.
(előadás)

9.3. Egyéb publikációs tevékenység

1. Bodnár Magdolna, Culpepper Matthew, Borók Imre, Daróczi Lajos, Borbély János
Foszfinzármezéket tartalmazó makromolekuláris kolloidok előállítása emulzióban
Műanyag és Gumi, **2003**, 40(8), 268-271.
2. Tóth Zoltán, Bodnár Magdolna
Kísérletek a kémia tankönyvekben
Iskolakultúra, **2004**, 14 (1), 106-112.
3. Magdolna Bodnar, Mohamed Fawzi, Janos Borbely
Nanoparticles Formed by Poly-gamma-glutamic acid and Lead Ion Complexation
Polymer Preprints, **2006**, 94, 402-403.
4. Magdolna Bodnar, Anna-Lena Kjoniksen, John F. Hartmann, Lajos Daroczi, Bo Nystrom, Janos Borbely
Nanoparticles Formed by Complexation of Poly-gamma-glutamic Acid with Lead Ions
Nanotech Conference Publications **2007**, (1), 309-312.
5. Magdolna Bodnár, Anna-Lena Kjøniksen, Reka Molnar, John F. Hartmann, Lajos Daróczi, Bo Nyström, János Borbély
Nanoparticles formed by complexation of poly-gamma-glutamic acid with lead ions
Journal of Hazardous Materials, **2007** (közlés alatt)
IF: 1,544 (2005)
6. Magdolna Bodnar, Tamara Minko, John F. Hartmann, Janos Borbely
Fluorescent Nanoparticles Based on Chitosan
Nanotech Conference Publications **2007**, (2), 279-282.

9.4. Egyéb konferencia-részvétel

1. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Preparation of core-shell nanoparticles from chitosan
Polymer Gels and Networks, Prága, Csehország, July 10-14 2005.
(poszter)
2. Magdolna Bodnar, Mohamed Fawzi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles formed by poly-gamma-glutamic acid and lead ion complexation
231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, March 24-29 2006.
(poszter)
3. Andrea Üveges, Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Polymeric nanoparticles by crosslinking polymerization
231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, March 24-29 2006.
(poszter)
4. M. Bodnar, A.-L. Kjøniksen, J. F. Hartmann, L. Daroczi, B. Nyström, J. Borbely
Nanoparticles Formed by Complexation of Poly- γ -glutamic Acid and Lead Ions
NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.
(poszter)
5. M. Bodnar, T. Minko, J. F. Hartmann, J. Borbely
Fluorescent Nanoparticles Based on Chitosan
NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.
(poszter)
6. Zsolt Keresztessy, Magdolna Bodnar, Elizabeth Ber, Istvan Hajdu, Min Zhang, John F. Hartmann, Tamara Minko, Janos Borbely
Self-Assembling Nanoparticles for Targeted Drug Delivery
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Október 3-5 2007.
(előadás)
7. Istvan Hajdu, Magdolna Bodnar, Dezsó Kazup, Zsolt Keresztessy, John F. Hartmann, Janos Borbely
Self-Assembled Nanoparticles for Intracellular DNA Delivery
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Október 3-5 2007.
(poszter)

9.5. Szabadalom

1. Janos Borbely, Magdolna Bodnar
Nanoparticles from Chitosan
U. S. Patent, Serial No. 11,091,940 (Filed: March 28, 2005)
2. Janos Borbely, Magdolna Bodnar, Reka Melinda Molnar, Ildiko Schriffertne Denyicska
Pb²⁺ ion Binding by Cross-linked Polyacid-Based Nanoparticles
U. S. Patent, Serial No. 60/737,606 (Filed: November 17, 2005)
3. Janos Borbely, Magdolna Bodnar, Istvan Hajdu, John F. Hartmann
Polymeric Nanoparticles by Ion-Ion Interactions
U. S. Patent, Serial No. 60/833,672 (Filed: July 27, 2006)
4. Janos Borbely, Magdolna Bodnar, Tunde Rente, Ildiko Schriffertne Denyicska
Hyaluronic Acid-Based Cross-linked Nanoparticles
U. S. Patent, Serial No. 11/645,094 (Filed: December 22, 2006)