

Válasz Dr. Hórvölgyi Zoltán bírálatára

Először is megköszönöm Dr. Hórvölgyi Zoltán alapos bírálói munkáját és támogató véleményét. A Professzor Úr által megfogalmazott kérdésekre, segítő szándékú javaslatokra, kritikai megjegyzésekre és észrevételekre az alábbiakban válaszolok.

Kérdés:

1. *Milyen elvek mentén tudta javítani a kapszulázási hatékonyságot és a hatóanyag tartalmat?*

Válasz: Az általunk vizsgált gyógyszerhordozó polimer nanorészecskék előállítási technikái (emulziós, nanoprecipitációs eljárások) esetében mátrix szerkezetű szemcsék keletkeznek. Fontos tapasztalatunk ezek esetében, hogy ha a hatóanyag koncentrációja a hordozó polimerhez képest hozzávetőleg 10% (m/m) fölé emelkedik, akkor a kapszulázási hatékonyság rohamosan csökken. Ennek az elvi okát abban látom, hogy a hordozó polimerek és az általunk vizsgált hatóanyagok között hidrofób-hidrofób kölcsönhatás alakult ki, még a hidrofil (fehérje típusú) aktív komponensek esetében is. Ennél erősebb kölcsönhatások (pl. ionos) esetében várható nagyobb hatóanyagtartalom magas kapszulázási hatékonysággal. Bár a hatóanyagtartalom az említett értéknél lényegesen magasabbra is növelhető, azonban a hatóanyag egyre nagyobb hányada a felszínen vagy ahhoz közel fog elhelyezkedni, ami a szervezetbe kerülve a kezdeti gyors kioldódás/leemosódás során szinte azonnal fel fog szabadulni. Az említett jelenséget is szem előtt tartva, a kapszulázási hatékonyság és a hatóanyagtartalom együttes növelésének legfontosabb eszköze a polimerkoncentráció megnövelése a szerves fázisban, ugyanis az így megnövelt viszkozitású polimer oldaton sokkal nehezebben jut át a hatóanyag a vizes oldatba, mint a híg oldatán keresztül. A polimerkoncentráció megemlése viszont a részecskeméret növekedése felé hat, ami az immunrendszer makrofágjainak felismerő mechanizmusa és a szűréssel történő sterilizálhatóság szempontja miatt a parenterális alkalmazásoknál nem kedvező.

Kérdés:

2. *A porlasztva szárítás révén keletkező részecskék méretét vajon hogyan befolyásolja az oldat vagy szuszpenzió felületi feszültsége? I. 2.5.3 fejezet (27. o.)*

Válasz: A porlasztás során létrejövő cseppméretet elsősorban a fúvóka átmérője határozza meg, és ennek megfelelően ez az elsődleges faktor a részecskeméret kialakításában. Emellett azonban fontos szerepet játszik a porlasztandó folyadék viszkozitása és felületi feszültsége is. A felületi feszültség és a hidrodinamikai tulajdonságok eredményeképpen a folyadékaramból megfelelő méretű folyadékcseppek szakadnak le. Minél nagyobb a folyadék felületi feszültsége, annál nagyobb energiára van szükség a folyadékcseppek leszakításához.

A porlasztás esetében a maximális cseppátmérő számítására a Bär-egyenletet használják:

$$d_{max} = \frac{8K\sigma_f}{\rho_f v_0^2}$$

ahol d: maximális csepp átmérő [m], K: anyagi állandó [-], σ_f : felületi feszültség [N/m], ρ_f : folyadék sűrűsége [kg/m³], v_0 : relatív sebesség [m/s].

Kérdés:

3. *A szorafenibet tartalmazó polimer nanorészecskék előállítása során (I. 3.1.3 első bekezdése, 30. o.) az emulgeátoroknak milyen szerepe van? Keletkezik egyáltalán emulzió a nanoprecipitációs eljárás során?*

Válasz: Az alkalmazott nanoprecipitációs eljárás során a polimer és hatóanyag szerves oldószeres oldatát elegyítettük az emulgeátor vizes oldatával. Célszerű a polimer oldat gyors és egyenletes összekeverése a polimert és a hatóanyagot nem oldó (antiszolvens) vízzel. Az oldhatósági gátat átlépve, a túltelítés hatására néhány nanométertől akár több mikrométer méretű részecskékké alakulva a folytonos fázisban kicsapódik az oldott anyag. A nanorészecskék létrejöttének 3 fontos lépése történik ilyenkor: 1. a szerves oldat keveredik az antiszolvenssel, 2. az oldott molekulák oldatbeli gyors telítődése és túltelítettsége a kritikus nukleációs koncentráció eléréséhez azaz nukleációhoz vezet, majd 3. aggregálódásuk következik, mely a nanorészecskék méretének növekedését eredményezi. A kritikus nukleációs méretet a térfogati szabad energia és a határfelületi energia egyensúlya határozza meg. A nagy túltelítés csökkenti a nukleációs energiagátat, ami segíti sok kis részecske keletkezését. A nukleáció megindulásával a nanorészecskék növekedése az oldott anyag diffúziójával valósul meg, melyet Fick-törvénye ír le. A fluxus arányos a koncentráció-gradienssel. A gyors diffúzió egységes részecskenövekedést okoz, a helyi koncentráció változása a részecskék heterogenitásához vezet, ezért fontos az intenzív keverés. Mind kinetikai, mind termodinamikai tényezők fontos szerepet játszanak a részecskeszerkezet és méreteloszlás kialakulásában. Keveredési és diffúziós folyamatok is lejátszódnak egyidejűleg. Mind az oldott anyagok fizikokémiai tulajdonságai az elegyben, mind az oldat és az antiszolvens közötti keveredési dinamika kritikus a túltelítés létrehozásában. A határfelületi feszültség fontos szerepet játszik a nanorészecskék stabilizálásában, hiszen a felületaktív anyagok csökkentik a határfelületi energiát, ezáltal a koaleszcenciát megakadályozzák. A kérdésre röviden válaszolva: emulzió ebben a rendszerben csak rövid ideig keletkezhet, mivel az acetonban oldott polimer lassíthatja a szerves oldószer elegyedését a vízzel, mégis a fent említettek miatt az emulgeátorok fontos szerepet játszanak a nanorészecskék kialakulásában.

Kérdés:

4. *Az emulziós oldószer elpárologtatási módszer esetén a szerves oldószer eltávozása a vízfázison keresztül valósul meg. Ennek révén mindig kinetikailag stabil vizes közegű diszperzió keletkezik? pl. I. 3.1.3 (második bekezdése, 30. o.)*

Válasz: Ahhoz, hogy stabil, nem ülepedő méretű szemcsék keletkezzenek, alapvető feltétel olyan felületaktív anyag alkalmazása (lásd még 11. válasz) és olyan koncentrációban, ami az oldószer elpárologtatás során megakadályozza a szemcsék aggregálódását és kiülepedését. A PVA nagy előnye pontosan ebben rejlik, hogy olaj-a-vízben emulziót is képes kialakítani és emellett a képződő szuszpenziót is tudja stabilizálni.

Kérdés:

5. *Lát-e lehetőséget, hogy az egyes hatóanyagokra kifejlesztett receptúrák más hatóanyagokra is alkalmasak lehetnek? Erre utalhat, hogy az IFN (interferon)- β modellezésére (41-42. o.) BSA-t használt.*

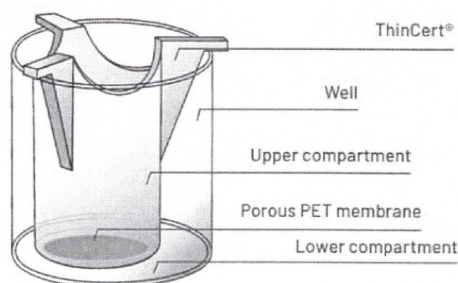
Válasz: A fehérjék (BSA, HSA, interferonok) mikrokapszulázására használt receptúrákat jól tudtuk alkalmazni lizozim modellfehérje és hasonlóan erős pozitív töltéssel bíró minifehérjék mikrokapszulázására is. A hatóanyagtartalom és a kapszulázási hatékonyság ezeknél a fehérjéknél hasonló függést mutatott a dolgozatban bemutatott paraméterektől. Megjegyzendő azonban, hogy ezen fehérjék jelentős pozitív töltése miatt a különböző molekulatömegű, összetételű és töltésű PLGA polimerek is szignifikáns hatással bírtak az említett tulajdonságokra, továbbá a hatóanyag-felszabadulás kinetikáját nagymértékben a töltésviszonyok határozták meg.

A kemoterapeutikumok mikrokapszulázása esetében is bizonyos ésszerű paraméter tartományokat meg lehet határozni azonos hordozó polimer esetében egy új (jellemzően hidrofób vagy hidrofób molekularészt tartalmazó) hatóanyag vizsgálatához, viszont a kioldódási vizsgálatok *in vitro* és főleg *in vivo* teljesen más tendenciát mutathatnak.

Kérdés:

6. Mi a BBB modell lényege? 47. oldal.

Válasz: Ez egy olyan mesterséges *in vitro* modellje a BBB-nek, ahol megfelelő sejtek (bEND3) konfluens réteget növesztik a célra alkalmas kialakítású ThinCerts® eszköz (1. ábra) membránján. A kialakított sejtréteg modellezi a BBB-t. A sejtréteg kialakítása után a nanorészecskék szuszpenzióját (a tápoldatban) a felső rekeszbe töltik, az alsó (bazolaterális) rekeszbe is tápoldatot töltenek. Megfelelő időközönként mérik a membrán sejtrétegen létrejövő transzdotéliás elektromos ellenállást (TER) és kapacitást 37 °C -on inkubálva. Ezenkívül a nanorészecskék (mind a hordozó HSA mind a hatóanyag NGF) karboxil-csoportjaihoz előzetesen kötött ATTO-647 N fluoreszcens festék alkalmazásával az alsó rekeszben kiindulási és a végső fluoreszcencia intenzitást mérték. Negatív kontrollnak a sejtek nélküli vizsgálatot használták. Pozitív kontrollként a nanorészecskék transzportját a membránon növesztett sejtrétegen (mesterséges BBB) keresztül összehasonlították a pegilált nanorészecskékével.



1. ábra: A BBB-modell kialakítását szolgáló ThinCerts® eszköz.

Kérdés:

7. PCM rendszereknél: hogyan befolyásolja a héjvastagság a hővezetési ellenállást és a ciklusállóságot?

Válasz: A héj hővezetési ellenállása nem nagyobb, mint a szilárd PCM-é, így a mikrokapszulák alkalmazhatósága szempontjából inkább az azokat tartalmazó közeg hővezetése a meghatározó tényező. Vakolat esetében az építőanyag hővezetése jobb, mint a mikrokapszulaké, így az nem gátló tényező. Szigetelőanyagban elhelyezett PCM kapszulák esetében fontos, hogy a szigetelőanyagban az épület felé néző oldalán helyezkedjenek el a fázisváltó hőtároló kapszulák, egyébként a szigetelőanyag hővezetési ellenállása miatt a PCM olvadása és fagyása nem kívánatos késleltetést szenvedhet.

A ciklusállóságra viszont nagyon jelentős hatással van a héjvastagság. Ennek megbízható tanulmányozásához mindenképpen hőterheléses vizsgálatokra van szükség, mert a mikroszkóp – az összefüggőnek és jól zárónak látszó héj esetében is – a hőtágulás és összehúzódás mechanikai igénybevételének mértékét nem képes előrejelezni.

Kérdés:

8. *Hogyan határozható meg mért peremszögekből a szilárd-folyadék határfelületi feszültség? 80. oldal 6-os összefüggés?*

A Young-egyenlet alapján:

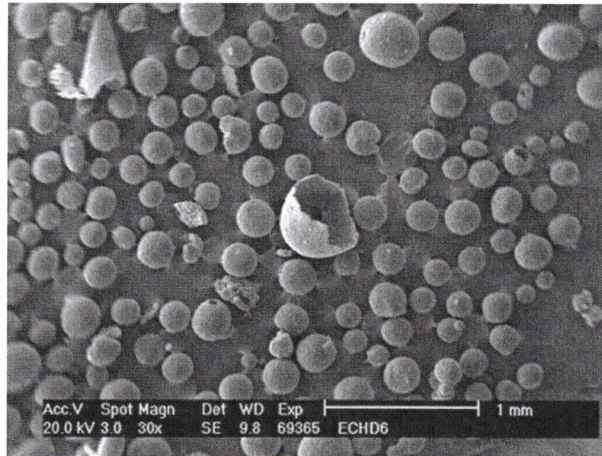
$$\gamma_{LV} \cdot \cos(\theta) = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (6)$$

ahol γ_{LV} : folyadék-gőz felületi feszültség [mN/m] (függő csepp módszerrel mérve), γ_{SV} : szilárd (polimer film) - gőz felületi feszültség [mN/m] (irodalmi adat), γ_{SL} : szilárd-folyadék határfelületi feszültség [mN/m] és θ : kontaktszög [$^\circ$] a polimer film és a folyadék fázis között.

Kérdés:

9. *A kevertetési elpárologtatás hogyan járul hozzá a részecskeméret és alak végső kialakításához. Nem törjük meg a PCM-et borító kérget? II. 3.2, első bekezdés.*

Válasz: Az említett eljárás, az olaj-a-vízben emulzió - oldószer elpárologtatás módszere, esetében az emulgeálási fázis során jönnek létre az emulziócseppek, melyeknek a mérete még az oldószer elpárologtatás szakaszában akkor is változhat, amikor az emulgeátor nem vagy csak részben akadályozza meg a cseppek koaleszcenciáját. Minél kisebb cseppeket és végeredményben részecskéket szeretnénk előállítani, annál nagyobb energiájú homogenizálásra van szükség az emulgeálás során. Mivel a kis méret nem mindig előny, és a vizsgált rendszerünkben a 10-100 μm szemcseméret céloztuk, ezért nem alkalmaztunk nagy energiájú (pl. ultrahang, ultraturax nagy sebességű keverő) emulgeálást, hanem a mágneses kevertetéssel elérhető cseppméretet alkalmaznak találtuk a célzott szemcseméret létrehozásához. Továbbá mivel ez egy viszonylag kíméletes kevertetési módszer, ezért feltételeztük, hogy a létrejövő szemcséket sem fogja törni. Az elektronmikroszkópos felvételeken (pl. 2. ábra, dolgozatban: 63.A ábra) azt láttuk, hogy a létrejövő szemcsék túlnyomó része sértetlen, bár megjegyzendő, hogy előfordultak törött héjú kapszulák is. Utólag megállapítható, hogy bizonyára lehet találni olyan kevertetési eljárást (pl. air-lift) az oldószer elpárologtatás végrehajtásához, melyek a kapszulák falát még inkább sértetlenül megőrzik.



2. ábra: Olaj-a-vízben emulzió - oldószer elpárologtatás módszerével előállított etil-cellulóz-n-hexadekán mikrokapszulák morfológiája poliszorbát 80 emulgeátor jelenlétében.

Kérdés:

10. A hűtésre használt PCM kapszulák esetében beszámol a túlhűtés jelenségéről. Hogyan befolyásolja ez a gyakorlati alkalmazásokat, és hogy lehet ezt kiküszöbölni (II. 4. 1. 4.)?

Válasz: A hűtési célra szánt, oktil-laurátot (Crodatherm 6.5) tartalmazó szemcsék esetében azt tapasztaltuk, hogy a mikrokapszulázás hatására a PCM DSC-vel mért túlhűlése növekedett. Az azóta eltelt időszakban más hőmérséklettartományban alkalmazott PCM-ek esetében is részletesen vizsgáltuk a túlhűlés kiküszöbölésének lehetőségeit. Mielőtt erről pár gondolatot írnék, kihangsúlyozom, hogy a tapasztalt túlhűlés mértéke nagymértékben függ a vizsgálati módszertől és kiemelten a felfűtési-lehűtési sebességtől, ugyanis a dermedés során kristályosodás játszódik le, és egy mérőkészülékben olyan térbeli és időbeli (kinetikai) gátak léphetnek fel, melyek a valós használatban nem jelentkeznek. Példának okáért megemlítem, hogy a dolgozatban vizsgált oktil-lauráthoz hasonló Crodatherm 9.5 anyagnak (az összetétele kismértékben tér el az előbbtől) az adatlapja szerint DSC-vel az olvadáspontja 9,7 °C, a fagyáspontja 5,0 °C, ami jól egyezik az általunk mikroDSC-vel mért értékekkel. Ugyanakkor a Crodatherm 9.5 adatlapján közlik, hogy 3-rétegű kalorimetriával meghatározott olvadáspontja és fagyáspontja egységesen 9 °C. Ez a technika nálunk nem áll rendelkezésre, viszont a mikroDSC-nél alkalmazottnál lényegesen nagyobb mintatömeget meghatározott hőmérsékletre termosztálva, mi is reprodukálni tudtuk, hogy megfelelő nagy mintatömeg esetében, és a kristályosodásnak elegendő időt hagyva, az anyag az olvadáspont hőmérsékletén túlhűlés nélkül képes megdermedni. Ennek alapján az egyik fő megállapításom az, hogy meg kell vizsgálni, hogy az elvárt működési hőmérséklettartományban és fűtési-hűtési sebesség mellett tapasztalható-e túlhűlés. Ha igen, akkor viszont kristálygócképző adalékokkal – tapasztalatunk szerint is – számottevően csökkenthető annak a mértéke. A dolgozatba sajnos már nem kerülhetett be, de a legtöbb vizsgálatot a dolgozat végén tárgyalt PMMA-paraffin mikrokapszulákkal folytattuk, ugyanis azok esetében a mikrokapszulázás hatására számottevő túlhűlést tapasztaltunk. A PMMA-paraffin mikrokapszulákban a túlhűlés kiküszöbölésére újonnan alkalmazott anyag vizsgálatáról írt publikációnkat jelenleg bírálják. Általános tapasztalatunk, hogy egy göcképző anyag akkor lehet megfelelő, ha sokkal magasabb (30-40 °C-kal) olvadás- és dermedésponttal bír, mint a túlhűlést mutató PCM, ez szükséges, de nem elégséges feltétel. Ahhoz, hogy a kristálygócképzést egy anyag hatékonyan kiváltsa, megfelelő

kristályszerkezettel és szemcsemérettel is rendelkeznie kell. Ezekon túlmenően tömbfázisban alkalmazott PCM esetében fontos még, hogy a kristálygócképző anyag a PCM fő tömegéhez hasonló sűrűségű anyag legyen, különben előbb-utóbb ki fog ülepedni, és nem lesz elég hatékony a gócképzés.

Kérdés:

11. Miért érdemes nagyobb HLB értékű tenzideket választani a kísérletekhez (97. oldal, II. 4.2.1. harmadik mondat)?

Válasz: Az eredetileg nemionos felületaktív anyagok polaritásának jellemzésére használt HLB-szám 20 értékig egyre polárisabb tenzidre utal. Mivel olaj-a-vízben emulziót készítettünk (1. táblázat) a HLB=8-18 tartományban érdemes vizsgáldni, ezzel lehetne pontosítani a dolgozatban megfogalmazottakat. Az alkalmazott nem ionos poliszorbát 80 (HLB = 15) vagy PVA (HLB = 18) emulgeátorokat is ebből a megfontolásból választottuk, amellett, hogy utóbbi kiváló emulgeálási képességéről a gyógyszerhatóanyagok mikrokapszulázása során már jelentős gyakorlati tapasztalattal is bírtunk.

HLB értékek	Felületaktív anyag tulajdonságai
0-3	habosodás gátló
4-6	víz-az-olajban emulzió emulgeátora
7-9	nedvesítő anyag
8-18	olaj-a-vízben emulzió emulgeátora
12-18	detergens
18-20	szolubilizáló

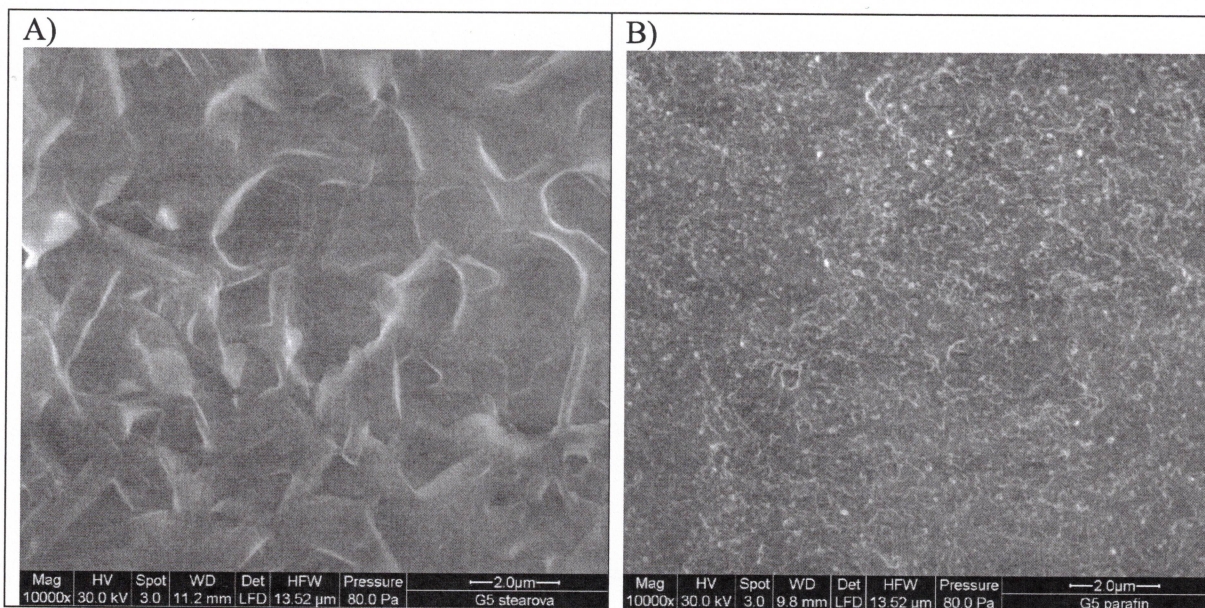
1. táblázat: Felületaktív anyagok tulajdonságai a HLB érték függvényében

Kérdés:

12. Lehet-e tudni a szilika nanorészecskékkal borított pórusos polietilén-dimetakrilát és poli(glicidilmetakrilát-etilén-dimetakrilát) polimer hordozó mikrorészecskék pórusainak méretéről (II.4.2.2, 100. o.)?

Válasz: Pórus térfogatot mind a kétféle polimerrel vizsgálták. A PEDMA mikrorészecskéké 3-3,9 ml/g tartományban változott. Ezek esetében a cetil-alkohol adszorpciójára használt polimer szemcsék 3 ml/g pórustérfogattal és 435 m²/g fajlagos felülettel bírtak 53,1% PCM tartalommal. Az elektronmikroszkópos felvételekből látszik, hogy főként makropórusok (3.A ábra) a jellemzőek, sajnos a pórus méreteloszlás mérésére nem került sor. A 75,6% paraffinnal átitatott hordozó szemcséket 3,9 ml/g pórustérfogattal, 513 m²/g fajlagos felülettel jellemezték, és a makropórusokon kívül nagyjából kisebb méretű, elsősorban mezopórusok (esetleg mikropórusok, bár ennek megállapítására az alkalmazott nagyítás nem alkalmas) figyelhetők meg a SEM felvételen (3.B ábra). A P(GMA-EDMA) szemcsék a jelentős méretkülönbségtől függetlenül (térfogat szerinti átlag méret: 643 µm vs. 111 µm) 2,5 ml/g és 2,6 ml/g pórusmérettel, 63 m²/g és 64 m²/g fajlagos felülettel és nem nagymértékben eltérő PCM tartalommal (42,9 és 48,9% (m/m)) bírtak. Ezeknél a polimer szemcséknél egy korábbi tanulmányban (Horák D, Labský J, Pilař J, Bleha M, Pelzbauer Z, Švec F. The effect of polymeric porogen on the properties of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene

dimethacrylate), Polymer 1993, 34, 3481-3489), különböző vizsgálati paramétereknél Hg-poroziméterrel vizsgálták a pórusméret változását, ahol azt is meghatározták, hogy milyen tényezők hatnak a makropórusok képződésének irányába.



3. ábra: 1-hexadekanol (A) és paraffin (B) PCM hordozására használt PEDMA polimer mikrorészecskék keresztmetszete.

Kérdés:

13. A szol-gél eljárással előállított szilikarészecskék mikrofázisok vagy polisziloxán-polimerek voltak? Milyen közegből (pH) történt a leválasztásuk (II. 4.2.2)? Ebből talán megítélhető ez.

Válasz: 0,01 M HCl-ben hidrolizálták a trimetoxi-metil-szilánt, ennek megfelelően polisziloxán-polimerek keletkeztek.

Az a)-f) pontokban megfogalmazott javításokkal és hiányosságokkal egyet kell értenem, és igyekszem a jövőben még több figyelmet szentelni a hibák kiküszöbölésére. Két megjegyzésre kiemelten alább röviden válaszolok.

Megjegyzés:

d) A 62. ábrán a színek minden bizonnyal felcserélődtek. A szövegben a PMMA-val előállított részecskék a legkisebbek (85 μm)

Válasz: Sajnálatosan a dolgozatba nem a feltüntetett átlag mérethez tartozó méreteloszlás került a PVA emulgeátor esetében.

Megjegyzés:

e) A 14. és 15. táblázatban fel kellene tüntetni a vizsgálatok hőmérsékletét is (99. o.). A 15. táblázat számsorai nem teljesen érthetőek. Hiányzik a szétterülési együtthatók mértékegysége is. A kontaktszögek minden bizonnyal fokokban vannak megadva.

Válasz: Az említett hiányosságok sajnos hibaként róhatók fel. A vizsgálatok hőmérséklete 25 °C volt, ami valóban fontos adat, hiszen a felületi feszültség függ a hőmérséklettől. A

kontaktszögek fokban vannak megadva. A szétterülési együtthatók dimenziója ugyanaz, mint a felületi feszültségé (mN/m), melyből származtatjuk.

Elfogadom a kritikai megjegyzést, hogy a tézisek és az összefoglalás funkciója eltérő, és előbbi nem helyettesítheti az utóbbit, továbbá, hogy egyes téziseknél a tömörebb megfogalmazás hasznos lett volna.

Még egyszer megköszönöm Dr. Hórvölgyi Zoltán alapos, gondolatébresztő és javító szándékú bírálatát, mely felhívta a figyelmemet a még precízebb munkára.

Veszprém, 2026.03.31.



Dr. Feczko Tivadar