



---

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

**Nanoszálak:** *Újszerű hatóanyag-hordozó  
rendszerek nanoformulált terápiás enzimekhez*

Tézisfüzet

**Szerző:** Tóth Gergő Dániel  
**Témavezető:** Dr. Balogh-Weiser Diána

FIZIKAI KÉMIA ÉS ANYAGTUDOMÁNYI TANSZÉK

2025

## 1. Bevezető

Az enzimek rendkívül hatékony biokatalizátorok, amelyek összetett kémiai reakciókat képesek nagy hatékonysággal és szelektivitással, környezetkímélő, enyhe körülmények között katalizálni. A gyógyszeripar különös érdeklődést mutat irántuk, mivel az aktív gyógyszerhatóanyagok biokatalitikus előállításán túl maguk az enzimek is alkalmazhatók terápiás ágensként. Számos betegség kezelésében játszanak szerepet, többek között anyagcserezavarok, hasnyálmirigy-elégtelenség, trombózis, egyes daganatos megbetegedések és bőrbetegségek esetén. Biokompatibilitásuk és szubsztrát-specifitásuk révén az enzimek mind a gyógyszergyártásban, mind pedig a közvetlen terápiás alkalmazásokban nélkülözhetetlen eszközökké váltak.

Az enzimek számos előnyös tulajdonsága ellenére klinikai alkalmazásukat sok esetben gyakorlati korlátok nehezítik. Natív állapotukban az enzimek könnyen denaturálódnak, érzékenyek a proteolitikus lebontásra, fiziológiás környezetben instabillá válhatnak, és gyakran kedvezőtlen farmakokinetikai tulajdonságokat mutatnak. Ezek a tényezők a terápiás hatékonyság csökkenéséhez vezethetnek, gyakori vagy nagy dózisú alkalmazást tehetnek szükségessé, ami megdrágítja a kezelést, és csökkentheti a betegek együttműködési hajlandóságát. Mindez indokoltá teszi olyan formulálási stratégiák fejlesztését, amelyek javítják az enzimek stabilitását, biológiai hasznosságát és kontrollált felszabadulását a terápiás alkalmazások során.

A modern nanotechnológia új távlatokat nyit az enzimterápia kihívásainak megoldásában. Nanoformulálás segítségével az enzimek olyan stabil, védett közegbe integrálhatók, amely megőrzi azok szerkezetét, növeli stabilitásukat, és lehetővé teszi a célzott vagy elnyújtott hatóanyag-leadást. A számos nanotechnológiai megközelítés közül az elektrosztatikus szálképzés (*electrospinning*) különösen ígéretes módszerként tűnik ki enzimtartalmú nanoszerkezetű anyagok előállítására. Az *electrospinning* lehetővé teszi nagy fajlagos felületű, szabályozható porozitású polimer nanoszálak képzését, amelyek alkalmasak érzékeny biomolekulák enyhe körülmények közötti immobilizálására.

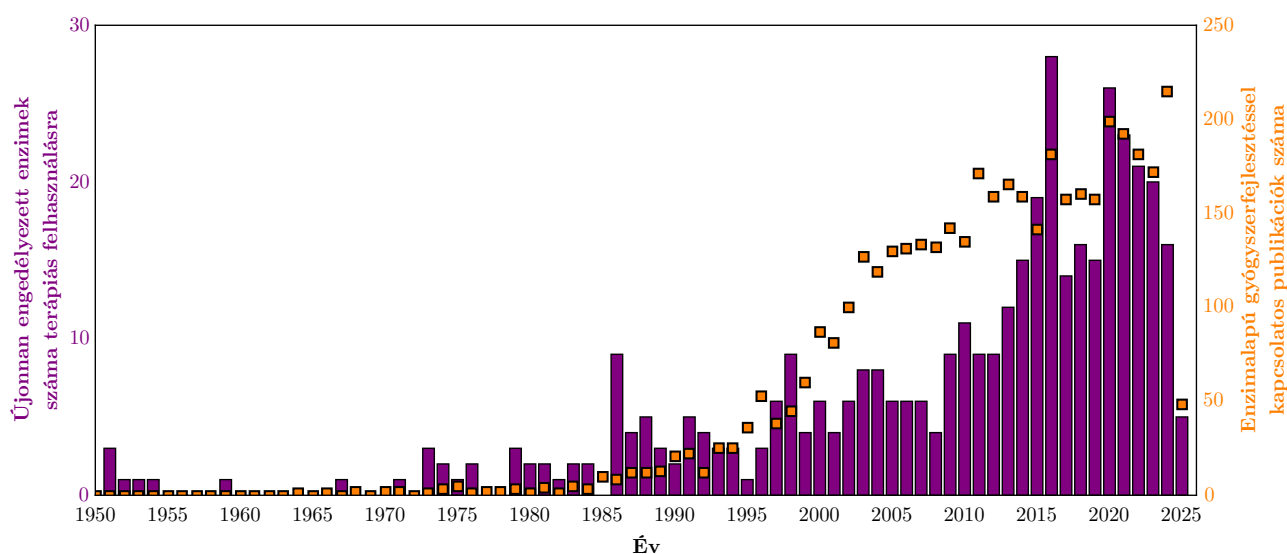
Az elektrosztatikus szálképzéssel előállított nanoszálak jelentős potenciállal bírnak terápiás enzimek hordozóanyagaként. Szerkezeti tulajdonságaik alkalmassá teszik őket topikális és orális gyógyszerhordozó rendszerek kialakítására, ahol védőmátrixként, hatóanyag-leadás szabályozóként vagy aktivitást fokozó közegként funkcionálhatnak. A nanoszálak összetételének, morfológiájának és rétegeztségének testreszabhatósága tovább bővíti alkalmazási lehetőségeiket az orvosi biológia területén.

A jelen doktori értekezés célja nanoszálak enzimhordozó rendszerek alkalmazásának vizsgálata terápiás lipázok célzott formulálására. A dolgozat bemutatja, hogy a polimerek jellemzői és a szálképzés során alkalmazott technológiai paraméterek hogyan befolyásolják az enzimek immobilizációját, stabilitását és katalitikus hatékonyságát. A munka két klinikailag releváns területen mutatja be a nanoszálak segítségével formulált lipázok terápiás alkalmazhatóságát: dermatológiai kórképek topikális kezelésében, valamint orális enzimhelyettesítő terápiában. Az eredmények alátámasztják a nanoszálak technológiában rejlő lehetőségeket, mint sokoldalú és skálázható platform a terápiás enzimek korszerű formulálására.

## 2. Szakirodalmi áttekintés

### 2.1. Az enzimek gyógyászati felhasználása

Az enzimek kiemelkedő jelentőséggel bírnak a modern gyógyászatban, mivel képesek bonyolult biokémiai reakciókat nagy hatékonysággal és szelektivitással katalizálni kíméletes, fiziológiás körülmények között. Természetes szerepük az anyagcsere-szabályozásban és sejtműködésben lehetővé teszi, hogy sokféle betegség kezelésében közvetlen terápiás hatóanyagként is alkalmazzák őket. Emiatt az enzimek nemcsak a gyógyszeripar gyártási folyamataiban nélkülözhetetlenek, hanem egyre több készítményben közvetlenül is megtalálhatók hatóanyagként – ahogy azt az 1. ábra is bemutatja.



**1. ábra.** Az enzimterápiás készítmények fejlesztéséhez kapcsolódó tudományos közlemények éves megjelenési száma, valamint az évente engedélyezett terápiás enzimek száma 1950 és 2025 között. A közlemények adatai a PubMed adatbázisból származnak, míg az enzimek jóváhagyási dátumait a DrugBank Online adatbázis alapján határoztuk meg.

Az enzimterápia jelentős fejlődésen ment keresztül az elmúlt években, amit a célzott, biológiailag jól tolerálható gyógymódok iránti egyre fokozódó igény is elősegített.<sup>1</sup> Az enzimalapú készítmények mára széles körben alkalmazottá váltak a gyógyászat különböző területein. Az onkológiában például proteolitikus enzimeket használnak a daganatok extracelluláris mátrixának és a daganathoz kapcsolódó fehérjéknek a lebontására,<sup>2</sup> ami elősegíti a tumor növekedésének gátlását és a metasztázisok csökkentését. Ezek a megközelítések alacsonyabb toxicitást eredményezhetnek, különösen akkor, ha célzott aktiválással vagy kis molekulatömegű inhibitorokkal kombinálják őket.

A kardiovaszkuláris gyógyászatban az enzimek kulcsszerepet töltenek be a fibrinolízis folyamatában.<sup>3</sup> Terápiás célokra szerin- és metalloproteázokat alkalmaznak patológiás vérrögök feloldására, különösen akut iszkémiás sztrók, mélyvénás trombózis vagy tüdőembólia esetén.

A topikálisan alkalmazható enzimterápiák széles körben elterjedtek a bőrgyógyászat és a sebkezelés területén.<sup>4</sup> A természetes eredetű papain és bromelain enzimek például elősegítik a szövetregenerációt, csökkentik a gyulladást, valamint támogatják az elhalt szövetek eltávolítását

1. Jennifer N Hennigan és tsai. *Drug discovery today* 27, szám 1 (2022): 117–133. oldal.

2. Lennart Gremmler és tsai. *Anticancer Research* 41, szám 7 (2021): 3213–3232. oldal.

3. Germana Michelle de Medeiros e SILVA és tsai. *Acta Amazonica* 46, szám 3 (2016): 323–332. oldal.

4. Amene Nikgoftar Fathi és tsai. *Journal of Wound Care* 29, szám 9 (2020): 488–495. oldal.

krónikus sebek, fekélyek és égési sérülések esetén. Ezeket az enzimeket gyakran biokompatibilis gélformulákba vagy nanoszálalás kötszerekbe integrálják, ezzel biztosítva a célzott és hatékony helyi kezelést.

Az enzimterápiák közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak az enzimhelyettesítő terápiák (ERT), amelyek különösen hatékonyak bizonyos örökletes anyagcsere-betegségek, például lizoszomális tárolási rendellenességek kezelésében.<sup>5</sup> E betegségek hátterében általában egy adott enzim hiánya vagy működésképtelensége áll, ami toxikus anyagok felhalmozódását eredményezi a szervezetben. Az ERT célja az adott enzim pótlása, ezáltal a metabolikus egyensúly helyreállítása és a tünetek enyhítése. Az 1990-es évektől kezdődően a terápia számos betegség – például Gaucher-, Fabry- és Pompe-kór – kezelésében bizonyult sikeresnek, és a rekombináns technológiák térnyerésének köszönhetően napjainkig dinamikusan fejlődik.

A nanotechnológia fejlődése jelentősen kibővítette az enzimterápiák alkalmazási lehetőségeit. A nanohordozók képesek megóvni az enzimeket a degradációtól, szabályozni azok felszabadulását, valamint növelni a sejtek általi felvételüket. Enzimhordozóként különféle szerves és szervetlen nanorészecskéket alkalmaztak sikerrel, mint például szilícium-dioxidot, poli(vinil-alkoholt), politejsavat, kitozánt, vagy különféle szénelapú nanostruktúrákat. Ezek az anyagok új terápiás lehetőségeket kínálhatnak, például az emésztőenzimek szájon át történő alkalmazására, illetve a fehérjék célzott szállítására meghatározott szervekhez vagy sejtcsoportokhoz.

## 2.2. Az enzimterápiák kihívásai

Bár az enzimek klinikai jelentősége vitathatatlan, terápiás alkalmazásukat számos kihívás korlátozza. A célzott hatóanyag-leadás nehézségei, az instabilitás fiziológiás környezetben, az immunogenitás, a rövid biológiai felezési idő és a magas előállítási költségek mind jelentős akadályt képeznek az enzimterápiák hatékonyságának, biztonságosságának és széles körű elterjedésének.

Az enzimterápiák egyik legnagyobb kihívása a hatóanyag célzott eljuttatása az érintett szövetekhez vagy sejtekhez. Az enzimek nagyméretű és komplex szerkezetű makromolekulák, amelyek nehezen képesek áthatolni a biológiai gáton, így gyakran nem halmozódnak fel megfelelő mértékben a kívánt célterületen. Ez nemcsak a kezelés hatékonyságát csökkenti, hanem a mellékhatások kockázatát is növeli. Ennek áthidalására az utóbbi években olyan nanorészecské-alapú hordozórendszerek kerültek kifejlesztésre, amelyek képesek az enzimeket környezeti ingerekre – például *pH*-változásra vagy betegséggel összefüggő fehérjék jelenlétére – reagálva, célzottan felszabadítani. Ezzel egyidejűleg a fehérjemérnöki technológiák segítségével tovább javítható az enzimek célsejtekhez való kötődése és hatásossága.<sup>6</sup>

A terápiás enzimek klinikai alkalmazásának egyik legjelentősebb akadálya az instabilitásuk. A natív enzimek szerkezete rendkívül érzékeny a környezeti hatásokra, így például a testhőmérséklet-ingadozásokra, a *pH*-változásokra, valamint a proteázok általi lebomlásra. E sérülékenység különösen jelentős a gasztrointesztinális traktus környezetében. A stabilitás fokozására alkalmazható technológiák közé tartozik az immobilizálás különféle védőközegekben (például nanoszerkezetű hordozókban), illetve a fehérjeszerkezet módosítása célzott mutációk révén. E stratégiák célja az enzim funkcionális konformációjának megőrzése és a terápiás hatás, valamint az eltarthatóság meghosszabbítása.<sup>7</sup>

A terápiás enzimek immunogenitása szintén komoly kihívást jelent.<sup>8</sup> Mivel e biológiai hatóanyagok többsége nem humán eredetű, vagy rekombináns technológiával előállított, a szervezet immunrendszere gyakran idegenként ismeri fel őket, ezzel semlegesítő antitestek termelését ki-

5. Maryam Yari és tsai. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 18, szám 7 (2017): 531–540. oldal.

6. Miguel de la Fuente és tsai. *International Journal of Molecular Sciences* 22, szám 17 (2021): 9181. oldal.

7. Shubhrima Ghosh és tsai. *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*, 2019, 131–150. oldal.

8. Leslie P Cousins és tsai. *Biobetters: Protein Engineering to Approach the Curative*, 2015, 63–77. oldal.

váltva. Ez jelentősen csökkentheti a kezelés hatásosságát, és súlyosabb esetben immunológiai mellékhatásokhoz vezethet. Az immunválasz mérséklésére különböző formulálási stratégiák alkalmazhatók, például a felületi PEGilálás (polietilén-glikol láncok kapcsolása), illetve nanoszerkezetekbe történő csapdázás, amelyek képesek csökkenteni az immunrendszer általi felismerést és növelni a hatóanyag keringési idejét.

A terápiás enzimek jellemzően rövid *in vivo* felezési ideje gyakori adminisztrációt tehet szükségessé a kívánt koncentráció fenntartásához.<sup>9</sup> Az enzimaktivitás időbeli meghosszabbítására alkalmazott stratégiák közé tartozik az elnyújtott hatóanyag-leadású nanohordozók alkalmazása, a PEGilálás, valamint a proteolízissel szemben ellenálló fehérjemódosítások bevezetése. Ezek a megoldások csökkenthetik az adagolás gyakoriságát, ezáltal javítva a beteg-együttműködést.

Végül, az enzimterápiák széles körű alkalmazásának egyik legfőbb akadályát továbbra is a magas előállítási költségek jelentik. Az aktív enzimek előállítása, tisztítása és formulálása bonyolult, költségigényes folyamat. Ugyanakkor a biotechnológiai gyártástechnológiák fejlődése – például fejlett bioreaktor-rendszerek, optimalizált gazdasejtek és hatékonyabb fehérjeexpressziós rendszerek – lehetőséget kínál a gyártási költségek csökkentésére és a termelés méretnövelésére. A fehérjemérnökség szintén hozzájárulhat a költséghatékonysághoz a hozamok növelésével és a *downstream* tisztítás egyszerűsítésével.

## 2.3. Nanotechnológia az enzimterápiákban

A nanotechnológia integrálása az enzimterápiákba új lehetőségeket nyitott az enzimek stabilitásának, aktivitásának és célzott felszabadulásának javítására.<sup>10</sup> A nanoméretű hordozók sokoldalú platformként szolgálnak: képesek megvédeni az enzimeket a lebomlástól, lehetővé teszik a kontrollált hatóanyag-leadást, és növelik a terápiás hatékonyságot. Számos nanostruktúrát – köztük polimer és szervesetlen nanorészecskéket, valamint hibrid rendszereket – alkalmaztak sikerrel enzimimmobilizáció céljából, melyek mindegyike különböző előnyöket kínál az adott terápiás kontextustól függően. Ezek a megközelítések nemcsak az enzimek funkcionális élettartamát növelik meg, hanem csökkentik azok immunogenitását, és javítják az *in vivo* biohasznosulásukat.

A nanotechnológián alapuló enzimterápiás stratégiák középpontjában az enzimimmobilizáció áll,<sup>11</sup> amelynek során a fehérjét nanostrukturált hordozókhöz rögzítik vagy azokba zárják. Az immobilizációs technikák az enzim és a hordozó közötti kölcsönhatás típusa szerint osztályozhatók. A leggyakrabban alkalmazott módszerek közé tartozik a csapdázás, az adszorpció, a kovalens kötés, a keresztkötéses rögzítés, valamint az affinitásalapú megközelítések. Ezek mindegyike sajátos előnyöket és korlátokat kínál az enzimaktivitás megőrzése, a stabilitás, a gyártási megvalósíthatóság és a klinikai alkalmazhatóság szempontjából.

Csapdázás során az enzimeket fizikai módon zárják be egy porózus vagy gél-szerű mátrixba, anélkül, hogy kémiai kötés alakulna ki a hordozó és az enzim között. Ez a módszer hatékonyan védi az enzimeket a külső stresszhatásokkal szemben, miközben lehetővé teszi számukra, hogy megőrizzék natív térszerkezetüket. Ugyanakkor a mátrix diffúziós korlátai csökkenthetik a szubsztrát hozzáférését és a termékek távozását, valamint hosszabb távon előfordulhat az enzim kioldódása is.

Adszorpció során az enzimek gyenge fizikai erőkre támaszkodva kötődnek meg a hordozó felszínén. Ez a módszer egyszerűen kivitelezhető, és nem befolyásolja jelentősen az enzimek térszerkezetét. Ugyanakkor az így rögzített enzimek stabilitása érzékenyen reagál a környezeti paraméterekre, például a *pH*-változásra, hőmérsékletre és az ionerősségre, ami a kötődés

9. Rahela Zaman és tsai. *Journal of controlled release* 301 (2019): 176–189. oldal.

10. Ambra Del Grosso és tsai. *Advanced Drug Delivery Reviews* 188 (2022): 114464. oldal.

11. Yasmin R Maghraby és tsai. *ACS omega* 8, szám 6 (2023): 5184–5196. oldal.

megszűnéséhez és az enzimaktivitás elvesztéséhez vezethet.

A keresztkötéses technikák során az enzimmolekulákat kovalens kötések révén közvetlenül egymáshoz rögzítik – például glutaraldehid segítségével – kristályok vagy aggregátumok formájában. Ezek a rendszerek rendkívül stabil szerkezetet biztosítanak, és minimális enzimkioldást mutatnak, azonban a kémiai módosítások gyakran csökkentik az enzim aktivitását, illetve akadályozhatják a szubsztrát hozzáférést az aktív centrumhoz.

Az affinitásalapú immobilizáció specifikus biokémiai kölcsönhatásokat használ ki az enzim és a hordozó között, amely elősegíti az enzimaktivitás megőrzését és minimalizálja az aktivitásvesztést. E módszer nagyfokú szelektivitást tesz lehetővé, ugyanakkor megköveteli a hordozófelület precíz mérnöki kialakítását vagy az enzim módosítását, ami fokozza az eljárás költségét és technikai összetettségét.

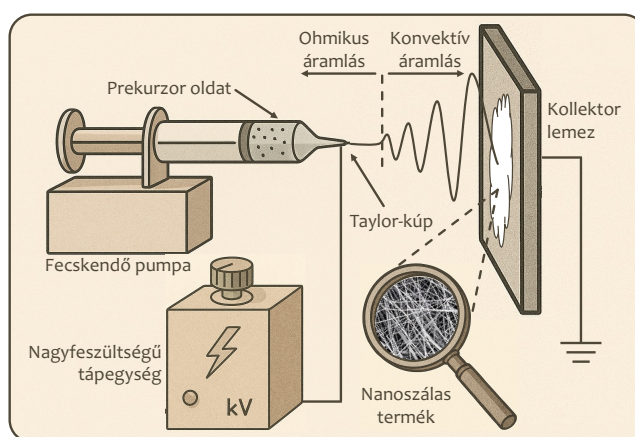
A kovalens kötéson alapuló immobilizáció során erős kémiai kötések alakulnak ki az enzim funkciócsoportjai és a hordozó felszíne között. Ez a módszer rendkívül stabil rendszerek létrehozását teszi lehetővé, amelyek hosszú távon, széles alkalmazási körülmények között is működőképesek. Ugyanakkor a kovalens rögzítés konformációs változásokat idézhet elő az enzim szerkezetében, ami az aktivitás csökkenéséhez vezethet, hasonlóan a keresztkötéses technikákhoz.

## 2.4. Az *electrospinning* szerepe az enzimek nanoformulálásában

Az *electrospinning* (lásd: 2. ábra) napjainkban egyre jelentősebb nanotechnológiai gyártási eljárás. Segítségével nagy fajlagos felületű, szabályozható szerkezetű nanoszálal szövetedékek hozhatók létre, amelyek nagy potenciállal rendelkeznek terápiás enzimek hordozására és szabályozott leadására. *Electrospinning* során egy polimer oldatból vagy olvadékból nagyfeszültségű elektromos tér alkalmazásával vékony szálakat húznak ki, amely megszilárdulva egységes nanoszálal réteget képez.<sup>12</sup> Az így előállított nanoszálal számos orvosi területen alkalmazhatóak, ilyenek például a hatóanyagleadás, sebkezelés és szövetmérnökség.

Az enzimetartalmú nanoszálal rendszerek<sup>13</sup> egyszerre biztosítanak védelmi és hatóanyag-hordozó funkciót. Az enzimek nanoszálalokba való csapdázása fokozza strukturális stabilitásukat, és védelmet nyújt számukra a denaturációval és lebomlással szemben, mind tárolás, mind alkalmazás közben. A szálal összetételének és porozitásának szabályozásával az enzimfelszabadulás kinetikája pontosan beállítható, amely lehetővé teszi a célzott vagy elnyújtott hatóanyag-leadást, ezáltal csökkentve az adminisztráció gyakoriságát. Az enzimek nem csupán a szálal belsejében, hanem azok felszínén is rögzíthetők – például adszorpciós vagy kovalens kötéssel –, ezzel tovább bővítve a formulálási lehetőségeket.

Az elektrosztatikus szálalképzéssel előállított nanoszálal kiemelkedő enzimrögzítő kapacitással rendelkeznek, és kisebb eséllyel váltanak ki immunválaszt más nanoformulálkhoz képest.<sup>14</sup> Az eljárás rendkívül sokoldalú, és számos természetes és szintetikus polimerrel – például poli(vinil-



2. ábra. Laboratóriumi elektrosztatikus szálalképző berendezés sematikus ábrája.

12. Geoffrey R Mitchell (Royal Society of Chemistry, 2015).

13. Anjum Hamid Rather és tsai. *Biotechnology and Bioengineering* 119, szám 1 (2022): 9–33. oldal.

14. Elena Cojocarú és tsai. *Polymers* 14, szám 13 (2022): 2647. oldal.

alkohollal) (PVA), politejsavval (PLA), zselatinnal és kitozánnal – kompatibilis. Ez lehetővé teszi a nanoszálak tulajdonságainak (pl. hidrofilitás, mechanikai szilárdság, degradációs sebesség) testreszabását az adott terápiás alkalmazás igényei szerint. Emellett a gyártási körülmények enyhése hozzájárul az érzékeny enzimek szerkezeti épségének megőrzéséhez, mivel a szálképzéshez nincs szükség magas hőmérsékletre vagy szerves oldószerekre.

A nanoszálás formulációk számos preklinikai vizsgálatban ígéretesnek bizonyultak lipázok orális adminisztrálása, krónikus sebek kezelése, valamint lokalizált hatóanyagleadó rendszerek kialakítása terén. Bár enzimtartalmú nanoszálás terápiás készítmény még nem került kereskedelmi forgalomba, több, nanoszálás mátrixra épülő eszköz – mint például a Spincare<sup>®</sup> sebkötöző és a Rivelin<sup>®</sup> nyálkahártya tapasz – már klinikai alkalmazásban igazolta a technológia gyakorlati hasznosíthatóságát. A folyamatos fejlesztések révén a nanoszálás technológia kulcsszereplővé válhat újgenerációs enzimterápiás gyógyszerformák kifejlesztésében.

## 2.5. A disszertáció célkitűzései

A doktori értekezés célja elektrosztatikus szálképzéssel előállított nanoszálás rendszerek vizsgálata, mint innovatív hordozóplatform terápiás lipázok számára. A központi hipotézis szerint a polimer mátrix gondos kiválasztása, a formulálási paraméterek optimalizálása, valamint funkcionális adalékanyagok beépítése révén jelentős mértékben fokozható az enzimek stabilitása és katalitikus aktivitása a nanoszálás közegben. A kutatás három fő célkitűzés köré épül, melyek különböző terápiás alkalmazási területekre fókuszálnak.

- Az első célkitűzés a poli(vinil-alkohol) mátrixanyagként való alkalmazására összpontosít. A vizsgálat azt elemzi, hogy a polimer molekulatömege, hidrolizáltsági foka és koncentrációja miként befolyásolja a nanoszálképződés folyamatát, valamint a benne csapdázott, *Burkholderia cepacia* eredetű modell lipáz katalitikus aktivitását. A vizsgálat célja az optimális PVA tulajdonságok meghatározása, amelyek elősegítik magas enzimaktivitású nanoszálás lipáz formulák előállítását.
- A második célkitűzés többrétegű nanoszálás arcmaszkok tervezésére és fejlesztésére irányul, topikális dermatológiai terápiás alkalmazás céljából. A maszkok két lipázt (*Candida rugosa* és *Rhizomucor miehei*) és a nadifloxacin nevű antibiotikumot tartalmaznak, amelyek révén potenciálisan alkalmasak lehetnek *acne vulgaris* kezelésére. A kutatás magában foglalja a nanoszálás maszkok szerkezeti jellemzését, az enzimek aktivitásának vizsgálatát bőrlipid-analóg szubsztrátokon, valamint *ex vivo* bőrpenetrációs kísérletek elvégzését.
- A harmadik célkitűzés értelmében szájon át alkalmazható nanoszálás lipázkészítmények fejlesztése valósul meg, *porcine pancreatic* lipáz formulálásával. A vizsgálatok során különböző polimer mátrixokat (polivinil-alkohol, polivinil-pirrolidon és politejsav) alkalmazunk, továbbá a katalitikus hatékonyság fokozását ciklodextrin adalékanyagokkal és nagyobb terápiás potenciállal rendelkező alternatív lipázok formulálásával vizsgáljuk.

A kutatás átfogó célja annak demonstrálása, hogy az elektrosztatikus szálképzéssel előállított nanoszálak újszerű és sokoldalú hordozóplatformként szolgálhatnak terápiás enzimek célzott topikális és orális alkalmazására.

### 3. Alkalmazott módszerek

#### 3.1. Nanoszálak előállítása elektrosztatikus szálképzéssel

A prekursor oldatokat a vízdékony polimerek (PVA, PVP) esetén  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on vízben, a PLA esetében pedig DKM:DMF (6:1,  $V:V$ ) oldószerkeverékben, szobahőmérsékleten készítettük el. Az elektrosztatikus szálképzést *spincube* berendezéssel (*spinsplit*, Budapest) végeztük, légkondicionált laboratóriumi körülmények között ( $23 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\sim 30\%$  relatív páratartalom). Mivel a készülék zárt kamrája nem rendelkezik belső klímaszabályozással, az *electrospinning* paramétereiket folyamatosan igazítottuk a változó körülményekhez. A jellemző beállítások: 11–18  $kV$  feszültség, 10–30  $\mu\text{L min}^{-1}$  adagolási sebesség, 12–16  $cm$  emitter–kollektor távolság. A nanoszálakas terméket sík kollektorfelületen gyűjtöttük, szobahőmérsékleten szárítottuk, majd  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### 3.2. Reológiai vizsgálat

A prekursor oldatok viszkozitását Anton Paar Physica MCR 301 reométerrel mértük, kúpos mérőfej segítségével,  $25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten,  $1\text{--}631\text{ s}^{-1}$  nyírási sebességtartományban. A vizsgálatokhoz  $100\text{ }\mu\text{L}$  mintatérfogatot használtunk, a méréseket három ismétlésben végeztük.

#### 3.3. Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat

A nanoszálak morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal (JSM JEOL-5500LV) vizsgáltuk. A mintákat arannyal vontuk be ( $10\text{ mA}$ ,  $180\text{ s}$ ), majd a felvételeket nagyvákuum üzemmódban készítettük. Az átlagos szálátmérőket ImageJ szoftver (NIH) segítségével határoztuk meg ( $n = 100$ ).

#### 3.4. Raman-mikroszkópos térképezés

A komponensek eloszlását Raman-térképezéssel vizsgáltuk Thermo Fisher DXR típusú Raman-spektrométerrel,  $780\text{ nm}$ -es lézert alkalmazva. A kémiai térképeket  $100 \times 100\text{ }\mu\text{m}$ -es területen rögzítettük,  $1\text{ }\mu\text{m}$ -es felbontással, pontonként 32 spektrum átlagolásával. Az intenzitásbeli eltéréseket spektrumnormalizálással korrigáltuk.

#### 3.5. A lipázaktivitás meghatározására szolgáló tesztreakciók

**Standard reakcióelegy:** Az enzimmészítményeket ( $5\text{ mg}$ ) TRIS-puffer ( $650\text{ }\mu\text{L}$ ,  $50\text{ mM}$ ,  $pH\ 8,0$ ), izopropanol ( $100\text{ }\mu\text{L}$ ) és 1-oktil-acetát ( $25\text{ }\mu\text{L}$ ) szubsztrát elegyében inkubáltuk. A reakciókat  $4\text{ mL}$ -es, csavarzárás fiolákban végeztük  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 2 órán keresztül. A minták elemzését gázkromatográfiával hajtottuk végre.

**Intesztinoszolvens reakcióelegy:** A *standard* enzimaktivitási vizsgálattal megegyező összetételben, azonban TRIS-puffer helyett intestinoszolvens pufferrel ( $650\text{ }\mu\text{L}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ,  $50\text{ mM}$ ,  $pH\ 6,8$ ) végeztük a reakciókat a bélrendszeri körülmények szimulálása érdekében. A minták elemzését gázkromatográfiával hajtottuk végre.

**FeSSIF reakcióelegy:** A FeSSIF reakcióelegy elkészítéséhez  $0,4125\text{ g}$  nátrium-taurokolátot oldottunk fel  $500\text{ mL}$  *blank* FeSSIF oldatban ( $pH\ 5,0$ ;  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  és  $\text{NaOH}$  ioncserélt vízben oldva, a táplálkozás utáni bélkörnyezet kémiai viszonyainak szimulálására beállítva). Ehhez hozzáadtuk a szubsztrát oldatot, amelyet  $p\text{-NPP}$ , ( $86,6\text{ mg}$ ), Triton X-100 ( $0,50\text{ g}$ ) és arabgumi ( $0,125\text{ g}$ )  $1,477\text{ mL}$  izopropanolban történő oldásával nyertünk. Az elegyet 60 percig ultrahang segítségével homogenizáltuk. A méréshez  $150\text{ }\mu\text{L}$  lipázoldatot (koncentráció:  $0,1\text{ mg mL}^{-1}$ , oldószer: *blank* FeSSIF) adtunk  $1,0\text{ mL}$  FeSSIF reakcióelegyhez. A mintákat  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on,  $4\text{ mL}$ -es csavarzárás fiolákban inkubáltuk 1 órán keresztül. Az enzimaktivitás meghatározása UV–Vis spektrofotometriás módszerrel történt.

### 3.6. Az enzimaktivitás meghatározása

Az enzimaktivitás-vizsgálatok kiértékelése gázkromatográfiával (GC) vagy UV-Vis spektrofotometriával történt, az alkalmazott mérési módszertől függően. A kapott kromatogramokból vagy abszorbancia-adatokból a következő főbb aktivitási paramétereket számítottuk ki: átalakulási fok ( $c$ , %), specifikus biokatalizátor aktivitás ( $U_B$ ,  $U\ g^{-1}$ ), specifikus enzimaktivitás ( $U_E$ ,  $U\ g^{-1}$ ), valamint aktivitási hozam ( $Y_A$ , %), az alábbi képletek szerint.

$$c = \frac{n_P}{n_S + n_P} \times 100 \quad (1)$$

$$U_B = \frac{n_S \times c}{t \times m_B}, \quad U_E = \frac{n_S \times c}{t \times m_E} \quad (2-3)$$

$$Y_A = \frac{U_{E,immobilizált}}{U_{E,natív}} \times 100 \quad (4)$$

Ahol  $n_P$  és  $n_S$  a termék, illetve a szubsztrát anyagmennyiségét jelölik ( $\mu mol$ ),  $t$  a reakcióidőt ( $min$ ), míg  $m_B$  és  $m_E$  a biokatalizátor, illetve az enzim tömegét ( $g$ ) jelentik.

### 3.7. Differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérés

A kalorimetriás mérések során 3–5  $mg$  tömegű mintákat vizsgáltunk hermetikusan lezárt alumínium csészékben, PerkinElmer DSC 8500 típusú differenciális pásztázó kaloriméter segítségével. A mérésekhez 20  $mL\ min^{-1}$  sebességű nitrogént használtunk *purge* gázként. A hőprogram három lépésből állt: kezdeti kondicionálás  $-20\ ^\circ C$ -on, majd hevítés  $150\ ^\circ C$ -ra, lehűtés ismét  $-20\ ^\circ C$ -ra, végül egy második hevítési ciklus  $150\ ^\circ C$ -ig, minden lépésnél  $10\ ^\circ C\ min^{-1}$  sebességet alkalmaztunk.

### 3.8. Molekuláris dokkolási szimuláció

Különböző lánchosszúságú és hidrolizáltsági fokú (88% és 98%) PVA-oligomereket építettünk fel Avogadro2 segítségével, majd dokkolásukat a *Burkholderia cepacia* lipázhoz (BcL) Auto-Dock Vina programmal, a DockingPie felületen keresztül végeztük. Kétféle receptorstruktúrát alkalmaztunk: az apo formát (2LIP) és egy inhibitorral komplexált állapotot (1YS1). A ligandumokat egy olyan dokkolórácsba helyeztük, amelynek középpontja a következő koordinátákon volt: ( $X = 15,9$ ;  $Y = 1,1$ ;  $Z = 20,0$ ), lehetővé téve mind a felszínhez, mind az aktív centrumhoz kötődő orientációkat. Minden ligandumhoz tíz kötődési pozíciót generáltunk (*exhaustiveness* = 8). A dokkolási eredményeket szűrtük: csak azokat a pozíciókat elemeztük tovább, amelyeknél a ligandumok irányultsága megfelelt a Phe52, Leu293 és Phe119 által definiált síkhoz viszonyított hosszú láncú polimerekre jellemző konformációnak. A vizuális ellenőrzést PyMOL szoftverrel végeztük.

### 3.9. Ex vivo bőrpermeabilitási vizsgálat

A bőrön történő hatóanyag-penetráció vizsgálatát Franz-diffúziós cella alkalmazásával végeztük, emberi hővel leválasztott epidermisz (HSE) mintákon. A nanoszálal szövetkeket ötrétegű lapokká hajtogattuk, majd donor fázisként alkalmaztuk (felület:  $1,77\ cm^2$ ), míg az akceptor fázist foszfátpuffer (PBS,  $pH = 7,4$ ;  $7,0\ mL$ ) képezte. A vizsgálatot  $32\ ^\circ C$ -on, 24 órán keresztül végeztük. Meghatározott időközönként  $0,8\ mL$  mintát vettünk az akceptor fázisból, amelyeket HPLC segítségével elemeztünk. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásaitikai Bizottsága (ETT-TUKEB, engedélyszám: BMEÜ/2339-3/2022/EKU) engedélyezte.

## 4. Eredmények

### 4.1. A PVA fizikai-kémiai tulajdonságainak befolyása az enzimaktivitásra

A doktori munka ezen szakaszában kereskedelmi forgalomban kapható, különböző molekula-tömegű és eltérő hidrolizáltsági fokú poli(vinil-alkohol) alapú vizes oldatokból történő elektro-sztatikus szálképzés lehetőségeit és limitációit vizsgáltuk. A kutatás célja az volt, hogy feltárjuk azokat a paramétereket, amelyek mellett megvalósítható stabil, enzimentartalmú nanoszálak elő-állítás. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a polimer tulajdonságai hogyan befolyásolják a prekursor oldatok reológiai viselkedését, illetve a kapott nanoszálak morfológiáját.

Párhuzamos reológiai és szálképzési kísérletek elvégzésével meghatároztuk azt az optimális viszkozitási tartományt (0,1–10 Pa s), amelyen belül stabil és folyamatos nanoszál képzés biztosítható. Az ezen tartományon kívüli oldatok vagy nem rendelkeztek kellő kohézióval a szálképzéshez, vagy túl nagy viszkozitásuk akadályozta az egyenletes adagolást a szálképző berendezésben.

A szálképzési kísérletek során több lényeges tendencia is megfigyelhető volt. A PVA molekula-tömegének és koncentrációjának növekedésével a keletkező nanoszálak vastagsága fokozatosan nőtt, mígnem egy adott ponton az szálképzés technikailag kivitelezhetetlenné vált a túlságosan magas viszkozitás és az erős polimer–polimer kölcsönhatások miatt. Ezek a kölcsönhatások áramlási instabilitáshoz és az oldatok feldolgozásának nehézségeihez vezettek, még magas feszültségek mellett is.

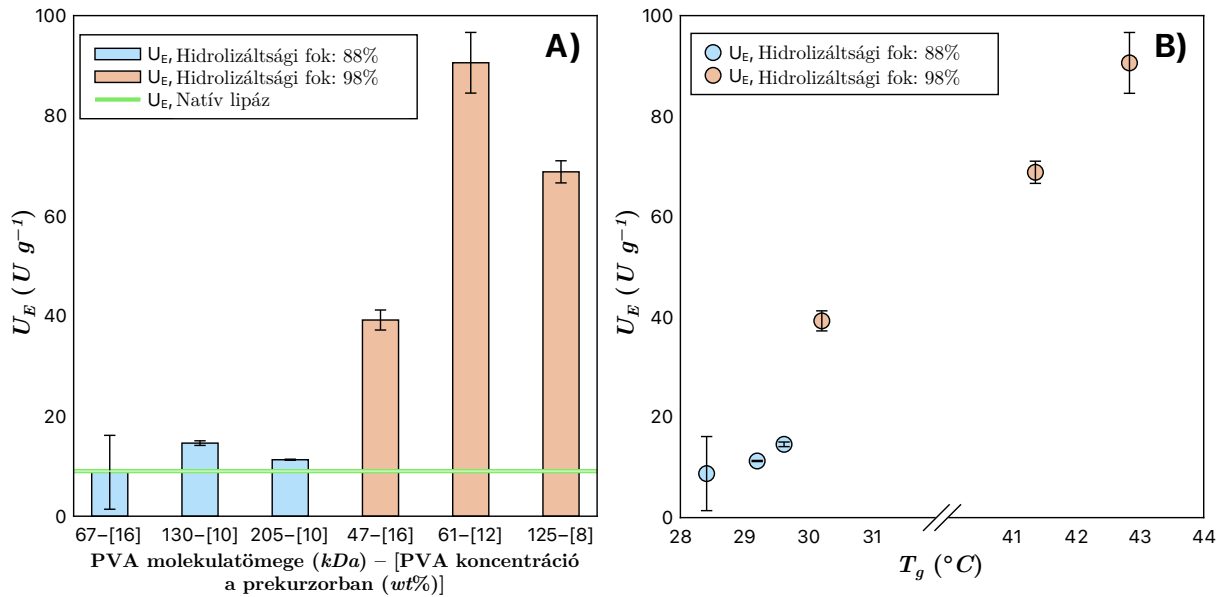
A *Burkholderia cepacia* lipáz (BcL) bevezetése a prekursorba további komplexitást eredményezett. Az enzimentartalmú oldatok viszkozitása alacsonyabb volt, mint az enzimmentes megfelelőké, ami valószínűleg az enzim és a polimer láncok közötti specifikus kölcsönhatások-ra vezethető vissza. Ezek a kölcsönhatások módosították az oldat kohézióját, ami rendszerint kisebb átmérőjű nanoszálakhoz vezetett, továbbá szűkebb optimális paraméter tartományt eredményezett az enzimentartalmú oldatok szálképzése során. Az eredmények arra utalnak, hogy az enzim-PVA kölcsönhatások meghatározó szerepet játszanak az oldat tulajdonságainak és a szálak jellemzőinek alakulásában.

A különböző PVA-paraméterek katalitikus aktivitásra gyakorolt befolyásának értékeléséhez átészterezési reakciót hajtottunk végre *racém* 2-oktanol és vinil-acetát között, BcL-t tartalmazó nanoszálás minták jelenlétében. A reakciókat *n*-hexán és MTBE 2:1 (V:V) arányú oldószerke-verékében végeztük, és a reakciók menetét gázkromatográfiás analízissel vizsgáltuk 2, 4 és 24 óra elteltével.

A kinetikus rezolválási kísérletek igazolták, hogy a PVA hidrolizáltsági foka, molekula-tömege és koncentrációja egyaránt jelentős hatással vannak a nanoszálakban immobilizált enzim biokatalitikus teljesítményére. A BcL-t tartalmazó PVA nanoszálak rendszerek szignifikánsan nagyobb enzimaktivitást mutattak a natív enzimhez képest, ahogyan azt az 3./A ábra is szemlélteti. A teljesen hidrolizált PVA-mátrixok minden esetben felülmúlták a részben hidrolizáltakat, akár tízszeres aktivitásnövekedést is elérve a natív BcL-hez viszonyítva.

A katalitikus teljesítményjavulás szerkezeti hátterének feltárására differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) méréseket végeztünk, hogy megvizsgáljuk a nanoszálás minták termikus tulajdonságait. Az 3./B ábra alapján megfigyelhető, hogy az enzimentartalmú nanoszálak üvegesedési hőmérséklete ( $T_g$ ) alacsonyabb volt az enzimmentes mintákhoz képest, amit a fehérjék lágyító hatása magyaráz. A  $T_g$  és a fajlagos enzimaktivitás ( $U_E$ ) között egyértelmű összefüggés rajzolódott ki: a magasabb  $T_g$ -vel rendelkező formulációk nagyobb katalitikus teljesítményt mutattak. Különösen figyelemre méltó, hogy azok a minták, amelyek  $T_g$  értéke meghaladta a 30 °C-ot – tehát a reakció hőmérsékletén üveges állapotban voltak –, érték el a legnagyobb aktivitást. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a merevebb mátrixstruktúra

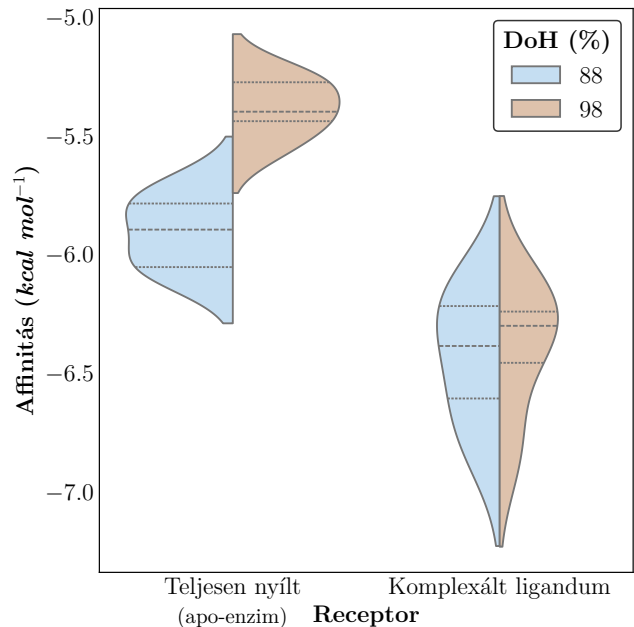
elősegíti az enzim aktív konformációjának megőrzését. A termikus stabilitásban bekövetkező változások továbbá utalhatnak a mátrixpolimer és az enzim közötti stabilizáló kölcsönhatások jelenlétére.



**3. ábra.** **A)** A *BcL* enzim specifikus enzimaktivitása ( $U_E$ ) PVA nanoszálakba ágyazva, a natív enzimhez viszonyítva. **B)** Összefüggés az üvegesedési hőmérséklet ( $T_g$ ) és a specifikus enzimaktivitás ( $U_E$ ) között. A  $T_g$  értékeket DSC-vel mértük, míg a  $U_E$  értékeket 24 órás átészterezési reakciók alapján, gázkromatográfiával határoztuk meg.

Végül, a molekuláris dokkolási szimulációk további bizonyítékot szolgáltatottak a PVA stabilizáló hatására (lásd 4. ábra). A számítási modellek azt mutatták, hogy a PVA-oligomerek hidrogénkötéseken keresztül képesek kölcsönhatásba lépni a *BcL* aktív centrumával és felszíni oldalláncaival. Ezek a kölcsönhatások egyfajta *bioimprinting* hatásra utalnak, amely során a polimer mátrix az enzim immobilizálása során elősegíti amaz aktív konformációjának megőrzését.

A bemutatott eredmények alapján megállapítható, hogy a PVA molekuláris tulajdonságainak és a feldolgozási paramétereknek az optimalizálásával fokozott aktivitású nanoszál biokatalizátorok állíthatók elő. A *BcL* PVA nanoszálakba történő immobilizálása több mint tízszeres növekedést eredményezett a fajlagos enzimaktivitásban a natív enzimhez képest, ami alátámasztja az elektroszálképzés hatékonyságát terápiás enzimek nanoformulálására. Ezek az eredmények szilárd alapot szolgáltatnak az enzimtartalmú nanoszál rendszerek további orvosi biológiai alkalmazásaihoz.



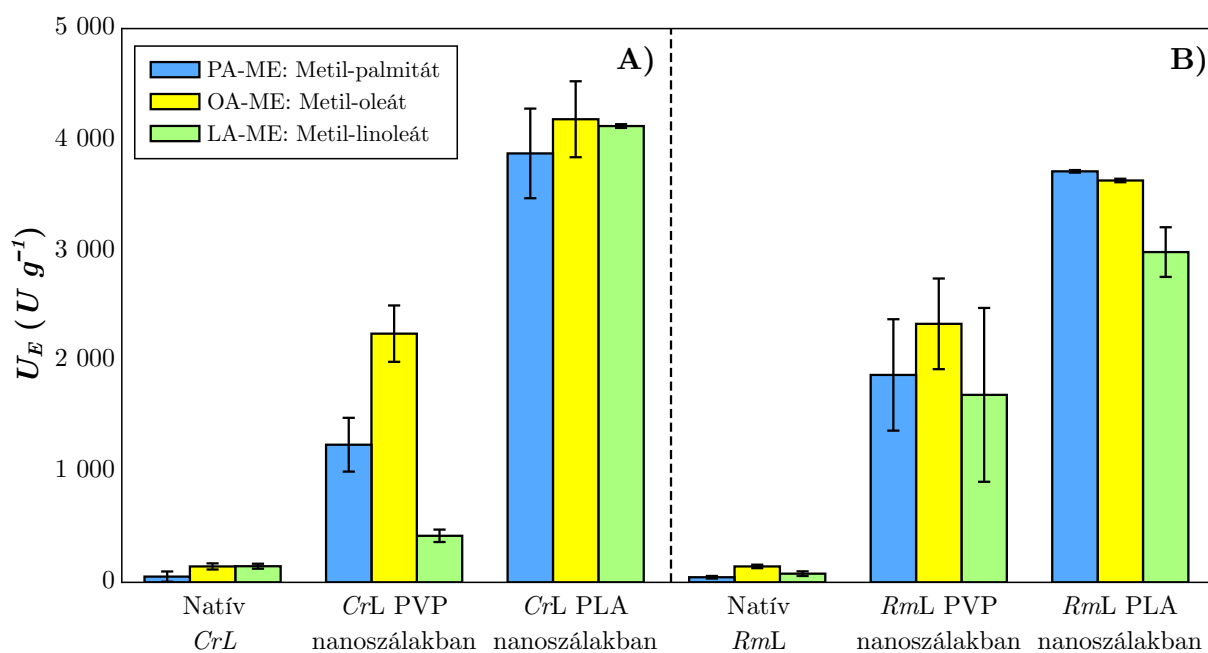
**4. ábra.** A különböző hidrolizáltsági fokú (DoH) PVA-ligandumok kötődési affinitása *BcL* lipáz szerkezeti variánsaival szemben. A számításokat AutoDock Vina szoftverrel, DockingPie modul használatával végeztük a PyMol környezetben.

## 4.2. Polimer nanoszálak a hatékonyabb bőrápolásért

A doktori munka ezen szakaszában olyan többrétegű nanoszálak előállítását céloztuk meg, amelyek terápiás és kozmetikai célokra egyaránt alkalmasak lehetnek. Elektrosztatikus szálképzéssel poli(vinil-pirrolidonból) (PVP) és politejsavból (PLA) készült nanoszálak hordozókat állítottunk elő, amelyekbe kétféle lipázt – *Candida rugosa* (CrL) és *Rhizomucor miehei* (RmL) eredetű enzimeket – valamint a nadifloxacin nevű antibiotikumot ko-formuláltuk. A cél ezen nanoszálak rendszerek szerkezeti integritásának, fizikai-kémiai tulajdonságainak és biokatalitikus teljesítményének vizsgálata volt, fókuszálva a potenciális bőrgyógyászati alkalmazásra.

Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatok igazolták, hogy valamennyi előállított nanoszálak minta egyenletes szálsztruktúrát mutatott, csupán kisebb morfológiai inhomogenitásokkal. A PVP-alapú nanoszálak következetesen vékonyabbnak bizonyultak, mint a PLA-ból készült társaik. Az enzimek csapdázása enyhe átmérőcsökkenést eredményezett, míg a nadifloxacin hozzáadása a polimer mátrix típusától függően eltérő hatást mutatott a szálvastagságra. A Raman-mikroszkópos térképezés megerősítette a lipázok és a nadifloxacin sikeres és homogén beágyazódását a nanoszálak szerkezetbe.

A mechanikai vizsgálatok alapján a PVP nanoszálak nagyobb rugalmasságot mutattak a PLA-alapú szálakhoz képest. Az enzimek és az antibiotikum hozzáadása mindkét esetben csökkentette a szálak merevségét. A peremszög ( $CA$ ) mérések szerint a PVP nanoszálak erősen hidrofilek ( $CA_{water} \approx 5^\circ$ ), és ennek megfelelően gyorsan oldódtak vizes közegben, míg a PLA nanoszálak hidrofób karaktert mutattak ( $CA_{water} > 90^\circ$ ), ezáltal hosszabb hatóanyag-leadásra nyújtanak lehetőséget. A nadifloxacin jelenléte nem befolyásolta jelentősen a két mátrix hidrofilitásukat.



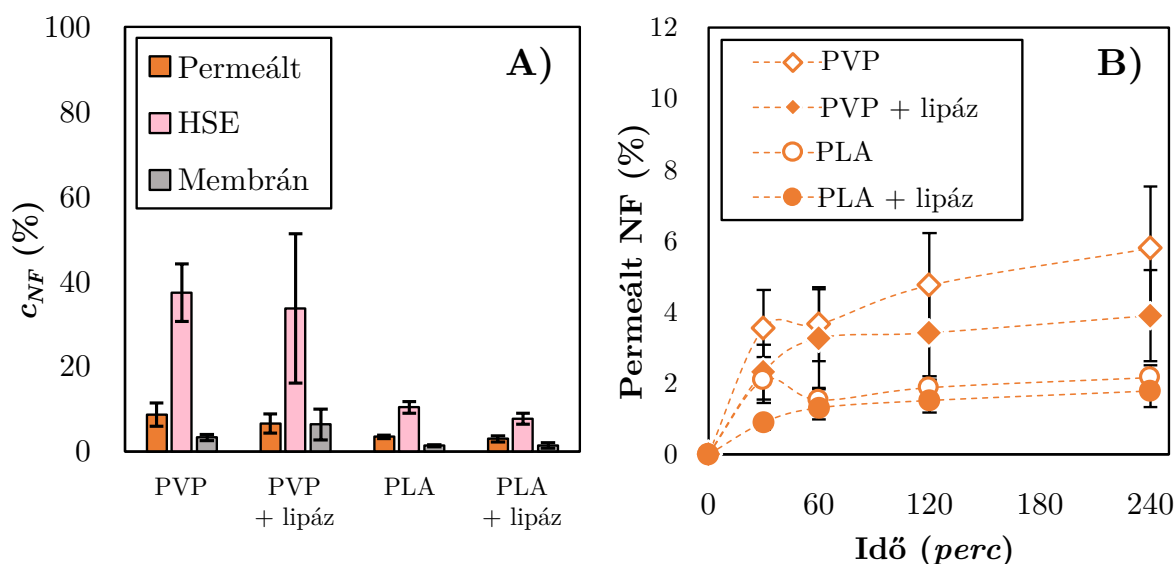
**5. ábra.** A PVP és PLA nanoszálakba történő csapdázás hatása a **A)** *Candida rugosa* és **B)** *Rhizomucor miehei* lipázok katalitikus teljesítményére zsírsav-metilészterek (PA-ME, OA-ME, LA-ME) hidrolízise során. A reakciók standard körülmények között,  $33^\circ C$ -on zajlottak, az aktivitásokat ( $U_E$ ) 2 óra után gázkromatográfiával határoztuk meg.

A lipáz aktivitását palmitinsav-, olajsav- és linolsav-metilészterek hidrolízise során vizsgáltuk. Az 5. ábra eredményei alapján a nanoszálak immobilizáció jelentősen fokozta az enzimaktivitást a natív enzimekhez képest. A PLA-mátrix stabilabb környezetet biztosított, és következetesen jobb katalitikus teljesítményt mutatott, mint a PVP-alapú szálak – még nagyobb

szálátmérőjük ellenére is –, ami elsősorban a PLA vízben nem oldódó természetének köszönhető, mivel ez megőrizte az enzimek konformációját a reakcióközegben és megakadályozta az aggregációt.

A többrétegű nanoszálak maszkok katalitikus aktivitását szintén értékeltük. A kapott eredményekből megállapítottuk, hogy a két együttesen alkalmazott lipáz jelentős aktivitást mutatott, és átlagosan magas teljesítményt ért el a vizsgált szubsztrátok teljes palettáján. Bár a nadifloxacin jelenléte bizonyos esetekben csökkentette az enzimaktivitást, ez a hatás a vízoldhatatlan PLA nanoszálak alkalmazásával mérsékelhető volt.

A Franz-diffúziós cellával végzett vizsgálatok megerősítették a nadifloxacin sikeres transzdermális bejutását hőszeparált humán epidermiszen (HSE) keresztül, ahogyan azt a 6./A ábra szemlélteti. A PVP-alapú nanoszálak gyorsabb hatóanyag-leadást biztosítottak oldhatóságuk révén, míg a PLA nanoszálak lassabb, elnyújtott felszabadulást eredményeztek (6./B). Az enzimek jelenléte enyhén csökkentette az átdiffundált nadifloxacin mennyiségét, vélhetően a felületen kialakuló enyhe diffúziót gátló biofilmréteg miatt.



**6. ábra.** NF transzdermális permeációjának értékelése emberi hőszeparált epidermisz (HSE) modellen Franz diffúziós cellával. **A)** Az NF koncentrációja a fogadó fázisban (permeált), az epidermiszben és a szűrőmembránban 24 óra elteltével. **B)** A permeált NF kumulatív mennyisége 4 órás periódusban, 33 °C-on. A vizsgálatokat háromrétegű nanoszálak maszkokkal végeztük.

Összegzésként elmondható, hogy a PLA-alapú, többrétegű nanoszálak maszkok mutatták a legkedvezőbb egyensúlyt a mechanikai stabilitás, hatóanyag-retenció és enzimstabilizálás szempontjából. Eredményeink alátámasztják, hogy az elektrosztatikus szálképzéssel előállított nanoszálak rendszerek testre szabható hordozóként szolgálhatnak enzim-alapú topikális terápiákhoz, kiváltképp az olyan kórképekre, mint az *acne vulgaris*, ahol az antimikrobiális hatás és a lipidek enzimatis bontása egyaránt terápiás előnyt jelenthet.

### 4.3. *Electrospinning* alkalmazása emésztőenzimek nanoformulálására

A doktori munka ezen szakaszában az elektrosztatikus szálképzés technológiáját vizsgáltuk, mint innovatív lehetőséget az emésztőenzimek nanoformulálására. Modellenzimként a sertés hasnyálmirigy eredetű lipázt (*PpL*) választottuk, mivel annak klinikai relevanciája és széles körű alkalmazása jól dokumentált a hasnyálmirigy enzimehelyettesítő terápiák (PERT) területén. A kutatás célja stabil, orálisan alkalmazható nanoszálás preformulációk kifejlesztése és jellemzése volt, mely során részletesen vizsgáltuk a polimertípus és a formulálási paraméterek hatását a rögzített enzim aktivitására.

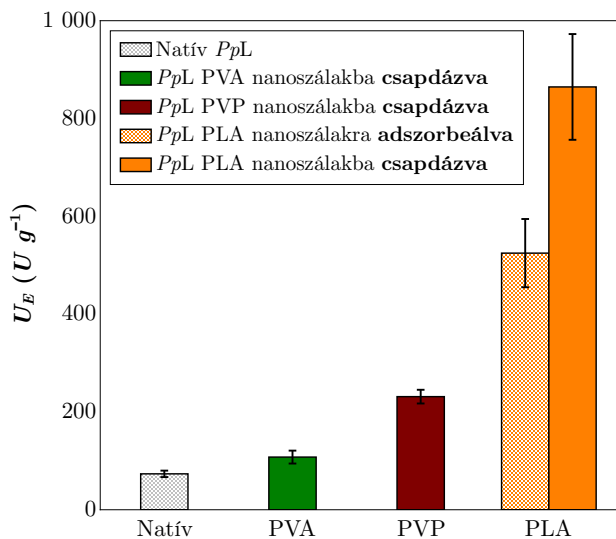
Összesen 25, PVA-, PVP- és PLA-alapú prekursor szisztematikus *electrospinning* vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a szálképzés folyamatát elsősorban a polimer molekulatömege és koncentrációja határozza meg, amely paraméterek jól tükröződnek az prekursorok viszkozitásában. A szálképzés szempontjából optimális viszkozitási tartomány ismételtelen 0.1 – 10 Pa s közé esett, míg a legjobban teljesítő oldatok – PVP (360 kDa, 20 wt%), PVA (205 kDa, 10 wt%) és PLA (86 kDa, 8 wt%) – egy szűkebb, 1.5 – 2.5 Pa s tartományban helyezkedtek el. Ezek a formulációk egyenletes, jó minőségű nanoszálakat eredményeztek, amelyek kiválóan alkalmasak a *PpL* immobilizálására.

A *PpL* integrációja a prekursor oldatok viszkozitásának és a kapott nanoszálak átmérőjének csökkenését eredményezte, amely feltehetően a fehérje és a polimer közötti kölcsönhatásoknak tulajdonítható. A Raman-térképezés minden vizsgált formulációban megerősítette az enzim sikeres rögzülését és homogén eloszlását. A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek alapján az enzim jelenlétében a nanoszálak morfológiája megfelelő maradt, bár az átmérőeloszlások kissé kiszélesedtek.

A Karl-Fischer-titrálás eredményei alapján minden nanoszálás minta alacsony víztartalommal rendelkezett, melyek között a PLA-alapú szálak mutatták a legalacsonyabb értéket (~ 4%). A pozitronanihilációs élettartam-analízis azt mutatta, hogy az enzim beépítése mérsékelte a szálak szabad térfogatát, utalva az enzim sikeres beágyazódására a polimer mátrixba.

Amint azt a 7. ábra szemlélteti, minden vizsgált nanoszálás formuláció fokozott katalitikus aktivitást mutatott a natív *PpL*-hez képest. A PVA esetében az enzimaktivitás 45%-kal, PVP-ben 215%-kal, PLA-mátrixra történő adszorpció mellett 615%-kal, míg PLA-ba történő csapdázás esetén 1075%-kal növekedett. A javulásokat a polimermátrixok által kialakított kedvező mikrokörnyezetnek tulajdoníthatjuk. A vízben nem oldódó PLA különösen előnyösnek bizonyult, mivel hatékonyabban őrizte meg az enzim stabilitását biztosító kölcsönhatásokat, mint a vízdékony mátrixok.

A nanoszálás formulációk enzimaktivitását több *PpL*-tartalmú kereskedelmi készítménnyel összehasonlítva is megvizsgáltuk. A PLA nanoszálakba csapdázott *PpL* formuláció mind standard, mind pedig intesztinoszolvens körülmények között azonos, vagy magasabb aktivitást mutatott, mint a forgalomban lévő PERT



**7. ábra.** Specifikus enzimaktivitás ( $U_E$ ) értékek natív és nanoszálak (PVA, PVP, PLA) segítségével rögzített *PpL* esetén, intesztinoszolvens környezetben ( $pH = 6.8$ ,  $37^\circ C$ ), 1-oktil-acetát hidrolízise során. Az aktivitási értékeket gázkromatográfiás módszerrel, 2 órás inkubáció után határoztuk meg.

készítmények. Ez a kedvező hatás főként annak tulajdonítható, hogy a PLA-mátrix hatékonyan stabilizálja az enzimet aktív állapotában, még kedvezőtlen környezetben is elősegítve a magasabb katalitikus teljesítményt.

A szerves oldószerekhez társuló toxicitás elkerülése érdekében vizsgálatainkat vízoldható PVA mátrix alkalmazására helyeztük át, mely során célunk volt az elérhető terápiás hatékonyság fokozása. Ennek érdekében különféle ciklodextrin (CD) adalékokat ko-formuláltunk *Burkholderia cepacia* (BcL) és *Aspergillus oryzae* (AoL) eredetű lipázokkal, melyek irodalmi adatok szerint jelentősebb terápiás potenciállal rendelkeznek, mint a PpL. Öt különböző CD vizsgálata alapján a 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciklodextrin (HPB-CD) és a  $\beta$ -ciklodextrin (B-CD) jelentősen növelte a BcL aktivitását, míg AoL esetében a HPB-CD és a szulfobutilált- $\beta$ -ciklodextrin (SBB-CD) bizonyult a leghatékonyabbnak. FeSSIF körülmények között ezek a CD-vel templált enzimek lényegesen magasabb aktivitást mutattak, mint natív megfelelőik.

A CD-lipáz párok PVA-alapú nanoszálakba történő szálképzése szabályos, homogén szerkezetű nanoszálakat eredményezett, melyekben a lipázok egyenletes eloszlását Raman-térképezéssel igazoltuk. Bár a szálképzés során a ciklodextrinek által fokozott enzimaktivitás némileg csökkent, minden nanoszálás CD-lipáz formuláció felülmúlta a kereskedelmi készítményeket a FeSSIF közegben végzett aktivitási vizsgálatok során (lásd: 1. táblázat).

**1. táblázat.** A különböző lipáz tartalmú készítmények – nanoszálás formulációk és kereskedelmi forgalomban kapható gyógyszerkészítmények – konverziójának ( $c$ , %) és specifikus aktivitásának ( $U_B$ ,  $U g^{-1}$ ) összehasonlítása  $p$ -nitrofenil-palmitát ( $p$ -NPP) hidrolízise során, 1 órás inkubáció után,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, standard és FeSSIF reakciókörülmények között.

| Lipáz                                     | Ciklodextrin        | Standard<br>$c$ (%) | Reakcióelegy<br>$U_B$ ( $U g^{-1}$ ) | FeSSIF<br>$c$ (%) | Reakcióelegy<br>$U_B$ ( $U g^{-1}$ ) |
|---|---------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| <b>Nanoszálás formulációk</b>             |                     |                     |                                      |                   |                                      |
| BcL                                       | –*                  | $74,9 \pm 4,8$      | $137 \pm 9$                          | $38,7 \pm 0,5$    | $191 \pm 3$                          |
|   | B-CD <sup>1</sup>   | $98,6 \pm 4,7$      | $188 \pm 9$                          | $39,6 \pm 0,5$    | $196 \pm 3$                          |
|   | HPB-CD <sup>2</sup> | $30,7 \pm 0,5$      | $56 \pm 1$                           | $43,6 \pm 3,5$    | $216 \pm 18$                         |
| AoL                                       | –*                  | $99,1 \pm 0,8$      | $182 \pm 10$                         | $22,7 \pm 0,3$    | $112 \pm 1$                          |
|   | HPB-CD <sup>2</sup> | $77,3 \pm 11,1$     | $142 \pm 20$                         | $24,6 \pm 4,1$    | $122 \pm 20$                         |
|   | SBB-CD <sup>3</sup> | $96,3 \pm 7,0$      | $177 \pm 13$                         | $21,0 \pm 0,4$    | $104 \pm 2$                          |
| <b>Forgalmazott gyógyszerkészítmények</b> |                     |                     |                                      |                   |                                      |
| Kreon <sup>®</sup> 25000                  |                     | $6,7 \pm 1,3$       | $12 \pm 2$                           | $10,9 \pm 0,1$    | $54 \pm 1$                           |
| Pangrol <sup>®</sup> 25000                |                     | $3,4 \pm 0,3$       | $6 \pm 1$                            | $10,8 \pm 0,5$    | $54 \pm 3$                           |

\* Natív lipáz

<sup>1</sup> B-CD:  $\beta$ -Ciklodextrin

<sup>2</sup> HPB-CD: 2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciklodextrin

<sup>3</sup> SBB-CD: Szulfobutilált- $\beta$ -ciklodextrin

Eredményeink igazolták, hogy az *electrospinning* hatékony megközelítést kínál az emésztőenzimek nanoformulálására. A ciklodextrin adalékok jelenléte szignifikánsan fokozta az enzimaktivitást, melynek eredményeként a PVA-alapú nanoszálás preformulációk kimagasló katalitikus teljesítményt és kedvező technológiai jellemzőket mutattak. Az eredmények alátámasztják a nanoszálás rendszerek ígéretes alkalmazhatóságát az orális enzimterápiák új generációjában.

## 5. A doktori értekezés tézispontjai

Az értekezés legfontosabb következtetéseit az alábbi tézisek formájában összegzem, minden állítás mellett feltüntetve a vonatkozó tudományos közleményeket:

1. Átfogó módon vizsgáltuk, hogy a poli(vinil-alkohol) molekulatömege, hidrolizáltsági foka és koncentrációja hogyan befolyásolja az elektrosztatikus szálképzést vizes prekursor oldatokban. Doktori munkám során bemutattam, hogy ezek a paraméterek jelentős hatással vannak a nanoszálak morfológiájára és a rögzített *Burkholderia cepacia* modell enzim biokatalitikus aktivitására. Meghatároztam a poli(vinil-alkohol) nanoszálak előállításához szükséges paramétertartományokat, és az electrospinning optimalizálásával több mint tízszeres specifikus enzimaktivitás-növekedést értem el a natív lipázhoz képest. [1]
2. Kísérleteink alapján megállapítottam, hogy az elektrosztatikus szálképzéssel előállított poli(vinil-alkohol) nanoszálak üvegesedési hőmérséklete és az immobilizált *Burkholderia cepacia* lipáz specifikus aktivitása között közvetlen összefüggés van. Kimutattam, hogy a magasabb üvegesedési hőmérséklet az enzim specifikus aktivitásának növekedésével jár együtt. [1]
3. Új típusú vízdoldható poli(vinil-pirrolidon)-alapú és vízben oldhatatlan politejsav-alapú nanostrukturált arcmaszkokat fejlesztettünk ki elektrosztatikus szálképzéssel. A több rétegből álló formulációk két különböző immobilizált lipázt (*Candida rugosa* és *Rhizomucor miehei*) és nadifloxacint kombináltak, újszerű megközelítést kínálva a topikális hatóanyagleadásra. Kimutattam, hogy a lipázok szinergikus módon képesek együtt hidrolizálni a humán bőrlipidekben megtalálható főbb zsírsavak metil-észtereit, és enzimaktivitásuk több mint két nagyságrenddel meghaladja natív formájukét. [2]
4. Topikális transzdermális permeabilitási vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a kifejlesztett több-rétegű nanoszálak maszkok – mind az önmagában nadifloxacint, mind a nadifloxacint és *Candida rugosa*, valamint *Rhizomucor miehei* lipázokat is tartalmazó változatok – hatékonyan segítik elő a nadifloxacin bejutását az emberi epidermiszbe, ezzel bemutatva az electrospinning technikával készült formulációk jelentőségét a topikális hatóanyagleadás fejlesztésében. [2]
5. Szisztematikusan vizsgáltuk a sertés hasnyálmirigy-lipáz immobilizációját elektrosztatikus szálképzéssel előállított poli(vinil-alkohol), poli(vinil-pirrolidon) és politejsav nanoszálakban, csapdázásos és adszorpciós módszerekkel. A politejsav nanoszálakba történő csapdázás több mint tízszeres aktivitásnövekedést eredményezett intesztinoszolvens körülmények között a natív lipázhoz képest, meghaladva a kereskedelmi forgalomban kapható terápiás formulációk hatékonyságát. Ezzel igazoltam, hogy az így előállított nanoszál-alapú preformulációk ígéretes alapot nyújthatnak az orálisan alkalmazható hasnyálmirigy enzimpótló terápiák (PERT) fejlesztéséhez. [3]
6. Kimutattuk, hogy a poli(vinil-alkohol) nanoszálakba csapdázott *Burkholderia cepacia* és *Aspergillus oryzae* lipázok enzimaktivitása növelhető specifikus ciklodextrin-adalékok ( $\beta$ -ciklodextrin, 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciklodextrin és szulfobutilált- $\beta$ -ciklodextrin) együttes alkalmazásával, optimális lipáz-ciklodextrin tömegarány mellett. Ez az eljárás nemcsak az enzimaktivitás fokozását segíti elő, hanem egyenletesebb eloszlást is biztosít a nanoszálakban, így új stratégiát kínál a nanoszál-alapú terápiás enzimformulációk fejlesztéséhez. [4]

## 6. Alkalmazási lehetőségek és jövőbeli hasznosítás

A dolgozatban kidolgozott nanoszerkezetű enzimformulációk számos ígéretes alkalmazási lehetőséget kínálnak az orvostudomány és a gyógyszerészet területén. A nanoszálás hordozókba immobilizált lipázok kiemelkedő potenciált demonstráltak topikális és orális enzimterápiás alkalmazásokban.

A *Candida rugosa* és *Rhizomucor miehei* lipázokat, valamint nadifloxacint tartalmazó, többrétegű nanoszálás maszk prototípusa kiváló biokatalitikus aktivitást és hatékony bőrpenetrációt mutatott. Eredményeink alapján ez a típusú formuláció alkalmas lehet jövőbeni dermatológiai készítmények fejlesztésére, különös tekintettel az olyan arcmaszkok esetében, amelyek célja az *acne vulgaris* kombinált kezelése. A lipázok hatékonyan kombinálhatók egyéb terápiás összetevőkkel és hámlasztó, valamint faggyúszabályozó tulajdonságaik elősegíthetik a hatóanyagok felszívódását.

Az orális alkalmazásra szánt, elektrosztatikus szálképzéssel előállított PERT terápiás preformulációk enzimaktivitása elérte vagy meghaladta a kereskedelmi forgalomban lévő, ilyen célú készítmények hatékonyságát. Emellett a *Burkholderia cepacia* és *Aspergillus oryzae* eredetű lipázokat tartalmazó nanoszálás formulációk nagyságrendileg magasabb terápiás potenciált mutattak, mint a sertés hasnyálmirigy lipáz alkalmazó kereskedelmi megoldások. A ciklodextrinek funkcionális adalékként történő alkalmazása tovább fokozta az enzimaktivitást, különösen a gasztrointesztinális traktust szimuláló környezetben, ezáltal hozzájárulva a készítmények hatásosságához.

Az *electrospinning* technológia méretnövelhetősége, testreszabhatósága és a terápiás hatóanyagokkal való széleskörű kompatibilitása lehetővé teszi fejlett, potenciálisan betegre szabott enzimterápiák tervezését. Az ipari megvalósítás lehetőségét tovább erősíti, hogy az *electrospinning* egy magas fokon automatizálható, GMP-kompatibilis gyártástechnológia.

Összességében a dolgozatban ismertetett formulációs stratégiák új irányokat jelölhetnek ki az enzimterápia területén, és hozzájárulhatnak hatékonyabb, stabilabb és célzottabb gyógyszerkészítmények jövőbeni fejlesztéséhez.

## 7. Közlemények

### A disszertáció elkészítéséhez felhasznált tudományos közlemények

- [1] **Gergő Dániel Tóth**, Zsófia Molnár, Gábor Koplányi, Benjámín Gyarmati, András Szilágyi, Gábor Katona, Alfréd Menyhárd, László Poppe, Béla Pukánszky, and Diána Balogh-Weiser. How could the physical properties of polyvinyl alcohol influence enzymatic activity? A detailed study on nanofibrous catalysts incorporating a lipase from *Burkholderia cepacia*. *ChemCatChem*, 2024. // Szerzői arány: 90%; Kvartilis besorolás: D1; Impaktfaktor: 5.497
- [2] Diána Balogh-Weiser, Alexandra Molnár, **Gergő Dániel Tóth**, Gábor Koplányi, József Szemes, Balázs Decsi, Gábor Katona, Maryana Salamah, Ferenc Ender, Anita Kovács, et al. Combined nanofibrous face mask: Co-formulation of lipases and antibiotic agent by electrospinning technique. *Pharmaceutics*, 15(4):1174, 2023. // Szerzői arány: 55%; Kvartilis besorolás: Q1; Impaktfaktor: 4.9
- [3] **Gergő Dániel Tóth**, Nikolett Kállai-Szabó, Miléna Lengyel, Károly Süvegh, Ferenc Ender, Gábor Katona, Adrienn Kazsoki, Romána Zelkó, István Antal, György T Balogh, et al. Nanoformulation of lipase from porcine pancreas by electrospinning as a novel alternative for enzyme-based per os therapies. *Journal of Molecular Liquids*, 389:122819,

2023. // Szerzői arány: 100%; Kvartilis besorolás: Q1; Impaktfaktor: 5.3

- [4] **Gergő Dániel Tóth**, Adrienn Kazsoki, Benjámín Gyarmati, András Szilágyi, Gábor Vasvári, Gábor Katona, Lajos Sente, Romána Zelkó, László Poppe, Diána Balogh-Weiser, et al. Nanofibrous formulation of cyclodextrin stabilized lipases for efficient pancreatin replacement therapies. *Pharmaceutics*, 13(7):972, 2021. // Szerzői arány: 100%; Kvartilis besorolás: Q1; Impaktfaktor: 4.9

## Egyéb tudományos közlemények

- [1] **Gergő Dániel Tóth**, Gábor Koplányi, Balázs Kenéz, and Diána Balogh-Weiser. Nanoformulation of therapeutic enzymes: A short review. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 67(4):624–635, 2023. // Szerzői arány: 60%; Kvartilis besorolás: Q3; Impaktfaktor: 1.4
- [2] Gábor Koplányi, Evelin Santa-Bell, Zsófia Molnár, **Gergő Dániel Tóth**, Muriel Józó, András Szilágyi, Ferenc Ender, Béla Pukánszky, Beáta G Vértessy, László Poppe, et al. Entrapment of phenylalanine ammonia-lyase in nanofibrous polylactic acid matrices by emulsion electrospinning. *Catalysts*, 11(10):1149, 2021. // Szerzői arány: 20%; Kvartilis besorolás: Q2; Impaktfaktor: 3.8
- [3] László Nagy-Győr, Emese Farkas, Mihai Lăcătuș, **Gergő Dániel Tóth**, Dániel Incze, Gábor Hornyánszky, Viktória Bódai, Csaba Paizs, László Poppe, and Diána Balogh-Weiser. Conservation of the biocatalytic activity of whole yeast cells by supported sol-gel entrapment for efficient acyloin condensation. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 64(2):153–161, 2020. // Szerzői arány: 20%; Kvartilis besorolás: Q3; Impaktfaktor: 1.4
- [4] Guoqiang Li, Waldemar Jankowski, Joanna Kujawa, Baturalp Yalcinkaya, Fatma Yalcinkaya, Diána Balogh-Weiser, **Gergő Dániel Tóth**, Ferenc Ender, Norman Sepsik and Wojciech Kujawski. Recent Advances in the Preparation and Applications in Separation Processes of Electrospun Nanofiber-Based Materials. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13, 115174 2025. // Szerzői arány: 90%; Kvartilis besorolás: Q1; Impaktfaktor: 7.4

## Konferencia előadások

1. **G.D. Tóth**, N. Kállai, M. Lengyel, G. Katona, R. Zelkó, I. Antal, B. Gyarmati, G.T. Balogh, D. Balogh-Weiser, Formulation of Lipases into Polymer Nanofibers for Pancreatin Replacement Therapies, *Chemistry Physics and Biology of Colloids and Interfaces*, 2022. Eger, Magyarország – Poszter bemutatás
2. **Tóth G.D.**, Molnár A., Kállai N., Lengyel M., Katona G., Zelkó R., Antal I., Balogh Gy.T., Balogh-Weiser D., Nanoszálás Enzimmészitmények Fejlesztése Enzimmhelyettesítő Terápiához, *Gyógyszertechológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia*, 2022. Siófok, Magyarország – Poszter bemutatás
3. **G.D. Tóth**, New Possibilities For The Immobilization And Formulation Of Biocatalysts By Electrospinning Technique *Membrane Materials - Modification and Separation (M3-S)*, 2023. Toruń, Lengyelország – Szóbeli előadás
4. **G.D. Tóth**, Nanoformulating enzymes for therapeutic use: A novel approach using electrospun nanofibers, *Zechmeister Award*, 2023. Pécs, Magyarország – Szóbeli előadás

5. **G.D. Tóth**, Electrospun Nanofibers: A Novel Delivery System for Nanoformulated Therapeutic Enzymes, *Electrospun Nanofibers and Applications Workshop*, 2024. Liberec, Csehország – Szóbeli előadás
6. **G.D. Tóth**, Nanofibrous Carriers For Advanced Enzyme Replacement Therapies, *Drug Delivery through the Physiological Barriers*, 2025. Budapest, Magyarország – Szóbeli előadás

### **További konferencia részvételek**

1. *SpinSpiration Symposium: Connecting Minds in Electrospinning*, 2024. Online
2. *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVII. and EUFEPS Annual Meeting*, 2024. Debrecen, Magyarország
3. *5<sup>th</sup> International Conference on Bio-based Polymers and Composites*, 2024. Esztergom, Magyarország