



**Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszertechológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet**

**Ph.D. értekezés tézisei**

**PARODONTÁLIS MEGBETEGÉS HELYI KEZELÉSÉRE  
SZOLGÁLÓ INNOVATÍV HATÓANYAG-HORDOZÓ  
RENDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATA**

**Léber Attila**

Témavezetők:

Dr. habil. Csányi Erzsébet  
Dr. Budai-Szűcs Mária PhD

**SZEGED  
2020**

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Vezető: Prof. Dr. Hohmann Judit, akadémikus

Képzési program: Gyógyszertechnológia  
Programvezető: Dr. habil. Csóka Ildikó

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezetők:  
Dr. habil. Csányi Erzsébet  
Dr. Budai-Szűcs Mária PhD

**Léber Attila**

**PARODONTÁLIS MEGBETEGÉS HELYI KEZELÉSÉRE SZOLGÁLÓ  
INNOVATÍV HATÓANYAG-HORDOZÓ RENDSZEREK  
FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATA**

**Komplexvizsga-bizottság:**

**Elnök:** *Prof. Dr. Révész Piroska DSc, Szegedi Tudományegyetem,  
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet*

**Tagok:** *Dr. habil. Bácskay Ildikó, Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai  
Tanszék*

*Ifj. Dr. habil. Regdon Géza, Szegedi Tudományegyetem,  
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet*

**Bíráló bizottság**

**Elnök:** *Prof. Dr. Hohmann Judit DSc, akadémikus, Szegedi  
Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet*

**Opponensek:** *Dr. habil. Bácskay Ildikó, Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai  
Tanszék*

*Dr. Fehér András PhD, EGIS Gyógyszergyár Zrt.*

**Tagok:** *Dr. habil. Doró Péter, Szegedi Tudományegyetem, Klinikai  
Gyógyszerészeti Intézet*

*Dr. Szatmári István PhD, Szegedi Tudományegyetem,  
Gyógyszerkémiai Intézet*

SZEGED  
2020

## 1. BEVEZETÉS

A plakk indukálta parodontális betegségek a leggyakrabban előforduló krónikus gyulladásos állapotok, amelyek a felnőtt lakosság közel felét érintik világszerte. A fogágybetegség súlyos, életminőséget rontó és fogvesztéssel, rágószervi elégtelenséggel, és beszédhibával járó egészségügyi probléma. Krónikus gyulladásos folyamatok, mint az aterogén kardiovaszkuláris megbetegedés, a kettes típusú cukorbetegség, a reumatoid artritisz, a krónikus vesebetegség, az elhízás és a krónikus obstruktív tüdőbetegség ugyancsak összefüggésbe hozhatók a parodontális megbetegedésekkel.

A parodontózis lehetséges kezelési módjai közé tartozik a szubgingivális terület plakkmentesítése, a szubgingivális fogfelszín simítása, valamint a sebészeti beavatkozás. Mindegyik kezelés kiegészítő terápiájaként szisztémás antibiotikumokat és klórhexidint tartalmazó szájvizet alkalmaznak. A mélyebb tasakok szubgingivális plakkmentesítése nehezen kivitelezhető, míg a műtéti beavatkozást követően a felépülési idő hosszú. Az adjuváns szisztémás antibiotikum-terápia a parodontális tasakban nem biztosít megfelelően magas hatóanyag-koncentrációt, használata növeli a rezisztens baktériumtörzsek megjelenésének esélyét is.

A fogágybetegségek kezelésére szolgáló helyi hatóanyag-hordozó rendszerek kutatására az elmúlt 10—15 évben nagymértékű figyelem összpontosult. Számos publikációban antibiotikumot tartalmazó helyi hatóanyag-hordozó rendszerek kifejlesztésére helyezték a hangsúlyt, mivel a helyi rendszerek alkalmazása önmagában vagy más fogászati beavatkozásokkal kombinálva hatásosabb kezelést biztosíthat a szisztémás antibiotikum terápiával összehasonlítva. A parodontális megbetegedés kezelésében ígéretes megközelítés az antibiotikumokat tartalmazó helyi hordozórendszerek alkalmazása. Ezeknek a rendszereknek a szubgingivális alkalmazása hatóanyagok megnövelt biohasznosíthatóságát eredményezheti, akár százszoros antibiotikum-koncentráció elérésével a fertőzéssel érintett területeken. A helyileg alkalmazható rendszerek az antibiotikumok nyújtott felszabadulását biztosíthatják, védve a hatóanyagot a gasztrointesztinális traktus degradáló hatásától, valamint elfedhetik esetleges kellemetlen ízüket. A helyi alkalmazás csökkentheti a rezisztens baktériumtörzsek kialakulását, valamint a szájon át történő antibiotikum kezelés során jelentkező komoly mellékhatások is elkerülhetőek.

Mindezeket figyelembe véve a helyileg alkalmazott antibiotikumot tartalmazó rendszerek igen fontosak lehetnek a fogágybetegség kezelése során. A technológiai cél olyan költséghatékony és a fent vázolt tulajdonságokkal rendelkező lokális készítmények fejlesztése,

amelyek a hatóanyagok szélesebb körű, biztonságosabb és ígéretesebb alkalmazását teszik lehetővé.

## 2. CÉLKITŰZÉS

A PhD-munkám célja fogágybetegség önálló vagy adjuváns helyi kezelésére szolgáló antibiotikumot tartalmazó, innovatív hatóanyag-hordozók fejlesztése és vizsgálata volt. A munka két fő szakaszra osztható: az első szakaszban lipid alapú, míg a második szakaszban nanoszálás helyi hordozórendszerek fejlesztése és vizsgálata történt meg.

A lipid alapú rendszerek esetében először az összetevők kiválasztását, majd az összetétel optimalizálását végeztem el úgy, hogy a formulált hordozó megfeleljen az alábbi követelményeknek:

- biokompatibilis és biodegradábilis összetevőket tartalmazzon;
- testhőmérsékleten lágyuljon meg, amely lehetővé teszi, hogy a rendszer felvegye a parodontális tasak alakját, valamint, hogy távozzon a tasakból annak gyógyulása során;
- rendelkezzen mukoadhezív tulajdonsággal, amely lehetővé teszi a rendszer szubgingivális retencióját és ezáltal a hosszabb helyi hatás biztosítását;
- biztosítson vízmentes közeget a hatóanyagok számára, így védve őket a környezeti hatásoktól (oxidáció és páratartalom) és következésképpen az esetleges bomlástól;
- biztosítson nyújtott hatóanyag-leadást, amely hozzájárul a hosszabb antimikrobás hatás kialakulásához;
- legyen lehetőség antibiotikumok vagy dezincificensek széles skálájának inkorporálására, hogy a betegek egyéni szükségletei kielégíthetők legyenek.

A munka második felében elektrosztatikus szálhúzással előállított nanoszálás hatóanyag-hordozó rendszerek fejlesztésére és vizsgálatára fókuszáltam. A rendszerekkel szemben a következő követelményeket támasztottam:

- legyen biodegradábilis és biokompatibilis az alkalmazott polimer;
- a hordozó hidrofíl antibiotikumok számára nyújtott hatóanyag-leadást biztosítson.

Az inkorporált hatóanyag és a hordozórendszer, valamint a hordozórendszer és a hatóanyag-leadás közötti kapcsolatok vizsgálata a munka fontos részét képezte.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Anyagok

##### 3.1.1. Lipid alapú rendszerek

A lipid alapú rendszerek elkészítése során az alábbi anyagok kerültek felhasználásra: Suppocire BP (SBP) pellet, Methocel E4M (HPMC = hidroxipropil-metilcellulóz), Kolliphor RH40 (KP) (makrogol-glicerín-éter-hidroxisztearát), amoxicillin (AMX), cera alba (WB), cetil-sztearil-alkohol (CA), metronidazol (MZ), cink-glükonát (ZnGlu), cink-hialuronát (ZnHA) és klórhexidin-diglükonát (CHX).

##### 3.1.2. PLA alapú nanoszálás rendszerek

A PLA alapú nanoszálás rendszerek elkészítése során politejsav (PLA), diklórmétán, dimetil-szulfoxid és metronidazol került felhasználásra.

#### 3.2. Módszerek

##### 3.2.1. A lipid alapú rendszerek előállítása

A rendszerek előállítása során olvasztásos módszert alkalmaztam. Fűthető mágneses keverő segítségével először a két lipofil komponenst (CA-t vagy WB-t, valamint SBP-t) és az emulgenst (KP) olvasztottam össze 70 °C-on, majd szuszpendáltam és homogenizáltam a polimert (a Methocel E4M-et vagy a ZnHA-ot). A hatóanyagokat ezután diszpergáltam az 50 °C-ra visszahűtött olvadékban. A rendszerek végső alakját öntéssel eljárással kaptam meg (1,5 mm magas és 9 mm átmérőjű henger alakú szilikon formába).

##### 3.2.2. A lipid alapú rendszerek differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálata (DSC)

A lipid rendszerek lágyulását és olvadáspontját differenciális pásztázó kalorimetriával határoztam meg (Mettler-Toledo DSC 821e). A mérések argon atmoszférában történtek, a hőmérsékletet +5 °C-ról +100 °C-ra emeltem 5 °C/perc sebességgel. A vizsgálatok során 10 mg mintát helyeztem a 40 µl-es alumínium tégelybe.

##### 3.2.3. A lipid alapú rendszerek *in vitro* hatóanyag-diffúziójának vizsgálata

A hatóanyag-hordozók *in vitro* hatóanyag-leadását dializálócsöves módszerrel határoztam meg. A rendszerek tömegét analitikai mérlegen mértem, majd a mintákat 50 mm hosszú dialíziscsövekbe helyeztem (Spectra/Por® Standard RC tubing, MWCO: 12-14 kD), végül a csöveket lezártam. A lezárt csöveket 7,5 ml 7,4-es pH-jú 37 °C-os PBS-oldatba helyeztem. A hatóanyag-leadást 7 napon keresztül vizsgáltam, 3 párhuzamos mérést végezve. A mérési

időpontokban (0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 24; 30; 48; 72; 96 és 168 óra) 1 ml mintát vettem, amelyet 1 ml 37 °C-os PBS-oldattal pótoltam.

A minták CHX-tartalmát UV/Vis spektrofotometriával 250 nm-en, míg a MZ-tartalmát HPLC-módszerrel határoztam meg UV-detektálással 230 nm-en. Kinetex 250 mm × 4.6 mm oszlopot használtam. A HPLC-analízis során izokratikus elúciót végeztem 20:80 (v/v) arányú metanol-Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-eleggyel. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. Az AMX retenciós ideje 4,6 perc, míg a MZ-é 6,7 perc volt. Az elválasztás felbontása (R<sub>s</sub>) 3,10 volt.

#### 3.2.4. A PLA alapú rendszerek előállítása elektrosztatikus szálhúzásos módszerrel

A PLA alapú rendszerek elektrosztatikus szálhúzással történő előállítását a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Műanyag- és Gumiipari Laboratóriuma végezte. A szálhúzáshoz használt oldat összetétele a következő volt: a PLA-t diklórmetán és dimetil-szulfoxid keverékében oldották, az összetételekben a metronidazolt két különböző koncentrációban alkalmazták.

#### 3.2.5. Az elektrosztatikus szálhúzással előállított nanoszálás rendszerek pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálata

A nanoszálás rendszerek natív és préselt (korong) formájának mikroszerkezetét Jeol JSM 6380 LA pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgálták. A különböző nagyítású mikroszkópos képek elkészítése során 15 kV gyorsítófeszültséget alkalmaztak. A vizsgálat előtt a minták felszínét arannyal vonták be.

#### 3.2.6. Az elektrosztatikus szálhúzással előállított nanoszálás rendszerek *in vitro* hatóanyag-diffúziójának vizsgálata

A nanoszálás rendszerekből történő *in vitro* MZ-diffúziót UV/Vis spektrofotometriával határoztam meg. A préselt rendszereket (0.014—0.017 g) és a natív szálakat (0.012—0.016 g) tömegmérést követően 7,5 ml 7,4-es pH-jú 37 °C-os PBS-oldatba helyeztem. A megadott időpontokban (0,5; 1; 4; 6; 10; 24; 30; 48; 72; 96 és 196 óra) 1,0 ml mintát vettem, amelyet 1,0 ml 37 °C-os PBS-oldattal pótoltam. A hatóanyag-diffúziót 7 napon keresztül vizsgáltam.

#### 3.2.7. A rendszerek antimikrobás hatékonyságának vizsgálata

Jellegzetes parodontopatogén baktériumtörzsek: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Parvimonas micra* (ATCC 33270), *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29524) és *Prevotella intermedia* (118710 számú klinikai minta) kerültek felhasználásra. 1 McFarland-sztenderdnek megfelelő koncentrációjú baktériumszuspenziót készítettem az egyes

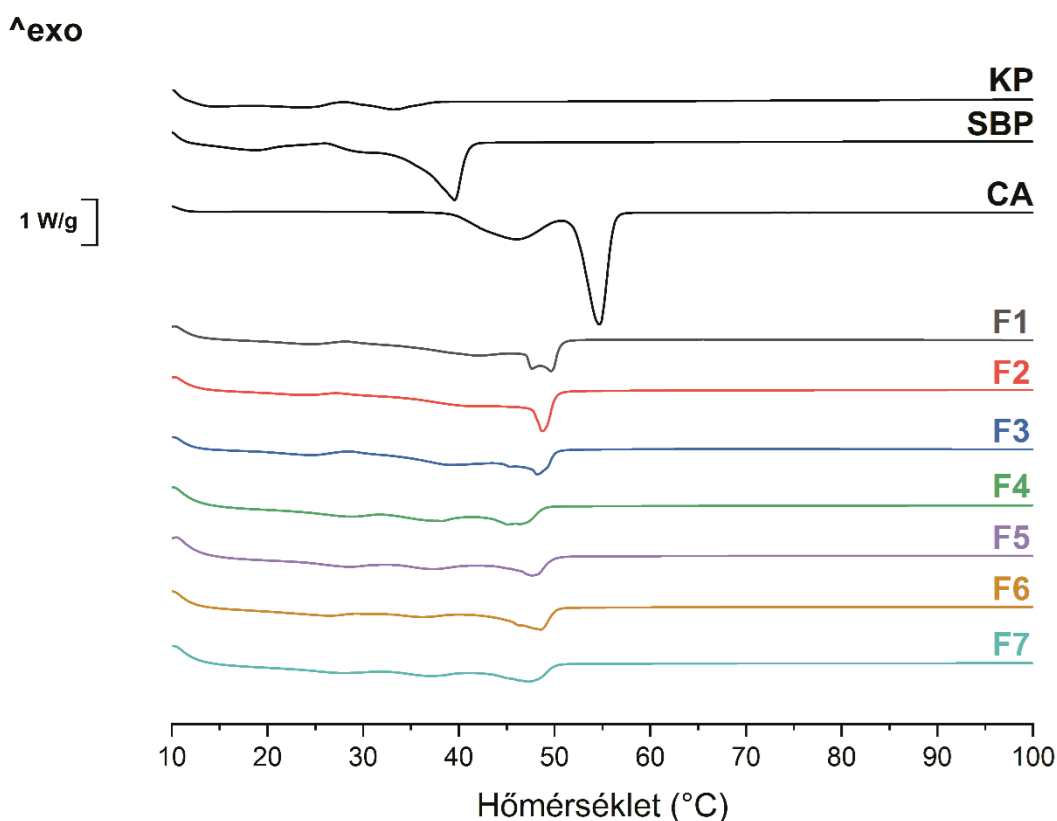
baktériumtörzsekből 0,9%-os NaCl-oldat felhasználásával. A szuszpenzió megfelelő mennyiségét lóvért tartalmazó agarra vittem fel, majd erre helyeztem a mintákat. 24 óra anaerob körülmények közötti inkubációt követően a gátlási zóna átmérőjét mértem. A mintákat ezután egy újabb, friss baktériumszuszenzióval inokkulált táptalajra helyeztem, majd 24 órán keresztül anaerob körülmények között inkubáltam. Ezt addig ismételtam, amíg már nem volt mérhető gátlási zóna.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 4.1. Lipid alapú rendszerek

#### 4.1.1. Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálat

A DSC mérések során vizsgáltam a különböző vázképző anyagok és koncentrációinak,



1. ábra A különböző rendszerek (F1—F7) és alapanyagok DSC-görbéi.

valamint a felületaktív anyag koncentrációjának az olvadáspontra kifejtett hatását (1. ábra). A mérések bebizonyították, hogy az inkorporált hatóanyagok nem befolyásolják a készítmények olvadáspontját, valamint lágyulási hőmérsékletét.

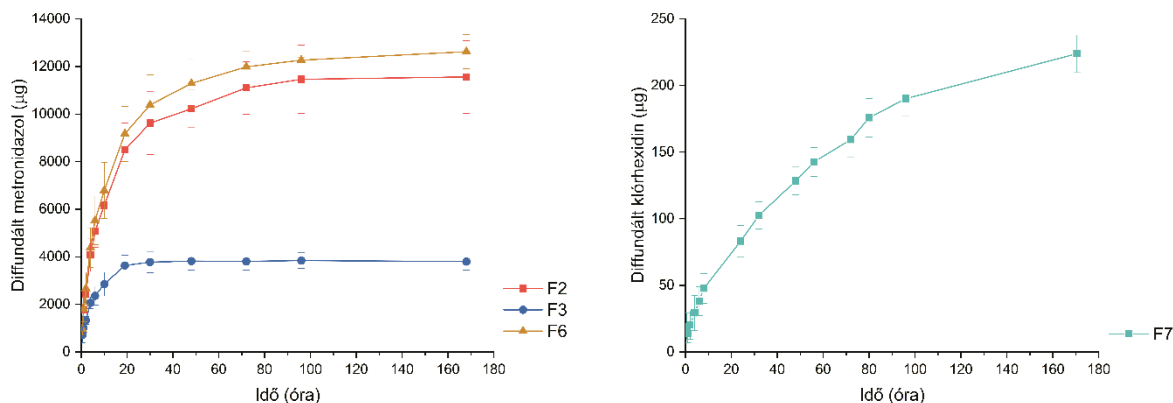
40%-os cetil-sztearil-alkohol-koncentrációnál tapasztalható a felhasználás szempontjából optimális lágyulási hőmérséklet. A felületaktív anyag koncentrációja nem befolyásolta a rendszerek lágyulását és olvadáspontját.

Az összetételek alapjául SBP-t választottam, amelynek a mérések alapján 39,08 °C az olvadáspontja. A készítményekben használt vázképző anyagnak – a CA-nak – az olvadáspontja 61 °C. A DSC vizsgálatok eredményei alapján a KP lágyulási hőmérséklet-tartománya 20—30 °C közé esik. Ebben a hőmérséklettartományban (10—100 °C) a polimerekhez (ZnHA és Methocel E4M) és a ZnGlu-hoz tartozó éles csúcs nem észlelhető a görbéken.

Az F1–F7 összetételek vizsgálata során az inkorporált hatóanyagok és segédanyagok olvadáspontra kifejtett hatását vizsgáltam. Az antibiotikumok vagy egyéb szuszpendált anyagok részben feloldódhatnak a lipid alapban, ezért vizsgáltam ezen inkorporált anyagok eltérő mennyiségeinek olvadáspontra kifejtett hatását. Minden rendszer esetén az SBP és CA éles csúcsai eltűntek, összeolvadtak, és a közös csúcs a két tiszta komponens csúcsai között lévő hőmérséklet felé tolódott. Kb. 30 °C-nál egy kisebb lágyulás figyelhető meg, de teljes olvadás csak 40 és 50 °C között történik, így testhőmérsékleten koherens szerkezet jellemzi a mintákat.

#### 4.1.2. *In vitro* hatóanyag-diffúziós vizsgálatok

A hatóanyag-diffúziós vizsgálatok során azon rendszerek hatóanyag-felszabadulási profiljait vizsgáltam, amelyek AMX-t, MZ-t vagy CHX-t tartalmaznak.



**2. ábra** Az F2 (MZ), F3 (AMX+MZ), F6 (MZ+ZnHA) és F7 (CHX) rendszerekből felszabaduló hatóanyag mennyisége (µg).

A 2. ábra a rendszerekből felszabaduló MZ vagy CHX mennyiségét mutatja. Az F2 (MZ) és F6 (MZ+ZnHA) rendszerek hasonló hatóanyag-felszabadulási profillal rendelkeznek. A 100. óránál kezdődő platófázis mindkét esetben megfigyelhető, amely teljes hatóanyag-leadásra utal. Az F3 (AMX+MZ) összetétel hatóanyag-felszabadulási görbéje azt mutatja, hogy az inkorporált MZ mindössze egyharmada szabadult fel.

Az AMX-nél jobb vízőldékonysággal rendelkező MZ feltételezhetően könnyebben oldódik ki a rendszerekből, a hatóanyagkristályok helyén kapillárisok maradnak, amely jobb vízpenetrációt és jelentősebb duzzadást eredményez, nagyobb mennyiségű MZ-t inkorporálás



esetében. Kisebb mennyiségű MZ inkorporálása esetén (amikor az AMX-szel kombinációban van jelen), csak kevesebb kapilláris képződik a hatóanyag-felszabadulás során, csökkent vízpenetrációt és hatóanyag-felszabadulást okozva. A ZnHA alkalmazása nem befolyásolta a hatóanyag-felszabadulási profilt, amely a 15% MZ-t tartalmazó rendszerek esetében a polimer típusától függetlenül tapasztalható hasonló duzzadási és eróziós profilokkal magyarázható.

Az F7-es (CHX) rendszer esetében az egyhetes vizsgálati periódus alatt kb. 225 µg hatóanyag szabadult fel a készítményekből. Ez az inkorporált hatóanyag közel 50%-ának felel meg. Az első 24 órában az összes hatóanyag átlagosan 19%-a (83 µg) szabadult fel a hordozókból. A mérés ideje alatt nem alakult ki platófázis, amely arra utal, hogy a hatóanyag-felszabadulás 1 hét után is folytatódik.

A diffúziós vizsgálat eredményeit összehasonlítva az ugyancsak CHX-t tartalmazó kereskedelmi forgalomban kapható PerioChip®-ből történő hatóanyag-diffúzióval megállapítható, hogy az F7-es összetétel folyamatos hatóanyag-leadást képes biztosítani, míg a PerioChip® esetében egy ún. „burst release” figyelhető meg (a hatóanyag 40%-a felszabadul az első 24 órában). A kezdeti gyors hatóanyagfelszabadulást egy lassabb szakasz követi, amely során további 27% hatóanyag szabadul fel az egyhetes vizsgálati időszak végére. Ez arra utal, hogy a lipid rendszerek folyamatos hatóanyag-leadást képesek biztosítani egy magasabb, állandó szinten.

A hatóanyag-diffúziós vizsgálatok eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az előállított lipid rendszerbe történő hatóanyag-inkorporáció nyújtott hatóanyag-felszabadulást tesz lehetővé. A hatóanyag-felszabadulást befolyásoló fő tényezők a duzzadás (amelyet az alkalmazott hidrofíl komponensek, hatóanyagok és azok koncentrációja irányít) valamint a koherens lipid váz.

#### 4.1.3. Antimikrobás hatékonyság

A mikrobiológiai hatékonyság vizsgálata során az előállított rendszerek antimikrobás aktivitását határoztam meg 6 különböző, a parodontális betegség kialakulásában résztvevő, patogén baktériumtörzsön. Ezek a baktériumtörzsek a következők voltak: *E. corrodens*, *P. intermedia*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* és *P. gingivalis*. A vizsgálat során a naponta új táptalajra helyezett rendszerek körül keletkező gátlási zóna átmérőjét mértem. Az eredmények értékelése során a táptalajokon a készítmény körül kialakult gátlási zóna nagyságát és annak időbeliségét hasonlítottam össze az egyes összetételek esetében. Az eredmények a 3. ábrán láthatóak.

A mérések alapján az AMX-re a *P. micra* volt a legérzékenyebb, mivel a rendszer 18 napon keresztül volt képes gátolni a baktérium növekedését. A legkevésbé érzékeny törzs az *E. corrodens* volt, amely növekedése ellen csak 9 napon keresztül volt hatékony az összetétel.

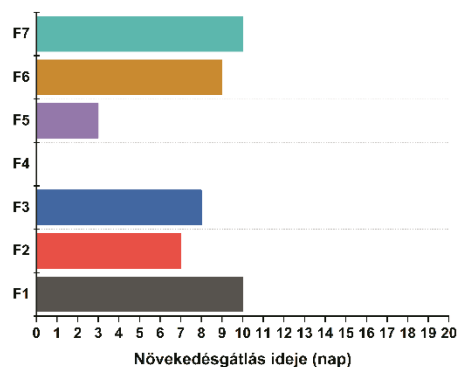
A MZ-vel szembeni érzékenység kisebb volt: a legérzékenyebb baktérium (*P. gingivalis*) növekedését ezek a rendszerek csak 9 napon keresztül voltak képesek gátolni. Az *E. corrodens* volt a legkevésbé érzékeny a MZ-t tartalmazó rendszerekre: 2 napon keresztül teljes gátlás volt látható, azonban a 3. napon nem volt észlelhető gátlási zóna. Az eredmények összefüggenek az irodalomban leírtakkal, miszerint az *E. corrodens* rezisztens a MZ-re.

Az F3-as (AMX+MZ) összetétel nem biztosított nagyobb átmérőjű gátlási zónákat, mint a vagy csak AMX-et, vagy csak MZ-t tartalmazó rendszerek, valamint a gátlás ideje is rövidebb volt. A *P. gingivalis* volt az egyetlen kivétel, amelynél nagyobb érzékenység mutatkozott az AMX és a MZ kombinációjára.

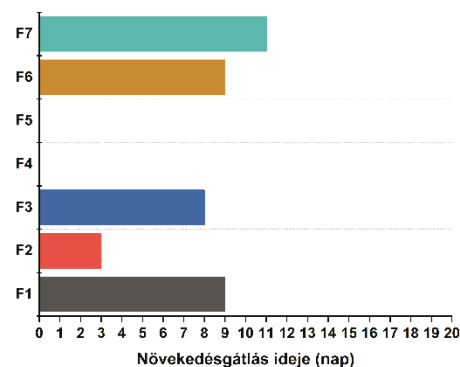
A legtöbb esetben az AMX és MZ kombinációt tartalmazó készítmények hosszabb gátlást biztosítottak, mint a csak MZ-t tartalmazó rendszerek, amely valószínűleg az AMX potensebb hatásának köszönhető. Az AMX és MZ kombináció esetében mutatkozó kisebb érzékenység pedig valószínűleg az AMX kisebb koncentrációjával magyarázható.

A ZnHA esetében mutatkozó érzékenység eltérő a különböző baktériumtörzsek esetén. Az *A. actinomycetemcomitans* és az *E. corrodens* rezisztenciát mutat a ZnHA-val szemben, de ZnGlu-val kombinálva, az *A. actinomycetemcomitans* esetében hosszabb hatás érhető el, míg az *E. corrodens* a kombinációval szemben is rezisztenciát mutat.

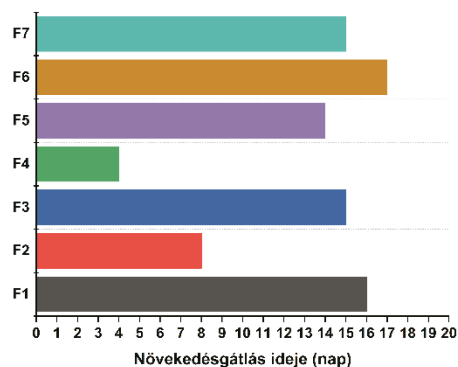
*A. actinomycetemcomitans*



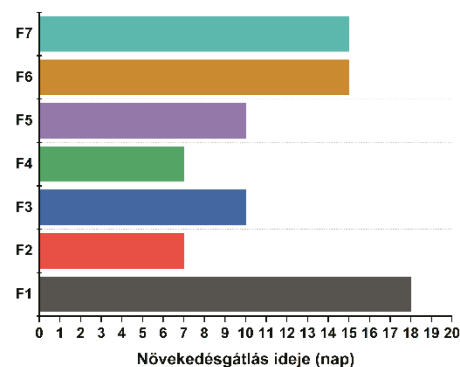
*E. corrodens*



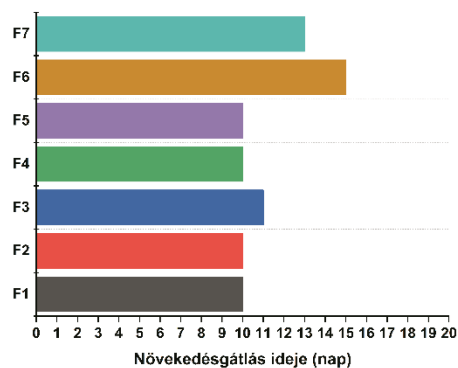
*F. nucleatum*



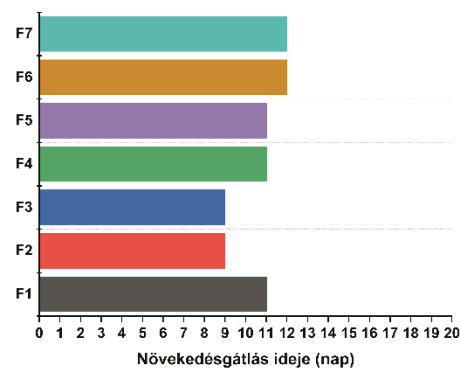
*P. micra*



*P. gingivalis*



*P. intermedia*



**3. ábra** A baktériumok növekedésgátlásának ideje (nap) az F1–F7 rendszerek esetében.

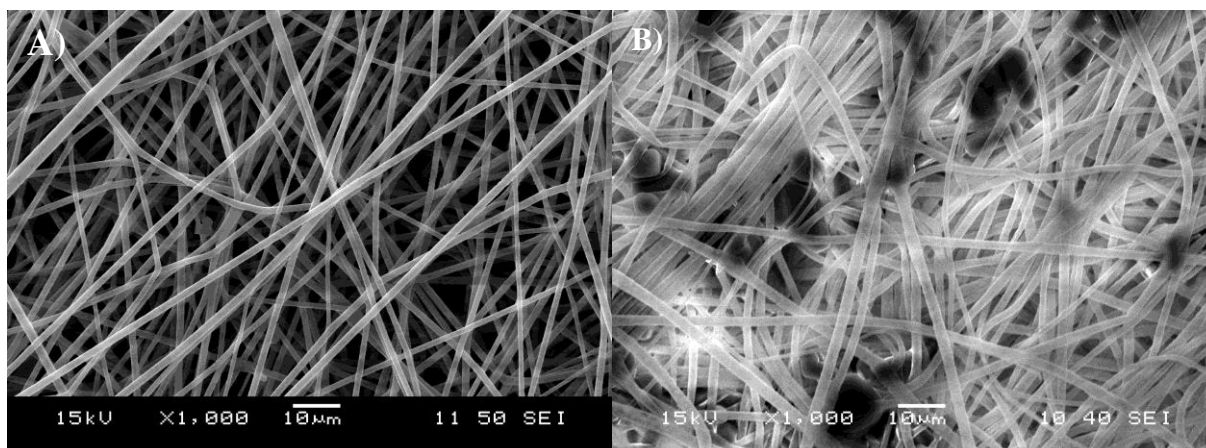
Az eredmények alapján ugyanaz az érzékenység jellemzi a *P. gingivalis* és a *P. intermedia* törzseket a csak ZnHA-t vagy a ZnHA és ZnGlu kombinációját tartalmazó rendszerek esetében. A *P. micra* és az *F. nucleatum* esetében az eredmények azt mutatják, hogy a ZnHA és a ZnGlu kombinációja hatékonyabb a csak ZnHA-t tartalmazó rendszereknél.

#### 4.2. PLA alapú nanoszálás rendszerek

Elektrosztatikus szálhúzásos technológiával két, MZ-t különböző koncentrációban tartalmazó (12,2% és 25,7%) nanoszálás hordozó-rendszert vizsgáltunk. A rendszereket a könnyebb kezelhetőség érdekében préselésnek vetettük alá.

#### 4.2.1. Pásztázó elektronmikroszkópia

A préselt és a natív nanoszálak minták szerkezetét elektronmikroszkópos technikával elemeztük. A 4. ábrán láthatóak a natív (A) és a préselt (B) rendszerekről készített felvételek.



4. ábra A szálakról készített SEM felvételek. A: natív szálak. B: préselt rendszerek.

A natív rendszerek esetében a szálak lazán helyezkednek el, közöttük jelentős szabad hely van. Ebben az esetben gyors vízpenetrációra és ezáltal gyors hatóanyag-leadásra számíthatunk. A képek beható vizsgálata során MZ-kristályok jelenlétét figyelhetjük meg a szálak között.

A préselt rendszerek esetében a préselés következtében a szálak szorosan helyezkednek el, ezért lassabb vízpenetrációt és nyújtott hatóanyag-leadást várhatunk. A főként préselt rendszerek esetében észlelhető fekete elszíneződések ugyancsak MZ-kristályok jelenlétére utalnak a szálak között, azoknak a felszínén.

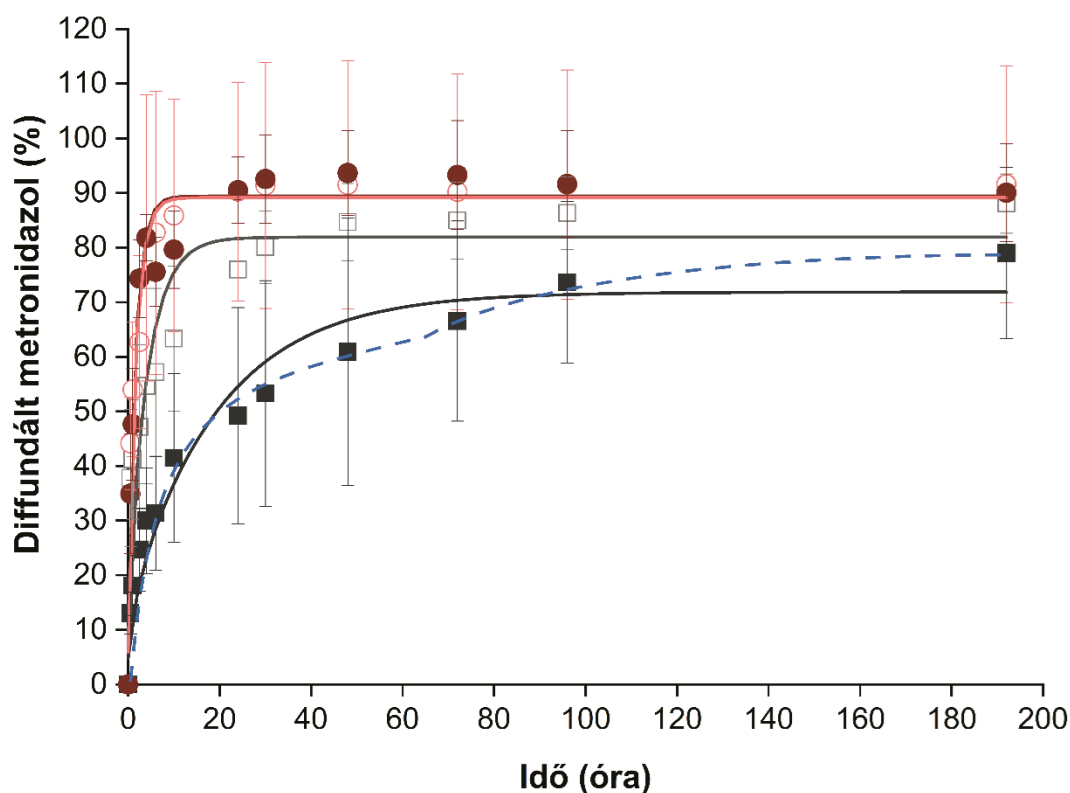
Az elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a préselés a szálakat nem károsította, csak a szálak egymáshoz viszonyított helyzetét befolyásolta, a szálak között MZ-kristályok helyezkednek el.

#### 4.2.2. *In vitro* hatóanyag-diffúziós vizsgálatok

Az inkorporált hatóanyag szálakból történő felszabadulása komplex folyamat és számos faktor befolyásolja. A kioldóközegnek be kell jutnia a szálak közé, fel kell oldania az MZ-kristályokat és ki kell diffundálnia a kioldóközegbe. A MZ csak kismértékben oldódik PLA-ban, valamint a diffúziót a koncentrációkülönbség irányítja, amely nagyon alacsony vagy akár negatív is lehet kristályok oldódása miatti magas hatóanyag koncentrációnak köszönhetően.

A hatóanyag-kioldódás időfüggése az 5. ábrán látható, mind a natív, mind a préselt rendszerek esetében. A préselt rendszerekből gyorsabban szabadul fel az MZ, azonban ez a sebesség a kezdeti MZ-koncentrációtól független, amelyet a PBS-oldat gyors penetrációja és a hatóanyag gyors oldódása eredményezhet. Ebben az esetben az oldott MZ-t tartalmazó folyadék diffúziójának sebessége lehet a kioldódás sebesség meghatározó lépése.

A natív szálak esetében a kioldódás sebessége függ az MZ-koncentrációtól. Ebben az esetben is a hatóanyag oldódása és az oldat kioldóközegbe történő penetrációja a sebesség meghatározó lépés. Ebben az esetben a két különböző MZ-koncentrációjú rendszer hatóanyag-leadásának különbségét az okozhatja, hogy a nagyobb mennyiségű MZ-t tartalmazó szálak esetében nagyobb kristályok keletkeznek a szálak között, amelynek oldódása is hosszabb időt vesz igénybe.



**5. ábra** A metronidazol diffúziója a natív és préselt rendszerekből. Jelmagyarázat: (□, ■) natív rendszerek, (○, ●) préselt rendszerek; üres szimbólumok: 12,2% MZ, teli szimbólumok: 25,7% MZ.

A préselt szálak esetében a hatóanyagdiffúzió 12 óra után elérte a platófázist. A rendszerekbe inkorporált hatóanyag mennyisége nem befolyásolta az eredményt. A natív szálak esetében a hatóanyagdiffúzió jelentősen eltért a préselt rendszerekhez képest, valamint a hatóanyag mennyisége is befolyásolta annak időtartamát. A 12,2%-os rendszerek esetében a platófázis 48, míg a 25,7%-os rendszerek esetében 96 órát követően kezdődik.

Az észlelt eltérések levezethetők a nedvesedési peremszög vizsgálatának eredményeiből. A natív rendszerek esetében a rossz nedvesedés lassabb hatóanyag-diffúzióhoz vezet, valamint ugyancsak a rossz nedvesedés miatt a hatóanyag egy része elérhetetlen marad a kioldóközeg számára.

A hatóanyag-diffúzió sebessége az 5. ábrán bemutatott összefüggések alapján megbecsülhető. Az elemzés alapján a préselt rendszerek esetében a platófázis 24 órát, míg a

natív rendszerek esetében 48 és 96 órát követően kezdődik. Azonban az időfüggést mennyiségileg is elemezhetjük, ha megfelelő függvényeket illesztünk a kísérletes eredmények adataira. A hatóanyag kioldódása és diffúziója Fick-törvénye szerint történik. Fick egyenletei matematikailag levezethetőek, és egyszerűsítések alkalmazásával analitikusan kifejezhetőek. Két fő megközelítést alkalmaznak a gyakorlatban: az egyik a görbe első felét az idő négyzetgyökének függvényében ábrázolja, a másik exponenciális illesztést alkalmaz. Ez a megközelítés sokkal pontosabb becslést tesz lehetővé hosszabb időtartamú mérések esetén, valamint becsülhető vele a hatóanyag-kioldódás sebessége és a kioldódott hatóanyag mennyisége is. Az utóbbi megközelítést alkalmazva az alábbi egyenletet illesztettük a görbékre:

$$M_t = M_\infty \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \left[ \exp(-at) + \frac{1}{9} \exp(-9at) + \frac{1}{25} \exp(-25at) \right] \right\} \quad (1)$$

ahol az  $M_t$  és az  $M_\infty$  a kioldódott hatóanyag mennyisége  $t$  és végtelen időben, és az  $a$  a kioldódás sebessége. Az egyenlet alapján számolható paramétereket az 1. táblázatban foglaltam össze.

**1. táblázat** A hatóanyag-diffúzió kinetikáját meghatározó tényezők.

Hatóanyag-tartalom (m/m%)	Forma	$a$ (1/h)	$M_\infty$ (%)	$R^2$
12,2	natív	0,233	81,9	0,8855
25,7	natív	0,051	71,8	0,9634
12,2	préselt	0,581	89,4	0,9449
25,7	préselt	0,556	89,1	0,9650

Az 1. táblázatban szereplő eredmények megerősítik a feltételezést, miszerint a préselt rendszerek esetében lényegesen gyorsabb a hatóanyag-diffúzió, mint a natív rendszerekből. A várhatóan felszabaduló hatóanyag százalékos mennyiségét megvizsgálva jelentős mennyiség (10-30%) marad a rendszerekben a kioldódási vizsgálatok elvégzését követően. Az illesztett egyenesek behatóbb vizsgálatából megállapítható, hogy a rendszerekből történő kioldódás nem írható le egyetlen folyamattal, hanem az legalább két lépésből tevődik össze: egy gyorsabb, kezdeti és egy lassabb, későbbi szakaszból. Ezt a kétlépéses folyamatot a magasabb MZ-koncentrációjú szálak kioldódási vizsgálata során nyert eredmények kifejezetten alátámasztják. A kétlépéses folyamatot az ábrán kék szaggatott vonallal jelöltem.

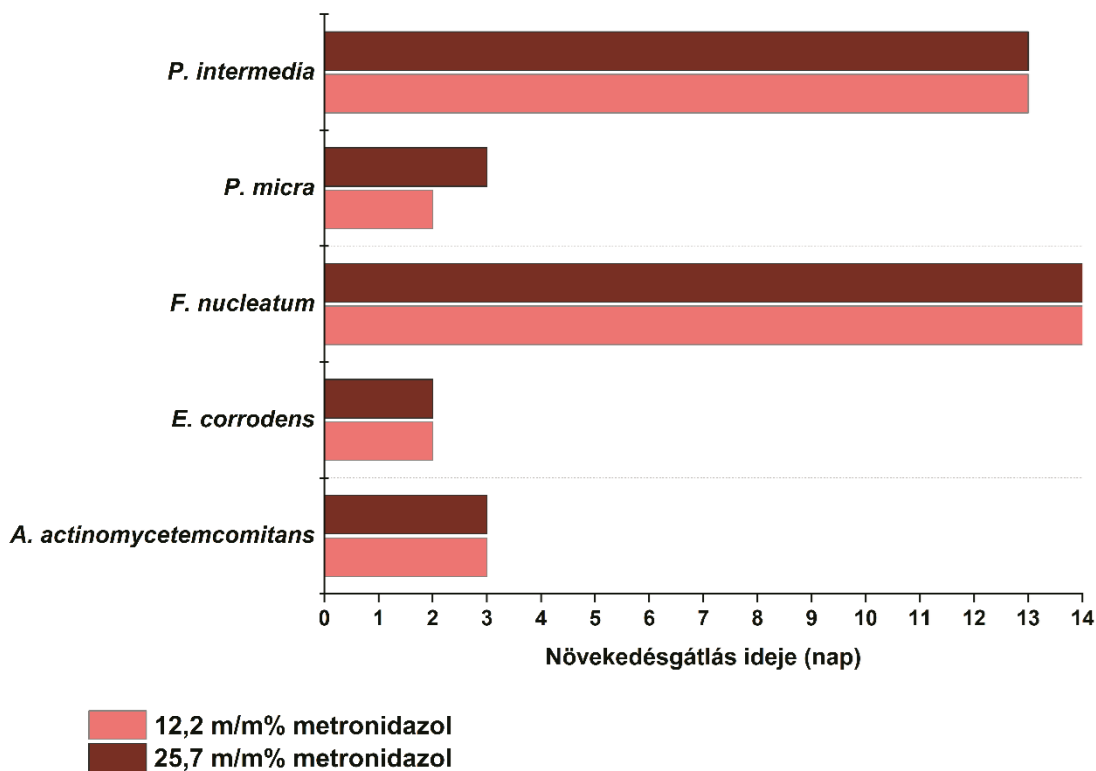
#### 4.2.3. Antimikrobás hatékonyság

Az antimikrobás hatékonyság vizsgálata során a préselt rendszereket vizsgáltuk, mivel alakjuk, tömegük és vastagságuk egységes, mely tulajdonságok a natív rendszerénél nem érhetők el. A préselt rendszerek a korábbiaknak megfelelően 12,2% és 25,7% MZ-t

tartalmaztak. A vizsgálatok során 5 különböző baktériumtörzset használtunk: *E. corrodens*, *P. intermedia*, *P. micra*, *F. nucleatum* és *A. actinomycetemcomitans*.

A vizsgálat eredményei a 6. ábrán láthatóak, amelyek alapján megállapítható, hogy a baktériumnövekedés gátlásának hossza független a MZ koncentrációjától. Egyedül a *P. micra* esetében tapasztalható különbség a gátlási idők hosszában.

A gátlás hossza rövidebb – csak 2–3 napos – az *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* és *P. micra* esetében, míg az *F. nucleatum* és a *P. intermedia* esetében hosszabb, 13 napos. Az eredmények összhangban vannak az irodalmi adatokkal, amely szerint az *F. nucleatum* és a *P. intermedia* érzékenyebb a MZ-re, mint az *A. actinomycetemcomitans*, az *E. corrodens* és a *P. micra*, amelyek csak minimálisan érzékenyek vagy akár teljesen rezisztensek is lehetnek.



6. ábra A préselt rendszerekkel elért gátlási idő.

A MZ-re érzékeny baktériumok esetében közel kéthetes gátlás volt tapasztalható, amely azt mutatja, hogy a rendszerek hosszabb időn keresztül is hatékonyak lehetnek. A szálakban lévő MZ sokkal lassabban diffundál ki a rendszerekből, mint a szálak közötti MZ-kristályok. A lassabb diffúzió elnyújtott növekedésgátláshoz és így eredményesebb kezeléshez vezethet.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A PhD-munkán célja parodontális megbetegedés kezelésére szolgáló innovatív, helyileg alkalmazható hatóanyag-hordozó rendszerek fejlesztése és vizsgálata volt. A munka új tudományos eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

- Lokális, mukoadhezív, duzzadásra képes, nyújtott hatóanyag-leadást biztosító lipid alapú hatóanyag-hordozó összetételét elsőként írtuk le.
- A kifejlesztett összetétel lehetővé teszi különböző hatóanyagok nagy mennyiségének inkorporálását egyszerű formulálási lépések mellett, és a hatóanyagok diffúziója akár 2 hétig is nyújtható.
- Hat darab anaerob baktériumtörzsön végzett antimikrobás vizsgálat alapján elmondható, hogy a ZnHA és a MZ szinergista hatásának bizonyultak.
- Hidrofil hatóanyag PLA nanoszálal rendszerekbe történő inkorporálásával nyújtott hatóanyag-leadás érhető el. A nanoszálal rendszerek nedvesedése és a víz, szálak közé történő penetrációja technológiai módszerekkel (pl. préselés) módosítható, amely megváltoztatja a hatóanyag diffúzióját a rendszerekből.

Az elvégzett vizsgálatok eredményei kitűnően illusztrálják a kifejlesztett lipid alapú hordozórendszerek alkalmazásában rejlő potenciált, nyújtott hatóanyagleadását és a parodontális megbetegedés kialakulásáért felelős baktériumok növekedésével szembeni magas és hosszú hatékonyságot. A politejsav alapú nanoszálal rendszerek esetében is bizonyítható a hatékonyság. A natív szálakból préseléssel kialakított korong alakú rendszerek azonos mérettel és alakkal rendelkeznek, és így szubgingiválisan alkalmazhatóak lehetnek.

Összességében elmondható, hogy a disszertációban leírt rendszerek hatékony kezelést biztosíthatnak parodontális megbetegedés során.



## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Attila Léber**, Mária Budai-Szűcs, Edit Urbán, Péter Vályi, Anita Kovács, Szilvia Berkó, Erzsébet Csányi: Formulation and Investigation of a Lipid Based Delivery System Containing Antimicrobials for the Treatment of Periodontal Disease. *CURRENT DRUG DELIVERY* 15(6): 887—897., 2018

**IF: 1,645**

- II. **Attila Léber**, Mária Budai-Szűcs, Edit Urbán, Péter Vályi, Anita Kovács, Szilvia Berkó, Erzsébet Csányi: Combination of Zinc Hyaluronate and Metronidazole in a Lipid-Based Drug Delivery System for the Treatment of Periodontitis. *PHARMACEUTICS* 11(3): 142., 2019

**IF: 4,773**

- III. Mária Budai-Szűcs, **Attila Léber**, Lu Cui, Muriel Józó, Péter Vályi, Katalin Burián, Balázs Kirschweng, Erzsébet Csányi, Béla Pukánszky: Electrospun PLA Fibers Containing Metronidazole for Periodontal Disease. *DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY* 14: 233—242., 2020

**IF: 3,208**

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

- I. **Attila Léber**, Mária Budai-Szűcs, Edit Urbán, Péter Vályi, Erzsébet Csányi: Development of a lipid-based drug delivery system containing antibiotics for the treatment of periodontitis. *7<sup>th</sup> BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences*, 5—7 October 2017, Balatonfüred, Hungary (Poster presentation)
- II. **Attila Léber**, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs: Effectiveness of a lipid-based subgingival system for the treatment of periodontitis. *12<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs*, 20—22 September 2018, Szeged, Hungary (Poster presentation)
- III. **Léber Attila**: Fogágybetegség kezelésére szolgáló lipid alapú hordozórendszer fejlesztése és vizsgálata. *XIII. Clauder Ottó Emlékverseny*, 22—23 November 2018, Budapest, Hungary (Verbal presentation)
- IV. **Attila Léber**, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs: Lipid-based delivery systems for periodontitis treatment. *I. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science*, 31 January 2019, Szeged, Hungary (Verbal presentation)
- V. **Léber Attila**, Budai-Szűcs Mária, Vályi Péter, Urbán Edit, Berkó Szilvia, Kovács Anita, Csányi Erzsébet: Antibiotikumot tartalmazó, lipid alapú, helyi hatóanyag-hordozó rendszer vizsgálata. *Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia*, 26—28 September 2019, Siófok, Hungary (Poster presentation)
- VI. **Attila Léber**, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs: PLA-based nanofibrous systems for the treatment of periodontal disease. *II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science*, 23—24 January 2020, Szeged, Hungary (Verbal presentation)