

Poliolok és aminosavak szerepe a bőr homeosztázis fenntartásában

PhD Tézis

Dr. Korponyai Csilla

Szegedi Tudományegyetem Doktori Intézet

Témavezető:

Dr. Erős Gábor PhD

Szegedi Tudományegyetem
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

2016

BEVEZETŐ

Bőrünk legfontosabb feladata a fizikai, kémiai és immunológiai védelem a külvilág impulzusaival szemben. A bőrbarrier ugyanakkor gátolja a folyadék és elektrolitok elvesztését, megakadályozva a szervezet kiszáradását.

Ennek a fizikokémiai gátnak a külvilággal közvetlenül érintkező első és legfontosabb védővonala, a szaruréteg, a stratum corneum külső részét képező elszarusodott sejtburrok („cornified envelope”), illetve a stratum corneum also sejtsejtjeire lokalizált keratinociták, a közöttük lévő sejtkapcsolatok valamint a lipid természetű intercelluláris anyag.

A barrier kémiai/biokémiai illetve immunológiai tényezői az antimikrobiális peptidek, enzimek és makrofágok valamint a humorális és celluláris immunrendszer elemei.

Bármelyik komponens kiesése vagy funkcióvesztése károsan befolyásolja a barrierfunkciót, amely később öngerjesztő módon tovább romolhat.

A barrierfunkció gyengülése jellemzi mind az allergiás illetve irritatív kontakt dermatitist valamint az atópiás dermatitist is. Külön kiemelendő az irritatív kontakt dermatitisz (ICD), mely kizárólag környezeti tényezők okozta, gyakori foglalkozási ártalom, főleg egészségügyi illetve élelmiszeripari dolgozók körében. Az említett kórképeknél a barrierkárosodást jellemzi a megnövekedett bőrön keresztüli vízvesztés (transepidermal water loss=TEWL), a csökkent bőrhidratáció valamint gyulladásos jelek megjelenése, pl. bőrpír. Emiatt célszerű kiegészíteni a bőrápoló externákat olyan hatóanyagokkal, melyek kifejezetten antiirritáns, antiinflammatorikus hatással rendelkeznek, és ezáltal hozzájárulnak a bőr homeosztázisának fenntartásához.

A glicerol egy jól ismert poliol, mely összetett folyamat révén növeli a stratum corneum víztartalmát (ún. humektáns). Rezervoárt képez a sejtek lipid kettősrétege között, és a fehérjékkel és lipidekkel kölcsönhatásba lépve megváltoztatja azok vízmegkötő képességét. Emellett a lipid kettős réteg poláris fejcsoportjaival kölcsönhatásba lépve fenntartja a stratum corneum lipidek folyékony és szilárd fázisának optimális arányát. Továbbá csökkenti a vízpórusok denzitását illetve az átlagos vízpórus átmérőt a stratum corneumban, ezzel nem csak a vízvesztést akadályozza, de hatása van különféle amfoter tulajdonságú, micellákat képző irritánsok penetrációjára is. A fenti hatások eredményeképpen hidratáló, antiirritáns és barrierjavító hatással rendelkezik, valamint lokális alkalmazása a bőr mechanikai tulajdonságait is javítja. A glicerol előnyös tulajdonságai alapján felmerült, hogy más poliolok is pozitív hatást gyakorolhatnak a bőrre. A xilitol ötértékű poliol, amelyet az iparban és a háztartásokban leggyakrabban édesítőszerként alkalmaznak, mivel a legtöbb cukorénál alacsonyabb az energiatartalma, és inzulin nélkül is be tud lépni a sejtekbe. A táplálékkal

bevitt xilitolnak terápiás hatása is van: állatkísérletekkel igazolták, hogy csökkenti a csontállomány reszorpcióját. Segédanyagként alkalmazva a xilitol elősegíti az antibiotikum felszabadulását polimer alapú hordozórendszerekből, ezáltal hatékonyabbá teszi az oszteomielitisz kezelését. A xilitol azonban hatóanyagként önmagában is antibakteriális hatásúnak bizonyult: a poliol jelenléte gátolja a szájüregben a *Streptococcus mutans* baktérium szaporodását, így rendszeres fogyasztása hozzájárulhat a fogszuvasodás megelőzéséhez. Mivel a xilitol jelentős humektáns hatással rendelkezik, képes a bőrt hidratálni. A mannitol szintén egy cukoralkohol, melyet a gyógyászatban agnyomáscsökkentőként alkalmaznak. Sem a xilitol, sem a mannitol potenciális lokális antiirritáns hatása nem került még vizsgálatra.

A fenti poliolokon kívül néhány aminosav esetében is felmerült, hogy antiirritáns hatással rendelkezhet. A bőr hidratáltságáért felelős ún. természetes hidratáló faktor ("Natural moisturizing factor", NMF), mely filaggrin degradációs termékekből áll, magas százalékban tartalmaz aminosavakat. Kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy az NMF-et alkotó aminosavak külön-külön milyen hatással rendelkeznek. Ígéretes antiirritánsnak tűnt a taurin, egy kéntartalmú aminosav, melyről ismert, hogy a sejteket az UV sugárzás okozta stressztől védi illetve gyulladásgátló hatással rendelkezik. A keratinociták specifikus taurin transzportereket (TauT) expresszálnak, mivel a taurin felvétele a sejtekbe pl. a hiperozmotikus stressz ellen véd. Egy másik aminosav a glicin, melyet a hegkezelésben illetve sebgyógyításban régóta használnak. A metioninről ismert, hogy hatékony védelmet biztosít a szabad oxigénradikálok ellen. Nem közölt *in vitro* adatok szerint a metionin képes a matrix metalloproteináz-1 (MMP-1) aktivitását csökkenteni. Az MMP-1 nagy szerepet játszik a fénykárosodás okozta bőroregedésben.

Felmerült, hogy a különböző antiirritáns hatással rendelkező anyagok potenciálisan szinergista hatással rendelkezhetnek.

Bár a glicerol és a xilitol kémiai szerkezete hasonló, *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy eltérő génexpressziós változásokat idéznek elő keratinocitákban: a glicerol antiirritáns hatású (a HLA-DR expresszióját csökkenti), míg a xilitol a filaggrin expressziójának fokozásával járulhat hozzá a barrier funkció regenerációjához. Korábbi állatkísérletekkel igazoltuk, hogy mind a glicerol, mind a xilitol gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik, de eltérő módon hatnak a gyulladást okozó citokinek expressziójára. Ezek alapján feltételeztük, hogy a két poliol kombinációjától kedvezőbb terápiás hatások várhatóak, mint ha külön alkalmaznánk őket.

A barrierfunkció objektívizálásához a bőrön keresztüli vízvesztés (TEWL) illetve a hidratáció mérése széles körben alkalmazott módszer.

A TEWL a str. corneumon elpárolgott vizet reprezentálja. A TEWL és a bőrhidratáció változásait kísérik a bőr mechanikai tulajdonságainak a változásai, melyek szintén mérhetőek, és ezáltal megbízhatóan jelzik az alkalmazott kezelés hatékonyságát.

Az irritatív kontakt dermatitis és a bőrbarrier regenerálódásának vizsgálatához gyakran használt módszer a nátrium-lauril-szulfát (SLS) okozta irritációs modell. Az SLS exponenciálisan emelkedő TEWL-t és epidermális hiperproliferációt okoz, ezen változások bőrfiziológiai mérőműszerekkel mérhetőek.

Kísérleteink során a fent ismertetett adatok alapján igyekeztünk az említett poliolok és aminosavak bőrre kifejtett hatásait feltérképezni.

CÉLJAINK

Fő célkitűzésünk az volt, hogy a fent említett poliolok és aminosavak barrierfunkcióra, hidratációra illetve a humán bőr biomechanikai, morfológiai és mikrobiológiai paramétereire kifejtett hatásait vizsgáljuk.

Vizsgálataink human és *in vitro* méréseket is tartalmaztak, három részből épültek fel.

Az I. vizsgálat céljai:

- enyhe (szubklinikai) irritációs modell létrehozása, SLS alkalmazásával
- a glicerol, xilitol, mannitol, taurin és glicin antiirritáns hatásának vizsgálata TEWL mérés által
- a vizsgálat anyagok hatékony koncentrációjának megállapítása.

A II. vizsgálat céljai:

- a glicerol- és xilitol tartalmú gél (Xylinep®) antibakteriális hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo*
- és a TEWL-ra, hidratációra és pH-ra kifejtett hatásának a vizsgálata.

A III. vizsgálat céljai:

- a glicerol- és xilitol tartalmú gél hatásának vizsgálata a TEWL-ra, hidratációra, biomechanikai paraméterekre és bőrmorfológiára 14 napos alkalmazás után
- a lokálisan alkalmazott metionin hatásának vizsgálata ugyanezen paraméterekre
- a filaggrin és MMP-1 mennyiségi meghatározása a kezelést követően

MÓDSZEREK

BŐRFIZIOLÓGIAI MÉRÉSEK

A vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika Kozmetológiai és Bőrfiziológiai Kutatólaboratóriumában végeztük, standard körülmények közt. Speciális mérőműszerekkel határoztuk meg a következő paramétereket: TEWL, hidratáció, pH, frikció, elaszticitás, továbbá ultrahangfelvételeket készítettünk a vizsgált bőrterületekről. Az epidermális és dermális vastagságot valamint a papilláris dermis echogenitását megfelelő szoftver (DUB-SkinScanner) segítségével állapítottuk meg.

IN VITRO ÉS IN VIVO MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

A vizsgálathoz *S. pyogenes* és *S. aureus* törzseket választottunk. A tesztörzsekből friss tenyészeteket állítottunk elő, ezekből 10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk, és szélesztési csíraszám becsléssel meghatároztuk a szuszpenziók sejtkoncentrációját. *S. pyogenes* esetén a kiindulási sejtkoncentráció $5,9 \times 10^5$ CFU/ml volt; a két kiválasztott hígítási tag 59 CFU/100 µl és 590 CFU/100 µl volt. A *S. aureus* csíraszámának beállításánál célunk az volt, hogy körülbelül 100 000 CFU nagyságrendű tesztbaktérium szuszpenziót hozzunk létre. A szuszpenzióból 3 mintát vettünk, ezek sejtkoncentrációja 121 000 CFU/100 µl, 125 000 CFU/100 µl és 54 000 CFU/100 µl volt. A Xylinep® gélt beoltottuk a tesztbaktériumokkal. A baktériumokkal beoltott géleket 24 és 48 óráig 25°C-on inkubáltuk. Ezt követően a gélt 9 ml steril desztillált vízben feloldottuk, ebből hígítási sort készítettünk, és a hígítási tagokból 100 µl-t táptalajra oltottunk. Az inkubáció után csíraszámot becsültünk. Kontrollként mindkét törzsnél a tesztbaktériummal beoltott gélek kezdeti csíraszámát szolgált (ennek meghatározása is az előbbieket szerint történt).

Az *in vivo* vizsgálat során mintát vettünk az önkéntesek kezeletlen alkarjáról tenyésztés céljából, majd a kezelést követően 15 perc múlva megismételtük a mintavételt. Ezt követően az önkéntesek 3 napig naponta 2x kezelték magukat, és legvégül, összesen 74 óra múlva is történt mintavétel.

VIZSGÁLATI PROTOKOLL

I. Vizsgálat:

Az egyik alkar voláris területére helyeztük fel 24 órára epikután tesztkamrában a 200µL 0.1%-os SLS vizes oldatot. A másik alkarra felhelyeztük ugyanezt az oldatot, mely valamelyik vizsgálat polioolt vagy aminosavat is tartalmazta.

TEWL mérés a tesztkamrák felhelyezése előtt, és 30 perccel a levétel után történt.

II. Vizsgálat:

In vitro és *in vivo* vizsgálatokat végeztünk, hogy felderítsük a Xylinep® gel antibakteriális hatását. Továbbá a gél hidratációra, TEWL-ra és pH-ra kifejtett hatását is vizsgálatuk 2, 8, 12 és 24 órás alkalmazás után.

III. Vizsgálat:

Szárazbőrű egyéneket vontunk be a vizsgálatba. Mindkét felkar laterális oldalán 2-2 db 2x2 cm nagyságú területet jelöltünk ki. Az 1. terület kezeletlen maradt, a 2. területre a hatóanyag nélküli gél alkalmaztunk (Carbopol Ultrez 10 0.4%, vizes oldatban). A 3. területre az 5% xilitolt és 5% glicerolt tartalmazó gél került alkalmazásra. A 4. területet 2%-os L-metionin tartalmú géllal kezeltük. 14 napon keresztül naponta 2x történtek a kezelések. A méréseket a vizsgálat legelején, az első kezelés előtt, illetve a 14. napon, az utolsó kezelés után 6 órával végeztük. A hidratáció, TEWL, frikció, elaszticitás mérését végeztük és ultrahangos felvételeket készítettünk. A legvégén mindegyik területből szövettani mintavétel történt, helyi érzéstelenítésben.

SZÖVETTANI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLAT

A III. vizsgálat során vett szövettani mintákat hematoxin-eozinnal (H&E) festettük, illetve immunhisztokémiai vizsgálat is történt (filaggrin, MMP- 1).

A beszkenelt metszeteket speciális programmal elemeztük. A H&E metszeteken interdigitációs indexet számoltunk. Az immunhisztokémiai metszetekben a filaggrin pozitív sejtek százalékos arányát állapítottuk meg, illetve az MMP-1 pozitív sejtek mennyiségét semiquantitatív rendszert alkalmazva határoztuk meg (1: enyhe, 2: közepes, 3: kifejezett epidermális pozitívítás).

EREDMÉNYEK

I. VIZSGÁLAT

POLIOLOK ANTIIRRITÁNS HATÁSA

A 0.1%-os SLS oldat hatására a TEWL egységesen, szignifikáns mértékben megemelkedett a kiindulási értékhez képest. A hozzáadott 2.6% glicerol nem volt képes kivédeni az SLS irritáns hatását, az epikután kamra felhelyezése előtti ($m=7.78$, $SD=3.3$) és utáni ($m=12.06$, $SD=7.71$) TEWL értékek között szignifikáns különbség volt. A 9% glicerol tartalmú oldat azonban hatékonynak bizonyult, a teszt előtti ($m=12.17$, $SD=6.32$) és utáni ($m=13.16$, $SD=4.77$) TEWL értékek között nem volt lényeges különbség. Továbbá ennél a koncentrációnál a kezelt területen szignifikánsan alacsonyabb TEWL értéket ($m=13.16$,

SD=4.77) észleltünk a 0,1% SLS oldattal irritált terület értékéhez képest ($m=20.39$, $SD=10.0$).

A xilitolt kettő koncentrációban alkalmaztuk: 4.5% és 15%. Az alacsonyabb koncentráció nem bizonyult antiirritáns hatásúnak (TEWL előtte: $m=6.06$, $SD=2.85$, utána: $m=11.43$, $SD=4.59$). A magasabb koncentráció azonban hatékonyan megakadályozta a TEWL emelkedését (előtte: $m=9.01$, $SD=3.51$; utána: $m=11.94$, $SD=6.69$).

A kezeletlen ($m=13.14$, $SD=5.09$) és kezelt ($m=11.94$, $SD=6.69$) területek közt nem találtunk szignifikáns különbséget az SLS applikációt követően.

Sem az 5.4%, sem a 18% mannitol nem volt képes kivédeni az SLS által okozott irritációt (5.4% mannitol: $m=15.71$, $SD=3.22$ előtte, $m=25.92$, $SD=3.19$ utána; 18% mannitol: $m=15.4$, $SD=4.64$ előtte, $m=22.99$, $SD=5.09$ utána). A 18% mannitol viszont szignifikánsan alacsonyabb TEWL értéket eredményezett, mint a kezeletlen területen mért TEWL (kezelt: $m=22.99$, $SD=5.09$; kezeletlen: $m=35.04$, $SD=9.85$).

AMINOSAVAK ANTIIRRITÁNS HATÁSA

A 3.4% taurin nem javította érdemben a TEWL értékét (előtte: $m=14.29$, $SD=3.38$; utána: $m=33.04$, $SD=14.49$), és a 8.4% taurin szintén nem volt képes a TEWL emelkedést megakadályozni (előtte: $m=12.34$, $SD=2.42$; utána: $m=23.53$, $SD=5.57$). Azonban a magasabb koncentrációjú oldat alkalmazása szignifikáns mértékben alacsonyabb TEWL értéket eredményezett, mint a 3,4%-os oldat. Továbbá a 8,4%-os koncentráció ($m=23.53$, $SD=5.57$) a kezeletlen oldalhoz képest ($m=31.18$, $SD=12.56$) képes volt csökkenteni a TEWL értékét.

Az 5% glicin oldat nem védte ki az SLS irritáns hatását (előtte: $m=12.47$, $SD=5.19$; utána: $m=24.23$, $SD=12.47$) és a TEWL értékek nem különböztek a kezeletlen oldalhoz képest ($m=24.61$, $SD=12.57$).

Az alacsony koncentrációjú poliol és aminosav oldatok nem voltak képesek a TEWL értéket szignifikáns mértékben csökkenteni a kezeletlen területekhez képest.

II. VIZSGÁLAT

POLIOLOK IN VITRO ÉS IN VIVO ANTIBAKTERIÁLIS HATÁSAI

Az 59 CFU/100 μ l koncentrációjú *S. pyogenes* szuszpenzióval beoltott gélből egyáltalán nem mutattunk ki túlélő baktériumokat; a Xylinep gél antibakteriális hatását már a minták elkészítése során eltelt idő alatt is kifejtette. Az 590 CFU/100 μ l baktérium koncentráció esetén a túlélő kolóniaszám 24 és 48 h elteltével 16 és 13 volt.

A kontrollként szolgáló, *S. aureussal* inokulált, és inkubáció nélkül táptalajra oltott gélben a csíraszámok alig mutattak csökkenést a kiindulási szuszpenziókkal összehasonlítva. 24 órás inkubáció után azonban jelentősen alacsonyabb baktériumkoncentrációt észleltünk, 48 óra elteltével pedig nem találtunk túlélő baktériumokat.

A kezelés előtt a vizsgált önkéntesek bőrével érintkező pufferből számos baktérium tenyésztett (telepszám: $m=53,27$; $SD=100,87$). A Xylinep® gél lokális alkalmazása már 15 perc elteltével szignifikánsan csökkentette a megjelenő baktériumtelepek számát ($m=7,47$, $SD=7,73$), és számottevő antibakteriális hatást tapasztaltunk 74 óra után is ($m=15,27$; $SD=20,38$).

POLIOLOK HATÁSA A BŐRFIZIOLÓGIAI PARAMÉTEREKRE 24 ÓRÁS ALKALMAZÁS UTÁN

A Xylinep-kezelés a bőrfiziológiai paraméterek közül a TEWL- és a pH-értékeket nem befolyásolta statisztikailag eltérő mértékben. A bőr hidratációjára hatással volt: a kiindulási értékekkel ($m=38,24$; $SD=5,84$) összehasonlítva már 2 óra elteltével számottevő növekedést tapasztaltunk ($m=45,83$; $SD=9,86$). A hidratáció 8 órával a kezelés után érte el a legmagasabb értékeket ($m=48,45$; $SD=7,29$). A hidratációs értékek még 12- és 24 óra elteltével is szignifikánsan magasabbak voltak (12h: $m=46,9$; $SD=7,34$; 24h: $m=42,52$; $SD=8,69$).

III. VIZSGÁLAT

POLIOLOK HATÁSA A BŐR FIZIOLÓGIAI PARAMÉTEREIRE 14 NAPOS HASZNÁLAT SORÁN

A különböző területek kiindulási értékei között nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés a 0. napon. A kontroll terület hidratációs értékei közt lényeges különbség nem mutatkozott (0. nap: $M=20,45$, $25p=17,49$, $75p=24,39$, 14. nap: $M=22,18$, $25p=18,68$, $75p=27,89$).

A hatóanyag nélküli gélnek volt némi hidratáló hatása (0. nap: $M=17,94$, $25p=16,39$, $75p=23,8$, 14. nap: $M=25,05$, $25p=17,99$, $75p=32,39$). A glicerol és xilitol tartalmú gél kifejezetten növelte a bőr hidratációját (0. nap: $M=18,9$, $25p=16,18$, $75p=23,4$, 14. nap: $M=29,44$, $25p=24,9$, $75p=37,51$).

A kezeletlen illetve hatóanyag nélküli géllel kezelt területek nem változtatták a TEWL értékét

(kezeletlen: 0.nap: M=10.5, 25p=8.45, 75p=12.38, 14.nap: M=8.65, 25p=8.25, 75p=10.13, hatóanyag nélküli gél: 0.nap: M=9.55, 25p=6.95, 75p=11.6, 14.nap: M=7.85, 25p=6.08, 75p=9.2). A glicerol és xilitol tartalmú gél szignifikánsan csökkentette a TEWL értékét (0. nap: M=11.3, 25p=8.35, 75p=12.18, 14. nap: M=5.45, 25p=4.25, 75p=7.9).

A hatóanyag nélküli géllal kezelt terület frikciós értékei bár emelkedtek, nem különböztek szignifikáns mértékben a kezeletlen terület frikciós értékeitől (kezeletlen: 0. nap: M=113.0, 25p=94.55, 75p=131.1, 14. nap: M=126.9, 25p=98.35, 75p=144.3, hatóanyag nélküli gél: 0.nap: M=128.8, 25p=93.8, 75p=150.15, 14.nap: M=149.2, 25p=138.6, 75p=228.7).

A xitol és glicerol tartalmú gél szignifikánsan megemelte a frikciós értékeket, a kezeletlen területhez képest is (0.nap: M=138.1, 25p=100.95, 75p=183.3, 14.nap: M=241.8, 25p=207.05, 75p=742.05).

A Cutometer MPA 580 eszközzel mért R-paraméterek közül az R0 érték mutatott érdemi változást. Egyedül a glicerol és xitol tartalmú gél alkalmazása során jelentkezett szignifikáns emelkedés (kezeletlen: 0.nap: M=0.199, 25p=0.174, 75p=0.255, 14.nap: M=0.205, 25p=0.15, 75p=0.224, hatóanyag nélküli gél: 0.nap: M=0.174, 25p=0.156, 75p=0.187, 14.nap: M=0.18, 25p=0.15, 75p=0.2, glycerol és xitol: 0.nap: M=0.177, 25p=0.165, 75p=0.196, 14.nap: M=0.205, 25p=0.18, 75p=0.235).

POLIOLOK HATÁSA A BŐR MORFOLÓGIAI PARAMÉTEREIRE

A glicerol és xitol tartalmú gél alkalmazása során az epidermis vastagsága szignifikáns mértékben növekedett (0.nap: M=187.67, 25p=175.33, 75p=218.33, 14.nap: M=235.83, 25p=210.33, 75p=257.33). A hatóanyag nélküli gél nem változtatta érdemben az epidermális vastagságot (0.nap: M=212.33, 25p=192.92, 75p=223.92, 14.nap: M=223.83, 25p=196.0, 75p=231.33). A dermális vastagságot szintén növelte a glicerol és xitol tartalmú gél, a többi területen ilyen változást nem észleltünk (kezeletlen: 0.nap: M=1564.0, 25p=1317.17, 75p=1846.67, 14.nap: M=1678.33, 25p=1319.25, 75p=1939.58, hatóanyag nélküli gél: 0.nap: M=1448.0, 25p=1201.08, 75p=1871.17, 14.nap: M=1586.17, 25p=1248.75, 75p=1836.08, glicerol és xitol: 0.nap: M=1539.33, 25p=1406.33, 75p=1690.33, 14.nap: M=1776.17, 25p=1538.33, 75p=1942.75).

A hatóanyag nélküli gél és a glicerol és xitol tartalmú gél is csökkentette a papilláris dermis echogenicitását. A poliolok azonban nagyobb mértékben csökkentették illetve a kezeletlen területhez képest is csökkentették az echogenicitást (kezeletlen: 0.nap: M=14.0, 25p=10.5, 75p=20.25, 14.nap: M=14.0, 25p=10.25, 75p=18.88, hatóanyag nélküli gél: 0.nap: M=14.75,

25p=13.25, 75p=17.25, 14.nap: M=14.0, 25p=11.25, 75p=16.56, glicerol és xilitol: 0.nap: M=14.0, 25p=12.25, 75p=15.38, 14.nap: M=10.0, 25p=9.13, 75p=11.13).

A kezeletlen terület interdigitációs index értéke viszonylag alacsonynak bizonyult (M=1.11, 25p=1.06, 75p=1.19). A glicerol és xilitol tartalmú gél 14 napos használata után az érték emelkedett a kezeletlen területhez képest (M=1.26, 25p=1.18, 75p=1.32). A hatóanyag nélküli gél nem befolyásolta az interdigitációs indexet (M=1.11, 25p=1.06, 75p=1.18).

A kezeletlen területen az epidermális sejtek kb. 25 %-a mutatott filaggrin pozitivitást. A glicerol és xilitol tartalmú gél ezt az arányt lényegesen megemelte (kezeletlen: M=19.25, 25p=15.13, 75p=33.88, glicerol és xilitol: M=37.9, 25p=23.87, 75p=47.53).

A hatóanyag nélküli gél alkalmazása nem változtatta meg a filaggrin mennyiséget (M=24.5, 25p=15.44, 75p=31.0). Az MMP-1 fehérje epidermális mennyiségét nem változtatták a különböző kezelések szignifikáns mértékben (az adatokat nem közöltük).

A 14 napig lokálisan alkalmazott L-metionin nem változtatta meg érdemben a vizsgált paramétereket (hidratáció, TEWL, frikció, elaszticitás, epidermális/dermális vastagság, echogenicitás, interdigitációs index, filaggrin pozitív epidermális sejtek aránya).

DISZKUSSZIÓ

Az antiirritánsok csoportja számos olyan hatóanyagot foglal magában, melyek lokális készítményekhez hozzáadva, csökkentik más anyagok irritáns hatását. Vizsgálatunk fontos célkitűzése volt, hogy bizonyos poliolok és aminosavak hatását vizsgáljuk SLS által irritált bőrön. A 4,5% és 15% xilitol és 5,4% és 18% mannitol oldatok ugyanannyi aktív molekulát tartalmaznak mint a 2,6% és 9% glicerol oldat. A taurin esetében nem volt lehetséges 8,4%-nál töményebb koncentrációjú oldatot létrehozni, a taurin rosszabb oldhatósága miatt. A glicin esetében is az 5 % volt a legmagasabb koncentráció, amit alkalmazni tudtunk. Vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy a glicerol hatékonyan csökkentette az SLS által előidézett irritációt, epikután kamrában alkalmazva. A xilitol, mannitol és taurin szintén antiirritáns hatásúnak bizonyult, a glicin viszont nem. A glicerol nem csak antiirritáns hatással rendelkezik, hanem bőrhidratáló tulajdonságú. A különböző hidratálók a száraz bőr báziskezelését jelentik, mivel javítják a barrierfunkciót, csökkentik a TEWL értékét, és javítják a bőr megjelenését.

A glicerol, úgymint a tejsav, urea és aminosavak, a humektánsok csoportjába tartozik, mely a hidratálók három csoportja közül az egyiket alkotja. A humektánsok azáltal hidratálják a bőrt, hogy a dermis mélyebb rétegeiből illetve a külvilágból vonják el és kötik meg a vizet.

Más készítményekhez képest gyorsabban szívódnak fel, ezáltal kellemesebb a használatuk.

Feltételeztük, hogy más humektáns anyagok is javíthatják a bőrbarriert.

Az urea kozmetológiai tulajdonságait jól ismerjük, de a xilitol és mannitol hatását még sosem vizsgálták *in vivo* körülmények között, habár *in vitro* körülmények közt ismerjük vízmegkötő tulajdonságait. Az *in vitro* és *in vivo* vízmegkötő tulajdonságok különbözhetnek, mint pl. a mannitol esetében.

Vizsgálataink alapján mind a mannitol, mind a xilitol képes csökkenteni a TEWL értékét, illetve kivédeni az SLS irritáns hatását, viszont egyéb tulajdonságokban különböznek. A mannitol csak akkor hidratálja a bőrt, ha hilauronsavval együtt injektálják, a xilitol azonban egyedül és lokálisan alkalmazva képes jelentősen megnövelni a bőrhidratációt.

Figyelembe véve a glicerol és xilitol előnyös és potenciálisan szinergista hatásait, melyek azon alapulhatnak, hogy különböző gének expressziójára hatnak, indokoltnak gondoltuk a kombinációban való alkalmazásuknak a vizsgálatát.

A II. vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a glicerol és xilitol tartalmú Xylinep gél antibakterális hatással bír *in vitro* és *in vivo* körülmények között is, és hatékonyan hidratálja a bőrt 24 órán keresztül. A formula antibakteriális hatásáért a xilitol a felelős, a hidratáló hatáshoz mindkét poliol hozzájárul. Munkacsoportunk állatkísérletes kutatásai során bebizonyította, hogy a glicerol és a xilitol is képes a TEWL csökkentésére és a hidratáció növelésére irritatív kontakt dermatitisz fennállása esetén. Továbbá a xilitol képes megakadályozni az SLS mélyebb rétegekbe való penetrációját. Ezen tulajdonságok alapján a glicerol és xilitol tartalmú gél hozzájárulhat az irritatív kontakt dermatitisz megelőzéséhez.

A II. vizsgálatunk során azonban csak a rövidtávú hatásokat mértük fel. A III. vizsgálat során egy hosszabb távú alkalmazást követően bizonyítottuk be, hogy a glicerol és xilitol nemcsak a stratum corneum víztartalmát növeli, hanem a mélyebb rétegek víztartalmát is.

Ultrahangos vizsgálattal mind az epidermális, mind a dermális vastagságot mértük, 2 hetes kezelés után. A vastagság növekedését értelmezhetjük a hidratáció markereként. Továbbá a papilláris dermis echogenicitásának csökkenését mértük, ami a nagyobb megkötött vízmennyiségnek köszönhető. A vizsgált biomechanikai paraméterek javulását a glicerol és xilitol hidratáló hatása magyarázza. A frikció értéke egyenesen arányos a str. corneum hidratáltságával. A vizsgálatunk során mért magasabb frikciós értékek, amelyek simább bőr fennállására utalnak, a bőr magasabb víztartalmának köszönhetőek.

Az R0 paraméter, mely a bőr erőhatásra jelentkező passzív viselkedését tükrözi, szintén emelkedett értékeket mutatott a poliolok alkalmazása után. Különböző módszerekkel bebizonyítottuk, hogy a glicerol és xilitol érdemben megnöveli a bőr felületes és mélyebb rétegeinek is a víztartalmát.

A poliolok vízmegkötő képessége nemcsak a kémiai szerkezetükben rejlik, hanem más magyarázatai is vannak. Vizsgálataink egyik fontos felfedezése, hogy a poliolok lokális alkalmazása a filaggrin fehérje mennyiségét megnöveli a bőrben. Korábbi *in vitro* adatok is arra utaltak, hogy a xilitol a filaggrin fokozott expresszióját eredményezi. Mivel a glicerol egyedül nem emeli a filaggrin expresszióját *in vivo*, feltételezhető, hogy a xilitol a felelős ezért a hatásért, azonban a pontos hatásmechanizmus nem ismert. Habár a hatóanyag nélküli hordozónak volt némi hatása a bőr hidratációjára, de a poliolok hatásához képest ez elenyésző volt illetve a filaggrin expresszióra sem volt hatással. Ennélfogva a poliolok tehetők felelőssé a készítmény hidratáló hatásáért. A hidratáló hatáson kívül a glicerol és xilitol hatékonyan javítja a bőr barrier funkcióját, amit a TEWL értékek jól reprezentálnak.

A II. vizsgálat során azt találtuk, hogy a glicerol és xilitol 24 órán keresztül emelte a str. corneum hidratáltságát, amit nem kísért a TEWL változása. A barrierfunkció megítélhetősége céljából egy hosszabb obszervációs periódusra volt szükség. Korábbi vizsgálatok szerint a glicerol 3 napos használata után lehetett csak szignifikánsan csökkent TEWL értékeket mérni. A xilitol csökkenti a TEWL értéket atópiás betegek esetén 7 napos használat után, de nem szignifikáns mértékben. A poliolok hidratáló hatása magyarázhatja a TEWL csökkenését.

A TEWL és a str. corneum hidratáltsága közti inverz kapcsolat jól ismert és ennek megfelelően a hidratálók sokszor javítják a barrierfunkciót. A filaggrin expresszió fokozása illetve az NMF mennyiség növekedése hozzájárul a bőrbarrier integritásához. Az öregedési folyamattal járó csökkent barrierfunkciót részben magyarázza a csökkent mennyiségű NMF.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy irritáns anyagok okozta barrierkárosodás csökkenti az NMF mennyiségét. Ennélfogva antiirritáns hatású lehet az NMF mennyiségének növelése a filaggrin expresszió fokozása által. A szövettani vizsgálatok kimutatták, hogy a dermo-epidermális junctionra (DEJ) is hatással vannak a poliolok. Ismert, hogy a bőröregedés együtt jár a DEJ elsimulásával, a papillák magasságának csökkenésével. Ezt a folyamatot szemlélteti az interdigitációs index. Az öregedés morfológiai változásai a dermális atrófia, a csökkent kollagénszint illetve az elastikus rostok csökkent aránya. A poliolok alkalmazása után mért magasabb interdigitációs index bőrfiatalító hatással ruházta fel a glicerolt és a xilitolt. Az ultrahangfelvételek igazolták a poliolok okozta epidermális és dermális hidratációnövekedést, ami szintén öregedésgátló hatású. Azonban megjegyezzük, hogy a poliolok nem változtatták érdemben az elaszticitást (Cutometer R2 és R5 paraméter), vagyis az elasztikus rostokra nincsenek hatással. A poliolok továbbá nem voltak hatással az MMP-1 mennyiségére, melynek csökkentése hozzájárult volna az öregedésgátló hatáshoz.

A vizsgált aminosavak hatása kevésbé bizonyult kifejezettnek. A taurin nem csökkentette szignifikáns mértékben az SLS okozta TEWL emelkedést, viszont dózisdependens módon a magasabb, 8,4%-os koncentráció már alacsonyabb TEWL értékeket eredményezett. Továbbá a 8,4%-os koncentráció csökkentette a TEWL-t, összehasonlítva a csak SLS oldattal kezelt területtel. A glicin nem bizonyult antiirritánsnak és a metionin sem volt hatással a III. vizsgálatban mért paraméterekre.

Összességében munkánkkal a glicerol, xilitol, mannitol és taurin antiirritáns hatását igazoltuk és a glicerol és xilitol kombinációjának előnyeit. Hatékonyságukat azáltal fejtik ki, hogy direkt fizikai vagy/és kémiai változásokat eredményeznek a bőrben, különböző gének expresszióját befolyásolják (nem csak a filaggrin expressziót, hanem gyulladásos citokinek expresszióját is befolyásolják) és antimikrobiális hatással is rendelkeznek.

Eredményeink szélesítik az antiirritáns hatóanyagok skáláját és hozzájárulnak újabb termékek fejlesztéséhez.

ÖSSZEGZÉS

Az *in vivo* vizsgálataink és *in vitro* kísérleteink a poliolok bőr homeosztázisára kifejtett hatásait derítették fel.

- szubklinikai gyulladásos modellen bebizonyítottuk, hogy a glicerol, xilitol, mannitol és mérsékeltén a taurin is antiirritáns hatással bír
- a glicerol és xilitol kombinált alkalmazása csökkenti az életképes baktériumok számát *S. pyogenes* és *S. aureus* kultúrákban
- *in vivo* is csökkenti a csíraszámot
- a glicerol és xilitol növeli a bőr hidratációját, hosszabb távon pedig fokozza a bőr barrierfunkcióját és javítja a bőr mechanikai tulajdonságait
- a két poliol kombinációja javítja a bőr morfológiai tulajdonságait, ezáltal bőrfiatalító hatású
- a glicerol és xilitol növeli a filaggrin mennyiségét

Ezek alapján ezen poliolok antiirritáns hatóanyagként való felhasználása jön szóba a kozmetikai iparban. A glicerol és xilitol kombinált alkalmazása a száraz bőr hatékony kiegészítő terápiája lehet és emellett lassíthatja a bőröregedés folyamatát.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először szeretném hálámat kifejezni Kemény Lajos professzor úrnak, aki munkám során mindvégig támogatott és lehetőséget nyújtott a kutatásaink elvégzéséhez.

Ugyancsak köszönetemet szeretném kifejezni Dikstein Shabtay professzor úrnak, aki tudásával végig rendelkezésemre állt, és akitől sokat tanultam.

Végtelen hálával tartozom Dr. Erős Gábornak, akinél jobb témavezetőt nem is tudtam volna elképzelni, az évek során tőle kapott támogatás és segítség számomra felbecsülhetetlen értékű.

Köszönetet szeretnék mondani Behány Zoltánnak, aki a munkáink során megosztotta velem a bőrfiziológiai mérések terén szerzett tudását és akivel minden felmerülő akadályt, nehézséget le tudtunk küzdeni.

Ezen kívül szeretném megköszönni Dr. Varga Erikának és Dr. Szél Editnek a szövettani metszetek feldolgozása és elemzése során végzett munkáját és Dr. Szabó Kornéliának a mikrobiológiai kísérletek sikerességéhez nyújtott segítségét. A laborban dolgozó összes kollégának szeretném megköszönni munkáját és segítségét.

Dr. Mohos Gábornak köszönöm a szövettani mintavételek elvégzését és Dr. Dura Ágnesnek a vizsgált oldatok és készítmények elkészítését.

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

- I. **Korponyai C**, Kovács RK, Erős G, Dikstein S, Kemény L. Antiirritant properties of polyols and amino acids. *Dermatitis* 2011; 22: 141-146. (IF: 1.211)
- II. Erős G, **Korponyai C**, Szabó K, Behány Z, Szél E, Kemény L. Antibacterial and skin hydrating effects of Xylinep® gel containing glycerol- and xylitol. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 2014; 90: 152-155. (Hungarian) (IF: 0)
- III. **Korponyai C**, Szél E, Behány Z, Varga E, Mohos G, Dura A, Dikstein S, Kemény L, Erős G. The effects of locally applied glycerol and xylitol on the hydration, barrier function and morphological parameters of the skin. *Acta Dermato-Venereologica* DOI: 10.2340/00015555-2493 (IF: 3.678)

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKT

Korponyai C, Szél E, Behány Z, Mohos G, Dikstein S, Nagy K, Kemény L, Erős G. A lokálisan alkalmazott glicerol, xilitol és metionin hatásai a bőr hidratációjára, barrier funkciójára és morfológiájára. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 2014; 90(6): 275.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

- I. Szél E, Polyánka H, Szabó K, Hartmann P, Degovics D, Balázs B, Németh IB, **Korponyai C**, Csányi E, Kaszaki J, Dikstein S, Nagy K, Kemény L, Erős G. Anti-irritant and anti-inflammatory effects of glycerol and xylitol in sodium lauryl sulfate-induced acute irritation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2015; 29(12):2333-2341. (IF: 3.029)
- II. Meszes A, **Korponyai C**, Orvos H, Csoma Z. Transient zebra-like hyperpigmentation in a healthy newborn. *The Indian Journal of Pediatrics* 2016; 83(7):758-759. (IF: 0.808)

EGYÉB ABSZTRAKTOK

1. **Korponyai C**, Altmayer A, Varga E, Szőke A, Bata-Csörgő Zs, Kemény L: Myeloma multiplex és amyloidosis együttes előfordulása. Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle 2009; 85:248.
2. Degovics D, Erős G, Hartmann P, Gáti K, Németh IB, Czóbel M, **Korponyai C**, Nagy K, Kemény L. The effects of oxygen- and hydroxyproline-containing solutions on the healing of acute wounds. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2013; 54(2):193-194.
3. Szél E, Erős G, Hartmann P, Németh IB, Degovics D, **Korponyai C**, Dikstein S, Boros M, Nagy K, Kemény L. Anti-irritant and anti-inflammatory effects of polyols in irritant contact dermatitis. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2013; 54(2):205.
4. Szél E, Erős G, Hartmann P, Degovics D, **Korponyai C**, Boros M, Dikstein S, Nagy K, Kemény L: Poliolok antiirritáns és gyulladáscsökkentő hatása irritatív kontakt dermatitiszben. Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle 2013; 89(6):179.
5. Szél E, Erős G, Hartmann P, Németh I, Degovics D, **Korponyai C**, Kaszaki J, Polyánka H, Szabó K, Dikstein S, Nagy K, Kemény L: Poliolok antiirritáns és gyulladáscsökkentő hatása irritatív kontakt dermatitiszben. Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle 2014; 90(6):261.

Társszerzői nyilatkozat

Korponyai Csilla doktorjelölt Ph.D. értekezésének tárgyát képező alábbi cikkben társszerzőként szerepel. Ezen tudományos közlemény létrejöttében jelentős szerepet töltött be. Konkrét feladata a cikkben közölt vizsgálatok technikai kivitelezése, és kiértékelése volt. A publikáció teljes anyaga így szerves részét képezi disszertációjának. Igazolom, hogy a közölt adatokat másik társszerző korábban nem használta, illetve a későbbiekben sem használja fel további Ph.D értekezés elkészítéséhez. Jelen nyilatkozat tárgyát képező cikk a következő:

Erős G, **Korponyai C**, Szabó K, Behány Z, Szél E, Kemény L. Antibacterial and skin hydrating effects of Xylinep® gel containing glycerol- and xylitol. Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle 2014; 90: 152-155. (Hungarian) (**IF: 0**)

Szeged, 2016. október 20.

.....

Dr. Erős Gábor Ph.D.