Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

PhD értekezés tézisei

HATÓANYAGOK BŐRPENETRÁCIÓJÁNAK ELŐSEGÍTÉSE AKTÍV ÉS PASSZÍV PENETRÁCIÓFOKOZÓ MÓDSZEREKKEL

Bakonyi Mónika

Témavezetők:

Dr. Csányi Erzsébet Ph.D.

és

Dr. Berkó Szilvia Ph.D.

SZEGED
2018

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Ph.D program
Programvezető: Prof. Dr. Szabó-Révész Piroska, Ph.D., D.Sc.

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Témavezetők: Dr. Csányi Erzsébet Ph.D. és Dr. Berkó Szilvia Ph.D.

Bakonyi Mónika

HATÓANYAGOK BŐRPENETRÁCIÓJÁNAK ELŐSEGÍTÉSE AKTÍV ÉS PASSZÍV PENETRÁCIÓFOKOZÓ MÓDSZEREKKEL

Szigorlati Bizottság

Elnök: *Dr. Csóka Ildikó Ph.D.,* Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Tagok: *Dr. Kiss Dorottya Ph.D.*, Richter Gedeon Nyrt.

Dr. Zupkó István Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló Bizottság

Elnök: *Prof. Dr. Kiss Loránd D.Sc.,* Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai Intézet

Opponensek: *Dr. Fehér András PhD.*, Egis Gyógyszergyár Zrt.

Dr. Vecsernyés Miklós Ph.D., Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai Tanszék

Tagok: *Dr. Ducza Eszter Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Dr. Vasas Andrea Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet

SZEGED
2018

1. BEVEZETÉS

A hatóanyagok bőrön keresztüli alkalmazása előnyös alternatíva lehet a hagyományos beviteli kapukkal szemben, különösen, ha a terápia célja valamely bőrben található patológiás állapot kezelése. A dermális hatóanyag-bevitel esetén kisebb dózisok alkalmazása válik lehetővé, mivel a felszívódás során a hatóanyagok elkerülik az enterohepatikus körforgást és a gasztrointesztinális rendszerben való lebomlást, emellett kisebb az esélye a szisztémás mellékhatások kialakulásának is. További előny, hogy nem invazív, a betegek által könnyen alkalmazható módszer.

A daganatos betegségek kezelése a 21. század egyik leginkább sürgető orvosi kihívása. Közülük is, a bőrrák előfordulása rendkívüli mértékben megnőtt az elmúlt évtizedek során különböző környezeti és genetikai faktornak köszönhetően, mint pl. a megnövekedett ultraibolya sugárzás. A bőr daganatos elváltozásai a betegség korai szakaszában csak a bőr felsőbb rétegeit érintik, így a tumorellenes hatóanyagok lokálisan történő alkalmazása előnyös lehet a daganatellenes terápia vagy a posztoperatív kezelések során.

Napjaink másik orvosi kihívása az eredményes helyi érzéstelenítés terápiájának kidolgozása, mivel a forgalomban lévő készítmények nagy része rosszul penetrálódik a bőrön keresztül, és gyors, de rövid ideig tartó hatást képesek csak kifejteni. Ezért különösen nagy szükség van olyan helyi érzéstelenítő készítmények fejlesztésére, amelyek hosszan tartó hatást képesek biztosítani. A két fent említett terápiás célban közös az, hogy eredményességükhöz feltétel, hogy a hatóanyagok a bőrben a dermisig penetrálódjanak.

A bőr külső rétege, a stratum corneum, azonban gátat szab a hatóanyagok dermisbe való penetrációjának, és csak a kis molekulatömegű és lipofil molekulák képesek átjutni rajta passzív diffúzió útján. Számos módszer ismert azonban a barrieren történő penetráció segítésére, amelyek alapja vagy a bőr áteresztő képességének növelése vagy külső hajtóerő alkalmazása, esetleg a két módszer kombinálása. Az elsőként említett módszerek az ún. passzív, míg a másodikak az aktív penetrációfokozó módszerek közé sorolhatók.

A hatóanyagok bőrpenetrációjának elősegítése szempontjából továbbá különösen fontos a célnak megfelelő hordozórendszerbe megválasztása. A készítmények összetételének tervezése és gyártása során elengedhetetlen azoknak a tényezőknek a feltárása és ellenőrzése, amelyek a végtermék tulajdonságait döntően befolyásolják. Ennek megvalósításához a Quality by Design módszer alkalmazása nyújthat segítséget, amely lehetővé teszi egy olyan költséghatékony gyógyszerfejlesztési módszer kidolgozását, amely a betegek, ipari és szabályozási szervek elvárásainak megfelelő, magas minőségű terméket eredményez.

2. CÉLKITŰZÉS

Ph.D. munkám során célul tűztem ki innovatív, bőrön alkalmazott terápiák vizsgálatát, beleértve az új típusú gyógyszerhordozó-rendszereket, aktív és passzív penetrációfokozó módszereket, továbbá a bőr modellezésére alkalmas rendszerek vizsgálatát, amelyek a készítményfejlesztés során a humán bőr alternatívái lehetnek.

1. Ph.D. munkám első részének célja egy liposzómális *in vitro* modellrendszer előállítása és vizsgálata volt, amely alkalmas a kémiai penetrációfokozó anyagok bőrön való hatásának modellezésére. Kísérleteim során két kémiai penetrációfokozó anyag, a Kolliphor RH40 és a Transcutol hatását vizsgáltam. Összehasonlításként, ezekkel az anyagokkal penetrációs kísérleteket is végeztem humán bőrön keresztül, *ex vivo*. Az *in vitro* és *ex vivo* eredmények korrelációjának felállításával igazolható, hogy a liposzómális rendszerek alkalmas modellek a penetrációfokozó anyagok hatásának vizsgálatára.
2. A munka második részében célul tűztem egy nem invazív, bőrön alkalmazható, melanoma kezelésére alkalmas terápia kidolgozását. Kísérleteim során egy betulinsav tartalmú készítményt állítottam elő, melynek bőrpenetrációját Raman térképezés segítségével vizsgáltam. Meghatároztam továbbá, hogy az elektroporáció (EP), mint aktív penetrációfokozó módszer, elősegíti-e a hatóanyag mélyebb bőrrétegekbe való permeációját.
3. Ph.D. munkám harmadik részében célul tűztem ki egy olyan dermális helyi érzéstelenítő készítmény fejlesztését, amely gyorsan penetrálódik a bőr barrier rétegén keresztül, majd nyújtott lokál anesztetikus hatást fejt ki.

Kutatómunkám során az alábbi célok megvalósítását tűztem ki:

- a lidokain só és bázis formájának inkorporálása különböző hagyományos és modern gyógyszerhordozó-rendszerekbe: hidrogél, oleogél, liposzóma, nanostruktúrált lipid hordozó (nanostructured lipid carrier=NLC) és liotróp folyadékkristály (lyotropic liquid crystal=LLC);
- a hordozórendszerek tulajdonságainak vizsgálata: részecskeméret, zéta-potenciál, bezárási hatékonyság, hatóanyag-vivőanyag kölcsönhatások;
- a liposzómák bezárási hatékonyságának vizsgálata differenciális pásztázó kalorimetria (differential scanning calormetry=DSC) segítségével, amely a módszer egy kevésbé ismert, innovatív felhasználási módja;
- a Quality by Design módszer alkalmazása a készítmények teljesítményének összehasonlítására leginkább alkalmas vizsgálatok kiválasztására;

- a lidokain *in vitro* felszabadulásának és *ex vivo* bőrpenetrációjának vizsgálata Franz diffúziós cella segítségével;
- a hordozórendszerek fiziológiás bőrfunkciókra (hidratáltság és transzepidermális vízvesztés) való hatásának vizsgálata *in vivo*;
- a lidokain bőrpenetrációjának nyomon követése Raman térképezés segítségével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Bőrmodellező liposzómák előállítása

A stratum corneum lipidekből felépülő liposzómákat (stratum corneum lipid liposomes=SCLLs) vékonyfilm-hidratációs módszerrel állítottam elő. A lipidek kiválasztása úgy történt, hogy azok mennyisége és minősége megegyezzen a stratum corneum lipid tartalmával (ceramidok: koleszterin: palmitinsav: koleszterin-szulfát= 4: 2,5: 2,5:1 m/m%). A hidratációhoz a következő puffert használtam: 20 mM HEPES (4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etánszulfonsav, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Németország), 0,8 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) és 120 mM NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Németország), illetve 70 mM kalcein (Sigma- Aldrich, Saint Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) NaCl helyett az efflux mérések esetén. A diszperziót 80°C-os ultrahangos kádba helyeztem 1 órára, majd további 30 percig hőkezeltem.

3.2. Betulinsav tartalmú készítmény előállítása

A betulinsavat (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Amerikai Egyesült Államok) eloszlattam 2-propanol (Merck ., Budapest, Magyarország), Transcutol, Labrasol (Azelis Magyarország Kft., Budapest, Magyarország) és izopropil-mirisztát (Merck Kft., Budapest, Magyarország) elegyében. A PEG 4000-t (Merck Kft., Budapest, Magyarország) megolvasztottam, és a szuszpenzióhoz adtam. A kenőcsöt kihűlésig kevertem.

3.3. Lidokain tartalmú készítmények előállítása

3.3.1. Hidrogél

A lidokain-hidrokloridot (Hungaropharma Zrt., Budapest, Magyarország) tisztított víz, etanol és makrogol 400 (Hungaropharma Zrt., Budapest, Magyarország) elegyében oldottam, majd Methocel K4M (Colorcon, Budapest, Magyarország) hozzáadásával gélesítettem.

3.3.2. Oleogél

A Mygliol 812N (Sasol GmbH, Hamburg, Németország) és a Kolliphor RH40 (BASF SE Chemtrade GmbH, Ludwigshafen, Németország) 60°C-ra melegített elegyében feloldottam 5 m/m% lidokain bázist (Hungaropharma Zrt., Budapest, Magyarország). A gél kialakításához

Aerosil 200-at (Sigma- Aldrich, Saint Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) használtam.

3.3.3. Liposzóma

A lidokain tartalmú liposzómákat vékonyfilm-hidratációs módszer segítségével állítottam elő, lipidként DMPC-t (1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszforilkolin) használva. A liposzómák hatóanyag-tartalma 1-2-3-4-10 m/m% volt. A hidratációhoz a következő puffert használtam: 20 mM HEPES, 154 mM NaCl, pH 7,4. A hidratációt szobahőmérsékleten végeztem, 5 percen keresztül.

3.3.4. LLC

Az izopropil-mirisztát (Merck Kft., Budapest, Magyarország) és Kolliphor RH40 1:4 arányú elegyét 60°C-ra melegítettem és mágneses keverő segítségével homogenizáltam, majd 5 m/m% lidokain bázist oldottam benne. Végül a vizes fázist folyamatos keverés mellett, cseppenként adtam a rendszerhez.

3.3.5. NLC

A szilárd lipidet, az Apifilt (PEG-8 Beeswax, Gattefossé, St. Priest, Franciaország) 80°C-on megolvasztottam, majd homogenizáltam a Mygliol 812N-nel és az elegyben oldottam a lidokain-bázist. A Cremophor RH60-at (BASF SE Chemtrade GmbH, Ludwigshafen, Németország) tartalmazó vizes fázist azonos hőmérsékletűre melegítettem, majd a fázisokat elegyítettem. A keletkezett pre-emulzióba 10 percre ultrahangos keverőfejet merítettem (Hielscher UP200S ultrasonic homogenizer, Hielscher Ultrasonics GmbH, Németország). Végül a diszperziót jeges fürdőbe helyeztem. A gélképzéshez glicerint és Methocel K4M-et adtam a rendszerhez. A lidokain végső koncentrációja 5 m/m% volt.

3.4. Részecskeméret és zéta-potenciál analízis

A liposzómák és NLC részecskeméretének és zéta-potenciáljának meghatározását a Malvern Nano ZS készülékkel (Malvern Instruments, Malvern, Egyesült Királyság) végeztem. A rendszer homogenitásának jellemzésére meghatároztam a polidiszperzitásfokot is (polydispersity index=PDI).

3.5. Ultracentrifugálás

A liposzómák bezárási hatékonyságának meghatározásához a fázisokat Beckman Coulter Optima XE-90 Ultracentrifuge készülék segítségével választottam szét, 3 órán keresztül, 35 000 rpm fordulatszámon, 4°C hőmérsékleten. A felülúszó folyadék („indirekt módszer”) és a pellet (1 mL etanolban oldva, „direkt módszer”) hatóanyag-tartalmát UV/VIS spektrofotométer segítségével határoztam meg 262 nm hullámhosszon mérve.

3.6. Differenciális pásztázó kalorimetria mérések

A lidokain tartalmú liposzómák DSC vizsgálatait MicroCal VPDSC készülék (MicroCal Inc., Northampton, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztem. A DSC görbét 5-80°C hőmérséklet-tartományban vettem fel, 1°C min^{-1} fűtési sebességet alkalmazva. A módszer újfajta alkalmazási lehetőségét vizsgáltam a liposzómák bezárási hatékonyságának vizsgálatára: a fő fázisátmeneti hőmérséklet csökkenése arányos a lidokain liposzómális membránban kötött (bezárt) frakciójával.

$$\Delta Tm(X) = -\frac{RT^2}{\Delta H} X_d^b \qquad (1)$$

ahol R az egyetemes gázállandó (1.9858775 cal K^{-1} mol^{-1}), ΔH a fő fázisátmenethez tartozó entalpia, és X_d^b a lidokain liposzómába bezárt mólfrakciója.

3.7. Polarizációs mikroszkóp

A LLC mintákat polarizációs mikroszkóp segítségével vizsgáltam (Leica Q500 MC Image Analyzer System) 200-szoros nagyítást alkalmazva.

3.8. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

A lidokain-NLC FT-IR spektrumát az Avatar 330 FT-IR spektroszkóp (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével rögzítettem, ATR feltétet (ZnSe, 45°) használva. A spektrumot 4000 és 400 cm^{-1} hullámszám-tartományban, 128 szkent készítve, 4 cm^{-1} optikai felbontással vettem fel.

3.9. Lidokain tartalmú készítmények vizsgálata Raman spektroszkópia segítségével

A készítmények Raman spektrumát Thermo Fisher DXR Dispersive Raman Spektrométer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével rögzítettem. A készülékben található lézer fényforrás 532 nm hullámhosszúságú fényt bocsát ki, 10 mW teljesítménnyel, 25 μm rekesz szélességgel. A spektrumok felvételéhez 24x6 s expozíciós időt alkalmaztam.

3.10. Kalcein efflux és fluoreszcencia élettartam mérés

A kémiai penetrációfokozó anyagok által okozott membránkárosodás mértékét kalcein efflux mérésével határoztam meg. Az efflux (E) a következő egyenlet alapján számolható:

$$E = \frac{(B_F - B_{F0})}{(B_F - B_{F0} + Q_{stat}\, B_E)} \qquad (2)$$

ahol B a pre-exponenciális faktor (arányos a szabad és bezárt kalcein koncentrációval). B_{F0} a szabad kalcein koncentrációjával arányos a mérés kezdetekor, B_F a szabad festék koncentrációjával a mérés adott időpontjában, és B_E a bezárt kalcein koncentrációjával. Q_{stat} a „statikus kioltási faktor” (static quenching factor), amelynek értékét irodalmi adatok alapján 1,2-nek vettük.

A méréseket Horiba Jobin Yvon (Edison,NJ) Fluorolog 3 készülékkel végeztem, amelyben a gerjesztéshez 467 nm hullámhosszúságú lézer dióda pulzál 1 MHz frekvencián. A relaxációs görbe felvételéhez alkalmazott hullámhossz 515 nm volt (sávszélesség= 2 nm).

3.11. Hatóanyag felszabadulás és penetráció *in vitro* és *ex vivo* vizsgálata

A hatóanyagok *in vitro* diffúzióját és *ex vivo* penetrációját vertikális Franz diffúziós cella (Hanson Research, Chatsworth, CA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével határoztam meg. A diffúzió vizsgálatához kevert cellulóz membránt (Porafil, Machenerey-Nagel, Düren, Németország) alkalmaztam, míg az *ex vivo* kísérletekben humán hőszeparált epidermist szintetikus membránnal alátámasztva. A diffundált és penetrálódott hatóanyag mennyiségét a lidokain esetén UV/Vis spektrofotometria, míg a koffein esetén HPLC segítségével határoztam meg.

3.12. Raman térképezés

A lidokain és betulinsav bőrben való pontos elhelyezkedésének meghatározásához Raman térképezést használtam. A kísérlet során a készítményekkel előzetesen kezelt bőrből készült keresztmetszeteket vizsgáltam a kezelést követően 6 órával. A méréseket a Thermo Fisher DXR Dispersive Raman Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) készülékkel végeztem. A fényforrás 780 nm hullámhosszúságú fényt bocsátott ki, 24 mW teljesítménnyel. A spektrumokat 12x2 másodperces expozíciós idővel rögzítettem, az optikai rés 25 μm szélességű volt.

3.13. Elektroporáció

Az EP penetrációfokozó hatásának vizsgálatára állatkísérleteket végeztem 6 hónapos SKH-1 szőrtelen egereken. Az állatokat véletlenszerűen a következő 4 csoportba soroltam:

- A csoport: hagyományos kezelés (30 perc, EP nélkül)
- B csoport: 900 V, 1 perces EP kezelés
- C csoport: 900 V, 2 perces EP kezelés
- D csoport: 900 V, 6 perces EP kezelés

Az elektromos impulzusokat Mezoforte Duo Mez 120905-D készülék (Dr. Derm Equipment Zrt., Budapest, Magyarország) generálta.

3.14. Bőrhidratáció és transzepidermális vízvesztés (TEWL)

A készítmények fiziológiás bőrfunkciókra gyakorolt hatását 3-4 hónapos SKH-1 szőrtelen egereken vizsgáltam *in vivo* a Multi Probe Adapter MPA 5 (Courage und Khazaka, Németország) készülék segítségével. A bőrhidratáció mérését Corneometer CM 825 mérőfej,

míg a TEWL meghatározását Tewameter TM 300 mérőfej segítségével végeztem a készítményekkel való kezelés előtt, ill. 30, 90 és 150 perccel a kezelés után.

3.15. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Amerikai Egyesült Államok) szoftver segítségével végeztem el, egyszempontos ANOVA analízist alkalmazva Bonferroni poszttesztel (*$p \leq 0,5$; **$p \leq 0,01$; ***$p \leq 0,001$ a referenciához viszonyítva).

4. EREDMÉNYEK

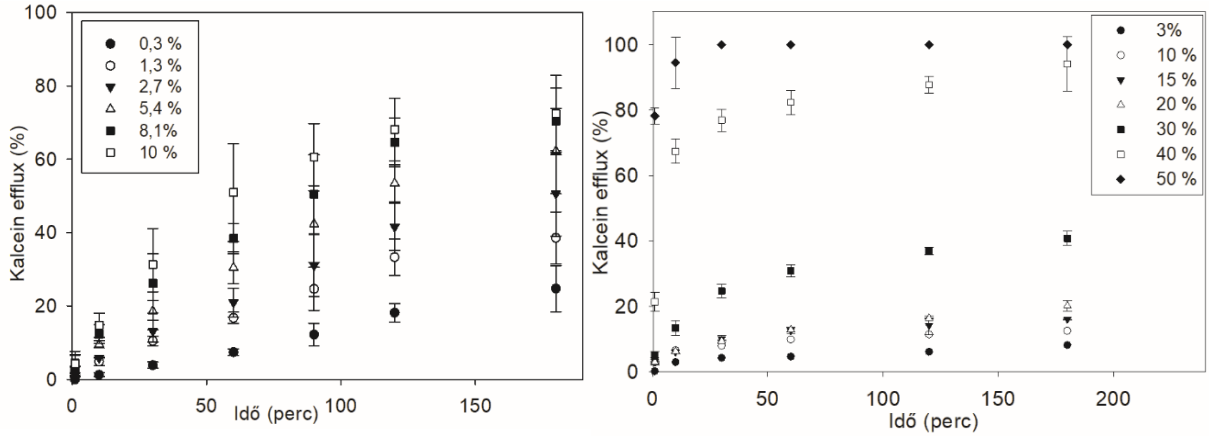
4.1. Stratum corneum lipideket tartalmazó liposzómák bőrmodellként való alkalmazhatóságának vizsgálata

4.1.1. Részecskeméret és polidiszperzitás fok meghatározása

A kalceint nem tartalmazó SCLL-k részecskemérete 135,23 ±0,06 nm volt, polidiszperzitás indexe pedig 0,220±0,02. A kalceint tartalmazó SCLL-k részecskemérete 137,35±0,07 nm, PDI értéke 0,228±0,02 volt.

4.1.2. Kalcein efflux és fluoreszcencia élettartam vizsgálata

A penetrációfokozó anyagok, a Kolliphor RH40 és Transcutol, különböző koncentrációinak membránkárosító hatását a SCLL liposzómákon kalcein efflux mérés segítségével határoztam meg. Mindkét anyag koncentráció-függő módon növelte a kalcein liposzómákból való felszabadulását, a Transcutol-ból azonban jóval nagyobb koncentráció volt szükséges azonos efflux érték eléréséhez (1. ábra).



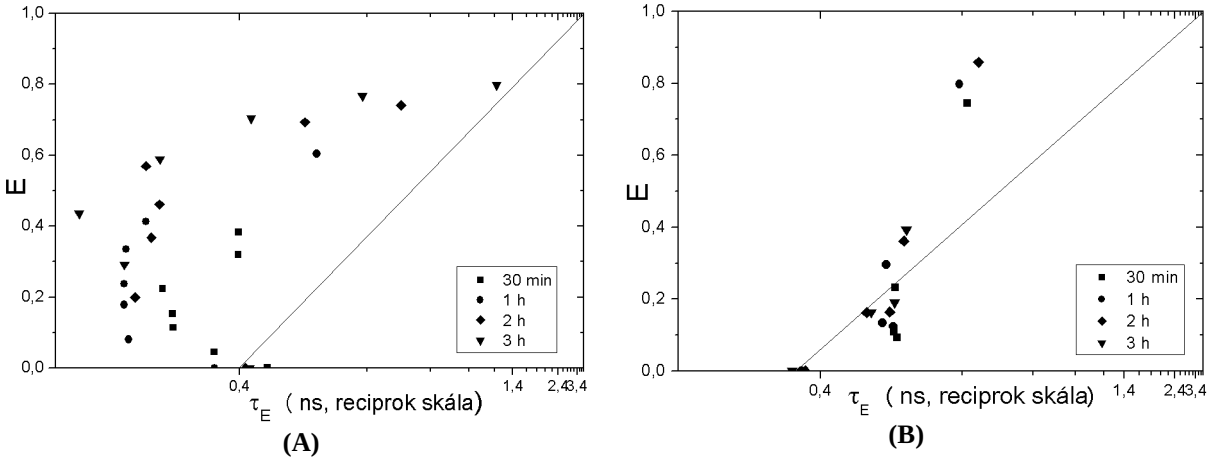
(A) **(B)**

1. ábra. A Kolliphor RH40 (A) és Transcutol (B) hatása a SCLL-ból való kalcein felszabadulásra az idő függvényében.

A membrán károsítás mechanizmusának meghatározásához a fluoreszcens élettartamot vizsgáltam. Az effluxot alapvetően kétféle membránkárosító mechanizmus okozhatja: (i)

„mindent vagy semmit” (all-or-none), amikor csak néhány liposzóma membránja károsodik, de azokból az összes bezárt kalcein felszabadul vagy (ii) „fokozatos” (graded), amikor minden egyes liposzómából a bezárt kalcein egy adott frakciója szabadul fel.

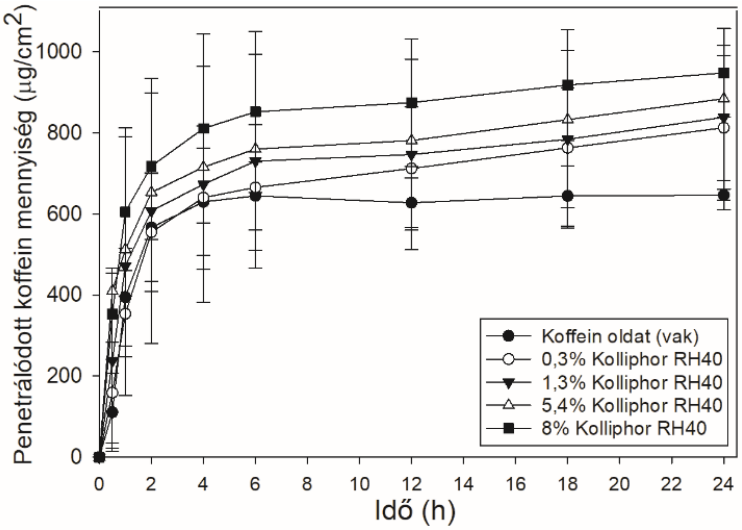
Eredményeim alapján, a Kolliphor RH40 egy bizonyos efflux érték eléréséig „mindent vagy semmit” mechanizmussal károsítja a liposzómák membránját, majd kb. 60%-os efflux elérése után a „fokozatos” mechanizmus válik uralkodóvá (2/A. ábra). A Transcutol membránnal való kölcsönhatására a „fokozatos” mechanizmus volt jellemző (2/B. ábra).



2. ábra. Kolliphor RH40 (A) és Transcutol (B) által okozott kalcein efflux a bezárt kalcein fluoreszcens élettartamának (τ_E) függvényében ábrázolva.

4.1.3. Penetrációfokozó anyagok hatásának *ex vivo* vizsgálata

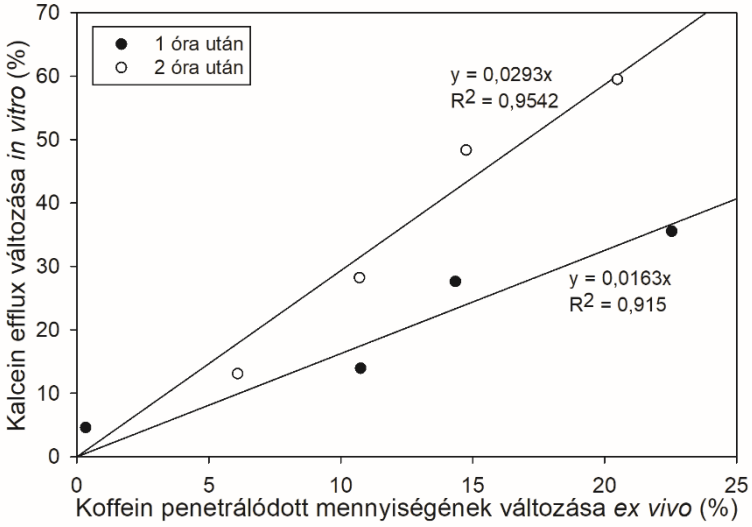
A Kolliphor RH40 penetrációfokozó hatásának *ex vivo* meghatározásához a koffein humán hőszeparált epidermisen keresztüli penetrációját vizsgáltam (3. ábra). A koffein penetrációjának növekedése arányos volt a penetrációfokozó anyag koncentrációjának növekedésével. A legmagasabb alkalmazott koncentráció 8,1% volt, amely 21%-os növekedést okozott a koffein kumulatív penetrálódott mennyiségében.



3. ábra. A koffein humán hőszeparált epidermisen keresztül penetrálódott kumulatív mennyisége a Kolliphor RH40 különböző koncentrációinak hatására.

4.1.4. A penetrációfokozók okozta kalcein efflux és az *ex vivo* penetráció korrelációja

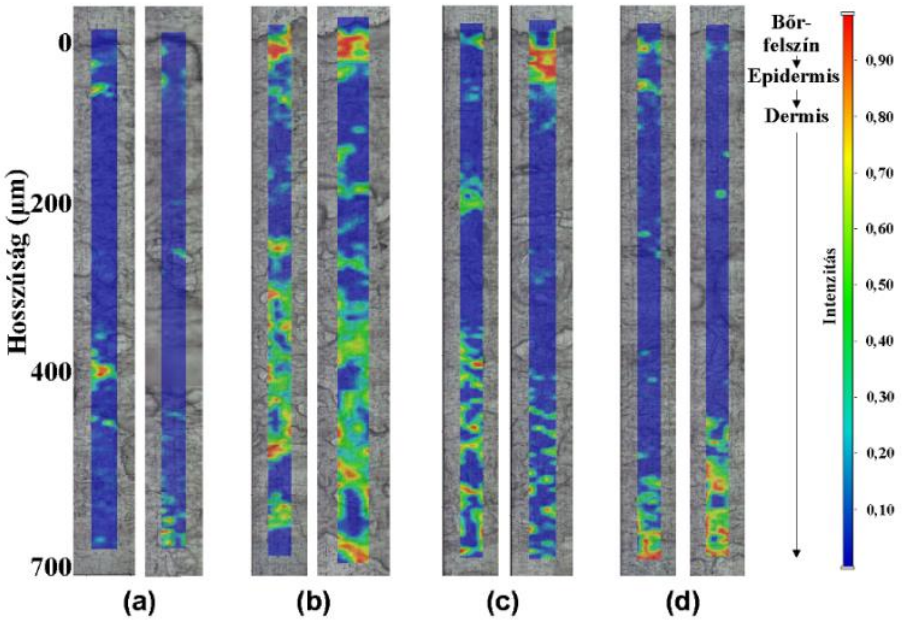
Munkám során meghatároztam az SCLL kalcein effluxon alapuló *in vitro* és az *ex vivo* penetrációs kísérletek eredményei közötti korrelációt. A korrelációs koefficiens értéke az 1 órás eredmények összehasonlításakor 0,915, míg a 2 óra után 0,954 volt (4. ábra). Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a stratum corneum lipideket tartalmazó liposzómák alkalmas modellek lehetnek a kémiai penetrációfokozó anyagok hatásának vizsgálatára.



4. ábra. Összefüggés a kalcein efflux növekedése és a koffein penetrálódott mennyiségének változása között 1 és 2 óra elteltével, a vak készítményekhez viszonyítva.

4.2. Betulinsav tartalmú készítmény bőpenetrációjának vizsgálata

A betulinsav tartalmú kenőcs elektroporációval kombinált penetrációjának vizsgálatára *ex vivo* Raman térképezést alkalmaztam. Az 5. ábrán a betulinsav (betulinic acid = BA) bőrben való eloszlása látható a különböző kezelési protokollokat követően. A hagyományos, EP nélküli kezelést követően a hatóanyag penetrációja minimális mértékű volt, köszönhetően a bőr barrier funkciójának, amely gátat szab a hatóanyag penetrációjának. Az 1 perces, 900 V-os EP kezelést követően a betulinsav penetrációja jóval nagyobb mértékű volt és a hatóanyag a bőr teljes keresztmetszetében megtalálható volt. A 2 perces EP kezelést követően a betulinsav koncentrációja a mélyebb bőrrétegekben csökkent, a hatóanyag főleg az epidermális rétegekben volt jelen. A 6 perces EP kezelés után a hatóanyag eltűnt az epidermális rétegből, és a dermis mély rétegeiben jelent meg nagyobb koncentrációban.



5. ábra. A betulinsav bőrben való eloszlása különböző EP protokollokkal való kezelést követően. Hagyományos kezelés (a), 900 V 1 perces EP kezelés (b), 900 V 2 perces EP kezelés (c), 900 V 6 perces EP kezelés (d). A hatóanyag-tartalom szín kódolása: piros>sárga>zöld>kék.

4.3. Lidokain tartalmú készítmények tulajdonságainak és teljesítményének vizsgálata

4.3.1. Hordozórendszerek tulajdonságainak jellemzése

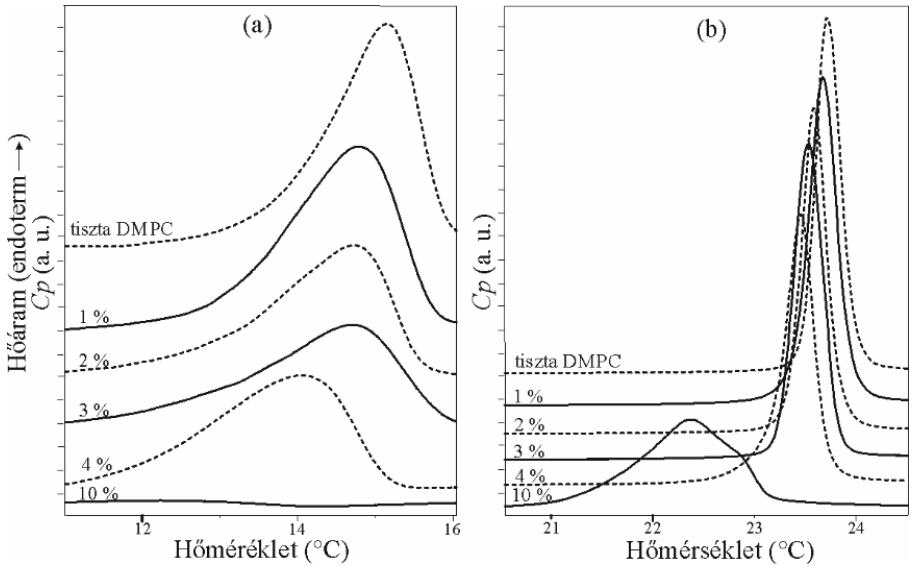
4.3.1.1. Liposzóma

4.3.1.1.1. Részecskeméret és zéta-potenciál vizsgálata

A 1-10 % lidokaint tartalmazó liposzómák részecskemérete 1844± 562,9 nm és 4842± 275,57 nm között változott. A részecskeméret és a diszperzió homogenitása a lidokain mennyiségének növelésével csökkent. A zéta-potenciál értékét a hatóanyag mennyiségének növelése nem befolyásolta, értéke 0 mV körüli volt.

4.3.1.1.2. DSC

A lidokain koncentráció növelésének hatását a liposzóma membránjának rendezettségére DSC segítségével vizsgáltam. A liposzóma membránját felépítő DMPC termogramján egy jellegzetes, fő fázisátmenetre jellemző csúcs jelenik meg, amely a lidokain koncentrációjának növelésével egyre szélesedik és alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódik el (6. ábra). A csúcs eltolódása a lipid membrán rendezettségének megbomlását jelzi.



6. ábra. A lidokain tartalmú liposzómák DSC görbéi a pre-tranzciós (a) és a fő fázisátmenetre (b) jellemző csúcsokkal.

4.3.1.1.3. Bezárási hatékonyság

A liposzómákba bezárt lidokain mennyiségét három különböző módszer segítségével határoztam meg (1. táblázat). Az indirekt módszerrel kapott eredmények jóval magasabbak voltak és nagy szórás jellemezte őket, amely a módszer pontatlanságára, kísérleti hiba jelenlétére utal. A direkt módszer és a DSC görbék alapján számolt bezárási hatékonyság értékek azonban nagyságrendileg megegyeztek, korreláltak egymással és lényegesen kisebb szórással rendelkeztek.

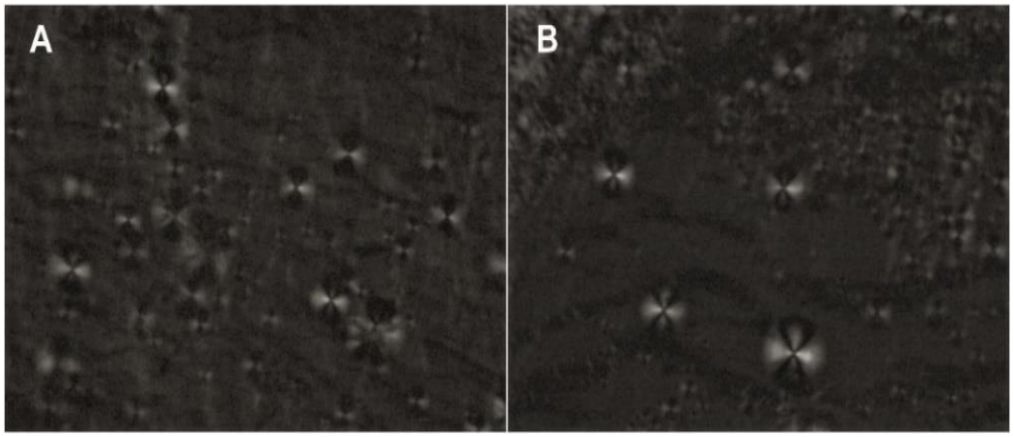
1. táblázat. Bezárási hatékonyság

Lidokain koncentráció (m/m %)	Indirekt módszer	Direkt módszer	DSC
	Bezárási hatékonyság %± SD	Bezárási hatékonyság %± SD	Bezárási hatékonyság %
1	29,0% ± 9,3	10,1% ± 4,2*	6,6%*
2	32,2% ± 7,4	5,6% ± 1,9***	6,4%**
3	32,0% ± 10,3	4,4% ± 1,8**	6,1%**
4	22,4% ± 14,1	3,9% ± 2,6	5,4%
10	9,4% ± 15,4	3,5% ± 3,2	13,0%

4.3.1.2. LLC

4.3.1.2.1. Polarizációs mikroszkóp

A 7. ábrán a LLC mintáról polarizációs mikroszkóppal készített kép látható, amelyen jól kitűnnek a lamelláris szerkezetű folyadékkristályokra jellemző „máltai-keresztek”.



7. ábra. Polarizációs mikroszkóp alatt készült képek a hatóanyagmentes (A) és lidokain tartalmú (B) LLC rendszerekről.

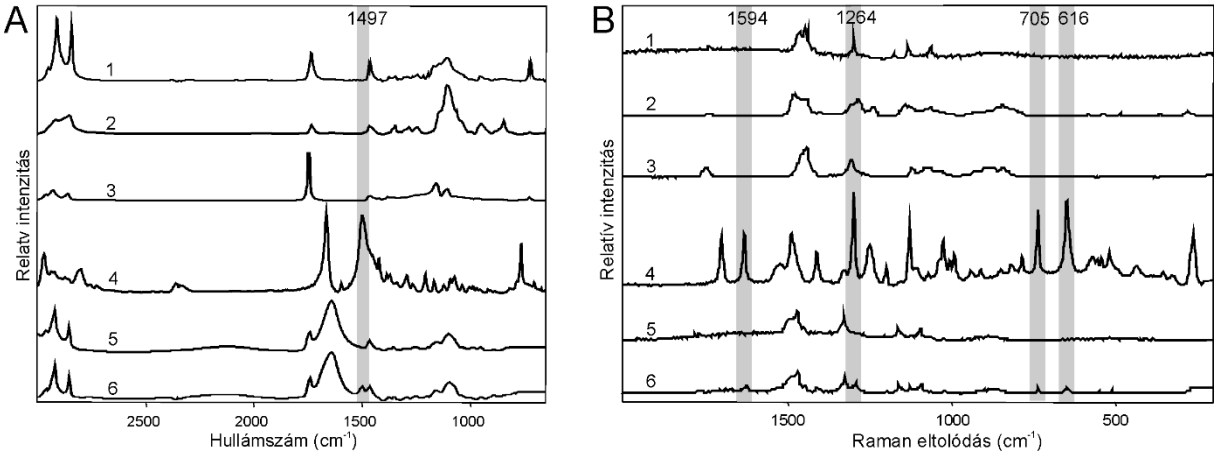
4.3.1.3. NLC

4.3.1.3.1. Részecskeméret és zéta-potenciál meghatározása

A lidokaint tartalmazó NLC részecskemérete 87,61±0,55 nm volt, és PDI értéke 0,1615±0,01, amely a részecskék monodiszperz eloszlására utal (PDI<0,30), és a rendszer kielégítő stabilitására enged következtetni. A zéta-potenciál értéke -11,983±0,31 mV volt.

4.3.1.3.2. A lidokain hordozórendszerrel való kölcsönhatásának vizsgálata

A lidokain és az NLC komponensek kölcsönhatásának vizsgálatát FT-IR és Raman spektroszkópia segítségével vizsgáltam. Az NLC spektrumában mind a hatóanyag, mind a segédanyagok karakterisztikus vegyértékrezgéseire jellemző csúcsok eltolódás nélkül megjelentek (8. ábra). Ezek alapján megállapítható, hogy a hatóanyag és az összetevők között nem alakult ki kémiai kölcsönhatás, amely a lidokain hordozóból való felszabadulását gátolná.



8. ábra. Az NLC komponensek és a készítmény FT-IR (A) és Raman (B) spektruma.
Jelmagyarázat: Apifil(1), Kolliphor RH60(2), Mygliol 812N(3), Lidokain(4), Hatóanyagmentes NLC(5), Lidokain NLC(6)

4.3.2. QbD módszer alkalmazása dermális helyi érzéstelenítő készítmények összehasonlítására

4.3.2.1. Dermális lokál anesztetikus készítményekre jellemző QTPP és CQA paraméterek definiálása

A készítmény hatásosságának igazolására alkalmas vizsgálatok kiválasztásához a „Quality by Design" módszer elemeit alkalmaztam. Első lépésként meghatároztam a céltermék kívánt tulajdonságait (Quality Target Product Profile, QTPP). A dermális félszilárd lokál anesztetikus készítmények esetén ezen jellemzők a következők: terápiás indikáció, beviteli kapu, hatás helye, gyógyszerforma, hatóanyag-felszabadulási profil, stabilitás, hatáserősség.

A céltermék kívánt tulajdonságait figyelembe véve meghatároztam azokat a jellemzőket, amelyek jelentős hatást gyakorolnak a termék hatásosságára és biztonságosságára (Critical Quality Attributes, CQAs): fizikai jellemzők (szín, szag, megjelenés), hatóanyag oldékonysága a készítményben, hatóanyag eloszlása a készítményben, *in vitro* hatóanyag-felszabadulás, *ex vivo* hatóanyag-penetráció, bőrhidratáló hatás, transzepidermális vízvesztés (TEWL), viszkozitás, hordozórendszer típusa.

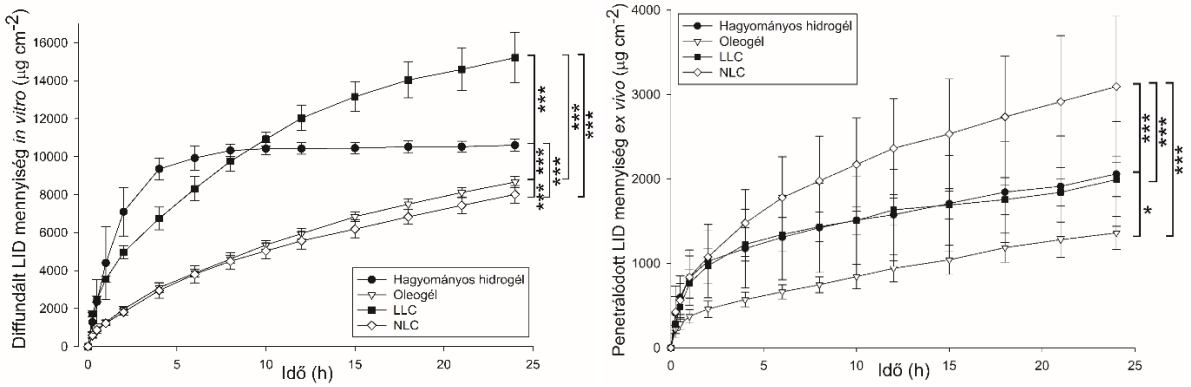
4.3.2.2. Kezdeti kockázatbecslés

Ezután kockázatbecslést (Risk Assesment, RA) végeztem, melynek során rangsoroltam a készítmények hatásosságának bizonyítására alkalmas vizsgálatokat. A kockázatbecslés eredményei alapján a legnagyobb súlyossági pontszámot (>300) elért vizsgálatokat végeztem el a lidokain tartalmú készítmények teljesítményének összehasonlítására: *in vitro* és *ex vivo* hatóanyag-felszabadulás, készítmény típusa, hidratáló hatás és TEWL-re való hatás.

4.3.2.3. *In vitro* diffúzió és *ex vivo* penetráció vizsgálata

A 9. ábrán a különböző hordozórendszerekből felszabadult lidokain mennyisége látható az idő függvényében ábrázolva. *In vitro,* az LLC-ből történő hatóanyag felszabadulás volt a legnagyobb mértékű. A hagyományos hidrogélből ugyan gyorsan megkezdődött a hatóanyag liberációja, de 24 óra elteltével mégsem volt teljes. Az oleogél és az NLC nyújtott hatóanyag-felszabadulást biztosítottak.

Az *ex vivo* kísérletek során az oleogélből penetrálódott a legkevesebb hatóanyag, a hidrogél és a LCC közel azonos mértékű hatóanyag-penetrációt eredményezett. Az epidermisen keresztül az NLC-ből történő lidokain penetráció volt a legnagyobb mértékű, meglepően, hiszen az *in vitro* hatóanyag felszabadulás vizsgálata során a hatóanyag kis százaléka szabadult fel belőle. Az *ex vivo* kísérletek során tapasztalt jó bőrpenetráció magyarázata az NLC speciális szerkezete lehet, amely magas biohasznosulást eredményez.



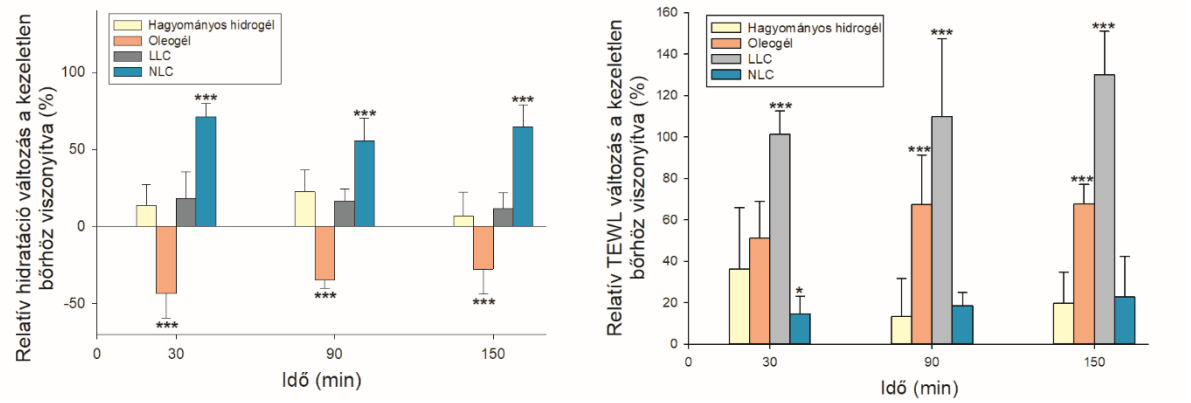
(A) **(B)**

9. ábra. A lidokain (LID) *in vitro* (A) és *ex vivo* (B) permeációja különböző hordozórendszerekből. (p< 0,05*, p<0,01** és p < 0,001***)

4.3.2.4. Bőrhidratáció és TEWL mérések

A bőrhidratációra gyakorolt hatás vizsgálata során a LLC és a hidrogél is növelte a hidratációt 30 perc után, azonban ez a hatás 150 perc után csökkent. Az oleogél jelentős mértékben csökkentette a bőrhidratációt. Az NLC pozitív hatással volt a hidratáltságra és nagymértékben növelte azt, és ez a hatás hosszabb távon is fennmaradt (10/A. ábra).

A TEWL mérések során az NLC okozta a legkisebb mértékű növekedést, tehát ez okozta a barrier funkció legkisebb mértékű károsodását. Mindhárom másik hordozórendszer jelentős TEWL növekedést eredményezett, különösen a LLC (10/B. ábra).



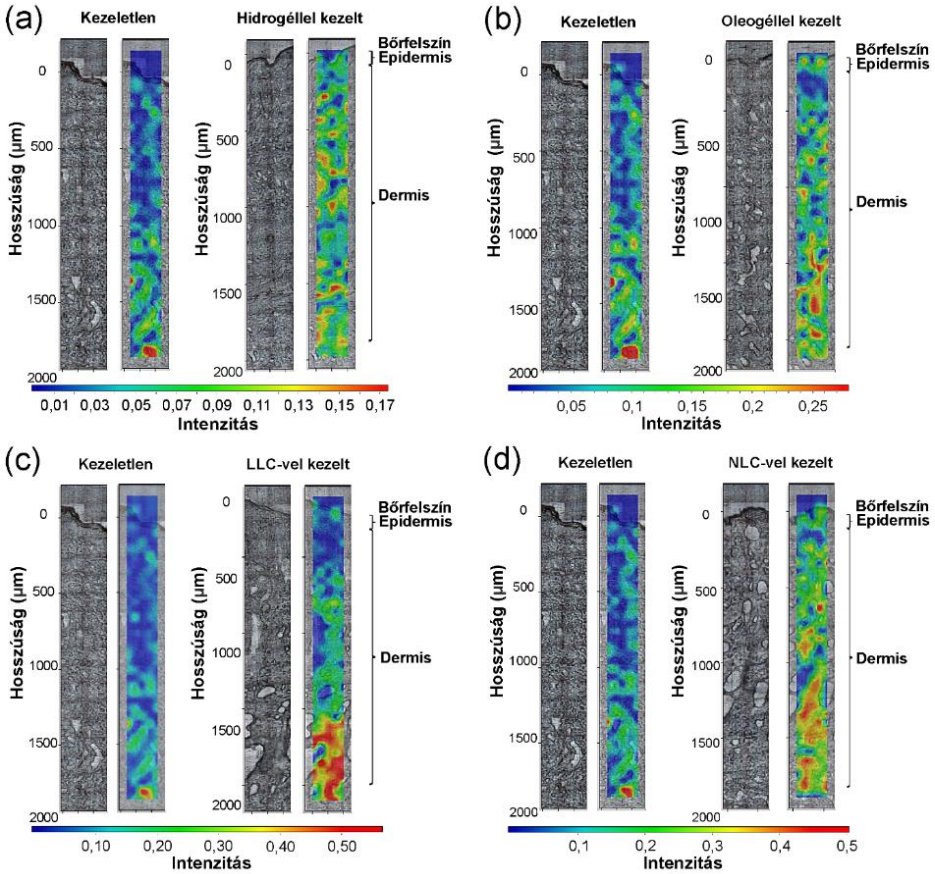
(A) **(B)**

10. ábra. Változás a bőrhidratáció (A) és a TEWL (B) értékében a hordozórendszerekkel való kezelés hatására. Az értékek a kezeletlen bőrhöz viszonyítva kerültek megadásra, százalékos formában. (p< 0,05*, p<0,01** és p < 0,001*** vs. hagyományos hidrogél)

4.3.3. A lidokain tartalmú készítmények bőrpenetrációjának nyomon követése Raman térképezéssel *ex vivo*

A 11.ábrán a lidokain bőrben való eloszlása látható a különböző hordozórendszerekkel való kezelés után. A hidrogéllel és oleogéllel való kezelést követően, a lidokain bőrben való eloszlása egyenletes az epidermális és dermális rétegekben, azonban a hatóanyag csak kisebb intenzitással jelenik meg. A nanostruktúrált LLC és NLC esetén a lidokain jóval nagyobb

koncentrációban található meg a bőrben, különös tekintettel a mélyebb bőrrétegekre, ahol a hatóanyag kifejti hatását.



11. ábra. A lidokain bőrben való eloszlása hidrogéllel (a), oleogéllel (b), LLC-vel (c) és NLC-vel (d) való kezelés után 6 órával. A Raman térképezést kezeltlen bőrön is elvégeztem kontrollként. A hatóanyag-tartalom szín kódolása: piros>sárga>zöld>kék.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ph.D. munkám célja volt, az aktív és passzív penetrációfokozó módszerek hatásának megismerése melanoma-ellenes és helyi érzéstelenítő hatású készítmények bőrpenetrációjának vizsgálatán keresztül.

1. Munkám első részében stratum corneum lipidekből felépülő liposzómák alkalmazhatóságát vizsgáltam kémiai penetrációfokozók (Kolliphor RH40 és Transcutol) bőrön való hatásának *in vitro* modellezésére. A kísérleti eredményeim újdonsága az alábbiakban foglalható össze:
   - igazoltam a Kolliphor RH40 és a Transcutol penetrációfokozó hatásának koncentráció függését;
   - meghatároztam a vizsgált penetrációfokozók kettős lipid réteget megbontó mechanizmusát;

- korrelációt állítottam fel az *in vitro* efflux és *ex vivo* penetrációs eredmények között, mellyel igazoltam a liposzómák bőrmodellként való alkalmazhatóságát.

2. Ph.D. munkám második részében betulinsav tartalmú topikális készítmény penetrációját vizsgáltam az elektroporáció, mint aktív penetrációfokozó módszer hatására. Eredményeim alapján megállapítható, hogy:

- a betulinsav bőrpenetrációjának mértéke jelentősen javítható az elektroporáció alkalmazásával;
- az elektroporációs kezelési idő befolyásolja a hatóanyag penetráció mértékét, mivel a különböző kezelési idők más hatóanyag eloszlást eredményeztek a bőrben;
- 6 perces elektroporációs kezelést követően a betulinsav jelentős mennyisége a bőr mélyen fekvő rétegébe penetrálódott;
- a betulinsav tartalmú készítmény és az elektroporációs kezelés kombinációja ígéretes terápiás lehetőséget nyújthat a melanoma nem invazív kezelésére.

3. Munkám harmadik részében különböző lidokain tartalmú készítményeket hasonlítottam össze *in vitro, ex vivo* és *in vivo* módszerekkel. A QbD módszer elemeinek alkalmazásával feltártam azon vizsgálatokat, amelyek a készítmények összehasonlítására leginkább alkalmasak és elvégzésük szükséges. Munkámat összegezve megállapítható:

- meghatároztam a dermális félszilárd lokál anesztetikus készítményekre vonatkozó céltermék profilt (QTTP) és kritikus minőségi jellemzőket (CQAs), majd kockázatbecslés segítségével azonosítottam azokat a jellemzőket, amelyek a legnagyobb befolyással bírnak a termék minőségére, így azokat vizsgálni szükséges;
- a lidokain só és bázis formáját két hagyományos (hidrogél, oleogél) és három modern (liposzóma, LLC, NLC) hordozórendszerbe inkorporáltam;
- a lidokain tartalmú liposzómák bezárási hatékonyságának vizsgálata során a DSC módszer újfajta alkalmazási lehetőségét mutattam be;
- eredményeim alapján az általam formulált rendszerek közül a NLC a legalkalmasabb a lidokain dermális bevitelére, mivel a hatóanyag penetráció ebből a készítményből volt a legnagyobb mértékű, továbbá az NLC növelte a bőr hidratáltságát, és csak kis mértékben volt hatással a TEWL-re;
- Raman térképezést alkalmaztam a lidokain bőrben való elhelyezkedésének vizuális megjelenítésére.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

I. **Bakonyi Mónika**, Berkó Szilvia, Budai-Szűcs Mária, Kovács Anita, Spaits Tamás, Samu Gyöngyi, Csányi Erzsébet: *In vitro* bőrmodellek, mint a hatékony gyógyszerformulálás eszközei.

Acta Pharmaceutica Hungarica 87 3-12 (2017)

IF:-

II. **Mónika Bakonyi**, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Anita Kovács, Erzsébet Csányi: DSC for evaluating the encapsulation efficiency of lidocaine- loaded liposomes compared to the ultracentrifugation method.

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 130 (3) *1619-1625 (2017)*

IF:1,953 (2016)
Citations: 1

III. **Mónika Bakonyi**, Szilvia Berkó, Anita Kovács, Mária Budai-Szűcs, Nikolett Kis, Gábor Erős, Ildikó Csóka, Erzsébet Csányi: Application of Quality by Design principles in the development and evaluation of semisolid drug carrier systems for the transdermal delivery of lidocaine.

Journal of Drug Delivery Science and Technology 44 136-145 (2018)

IF: 1,194 (2016)

IV. **Mónika Bakonyi**, Attila Gácsi, Anita Kovács, Mária Budai-Szűcs, Szilvia Berkó,Erzsébet Csányi: Following-up skin penetration of lidocaine from different vehicles by Raman spectroscopic mapping.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 154 1-6 (2018)

IF: 3,255 (2016)

V. **Mónika Bako**nyi, Szilvia Berkó, Gábor Erős, Gábor Varjú, Christina Dehelean, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi: A review of electroporation-based antitumor skin therapies and investigation of betulinic acid-loaded ointment.

Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry (accepted for publication) doi:10.2174/1871520617666171113120255 (2017)

IF: 2,598 (2016)

VI. Petra Hartmann, Edina Butt, Ágnes Fehér, Ágnes Lilla Szilágyi, Kurszán Dávid Jász, Boglárka Balázs, **Mónika Bakonyi**, Szilvia Berkó, Gábor Erős, Mihály Boros, Gyöngyi Horváth, Endre Varga, Erzsébet Csányi: Electroporation-enhanced transdermal diclofenac sodium delivery into the knee joint in a rat model of acute arthritis. *Drug Design, Development and Therapy* (*accepted for publication*)

IF: 2,822 (2016)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

I. Boglárka Balázs, **Mónika Bakonyi**, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi: Non-invasive *in vivo* comparison of penetration enhancers containing hydrogel formulations. *1st European Conference on Pharmaceutics: Drug delivery.* Reims, France, 13-14. 04. 2015 (poster*)*

II. Berkó Szilvia, **Bakonyi Mónika**, Csányi Erzsébet: Bőrön keresztüli hatóanyagbevitel elektroporáció segítségével. *Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium,* Herceghalom, Magyarország, 15-16. 09. 2016 (verbal presentation)

III. Kovács Anita, Berkó Szilvia, **Bakonyi Mónika,** Kőrösi Zita, Csányi Erzsébet: Dermálisan alkalmazott kozmetikai készítmények fejlesztése és vizsgálata. *Kozmetikai Szimpózium,* Budapest, Magyarország, 17. 11. 2016 (verbal presentation)

IV. **Mónika Bakonyi**, Szilvia Berkó, Erzsébet Csányi: Investigation of lidocaine base liposomes for transdermal delivery. *7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences*. Balatonfüred, Magyarország, 5-7. 10. 2017, *Acta Pharmaceutica Hungarica 87 (043) (2017) (*poster)

V. **Mónika Bakonyi**, Szilvia Berkó, Erzsébet Csányi: Investigation of lidocaine-containing NLC systems for dermal application. *15th Annual European Pharma Congress*. Frankfurt, Németország, 7-9.05.2018, *Pharmaceutical Regulatory Affairs: Open Access 7 (2018) (*poster)