Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti intézet
Gyógyszerésztudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Ph.D. értekezés tézisei

A SZEMÉSZETI HATÓANYAGOK BIOHASZNOSÍTHATÓSÁGÁNAK NÖVELÉSE INNOVATÍV GYÓGYSZERHORDOZÓ RENDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL

L.Kiss Eszter

Témavezetők:
Dr. habil. Csányi Erzsébet Ph.D.
Dr. habil. Budai-Szűcs Mária Ph.D.

SZEGED
2021

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Ph.D program
Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Témavezető:
Dr. habil. Csányi Erzsébet
Dr. habil. Budai-Szűcs Mária

L.Kiss Eszter

A szemészeti hatóanyagok biohasznosíthatóságának növelése innovatív gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazásával

Szigorlati Bizottság:

Elnök:	Prof. Dr. Szabó-Révész Piroska DSc, Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Tagok:	Dr. habil. Bácskay Ildikó, Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai Tanszék
	Dr. habil. Aigner Zoltán, Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bírálói bizottság:

Elnök:	Prof. dr. Szakonyi Zsolt, DSc., Gyógyszerkémiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem
Opponensek	Dr. habil. Tóth-Molnár Edit, PhD., Szemészeti Klinika, Szegedi Tudományegyetem
	Dr. Fehér Pálma, PhD., Gyógyszertechnológiai Tanszék, Debreceni Egyetem
Tagok:	Dr. habil. Ducza Eszter, PhD., Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet, Szegedi Tudományegyetem
	Dr. habil. Vasas Andrea, PhD., Farmakognóziai Intézet, Szegedi Tudományegyetem

SZEGED
2021

1. BEVEZETÉS

Globálisan egyre nagyobb igény mutatkozik új nem invazív szemészeti kezelések, készítmények kifejlesztésére, mivel számos kevéssé ismert, esetenként gyógyíthatatlan, látást veszélyeztető betegség létezik. A leggyakoribb szemészeti betegségek közé soroljuk a glaukómát, a különböző fertőzéseket, a száraz szem szindrómát, a szemallergiát, a szaruhártya neovaszkularizációját, a szaruhártya erózióját, a gyulladásos megbetegedéseket és a makula degenerációt. A jelenlegi kezelések többsége főként a hagyományos szemészeti gyógyszerformákra, hatóanyagokra korlátozódik, és sok esetben a kezelés csak a betegség tüneteit érinti, a kiváltó okot nem. A fejlett szemészeti gyógyszeres terápiák napjainkban nem csupán a különféle szembetegségek kezelését célozzák meg, hanem a szem egészséges állapotának megőrzését is, mindemellett könnyű alkalmazást tesznek lehetővé, növelve ezzel a betegek együttműködését is. A lokális szemészeti kezeléseket tekintik a legbiztonságosabb és legkevésbé invazív terápiáknak, mindemellett a betegek számára is könnyen alkalmazhatók. Alacsony biohasznosulásuk miatt azonban nagy szükség van további fejlesztésekre. Számos olyan anatómiaifaktor ismert a szemben, amely akadályozza a hatóanyag sikeres és hatékony célba juttatását. Egy sikeres lokális szemészeti terápia megvalósításakor olyan kihíváskkal szembesül a fejlesztő, mint a szem anatómiai összetettsége és biofarmáciája, a betegek igényei, elvárásai (pl a gyakori alkalmazás elkerülése), következésképpen ezeket a szempontokat mindenképpen figyelembe kell venni egy új szemészeti gyógyszerhordozó rendszer kidolgozása során.

A legújabb technológiai fejlesztések három fő stratégia mentén valósítják meg a fent említett célokat:a a készítmény szemen tartózkodási idejének megnövelése; a a hatóanyag olyan formában történő inkorporálása a hordozóban, ami alkalmassá teszi a penetrációra , a hatóanyag penetráiójának javítása. PhD-munkám során az innovatív szemészeti rendszerek fejlesztése ezen irányvonalak mentén történt.

2. CÉLKITŰZÉS

PhD-munkám során lokálisan alkalmazott szemészeti készítmények biohasznosulásának növelése volt a cél két fő irány mentén.

Doktori munkám első részében arra törekedtem, hogy ciklodextrinek alkalmazásával megnöveljem az oldékonyságát a prednizolonnak (PR), majd ezt kombinálva egy *in situ* gélesedő, mukoadhezív polimerrel (tiolált poli-aszparaginsav) növeljem a hatóanyag biohasznosulását. A ciklodextrinnel módosított polimer feltételezhetően magában hordozza *in situ* gélesedés és az erős mukoadhezív tulajdonság előnyeit, amelyet az alap mukoadhezív polimer tulajdonságok biztosítanak, valamint a ciklodextrinek prednizolon (PR) hatóanyag esetében mutatott oldékonyságnövelő hatását. Ebben az esetben a kovalens kötésű hatóanyag-ciklodextrin komplex várhatóan nem tud a gélmátrixból kidiffundálni, így nem mosódik ki a könnyezéssel a szem felszínére tapadó gélből, ezáltal megnőhet a hatóanyag szemen tartózkodási ideje és a komplexnek köszönhetően az oldékonysága.

PhD-munkám második része két fő szakaszra bontható. Az első szakaszban a dexametazon (DXM) biohasznosíthatóságának javítása volt a cél a lipidekben történő oldás és a nanostruktúrált lipid hordozóba (NLC) történő beépítés révén. A második részben az volt a cél, hogy mukoadhezív polimer segítségével megnöveljük nanokészítményeink szemen tartózkodási idejét. Amfifil mukoadhezív polimert alkalmazva egy határfelületi feldúsulás várható, amely egy mukoadhezív gélréteg képződését eredményezhet a nanorészecskék körül, így ez a nanohordozó körüli gélréteg biztosíthatja a nanorészecskék tapadását a nyálkahártya felületéhez.

3. ANGYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Anyagok

3.1.1. In situ gélképző rendszerek anyagai

L-aszparaginsavat, ciszteamint, dibutil-amint, ditiotreitolt, N, N-dimetil-formamidot, nátrium-bromátot, 6-monodeoxi-6-monoamino-béta-ciklodextrin-hidrokloridot (MABCD) és mucint (sertés gyomor-mucin II. típus) használtunk a formulációkban.

A szintetizált tiolált poli-aszparaginsav (PASP-CEA) tiol oldalláncokat tartalmaz, és az oxidálószer jelenlétében a PASP-CEA reverzibilisen térhálósodik a diszulfidkötéseknek köszönhetően. A ciklodextrinnel módosított tiolált poliaszparaginsav (PASP-CEA-CD) képes a ciklodextrinnek köszönhetően zárványkomplexeket képezni szteroid gyulladáscsökkentőkkel. A tiolált poli-aszparaginsav polimereket a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Lágy Anyagok Kutatócsoportja szintetizálta.

Az alkalmazott hatóanyag a prednizolon (PR) volt.

3.1.2. Anyagok az NLC rendszserekhez

A nanohordozókhoz Compritol 888ATO (glicerin-dibehenát), Apifil (PEG-8 méhviasz) Labrasol (kaprilokaproil-polioxil-8-gliceridek), Miglyol 812N (kaprikus triglicerid), Kolliphor EL (Polyoxyl 35 hidrogénezett ricinusolaj) és Cremophor RH60 (PEG-60) ,Tween 20-at (Polysorbate 20), hipromellózt (Methocel F4M, HPMC) használtunk. A hatóanyag dexametazon volt.

3.2. Módszerek a tiolált polimerek vizsgálatára

3.2.1. Preformulációs vizsgálatok

A preformulációs vizsgálatok során a PASP-CEA és PASP-CEA-CD vizes oldatoknak (10 w/v%) az ozmolalitását, a törésmutató és a pH-értékét mértük automata ozmométerrel, refraktométerrel és pH-mérővel.

3.2.2. Porröntgendiffrakciós vizsgálata a ciklodextrin-prednizolon komplexeknek

A zárványkomplexeket röntgen diffraktométerrel (XRPD) vizsgáltuk. A vizsgált minták PR, PASP-CEA-CD por, valamint az MABCD-PR (2,5 w/w% MABCD, 0,4 w/w% PR) és a PASP-CEA-CD – PR (10,2 w/v% PASP-CEA-CD, 0,15 w/v% PR) oldat liofilizátumai voltak. A minta előkészítése után a készítményeket liofileztük.

3.2.3. Reológiai vizsgálatok

A gélesedést oszcillációs reológiai módszerrel vizsgáltuk. A szem oxidációs körülményeit nátrium-bromát oldattal szimuláltuk. A gélesedési mérések során a polimer oldatokat (10 w/w %) 1 M oxidálószerrel (20 w/w %) elegyítettük a reométerben, és a mérést azonnal megkezdtük.

A mukoadhézió vizsgálatához a polimert feloldottuk PBS-ben, majd összekevertük a mucin diszperzióval (5 w/w %). Ezt követően adtuk hozzá az oxidálószert. A mukoadhezivitást reológiai szinergizmussal jellemeztük.

3.2.4. Hatóanyagdiffúziós vizsgálatok

A PR diffúzióját a gélekből vertikális Franz diffúziós cellával vizsgáltuk. A donorfázis 10 w/w% polimert (PASP-CEA vagy PASP-CEA-CD), 0,1 w/w% PR és 20 w/w% oxidálószert tartalmazó készítmény volt. A gélesedés az oxidálószer hozzáadása után *in situ* történt. Diffúziós membránként Porafilm membránt használtunk (pórusmérete 0,45 μm). Az akceptor fázis 35 ° C-on termosztált PBS (pH = 7,4) volt. A diffundált PR mennyiségét UV-VIS spektrofotométerrel határoztuk meg 247 nm hullámhossznál.

3.3. Módszerek az NLC rendszerek vizsgálatára

3.3.1. NLC rendszerek készítése

Az NLC mintákat (1. táblázat) ultrahangos módszerrel állítottuk elő. A lipideket (Compritol 888 ATO és Miglyol 812N 7: 3 arányban) és a felületaktív anyagot (Cremophor RH40) fűthető mágneses keverővel 85 ° C-on megolvasztottuk. Ezt követően a DXM-t és a polimert (Methocel F4M) hozzáadtuk az olvasztott keverékhez, és 85 °C hőmérsékleten kevertük. A tiszta vizet 85 °C-ra melegítettük, és a két fázist összekevertük, ultrahanggal kezeltük és jeges fürdőben lehűtöttük.

Táblázat 1. *Az NLC összetételek.*

		Lipid koncentráció (w/w%)	**DXM koncentráció (w/w%)**	**Emulgens koncentráció (w/w%)**	**Polimer koncentráció (w/w%)**
Alap NLC összetételek (Faktoriális terv 1)	NLC1	10	0.05	2.5	-
	NLC2	15	0.05	2.5	-
	NLC3	10	0.10	2.5	-
	NLC4	15	0.10	2.5	-
	NLC5	10	0.05	5.0	-
	NLC6	15	0.05	5.0	-
	NLC7	10	0.10	5.0	-
	NLC8	15	0.10	5.0	-
Mukoadhezív NLC összetételek (Faktoriális terv 2)	NLC9	10	0.05	2.5	0.05
	NLC10	10	0.05	2.5	0.10
	NLC11	10	0.05	5.0	0.05
	NLC12	10	0.05	5.0	0.10
	NLC13	10	0.10	2.5	0.05
	NLC14	10	0.10	2.5	0.10
	NLC15	10	0.10	5.0	0.05
	NLC16	10	0.10	5.0	0.10

3.3.2. A lipid keverékek röntgendiffrakciós vizsgálata

A liofilizált lipidkészítményben vizsgáltuk a DXM szilárd formáját (kristályos, amorf, molekuláris diszperz) porröntgen (XRPD) készülékkel.

3.3.3. A lipidek kristályosságának vizsgálata DSC-vel

A hatóanyagmentes és DXM-t tartalmazó lipidkeverékek kristályossági indexét DSC-vel vizsgáltuk.

3.3.4. Szemcseméret, Zéta potenciál vizsgálat

Az NLC-k hidrodinamikai átmérőjét (Z_{ave}), zétapotenciálját (ZP) és polidiszperzitási indexét (PI) a Zetasizer Nano ZS műszerrel vizsgáltuk 25 ° C-on.

Az NLC-k (1. táblázat) részecskeméretét és részecskeméret-eloszlását is elemeztük lézerdiffrakciós módszerrel. Az értékeléshez a d (0,1), d (0,5) és d (0,9) értékeket használtuk.

3.3.5. Bezárási hatékonyság vizsgálat

Az NLC-k bezárási hatékonyságát (EE%) közvetett módszerrel határoztuk meg. Az NLC-k vizes fázisát centrifugálással választottuk el. A szűrt oldat DXM-tartalmát HPLC-vel vizsgáltuk, 1,7 µm, 100 Å, 100 x 2,1 mm méretű C18 fordított fázisú oszlopot alkalmaztunk. A mozgófázis víz: acetonitril 75:25 volt, izokratikus elúcióban, a detektálást 240 nm-en végeztük. Az injektált térfogat 5 µl, az áramlási sebesség pedig 0,5 ml/perc volt. A következő egyenletet használtuk az EE% kiszámításához:

$$EE\ \% = \frac{m_{kiindulási\ hatóanyag} - m_{szabad\ hatóanyag}}{m_{kiindulási\ hatóanyag}} \times 100 \qquad (1)$$

3.3.6. In vitro hatóanyag diffúziós vizsgálat

A faktoriális kísérlettervezés eredményei alapján választottuk ki diffúziós vizsgálatra a vizsgálandó NLC rendszereket. Az *in vitro* hatóanyag diffúzió vizsgálatához dialízis zsák módszert alkalmaztuk. A minta mennyisége 200 µl volt. Az akceptor fázis 20 ml foszfát puffer (PBS) volt. Összehasonlító készítményként DXM szuszpenziót alkalmaztunk. A DXM diffundált mennyiségeit HPLC-vel elemeztük.

3.3.7. Humán HCE-T szaruhártya epitél sejtvonal

Rekombináns SV40-adenovírus vektorral transfektálással immortalizált human szaruhártya sejteket használtunk. A sejteket a permeabilitási vizsgálatokhoz használt sejtkultúrás lapok betétjein növesztettük.

3.3.8. Sejt életképességi vizsgálatok

Valós idejű impedancia mérést alkalmaztunk a barrierképző sejtek károsodásának és/vagy védelmének követésére. A vizsgált minták Cremophor RH60, NLC3, NLC7, NLC9, NLC10, NLC11, NLC12 készítmények és HPMC oldat volt.

3.3.9. Immunhisztokémia

A HCE-T sejtekben bekövetkezett morfológiai változásokat immunfestéssel vizsgáltuk, a vizsgált fehérjék a zonula okludens protein-1, az okludin, a β-katenin és az E-kadherin voltak.

3.3.10. Faktoriális kísérletterv

A polimert tartalmazó NLC összetételek jellemzésére 2^3 teljes faktoriális kísérlettervet alkalmaztunk (2. egyenlet). A modell leírja a változók fő hatásait és kölcsönhatásait.

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{23}x_2x_3 + a_{13}x_1x_3 \quad (2)$$

ahol az a_0 a tengelymetszet, $a_{1,\,2,\,3}$ az illesztett polinom meredeksége. x_1, x_2, és x_3 megfelel az A, B and C tényezőknek.

3.3.11. Mukoadhezivitás vizsgálata

A polimeres és polimer nélküli készítmények mukoadhézivitását szerkezet analizáló készülékkel vizsgáltuk, szakító tesztet alkalmazva. A mukoadhézió erősségét az adhéziós munkával (A, mN.mm) jellemeztük.

3.3.12. Penetrációs vizsgálat PAMPA membránon keresztül

Az *in vitro* transzkorneális permeabilitás mérésére PAMPA módszert alkalmaztunk. Donorfázisként a fejlesztett NLC-ket és DXM szuszpenziót vizsgáltuk (150 µL). A donorlemezt a 300 µl PBS-oldatot (pH 7,4) tartalmazó akceptorlemezbe illesztettük. A lemezeket 4 órán át inkubáltuk 35 ° C-on. A gyógyszerek hatékony permeabilitását és membránretencióját a következő egyenlet felhasználásával számítottuk ki (3. egyenlet):

$$P_e = -\frac{2.303 \cdot V_A}{A(t - \tau_{SS})} \cdot \log\left[1 - \frac{c_A(t)}{S}\right] \quad (3)$$

ahol P_e az effektív permeabilitási együttható (cm s^{-1}), A a szűrő területe (0,24 cm^2), V_A az akceptor fázis térfogata (0,3 cm^3), t az inkubációs idő (s), τ_{SS} az egyensúlyi állapot(ok) eléréséhez szükséges idő, a C_A (t) a vegyület koncentrációja az akceptor fázisban a t időpontban (mol cm^{-3}), S a szabad DXM tartalom a donor fázisban.

3.3.13. Permeabilitás vizsgálata in vitro HCE-T sejtkultúrán

A barrier integritásának ellenőrzéséhez a transzepithelialis elektromos ellenállást (TEER) mértük. A sejtmentes inzertek TEER értékét kivontuk a mért adatokból. A sejteket akkor kezeltük, amikor a sejtréteg TEER értéke állandó volt.

A permeábilitás jellemzésére a látszólagos permeabilitási együtthatókat (P_{app}) számítottuk ki. A permeabilitási mérésekhez NLC5, NLC6, NLC7, NLC8 formulációkat alkalmaztuk.

3.3.14. Penetrációs vizsgálat ex vivo sertés szaruhártyán

Az *ex vivo* szaruhártya penetrációt Raman térképezéssel vizsgáltuk. A sertés szaruhártyáját 250 µl NLC mintával (NLC14 és az NLC14 polimermentes változata) csepegtettük 30 percenként, és a készítményt közvetlenül a következő csepegtetés előtt eltávolítottuk. A kezelés időtartama hat óra volt. A kezelt szaruhártyát lefagyasztottuk és metszeteket készítettünk. A kezeletlen sertés szaruhártyát használtuk referenciaként. Az értékelés során a Raman térkép profilozását a teljes NLC spektrum felhasználásával végeztük.

3.3.15. Statisztikai módszerek

A diffúziós vizsgálat eredményeit kétutas ANOVA és Bonferroni-féle post-hoc analízissel értékeltük. Az MTT és a sejt penetrációs vizsgálatok értékeit ANOVA, Dunett teszt vagy kétutas ANOVA és Bonferroni teszt segítségével értékeltük statisztikusan. Az értékeket átlag ± szórás (SD) formában fejeztük ki. A faktoriális kísérletterveket a Statistica for Windows 10-es verziójával értékeltük ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Tiolált polimerek vizsgálata

4.1.1. Preformulációs vizsgálat

4.1.1.1. A ciklodextrin-prednizolon komplexek porröntgendiffrakciós vizsgálata

A PR-ciklodextrin komplex képződését XRPD-vel vizsgáltuk. A PR, MABCD, PASP-CEA-CD, MABCD-PR és PASP-CEA-CD-PR difraktogramjait rögzítettük. A PR diffraktogramja kristályos szerkezetet mutatott (éles diffrakciós csúcsok). A PASP-CEA-CD és a MABCD esetében amorf mintázat figyelhető meg, a diffraktogramban nincs magas intenzív jellegzetes csúcs. Az zárványkomplex képződés esetében eltűnnek a PR jellegzetes csúcsai, a PASP-CEA-CD és az MABCD amorf szerkezete dominál. A PR kristályos csúcsainak hiánya bizonyította a zárványkomplexek kialakulását.

4.1.1.2. Ozmolalitás, pH és refraktív index vizsgálata

Összehasonlítottuk a PAS-CEA és a PASP-CEA-CD oldat fiziológiai jellemzőit a könnyfolyadékkal. A könnyfolyadék ozmolalitása normál szemnél 300-310 $mOsmL^{-1}$. Esetünkben egyik polimer oldat ozmolalitása sem volt mérhető az alkalmazott koncentrációnál ezzel a módszerrel, ami azt jelzi, hogy segédanyagok, például izotonizáló anyag hozzáadása szükséges. Bizonyos esetekben a szemészeti oldat hipoozmolitására van szükség, különösen a száraz szem szindróma kezelésében alkalmazott műkönnyekben.

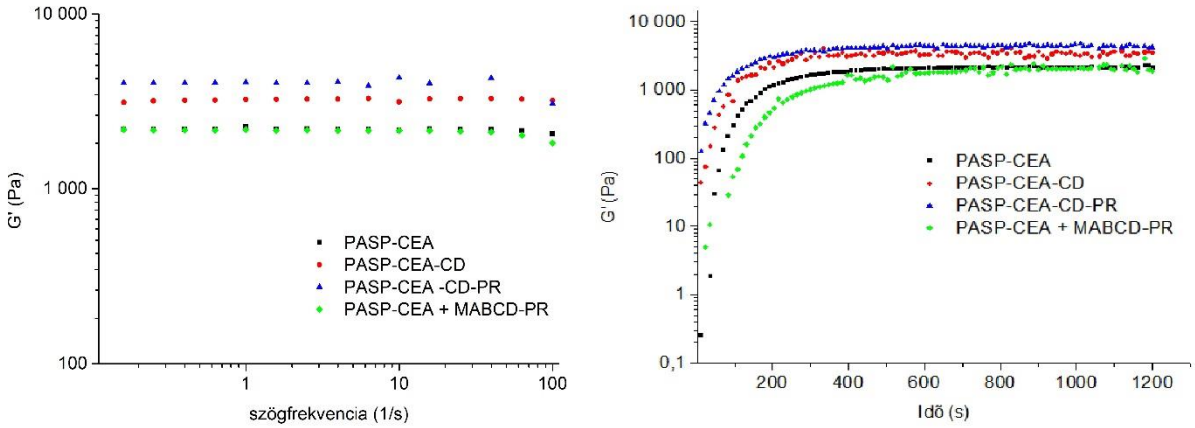
A polimer oldatok törésmutató értéke (PASP-CEA: 1,3494; PASP-CEA-CD: 1,3478) a könnyfilmhez hasonló volt (1,3370), ami arra utal, hogy a készítmény nem zavarja a beteg látását.

A 6 és 9 közötti pH-tartomány a szem számára tolerálható. A készítményeket pH=7,4-es PBS oldattal készítettük, amellyel a fiziológiás tartomány biztosítható volt.

4.1.2. Gélesedés és mukoadhezivitás vizsgálata

A gélesedési folyamatot, a gél szerkezetét és a módosított polimer mukoadhézióját reológiai módszerekkel vizsgáltuk. A gélesedési idő kritikus tényező egy *in situ* gélesedő

szemészeti készítmény esetében, vizsgálatainkban a PASP-CEA oldat egy igen kedvező, gyors szol-gél átmenetet mutatott oxidálószer jelenlétében (1.b ábra).



1. ábra *Gélesedés (a), és gélerősség (frekvencia söprés) vizsgálata különböző polimer oldatoknál (b).*

Az 1.b ábra azt mutatja, hogy a CD polimerhez kötése nem akadályozta a gélesedési folyamatot, és a gélszerkezet erőssége is megmaradt.

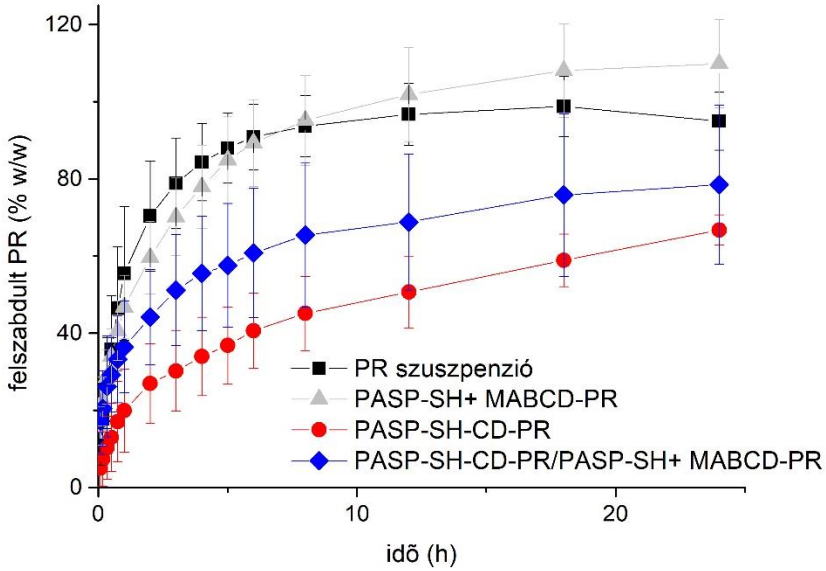
A mukoadhéziót a G' értékekből számított szinergista paraméter segítségével 1,0 1/s szögfrekvencián jellemeztük: a mérések alapján a PASP-CEA és a PASP-CEA-CD szinergista paraméterei 1370, illetve 1390 Pa voltak. A hasonló adatok hasonló mukoadhezivitást jelentenek, így következtetésként elmondható, hogy a polimer MABCD-vel történő módosítása nem változtatta meg a PASP-CEA polimerek mukoadhezív tulajdonságait.

4.1.3. Hatóanyag in vitro diffúziója a gélekből

A PR-CD komplex képződése javítja a PR oldhatóságát vizes közegben. A szabad komplexek diffúzibilisek a készítményben, és a PR molekulák komplexként át tudnak jutni a vizes mucin rétegén is, viszont könnyen kimosódhatnak a mátrixból és eliminálódnak az orr-könny vezetéken keresztül.

Munkám során a kötött és a szabad CD-t tartalmazó rendszereket hasonlítottam össze *in vitro* (2. ábra). A szabad MABCD-PR-t tartalmazó PASP-CEA készítmény felszabadulási profilja nagyon hasonló volt a PR-szuszpenzióhoz ($p > 0,05$). Ahol a MABCD kovalensen kapcsolódott a PASP-CEA-hoz, a komplex diffúziója akadályozott volt, mivel csak a szabad PR képes diffundálni, így a felszabadulás sebessége lassabb volt, és a CD-komplexből történő PR-disszociáció sebességétől vált függővé. A hatóanyag-leadás növelése érdekében a MABCD 50% -át szabad formában alkalmaztuk. Ebben az esetben a kötött és szabad MABCD közötti hatóanyag-felszabadulási profil figyelhető meg, amely azt jelzi, hogy a szabad és kötött

MABCD kombinációjával a hatóanyag-felszabadulási profil módosítható a két szélső profilon belül.



2. ábra *Hatóanyag diffúziója a gélekből.*

4.2. DXM tartalmú NLC-k vizsgálatai

4.2.1. NLC rendszerek preformulációs vizsgálata

4.2.1.1. Lipid kiválasztása

Az NLC-k szilárd lipidet, folyékony lipidet és felületaktív anyagot tartalmaznak vizes közegben. A lipidek kiválasztásánál 3 fő szempontot jelöltünk meg: az első olyan lipidkeverék megtalálása, amely képes feloldani a DXM szemészetben alkalmazott mennyiségét; a második kritikus tényező volt a kiválasztott lipidkeverék kristályossági foka, ami befolyásolhatja az NLC-k bezárási hatékonyságát; a harmadik kritikus tényező, hogy egy olyan határfelület kialakítására legyen alkalmas az emulgenssel, amely stabil nanorendszert eredményez.

4.2.1.2. A DXM oldhatóság vizuális megfigyelése

Az oldhatósági vizsgálat ezen részében a lipidek különböző kombinációit vizuálisan megfigyeltük: szilárd lipideket, folyékony lipidek önmagukban és keverékeikt felületaktív anyaggal és anélkül kerültek vizsgálatra. A két szilárd lipid (Compritol 888 ATO és Apifil) között nem volt különbség. A Miglyol és Labrasol összehasonlításának eredményei azt mutatták, hogy a Miglyol sokkal hatékonyabban oldotta fel a hatóanyagot. Szilárd lipid (Compritol 888 ATO), olajok (Miglyol, Labrasol) és felületaktív anyagok (Cremophor RH60, Kolliphor EL) keverékeit is vizsgáltuk. A DXM szinte minden esetben feloldódott, ahol az elegy Apifil-t, Miglyol-t, Cremophor RH60-t, Kolliphor EL-t tartalmazott.

4.2.1.3.A lipid keverékek vizsgálata XRPD-vel

Az a tény, hogy a kristályos DXM jellegzetes csúcsai nem mutathatók ki, bizonyíthatja, hogy a hatóanyag amorf vagy molekulárisan diszpergált állapotban van a vizsgált lipidmátrixokban.

4.2.1.4. Lipid kristályosság vizsgálata DSC-vel

Mindkét emulgens (Cremophor RH60 és Kolliphor EL) csökkentette a lipid kristályossági indexét, de nem volt jelentős különbség közöttük. A magasabb folyékony lipidkoncentráció eredményezte a legrelevánsabb kristályossági index (CI%) csökkenést. A 7: 3 szilárd lipid-olaj arány a kedvező a CI% csökkentő hatásának köszönhetően (minimális olvadáspont-csökkenéssel), ezért ezt az arányt alkalmaztuk a további optimalizáláshoz.

4.2.1.5. Potenciális NLC összetevők kiválasztása

Annak vizsgálatára, hogy a kiválasztott lipidkeverékek alkalmasak-e nanorendszerek formulálására hatóanyagmentes teszt NLC-ket készítettünk. Az NLC rendszerek jellemzéséhez a következő paramétereket mértük lézerdiffrakciós módszerrel: d(0,1), d(0,5), d(0,9) és Span érték.

Az eredmények alapján a további mérésekhez és a készítmény optimalizálásához Compritol 888 ATO-t, Miglyol 812N-t és Cremophor RH60-t választottunk.

4.2.2. DXM tartalmú NLC összetételek optimalizálása faktoriális kísérlettervvel

4.2.2.1. Alap NLC összetételek

Az optimális összetétel megtalálásához 2^3 teljes faktoriális kísérlettervet használtunk. A DXM-NLC három paraméterét választottuk független változóként (az emulgeálószer, a hatóanyag és az összes lipid koncentrációja). Optimalizációs paraméterként (függő változók) az NLC rendszerek részecskeméretét (Z_{ave}), zétapotenciálját (ZP), polidiszperzitási indexét (PDI) és bezárási hatékonyságát (EE%) vizsgáltuk.

Az eredmények alapján a felületaktív anyag-koncentrációnak van a legjelentősebb hatása az NLC-k stabilitási paramétereire (Z_{ave} és ZP), a megnövelt mennyiség kedvező lehet, de nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy felületaktív anyag magasabb koncentrációja alacsonyabb bezárási hatékonyságot és lehetséges irritációt, toxicitást okozhat. A stabilitási vizsgálatok eredménye alapján a további készítményekben 10% lipidkoncentrációt alkalmaztunk.

4.2.2.2. Mukoadhezív NLC összetételek

A mukoadhezív NLC-k előállításához HPMC-t alkalmaztunk, amely amfifil jellegéből adódóan gélréteget képez a nanorészecskék körül. A 2^3 teljes faktoriális kísérlet terv független

változói a polimer koncentráció (A), a felületaktív anyag koncentráció (B) és a DXM koncentráció (C) voltak. Az optimalizálási paraméterként (függő változóként) a nanorészecskék részecskeméretét (Z_{ave}), a Zeta potenciálját (ZP), a polidiszperzitás indexét (PDI), d (0,1), d (0,5), d (0,9), Span értékét, hatékonyság hatékonyságát (EE%) és mukoadhezivitását választottuk.

A (4-9) egyenletek megmutatják a választott faktorok önálló és együttes hatását az optimalizálási paraméterekre (Z_{ave}, PDI, ZP, EE%, d (0,5) és Span érték). Az egyenletek vastagon kiemelt értékei szignifikáns hatást jeleznek.

Z_{ave}= 153.22 **– 4.93A** – **42.65B** – **1.74C** – **5.50AB** + **5.71AC** – 0.35BC, (4)

PDI = 0.30 – 0.03A – 0.04B – 0.02C – 0.01AB + 0.04AC + 0.00BC, (5)

ZP = -7.65+0.46A+2.21B-0.44C+0.24AB+0.83AC-1.49BC, (6)

EE% = 88.63 - 0.51A+3.6B+0.35C-0.69AB+0.51AC-1.18BC, (7)

d(0.5) = 0.12 – 0.001A -0.003B + 0.002C + 0.000AB +0.000AC+0.002BC, (8)

Span value=1.24-0.05A-0.1B+0.11C-0.09AB+0.01AC+0.1BC. (9)

A faktoriális kísérlettervezés eredményei alapján a felületaktív anyag koncentrációja, a polimer koncentrációja és a DXM koncentrációja szignifikáns hatással van a részecskeméretre (4. egyenlet). A polimer és a felületaktív anyag koncentrációjának (AC), valamint a polimer és a DXM koncentrációjának (AB) együttes hatása szintén szignifikáns hatással van a Z_{ave}-re.

4.2.3. Mukoadhézió vizsgálata

A készítmények mukoadhezivitásának javítása érdekében egy mukoadhezív polimert, HPMC-t adtunk az NLC rendszerekhez. Az NLC készítmények mukoadhézióját összehasonlítottuk ugyanazokkal a HPMC nélküli készítményekkel, majd statisztikai analízist (T-teszt) végeztünk a szignifikancia értékelésére. Megállapítottuk, hogy a legtöbb készítmény esetében szignifikáns különbség van a mukoadhezív polimert tartalmazó és nem tartalmazó minták között. A több emulgenst (5%) tartalmazó minták magasabb adhezív munka értékkel rendelkeztek, mint a kisebb emulgens tartalmú készítmények.

4.2.4. In vitro hatóanyag-felszabadulás

4.2.4.1. Alap NLC összetételek

Az optimalizált NLC-k összehasonlítását a hagyományos szuszpenziós formával *in vitro* hatóanyag diffúziós vizsgálatokkal végeztük. Faktori kísérlettervezésünk eredményei alapján a négy legrelevánsabb (NLC1, 5 - 0,05% DXM és NLC3,7 - 0,10% DXM) összetételt választottuk az összehasonlításhoz.

Az eredmények alapján az NLC7 összetétel minden egyes időpontban szignifikánsan nagyobb mennyiségű diffundált hatóanyagot mutatott, mint a szuszpenziós forma.

4.2.4.2. Mukoadhezív NLC összetételek

Megvizsgáltuk a HPMC-t tartalmazó NLC rendszerek (NLC9-16) *in vitro* hatóanyag diffúzióját is. A faktoriális terv kiértékelése alapján megállapítható, hogy a felületaktív anyag koncentrációjának (B) jelentős negatív, (10. egyenlet), míg a DXM koncentrációnak (C) jelentős pozitív hatása van a diffúzióra.

$$C_{DXM\ (6h)} = 73.50 + 1.64A \mathbf{- 14.40B + 25.07C} - 1.24AB + 2.65AC - 3.11BC, \qquad (10)$$

A legnagyobb diffundált DXM mennyiség az NLC13 és 14 esetében volt kimutatható (kisebb emulgens mennyiséget tartalmazó és alacsony bezárási hatékonyságot mutató összetételek). Ez alapján megállapítható, ha kevesebb hatóanyag van a nanohordozóba bezárva (azaz több a szabad DXM), akkor nagyobb mennyiség diffundál a szintetikus membránon keresztül, másrészt ez azt jelentheti, hogy a magas emulgeálószer-koncentrációnak (és/vagy magasabb bezárási hatékonyságnak) visszatartó hatása lehet a DXM diffúziójára.

4.2.5. Sejt életképességi vizsgálat

4.2.5.1. Alap NLC összetételek

Az NLC-k lehetséges toxicitásának elemzésére humán szaruhártya epitél sejtek életképességi vizsgálatát alkalmaztuk (MTT teszt). Az eredmények alapján az NLC-k és komponenseik nem voltak toxikusak a szaruhártya epitélsejtekre.

4.2.5.2. Mukoadhazív NLC összetételek

A mukoadhezív NLC készítmények (NLC9-12) és a polimer toxicitását impedancia méréssel vizsgáltuk. A DXM tartalmú NLC készítményekkel történő kezelés után nem volt mérhető, jelentős sejtkárosodás.

4.2.6. Immunhisztokémia

A sejtek életképességi vizsgálatát immunhisztokémiával egészítettük ki, annak érdekében, hogy tisztázzuk a készítmények hatását a szaruhártya hámsejtjeinek barrier funkciójára. A kezelt csoportokban nem tapasztaltunk jelentős morfológiai változásokat. Valamennyi összekapcsoló fehérje az intercelluláris kapcsolatokon lokalizálódott, és minden csoportban folyamatos pericelluláris öveket képzett.

4.2.7. Permeábilitás vizsgálatok

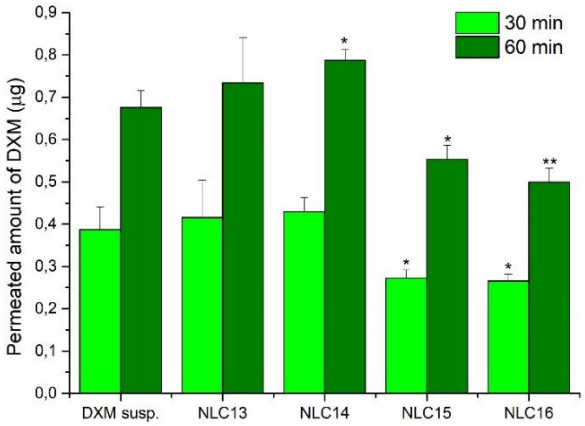
A permeabilitás a hatóanyagmolekulák azon képessége, hogy áthatolhatnak a biológiai membránokon. Vizsgálatunkban 3 különböző módszert alkalmaztunk és összehasonlítottunk egymással: *in vitro* nagy áteresztőképességű szaruhártya-PAMPA modellt; szaruhártya sejttenyészetet; és *ex vivo* sertés szaruhártyája penetrációt, amit Raman térképezés értékeltünk ki.

4.2.7.1. Permeábilitás vizsgálata PAMPA membránon keresztül

Az NLC rendszerek és a szuszpenzió fluxusértékeinek összehasonlítása jelentős penetrációt prediktált a nanohordozókból. Meglepő módon az NLC11 és 12 mutatta a legnagyobb penetrációt és szignifikáns különbséget a DXM szuszpenziós formájához képest. Az NLC11 és 12 készítmények azonban alacsonyabb hatóanyag diffúziót mutattak az *in vitro* diffúziós vizsgálat során. Ez az ellentmondás valószínűleg az NLC-k komponensei és a PAMPA membrán közötti kölcsönhatással magyarázható.

4.2.7.2. Permeabilitás vizsgálata sejtkultúra modellen

A legnagyobb hatóanyagmennyiség az NLC13 és NLC14 készítmények esetében penetrált (3. ábra). 60 perc elteltével a DXM penetrált mennyisége szignifikánsan magasabb volt az NLC14 esetében, mint a szuszpenziós forma esetében. Amikor a donor fázisban magasabb volt a szabad koncentráció, a penetrált DXM mennyisége is magasabb volt. Ez a tendencia hasonló az *in vitro* diffúziós vizsgálatokhoz. Ez azt sugallhatja, hogy ha a bezárási hatékonyság jobb, akkor a DXM kisebb mennyiségben diffundálhat és penetrálhat az NLC rendszerekből.



3. ábra *A penetrált DXM mennyisége a HCE-T sejteken keresztül 30 perc és 60 perc után.*

Figyelembe véve a kezelés utáni permeabilitási (P_{app}) értékeket, az összes NLC készítmény magasabb értékeket mutatott a szuszpenzióhoz képest, ami a hatóanyag jobb penetrációját jelzi nano-lipid készítmények alkalmazásával.

4.2.7.3. A különböző penetrációs modellek közötti korreláció vizsgálata

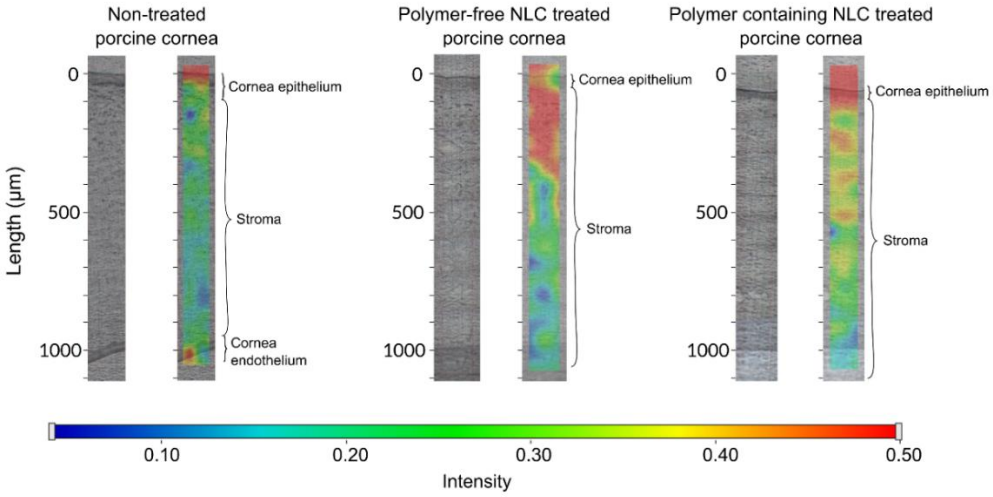
A penetrációs vizsgálatok összehasonlításához korreláltattuk a különböző membránokon keresztül penetrált mennyiségeket. A korrelált eredmények megerősíthetik a modellek relevanciáját és alkalmazhatóságát, valamint segíthetnek kiválasztani a legalkalmasabbat a hatóanyag biohasznosulásának prediktálására a fejlesztett NLC rendszerek esetében.

Az *in vitro* diffúziós vizsgálat eredményei és a PAMPA membránon penetrált mennyiségek nem korreláltak egymással (a korrelációs együttható 0,06522 volt). A korreláció eredménye HCE-T sejteken és a PAMPA-n keresztül penetrált mennyiségek között mérsékelt volt (a korrelációs együttható 0,52248 volt). A lehetséges magyarázat az lehet, hogy az NLC komponense módosíthatja a PAMPA membránt, ami megváltoztathatja a permeabilitást ebben a modellben.

Az *in vitro* diffúziós vizsgálat és a permeabilitási vizsgálat HCE-T sejtvonal közötti korreláció nagyon magas volt (0,96595). Ez azt sugallja, hogy a DXM penetrációjának fő sebességkorlátozó tényezője az NLC készítményekben a gyógyszer felszabadulása a nanohordozókból.

4.2.7.4. Ex vivo penetrációs vizsgálat Raman térképezéssel

A hatóanyag-diffúziós vizsgálat és a sejtvonal-penetrációs teszt alapján az NLC14-et választottuk ki a félkvantitatív Raman-térképezési vizsgálatra. A sertés szaruhártyákat mukoadhezív és nem mukoadhezív (NLC14) készítményekkel kezeltük. A polimer nélküli NLC esetén jelentős NLC jelenlétére utaló intenzitást figyelhetünk meg a szaruhártya sztróma rétegében (300 µm behatolási mélység) (4. ábra).



***4. ábra**. A mukoadhezív és alap NLC rendszerek penetrációjának nyomonkövetése Raman térképezéssel.*

A polimert tartalmazó NLC (NLC14) esetében a szaruhártya felszínén és a sztróma felső részén jelentős Raman-intenzitás figyelhető meg, de ez utóbbi gyengébb, mint a polimer nélküli NLC esetében. Mukoadhezív tulajdonságainak köszönhetően az NLC14 jelentős depót képez a szaruhártya felületén, és kevesebb komponens juthat át a hámrétegen keresztül a hidrofil sztrómába.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD-munkám célja szemészeti felhasználásra szánt innovatív gyógyszeradagoló rendszerek kidolgozása volt. A munka újszerűsége a következőképpen foglalható össze:

- *In situ* gélesedő mukoadhezív készítmény formulálása ciklodextrinnel módosított tiolált polimerrel, amely lehetővé tette a prednizolon, mint hatóanyag beépítését egy hidrofil mukoadhezív szemészeti készítménybe.
- A ciklodextrin kötése a polimerhez megnövelte a hatás időtartamát, és a ciklodextrin szabad és kötött formájának kombinálásával programozhatóvá tette a hatóanyagleadás sebességét és mértékét.
- Először került bemutatásra a DXM-t tartalmazó mukoadhezív NLC rendszerek optimálása a szemen tartózkodási idő növelésére.
- A fejlesztett NLC rendszerek biokompatibilisek voltak, ezt immunhisztokémiai módszerrel és a sejtek életképességi vizsgálatával igazoltuk.
- Erős korrelációt találtunk az *in vitro* hatóanyag-diffúziós vizsgálat és a HCE-T sejteken történt permeabilitási vizsgálat között az NLC rendszereink esetében.
- *Ex vivo* Raman térképezést alkalmaztunk a penetráció nyomon követésére, amely igazolta, hogy az alap NLC készítmények komponensei penetrálnak a sztróma rétegbe, míg a mukoadhezív nanokészítmények egy depót hoznak létre a szem felszínén.

Összegzésként megállapítható, hogy a disszertációban ismertetett tiolált mukoadhezív hidrogélek és NLC-k lehetőséget adnak a szemészeti szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek biohasznosulásának növelésére.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

I. Mária, Budai-Szűcs; **Eszter, L Kiss**; Barnabás, Áron Szilágyi; András, Szilágyi; Benjámin, Gyarmati; Szilvia, Berkó; Anita, Kovács; Gabriella, Horvát; Zoltán, Aigner; Judit, Soós and Erzsébet Csányi; Mucoadhesive Cyclodextrin-Modified Thiolated Poly(aspartic acid) as a Potential Ophthalmic Drug Delivery System. Polymers 10, 199 (2018).

IF: 3.164

II. **Eszter, L. Kiss**; Szilvia, Berkó; Attila, Gácsi; Anita, Kovács; Gábor, Katona; Judit, Soós; Erzsébet, Csányi; Ilona, Gróf; András, Harazin; Mária A., Deli, and Mária, Budai-Szűcs; Design and Optimization of Nanostructured Lipid Carrier Containing Dexamethasone for Ophthalmic Use. Pharmaceutics 11, 679 (2019).

IF: 4.421

III. **Eszter, L. Kiss**; Szilvia, Berkó; Attila, Gácsi; Anita, Kovács; Gábor, Katona; Judit, Soós; Erzsébet, Csányi; Ilona, Gróf; András, Harazin; Mária A., Deli, Balogh T. György and Mária, Budai-Szűcs; Development and Characterization of Potential Ocular Mucoadhesive Nano Lipid Carriers Using Full Factorial Design. Pharmaceutics 12, 682 (2020).

IF: 4.421

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

I. **Eszter, L. Kiss**; Mária, Budai-Szűcs; Áron, Szilágyi Barnabás; András, Szilágyi; Benjámin, Gyarmati; Erzsébet, Csányi: Cyclodextrin-Modified Thiolated Poly(aspartic acid) as a Potential Mucoadhesive Ophthalmic Drug Delivery, 4th International Conference on Bio-Based Polymers and Composites, Balatonfüred, Hungary, 2018.09.02-06. (Szóbeli előadás)

II. **Eszter, L Kiss**; Barnabás, Szilágyi; András, Szilágyi; Benjamin, Gyarmati; Erzsébet, Csányi; Mária, Budai-Szűcs: Cyclodextrin-Modified Mucoadhesive Polymers as an Enhancer of Ophtalmic Drug Delivery, 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Szeged, Hungary, 2018.09.20-22. (Poszter előadás)

III. **Eszter, L. Kiss**; Mária, Budai-Szűcs; Erzsébet, Csányi: Improving the ophthalmic bioavailability of steroidal anti-inflammatory drugs, I. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, Hungary, 2019.01.31. (Szóbeli előadás)

IV. **Eszter, L. Kiss**; Szilvia, Berkó; Anita, Kovács; Attila, Gácsi; Mária, Budai-Szűcs; Erzsébet, Csányi; Dexametazon tartalmú nanostrukturált lipid hordozók preformulációs és formulációs vizsgálatai; Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia: A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógyszeripari Szervezetének és Gyógyszertechnológiai Szakosztályának Konferenciája, Siófok, Hungary, 2019.09.26-28. (Poszter előadás)

V. **Eszter, L. Kiss**; Erzsébet, Csányi; Mária, Budai-Szűcs; Nanostructured lipid carriers for ophthalmic use, II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, Hungary, 2020.01.23-24. (Szóbeli előadás)

VI. **Eszter, L. Kiss**; Erzsébet, Csányi; Mária, Budai-Szűcs; Mucoadhesive nanostructured lipid carriers for ophthalmic use, III. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, Hungary, 2021.01.20-22. (Szóbeli előadás)