



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

PhD értekezés tézisei

Bőrpenetrációt modellező új, innovatív technikák vizsgálata

Zsikó Stella

Témavezetők:

Dr. habil. Berkó Szilvia Ph.D.

Dr. habil. Csányi Erzsébet Ph.D.

Szeged

2021

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Vezető: Prof. Dr. Hohmann Judit, akadémikus
Képzési program: Gyógyszertechnológia
Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezetők:

Dr. habil. Berkó Szilvia Ph.D.

Dr. habil. Csányi Erzsébet Ph.D.

Zsikó Stella

Bőrpenetrációt modellező új, innovatív technikák vizsgálata

Komplexvizsga-bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Révész Piroska D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Tagok: Prof. Dr. Bácskay Ildikó Ph.D., Debreceni Egyetem,
Gyógyszertechnológiai Tanszék
Dr. habil. Aigner Zoltán Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bíráló bizottság:

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

Opponensek: Dr. Balázs Boglárka, Ph.D., Richter Gedeon Nyrt.
Dr. habil. Fenyvesi Ferenc, Ph.D., Debreceni Egyetem,
Gyógyszertechnológiai Tanszék

Tagok: Dr. habil. Ducza Eszter Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Dr. Spaits Tamás, Ph.D., EGIS Gyógyszergyár Zrt.

SZEGED

2021

1. BEVEZETÉS

A dermális és transzdermális készítményeket általában a hatóanyagok bőrre, illetve a bőr alatti szövetekbe juttatására, vagy a bőrön keresztül történő szisztémás hatás elérésére alkalmazzák. Az elmúlt években intenzíven nőtt a dermális és transzdermális készítmények száma, egy 2016-ban végzett piackutatás alapján a transzdermális készítményekből származó bevételek 2024-re drámai módon növekedni fognak. Népszerűségük fő oka számos előnyös tulajdonságuk, ilyen például a máj „first-pass” metabolizmusának elkerülése, a gyomor-bél traktus védelme és a non-invazív alkalmazás. A növekvő piaci igények olyan integrált szabályozási környezetet igényelnek, amelyek segítségével könnyen lehet azonosítani és értékelni a termékek tulajdonságait a világ bármely pontján, megkönnyítve a dermális és transzdermális gyógyszerkészítmények fejlesztését.

A bőrön keresztüli permeáció modellezése összetett feladat. Számos *in vitro* és *in vivo* módszer alkalmazható. A különböző módszerek paraméterei, valamint a termék tulajdonságai befolyásolják azt, hogyan tesztelhető leghatékonyabban az adott rendszer. A vizsgálati módszer választását nagyban befolyásolja az adott módszer prediktív képessége, idő- és laborigénye, valamint annak költsége.

A diffúziós cellákon - bőrmodellek és szintetikus membránok felhasználásával - végzett *in vitro* permeációs vizsgálatok jól használhatók a készítmények tervezésében és optimalizálásában. Az *in vitro* bőrpermeáció mérésére a leggyakrabban alkalmazott kvantitatív módszer a számos szakmai irányelvben leírt Franz diffúziós cellás vizsgálat. Ezen módszer esetében a vizsgált készítményt egy szintetikus vagy biológiai membrán felületére helyezük, amely gátként szolgál a donor fázis és a Franz diffúziós cella akceptor része között. A Franz-cellás módszer előnyei, hogy a mérések elvégezhetők humán bőrön és egyéb membránokon is, több készítmény tesztelhető egyszerre, nincs szükség a vizsgálati anyag radioaktív jelölésére és nem merülnek fel tudományetikai problémák.

A bőrön keresztüli penetráció prediktálására az *in vitro* humán bőrön végzett vizsgálatok biztosítják a legpontosabb információt, de a magas költségek miatt általánosan elfogadott az egyszerűbb *in vitro* módszerek alkalmazása a készítmény fejlesztésének korai szakaszában. A gyógyszerkutatás mellett ezek a vizsgálatok más iparágakat is segítenek. Az agrokémia területén rovarirtók és rovarriasztók vizsgálatai során alkalmazzák, valamint az állatgyógyászat és a kozmetikai ipar is ezekre a módszerekre támaszkodik, így kiemelten fontos az új, innovatív módszerek kutatása.

2. CÉLKITŰZÉS

PhD-munkám célja a bőrpermeáció modellezésére használható hagyományos és új, innovatív módszerek alkalmazhatóságának és egymással való helyettesíthetőségének vizsgálata volt. Kutatómunkám során az alábbi célok megvalósítását tűztem ki:

- Hanson- és Logan-típusú Franz cellák összehasonlítása;
- különböző membránok alkalmazhatóságának vizsgálata, különös tekintettel arra, hogy a humán epidermisz helyettesíthető-e szintetikus membránnal;
- a skin PAMPA módszer alkalmazhatóságának vizsgálata;
- a félkvantitatív Raman térképezési módszer alkalmazhatóságának vizsgálata
- a módszerek szenzitivitásának vizsgálata a különböző készítmények közötti különbségek kimutatására.

A különböző módszerek összehasonlítása során hidrogél, különböző típusú krémek és nanostrukturált lipidhordozó gél vizsgálata történt.

A PhD-munka első részében (1. kísérleti rész), különböző kvantitatív bőrpermeációs modellezési módszereket alkalmaztam a hatóanyag felszabadulásának és permeációjának tanulmányozására. Kétféle vertikális Franz-diffúziós cellát (Logan, Hanson) hasonlítottam össze három különböző membránon vizsgálva a diffúziót, illetve a permeációt (cellulóz, Strat-M, hőszeparált human epidermisz (HSE)). Majd az eredményeket a skin PAMPA módszerrel is összehasonlítottam.

Munkám második részében (2. kísérleti rész) a kvantitatív mérési módszerek eredményei és egy félkvantitatív spektroszkópiai módszer közötti összefüggéseket vizsgáltam. A Logan típusú Franz cella és skin PAMPA készülék került összehasonlításra Raman spektroszkópiás módszerrel.

További célom volt, hogy meghatározzam a módszerek szelektivitását arra vonatkozóan, hogy alkalmasak-e különböző összetételű félszilárd rendszerek közötti különbségek kimutatására. A mindennapi bőrgyógyászati gyakorlatban leggyakrabban használt készítmények kerültek vizsgálatra, egy hidrogél és két különböző típusú krém.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Lidokain tartalmú nanostrukturált lipid hordozó gél (LID-NLC gél)

Az NLC gél elkészítése során az alábbi anyagok kerültek felhasználásra: lidokain-bázis, glicerin, Cremophor® RH 60, Apifil®, Methocel™ E4M és tisztított víz.

3.1.2. Diklofenák-nátrium (DFNa) tartalmú rendszerek

A rendszerek elkészítése során az alábbi anyagok kerültek felhasználásra: diklofenák-nátrium, etanol 96%, cetil-sztearil-alkohol, folyékony paraffin, fehér vazelin, fehér viasz, gyapjúviasz, oleil-oleát, ricinusolaj, poliszorbát 60, MethocelTM E4M és tisztított víz.

3.1.3. Szintetikus és biológiai membránok

Szintetikus membránként cellulóz-acetát membránt (Porafil membránszűrő, cellulóz-acetát, pórusátmérő: 0,45 µm), Strat-M membránt (Strat-M membrán, Transdermal Diffusion Test Model, 25 mm) és skin PAMPA lemezeket alkalmaztam. A biológiai membránként használt humán bőr kaukázusi nőbetegektől, rutin plasztikai műtétekből származott.

3.2. Módszerek

3.2.1. Lidokain tartalmú nanostruktúrált lipid hordozó gél előállítása

Az NLC-k kolloid hordozók olyan o/v típusú emulziókból származnak, amelyekben a szobahőmérsékleten folyékony lipideket szilárd lipidekre cserélik. Az NLC lipofil fázisa Apifilt, Cremophor RH 60-at és Miglyol 812 N-t tartalmazott, amelyeket 60 °C-on összeolvasztottam. Ezután az elegyben oldottam a lidokain-bázist. Az azonos hőmérsékletű tisztított vízben emulgeáltam a lipid fázist a pre-emulzió kialakításához. A keletkezett pre-emulziót Hielscher UP200S kompakt ultrahangos homogenizátorral 10 percig ultrahangoztam a kolloid mérettartomány elérésére. Végül a diszperziót jeges fürdőbe helyeztem szilárd lipid részecskék kialakításához. A külső vizes fázis gélesítéséhez glicerint és Methocel E4M-et alkalmaztam. A lidokain végső koncentrációja 5% volt. A készítményeket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat A vizsgálati készítmények összetétele

LID-NLC	LID-NLC gél
Apifil	LID-NLC
Cremophor RH60	Glicerin
Miglyol 812N	Methocel E4M
Tisztított víz	
Lidokain	

3.2.2. A diklofenák-nátriumot tartalmazó készítmények előállítása

Három félszilárd DFNa-t tartalmazó készítményt készítettem (2. táblázat). A hidrogél 1% DFNa-ot tartalmazott, tisztított víz és 96%-os etanol elegyében oldva. A gélesítés Methocel E4M-el történt. Az o/v krém esetében a cetil-sztearil-alkoholból, folyékony paraffinból, fehér vazelinből és poliszorbát 60-ból álló olajos fázist 60 °C-ra melegítettem. Ezután keverés közben forró vizet adtam az olajos fázishoz. Végül a DFNa-t diszpergáltam

a készítményalapban, homogenizáltam, majd kihűlésig kevertem. A v/o krém fehér viaszból, gyapjúviaszból, oleil-oleátból és ricinusolajból álló olajos fázisát 60 °C-ra melegítettem. Ezután keverés mellett forró vizet adtam az olajos fázishoz. Végül a DFNa-t diszpergáltam és homogenizáltam a készítményt.

2. táblázat A diklofenák-nátriumot tartalmazó készítmények összetétele

hidrogél	o/v krém	v/o krém
Diklofenák-nátrium	Diklofenák-nátrium	Diklofenák-nátrium
Methocel E4M	Cetil-sztearil-alkohol	Fehér viasz
Etanol 96%	Folyékony paraffin	Gyapjúviasz
Tisztított víz	Poliszorbát 60	Oleil-oleát
	Fehér vazelin	Ricinusolaj
	Tisztított víz	Tisztított víz

3.2.3. Hatóanyag-felszabadulás és permeációs vizsgálatok

Három különböző készüléket alkalmaztam a hatóanyag felszabadulásának és a membránon keresztüli diffúziójának, valamint a bőrön keresztüli permeáció modellezésének vizsgálatára (3. táblázat).

3. táblázat Hatóanyag-felszabadulást és permeációt vizsgáló készülékek paramétere

	Hanson Microette TM Topical&Transdermal Franz Diffusion Cell System	LOGAN Automated Dry Heat Sampling System	Skin PAMPA
Statikus vagy dinamikus	statikus	statikus	statikus
Cellák száma	6	6	96
Cella típusa	zárt (nyomás alatt van)	nyitott	nyitott
Permeációs felület mérete	1,76 cm ²	1,76 cm ²	0,3 cm ²
Akceptor fázis mennyisége	7 ml	9 ml	250 µl
Akceptor fázis	Foszfát puffer oldat pH 7,4	Foszfát puffer oldat pH 7,4	Foszfát puffer oldat pH 7,4
Donor fázis	0,30 g	0,30 g	70 µl
Membrán	Szintetikus <ul style="list-style-type: none"> • cellulóz • Strat-M Biológiai <ul style="list-style-type: none"> • HSE 	Szintetikus <ul style="list-style-type: none"> • cellulóz • Strat-M Biológiai <ul style="list-style-type: none"> • HSE 	Skin PAMPA membrán
Hőmérséklet	32 °C	32°C	32°C
Mintavétel	automatikus	automatikus	kézi
Mintavételi idő	6 és 24 h	6 és 24 h	6 h
API koncentráció meghatározása	Spektrofotometria	Spektrofotometria	Spektrofotometria

Két vertikális Franz-cellás diffúziós készüléket használtam, a Hanson Microette™ Topical&Transdermal Franz Diffusion Cell System-et és a LOGAN Automated Dry Heat Sampling System-et. A Franz cellákban a donor és az akceptor fázisokat vagy szintetikus membrán (cellulóz-acetát és Strat-M membrán) vagy biológiai membrán (HSE) választotta el egymástól. A humán bőr esetén az epidermiszt hőszeparációs módszerrel távolítottam el a többi bőrrétegtől. A kimetszett zsírmentes humán bőrt vízfürdőbe helyeztem ($60 \pm 0,5$ °C, 1 perc), majd csipesz segítségével elválasztottam az epidermisz réteget a dermisztől. A harmadik készülék a skin PAMPA volt, mely két 96 lyukú mikrotiter lemezből álló módszer és speciális biomimetikus membránt tartalmaz. A skin PAMPA membránt 24 órára behidratáltam a mérések előtt. A különböző készítmények permeációs profilját jellemeztem. Kiszámoltam a hatóanyag kumulatív mennyiségét (Q) és a kioldódási sebesség jellemző paraméterét a fluxot (J). Meghatároztam a HSE és a Strat-M, illetve a HSE és a skin PAMPA membránon permeálódott hatóanyag-mennyiségek közötti korrelációt.

3.2.4. Raman térképezés

A mérésekhez kimetszett humán bőrt (epidermisz és dermisz) használtam. A mintahasi plasztikai műtéten átesett kaukázusi nőbetegektől származott. 1 cm^2 bőrfelületet 3 órán át 32 °C-on kezeltem a különböző összetételű készítményekkel. A kezelt bőrmintákból fagyasztást követően Leica CM1950 kriosztáttal metszeteket készítettem ($10 \mu\text{m}$ vastagsággal), amit alumínium felületre helyeztem. A Raman spektroszkópiai méréseket CCD kamerával és dióda lézerrel felszerelt Thermo Fisher DXR Dispersive Raman Spectrometer készülékkel végeztem. A fényforrás 780 nm hullámhosszúságú fényt bocsátott ki, 24 mW maximális teljesítménnyel. Az ilyen típusú lézerforrások használatával a fluoreszcencia hatása minimálisra csökkenthető. A mérésekhez 50-szeres nagyítású lencsét használtam, az optikai rés $25 \mu\text{m}$ szélességű volt. A kémiai térképezés során $200\text{--}1800 \mu\text{m}$ területet vizsgáltam; $50 \mu\text{m}$ -es lépésközzel (függőlegesen és vízszintesen). Így 205 spektrum került rögzítésre 16×2 másodperces expozíciós idővel. A kezelt és kezeletlen bőrminták spektrumait, a készítmények és a hatóanyag spektrumaival hasonlítottam össze. A készítmények spektrumainak rögzítése 532 nm -es lézerfényvel történt 32×6 másodperces expozíciós idővel. A mérésekhez 10-szeres nagyítású lencsét használtam, az optikai rés $25 \mu\text{m}$ szélességű volt. A kiértékelés az OMNIC™ 8.2 for Dispersive Raman szoftvercsomag segítségével történt.

3.2.5. Statisztikai analízis

Az adatok elemzéséhez a Microsoft® Excel® és az OriginPro® 8.6 szoftvert használtam. A statisztikai analízist a GraphPad Prism szoftver segítségével végeztem el, egyszempontos ANOVA analízist alkalmazva Bonferroni teszttel (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001 a referenciához viszonyítva).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. 1. kísérleti rész

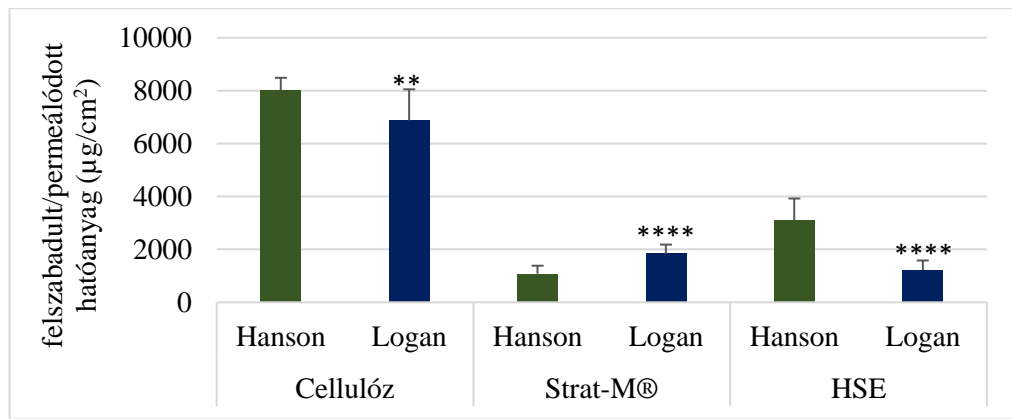
Az 1. kísérleti rész során két típusú Franz diffúziós cella összehasonlítása történt három különböző membrán alkalmazásával, majd az eredményeket skin PAMPA módszerrel is összehasonlítottam. Vizsgálati készítményként lidokain tartalmú NLC gélt használtam.

Az hatóanyag-felszabadulásának vizsgálatára (*in vitro* release test, IVRT) cellulóz membránt, a permeáció méréséhez (*in vitro* permeation test, IVPT) hőszeparált humán epidermiszt használtam. Mindkét vizsgálat eredményeit összehasonlítottam a Strat-M membránon végzett mérésekkel. (átlagos kumulatív mennyiségben, $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{SD}$). A mérés 6 és 24 órán keresztül történt.

Az eredményeket az 1. ábra mutatja be, amelyen a 24 óra elteltével mért eredmények láthatók. Szignifikáns különbség volt a két cellán keresztül mért értékek között mindhárom membrán esetén. A hatóanyag diffúziója a szintetikus cellulóz membránon keresztül lényegesen nagyobb, mint a biológiai hőszeparált humán epidermiszen keresztül. Fontos megemlíteni, hogy az IVRT vizsgálat a hatóanyag felszabadulást modellezi, de nem nyújt releváns információt a permeációra. Így kiemelten fontos megvizsgálni a bőrön keresztüli permeációs folyamatot (IVPT), hogy ne csak a felszabaduló gyógyszer mennyiséget ismerjük, hanem a rendszer és a bőr közötti kölcsönhatásokat is vizsgálni tudjuk. Az azonban ígéretes, hogy a szintetikus Strat-M membrán eredményei nagyon közel állnak a HSE eredményeihez.

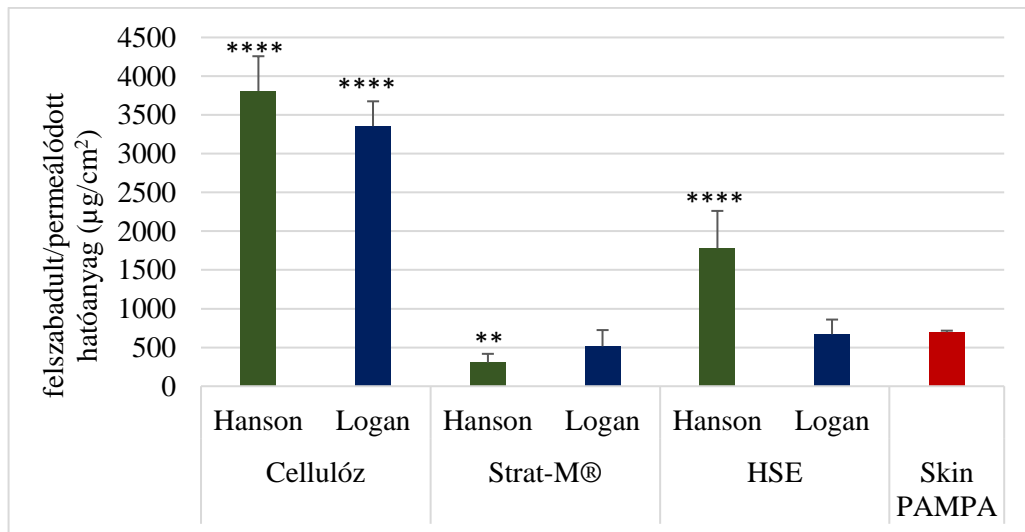
A skin PAMPA módszerrel végzett mérések során azt tapasztaltam, hogy a membrán integritása nem volt megfelelő a 24 órás mérésekhez, ezért a skin PAMPA méréseket 6 órán keresztül végeztem.

A LID-NLC gélből a két szintetikus és egy biológiai membránon át, valamint a skin PAMPA-n keresztül *in vitro* felszabadult/permeálódott lidokain eredményeket a 2. ábra mutatja. A skin PAMPA, a Logan cellán alkalmazott Strat-M és HSE membrán eredményei között nem volt szignifikáns különbség.



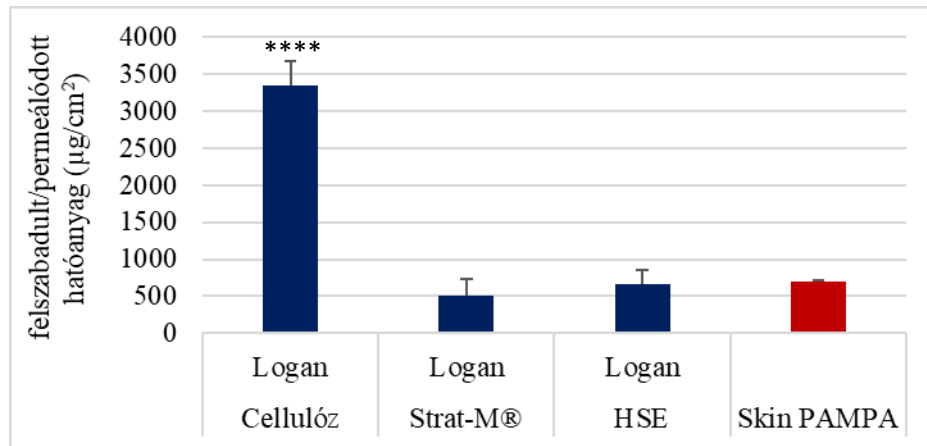
1. ábra A diffúziós cellák és membránok összehasonlítása

(**** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$)



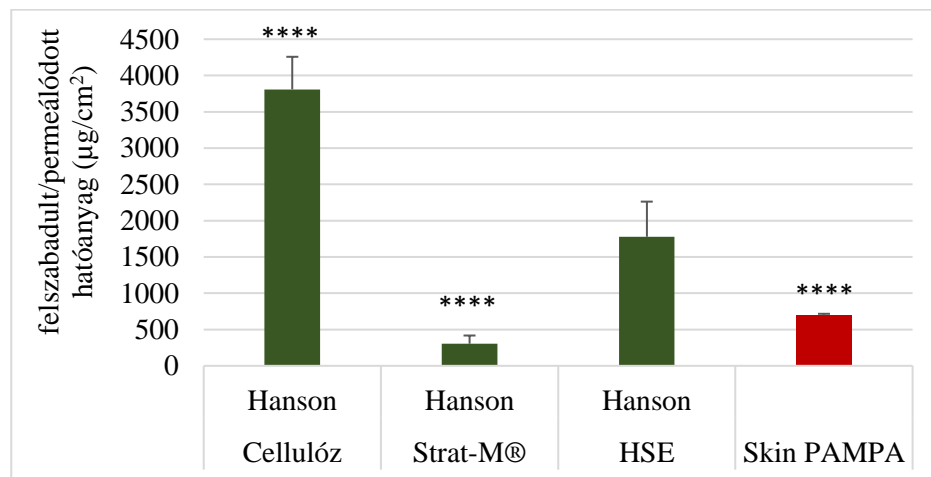
2. ábra A skin PAMPA membrán eredményeinek összehasonlítása a Franz cellás mérésekkel (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs skin PAMPA)

A 3-4. ábra a Hanson és Logan cellákon külön-külön mért eredményeket szemlélteti. A humán epidermisz, a Strat-M membrán és a skin PAMPA membrán eredményei között nem volt szignifikáns különbség a Logan készüléken, a cellulóz membránon szignifikánsan több hatóanyag permeálódott 6 óra alatt. A Hanson készüléken kapott eredmények nagyobb szórást mutattak és a HSE membránhoz képest mindhárom másik membrán eredményei szignifikáns különbséget mutattak a 6 órás vizsgálat végén.



3. ábra A Logan cella és a skin PAMPA eredményei

(**** $p < 0,0001$ vs Logan HSE)



4. ábra A Hanson cella és a skin PAMPA eredményei

(**** $p < 0,0001$ vs Hanson HSE)

Az 1. kísérleti rész összefoglalása

Az *in vitro* felszabadulás és a bőrpermeáció tanulmányozásához lidokain tartalmú NLC gélt használtam. Két különböző típusú Franz diffúziós cellás berendezést hasonlítottam össze egymással. A Logan és Hanson készüléken eltérő eredményeket kaptam.

Különböző membránok összehasonlítása során mind a két új, speciális bőrimitáló membrán (skin PAMPA, Strat-M) eredményei jól korreláltak a HSE membránnal.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az irányelvekben jóváhagyott IVPT tesztek (humán epidermiszen keresztüli permeáció) jól helyettesíthetők a Strat-M membránnal a Logan-típusú készüléken és a skin PAMPA módszerrel. A Hanson készüléken szignifikáns különbség volt a különböző membránok és a skin PAMPA között. Munkám során a továbbiakban a vizsgálatokat a Logan készüléken végeztem.

4.2. 2. kísérleti rész

A 2. kísérleti részben a Logan Franz cellát, a skin PAMPA módszert és a Raman spektroszkópiát hasonlítottam össze. A Franz cellás mérés és a skin PAMPA kvantitatív, míg a Raman spektroszkópia szemikvantitatív technika. Az egyes módszerek érzékenységét különböző félszilárd készítmények vizsgálatával is teszteltem.

Három gyakran alkalmazott dermális készítményt hasonlítottam össze: egy hidrogélt, egy o/v és egy v/o krémet. A készítmények 1% DFNa-t tartalmaztak hatóanyagként.

4.2.1. Félszilárd készítmények vizsgálata kvantitatív módszerekkel

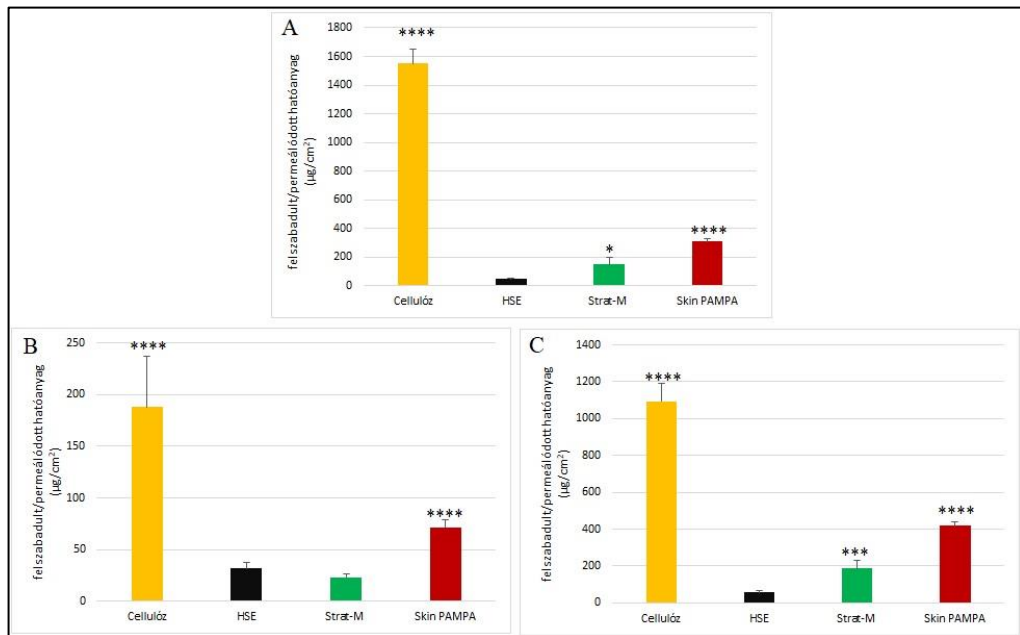
A Franz diffúziós és a skin PAMPA módszer membránon keresztüli hatóanyag permeáció kvantitatív mérésén alapulnak. Az 5. és 6. ábra a különböző típusú membránokon átjutó hatóanyag kumulatív mennyiségét mutatja az egyes készítményekből 6 óra alatt $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ -ben.

A 5. ábrán különböző készítmények összehasonlítása látható. A cellulóz membrán esetében a hidrogélből szabadult fel a legtöbb hatóanyag. A hidrogél egy vizes alapú rendszer, a hatóanyag oldott formában van, így a szintetikus membránon keresztüli diffúzió jelentős. A HSE, a Strat-M és a Skin PAMPA membrán esetén viszont az o/v krémből volt a legnagyobb mértékű penetráció. Ennek oka, hogy a DFNa a krém külső vizes fázisában oldott formában van, illetve a krémekben lévő emulgensek penetrációfokozó hatása elősegíti az emberi bőrön és a speciális bőrimitáló membránokon keresztüli permeációt. A DFNa felszabadulása és permeációja a v/o krém esetében minden mérés során rendkívül alacsony volt, melynek oka az, hogy a hatóanyag a krém belső fázisában van, és a DFNa diffúziója korlátolt az olajfázison keresztül.

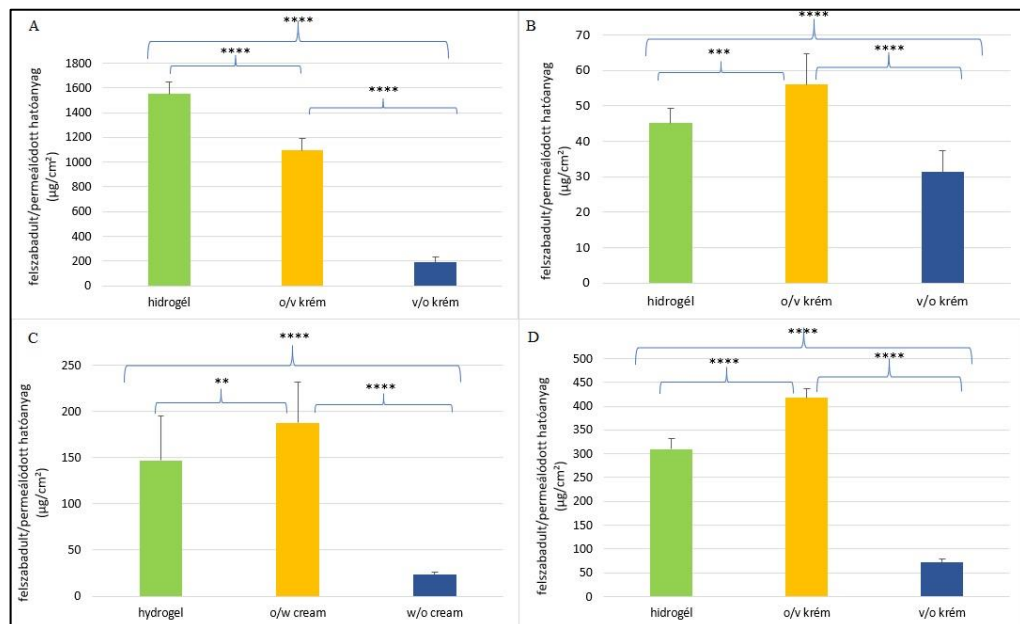
A hidrogél és az o/v krém esetében a HSE-hez viszonyítva az összes többi membrán szignifikáns különbséget mutatott, de legközelebb a Strat-M membrán eredménye állt a human epidermiszéhez. A v/o krém esetében nem volt szignifikáns különbség a HSE és a Strat-M membrán eredményei között.

A 6. ábrán a különböző membránokon keresztüli hatóanyag-permeáció látható. A cellulóz membránon keresztül a hidrogélből szabadult fel a legtöbb hatóanyag, ezt követte az o/v krém és végül a v/o krém. Szignifikáns különbség volt az egyes készítmények között. A humán epidermiszen keresztüli vizsgálat során megváltozott ez a sorrend, legtöbb hatóanyag az o/v krém esetén volt detektálható, ezt követte a hidrogél, majd a v/o krém, mely azzal magyarázható, hogy az o/v krémekben található emulgens penetrációfokozó hatása révén megkönnyítette a hatóanyag permeációját. A Strat-M membránon és a skin PAMPA készüléken a készítmények sorrendje követte a HSE-n kapott eredményeket, vagyis a

szintetikus, de speciális bőrimitáló membránok jó korrelációt mutattak a HSE-en mért értékekkel.



5. ábra A: Hidrogélből felszabadult és permeálódott hatóanyag **B:** v/o krémből felszabadult és permeálódott hatóanyag **C:** o/v krémből felszabadult és permeálódott hatóanyag
(**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs HSE)



6. ábra A: Diffúzió cellulóz membránon **B:** Permeáció HSE-en keresztül **C:** Permeáció Strat-M membránon keresztül **D:** Permeáció skin PAMPA készüléken
(**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$)

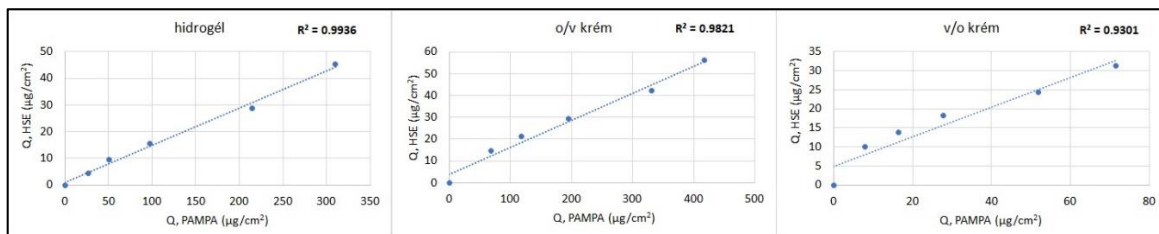
Az eredmények matematikai kiértékelése az 4. táblázatban látható. A permeációs paramétereiből (Q és J) következtetni lehet a módszerek és a készítmények közötti különbségekre. Valamennyi módszer alkalmas arra, hogy a különböző készítmények permeációs profiljainak eltéréseit kimutassa, ezért a preformulációs fázisban nagyon jó eszközként szolgálhatnak.

4. táblázat A diklofenák-nátrium permeációs paramétereit az egyes membránokon (6 óra)

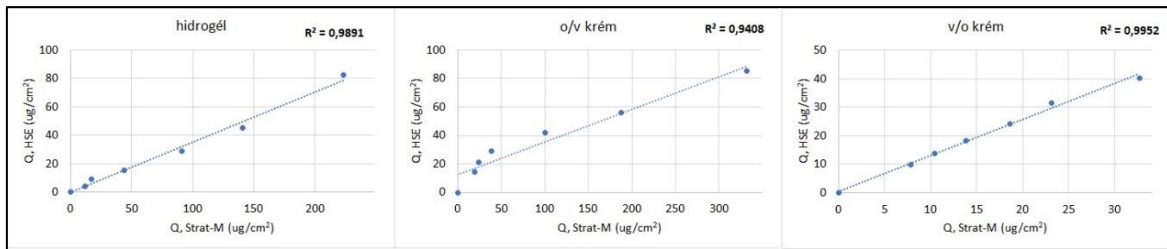
Formuláció	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
cellulóz		
hidrogél	1552,0 \pm 98,9	76,03
o/v krém	1092,9 \pm 98,4	179,13
v/o krém	188,2 \pm 48,8	31,36
Strat-M		
hidrogél	146,83 \pm 47,94	23,593
o/v krém	187,68 \pm 44,33	29,966
v/o krém	23,17 \pm 3,04	3,3194
HSE		
hidrogél	45,18 \pm 4,15	7,32
o/v krém	56,1 \pm 8,6	8,37
v/o krém	31,4 \pm 6,0	4,50
skin PAMPA		
hidrogél	310,1 \pm 21,4	52,59
o/v krém	417,6 \pm 19,7	68,51
v/o krém	71,5 \pm 7,1	11,85

Q, permeálódott DFNa kumulatív mennyisége, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 6 h (átlag \pm SD, $n = 6$); J, flux, a permeálódott kumulatív DFNa ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) vs idő (h) alapján

A 7. és 8. ábra a skin PAMPA és Strat-M membrán humán epidermiszhez viszonyított korrelációját mutatja. Mindkét szintetikus membrán magas korrelációt mutat a HSE-vel a vizsgált készítmények esetében. A szintetikus membránok és a HSE közötti korreláció minden esetben 0,93–0,99 között volt.



7. ábra Diklofenák-nátrium permeáció korrelációja HSE és skin PAMPA között



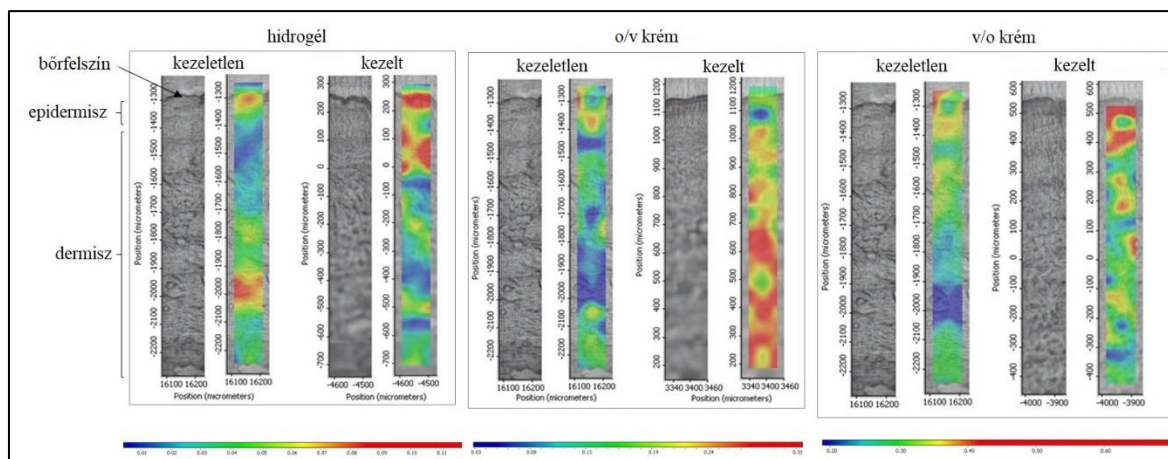
8. ábra Diklofenák-nátrium permeáció korrelációja HSE és Strat-M között

4.2.2. Félkvantitatív mérés Raman térképezéssel

A Raman korrelációs térkép segítségével az egyes készítményekkel végzett kezelés után követhető a bőrbe jutott gyógyszerkészítmény mennyisége a humán bőr különböző régióiban, egészen a bőrfelszíntől a dermisz alsó rétegéig. A különböző bőrrétegek Raman-spektrumai változatosak, és több sávból állnak, amelyek a különböző bőrkomponensekből származnak (pl. nukleinsavak, lipidek, fehérjék). Számos sáv átfedésben van a vizsgált készítmények spektrumával. A Raman-mérések során meghatároztam az egyes készítmények eloszlását a bőr különböző régióiban, és ezt összehasonlítottam a Franz cellán és a skin PAMPA-n kapott eredményekkel.

A DFNa a bőr egyes rétegeiben való eloszlását szemléltető korrelációs térképeket készítettem. A kezeletlen és kezelt bőrspektrumokat egymásra illesztettem. A DFNa jelenléte könnyen bizonyítható a készítményekben, de a jellegzetes DFNa csúcsok intenzitása nagyon alacsony. Ezért a tiszta API spektrumai helyett a teljes készítmény spektrumát (referencia spektrum) használtam a korrelációs térképek elkészítéséhez, amely közvetetten jelzi a DFNa jelenlétét is. A kezelt és kezeletlen bőrminták kapcsolatát jellemző Raman térképeket készítettem (eloszlási profil). Az így kapott térkép-spektrumokból jól olvasható az egyes készítmények helyzete. A nagyobb intenzitás (melegebb színek) nagyobb egyezést jelez a referencia-spektrummal.

A készítmények Raman térképeit a 9. ábra mutatja. Az általam vizsgált hidrogél esetében a hatóanyag leginkább a bőr felső rétegeiben, az epidermiszben és a dermisz felső részében található. Az o/v krém a bőr mélyebb rétegeibe hatolva leginkább a dermiszben volt detektálható. Ez annak köszönhető, hogy az emulgens fokozza a bőrön keresztüli permeációt. A v/o krém esetében a készítmény nagy része a stratum corneumban található, a mélyebb rétegekbe nem jutott el a készítmény. Ennek oka lehet, hogy a készítmény külső fázisa az olajos fázis, amely így nehezen tud áthaladni az epidermisz hidrofil rétegén.



9. ábra Raman korrelációs térképek, a készítmények eloszlása humán bőrben hidrogélell, o/v krémmel és v/o krémmel történő kezelést követően. Kontrollként a kezeletlen bőr látható.

A készítmények relatív mennyisége: piros > sárga > zöld > kék.

Ezek az eredmények jól korreláltak a diffúziós cella (HSE, Strat-M) és a skin PAMPA eredményeivel. A Raman térképezés során is az o/v krém volt a leghatékonyabb a permeációt tekintve, ezt követte a hidrogél, majd a v/o krém.

A 2. kísérleti rész összefoglalása

A vizsgálatok során a Strat-M membrán és a skin PAMPA módszer jelentős korrelációt mutatott a HSE membránnal összehasonlítva a különböző dermális készítmények permeációját. A különböző készítményekből permeálódott API mennyisége azonban eltérő volt, ami a módszerek szelektivitását bizonyítja. Az IVPT tesztek előtt az alkalmazásuk előnyös lehet, mivel a HSE-hez hasonlóan képes kimutatni különbségeket a készítmények között eredmények alapján a Raman spektroszkópia alkalmas lehet a hatóanyagok bőrben való eloszlásának tanulmányozására és a hatóanyag követésére a különböző bőrrétegekben. A mérésekből megállapítható, hogy a Raman térképezés eredményei szoros összefüggésben vannak a Strat-M, a skin PAMPA és az IVPT módszerek eredményeivel.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Diffúziós cellák összehasonlító vizsgálata

- Szignifikáns különbség volt két típusú Franz cellás készülék eredményei között.
- Membránfüggő volt az, hogy az egyes készítményekből melyik készüléken permeálódott több hatóanyag. A készülékekre nem lehetett általános összefüggést megállapítani.
- A hatósági értékelés és engedélyeztetés szempontjából ezen eredmények figyelemfelkeltőek lehetnek.

II. Szintetikus Strat-M membrán vizsgálata

- A Strat-M membránon mért eredmények a korábban jól definiált cellulóz membránnal és hőszeparált humán epidermisszel kerültek összehasonlításra.
- Az eredmények alapján az innovatív szintetikus Strat-M membránon szignifikánsan kevesebb hatóanyag jutott át a cellulóz membránhoz viszonyítva, és közel azonos eredményt adott a HSE-n mért értékekkel, köszönhetően a speciális bőrimitáló tulajdonságainak. A HSE-n mért kumulatív mennyiségeket vizsgálva a Strat-M membrán jó korrelációt mutatott a humán epidermisszel különböző összetételű készítmények esetén is. A HSE-n jól detektálható penetrációfokozó hatást a Strat-M membrán jól tudta modellezni.
- Ezek alapján a szintetikus Strat-M membrán javasolható IVPT mérések során a humán epidermisz helyettesítésére a preformulációs szakban, kiküszöbölve ezzel a biológiai membrán hátrányos tulajdonságait.

III. Skin PAMPA módszer vizsgálata

- A cellulóz membránhoz viszonyítva a skin PAMPA membránon szignifikánsan kevesebb hatóanyag permeálódott, a HSE-n végezett tesztekhez képest viszont szignifikánsan több hatóanyag jutott át. A skin PAMPA membrán áteresztőbbnek bizonyult a hatóanyag kumulatív mennyisége szempontjából, mint a Strat-M membrán.
- A különböző készítmények összehasonlításakor a Strat-M membránhoz hasonlóan a skin PAMPA membrán is jól modellezte a HSE-n kapott eredményeket. A módszer különbséget tudott tenni az egyes készítmények között.
- Megállapítható, hogy a skin PAMPA módszer is alkalmas lehet a HSE membrán helyettesítésére, azzal a kitételrel, hogy csak rövidebb, 6 órás vizsgálati időtartam javasolt a membrán integritás biztosítása végett.

IV. Raman spektroszkópia vizsgálata

- A Raman spektroszkópiával végzett kémiai térképezés módszere került vizsgálatra, mely során a teljes bőrön keresztüli penetráció vizsgálható. A legújabb EMA ajánlásban már említésre kerül, ezért fontos a módszer alkalmazhatóságának vizsgálata.
- Megállapítható, hogy a módszer alkalmas különböző összetételű készítmények közötti különbségek kimutatására. A penetrációfokozó hatás jól detektálható volt követve a hőszeparált humán epidermiszen végzett mérések eredményeit.
- A Raman térképezés jó korrelációval egészíti ki a kvantitatív módszerek eredményeit.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Stella Zsikó**; Kendra Cutcher; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs; Attila Gácsi; Gabriella Baki; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Nanostructured Lipid Carrier Gel for the Dermal Application of Lidocaine: Comparison of Skin Penetration Testing Methods *PHARMACEUTICS 11: 7 Paper: 310, 11 p. (2019) Q1, IF: 4.421*
- II. **Stella Zsikó**; Erzsébet Csányi; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs; Attila Gácsi; Szilvia Berkó; Methods to Evaluate Skin Penetration *In Vitro* *SCIENTIA PHARMACEUTICA 87: 3 Paper: 19, 21 p. (2019) Q2, IF: -*
- III. **Stella Zsikó**; Erzsébet Csányi; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs; Attila Gácsi; Szilvia Berkó; Novel *In Vitro* Investigational Methods for Modeling Skin Permeation: Skin PAMPA, Raman Mapping *PHARMACEUTICS 12: 9 Paper: 803, 10 p. (2020) Q1, IF: 4.421*

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. Szilvia Berkó; **Stella Zsikó**; Gábor Deák; Attila Gácsi; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs; László Pajor; Zoltán Bajory; Erzsébet Csányi; Papaverine hydrochloride containing nanostructured lyotropic liquid crystal formulation as a potential drug delivery system for the treatment of erectile dysfunction *DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY 12 pp. 2923-2931. 9 p. (2018) Q1, IF: 3.216*

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

- I. **Stella Zsikó**; Kendra Cutcher; Gyöngyi Samu; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Investigation of Lidocaine-Loaded Nanostructured Lipid Carrier for Dermal Delivery *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Pécs, 2018 (PP)*
- II. **Zsikó Stella**; A humán bőrpenetráció modellezésének lehetőségei *SZTE Orvos- és Gyógyszerésztudományok doktori iskolák II. PhD szimpóziuma, Szeged, 2018 (VP)*
- III. **Zsikó Stella**; Az *in vivo* humán bőrpenetráció modellezésének lehetősége a hármas megközelítés módszerrel *XIII. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2018 (VP)*
- IV. **Stella Zsikó**; Szilvia Berkó; Erzsébet Csányi; Skin penetration investigational methods *I. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2019 (VP)*

- V. **Stella Zsikó**; Kendra Cutcher; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs; Attila Gácsi; Gabriella Baki; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Lidokain tartalmú nanostrukturált lipid hordozó vizsgálata, különböző bőrpenetrációs mérési módszerek összehasonlítása
Gyógyszertechológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, 2019 (PP)
- VI. **Stella Zsikó**; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Study of Skin Penetration Testing Methods
II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2020 (VP)
- VII. Szilvia Berkó; **Stella Zsikó**; Erzsébet Csányi; New perspectives of skin penetration investigational methods for dermal preparations
XVI. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Debrecen, 2020 (VP)
- VIII. **Stella Zsikó**; Szilvia Berkó; Erzsébet Csányi; New perspectives of skin penetration testing methods
Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2020 (VP)
- IX. **Stella Zsikó**; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs; Attila Gácsi; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Comparison Study of Skin Penetration Testing Methods
12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Vienna, 2021 (PP)
- X. **Zsikó Stella**, Csányi Erzsébet, Berkó Szilvia; Bőrimitáló membrán vizsgálata félszilárd gyógyszerkészítmények bőrpenetrációs tulajdonságainak jellemzésére
IV. Fiatal technológusok fóruma, 2021 (VP)

ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

- I. **Zsikó Stella**; Papaverin-hidroklorid tartalmú topikális készítmény fejlesztése és vizsgálata
XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, 2017 (VP)
- II. **Stella Zsikó**; Gábor Deák; Attila Gácsi; Anita Kovács; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Development and investigation of papaverine hydrochloride containing nanostructured systems for the treatment of erectile dysfunction
12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Szeged, 2018 (PP)