

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**Hatóanyagok biológiai membránokon keresztüli
permeációjának vizsgálata**

Csizmazia Eszter

Témavezető:
Dr. Csányi Erzsébet

Szeged
2011

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Oktatási Program
Programvezető: Prof. Dr. Révész Piroska

Gyógyszertechnológiai Intézet
Témavezető: **Dr. Csányi Erzsébet**

Csizmazia Eszter

Hatóanyagok biológiai membránokon keresztüli permeációjának vizsgálata

Szigorlati Bizottság:

Elnök: *Prof. Dr. Révész Piroska*, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet
Tagok: *Dr. Dredán Judit Ph.D.*, SE Gyógyszerészeti Intézet
Dr. Ducza Eszter Ph.D., SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló Bizottság:

Elnök: *Prof. Dr. Hohmann Judit*, SZTE Farmakognózi Intézet
Opponensek: *Dr. Bácskay Ildikó Ph.D.*, DE Gyógyszertechnológiai Intézet
Francsicsné Dr. Czinege Erzsébet Ph.D., Richter Gedeon Nyrt.
Tagok: *Dr. Bajdik János Ph.D.*, sanofi-aventis/Chinoin Zrt.
Dr. Hajdú Zsuzsanna Ph.D., SZTE Farmakognózi Intézet

Szeged

2011

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a gyógyszerek helyi alkalmazása, ami számos hatóanyag esetében előnyt jelenthet az orális bevitellel szemben. Népszerűségének legfőbb oka, hogy elkerülhető vele a máj metabolizáló hatása, ezáltal a hatóanyag jobb biohasznosíthatóságát eredményezheti. Továbbá csökken az orális alkalmazás esetén tapasztalható plazma csúcskoncentráció, így a mellékhatások mértéke is csökken. A lokális alkalmazás előnyei közé sorolható ezenkívül, hogy folyamatos gyógyszerbevitelt tesz lehetővé, nyújtható és tervezhető a hatás időtartama, rövid felezési idejű farmakonok is bevihetők, és egy jól formulált készítménnyel a beteg compliance is javítható.

A nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagokat (NSAID) széles körben alkalmazzák a különböző krónikus váz- és izomrendszeri megbetegedések (pl. rheumatoid arthritis, osteoarthritis) kezelésében. Az ezen csoportba tartozó hatóanyagok azonban erős nyálkahártya irritáló hatással rendelkeznek a gastrointesztinális traktusban, ahol akár vérzést, fekélyt is okozhatnak. Így helyileg történő alkalmazásuk megoldása különös jelentőséggel bír. A cél, olyan készítmény fejlesztése, mely biztosítja a hatóanyag jó transzdermális permeációját, és a farmakont egészen a gyulladt ízületig vagy izomig juttatja. Ezzel az alkalmazási móddal csökkenthetők az orális mellékhatások, valamint gyorsabb fájdalomcsillapítás és hosszantartó, egyenletes hatóanyagszint biztosítható az alkalmazás területén.

A fő probléma azonban a lokális hatóanyag bevitellel, hogy csak kevés hatóanyag képes leküzdeni a szervezet védő barrierjeit. A bőr és a nyálkahártya alapvető funkciója, hogy barriert képezzen az idegen anyagok és a párolgó víz számára. A szervezet legjelentősebb barrierje a bőr, melynek közvetlenül a külvilággal is érintkező, külső rétege a stratum corneum (SC). Erre a rétegre az úgynevezett „tégla-fal-szerkezet” jellemző, ahol a „tégla-knak” elszarusodott, sejtmag nélküli corneocyták felelnek meg. Közöttük pedig lipid- és vízrétegek helyezkednek el. Azonban a stratum corneum ennek a szigorúan rendezett struktúrájának és kitűnő diffúziós ellenállásának köszönhetően számos hatóanyag bejuttatását is megnehezíti, olykor lehetetlenné teszi. A bőrön keresztüli diffúziós folyamatok megértése elengedhetetlen a transzdermális gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztéséhez.

A perkután hatóanyag felszívódás optimalizálása egy nagyon fontos és innovatív kutatási terület a modern terápiában. Figyelembe kell venni a barrier természetét, a hatóanyag és a membrán fizikai-kémiai sajátosságait, valamint a gyógyszertechnológusok számára elérhető hatóanyag penetrációfokozási lehetőségeket. A cél, hogy a különböző technikák közül

megtaláljuk a leghatékonyabb és emellett a legbiztonságosabb módszert, mely nem okoz a SC szerkezetében irreverzibilis károsodást. A rendelkezésre álló módszerek közül a Ph.D. munkám során a SC módosításán alapuló lehetőségekkel foglalkoztam. Ezek közé sorolható a bőr hidratációjának fokozása. A víz a hidrofil domének közé épül be, ezáltal a SC megduzzad, sejtjei eltávolodnak egymástól, és a hatóanyag a sejtek közötti járatokban intercellulárisan bejuthat a mélyebb rétegekbe. Másik lehetőségként olyan kémiai penetrációfokozó anyagok alkalmazása jöhet szóba, melyekkel reverzibilisen lehet megnyitni a SC szigorúan rendezett szerkezetét.

Az utóbbi időben a transzdermális út mellett a hatóanyag biohasznosíthatóságának növelése érdekében más lokális beviteli kapuk is előtérbe kerültek. Új és érdekes kutatási terület az amnion membránon (AM) keresztüli permeáció tanulmányozása. Az amnion membrán a placenta legbelső rétege, melyet a szemészetben különböző szaruhártya betegségeknél és sérüléseknél használnak transzplantációra. A mesterséges anyagokkal és terápiás kontaktlencsékkel szemben az AM jól tolerálható, szövetbarát. Transzplantációja alternatív lehetőséget biztosít a különböző szaruhártya betegségek, fekélyek kezeléséhez. A transzplantáció után minden esetben lokális kezelés szükséges. Azonban a membrán barrier kapacitása és a farmakokinetikai tulajdonságai eddig az irodalomban nem voltak ismeretesek.

2. CÉLKITŰZÉS

Ph.D. értekezésem témája hatóanyagok biológiai membránokon keresztüli permeációjának vizsgálata.

1. A munkám első részében a bőrön keresztüli, transzdermális hatóanyag permeációt kívántam tanulmányozni. Kutatómunkámban az alábbi célok megvalósítását tűztem ki:

- különböző félszilárd gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése,
- a fejlesztett rendszerek bőrhidratáló és a bőr barrier funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo*,
- termoanalitikai mérések kivitelezése a minták hidratáló hatásának és a vízkötési mechanizmusok kapcsolatának tisztázására,
- Ibuprofen tartalmú készítmények reológiai tulajdonságainak tanulmányozása,
- hatóanyag felszabadulási és diffúziós vizsgálatok végzése Franz diffúziós cellával szintetikus membránon *in vitro*,
- hatóanyag permeációs vizsgálatok végzése Franz diffúziós cellával humán epidermiszen *ex vivo*, és különböző penetrációfokozó segédanyagok hatásának vizsgálata,
- a stratum corneum szerkezetének molekuláris szinten történő tanulmányozása, és a penetrációfokozók hatásmechanizmusának tisztázása ATR-FTIR spektroszkópiával *in vivo*.

2. A munkám második része a humán amnion membránon keresztüli hatóanyag permeáció tanulmányozása volt. Célul tűztem ki:

- a membrán barrier és rezervoár funkciójának vizsgálatát Franz diffúziós cellával egy antibiotikum (Ofloxacin) tartalmú szemcsepp alkalmazását követően *in vitro* és *ex vivo*.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

Az előállított minták között szerepeltek liotróp folyadékkristályos rendszerek (LLC), polimer emulgens (PTR1) tartalmú hidrogél és gél-emulzió, alginát (PA) tartalmú hidrogél és olaj diszperzió, Carbopol alapú hidrogél. Összehasonlítási alapul két, a mindennapi bőrgyógyászatban általánosan alkalmazott anionos, illetve nemionos emulgenst tartalmazó o/v krém (Unguentum hydrophilicum anionicum és Unguentum hydrophilicum nonionicum, Ph.Hg.VII.) szolgált.

Hatóanyagként egy NSAID hatóanyagot, az Ibuprofent (IBU) választottam, amit a Carbopol 971 alapú hidrogélbe inkorporáltam (IBU gél), és emellett készítettem két azonos összetételt, melyek penetrációfokozó segédanyagot is tartalmaztak. Az egyik Transcutolt (TR, Diethylene glycol monoethylether, Gattefossé and S&D Chemicals Ltd, Magyarország) tartalmazott (IBU-TR gél), a másik a penetrációfokozók új generációjához tartozó cukorészterek (SE) közül a szacharóz-laurátot (D-1216, Mitsubishi-Kagaku Foods Co, Japán) (IBU-SE gél).

Az AM permeabilitásának vizsgálatához 3%-os forgalomban levő Ofloxacin (OFL) tartalmú antibiotikus szemcseppet (Floxal[®]; Dr. Mann-Pharma, Németország) használtam.

3.2. Módszerek

In vivo tesztek

A gyógyszerhordozó rendszereket először egészséges önkénteseken tesztelve *in vivo* vizsgáltam. Bőrük kezelés előtti és utáni hidratáltsági állapotát Corneometer[®] CM 825 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Németország) segítségével határoztam meg. A bőr barrier funkciójának épségére utaló transzepidermális vízvesztést (TEWL) Tewameterrel[®] TM 300 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Németország) állapítottam meg.

Termoanalitikai vizsgálatok

A termogravimetriai vizsgálatokra MOM Derivatograph-C (MOM GmbH, Magyarország) típusú készüléket használtam, mellyel a készítmények víztartalmáról és a vízkötődési mechanizmusokról nyerhető információ. Lassú fűtési sebességnél a minták fűtése 25 °C-tól 120 °C-ig 1 °C/min sebességgel történt, gyors fűtési sebességnél 25 °C-tól 200 °C-ig 10 °C/min sebességgel.

Reológiai mérések

Reológiai mérésekkel tanulmányoztam a készítmények viszkozitását és folyási sajátságait. A reológiai vizsgálatok PaarPhysica MCR101 típusú, kúp-lap rendszerű reométerrel (Anton Paar GmbH, Ausztria) (kúp szöge: 1°) történtek. A nyírási sebesség 0,1 1/s-tól 100 1/s-ig nőtt (felszálló ág), és 100 1/s-tól 0,1 1/s-ig csökkent (leszálló ág). A nyírási idő mindkét szegmens esetében 300 s volt.

Hatóanyag diffúziós és permeációs vizsgálatok

A membrán diffúziós és permeációs vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, USA) végeztem. 0,30 g mintát helyeztem donor fázisként szintetikus membránra (Porafil membránszűrő, cellulóz-acetát, a pórusátmérő: 0,45 µm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Németország) (*in vitro*) és hő-szeparált epidermiszre illetve amnion membránra (*ex vivo*).

Az amnion membrán rezervoár funkciójának vizsgálatához a membránokat 10 ml 3%-os Floxal szemcseppben áztattam 1 (1. csoport), 2 (2. csoport) és 3 (3. csoport) órán keresztül.

A hatékony diffúziós felület 1,767 cm² volt. Akceptor fázisként 37±0,5 °C-ra termosztált foszfát puffert (PBS pH=7,4±0,15) alkalmaztam. A bőrpermeációs kísérletek időtartama 24 (*in vitro*), illetve 48 óra (*ex vivo*) volt, az AM-on keresztüli permeációs vizsgálatok hossza 1,5 óra volt, az AM rezervoár funkcióját pedig 7,5 órán keresztül tanulmányoztam.

Humán bőrpreparátum készítése

A bőrpenetrációs vizsgálatokhoz plasztikai sebészeten végzett hasi redukciós műtétekből származó bőrt használtam. Az epidermiszt a dermisztől hő-szeparálási eljárással választottam

el. A szubkután zsírtól megszabadított bőrt 90-120 s-ra 60 °C-os vízfürdőbe helyeztem, majd az epidermiszt csipesszel óvatosan elválasztottam az alatta elhelyezkedő dermisztől.

Humán amnion membrán készítése

A humán amnion membrán (AM) a placenta legbelső rétege, melyet császármetszés után választanak le a magzatburokról. Legkésőbb 1 órával a kivétel után foszfát pufferbe ($\text{pH}=7,4\pm0,15$) áztattuk a felhasználásig, vagy fagyasztva tároltuk.

ATR-FTIR spektroszkópai vizsgálatok

Az Fourier transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia kiváló módszer a SC szerkezetének molekuláris szinten történő tanulmányozására. Jellemezhető vele a bőr víz, lipid és protein tartalma. Vizsgálható a hatóanyag penetráció, és alkalmas penetrációfokozó segédanyagok hatásmechanizmusának tisztázására. A tape stripping technika lehetővé teszi továbbá a bőrfelszínen kívül a mélyebb rétegek tanulmányozását is. Egy adhezív tapasz (D-Squame[®] Skin sampling discs, CuDerm Corporation, Dallas, USA) segítségével minta gyűjthető a bőr egymás alatti rétegeiből, majd a tapaszt a készülék ZnSe kristályára helyezve, infravörös sugárzással vizsgálható a SC összetétele.

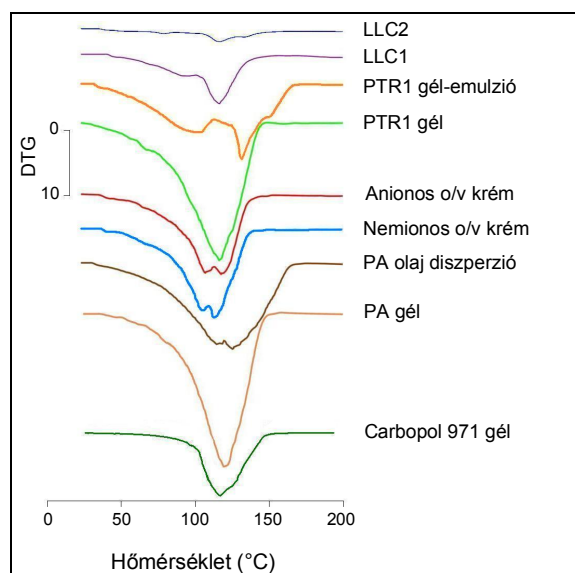
Az ATR-FTIR spektroszkópai vizsgálatokat horizontális ATR kristállyal ellátott (ZnSe, 45°) Avatar 330 FTIR spectrometerrel (Thermo Nicolet, USA) végeztem. A spektrumokat 4000 cm^{-1} és 400 cm^{-1} hullámszám között vettem fel 4 cm^{-1} optikai felbontással, 32 szkenneléssel. A vizsgálatokat 15 hetes hím SKH-1 szőrtelen egereken végeztem altatásban. 30 perccel bőrük készítményekkel történő kezelése után az adhezív tapasz segítségével mintákat gyűjtöttem a bőrük felső rétegéből, egymás után 18-szor. Majd minden 3. tapaszcsoportról spektrumot vettem fel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A félszilárd gyógyszerhordozó rendszerek vizsgálata

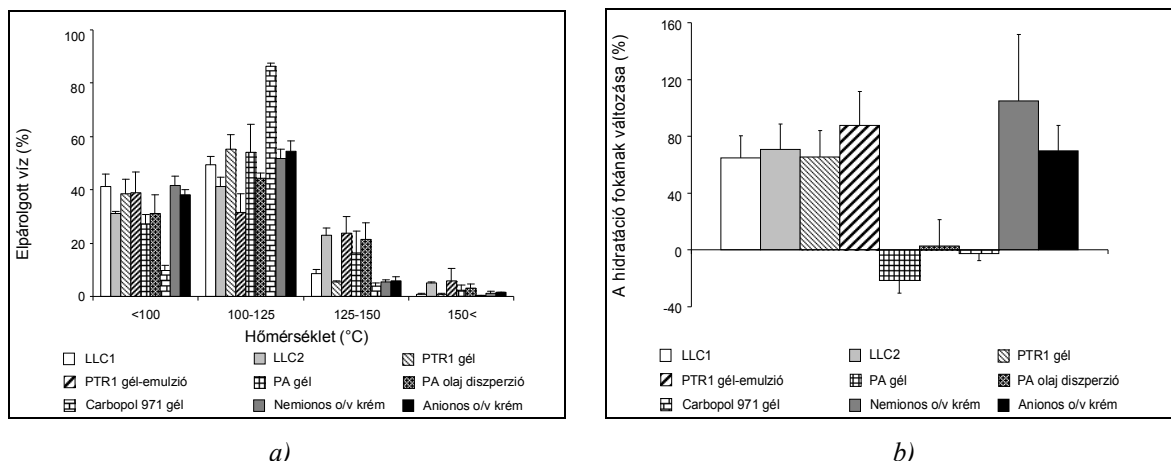
In vivo tesztek és termogravimetriai prediktáló módszer a hidratáló hatás meghatározására

A termogravimetriai mérések alapján megállapítható, hogy azokban az összetételekben, ahol a szerkezetnek köszönhetően különböző vízterek feltételezhetők (LLC, a polimer emulgens tartalmú gél-emulzió, PA olaj diszperzió, anionos és nemionos o/v krém esetében), a DTG görbéken több csúcs tapasztalható. Ezek közül az alacsonyabb hőmérsékleten (100 °C) jelentkező szabad vagy töltővíznek, a magasabb hőmérsékleten (140 °C) lévő kötött víznek feleltethető meg (1. ábra).



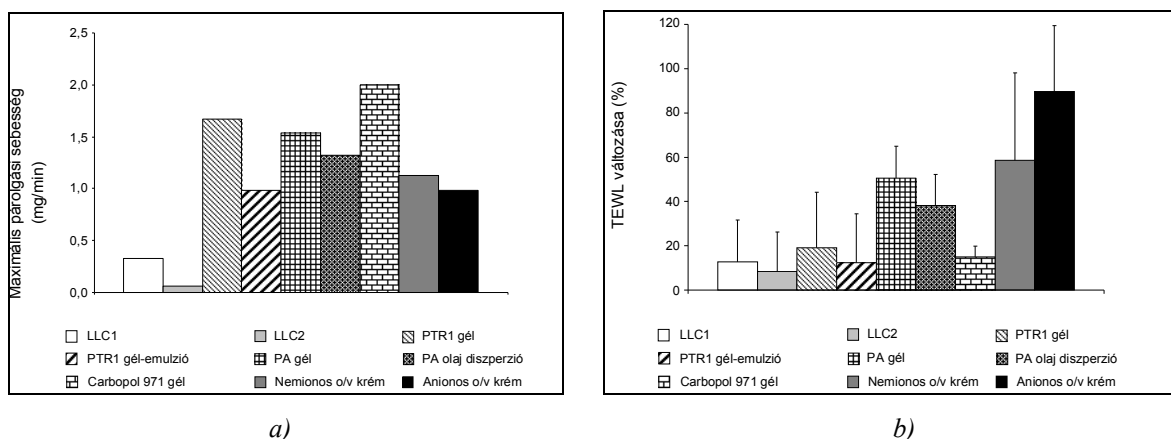
1. ábra A vizsgálati minták DTG görbéi

A mért tömegcsökkenésből kiszámítható, hogy a készítményből elpárolgott víz hány százaléka mely hőmérséklet tartományban távozott a rendszerből. Megállapítható, hogy a tagoltabb DTG görbével rendelkező készítmények a különbözőképpen kötött vizet több lépcsőben, időben elhúzódva képesek leadni, tartós hidratáló hatást előidézve ezzel (2a ábra). Megfigyelhető, hogy az összetettebb szerkezetű minták, melyek erősebb vízkötő tulajdonságúak, a corneometriás vizsgálat során is jobb hidratáló hatást mutattak (2b ábra).



2. ábra a) A készítményekből elpárolgott víz aránya az egyes hőmérséklet tartományokban b) A hidratáció fokának változása

A TG görbékből kiszámítottam a maximális párolgási sebességeket is (mg/min), melyek összhangban vannak a transzepidermális vízvesztés mérése során kapott eredményekkel (3. ábra).



3. ábra a) A maximális párolgási sebesség b) A TEWL változása

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a termogravimetriai analízisünk kiválóan alkalmas arra, hogy felszilárd gyógyszerhordozó rendszerek hidratáló hatásának mértékét és tartósságát prediktáljuk.

4.2. Az Ibuprofen tartalmú hidrogélek tanulmányozása

A továbbiakban Ibuprofen (IBU) tartalmú Carbopol 971 hidrogéleket vizsgáltam, melyek közül az első nem tartalmazott penetrációfokozó segédanyagot, a másodikban Transcutolt, a harmadikban pedig cukorésztert alkalmaztam penetrációfokozóként.

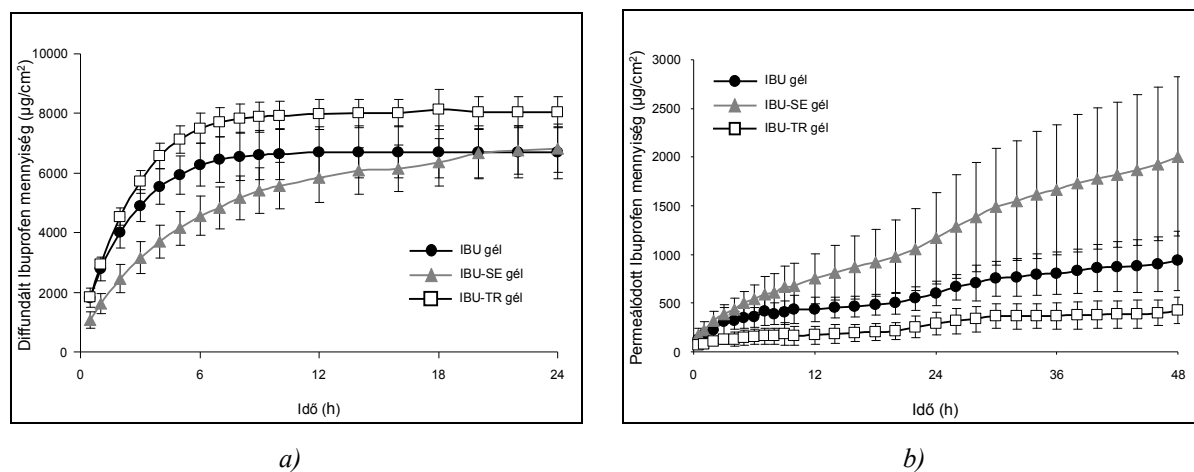
Reológiai vizsgálatok

A reológiai vizsgálatokkal a készítmények folyási sajátságai, illetve a külső erő hatására bekövetkező deformációjuk tanulmányozhatók. A méréseink alapján megállapítható, hogy az IBU tartalmú minták (IBU gél, IBU-SE gél, IBU-TR gél) valamivel könnyebben deformálhatók, mint a hatóanyagmentes hordozó (Carbopol 971 gél). A hatóanyag inkorporálása azonban nem okoz jelentős változást a készítmények viszkozitásában.

Hatóanyag diffúziós és permeációs vizsgálatok

Az IBU ezen készítményekből történő diffúzióját és bőrpenetrációját vertikális Franz diffúziós cellával vizsgáltam. A szintetikus membránon keresztüli *in vitro* vizsgálatok azonban mindössze a hatóanyag felszabadulásról és diffúzióról adnak információt. A hatóanyag bőrbe történő penetrációját *ex vivo* humán epidermiszen szükséges vizsgálni.

A hatóanyag diffúziós vizsgálatok eredményéből megállapíthatjuk, hogy a Transcutol hatékonyan fokozta az IBU diffúzióját. A SE viszont inkább gátolta a diffúziós folyamatot (4a ábra).

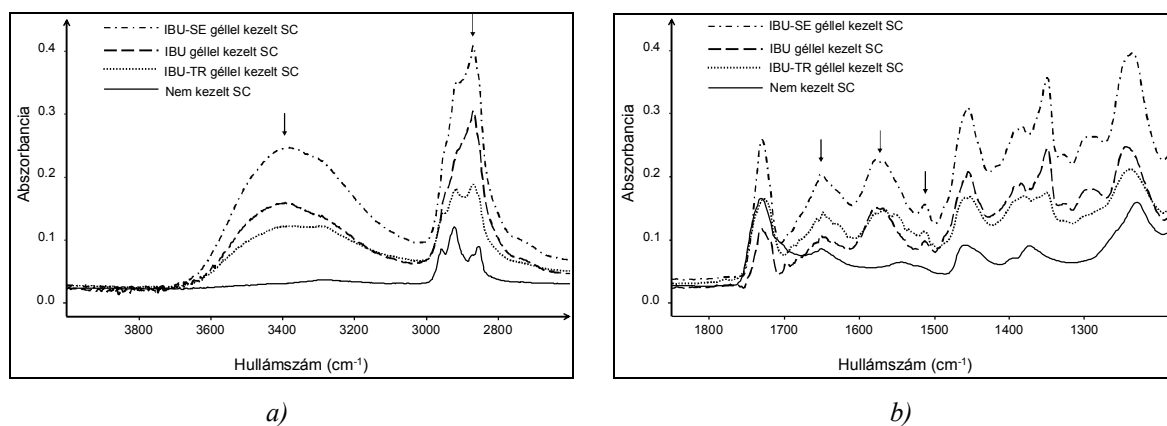


4. ábra a) A diffundált Ibuprofen mennyiség *in vitro* b) A permeálódott Ibuprofen mennyiség *ex vivo*

Az epidermiszen történő vizsgálatoknál azonban éppen ellenkező eredményeket kaptunk. A SE szignifikánsan fokozta a permeációt, míg a TR inkább csökkentette. Ez a két penetrációfokozó eltérő hatásmechanizmusából adódik. A SE ugyanis a bőr szerkezetének minimális módosításával képes a penetrációt fokozni, a TR pedig nem a bőrszerkezetben okoz változást, hanem a diffúziót fokozza. A csökkent *ex vivo* értékek pedig azzal magyarázhatók, hogy a TR képes a bőrben depót képezni és a hatóanyag raktározódását elősegíteni (4b ábra).

FTIR analízis

Az FTIR analízist a permeációs vizsgálatokban tapasztalt alátámasztására végeztem. Folytonos vonallal jelölve látható a nem kezelt bőr spektruma. A víz O-H kötéseinek sávjai 3000-3500 cm^{-1} közötti hullámszám tartományban detektálhatók. Ha ebben a régióban intenzívebb és szélesebb csúcs mutatkozik kezelés hatására, akkor az a bőr hidratálódására utal. A SC lipidek szénhidrogén láncait jelölő metilén csoportok ($-\text{CH}_2$) sávjai a 2920 cm^{-1} -es és a 2850 cm^{-1} -es hullámszámnál a jelentkezők. Ebben a régióban figyelhetjük meg, ha a bőrön alkalmazott anyagok megbontották a SC-ra jellemző szabályos rendezett struktúrát, illetve lipideket vontak ki a bőrből. A különböző penetrációfokozó segédanyagok hatására bekövetkező lipid struktúrabeli változások jól követhetők a spektrumon. Ilyenkor vagy lecsökken a lipidek mennyisége a bőrben a kivonás hatására, amit a csúcsok magasságának és szélességének csökkenése mutat, vagy a lipidek fluiditása nő meg a SC-ban, ekkor a CH_2 csúcsok magasabb frekvencia felé tolódnak el. A csúcsok kiszélesedéséből pedig a láncok rotációs szabadságának megnövekedésére következtethetünk. A SC fehérjék szerkezetének változását az 1650 cm^{-1} -es és 1550 cm^{-1} -es hullámszám körül kísérhetjük figyelemmel az amid I ($\text{C}=\text{O}$), illetve amid II ($\text{N}-\text{H}$) sávok segítségével. Ezek a frekvenciák érzékenyek a SC proteinjeinek konformáció változására.



5a-b) ábra A nem kezelt és az Ibuprofen tartalmú hidrogélekkel kezelt SC FTIR spektrumai

Az FTIR vizsgálatok eredménye azt mutatja, hogy mindhárom hidrogél jelentősen megnövelte a SC víztartalmát (5. ábra). A TR tartalmú gél hasonló mértékű hidratációt eredményezett, mint a penetrációfokozó nélküli készítmény. A legintenzívebb hidratációt azonban a SE tartalmú géllal sikerült elérnünk. Ami a lipid szerkezetet illeti, nem tapasztaltunk abszorbancia csökkenést. Ellenkezőleg, a 2850 cm^{-1} -es hullámszámnál az abszorbancia jelentősen megnőtt. Ez azzal magyarázható, hogy a készítményünk lipofil

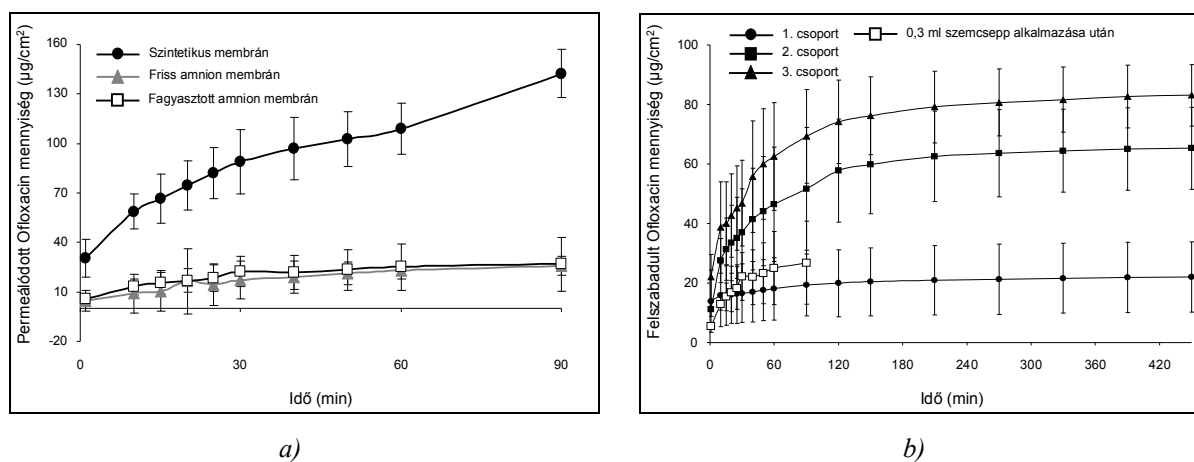
sajátságú komponensei beépültek a bőrbe. A legszembetűnőbb növekedés a SE tartalmú készítménnyel történő kezelés hatására volt megfigyelhető. Mindhárom esetben minimális eltolódást tapasztaltunk. Az amid I sávot 1650 cm^{-1} hullámszám körül találtuk, ami a kezelés hatására sem tolódott el. Az amid II csúcs azonban erős átfedést mutat 1570 cm^{-1} hullámszám körül a kezelt bőr esetében, mivel a készítményünkben jelen levő karboxilát csoportok épp itt adnak jelet. A készítmények tehát a fehérjék szerkezetében is mindössze minimális változást okoztak. Az Ibuprofent sikeresen tudtuk detektálni mindhárom kezelés után 1512 cm^{-1} hullámszámnál. A SE volt képes leginkább fokozni az IBU penetrációt. A SC egymás alatti rétegeinek hatóanyag eloszlását tanulmányozva elmondhatjuk, hogy a SE tartalmú géllal történő kezelés után az azonos hatóanyag tartalom ellenére, minden egyes rétegben magasabb IBU mennyiség mutatkozott, mint az IBU gél esetében. Az IBU-TR géllal történő kezelés után a SC legfelső rétegében kiemelkedően magas értéket találtunk, ami alátámasztja a feltételezésünket, miszerint a TR és a hatóanyag a bőrben raktározódik, és depót képez. Elmondhatjuk tehát, hogy a cukorészter típusú penetrációfokozónk hatékonyan képes a bőrt hidratálni, és ezáltal az IBU penetrációját fokozni, anélkül, hogy a SC szerkezetében jelentősebb, irreverzibilis változásokat idézne elő.

4.3. A humán amnion membrán permeabilitás vizsgálata

A mesterséges anyagok, terápiás kontaktlencsék szemészeti tolarenciája problémás lehet. Az amnion membrán azonban jól tolerálható, felszívódik, vagy integrálódik a szaruhártyába. Transzplantációja alternatív lehetőséget biztosít a különböző szaruhártya betegségek, fekélyek kezeléséhez. A barrier kapacitása és a farmakokinetikai tulajdonságai azonban eddig nem voltak ismeretesek az irodalomban. Ezért humán amnion membránon is végeztem hatóanyag permeációs vizsgálatokat egy Ofloxacin tartalmú forgalomban levő antibiotikus szemcsepp alkalmazását követően.

Vizsgálataimat először friss membránon végeztem, és a szintetikus membránon keresztüli diffúziós eredményekkel vetettem össze. Tapasztalataink szerint a membrán ugyan barriert képez, de a hatóanyag átjut rajta. A továbbiakban azt kívántam tanulmányozni, hogy a membrán fagyasztása befolyással van-e a permeabilitásra. Gyakorlati szempontból praktikusabb, ha a membránok fagyaszthatók, így a transzplantációknak nem kell másik műtéthez kötődniük. Ezért fagyasztott AM-on is végeztem vizsgálatokat. Az eredmények alapján elmondható, hogy nincs szignifikáns különbség a friss és fagyasztott AM permeabilitása között (*6a ábra*).

Feltételezések szerint az AM rezervoár funkcióval is rendelkezik. Ez előnyös lehet, mert egy előkezelt AM a transzplantáció után hatóanyag leadó rendszerként funkcionálhat. Ezáltal a hatóanyag leadása gyorsabban megkezdődne, és folyamatosabb lenne, mint csepegtetésnél. Az eredmények azt mutatták, hogy az AM rezervoár kapacitása függ az áztatás idejétől. Több Ofloxacin tud tárolni a membrán, ha az áztatás időtartamát 1 órától kettőre emeljük. További áztatás (3 óra) azonban már nem növelte szignifikánsan a felszabadult hatóanyag mennyiségét. Az 1 órás áztatás eredménye ekvivalens a szemcsepp alkalmazása utáni eredményekkel (6b ábra).



6. ábra a) Az AM-on permeálódott Ofloxacin mennyisége b) Az AM-ból felszabaduló hatóanyag mennyiség
Floxalban történő áztatás után

Klinikai jelentősége az AM transzplantációnak a korai posztoperatív periódusban lehet, amikor még gyakori helyi kezelés szükséges, és az AM egy nyújtott hatóanyag leadású rendszerként funkcionálhat.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám célja hatóanyagok biológiai membránokon keresztüli permeációjának tanulmányozása volt. A kísérleti eredményeim az alábbiakban foglalhatók össze:

- Az összetett szerkezettel rendelkező készítmények a különbözőképpen kötött vizet több lépcsőben, időben elhúzódva képesek leadni, tartós hidratáló hatást előidézve ezzel.
- Az eredményeink alapján a termogravimetriai analízisünk kiválóan alkalmas arra, hogy félszilárd rendszerek hidratáló hatásának mértékét és tartósságát prediktáljuk. Alkalmazható potenciális gyógyszerhordozó rendszerek idő- és költségkímélő szűrésére az *in vivo* tesztek számának csökkentésével.
- A hatóanyag inkorporálása nem változtat jelentősen a hordozó konzisztenciáján.
- A Transcutol hatékony diffúziófokozó az Ibuprofen számára, de a bőrpenetrációt nem tudta növelni.
- A cukorészter hatékonyabb penetrációfokozó az Ibuprofen számára, a hatóanyag penetrációt jelentősen növelte.
- A szintetikus membránon keresztüli *in vitro* vizsgálatok mindössze a hatóanyag felszabadulásról és diffúzióról adnak információt. A hatóanyag bőrbe történő penetrációját, kölcsönhatását a bőrrel, az esetleges raktározódását és a penetrációfokozók hatásmechanizmusát humán epidermiszen szükséges vizsgálni.
- Az ATR-FTIR spektroszkópia tape stripping módszerrel kombinálva alkalmas nem-invazív módszer a SC hidratációjának vizsgálatára, a lipid szerkezet változásainak követésére, a fehérjekonformáció-változás tanulmányozására, hatóanyagok penetrációjának követésére, penetrációfokozó segédanyagok hatásmechanizmusának felderítésére.
- A Transcutol az Ibuprofen raktározódását idézi elő a bőrben, ezzel nyújtott hatást biztosít.
- A cukorészter tartalmú készítménnyel nagy mértékű hidratációt és az Ibuprofen penetrációjának növekedését tudtuk elérni, jelentős bőrszerkezeti változás nélkül.
- A Franz diffúziós cella az amnion membránon keresztüli permeációs vizsgálatokhoz is alkalmas modellt biztosít.
- Az AM kettős farmakokinetikai hatással bír helyileg alkalmazott hatóanyagok esetében: barrier és rezervoár funkcióval egyaránt rendelkezik.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. M. Resch, B. Resch, **E. Csizmazia**, L. Imre, J. Németh, P. Révész, E. Csányi:
Permeability of human amniotic membrane to ofloxacin in vitro.
Invest. Ophth. Vis. Sci. (2010) 51, 1024-1027 IF: 3,431
- II. **E. Csizmazia**, M. Budai-Szücs, I. Erős, Zs. Makai, P. Szabó-Révész, G. Varju, E. Csányi:
Thermoanalytical method for predicting the hydration effect permanency of dermal semisolid preparations.
J. Therm. Anal. Calorim. (2010) 102, 313–316 IF: 1,587
- III. **E. Csizmazia**, G. Erős, O. Berkesi, Sz. Berkó, P. Szabó-Révész, E. Csányi:
Ibuprofen penetration enhance by sucrose ester examined by ATR-FTIR in vivo.
Pharm. Dev. Technol. doi: 10.3109/10837450.2010.508076 IF: 0,895
- IV. Miklós D Resch, Béla E Resch, **Eszter Csizmazia**, László Imre, János Németh, Piroska Révész, Erzsébet Csányi:
Drug Reservoir Function of Human Amniotic Membrane.
J. Ocul. Pharmacol. Th. (közlésre elfogadva) IF: 1,457
- V. **Eszter Csizmazia**, Gábor Erős, Ottó Berkesi, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi:
Penetration enhancer effect of Sucrose laurate and Transcutol on Ibuprofen.
J. Drug Deliv. Sci. Tec. (közlésre elfogadva) IF: 0,508

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

- I. M.D. Resch, B.E. Resch, **E. Csizmazia**, L. Imre, J. Nemeth, P. Revesz, E. Csanyi:
Permeability of human amniotic membrane to ofloxacin in vitro, SOE 2009 The 17th Congress of the European Society of Ophthalmology 13-16 June 2009 Amsterdam (FP-BAS-041)

- II. **Csizmazia E.:** *Félszilárd készítmények stratum corneumra gyakorolt hatásának vizsgálata*, Magyar Tudomány Ünnepe, Szegedi Akadémiai Bizottság Székháza, 2009. november 10. Szeged
- III. **Csizmazia E.,** Budai-Szücs M., Erős I., Makai Zs., Szabóné Révész P., Csányi E.: *Új típusú dermális gyógyszerhordozó rendszerek bőrhidratációra gyakorolt hatása*, Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. 2009. november 13-15. Budapest (P-47.)
- IV. Berkó Sz., **Csizmazia E.,** Szabóné Révész P., Csányi E.: *Új típusú alapanyagok és trendek a bőrápolásban*, Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. 2009. november 13-15. Budapest (P-38.)
- IV. **E. Csizmazia,** M. Budai-Szücs, A. Fehér, Zs. Makai, P. Szabó-Révész, E. Csányi: *Effect of new types of dermal delivery vehicles on skin hydration and barrier function*, Skin Forum 11th Annual Meeting 6-7 july 2010 Edinburgh, Scotland (P45.)
- V. Berkó Sz., Erős G., **Csizmazia E.,** Csányi E.: *Egy új in vivo modell bemutatása hatóanyagok bőrön keresztüli penetrációjának vizsgálatára*, Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium 2010. október 4-5. Velence
- VI. Csányi E., **Csizmazia E.,** Berkó Sz.: *Hatóanyagok bőrön keresztüli penetrációjának vizsgálati lehetőségei I., In vitro, ex vivo model*, „XVI. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia” és „VIII. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia” 2010. október 20-22. Siófok (EA-05)
- VII. Berkó Sz., Erős G., **Csizmazia E.,** Csányi E.: *Hatóanyagok bőrön keresztüli penetrációjának vizsgálati lehetőségei II., In vivo egér model*, „XVI. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia” és „VIII. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia” 2010. október 20-22. Siófok (EA-06)
- IX. **Csizmazia E.,** Erős G., Berkesi O., Berkó Sz., Csányi E.: *Hatóanyagok bőrön keresztüli penetrációjának vizsgálati lehetőségei III., FT-IR alkalmazás*, „XVI. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia” és „VIII. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia” 2010. október 20-22. Siófok (EA-07)
- X. **Csizmazia E.:** *FTIR alkalmazása a bőr szerkezeti változásainak vizsgálatához*, Magyar Tudomány Ünnepe, Szegedi Akadémiai Bizottság Székháza, 2010. november 17. Szeged