

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszertechnológiai Intézet

**Ph.D. értekezés tézisei**

**Keresztkötött hialuronsav nanorészecske rendszerek előállítása és  
vizsgálata**

**Maroda Mónika**

Témavezető:

**Dr. Csányi Erzsébet Ph.D.**

**Szeged**

**2013**

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>CÉLKITÚZÉSEK</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>4</b>
3.1	ANYAGOK	4
3.2	KERESZTKÖTÖTT HIALURONSAV NANORÉSZECSCKE (CLHA) RENDSZER VIZSGÁLATA.	4
3.3	MÓDSZEREK	4
3.3.1	<i>Foton korrelációs spektrofotometria (DLS)</i>	4
3.3.2	<i>UV spektrofotometria</i>	4
3.3.3	<i>Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM)</i>	5
3.3.4	<i>Gélkromatográfia (GPC)</i>	5
3.3.5	<i>Reológia</i>	5
3.3.6	<i>Hidratációs és irritációs teszt</i>	5
3.3.7	<i>In vitro hatóanyag felszabadulás és bőrpenetrációs mérések</i>	5
3.3.8	<i>Humán bőrpreparátum készítése</i>	5
3.3.9	<i>In vivo tesztek</i>	5
<b>4</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS</b>	<b>6</b>
4.1	NANORÉSZECSCKE TERMÉKEK EREDMÉNYEI	6
4.1.1	<i>DLS eredmények</i>	6
4.1.2	<i>Hidrodinamikai átmérő</i>	8
4.1.3	<i>TEM eredmények</i>	8
4.1.4	<i>GPC eredmények</i>	9
4.1.5	<i>Transzmittancia eredmények</i>	9
4.1.6	<i>Reológiai eredmények</i>	9
4.2	LINEÁRIS ÉS KERESZTKÖTÖTT HA-T TARTALMAZÓ FÉLSZILÁRD KÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATI EREDMÉNYEI	10
4.2.1	<i>Reológiai mérések eredményei</i>	10
4.2.2	<i>Hidratációs és irritációs vizsgálatok eredményei</i>	10
4.2.3	<i>In vitro diffúzió, penetráció és in vivo vizsgálatok</i>	11
<b>5</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK</b>	<b>15</b>

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Oktatási Program  
Programvezető: Prof. habil. Dr. Révész Piroska, MTA doktor

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

**Maroda Mónika**

## **Keresztkötött hialuronsav nanorészecske rendszerek előállítása és vizsgálata**

### **Szigorlati bizottság:**

#### **Elnök:**

Dr. Révész Piroska MTA doktor, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet

#### **Tagok:**

Dr. Dredán Judit Ph.D., SE Gyógyszerészeti Intézet  
Dr. Zupkó István Ph.D., SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

### **Bíráló bizottság:**

#### **Elnök:**

Dr. Dombi György Ph.D., SZTE Gyógyszeranalitikai Intézet

#### **Opponensek:**

Dr. Vecsernyés Miklós Ph.D., DE Gyógyszertechnológiai Intézet  
Dr. Dér Péter Ph.D., TEVA Gyógyszergyár Zrt.

#### **Tagok:**

Titkár: Dr. Hajdú Zsuzsanna Ph.D., SZTE Farmakognóziái Intézet  
Tag: Dr. Szakonyi Zsolt Ph.D., SZTE Gyógyszerkémiai Intézet

**Szeged**

**2013**

## 1 Bevezetés

A nanorészecskék és a nanogyógyszerek alkalmazása egyre nagyobb teret kap mind a gyógyszerek mind a kozmetikai termékek gyártása során. A nanogyógyszer alapja a nanorészecske, mely lehet például polimer, liposzóma, dendrimer vagy nanocső vagy ezek kombinációja. Ezen anyagok elősegíthetik a közeljövőben a személyre szabott gyógyszerek megalkotását, mellyel lehetőség nyílik a diagnózissal összekötött nagy hatásfokú célzott terápiára.

A gyógyászat nemcsak a legjelentősebb biopolimereket használja, úgy, mint pl. alginsavat, hialuronsavat, kitozánt, poliglutaminsavat, hanem ezen biopolimerekből készített nanorendszereket is. A biopolimereket jellemzik kedvező biológiai tulajdonságaik, gyógyszer technológiai és nanotechnológiai alkalmazásuk alapján. Napjainkban a kutatóknak nagy kihívást jelent a célzott hatóanyag szállítás megvalósítása, minimalizálva a mellékhatásokat. A nanotechnológia alkalmazásával módosíthatjuk a hatóanyagok fizikai, kémiai és farmakokinetikai sajátságait. Nanotechnológiai rendszerek fejlesztésével kombinált terápia érhető el. A nanotechnológia képes óriás molekulákat, így a biopolimereket is kb. 100 nm-es mérettartomány alá „csomagolni”, értékes csoportjaihoz hatóanyagokat kapcsolni, miközben eredetéből adódó tulajdonságait nem veszíti el, így a szervezet nem kezeli idegen anyagként és a molekulák önszerveződő képessége tovább növeli a nanorészecskék stabil és hatásos alkalmazását.

Ezen munka leírja és bemutatja egy stabil hialuronsav alapú nanorendszer előállítását, jellemzését. Az alkalmazott hialuronsav(HA) koncentráció, a térhálósító arány és a közeg hatásait vizsgáltuk. Továbbá egy stabil térhálósított HA-alapú nanorészecskét tartalmazó félszilárd készítményt hasonlítottunk össze egy lineáris HA-t tartalmazó vizes bázisú géllal.

## 2 Célkitűzések

A munkám célja egy olyan keresztkötött hialuronsav nanorészecske (CLHA) rendszer előállítása és vizsgálata, melyet hialuronsav (HA) és 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin) reakciójával vizes közegben állítunk elő, kondenzáló ágensként vizoldékony karbidiimidet alkalmazva.

A vizsgálat első részében mátrix formákat szintetizáltunk, melynek célja megismerni a különböző változók közös hatásait.

Kísérleteink fő lépései a következők voltak.

- Párhuzamos reakciók végrehajtása azonos feltételekkel és paraméterekkel. Ezen esetekben a változó paraméter lehet a közeg, a HA koncentrációja, valamint a diamin és CDI mennyisége. Az állandó paraméterek a következők: a közeg térfogata (50 ml), oldott HA azonos pH-ra történő állítása, a diamin oldat azonos módon történő előállítása, azonos keverés és elegyítési idők alkalmazása, alkalmazott hőmérséklet, azonos dialízis és liofilező módszer alkalmazása.
- HA nanorészecske rendszer létrejöttének igazolása transzmissziós elektronmikroszkóp felvételek készítésével.

A vizsgálat második része, a gyártási eljárás tanulmányozása volt a következő módon:

- Az alkalmazott technológia különböző lépéseiben, a részecskeméret, részecske-méreteloszlás, molekulatömeg-eloszlás és reológiai mérések elvégzése, és a kapott eredmények összehasonlítása.
- Sókoncentráció hatásának meghatározása a részecske méretére vonatkozólag.
- Nanorészecske rendszer stabilitásának meghatározása különböző közeg és célzott keresztkötési arány alkalmazása esetén.

A vizsgálat harmadik részében félszilárd készítményeket hasonlítunk össze, térhálósított HA nanorészecske tartalmú készítményt egy lineáris HA-t tartalmazó vizes bázisú géllal.

- Reológiai tulajdonságok, hidratációs és irritációs hatások vizsgálata és összehasonlítása.
- A bőr penetrációs képességek meghatározása *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* bőrmodelleken.

### 3 Anyagok és módszerek

#### 3.1 Anyagok

HA ( $M_w = 4350$  kDa) Richter Gedeon Kft.-től (Budapest, Magyarország) származott só formájában, a minősége megfelelt a Ph. Eur. 6. követelményeinek. 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin) és 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodid (CDI) anyagokat a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A pH állítása NaOH and HCl oldattal történt. Millipore vizet használtunk a vizsgálatok során. S&D Chemicals Kft.-től (Budapest, Magyarország) származó Transcutol®-t és Labrasol®-t használtunk. A glycerol-85% a Molar Chemicals Kft (Budapest, Magyarország) forgalmazta. Minden vegyszer analitikai tisztaságú volt.

#### 3.2 Keresztkötött hialuronsav nanorészecske (CLHA) rendszer vizsgálata.

A keresztkötéses reakciót három különböző közegben hajtottuk végre. (Táblázat 1)

##### 1. Táblázat A közeg jelölése

Közeg	víz	NaCl (0.09% w/w)	NaCl (0.9% w/w)
Jelölés	A	B	C

A reakció végtermékeket különböző reakció paraméterek alkalmazásával szintetizáltuk, módosítva a közeget, a HA koncentrációt és a keresztkötési arányt.

A CLHA-t hármás-jelölésű rendszerrel azonosítjuk, a kezdő betű a közegre vonatkozik, az azt követő szám jelöli a HA koncentrációját (mg/ml) és az utolsó szám jelöli a sztöchiometriai keresztkötési rátát.

#### 3.3 Módszerek

##### 3.3.1 Foton korrelációs spektrofotometria (DLS)

A CLHA részecskeméret eloszlás és a hidrodinamikai átmérő meghatározáshoz Malvern–Zetasizer NanoZS90 berendezést használtunk. A mérést foton korrelációs spektroszkópiával végeztük 173°-nál 25°C-on.

##### 3.3.2 UV spektrofotometria

A keresztkötött hialuronán nanorendszer transzmittanciáját HP-8453 Ultraviolet Spektrofotométer berendezéssel határoztuk meg. A mintát 500 nm mértük, optikailag homogén kvarc küvettát használva, 25 °C-on.

### **3.3.3 Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM)**

A CLHA méretét és morfológiáját JEOL2000 FX-II transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) határoztuk meg.

### **3.3.4 Gélkromatográfia (GPC)**

GPC használatával határoztuk meg a minta molekulaméret eloszlását, az alkalmazott BioSuite 450 HR SEC kollona segítségével.

### **3.3.5 Reológia**

A reológiai méréseket Physica MCR101 (Anton Paar, Austria) reométerrel végeztünk. Kúp-lap mérőberendezést használtunk, ahol a kúp szöge  $1^\circ$ , a minta vastagsága pedig 0,046 mm volt a kúp közepén mérve.

### **3.3.6 Hidratációs és irritációs teszt**

A Corneometer® CM 825 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) berendezés világszerte elterjedt a bőrfelszín hidratációs tulajdonságának meghatározására.

A Tewameter® TM 300 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) általánosan elfogadott eszköz a transepidermális vízvesztés mérésére (TEWL).

### **3.3.7 In vitro hatóanyag felszabadulás és bőrpenetrációs mérések**

A membrán diffúziós és permeációs vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, USA) végeztük.

### **3.3.8 Humán bőrpreparátum készítése**

A bőrpenetrációs vizsgálatoknál, hasi plasztikai sebészeti redukciós műtétekből származó bőrt használtunk. Az epidermiszt, a dermisztől hő-szeparálási eljárással választottuk el. A szubkután zsírtól megszabadított bőrt 90 s-ra  $60^\circ\text{C}$ -os vízfürdőbe helyeztük.

### **3.3.9 In vivo tesztek**

Módosított bőrredő kamra modellt alkalmaztunk. A kísérleteknél 15-hetes hím szőrtelen egereket (törzs SKH) használtunk. A teljes bőrt eltávolítottuk a bőrredő egyik oldalán. A kamra másik oldalán vizsgált bőr tartalmazta a teljes epidermiszt, dermiszt és a bőr izomzatát. A HA mennyiségét GPC-vel határoztuk meg.

## **4 Eredmények és értékelés**

### **4.1 Nanorészecske termékek eredményei**

#### **4.1.1 DLS eredmények**

A hialuronsav keresztkötései, intra és intermolekuláris keresztkötéseket eredményezhetnek. A CLHA nanorészecskék egy része kisméretű, egyedülálló részecskékké formálódtak, ugyanakkor, nagyobb részecskék szintén keletkeztek. A nagyobb részecskék aggregálódhattak, másodlagos kötőerők vagy intermolekuláris keresztkötések következtében. Mivel a reakcióelegy nanorészecskéinek hidrodinamikai átmérője nem egységes, ezért a Z-átlagot alkalmaztuk a hidrodinamikai átmérők összehasonlításához.

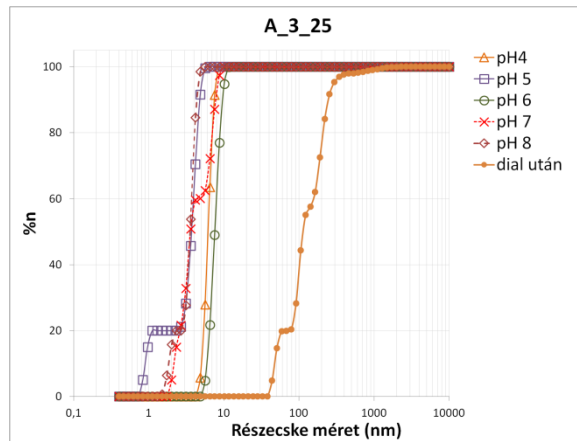
A reakció keverékek, részecskeméret eloszlás profil (PSD) végpontjai - növelve a HA koncentrációját ugyanazon célzott térhálósítás arányt alkalmazva (25%) – eltolódtak a kisebb részecskék irányába. Magasabb kiindulási HA koncentráció kisebb CLHA-t eredményezett. A magyarázat az, hogy a magasabb koncentrációjú HA növeli a molekulák közötti keresztkötés lehetőségét, ez vezet a még kompaktabb hialuronán nanorészecskéhez. Ez a tendencia jelzi azt is, hogy nagyon gyenge molekulák közötti kölcsönhatás van a nanorészecskék között. A TEM felvételei ugyancsak gömb alakú, nagyon jól diszpergált nanorészecskéket mutatnak.

Megfelelő HA koncentráció alkalmazása esetén megállapítható, hogy kisebb keresztkötési arány (12%, 7%) is elegendő, megfelelő mennyiségű kötés kialakítására. (1.a-c ábra). Ezen feltevést igazolja, hogy a 25%-ról 7%-ra módosított térhálósítás, valamint a reakció keverék pH állítása nem módosította jelentősen a keresztkötési rendszert.

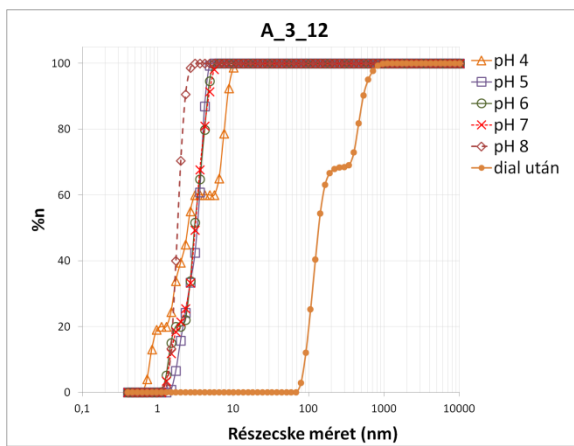
A taszító erők és az elektromos kettősréteg mértékének létrejöttében a keresztkötött hialuronsav negatív töltése meghatározó tulajdonság. CLHA összegzett töltése módosítható pH állítással. A 'töltés hatását' módosíthatjuk a sókoncentráció változtatásával. A kölcsönös taszító erők és az elektromos kettősréteg csökken a magasabb sókoncentrációnál.

Vizsgáltuk a sókoncentráció hatását a szemcseméret eloszlás függvényében. Só hatására szűkebb szemcseméret tartományú rendszer jött létre, nagyobb gradiensű profilokkal, mely jelentősen nem módosult pH változtatás hatására.

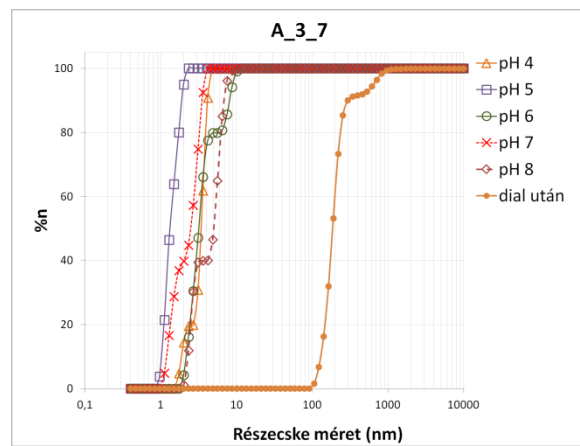




**a**



**b**



**c**

**1. ábra** Kisebbszertartésű, pH és a tisztítás hatása a CLHA részecske méreteloszlására, az alábbi reakció feltételekkel

**a:**  $c_{HA} = 3 \text{ mg/ml}$ , keresztartésű arány: 25%, vízben készítve;

**b:**  $c_{HA} = 3 \text{ mg/ml}$ , keresztartésű arány: 12%, vízben készítve;

**c:**  $c_{HA} = 3 \text{ mg/ml}$ , keresztartésű arány: 7%, vízben készítve

Szignifikáns összefüggést nem állapíthatunk meg a duzzadt részecskék és a reakció fizikai-kémiai paramétereinek között, mivel a mért méretek és a CLHA (számszerű) méret eloszlása 20 nm alatti értéket mutattak.

A reakció keverék és a dializált reakció keverék PSD-jében észleltünk különbséget. Az utóbbi említett profilt 'dial után' névvel jelezzük az első ábrán. Mivel az összes dializált reakció keverék PSD-je eltolódott a nagyobb részecsketartományba, ez világosan mutatta, hogy a kisebb részecskéket elvesztettük, amikor a reakció keveréket dializáltuk.

#### **4.1.2 Hidrodinamikai átmérő**

A reakciókeverékek nem monomodálisak, ezért ugyanazon mérési technika alkalmazásával 'Z-átlag méret' méréssel – hasonlítottuk össze a termékeket.

A HD-t DLS-vel mértük. A hidrodinamikai átmérőt foton korrelációs spektroszkópiával mértük és a Stokes-Einstein egyenlettel számoltunk:

$$HD = kT/3\pi\mu D \quad (1)$$

ahol:  $d(H)$  = hidrodinamikai átmérő,  $D$  = translációs diffúziós együttható,  $k$  = Boltzmann állandó,  $T$  = hőmérséklet és  $\mu$  = viszkozitás.

A translációs diffúziós együttható nem csak a részecske „magjának” méretétől, de annak felületi struktúrájától, valamint a közegben lévő ionok típusától és koncentrációjától is függ.

Összevetettük az A\_1\_25, A\_2\_25 és A\_3\_25 mátrix termékek eredményeit más mátrix termékek eredményeivel. Megállapítható, hogy az alacsony vezetőképességű víz mint közeg – más közeghez viszonyítva - megnövekedett kettősréteget hoz létre a részecskék körül, ezáltal csökkentve a diffúziós sebességet és nagyobb hidrodinamikai átmérőt eredményezve.

#### **4.1.3 TEM eredmények**

TEM felvételek igazolták a kis méretű nanorészecskék keletkezését (~10 nm), nemcsak A\_1\_25, hanem a A\_3\_7 reakciókeverékben is, ahol a HA koncentráció magasabb volt és a keresztmetszeti arány kisebb. A megszáradt nanorészecske mérete 110 nm alatt van.

#### **4.1.4 GPC eredmények**

GPC-vel megvizsgáltuk a kiindulási HA-t és a CLHA-t. A hialuronsav GPC görbéje széles eloszlású lineáris biopolimert mutatott. Összehasonlítottuk a nanorészecske dialízis előtti és utáni GPC kromatogramját. Azt tapasztaltuk, hogy a dialízis előtt az unimodal nanorészecske rendszer GPC kromatogramja széles eloszlást mutat, de a nanorészecske képződéssel a retenciós idő nőtt, a lineáris HA retenciós idejéhez viszonyítva, azaz kisebb részecskék képződtek a keresztkötési reakcióval.

A rendszer tisztítása cellulóz alapú dialízis zsákkal történt (MWCO = 12000 Da). A tisztítás után a reakciókeverék intenzitása a nagyobb retenciós időknél csökkent. Ez arra utal, hogy a reakció során képződő kisebb részecskék átdiffundáltak a dialízis zsák membránján, ezáltal a dialízis során elveszítettük azokat.

#### **4.1.5 Transzmittancia eredmények**

Különböző CLHA reakció keverékből mértünk transzmittanciát. Ezek a kolloid diszperziók átlátszóak, vagy enyhén opálos rendszerek. Az eredmények összhangban vannak a Bouguer-Lambert-Beer törvénnyel, miszerint a transzmittancia érték csökken a koncentráció növelésével. Különböző közegben és széles pH tartományban (pH 3–8) a kolloid tartományú részecske rendszerek három hétig stabilak voltak. Továbbá a CLHA rendszerek stabilitása nem függött a közegtől vagy a módosított keresztkötési aránytól (7-től, 25-ig) és nem észleltünk aggregációt három héten keresztül.

#### **4.1.6 Reológiai eredmények**

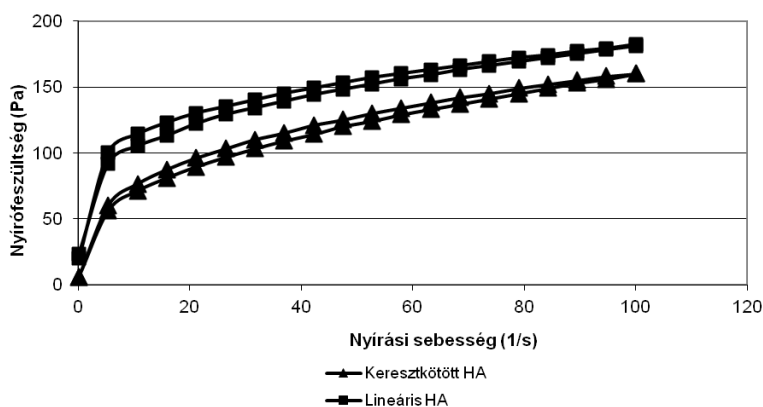
A viszkozitás nagyon fontos tulajdonsága a kolloid rendszereknek, melyet befolyásolnak az intermolekuláris kölcsönhatások és a polimer láncok összegabalyodása is. A tisztított nanorészecske rendszer folyásgörbéje lassabban fut, mint a kiindulási HA görbéje, mely igazolja a keresztkötési módszer eredményességét, kisméretű részecskéket eredményezve. Összehasonlítva a tisztított nanorészecske rendszert, a nem tisztított nanorészecske rendszerrel, megállapíthatjuk, hogy a reakció keverék görbéje lassabban fut, mint a dializált minta görbéje, ugyanis a tisztítatlan rendszer tartalmazta a kis részecskéket is, melyek

hiányoztak a tisztított mintából. Az alkalmazott keresztkötési eljárás során képződött kis részecskéket elvesztettük a tisztítási fázisban. A tisztított rendszer tulajdonságait a képződött nagyobb részecskék határozták meg.

## 4.2 Lineáris és keresztkötött HA-t tartalmazó félszilárd készítmények vizsgálati eredményei

### 4.2.1 Reológiai mérések eredményei

A reológiai mérés technika a kolloid rendszerek fontos vizsgáló módszere (pl. viszkozitás, folyásgörbe). A nyírófeszültség a CLHA esetén alacsonyabb, mint a lineáris HA esetén, mely megerősíti a sikeres keresztkötések létrejöttét, melyek kisebb részecskék képződéséhez vezettek. (2. ábra).

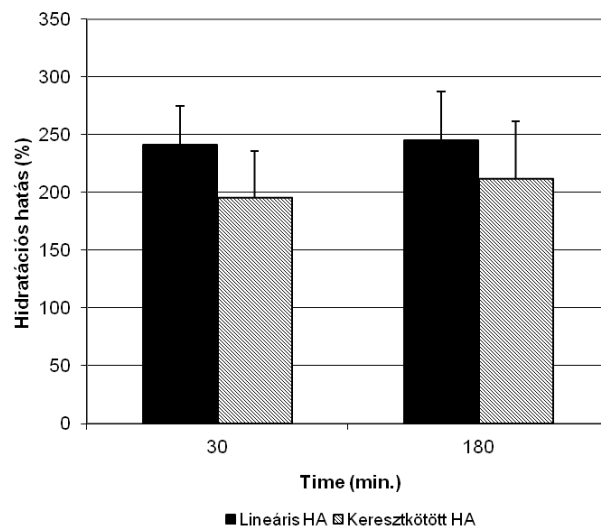


2. ábra Lineáris HA-t és CLHA-t tartalmazó félszilárd készítmények folyásgörbéi

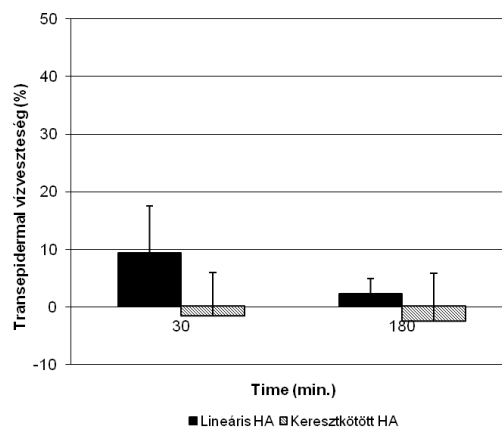
### 4.2.2 Hidratációs és irritációs vizsgálatok eredményei

Korneometriás méréssel lehetőség nyílik a stratum corneum víztartalmának, víztartalom-változásának meghatározására. Megállapítottuk, hogy nincs különbség a lineáris és a CLHA hidratáló hatása között. Kémiai módosítást követően a CLHA megtartja a HA kedvező hidratáló tulajdonságait (3. ábra).

A vizsgálataink során a transzepidermális vízvesztés csökkenése igazolta, hogy CLHA-t tartalmazó gél, a bőr tartósabb hidratációját eredményezte az irritációs hatás csökkenésével. (4. ábra).



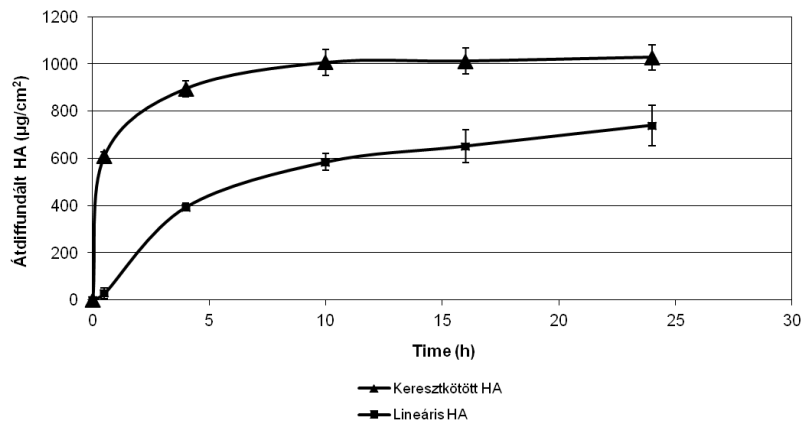
**3. ábra** A HA és CLHA hidratációs hatásai



**4. ábra** Transzepidermális vízvesztés HA és CLHA alkalmazása esetén

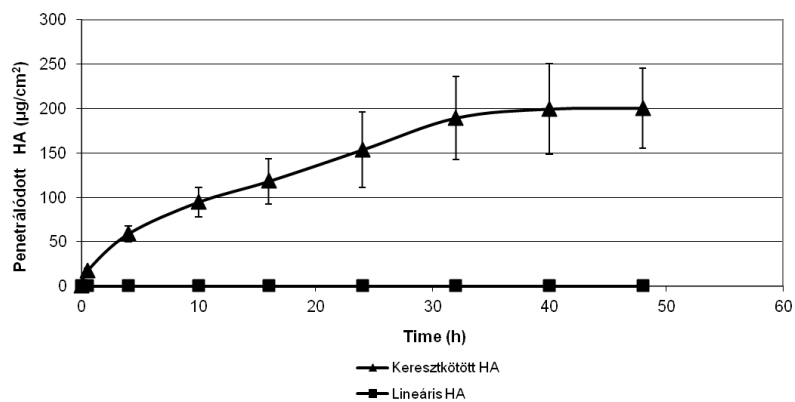
#### 4.2.3 In vitro diffúzió, penetráció és in vivo vizsgálatok

Szintetikus membrán egységnyi felületén átdiffundált lineáris HA és CLHA kumulatív mennyiségének időbeli lefutását vizsgálva, jól megfigyelhető, hogy a keresztkötött HA intenzívebben diffundál és 10 óra után egyensúlyi állapot figyelhető meg. Az átdiffundált CLHA mennyisége 24 óra után  $1028 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . A lineáris HA ugyancsak átdiffundál a szintetikus membránon, de a mennyisége jelentősen kevesebb,  $739 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (24 óránál). A keresztkötött HA jobb diffúziója magyarázható az alacsonyabb viszkozitásával és kisebb részecskemérettel (5. ábra).

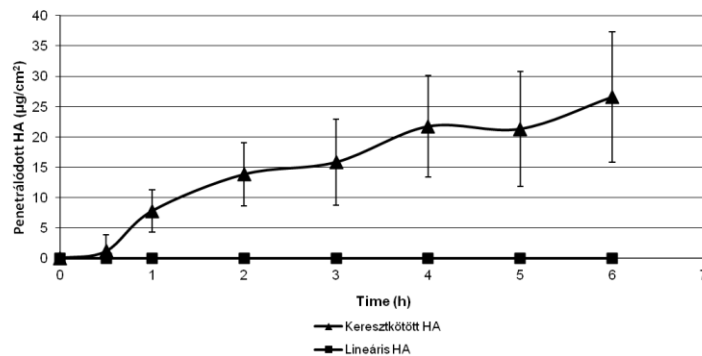


**5. ábra** HA és CLHA diffúziója a szintetikus membránon

A human epidermiszen történő penetrációs vizsgálatok alapján megállapíthatjuk, hogy nem volt detektálható penetrációja a lineáris HA-nak a megfigyelési intervallumban, míg humán epidermiszen a keresztkötött HA-nak  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  a penetrációja (6. ábra).



**6. ábra** HA és CLHA penetrációja a humán epidermiszen



### 7. ábra HA és CLHA penetrációja élő állatbőrön

Vizsgáltuk a lineáris és CLHA élő állatbőrön történő penetrálódását. Megállapítottuk, hogy hasonlóan az ex-vivo humán epidermisz vizsgálatokhoz, itt sem detektáltunk lineáris HA penetrációt. A CLHA penetrációjában folyamatos emelkedés jelenik meg a megfigyelési periódus egészében, mely  $26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  volt a hat órás vizsgálat végén (7. ábra).

## 5 Összefoglalás

A Ph.D. munka célja, egy CLHA nanorészecske rendszer előállításának és vizsgálatának volt.

- A kapott nanorészecskék gömbölyű alakot mutattak nanometer mérettartományban. A rendszer előállításakor irányítottan változtattuk a keresztkötési arányt, a kiindulási lineáris HA koncentrációt és a közeg paramétereit. Az így kapott rendszerek fizikai-kémiai sajátosságait - beleértve transzmittanciát is – ellenőriztük, valamint a hidrodinamikai átmérőket megmértük.
- A TEM, és a reológiai mérési eredményei igazolták a gömb alakú, különálló HA nanorészecskék létezését.

A gyártási eljárást vizsgáltuk.

- A DLS, transzmittancia és TEM eredmények igazolták, hogy a növekvő lineáris HA (1 mg/ml-ről 3 mg/ml-ra) koncentráció alkalmazása kisebb szemcseméretű terméket eredményezett.

Összehasonlítva a részecskeméretet (TEM), a részecskeméret-eloszlást és a molekulatömeg eloszlást - a technológia különböző fázisaiban – ahhoz a felismeréshez

vezetett, hogy a kisebb részecskéket elveszítjük a dialízis alatt. A reológiai eredmények igazolták - melyeket a DLS és GPC eredmények ugyancsak alátámasztottak – hogy a CLHA többsége 20 nm-nél kisebb méretűvé alakult, melyeket a tisztítás során elveszítettünk.

- Nagyobb vezetőképességű közeget alkalmazva, az elektromos kettősréteg és a hidrodinamikai átmérő kisebb méretűvé "nyomódott". A pH növelésével, a HD növekvő tendenciát mutatott.

Nagyobb sókoncentrációjú közeg alkalmazásával, szűkebb részecskeméret eloszlási rendszer képződött, mely jelentős változást nem mutatott pH módosítás hatására.

- A nanorészecskék stabilitása nem függött a közegtől és a keresztkötés mértékétől (7-ről, 25%-ra) és nem tapasztaltunk aggregációt a három hetes megfigyelés alatt.

Félszilárd HA alapú nanorészecske készítményt vizsgáltunk, összehasonlítva a lineáris HA tartalmú hidrogéllal.

- A kísérleti munka során bizonyítottuk a CLHA alkalmazásainak előnyeit, bőrön történő alkalmazás esetén, a lineáris HA alkalmazásával összehasonlítva. A keresztkötés megváltoztatja a lineáris HA molekulát, ezáltal reológiai paramétereit. A nyíróerő csökkenő tendenciát mutat a keresztkötést követően. A dinamikus reológiai mérések igazolták, hogy a HA gél speciális viszkoelasztikus tulajdonsága kissé módosult a keresztkötési eljárást követően.
- Korneometria mérések igazolták a hidratációs hatás megmaradását. Nem tapasztaltunk irritációs hatás növekedést a keresztkötött HA használatakor a TEWL tesztet alkalmazva.
- A diffúziós és penetrációs vizsgálatok alapján megállapíthatjuk, hogy a CLHA eredményez jobb diffúziót szintetikus membránon, jobb penetrációt a humán epidermiszen és élő állatbőrön - összehasonlítva a lineáris HA használatával - amikor is penetrációt nem tapasztaltunk. A CLHA megfelelő transzdermális alkalmazásra, elősegítve a hidratációt a mélyebb rétegekbe, és lehetőséget adva HA termelést beindító jeladásra. A CLHA alkalmazása a bőr mélyebb rétegeibe történő hatóanyag hordozó rendszerek fejlesztésére adhat lehetőséget.



## 6 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

I. M. Maroda, M. Bodnár, Sz. Berkó, J. Bakó, G. Erős, E. Csányi, P. Szabó- Révész, JF. Hartmann, L. Kemény, J. Borbély: Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system. *Carbohydr. Polymer* (2011); 83: 1322-1329.

IF: 3.628

II. Csizmazia E., Berkó Sz., Maroda M., Szabó-Révész P., Csányi E.: A bőrön keresztüli hatóanyag permeáció modellezése és penetrációfokozók hatásának vizsgálata. *Acta Pharmaceutica Hungarica* (2012); 82: 15-22.

IF: -

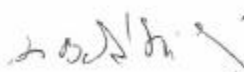
III. Sz. Berkó, M. Maroda; M. Bodnár, G. Erős, P. Hartmann, K. Szentner; P. Szabó-Révész, L. Kemény, J. Borbély, E. Csányi: Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems *Eur. Polym. J.* (2013),49: 2511-2517

IF: 2.739

## Nyilatkozat

Hozzájárulok ahhoz, hogy Maroda Mónika a közösen publikált dolgozatok eredményeit PhD disszertációjában felhasználja.

Szeged, 2013. szeptember 11.



Dr. Berkó Szilvia PhD  
egyetemi tanársegéd

## Beleegyező Nyilatkozat

Hozzájárulok ahhoz, hogy **Maroda Mónika**, a közösen publikált dolgozatok eredményeit PhD disszertációjában felhasználja.

Budapest, 2013. szeptember 11.



Dr. Csizmazia Eszter PhD