



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet

PhD értekezés tézisei

Mukoadhezív polimerek szemészeti alkalmazási lehetőségei

Horvát Gabriella

Témavezető:

Dr. habil. Csányi Erzsébet

Szeged

2015

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

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

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

Horvát Gabriella

MUKOADHEZÍV POLIMEREK SZEMÉSZETI ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI

Szigorlati bizottság:

Elnök: *Dr. Erős István MTA doktor, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet*
Tagok: *Dr. Zupkó István Ph.D., SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet*
Dr. Antal István Ph.D., SE Gyógyszerészeti Intézet

Bíráló bizottság

Elnök: *Dr. Hohmann Judit MTA doktor, SZTE Farmakognóziái Intézet*
Opponensek: *Dr. Bácskay Ildikó Ph.D., DE Gyógyszertechnológiai Intézet*
Dr. Csóka Ildikó Ph.D., SZTE Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Tagok: *Dr. Lázár László Ph.D., SZTE Gyógyszerkémiai Intézet*
Dr. Ducza Eszter Ph.D., SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Szeged

2015

1. BEVEZETÉS

Öregedő társadalmunkban az idős korról összefüggésbe hozható szemészeti betegségek hatásos kezelése utáni igény egyre fontosabbá válik. Az időskori makula degeneráció, glaukóma, diabéteszes retinopátia és szemészeti gyulladással járó betegségek a jelenleginél hatékonyabb és innovatív kezeléseket igényelnek. Az egészséges és jó életminőségű idős kor feltétele az aktivitás és függetlenség megőrzése, melynek egyik elengedhetetlen követelménye a látás megőrzése.

A jelenleg forgalomban lévő, lokálisan alkalmazásra kerülő szemészeti készítmények igen alacsony, kevesebb, mint 2%-os biohasznosulással rendelkeznek. Új típusú lokális szemészeti gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztésének igényét vetíti előre a hatékonyság mellett a biztonságos, nem invazív és kényelmes, a beteg által is kivitelezhető alkalmazás.

Egy új típusú, innovatív szemészeti gyógyszerkészítmény formulálása során számos kihívással kell szembenézni, de számos lehetőség is kínálkozik a megoldására.

A szem felszínén alkalmazott gyógyszerformák esetében számolni kell a szaruhártya komplex lipo-hidofil szerkezetével és a szem védő mechanizmusaival (pislogás, könnyezés). Ennek köszönhetően a ma forgalomban lévő szemcseppek gyakori alkalmazása szükséges, amely diszkomfort érzéshez és a beteg együttműködésének csökkenéséhez vezet, különösen hosszú távú terápia esetén.

Az alacsony biológiai hasznosíthatóság javításával, nyújtott hatás kialakításával, olyan készítmények formulálására nyílik lehetőség, amelyekkel alacsonyabb hatóanyag dózis, ritkább alkalmazás is megvalósítható. Ennek egyik lehetősége mukoadhezív polimerek alkalmazása.

Ph.D. munkám során első (keresztkötött nátrium-, lineáris nátrium- és cink-hialuronát) és második generációs (tiolált poliaszparaginsav) mukoadhezív polimereket, mint lehetséges szemészeti hatóanyag hordozó rendszereket vizsgáltam szabályozott hatóanyag leadás és biológiai hasznosíthatóság javítása céljából.

2. CÉLKITŰZÉS

Szemészeti készítmények fejlesztése során az alkalmazott polimer jelentősen befolyásolhatja a hatóanyag biológiai hasznosíthatóságát. Mukoadhezív polimerek alkalmazása a szemészeti gyógyszerhordozó rendszerekben megnöveli a készítmény tartózkodási idejét a szemén illetve a kötőhártyaszakban. A programozott hatóanyag leadás biztosításához, a polimer mukoadhéziójának meghatározása mellett a gél mátrix szerkezetét is ismerni kell.

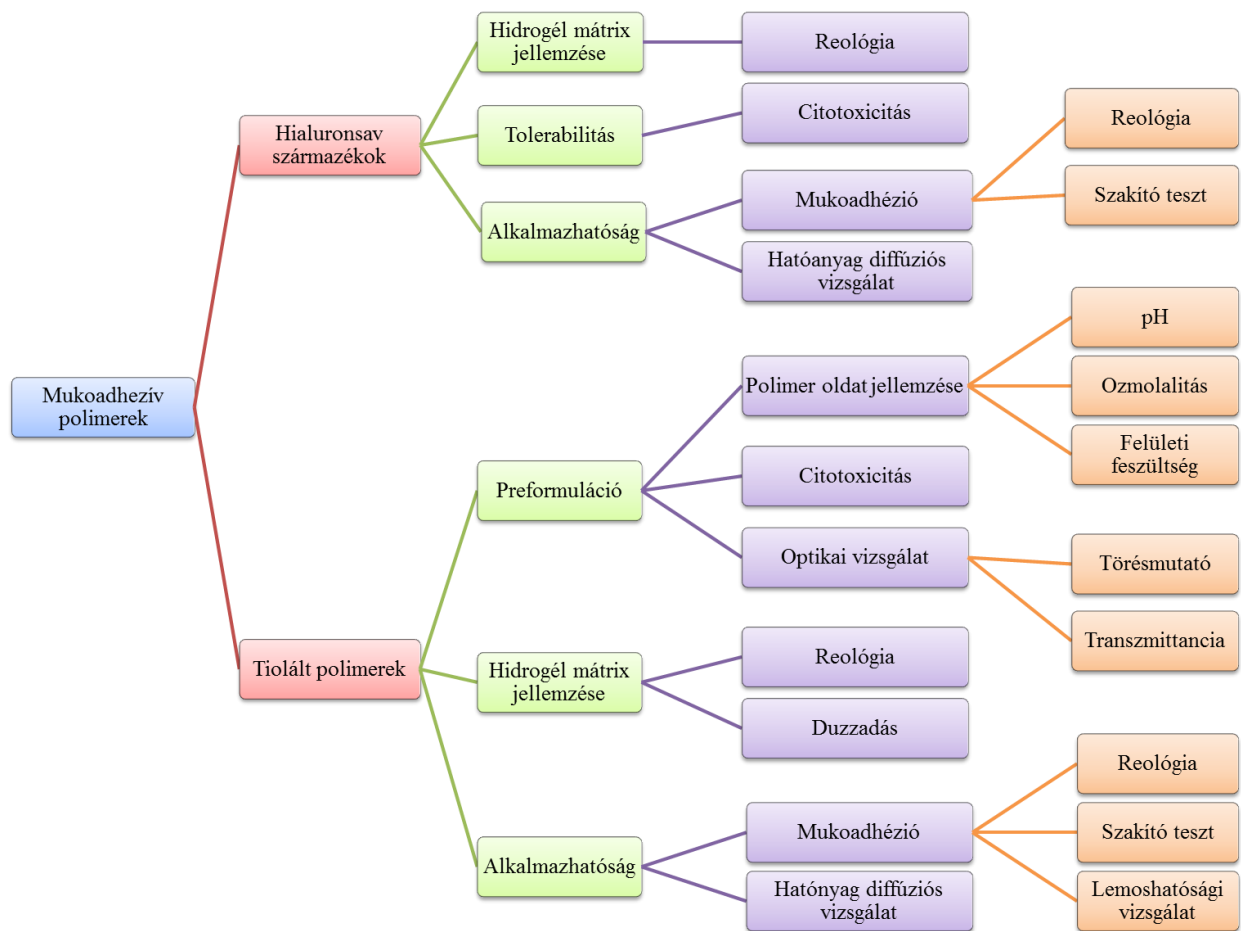
Ph.D. munkám célja mukoadhezív, szemészeti célra alkalmazható vivőrendszerek fejlesztése volt, amelynek során hialuronsav származékokat, mint első generációs és tiolált poliaszparaginsavat (ThioPASP), mint második generációs mukoadhezív polimereket vizsgáltam.

Kísérleti munkám célja az alábbiakban foglalható össze:

- Hialuronsav származékok, nano-méretű keresztkötött nátrium hialuronát (CLNaHA), lineráris nátrium- (NaHA) és cink-hialuronát (ZnHA) összehasonlító vizsgálata:
 - biokompatibilitás meghatározása (toxicitási vizsgálat),
 - gél mátrix jellemzése reológiai módszerrel,
 - mukoadhézió tanulmányozása:
 - *in vitro* (reológia és szakító teszt) vizsgálat,
 - *ex vivo* (szakító teszt) vizsgálat,
 - hatóanyag diffúziójának meghatározása a gél mátrixából.
- Új típusú szemészeti terápiában alkalmazható segédanyag, a tiolált poliaszparaginsav polimer jellemzése:
 - preformulációs vizsgálatok szemészeti gyógyszerhordozó rendszerek szempontjából,
 - biokompatibilitás meghatározása (toxicitási vizsgálat),
 - polimer gél mátrixának jellemzése:
 - duzzadási képesség,
 - reológiai tulajdonságok,
 - mukoadhézió tanulmányozása:
 - *in vitro* (reológia és szakító teszt) vizsgálat,
 - *ex vivo* (szakító és lemoshatósági teszt) vizsgálat,
 - hatóanyag diffúziójának meghatározása gél mátrixból,

- antioxidáns, mint polimer stabilizáló anyag (ditiotreitól (*DTT*), glutation (*GSH*) és acetilcisztein (*ACC*)) hatásának meghatározása a ThioPASP rendszerekre:
 - mukoadhézió tanulmányozása (reológia és szakító teszt),
 - hatóanyag diffúziójának meghatározása gél mátrixból.

Kísérleti munkám célját az alábbi diagramon foglaltam össze (1. ábra).



1. ábra: Első és második generációs mukoadhezív polimereken végzett vizsgálatok

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Hialuronsav származékok

Kutatómunkám során NaHA-t (MW: 4350 kDa) és ZnHA-t (MW: 498 kDa) (Richter Gedeon Zrt., Budapest, Magyarország) és CLNaHA-t (BBS Biochemicals LLC, Debrecen, Magyarország) alkalmaztam.

A CLNaHA, NaHA és ZnHA géleket 0,5; 1 és 2%-os koncentrációban vizsgáltam.

3.1.2. Tiolált poliaszparaginsav

Munkám során a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék, Lány Anyagok Kutatócsoportja által újonnan szintetizált tiolált poliaszparaginsav polimereket (ThioPASP) vizsgáltam. A polimerek módosítása 10% ciszteaminnal történt. A polimerek stabilizálása ditiotreitolt (*DTT*, Merck), glutation (*GSH*, Merck) és acetilcisztein (*ACC*, Reanal Hungary) hozzáadásával lett biztosítva. Modell oxidálószerként 1M NaBrO₃ oldatot alkalmaztam.

3.2. Módszerek

3.2.1. Preformuláció

Az ozmolalitás (*Knauer osmometer automatic, Németország*), a felületi feszültség (*Dataphysics OCA-20, Németország*), a törésmutató (*refraktométer*) és a transzmittancia (*Unicam Helios a Thermospectronic UV-spektrofotométer v4.55, Anglia*) vizsgálatokhoz ThioPASP oldatot készítettem desztillált vízzel, öt különböző koncentrációban (1; 3; 5; 7 és 10%).

3.2.2. Citotoxicitás (biokompatibilitás)

A ThioPASP oldatok citotoxicitását MTT teszttel, nyúl szaruhártya epitél sejtvonalon (RCE) vizsgáltam. A vizsgálat korábban publikált módszer alapján történt.

A CLNaHA, NaHA és ZnHA minták 4%-os koncentrációban készültek, majd 20x hígítás után kerültek a sejtekre. A ThioPASP polimerből 5; 7 és 10%-os ThioPASP oldatokat vizsgáltam. Kontroll minta HBSS oldat (Hank's Buffered Salt Solution) volt.

3.2.3. Reológia

A vizsgálatokat Physica MCR101 reométerrel (Anton Paar, Ausztria) végeztem. A vizsgálat korábban publikált módszer alapján történt.

Minden mérést mucinnal (mucin koncentráció a keverékben 5% volt) és mucin nélkül végeztem el. A gélesedési időt (ThioPASP) és a gélek (HA származékok és ThioPASP) viszkoelasztikus jellegét frekvenciasöpéssel határoztam meg 0,1 - 100 1/s frekvenciatartományban, követve a tárolási (G'), veszteségi (G'') moduluszok és a komplex viszkozitás (η^*) változását.

3.2.4. Duzzadás

A ThioPASP gélek duzzadását a korábban publikált gravimetrikus módszerrel határoztam meg, 20% ThioPASP koncentrációjú gélek alkalmazásával.

3.2.5. Szakító teszt

A méréseket TA-XT Plus (Texture analyser (ENCO, Spinea, I)) készüléssel, 1 kg-os mérőcellával és 1 cm átmérőjű hengeres próbatesttel végeztem el. A géleket mucin diszperzióval (*in vitro*), mucin mentes mesterséges könnyfolyadékkal (vak) és sertés szem kötőhártyával (*ex vivo*) vizsgáltam.

3.2.5.1. Szakító teszt adatelemzés

Szakító teszt esetén, a mukoadhézió jellemzésére, normalizált mukoadhezív paraméter ($\Delta AUC/AUC$) számítható a következő összefüggés alapján:

$$\Delta AUC/AUC = (AUC_m - AUC_b)/AUC_b \quad (1)$$

ahol AUC_m az adhezív munka értéke mucinnal, míg az AUC_b az adhezív munka értéke hatóanyagmentes minták esetén (mesterséges könnyfolyadék).

3.2.6. Lemoshatósági vizsgálat

Lemoshatósági vizsgálat során módosított Franz diffúziós cellát alkalmaztam. *Ex vivo* vizsgálat során sertés szem kötőhártyát rögzítettem az akceptor cellára és mesterséges könnyfolyadékot áramoltattam a donor cellán keresztül. Fluoreszcein-nátriumot (0,008%) tartalmazó 5; 7 és 10%-os ThioPASP géleket vizsgáltam. Hidroxietilcellulóz géleket alkalmaztam referenciaként.

3.2.7. Hatóanyag diffúziós vizsgálat

Diklofenák-nátrium (SD) diffúzióját a gél mátrixokból vertikális Franz diffúziós cellával (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, USA) határoztam meg. Minden minta 0,1% SD-t tartalmazott.

3.2.8. Statisztika

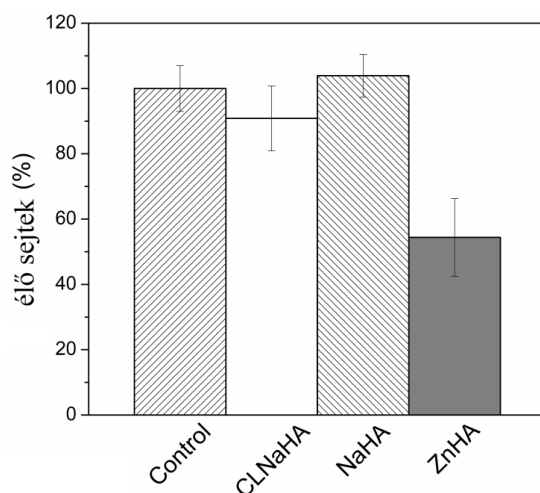
Statisztikai analízist GraphPad Prism 5 programmal készítettem. Két utas ANOVA analízist alkalmaztam Bonferroni post-teszttel. A $p \leq 0,05$ érték szignifikánsnak, $p \leq 0,01$ erősen szignifikáns és a $p \leq 0,001$ igen erősen szignifikánsnak tekinthető.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Első generációs mukoadhezív polimerek

4.1.1. Preformuláció

A CLNaHA, NaHA és ZnHA polimerek vizsgálatának első lépése a biokompatibilitás meghatározása volt, MTT citotoxicitási teszttel RCE sejtenyészeten (2. ábra).



2. ábra: CLNaHA, NaHA és ZnHA oldatok biokompatibilitása

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a lineáris és a keresztkötött nátrium hialuronát biokompatibilis, míg a cink hialuronát *in vitro* körülmények között alacsonyabb biokompatibilitást mutat. *In vivo* körülmények közt a ZnHA biokompatibilitása is várhatóan jobb az *in vivo* homeosztatiszikus mechanizmusok hatására.

4.1.2. Polimer oldatok jellemzése

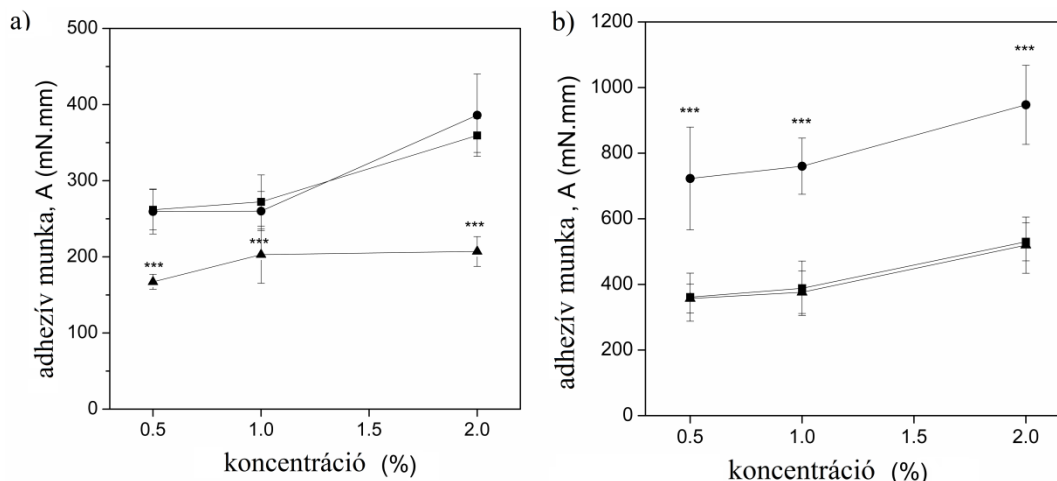
A CLNaHA, NaHA és ZnHA rendszerek viszkoelasztikus tulajdonságait frekvenciasöpéssel határoztam meg 0,1 - 100 $1s^{-1}$ frekvenciatartományban.

A vizsgált CLNaHA és NaHA polimer oldatok viszkoelasztikus tulajdonsággal rendelkeznek, alacsony frekvencia tartományban viszkózus folyadékként viselkednek, míg magasabb

frekvencia tartományban elasztikus tulajdonságokat mutatnak. Az NaHA gél viszkózus és elasztikus jellegét leíró görbe metszéspontja alacsonyabb frekvenciánál jelentkezik. A keresztkötött gél kevésbé elasztikus tulajdonságot mutat. A ZnHA polimer oldata a vizsgálati tartományban végig viszkózus folyadékként viselkedik.

4.1.3. Mukoadhézió

A szakító teszt során mind *in vitro*, mind *ex vivo* módszerekkel meghatároztam a CLNaHA, NaHA és ZnHA gélek mukoadhézióját. A mukoadhéziót *in vitro*, mucin diszperzióval és *ex vivo*, sertés szem kötőhártyával szemben mértem (3. ábra).

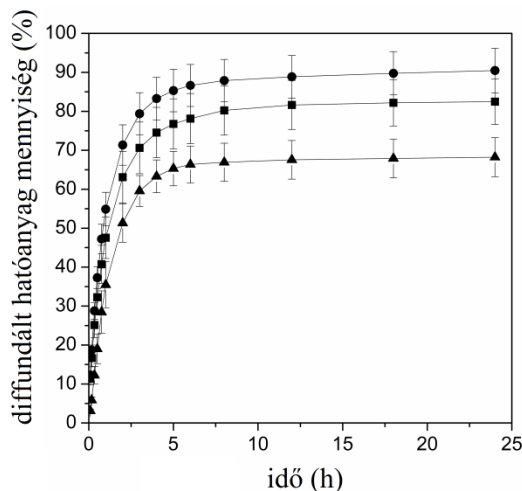


3. ábra: (●) CLNaHA, (■) NaHA és (▲) ZnHA gélek adhéziós munka értékei a polimer koncentráció függvényében a) *in vitro* és b) *ex vivo* körülmények között (***: $p \leq 0.001$, igen erősen szignifikáns CLNaHA-hoz képest)

Az *in vitro* vizsgálat során a koncentráció növelésével az adhéziós munka folyamatos növekedést mutat a polimer és mucin közötti fizikai kölcsönhatásoknak köszönhetően. *Ex vivo* vizsgálat során az adhéziós munka értéke minden vizsgált polimer gél esetében kétszer nagyobb, mint az *in vitro* vizsgálat során, mucinnal mért. A nanoméretű keresztkötött nátrium-hialuronát (CLNaHA) szignifikánsan magasabb adhéziós munka értékei a szemben történő mélyebb interpenetrációra és kémiai kötés képzésre utalnak. Már 0,5%-os koncentrációban jelentős mukoadhéziós mutatót mutatott, így már alacsony koncentrációban is jól alkalmazható mukoadhéziós polimerként szemészeti terápiában.

4.1.4. Hatóanyag diffúzió

Az diklofenák-nátrium (SD) (0,1%) diffúzióját az 1%-os CLNaHA, NaHA és ZnHA mintákból Franz diffúziós cellával vizsgáltam. A gél mátrixból diffundált hatóanyag mennyiségét az idő függvényében a 4. ábrán láthatjuk.



4. ábra: Diffundált hatóanyag mennyisége (●) CLNaHA, (■) NaHA és (▲) ZnHA esetében

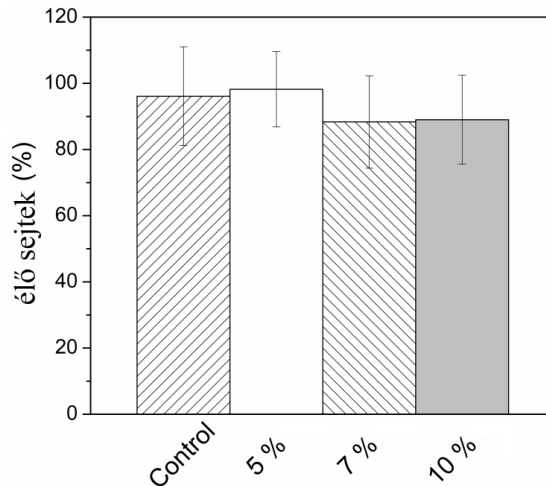
Az első órában mindhárom polimer esetében egy gyors diklofenák-nátrium diffúzió figyelhető meg. Ezt követően a három minta hatóanyag diffúziós görbéje elválik egymástól, nincs jelentős különbség a CLNaHA és az NaHA között az első órában, de később CLNaHA gélből több hatóanyag diffundált ki. A CLNaHA gél alacsonyabb viszkozitással rendelkezik az intramolekulárisan keresztkötött polimer láncoknak köszönhetően, ami könnyebb hatóanyag diffúziót is biztosít.

4.2. Második generációs mukoadhezív polimerek

4.2.1. Preformuláció

A preformulációs vizsgálatok során a szemészeti alkalmazhatóságot vizsgáltam, ebbe a körbe sorolható a pH, ozmolalitás, felületi feszültség, törésmutató és a transzmittancia meghatározása. Ezen vizsgálatok bizonyították, hogy a ThioPASP polimerek hordozói lehetnek szemészetben alkalmazható készítményeknek, mivel mind fizikai, kémiai és optikai tulajdonságaikat tekintve megfelelnek a szemészeti alkalmazhatóság követelményeinek.

Az 5; 7 és 10%-os ThioPASP oldatok biokompatibilitását vizsgáltam MTT citotoxicitási teszttel nyúl szaruhártya epitél sejteken (5. ábra).



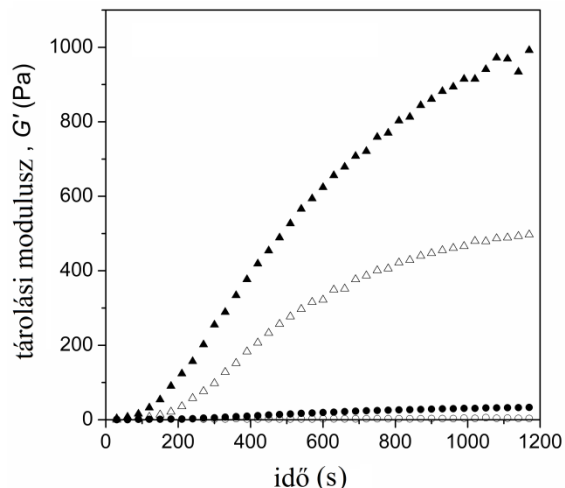
5. ábra: ThioPASP oldatok biokompatibilitása

Az MTT tesztek eredménye alapján megállapítható, hogy a ThioPASP oldat nem toxikus nyúl szaruhártya epitél sejtekre, mivel az élő sejtek közel 90%-os arányban életképesek maradtak még a legnagyobb vizsgált polimer koncentráció esetében is. Ez egy igen kedvező eredmény, mivel az RCE sejtek nagyon érzékenyek és így vélhetőleg a szemén alkalmazva a ThioPASP rendszerek nem lesznek toxikusak.

4.2.2. Gélek jellemzése

A ThioPASP gélek duzzadását gravimetriás vizsgálattal határoztam meg. A 6 órás mérés során a duzzadt gél megtartotta koherens szerkezetét és alakját a polimeren belüli diszulfid kötéseknek köszönhetően. A ThioPASP gélek nagy vízfelvevő képességgel rendelkeznek, a vivőrendszer kevés keresztkötésének köszönhetően a víz könnyebben tudott bediffundálni a gélvázba. A ThioPASP polimer körülbelül 6-7 ezerszeres vízfelvételre képes.

A ThioPASP oldatok gélesedési idejét mucin nélkül és mucin jelenlétében is meghatároztam. Vizsgáltam a polimer oldat koncentrációjának (7 és 10%) hatását (6. ábra).



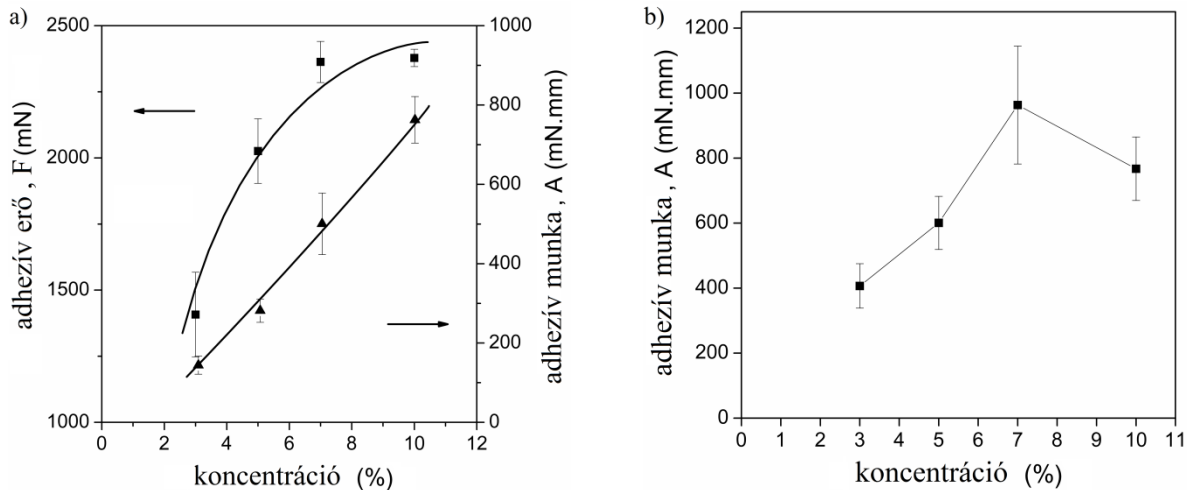
6. ábra: Tárolási modulusz (G') növekedése az idő függvényében (●) 7% és (▲)10% polimer koncentrációnál mucinnal (teli szimbólum) vagy mucin nélkül (üres szimbólum)

10% alatti polimer koncentráció esetén, a ThioPASP koncentráció nem befolyásolta a gélesedést, G' nem nőtt szignifikánsan és a minta folyadék állapotban maradt még oxidálószer hozzáadása után is ($G' \sim G''$). 10%-os polimer koncentráció esetén alakult ki a gél szerkezet (G' jelentősen nagyobb, mint G''). A frekvenciafüggő oszcillációs tesztek alapján a 10%-os ThioPASP gél erős gél szerkezettel rendelkezik, ami alapján arra következtethetünk, hogy a koncentráció növekedésével a keresztkötések száma is nő, és elegendő a gélváz kialakításához.

A reológiai mukoadhéziós vizsgálat alapján a mucinnak jelentős hatása volt a keresztkötések kialakulására, gyorsabb gélesedés volt tapasztalható (7 és 10% ThioPASP koncentráció) és a tárolási modulusz értékek is magasabbak voltak.

4.2.3. Mukoadhézió

A 3; 5; 7 és 10%-os ThioPASP rendszerek mukoadhézióvizitását szakító teszttel is meghatároztam. A vizsgálat során a) *in vitro* mucinnal mért adhezív erőt (F) és az erő-út görbéből számított adhezív munkát (A) valamint b) *ex vivo* sertés szem kötőhártyával mért adhezív munkát a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: a) *in vitro* (■) adhezió erő (F) és (▲) adhezió munka (A), valamint b) *ex vivo* körülmények közt az adhezió munka (A) változása a ThioPASP koncentráció függvényében

A szakító teszt eredményeit bemutató 7a. ábrán látható, hogy az adhezió munka folyamatos növekedést mutat a polimer koncentrációjával, míg az adhezió erő maximum értéket ér el 7%-os polimer koncentrációnál. Park és Munday tanulmányait alapul véve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy alacsony polimer koncentrációnál a kémiai kölcsönhatások dominálnak, kovalens és másodlagos kémiai kötések jöttek létre a polimer és a mucin glikoproteinjei közt. Magas polimer tartalomnál a kémiai kötések kialakításának lehetősége a polimer és a mucin között lecsökken, mivel nem lesz több szabad tiol csoport a felületen, ezért az adhezió erőt leíró görbe plató fázisba fut. Adhezió munka folyamatos növekedést mutat a polimer koncentráció növekedésével, mert magasabb koncentrációnál az interpenetráció fontosabb szerepet játszik, mint a kémiai kötések kialakítása. ThioPASP gélek esetében nagyobb koncentrációban több keresztkötés jön létre a láncok között, gél szerkezetet eredményezve, amely duzzadáshoz és fokozottabb interpenetrációhoz vezet.

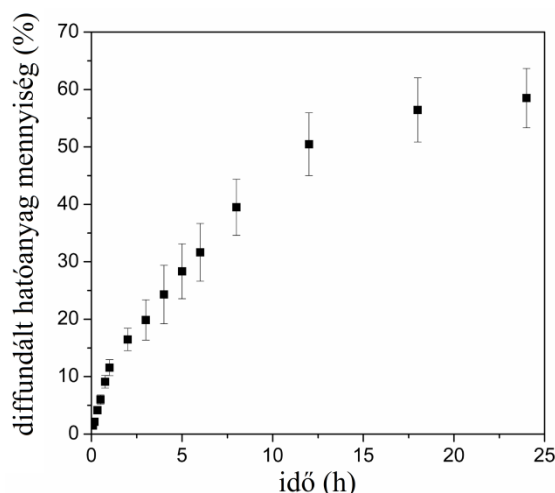
Ex vivo, sertés szem kötőhártyán végzett szakító teszt (7b. ábra) esetén adhezió munka folyamatosan növekszik a ThioPASP koncentráció növelésével, 7%-os ThioPASP koncentrációig. A 7%-os koncentráció felett *ex vivo* körülmények között vélhetőleg az interpenetráció mértéke és a mucin-polimer diszulfid hidak létrejötte is korlátozott.

A lemosódási („wash away”) teszt a szemben lévő fiziológias folyamatokat imitáló *ex vivo* módszer. A sertés szem kötőhártyáról lemosódott fluoreszcein-nátrium mennyisége alapján meghatározható, hogy mennyi modell hatóanyagot tartalmazó gél maradt a nyálkahártya

felszínén. A ThioPASP polimer koncentrációját növelve a lemosódás mértéke enyhén csökken. A referencia rendszernek választott hidroxietil-cellulóz gél esetében is hasonló tendencia mutatkozott. Összehasonlítva a polimerünket a referencia polimerrel megállapítható, hogy a ThioPASP rendszerek jelentősebb rezisztenciát mutatnak a szimulált könnyezéssel szemben, 40-50% szemben a referencia rendszer esetében mért 0-30%.

4.2.4. Hatóanyag diffúzió

A vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellán végeztem. Meghatároztam a modell hatóanyag (diklofenák-nátrium) 10%-os ThioPASP gélből történő diffúzióját (8. ábra).



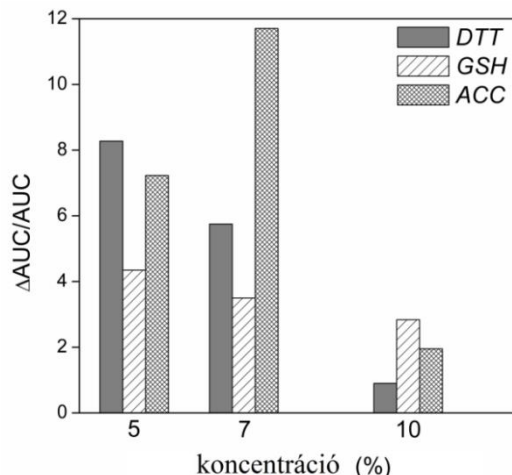
8. ábra: Diffundált diklofenák-nátrium mennyisége

A hatóanyag diffúziós vizsgálat eredménye az első órában gyors hatóanyag diffúziót mutatott, amit egy lassú, nyújtott hatóanyag-leadás követett. A kioldódási profil szoros összefüggést mutatott a gélek duzzadásával. Pórusos szerkezetének köszönhetően nagy vízfelvevő képességgel rendelkezik, és lehetővé teszi a hatóanyag könnyű diffúzióját.

4.2.5. Stabilizálószer hatása

4.2.5.1. Mukoadhézió

A szakító teszt eredményeiből számított normalizált mukoadhéziós paramétereket a 9. ábra szemlélteti. ThioPASP polimer stabilizálására ditiotritol, glutation és acetilcisztein lett alkalmazva.



9. ábra: Számított, normalizált mukoadhéziós paraméterek

(*DTT* – ditiotreitollal, *GSH* – glutationnal és *ACC* – acetilciszteinnel stabilizált minta)

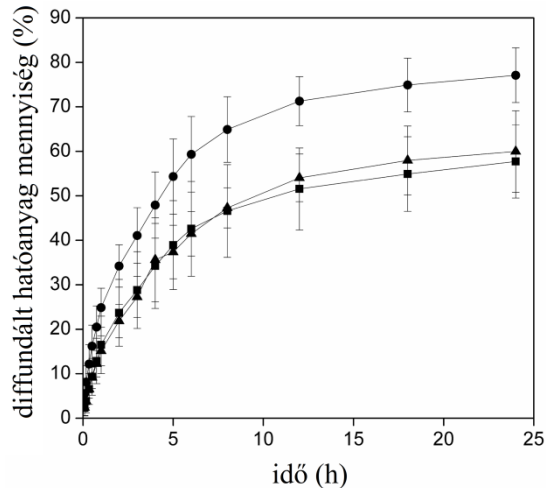
A ditiotreitollal stabilizált polimer koncentrációjának növelésével a mukoadhézió csökken. Ez arra utal, hogy ditiotreitollal stabilizálószer alkalmazása a polimer-polimer kölcsönhatások kialakítását részesíti előnyben a polimer-mucin kölcsönhatások helyett, viszont még ebben az esetben is képes gyenge mukoadhézióra.

A glutationnal stabilizált minta, kis polimer koncentrációnál mukoadhezív tulajdonságú, de a koncentráció növelésével mukoadhezivitása csökken. Ditiotreitollal stabilizált mintával szemben, a szakító teszt eredményei arra utalnak, hogy gyengébb mukoadhezitással rendelkezik a gyenge kohezivitásának és a szakító erővel szembeni ellenállásának köszönhetően.

Az acetilciszteinnel stabilizált minta kiemelkedő mukoadhezivitást mutat 7%-os ThioPASP koncentrációig az előző két mintához képest. 7%-os koncentrációnál már gél szerkezet alakult ki, biztosítva a rendszer mukoadhézióját.

4.2.5.2. Hatóanyag diffúzió

A diklofenák-nátrium diffúzióját ditiotreitollal, glutationnal és acetilciszteinnel stabilizált gél mátrixokból (optimális 7%-os polimer koncentrációban) Franz diffúziós cellával határoztam meg (10. ábra).



10. ábra: Diklofenák-nátrium diffúziója 7%-os ThioPASP gélekből: (■) ditiotritollal; (●) glutathionnal és (▲) acetilciszteinnel stabilizált gélek

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a legtöbb hatóanyag (~80%) a glutathionnal stabilizált mintából diffundált ki, míg a ditiotreitollal és acetilciszteinnel stabilizált gélekből szignifikánsan kevesebb hatóanyag vált szabaddá és a két minta között nincs szignifikáns különbség. A glutathionnal stabilizált minta a mérés során nem tartja meg koherens szerkezetét, ami elősegíti a hatóanyag diffúzióját a gélből. *DTT* és *ACC* erősebb gél struktúrájú, ami kisebb mértékű hatóanyag diffúziót eredményezett.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám célja hialuronsav származékok, mint első generációs és tiolált poliaszparaginsav (ThioPASP) mint második generációs mukoadhezív polimerek szemészeti alkalmazhatóságának vizsgálata volt.

A hialuronsav származékok összehasonlító vizsgálatait mukoadhézió és hatóanyag diffúzió szempontjából előzőekben nem kerültek publikálásra. Mindemellett a keresztkötött nátrium-hialuronátot szemészeti gyógyszerhordozóként elsőként alkalmaztuk.

Az új típusú, mukoadhezív polimerek csoportjába tartozó ThioPASP polimerek széleskörű szemészeti alkalmazhatósági prefomulációs (pH, ozmolalitás, felületi feszültség, törésmutató, transzmittancia és citotoxicitás) és formulációs (gél mátrix jellemzése, mukoadhézió, hatóanyag diffúzió) vizsgálatait elsőként végeztük el.

Ph.D. munkám eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

- Az RCE sejtvonalon végzett MTT citotoxicitási tesztek alapján a vizsgált hialuronsav származékok és a ThioPASP polimerek is biokompatibilisek.
- A jó mukoadhézió tulajdonságukat *in vitro* (reológiai mérések és szakító teszt) és *ex vivo* (szakító teszt) mukoadhéziós vizsgálat igazolta. Az *ex vivo* mért magasabb adhézió munka értékek arra utalnak, hogy *in vivo* a mukoadhézió növekedése várható.
- A cink-hialuronát alacsonyabb biokompatibilitással és mukoadhézióval rendelkezik, de alkalmazhatóságát indokolja kedvező mikrobiológiai tulajdonsága.
- Mukoadhézió és hatóanyag diffúzió szempontjából a hialuronsav származékok közül a keresztkötött nátrium-hialuronát rendszer rendelkezik a legjobb szerkezettel.
- *In situ* gélesedő szemészeti készítmények formulálására esetünkben a ThioPASP polimerek alkalmasak. Ez lehetővé teszi a cseppként való adagolást, jó szétterülést és a gélesedést követően a hosszabb hatástartamot.
- ThioPASP oldat optikailag tiszta és fiziológiásan inert tulajdonságú, amely megkönnyíti a szemészeti készítmény fejlesztését.
- A ThioPASP gélek ellenállnak a szem eliminációs mechanizmusainak, így a könnyezésének (lemoshatósági vizsgálat) és pislogásának (reológiai vizsgálat) is.
- Az acetilciszteinnel stabilizált polimer rendelkezik a legjobb mukoadhéziós és hatóanyag diffúziós tulajdonsággal.
- A hialuronsav származékok és a ThioPASP polimer esetén is kezdeti gyors hatóanyag (diklofenák-nátrium) diffúziót követően egy lassú, nyújtott hatóanyag-leadás volt tapasztalható, amely hosszantartó terápiás hatást tesz lehetővé.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a hialuronsav származékok és a ThioPASP polimert tartalmazó rendszerek kedvező diffúziós és mukoadhéziós tulajdonságuknak köszönhetően ideális mukoadhézió szemészeti hatóanyag hordozók lehetnek.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- 1. Gabriella Horvát**, Benjámín Gyarmati, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Barnabás Áron Szilágyi, András Szilágyi, Judit Soós, Giuseppina Sandri, Maria Cristina Bonferoni, Silvia Rossi, Franca Ferrari, Carla Caramella, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs
Thiolated poly(aspartic acid) as potential *in situ* gelling, ocular mucoadhesive drug delivery system
Eur. J. Pharm. Sci. 67, 1-11, 2015
IF: 3.350
- 2. Gabriella Horvát**, Szilvia Berkó, Erzsébet Csányi, Piroska Szabó-Révész, Judit Soós, Andrea Facskó, Mónika Maroda, Michela Mori, Giuseppina Sandri, Maria Cristina Bonferoni, Carla Caramella, Mária Budai-Szűcs
Comparative study of nanosized cross-linked sodium-, linear sodium- and zinc-hyaluronate as potential ocular mucoadhesive drug delivery systems
Int. J. Pharm. 494, 321-328, 2015
IF: 3.650
- 3. Mária Budai-Szűcs**, **Gabriella Horvát**, Benjámín Gyarmati, Barnabás Áron Szilágyi, András Szilágyi, Tímea Csihi, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Michela Mori, Giuseppina Sandri, Maria Cristina Bonferoni, Carla Caramella, Erzsébet Csányi: *In vitro* testing of thiolated poly(aspartic acid) from ophthalmic formulation aspects, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, DOI: 10.3109/03639045.2015.1118497
IF: 2.101

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

Verbális előadások

1. Mária Budai-Szűcs, Benjámín Gyarmati, **Gabriella Horvát**, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Barnabás Szilágyi, Giuseppina Sandri, Maria C. Bonferoni, Carla Caramella, András Szilágyi, Erzsébet Csányi
In situ gelling mucoadhesive drug delivery system for ophthalmic use
2nd International Conference on Bio-based Polymers and Composites, Visegrád, Hungary, 24th to 28th August 2014.
2. Benjámín Gyarmati, **Gabriella Horvát**, Mária Budai-Szűcs, Szilvia Berkó, Barnabás Szilágyi, Erzsébet Csányi, András Szilágyi
Mucoadhesive thiolated poly(aspartic acid)
Polymer Network Groups Meeting and Gel Symposium, Tokyo, Japan, 10th to 14th November 2014.
3. **Gabriella Horvát**, Benjámín Gyarmati, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Barnabás Áron Szilágyi, András Szilágyi, Judit Soós, Giuseppina Sandri, Maria Cristina Bonferoni, Carla Caramella, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs
Thiolated poly(aspartic acid) polymers in ophthalmic therapy
5th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems, Dubai, UAE, 16th to 18th March 2015.
4. Benjámín Gyarmati, Barnabás Szilágyi, **Gabriella Horvát**, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi, András Szilágyi
In situ gelling poly(aspartic acid)s for pharmaceutical applications
16. Österreichische Chemietage 2015, Joint Meeting of the Italian and Austrian Chemical Societies, Innsbruck, Austria, 21st to 24th September 2015.
5. **Horvát Gabriella**, Csányi Erzsébet, Budai-Szűcs Mária
Szemészeti terápia során alkalmazható első és második generációs mukoadhezív polimerek
Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, Magyarország, 2015. Október 15-17.

Poszter prezentációk

1. **Horvát Gabriella**, Gyarmati Benjámín, Szilágyi Barnabás, Budai-Szűcs Mária, Berkó Szilvia, Révész Piroska, Csányi Erzsébet, Szilágyi András
Új típusú aminosav alapú polimerek in situ gélesedő szemészeti rendszerekben
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. Budapest, Hungary, 2014. április 10-12.
2. Mária Budai-Szűcs, **Gabriella Horvát**, Mónika Maroda, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi, Szilvia Berkó
Cross-linked and linear hyaluronic acid in focal drug delivery
International Conference on Bio-Friendly Polymers and Polymer Additives, Budapest, Hungary, 19th to 21st March 2014.
3. **Gabriella Horvát**, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi, Mónika Maroda, Giuseppina Sandri, Maria Cristina Bonferoni, Carla Caramella, Mária Budai-Szűcs
Hyaluronan and its salts as mucoadhesive ocular drug delivery systems
2nd International Conference on Bio-based Polymers and Composites, Visegrád, Hungary, 24th to 28th August 2014.
4. **Gabriella Horvát**, Benjámín Gyarmati, Barnabás Szilágyi, Tímea Csihi, Giuseppina Sandri, Maria Cristina Bonferoni, Carla Caramella, András Szilágyi, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs
Mucoadhesion of thiolated poly(aspartic acid) polymers for ophthalmic use
1st European Conference on Pharmaceutics – Drug Delivery, Reims, France, 13th to 14th April 2015.
5. Barnabás Áron Szilágyi, Benjámín Gyarmati, **Gabriella Horvát**, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi, András Szilágyi
Thiolated poly(aspartic acid): an in situ gelling mucoadhesive polymer
16. Österreichische Chemietage 2015, Joint Meeting of the Italian and Austrian Chemical Societies, Innsbruck, Austria, 21st to 24th September 2015.