



**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet**

Ph.D. értekezés tézisei

Nanostrukturált lipid hordozók előállítása és vizsgálata dermális felhasználásra

Sütő Blanka

Témavezetők:

Dr. habil. Csányi Erzsébet

és

Dr. Berkó Szilvia, Ph.D.

**SZEGED
2016**

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Gyógyszertechnológia Ph.D program
Programvezető: Prof. Dr. Szabó-Révész Piroska, D.Sc.

Gyógyszertechnológiai Intézet
Témavezető: Dr. habil. Csányi Erzsébet,
Dr. Berkó Szilvia, Ph.D.

Sütő Blanka

**NANOSTRUKTURÁLT LIPID HORDOZÓK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA
DERMÁLIS FELHASZNÁLÁSRA**

Szigorlati Bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Erős István, MTA doktor, SZTE, Gyógyszertechnológiai Intézet

Tagok:

Dr. Antal István, Ph.D., SE, Gyógyszerészeti Intézet

Dr. Zupkó István, Ph.D., SZTE, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Dombi György, kandidátus, SZTE, Gyógyszeranalitikai Intézet

Opponensek:

Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., DE, Gyógyszertechnológiai Intézet

Dr. Dávid Ádám, Ph.D., EGIS Gyógyszergyár Zrt.

Tagok:

Dr. Szakonyi Zsolt, Ph.D., SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet

Dr. Vasas Andrea, Ph.D., SZTE, Farmakognóziái Intézet

SZEGED

2016

1. BEVEZETÉS

A hatóanyagok bőrön keresztüli alkalmazása előnyös a különböző bőrbetegségek és ízületi betegségek helyi kezelésére.

A lipid nanorészecskék (LNP) a mai napig intenzíven tanulmányozott hatóanyag-hordozó rendszerek, amelyeket az o/v típusú emulziókból fejlesztettek ki. Ezek a rendszerek egyesítik a polimer nanorészecskék, a konvencionális emulziók és a liposzómák előnyeit, és ezzel egyidejűleg kiküszöbölik azok hátrányos tulajdonságait. Lehetőséget biztosítanak az előnytelen fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező hatóanyagok, mint például a biofarmáciai osztályozási rendszer (BCS) II. osztályába tartozó (rossz vízoldékonyság, jó permeabilitás) nemszteroid gyulladásgátlók sajátságainak javítására, ezzel növelve biohasznosíthatóságukat. Az LNP-k második generációját nanostrukturált lipid hordozóknak (NLC-k) nevezzük. Az NLC rendszerek bőrön keresztüli alkalmazásának számos előnye van: elősegítik a vízben rosszul oldódó hatóanyagok bőrpenetrációját, alkalmasak oxidációra és fényre érzékeny anyagok stabilitásának növelésére, segítségével szabályozott hatóanyag leadás tervezhető. Biokompatibilis lipidekből állnak, amelyek lebomlanak a szervezetben. Nano méretüknek köszönhetően közvetlen kontaktus alakul ki a stratum corneum-mal, amelynek hatására nő a hatóanyag bőrpenetrációja. A lipid nanorészecskék filmként vonják be a bőr felszínét, okkluzív hatást kialakítva, amelynek hatására nő a bőr hidratációja, ami szintén javítja a hatóanyagpenetrációt *in vivo*. UV-szűrő tulajdonságokkal is rendelkeznek, így jól alkalmazhatók fényvédő készítmények hordozójaként, hiszen fokozzák azok bőrvédő hatásait, valamint a hatóanyagok bőrpenetrációjának kinetikáját is képesek modulálni.

Az NLC rendszerek fejlesztése összetett és hosszadalmas feladat, mivel tulajdonságaikat számos faktor befolyásolhatja, mint például az alkalmazott lipidek és emulgensek típusa és mennyisége, a hatóanyag-lipid arány a készítményben. Mivel ezek a segédanyagok nagyban befolyásolják az NLC-k fizikai-kémiai tulajdonságait, a megfelelő komponensek kiválasztása kulcsfontosságú lépés a fejlesztés során. A készítmények összetételének optimalítása faktoriális kísérletterv segítségével nagyban megkönnyítheti e folyamatot. A válaszfelület módszer (response surface methodology, RSM) jól alkalmazható a függő- és független változók közötti kapcsolat megállapítására a különböző készítmények vagy folyamatok optimalítása során. Az RSM kisebb kísérletszámot igényel, és segítségével jól becsülhető a különböző faktorok hatásának szignifikanciája is.

2. CÉLKITŰZÉS

Ph.D. munkám célja egy ibuprofén (IBU) tartalmú nanostrukturált lipid hordozó (IBU-NLC) fejlesztése és vizsgálata volt, amely összetételének optimalizálásával a hatóanyag fokozott bőrpenetrációja biztosítható.

1. A kísérletes munka első részét a segédanyagok kiválasztása képezte, amelyek segítségével egy olyan NLC rendszer állítható elő, amely az IBU-t a legnagyobb koncentrációban képes bezárni. Ennek érdekében az alábbi célokat tűztük ki:

- a megfelelő szilárd lipid és a megfelelő folyékony lipid (olaj) kiválasztása, amelyek kompatibilisek az IBU-val, és a legnagyobb koncentrációban képesek azt bezárni;
- a megfelelő emulgens kiválasztása, amely képes megfelelő stabilitást biztosítani az LNP-knek a külső vizes fázisban, kialakítva ezzel az NLC-t;
- egy olyan NLC rendszer fejlesztése, amely alkalmas transzdermális terápia biztosítására;
- az összetétel optimalizálása 2^3 teljes faktoriális kísérletterv segítségével;
- a hatóanyag-segédanyag kompatibilitásának meghatározása:
 - differenciál pásztázó kalorimetria (DSC);
 - Röntgendiffraktometria (XRD);
 - Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópia segítségével.

2. Ph.D. munkám második felében a korábbiakban előállított IBU-NLC-t vizsgáltuk. Céljaink az alábbiakban foglalhatók össze:

- a hatóanyagmentes (üres IBU-NLC) és az IBU-NLC minták részecskeméretének (PS és Z_{ave}) meghatározása foton-korrelációs spektroszkópia (PCS), lézer diffrakció (LD) és atomerő mikroszkópia (AFM) segítségével;
- a minták zéta potenciáljának (ZP) meghatározása;
- a lipid mátrix kristályossági paramétereinek meghatározása és a hatóanyag állapotának megállapítása XRD-s mérések segítségével;
- az alkalmazott komponensek között esetlegesen kialakult interakciók vizsgálata FT-IR- és Raman spektroszkópia segítségével;
- a hatóanyag elhelyezkedésének meghatározása Raman térképezés segítségével;
- a hatóanyag permeabilitásának vizsgálata *in vitro*-, *ex vivo*- és *in vivo* vizsgálatok segítségével referencia készítményhez viszonyítva.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Ibuprofén (IBU)

Az NLC rendszerek lipid mátrixában IBU-t oldottunk fel, amelyet a PannonPharma Kft. (Pécsvárad, Magyarország) biztosított.

3.1.2. Szilárd- és folyékony lipidek

Olyan szilárd- és folyékony lipideket kerestünk, amelyek a legnagyobb koncentrációban oldják az IBU-t, és egy stabil lipid mátrixot alkotnak (1. táblázat).

1. táblázat: Az alkalmazott szilárd- és folyékony lipidek főbb jellemzői.

Lipid típusa	Vizsgált lipid	Kémiai név	Olvadáspont (°C)
szilárd	Compritol 888 ATO	gliceril-behenát/dibehenát	70–72
	Cutina CP	cetil-palmitát	55–56
	Precirol ATO 5	glicerol-palmitosztearát	52–55
	Witepsol E85	szilárd zsír	42–44
olaj	Miglyol 812	kapril/kapron trigliceridek	< 0
	olajsav	olajsav	13–14
	Walcer	hibrid napraforgóolaj	-18

3.1.3. Emulgensek

A vizsgált emulgensek főbb jellemzőit foglalja össze a 2. táblázat:

2. táblázat: Az alkalmazott emulgensek főbb jellemzői.

Név	Kémiai név	Típus	HLB érték
Tego Care 450	poligliceril-3 metilglükóz disztearát	ionos	12
Cremophor EL	makrogolglicerol ricinoleát	nemionos	12–14
Cremophor RH60	PEG-60 hidrogénezett castor oil	nemionos	15–17
Lutrol F68	Poloxamer 188	nemionos	29
Tween 20	Poliszorbát 20	nemionos	16,7
Tween 80	Poliszorbát 80	nemionos	15

3.1.4. Egyéb segédanyagok

A Carbopol 971P NF polimert az Azelis Hungary Kft. (Budapest, Magyarország) biztosította, amely gélképzőként szolgált. A makrogol 400-at a Hungaropharma Kft. (Budapest, Magyarország) szolgáltatta. A HPLC minőségű tisztított vizet TKA Smart2Pure rendszerrel (TKA GmbH, Niederelbert, Németország) állítottuk elő.

3.2. Preformulációs vizsgálatok

3.2.1. Lipid screening

Az IBU-t növekvő mennyiségben adtuk a vizsgált szilárd- vagy folyékony lipidhez, és a keveréket Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Németország) segítségével kevertettük. A vizsgálatot egy korábban publikált módszerrel végeztük.

3.2.2. Nedvesedési peremszög meghatározása

A nedvesedési peremszög meghatározása Easy Drop G1 (A.Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Németország) segítségével történt. A lipid filmre 0,5% (m/v)-os emulgens oldatot, vagy HPLC minőségű tisztított vizet csepegtettünk, és meghatároztuk a csepp nedvesedési peremszögét.

3.3. Részecskeméret- és zéta potenciál analízis

A minták részecskeméretét PCS és LD módszerekkel határoztuk meg egy Zetasizer Nano ZS, valamint egy Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Egyesült Királyság) segítségével. A minták stabilitásának becslése a ZP meghatározásával történt, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Egyesült Királyság) készülékkel.

3.4. Atomerő mikroszkópia

Az üres- és az IBU-NLC készítmények részecskeméretének és morfológiai sajátosságainak vizsgálatához az ún. kopogtató („tapping”) módszert alkalmaztuk SOLVER Scanning Probe mikroszkópot (NT-MDT Co., Zelenograd, Moszkva, Oroszország) alkalmazva.

3.5. DSC analízis

A DSC méréseket DSC 204 F1 Phoenix műszerrel (Netzsch Group, Selb, Németország) végeztük. A szilárd lipid, a szilárd- és folyékony lipid keverék, valamint az IBU-lipid keverék termogramjait vettük fel egy már korábban publikált módszert alkalmazva. A minták kristályossági fokát (CI(%)) az alábbi egyenlet segítségével határoztuk meg:

$$CI (\%) = \left(\frac{\Delta H_{\text{fizikai keverék}} \cdot \text{szilárd lipid arány}}{\Delta H_{\text{szilárd lipid}}} \right) \cdot 100,$$

ahol ΔH a vizsgált minta entalpiája.

3.6. Röntgendiffraktometriás (XRD-s) analízis

A minták diffraktogramjait Bruker D8 Advance diffraktométer (Bruker AXS GmbH, Billerica, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével rögzítettük, Cu K λ sugárzást alkalmazva ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Az alapanyagok, a fizikai keverékek és az NLC minták vizsgálata 40 kV-on és 40 mA-en történt, $3-40^\circ 2\theta$ között, $0,1^\circ/\text{s}$ sebességgel, $0,010^\circ$ lépésközökkel alkalmazva.

3.7. DXR Raman spektroszkópia

A Raman spektrumok rögzítése Thermo Fisher DXR diszperzív Raman spektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) történt, amelyet egy Olympus MPlan 10x/0.25 BD mikroszkóphoz (Olympus Corp., Tokió, Japán) csatlakoztattunk. Az IBU elhelyezkedését az üres- és az IBU-NLC készítményeken belül Raman térképezéssel határoztuk meg.

3.8. Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópia

Az FT-IR spektrumokat Bio-Rad Digilab Division FTS-65A/896 FT-IR spektrométerrel (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) rögzítettük 4000 és 400 cm^{-1} között, 128-as scan számmal.

3.9. A lipid nanorészecskék hatóanyagtartalmának (DL%) és bezárási hatékonyságának (EE%) meghatározása

Az IBU-NLC-t foszfát puffer oldattal hígítottuk, és az elegyet centrifugáltuk. A kapott szüredéket megszürtük, és a HPLC rendszerbe injektáltuk. A DL%-t és az EE%-t az indirekt módszer segítségével határoztuk meg:

$$\text{DL}\% = \frac{m_{\text{kiindulási hatóanyag}} - m_{\text{szabad hatóanyag}}}{m_{\text{lipid}}} \cdot 100\%$$

$$\text{EE}\% = \frac{m_{\text{kiindulási hatóanyag}} - m_{\text{szabad hatóanyag}}}{m_{\text{kiindulási hatóanyag}}} \cdot 100\%,$$

ahol m a tömeget jelöli mg-ban kifejezve.

3.10. Hatóanyag permeabilitási vizsgálatok

3.10.1. *In vitro* kioldódási vizsgálatok

Az IBU *in vitro* kioldódását dializáló csöves módszerrel végeztük. Az IBU-NLC-t, valamint összehasonlító készítményként egy 1%-os IBU szuszpenziót vizsgáltunk.

3.10.2. *Ex vivo* permeációs vizsgálatok

Az *ex vivo* permeációt vertikális Franz diffúziós cellákon (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, Amerikai Egyesült Államok) követtük nyomon. 0,5% IBU-NLC gélt vagy 0,5% IBU gélt (amely referenciaként szolgált) vizsgáltunk.

3.10.3. *In vivo* bőrpenetráció vizsgálata

Az hatóanyag *in vivo* bőrpenetrációját SKH-1 szőrtelen egereken végeztük módosított bőrredő karma segítségével annak érdekében, hogy meghatározzuk élő állatbőrön keresztül az IBU penetrációját az IBU-NLC gélből és a referenciaként alkalmazott IBU gélből. Mindhárom vizsgálatot már korábban publikált módszerek segítségével végeztük.

3.11. Az üres- és IBU NLC rendszerek, valamint a referencia minták előállítása

Az üres- és IBU-NLC készítmények első sorozatát nagynyomású homogenizátoros módszerrel, Panda K2 NS1001L Spezial (GEA Niro Soavi, Németország) készülékkel állítottuk elő. A módszer részleteit korábban publikáltuk. A második sorozat (mind az üres-, mind az IBU-NLC) Emulsiflex C-3 nagynyomású homogenizátorral (Avestin Europe GmbH, Mannheim, Németország) készült, és a hatóanyagtartalmat 1%-ra csökkentettük. Az *in vitro* hatóanyagdiffúziós vizsgálatokhoz IBU szuszpenziót készítettünk referenciaként: 1% IBU-t

diszpergáltunk HPLC minőségű tisztított vízben. Az *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatokhoz az IBU-NLC-t Carbopol 971P NF polimerrel gélesítettük. Referenciaként 0,5% IBU-t makrogol 400-ban oldottuk, és gélesítettük ugyanezzel a polimerrel.

3.12. Faktoriális kísérletterv

Az összetétel-optimalizálás 2^3 teljes faktoriális kísérletterv segítségével történt. Nyolc különböző összetételű NLC-t állítottunk elő, és három független változó: a szilárd lipid koncentráció (A), a folyékony lipid koncentráció (B), és az emulgens koncentráció (C) hatásait vizsgáltuk két szinten (+1, -1). Független változóként az elkészített NLC minták PS és ZP értékeit választottuk. Ez a nyolc minta mellett nyolc másik NLC rendszert is előállítottunk, amelyek ugyanehhez a faktoriális térhez tartoztak, és segítségükkel egy egyszerűbb modell felállításának lehetőségét vizsgáltuk (3. táblázat). Az adatokat Statistica for Windows szoftverrel értékeltük ki.

3. táblázat: A független- (A, B és C) és függő változók (ZP és PS) értékei, valamint az NLC rendszerek összetétele.

Minta	Szilárd lipid koncentráció %(w/w)	Folyékony lipid koncentráció %(w/w)	Emulgens koncentráció %(w/w)	ZP (mV)	PS (nm)
NLC 1	7 (-1)	3 (-1)	4 (-1)	-14,2	135
NLC 2	10 (+1)	3 (-1)	4 (-1)	-9,5	160
NLC 3	7 (-1)	5 (+1)	4 (-1)	-11,2	143
NLC 4	10 (+1)	5 (+1)	4 (-1)	-11,7	140
NLC 5	7 (-1)	3 (-1)	5 (+1)	-14,2	129
NLC 6	10 (+1)	3 (-1)	5 (+1)	-10,9	152
NLC 7	7 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	-11,4	147
NLC 8	10 (+1)	5 (+1)	5 (+1)	-12,1	150
üres NLC	10	5	5	-7,54	149
NLC 9	7	3,5	4	-12,4	131
NLC 10	10	4	4	-12,3	137
NLC 11	10	4	5	-15,4	143
NLC 12	7	4,5	5	-9,64	130
NLC 13	10	4,5	4	-12,0	136
NLC 14	10	4,5	5	-12,3	141
NLC 15	7	4	4	-9,97	158

3.13. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis GraphPad Prism 5 programmal készült. Két utas ANOVA analízist alkalmaztunk Bonferroni post-tesztel. Az eredmények legalább öt párhuzamos mérés eredményei \pm szórás (* $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ a referenciához képest).

4. EREDMÉNYEK

I. AZ NLC KÉSZÍTMÉNYEK OPTIMÁLÁSA

4.1 Lipid screening eredményei

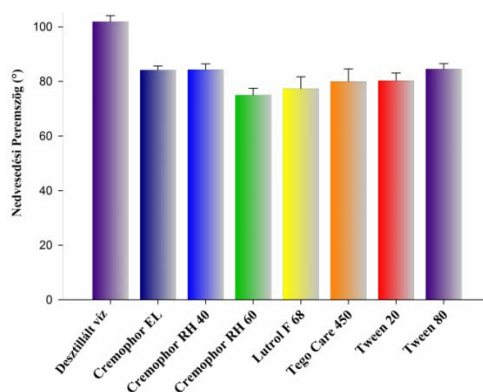
Az olajsav kivételével az összes általunk vizsgált lipid nagy koncentrációban (50 %(m/m)) képes volt feloldani az IBU-t (4. táblázat), azonban a hatóanyag a vizsgált minták nagy részéből kikristályosodott egy nap után. A Witepsol E85 és a Miglyol 812 hatóanyagok keverékéből nem váltak ki IBU kristályok. A két lipidet 10:3, 7:3, 10:5 és 7:5 arányban elegyítettük egymással. Az elegyek nem váltak szét, mivel a szűrőpapíron nem jelent meg olajfolt. Az IBU sem vált ki a két lipid megolvasztott elegyéből, így ezeket a lipideket választottuk a lipid mátrix komponenseiként.

4. táblázat: A lipid screening eredménye.

Lipid típusa	Vizsgált lipidek	IBU oldékonysága	Rekrisztallizáció 24 óra után
szilárd lipid	Compritol 888 ATO	oldódik	igen
szilárd lipid	Cutina CP	oldódik	igen
szilárd lipid	Precirol ATO 5	oldódik	igen
szilárd lipid	Witepsol E85	oldódik	nem
folyékony lipid	Miglyol 812	oldódik	nem
folyékony lipid	olajsav	nem oldódik	igen
folyékony lipid	Walcer	oldódik	igen

4.2 Nedvesedési peremszög vizsgálat eredményei

A nedvesedési peremszög vizsgálatok során azt az emulgenst kerestük, amely a legjobb nedvesedést biztosítja a lipidek számára. A faktoriális kísérletterv során alkalmazott lipid arányok (10:3, 7:3, 10:5 and 7:5) mindegyike hasonló eredményt adott; az 1. ábra a 10:5 arányú lipid keveréken végzett kísérletek eredményeit szemlélteti:



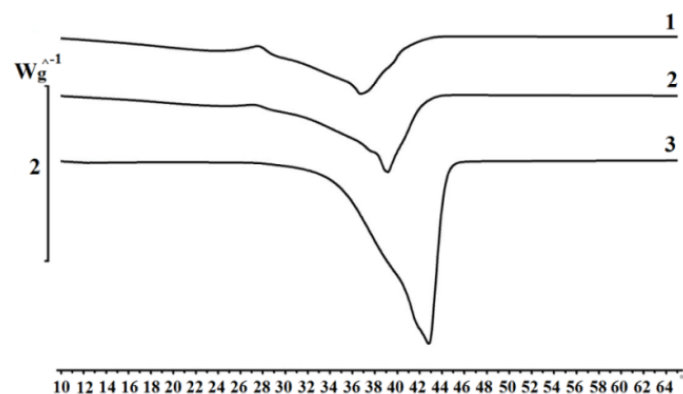
1. ábra: A 0,5% (m/v) emulgens oldatok és a desztillált víz nedvesedési peremszögeinek értékei 10:5 arányú Witepsol E85:Miglyol 812 lipid filmre cseppentve.

A Cremophor RH60 emulgens eredményezte a legkisebb nedvesedési peremszöget ($75,02 \pm 2,49^\circ$). Hasonlóan alacsony értéket adott a Lutrol F68 ($77,4 \pm 4,29^\circ$) is. Mindkét emulgenssel előállítottunk NLC rendszereket, és a mért PS ($d(0.5)$ érték) és ZP értékek

alapján a Lutrol F68-at választottuk emulgensként a további kísérletinkhez, mivel a részecskék kisebbek és stabilabbak voltak (Cremophor RH 60: $d(0.5) = 214,4$ nm, ZP = -9,17 mV, Lutrol F68: $d(0.5) = 112,4$ nm, ZP = -12,4 mV).

4.3 Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) analízis eredményei

A Witepsol E85 termogramján 42 °C körül egy széles endoterm csúcs figyelhető meg, ami a lipid olvadáspontját jelöli. A két lipid esetében mind a négy különböző arányú keveréknél megjelent egy széles, elnyúló endoterm csúcs, alacsonyabb kezdeti hőmérséklettel, és csúcspontban mérhető hőmérséklettel. Mind a négy keverék esetében hasonló DSC görbékert kaptunk, a 10:5 arányú lipid keverék termogramja látható a 2. ábrán.



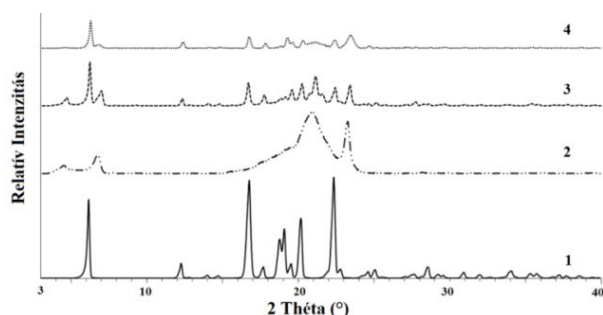
2. ábra: A komponensek DSC görbéi: (1) Witepsol E85:Miglyol 812:IBU 10:5:5 keveréke, (2) Witepsol E85:Miglyol 812 10:5 keveréke, és (3) Witepsol E85.

Megállapítható, hogy mind a Miglyol 812, mind az IBU hozzáadására növekedett a szilárd lipid kristályrácsának rendezetlensége, amely hatására csökken a CI(%), valamint a Witepsol E85 olvadáspontja is. Az a lipid mátrix, amely több, kémiaiag különböző anyagból épül fel, gátolja a kristályszerkezet kialakulását, ezzel helyet biztosítva a hatóanyag bezárására, molekulárisan oldott vagy amorf formában.

4.4 Röntgendiffraktometriás (XRD-s) analízis eredményei

Az XRD analízissel az előállítási hőmérséklet hatását vizsgáltuk a komponensekre. A Witepsol E85:Miglyol 812:IBU 10:5:5 megolvasztott fizikai keverékének diffraktogramján mind a lipid mátrix, mind az IBU karakterisztikus csúcsai jól láthatóak. Az emulgenst hozzáadva ehhez a keverékhez, csökkent az IBU-ra jellemző csúcsok intenzitása (3. ábra).

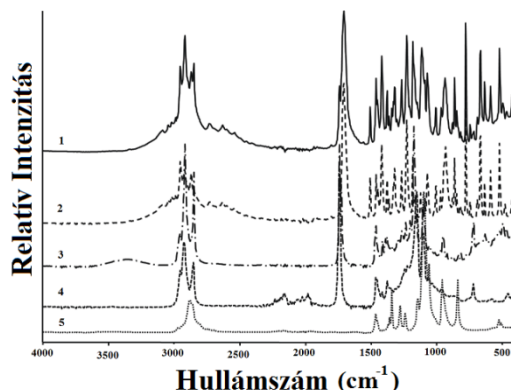
A komponensek mindegyike kristályos állapotban maradt, az IBU-ra jellemző csúcsok intenzitása tovább csökkent minden egyes új komponens hozzáadására, amely alapján feltételezhető, hogy a hatóanyag mind oldott, mind kristályos formában jelen lesz a rendszerben.



3. ábra: XRD diffraktogramok: (1) IBU, (2) a Witepsol E85 és a Miglyol 812 10:5 keveréke, (3) a Witepsol E85, a Miglyol 812 és az IBU 10:5:5 keveréke, valamint (4) a Witepsol E85, a Miglyol 812, az IBU és a Lutrol F68 10:5:5:5 keveréke.

4.5 Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópia eredményei

Az FT-IR analízis célja a komponensek között kialakuló lehetséges interakciók vizsgálata volt, mivel az újonnan kialakuló kötések befolyásolhatják az IBU nanorészecskékből történő diffúzióját. A spektrumok összehasonlításával megállapítható, hogy az NLC előállításának hőmérsékletén nem történt kémiai változás, a főbb vegyértékrezgések sávjai nem tolódtak el, valamint új csúcsok sem jelentek meg (4. ábra).



4. ábra: A komponensek FT-IR spektrumai: (1) a Witepsol E85, a Miglyol 812, az IBU és a Lutrol F68 10:5:5:5 keveréke, (2) az IBU, (3) a Witepsol E85, (4) a Miglyol 812, és (5) a Lutrol F68.

4.6 A részecskeméret- és a zéta potenciál analízis eredményei

Az NLC-k PS-e 108,6 és 216,3 nm, ZP-ja pedig -14,2 és -7,54 mV közötti volt (5. táblázat).

5. táblázat: Az NLC-k részecskeméretei, részecskeméret-eloszlásai és zéta potenciál értékei.

Név	ZP (mV)	Z_{ave} (nm)	PDI	$d(0.1)$ (nm)	$d(0.5)$ (nm)	$d(0.9)$ (nm)	$d(0.95)$ (nm)	$d(0.99)$ (nm)	Span érték
üres NLC	-7,54	132,2	0,096	91	149	228	250	300	0,919
NLC 1	-14,2	216,3	0,230	97	135	249	280	330	1,126
NLC 2	-9,5	114,5	0,077	87	160	195	210	250	0,675
NLC 3	-11,2	113,1	0,067	86	143	192	210	250	0,741
NLC 4	-11,7	114,5	0,087	89	140	198	220	260	0,779
NLC 5	-14,2	108,6	0,065	86	129	192	210	250	0,822
NLC 6	-10,9	115,8	0,093	91	152	206	230	270	0,757
NLC 7	-11,4	112,7	0,089	85	147	191	210	250	0,721
NLC 8	-12,1	115,0	0,078	87	150	195	210	250	0,720
NLC 9	-12,4	112,4	0,089	87	131	195	210	250	0,824

NLC 10	-12,3	138,2	0,249	74	137	238	270	320	1,197
NLC 11	-15,4	114,7	0,108	90	143	219	240	280	0,902
NLC 12	-9,64	109,7	0,057	86	130	191	210	250	0,808
NLC 13	-12,0	116,1	0,085	90	136	200	220	260	0,809
NLC 14	-12,3	114,8	0,101	92	141	208	230	270	0,823
NLC 15	-9,97	214,4	0,237	91	158	262	300	360	1,082

4.7 A faktoriális kísérletterv eredményei

4.7.1. A függő változók hatása a zéta potenciálra

A három függő változó (a szilárd lipid- (A), a folyékony lipid- (B), és az emulgens (C) koncentráció) együttesen szignifikáns hatással ($p < 0,05$) voltak a ZP-ra, de külön-külön hatásuk nem volt szignifikáns. A párosított faktorok (A és B, B és C, A és C) hatása sem érte el a szignifikancia szintjét. Az A faktor egyenesen arányos a ZP-lal, de ez a hatás sem szignifikáns. A ZP értéke kisebb lesz, ha az A faktort a -1-es szinten tartjuk (7% Witepsol E85). A B faktor esetében is ugyanezt a hatást tapasztaltuk, vagyis ha 3% Miglyol 812-t alkalmazunk. Az A és B faktorok hányadosa fordítottan arányos a ZP-lal: a válaszfelszínnek minimuma van 7:3 szilárd- és folyékony lipid aránynál ($ZP = -14,2$ mV). Ez a minimum-érték nem változik, ha az emulgens koncentrációját változtatjuk 4 és 5% között, vagyis a válaszfelszín viselkedése változatlan az általunk megfigyelt tartományban. A C faktor fordítottan arányos a ZP-lal. Alacsonyabb ZP értékek várhatóak, amennyiben nagyobb emulgens koncentrációt alkalmazunk, vagyis 5% Lutrol F68 alkalmazása előnyösebb az NLC-k előállításánál.

4.7.2. A függő változók hatása a részecskeméretre

A három független változónak együttesen volt szignifikáns hatása ($p < 0,05$) a PS-re, viszont külön-külön hatásuk nem érte el a szignifikancia szintjét. A párosított faktorok hatása sem volt szignifikáns. A PS kisebb, ha az A faktort -1-es szinten tartjuk (7% Witepsol E85). Ugyanezt a hatást figyelhetjük meg a B faktor esetében is, vagyis a nanorészecskék PS-e kisebb lesz, ha előállításuk során 3% Miglyol 812-t alkalmazunk. Az A és B faktorok hányadosa fordítottan arányos a PS-tel. A C faktornak nem volt hatása a PS-re a vizsgált tartományban.

Az alkalmazott faktoriális kísérletterv eredményei alapján megállapítható, hogy az NLC 5 készítmény (7% Witepsol E85, 3% Miglyol 812 és 5% Lutrol F68) bizonyult a legalkalmasabbnak az IBU hordozójaként.

A 3.12-es fejezetben lévő 3. táblázatban található nyolc olyan NLC minta (üres NLC, NLC 9 – 15), amelyek összetételét véletlenszerűen választottuk ki a kísérleti térből. Megvizsgálva ezen minták ZP-, Z_{ave} -, PDI- és Span értékeit, egy egyenletet sikerült

definiálnunk, amelyet optimum egyenletnek nevezünk el. A teljes faktoriális kísérletterv hátránya, hogy több faktor vizsgálata esetén nagyszámú elvégzendő kísérletet igényel. Az általunk felírt egyenlet segítségével ez a kísérletszám csökkenthető, amennyiben a válaszfelszín minimum hellyel rendelkezik. Célunk az volt, hogy egy egyszerűbb összefüggést találjunk a vizsgált függő- és független változók között, és megtaláljuk az alkalmazott komponensek optimális arányát. A következő egyenlet ezt az ún. optimumot egy dimenzió nélküli számként adja meg, amely az optimális összetétel esetén a lehető legkisebb értéket veszi fel:

$$\text{Optimum} = \min \left[ZP + Z_{ave} + \text{PDI} + \text{Span} + \frac{SL}{LL} + \frac{SL/LL}{S} \right],$$

ahol ZP = zéta potenciál; Z_{ave} = effektív részecskeméret; PDI = polidiszperzitási index, $\text{Span} = \text{Span}$ érték, $\frac{SL}{LL}$ = szilárd lipid folyékony lipid hányadosa és $\frac{SL/LL}{S}$ = szilárd lipid folyékony lipid hányadosa arányosítva az emulgens koncentrációhoz.

Az optimum egyenlet szerint, a faktoriális kísérlettervhez hasonlóan az NLC 5 (7 % Witepsol E85, 3 % Miglyol 812, 5 % Lutrol F68 és 5 % IBU) bizonyult optimális összetételűnek.

II. AZ IBU-NLC JELLEMZÉSE

Az optimált NLC 5 készítmény hatóanyagtartalmát 5%-ról 1%-ra csökkentettük annak érdekében, hogy egy hosszútávú kezelést igénylő betegség esetében csökkenthessük az esetlegesen megjelenő mellékhatásokat. Ezen felül megfigyeltük, hogy az IBU koncentrációjának csökkenésével nőtt a készítmény stabilitása is, mivel a ZP értéke $-14,2$ mV-ról $-18,4$ mV-ra csökkent.

4.8 A részecskeméret- és a zéta potenciál analízis eredménye

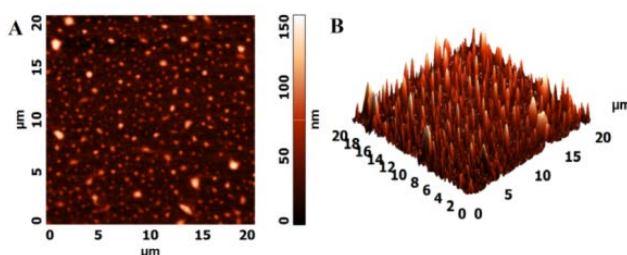
Mindkét minta (üres NLC és IBU-NLC) nano méretű volt, effektív részecskeméretük (Z_{ave}) 114 nm volt az üres-, és 106 nm az IBU-NLC esetében. Nagyobb méretű ($> 1 \mu\text{m}$) részecskék nem voltak jelen egyik készítményben sem. A nanorészecskék felülete negatív töltésű volt (a ZP értéke negatív). A PDI és a Span is kis értéket vettek fel, ami alapján megállapítható, hogy a részecskék méretének eloszlása szűk tartományban volt, amely egységes hatóanyagdiffúziót prediktál. A vizsgálatok eredményeit a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: Az üres- és IBU-NLC-k PS, PS-eloszlás (PDI és Span), valamint ZP értékei.

Minta	Z_{ave} (nm)	ZP (mV)	PDI	$d(0.1)$ (nm)	$d(0.5)$ (nm)	$d(0.9)$ (nm)	Span érték
üres NLC	$114 \pm 2,2$	$-15,9 \pm 0,7$	$0,15 \pm 0,1$	67 ± 0	118 ± 0	$204 \pm 0,6$	$1,16 \pm 0$
IBU-NLC	$106 \pm 1,7$	$-18,4 \pm 1,3$	$0,18 \pm 0,3$	74 ± 0	122 ± 0	$205 \pm 0,6$	$1,07 \pm 0$

4.9 Az atomerő mikroszkópia (AFM) eredményei

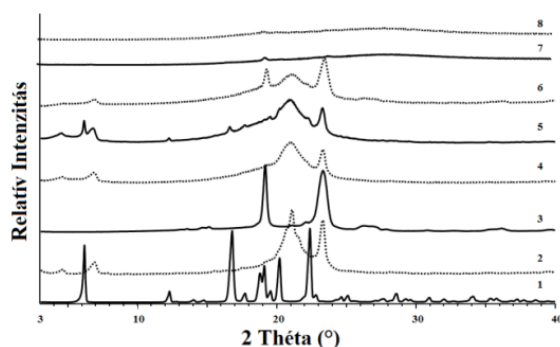
Az AFM-et széleskörűen alkalmazzák a nanorészecskék méretének, alakjának és morfológiájának tanulmányozására. Az ún. Z érték (a magasságból kapott részecskeméret) az üres NLC esetében 109 és 124 nm közötti érték volt, átlagosan $113,67 \pm 15,5$ nm, míg az IBU-NLC esetében 95 és 118 nm közötti értéket mértünk, amelynek átlaga $107,47 \pm 14,4$ nm volt, amelyek jól korrelálnak a PCS és LD módszerekkel mért részecskemérettel. Mindkét minta esetében szférikus, sima felszínű részecskéket láttunk. Az 5. ábra az üres NLC 2D-s és 3D-s AFM képeit mutatja be.



5. ábra: Az üres NLC 2D-s (A) és 3D-s (B) AFM képei.

4.10 A Röntgendiffraktometriás (XRD-s) mérés eredményei

AZ XRD méréseket annak érdekében végeztük, hogy megfigyeljük a nagynyomású homogenizálás következtében esetlegesen fellépő változásokat a komponensek kristályszerkezetében. A tiszta, kezeletlen komponensek (IBU, Witepsol E85, és Lutrol F68), a megolvasztott fizikai keverékek, valamint az üres- és IBU-NLC diffraktogramjait szemlélteti a 6. ábra:



6. ábra: A komponensek és a kész NLC-k XRD diffraktogramjai: (1) IBU, (2) Witepsol E85, (3) Lutrol F68, (4) a szilárd- és folyékony lipidek 7:3 fizikai keveréke, (5) a szilárd- és folyékony lipidek és az IBU 7:3:1 fizikai keveréke, (6) a lipidek, az IBU és a Lutrol F68 7:3:1:5 arányú fizikai keveréke, (7) üres NLC, és (8) az IBU-NLC.

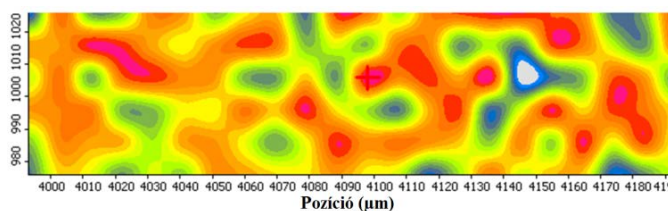
A megolvasztott lipid keverék 7:3 arányú keverékének hatóanyag- és hatóanyagmentes változatát, a teljes fizikai keveréket, valamint az üres- és IBU-NLC-t is vizsgáltuk XRD analízissel. A szilárd lipid (2. diffraktogram) kristályossága olyan mértékben lecsökkent a

többi segédanyag (4. és 6. diffraktogram) és az IBU (5. diffraktogram) hatására, hogy az üres- (7. diffraktogram), és az IBU-NLC (8. diffraktogram) esetében amorf szerkezetűvé vált.

4.11 DXR Raman spektroszkópia

A Raman spektroszkópia segítségével az IBU fizikai állapotáról és az esetleges fizikai-kémiai interakciók megjelenéséről nyertünk információt. Az összetevők, az üres- és az IBU-NLC-k Raman spektrumát 2000 és 200 cm^{-1} közötti tartományban rögzítettük. Az IBU spektrumában a legjellegzetesebb csúcsok nagyrészt az aril gyűrű nyúlási rezgésének, valamint a C_{24} -Ar- C_{11} konformációs nyúlási- és csóválási rezgésének következtében jelennek meg. A közepes intenzitású csúcsok az aromás és az Ar-CH kötések síkbeli- és síkra merőleges vegyértékrezgéseit jelölik. Az IBU-NLC spektrumában egyes csúcsok kismértékű hullámszám eltolódása figyelhető meg, amely a lipidek és az IBU közötti gyenge kölcsönhatásra utalnak. A lipid komponensekre jellemző csúcsok a 3000-200 cm^{-1} közötti tartományban jelentkeztek, amely a zsírsav láncokra jellemző vegyértékrezgések tartománya. Az IBU oldásának hatására nem tűntek el a 2881 és 2850 cm^{-1} hullámszámnál lévő lipidekre jellemző éles csúcsok.

Az IBU elhelyezkedését a lipid mátrixon belül Raman térképezéssel vizsgáltuk. A 7. ábra mutatja be az IBU NLC-ben való eloszlásának térképét (az IBU-t a sárga, narancs és piros árnyalataival jelölve). A hatóanyagra jellemző 1608 cm^{-1} csúcs segítségével vizualizáltuk az IBU mintabeli elhelyezkedését. A vizsgálat eredményeképp megállapítható, hogy a hatóanyag homogén eloszlást mutatott az NLC lipid mátrixában.



7. ábra: Az IBU Raman eloszlásának térképe az IBU-NLC lipid mátrixában (10x-es nagyítás).

4.12 A Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópia eredményei

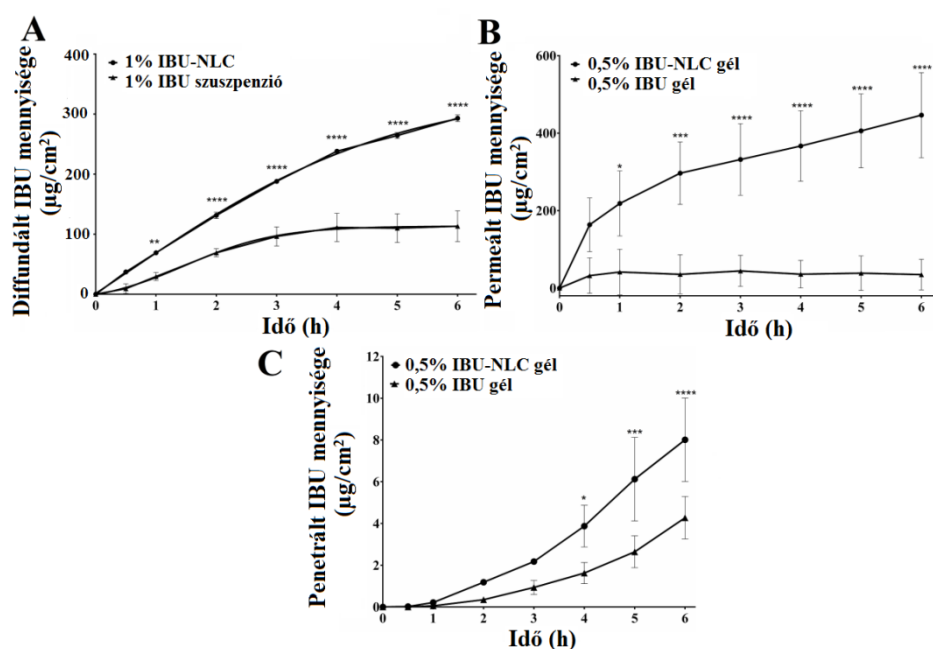
A komponensek, valamint az üres- és az IBU-NLC FT-IR spektrumait azért rögzítettük, hogy információt nyerjünk az IBU és a segédanyagok között esetlegesen kialakuló kölcsönhatásokról. Az IBU-NLC spektrumának analíziséből azt a következtetést vontuk le, hogy a hatóanyag és a segédanyagok között nem alakult ki erősebb kölcsönhatás.

3.14. A lipid nanorészecskék hatóanyagtartalmának (DL%) és bezárási hatékonyságának (EE%) meghatározásának eredményei

Az IBU-NLC készítmény a DL%-a $9,85 \pm 4,10\%$, a EE%-a pedig $98,51 \pm 4,10\%$ volt.

4.13 A hatóanyagpenetrációs vizsgálatok eredményei

Az IBU *in vitro* diffúziója 6 óra után szignifikánsan, 2,59-szer ($p < 0,0001$) magasabb volt az IBU-NLC-ből, mint az IBU szuszpenzióból mesterséges membránon keresztül vizsgálva (8. ábra, A). Az IBU *ex vivo* permeációját az IBU-NLC gélből és a referencia IBU gélből ugyanúgy végeztük, mint az *in vitro* vizsgálat esetében. A hatóanyag permeációja a kimetszett humán epidermisen 12,78-szor volt nagyobb ($p < 0,0001$) az IBU-NLC esetén, mint az IBU gélnél (8. ábra, B). Az IBU *in vivo* penetrációját módosított bőrredő karma segítségével végeztük SKH-1 szőrtelen egereken. 6 óra elteltével az IBU-NLC gél hatóanyagpenetrációja 1,87-szer ($p < 0,0001$) volt magasabb, mint az IBU gél esetén mért eredményeké, amely összhangban van az előző két vizsgálat eredményeivel (8. ábra, C).



8. ábra: az IBU **A:** *in vitro* diffúziója az IBU-NLC-ből (●) és az IBU szuszpenzióból (▲); **B:** *ex vivo* permeációja az IBU-NLC gélből (●) és az IBU gélből (▲) hőszeparált humán epidermisen keresztül; **C:** *in vivo* penetrációja az IBU-NLC gélből (●) és az IBU gélből (▲) SKH-1 szőrtelen egérbőrön keresztül.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ph.D. munkám célja ibuprofén-tartalmú NLC (IBU-NLC) rendszer összetételének optimalítása, és az optimált készítmény karakterizálása volt, dermális terápia biztosítására. Munkámat összegezve megállapítható:

- a lipid screening vizsgálat eredményei alapján a Witepsol E85-öt választottuk szilárd lipidnek, a Miglyol 812-t pedig folyékony lipidnek, amelyek kompatibilisek az IBU-nel, és a legnagyobb koncentrációban (50%) oldották fel azt;
- a nedvesedési peremszög mérési eredményei alapján a Lutrol F68 alkalmasnak bizonyult a nanorészecskék vizes közegben történő stabilizálására;

- a hatóanyag-segédanyag kompatibilitást DSC-, XRD- és FT-IR vizsgálatokkal támasztottuk alá;
- az összetételt 2^3 teljes faktoriális kísérlettervvel optimáltuk, amelynek eredményeképpen az NLC 5 készítményt (7 % Witepsol E85, 3 % Miglyol 812, 5 % Lutrol F68 és 5% IBU) választottuk ki a későbbi vizsgálatokhoz,

Munkám második felében az optimált, és csökkentett hatóanyagtartalmú IBU-NLC rendszert vizsgáltunk. Megállapítható, hogy:

- az üres- és az IBU-NLC részecskemérete a nano mérettartományban volt (<205 nm), kis PDI és Span értékekkel;
- a ZP mérések alapján megállapítható, hogy a részecskék felülete negatív töltésű volt, és stabilitásuk megfelelőnek prediktálható;
- a lipid mátrix amorf állapotú volt, és az IBU-t oldott formában zárta be;
- az FT-IR- és a Raman spektroszkópia alapján a komponensek között nem alakult ki erős kölcsönhatás, amely gyors hatóanyagfelszabadulást prediktál az NLC-ből;
- a Raman térképezés alapján az IBU homogén eloszlású volt a lipid mátrixban;
- a hatóanyag permeabilitási vizsgálatok bizonyították a feltételezett gyors hatóanyag kioldódást a nanorészecskékből, amely mind az *in vitro*-, *ex vivo*- és *in vivo* vizsgálatok esetében szignifikánsan nagyobb volt az NLC-k esetében, a referencia készítményekhez viszonyítva.

A munka újdonsága a következő pontokban összegezhető:

- egy ún. optimum egyenletet definiáltunk, amely hasznos eszköze lehet az optimális összetétel kiválasztásának, amennyiben a válaszfelszínnek minimum értéke van;
- a Raman térképezést elsőként alkalmaztuk a hatóanyag elhelyezkedésének megállapítására egy NLC formuláción belül;
- az IBU *ex vivo* permeációját és *in vivo* penetrációját az IBU-NLC-ből elsőként hasonlítottuk össze egy olyan referenssel (IBU gél), amelynek összetétele megegyezik a kereskedelemben elérhető készítmények összetételével, és az eredmények szignifikánsan jobbnak bizonyultak az NLC esetében;
- a módosított bőrredő kamrát elsőként alkalmaztuk annak bizonyítására, hogy az IBU képes az SKH-1 szőrtelen egerek bőrén átjutni az IBU-NLC készítményből, szignifikánsan magasabb koncentrációban a referenshez viszonyítva.

Mіндеzen eredmények alapján megállapítható, hogy a munkám során optimált IBU-NLC a hatóanyag stabil hordozója, amely gyors hatóanyag kioldódást és a referencia készítményhez képest nagyobb bőrpermeabilitást biztosít, amely feltételezhetően jobb biohasznosíthatóságot eredményezhet a váz- és izomrendszer helyi kezelése esetén.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Berkó Szilvia, Balázs Boglárka, **Sütő Blanka**, Erős Gábor, Gál Brigitta, Sztojkov-Ivanov Anita, Soica Codruta, Szabó-Révész Piroska, Kemény Lajos, Zupkó István és Csányi Erzsébet: Monitoring of skin penetration and absorption with a new *in vivo* experimental model.
Farmacia 62 (6) 1157-1163 (2014).
IF: 1,005 (2014)
2. **Sütő Blanka**, Weber Sabrina, Zimmer Andreas, Farkas Gabriella, Kelemen András, Budai-Szűcs Mária, Berkó Szilvia, Szabó-Révész Piroska és Csányi Erzsébet: Optimization and design of an Ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier with a 2³ full factorial design.
Chemical Engineering Research and Design 104 488–496 (2015)
IF: 2,348 (2014)
3. **Sütő Blanka**, Berkó Szilvia, Csányi Erzsébet: Nanostrukturált lipid hordozó rendszerek alkalmazása a bőrön keresztüli hatóanyag-penetráció elősegítésére.
Gyógyszerészet 60 76-85 (2016)
IF: -
4. **Sütő Blanka**, Berkó Szilvia, Kozma Gábor, Kukovecz Ákos, Budai-Szűcs Mária, Erős Gábor, Kemény Lajos, Sztojkov-Ivanov Anita, Gáspár Róbert és Csányi Erzsébet:
Development of ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier based-gels: characterization and investigation of *in vitro* and *in vivo* penetration through the skin.
International Journal of Nanomedicine (közlésre elfogadva)
IF: 4,348 (2014)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

Verbális előadások

1. **Sütő Blanka**, Weber Sabrina, Berkó Szilvia, Csányi Erzsébet, Révész Piroska és Zimmer Andreas:
Ibuprofen loaded lipid nanoparticles (SLN and NLC) for topical delivery.
2nd Pharma DocDay; Graz, Ausztria, 2013. 07. 04.
2. Berkó Szilvia, **Sütő Blanka**, Szabóné Révész Piroska és Csányi Erzsébet:
Rossz vízoldékonyságú hatóanyagok formulálása szilárd lipid nanohordozók alkalmazásával.
MKE Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 7. Kerekasztal Konferenciája; Szeged, Magyarország, 2014. 05. 16-17.
3. **Sütő Blanka**, Budai-Szűcs Mária, Csányi Erzsébet és Berkó Szilvia:
Termoanalitika alkalmazása lipid nanorészecskék formulálásában.
MKE Termoanalitikai Szakosztályának Termikus ülése; Szeged, Magyarország, 2014. 11. 21.
4. **Sütő Blanka**, Budai-Szűcs Mária, Sipos Péter, Csányi Erzsébet, Szabó-Révész Piroska és Berkó Szilvia:
Characterisation of nanostructured lipid carriers loaded with ibuprofen.
5th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems; Dubai, Egyesült Arab Emírségek, 2015. 03. 16-18. *Pharmaceutica Analytica Acta* 6 (1) p. 82. (2015)
5. **Sütő Blanka**, Berkó Szilvia, Csányi Erzsébet:
Nemszteroid gyulladásgátlót tartalmazó NLC rendszerek fejlesztése.
Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, Magyarország, 2015. 10. 15-17.

Poszter prezentációk

1. **Sütő Blanka**, Weber Sabrina, Farkas Gabriella, Ambrus Rita, Csányi Erzsébet, Szabóné Révész Piroska, Zimmer Andreas és Berkó Szilvia:
Ibuprofén tartalmú nanostrukturált lipid hordozók előállítása és vizsgálata transzdermális kezelés biztosítására.
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, Magyarország, 2014. 04. 10-12.
2. **Sütő Blanka**, Farkas Gabriella, Kelemen András, Budai-Szűcs Mária, Berkó Szilvia, Szabó-Révész Piroska és Csányi Erzsébet:
Optimization of an Ibuprofen loaded nanostructured lipid carrier with 2^3 full factorial design.
Stratum Corneum VIII. Cardiff, Egyesült Királyság, 2014. 09. 17-19.
International Journal of Cosmetic Science 37 (1) pp. 159-160. (2015)
3. **Sütő Blanka**, Ungvári Nikolett, Csányi Erzsébet., Szabó-Révész Piroska és Berkó Szilvia:
Factorial design aided development of salicylic acid loaded nanostructured lipid carriers.
1st European Conference on Pharmaceutics: Drug delivery, Reims, Franciaország, 2015. 04. 13-14.