



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet

PhD értekezés tézisei

**A bőr barrier funkcióját és a transzdermális hatóanyag penetrációt
befolyásoló módszerek vizsgálata**

Balázs Boglárka

Témavezetők:

Dr. habil. Csányi Erzsébet

Dr. Berkó Szilvia Ph.D.

Szeged

2016

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

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

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

Balázs Boglárka

**A bőr barrier funkcióját és a transzdermális hatóanyag penetrációt
befolyásoló módszerek vizsgálata**

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 Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet

Bíráló bizottság

Elnök: Dr. Fülöp Ferenc MTA doktor, akadémikus, SZTE Gyógyszerkémiai Intézet
Opponensek: Dr. Ujhelyi Gabriella Ph.D., címzetes egyetemi docens, SZTE
Gyógyszertechnológiai Intézet
Dr. Zelkó Romána MTA doktor, SE Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet
Tagok: Dr. Csoma Zsanett Ph.D., SZTE Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika
Dr. Szakonyi Zsolt Ph.D., SZTE Gyógyszerkémiai Intézet

Szeged

2016

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap a bőrápolás, illetve a bőrbetegségek megelőzése. Nem véletlenül, hiszen a megfelelő fizikai és szellemi harmóniához hozzátartozik a megfelelő bőrállapot, a szép és egészséges bőr.

Gyógyszertechnológiai szempontból fontos megemlíteni, hogy a bőr, mint hatóanyag beviteli kapu lehetősége a kutatások keresztjében áll. A bőr élő biokémiai közeg, amely a teljes testtömeg közel 16%-a. A szervezetet védi a külvilág káros behatásaitól és egyben a hatóanyag beviteltől is. Az amerikai élelmiszer-, és gyógyszerellenőrző hatóság (FDA) az első transzdermális tapaszt közel 35 évvel ezelőtt hagyta jóvá, azóta a transzdermális termékek palettája egyre csak bővül, egy növekvő, több milliárd dolláros piacról beszélhetünk világszerte. Nem meglepő módon, ugyanis a transzdermális hatóanyag bevitel számos előnyt biztosít a hagyományos adagolási módokkal szemben. Elsősorban ez a máj metabolizáló hatásának kiküszöbölése, illetve a fájdalom minimalizálhatósága, amely hozzájárul a jobb beteg adherencia kialakulásához. A megfelelő formulálással elérhető nyújtott hatóanyag felszabadulás lehetősége egyaránt fokozza a percután hatóanyag penetráció iránti megnövekedett érdeklődést.

A hatóanyagok transzdermális bejuttatásának a legjelentősebb korlátozó tényezője, az epidermisz legkülső rétege, a stratum corneum (SC). Emiatt ezen a beviteli kapun keresztül alkalmazható hatóanyagok száma erősen korlátozott. A gyógyszertechnológus legfontosabb feladata, tehát olyan stratégiák felkutatása, amelyekkel kiküszöbölhetjük az ép bőr átjárhatatlanságát. A penetrációfokozási lehetőségek alkalmazása mind azt a célt szolgálja, hogy terápiás mennyiségű hatóanyagot juttassunk be a bőr irreverzibilis károsodása nélkül.

Számos lehetőség áll a rendelkezésünkre, nemcsak passzív penetrációfokozó segédanyagok, hanem a technológiai fejlődésével az aktív módszerek is előtérbe kerültek. Ezen új típusú stratégiák közé sorolható az iontoforézis, az elektroporáció, az ultrahang, a mikrotűk, illetve a nanohordozó rendszerek alkalmazása.

A jövő hatékony és biztonságos gyógyszerbeviteli irányzatai az összetettebb és kombinált gyógyszerhordozó rendszerek felé mutatnak, így ezeknek a tanulmányozása és optimalizálása egy előremutató célként van jelen a gyógyszertechnológiai fejlesztések területén.

2. CÉLKITŰZÉS

A Ph.D. munkám célja a transzdermális penetrációfokozó technikák tanulmányozása volt. Ennek érdekében a bőr barrier funkcióját vizsgáltam, illetve különféle új típusú penetrációfokozó módszereket tanulmányoztam.

Kísérleti munkám célja az alábbiakban foglalható össze.

1. A Ph.D. munkám első felében az egészséges és a plakkoktól mentes pszoriázisos bőrt hasonlítottam össze, annak érdekében, hogy jobban megérthessük a károsodott SC barrier funkciókat, ezáltal segítve az egészséges önkéntesek kiszűrését a bőr vizsgálatát célzó kísérletekben.
2. A munka második felében különböző penetrációt fokozó stratégiákat tanulmányoztam a megfelelő transzdermális hatóanyag bevitel érdekében. Kutatómunkámban az alábbi célok megvalósítását tűztem ki:
 - az újonnan formulált szacharóz-mirisztát (SM) penetrációfokozó hatásának az összehasonlítása a már régebben e célból használt szacharóz-lauráttal (SL);
 - Transcutol (TR) és cukorészter (SE) önmagában vagy kombinációban történő alkalmazásának vizsgálata Skin PAMPA modellen és humán bőrön;
 - a poliolok (glicerin: GLY, xilitol: XYL) hatásának lehetséges spektrális analízise nátrium-lauril-szulfát (SLS) okozta akut irritációban;
 - a vízben rosszul oldódó, lipofil fitoösztrogén genisteinnek (GEN) megfelelő hordozó rendszer formulálása;
 - a formulált GEN tartalmú liotróp folyadékkristályos rendszer (LLC-GEN) transzdermális bevitelének vizsgálata önmagában, illetve elektroporációval kombinálva;
 - a LLC-GEN rendszer, valamint a LLC-GEN és elektroporáció (EP) kombinációjának hatékonyságának tesztelését egér melanóma modellben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Szacharóz-zsírsvészterek és/vagy Transcutol tartalmú hidrogélek

Készítményeim hatóanyagául az Ibuprofent (IBU) választottam (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (5 %). Oldószerként Makrogol 400-at (Hungharopharma Ltd., Budapest, Magyarország) használtam fel (20 %). A hidrogélem elkészítéséhez 3 %-os Carbopol 971P-t (Lubrizol Corporation/Azelis, Budapest, Magyarország) és tisztított vizet (Aqua purificata Ph.

Hg. VIII) alkalmaztam. A pH 7,0 beállítása trietanol-aminnal (TEA) történt (7 %) (Hungerpharma Ltd., Budapest, Magyarország). Penetrációfokozó segédanyagként két cukorésztert, a szacharóz-laurátot (SL), a szacharóz-mirisztátot (SM) (Mitsubishi-Kagaku Food Corporation, Tokyo, Japan) és a Transcutolt[®] (TR, dietilén-glikol-monoetil-éter, Gattefossé és Lubrizol Corporation/Azelis, Budapest, Magyarország) használtam. A minták 10 % Transcutolt tartalmaztak, míg a cukorészter koncentrációja:

- SL esetében: 1; 2; 2,64; 4; 6; 8; 10 %;
- SM esetében: 0,25; 0,5; 1; 2; 2,64; 4; 6; 8; 10 % volt.

3.1.2. Genistein tartalmú liotróp folyadékkristályos rendszer

Emulgensnek a nem-ionos Cremophor RH40 (CRH40; Polyoxyl 40 Hydrogenated Castor Oil USP/NF, BASF, Ludwigshafen, Germany) választottam. A rendszer vízfázisát tisztított víz, az olajfázist izopropil-mirisztát (IPM; Merck Kft., Budapest, Magyarország) biztosította. A Genistein (GEN, Extrasynthèse, Genay, France; tisztaság > 95%) koncentrációja 3 m/m% volt.

3.2. Módszerek

3.2.1. Hatóanyag diffúziós és penetrációs vizsgálatok

3.2.1.1. Franz diffúziós cella

A membrán diffúziós és penetrációs vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Co., Chatsworth, CA, USA) végeztem. 0,30 g mintát helyeztem donor fázisként szintetikus membránra (Porafil, Machenerey-Nagel, Düren, Németország és Pall Life Sciences, Washington, NY, USA) (*in vitro*), Porafil membrán filterrel alátámasztott chorioallantoisz membránra (CAM) és hő-szeparált epidermiszre *ex ovo* illetve *ex vivo* kísérlet esetén. A hatóanyag abszorbanciájának mérése Unicam Helios α v4.55 Thermospectronic UV-spektrofotométerrel történt (Unicam, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.1.2. Skin PAMPA modell

A Skin PAMPA modell egy újonnan publikált mesterséges membrán alapú technológia a bőr penetrációnak a gyors vizsgálatára (Vizserálek et al., 2015).

3.2.1.3. Chorioallantoisz membránok

A chorioallantoisz membránokat az *ex ovo* kíséretekhez a temesvári Victor Babes University of Medicine and Pharmacy biztosította.

3.2.1.4. Humán bőrpreparátum készítése

A bőrpenetrációs vizsgálatokhoz plasztikai sebészeten végzett hasi redukciós műtétekből származó bőrt használtam. Az epidermiszt a dermisztől hőszeparálási eljárással választottam el. A szubkután zsírtól megszabadított bőrt 90-120 s-ra 60 °C-os vízfürdőbe helyeztem, majd az epidermiszt csipesszel óvatosan elválasztottam az alatta elhelyezkedő dermisztől.

3.2.2. Bőrhidratáció és transzepidermális vízvesztés (TEWL) vizsgálata

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

3.2.3. Polarizációs mikroszkópos vizsgálat

A LLC szerkezetének vizsgálata polarizációs feltétellel ellátott LEICA Q 500 típusú képanalizátor segítségével történt 20x nagyításon.

3.2.4. Reológiai mérések

Az LLC alapszerkezet reológiai vizsgálata PaarPhysica MCR101 kúp-lap rendszerű reométerrel történt (Anton Paar GmbH, Graz, Ausztria).

3.2.5. Elektroporációs paraméterek

A Mezo Forte Duo EP készüléket (Dr Derm Equipment Ltd., Budapest, Magyarország) a Dr Derm Bőrgyógyászat és Esztétikai Lézercentrum (Budapest, Magyarország) bocsátotta a rendelkezésünkre. A polipropilén borítású kezelőfej egy 25 mm átmérőjű lapielektrodát tartalmaz, amely pulzáló elektromágneses teret generál. A magas feszültségű impulzusok modulációja: 5 ms impulzus – 20 ms szünet.

3.2.6. Gyengített, teljes reflexiós Fourier-transzformációs infravörös (ATR-FTIR) spektroszkópiai vizsgálatok

Az ATR-FTIR spektroszkópiai vizsgálatokat horizontális ATR kristállyal ellátott (ZnSe, 45°) Avatar 330 FTIR spektrométerrel (Thermo Nicolet, USA) végeztem. A spektrumokat 4000 cm^{-1} és 400 cm^{-1} hullámszám között vettem fel 4 cm^{-1} optikai felbontással, 128 szkenneléssel vagy a polioloak vizsgálata esetén 64 szkenneléssel. A spektrumok kiértékelése Thermo Scientific's GRAMS/AI Suite szoftverrel történt, ATR korrekciót nem végeztem.

A mintavétel a pszoriázisos bőr vizsgálata esetén adhezív tapasz segítségével tape-stripping módszerrel történt 6 egészséges és 6 pszoriázisos beteg bevonásával. Nemek szerint külön vizsgáltam, mivel eltérés tapasztalható az egészséges férfi és nő bőrszerkezet között. A mintavétel minden esetben az alkarról történt. Az amid-I sáv komponenseit és relatív intenzitásukat szemikvantitatív módon a spektrum 1695–1600 cm^{-1} tartományában először Fourier öndeconvolúcióval választottam szét, majd Gauss–Lorenz görbeillesztés történt.

Az állatkísérletek esetén a hatóanyagok referencia spektruma 0,5 mg SLS vagy GEN tartalmú KBr pasztillákkal kerültek felvételre. A kezelt és a kezeletlen területekről származó minták felvétele egyaránt megtörtént. A kezelt SC minden rétege korrigálva lett a megfelelő kezeletlen SC réteggel.

3.2.7. Raman spektroszkópiás vizsgálatok

A Raman spektrumok felvétele CCD kamerával és 780 nm-es diódalézerrel rendelkező DXR diszperzív Raman mikroszkóppal (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) valósult meg. A CRH40, IPM és GEN spektrumának felvételét 6 s expozíciós idővel, 48 szkenneléssel, valamint a kozmikus sugárzás és a fluorerszcencia korrekciójával végeztem. A lézer erőssége 12 mW volt 25 μm -es résszélességgel. A GEN lokalizációját a bőrmintákban konfokális Raman térképezéssel vizsgáltam.

3.2.8. Melanómás egér modell

Az állatkísérlet 30 darab 20-25 g átlagtömegű C57BL/6J nőtény egér segítségével történt. A kísérlet 0. napján az egereket subcután beoltottuk a tumor sejtekkel [B – F]. A készítmény 2 ml-ét alkalmaztuk klaszikus dermális felhasználás mellett, valamint 6 perces magasfeszültségű elektroporáció segítségével. Az egereket 6 csoportra osztottuk a következők szerint:

- A csoport: vak csoport,
- B csoport: B164A5 sejtekkel beoltott kezeletlen egerek,

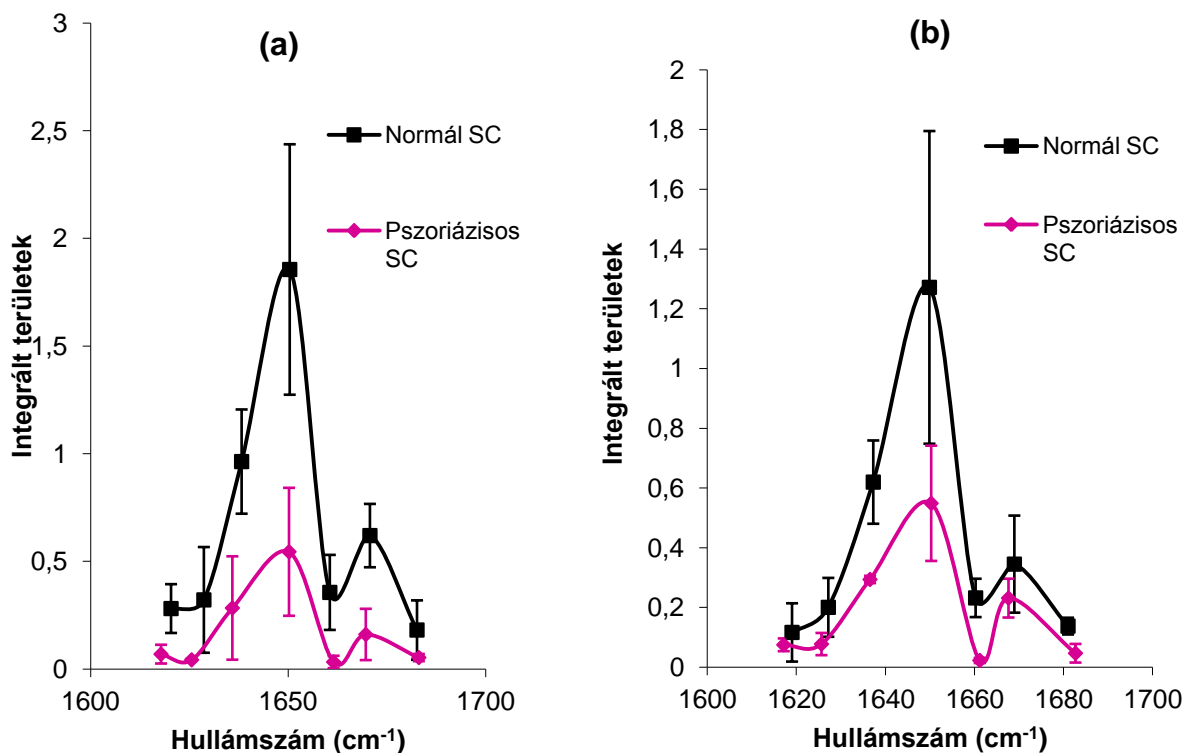
- C csoport: B164A5 sejtekkel beoltott és hatóanyagmentes LLC kezelt egerek,
- D csoport: B164A5 sejtekkel beoltott és LLC-GEN kezelt egerek,
- E csoport: B164A5 sejtekkel beoltott LLC és 6 perces EP kezelt egerek,
- F csoport: B164A5 sejtekkel beoltott LLC-GEN és 6 perces EP kezelt egerek.

A tumor méretét naponta mértük tolmérővel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A plakkoktól mentes pszoriázisos bőr fehérje struktúrájának vizsgálata

A SC fehérjéi főleg α -helikális konformációt mutatnak, amelyet az 1650 cm^{-1} hullámszámnál lévő csúcs prezentál a legnagyobb görbe alatti területtel. Kutatásunk során az 1660 cm^{-1} csúcsra fókuszáltunk, ami egy hurok másodlagos szerkezeti elemnek felel meg. Megfigyeltük, hogy a teljes amid-I sáv intenzitása csökkent a pszoriázisos SC esetében, de a legjelentősebb változás az 1660 cm^{-1} csúcsnál látható. Ennek a csúcsnak az intenzitása majdnem nullára csökken a betegek esetén, ami a struktúra jelentős koncentráció csökkenését mutatja (1. ábra).



1. ábra Az amid-I sáv komponenseinek területe az egészséges és a pszoriázisos SC esetében: (a) férfiak; (b) nők.

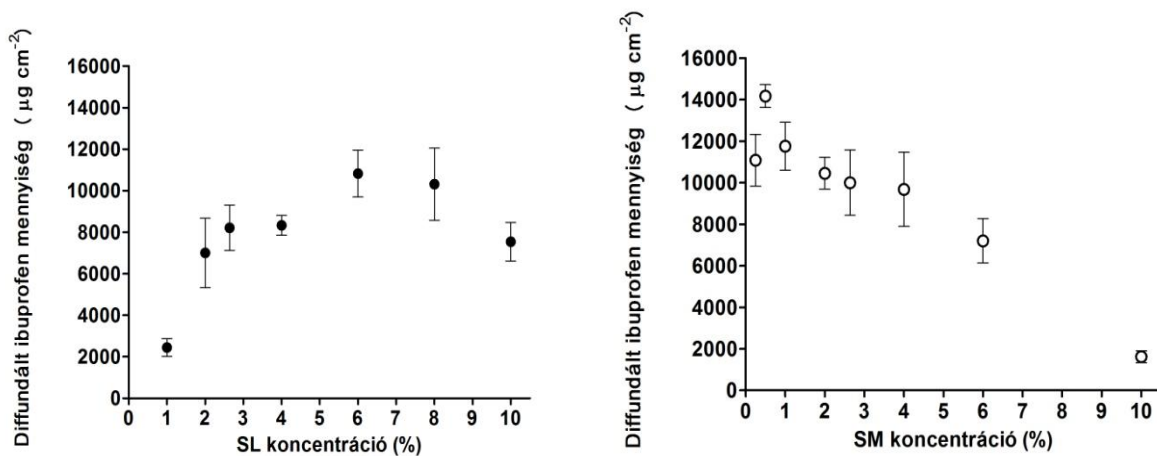
Az 1660 cm^{-1} csúcs intenzitás csökkenése szignifikáns a férfiak ($p < 0,05^*$) és a nők ($p < 0,01^{**}$) esetében is. Nagymértékű az 1630 cm^{-1} csúcs csökkenése is, amely a β másodlagos szerkezethez rendelhető. Ezen intenzitásváltozásokból arra következtethetünk, hogy a pszoriázisos bőr fehérjéinek flexibilitása csökken a betegség miatt, még az épnek tűnő területek esetében is.

4.2. Transzdermális penetrációfokozó segédanyagok vizsgálata

4.2.1. Szacharóz-zsírsvészterek és/vagy Transcutol tartalmú hidrogélek

4.2.1.1. Hatóanyag diffúziós és penetrációs vizsgálatok

A szacharóz-zsírsvészterek vizsgálata során a szacharóz-laurát (SL) és a szacharóz-mirisztát (SM) összehasonlítását különböző cukorészter koncentrációjú gélek segítségével végeztem. Szintetikus membránon a szacharóz-laurát hatékony penetrációfokozó segédanyagként bizonyult 6 %-os koncentrációban. A szacharóz-mirisztát 0,5 %-os koncentrációnál mutatta a legjobb penetrációfokozó hatást, ennél magasabb koncentráció esetén csökkent a penetrációfokozó hatékonysága, viszont még így is 4 m/m%-ig előnyösebb penetrációfokozónak bizonyult a szacharóz-lauráthoz képest (**2. ábra**).



2. ábra Diffundált IBU mennyiség 24 óra után különböző SL és SM tartalmú hidrogélek esetén *in vitro*.

Az **1. táblázat** az *ex vivo* penetrálódott IBU mennyiségét mutatja. A humán epidermiszen a szintetikus membránon végzett kísérletektől eltérő eredményt kaptam. A kontrol-gélhez képest is alacsonyabb mértékű penetráció látható az TR-gél esetében. A csökkent *ex vivo* értékek azzal magyarázhatóak, hogy a TR képes a bőrben depót képezni és a hatóanyag raktározódását elősegíteni. Ezzel szemben humán epidermiszen mindkét cukorészter jelentős penetráció fokozódást okoz, illetve a szacharóz-mirisztát nemcsak a

diffúziós, de a penetrációs vizsgálatokban is hatékonyabbnak bizonyult a szacharóz-lauráthoz képest.

1. táblázat IBU penetrációs paraméterek humán epidermiszen 16 óra után

(Q: diffundált IBU kumulatív mennyisége; J: abszorpciós ráta;

$$EF = J_{\text{penetrációfokozó tartalmú gél}} / J_{\text{penetrációfokozó mentes gél}}).$$

Vizsgálati minta	Q ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	EF
Kontrol gél	463,95±110,50	42,72	-
TR gél	193,36±87,13	14,23	0,33
SL gél	866,79±320,42	67,93	1,59
SM gél	889,22±348,09	54,28	1,27
SL + TR gél	825,08±384,67	54,38	1,27
SM + TR gél	1527,19±764,62	91,59	2,14

A SM + TR gél mutatta a legjobb penetrációs paramétereket (**1. táblázat**). A SL + TR gél alacsonyabb penetrációt eredményezett, mint a SL gél, bár a különbség nem volt szignifikáns. A jelenség valószínűsíthető oka az, hogy a SL nem tudja olyan mértékben módosítani a kettős lipid membránt, amivel a TR depó effektusa elkerülhető lenne. Ezzel szemben a SM a minimálisan nagyobb szénláncának köszönhetően kissé jobban be tud épülni a kettős lipid membránba ezáltal nagyobb lipid változásokat okozva kiküszöböli a TR depó effektusát. A SM a SC szerkezetének módosításával képes a penetrációt fokozni, amit tovább növel a TR diffúziófokozó hatása.

A Skin PAMPATM rendszeren végzett vizsgálatok eredményei szoros korrelációt mutattak az *ex vivo* humán epidermiszen mért adatokkal. Eredményeink alapján a Skin PAMPA megfelelő gyors módszer lehet a transzdermális rendszerek preformulációs tesztelésére. Továbbá mindkét módszerrel bizonyítottuk, hogy hidrogél alapon a szacharóz-mirisztát TR kozsolvenssel kombinálva hatékonyan fokozza az IBU penetrációját (**2. táblázat**).

2. táblázat IBU penetrációs paraméterek Skin PAMPATM modell esetén 16 óra után

(Q: diffundált IBU kumulatív mennyisége; J: abszorpciós ráta;

$$EF = J_{\text{penetrációfokozó tartalmú gél}} / J_{\text{penetrációfokozó mentes gél}}).$$

Vizsgálati minta	Q ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	EF
Kontrol gél	5204,95±311,23	432,35	-
TR gél	4941,95±966,97	329,95	0,76
SL gél	5642,38±383,43	517,06	1,20
SM gél	5812,12±150,72	512,81	1,19
SL + TR gél	5616,67±208,33	483,72	1,12
SM + TR gél	6062,98±121,23	563,1	1,30

4.2.1.2. *In vivo* bőr vizsgálatok

A mélyebb bőrrétegekbe történő penetrációt elősegíti a megfelelően hidratált bőrállapot elérése, mivel a hidratáció során a korneocyták közötti intercelluláris tér növekszik. Emiatt az egyik leggyakrabban alkalmazott passzív penetrációfokozó módszer a készítmények hidratáló hatásának kihasználása. A vizsgált készítmények növelték a bőr víztartalmát, illetve megfelelő és hosszan tartó hidratáló hatást eredményeztek.

4.2.2. Poliolk hatásának spektrális analízise nátrium-lauril-szulfát (SLS) okozta akut irritációban

A dermális készítmények formulálása során fontos szempont a komponenseik penetrációja. A SLS gyakran alkalmazott, viszont irritációra hajlamosító komponens, penetrációs profiljának vizsgálata tape-stipping módszerrel kombinált ATR-FTIR spektroszkópiával történt. Már alacsonyabb poliolkoncentráció alkalmazása is változtatta a SLS penetrációját, viszont a mélyebb bőrrétegekben a SLS szignifikáns mennyiség csökkenését magasabb poliolkoncentrációval sikerült elérni. (3. táblázat).

3. táblázat A kezelt SC alsó és felső rétegeinek intenzitása (SLS relatív abszorbanációi 1220 cm^{-1} -nél). Medián értékek (M) a 25 és 75%-os percentilisekkel.

	2. Csoport (SLS 5 %)		3. Csoport (SLS + GLY 5 %)		4. Csoport (SLS + XYL 8.26 %)		5. Csoport (SLS + GLY 10 %)		6. Csoport (SLS + XYL 16.52 %)	
SC rétegek	M	25p; 75p	M	25p; 75p	M	25p; 75p	M	25p; 75p	M	25p; 75p
1 - 4	0,0226	0,0137; 0,0264	0,0309	0,0187; 0,0518	0,0318	0,0181; 0,0468	0,0319	0,0161; 0,0532	0,0196	0,0134; 0,0360
5 - 8	0,0234	0,0140; 0,0433	0,0223	0,0122; 0,0300	0,0241	0,0149; 0,0454	0,00601 *	0,00143; 0,0134	0,000 *	0,000; 0,0133

4.2.3. Genistein tartalmú liotróp folyadékkristályos rendszer

4.2.3.1. Polarizációs mikroszkópos vizsgálatok

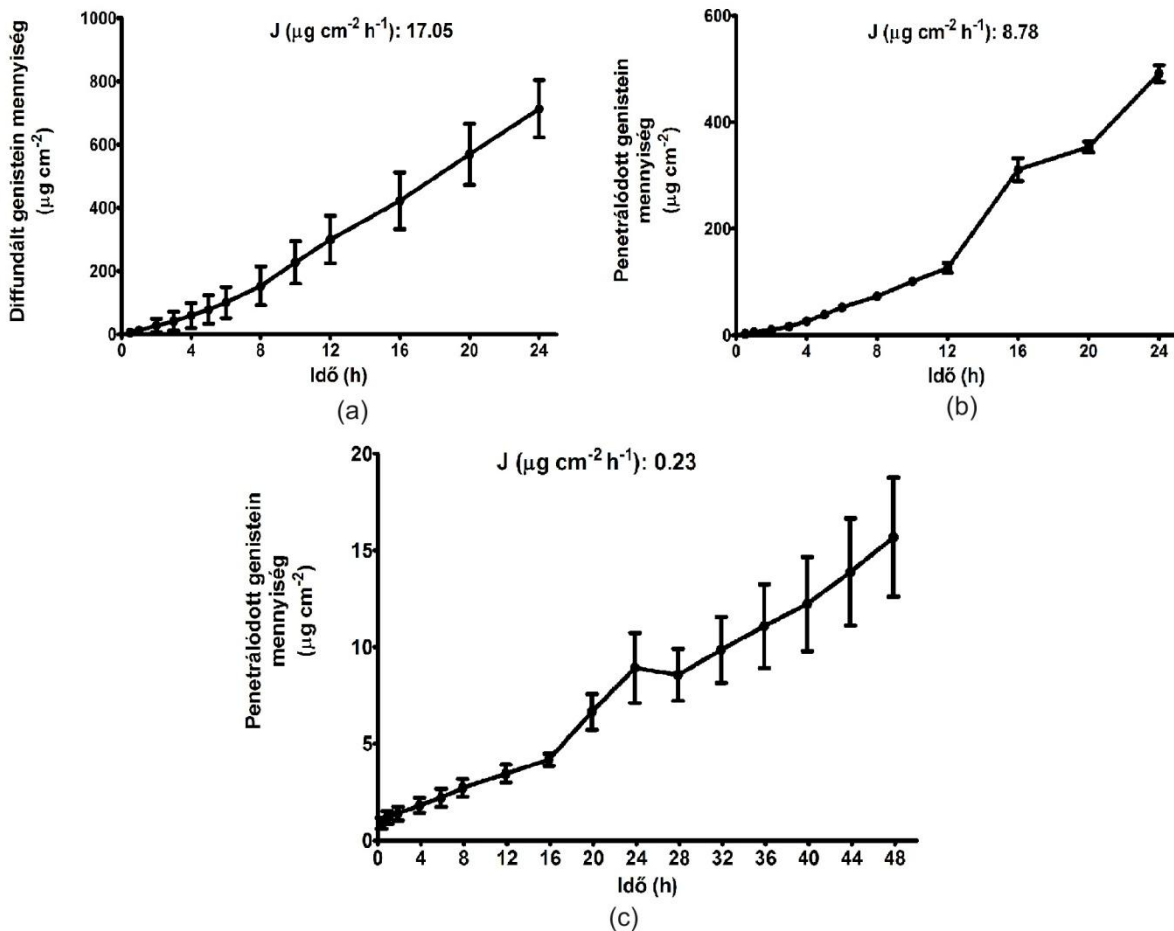
A 3 %-os GEN tartalmú LLC rendszer alkalmas volt a hatóanyag részleges oldására, a direkt szerkezetvizsgálat során láthatóvá vált a jellegzetes liotróp folyadékkristályos lamelláris szerkezet.

4.2.3.2. Reológiai vizsgálatok

A folyadékkristályos rendszer vizsgálata során közvetett módszerként reológiai méréseket is folytattam szerkezetazonosítás céljából. A GEN inkorporálása után is a rendszer a lamellás liotróp folyadékkristályra jellemző reogramot mutatta.

4.2.3.3. Hatóanyag diffúziós és penetrációs vizsgálatok

A hatóanyag diffúziós mérés alapján a GEN diffúziója szintetikus membránon megfelelő volt (**3a ábra**). *Ex ovo* biológiai membrán alkalmazásakor már csökkent a penetrálódott hatóanyag mennyiség ($491,26 \pm 15,55 \mu\text{g cm}^{-2}$) (**3b ábra**). *Ex vivo* vizsgálatok során már csak a hatóanyag kis mennyisége penetrálódott a humán epidermiszen keresztül, ennek oka a SC rezervoár funkciójában keresendő. Az *ex vivo* penetrációs profil hasonló volt *ex ovo* profilhoz (**3c ábra**).

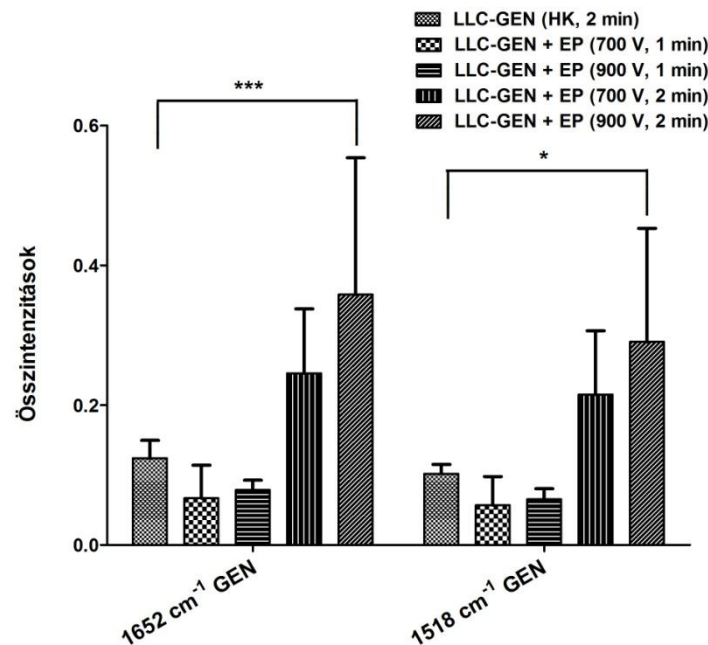


3. ábra Diffundált *in vitro* (a), vagy penetrált *ex ovo* (b) és *ex vivo* (c) GEN mennyisége.

4.2.3.4. ATR-FTIR spektroszkópia

A GEN tartalmú LLC hagyományos dermális alkalmazása mellett egy új beviteli módot is teszteltem, az aktív penetrációfokozó módszernek számító elektroporációt. Az elektroporációval történő hatóanyag bejutás nyomon követésére tape-stripping mintavétellel kombinált ATR-FTIR spektroszkópiát alkalmaztam, a GEN nyomait az 1652 cm^{-1} és 1518 cm^{-1} -es csúcsonál észleltem.

ATR-FTIR spektroszkópiás vizsgálatok alapján az 1 perces 700 V intenzitású EP kezelés nem eredményezett jobb hatóanyag penetrációt, mint a hagyományos kezelés. 1 perces 900 V intenzitású kezelés esetén viszont már mélyebb hatóanyag penetrációt értem el, mint a hagyományos kezelés esetén. 2 perces 700 V intenzitású EP kezelés már jelentősen megnövekedett GEN penetrációt eredményezett, a 900 V intenzitású kezelés esetén a hagyományos kezeléshez képest a változás szignifikánsnak bizonyult mindkét asszignált GEN csúcsra ($p < 0,001^{***}$ és $p < 0,05^*$) (4. ábra).



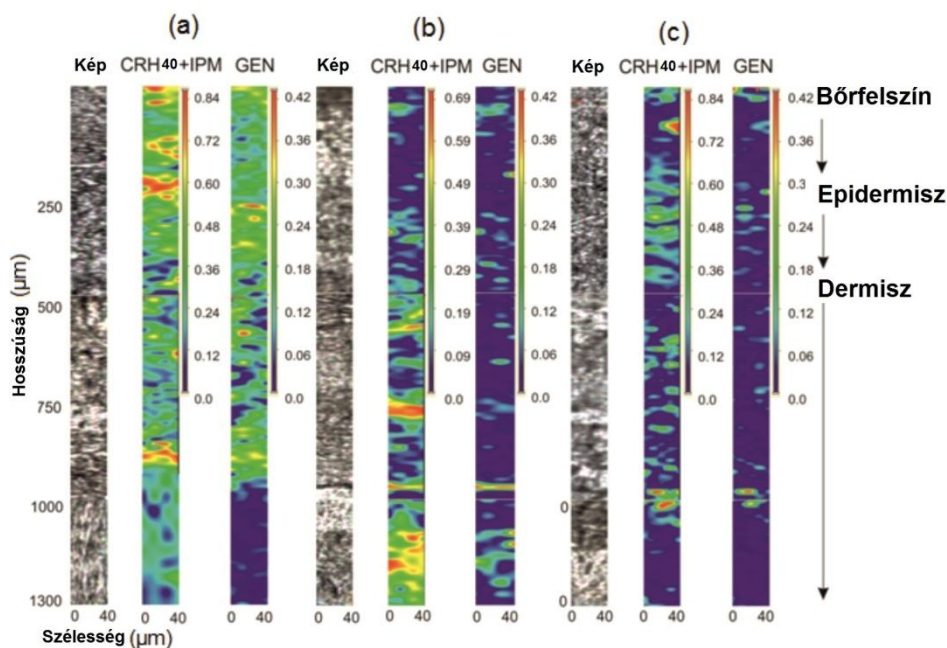
4. ábra Genistein relatív intenzitások összege 1652 cm^{-1} és 1518 cm^{-1} hullámszámnál. Hagyományos kezelés (HK) alkalmazása kontrollként ($p < 0,001^{***}$ és $p < 0,05^*$).

4.2.3.5. Raman spektroszkópia

Az elektroporációval kombinált LLC-GEN kezelés vizsgálatára *ex vivo* Raman spektroszkópiát is alkalmaztam. A Raman mérés lehetővé tette a kezelt egérbőrben a készítmény komponenseinek (CRH40, IPM, GEN) mélységi bőrpenetrációs vizsgálatát. Az ATR-FTIR eredmények alapján a 900 V intenzitású kezeléssel mélyebb penetráció érhető el,

ezért a mérés során az 1 és 2 perces 900 V intenzitású kezelést hasonlítottam össze a hagyományos alkalmazással.

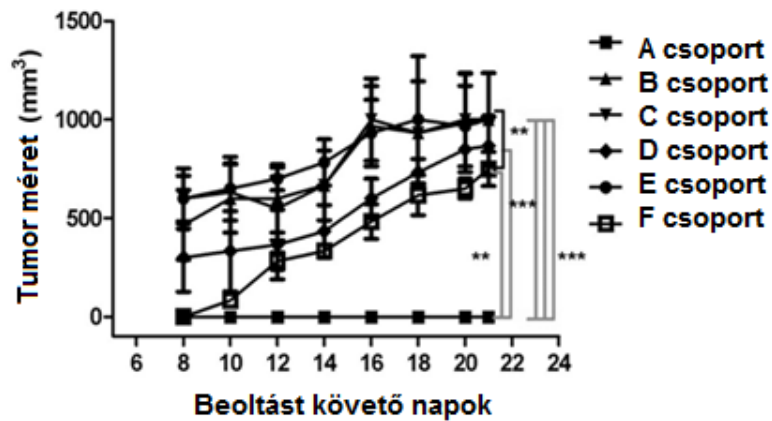
A klasszikus kezelést követően a hatóanyag és a LLC komponenseinek megfelelő eloszlása látható a bőr felső régióiban (0–1000 μm) (**5a ábra**). A 900 V intenzitású 1 perces EP eljárás után a GEN és a LLC komponensek felhalmozódtak a dermisz középső régiójában (**5b ábra**), amelynek valószínűsíthető oka, hogy a dermisz kollagén rostokból álló hálózata lassította a penetrációt. A bőr GEN és LLC komponens tartalma alacsony volt a 900 V intenzitású 2 perces EP eljárást követően, így feltételezhető, hogy a készítmény már a dermisz mélyebb rétegeibe penetrálódott (**5c ábra**). Az epidermisz és a dermisz felső régiója barrierként funkcionálnak, lelassítva a LLC-GEN penetrációját, míg ez a folyamat elektroporáció alkalmazásával jelentősen gyorsítható.



5. ábra Kvalitatív Raman térképek az eltérő EP protokollokat követő GEN megoszlásról az állati bőrben (10x nagyítás). Hagyományos kezelés, mint kontrol (a), 900 V 1 perces EP kezelés (b) és 900 V 2 perces EP kezelés (c). A tartalom színekódja: piros > sárga > zöld > kék.

4.2.3.6. Az elektroporáció hatása melanómás egér modellben

A tumor megjelenése a kezeletlen egerek és a hatóanyag tartalmú LLC klasszikus alkalmazása mellett a 8. napon történt. Az elektroporációval kombinált kezelés esetén a tumor a 10. napon jelent meg, kisebb tumor méretet eredményezve. A **6. ábrán** látható, hogy a legjobb eredményeket a LLC-GEN + elektroporáció kombinált alkalmazás (F csoport) mutatta.



6. ábra A tumor méretének változása (mm^3) 21. napon keresztül a különböző kísérleti csoportokban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ph.D. munkám célja a SC szerkezetének és a bőr barrier funkciójának a tanulmányozása volt a megfelelő hatóanyag penetráció elérése érdekében. Összehasonlítottam a plakkoktól mentes kezeletlen pszoriázisos bőrt egészséges emberek bőrével, illetve különféle penetrációfokozó módszerek hatékonyságát vizsgáltam.

1. Az épnek tűnő pszoriázisos bőr másodlagos fehérje szerkezetének vizsgálata tape-stipping módszerrel kombinált ATR-FTIR spektroszkópiával történt, az amid-I sáv komponenseit és relatív intenzitásukat szemi-kvantitatív módon a spektrum $1695\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ tartományában vizsgáltam, Fourier öndeconvolúcióval szétválasztottam, majd Gauss-Lorenz görbeillesztést alkalmaztam. A Gauss-Lorenz komponens görbe alatti területe arányos az adott másodlagos szerkezetet alkotó aminosavak mennyiségével. A komponensek területeinek relatív aránya megegyezik a fehérjében előforduló másodlagos szerkezetek arányával.

A kísérleti eredményeim újdonsága az alábbiakban foglalható össze:

- A pszoriázisos betegek plakkal nem érintett, ép bőrszerkezetében az irodalomban eddig nem részletezett szignifikáns fehérje szerkezet eltérés található.
- Az amid-I csoport minden komponensének intenzitása csökken, de a legszembetűnőbb eltérés az 1630 és 1660 cm^{-1} hullámszámnál lévő β -redő és kanyar

esetében jelentkezik.

- Az ATR-FTIR tape-strippinggel kombinálva alkalmas módszer lehet a pszoriázisos bőr gyors, egyszerű és nem-invazív tanulmányozására, amellyel diagnosztizálni és követni is lehetne a terápia hatékonyságát.

2. A Ph.D. munkám második részében különböző transzdermális penetrációfokozó technikákat tanulmányoztam a hatóanyag bőrön keresztüli penetrációjának növelése érdekében.

2.1. Biokompatibilis penetrációfokozó segédanyagok (szacharóz-zsírsvészterek és a Transcutol) hatásának vizsgálatához IBU tartalmú hidrogéleket alkalmaztam. A szacharóz-zsírsvészterek koncentrációsorozatát hatóanyag diffúziós kísérletekkel vizsgáltam vertikális Franz diffúziós cellával szintetikus membránon (*in vitro*) keresztül. A penetrációfokozók bőrre gyakorolt hatását hatóanyagmentes minták alkalmazásával egészséges önkéntesek bőrén tanulmányoztam *in vivo* bőrtesztekkel. Továbbá az ígéretes penetrációfokozóknak a viselkedését teszteltem két különböző bőr modellen egyaránt.

- Fontos volt a minimum és maximum effektív penetrációfokozó koncentráció meghatározása minden új formuláció esetén, mivel ezen paramétereket nagyban befolyásolják a hordozó és a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai. A szacharóz-laurát esetében a maximális hatást 6 %-nál, a szacharóz-mirisztátnál egy viszonylag kis cukorészter tartalomnál, 0,5 %-nál tapasztaltam.
- Az *ex vivo* és a Skin PAMPA hatóanyag penetrációs eredmények alapján a TR a szacharóz-mirisztát koszolvensként szignifikánsan növelte a cukorészter bejutását a bőrbe, ezáltal biztosítva a maximális penetrációfokozó hatását. Hidrogél alapon a SM + TR kombináció egy ígéretes penetrációfokozó kombinációnak bizonyult IBU esetében.
- A Skin PAMPA hatékony és gyors módszerként alkalmazható lehet a penetrációfokozó segédanyagok és a hatóanyag bőrbe juttatásának a modellezésére. Ez az új mesterséges membrán a kísérletek alapján szoros korrelációt mutatott az *ex vivo* humán epidermiszen elért eredményekkel.
- A cukorészterek (főképpen a szacharóz-mirisztát) hidrogél készítményalapban való alkalmazása az *in vivo* eredmények alapján megnövekedett és hosszan tartó bőrhidratációt okoz. A SM tartalmú gél a cukorészter mentes hidrogélhez képest szignifikánsan növelte a bőrhidratációt.

2.2. A nátrium-lauril-szulfát poliolokkal kombinált alkalmazásának ATR-FTIR spektroszkópiai vizsgálata alapján a glicerín és a xilitol csökkenti a SLS penetrációját a bőrbe. Magasabb koncentrációban történő alkalmazásukkal a hatás szignifikánsnak bizonyult.

2.3. A melanóma kezelésére alkalmas lipofil hatóanyag, a genistein liotróp folyadékkristályba történő formulálása megvalósult. A dermális készítmény hatékonyságát hatóanyag diffúziós és penetrációs kísérletekkel teszteltem vertikális Franz diffúziós cellával szintetikus membránon *in vitro*, chorioallantois membránon *ex ovo* és hő-szeparált epidermiszen *ex vivo*. Ezt követően a GEN tartalmú LLC és az elektroporáció kombinációjának lehetőségét vizsgáltam.

- Az elektroporáció szinergisztikus hatását alátámasztottam *in vivo* ATR-FTIR és *ex vivo* Raman spektroszkópiával szőrtelen egérbőrön. A bőrön keresztüli hatóanyag bevitel megvalósult a LLC-GEN önálló alkalmazása mellett is, viszont az elektroporációval kombinált LLC nanohordozó rendszer sokkal gyorsabb és hatékonyabb transzdermális hatóanyag transzportot biztosított.
- A melanómás egér modell segítségével sikerült alátámasztani, hogy az EP megfelelő eljárás lehet a LLC-GEN transzdermális bejuttatására, mivel késleltette a tumor kialakulását illetve mély bőrpenetrációt eredményezett.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Boglárka Balázs**, Gabriella Farkas, Ottó Berkesi, Rolland Gyulai, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Piroska Szabó-Révész, Lajos Kemény, Erzsébet Csányi: Protein structure is changed in psoriatic skin on the unaffected region – imaging possibility with ATR-FTIR spectroscopy. *MICROCHEMICAL JOURNAL* 117. 183–186. (2014)
IF: 2,746 Citációk: 3

- II. Corina Danciu, Marius Biriş, **Boglárka Balázs**, Erzsébet Csányi, Ioana Zinuca Pavel, Georgeta Pop, Codruta Soica, Lavinia Ceuta, Lucian Nita, Claudiu Morgovan, Dana Stoian: Pro-apoptotic Effect of Soy Total Extract Incorporated in Lyotropic Liquid Crystals Formulation, *REVISTA DE CHIMIE* 66. 1038–1041. (2015)
IF: 0,810

- III. Corina Danciu, Szilvia Berkó, Gábor Varju, **Boglárka Balázs**, Lajos Kemény, István Balázs Németh, Andreea Cioca, Alexandra Petruş, Cristina Dehelean, Citu Ioan Cosmin, Elena Amaricai, Claudia Crina Toma: The Effect of Electroporation of a Lyotropic Liquid Crystal Genistein-Based Formulation in the Recovery of Murine Melanoma Lesions, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 16. 15425–15441. (2015)
IF: 2,862

- IV. **Boglárka Balázs**, Eszter Csizmazia, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi: New approach of sucrose myristate as a promising penetration enhancer in dermal preparations, *TENSIDE SURFACTANTS DETERGENTS* 52. 375–379. (2015)
IF: 0,739

- V. **Boglárka Balázs**, Péter Sipos, Corina Danciu, Stefana Avram, Codruta Soica, Cristina Dehelean, Gábor Varju, Gábor Erős, Mária Budai-Szűcs, Szilvia Berkó, Erzsébet Csányi: An ATR-FTIR and Raman spectroscopic investigation of the electroporation-mediated transdermal delivery of a nanocarrier system containing an antitumour drug, *BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS* 7. 67–78. (2016)
IF: 3,648

- VI. **Boglárka Balázs**, Gábor Vizserálek, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, András Kelemen, Bálint Sinkó, Krisztina Takács-Novák, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi: Investigation of the efficacy of transdermal penetration enhancers through the use of human skin and a skin mimic artificial membrane, *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* 105. 1134–1140. (2016)
IF: 2,590

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

- I. Corina Danciu, Ciurlea Sorina, Erzsébet Csányi, **Boglárka Balázs**, Avram Ștefana, Camelia Peev, Dehelean Cristina: A new approach in the recovery of murine melanoma lesions: electroporation of lyotropic liquid crystals genistein based formulation, 5th BBBB International Conference, Athen, Greece, 26-28. September 2013. (poszter)
- II. **Balázs Boglárka**: A pszoriázisos bőr fehérje struktúrájának újszerű vizsgálati lehetősége, XX. Szent-Györgyi Napok, Szeged, 2013. november 15. (verbális prezentáció)
- III. **Balázs Boglárka**, Csizmazia Eszter, Berkó Szilvia, Szabóné Révész Piroska, Csányi Erzsébet: Szacharóz-zsír savészterek penetrációfokozó hatásának vizsgálata, XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2014. április 10-12. (poszter)
- IV. **Boglárka Balázs**, Eszter Csizmazia, Szilvia Berkó, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi: Penetration enhancer effect of sucrose esters, Skin Forum 14th Annual Meeting, Prague, Czech Republic, 4-5. September 2014. (poszter)
- V. **Boglárka Balázs**, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi: Drug diffusion and permeation studies of Genistein containing Lyotropic liquid crystals, 5th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems, Dubai, UAE, 16-18. March 2015 (poszter)
- VI. **Boglárka Balázs**, Mónika Bakonyi, Eszter Csizmazia, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi: Non-invasive in vivo comparison of penetration enhancers containing hydrogel formulations, 1st European Conference on Pharmaceutics - Drug Delivery, Reims, France, 13-14. April 2015. (poszter)

- VII. **Balázs Boglárka**: Szacharóz-zsírsvészterek penetrációfokozó hatásának vizsgálata, Richter Gedeon Centenáriumi Alapítvány előadótülés, Budapest, 2015. március 05. (verbális prezentáció)
- VIII. Csupor Dezső, Jedlinszki Nikoletta, **Balázs Boglárka**, Csányi Erzsébet: Veszélyes-e a nadálytő? Egy farmakokinetikai vizsgálat tanulságai, XIV. Magyar Gyógynövény Konferencia, Pannonhalma, Magyarország, 2015. május 29-30. (poszter)
- IX. **Boglárka Balázs**, Attila Léber, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Piroska Szabó-Révész, Erzsébet Csányi: In vivo investigation of newly developed microemulsion and lyotropic liquid crystal systems, 4th International Conference and Expo on Cosmetology & Trichology, Philadelphia, USA, 22-24. June 2015. (poszter)
- X. Nikoletta Jedlinszki, Anikó Dobó Beretka, **Boglárka Balázs**, Dezső Csupor: Absorption of lycopsamine from a comfrey ointment through human skin, 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA2015), Budapest, Hungary, 23-27. August 2015. (poszter)
- XI. Léber Attila, **Balázs Boglárka**, Berkó Szilvia, Csányi Erzsébet: Új típusú nanohordozó rendszerek bőrre gyakorolt hatásának tanulmányozása non-invazív NIR spektroszkópiái és *in vivo* vizsgálati módszerekkel, Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, 2015. október 15-17. (poszter)
- XII. **Balázs Boglárka**, Berkó Szilvia, Csányi Erzsébet: Elektoporáció, mint a bőrön keresztüli hatóanyag bejuttatás új típusú lehetősége, Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, 2015. október 17. (verbális prezentáció)