



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



HATÓANYAGOK AGYBA JUTTATÁSA A NAZÁLIS ÚTVONALON KERESZTÜL

Ph.D. értekezés tézisei

Horvát Sándor

Témavezetők:

Dr. Deli Mária

MTA SzBK, Biofizikai Intézet
Molekuláris Neurobiológiai Csoport

Prof. Dr. Erős István

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertechnológiai Intézet

Szeged

2009

1. BEVEZETÉS

A vér-agy gát dinamikus határfelületet alkot az agy és a vérkeringés között. A központi idegrendszer kezelésére szánt hatóanyagok a vér-agy gáton átjutva tudják kifejteni hatásukat, azonban a lehetséges farmakonok 98%-ának az agyba való bejutását az agyi mikroerek speciális barrier-funkciói megakadályozzák, ezért csupán a kis méretű és lipofil molekulák képesek passzív transzporttal az agyszövetbe jutni. Az agyszövetbe irányuló gyógyszer transzport fokozására többféle megközelítés létezik. Ilyen módszer például a gyógyszermolekulák, vagy a vér-agy gát funkciók módosítása. A vér-agy gátat megkerülő alternatív útvonalak kiaknázása egy harmadik megközelítés. A farmakonok közvetlenül az agyszövetbe, az agy-gerincvelői folyadékterekbe, vagy tumorszövetekbe juttathatóak injektálással, különféle gyógyszeres szivacsok, illetve minipumpák alkalmazásával. Emellett a nazális és az okuláris út jelentős, új alternatív útvonal az agyi targetálásra. A hatóanyagok intranazális bejuttatásának számos előnye van. Ez a módszer nem invazív, könnyen elvégezhető a beteg vagy az orvos által, gyors felszívódás érhető el, valamint elkerülhető a máj és a vese first-pass metabolizmusa és nem szükséges a gyógyszert sterilen elkészíteni.

A szaglórégió egyedülálló anatómiai és élettani tulajdonságai lehetővé teszik mind extracelluláris, mind intracelluláris úton a hatóanyag központi idegrendszerbe jutását a vér-agy gát megkerülésével. A nazális útvonal kihasználásánál azonban figyelembe kell vennünk több tényezőt, mint például a szaglóidegsejtek specifikus receptorait, a hatóanyag lipofilitását és molekulatömegét.

A nazális hatóanyag bejuttatására alkalmazott hordozórendszer kialakításánál számos dologra kell ügyelnünk. Nazálisan beadott hatóanyagok a mukociliáris tisztulás miatt általában gyorsan távoznak az orrüregből az emésztő traktusba. Az alacsony membránpermeabilitás és az epitélisejtek közötti kapcsoló struktúrák, amelyek megakadályozzák a molekulák transz-, ill. paracelluláris transzportját, további lényeges korlátozó tényezőt jelentenek a nagy molekulatömegű vagy poláros hatóanyagok számára. A mukózus nyálkáréteg metabolikus kapacitása is hozzájárul a

peptidek és fehérjék alacsony ornyálkahártyán keresztüli transzportjához. Ezen okok miatt a nazális vivőanyagok készítése során különösen lényeges mukoadhezív komponensek felhasználása az ornyálkahártyán való tartózkodás fokozására, valamint abszorpciófokozó segédanyagok alkalmazása az ornyálkahártyán keresztüli hatóanyag transzport növelése céljából.

Noha számos újfajta, szisztémás hatóanyag bejuttatására kifejlesztett nazális termék már forgalomban van, központi idegrendszeri betegségek kezelésére szánt, a nazális utat kihasználó gyógyszer még nincs a piacon. Ezért a gyors és hatékony agyi farmakon koncentrációt biztosító nazális hordozórendszerek fejlesztése egy új és mindeztidáig kiaknázatlan kutatási terület.

2. CÉLKITÚZÉSEK

A nazális hatóanyagbejuttatás fentebb említett sajátosságait, a szaglórégió permeabilitási tulajdonságait és a nazális hordozók szerepét figyelembe véve, célkitűzéseink a következők voltak:

- (1) a fehérje összetétel felderítése a szaglórégió kapcsoló struktúráiban immunhisztokémiai vizsgálatokkal,
- (2) a vérerek permeabilitásának jellemzése a szaglórégió különböző részeiben az orrüregtől a központi idegrendszerig,
- (3) bioadhezív és/vagy abszorpciófokozó komponenseket tartalmazó hordozó rendszer formulálása és jellemzése,
- (4) különböző vivőanyagok esetén a 4,4 kDa átlagos molekulatömegű fluorescein-izotiocianáttal jelölt dextrán (FD-4) modellanyag vérplazma és agyi farmakokinetikájának, valamint biohasznosulásának mérése patkánykísérletekben,
- (5) a nazális hordozók szaglórégióba gyakorolt akut toxicitásának vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Antitestek és immunhisztokémia

A szoros zárókapcsolat (tight junction, TJ) fehérjék detektálására fixált szaglórégió és agyszövet mintákon elsődleges antitestekként claudin-1, claudin-3, claudin-19, occludin, ZO-1, ZO-2, connexin-43 fehérjék ellenében termelt poliklonális nyúl szérumot, valamint ZO-1 ellen termelt monoklonális egér antitestet használtunk. Másodlagos antitestként Cy3 és Cy2 festékekkel jelölt kecske anti-egér és anti-nyúl immunglobulint alkalmaztunk. A sejtmagokat Sytox vagy Topro festékekkel jelöltük.

3.2. Permeabilitás vizsgálatok

A vérerek permeabilitásának jellemzésére a szaglórendszerben fluoreszcein (MW 376 Da) és a szérum albuminhoz kötődő Evans kék (MW 67 kDa) festékek keverékét injektáltuk intravénásan patkányokba. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a transzkardiális perfúzióhoz használt fixáló oldathoz 1% lantán-nitrátot adtunk.

3.3. A vivőanyagok elkészítése

Az abszorpciófokozó Cremophor RH40-et fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. A nátrium-hialuronsavat kis mennyiségekben adtuk az oldathoz, és a teljes oldódás biztosításához a mintákat 24 óra múlva újra homogenizáltuk. Az FD-4 tesztmolekulát az elkészített hordozókban oldottuk fel. Intranazális beadás esetén 1 mg/ml, az intravénás beadásnál 8 mg/ml koncentrációban.

1. táblázat. A vivőanyagok összetétele (tömegszázalékban).

Hordozó	Fiziológiás sóoldat	Nátrium-hialuronsav	Cremophor RH40
PhS	100.0%	-	-
AE	90.0%	-	10%
HA	98.5%	1.5%	-
MA	88.5%	1.5%	10%

3.4. Reológiai mérések

A reológiai mérésekhez Rheostress 1 Haake műszert használtunk. A minták folyás- és viszkozitás-görbéit 0,01 és 100 s⁻¹ közötti nyírási sebesség-gradiensek esetén vettük fel 37 °C-os állandó hőmérséklet mellett.

3.5. *In vitro* hatóanyag-felszabadulás vizsgálatok

A vizsgálatok Hanson SR8-plus kioldókészülékben folytak. Membránként 0,45 µm pórusátmérőjű membrán filtert használtunk. Kioldóközegként 7,4-es pH-jú, 37 °C -os foszfát-puffert alkalmaztunk, és 1 mg/ml FITC-dextrán tartalmú rendszereket vizsgáltunk. Mintavételi időpontok az alábbiak voltak: 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 és 480 perc. A levett minták FITC-dextrán tartalmát spektrofotométer segítségével határoztuk meg. Minden esetben hat párhuzamos mérést végeztünk.

3.6. Állatkísérletek

Minden kísérlethez három hónapos, hím Wistar patkányokat (316 ± 48 g) használtunk.

3.6.1. Kezelések

A patkányokat intraperitoniálisan tribromoetanollal altattuk, és a hanyatt fekvő állatok jobb orrüregébe 40 µl mintát injektáltunk. A mikropipettát 5 mm mélyen helyeztük az orrüregbe, hogy a lehető leghosszabb tartózkodási időt biztosítsuk a hordozónak. Intravénás kezelés esetén 500 µl oldatot fecskendeztünk az altatott állatok farokvénájába. A kísérlet során öt különbözőképpen kezelt csoportot vizsgáltunk, öt időpontban (30, 60, 120, 240 és 480 perc).

2. táblázat. A vizsgálati csoportok összetétele.

Hordozó	Kezelés	n	V _{FD-4}	C _{FD-4}	m _{FD-4}
PhS	intravénás	4	500 µl	8 mg/ml	4000 µg
PhS	intranazális	4	40 µl	1 mg/ml	40 µg
AE	intranazális	4	40 µl	1 mg/ml	40 µg
HA	intranazális	4	40 µl	1 mg/ml	40 µg
MA	intranazális	4	40 µl	1 mg/ml	40 µg

n, állatok száma csoportonként; *V*, a beadott minta térfogata; *C*, a minták FD-4 koncentrációja; *m*, beadott FD-4 mennyisége, minta/állatban, PhS, fiziológiás sóoldat; AE, abszorpciófokozó Cremophor RH40-et tartalmazó vivőanyag; HA, csak nátrium-hialuronsavat tartalmazó hordozó; MA, mukoadhezív nátrium-hialuronsavat és abszorpciófokozó Cremophor RH40-et is tartalmazó vivőanyag.

3.6.2. Plazma- és agyminták vétele az FD-4 szint meghatározáshoz

A kezelések után, mély altatásban, heparinizált csövekbe vért vettünk az összes patkánytól, majd az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk. Ezt követően az agyukat eltávolítottuk és 10 agyrégiót különítettünk el. Ezek a szaglógumó, a frontális kéreg, a parietális kéreg a jobb és a bal oldalról egyaránt, valamint a hippokampusz, a köztiagy, a hid és a kisagy voltak. Az agyminták tömegét megmértük. A vérmintákat centrifugáltuk és a további vizsgálatokig a plazma és agymintákat lefagyasztottuk.

3.7. A minták FD-4 koncentrációjának meghatározása

Az agymintákat 7.5% w/v triklórecetsav oldattal Potter–Elvehjem szövetdarálóban homogenizáltuk. A homogenizált mintákat centrifugáltuk, majd a felülúszókat semlegesítettük. A minták FD-4 tartalmát egy PTI spectrofluorométerrel (Photon Technology International Inc.) határoztuk meg, 492.5 nm excitációs és 514.5 nm emissziós hullámhossz beállításoknál. A mérés érzékenysége a mintákban 1 ng/ml FD-4 volt. A mérés linearitása $r^2 \geq 0.9986$, a relatív standard deviáció pedig $RSD \leq 9.19\%$.

3.8. Elektronmikroszkópia

A patkányokat 0.1 M kakodilát puffert (pH 7.4) tartalmazó 2.5% glutáraldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk, majd az eltávolított szaglőrendszert további 4 órán át utófixáltuk, ezt követően kakodilátban tároltuk. Az agykérget, szaglógumót, ornyálkahártyát 1% OsO₄-ot tartalmazó 0.1 M kakodilát pufferben utófixáltuk, azután etanol sorozattal víztelenítettük. A mintákat beágyaztuk és ultravékony szeleteket metszettünk ultramikrotómmal. A metszeteket rézgridekre vittük fel és ólomcitráttal kontrasztoltuk majd a mintákat EM10A (Zeiss) elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.9. Statisztikai analízis

Minden adatot átlag \pm SEM vagy SD értéként tüntetünk fel. Az értékeket GraphPad Prism programmal hasonlítottuk össze. A variancia-analízist Newman–Keuls próba követte. A változásokat statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P < 0.05$ -nél.

4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

4.1. Reológiai mérések

A vivőanyag viszkozitása befolyásolhatja a hatóanyag diffúziós sebességét, ezért a hatóanyag felszabadulásban fontos szerepe van. Alacsony nyírőfeszültség értékek, valamint a nyírőfeszültség és a nyírási sebességgrádiens között lineáris korrelációt figyeltünk meg a fiziológiás sóoldatot (PhS) és az abszorpciót fokozó tulajdonságú vivőanyagot tartalmazó (AE) minták esetén, ezek tipikus Newton-i folyási sajátságokkal rendelkeztek. A nátrium-hialuronsavat is tartalmazó rendszerek (HA, MA) viszkozitás értékei magasabbak voltak, mint a PhS és EA minták esetén. Ezek pszeudoplasztikus folyási sajátsággal rendelkeztek.

4.2. *In vitro* hatóanyag felszabadulás

A mukoadhezív biopolimert nem tartalmazó PhS és AE hordozók hasonló kioldódási kinetikát és profilt mutattak, ugyanakkor a hialuronsavat tartalmazó HA és MA vivőanyagok esetében ezektől eltérő profilt láttunk. A hialuronsav 30-240 perc között lelassítja az FD-4 felszabadulást, de 8 óra elteltével a felszabadulás minden vivőanyagnál megegyezett.

4.3. A nazális út morfológiai alapjai

4.3.1. A kapcsoló fehérjék immunfestése a szaglőrendszerben

Az élőlények belső környezetét epitél és endotél barrierek választják el a külvilágtól. A barrierek morfológiai alapját a sejtközötti kapcsolatok képezik. Kutatásaink során immunhisztokémiás vizsgálatokkal tanulmányoztuk a szaglőrendszer fő barrierjeinek TJ struktúráját: (i) a szaglőhám epitelsejt rétegei, (ii) a lamina propria vérereinek endotélsejtjei, valamint (iii) a szaglőneuronokat burkoló és védő OEC-k (olfactory ensheathing cell) és perineurális sejtek közötti TJ komplexeket.

3. táblázat. A szaglőrégió barrierjeiben talált immunhisztokémiai eredmények összefoglalója.

Kapcsoló fehérje	Epitél sejtek	Endotél sejtek	OEC-k
ZO-1	+++	+++	+++
ZO-2	++	-	-
Occludin	+++	+	+++
Claudin-1	+++	-	-
Claudin-3	+++	-	-
Claudin-5	+++	+	++
Claudin-19	++	-	-

Az OEC-k TJ fehérjeösszetétele az endotelsejtekéhez hasonló volt és claudin-5, occludin és ZO1 fehérjéket tartalmazott. Vizsgálataink alapján a gyógyszerbejuttatás szempontjából a szaglórégió epitelsejt rétegének barrierje a legösszetettebb és a legszorosabb.

4.3.2. A szaglórégió permeabilitásának jellemzése

Festék extravazáció

Eredményeink azt mutatják, hogy mind a légző-, mind a szaglórégióban a lamina propria erei áteresztőek fluoreszcein és Evans kék festékekre, ezzel szemben az agy erei nem engedik át a festékeket. Ezek az eredmények megerősítik az endotelsejtek közötti szoros zárókapcsolatok (TJ) fehérje összetételének vizsgálata során kapott adatokat.

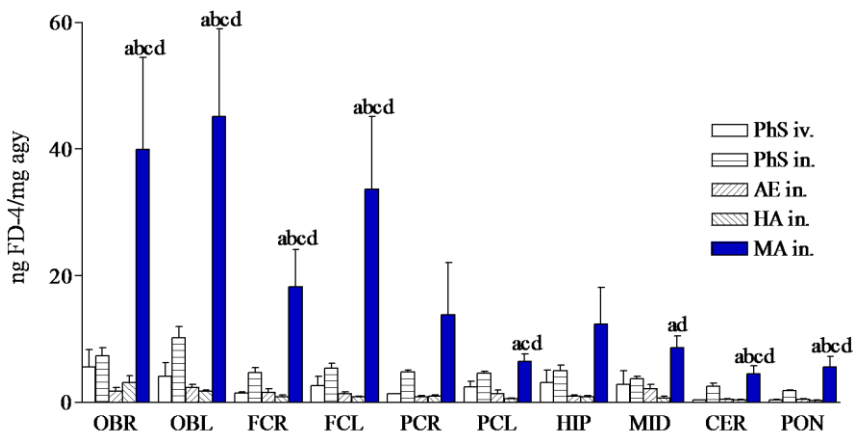
Lantán-nitrát vizsgálat

Elsőként igazoltuk, hogy a szaglórégió erei áteresztik az elektronmikroszkópiában jelölőanyagként használt kis molekulatömegű lantán-nitrátot. Az OEC-k sejtközötti kapcsolatai nem teljes zárt barrieret képeznek, így a sejtközötti térből a periaxonális térbe szivároghat a jelzőanyag. Ez a megfigyelés igazolja a szaglóiidegen keresztüli transzportút morfológiai alapjait. Egyben azt is alátámasztja, hogy amennyiben egy hatóanyag megfelelő nazális hordozó segítségével átjut a szaglóhám epitelsejt rétegén, a nazális úton elérheti a központi idegrendszert.

4.4. Az FD-4 tesztmolekula nazális targetálása különböző vivőanyagokkal patkányban

Kísérleteink egyik legfontosabb eredménye, hogy a felületaktív Cremophor, mint abszorpciófokozó és a hialuronsav, mint viszkózus bioadhezív polimer szignifikánsan növelni tudta az FD-4 modellanyag orrüregből agyba irányuló transzportját. Ez leginkább a szaglógumóban és a frontális agykérgi régióban érvényesült 4 órával a beadás után.

1. ábra. FD-4 koncentrációk a különböző agyterületeken, 240 perccel a beadást követően.



OBR: jobb oldali szaglógumó; OBL: bal oldali szaglógumó; FCR: jobb oldali frontális kéreg; FCL: bal oldali frontális kéreg; PCR: jobb oldali parietális kéreg; PCL: bal oldali parietális kéreg; HIP: hippocampus; MID: köztiagy; CER: kisagy; PON: hid. Statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0.05$) detektáltunk az MA csoport esetén a többi csoporthoz képest (átlag \pm SEM, $n = 4$).

Az eredmények gyakorlati alkalmazhatóságának szempontjából úgy véljük, hogy az idegrendszer neuropeptid-, vagy hormonreceptorain ható, pl. étvágyat, testtömeget szabályozó peptidek, vagy 1-4 kDa nagyságú peptidszakaszok terápiás célra targetálhatók lehetnek MA formulációban.

4.4.1. Felületaktív anyagok, mint abszorpciófokozók

Abszorpciófokozónak a felületaktív Cremophor RH40-et használtuk. Habár a felületaktív anyagok nem specifikusan növelik a permeabilitást, így a hatóanyagok paracelluláris és transzcelluláris transzportját, az AE hordozó esetében nem észleltünk a PhS-nél magasabb agyi FD-4 koncentrációt. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a mukociliáris tisztulás következtében ez a két nem-viszkózus hordozó gyorsan kiürül az orrüregből. A HA-val összehasonlítva az MA hordozó esetében nagyobb agyi FD-4 koncentrációt mértünk, ami azt jelzi, hogy a Cremophor fontos szerepet

játszik a szaglőrendszer legfontosabb barrierje, az epitélium réteg permeabilitásának növelésében.

4.4.2. A mukoadhézió szerepe nazális hordozóknál

Noha a nazális gyógyszerbejuttatás szempontjából a viszkozitás és a mukoadhézió kulcsfontosságú jellemző, és a hialuronsav kiváló mukoadhezív tulajdonságokkal, természetes biokompatibilitással rendelkezik, valamint nem vált ki immunválaszt, eddig csupán egyetlen tanulmány vizsgálta a nátrium-hialuronsavat nazális abszorpció során. Ebben a tanulmányban nem határozták meg a vizsgált hatóanyagok farmakokinetikáját a vérben ill. a központi idegrendszerben.

Kísérleteink során a nátrium-hialuronsav önmagában (HA hordozó) nem növelte az FD-4 agyba jutását, ezzel szemben Cremophor RH40-nel alkalmazva (MA) jelentős bejutást detektáltunk.

3. táblázat. Farmakokinetikai paraméterek az agyban

Hordozó	c_{\max} [ng FD-4/ml agy] átlag \pm SD	t_{\max} [min]	AUC átlag \pm SD	Relatív BH átlag \pm SD
PhS iv.	1.72 \pm 0.90	240	598 \pm 178	1.0 \pm 0.3
PhS in.	4.49 \pm 0.14	120	1523 \pm 97	254.7 \pm 16.3
AE in.	2.07 \pm 0.21	30	554 \pm 83	92.7 \pm 13.9
HA in.	1.39 \pm 0.09	60	431 \pm 52	72.2 \pm 22.7
MA in.	15.21 \pm 9.11	240	3358 \pm 1713	561.5 \pm 286.5

AUC, koncentráció/idő görbe alatti terület; BH, biohasznosulás a PhS iv.csoporthoz hasonlítva; PhS, fiziológiás sóoldat; AE, abszorpciófokozót tartalmazó hordozó; HA, nátrium-hialuronsav önmagában; MA, nátrium-hialuronsavat és Cremophor RH40-et tartalmazó vivőanyag; n = 4.

A HA és az MA hordozók hatékonysága közötti különbség azt jelezheti, hogy az optimális viszkozitás, a feltételezett mukoadhezivitás, a hosszabb tartózkodási idő

és a felületaktív anyag általi abszorpciófokozás egyaránt hozzájárul a tesztmolekula fokozott agyi bejutásához.

Az MA hordozó hatása nincs összefüggésben a vérplazma FD-4 szintjével, Az intravénásan beadott FD-4 nagy koncentrációt eredményezett a plazmában, míg a vér-agy gát szelektív és szigorúan szabályozott transzportfolyamatai miatt csak alacsony koncentrációt eredményezett az agyban. Ezzel szemben a nazális vivőanyagok elhanyagolható plazmakoncentrációhoz vezettek, ugyanakkor az MA csoportnál az agyi FD-4 koncentráció jelentősen meghaladta az intravénás csoport agyi FD-4 mennyiségét. Ezek az eredmények világosan jelzik nazális beadás esetén a közvetlen utat a központi idegrendszerbe a vér-agy gát megkerülésével.

4. táblázat. Farmakokinetikai paraméterek a plazmában.

Hordozó	c_{max} [ng FD-4/ml plazma] átlag ± SD	t_{max} [min]	AUC átlag ± SD	Relatív BH átlag ± SD
PhS iv.	8253 ± 848	30	592411 ± 82638	1.00 ± 0.14
PhS in.	6.52 ± 3.16	30	1887 ± 730	0.32 ± 0.12
AE in.	3.04 ± 2.35	30	1129 ± 567	0.19 ± 0.10
HA in.	4.36 ± 0.53	30	1719 ± 79	0.29 ± 0.01
MA in.	9.73 ± 6.27	120	1847 ± 1060	0.31 ± 0.18

AUC, koncentráció/idő görbe alatti terület; BH, biohasznosulás a PhS iv.csoporthoz hasonlítva; PhS, fiziológiás sóoldat; AE, abszorpciófokozót tartalmazó hordozó; HA, nátrium-hialuronsav önmagában; MA, nátrium-hialuronsavat és Cremophor RH40-et tartalmazó vivőanyag; n = 4.

A nazális formulálások fejlesztésénél fontos szempont azok toxicitása. Elektronmikroszkópiával kimutattuk, hogy a kísérleteink során használt, hialuronsavat és Cremophor RH 40-et tartalmazó hordozó nem indukált szövethárosodást, epiteliális vagy szubepiteliális toxicitást, valamint csillókárosodást vagy elhalást.

5. ÖSSZEGRÉS

Hidrofil molekulák vagy nagy méretű biofarmakonok bejuttatása a központi idegrendszerbe még mindig nagy kihívás. A vér-agy gát megakadályozza a lehetséges terápiás molekulák agyba jutását. Hatóanyagok agyi targetálásához a molekuláknak keresztül kell jutni a vér-agy gáton, vagy alternatív útvonalakat kell kiaknázni. Specifikus anatómiai és élettani jellemzőinek köszönhetően az intranazális út ilyen vér-agy gátat megkerülő közvetlen útvonal az idegrendszer felé.

A szaglólórendszer három fő barrierje az epitelsejtek, a lamina propria ereit alkotó endotelsejtek, és az OEC-k, amelyek a szaglólóidegeket védik. Immunohisztokémiás eljárással feltártuk az itt található szoros zárókapcsolatok fehérjeösszetételét. A patkány endotelsejtek és OEC-k zárókapcsolat-mintázata hasonló, claudin-5, occludin, valamint ZO-1 fehérjék alkotják. A szaglólóepitelsejtek ezeken kívül ZO-2, claudin-1, -3 és -19 fehérjéket is termelnek, és a gyógyszerátjutás szempontjából a legösszetettebb és legszorosabb barriert alkotják. Ezekkel az eredményekkel összhangban kimutattuk, hogy a lamina propria véreirei áteresztik a lantán elektronmikroszkópos jelölőanyagot, míg az agyi erek nem. Az OEC-k szoros zárókapcsolatai tökéletlen barriert képeznek, így a sejtközötti térből a periaxonális térbe szivároghat a jelzőanyag. Ez a megfigyelés először ad magyarázatot a szaglólóidegen keresztüli nazális transzportút morfológiai alapjaira.

Ezek a barriereken keresztüli hatóanyag átjuttatásra nazális vivőanyagokat fejlesztettünk, amelyeket patkánykísérletekben teszteltünk 4 kDa nagyságú fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt dextransz használva tesztmolekulaként. A négy vizsgált hordozóból a felületaktív Cremophor abszorpciófokozót, illetve a viszkózus bioadhezív polimer hialuronsavat tartalmazó kombináció szignifikánsan növelte a tesztmolekula agyba kerülését a nazális útvonalon keresztül, különösen a szaglólógumó és a frontális kéreg régiókban. Kimutattuk, hogy a kísérletben használt hordozórendszerek nem károsítják a szaglólórendszer szövetét, biztonságosan alkalmazhatóak.

Kísérleteink alapján a hialuronsav-tartalmú vivőanyag alkalmas lehet hatóanyagok, biológiailag aktív peptidek bejuttatására a központi idegrendszerbe a nazális úton a vér-agy gát megkerülésével.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Deli Máriának a tudományos útmutatást, bátorítást és a rengeteg segítséget a Ph.D. tanulmányaim során.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Erős Istvánnak, a Gyógyszertechnológiai Intézet professzorának támogatásáért.

Köszönöm Dr. Siklós Lászlónak a Molekuláris Neurobiológiai Csoport vezetőjének, és Prof. Révész Piroskának a Gyógyszertechnológiai Intézet vezetőjének támogatását tanulmányaim során.

Hálával tartozunk Prof. Hartwig Wolburgnak a csoportok közötti tudományos együttműködésért, amelynek keretében történt a szaglórendszer elektronmikroszkópos és immunhisztokémiai tanulmányozása.

Hálás vagyok Dr. Fehér Andrásnak, Kiss Lórándnak, Dr. Kurunczi Anitának, Dr. Kürti Leventének, Dr. Sipos Péternek, Tóth Andreának és Dr. Veszeka Szilviának a közös munkákért és a kellemesen együtt töltött időért.

Köszönöm Ngo Thi Khue Dung-nak a kiváló technikai közreműködést.

Köszönöm a Molekuláris Neurobiológiai csoport minden tagjának a hasznos segítséget.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Jámbor Izabellának és családomnak a szünni nem akaró szeretetüket és támogatásukat a tanulmányaim folyamán.

A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA T37834, T37956, M036252) és a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (RET 08/2004, GVOP-KMA-52) és a Richter Gedeon Alapítvány támogatta.

7. KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSKIVONATOK

Az értekezés alapját képező közlemények

- I. Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Sam K., **Horvát S.**, Deli M.A., Mack A.F.
Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat.
Histochemistry and Cell Biology; 130: 127-140, 2008.
IF: 2.320 (2008)
- II. **Horvát S.**, Fehér A., Wolburg H., Sipos P., Veszélka S., Tóth A., Kis L., Kurunczi A., Balogh G., Kürti L., Erős I., Szabó-Révész P., Deli M.A.
Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics; 72: 252-259, 2009.
IF: 3.344 (2008)
- III. **Horvát S.**, Kis L., Dr. Szabóné Dr. Révész P., Dr. Erős I., Dr. Deli M.
Hatóanyagok agyba juttatása a nazális útvonalon keresztül.
Gyógyszerészet; 53: 259-266, 2009.
IF: -

Az értekezés témájában bemutatott poszterek és előadások

P = Poszter, E = előadás

1. Deli M.A., Fehér A., Kurunczi A., Sipos-Bodó E., Veszélka S., **Horvát S.**, Penke B., Szabó-Révész P., Targeting molecules to brain by intranasal delivery.
9th Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Salzburg, Austria, 2006. szeptember 7-10. E

2. Kurunczi A., Fehér A., Veszelka S., Sipos E., **Horvát S.**, Szabó-Révész P., Erős I., Párducz Á., Penke B., Deli M., β -amiloid peptid bejuttatás agyba intranazális úton - egy új lehetséges Alzheimer-kór modell?
X. Alzheimer-kór konferencia, Szeged, 2006. szeptember 20-22. P
3. Fehér A., Kurunczi A., Veszelka S., Sipos E., **Horvát S.**, Párducz Á., Penke B., Deli M., Erős I., Révész P., B-amiloid peptid központi idegrendszerbe irányuló transzportjának vizsgálata intranazális alkalmazás esetén.
Gyógyszerkutató Szimpózium, Debrecen, 2006. november 24-25. P
4. **Horvát S.**, Fehér A., Kurunczi A., Veszelka S., Penke B., Erős I., Szabó-Révész P., Deli M., Molekulák agyba juttatása intranazális beadással.
Magyar Idegtudományi Társaság XI. konferenciája, Szeged, 2007. január 24-27. P
5. Deli M. A., **Horvát S.**, Fehér A., Veszelka S., Kurunczi A., Kürti L., Penke B., Erős I., Szabó-Révész P., Targeting molecules to brain by intranasal delivery.
Cerebrovascular Biology Conference, Ottawa, Kanada, 2007. június 24-28. P
- 6.. Fehér A, **Horvát S.**, Veszelka S., Kurunczi A., Kürti L., Erős I., Deli M.A., Révész P., Study of drug transport to the central nervous system following intranasal administration
BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Tallinn-Tartu, Észtország, 2007. szeptember 13-15. E
7. **Horvát S.**, Fehér A., Veszelka S., Kurunczi A., Kürti L., Penke B., Erős I., Szabó-Révész P., Deli M.A., Bioadhesive formulations increase the brain targeting of molecules by the nasal pathway.
Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Potsdam, Németország, 2007. szeptember 13-16. P

8. **Horvát S.**, Fehér A., Veszelka S., Kurunczi A., Kürti L., Penke B., Erős I., Szabó-Révész P., Deli M.A., Bioadhesive formulations increase the brain targeting of molecules by the nasal pathway.
7th Conference and Workshop on Biological Barriers and Nanomedicine, Saarbrücken, Németország, 2008. február 20-29. P
9. **Horvát S.**, Fehér A., Veszelka S., Tóth A., Kis L., Sipos P., Kürti L., Erős I., Szabó-Révész P., Deli M.A., Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue.
COST-ESF/IBRO Training School “Neuroimaging and complementary techniques” Belgrád, Szerbia, 2008. június 29-július 6. P
10. **Horvát S.**, Fehér A., Sipos P., Veszelka S., Tóth A., Kis L., Kurunczi A., Kürti L., Erős I., Szabó-Révész P., Deli M.A., A hialuronsav, mint mukoadhézív komponens, növeli a molekulák agyba juttatását a nazális útvonalon keresztül.
A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Ipari Szervezete, Gyógyszer-technológiai és Gyógyszerkutató Szakosztályának Konferenciája, Sopron, 2008. szeptember 25-27. P
11. **Horvát S.**, Deli M.A., Erős I., Gyógyszerbejuttatás az agyba a nazális út, mint alternatív beviteli kapu felhasználásával
Sófi József Alapítvány Konferencia, Szeged, 2009. március 25. E