Gyógyszerek permeábilitásának vizsgálata elméleti és gyakorlati szempontból PAMPA módszerrel

Doktori értekezés

Vizserálek Gábor

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Takácsné Dr. Novák Krisztina, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Keserű György, D.Sc., c. egyetemi tanár
Dr. Budai Marianna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vincze Zoltán, C.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, C.Sc., egyetemi tanár
Dr. Osváth Szabolcs, Ph.D., tud. főmunkatárs

Budapest
2016

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke 4

2. Bevezetés 5

2.1. Irodalmi háttér 6

2.1.1. A permeábilitás fogalma és szerepe a fizikai-kémiai jellemzésben 6

2.1.1.1. A permeábilitás, mint kinetikai paraméter 6

2.1.1.2. A permeábilitás fajtái és számolásuk 7

2.1.1.3. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) 9

2.1.2. A permeábilitás meghatározásának lehetőségei 10

2.1.2.1. Sejtkultúra modellek használata 11

2.1.2.2. Mesterséges membrán modellek, PAMPA 11

2.1.2.3. Szövetspecifikus PAMPA modellek 14

2.1.2.4. PAMPA méréseket befolyásoló tényezők 15

2.1.3. A bőr, mint gyógyszerbeviteli kapu 19

2.1.3.1. A bőrön keresztüli gyógyszerbevitel előnyei, hátrányai 20

2.1.3.2. A bőrön keresztüli permeáció mérési lehetőségei, bőr-PAMPA modell21

2.1.3.3. Kísérleti megfontolások a bőr modellezésekor, finite és infinite dózis. 24

3. Célkitűzések 27

3.1. Az inkubációs hőmérséklet hatása a PAMPA permeábilitásra 27

3.2. Gyógyszerformulációk vizsgálata Skin PAMPA rendszeren 27

3.2.1. Gyógyszeres tapaszok vizsgálatára alkalmas PAMPA módszer fejlesztése 28

3.2.2. Félszilárd készítmények tanulmányozása Skin PAMPA rendszeren 28

3.2.3. Eltérő tulajdonságú oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra 29

4. Módszerek 30

4.1. A permeábilitás hőmérsékletfüggésének vizsgálata 30

4.1.1. A vizsgálatokhoz választott vegyületek 30

4.1.2. A PAMPA permeábilitás mérések kivitelezése, értékelése 32
4.2. Transzdermális és helyi hatású gyógyszeres tapaszok vizsgálata 34
4.2.1. A vizsgálatokhoz felhasznált gyógyszeres tapaszok 34
4.2.2. A Skin PAMPA rendszer felépítése gyógyszeres tapaszok vizsgálatára 34
4.2.3. Hatóanyag-tartalom meghatározása, permeáció-idő profil felvétele..... 35
4.2.4. A tapaszok Franz diffúziós cella (ex vivo) vizsgálatai 36
4.3. Gél gyógyszerforma vizsgálata Skin PAMPA rendszeren 37
4.3.1. Az ibuprofén tartalmú gélek elkészítése..... 37
4.3.2. A gélek vizsgálatára alkalmas Skin PAMPA rendszer felépítése 39
4.4. Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra 40
4.4.1. A vegyület tájékoztató oldhatóságának meghatározása a vizsgált oldószerekben 40
4.4.2. A Skin PAMPA membránintegritás vizsgálata 41
4.4.3. A PAMPA permeábilitás mérések kivitelezése..... 42
5. Eredmények 44
5.1. Az inkubációs hőmérséklet változásának hatása a permeábilitásra..... 44
5.1.1. A GIT-PAMPA rendszeren végzett vizsgálatok eredményei 44
5.1.2. A BBB-PAMPA modellen végzett vizsgálatok eredményei 44
5.1.3. A Skin PAMPA módszeren végzett vizsgálatok eredményei 46
5.2. Gyógyszeres tapaszok vizsgálata..... 47
5.2.1. Fentanil tartalmú tapaszok..... 48
5.2.2. Rivasztigmin tartalmú gyógyszeres tapasz..... 48
5.2.3. Nikotin tartalmú tapaszok..... 49
5.2.4. Ketoprofén tartalmú, helyi hatású tapasz 50
5.3. Ibuprofén tartalmú gélek permeábilitás vizsgálata 51
5.3.1. A Skin PAMPA permeábilitás mérések eredményei..... 51
5.4. Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra 54
5.4.1. A vegyületek oldhatósága a vizsgált oldószerekben 54
5.4.2. A membránintegritás vizsgálat eredménye..... 55

5.4.3. A Skin PAMPA permeábilitás mérések eredményei 57
6. Megbeszélés 59
6.1. Az inkubációs hőmérséklet változásának hatása a permeábilitásra 59
6.2. Gyógyszeres tapaszok vizsgálata 65
6.3. Ibuprofén tartalmú gélek vizsgálata 71
6.4. Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra 76
7. Következtetések 81
8. Összefoglalás 84
9. Summary 85
10. Irodalomjegyzék 86
11. Saját publikációk jegyzéke 94
11.1. Az értekezés alapját képező közlemények 94
11.2. Más témákhoz kapcsolódó saját közlemények 94
12. Köszönetnyilvánítás 95

1. Rövidítések jegyzéke

PAMPA: parallel artificial membrane permeability assay
NKVR: nem kevert vizes réteg
BCS: Biofarmáciai Osztályozási Rendszer
BLM: fekete lipid membrán modell
PVDF: polivinilidén-fluorid
AFM: atomerő-mikroszkóp
PS: foszfatidil-szerin
PI: foszfatidil-inozitol
PC: foszfatidil-kolin
PE: foszfatidil-etanolamin
$logP_m$: membrán permeábilitás
$logP_e$: effektív permeábilitás
$logP_a$: látszólagos permeábilitás
$logP_0$: intrinsic permeábilitás
GIT-PAMPA: gyomor-bél rendszeri PAMPA modell
BBB-PAMPA: vér-agy gát PAMPA modell
Skin PAMPA: bőrmimetikus PAMPA modell
P-gp: P-glikoprotein
OECD: *Organisation for Economic Co-Operation and Development*
logBB: vér-agy koncentráció hányados
FDA: *Food and Drug Administration*
PBLE: sertés agyi lipid kivonat
DMSO: dimetil-szulfoxid
D1216: szacharóz-laurát tartalmú gélek
C1416: szacharóz-mirisztát tartalmú gélek
TR: transzkutol (dietilén-glikol-monoetil-éter)
J_{PAMPA}: a tapaszvizsgálatnál PAMPA módszerrel mért fluxus
J_{max}: a hatóanyag potenciális legnagyobb fluxusa
$J_{in\ vivo}$: a gyártó által deklarált felszívódási kinetikából számolt fluxus
J_{Franz}: a tapaszvizsgálatnál Franz diffúziós cella módszerrel mért fluxus

2. Bevezetés

A gyógyszerkutatásban tapasztalt paradigmaváltás következtében az 1960-as évektől előtérbe került a racionális gyógyszermolekula tervezés, melynek első lépése a kvantitatív szerkezet-hatás összefüggések szisztematikus vizsgálata volt [1]. Az 1990-es évektől a nagy áteresztőképességű szűrőmódszerek és a kombinatorikus kémia megjelenésével az ígéretes gyógyszerjelölt molekulák száma növekedett. Ezzel párhuzamosan előtérbe került a gyógyszerré fejleszthetőség kérdése is. Ezt a tényt támasztja alá, hogy míg a ’90-es évek előtt a molekulák mintegy 40 %-a, addig a 2000-es évektől csupán 10 %-a morzsolódott le nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságok miatt [2]. E tulajdonságok előrejelzését segíti a molekulák részletes fizikai-kémiai jellemzése. Korábban a vegyületek ionizációjának és lipofilitásának meghatározása jelentette a fizikai-kémiai profil leírását, azonban két újabb paraméter, a molekulák oldhatósága és permeábilitása, egyaránt nélkülözhetetlen információkkal szolgálnak a vegyületek szervezetbeli viselkedéséről [3].

A permeábilitás a gyógyszermolekulák azon képessége, hogy milyen mértékben jutnak át a biológiai membránokon. Ezért ennek a paraméternek a vizsgálata már a fejlesztés korai szakaszában elkerülhetetlen. E célból került kidolgozásra egy gyors, nagy áteresztőképességű, mesterséges membrán alapú, párhuzamos módon végrehajtható permeábilitás mérési módszer, az úgy nevezett PAMPA technika [4].

A Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetének fizikai-kémiai jellemzéssel foglalkozó kutatócsoportja 2007 óta sikerrel alkalmazza a PAMPA módszert. 2012-ben kidolgozásra került egy olyan mesterséges membrán PAMPA platformra, mely a vegyületek bőrön keresztüli átjutását hivatott előre jelezni (Skin PAMPA) [5]. A módszer iránt mind a gyógyszeripar, mind a kozmetikai ipar nagy érdeklődést mutat, így a technika továbbfejlesztését tűztük ki munkánk céljául.

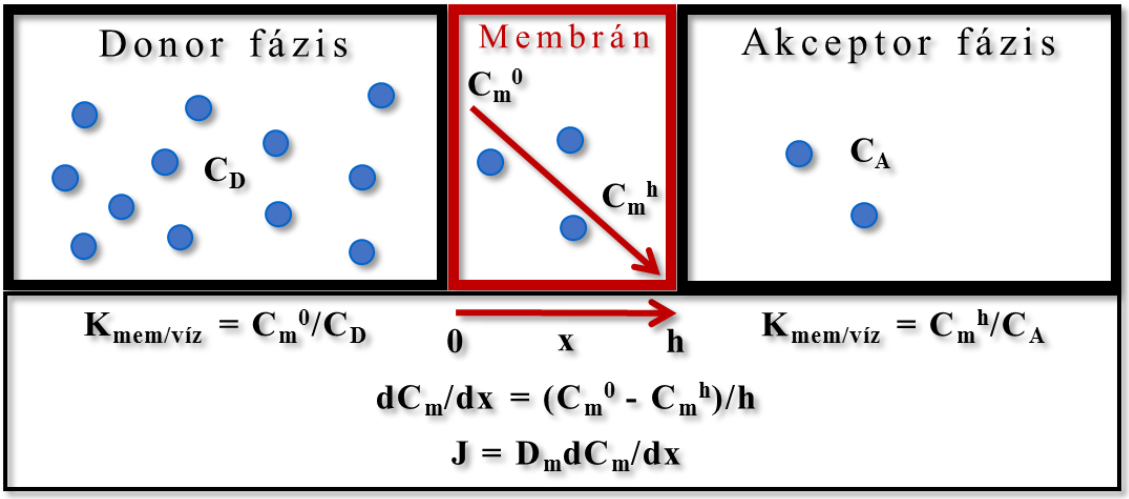
Doktori értekezésemben először ismertetem azokat a kutatási eredményeinket, amelyek a PAMPA rendszerrel mért permeábilitás inkubációs hőmérséklettől való függését tisztázták. Majd összefoglalom a gyógyszeres tapaszok vizsgálatára alkalmas Skin PAMPA módszer fejlesztésének eredményeit, bemutatom a félszilárd készítmények tanulmányozásának lehetőségét ezzel a módszerrel, illetve egy olyan szűrési eljárást, ami alkalmas különböző, termékfejlesztéshez használt oldószerek előzetes értékelésére.

2.1. Irodalmi háttér

2.1.1. A permeábilitás fogalma és szerepe a fizikai-kémiai jellemzésben

2.1.1.1. A permeábilitás, mint kinetikai paraméter

A szisztémás gyógyszerhatás létrejöttének elengedhetetlen feltétele, hogy a gyógyszerbevitel után a gyógyszerhatóanyag a készítményből felszabaduljon, a testnedvekben feloldódjon, a véráramba kerüljön, és onnan a biológiai válasz kiváltásáért felelős célmolekulához jusson. Ez alól kivételt képeznek a parenterálisan alkalmazott készítmények, ahol az aktív komponens általában oldatfázisban kerül a véráramba, vagy a környező szövetekbe. A gyógyszerbevitel bármely útját vizsgálva döntő fontosságú szerepe van a passzív diffúziónak, mely a gyógyszermolekulák töltéssel nem rendelkező formájának kedvez (**1. ábra**).



1. ábra A fluxus sematikus szemléltetése. C_D és C_A: a permeáló anyag donor (**D**) és akceptor (**A**) oldali koncentrációja; C_m^0 és C_m^h: a membrán kezdeti és végpontján lévő koncentráció; **h**: a membrán vastagsága; **J**: fluxus; D_m: membránon belüli diffúziós koefficiens; $K_{mem/víz}$: membrán-víz megoszlási hányados

Fick I. törvénye szerint egy homogén membránon keresztüli anyagáramot, fluxust (J), egyaránt meghatározza a membránon belüli diffúziós koefficiens (D_m) és a membránban fennálló koncentráció-gradiens (dC_m/dx). Mivel a membránon belüli koncentráció meghatározása körülményes, ezért annak kiküszöbölésére bevezethetjük a membrán-víz megoszlási hányadost ($K_{mem/víz}$), így egy jóval könnyebben kezelhető formához jutunk (**1. egyenlet**):

$$J=D_m K_{mem/víz}(C_D-C_A)/h \quad \textbf{(1.)}$$

A D_m, $K_{mem/víz}$ és h összevonásával fejezhető ki a membrán permeábilitás (P_m) (**2. egyenlet**):

$$P_m=D_m K_{mem/víz}/h \quad \textbf{(2.)}$$

A P_m bevezetésével, illetve annak a ténynek a figyelembevételével, hogy a donor oldali koncentráció szignifikánsan nagyobb, mint a fogadó oldalon mérhető koncentráció, így utóbbi elhanyagolható, az alábbi összefüggésre jutunk (**3. egyenlet**):

$$J=P_m C_D \quad \textbf{(3.)}$$

A **3. egyenlet** alapján látható, hogy a membránon keresztüli anyagáramot lényegében a membrán permeábilitás és a molekula donor oldali koncentrációja határozza meg [6, 7]. A permeábilitás - eltérően más, a gyógyszerkutatásban fontos szerepet betöltő egyensúlyi folyamatokat jellemző, termodinamikai fizikai-kémiai állandótól (protonálódási állandók, lipofilitás, oldhatóság) - egy kinetikai paraméter, mely a membránon keresztüli diffúzió sebességét jelöli. Mértékét általában cms^{-1} egységben szokás megadni. A permeábilitás, az előzőekben említett egyéb állandókkal összevetve a „legfiatalabb” tagja a fizikai-kémiai jellemzésben alkalmazott paramétereknek [8].

2.1.1.2. A permeábilitás fajtái és számolásuk

A permeábilitás jellemzése több állandóval lehetséges. Ezek egymástól abban különböznek, hogy a teljes folyamatot milyen részletességgel veszik figyelembe, azaz milyen elhanyagolásokkal, közelítésekkel élnek.

Látszólagos permeábilitás (P_a)

Abban az esetben, ha a membrán belsejében maradt anyagmennyiséget, azaz a membránretenciót nullának tekinthetjük, akkor *látszólagos* permeábilitásról beszélünk (P_a). Ha az akceptor oldalon lévő koncentráció kellően alacsony, akkor az akceptor-donor irányú hatóanyagáramot el tudjuk hanyagolni, így az alábbi összefüggéssel fejezhetjük ki P_a-t (**4. egyenlet**):

$$P_a = \frac{V_D}{A}\frac{m_A(t)}{m_D(0)} \qquad \textbf{(4.)}$$

Az összefüggésben V_D a donor fázis térfogata, A a membrán felülete, $m_A(t)$ az akceptor oldalon megjelenő teljes anyagmennyiség, míg $m_D(0)$ a kiindulási anyagmennyiség a donor oldalon. Ha az akceptor-donor irányú fluxust nem hanyagoljuk el, akkor az alábbi két ekvivalens egyenlettel fejezhetjük ki P_a-t (**5. egyenlet**):

$$\begin{aligned} P_a &= -\frac{2{,}303V_D}{At}\left(\frac{1}{1+r_V}\right)\log\left[-r_V+(1+r_V)\frac{C_D(t)}{C_D(0)}\right] \\ &= -\frac{2{,}303V_D}{At}\left(\frac{1}{1+r_V}\right)\log\left[1-\left(1+\frac{1}{r_V}\right)\frac{C_A(t)}{C_D(0)}\right] \qquad \textbf{(5.)} \end{aligned}$$

ahol t az inkubációs idő, r_V a fázisarány (V_D/V_A), $C_D(t)$ és $C_A(t)$ az inkubációs idő után az adott fázisban mérhető koncentráció (D: donor, A: akceptor), $C_D(0)$ a kiindulási donor oldali koncentráció [9].

Effektív permeábilitás (P_e)

Az *effektív* permeábilitás esetén figyelembe vesszük a membránretenciót (R) (**6. egyenlet**):

$$R = 1 - \frac{m_D(t)}{m_D(0)} - \frac{m_A(t)}{m_D(0)} \qquad \textbf{(6.)}$$

ahol $m_D(t)$ és $m_A(t)$ az adott fázisban lévő anyagmennyiség, míg $m_D(0)$ a donor oldali kiindulási anyagmennyiség. Figyelembe véve azt a tényt, hogy az inkubációs idő szignifikánsan nagyobb, mint az az idő, ameddig a membrán telítődik a permeáló vegyületre nézve (τ_{LAG}: késleltetési idő), az alábbi összefüggés érvényes (**7. egyenlet**):

$$R \approx \frac{V_M C_M(t)}{V_D C_D(0)} \qquad \textbf{(7.)}$$

ahol V_M a membrán térfogata, $C_M(t)$ a membránban ragadt anyag koncentrációja az inkubációs idő után. Ezt továbbalakítva, illetve a retenciót figyelembe véve az alábbi összefüggésekhez jutunk (**8-9. egyenlet**):

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A(t-\tau_{LAG})}\left(\frac{1}{1+r_V}\right)\log\left[-r_V+\left(\frac{1+r_V}{1-R}\right)\frac{C_D(t)}{C_D(0)}\right] \quad \textbf{(8.)}$$

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A(t-\tau_{LAG})}\left(\frac{1}{1+r_V}\right)\log\left[1-\left(\frac{1+r_V^{-1}}{1-R}\right)\frac{C_A(t)}{C_D(0)}\right] \quad \textbf{(9.)}$$

A permeábilitás mérések során lehetőség van az *in vivo* körülmények minél pontosabb szimulálásának érdekében eltérő donor és akceptor oldali pH alkalmazására (pl.: gyomor-bél rendszer, vagy bőr modellezése). Ebben az esetben az effektív permeábilitás számolása az alábbiak szerint változik (**10. egyenlet**):

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A(t-\tau_{LAG})}\left(\frac{1}{1+r_a}\right)\log\left[-r_V+\left(\frac{1+r_a}{1-R}\right)\frac{C_D(t)}{C_D(0)}\right] \quad \textbf{(10.)}$$

$$r_a = \left(\frac{V_D}{V_A}\right)\frac{P_e^{A\to D}}{P_e^{D\to A}} \quad \textbf{(11.)}$$

ahol r_a a pH grádienst figyelembe vevő aszimmetriás koefficiens, melyet a **11. egyenlet** segítségével adhatunk meg [9].

Intrinsic permeábilitás (P_0)

A töltésmentes forma permeábilitását az *intrinsic* permeábilitás értékével fejezhetjük ki. P_0 tárgyalásakor figyelembe kell vennünk a nem kevert vizes réteg (NKVR) jelenlétét. A NKVR egy, a membrán mindkét oldalán jelenlévő, statikus rész, mely hozzájárul a membrán által kifejtett teljes ellenálláshoz. Nyilvánvalóan a NKVR szignifikáns barriert képez lipofil molekulák permeációjakor, míg poláris származékok membránon keresztüli átjutásakor kisebb befolyásoló szereppel bír. A NKVR hatásának, egyúttal az intrinsic permeábilitás számolásának irodalomban elfogadott módszere a pK_a^{Flux} módszer [6, 10, 11]. E számolás részletezése nem képzi jelen munka tárgyát, azonban a NKVR gyakorlati megfontolásait az értekezés további fejezetében részletezem.

A molekulák intrinsic permeábilitása mérhető közvetlenül is, ha a donor és akceptor fázis pH viszonyát úgy alakítjuk ki, hogy a donor fázisban kizárólag a töltésmentes forma szerepel (bázikus komponensek esetén magas, savas komponensek esetén alacsony donor oldali pH).

2.1.1.3. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS)

A gyógyszerek permeábilitása és az oldhatósága képezi az *Amidon* és munkatársai által 1995-ben kidolgozott Biofarmáciai Osztályozási Rendszer alapját [12] (**2. ábra**).

2. ábra A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer osztályai néhány képviselővel

A BCS rendszer négy osztályt különít el. Magas oldhatóságról akkor beszélünk, ha a vegyület legnagyobb dóziserősséget jelentő mennyisége pH 1-8 tartományban legfeljebb 250 ml vízben feloldódik. A BCS permeábilitás osztályozás emberi vékonybélben történő felszívódásra vonatkozik. Magasnak tekinthető a permeábilitás, ha nagyobb, mint 10^{-4} cms^{-1}, alacsonynak, ha nem haladja meg ezt az értéket. E két paraméter kiegészülhet a gyógyszerkészítményből való kioldódás sebességének vizsgálatával. A folyamat gyors, ha a kioldódás 30 perc alatt nagyobb, mint 85% vizes közegben (900 ml, pH 1; 4,5 és 6,8). Az osztályozási rendszer fontos szerepet tölt be a molekulák bioekvivalencia vizsgálata során [6, 13].

2.1.2. A permeábilitás meghatározásának lehetőségei

Számos *in vitro* eljárást publikáltak az irodalomban a gyógyszermolekulák permeábilitásának pontos meghatározására [14]. Széles körben használt módszer a Caco-2 sejtkultúrán keresztüli permeábilitás mérés. Ennek egy újabb, olcsóbb és gyorsabb alternatívája a mesterséges membrán alapú rendszerek használata. Leírtak továbbá egy kromatográfiás módszert is, mely a vegyületek állófázishoz való affinitásából, retenciójából számolja a permeábilitást [15, 16]. Az értekezésben részletesen a mesterséges membrán modelleket tárgyalom, azonban röviden kitérek a Caco-2 eljárásra is, hogy szemléltessem a köztük lévő alapvető különbséget.

2.1.2.1. Sejtkultúra modellek használata

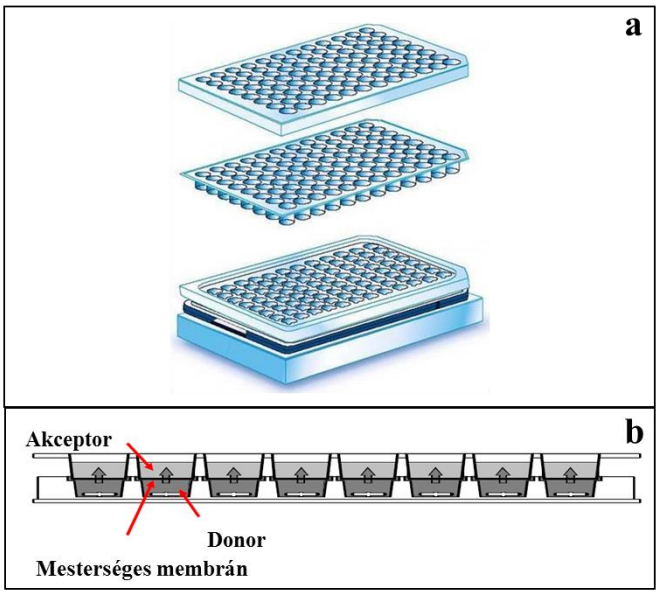
A Caco-2 sejtkultúra modell a leggyakrabban használt *in vitro* eljárás a gyomor-bél rendszeri abszorpció predikciójára [17]. A sejtvonal vastagbél adenokarcinómából származik. A Caco-2 sejtkultúra vizsgálatoknál tulajdonképpen nem egy gyógyszer-lipid interakciót látunk, hanem egy valódi sejtmembránon keresztüli permeációt [18]. Egy molekula négy eltérő úton haladhat át az intesztinális epitéliumon: passzív diffúzióval transz- és paracelluláris úton, karrier meditált módon és transzcitózis útján. A Caco-2 sejtvonal a felsorolt négy útvonal mindegyikét képes modellezni a fentebbiek alapján [19]. A mesterséges membrán modellekkel ellentétben az aktív transzport (efflux, influx) követésére is alkalmas azáltal, hogy – bár kisebb mennyiségben – de az emberi vékonybélben expresszálódó fehérjék (pl.: PEPT1, MRP2, MDR1, stb.) nagy része kifejeződik az említett sejtvonalon [20, 21]. Ezáltal a vizsgálati módszer releváns adatokkal szolgálhat a gyomor-bél rendszeri felszívódásra. A mesterséges membrán modellekkel szembeni hátrány a vizsgálatok nagyobb költsége és a sejtnövesztési ciklus miatt nagyobb időigény.

A Caco-2 sejtvonalon kívül egyéb sejtkultúra modellek is ismeretesek: MDCK [22], HT-29 [23], T84 sejtvonal [24]. E módszerek részletesebb tárgyalása nem képzi az értekezés tárgyát.

2.1.2.2. Mesterséges membrán modellek, PAMPA

A sejtkultúra modellek mellett a mesterséges membrán modellek jelentenek fontos alternatívát a gyógyszermolekulák permeábilitásának, ezáltal várható biofarmáciai viselkedésének az előrejelzésében. A mesterséges membrán modellek kutatása hosszú évtizedekre nyúlik vissza. Az első jelentős modell a *Müller* és munkatársai által publikált fekete lipid membrán modell (*Black Lipid Membrane* – BLM) volt, melyet az 1960 és ’70-es években intenzíven vizsgáltak [25-27]. Ezen rendszer kialakításánál úgy jártak el, hogy kis mennyiségű foszfolipidet szerves oldószerben oldva, az oldatot egy teflon lemez ~ 0,5 mm átmérőjű pórusán átengedtek. Így egy rendkívül vékony filmréteg keletkezett a pórusokban, melynek felülnézeti képe feketének látszott, innen ered a modell elnevezése. A BLM túlzottan törékenynek és nehezen kezelhetőnek bizonyult ahhoz, hogy alkalmazni lehessen nagy áteresztőképességű permeábilitás mérésekre [6].

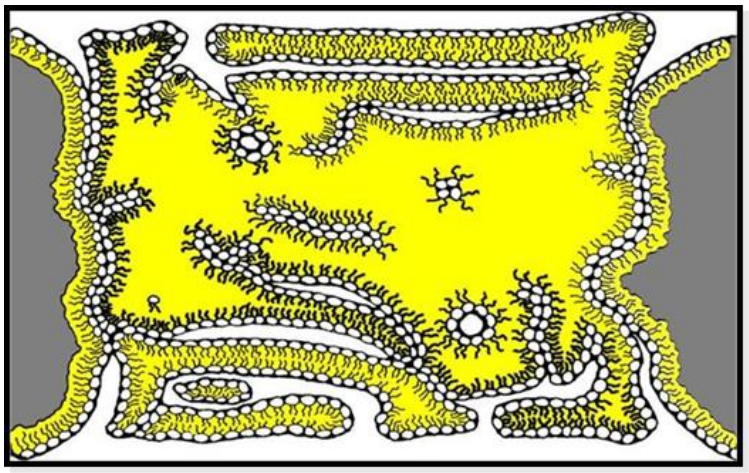
Komoly áttörést jelentett annak a felismerése, hogy ha a membránt egy alkalmas mikroszűrő felületén, annak pórusaiban alakítjuk ki, akkor egy jelentősen stabilabb membránszerkezettel dolgozhatunk. Ez vezetett a párhuzamos mesterséges membrán permeábilitás mérések (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* – PAMPA) kidolgozásához [4]. A PAMPA két egymásba illeszkedő 96 cellájú mikrotiter lemezből álló szendvics, melyben a felső lemez alján egy ~ 0,45 µm pórusátmérőjű poli(vinilidén-difluorid) (PVDF) szűrő helyezkedik el. E szűrő ad lehetőséget a mesterséges membrán kialakítására. A PAMPA sematikus felépítését az **3. ábra** foglalja össze.



3. ábra A PAMPA szendvics felépítése (a), a kísérleti elrendezés sematikus szemléltetése (b). Az (a) ábra forrása: Millipore

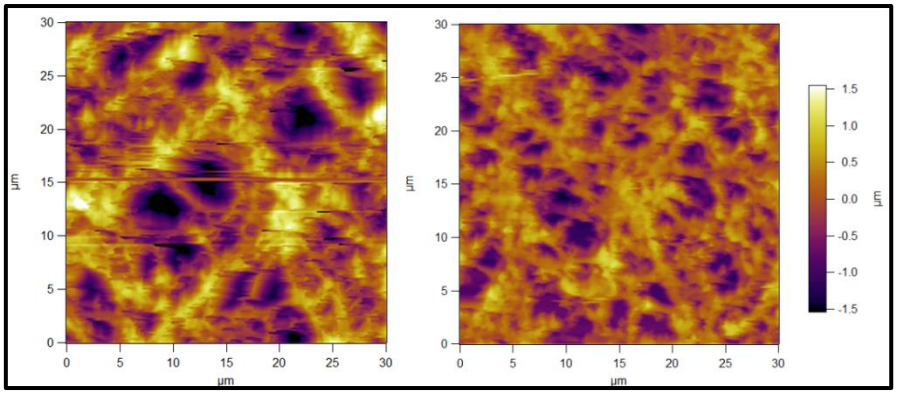
Az általánosan elfogadott kísérleti elrendezés szerint a felső lemez az akceptor, míg az alsó lemez a donor fázis. Ez olyan gyakorlati megfontolások miatt alakult ki, hogy ha egy úgynevezett több időpontos vizsgálat kivitelezése történik, melyben az akceptor fázisból eltérő időpontokban vesznek mintát, ezt megtehessék anélkül, hogy a rendszert meg kelljen bontani. A permeábilitás mérés inkubációs idejének letelte után a PAMPA szendvics lemezeit szétszedik, mindkét fázisból mintát vesznek, és egy alkalmas analitikai módszerrel (UV spektrofotometria, HPLC-UV, HPLC-MS) meghatározzák mind az akceptor, mind a donor fázis hatóanyag-tartalmát. Ebből lehet számolni a vegyületek permeábilitás értékét.

A mesterséges membránt alkotó foszfolipideket általában *n*-dodekánban oldják, és ezt az oldatot cseppentik fel a PVDF filter felületére. Korábbi feltételezések szerint a mikroszűrőkön létrehozott membránok valódi lipid kettősréteggel rendelkeznek [28], azonban ezt az álláspontot nem sikerült egyértelműen alátámasztani. Sokkal valószínűbb egy rendezetlen, multilamelláris struktúra megléte, melyben a foszfolipidek a szerves oldószer cseppjeit veszik körül, és így töltik ki a filter pórusait (**4. ábra**).



4. ábra A mesterséges membrán feltételezhető szerkezete a PAMPA lemez pórusain belül [9]

Ezt az elképzelést a PAMPA lemezek filterének szerkezete is alátámasztja, ugyanis az inkább egy hálós, szabálytalan felépítést mutat atomerő-mikroszkópiás (AFM) felvételeken (**5. ábra**).



5. ábra A PAMPA PVDF filterek AFM vizsgálata (saját felvételek; Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet)

A filter e tulajdonságai miatt nem jelent alkalmas felületet arra, hogy azon egy valódi lipid kettősréteg alakuljon ki, így a **4. ábra** által vázolt szerkezet nagyobb eséllyel valószínűsíthető.

A PAMPA egy nagy áteresztőképességű módszer gyógyszermolekulák vagy gyógyszerjelölt molekulák passzív, transzcelluláris permeábilitásának mérésére. Előnyét az adja, hogy gyorsabb, könnyebb és jelentősen olcsóbb, mint a Caco-2 sejtvonalakon végzett vizsgálatok. Azonban mivel csak passzív folyamatokat képes modellezni, ezért az olyan molekulák viselkedésére, melyek transzportja valamilyen aktív folyamat által érintett, nem ad reális képet [29]. Egy, a két módszert összehasonlító, 17 fluorokinolon származékot vizsgáló tanulmány jó korrelációt talált az *in vivo*, PAMPA és Caco-2 adatok között [30], így mindkét eljárás eredményei hasznos prediktorai a gyógyszerek farmakokinetikai viselkedésének.

2.1.2.3. Szövetspecifikus PAMPA modellek

A PAMPA mesterséges membrán kialakításánál lehetőség van arra, hogy a felhasznált foszfolipidek mennyiségét és minőségét úgy optimalizáljuk, hogy adott, modellezni kívánt emberi szövet membránösszetételéhez a legjobban hasonlítson, így lehetőség szerint minél inkább biomimetikus legyen.

Az eredeti PAMPA modell membránja tojás lecitint tartalmazott 10 m/v%-ban oldva *n*-dodekánban [4]. Ez a modell a gasztrointesztinális felszívódás jó prediktorává vált, azonban alacsony permeábilitással rendelkező molekulák vizsgálatára kevésbé bizonyult alkalmasnak. *Sugano* és munkatársai 2001-ben javaslatot tettek a membrán oldószerének 1,7-oktadiénre és 1,9-dekadiénre való cseréjére, továbbá a foszfolipid összetételt úgy módosították, hogy negatív töltéssel rendelkező lipideket (foszfatidil-szerin - PS, foszfatidil-inozitol – PI) is tartalmazzon a membrán. E módosításokkal alacsony permeábilitású molekulák és bázikus komponensek vizsgálatára is kedvezőbben használható modellt kaptak [31]. A fent említett szerző és kutatócsoportja munkásságuk során intenzíven vizsgálták a membrán összetételének szerepét a PAMPA gyomor-bél rendszeri előrejelző képességét illetően. Vizsgálataik során leírtak egy olyan mesterséges membrán modellt, ami nagymértékben megközelíti az emberi bélrendszer kefeszegély sejtjeinek membránösszetételét [31-34]. A membrán, összetételét illetően 3 m/v% foszfolipidet tartalmazott, melyben az egyes lipidek részaránya a következő: 27 %

foszfatidil-kolin (PC), 27 % foszfatidil-etanolamin (PE), 7 % foszfatidil-szerin (PS), 7 % foszfatidil-inozitol (PI) és 32 % koleszterin.

Az eddig részletezett modellek csak a gyomor-bél rendszeri permeációt leíró rendszerek voltak, azonban a PAMPA megfelelő membránösszetétellel képes vizsgálni a gyógyszermolekulák vér-agy gáton történő penetrációját is. Több vér-agy gát PAMPA (BBB-PAMPA) modell került kidolgozásra [35, 36]. Ezekben közös, hogy a membrán fő alkotója egy lipid keverék, mely sertés agyi lipid kivonatból készül (Avanti Polar Lipids). Egyes szerzők emellett a kivonat mellett 1 m/v% koleszterint is használnak a membrán kialakításakor [37]. Fontos megjegyeznünk, hogy az emberi vér-agy gát sejtjeiben nagy számban expresszálódik a P-glikoprotein (P-gp), melynek fontos szerepe van az idegrendszer védelmében azáltal, hogy a membránon keresztül permeált vegyületeket, melyek szubsztrátjai a fentebbi fehérjének, kifele szállítja [38]. E fehérje funkciójának modellezésére a BBB-PAMPA rendszer nem alkalmas, így a kísérlet jelentős korlátokkal rendelkezik a P-gp szubsztrátok vizsgálata során a Caco-2 modellekkel szemben [39].

A PAMPA harmadik, legújabb területe a bőrön keresztüli felszívódás jellemzésére alkalmas rendszer [5]. A bőr-PAMPA (Skin PAMPA) és egyéb, bőrön keresztüli permeációt vizsgáló módszerek részletes tárgyalására az értekezés **2.1.3.2. fejezetében** (21. oldal) kerül sor.

Elméletileg a fentebbiekben felsorolt három humán szöveten kívül egyéb létfontosságú szerv membránjának viselkedését is lehetne modellezni PAMPA módszerrel, megfelelő lipid összetétel felhasználásával. Ez idáig szisztematikus tanulmány nem jelent meg az irodalomban, mely a gasztrointesztinális traktus, a vér-agy gát és a bőr kivételével más szövettel foglalkozna a PAMPA területén belül. *Balogh* és munkatársai közleményükben szív, vese, tüdő és máj PAMPA modell lipidösszetételét is összefoglalták, azonban ezek egyelőre nem tekinthetők széleskörűen alkalmazott módszereknek [37]. A különböző, szövetspecifikus PAMPA modellek a fejlesztés korai fázisában a gyógyszermolekulák szöveti megoszlásának gyors, nagy áteresztőképességű vizsgálati módszerei lehetnének.

2.1.2.4. PAMPA méréseket befolyásoló tényezők

A PAMPA mérések eredményeit több kísérleti paraméter befolyásolja, ezek jelentős részét (a membrán lipidösszetétele, a NKVR jelenléte, a donor és akceptor oldali

pH, a két fázis alkotói) korábban a szakirodalom tárgyalta. *Avdeef* és munkatársai egy 2007-ben megjelent közleményükben egy összefoglaló folyamatábrát publikáltak, mintegy iránymutatásként a különböző esetekben választandó mérési körülményekre [40].

A membrán lipidösszetétele

Seo és munkatársai öt modellvegyület permeábilitását vizsgálták hat eltérő, szintetikus lipidösszetételű PAMPA rendszeren. A foszfolipideket a következők szerint választották ki: három töltésmentes származékot (dioleoil-foszfokolin, dilinoleoil-foszfokolin, dioleoil-foszfoetanolamin, dilinoleoil-foszfoetanolamin), egy negatív töltéssel rendelkező telített zsírsav oldalláncú foszfatidil-szerint, és egy negatív töltéssel bíró telítetlen oldalláncú foszfatidil-szerint használtak. Vizsgálataik szerint a foszfatidil-kolint (PC) tartalmazó membrán esetén a vegyületek permeábilitása alacsonyabb volt. Ez a tény azzal magyarázható, hogy a PC növeli a membrán rigiditását. Továbbá kimutatták, hogy az oldallánc telítettsége nem befolyásolja a PAMPA rendszeren mért permeábilitás értékeket [41]. *Carrara* és kutatócsoportja egy 34 vegyületet tartalmazó vizsgálatban megállapította, hogy a *n*-dodekán mennyisége befolyásolja a méréseket, illetve a foszfolipidek hatása csak a közepes permeábilitású komponensek esetén szignifikáns [42]. *Corti* és munkatársai szintén vizsgálták a lipidösszetétel hatását [43]. Munkásságuk megerősítette a rigidebb membránszerkezet esetén tapasztalt alacsony permeábilitást, ugyanis az általuk vizsgált molekulák a legkisebb permeábilitást abban a rendszerben mutatták, ahol a foszfolipidek mellett koleszterin is növelte a membrán rigiditását. *Chen* és munkatársai feltételezése szerint az oldat alapú mesterséges membránok esetén (pl.: PAMPA) a nagy oldószer felesleg extra barriert jelent, így egyfajta csapdaként viselkedik a lipofilebb komponensek számára, növelve azok membránretencióját. Ezért olyan oldószer használatát javasolták, ami a filter impregnálása után elpárolog annak felületéről. Rendszerük felépítésére az volt a jellemző, hogy egy háromrétegű, lipid-hexadekán-lipid barrier alakult ki, melynél a foszfolipidek oldására hexánt alkalmaztak, ami azután elpárolgott a mérések kezdete előtt. E háromrétegű mesterséges membrán középső rétege tartalmazott 1 µl hexadekánt, és a filter két oldalát impregnálták a foszfolipidek hexánnal készült oldatával. Vizsgálataik alapján ezt a kísérleti elrendezést előnyösebbnek találták, mint a hagyományos dodekán-lipid felépítést [29, 44].

A membrán összetétele nyilvánvalóan nagymértékben befolyásolja a PAMPA méréseket, ezért annak kialakítása megfontolandó a vizsgálatok megtervezésekor.

Nem kevert vizes réteg (NKVR)

A NKVR fogalmát az értekezés **2.1.1.2. fejezetében** (9. oldal) bevezettem. A NKVR nem kizárólag a PAMPA, hanem egyéb *in vitro* módszereknél (pl.: Caco-2), illetve *in vivo* körülmények között egyaránt fennáll. A Caco-2 esetén a NKVR vastagsága a cellák kevertetése nélkül hozzávetőlegesen 1100-1500 µm-re tehető [45]. Ugyanez a PAMPA rendszer mesterséges membránjánál 1500-4000 µm-es, míg *in vivo* körülmények között 30-100 µm-es vastagságot érhet el [11]. Az emberi szervezet különböző szöveteinél eltérő lehet a NKVR vastagsága. A gasztrointesztinális rendszerben a fenti adat jellemzi vastagságát, azonban a vér-agy gát vékony kapillárisaiban a vörösvérsejtek kellő kevertetést biztosítanak ahhoz, hogy a NKVR közel nulla legyen [46].

Avdeef és munkatársai 2004-ben leírtak egy olyan kevertetési eljárást, melyben a hagyományos, és nem túl hatékony lemez rázatással szemben minden egyes PAMPA cellában egy kis mágneses keverőt használtak. A kevertetővel ellátott PAMPA lemezeket egy speciális keverő fölé helyezve (pl.: Gut-Box^{TM}, Pion Inc.), a kevertetés fordulatszámának változtatásával lehet szabályozni a NKVR vastagságát. Tanulmányukban nagyszámú modellvegyülettel dolgoztak, és kevertetés nélkül, illetve különböző intenzitású keverés mellett vizsgálták a molekulák permeábilitását. A fordulatszámot 49 és 622 rpm között változtatták. Számításaik alapján kis fordulatszám esetén 130-335 µm, míg nagy fordulatszám alkalmazásánál 13-54 µm körül alakult a NKVR vastagsága [11].

A NKVR limitáló hatása főleg lipofil molekulák tanulmányozásakor jelentkezik. Ebben az esetben a membránon keresztüli transzport sebesség meghatározó lépése nem a membrán telítődése adott vegyületre nézve, és az onnani diffúzió az akceptor oldal irányába, hanem a NKVR által kifejtett ellenállás legyőzése. Ezt a tényt *Wohnsland* és munkatársai 2001-ben publikált közleménye is bizonyította [47].

A NKVR egy olyan jelenség, melyet *in vitro* körülmények között megfelelő kísérleti elrendezés segítségével könnyen ki lehet küszöbölni, illetve a **2.1.1.2. fejezetben** (9. oldal) hivatkozott pK_a^{Flux} módszerrel számításba lehet venni [29].

Az akceptor és a donor fázis összetétele, pH viszonya

A hagyományos PAMPA eljárásnál az akceptor és a donor fázis is vizes puffer. Az akceptor fázis általában a vér pH-ját szimuláló pH 7,4, míg a donor fázis pH-ja széles skálán változtatható. Napjaink gyógyszerfejlesztésére általánosságban elmondható, hogy a vizsgált molekulák legnagyobb része nagy lipofilitással és kis vízoldhatósággal rendelkezik. Ez a körülmény az ilyen modellvegyületek vizsgálatát PAMPA rendszeren megnehezíti, többek közt azért is, mert korlátozza a felhasználható analitikai módszereket, ugyanis a kis vízoldhatósággal rendelkező vegyületek (<20 µg/ml) esetén az UV meghatározás nagy hibával terhelt. Az analitikai módszer váltása (pl.: HPLC-MS) a PAMPA áteresztőképességét csökkentheti. *Ruell* és munkatársai egy olyan segédoldószert alkalmazó módszert írtak le, ami esetében lehetőség van direkt UV spektrofotometriát használni a hatóanyag-tartalom mérésére kis oldhatósággal jellemezhető molekulák vizsgálatakor. Méréseiket acetonitril-víz (2:8) elegy donor fázisként való felhasználásával végezték, és az eredményekből egy matematikai módszerrel származtatták a nulla acetonitril tartalmú rendszerre érvényes permeábilitás értékeket [48].

Az akceptor és a donor fázis összetételének és pH-jának változtatásával úgy nevezett *sink*, „süllyesztő" állapotot tudunk kialakítani. Ez azt jelenti, hogy bizonyos kísérleti körülmények között, az akceptor fázisból visszafele irányuló hatóanyagáramot nullának tekinthetjük. A legegyszerűbben *sink* kondíciót pH grádiens segítségével hozhatunk létre. Ebben az esetben savas tulajdonságú komponensek vizsgálatakor (ahol a donor oldali pH 3-4 nagyságrenddel alacsonyabb) az akceptor fázisban megjelenő molekula szinte teljes mértékben ionizált állapotba kerül. A pH-megoszlás hipotézis alapján a töltéssel rendelkező részecske lipofilitása és permeábilitása elhanyagolható a semleges formához képest, a PAMPA rendszerben ilyenkor az akceptor oldalról donor irányba történő diffúzió nullának tekintendő [6]. Egy másik lehetőség, hogy a *sink* kondíciót felületaktív anyagok akceptor fázisban történő felhasználásával érjük el. Ezek a vegyületek a permeáló molekulákat szinte teljes mértékben megkötik, a fogadó fázisban lévő szabad hatóanyag-koncentráció nulla. Ez a módszertani módosítás rövidebb vizsgálati időt eredményez. Az előzőekben jellemzett rendszer az úgynevezett Double-Sink™ PAMPA módszer, mely kevertetés mellett lipofil komponensekre nézve körülbelül 30 perces kísérleti idővel határozza meg a molekulák permeábilitását [6, 49].

Továbbá adott vegyület permeábilitását több, jól megválasztott donor oldali pH mellett mérve a NKVR zavaró hatását kiküszöbölhetjük. A fentebbiek alapján elmondható, hogy a donor és az akceptor oldal összetétele és pH-ja a mérések kimenetelét, annak időigényét, és az eredményeket nagymértékben befolyásolja.

Hőmérséklet

Az inkubációs hőmérséklet változásának hatását ez idáig szisztematikus tanulmány nem írta le, azonban ha az alábbi elméleti összefüggéseket figyelembe vesszük, kitűnik, hogy a hőmérsékletnek jelentős hatása lehet a membrán permeábilitás (P_m) értékekre.

$$P_m = \frac{D_m K_d}{h} \qquad \textbf{(12.)}$$

ahol D_m a diffúziós koefficiens, K_d a látszólagos megoszlási állandó, h a membrán vastagsága. A **12. egyenletben** szereplő D_m és K_d hőmérsékletfüggő paraméter. Az előbbi összefüggést a Stokes-Einstein egyenlet írja le (**13. egyenlet**) [50], míg utóbbi esetében a van't Hoff egyenlet adhat magyarázatot (**14. egyenlet**) [51].

$$D_m = \frac{kT}{6\pi\eta r} \qquad \textbf{(13.)}$$

$$\frac{d(\log K_d)}{dT} = \frac{a}{T} + b \qquad \textbf{(14.)}$$

A **13. egyenletben** lévő k a Boltzmann állandó, T a hőmérséklet, η a viszkozitás, r a gömb alakú részecske sugara. A **14. egyenletben** szereplő a és b illesztési paraméterek.

A PAMPA témakörben megjelenő publikációk általában az inkubációs hőmérséklet feltüntetésekor szobahőmérséklet alkalmazására hivatkoznak, számszerű értéket nem, vagy nem mindig adnak meg. A fentebbi összefüggések alapján valószínűsíthető a hőmérséklet pontos szabályozásának fontossága.

2.1.3. A bőr, mint gyógyszerbeviteli kapu

A bőr – kiterjedt biológiai funkciója mellett (elsődleges védelmi vonal, hőháztartás, stb.) – fontos alternatív gyógyszerbeviteli lehetőséget jelent. Egy 2014-ben megjelent összefoglaló közlemény alapján 17 olyan gyógyszermolekula van, mely engedélyezett transzdermális terápiás rendszer hatóanyaga [52]. A bőrön keresztüli bevitel azonban nem

tekint vissza túl hosszú múltra, ugyanis az 1980-as években a gyógyszerbevitel e módja csak néhány hatóanyagra korlátozódott (pl.: nitroglicerin, ösztradiol), és a felhasznált gyógyszerformák sem mutattak nagy változatosságot (pl.: kenőcsök, gélek). A gyógyszervegyületek felszabadulásának kontrollja és a hatékonyság hiánya miatt a korai időszakban a bőrben, mint gyógyszerbeviteli kapuban rejlő potenciális előnyöket nem is igazán tudták kihasználni. A területet alapvetően változtatta meg az Alza Vállalat első transzdermális tapasza, mely jól kontrolláltan, előre meghatározott módon adta le a bőrön keresztül felszívódó, majd szisztémás hatást kiváltó gyógyszermolekulát [52, 53]. A transzdermális gyógyszerbevitel fejlődésének történetéről *Hadgraft* és *Lane* jelentetett meg egy összefoglaló közleményt [54].

2.1.3.1. A bőrön keresztüli gyógyszerbevitel előnyei, hátrányai

A transzdermális gyógyszerbevitel előnyei korán és egyértelműen látszódtak. Az egyik előnyös tulajdonsága a lehetséges hosszú gyógyszerbeviteli idő, melyben a hatóanyag koncentrációja szabályozottan, végig a terápiás ablakon belül tartható. A hosszú gyógyszer bejuttatási idő különösen előnyös olyan komponensek esetén, melynek biológiai felezési ideje rövid, ugyanis ezeknél a származékoknál más adagolási módok esetén gyakrabban kellene alkalmazni adott készítményt. Összefoglalva, a transzdermális terápiás rendszerek az alkalmazás gyakoriságát csökkenthetik, ezáltal a gyógyszer felhasználását egyben biztonságosabbá is tehetik. A *per os* felhasználású gyógyszerekkel ellentétben *first-pass* metabolizmus nem lép fel, ami alacsony orális biohasznosulással rendelkező vegyületeknél a bőrön keresztüli bejuttatást kedvezőbbé teszi. Az ilyen értelemben elmaradt *first-pass* metabolizmus termékei által esetlegesen kiváltott mellékhatások szintén nem játszanak számottevő szerepet. További fontos előny, hogy a gyógyszer szervezetbe juttatása rögtön felfüggeszthető a tapaszok eltávolításával, amint az valamilyen okból kifolyólag a továbbiakban már nem kívánatos. A felsorolt előnyös tulajdonságoknak köszönhetően a beteg *compliance* várhatóan szignifikánsan jobb egy transzdermális tapasz használata során [52, 55, 56].

A felsorolt potenciális előnyök felismerésének következtében a korai elképzelések kimagasló szerepet tulajdonítottak a transzdermális terápiás rendszerek gyógyszeres terápiában való helyének. Természetesen vannak olyan tényezők, amik limitálják a felhasználását. A bőrön keresztüli gyógyszerbevitel komoly nehézsége éppen a bőr

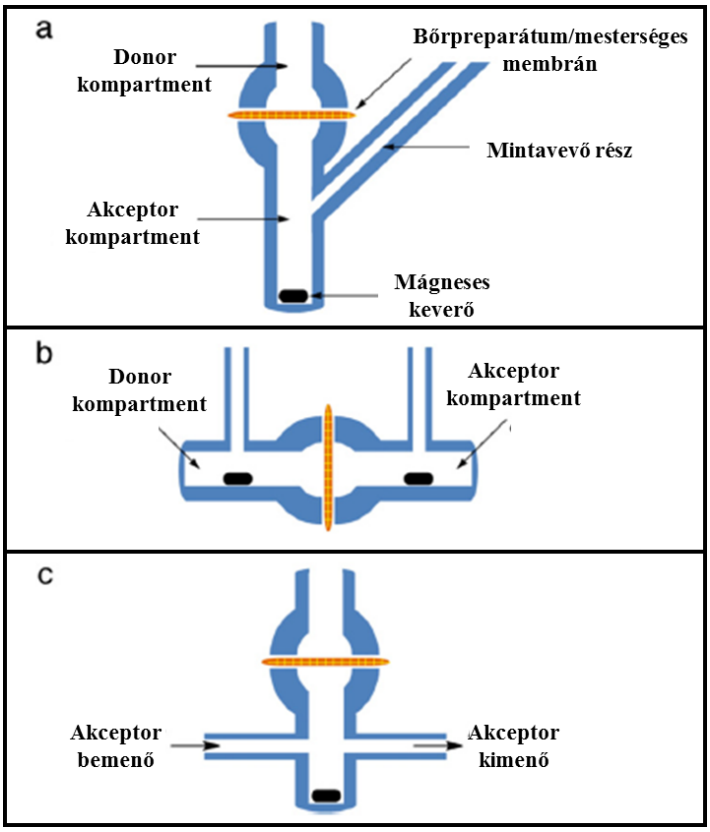
elsődleges funkciójából, azaz védelmi szerepéből adódik, ugyanis a bőr hozzávetőlegesen 20 µm vastag *stratum corneum* rétege rendkívül ellenálló barriert képez a xenobiotikumokkal szemben. A transzdermális fluxus kis molekulák esetén döntően intercelluláris módon valósul meg, de nem elhanyagolható az intracelluláris útvonal vagy ezek közös szerepe sem. A sejtek közötti részt kitöltő lipid mátrix egyaránt rendelkezik hidrofil és lipofil régiókkal. Ebből eredően a jó bőrön keresztüli permeációt mutató vegyületeknek egyaránt jó víz és lipid oldékonysággal kell rendelkezniük. A várható permeáció jó prediktora az oktanol-víz megoszlási hányados (logP). Gyakran parabolikus összefüggést írtak le a logP érték és a permeáció között. Az extrém alacsony és magas lipofilitású molekulák nem alkalmas jelöltek transzdermális terápiás rendszerek fejlesztésére (ideális logP: 2-3). Nem előnyös az sem, ha a molekula mérete jelentősen meghaladja a 400 Da molekulatömeget. További, nem feltétlenül a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai által befolyásolt nehézség a készítmény dozírozása, ami a gélek és kenőcsök felhasználásakor jelenthet komoly problémát. A transzdermális terápia sikerét ugyancsak befolyásolhatják a különböző bőrtípusok, bőrbetegségek, a bőr hidratáltsági állapota és mikrocirkulációja [52, 53].

Egy transzdermális terápiás rendszer fejlesztése hosszú időt és nagyon jelentős anyagi befektetést igényel. A kutatás eredményessége nagyban függ az olyan vizsgáló módszerektől, melyek a gyógyszermolekulák bőrön keresztüli felszívódását minél pontosabban modellezik, lehetőleg minél korábbi szakaszában a fejlesztésnek. Ezáltal az előnytelen tulajdonságú molekulák és technológiai megoldások hamar kizárhatók a további vizsgálatokból. Ez nem kizárólag a gyógyszeripart, hanem a kozmetikai ipart is érinti.

2.1.3.2. A bőrön keresztüli permeáció mérési lehetőségei, bőr-PAMPA modell

A mérési lehetőségek bemutatása előtt fontos a permeáció és penetráció fogalmának tisztázása. Permeációról akkor beszélünk, ha a vizsgált molekula átlépi adott barriert. Ez a bőr esetén akkor nélkülözhetetlen, ha a készítmény felhasználásával a szisztémás hatás elérése a cél. A penetráció során a hatóanyag bőrbe történő belépését értjük. Ez akkor fontos, ha helyi hatást kívánunk elérni (pl.: fájdalom- és gyulladáscsökkentés). A penetrált vegyület azután fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően bizonyos idő elteltével átléphet a barrieren, és bekerülhet a keringésbe.

A permeáció hatékonyságát vizsgáló módszerek nagy része diffúziós cellát használ, melynél vagy teljes emberi bőrpreparátumon, vagy valamely részein, esetleg egy alkalmas mesterséges membránon keresztüli passzív diffúziót vizsgálnak.



6. ábra A diffúziós cellák lehetséges kísérleti elrendezése. **a**: vertikális; **b**: horizontális; **c**: átfolyó cellás. Az ábra irodalmi forrásból származik [57]

A diffúziós cella kísérletek elrendezési lehetőségeit mutatja a **6. ábra**. Az irodalomban széleskörűen jellemzett Franz diffúziós cella vertikális (**a**) [58], míg a Bronaugh cella [59] horizontális kialakítású (**b**) vizsgáló módszer. Az átfolyó cellás rendszerek lényegében a vertikális Franz diffúziós cellához hasonlítanak azzal a lényeges különbséggel, hogy egy pumpa segítségével az akceptor oldat folyamatosan áramlik. Ez főleg alacsony oldhatósággal rendelkező molekulák esetén előnyös, ugyanis megakadályozza az akceptor oldat telítődését, az anyag kiválását. További előnye ennek a módszernek, hogy a fogadó kompartment folyamatos áramlása jobban hasonlít az *in vivo* körülményekre [57].

Azt, hogy adott gyógyszermolekula bőrön keresztüli permeációját milyen rendszeren vizsgálják, nagymértékben befolyásolja az adott módszer előrejelző

képessége, idő- és laborigénye, illetve a költsége. A legrelevánsabb információ tartalma az *in vivo* humán vizsgálatoknak van, azonban ezek nagy költsége és időigénye miatt egy készítmény fejlesztése során, főként a korai szakaszban célszerű egyszerűbb módszereket választani. *Zendzian* és munkatársai patkányokon végeztek *in vivo* vizsgálatokat [60], melyekből azonban csak áttételesen tudunk következtetni az emberi felhasználás során várható felszívódásra. Az *in vivo* vizsgálatoknál alapvetően gyorsabbak a különböző szövetpreparátumokat felhasználó *in vitro* eljárások. E preparátumok lehetnek állati vagy emberi eredetűek. *Salerno* és kutatócsoportja sertés fül bőrének preparátumán keresztül vizsgálták molekulák perkután transzportját, ugyanis ez az állati szövet nagy strukturális hasonlóságot mutat az emberi bőrrel [61]. Széleskörűen elfogadott *in vitro* eljárás az emberi bőr preparátumon keresztüli permeáció vizsgálat. Azonban figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a humán bőr „minőségét", átjárhatóságát számos paraméter befolyásolja: a humán rassz, az ember kora és neme, a *stratum corneum* hidratáltsága, a bőr anatómiai elhelyezkedése, sérülései és betegségei. E tényezők nagy intra- és interlaboratóriumi variabilitáshoz vezetnek az adatközlés során [62].

A **2.1.2.2. fejezetben** (11. oldal) bemutatott PAMPA módszer alkalmas platform a bőrön keresztüli permeábilitás vizsgálatára. Mindezidáig két PAMPA rendszert írtak le a bőr modellezésére. Az elsőt *Ottaviani* és munkatársai dolgozták ki 2006-ban [63]. E modell mesterséges membránja szilikon olajat és izopropil-mirisztátot tartalmazott. A membrán ebben az esetben olyan összetevőkből áll, melyek nem alkotói az emberi bőrnek. Igazi áttörést és sikert jelentett a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében *Sinkó* és munkatársai által kidolgozott és publikált Skin PAMPA eljárás [5]. Utóbbi módszer membránösszetétele – a gyógyszeripar igénye szerint – biomimetikus az emberi bőr *stratum corneum* rétegére nézve. A *stratum corneum* egy ceramidokból, koleszterinből és zsírsavakból álló multilamelláris lipid rétegbe ágyazott korneociták alkotta réteg [64]. A mesterséges membrán szintetikus ceramid származékot tartalmaz, mely stabilabb és könnyebben kezelhető, mint a valódi ceramidok. Ezek a ceramid-analóg vegyületek (certramidok) a vizsgálatok során bizonyították, hogy alkalmasak a bőrt modellező mesterséges PAMPA membrán kialakítására [65, 66]. A Skin PAMPA eljárás nagy áteresztőképességű, jól standardizálható, és relatíve költségkímélő módszer. A mesterséges membrán hidratáltsági állapota befolyásolja a vizsgálatokat, azonban ez az

állapot a mérések előtt vizuálisan könnyen ellenőrizhető, így ez nem okoz nagy variabilitást az eredményekben.

A Skin PAMPA esetén ígéretes lehetőség olyan módosítások kidolgozása, ami különböző gyógyszerformák (pl.: krémek, gélek, gyógyszeres tapaszok) vizsgálatára teszik alkalmassá a módszert. Ez mind a gyógyszeriparban, mind a kozmetikai iparban előnyös lenne a termékfejlesztés korai szakaszában adott készítmény összetételének optimalizálása, illetve a penetrációfokozó segédanyagok tesztelése céljából.

2.1.3.3. Kísérleti megfontolások a bőr modellezésekor, finite és infinite dózis

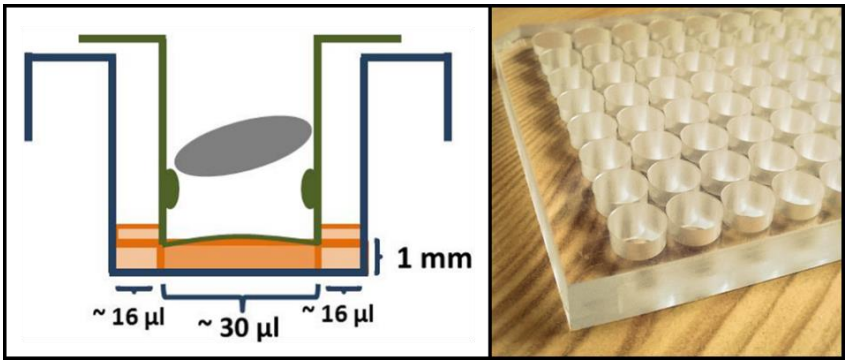
Ahhoz, hogy megbízható bőrön keresztüli permeábilitás adatokhoz jussunk, a vizsgálati rendszer felépítésekor több, kísérlettervezés szempontjából fontos paramétert kell figyelembe vennünk, melyeket befolyásol a vegyületek oldhatósága, a kísérletek inkubációs ideje és hőmérséklete, a kevertetés, a membrán hidratáltsága, és nem utolsó sorban a készítmény felhasznált dózisának mennyisége.

Főként alacsony oldhatósággal rendelkező anyagok esetén fontos a **2.1.2.4. fejezetben** (18. oldal) részletezett *sink* állapot kialakítása. A hivatkozott fejezetben részletezetteken túl további megoldást jelent szérum albumin használata, mert képes a lipofil komponenseket megkötni, alacsonyan tartva ezáltal a molekula szabad koncentrációját. Az albumin felhasználásának előnye, hogy kellően nagy molekula ahhoz, hogy a bőrön keresztül ne permeáljon. Az inkubációs idő megválasztásánál figyelembe kell venni azt, hogy a kísérlet végéig a bőr vagy a mesterséges membrán szerkezete változatlan maradjon. A membránintegritás vizsgálatok főként egy mesterséges membrán alapú modellnél fontosak, ahol arról kell meggyőződni, hogy a vizsgált összetett készítmény valamely komponense, segédanyaga nem károsítja a membrán struktúráját. A hivatalos ajánlások szerint egy készítmény jellemzésére 24 órás inkubációs idő alatt kivitelezett mérés elegendő. Az inkubációs hőmérséklet mind a vegyületek permeábilitását, mind a tanulmányozott termék reológiai tulajdonságait befolyásolja. A bőr hidratáltsága többek között a *stratum corneum* barrier funkcióját érinti, ezért az optimális hidratáltsági állapot kialakítása nélkülözhetetlen [57].

Attól függően, hogy a mintából mekkora mennyiség kerül a vizsgálati cellákba, két fajta kísérletet különíthetünk el, a *finite* és *infinite* dózisú méréseket. Az *infinite* dózis esetén a felhasznált mintamennyiség nagy feleslegben van, olyannyira, hogy a permeáló

molekulára nézve a donor fázis (maga a minta) normál körülmények között nem tud kiürülni. Ennek az az eredménye, hogy ha megvizsgálunk egy permeábilitás-idő profilt ebben az esetben, az egyenes általában konstans meredekséggel emelkedik, anélkül, hogy plató fázist tapasztalnánk. Az *infinite* dózissal ellentétes fogalom a *finite* dózis. *Finite* dózis alkalmazásakor limitált mennyiségű mintát (donor fázist) juttatunk a bőr vagy a mesterséges membrán felületére. Belátható, hogy utóbbi kísérleti körülmény jóval közelebb áll ahhoz az állapothoz, mikor a beteg a saját bőrére viszi fel adott készítményt. Az OECD (*Organisation for Economic Co-Operation and Development*) ajánlása alapján akkor beszélünk *finite* dózisról oldat fázisú minta esetén, ha a felvitt dózis nem haladja meg a 10 µl/cm^2, illetve félszilárd mintánál 1-10 mg/cm^2 tartományba esik [57].

Nyilvánvaló, hogy előnyösebb úgy kialakítani a mérési körülményeket, hogy minél inkább megközelítse a *finite* dózis követelményeit. A hagyományos Skin PAMPA eljárás alsó, donor lemeze akkora mennyiségű minta felhasználását igényli, mely nem elégíti ki a *finite* dózis fogalmát. A közelmúltban kifejlesztésre, és tesztelésre, majd kereskedelmi forgalomba került egy módosított alsó lemez a Skin PAMPA modellhez. Ennek keresztmetszeti ábráját, illetve fényképét mutatja a **7. ábra**.



7. ábra A Skin PAMPA modellhez használható, módosított alsó lemez keresztmetszeti képe, és valódi megjelenése (saját ábra és fénykép)

E lemez felhasználásával hozzávetőlegesen már 60-70 µl térfogatú minta felhelyezése esetén érintkezik a donor fázis a hidratált mesterséges membránnal. Ez a mennyiség a hagyományos alsó lemez használatával ~ 180-200 µl volt. Ha megvizsgáljuk az új lemez donor cellájának keresztmetszeti képét, akkor 60-70 µl minta vizsgálatánál a membránnal közvetlenül érintkező anyagmennyiség kb. 30 µl. Ez azt eredményezi, ismerve a nettó permeációs felületet (0,3 cm^2), hogy az egységnyi felületre eső donormennyiség 100

$\mu l/cm^2$. Az OECD ajánlásához képest ez még mindig egy nagyságrenddel nagyobb, de a hagyományos Skin PAMPA eljárásnál előnyösebb felhasználású, jobban megközelíti a *finite* dózis fogalmát. Az értekezés részét képző gél gyógyszerforma vizsgálatakor a fentebbiekben bemutatott alsó lemezt használtuk az adott fejezetben leírásra kerülő módon.

3. Célkitűzések

3.1. Az inkubációs hőmérséklet hatása a PAMPA permeábilitásra

A PAMPA rendszeren elvégzett permeábilitás vizsgálatokat számos tényező befolyásolhatja, ilyen többek között a mesterséges membrán lipidösszetétele, a NKVR jelenléte és az akceptor-donor kompartment pH viszonya. Ezek jelentős részének pontos szerepét már korábban feltárták, azonban mindezidáig szisztematikus tanulmány a kísérletek során használt inkubációs hőmérséklet hatásáról nem jelent meg. Munkánk e pontjának célja az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen mértékben változik a vegyületek permeábilitása a PAMPA mérések során, ha a hőmérsékletet emeljük. Ezért három különböző PAMPA modellen, hét eltérő szerkezetű és tulajdonságú vegyület permeábilitását kívántuk meghatározni 15 és 55°C inkubációs hőmérséklet tartományban.

E munka keretein belül a továbbiakban azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk, mely hőmérsékleten kivitelezett PAMPA kísérlet korrelál jobban adott szövetet modellező, egyéb *in vitro* módszeren elvégzett vizsgálattal. Ehhez a modellvegyületek körét bővítettük, és a vér-agy gát PAMPA rendszeren mért adatokat irodalmi forrásokból nyert vér-agy koncentráció hányados (log BB) értékekkel hasonlítottuk össze. A Skin PAMPA modellen mért permeábilitás értékek és a bőr autentikus, 32°C hőmérsékleten kivitelezett Franz diffúziós cella mérések közötti korreláció analízist is el kívántuk végezni.

3.2. Gyógyszerformulációk vizsgálata Skin PAMPA rendszeren

A 2012-ben kutatócsoportunk által kidolgozott Skin PAMPA módszer [5] iránt mind a gyógyszeripar, mind a kozmetikai ipar nagy érdeklődést mutatott és mutat jelenleg is. 2014 év végén egy összefoglaló közleményt jelentettünk meg a módszer gyakorlati felhasználásáról [67]. Határozott igény merült fel arra, hogy ezt a metodikát különböző gyógyszerformájú dermális és transzdermális készítmények tesztelésére is alkalmassá tegyük. Doktori értekezésem ez irányú része három, témájukat tekintve hasonló munka eredményeit tárgyalják.

3.2.1. Gyógyszeres tapaszok vizsgálatára alkalmas PAMPA módszer fejlesztése

A transzdermális tapaszok rendkívül fontos készítmények a gyógyszeres terápiában, mivel sok, a beteg *compliance* növelésével járó előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Ennek ellenére sem a gyógyszerkönyvünknek, sem az FDA-nek nincsen teljesen egyértelmű álláspontja a permeáció vizsgálatáról. A Ph. Hg. VIII. három módszert ír elő a gyógyszeres tapaszok hatóanyag-kioldódásának meghatározására, ezek a szitakorongos, cellás és forgólapátos eljárások. Az értekezésben részletezett kísérletsorozatban arról szerettünk volna meggyőződni, hogy a Skin PAMPA – a Franz diffúziós cellához hasonlóan – alkalmas lehet-e gyógyszeres tapaszok ilyen irányú tesztelésére. Erre a célra kereskedelmi forgalomban elérhető három nikotin, kettő fentanil és egy-egy ketoprofén és rivasztigmin tartalmú tapaszt választottunk. A hagyományos PAMPA módszer módosítását tűztük ki célul, hogy a Skin PAMPA modellel minél egyszerűbben lehessen tanulmányozni ezeket a készítményeket. Együttműködést alakítottunk ki a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetével, ahol mintegy referencia mérésként az általunk tanulmányozott tapaszok Franz diffúziós cella vizsgálatát végezték el. Kísérletsorozatunkkal vizsgálni kívántuk a gyógyszeres tapaszokból felszabaduló gyógyszermolekulák membránon keresztüli permeációját vizsgáló eljárásokat befolyásoló tényezőket.

3.2.2. Félszilárd készítmények tanulmányozása Skin PAMPA rendszeren

A közelmúltban kifejlesztésre és kereskedelmi forgalomba került egy kiegészítő lemez a Skin PAMPA-hoz, melynek részletes ismertetése az értekezés **2.1.3.3. fejezetében** (25. oldal) olvasható. Ezt a lemezt felhasználva, együttműködésben a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézettel, ibuprofén tartalmú géleket vizsgáltunk. E készítmények penetrációfokozó segédanyagként egy-egy, eltérő típusú cukorészter származékot tartalmaztak más-más mennyiségben. Szisztematikus PAMPA vizsgálataink során bizonyítani szerettük volna, hogy az eljárásunk alkalmas a megfelelő segédanyagok kiválasztására mind minőségi, mind mennyiségi szempontok figyelembe vételével, így valójában alkalmas módszer-e dermális és transzdermális gyógyszerkészítmények elővizsgálatára a termékfejlesztés korai periódusában az összetétel optimalizálása céljából.

3.2.3. Eltérő tulajdonságú oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra

Egy neves külföldi kozmetikai céggel való tudományos együttműködés keretein belül különböző tulajdonságú, termékfejlesztéshez használt oldószerek transzdermális felszívódásban betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. Ezen oldószerek között helyet kaptak egyszerűbb, közismertebb oldószerek (pl.: etanol, glicerin), azonban több, kozmetikai felhasználású oldószerrel (pl.: barackmagolaj, kukoricaolaj) végzett vizsgálat is hivatott volt a Skin PAMPA ilyen irányú felhasználásának igazolására. Egy apoláris jellegű komponens a *Symwhite*^{TM} márkanevű, bőrfehérítő hatású modellvegyület került kiválasztásra a méréseinkhez, mely molekula 23 eltérő oldószerrel készült oldatának viselkedését kívántuk tanulmányozni a Skin PAMPA modellen.

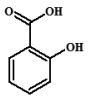
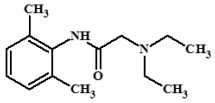
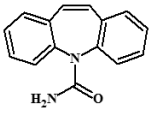
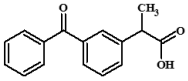
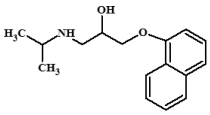
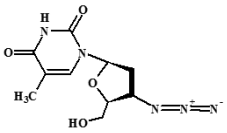
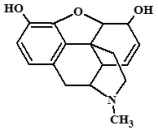
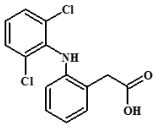
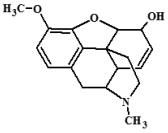
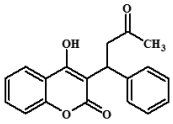
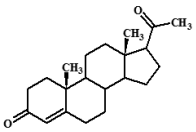
4. Módszerek

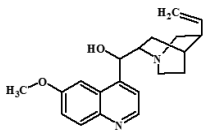
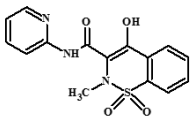
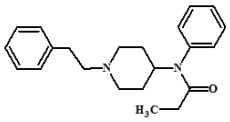
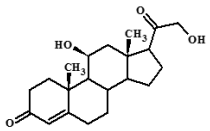
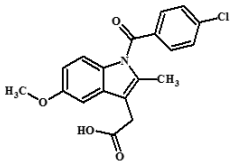
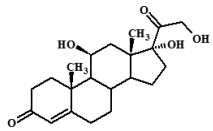
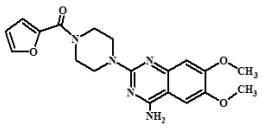
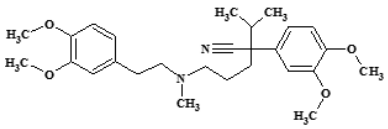
4.1. A permeábilitás hőmérsékletfüggésének vizsgálata

4.1.1. A vizsgálatokhoz választott vegyületek

A modellvegyületek kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy sav-bázis jellegükre, lipofilitásukra és méretükre nézve eltérő tulajdonságú vegyületek legyenek, ezért a permeábilitás hőmérsékletfüggésének vizsgálatához egy viszonylag széles, gyógyszermolekulákból álló vegyületkört választottunk (**1. táblázat**). Ezek között vannak savi tulajdonságú molekulák (pl.: diklofenák, ketoprofén), bázikus komponensek (pl.: verapamil, propranolol), neutrális vegyületek (pl.: progeszteron, karbamazepin), és amfoter származékok egyaránt (pl.: piroxikám, morfin). A modellvegyületek moláris tömege széles tartományt ölel fel, 138 és 455 g/mol közé tehető. A vizsgált anyagok gyógyszerkönyvi minőségűek, a reagensek analitikai tisztaságúak voltak.

1. táblázat A permeábilitás hőmérsékletfüggésének vizsgálatához használt modellvegyületek (a táblázat folytatása a 32. oldalon látható)

Vegyület	Szerkezeti képlet	Moláris tömeg (g/mol)	Sav-bázis tulajdonság
szalicilsav*		138,12	**A**
lidokain*		234,34	**B**
karbamazepin		236,27	**N**
ketoprofén		254,28	**A**
propranolol		259,34	**B**
zidovudin*		267,24	**A**
morfin*		285,34	**X**
diklofenák		296,15	**A**
kodein*		299,36	**B**
warfarin*		308,33	**A**
progeszteron		314,46	**N**

Vegyület	Szerkezeti képlet	Moláris tömeg (g/mol)	Sav-bázis tulajdonság
kinin*		324,42	**B**
piroxikám		331,35	**X**
fentanil*		336,47	**B**
kortikoszteron*		346,47	**N**
indometacin*		357,79	**A**
hidrokortizon*		362,46	**N**
prazozin*		383,40	**B**
verapamil		454,60	**B**

A: sav; **B**: bázis; **N**: semleges; **X**: amfoter vegyületet jelenti. A *-al jelölt molekulák kizárólag vér-agy gát PAMPA (BBB-PAMPA) modellen lettek vizsgálva, míg a **félkövérrel** szedett gyógyszermolekulák mindhárom PAMPA modell tárgyát képezték.

4.1.2. A PAMPA permeábilitás mérések kivitelezése, értékelése

A mérésekhez hagyományos STIRWELL^{TM} PAMPA szendvicseket (Pion Inc.) használtunk. Az adott szövetspecifikus membránt közvetlenül a mérések előtt alakítottuk

ki a felső, akceptor lemez filterein. Minden egyes cella szűrő felületére 5 µl térfogatú membrán oldatot vittünk fel, mely úgy készült, hogy a modellezni kívánt szövetre jellemző lipid komponenst oldottuk fel *n*-dodekánban. A gasztrointesztinális PAMPA (GIT-PAMPA) esetén 2 m/v% foszfatidilkolint és 1 m/v% koleszterint tartalmazott a membrán. A vér-agy gát PAMPA modell korábbi publikációk alapján 2 m/v% sertés agyi lipid kivonatból (PBLE, Avanti Polar Lipids) és 1 m/v% koleszterinből épült fel [35, 37]. Ettől eltérően a bőr PAMPA (Skin PAMPA) esetén kereskedelmi forgalomban kapható lemezeket használtunk, amin már ki volt alakítva a bőr *stratum corneumára* jellemző lipidmátrix. A mérések előtt a Skin PAMPA membránját hidratáltuk egy éjszakán keresztül az erre a célra használatos hidratáló oldattal (Hydration Solution, Pion Inc.), és csak megfelelő hidratált állapot esetén használtuk a szendvicset. A hidratáltságról a cellák filtereinek vizuális vizsgálatával lehet meggyőződni. Mérésre alkalmas a membrán, ha fény felé fordítva annak felülete világos, ezzel szemben a nem kellőképpen hidratált membrán sötét árnyalatú.

A permeábilitást a PAMPA kísérleteket tekintve hagyományos elrendezésben vizsgáltuk, azaz a felső lemez volt az akceptor fázis, míg a donor fázist az alsó lemez alkotta. A modellvegyületeket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk olyan koncentrációt alkalmazva, melyet az oldhatóságuk és az UV spektrofotometriás tulajdonságuk lehetővé tett (5-20 mM). 180 µl eltérő pH-jú, 1 v/v% DMSO törzsoldatot tartalmazó Britton-Robinson puffer oldatot mértünk a PAMPA szendvicsek alsó lemezének celláiba. Emellett a cellák egy-egy mágneses keverőt is tartalmaztak. A felső, akceptor lemez celláiba 200 µl pH 7,4 Britton-Robinson puffert pipettáztunk. Az oldatok párolgását megakadályozandó, nedves szűrőpapírral és egy, a PAMPA lemezekre illeszkedő műanyag fedéllel fedtük le az összeállított rendszert. A kialakított szendvicset mágneses keverőre (Gut-Box™, Pion Inc.) helyeztük, és a kevertetés intenzitását úgy állítottuk be, hogy a NKVR hozzávetőlegesen 40 µm vastagságú legyen. A mérések teljes időtartama 1-4 óra volt. Az inkubációs idő elteltével a PAMPA szendvicseket szétszedtük, és mindkét fázisból 150-150 µl mintát UV lemezbe (Greiner BioOne) mértünk, és UV spektrofotometriásan Tecan Infinite M200 készülék felhasználásával meghatároztuk a hatóanyag-tartalmat. A PAMPA Explorer™ és a PAMPA Evolution™ szoftver segítségével kiszámoltuk az adott vegyület permeábilitását a különböző hőmérsékleteken végrehajtott vizsgálatok alapján. A keverőhöz csatlakoztatott termosztát

segítségével szabályoztuk a rendszer hőmérsékletét. A kísérleteket 15, 25, 37, 45 és 55°C-on is elvégeztük, hogy a permeábilitás változásának tendenciáját megfigyelhessük. A bőrön keresztüli vizsgálatok sora a bőr autentikus, 32°C-os hőmérsékletével bővült.

4.2. Transzdermális és helyi hatású gyógyszeres tapaszok vizsgálata

4.2.1. A vizsgálatokhoz felhasznált gyógyszeres tapaszok

A vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható nikotin, fentanil, rivasztigmin és ketoprofén tartalmú tapaszokat választottunk. A **2. táblázat** összefoglalja a készítmények fontosabb jellemzőit.

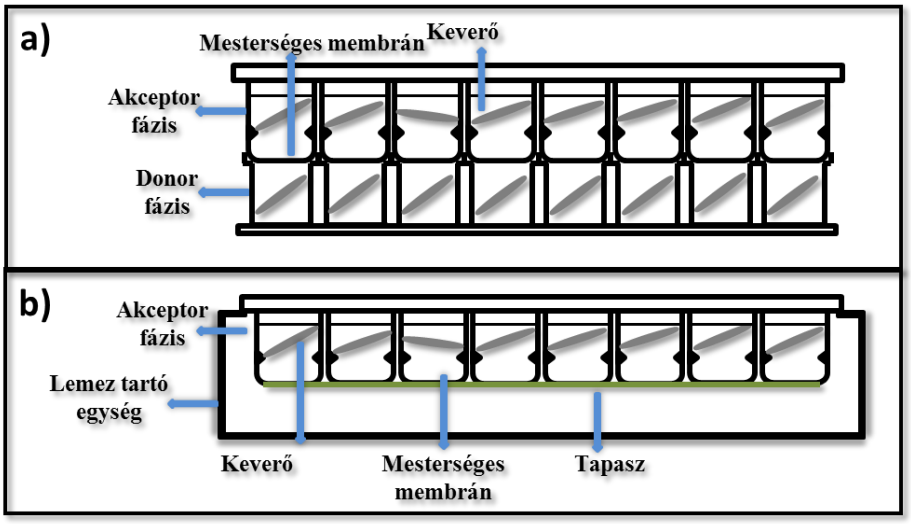
2. táblázat A vizsgált tapaszok tulajdonságai

Hatóanyag	Hatóanyag-tartalom [mg]	Felszín [cm^2]	Permeációs sebesség [mg/h]	Időtartam [h]	Készítmény	Gyártó
nikotin	23,62	13,5	0,94	16	Nicorette®	McNeil AB
	78,00	15,0	0,58	24	Niquitine®	GSK Consumer Healthcare
	17,50	10,0	0,29	24	Nicotinell®	Novartis Hungary Ltd
fentanil	23,12	42,0	0,10	72	Fentanyl Sandoz®	Sandoz Hungary Ltd
	16,50	30,0	0,10	72	Fentanyl-ratiopharm®	Teva Pharmaceutical Industries Ltd
rivasztigmin	9,00	5,0	0,19	24	Exelon®	Novartis Europharm Ltd
ketoprofén	20,00	70,0	∞	∞	Keplat®	Hisamitsu

4.2.2. A Skin PAMPA rendszer felépítése gyógyszeres tapaszok vizsgálatára

A gyógyszeres tapaszok által leadott hatóanyag bőrön keresztüli permeációjának Skin PAMPA rendszeren történő méréséhez a hagyományos PAMPA eljárás módosítása vált szükségessé. A vizsgálatokhoz a PAMPA lemezek felső, akceptor fázisát tartottuk meg, míg az alsó részt egy megfelelő tartó elemmel helyettesítettük. Az akceptor oldalon található mesterséges membránt egy éjszakán át szobahőmérsékleten hidratáltuk. A

mérések kezdetekor a tapaszok adhezív felületéről a védő fóliát eltávolítottuk, és minden további módosítás nélkül a hidratált membrán felületére ragasztottuk. A 250 µl akceptor oldat (Britton-Robinson puffer, pH 7,4) és a mágneses keverők cellákba töltése után az akceptor fázist és a vizsgált tapaszt tartalmazó rendszert a tartó elemre helyeztük, majd ezt az egységet a mágneses keverőre fektettük, és szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kevertetés sebességét úgy állítottuk be, hogy a NKVR vastagsága körülbelül 40 µm legyen. Az effektív diffúziós felület 0,3 cm^2 volt. Az **8. ábra** sematikusan szemlélteti a tapaszok vizsgálatára alkalmas kísérleti elrendezés (b) különbségeit a hagyományos (a) módszer felépítéséhez képest.



8. ábra A hagyományos PAMPA eljárás (a), és a tapaszok vizsgálatára alkalmas kísérleti elrendezés (b) sematikus ábrázolása

4.2.3. Hatóanyag-tartalom meghatározása, permeáció-idő profil felvétele

A nikotin és ketoprofén tartalmú tapaszokat 6 óra hosszan inkubáltuk, eközben 1/2, 1, 3 és 6 óránál 150 µl mintát vettünk az akceptor fázisból, és ebből a részletből határoztuk meg a hatóanyag koncentrációját. A mintavétel után az akceptor fázisból hiányzó oldattérfogatot friss pufferrel pótoltuk. Hasonlóan jártunk el a fentanilt és rivasztigmint tartalmazó készítmények esetén is, de előbbi esetben 12, míg utóbbi esetben 24 órán keresztül inkubáltuk a rendszert, és a kezdeti mintavételi pontok kiegészültek egy 12. és 24. órás mintavételezéssel. A nikotin, rivasztigmin és ketoprofén tartalom meghatározása UV spektrofotometriásan történt Tecan Infinite M200 típusú készülékkel. A

spektrumokat a Magellan 6 szoftverrel értékeltük. A kalibrációs egyenes meghatározása (Lambert-Beer törvény: $A=A_{1cm}^{1\%}cl$) hat pontból álló hígítási sorozatból történt, pH 7,4 Britton-Robinson pufferben. Az UV spektrofotometriás tartalmi meghatározáshoz szükséges paramétereket (koncentráció tartomány, hullámhossz, kalibrációs egyenes egyenlete, determinációs koefficiens) a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat Az UV spektrofotometriás kalibráció releváns paraméterei

Hatóanyag	Koncentráció tartomány [g/100 cm^3]	λ_{max} [nm]	Kalibrációs egyenes egyenlete	R^2
nikotin	0,0007-0,0135	261	y = 174,95x + 0,0044	0,9999
rivasztigmin	0,0055-0,0829	264	y = 17,28x + 0,0009	0,9998
ketoprofén	0,0008-0,0032	260	y = 484,96x + 0,0636	0,9960

A membránon keresztül permeált, és az akceptor fázisban megjelenő fentanil tartalmat irodalmi LC-MS módszerrel határoztuk meg [68]. Erre a célra Agilent 1260 HPLC-hez kapcsolt, Agilent 6460 QQQ tömegspektrométert használtunk. A kromatográfiás analízis fordított fázisú rendszerben történt (oszlop: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 100 mm, 3,6 µm, mozgó fázis: metanol: vizes hangyasav [9:1 v/v] 50:50 v/v). Az áramlási sebességet 0,5 ml/percre, a hőmérsékletet 25°C-ra állítottuk. A fentanil molekulaionját szelektív ionkövetési módban (SIM mód) detektáltuk. A kromatogrammokat és a tömegspektrumokat az Agilent MassHunter szoftver segítségével értékeltük. A fentanil kalibrációját hat különböző hígítással végeztük el, melyek koncentrációja 1 és 500 ng/ml tartományt ölelt fel.

A permeált hatóanyag mennyiségét mindkét analitikai (UV és LC-MS) eljárás esetén egységnyi felületre adtuk meg és mg/cm^2 egységben fejeztük ki. Az adott mintavételi pontokhoz tartozó eredményekből felvettük a vizsgált tapaszokra jellemző permeáció-idő profilt.

4.2.4. A tapaszok Franz diffúziós cella (ex vivo) vizsgálatai

A tapaszok vizsgálatára módosított Skin PAMPA eljárás eredményeit egy független módszerrel kívántuk összevetni. Az összehasonlító vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával végeztük. Egy 0,45 µm pórus átmérővel rendelkező cellulóz-acetát lemezre került a humán bőr epidermisz, melynek felületére rögzítettük a vizsgálat tárgyát

képező tapaszt. Az epidermisz preparátumok 35 és 40 év közötti női páciensektől származtak, akik hasi sebészeti beavatkozáson estek át. Ennek során a bőr eltávolítása után a bőr alatti zsírszövetet is eltávolították, majd a bőr preparátumot -20°C-on tárolták. A permeábilitás vizsgálatokhoz ezeket a preparátumokat felolvasztottuk, és egy ún. hőszeparációs technikával [69] eltávolítottuk az epidermiszt az alatta fekvő rétegektől. Ennek a kivitelezéséhez a bőrt 90 másodpercre 60°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd onnan kivéve, a *stratum corneum* oldalával felfele egy szűrőpapírra fektettük. Egy csipesz segítségével ezután az epidermisz óvatosan eltávolítható. Az epidermisz további, foszfát pufferben (pH 7,4) történő hidratálás után már rögzíthetővé vált a cellulóz-acetát lemez felületén. Az így kialakított „membránra" ragasztott gyógyszeres tapasz szintúgy, mint a Skin PAMPA esetén, donor fázisként viselkedett, melyből a felszabaduló hatóanyag permeációját vizsgáltuk a bőr epidermiszen keresztül. Az effektív diffúziós felület 1,33 cm^2 volt. Akceptor fázisként foszfát puffer oldatot (pH 7,4) alkalmaztunk. Az így összeállított kísérletet 24 órán keresztül inkubáltuk, mely idő közben 1/2, 1, 3, 6, 12 és 24 óránál 0,8 ml mintát vettünk az akceptor fázisból, és UV spektrofotometriásan meghatároztuk a gyógyszermolekula koncentrációját. A hiányzó oldatrészletet friss puffer oldattal pótoltuk. Az eredményeket az egységnyi felületen permeált anyag mennyiségére adtuk meg mg/cm^2 egységben, valamint felvettük a tapaszok e rendszerben mért permeáció-idő profilját is. A fentanil tartalmú tapaszokat a vághatóság hiánya miatt Franz diffúziós cellán nem vizsgáltuk.

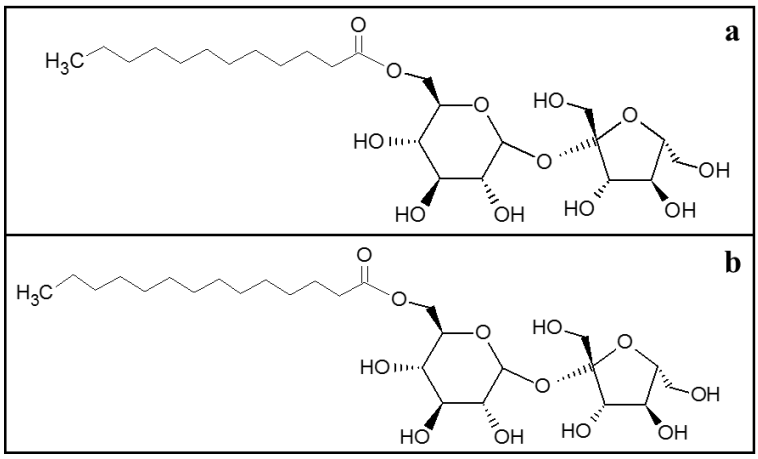
4.3. Gél gyógyszerforma vizsgálata Skin PAMPA rendszeren

A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetével közösen félszilárd készítmények vizsgálatát végeztük el. Az ehhez szükséges gélek előállítására Szegeden, míg a Skin PAMPA mérésekre a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében került sor.

4.3.1. Az ibuprofén tartalmú gélek elkészítése

A tanulmányozott félszilárd készítmények, gélek hatóanyagaként egy széleskörűen használt, nemszteroid gyulladás- és fájdalomcsökkentő vegyületet, az ibuprofént választottuk. A készítmények a továbbiakban részletezett penetrációfokozó

segédanyagok mellett polietilén-glikol 400-at, karbopolt, trolamint és desztillált vizet tartalmaztak. A gélek ibuprofén koncentrációja (5 m/m%) minden esetben azonos volt, azonban attól függően, hogy melyik penetrációfokozó segédanyagot, és milyen koncentrációban tartalmazták, négy csoportot különíthetünk el. Az első csoport szacharóz-laurát D-1216 (továbbiakban D1216) hozzáadásával készült. A második csoportban penetrációfokozó anyagként szacharóz-mirisztát C-1416-ot (továbbiakban C1416) használtunk. A harmadik és negyedik osztályt olyan gélek alkották, melyek a fenti segédanyagok közül egyet-egyet tartalmaztak 2,64 m/m% mennyiségben, de emellett egy transzkutol (TR) (dietilén-glikol-monoetil-éter) nevű anyag is a receptúra részét képezte, mely szintén penetrációfokozó segédanyag. Továbbá kontrolmintának készítettünk egy, minden permeábilitást növelő segédanyagot nélkülöző gélt, illetve egy olyat is, mely csak transzkutolt tartalmazott. A vizsgálatok során tanulmányozott géleket a jobb áttekinthetőség érdekében, a **4. táblázat** foglalja össze. A szacharóz észterek szerkezeti képletét a **9. ábra** mutatja.



9. ábra A szacharóz-laurát (**a**) és a szacharóz-mirisztát (**b**) szerkezeti képlete

4. táblázat A gél gyógyszerforma vizsgálatához készített gélek

Készítmény jelölése	Segédanyag	Segédanyag mennyisége [m/m%]	Készítmény jelölése	Segédanyag	Segédanyag mennyisége [m/m%]
D1216 [1%]	D1216	1,00	**C1416 [0.25%]**	C1416	0,25
D1216 [2%]	D1216	2,00	**C1416 [0.5%]**	C1416	0,5
D1216 [4%]	D1216	4,00	**C1416 [1%]**	C1416	1,00
D1216 [6%]	D1216	6,00	**C1416 [2%]**	C1416	2,00
D1216 [8%]	D1216	8,00	**C1416 [4%]**	C1416	4,00
D1216 [10%]	D1216	10,00	**C1416 [6%]**	C1416	6,00
D1216 [2.64%]	D1216	2,64	**C1416 [8%]**	C1416	8,00
D1216-TR [2.64%]	D1216 + TR	2,64 + 10,00	**C1416 [10%]**	C1416	10,00
Kontrol	ø	ø	**C1416 [2.64%]**	C1416	2,64
Kontrol TR	TR	10,00	**C1416-TR [2.64%]**	C1416 + TR	2,64 + 10,00

A gélek jelölésében tükröződik a penetrációfokozó segédanyag neve és mennyisége. **D1216**: szacharóz-laurát D-1216, **C1416**: szacharóz-mirisztát C-1416, **TR**: transzkutol, **[m/m%]**.

A penetrációfokozó segédanyagok részletesebb áttekintése az értekezés **6.3. fejezetében** (71. oldal) olvasható. A 2,64 m/m% koncentrációjú gélek kissé kilógnak a segédanyagok mennyiségének növekvő tendenciájából. Ezek a gélek technológiai megfontolások miatt készültek el, ugyanis ezek azok, melyek a legtöbb D1216-ot vagy C1416-ot tartalmaztak, de még nem kellett őket centrifugálni a készítésnél.

4.3.2. A gélek vizsgálatára alkalmas Skin PAMPA rendszer felépítése

A gélek hatóanyagának transzdermális permeábilitását kereskedelmi forgalomban kapható Skin PAMPA szendviccsel végeztük el. Azonban a hagyományos PAMPA eljárásból csak a felső lemezt hagytuk meg, míg az alsót, a **2.1.3.3. fejezetben** (25. oldal) bemutatott, módosított alsó lemezzel helyettesítettük. Ezen formulációs lemez minden cellájába közvetlenül 70 µl félszilárd készítményt mértünk, mely a donor fázist alkotta. Akceptor fázisként a felső lemez celláiban 250 µl pH 7,4 puffert használtunk. A NKVR hatásának kiküszöbölése céljából a fogadó oldal celláit egyenként kevertettük. A mérések előtt a Skin PAMPA mesterséges membránját egy éjszakán át hidratáltuk, mely hidratáció hatásfokát vizuálisan ellenőriztük. A PAMPA szendvics összeállítása után a rendszert 32°C hőmérsékleten 24 óra hosszan inkubáltuk. Közben az első órában kétszer, utána a 10. óráig óránként, majd 12, 16 és 24 óránál vettünk mintát a fogadó fázisból. Az így

eltávolított puffert friss akceptor oldattal pótoltuk, és az így jelentkező hígulást az értékelésnél figyelembe vettük. A mintavétel után az ibuprofén mennyiségét UV spektrofotometriásan határoztuk meg. A tartalmi meghatározáshoz használt kalibráció paramétereit az **5. táblázat** foglalja össze.

5. táblázat Az ibuprofén UV spektrofotometriás kalibrációjának paraméterei

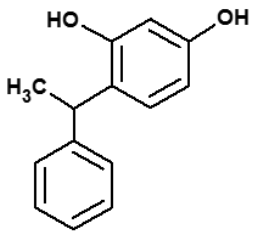
Hatóanyag	Koncentráció tartomány [g/100 cm^3]	λ_{max} [nm]	Kalibrációs egyenes egyenlete	R^2
ibuprofén	0,0100-0,0600	263	y = 11,21x – 0,0136	0,9999

Az ibuprofén mennyiségét az egységnyi felületre eső permeált anyagmennyiségben, µg/cm^2 egységben adtuk meg. Az eredményekből felvettük a gélek permeábilitás-idő profiljait, melyek a további értékelés alapját képezték.

4.4. Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra

4.4.1. A vegyület tájékoztató oldhatóságának meghatározása a vizsgált oldószerekben

A nemzetközi kutatási együttműködés keretein belül végzett munka első lépése a modellvegyület, a feniletil-rezorcin (Symwhite^{TM}, **10. ábra**) tájékoztató oldhatóságának meghatározása volt a 23 különböző tulajdonságú oldószerben (**6. táblázat**). A feniletil-rezorcin ezen oldószerekkel készült oldatai a donor fázist alkották a Skin PAMPA vizsgálatokkor, így nyílt arra lehetőség, hogy az oldószerek bőrön keresztüli permeábilitást befolyásoló hatását vizsgáljuk. A tájékoztató oldhatósági adatokra azért volt szükség, hogy meghatározzuk a minta ideális kiindulási koncentrációját a donor fázisban.



10. ábra A feniletil-rezorcin (Symwhite^{TM}) szerkezeti képlete

6. táblázat A vizsgálatokhoz használt oldószerek listája

Oldószerek [laboratóriumi jelölésük]	
víz **[L01]**	kaprilsav- és kaprinsav trigliceridek **[L13]**
etanol **[L02]**	izododekán **[L14]**
glicerin **[L03]**	dimetikon **[L15]**
DMSO **[L04]**	izopropil-mirisztát **[L16]**
paraffin **[L05]**	oktil-dodekanol **[L17]**
víz/propilén-glikol 8/2 **[L06]**	izononil-izononanoát **[L18]**
víz/etanol 8/2 **[L07]**	hidrogénezett poliizobutén **[L19]**
víz/dimetil-izoszorbid 9/1 **[L08]**	barackmagolaj **[L20]**
víz/propilén-glikol/etanol 1/3/6 **[L09]**	fenil-trimetikon **[L21]**
propilén-glikol **[L10]**	dimetil-izoszorbid **[L22]**
butilén-glikol **[L11]**	kukoricaolaj **[L23]**
dipropilén-glikol **[L12]**	-

A nevek után jelzett kódszámok az általunk használt laboratóriumi jelölések voltak a könnyebb kezelhetőség érdekében.

Az oldhatóság vizsgálat során egy tájékoztató módszert alkalmaztunk, melyben a feniletil-rezorcinra nézve töményebb rendszerből kiindulva hígítottuk a szuszpenziót addig, míg a hatóanyag feloldódott adott oldószerben. Az így meghatározott oldhatósági kategóriák a következők voltak: >1000; 100-1000; 10-100; 1-10; <1 mg/ml. Ezeket a tág kategóriákat azután tovább szűkítettük. Minden egyes tartománynál megvizsgáltuk, hogy a modellvegyület oldhatósága a felső határon van-e. Ha nem, akkor vagy egy köztes értéknél, vagy az alsó limiten helyezkedik el. A továbbiakban 4/3-szoros, kétszeres, négyszeres és tízszeres hígítással az alábbi szűkebb oldhatósági kategóriákat kaptuk (példának véve a 10-100 mg/ml-es csoportot): 10; 25; 50; 75; 100 mg/ml. Ezen logika mentén finomítottuk az oldhatósági skálát a többi csoportban is. Az eredmények tükrében meghatároztuk a vizsgálatokhoz használt kezdeti feniletil-rezorcin koncentrációt.

4.4.2. A Skin PAMPA membránintegritás vizsgálata

A membránintegritás vizsgálat célja az volt, hogy meggyőződjünk róla, a tanulmányban szereplő oldószerek nem teszik-e tönkre a Skin PAMPA mesterséges membránját. A vizsgálat során arra törekedtünk, hogy mindent ugyanazon a módon hajtsunk végre, ahogyan a tényleges permeábilitás méréseknél, így a membránt ugyanolyan hatásoknak tettük ki minden esetben. A kísérletekhez kereskedelmi forgalomban kapható Skin PAMPA lemezeket használtunk. A méréseket úgy építettük

fel, hogy az alsó lemez négy darab celláját tartalmazó egységeibe mértünk egy-egy típusú oldószert, hogy az érintkezzen az előzetesen hidratált felső lemez membránjával. Az oldószerek ebben az esetben nem tartalmaztak oldott anyagot, ez egy üres kísérlet volt, azonban a felső lemezbe a további méréseknél használt pH 7,4 puffert mértük. Az így összerakott PAMPA szendvicset 7 óra hosszan, 32°C hőmérsékleten inkubáltuk folyamatos akceptor fázis keverés mellett.

Az inkubációs idő letelte után először makroszkópikusan vizsgáltuk meg a membrán felületét. Amennyiben megfelelőnek bizonyult adott cella, úgy a filtert óvatosan, papírvattával megtisztítottuk, és egy hagyományos Skin PAMPA mérést raktunk össze piroxikám modellvegyület felhasználásával. Itt az oldószerenkénti négy cellából háromban történt permeábilitás mérés, a negyediket üres kísérletként hajtottuk végre. Az így kapott $\log P_e$ értékeket egy korábban kivitelezett piroxikám mérés eredményéhez hasonlítottuk.

4.4.3. A PAMPA permeábilitás mérések kivitelezése

A vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható Skin PAMPA szendvicseket használtunk. A mérések előtt a Skin PAMPA mesterséges membránját hidratáltuk, majd ennek hatásfokát vizuálisan ellenőriztük. Donor fázisként a feniletil-rezorcin adott oldószerrel készült oldatát használtuk, melyet az előzetes tájékoztató oldhatóság-vizsgálat függvényében kijelölt koncentrációban, a mérések előtt frissen készítettünk. A vizsgálatoknál rendhagyó módon a donor fázis a felső lemez volt, míg a fogadó oldal alul helyezkedett el. Utóbbi celláiba 180 µl pH 7,4 puffert töltöttünk, és egy-egy mágneses keverőt helyeztünk. A donor oldalra az oldatok 70-70 µl-ét mértük. A lemezeket ezután óvatosan egymásra helyeztük, és 32°C hőmérsékleten 6 órán keresztül inkubáltuk. Eközben 2, 4 és 6 óránál az akceptor fázisból 150 µl mintát vettünk, és UV spektrofotometriásan meghatároztuk a feniletil-rezorcin koncentrációját. A tartalmi meghatározáshoz kalibrációt készítettünk, melynek releváns paramétereit a **7. táblázat** foglalja össze.

7. táblázat A feniletil-rezorcin (Symwhite™) UV spektrofotometriás mérésének kalibrációs adatai

Hatóanyag	Koncentráció tartomány [g/100 cm^3]	λ_{max} [nm]	Kalibrációs egyenes egyenlete	R^2
feniletil-rezorcin	0,0009-0,0090	280	y = 120,5x + 0,0014	0,9997

A mintavétel után a fogadó fázist egy új alsó lemezzel helyettesítettük, melybe előzetesen szintén pH 7,4 puffert mértünk és mágneses keverőt helyeztünk. A mintavételek során jelentkező hígulást az adatok értékelésekor figyelembe vettük. A NKVR hatásának kiküszöbölése céljából az akceptor fázist kevertettük olyan intenzitással, hogy a NKVR hozzávetőlegesen 60 µm legyen. Az oldószerek párolgását a PAMPA szendvics gondos lezárásával akadályoztuk meg. A mérési eredményekből kiszámoltuk a modellvegyület membrán permeábilitás értékét ($\log P_m$), és meghatároztuk adott oldószerben létrejövő fluxusát.

5. Eredmények

5.1. Az inkubációs hőmérséklet változásának hatása a permeábilitásra

5.1.1. A GIT-PAMPA rendszeren végzett vizsgálatok eredményei

Hét eltérő sav-bázis tulajdonságokkal és szerkezettel jellemezhető vegyület permeábilitását mértük meg a **4.1.2. fejezetben** (32. oldal) leírtak szerint készített GIT-PAMPA rendszeren. A 15, 25, 37, 45 és 55°C hőmérsékleten mért *intrinsic* permeábilitás ($logP_0$) értékek a **8. táblázatban** láthatók. Minden esetben három párhuzamos mérés átlageredményei szerepelnek.

8. táblázat A gasztrointesztinális PAMPA modellen mért $logP_0$ értékek

GIT-PAMPA							
t [°C]	**$logP_0$ diklofenák**	**$logP_0$ karbamazepin**	**$logP_0$ ketoprofén**	**$logP_0$ piroxikám**	**$logP_0$ progeszteron**	**$logP_0$ propranolol**	**$logP_0$ verapamil**
15	-2,11	-4,93	-3,65	-3,27	-4,21	-2,75	-2,52
25	-1,98	-4,94	-3,61	-3,16	-4,34	-2,63	-2,60
37	-1,93	-4,75	-3,55	-3,13	-4,17	-2,18	-2,28
45	-1,94	-4,64	-3,44	-3,16	-4,04	-2,06	-2,10
55	-1,88	-4,49	-3,38	-3,07	-3,64	-1,84	-1,78

5.1.2. A BBB-PAMPA modellen végzett vizsgálatok eredményei

A vizsgálataink első fázisában a BBB-PAMPA modellen ugyanannak a hét gyógyszermolekulának az *intrinsic* permeábilitását mértük, mely a GIT-PAMPA esetén is szerepelt. Az inkubációs hőmérsékleteket szintén 15 és 55°C hőmérséklet között választottuk meg. Az eredményeket a **9. táblázat** tünteti fel.

9. táblázat A vér-agy gát PAMPA modellen mért $logP_0$ értékek

BBB-PAMPA							
t [°C]	**$logP_0$ diklofenák**	**$logP_0$ karbamazepin**	**$logP_0$ ketoprofén**	**$logP_0$ piroxikám**	**$logP_0$ progeszteron**	**$logP_0$ propranolol**	**$logP_0$ verapamil**
15	-2,08	-4,91	-3,49	-3,37	-4,55	-2,74	-3,13
25	-1,96	-4,78	-3,39	-3,26	-4,35	-2,46	-2,85
37	-1,80	-4,52	-3,19	-3,10	-4,21	-2,33	-2,76
45	-1,76	-4,39	-3,04	-3,04	-4,08	-2,17	-2,62
55	-1,68	-4,21	-2,96	-2,99	-3,94	-2,00	-2,33

A kísérletsorozat második fázisában a **4.1.1. fejezet 1. táblázata** (31. oldal) szerint 16-ra bővítettük a vegyületek körét, és megmértük azok permeábilitását 25 és 37°C hőmérsékleten. Ezen mérések esetén a pH 7,4 donor fázis alkalmazásával mért, *effektív* permeábilitás értékeket ($logP_e$) adtuk meg. A célból, hogy megvizsgáljuk mely hőmérsékleten végrehajtott PAMPA mérés korrelál jobban más módszerek eredményeivel, korrelációanalízist végeztünk egy eltérő eljárással, 37°C hőmérsékleten kapott vér-agy koncentráció hányados (logBB) értékekkel. A permeábilitás mérés eredményeit, és az irodalmi forrásból [36, 70] nyert logBB adatokat a **10. táblázat** foglalja össze.

10. táblázat A bővített vegyületkör felhasználásával pH 7,4 donor fázis esetén mért $logP_e$ értékek (a táblázat folytatása a 46. oldalon látható)

	BBB-PAMPA pH 7,4 $logP_e$		**logBB***
t [°C]	**25**	**37**	**37**
propranolol	-4,39	-4,17	0,64
kinin	-4,51	-4,34	0,60
fentanil	-4,32	-3,97	0,60
kodein	-5,13	-4,94	0,55
progeszteron	-4,35	-4,21	0,20
lidokain	-4,86	-4,31	0,10
karbamazepin	-4,78	-4,52	0,00
warfarin	-5,74	-5,64	0,00
morfin	-6,06	-5,31	-0,16
kortikoszteron	-5,01	-4,68	-0,50

	BBB-PAMPA pH 7,4 $logP_e$		logBB*
t [°C]	**25**	**37**	**37**
verapamil	-4,17	-3,92	-0,70
zidovudin	ø	-6,52	-0,89
hidrokortizon	-5,46	-5,32	-0,90
prazozin	-4,95	-4,80	-0,90
szalicilsav	-7,25	-6,66	-1,10
indometacin	-5,44	-5,52	-1,26

*****: Irodalmi forrásból kapott vér-agy koncentráció hányados [36, 70]. **ø**: nincs adat.

5.1.3. A Skin PAMPA módszeren végzett vizsgálatok eredményei

A Skin PAMPA modellen 32°C hőmérsékleten is tanulmányoztuk a hét vegyület permeábilitását. A **11. táblázat** foglalja össze a mérések eredményeit.

11. táblázat A Skin PAMPA modellen mért $logP_0$ értékek

Skin PAMPA							
t [°C]	**$logP_0$ diklofenák**	**$logP_0$ karbamazepin**	**$logP_0$ ketoprofén**	**$logP_0$ piroxikám**	**$logP_0$ progeszteron**	**$logP_0$ propranolol**	**$logP_0$ verapamil**
15	-3,46	-6,00	-4,60	-4,69	-4,78	-4,74	-4,13
25	-3,46	-5,95	-4,29	-4,28	-4,58	-3,96	-3,59
32	-3,16	-5,58	-3,98	-4,27	-4,75	-3,30	-3,44
37	-2,94	-5,26	-3,73	-4,22	-4,53	-3,12	-3,40
45	-2,77	-4,88	-3,52	-3,93	-4,40	-2,92	-3,20
55	-2,60	-4,59	-3,24	-3,47	-4,23	-2,57	-2,99

A 32°C inkubációs hőmérséklet azért került be a vizsgálati körbe, mert ez az autentikus hőmérséklete az emberi bőrnek, továbbá a referenciaként alkalmazott Franz diffúziós cella mérések adatai szintén ezen a hőmérsékleten végrehajtott kísérletekből származnak [5]. Ahogy a vér-agy gát PAMPA esetén, a Skin PAMPA vizsgálatok kivitelezésekor is cél volt egy másik, ebben az esetben egy Franz diffúziós cella módszer eredményeivel összevetni az adatainkat, hogy megvizsgáljuk, mely inkubációs hőmérséklet alkalmazása előnyösebb. Az ehhez szükséges eredményeket, és az irodalmi forrásból nyert adatokat foglalja össze a **12. táblázat**.

12. táblázat A pH 6,4 donor fázis mellett, Skin PAMPA módszerrel mért $logP_e$ értékek

	Skin PAMPA pH 6,4 $logP_e$						
t [°C]	**diklofenák**	**karbamazepin**	**ketoprofén**	**piroxikám**	**progeszteron**	**propranolol**	**verapamil**
15	-5,88	-6,00	-6,04	-6,04	-4,78	-7,87	-6,80
25	-5,65	-5,95	-6,72	-5,85	-4,58	-6,91	-6,58
32	-5,58	-5,58	-6,37	-5,68	-4,75	-6,43	-6,12
37	-5,35	-5,26	-6,19	-5,57	-4,53	-6,25	-6,07
45	-5,19	-4,88	-5,77	-5,29	-4,40	-6,05	-5,88
55	-5,02	-4,59	-5,55	-4,83	-4,23	-5,70	-5,66
$logK_p^*$ Franz cella	ø	0,18	-0,31	-0,96	1,08	-0,85	-0,36

*: Franz diffúziós cella módszerrel kapott permeábilitás adatok (32°C) [5]. **ø**: nincs adat.

Az eredmények részletes értelmezése az értekezés **6.1. fejezetében** (59. oldal) olvasható.

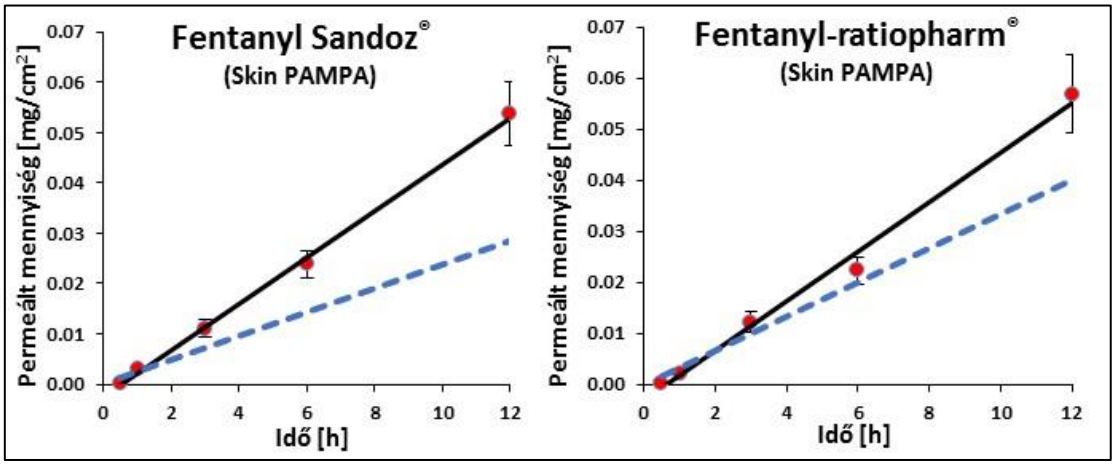
5.2. Gyógyszeres tapaszok vizsgálata

A vizsgálatokhoz hat, kereskedelmi forgalomban kapható transzdermális gyógyszeres tapaszt, és egy helyi hatású, nemszteroid fájdalom- és gyulladáscsökkentő készítményt választottunk. A tapaszok néhány, a vizsgálat szempontjából releváns tulajdonságát a **4.2.1. fejezet 2. táblázata** (34. oldal) tartalmazza. A tanulmányozott gyógyszerek között van két különböző gyártótól származó fentanil tartalmú tapasz (Fentanyl Sandoz®, Fentanyl-ratiopharm®), egy rivasztigmint és egy ketoprofént tartalmazó készítmény (Exelon®, Keplat®), illetve három eltérő gyártó által készített nikotin tartalmú tapasz (Niquitin®, Nicotinell®, Nicorette®). Minden termékből három mintát vizsgáltunk. A tapaszok PAMPA lemezekre történő felhelyezése és vizsgálata a **4.2.2. fejezetben** (34. oldal) leírtak szerint történt. A készítmények rögzítésekor fontos szempont volt, hogy minél több cellát teljes mértékben lefedjenek. Azon PAMPA cellák eredményeit, melyeket csak részben fedett adott gyógyszeres tapasz, az értékelésben a továbbiakban elhanyagoltuk. Az átlagos permeált mennyiséget az akceptor tálca celláiban lévő hatóanyag-koncentráció alapján számoltuk, minden esetben figyelembe véve a több mintavétellel járó hígulási folyamatot. A következőkben megadott eredmények az egységnyi felületre eső permeált mennyiséget mg/cm^2 egységben fejezik ki. Az adatok

szórását a grafikonokon feltüntettük. A PAMPA mérések esetén a szórás az individuális cellák közötti szórást mutatja, míg az összehasonlításképpen végzett vertikális Franz diffúziós cella kísérleteknél a párhuzamosan végzett mérésekből eredő szórást adtuk meg.

5.2.1. Fentanil tartalmú tapaszok

A hatóanyagként fentanilt hordozó, erős fájdalomcsillapító hatású készítmények vizsgálati eredményeit a **11. ábra** szemlélteti. A kék szaggatott vonal a tapasz gyártó általi hatóanyag-bejutási kinetikáját mutatja, mely a gyógyszer szekunder csomagolásán jelölt értékből és a tapasz méretéből lett megállapítva. Ez, bár eltérő gyártótól származik, egyező a két gyógyszernél. A fentanil kis mennyisége miatt a kvantitatív analízis LC-MS módszerrel történt. Ezeknél a tapaszoknál összehasonlító Franz diffúziós cella méréseket nem végeztünk. Ennek oka az volt, hogy a készítmény betegtájékoztatója nem javasolja a vágását, így nem volt lehetőség a membránra rögzíteni a tapaszt.

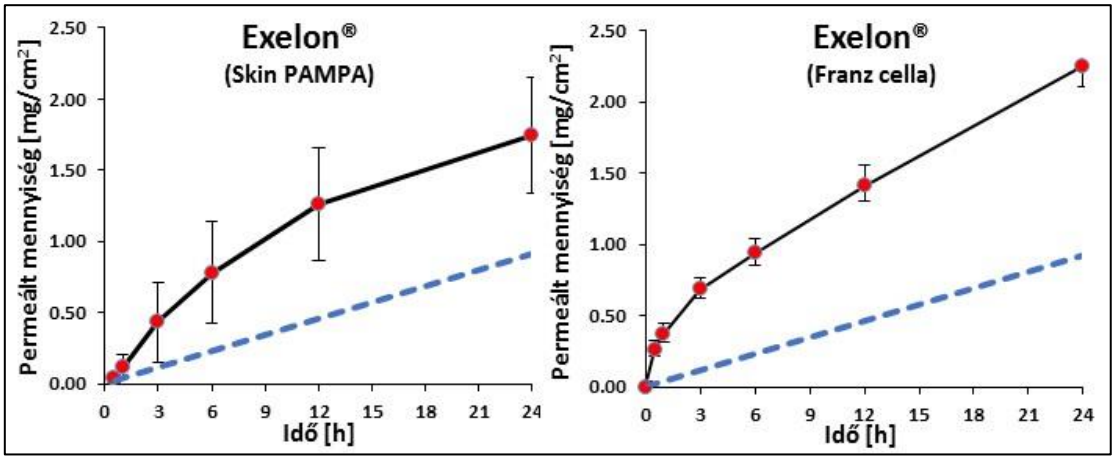


11. ábra A két fentanil tartalmú tapasz permeált mennyiség-idő profilja (permeábilitás profil). A piros pontok és a fekete folytonos vonal a PAMPA mérések eredményeit, a kék szaggatott vonal a gyártó által deklarált hatóanyag-bejutás kinetikáját jelöli.

5.2.2. Rivasztigmin tartalmú gyógyszeres tapasz

Az Exelon® transzdermális készítmény egy központi idegrendszeri támadáspontú kolineszteráz-gátló vegyületet, a rivasztigmint tartalmazza. A gyógyszert az Alzheimer és Parkinson kórral járó demencia kezelésére használják. A vizsgálat eredményét a **12. ábra** mutatja. Az ábra bal oldali paneljén a Skin PAMPA, míg jobb oldalán a Franz

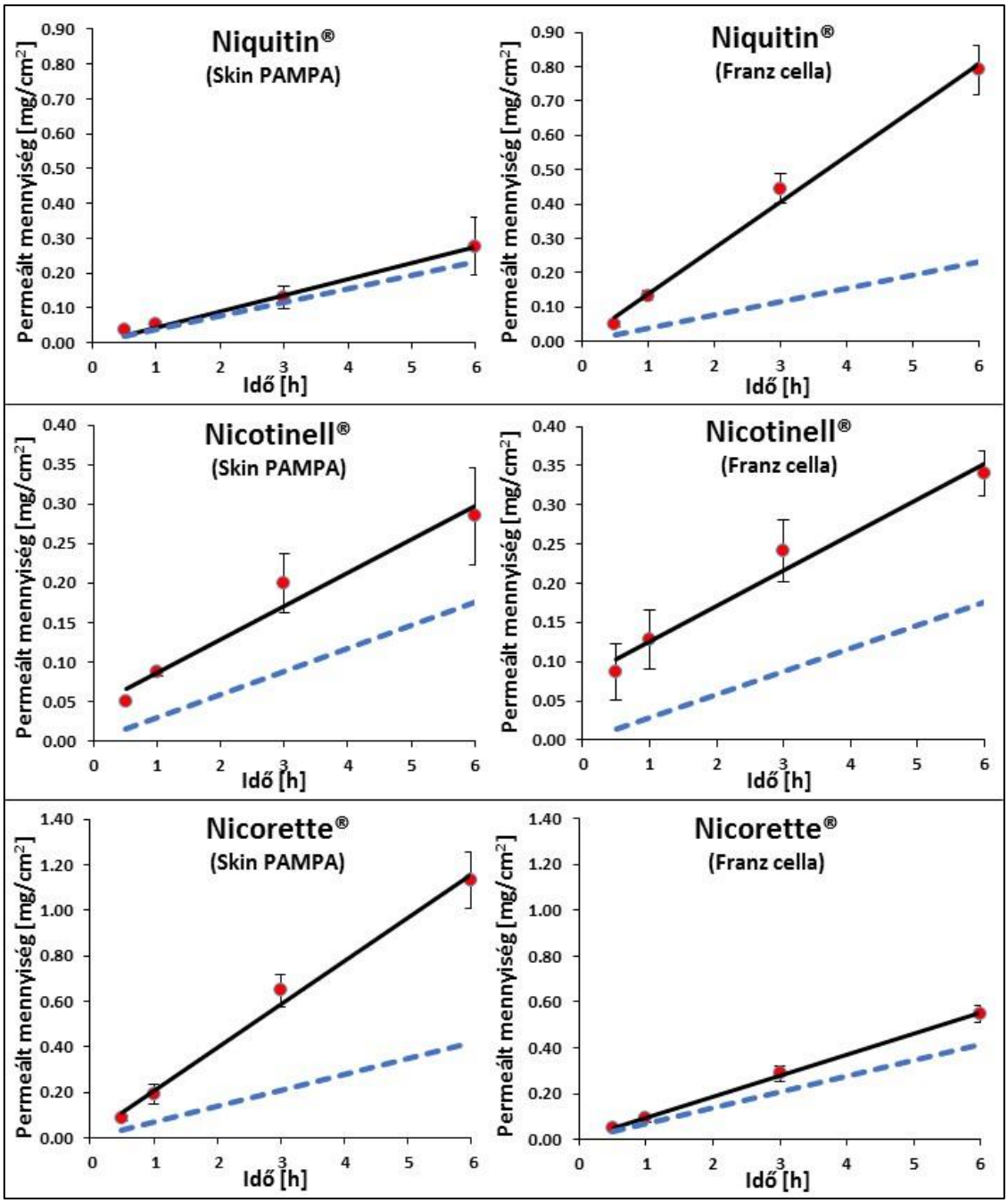
diffúziós cella módszer által kapott eredmények láthatók. A grafikus ábrázolás követi a fentanil tartalmú tapaszoknál alkalmazott ábrázolási módot, azaz a permeábilitás profilt a gyártó által deklarált felszívódási kinetikához hasonlítja. Az Exelon® esetén 24 óra hosszú mérést hajtottunk végre hat mintavételi ponttal, hogy megvizsgáljuk a beteg általi teljes felhasználási periódusban a tapaszból felszabaduló hatóanyag bőrön keresztüli felszívódását.



12. ábra A rivasztigmin tartalmú tapasz permeábilitás profilja. A piros pontok és a fekete folytonos vonal a saját PAMPA (bal), illetve a Franz diffúziós cella mérések (jobb) eredményeit, a kék szaggatott vonal a gyártó által deklarált hatóanyag-bejutás kinetikáját jelöli.

5.2.3. Nikotin tartalmú tapaszok

A munka harmadik fázisában nikotin tartalmú készítményeket vizsgáltunk. A nikotin tapaszok a dohányzásról való leszokást támogató terápia eredményesen használható eszközei. Három különböző gyártótól származó, kereskedelmi forgalomban kapható, eltérő dóziserősségű tapaszt (Niquitin®, Nicotinell®, Nicorette®) vizsgáltunk. A Skin PAMPA és a Franz diffúziós cella eredményeit a **13. ábra** foglalja össze. Az értékelés során – az előzőekben megismertekkel egyezően – a gyártók által jelölt felszívódási kinetikához (kék szaggatott vonal) hasonlítottuk az adatainkat. Ezeknél a méréseknél hat óra hosszú inkubációt használtunk négy mintavételi ponttal. Az összehasonlítás során a Nicotinell® két módszeren történő egyezése mellett, a másik két tapasznál különbségeket figyeltünk meg. E különbségek értelmezése a **6.2. fejezetben** (66. oldal) történik.

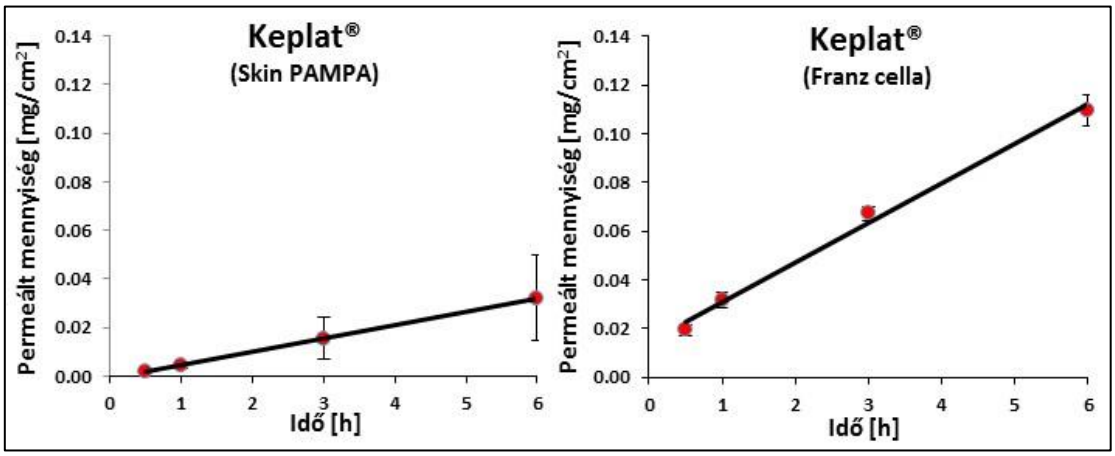


13. ábra A három különböző nikotin tartalmú tapasz permeábilitás profilja. A piros pontok és a fekete folytonos vonal a saját PAMPA (bal), illetve a Franz diffúziós cella mérések (jobb) eredményeit, a kék szaggatott vonal a gyártó által deklarált hatóanyag-bejutás kinetikáját jelöli.

5.2.4. Ketoprofén tartalmú, helyi hatású tapasz

A negyedik, egyben utolsó vizsgált gyógyszeres tapasz a ketoprofént tartalmazó Keplat® volt. Ez a tapasz nem szisztémás hatású transzdermális készítmény, hanem egy helyi fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatást célzó gyógyszer. Éppen ezért a gyártó nem

jelöl meg felszívódási adatot a csomagoláson, így az ezzel történő összehasonlítás sem kivitelezhető. A Skin PAMPA mérés eredményét a **14. ábra** bal oldali panelje, míg a Franz diffúziós cella vizsgálatok eredményét a jobb oldali panelje mutatja.



14. ábra A Keplat® tapasz permeábilitás profilja. A piros pontok és a fekete folytonos vonal a PAMPA (bal), illetve a Franz diffúziós cella mérések (jobb) eredményét ábrázolják.

Az eredmények értelmezése során a permeábilitás profilok meredekségéből megadtuk adott készítmény hatóanyagának fluxusát. A vizsgálat részletes tárgyalása az értekezés **6.2. fejezetének** (65. oldal) tárgyát képzi.

5.3. Ibuprofén tartalmú gélek permeábilitás vizsgálata

5.3.1. A Skin PAMPA permeábilitás mérések eredményei

A vizsgálatok első körében a **4.3.1. fejezet 4. táblázatában** (39. oldal) jelölt gélek közül az első nyolc készítmény viselkedését tanulmányoztuk. Ezekben közös volt, hogy penetrációfokozó segédanyagként szacharóz-laurát D-1216-ot (D1216) tartalmaztak. A 24 óra hosszú Skin PAMPA vizsgálat eredményeit a **13. táblázat** foglalja össze.

13. táblázat A D1216 tartalmú gélek vizsgálatának eredményei

t [h]	Permeált mennyiség [μg/cm^2]							
	D1216 [1%]	**D1216 [2%]**	**D1216 [4%]**	**D1216 [6%]**	**D1216 [8%]**	**D1216 [10%]**	**D1216 [2.64%]**	**D1216-TR [2.64%]**
0,5	186,3	52,7	42,1	42,1	43,5	42,8	70,0	74,2
1	412,1	152,8	127,9	124,1	145,2	154,9	212,0	206,0
2	931,2	489,5	421,6	413,3	481,4	492,1	705,5	638,4
3	1445,4	918,4	779,9	762,6	884,6	878,4	1247,9	1162,5
4	1922,4	1362,9	1184,9	1136,0	1244,8	1215,6	1770,5	1659,8
5	2370,2	1807,6	1591,5	1471,5	1603,9	1448,2	2311,5	2143,2
6	2776,1	2212,1	1958,1	1782,4	1793,6	1820,5	2763,3	2570,0
7	3168,9	2603,0	2306,3	2103,2	2170,5	1996,1	2639,2	2900,4
8	3508,8	2845,6	2622,1	2378,4	2363,0	2305,4	2777,0	2776,8
9	3822,9	3163,8	2898,1	2577,4	2609,8	2564,5	2879,3	3517,3
10	4111,5	3375,4	3240,0	2862,0	2793,8	2819,3	3573,5	3848,0
12	4633,6	4073,8	3887,7	3397,9	3448,7	3341,0	4162,7	4374,8
16	5494,9	5156,8	5022,2	4331,1	4376,2	3807,0	5642,4	5616,7
24	6669,1	6549,8	6551,8	5661,3	5609,7	5132,0	7133,8	7219,0

A szacharóz-mirisztát C-1416 tartalmú készítmények (C1416) tanulmányozására a vizsgálatok második fázisában került sor. A különböző mintavételi időpontokban mért permeált mennyiséget a **14. táblázat** mutatja.

14. táblázat A C1416 tartalmú gélek vizsgálatának eredményei

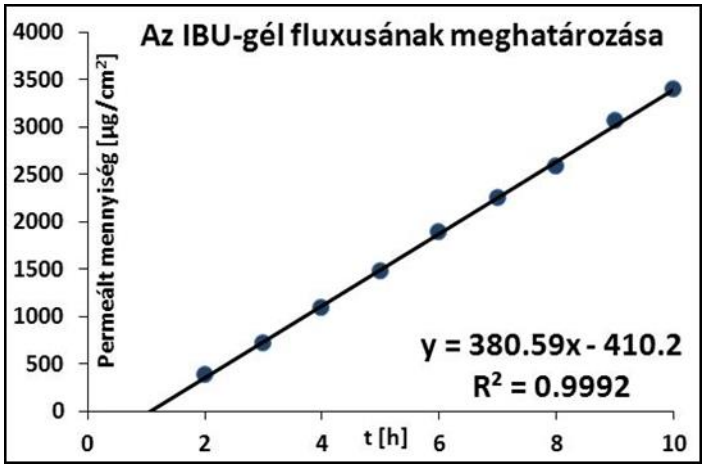
t [h]	Permeált mennyiség [μg/cm^2]									
	C1416 [0.25%]	**C1416 [0.5%]**	**C1416 [1%]**	**C1416 [2%]**	**C1416 [4%]**	**C1416 [6%]**	**C1416 [8%]**	**C1416 [10%]**	**C1416 [2.64%]**	**C1416-TR [2.64%]**
0,5	84,7	96,0	80,9	71,2	66,1	67,8	54,1	60,1	59,8	65,6
1	263,4	284,0	243,7	237,5	272,6	281,0	153,9	179,4	193,0	214,0
2	829,1	875,2	794,7	901,9	1029,0	894,0	526,3	655,7	746,0	820,1
3	1427,6	1647,4	1564,7	1617,3	1682,0	1493,6	963,4	1345,0	1426,0	1538,6
4	2020,6	2346,4	2316,7	2246,4	2296,4	2032,4	1343,8	2016,0	1995,3	2113,5
5	2540,6	2919,3	2825,3	2673,6	2795,3	2499,7	1676,8	2542,1	2493,7	2634,5
6	2993,9	3433,8	3374,0	3236,2	3094,6	2786,3	1994,1	2902,2	2925,5	3146,9
7	3395,8	3873,9	3796,8	3511,3	3397,5	3162,0	2282,1	3392,9	3227,3	3553,0
8	3768,9	4273,4	4197,0	3872,7	3699,5	3449,6	2546,1	3806,5	3505,4	3883,0
9	4103,2	4613,5	4576,6	4232,5	3972,6	3714,2	2787,8	3928,6	3888,5	3981,1
10	4392,1	4928,7	4892,8	4513,0	4340,4	3954,9	3028,7	4192,6	4054,3	4492,2
12	4991,7	5596,5	5617,4	5143,2	4993,2	4547,4	3415,6	4658,6	4776,7	5171,7
16	5938,8	6701,5	6654,6	6062,5	6039,9	5420,6	4038,7	5881,6	5812,1	6063,0
24	7164,4	7955,1	7883,2	7238,1	7281,3	6551,6	4930,9	6250,4	7246,5	7463,8

Annak érdekében, hogy megfigyeljük, mekkora hatást fejtenek ki a penetrációfokozó segédanyagok a készítményekben, készítettünk D1216 és C1416 mentes géleket is. Az egyik kontrol gél semmilyen penetrációfokozó anyagot sem, míg a másik kizárólag transzkutolt tartalmazott. E gélek vizsgálatának eredményeit a **15. táblázat** foglalja össze.

15. táblázat A kontrol és a transzkutolt tartalmazó kontrol minták vizsgálatának eredményei

t [h]	Permeált mennyiség [μg/cm^2]	
	Kontrol	**Kontrol TR**
0,5	53,6	64,6
1	136,8	155,1
2	382,9	398,3
3	723,0	695,7
4	1091,0	1022,9
5	1479,5	1333,1
6	1887,4	1718,5
7	2255,9	2075,8
8	2579,6	2404,0
9	3060,0	2736,2
10	3400,6	2848,8
12	3767,3	3999,8
16	3675,3	5636,0
24	9060,8	7862,2

A vizsgálatok relatív szórása 5-20% között volt. A Skin PAMPA mérések eredményeiből minden egyes gélre külön-külön felvettük a permeábilitás profilokat, melyből megadtuk a fluxus értékeket. A fluxust minden esetben a permeábilitás profil felszálló, meredek szakaszából számoltuk (első 6-10 óra). Erre egy példát mutat a **15. ábra**. A permeábilitás profilok meredeksége a 10. óra után csökken, mintegy plató szakasz tapasztalható a grafikonokon. Ez jól bizonyítja azt a tényt, hogy a módosított alsó lemez használata általi kisebb mintamennyiség jóval közelebb van a *finite* dózis fogalmához, mivel a készítmény az ibuprofén mennyiségére nézve elkezdett kiürülni.



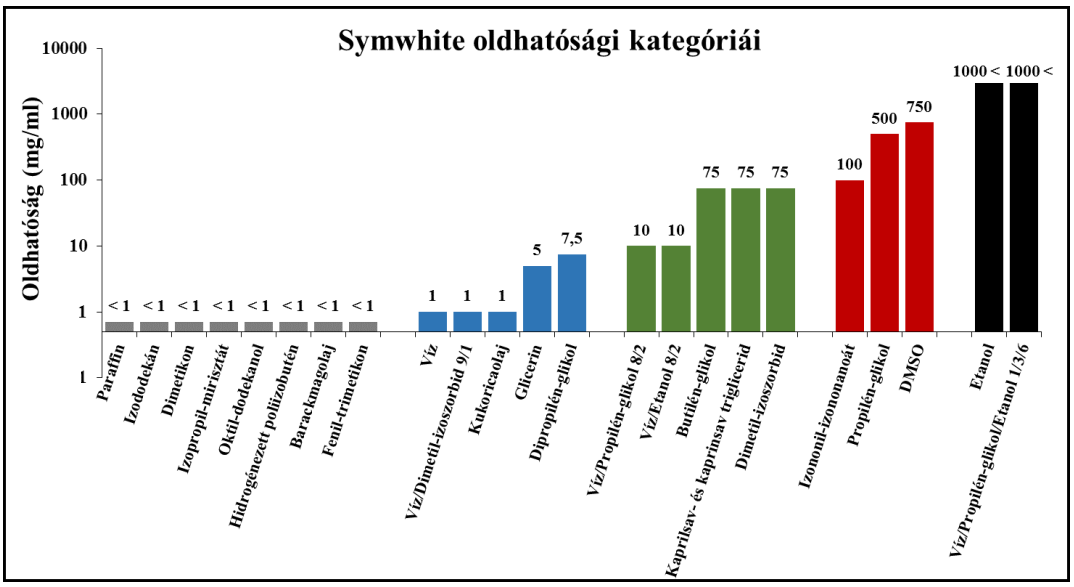
15. ábra A kontrol gél fluxusának meghatározása

Adott gél hatóanyagának membránon keresztüli fluxusa $\mu gcm^{-2}h^{-1}$ egységben lett kifejezve. Ezek, és az adatok további értelmezése az értekezés **6.3. fejezetének** (71. oldal) tárgyát képzi.

5.4. Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra

5.4.1. A vegyületek oldhatósága a vizsgált oldószerekben

Meghatároztuk a feniletil-rezorcin tájékoztató oldhatóságát 23 oldószerben. Az így kialakított oldhatósági kategóriák szerint rendszerezett eredményeket a **16. ábra** mutatja.

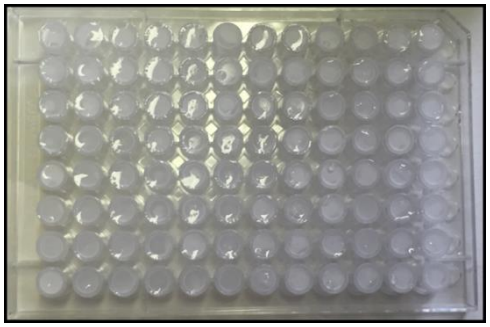


16. ábra A modellvegyület oldhatósága az oldószerekben

A feniletil-rezorcin oldhatósága a tanulmányozott 23 oldószerben igen eltérő. A **16. ábra** oldószereket felsorakoztató tengelyén az első nyolc esetben (szürke oszlopok) rendkívül alacsony (< 1 mg/ml) oldhatóságot tapasztaltunk. Ennek alapján a permeábilitás mérések előtt egy 1 mg/ml tartalmú oldatot kíséreltünk meg készíteni, majd a nem oldódó részt kiszűrtük, tehát ezen oldószereknél a pontos kiindulási koncentráció ismeretlen maradt. Ezen oldószerek jórészt hosszabb szénláncú, jelentős apoláris karakterrel rendelkező származékok voltak. A következő oldhatósági kategóriába került az 1-7,5 mg/ml oldhatóságot biztosító öt oldószer (kék oszlopok), mely képviselői között vizet, dimetil-izoszorbidot tartalmazó vizes elegyet, kukoricaolajat, glicerint és dipropilén-glikolt találunk. A harmadik oldhatósági kategória esetén a feniletil-rezorcin koncentrációja a vizsgált oldószerekben eléri a 10-75 mg/ml-es értéket (zöld oszlopok). A legmagasabb oldhatóságot biztosító oldószereket a **16. ábra** piros és fekete oszlopai jelölik. Ezekben az esetekben a mért oldhatóság 100-750 mg/ml-re, és 1000 mg/ml < -re tehető. Ezek az oldószerek voltak az izononil-izononanoát, a propilén-glikol, a DMSO, az etanol és egy elegy, ami vizet, propilén-glikolt és etanolt tartalmazott. Az oldhatósági kategóriák által kijelölt kiindulási koncentrációkat az **5.4.3. fejezet 16. táblázata** (57. oldal) foglalja össze.

5.4.2. A membránintegritás vizsgálat eredménye

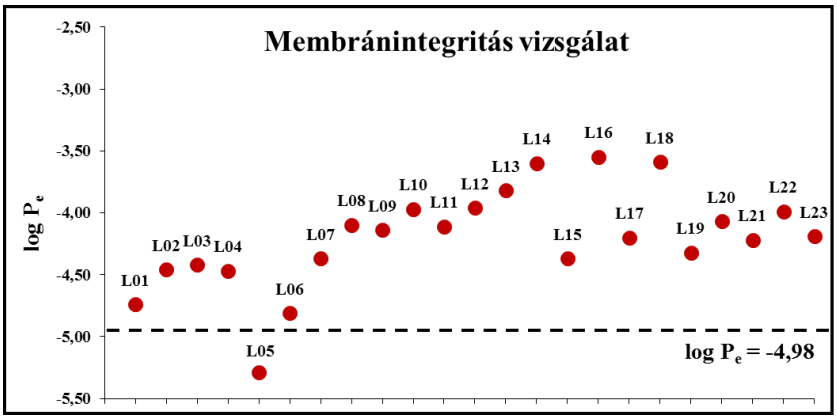
Az oldószerek membránra gyakorolt hatását vizsgáltuk a munka második fázisában a **4.4.2. fejezetben** (41. oldal) leírtak szerint. Fontos kiemelni, hogy minden oldószer esetén ugyanazokat a kísérleti körülményeket alakítottuk ki, mint azt a feniletil-rezorcin permeábilitás mérésénél terveztük. Ezeknek a próbáknak két szintje volt, egy vizuális vizsgálat, és egy általunk már többször tanulmányozott molekula ismételt permeábilitás mérése. A vizuális vizsgálat eredményét mutatja a **17. ábra**.



17. ábra A membránintegritás vizsgálathoz készített lemez fényképe

A vizuális értékelés során azt tapasztaltuk, hogy a Skin PAMPA membránját a vizsgált oldószerek közül egyik sem károsította olyan mértékben, hogy alkalmatlannak jelöltük volna a további kísérletekre.

A membránintegritás vizsgálat második lépésében az oldószerek hatásának kitett bőrmimetikus membránon piroxikám modellvegyület felhasználásával hagyományos Skin PAMPA mérést hajtottunk végre (**18. ábra**). Korábbi mérések alkalmával pH 7,4 donor fázis alkalmazásánál a piroxikám log P_e értéke -4,98 volt. A membránvizsgálatnál mind a 23 oldószerrel inkubáltuk a Skin PAMPA szendvicset, majd ismételten megmértük a piroxikám effektív permeábilitását, és ezek eredményét hasonlítottuk a korábban kapott adathoz. Ennek eredményét a **18. ábra** mutatja.



18. ábra A piroxikám permeábilitás mérése az oldószerekkel kezelt mesterséges membránon

Az eredmények alapján látszik, hogy a legtöbb oldószer esetén logP_e = -4,98 értékkel összehasonlítva legfeljebb egy nagyságrendi különbséget kaptunk. Az egy nagyságrendnél nagyobb különbséget mutató oldószerek (kaprilsav- és kaprinsav trigliceridjei, izododekán, izopropil-mirisztát és izononil-izononanoát) mind hosszabb szénláncú, apoláris származékok. Ezek, miután 7 óra hosszan érintkeztek a mesterséges membrán felületével, valamelyest jobban befolyásolták a piroxikám permeábilitását, mint a többi oldószer. Ez viszont nem arra enged minket következtetni, hogy a membrán integritását bármilyen formában megbontották volna, jóval inkább a modellvegyület-membrán interakciót fokozták, ezáltal növelték a bőrön keresztüli permeációt.

Mind a vizuális értékelés, mind a permeábilitás mérés eredménye alapján azt állapítottuk meg, hogy a Skin PAMPA alkalmas e 23 oldószer vizsgálatára anélkül, hogy a membrán integritása a kísérletek során sérülne.

5.4.3. A Skin PAMPA permeábilitás mérések eredményei

Az adott oldószerrel készült donor fázis alkalmazásával végrehajtott Skin PAMPA mérés eredményeit a **16. táblázat** foglalja össze. A táblázat feltünteti a tájékoztató vizsgálat során megállapított oldhatósági kategóriákat (S [mg/ml]), és az ezek alapján megállapított kiindulási koncentrációkat is (C_0 [mg/ml]).

16. táblázat A Skin PAMPA kísérletek eredményei

Oldószer	S [mg/ml]	C_0 [mg/ml]	m_0 [mg]	Perm. menny. [mg]	Perm. menny. [m/m%]	J [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]	$logP_m$
[L04]	750	500,0	35,00	0,0912	0,26	40,62	-4,09
[L22]	75	75,0	5,25	0,0480	0,91	13,66	-3,74
[L02]	1000	500,0	35,00	0,4125	1,18	265,51	-3,27
[L13]	75	74,9	5,24	0,1409	2,69	76,62	-2,99
[L23]	1	1,0	0,07	0,0025	3,61	1,72	-2,76
[L17]	1	1,0	0,07	0,0038	5,37	2,12	-2,67
[L18]	100	100,0	7,00	0,4477	6,40	248,40	-2,60
[L09]	1000	500,1	35,01	3,1956	9,13	1546,20	-2,51
[L12]	7,5	7,4	0,52	0,0589	11,38	28,64	-2,41
[L10]	500	500,6	35,04	3,5936	10,26	2117,50	-2,37
[L08]	1	1,0	0,07	0,0115	16,38	5,12	-2,29
[L11]	75	75,0	5,25	0,8215	15,65	487,86	-2,19
[L07]	10	10,0	0,70	0,2420	34,57	125,49	-1,90
[L01]	1	1,0	0,07	0,0466	66,57	21,55	-1,67
[L06]	10	10,0	0,70	0,6468	92,40	225,48	-1,65
[L16]	< 1	< 1	ø	0,0025	ø	1,44	ø
[L15]	< 1	< 1	ø	0,0087	ø	2,64	ø

Az oldószerek az általunk használt laboratóriumi jelöléssel szerepelnek a táblázatban, melyek jelentései a **4.4.1. fejezet 6. táblázatában** (41. oldal) olvashatók. **S**: oldhatóság; **C_0**: kiindulási koncentráció; **m_0**: kiindulási anyagmennyiség; **J**: fluxus; **$logP_m$**: membrán permeábilitás. A táblázat növekvő $logP_m$ alapján mutatja az oldószereket.

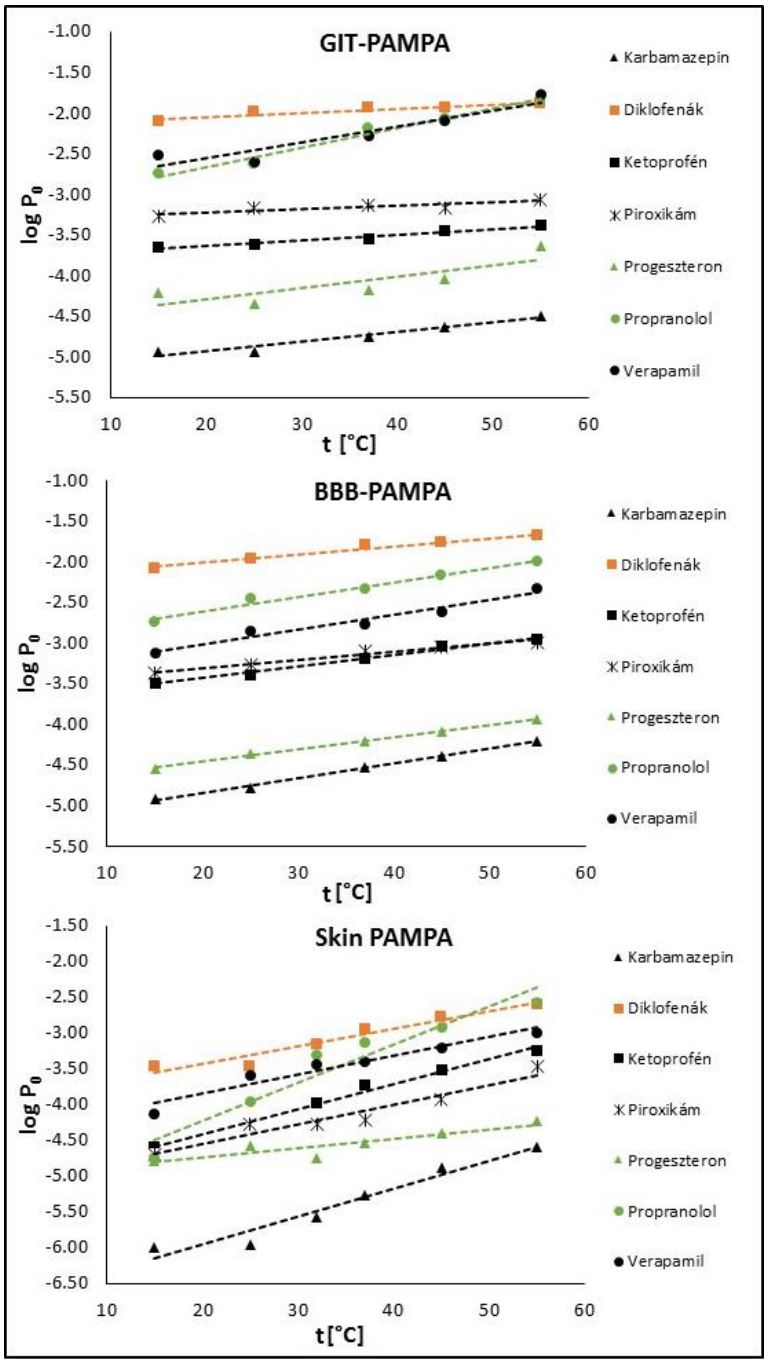
A fluxus értékeket adott oldószer esetén kapott permeábilitás profil meredekségéből, $\mu gcm^{-2}h^{-1}$ egységben adtuk meg. A membrán permeábilitást az értekezés **2.1.1.1. fejezetében** bemutatott **3. egyenlet** (7. oldal) segítségével számoltuk. Ehhez felhasználtuk a vegyület vizsgált oldószerben lévő kiindulási koncentrációját, és a mérések során meghatározott fluxust. A táblázatban továbbá megadtuk a permeált mennyiséget mg egységben, illetve a kiindulási mennyiséghez képest %-ban kifejezve is.

A paraffin, az izododekán, a hidrogénezett poliizobutén, a barackmagolaj, illetve a fenil-trimetikon esetén az akceptor fázisban UV spektrofotometriásan nem detektáltunk kimutatható mennyiségű modellvegyületet. Folyadékkromatográfiás vizsgálatok során szintén a kvantifikálási limit alatt maradt a feniletil-rezorcin koncentrációja ezen oldószereknél, így a további értékelésnél ezeket figyelmen kívül hagyjuk. Továbbá a dimetikon és az izopropil-mirisztát tanulmányozásakor a pontos kiindulási koncentráció ismeretének hiánya miatt a permeábilitási koefficients nem tudtuk értékelni, így ezeket is elhanyagoljuk. A Skin PAMPA mérések során jelentős relatív szórással tudtuk csak vizsgálni a glicerint, így a részletes elemzés tárgyát ez sem képzi a továbbiakban.

Az eredmények értelmezése az értekezés **6.4. fejezetében** (76. oldal) olvasható részletesen.

6. Megbeszélés

6.1. Az inkubációs hőmérséklet változásának hatása a permeábilitásra



19. ábra A $\log P_0$ és a hőmérséklet kapcsolata. **GIT-PAMPA**: gyomor-bél rendszeri PAMPA, **BBB-PAMPA**: vér-agy gát PAMPA, **Skin PAMPA**: bőr PAMPA

Annak érdekében, hogy megfigyeljük, milyen tendenciát mutat a mért permeábilitás különböző inkubációs hőmérséklet mellett, három PAMPA modellen hét eltérő tulajdonságú és szerkezetű vegyületet vizsgáltunk. A három PAMPA modell nem

egyforma lipidösszetételű mesterséges membránt használ. A GIT-PAMPA foszfatidilkolint tartalmaz, tehát egy foszfolipidre nézve egykomponensű membrán. A BBB-PAMPA sertés agyi lipid kivonata több foszfolipid keverékéből áll. Ezzel ellentétben a Skin PAMPA egy foszfolipid mentes rendszer. Ami mindhárom modellben közös az az, hogy mindegyik tartalmaz koleszterint. További eltérés, hogy az első két modell *n*-dodekánt használ a mesterséges membrán oldószereként, azonban a Skin PAMPA egy *n*-dodekán mentes membrán rendszer.

A kísérletsorozat eredményei azt mutatják, hogy mindhárom választott PAMPA modell esetén az intrinsic permeábilitás és a hőmérséklet között lineáris összefüggés van (**19. ábra**), azonban az inkubációs hőmérséklet változása nem egyenlő mértékben befolyásolja a különböző modelleket. Továbbá eltérő az egyes vegyületek viselkedése a három PAMPA rendszerben. A lineáris regresszió analízis eredményeit foglalja össze a **17. táblázat**.

17. táblázat A $\log P_0$ és a hőmérséklet lineáris regresszió analízise

	$\log P_0$ = at+b								
	GIT-PAMPA			**BBB-PAMPA**			**Skin PAMPA**		
	a	**b**	**R**	**a**	**b**	**R**	**a**	**b**	**R**
diklofenák	0,005	-2,15	0,92	0,010	-2,21	0,99	0,024	-3,91	0,97
karbamazepin	0,012	-5,17	0,97	0,018	-5,20	0,99	0,039	-6,74	0,97
ketoprofén	0,007	-3,77	0,98	0,014	-3,71	0,99	0,035	-5,11	0,99
piroxikám	0,004	-3,30	0,88	0,010	-3,50	0,98	0,028	-5,11	0,96
progeszteron	0,014	-4,58	0,84	0,015	-4,75	0,99	0,013	-5,01	0,91
propranolol	0,024	-3,14	0,99	0,018	-2,97	0,99	0,053	-5,29	0,96
verapamil	0,020	-2,95	0,94	0,018	-3,38	0,98	0,026	-4,38	0,96

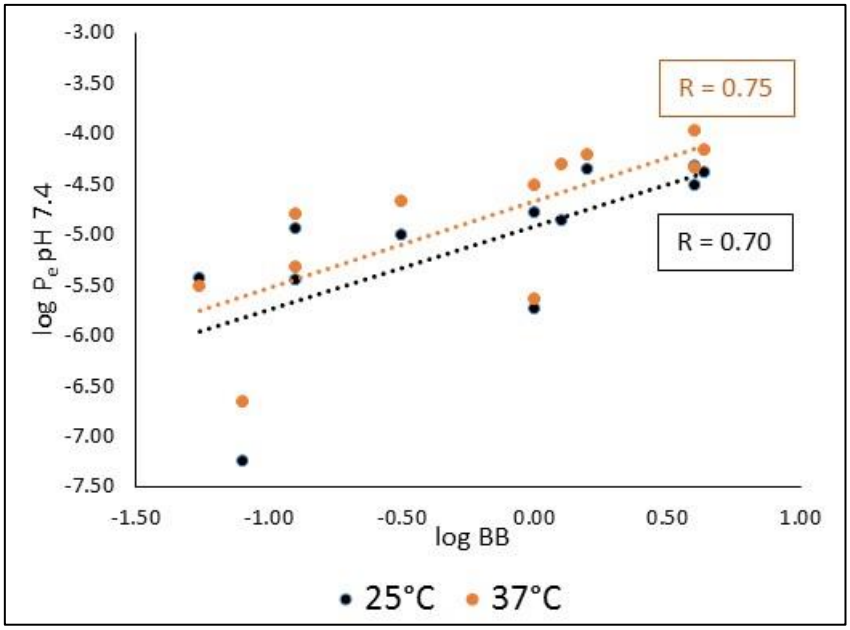
Az illesztett egyenesek meredeksége ('**a**' paraméter) azt a változást fejezi ki a mérhető permeábilitás értékekben, melyet 1°C hőmérsékletváltozás esetén tapasztalhatunk adott rendszerben a vizsgált vegyületre nézve. Ez azt jelenti, hogy ha a hőmérséklet 25°C-ról 37°C-ra változna, a $\log P_0$ növekménye 12**a** egység lenne. Az eredmények további értelmezéséhez szükséges megadni a $\log P_0$ értékek szórását: a szórás minden esetben 0,01-0,04 volt, az átlagos szórás 0,02. A legkisebb meredekséget, azaz a legkisebb hőmérsékleti hatást a GIT-PAMPA modellen savas és amfoter karakterű vegyületek

vizsgálata esetén tapasztaltuk (a = 0,004-0,007). E származékoknál ebben a rendszerben szignifikáns különbséget nem figyeltünk meg a permeábilitás értékekre nézve, ugyanis 5°C emelkedés hozzávetőlegesen annyi változást eredményez, ami a mérések átlagos szórásával egyenlő. Ezzel ellentétben a bázikus komponensek viselkedése jelentős hőmérsékleti hatást mutat (a = 0,020-0,024), ez mintegy ötszöröse az átlagos szórásnak 5°C emelkedést feltételezve. A legalacsonyabb hőmérsékleti hatást a BBB-PAMPA modell esetén tapasztaltunk, az 1°C-ra eső változás 0,010 és 0,018 között alakult. A kisebb változás ellenére a GIT-PAMPA rendszernél megfigyelt tendencia, miszerint a bázikus vegyületek permeábilitása érzékenyebb az inkubációs hőmérsékletre, itt is megfigyelhető.

Ha megvizsgáljuk a különböző membránszerkezetű modelleket, azt kapjuk, hogy az illesztett egyenesek átlagos meredeksége a GIT-PAMPA modellen 0,012 (0,004-0,024; Δ: 0,020), a BBB-PAMPA rendszeren 0,015 (0,010-0,018; Δ: 0,008), a Skin PAMPA esetén 0,031 (0,013-0,053; Δ: 0,040). Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vizsgált vegyületek permeábilitása a hőmérsékletváltozás hatására a Skin PAMPA esetén változik a legnagyobb mértékben, kétszer, illetve háromszor nagyobb változást mutat, mint a GIT- és BBB-PAMPA esetén. A GIT-PAMPA és BBB-PAMPA viselkedésében tapasztalt különbség eredhet az eltérő foszfolipid összetételből, ugyanis egy lipid keverék fázisátalakulási hőmérséklete rendszerint nagyobb, mint egy egykomponensű rendszeré. Ebben az esetben a membrán fluiditása magasabb hőmérsékleten változik meg jelentősen, így értelmezhető az inkubációs hőmérséklet változására mutatott kisebb mértékű permeábilitásváltozás.

Ha az egyes vegyületek egyedi viselkedését vizsgáljuk meg, a legnagyobb hőmérsékleti hatást a különböző modellek között a piroxikámnál tapasztaljuk. A molekula a BBB-PAMPA esetén két és félszer, míg a Skin PAMPA esetén hétszer nagyobb változást mutat 1°C változásra, mint a GIT-PAMPA modellen. Ezzel szemben nagyon kismértékű változást mutat a progeszteron permeábilitása (a = 0,014; 0,015; 0,013). Mivel ez a szteroid származék a legnagyobb molekula a csoportból, ezért feltételezhetően sokkal inkább a molekula méretéből ered ez a viselkedés, mint abból a tényből, hogy egy semleges molekuláról van szó, ugyanis az ugyancsak semleges karbamazepin háromszor nagyobb hőmérséklettől való függést mutatott Skin PAMPA esetén, mint a GIT-PAMPA modellen.

Az előzőekben ismertetett eredmények alapján az inkubációs hőmérséklet pontos ismeretének és szabályozásának jelentős szerepe van, és adott esetben fontos lehet a jobb *in vitro/in vivo* összehasonlítás érdekében a helyesen megválasztott hőmérsékleten kivitelezett mérés. Ennek a ténynek a bizonyítása céljából a BBB-PAMPA modellen végzett vizsgálatokat kiterjesztettük egy 16 vegyületből álló csoportra. Ezen vegyületek $\log P_e$ értékeit 25 és 37°C hőmérsékleten mértük pH 7,4 donor fázis alkalmazásával. A vizsgálat eredményeit az **5.1.2. fejezet 10. táblázata** (45. oldal) foglalja össze. A mért $\log P_e$ adatok, és az irodalmi forrásból nyert [36, 70] logBB adatok között korreláció analízist végeztünk. Ennek eredményét az **20. ábra** szemlélteti.



20. ábra A BBB-PAMPA rendszeren 25°C (sötét jelölő) és 37°C (világos jelölő) hőmérsékleten mért $\log P_e$ értékek az irodalmi forrásból nyert logBB adatok (37°C) függvényében

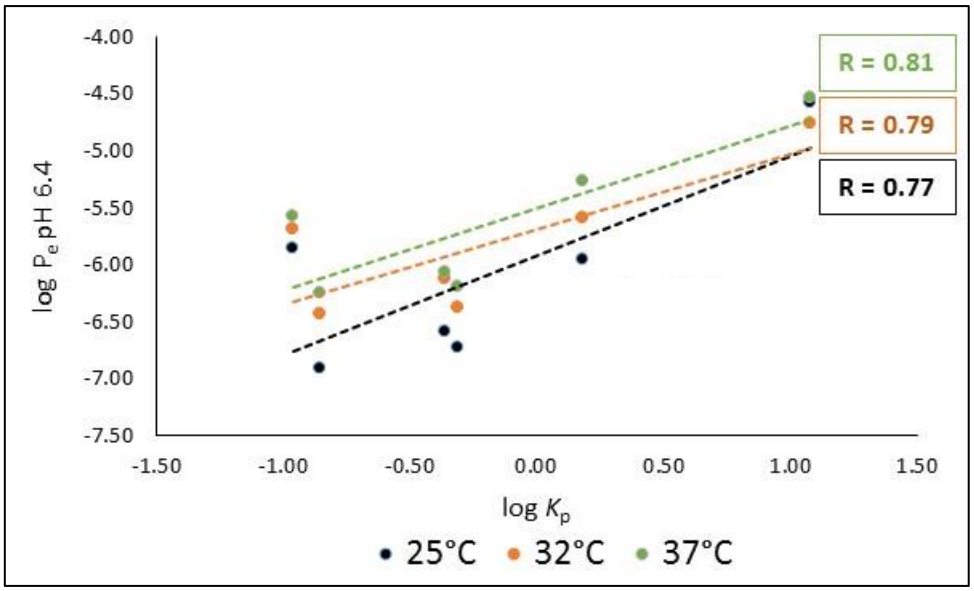
Az analízis során négy vegyületet (kodein, morfin, verapamil és zidovudin) nem vettünk figyelembe, mert azok P-gp szubsztrátok, így a BBB-PAMPA eredményei, mivel az aktív transzportot nem képes modellezni, nem összevethetők *in vivo* adatokkal [71-73]. A lineáris regresszió analízis eredményeit a **15-16. egyenlet** mutatja:

$$\textbf{25°C}: \log P_e = 0{,}831 \log BB - 4{,}91 \ (R=0{,}70) \qquad \textbf{(15.)}$$

$$\textbf{37°C}: \log P_e = 0{,}864 \log BB - 4{,}66 \ (R=0{,}75) \qquad \textbf{(16.)}$$

A vizsgálat valamelyest jobb korrelációt talált az ugyanazon a hőmérsékleten végrehajtott kísérletek között.

A Skin PAMPA esetén is megvizsgáltuk, hogy mely inkubációs hőmérsékleten kivitelezett PAMPA mérés eredményei korrelálnak jobban a 32°C-on mért Franz diffúziós cella adatokkal. Itt a vegyületek körét nem bővítettük, de az eddig használt öt inkubációs hőmérséklet mellett 32°C hőmérsékleten is mértük a vegyületek permeábilitását. A pH 6,4 donor fázis alkalmazásával kapott $\log P_e$ értékeket, és a Franz diffúziós cella adatokat [5] az **5.1.3. fejezet 12. táblázata** (47. oldal) foglalta össze. Az adatok között korreláció analízist végeztünk, melynek eredményét a **21. ábra** és a **17-19. egyenletek** mutatják.



21. ábra A Skin PAMPA modellen 25°C (sötét jelölő), 32°C (narancssárga jelölő) és 37°C (zöld jelölő) hőmérsékleten mért $\log P_e$ értékek a Franz diffúziós cella mérések $\log K_p$ adatainak (37°C) függvényében

$$\textbf{25°C}: \log P_e = 0{,}8789 \log K_p - 5{,}9185 \ (R=0{,}77) \qquad \textbf{(17.)}$$

$$\textbf{32°C}: \log P_e = 0{,}6592 \log K_p - 5{,}6876 \ (R=0{,}79) \qquad \textbf{(18.)}$$

$$\textbf{37°C}: \log P_e = 0{,}7212 \log K_p - 5{,}4974 \ (R=0{,}81) \qquad \textbf{(19.)}$$

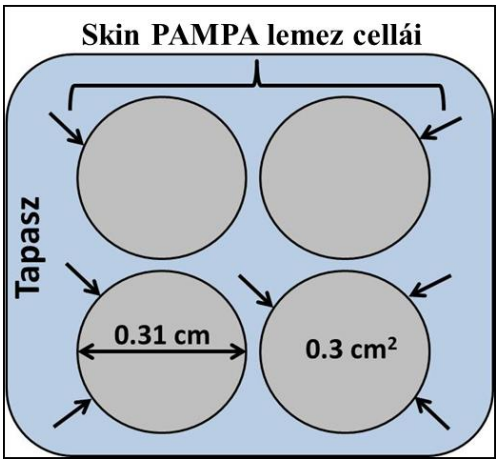
A vizsgálat szignifikáns különbséget a különböző hőmérsékleten végrehajtott Skin PAMPA kísérletek és a Franz diffúziós cella mérések között nem talált. Azonban a Skin PAMPA esetén is érdemes a vizsgálatokhoz a bőr autentikus hőmérsékletét, a 32°C inkubációs hőmérsékletet választani.

Az e témakörbe tartozó vizsgálataink kimutatták, hogy a hőmérsékletnek jelentős befolyásoló hatása van a PAMPA módszerrel mért permeábilitásra, azonban a különböző modelleken, eltérő vegyületekre más mértékben fejti ki hatását. A vizsgálat továbbá bizonyította, hogy a jobb *in vitro/in vivo* korreláció érdekében előnyös a vizsgálati módszerek inkubációs hőmérsékleteit a lehetőségekhez képest minél jobban megfeleltetni egymásnak.

6.2. Gyógyszeres tapaszok vizsgálata

A doktori munkám során végzett gyógyszeres tapaszvizsgálat nem csak a felszabaduló hatóanyag viselkedésének jellemzésére korlátozódik, hanem a készítményeket komplett transzdermális terápiás rendszerekként kívánja értékelni. Ezért az alapfelvetés szerint, a permeábilitás profilokat a gyártók által számított, és a csomagolásokon jelölt felszívódási kinetikához hasonlítottuk. Továbbá egy, a PAMPA (*in vitro*) méréseket megerősítő, bőrön keresztüli permeációt modellező eljárást, a Franz diffúziós cellát (*ex vivo*) is felhasználtuk a kísérletekhez.

Az **5.2. fejezetben** (47. oldal) bemutatott eredmények (**11-13. ábra**) alapján az látszik, hogy a készítmények mért permeábilitás profilja minden esetben magasabb hatóanyag-mennyiséget mutat adott időpontban, mint azt az elméleti felszívódási görbe indokolná. Az eltérés olykor kisebb mértékű (pl.: Fentanyl-ratiopharm®), de vannak jelentősebb különbséget mutató tapaszok (pl.: Exelon®). A jelenségért feltételezhetően az irodalomban jól ismert szél-hatás (*„edge-effect”*) a felelős [74, 75]. A **22. ábra** sematikusan szemlélteti ezt a hatást.



22. ábra A szél-hatás sematikus szemléltetése

A szél-hatás azt jelenti, hogy nem kizárólag a lemezek cellái által fedett tapasz felületről várható fluxus, hanem attól távolabbi, cellákkal nem érintkező részekről is. Ez a fellépő laterális diffúzió tulajdonképpen a teljes permeációs felületet növeli a méréseinknél, és normál esetben mintegy 10-30%-al növeli a permeált anyagmennyiséget. Ezt a folyamatot valószínűsíthetően befolyásolja a készítmények mátrixa, továbbá a hatóanyag

diffúziós tulajdonságai. Mivel adott közegben nem ismert a vizsgált vegyületek diffúziós koefficiense, ezért számszerű korrekciót végezni nem tudunk. A szél-hatás nem csak a PAMPA módszernél, hanem egyéb *in vitro* és *ex vivo* módszereknél is fellép. Ezt alátámasztják a vizsgálat során végrehajtott Franz diffúziós cella kísérletek is. A gyógyszeres tapaszok terápiás célú felhasználásánál ennek fontos szerepe várhatóan nincsen.

A PAMPA mérések esetén nagyobb szórás értékeket figyelhetünk meg. A különbségek a két eltérő módszer sajátosságaiból adódnak. A Skin PAMPA akceptor lemezére felhelyezett tapaszok – a készítmény méretétől függően – 6-80 darab individuális cellát fedhetnek le. A permeált mennyiséget az összes, teljes mértékben fedett cella adataiból számoltuk, így ebben az esetben a szórásunk valamelyest nagyobb lehet. Ez egyrészt adódhat abból, ha a tapaszok felületén nem homogén a hatóanyag eloszlása, másrészt abból, ha a permeációs folyamatot nagymértékben, és szabálytalanul érinti a fentebbiekben részletezett szél-hatás.

Az eredményeket két szempont szerint értékeljük ki. Egyrészt összehasonlítjuk a két módszer eredményeit, másrészt a vizsgált transzdermális terápiás rendszerekben mért fluxus alapján megkíséreljük azok osztályozását.

Az eltérő módszerekkel mért permeábilitás profilok összehasonlítása

Az Exelon® tapasz esetén a Skin PAMPA és a Franz diffúziós cella mérések eredményei nagymértékű egyezést mutatnak (**5.2.2. fejezet 12. ábra** (49. oldal)). Azonban a permeált anyag mennyisége jelentősen magasabb, mint a gyártó által deklarált kinetika szerint várható lenne. Ez meghaladja azt a növekményt, amit a szél-hatás magyarázna. Az eredmények tükrében valószínűsíthető, hogy egy vagy több penetrációfokozó segédanyagot tartalmaz ez a készítmény, és ezekre a felhasznált módszerek érzékenyebben reagáltak.

A nikotin tartalmú tapaszoknál a két eljárás közötti legjobb egyezést a Nicotinell® mutatta (**5.2.3. fejezet 13. ábra** (50. oldal)). Mindkét módszer a vizsgálat kezdeti szakaszában egy nagy, lökésszerű permeációt mutat, azonban mind a mesterséges membránon, mind a bőr preparátumon keresztüli átjutás kinetikája ezután szépen követi a deklarált értéket. A nagymértékű kezdeti kioldódást és permeációt feltételezhetően a tapasz adhezív rétegének nikotinra történő feldúsulása okozza. Ezt a jelenséget a Niquitin® és a Nicorette® esetén nem tapasztaltuk. E két készítmény viselkedésében

szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a két módszer eredményei között (**5.2.3. fejezet 13. ábra** (50. oldal)). Míg a Niquitin® permeábilitás profilja a deklarált kinetikához képest túlbecsült a Franz diffúziós cella által, addig a Nicorette® a Skin PAMPA mérés esetén mutat jóval magasabb permeált anyagmennyiséget. Elképzelhető a különböző összetételből adódóan, hogy a tapasz mátrixának bizonyos komponensei hol a mesterséges membránon, hol a humán bőr preparátumon fejtenek ki jelentősebb permeáció fokozó hatást. Az összetevők ismeretének hiányában erre részletesebb magyarázatot nem tudunk adni.

A transzdermális terápiás rendszerek vizsgálata után egy helyi hatású tapasz (Keplat®) viselkedését tanulmányoztuk (**5.2.4. fejezet 14. ábra** (51. oldal)). A vizsgálat tárgyát képző tapaszok közül ez rendelkezett a legnagyobb felülettel (70 cm^2), legalább kétszer, de az Exelon®-nál 14-szer nagyobb méretű a készítmény. A Skin PAMPA esetén ez a tapasz hozzávetőlegesen az akceptor lemez 80 celláját fedte le, így mintegy pontról pontra letapogatta a PAMPA módszer a tapasz adhezív rétegében lévő hatóanyag eloszlását. A magasabb szórás értékek ezen eljárás esetén nem homogén eloszlást sejtetnek.

A gyógyszeres tapaszok számított fluxusai szerinti osztályozás

A transzdermális terápiás rendszereknél tapasztalt fluxus széles skálán változik az extrém alacsony permeábilitású vegyületektől (pl. buprenorfin), a rendkívül jól permeálókig (pl.: nikotin) [52]. A gyógyszer megfelelő hatásának érdekében a hatóanyag koncentrációját a felhasználás alatt végig a terápiás ablakon belül kell tartani, ezért a gyógyszerbevitel ezen útjánál is különböző technológiai megoldásokat alkalmaznak, melyek a molekulák nagy variabilitást mutató fizikai-kémiai tulajdonságai miatt kihívások elé állítják a gyártókat. A gyógyszeres tapaszok vizsgálatára módosított PAMPA eljárás a fejlesztés korai szakaszában nyújthat támogatást, mivel a tapaszokat a hatóanyag fluxusa szerint kívánja osztályozni, ezáltal a hatóanyag leadó rendszer összetételének optimalizálásában nyújthat hasznos információt.

A vizsgált tapaszok fluxusát a permeábilitás profilok meredeksége adja meg, amit $\mu gcm^{-2}h^{-1}$ egységben fejeztünk ki mindkét módszer esetén. Az Exelon® tapasz 24 órás mérésének eredménye esetén a görbe első négy mintavételi pontjához tartozó adatokra illesztett egyenes meredekségével számoltunk. Továbbá megadtuk a gyártó által deklarált

felszívódási kinetikából eredő fluxust is (kivétel Keplat®). E paramétereket foglalja össze a **18. táblázat**.

18. táblázat Az *in vitro*, *ex vivo* és a gyártó által jelölt hatóanyag fluxus

Vizsgált tapasz	PAMPA (*in vitro*)		Franz cella (*ex vivo*)		Deklarált
	J [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]	SD*	J [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]	SD*	J [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]
Nicorette®	191,16	11,51	90,80	1,75	69,40
Niquitin®	43,20	2,35	134,60	7,85	38,90
Nicotinell®	42,20	5,57	45,30	5,29	29,20
Fentanyl Sandoz®	4,60	0,91	∅	∅	2,40
Fentanyl-ratiopharm®	4,90	0,28	∅	∅	3,30
Exelon®	135,20	7,82	142,30	15,68	38,30
Keplat®	5,50	0,02	16,20	0,94	∅

*: A szórásértékek az illesztett egyenesek szórásait jelölik.

A hatóanyagok termodinamikai tulajdonságai meghatározzák azok maximális fluxusát, melyet az emberi bőrön keresztül potenciálisan el tudnának érni. E maximális fluxusokat (J_{max}) szintén $\mu gcm^{-2}h^{-1}$ egységben a **19. táblázat** mutatja [52]. A készítmények csomagolásán jelzett *in vivo* felszívódási ráta ($J_{in\ vivo}$), és a J_{max} hányadosa ($J_{in\ vivo}/J_{max}$) a transzdermális tapaszok tulajdonságaira nézve fontos információkat hordoz. A $J_{in\ vivo}/J_{max}$ hányadosok értékei a **19. táblázatban** vannak megadva.

19. táblázat A hatóanyagok J_{max}, és a készítmények $J_{in\ vivo}$ értékei

Hatóanyag	$J_{in\ vivo}$* [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]	J_{max} [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]**	$J_{in\ vivo}/J_{max}$	J_{PAMPA}/J_{max}
nikotin	45,83	1425,0	0,03	0,06
fentanil	2,85	2,6	1,10	1,83
rivasztigmin	38,30	9,5	4,03	14,23

*: A $J_{in\ vivo}$ értékek adott hatóanyag vizsgált készítményeinek deklarált átlagos fluxusából erednek (pl.: Fentanyl Sandoz®: 2,40; Fentanyl-ratiopharm®: 3,30; $J_{in\ vivo}$ = 2,85). A J_{PAMPA} számolása egyező logika alapján történt.

**: irodalmi forrásból származó adatok [52].

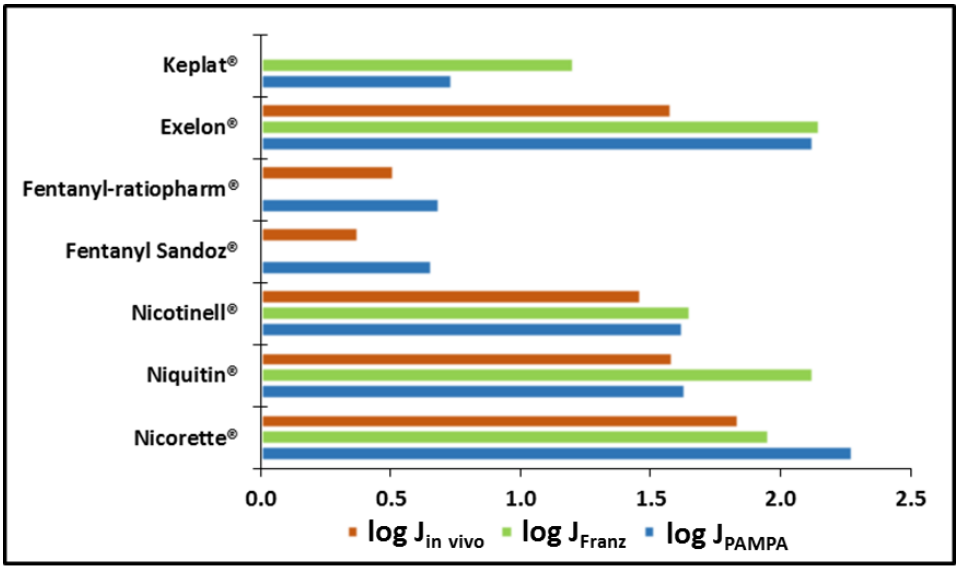
A vizsgálat során felhasznált gyógyszeres tapaszokat $J_{in\ vivo}/J_{max}$ hányadosuk szerint három csoportba oszthatjuk. Ha a transzdermális terápiás rendszerek hatóanyag-leadása olyan, hogy a hatóanyag potenciálisan maximális fluxusát eléri a permeáció során, akkor az említett hányados ~1. A fentanil tartalmú tapaszok tulajdonságaik alapján ebbe az *első*

osztályba tehetők. A *második csoportra* az jellemző, hogy a J_{max} alacsonyabb, mint a készítmény $J_{in\ vivo}$ fluxusa. Ez akkor lehetséges, ha valamilyen penetrációfokozó segédanyag jelenlétét feltételezzük adott készítményben. A rivasztigmin tapaszra jellemző ez a viselkedés. A *harmadik csoportot* az olyan vegyületeket hordozó készítmények jelentik, ahol a J_{max} szignifikánsan magasabb, mint a gyógyszer $J_{in\ vivo}$ értéke. Ez akkor van így, ha a molekula bőrön keresztüli permeációja alapvetően nagymértékű, de farmakológiai hatását tekintve szűk terápiás ablakkal rendelkezik. Ilyenkor a tapasz mátrix vagy membrán szerkezete visszafogja a hatóanyag gyors, nagy mennyiségű bőrbe történő penetrációját. Ezt a csoportot képviselik a nikotin tartalmú készítmények [52].

A gyógyszeres tapaszok vizsgálatára alkalmas Skin PAMPA módszer esetén azt találtuk, hogy a mérések eredményeiből kapott J_{PAMPA} és J_{max} hányadosa (J_{PAMPA}/J_{max}) a fentebbi kategóriákat el tudja különíteni. Az *első csoportba* ($J_{in\ vivo}/J_{max}$: ~1) tartozó fentanil tapaszok esetén a J_{PAMPA}/J_{max} hányados 1,83, ami jó egyezést mutat a $J_{in\ vivo}/J_{max}$ értékkel (1,10). A *második osztályba* ($J_{in\ vivo}/J_{max} >> 1$) tartozó Exelon® PAMPA vizsgálataiból számolt J_{PAMPA}/J_{max} 14,23, mely a várható értéknél valamelyest nagyobb. A rivasztigmin kevésbé előnyös bőrön keresztüli permeációja miatt – a fentebbiek alapján – penetrációfokozó segédanyag jelenlétét feltételezzük a készítményben. A permeábilitás vizsgálat alapját képző mesterséges membrán összetétele elképzelhetően erre a segédanyagra érzékenyebb, ezért kissé magasabb a becsült permeáció, mint azt az elméleti kinetika alapján várnánk. Ettől függetlenül a módszerünk ezt a tapaszt is a várt, második osztályba sorolta. A dohányzásról való leszokást segítő, nikotin tartalmú készítmények esetén nincs szükség akkora hatóanyag-koncentrációra, mint amennyit a nikotin termodinamikai tulajdonságaiból eredő magas permeábilitás lehetővé tenne. Ezért e tapaszok a *harmadik csoportba* ($J_{in\ vivo}/J_{max} << 1$) tartoznak. Jó egyezést találtunk a J_{PAMPA}/J_{max} (0,06) és $J_{in\ vivo}/J_{max}$ (0,03) értékek között. Ez azt jelenti, hogy egy jól permeáló hatóanyagot tartalmazó tapasz viselkedéséről is hasznos információk állapíthatók meg a módosított Skin PAMPA módszerrel.

A mért fluxus értékek (J_{PAMPA} és J_{Franz}) és a számolt *in vivo* fluxus ($J_{in\ vivo}$) alapján bizonyítottuk, hogy a Skin PAMPA alkalmas a tapaszok fentebbiekben bemutatott csoportosítására. Ennek grafikus áttekintését a **23. ábra** mutatja. A logaritmikus skála mentén feltüntetett fluxus értékek szerint a PAMPA eredmények jó egyezést mutatnak a

gyártók által deklarált felszívódási kinetikával, és az eredményeket a Franz diffúziós cella mérések is alátámasztják.



23. ábra A J_{PAMPA}, J_{Franz} és $J_{in\ vivo}$ logaritmikus ábrázolása a vizsgált tapaszok szerint

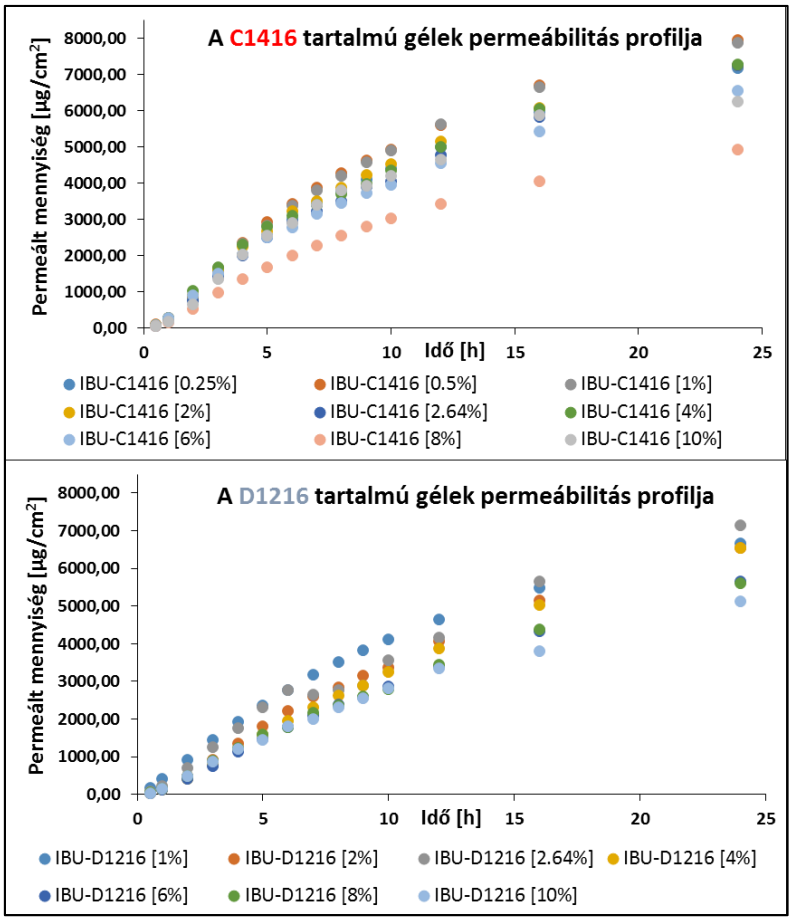
A vizsgálataink alapján elmondható, hogy mindkét felhasznált módszer hasznos eszköze a transzdermális terápiás rendszerek fejlesztésének korai szakaszában. Azonban a lemez alapú, mesterséges membránt tartalmazó Skin PAMPA módszer kisebb költségű, és egyszerűbb kivitelezni, mint a humán bőr preparátumot használó vertikális Franz diffúziós cellás eljárást.

6.3. Ibuprofén tartalmú gélek vizsgálata

A szacharóz észterek nem-ionos felületaktív anyagok, melyek cukor komponenssel, mint poláris fejcsoporttal rendelkeznek, és hosszabb láncú zsírsavakat tartalmaznak, mint apoláris régiót. A cukor résznek nyolc szabad hidroxil csoportja van, így 1-8 molekula zsírsavval tudnak észtereket képezni (mono- és oktaészterek). Az észteresítő ágens több zsírsav is lehet, gyakran használnak palmitinsavat, mirisztinsavat, oleinsavat és laurinsavat. Ezeket különböző arányban tartalmazva, a molekulák hidrofil-lipofil egyensúlya (*hydrophil-lipophil balance*, HLB érték) széles skálán változik, 1 és 16 közé tehető. Attól függően, hogy melyik zsírsavval képez a cukor komponens észtert, eltérő szénatomszám fogja jellemezni. A szénatomszám, illetve a HLB érték a szacharóz észterek megnevezésében általában fel van tüntetve. Az általunk tanulmányozott két segédanyag, a szacharóz-laurát D-1216 és a szacharóz-mirisztát C-1416. A szacharóz-laurát esetén a szénatomszám 12, a HLB érték 16 (D-1216), míg a szacharóz-mirisztát esetén a szénatomszám 14, a HLB érték 16 (C-1416). Ez a gélek, általunk használt laboratóriumi jelölésében is megjelenik (**4.3.1. fejezet 4. táblázat** (39. oldal)). A szacharóz észterek felhasználása sokrétű mind a gyógyszeripar, mind a kozmetikai ipar részéről, de az élelmiszeripar is előszeretettel használja. Előbbi két iparág szolubizáló és perkután permeációt fokozó hatását használja ki [76-78]. Különösen hatékony permeáció fokozó hatást fejtenek ki, ha kombinációban használják a dietilén-glikol-monoetil-éterrel (transzkutol), mely egy erős szolubizáló ágens [79].

Vizsgálataink során e segédanyagok gél gyógyszerformában kifejtett hatását tanulmányoztuk, egyúttal a Skin PAMPA használatának létjogosultságát kívántuk bizonyítani azon a területen, hogy alkalmas-e félszilárd készítmények gyors elővizsgálatára az összetétel optimalizálása céljából.

A **24. ábra** mutatja a gélek viselkedését külön a C1416 és a D1216 esetén. Az összes készítmény azonos mennyiségű ibuprofént tartalmazott, de eltérő volt a segédanyagok koncentrációjára nézve.



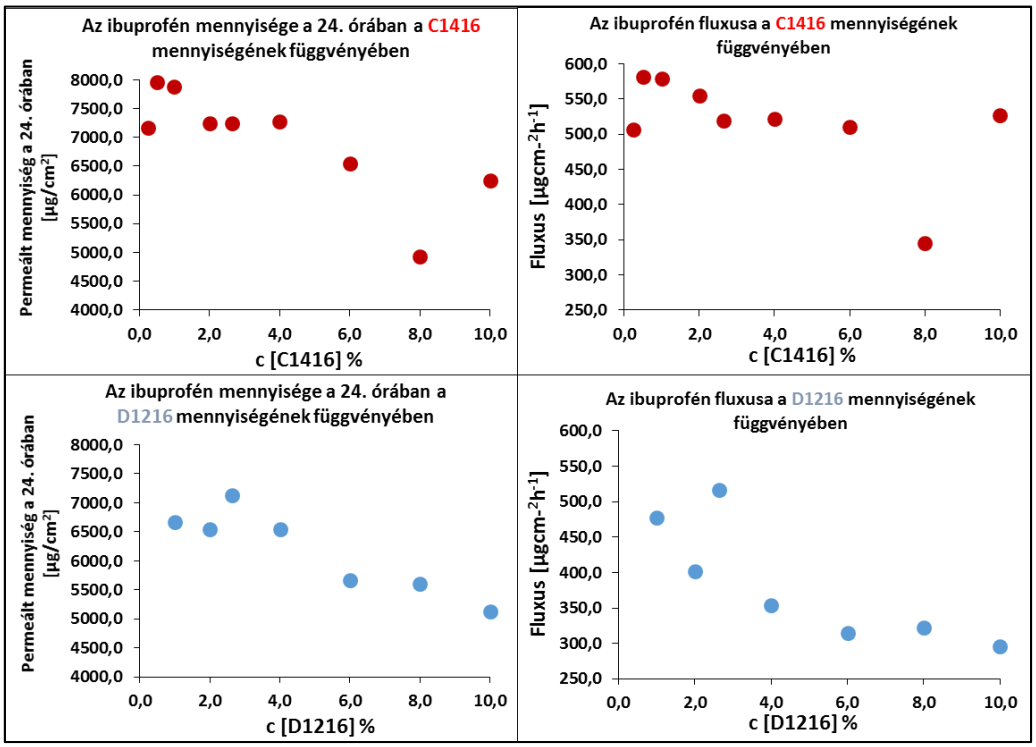
24. ábra A gélek permeábilitás profilja a segédanyag minősége és mennyisége szerint. A C1416 gélek permeábilitás profiljai az ábra felső részén, míg a D1216 viselkedése az alsó ábrán látható. A különböző színű jelölők az eltérő segédanyag koncentrációt jelölik

A **24. ábra** alapján látható, hogy attól függően, hogy adott segédanyag koncentrációja milyen mértékű volt, eltérő mennyiségű ibuprofént detektáltunk a Skin PAMPA fogadó oldalán az inkubáció alatt. Ez arra bizonyíték, hogy a PAMPA bőrmimetikus mesterséges membránja képes differenciálni a vizsgált géleket annak ellenére is, hogy a kiindulási hatóanyag koncentráció minden esetben azonos volt. Az eredmények pontosabb értelmezése és jobb átláthatósága céljából megadtuk az ibuprofén fluxusát az összes tanulmányozott készítményre. Ezeket $\mu gcm^{-2}h^{-1}$ egységben fejeztük ki, és a **20. táblázatban** foglaltuk össze.

20. táblázat Az ibuprofén fluxusa a különböző összetételű gélekben

Készítmény	Fluxus [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]	Készítmény	Fluxus [$\mu gcm^{-2}h^{-1}$]
D1216 [1%]	478,00	**C1416 [0,25%]**	507,03
D1216 [2%]	401,70	**C1416 [0,5%]**	581,57
D1216 [4%]	353,63	**C1416 [1%]**	578,81
D1216 [6%]	314,76	**C1416 [2%]**	555,23
D1216 [8%]	322,10	**C1416 [4%]**	522,11
D1216 [10%]	295,62	**C1416 [6%]**	510,91
D1216 [2,64%]	517,06	**C1416 [8%]**	344,64
D1216-TR [2,64%]	461,69	**C1416 [10%]**	527,06
Kontrol	380,59	**C1416 [2,64%]**	518,92
Kontrol TR	329,95	**C1416-TR [2,64%]**	563,10

A 24. órában mért ibuprofén mennyiséget, és a gélek fluxusát mutatja a **25. ábra** a felhasznált segédanyag koncentráció függvényében.

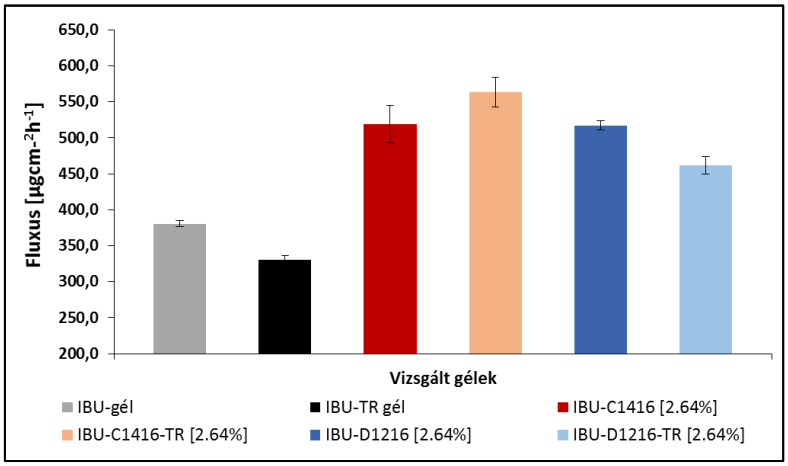


25. ábra Az ibuprofén 24 órás mennyisége és fluxusa a segédanyag koncentráció függvényében

A **20. táblázat** és a **25. ábra** alapján látszik, hogy a permeáció fokozó segédanyag minősége és mennyisége szoros kapcsolatban van az ibuprofén várható fluxusával. Szignifikáns különbség figyelhető meg a szacharóz-mirisztát (C1416) és szacharóz-laurát

(D1216) viselkedése között. Előbbi közel 20%-al nagyobb hatást fejtett ki az ibuprofén perkután permeációjára nézve, mint a D1216, így a Skin PAMPA vizsgálatok alapján előnyösebb permeáció fokozó segédanyag készítményfejlesztés során. Érdekes megvizsgálni, hogy milyen összefüggésben van a segédanyag mennyisége a fluxus értékekkel. Vizsgálataink során azt kaptuk, hogy a szacharóz észtereknek van egy optimális koncentrációja, amikor a legjelentősebb a hatásuk a bőrön keresztüli permeábilitás fokozására. Ez az ideális koncentráció tartomány 2-4% közé tehető. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a felületaktív és szolubilizáló anyagok oldhatóság növekedése nem egyértelműen eredményezi a hatóanyag permeábilitásának növekedését.

A technológiai szempontból kitüntetett 2,64%-os segédanyag koncentrációjú gélek készítésekor kétféle módon jártunk el. Egyik esetben csak az adott szacharóz észter származékot tartalmazta, míg a másik esetben a receptúra transzkutol használatát is előírta. E gélek előállításával és vizsgálatával lehetőség nyílt rá, hogy tanulmányozzuk a C1416 és D1216 transzkutollal kifejtett szinergizmusát. Az összehasonlítás érdekében formuláltunk kontrol géleket transzkutollal és anélkül is. E készítmények fluxusát a **26. ábra** oszlopdiagramja szemlélteti.



26. ábra A transzkutol és a szacharóz észter származékok együttes hatása kontrol készítményekkel szemben

A kontrol készítményeket egymással összehasonlítva az látszik, hogy a transzkutolt tartalmazó gél esetén kisebb ibuprofén fluxust mértünk, mint a transzkutolt nem tartalmazó gélnél (szürke és fekete oszlop). A C1416 és a D1216 minden eseténél magasabb fluxust tapasztaltunk a kontrol mintákhoz képest. A transzkutol a C1416

együttes felhasználásával fejtette ki a nagyobb hatást (piros és narancssárga oszlop). Ebben az esetben a szacharóz észter és a transzkutol együttes alkalmazása előnyösnek tűnik. A D1216 felhasználásánál ugyanezt nem tapasztaltuk, itt valamelyest jobbnak bizonyult a csak szacharóz-laurátot tartalmazó készítmény (kék és világoskék oszlop). Az eredményeket a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetének munkatársai által végzett Franz diffúziós cella vizsgálatok alátámasztják, a két módszer között jó korrelációt találtunk [**11.1 fejezet** – Az értekezés alapját képező közlemények – 4) közlemény].

Összefoglalásként elmondható, hogy mindkét választott cukor észter származék növelte az ibuprofén permeábilitását, de eltérő mértékben. A C1416 előnyösebb tulajdonságúnak bizonyult, főként transzkutollal együtt eredményesen használható mind gyógyszeripari, mind kozmetikai oldalról nézve.

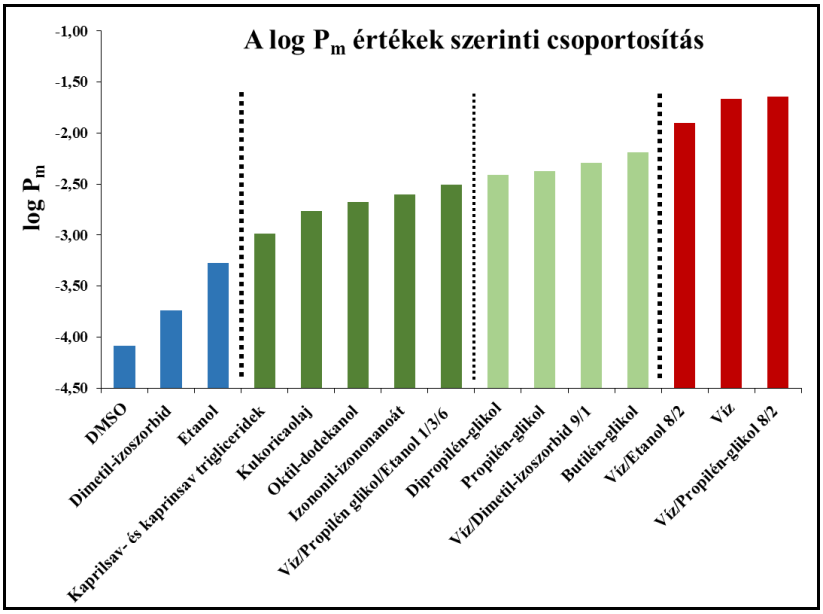
A Skin PAMPA a vizsgálatok alapján alkalmasnak bizonyult félszilárd készítmények szisztematikus tanulmányozására is. A módosított alsó lemezzel egy sokkal inkább bioreleváns kísérleti elrendezést érhetünk el a kisebb donor mennyiség miatt, mint a hagyományos PAMPA eljárásnál. A bőrmimetikus mesterséges membrán differenciálta az eltérő összetételű készítményeket, így a termékfejlesztés korai szakaszában jó alternatívát jelenthet a megfelelő segédanyagok minőségi és mennyiségi optimalizálása céljából.

6.4. Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeábilitásra

A vizsgálatokhoz választott modellvegyület, a feniletil-rezorcin bőr- és hajvilágosító hatását *Schmaus* és munkatársai 2006-ban írták le először, mely a tirozináz enzim működésének gátlásán alapul. Ez az enzim kulcsfontosságú szerepet játszik a melanin képződésében [80]. Nemzetközi kutatási együttműködés keretében, a **4.4.1. fejezet 6. táblázata** (41. oldal) által jelölt 23 eltérő tulajdonságú oldószer transzdermális permeábilitást befolyásoló hatását vizsgáltuk. Az oldószerek tulajdonságainak nagy variabilitása miatt már a modellvegyület oldhatóságában is jelentős különbségeket tapasztaltunk. A kísérleti eredmények alapján lehetőség van rá, hogy megvizsgáljuk az oldhatóság és a permeábilitás kapcsolatát, melyek külön-külön széles irodalmi háttérrel rendelkeznek, azonban szisztematikus, együttes tanulmányozásuk már annál ritkább. A kettő kapcsolatának vizsgálata annak ellenére is szegényesebb irodalommal rendelkezik, hogy a két fizikai-kémiai paraméter alkotja az értekezés **2.1.1.3. fejezetében** (9. oldal) bemutatott BCS rendszer alapját. *Dahan* és munkatársai 2012-ben publikáltak egy tanulmányt, melyben növekvő propilén-glikol és PEG-400 koncentráció mellett vizsgálták az oldhatóság és a permeábilitás változását. Azt találták, hogy az oldhatóság növekedését okozó segédanyagok használata esetén – a jobb oldhatóság ellenére – nem feltétlenül változott a permeábilitás is jó irányban [81]. Ez azt bizonyítja, hogy az optimális abszorpció érdekében célszerű a fentebbi két fizikai-kémiai paraméter megfelelő egyensúlyát kialakítani adott készítményben. Így érthető, hogy miért szükséges a termékfejlesztés korai szakaszában az oldhatóság mellett a permeábilitás pontos jellemzése is.

A membránintegritás vizsgálatok alapján (**5.4.2. fejezet** (55. oldal)) a Skin PAMPA membránja lehetőséget teremt rá, hogy a különböző típusú oldószerekkel készült oldatokat vizsgáljuk. Ennek alapján választ kerestünk arra, hogy a tapaszok és félszilárd gyógyszerformák mellett a módszer alkalmas-e oldatfázisú minták összetételének optimalizálására is.

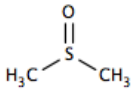
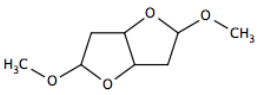
A mért $\log P_m$ értékek az oldószereket három nagy csoportra osztják, azonban a középső kategóriát még további két alcsoportra bontottuk. A **27. ábra** azonos színű oszlopai egy-egy permeábilitási kategóriát jelölnek.



27. ábra A $\log P_m$ alapján történt kategorizálás. Az azonos színek azonos kategóriát jelölnek

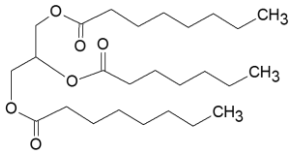
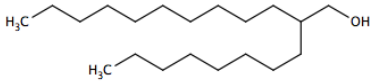
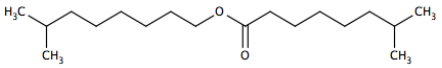
Az alacsony permeábilitást ($\log P_m$ = (-4) – (-3)) biztosító oldószerekhez kis molekulaméretű, poláris karakterű szerves oldószerek tartoznak (DMSO, dimetil-izoszorbid, etanol). Ezen oldószerek kémiai szerkezetét a **21. táblázat** foglalja össze.

21. táblázat Az alacsony permeábilitást biztosító oldószerek csoportja

Oldószer	Szerkezeti képlet
DMSO	
Dimetil-izoszorbid	
Etanol	

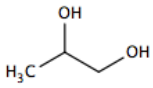
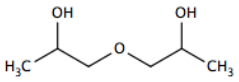
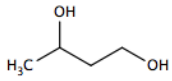
A közepes permeábilitást biztosító kategóriát ($\log P_m$ = (-3) – (-2)) az ide tartozó oldószerek kémiai szerkezete alapján további két csoportra osztottuk. Az első csoportba hosszabb szénláncú zsírsavak észtereit (izononil-izononanoát, kaprilsav- és kaprinsav trigliceridek), a kukoricaolajat, egy oldószerelegyet, mely vizet, propilén-glikolt és etanolt tartalmazott, valamint egy hosszú szénláncú alkoholt (oktil-dodekanol) soroltunk. Ezek egyértelműen jellemezhető kémiai szerkezettel rendelkező képviselőit a **22. táblázat** mutatja.

22. táblázat A közepes permeábilitást biztosító oldószerek első csoportjának néhány képviselője

Oldószer	Szerkezeti képlet
Kaprilsav- és kaprinsav trigliceridjei	
Oktil-dodekanol	
Izononil-izononanoát	

A második csoportba ’glikol’ típusú oldószerek (propilén-glikol, butilén-glikol, dipropilén-glikol) és egy oldószerelegy tartozott, mely vizet és dimetil-izoszorbidot tartalmazott (**23. táblázat**).

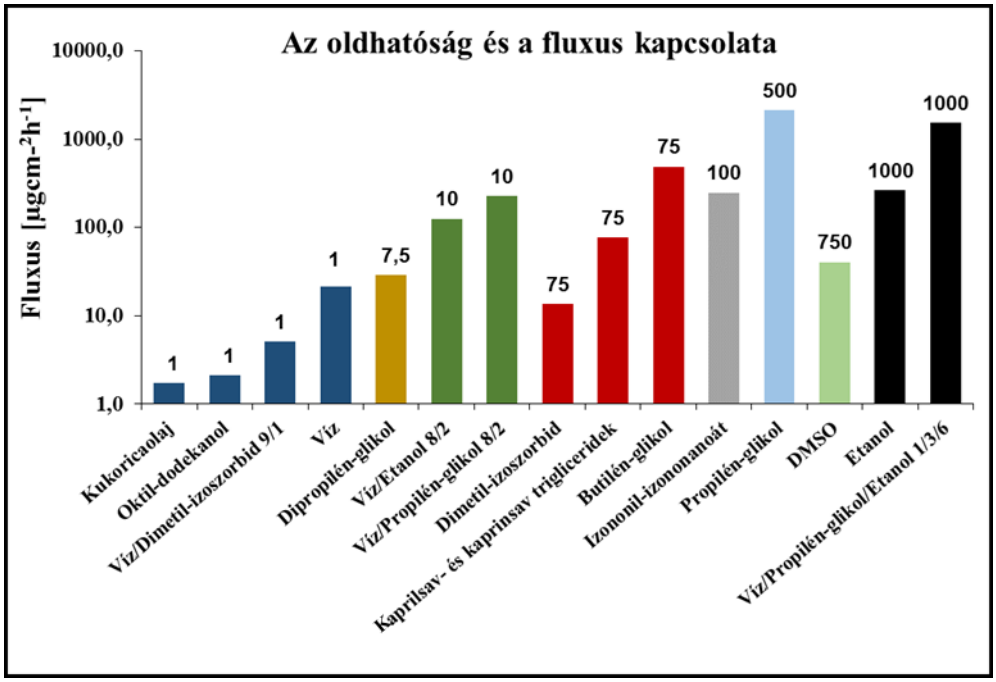
23. táblázat A közepes permeábilitást biztosító oldószerek második csoportjának néhány képviselője

Oldószer	Szerkezeti képlet
Propilén-glikol	
Dipropilén-glikol	
Butilén-glikol	

A legmagasabb membrán permeábilitást ($\log P_m > -2$) a harmadik kategóriában tapasztaltuk, mely képviselői a víz, és két vizet tartalmazó oldószerelegy (víz/etanol, víz/propilén-glikol) volt. Az eredmények összhangban vannak azzal a technológiai ténnyel, hogy lokális hatás eléréséhez célszerű valamilyen hosszabb szénlánccal rendelkező vivőanyaggal készítményt fejleszteni (izododekán és izopropil-mirisztát esetén nem, vagy csak nagyon kis mennyiségű hatóanyagot detektáltunk az akceptor fázisban), míg szisztémás hatás eléréséhez előnyös egy hidrogél használata, melyben a különböző ’glikol’ származékok növelik a hatóanyag bőrön keresztüli permeábilitását.

Az oldhatóság és a fluxus közötti kapcsolatot szemlélteti a **28. ábra** oszlopdiagramja. A jobb áttekinthetőség érdekében az ábrán az azonos oldhatósági

kategóriák képviselői egy csoportba vannak rendezve, és azonos színnel lettek feltüntetve.

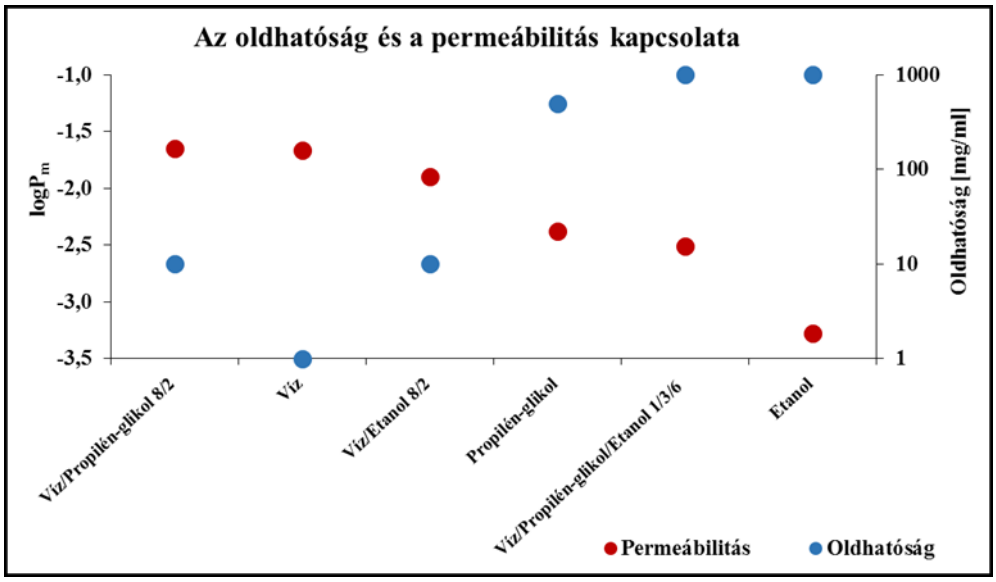


28. ábra Az oldhatóság és a fluxus kapcsolata. Az azonos színű oszlopok az azonos oldhatósági kategóriákat jelölik. Az oldhatóság értékét az oszlopok felett lévő számok mutatják mg/ml egységben

A **28. ábra** alapján elmondható, hogy az azonos oldhatóság közel sem jelent hasonló fluxust a modellvegyületünk esetén. Tekintsük példaként a piros oszloppal jelölt, 75 mg/ml oldhatóságot biztosító 3 oldószert. A dimetil-izoszorbid permeábilitása alapján az első, legalacsonyabb permeábilitási kategóriába sorolható. A kaprilsav- és kaprinsav trigliceridje és a butilén-glikol a közepes permeábilitási osztályba tartozik, azonban utóbbinak, mint a 'glikol' származékoknál tapasztaltuk, valamelyest nagyobb a permeábilitása. Az említett három oldószernél számolt fluxus közel 3 nagyságrendet ölel fel.

Fent tárgyalt eredményeink alapján láthatjuk, hogy az oldószerek igen eltérő permeábilitást biztosítanak a vegyület számára. Mivel az akceptor irányú fluxus a permeábilitás és a donor oldali koncentráció szorzataként adódik (**3. egyenlet**), megérthetjük, hogy a donor oldalon a különböző oldószerek általi nagyobb oldhatóság miért nem jelent arányos növekedést a fluxusban is. Bebizonyítottuk, hogy egy terápiás szempontból optimális fluxus eléréséhez, permeábilitás szempontjából megfelelő

segédanyag rendszer mellett kisebb kiindulási koncentráció is elegendő. Erre jó példaként szolgált a víz/propilén-glikol oldószerelegy, melynél nem tapasztaltunk kiugróan nagy oldhatóságot, de ezzel szemben a feniletil-rezorcin fluxusa magasnak bizonyult. Ennél az elegynél a víz jó permeábilitást biztosított, a propilén-glikol viszont növelte a vegyület oldhatóságát. A **29. ábra** hat oldószert, illetve oldószerelegyet ragad ki a vizsgált anyagok köréből. A fentebbiekben részletezett víz/propilén-glikol előnyös tulajdonságaival szemben az etanol, annak ellenére, hogy rendkívül magas oldhatóságot biztosított a modellvegyületnek, alacsony membrán permeábilitást tapasztaltunk. A **29. ábrán** kirajzolódó tendencia alátámasztja azt a tényt, hogy a termékfejlesztés során mind az oldhatóságot, mind a permeábilitást szükséges vizsgálni. Munkánk alapján feltételezhető, hogy egy ideális hatóanyag-oldószer rendszer esetén, az oldhatóság és a permeábilitás értéke az ábrán látható kék és piros szaggatott vonal metszéspontja körül helyezkedik.



29. ábra Az oldhatóság és a permeábilitás kapcsolata

Összefoglalva e munkát, elmondhatjuk, hogy a Skin PAMPA rendszer alkalmas különböző tulajdonságú oldószerek vizsgálatára, képes differenciálni őket az alapján, hogy melyik rendelkezik előnyös tulajdonsággal a benne oldott vegyület permeábilitására nézve. A készítményfejlesztés korai szakaszában – a molekulák oldhatóságának pontos meghatározása mellett – a Skin PAMPA hasznos eszköznek bizonyult az összetétel optimalizálásának támogatására.

7. Következtetések

Az értekezés gyógyszermolekulák permeábilitásának PAMPA módszerrel történő vizsgálatát részletezi. A permeábilitás fontos alappillére a vegyületek fizikai-kémiai jellemzésének, ugyanis jó prediktora a különböző szövetekben zajló abszorpciós folyamatoknak.

A PAMPA méréseket befolyásoló tényezőket az inkubációs hőmérsékleten kívül széleskörűen tárgyalták korábban az irodalomban. Munkánk során vizsgáltuk a hőmérséklet szerepét a három fentebb említett modellen. A választott vegyületkör képviselői között egyaránt voltak eltérő sav-bázis tulajdonsággal rendelkező és különböző molekulaméretű származékok. A kísérleti modellek és a vegyületek megválasztása lehetővé tette mind a különböző PAMPA modellek, mind a molekulák sajátosságaiból eredő, eltérő hőmérsékleten mutatott viselkedésük tanulmányozását. Minden esetben lineáris összefüggést figyeltünk meg az intrinsic permeábilitás és az inkubációs hőmérséklet között, azonban a változás más-más mértékű volt a különböző rendszerekben. Ennek számszerű jellemzésére a lineáris regresszió analízis meredekségét ('a' paraméter) használtuk, mely megmutatta adott molekula permeábilitás növekményét 1°C hőmérsékletváltozás hatására. A legérzékenyebb modellnek a Skin PAMPA bizonyult, itt tapasztaltuk a legnagyobb mértékű hőmérsékleti hatást, ezzel ellentétben a BBB-PAMPA modellen mért permeábilitás értékeket kevésbé befolyásolta a hőmérséklet. A vegyületek eltérő módon viselkedtek a három rendszerben. A legkisebb változást a semleges, nagy molekulájú progeszteron mutatta, ha összehasonlítottuk a $\log P_0$ értékét mindhárom modellen. A legnagyobb eltérést az amfoter tulajdonságú, kisebb molekula, a piroxikám mutatta. A vizsgálatok kibővítésével tanulmányoztuk, mely hőmérsékleten kivitelezett PAMPA mérések korrelálnak jobban más in vitro/in vivo mérésekkel. Ezek alapján azt találtuk, hogy minden esetben, de különösen a BBB-PAMPA esetén célszerű a humán-releváns inkubációs hőmérséklet használata. A munka e része bizonyította, hogy a PAMPA módszer érzékeny a hőmérsékletre, így annak pontos szabályozása a kísérleteknél nélkülözhetetlen. Továbbá az egyes kutatócsoportok által publikált munkák során, a módszertani leírásnál célszerű pontosan feltüntetni, hogy milyen hőmérsékleten végezték a kísérleteiket.

Az értekezés további része gyógyszerformák vizsgálatát írja le Skin PAMPA modell segítségével. A bőrmimetikus PAMPA modell iránti igény generálta ezt a

területet, ugyanis a gyógyszeripar és a kozmetikai ipar számára hasznosak az olyan eljárások, melyek a készítmények fejlesztésekor gyorsan és pontosan tudják jelezni a várható felszívódást, ezáltal releváns adatokat biztosítanak adott összetétel viselkedéséről.

A Skin PAMPA modellt továbbfejlesztettük, hogy alkalmas legyen transzdermális gyógyszeres tapaszok vizsgálatára. Itt úgy jártunk el, hogy az alsó lemezt egy tartó blokkal helyettesítettük, és ebbe helyeztük bele a tapaszok rögzítése után a felső lemezt. Megadtuk a tapaszok hatóanyagának fluxus értékeit, melyek segítségével egy olyan értékelési rendszert írtunk le, mely a készítmények kategorizálására alkalmas. Ez felhasználja a molekulák potenciális maximális fluxusát, és a gyártók által jelölt felszívódási kinetikából számolt fluxust. A vizsgált transzdermális tapaszokat három különálló osztályba soroltuk. A megfelelő segédanyag-összetételű mátrix fejlesztésekor az általunk kidolgozott értékelési rendszer hasznos támogatást nyújthat. A ketoprofén tartalmú tapasz vizsgálata bizonyította, hogy a Skin PAMPA eljárás helyi hatású tapaszok vizsgálatára is alkalmas. Fontos megjegyeznünk azt a tényt, hogy a módszerünk a készítmények előszűrésére alkalmas, azonban arra idő- és költségigénye miatt feltétlenül előnyösebb használni a fejlesztés korai szakaszában, mint más drágább, és lassabb módszereket.

A félszilárd gyógyszerformák széleskörűen használt dermális, illetve transzdermális készítmények. A hatóanyag bőrön keresztüli felszívódásának fokozására penetrációfokozó segédanyagok használata kínál jó lehetőséget. Ilyen ismert anyagok a szacharóz különböző zsírsavakkal alkotott észterei, melyek egyben szolubilizáló ágensek is, illetve a transzkutol nevű vegyület. Munkánk során szacharóz-laurát és szacharóz-mirisztát hatását vizsgáltuk az ibuprofén modellvegyület transzdermális permeábilitására, továbbá tanulmányoztuk a két segédanyag és a transzkutol szinergista hatását. Azt találtuk, hogy a segédanyagok mennyiségének növelése nem okozta a permeábilitás lineáris növekedését. Egy optimális segédanyag koncentrációt tudtunk kijelölni, ami előnyösen befolyásolta az ibuprofén permeációját. Az irodalomban publikált adatok alapján, a transzkutol cukor észterekkel történő együttes használata eredményesen növeli a molekulák permeábilitását. Vizsgálataink során a szacharóz-mirisztát és transzkutol kombinációja esetén találtuk azt, hogy a kettő erősíti egymás penetrációfokozó hatását, ugyanezt a szacharóz-laurát és transzkutol kombinációjánál nem tapasztaltuk. A

tanulmány alapján elmondhatjuk, hogy a Skin PAMPA félszilárd készítmények értékelésére is megfelelőnek bizonyult.

Munkánk negyedik fázisában készítményfejlesztéshez használt 23 különböző tulajdonságú oldószer transzdermális permeábilitást befolyásoló szerepét vizsgáltuk. Ezen oldószerek között több, döntően kozmetikai felhasználású származék is helyet kapott. Modellvegyületként a bőr- és hajvilágosító hatású feniletil-rezorcint (Symwhite™) választottuk. A vegyület tájékoztató oldhatósági vizsgálata során oldhatósági kategóriákat jelöltünk ki. A PAMPA permeábilitás méréseknél donor fázisként a molekula adott oldószerrel készült oldatát vizsgáltuk, melynél a kiindulási koncentrációt az előzetes oldhatóság vizsgálatok alapján határoztuk meg. A permeábilitás és a fluxus értékek egy oldhatósági kategórián belül is eltérést mutattak, némely esetben akár 2-3 nagyságrendnyi differenciát tapasztaltunk. Ebből azt az összefüggést szűrhetjük le, hogy a magasabb oldhatóság nem magától értetődően jelent nagyobb permeábilitást is. Az ibuprofén tartalmú félszilárd készítmények eredményei alátámasztják e megfigyelést, ugyanis a szolubilizáló hatású penetrációfokozó anyagok mennyiségének növelése nem jelentett jobb transzdermális permeábilitást. A készítményfejlesztés korai szakaszában célszerű az oldhatóságot és a permeábilitást együtt vizsgálni, illetve e paramétereket befolyásoló segédanyagok megfelelő összetételét optimalizálni, továbbá az oldhatóság és a permeábilitás kapcsolatát nem szabad elhanyagolni.

8. Összefoglalás

PhD munkám során feltártuk a permeábilitást befolyásoló tényezőket, elsősorban az inkubációs hőmérséklet hatását, továbbá a különböző gyógyszerformákból történő hatóanyag permeáció előrejelzésének új eljárásaira tettünk javaslatot.

Fontos összefüggéseket állapítottunk meg a PAMPA módszeren mért permeábilitás és az inkubációs hőmérséklet között. Az eredmények értékelésekor mindhárom modell (GIT-, BBB-, Skin PAMPA) esetén lineáris kapcsolatot találtunk a két paraméter között. Ez mind a hét vizsgált modellvegyületre érvényes volt, azonban a permeábilitás nem egyformán változott a három rendszerben. A hőmérséklet változására a Skin PAMPA reagált a legérzékenyebben. A molekulák sav-bázis karaktere és mérete szintén jelentősen befolyásolta a permeábilitás változását az inkubációs hőmérséklet növelésének hatására.

A munkánk további részében sikerrel fejlesztettük tovább a Skin PAMPA modellt különböző gyógyszerformák vizsgálatára. Kidolgoztunk egy módszert és egy értékelési rendszert, mely segítségével transzdermális gyógyszeres tapaszokat tanulmányozhatunk. A tapaszok összehasonlítását a bennük lévő hatóanyag mért fluxusa, és a gyártó által jelölt kinetika alapján tettük meg. Félszilárd készítmények esetén vizsgáltuk a különböző penetrációfokozó segédanyaggal rendelkező gélek előszűrésének lehetőségét. Két cukor észter származékot és transzkutolt tartalmazó gélek vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a Skin PAMPA hasznos eszköz az összetétel optimalizálásának folyamatában. Az irodalomban kevésbé tárgyalt összefüggést, a permeábilitás és oldhatóság kapcsolatát vizsgálta munkánk utolsó szakasza 23 eltérő tulajdonságú oldószer transzdermális permeábilitást befolyásoló szerepének tanulmányozásával. Azt találtuk, hogy az oldhatóság növekedés nem jelent feltétlenül nagyobb permeábilitást, ezáltal fluxust, így következésképpen levonhatjuk, hogy a termékfejlesztés során e két paramétert befolyásoló segédanyagok optimális egyensúlyát érdemes kialakítani.

Munkánk során új módszereket javasoltunk különböző gyógyszerformák hatóanyagainak bőrön keresztüli felszívódási előrejelzésére. A Skin PAMPA használatának ilyen irányú kiterjesztése mind a gyógyszeripar, mind a kozmetikai ipar érdeklődésére számot tarthat.

9. Summary

The aim of my Ph.D. thesis was the investigation of permeability of drugs. In the first part, the significance and extent of temperature dependence of permeability was studied. Seven marketed drugs with diverse structure and different acid-base properties were selected as test compounds. The permeability data were measured in three different PAMPA models. The results show that the permeability of the compounds is linearly proportional to temperature, although the slope of the permeability curve is strongly influenced by the compounds and the PAMPA membrane used for the measurements. Based on our results the better prediction of *in vivo* permeability processes can be reached by using human-relevant incubation conditions in *in vitro* assays.

In the second part, the aim was to extend the Skin PAMPA method for the evaluation of topical and transdermal products. Different drug formulations were selected for these studies. We investigated the behaviour of six marketed transdermal and local therapeutic patches. The original Skin PAMPA method was successfully modified for the evaluation of patches. The method is suitable for patch testing, as it reflects well the permeability differences between drugs, the deviating behaviour of various patches and is able to classify them based on the flux ratio.

After the transdermal patch testing, several gels containing sucrose esters and transcutol as penetration enhancer compounds have been investigated. Ibuprofen as API was selected for this study. The results have demonstrated that the *in vitro* Skin PAMPA system is a suitable method to select the most promising compositions of the product for further *ex vivo* human skin and *in vivo* animal studies.

The aim of a further Skin PAMPA study was to investigate the effects of different solvents for the permeability. Membrane integrity tests were performed to prove the useability of the artificial membrane for this purpose. The results demonstrated that the permeability and the flux ratio are strongly influenced by the property of solvents. This study suggests that the solubility-permeability interplay is recommended to take into account during the design of any dermal or transdermal products.

The results of my Ph.D. thesis suggest that Skin PAMPA system is a useful tool for evaluation of transdermal drug delivery, and it can be recommended for the permeation studies during the development process of transdermal therapeutic systems and other pharmaceutic and cosmetic products as well.

10. Irodalomjegyzék

1. Hansch C, Maloney P P, Fujita T, Muir R. (1962) Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. Nature, 194: 178-180.
2. Kola I, Landis J. (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Disc, 3: 711-715.
3. Takács-Novák K, Physicochemical profiling in drug research and development, in Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development (ed: Mandic Z) IAPC Publishing, Zágráb: 2014. pp: 1-59.
4. Kansy M, Senner F, Gubernator K. (1998) Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. J Med Chem, 41: 1007-1010.
5. Sinkó B, Garrigues T M, Balogh G T, Nagy Z K, Tsinman O, Avdeef A, Takács-Novák K. (2012) Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. Eur J Pharm Sci, 45: 698-707.
6. Avdeef A, Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State, 2nd Edition. Wiley-Interscience, Inc., New York: 2012. pp: 319-498.
7. Avdeef A, Strafford M, Block E, Balogh M P, Chambliss W, Khan I. (2001) Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. Eur J Pharm Sci, 14: 271-280.
8. Takácsné Novák K, Völgyi G. (2005) A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban. Magyar Kémiai Folyóirat - Összefoglaló közlemények, 111: 169-176.
9. Avdeef A, Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State, 1st Edition. Wiley-Interscience, Inc., New York: 2003. pp: 116-246.
10. Ruell J A, Tsinman K L, Avdeef A. (2003) PAMPA - A drug absorption in vitro model: 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKaflux - Optimized design (pOD-PAMPA). Eur J Pharm Sci, 20: 393-402.

11. Avdeef A, Nielsen P E, Tsinman O. (2004) PAMPA--a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. Eur J Pharm Sci, 22: 365-374.
12. Amidon G L, Lennernas H, Shah V P, Crison J R. (1995) A theoritical basis for a biopharmaceutic drug classification - the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability. Pharm Res, 12: 413-420.
13. Benet L Z, Amidon G L, Barends D M, Lennernas H, Polli J E, Shah V P, Stavchansky S A, Yu L X. (2008) The Use of BDDCS in Classifying the Permeability of Marketed Drugs. Pharm Res, 52: 483-488.
14. Camenisch G, Folkers G, Vandewaterbeemd H. (1997) Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes. Int J Pharm, 147: 61-70.
15. Lundahl P, Beigi F. (1997) Immobilized liposome chromatography of drugs for model analysis of drug-membrane interactions. Adv Drug Del Rev, 23: 221-227.
16. Yang C Y, Cai S J, Liu H L, Pidgeon C. (1997) Immobilized artificial membranes - Screens for drug membrane interactions. Adv Drug Del Rev, 23: 229-256.
17. Artursson P, Borchardt R T. (1997) Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. Pharm Res, 14: 1655-1658.
18. Stenberg P, Luthman K, Artursson P. (2000) Virtual screening of intestinal drug permeability. J Cont Rel, 65: 231-243.
19. Artursson P, Palm K, Luthman K. (2001) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Adv Drug Del Rev, 46: 27-43.
20. Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Bjorquist A, Ungell A L. (2006) Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. Eur J Pharm Sci, 28: 291-299.
21. Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, Zerangue N, Sadee W. (2003) Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines. Pharm Res, 20: 3-15.
22. Volpe D A. (2008) Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. J Pharm Sci, 97: 712-725.

23. Wils P, Warnery A, Phungba V, Scherman D. (1994) Differentiated intestinal epithelial-cell lines as in-vitro models for predicting the intestinal absorption of drugs. Cell Biol Tox, 10: 393-397.
24. Barthe L, Woodley J, Houin G. (1999) Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. Fund Clin Pharm, 13: 154-168.
25. Montal M, Mueller P. (1972) Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. Proc Nat Acad Sci USA, 69: 3561-3566.
26. Tien H T, Dawidowicz E A. (1966) Black Lipid Films in Aqueous Media: A New Type of Interfacial Phenomenon. J Coll Int Sci, 22: 438-453.
27. Tien H T. (1967) Black Lipid Membranes: Thickness Determination and Molecular Organization by Optical Methods. J Theoret Biol, 16: 97-110.
28. Thompson M, Lennox R B, Mcclelland R A. (1982) Structure and electrochemical properties of microfiltration filter-lipid membrane systems. Anal Chem, 54: 76-81.
29. Reis J M, Sinkó B, Serra C H R. (2010) Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is it Better than Caco-2 for Human Passive Permeability Prediction? Mini-Rev Med Chem, 10: 1071-1076.
30. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell J A, Tsinman O, Gonzalez I, Fernandez C, Sanchez G, Garrigues T M, Merino V. (2004) PAMPA--a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. Eur J Pharm Sci, 21: 429-441.
31. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H. (2001) High Throughput Prediction of Oral Absorption: Improvement of the Composition of the Lipid Solution Used in Parallel Artificial Membrane Permeation Assay. J Biomol Scr, 6: 189-196.
32. Sugano K, Takata N, Machida M, Saitoh K, Terada K. (2002) Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. Int J Pharm, 241: 241-251.
33. Sugano K, Nabuchi Y, Machida M, Aso Y. (2003) Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. Int J Pharm, 257: 245-251.

34. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H, Saitoh K, Terada K. (2001) Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. Int J Pharm, 228: 181-188.
35. Di L, Kerns E H, Fan K, Mcconnell O J, Carter G T. (2003) High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. Eur J Med Chem, 38: 223-232.
36. Tsinman O, Tsinman K, Sun N, Avdeef A. (2011) Physicochemical selectivity of the BBB microenvironment governing passive diffusion--matching with a porcine brain lipid extract artificial membrane permeability model. Pharm Res, 28: 337-363.
37. Balogh G T, Müller J, Könczöl A. (2013) pH-gradient PAMPA-based in vitro model assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery. Eur J Pharm Sci, 49: 81-89.
38. Schinkel A H. (1999) P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. Adv Drug Del Rev, 36: 179-194.
39. Hellinger E, Bakk M L, Pocza P, Tihanyi K, Vastag M. (2010) Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. Eur J Pharm Sci, 41: 96-106.
40. Avdeef A, Bendels S, Di L, Faller B, Kansy M, Sugano K, Yamauchi Y. (2007) PAMPA - Critical factors for better predictions of absorption. J Pharm Sci, 96: 2893-2909.
41. Seo P R, Teksin Z S, Kao J P Y, Polli J E. (2006) Lipid composition effect on permeability across PAMPA. Eur J Pharm Sci, 29: 259-268.
42. Carrara S, Reali V, Misiano P, Dondio G, Bigogno C. (2007) Evaluation of in vitro brain penetration: optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison. Int J Pharm, 345: 125-133.
43. Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Furlanetto S, Mura P. (2006) Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption I. Assessment of artificial membrane composition. Eur J Pharm Sci, 27: 346-353.
44. Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi C L, Balimane P V. (2008) A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. Pharm Res, 25: 1511-1520.

45. Karlsson J, Artursson P. (1991) A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. Int J Pharm, 71: 55-64.
46. Yusof S R, Avdeef A, Abbott N J. (2014) In vitro porcine blood-brain barrier model for permeability studies: pCEL-X software pKa(FLUX) method for aqueous boundary layer correction and detailed data analysis. Eur J Pharm Sci, 65: 98-111.
47. Wohnsland F, Faller B. (2001) High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. J Med Chem, 44: 923-930.
48. Ruell J A, Tsinman O, Avdeef A. (2004) Acid-base cosolvent method for determining aqueous permeability of amiodarone, itraconazole, tamoxifen, terfenadine and other very insoluble molecules. Chem Pharm Bulletin, 52: 561-565.
49. Avdeef A, Artursson P, Neuhoff S, Lazorova L, Grasjo J, Tavelin S. (2005) Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the double-sink PAMPA pKa(flux) method. Eur J Pharm Sci, 24: 333-349.
50. Bockris J O M, Reddy A K N, Modern elechtrochemistry. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York: 1998. pp: 361-599.
51. Sangster J, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. Wiley-Interscience, Inc., New York: 1997. pp: 33.
52. Wiedersberg S, Guy R H. (2014) Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! J Cont Rel, 190: 150-156.
53. Thomas B J, Finnin B C. (2004) The transdermal revolution. Drug Disc Today, 9: 697-703.
54. Hadgraft J, Lane M E. (2005) Skin permeation: The years of enlightenment. Int J Pharm, 305: 2-12.
55. Guy R H, Transdermal Drug Delivery. Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2009. pp: 399-410.
56. Prausnitz M R, Langer R. (2008) Transdermal drug delivery. Nat Biotech, 26: 1261-1268.

57. Selzer D, Abdel-Mottaleb M M A, Hahn T, Schaefer U F, Neumann D. (2013) Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. Adv Drug Del Rev, 65: 278-294.
58. Franz T J. (1975) Percutaneous absorption - relevance of invitro data. J Inv Dermat, 64: 190-195.
59. Bronaugh R L, Stewart R F. (1985) Methods for in-vitro percutaneous absorption studies IV: The Flow-through diffusion cell. J Pharm Sci, 74: 64-67.
60. Zendzian R P. (2000) Dermal absorption of pesticides in the rat. Aihaj, 61: 473-483.
61. Salerno C, Carlucci A M, Bregni C. (2010) Study of In Vitro Drug Release and Percutaneous Absorption of Fluconazole from Topical Dosage Forms. Aaps Pharmsci, 11: 986-993.
62. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings J, Hoeck U, Kemper F, Maibach H, Marty J P, Merk H, Parra J, Rekkas D, Rondelli I, Schaefer H, Tauber U, Verbiese N. (1996) Methods for assessing percutaneous absorption - The report and recommendations of ECVAM workshop 13. Atla-Alternat Lab Anim, 24: 81-106.
63. Ottaviani G, Martel S, Carrupt P A. (2006) Parallel artificial membrane permeability assay: A new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. J Med Chem, 49: 3948-3954.
64. Bouwstra J A, Honeywell-Nguyen P L, Gooris G S, Ponec M. (2003) Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Prog Lipid Res, 42: 1-36.
65. Sinkó B, Kökösi J, Avdeef A, Takács-Novák K. (2009) A PAMPA Study of the Permeability-Enhancing Effect of New Ceramide Analogues. Chem Biodiv, 6: 1867-1874.
66. Sinkó B, Pálfi M, Béni S, Kökösi J, Takács-Novák K. (2010) Synthesis and Characterization of Long-Chain Tartaric Acid Diamides as Novel Ceramide-Like Compounds. Molecules, 15: 824-833.
67. Sinkó B, Vizserálek G, Takács-Novák K. (2014) Skin PAMPA: Application in practice. ADMET & DMPK, 2: 191-198.

68. Koch D E, Isaza R, Carpenter J W, Hunter R P. (2004) Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from primate plasma with LC/MS detection. J Pharm Biomed Anal, 34: 577-584.

69. Kligman A, Christophers E. (1963) Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. Arch Dermat Res, 702-705.

70. Platts J A, Abraham M H, Zhao Y H, Hersey A, Ijaz L, Butina D. (2001) Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set - an LFER study. Eur J Med Chem, 36: 719-730.

71. Cunningham C W, Mercer S L, Hassan H E, Traynor J R, Eddington N D, Coop A. (2008) Opioids and efflux transporters. Part 2: P-glycoprotein substrate activity of 3- and 6-substituted morphine analogs. J Med Chem, 51: 2316-2320.

72. Orlowski S, Mir L M, Belehradek J, Garrigos M. (1996) Effects of steroids and verapamil on P-glycoprotein ATPase activity: Progesterone, desoxycorticosterone, corticosterone and verapamil are mutually non-exclusive modulators. Biochem J, 317: 515-522.

73. Quevedo M A, Nieto L E, Brinon M C. (2011) P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. Eur J Pharm Sci, 43: 151-159.

74. Hadgraft J, Lewis D, Beutner D, Wolff H M. (1991) In vitro assessments of transdermal devices containing nitroglycerin. Int J Pharm, 73: 125-130.

75. Olivier J C, Rabouan S, Couet W. (2003) In vitro comparative studies of two marketed transdermal nicotine delivery systems: Nicopatch and Nicorette. Int J Pharm, 252: 133-140.

76. Ayala-Bravo H A, Quintanar-Guerrero D, Naik A, Kalia Y N, Cornejo-Bravo J M, Ganem-Quintanar A. (2003) Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on in vivo human stratum corneum permeability. Pharm Res, 20: 1267-1273.

77. Csóka G, Marton S, Zelkó R, Otomo N, Antal I. (2007) Application of sucrose fatty acid esters in transdermal therapeutic systems. Eur J Pharm Biopharm, 65: 233-237.

78. Youan B B C, Hussain A, Nguyen N T. (2003) Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. Aaps Pharmsci, 5: 9.

79. Cazares-Delgadillo J, Naik A, Kalia Y N, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. (2005) Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon. Int J Pharm, 297: 204-212.

80. Schmaus G, Vielhaber G, Jacobs K, Franke H. (2006) 4-(1-phenylethyl) 1,3-benzenediol: A new highly potent lightening agent. J Cosm Sci, 57: 197-198.

81. Dahan A, Miller J M. (2012) The Solubility–Permeability Interplay and Its Implications in Formulation Design and Development for Poorly Soluble Drugs. The AAPS Journal, 14: 244-251.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1) PAMPA study of the temperature effect on permeability, G. Vizserálek, T. Balogh, K. Takács-Novák, B. Sinkó, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 53. (2014) 45-49.
2) Skin PAMPA: Application in practice, B. Sinkó, G. Vizserálek, K. Takács-Novák, ADMET & DMPK 2. (2014) 191-198.
3) Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method, G. Vizserálek, Sz. Berkó, G. Tóth, R. Balogh, M. Budai-Szűcs, E. Csányi, B. Sinkó, K. Takács-Novák, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 76. (2015) 165-172.
4) Investigation of the efficacy of transdermal penetration enhancers through the use of human skin and a skin mimetic artificial membrane, B. Balázs, G. Vizserálek, Sz. Berkó, M. Budai-Szűcs, A. Kelemen, B. Sinkó, K. Takács-Novák, P. Szabó-Révész, E. Csányi, Journal of Pharmaceutical Sciences, 105. (2016) 1134-1140.

11.2. Más témákhoz kapcsolódó saját közlemények

1) Predicting the exposure and antibacterial activity of fluoroquinolones based on physico chemical properties, G. Völgyi, G. Vizserálek, K. Takács-Novák, A. Avdeef, K. Y. Tam, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 47. (2012) 21-27.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet jelenlegi és előző igazgatójának, Dr. Horváth Péternek és Dr. Noszál Béla Professzor Úrnak, hogy PhD tanulmányaimat az Intézetben végezhettem.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Takácsné Dr. Novák Krisztina Professzor Asszonynak és Dr. Sinkó Bálintnak, akik segítsége, iránymutatása és támogatása nélkül e munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm szépen Dr. Völgyi Gergelynek mind a szakmai, mind a baráti segítséget, amit 2010-től tanúsít felém. A gyakorlati munkában nyújtott segítségért köszönettel tartozom Teitelbaum Ágnesnek. Köszönöm az inspiráló közös munkát, és minden egyebet az Intézet fizikai-kémiai jellemzéssel foglalkozó kutatócsoportjában dolgozó két TDK hallgatónak, Malcsiner Petrának és Vesztergombi Dánielnek. Az Intézet további munkatársainak is köszönettel tartozom a szakmai és személyes kapcsolatokért.

Köszönettel tartozom Balogh Györgynek, a Richter Gedeon Nyrt. munkatársának a materiális segítségért, amivel rendelkezésemre állt, mikor támogatásra volt szükségünk.

Köszönöm szépen az együttműködést és a segítséget minden szerzőtársamnak a közleményeink megírásában.

Köszönettel tartozom jelenlegi kollégáimnak az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézetből, hogy az értekezésem megírásához biztosították számomra a lehetőséget.

Legfőképpen hálás köszönettel tartozom a családomnak, kiváltképpen feleségemnek, dr. Balogh Rékának a támogatásért, a türelemért, és a segítségért, amit minden körülmények között jelentett és jelent nekem.