

Ph.D. értekezés tézisei

**MÁSODIK GENERÁCIÓS POLIMETIL-METAKRILÁT-SZORBITOL
KAPSZULÁK - LOKÁLIS ANTIBIOTIKUM HORDOZÓ ESZKÖZ
KIFEJLESZTÉSE
ÉS PERMEABILITÁS VIZSGÁLATA**

Dr. Frank Dorottya



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet
Fogászati és Szájsebészeti Klinika

Témavezető: Prof. Dr. Miseta Attila
Programvezető: Prof. Dr. Olasz Lajos
Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel

Pécs, 2011

RÖVIDÍTÉSEK

ANOVA: varianciaanalízis, **BPB:** brómfenolkék, **HPLC:** nagy teljesítményű folyadékkromatográfia, **MIC:** minimális gátló koncentráció, **PMMA:** polimetil-metakrilát, **SEM:** pásztázó elektronmikroszkóp, **w/w %:** tömegszázalék

1. BEVEZETÉS

A traumatológiai és ortopéd sebészetben a szeptikus csontfolyamatok, kiváltképpen a csontvelőgyulladás (oszteomielitisz) még napjainkban is a nehezen kezelhető, jelentős költségekkel járó gyulladással járó folyamatok közé tartozik.

A krónikus csontvelőgyulladás kezelésének elengedhetetlen részét képezi az ép szövetig hatoló, kiterjesztett sebészi szöveteltávolítás (debridement), illetve az antimikrobiális terápia. Azonban a hosszú ideig tartó, nagy dózisú célzott parenterális kezelés (4-6 hét) meglehetősen költséges és jelentős mellékhatásokkal járhat. Ezért az utóbbi pár évtizedben kiemelten hangsúlyos szerepet kapott a lokális antibiotikum hordozó eszközök kifejlesztése és alkalmazása. A lokális kezelés legnagyobb előnye, hogy nagy dózisú gyógyszeres kezelést biztosít közvetlenül a fertőzött, rossz vérellátású területen anélkül, hogy a szisztémás toxicitás veszélyét jelentősen megnövelné. Napjainkban számos lokális terápiát szolgáló rendszer létezik, azonban egyik sem tekinthető ideálisnak.

Először Buchholz és Engelbrecht használta 1970-ben az ún. antibiotikummal impregnált polimetil-metakrilátot (PMMA). Azóta mindmáig ezek a PMMA alapú rendszerek az ortopéd és traumatológiai sebészetben mintegy „arany standardnak” tekinthetőek annak ellenére, hogy számos hátrányos tulajdonságunk ismert. Kiemelkedő ezek közül, hogy a PMMA alapú rendszereket tipikusan kétfázisos antibiotikum leadási profil jellemzi. A kétfázisos kiáramlás jellemzője, hogy a terápia első pár napjában magas, majd azt követően lényegesen lecsökkent gyógyszerleadás mérhető, ez pedig messze elmarad az ideálistól. Továbbá a PMMA-ba kevert antibiotikumnak kevesebb, mint 10%-a oldódik ki a polimer mátrixból, ezért az antibiotikumokat jelentős feleslegben kell használni.

Ez utóbbi két probléma arra vezethető vissza, hogy a PMMA erősen hidrofób, így az antibiotikum tartalma csak abban az esetben tud kiáramlani, ha az közvetlen hozzáférhetővé válik a vizes közeg számára. A kioldódott antibiotikum helyén így pórusok keletkeznek, melyek további felületnövelő hatásukkal még több közvetlen felszíni kontakttal elérhető területet szabadítanak fel. A folyamat végére így egy anyagon belüli pórushálózat alakul ki. Alapvetően azt is mondhatjuk, hogy az anyag porozitása döntően meghatározza az antibiotikum kiáramlást.

Ezért, hogy egyes munkacsoportok megnöveljék a PMMA porozitást, illetve ennek megfelelően a permeabilitást, különböző vízdoldékony töltőanyagokat keverték a PMMA-ba. Ilyen töltőanyag például a szénhidrátok közül a dextrans és szukróz, aminosavak közül a glicin, a poliolkok közül az eritrol és xilitol, illetve a további feleslegben használt antibiotikum. További hátrányt jelent, hogy jelentősen korlátozott a felhasználható antibiotikumok típusa. Ennek az egyik oka, hogy kizárólag olyan hőstabil gyógyszertípust lehet alkalmazni, mely az akrilát magas polimerizációs hőmérséklete (akár 100°C feletti) után is megtartja biológiai aktivitását. Emellett csak olyan antibiotikumokat

alkalmazhatunk, melyek nem befolyásolják a cement mechanikai tulajdonságát, illetve melyek por formában hozzáférhetőek, azért hogy a keverési és kötési reakciók zavartalanul végbemehessenek. Ezen kritériumoknak pedig csak kevés antibiotikum felel meg.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt egy olyan lokális antibiotikum terápiát szolgáló eszköz kifejlesztése, mely a korábbi PMMA alapú rendszereknél hatékonyabb lokális terápiás lehetőséget biztosít a szeptikus csontfolyamatok kezelésében. Olyan rendszert akartunk kifejleszteni, mely lehetőséget biztosít bármilyen antimikrobiális szer lokális alkalmazására. Továbbá olyan rendszert szerettünk volna kifejleszteni, mely időben szabályozható, előre megjósolható kiáramlási kinetikával rendelkezik, lehetőséget biztosítva a terápia teljes időtartama alatt az egyenletes gyógyszer szintre.

Ezért egy vízdékony töltőanyag tartalmú (szorbitol) PMMA alapú kapszularendszert készítettünk különböző töltőanyag tartalommal és falvastagsággal. Hipotézisünk az volt, hogy e két paraméter (töltőanyag tartalom és falvastagság) szabályozásával befolyásolni tudjuk a kapszula falának áteresztőképességét. Mindent összevetve, ha a kapszulákat megtöltjük, majd vizes közegbe helyezük, a falvastagság függvényében a töltőanyag kioldódás helyén ún. elúciós csatornák képződnek, melyek hatással vannak a kapszulafal áteresztőképességére, és ennek megfelelően a kapszulába töltött anyag kiáramlási kinetikájára.

A kifejlesztett kapszulák permeabilitását idő függvényében spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk. Mértük, hogy a kapszulákba töltött brómfenolkék oldatot milyen mértékben képes a fal átteresztetni, illetve, hogy azt milyen ütemben teszik. A vizsgálatok után pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken értékeltük a különböző kapszulák felszíni morfológiáját.

Az előzetes in vitro vizsgálatok után, az eredményül kapott permeabilitás profilok alapján kiválasztottuk a legalkalmasabbnak ígérkező, a jövőben potenciális terápiás lehetőséget nyújtó típusokat. A kiválasztott kapszula típusokat tovább vizsgáltuk különbözőfajta antibiotikumokra nézve. Az antibiotikum leadást egyrésztől mikrobiológiai, másrésztől nagy teljesítményű folyadékkromatográfiai módszerrel határoztuk meg.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. PMMA-szorbitol kapszulák készítése

Összesen 16 féle kapszulát állítottunk elő eltérő töltőanyag tartalommal és falvastagsággal. Töltőanyagként a fogorvostudományban elsősorban preventív céllal, és az élelmiszeriparban elterjedten használt semleges, vízdékony szorbitolt választottuk.

Először a szorbitolt ledaráltuk az egyenletes szemcsenagyság biztosítása érdekében, majd egy 160 µm-es szűrőn átszitáltuk. Ezt követően 40, 50, 60 és 70 tömegszázalék (w/w %) arányban homogéne összekevertük a PMMA (Surgical Simplex P, Stryker-Howmedica-Osteonics, Rutherford, USA) polimer porral. Az így keletkezett 4 féle keverékhez ezután adtuk hozzá a monomert, és henger alakú blokkokat készítettünk. A

kapszulák készítéséhez a Börzsei és munkatársai által használt technológiát fejlesztettük tovább. Munkacsoportunk azért, hogy a korábbi technológiából adódó deformításokat kiküszöbölje, először megfelelő méretű henger blokkokat préselt a bekevert tézsa állagú masszából, majd a polimerizációt követően a már megpolimerizálódott blokkokból egy forgácsológép segítségével 0.3, 0.4, 0.5 és 0.6 mm falvastagságú kapszulákat készített.

3. 2. Kapszulafal permeabilitás vizsgálat

Diffúziós indikátorként egy jól detektálható anyagot; brómfenolkéket (BPB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) használtunk. Minden kapszulát 40 μ L, 1 mg/mL BPB-t tartalmazó fiziológiás sóoldattal töltöttünk meg. Ezután a kapszulákat lezártuk, és egyenként 1-1 mL fiz. sóoldatba helyeztük 42 napra. A kapszulából kiáramlott BPB mennyiségét a környező sóoldatban bizonyos időközönként (első 6 napon naponta, majd a 9., 12., 15., 19., 23., 27., 32., 37. és 42. napon) spektrofotométer segítségével határoztuk meg.

3. 3. PMMA-szorbitol kapszula felszíni morfológia vizsgálata

A kapszulák felszíni morfológia vizsgálatához pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk. A kapszulák felszínéről azonos nagyítással (60x) felvételeket készítettük, majd a felszínen képződött pórusok összefelszínhez viszonyított százalékos arányát egy számítógépes szoftver segítségével meghatároztuk (Image J image processing software, plugin: contour plotter analyzer).

3. 4. Antibiotikumok és azok minimális gátló koncentrációjának meghatározása

A BPB-vel végzett permeabilitás vizsgálatok eredményei alapján 4 féle PMMA-szorbitol kapszulát (60 w/w%, 0.5 mm; 60 w/w%, 0.6 mm; 70 w/w%, 0.5 mm; 70 w/w%, 0.6 mm) választottuk ki, és vizsgáltuk tovább a következő antibiotikumokra nézve: gentamicin (gentamicin-szulfát por (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország)), tobramycin (Brulamycin, TEVA Pharmaceuticals, Debrecen, Magyarország), amikacin (Likacin, Lisapharma S.p.A, Erba, Olaszország) és clindamycin (Dalacin C, Pfizer Kft, Budapest, Magyarország). Kontrollként kereskedelmi forgalomban kapható PMMA-gentamicin-gyöngyöket (Septopal, Biomet Europe, Darmstadt, Németország) használtunk. A kapszulákat etilén oxidos sterilizést követően aseptikus körülmények között 40 μ L antibiotikum oldattal töltöttük meg. Ezt követően a gyöngyöket, illetve a megtöltött és lezárt, steril kapszulákat 1-1 mL fiz. sóoldatba helyeztük 42 napra. Az 1-6. nap között naponta, majd a 9., 12., 15., 19., 23., 27., 32., 37. és 42. napon a fiz. sóoldatot 1-1 mL friss fiz. sóoldatra cseréltük le. A kapott mintákat -80°C tároltuk a mérésekig.

A minimális gátló koncentráció értékeket (MIC) makrodilúciós módszer segítségével határoztuk meg. A vizsgálatokhoz *Staphylococcus aureus* HNCMB 112002 baktérium törzset használtunk.

3. 5. Gentamicin, tobramycin, amikacin kiáramlás meghatározása lemezöntéses agardiffúziós lyuk módszer segítségével

A PMMA-szorbitol kapszulákból kiáramlott gentamicin, tobramycin, amikacin mennyiségét lemezöntéses agardiffúziós lyuk módszer segítségével határoztuk meg. Indikátor mikroorganizmusként Müeller-Hinton agarba kevert *S. aureus* HNCMB 112002 törzset használtunk. A kialakult gátlási zónák mm²-ben mért értékeit az ismert koncentrációjú standard hígítási sor alapján értékeltük, és µg/mL antibiotikum koncentrációkra számoltuk át.

3. 6. Clindamycin kiáramlás meghatározása nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás módszer segítségével

A kapszulákból kiáramlott clindamycin mennyiségi meghatározásához nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC, Ultimate 3000 HPLC, Dionex Corporation, Kalifornia, USA) módszert alkalmaztunk. A mérések előtt a felolvasztott mintákat 10-50-szeresre kihígítottuk. A szeparálást 25°C-on fordított fázisú C18 oszlopon (150x4.6 mm, 5 µm, Supelco Discovery, Sigma-Aldrich Kft, Budapest) végeztük el. A mozgófázisként acetonitril és foszfát-puffer keverékét használtuk (1:1, v/v). A flow rate 10 mL/perc, az injektálási térfogat pedig 10 µL volt, és az eluent 205 nm-en detektáltuk. A mennyiségi meghatározáshoz pedig ismert koncentrációjú (1.5-40 µg/mL) clindamycin oldatokat használtunk.

3. 7. Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzés az SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programcsomag segítségével történt. Vizsgáltuk egyrészt a varianciaanalízissel (ANOVA) a fálvastagság és sorbitol tartalom hatását a BPB kiáramlásra nézve minden mintavételi időpontban (1-42 nap). A szignifikancia szintet $p < 0.05$ határoztuk meg.

ANOVA-t követően az adatok "post hoc" elemzését végeztük el. A 6., 15. és 32. mintavételi időpontokon páronként összevetettük a kiáramlott kumulatív BPB mennyiségeket. Mivel 3 különböző időpontot vizsgáltuk 16 féle kapszulára nézve, így összesen 720 ($3 \times 15 \times 16 = 720$) analízist végeztünk el. Azokat a kapszulatípusokat, melyekből az adott vizsgálati napon szignifikánsan nem különböző ($p > 0.05$) mennyiségű BPB áramlott ki, egyforma színjelölést kaptak.

Továbbá a kiáramlási kinetikák és a felszíni morfológia közötti összefüggéseket is megvizsgáltuk. A kiáramlási kinetikára jellemző paramétereket összevetettünk a pórusok összfelületéhez viszonyított százalékos arányával.

Az in vitro antibiotikum kiáramlás vizsgálatoknál az összehasonlító elemzéseket Students T-teszttel végeztünk és statisztikailag szignifikáns eltéréseket $p < 0.05$ esetén fogadtunk el.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. A PMMA-szorbitol kapszulák falának permeabilitása

A BPB kiáramlási kinetikák görbéi alapján azt láttuk, hogy minden egyes falvastagság esetében a magasabb szorbitol tartalmú kapszulák meredekebb kumulatív görbét eredményeztek. Eszerint egy adott időpillanatban nagyobb mértékű és dinamikusabb kiáramlást mutattak az azonos falvastagságú, de nagyobb töltőanyag tartalmú kapszulák. A falvastagság növelésével pedig jelentősen elnyúlt, hosszabb ideig tartó kiáramlást, laposabb görbéket kaptunk. Például a legmagasabb, 70 w/w % szorbitol tartalmú, és legvékonyabb, 0.3 mm falvastagságú kapszulák a 6. napra kiengedték teljes BPB tartalmukat. Ezzel szemben a teljes kiáramlás időpontja jóval eltolódott abban az esetben, ha a falvastagságot megnöveltük; 19. (0.4 mm), 23. (0.5 mm) és a 42. nap (0.6 mm). Illetve hasonló tendenciát figyelhettünk meg, ha a szorbitol mennyiségét lecsökkentettük; a legalacsonyabb töltőanyag tartalmú (40 w/w %) és legvékonyabb falú (0.3 mm) kapszulák esetén a vizsgálati idő végére körülbelül a BPB-nek csak a fele áramlott ki, addig láthattuk, hogy ugyanennél a falvastagságnál a legnagyobb töltőanyag tartalom mellett (70 w/w %) a teljes kiáramlás időpontja már a 6. napra esett.

ANOVA eredménye alapján a kiáramlott BPB mennyisége, mint a falvastagság és a szorbitol tartalom függvénye szignifikáns ($p < 0.001$) különbségeket mutatott minden mérési időpillanatban (1-42. nap). Továbbá a két faktor együttesen is jelentős hatást gyakorolt a kiáramlott BPB mennyiségére ($p < 0.001$).

A páronkénti „post hoc” analízis ugyancsak azt bizonyítja, hogy az alacsony szorbitol tartalmú kapszulák egy adott időtartam alatt kevesebb BPB kiáramlást tesznek lehetővé, míg a vékonyabb falvastagság mellett a kapszulák pedig ezzel ellenkezőleg, fokozottabban permeabilisak.

4. 2. Felszíni morfológia vizsgálata SEM-vel

A kapszulák felszínéről a 42. napot követően SEM felvételeket készítettünk. A képeken a kapszulák felszínén sötét foltok, pórusok voltak láthatók. Ezt követően a kapszulák pórusainak teljes felszín nagyságához viszonyított összterületének százalékos arányát 4 különböző kiáramlási paraméterrel vetettük össze.

Az első összevetésben azt találtuk, hogy minél nagyobb a felszínen található pórusok területének százalékos aránya, annál hamarabb kezdődik a kiáramlás. Az adatok szoros exponenciális kapcsolatot mutattak ($R^2 = 0.868$, $p < 0.001$). Negatív exponenciális összefüggést találtunk egy másik paraméter tekintetében is, amikor a pórusok százalékos megoszlását azzal az időintervallummal vetettük össze, ami alatt a kapszulákból a BPB fele kiáramlott ($R^2 = 0.945$, $p < 0.001$). A felszíni pórusok megoszlása és a napi maximális BPB kiáramlás között szintén erős exponenciális korrelációt mutattak az adatok ($R^2 = 0.939$, $p < 0.001$). Végül a negyedik összevetés tekintetében is erős exponenciális korrelációt kaptunk a felszíni pórusok megoszlása és az az időtartam között, ami a BPB 25% és 75%-ának kiáramlása között telt el ($R^2 = 0.945$, $p < 0.001$).

4. 3. Gentamicin, tobramycin, amikacin MIC értékei

Az eredményeink alapján az alkalmazott antibiotikumok a vizsgálat végéig megtartották biológiai aktivitásukat.

A kapott MIC értékek *S. aureus HNCMB 112002* törzs esetében a következők voltak: gentamicin esetén 0.2 µg/ml, tobramycin esetén 0.2 µg/ml, amikacin esetén pedig 0.8 µg/ml.

4. 4. Antibiotikum kiáramlás a PMMA-szorbitol kapszulákból

A vizsgálatsorozatunk eredményeit tekintve a PMMA gyöngyök az irodalmi adatoknak megfelelően tipikus kétfázisos kiáramlást mutattak, kezdeti magas, majd azt követő hirtelen lecsökkent mennyiségű gentamicin kioldódással. A 42. napra összesen az impregnált antibiotikum tartalmuk összmennyiségének mintegy 50%-át adták le. Ennek az 50%-nak is mintegy felét a vizsgálati periódus első 5 napja alatt. Az 5. nap után valamivel mérsékeltebb kiáramlást tapasztalunk még, azonban az azt követő 10 nap után már csak minimális gentamicin kioldódást mértünk. Ezzel szemben a PMMA-szorbitol kapszulák a falvastagság és a szorbitol tartalom függvényében az antibiotikum tartalmuknak mintegy 70-100%-át adták le. A vizsgálati időintervallum végére a 60 w/w % töltőanyag tartalmú és 0.6 mm-es falvastagságú kapszulák mutatták a legalacsonyabb kumulatív kiáramlást, míg a legmagasabbat a 70 w/w % szorbitol tartalmú és 0.5 mm-es falvastagságú kapszulák érték el. Ennek megfelelően ez utóbbi kapszula típus falán a gentamicin tartalomnak mintegy 100%-a átdiffundált a 42. nap végére. Mindazonáltal a 70 w/w %, 0.5 mm-es kapszulák kiáramlási kinetikája hasonlított leginkább a Septopal gyöngyök kinetikájához. Azonban lényeges különbség, hogy - mint fent említettem – míg a gyöngyök kb. 50%-át, addig a kapszulák gentamicin tartalmuknak mintegy 100%-át adták le, biztosítva ezzel a szignifikánsan nagyobb mennyiségű gyógyszeres szintet. Ezek a kapszulák az első 19 nap alatt mindvégig jelentős, majd valamivel csökkent gentamicin kiáramlást mutattak. A 70 w/w %, 0.5 mm-es PMMA kapszulák esetén a 2. és 23. nap között a kontroll, Septopal gyöngyökhöz képest szignifikánsan több antibiotikum leadást mértünk.

A többi, alacsonyabb töltőanyag tartalmú és/vagy 0.6 mm-es falvastagságú kapszula az inkubációs időtartam első fele alatt mérsékeltebb mennyiségű gentamicin leadást produkált, majd az elúciós csatornák kialakulását követően egyre fokozódó gyógyszerleadást mutattak a vizsgálat hátralevő, második részében. Eszerint a 60 w/w %-os és 70 w/w %, 0.6 mm-es kapszulák a 9. nap után szignifikánsan több gentamicint adtak le, mint a kontroll gyöngyök.

A 60 w/w % szorbitol tartalmú és 0.6 mm-es falvastagságú PMMA kapszulák mutatták a legmagasabb gentamicin kiáramlást a vizsgálati periódus második felében; a 23. és 42. nap között a MIC érték több százszorosának megfelelő mennyiségű antibiotikum diffundált át a kapszula belsejéből a környező fiz. sóoldatba.

A különböző típusú kapszulák kumulatív kiáramlási görbéinek lefutása tobramycinre nézve hasonló volt a gentamicinnel kapott azonos típusú kapszulák kumulatív görbéihez. Tobramycinnel is a 70 w/w %-os szorbitol tartalmú és 0.5 mm-es falvastagságú kapszulák tipikus kétfázisos kinetikát mutattak. Nagy mennyiségű kiáramlás tapasztaltunk az első napokban, majd lecsökkent, a 27. napot követően pedig már további gyógyszerleadás nem

mértük. Ezek a kapszulák a gentamicines méréseknek megfelelően ugyancsak 27 nap alatt ürültek ki.

Ugyancsak azok a kapszulák, melyek kevesebb töltőanyag tartalommal, vagy vastagabb fallal rendelkeztek tobramycinre nézve is szintén a gentamicinhez hasonló kinetikákat eredményeztek. A kísérlet második felében ugyanúgy a 60 w/w %-os, 0.6 mm-es falvastagságú kapszulák engedték át a falukon a legnagyobb mennyiségben az antibiotikumot. Azonban nemcsak a 60 w/w %-os és 0.6 mm-es, hanem a 70 w/w %-os és 0.6 mm-es, illetve a 60 w/w %-os, 0.5 mm-es kapszulákból is még az utolsó 5 napban is a MIC érték többszörösét meghaladó tobramycin kiáramlást detektálunk.

A különböző típusú PMMA-szorbitol kapszulákból az amikacin kumulatív és addicionális kiáramlása is mind a gentamicinhez, mint pedig a tobramycinhez hasonló tendenciát mutatott.

A kapszulákból kiáramlott clindamycin meghatározása során ugyancsak a 70 w/w %, 0.5 mm-es kapszulák esetén kaptuk a legmagasabb kezdeti kiáramlást, azonban ez nem volt annyira kifejezett, mint a másik három antibiotikum esetén. Ezek, a leginkább permeabilisnak mutató kapszulák antibiotikum tartalmuknak mintegy 100%-át adták le, azonban az előző mérésekhez képest később, a vizsgálat végére ürültek ki teljesen. A különbségek feltehetően az eltérő mérési módszerből és antibiotikumból adódnak.

A 70 w/w %, 0.6 mm-es és 60 w/w %, 0.5 mm-es kapszulák az előbbi kapszulákhoz képest egyenletesebb, lassabb kiáramlást produkáltak. Mindkét PMMA-szorbitol kapszula a vizsgálat elején csekélyebb, majd az elúciós csatornák folyamatos kialakulás miatt egyre fokozódó kiáramlást mutatott. A két típus kumulatív görbéi az eltérő paraméterek (falvastagság, szorbitol tartalom) ellenére szignifikánsan nem különbözött egymástól.

Clindamycinre nézve is ugyancsak a 60 w/w %, 0.6 mm-es kapszulák esetén detektáltuk a legalacsonyabb kumulatív kiáramlást.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink igazolták, hogy a két paraméter (falvastagság és szorbitol tartalom) változtatásával különböző kinetikájú lokális antibiotikum hordozó eszközöket lehet készíteni. A kezdeti jelentős BPB kiáramlás a magas szorbitol tartalommal, és a vékony falvastagsággal mutatott szoros összefüggést. Továbbá az alacsony töltőanyag tartalmú, illetve a vastag falú kapszulák a vártnak megfelelően pedig elnyújtottabb BPB kiáramlást produkáltak. Miután megbizonyosodtunk, hogy a PMMA-szorbitol kapszulák valóban különböző áteresztőképességgel rendelkeznek, kiválasztottuk a legmegfelelőbb kombinációkat.

Kísérletsorozatunk következő lépéseként azt vizsgáltuk, hogy ezen kiválasztott kapszulák különböző antibiotikumokkal töltve milyen antibiotikum leadást mutatnak. Együttvéve - mint vártuk - minden kapszula a falvastagságnak és a szorbitol tartalomnak megfelelő antibiotikum leadást mutatott. Minden gyógyszer esetében a 70 w/w %, 0.5 mm-es kapszulák kétfázisos kiáramlást mutattak (hasonlóan a PMMA gyöngyökhöz). A gyors gyógyszerkiáramlásnak pedig terápiás szempontból kiemelkedő jelentősége van. Továbbá, mint azt a gentamicin esetében láthattuk a kontrollhoz képest szignifikánsan több antibiotikum diffundált ki a kapszulákból. A többi kapszula típusnál a kiáramlás valamivel

később, az elúciós csatornák folyamatos kialakulásával érte el maximumát. A 60 w/w %-os és 0.5 mm-es, illetve a 70 w/w %-os és 0.6 mm-es kapszulák kumulatív kiáramlása között jelentősebb különbséget nem tapasztaltunk egyik antibiotikum esetén sem. Ennek feltehetően az az oka, hogy a plusz 10 w/w % szorbitol tartalom körülbelül a 0.1 mm-es falvastagsághoz hasonló permeabilitást tesz lehetővé, vagyis a két típus esetén e két paraméter változtatásával körülbelül hasonló áteresztőképességet értünk el.

Azonban mint láthatjuk munkacsoportunknak sem sikerült egy eszközzel biztosítani a 42. napig tartó folyamatosan egyenletes gyógyszer szintet. Ellenben kiemelkedő eredmény, hogy a gyorsabb és a lassabb kinetikát mutató kapszulák egyidejű kombinálásával ezen cél elérésére lehetőségünk nyílt. Így mire a gyors kapszulák falán keresztül a kapszulába töltött antibiotikum átdiffundált, a lassabb kapszulák elnyújtottabb kiáramlásának köszönhetően csak a terápia második felében produkálnak jelentősebb gyógyszerleadást; biztosítva ezzel a relatív egyenletes, jóval a MIC értéket meghaladó gyógyszer szintet. Továbbá mivel a kapszulákat a polimerizációt követően töltjük meg, így a célzott terápiának megfelelő (bármilyen) antimikrobiális szerrel (szerekkel) is megtölthetjük, következésképp egy újabb, a PMMA rendszerekre jellemző hátrány kiküszöbölésére nyílik lehetőségünk.

A gyakorlatban a PMMA-szorbitol kapszulák felhasználása a következőképp működne; a sebészi debridementet követően vagy a műtőben, vagy még közvetlenül műtét előtt a mikrobiológiai vizsgálatok eredménye szerinti célzott antibiotikum oldattal megtölthetjük a kapszulákat. A megtöltést követően a lezárt kapszulákat a sebészi debridementet követően a csontvelőüregben elhelyezzük. Ezt követően kb. 6 hét elteltével pedig egy második műtéttel a kapszulákat eltávolítjuk.

Összegezve az eredményeket, az általunk kifejlesztett PMMA-szorbitol kapszulák egyik legnagyobb előnye, hogy a falvastagság és a szorbitol tartalom változtatásával a kapszulákba töltött folyadék kiáramlási kinetikáját befolyásolni tudjuk. Így segítségünkkel lehetőségünk nyílik, hogy időben szabályozható, előre megjósolható gyógyszerleadást biztosítsunk lokálisan a fertőzött területen. Ennek megfelelően a különböző kinetikát mutató kapszulák kombinálásával, elsősorban a 70 w/w %-os és 0.5 mm-es, illetve a 60 w/w %-os és 0.6 mm-es kapszulák egyidejű alkalmazásával a kezelés teljes ideje alatt egyenletes, a MIC érték több százszorosával megegyező gyógyszer szintet érhetünk el. Ezáltal - a korábbi rendszerekkel ellentétben - jelentősen csökkenthető az antibiotikum rezisztencia kialakulásának veszélye. Mindemellett, mivel a kapszulákat a polimerizációs folyamat lezajlása után töltjük meg, elviekben bármilyen antimikrobiális szert alkalmazhatunk (leoltás, és antibiotikum rezisztencia vizsgálatra alapozva). Továbbá egyéb gyógyszerek, akár kemoterápiás szerek lokális alkalmazására is lehetőség nyílik; például csont metasztázisok kezelésénél. Végül, de nem utolsó sorban pedig a PMMA-szorbitol kapszulák előállítási költsége is meglehetősen kedvező.

Mindezeket egybevéve úgy gondoljuk, hogy a PMMA-szorbitol kapszulák potenciális, új, költségkímélő lehetőséget nyújthatnak már a közeli jövőben a szeptikus csontfolyamatok lokális kezelésében.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Frank D, Cseh G, Nagy T, Pótó L, Kocsis B, Miseta A
Polymethyl-Methacrylate-Sorbitol Based Capsules as Local Drug Delivery Vehicles: A Preliminary Study
Cell Biol Int. 2011; 35(5):499-504.
IF: 1.8 (2009)

Frank D, Cseh G, Kocsis B, Nagy T, Borsiczky B, Tóké-Füzesi M, Miseta A
Polymethyl-Methacrylate-Sorbitol Based Capsules as Local Drug Delivery Vehicles: In Vitro Antibiotic Elution Study
Cell Biol Int. 2011; 35(3):267-272.
IF:1.8 (2009)

Frank D, Montsko G, Juricskay I, Borsiczky B, Cseh G, Kocsis B, Nagy T, Nagy AK, Kovács LG, Miseta A
Clindamycin Release Determined by High Performance Liquid Chromatography from a Novel Low-Cost Local Drug Delivery System: A New Potential Treatment Option for Chronic Osteomyelitis
Közlésre elfogadva: J Chemother
IF: 1.166 (2009)

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló hazai és nemzetközi előadások

Frank D, Cseh G, Borsiczky B, Miseta A
A polimetil-metakrilát egy újfajta felhasználási lehetősége a muszkuloskeletális infekciók kezelésében
2009.08.21-22.
HMAA Balatonfüredi Nyári Diákkonferencia (Balatonfüred, Magyarország)

Frank D, Cseh G, Nagy T, Borsiczky B, Seress L, Miseta A
A novel local drug delivery device in the management of musculoskeletal infections
Preliminary testing
2009.11.19-22.
6th International Medical Postgraduate Conference (Hradec Kralove, Csehország)

Frank D, Cseh G, Borsiczky B, Börzsei L, Miseta A
PMMA-szorbitol kapszulák diffúziós vizsgálata
2010.06.17-19.
A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi Közös Kongresszusa (Pécs, Magyarország)

Frank D, Cseh G, Borsiczky B, Börzsei L, Kocsis B, Miseta A
PMMA-szorbitol kapszulák antibiotikum kiáramlás vizsgálata
2010.06.17-19.

A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi Közös Kongresszusa (Pécs, Magyarország)

Borsiczky B, Börzsei L, Jancsik V, **Frank D**, Miseta A, Cseh G
Nyúl tibiáján létrehozott kísérletes osteomyelitis lokális terápiája antibiotikummal töltött PMMA-szorbitol kapszulák közvetítésével
2010.06.17-19.

A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi Közös Kongresszusa (Pécs, Magyarország)

Börzsei L, Borsiczky B, Cseh G, Kocsis B, **Frank D**, Miseta A
Szeptikus csontfolyamatok lokális antibiotikum terápiájának lehetőségei és egy újabb antibiotikum hordozó: A PMMA-szorbitol kapszula
2010.06.17-19.

A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi Közös Kongresszusa (Pécs, Magyarország)

Frank D, Cseh G, Borsiczky B, Kocsis B, Miseta A
PMMA-sorbitol capsules
2010.08.20-21.

Hungarian Medical Association of America. HMAA Summer conference in Balatonfüred (Balatonfüred, Magyarország)

Frank D
PhD hallgatói előadás-PMMA-szorbitol kapszulák
2010.08.30-09.3.

Fogorvosok számára kötelező szintentartó tanfolyam és gyakorlati kurzus, Fogorvostudományi tudományos ülés (Pécs, Magyarország)

Frank D
PMMA-szorbitol kapszulák permeabilitás és in vitro antibiotikum kiáramlás vizsgálata
2010.09.27.

Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztály Tudományos Ülése- Tanulságos Estek Fóruma- Felkért előadás (Pécs, Magyarország)

Cseh G, Jancsik V, Börzsei L, **Frank D**, Jávör S, Borsiczky B
PMMA sorbitol capsules for the treatment of pyogenic bone infection: experimental study in rabbits
2011.06.26-30.

Br J Surg. 2011 Jun;98 Suppl 5:S1-69
46th Congress of the European Society for Surgical Research (Aachen, Németország)
IF: 4.077 (2009)

Frank D, Borsiczky B, Montskó G, Cseh G, Kocsis B, Kolarovszki B, Nagy T, Nagy Á, Kovács LG, Miseta A
A novel local drug delivery system
2011.08.31-09.03.

45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research with the Scandinavian Division (Budapest, Magyarország)
IF:3.773 (2009)

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló nemzetközi poszterek

Frank D, Borsiczky B, Börzsei L, Kocsis B, Nagy T, Miseta A, Cseh G
Release Properties of a Novel Local Drug Delivery System
2010.06.16-17.
8th Central European Orthopaedic Congress (Pécs, Magyarország)

Frank D, Montskó G, Borsiczky B, Cseh G, Kocsis B, Kolarovszki B, Nagy T, Kovács LG, Miseta A
Clindamycin Release from a Novel Local Antibiotic Delivery System for the Management of Chronic Osteomyelitis
2011.06.24-30.
4th Congress of European Microbiologist FEMS 2011 (Genf, Svájc)

Egyéb közlemények

Nagy T, Balasa A, **Frank D**, Rab A, Rideg O, Kotek G, Magyarlaki T, Bogner P, Kovács GL, Miseta A
O-GlcNAc modification of proteins affects volume regulation in Jurkat cells
European Biophysics Journal. 2010:39;1207-1217.
IF: 2,437 (2009)

Frank D, Nagy T, Kátai E, Yahiro RKK, Bakó C, Zrínyi Z, Poór VS, Kovács GL, Miseta A
Lithium induces unfolded protein response and enhance O-GlcNAc modification of proteins in Jurkat cells grown on galactose
(Bírálat alatt)

Egyéb idézhető absztraktok

Nagy T, **Frank D**, Poor VS, Rab A, Kovacs GL, Miseta A
Impaired galactose metabolism by lithium treatment leads to increased unfolded protein response and elevated O-GlcNAc modification of proteins
Glycobiology.2010:(20)11; 1481-1482. Meeting Abstract: 103
2010.11.7-10.
2010 Annual Conference of the Society for Glycobiology (St Pete Beach, FL, USA)
IF: 3,929 (2009)

Egyéb előadások

Frank D, Benke B

Teljes kivethető lemezes fogpótlás szerkezeti stabilitásának növelési lehetősége
2008.08.22-23.

Tobacco Epidemic in Hungary Conference in Budapest (Budapest, Magyarország)

Benke B, **Frank D**, Marada G, Cseh K, Szabó G

The effect of reinforcement with glass fibers and fracture characteristic of damaged acrylic-resin based specimen sas analysed by SEM

2008.09.4-6.

32nd Annual Congress of European Prosthodontic Assotiation (Pécs, Magyarország)

Frank D, Nagy T, Rab A, Poór VS, Kovács LG, Miseta A

Lithium treatment induces unfolded protein response and increases O-GlcNAc modification of proteins in Jurkat cells grown on galactose

2010.08.20-21.

HMAA Balatonfüredi Nyári Konferencia 2010 (Balatonfüred, Magyarország)

Nagy T, **Frank D**, Miseta A

Protein O-glycosylation; A new diagnostic Tool?

2010.08.26-28.

A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagygyűlése (Pécs, Magyarország)

Frank D, Nagy T, Rab A, Poór VS, Kovács LG, Miseta A

Lithium influences the signaling mechanism of O-glycosylation by the modulation of Ca²⁺-stores in galactose-fed Jurkat cells

2010.11.18-20.

7th International Medical Postgraduate Conference (Hradec Kralove, Csehország)

Egyéb poszterek

Frank D, Pandúr E, Poór VS, Sarnyai Á, Nagy T, Miseta A, Sipos K

A hepcidin kimutatása a nagy nyálmirigyekből

2009.05.19-22.

39. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Frank D, Nagy T, Rab A, Miseta A

A foszfooglükomutáz (PGM) szerepe a lítium hatásmechanizmusában Jurkat sejteken

2009.05.19-22.

39. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Nagy T, **Frank D**, Balasa A, Józsa G, Rab A, Miseta A
O-glikoziláció: calcium szabályozás hypoxiás folyamatokban
2009.05.19-22.
39. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Frank D, Szalma J, Rideg O, Nagy T, Miseta A, Olasz L
Humán papillomavírusok (HPV) szerepe a szájüregi daganatos megbetegedésekben
2009.11.5-7.
Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság XIII.Kongresszusa (Pécs, Magyarország)

Frank D, Nagy T, Kovács LG, Miseta A
A lítium hatása a galaktóz metabolizmusra és az O-glikozilációra Jurkat sejteken
2010.05.18-21.
40. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Frank D, Nagy T, Kátai E, Poór VS, Kovács LG, Miseta A
Lítium a galaktóz metabolizmus megváltoztatásával fokozza a fehérjék O-glikozilációját és az UPR-t
2011.05.17-20.
41. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Kátai E, Nagy T, **Frank D**, Kovács LG, Miseta A
Lítium új preventív lehetőség az Alzheimer betegségben?
2011.05.17-20.
41. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Nagy T, Yahiro KKR, Kátai E, **Frank D**, Balogh A, Kovács LG, Miseta A
Az O-típusú protein glikoziláció szerepe a TRPC1 kalcium-csatorna szabályozásában
2011.05.17-20.
41. Membrántranszport Konferencia (Sümege, Magyarország)

Kolarovszki B, Barla-Szabó P, **Frank D**, Fülöp G
Biszfoszfónát – kezelés mellékhatásaként fellépő állcsontnekrózis – „lerágott csont”
2011.09.2-3.
51. Somogyi Egészségügyi Napok (Siófok, Magyarország)

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Őszinte és hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek *Prof. Dr. Miseta Attilának*, aki érdemesnek talált arra, hogy ezen a témán dolgozzam, és akinek fáradhatatlan támogatása, szakmai útmutatásai nélkül nem ölthetett volna formát dolgozatom.

Köszönöm programvezetőmnek, *Prof. Dr. Olasz Lajosnak* és a Fogászati és Szájsebészeti Klinika korábbi és jelenlegi Igazgatójának, *Prof. Dr. Szabó Gyulának* és *Dr. Nagy Ákosnak* segítőkészségét és támogatását.

Továbbá köszönettel tartozom *Dr. Nagy Tamásnak* és *Dr. Kátai Emesének*, akik helyes útmutatásaikkal, lényegre törő tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönettel tartozom még *Prof. Dr. Kovács L. Gábor* Intézetvezető Úrnak és *Montskó Gergelynek*, hogy a HPLC vizsgálatok elvégzésében segítettek.

Megköszönöm továbbá *Dr. Borsiczky Balásznak*, *Dr. Cseh Gellértnek* és *Dr. Börzsei Lászlónak* támogatását, mellyel hozzájárultak a munkám elvégzéséhez.

Köszönöm ezen felül *Szvacsek Ferencnek* a kapszulák gyártásában nyújtott segítségét.

Köszönetet szeretnék mondani *Dr. Kocsis Bélának* és kedves feleségének, *Kocsis Erikának* biztatásukért, és a mikrobiológiai vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Továbbá köszönöm *Prof. Dr. Seress Lászlónak* és *Dolgos Bélának* a támogatását, és a pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzésében nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönettel tartozom *Dr. Póto Lászlónak*, és *Dr. Juricskay Istvánnak* a statisztikai számítások elvégzésében nyújtott hathatós munkájáért.

Ezen felül szeretnék köszönetet mondani *Dr. Nőt László Gergelynek* és *Dr. Patczai Balásznak*, amiért a PTE KK Mozgásszervi Sebészeti Intézet Traumatológiai és Kézsebészeti Klinikai Tanszék beteganyagának röntgen felvételeit rendelkezésemre bocsátották.

Köszönetemet fejezem ki még *minden kollégámnak és munkatársamnak*, akik valamilyen módon segítséget nyújtottak, hozzájárultak munkám sikeres befejezéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm *Családomnak*, *Férjemnek* és *Barátaimnak* kitartó türelmüket, támogatásukat, megértésüket és segítőkész hozzáállásukat, mely nélkül nem születhetett volna meg e dolgozat.