

**Fájdalomcsillapító hatóanyagot tartalmazó, szilikon polimer
alapú gyógyszeres tapaszok fejlesztése**

PhD értekezés



László Szabolcs

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Pintér Erika, Dr. Wagner Ödön

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés, célkitűzések.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. Szilikon polimerek, kaucsukok.....	8
2.1.1. Kémiai szerkezet és tulajdonságok.....	8
2.1.2. Élettani hatás.....	10
2.1.3. A szilikon polimerek típusai, a térhálósítás módszerei.....	10
2.1.4. A szilikon gumik töltőanyagai, adalékai.....	12
2.2. Transzdermális terápiás rendszerek.....	13
2.2.1. Áttekintés.....	13
2.2.2. A különböző transzdermális terápiás rendszerek típusai.....	15
2.3. Szilikon polimerek alkalmazása TTS-ként.....	23
2.4. A krónikus fájdalom háttere és az analgetikus terápia kihívásai.....	25
2.4.1A fájdalom patomechanizmusa.....	25
2.4.2. A neuropátiás fájdalom kezelési módjai.....	27
2.4.2. Szulfid donor molekulák.....	29
2.4.3. Kapszaicin és annak terápiás felhasználása.....	31
2.4.4. Alacsony koncentrációjú kapszaicin alkalmazása transzdermális terápiában.....	34
3. A kísérletekhez felhasznált módszerek és anyagok.....	35
3.1. Szulfid típusú hatóanyagokat leadó transzdermális rendszerek fejlesztése.....	35
3.1.1. Vegyszerek.....	35
3.1.2. Műszeres vizsgálatok.....	35
3.1.3. Diállil-diszulfid előállítása.....	36
3.1.4. Szilikonmembránok előállítása.....	36
3.1.5. Diállil-diszulfid tartalmú transzdermális tapaszok előállítása.....	37

3.1.6. A membrán diffúzió mérése.....	38
3.1.7. A DADS-tartalmú transzdermális tapaszok <i>in vitro</i> hatóanyag leadásának mérése	38
3.2. Kapszaicin hatóanyagot leadó transzdermális rendszerek fejlesztése	41
3.2.1. Vegyszerek.....	41
3.2.2. A kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok előállításához szükséges előkísérletek	41
3.2.3. Kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok előállítása	41
3.2.4. A kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok <i>in vitro</i> hatóanyag leadásának mérése	43
3.2.5. A bőrpermeáció vizsgálata Raman mikroszkóppal.....	45
3.2.6. Az <i>in vivo</i> vizsgálatok bemutatása	45
4. Eredmények.....	49
4.1. Szulfid tartalmú tapaszok vizsgálata	49
4.1.1. A DADS oldhatósága.....	49
4.1.2. A membrándiffúziós mérés eredményei	49
4.1.3. A hatóanyag leadás stabilitásának vizsgálata Franz-diffúziós cellával	53
4.1.4. A hatóanyag leadás vizsgálata átfolyócellával.....	54
4.2. A kapszaicin tartalmú tapaszok vizsgálata	56
4.2.1. A kapszaicin tapaszok kifejlesztéséhez szükséges elővizsgálatok eredményei.....	56
4.2.2. A kapszaicin tartalmú tapaszok hatóanyag leadási tulajdonságai Franz cellás vizsgálatok során.....	59
4.2.2. A hatóanyagleadási vizsgálat eredményei átáramló cellában	61
4.2.3. A Raman-spektroszkópia eredményei	62
4.2.4. A kapszaicint tartalmazó tapaszok termális allodíniát enyhítő hatásának vizsgálata	63
4.2.5. A kapszaicint tartalmazó tapaszok karragén kiváltotta mechanikus hiperalgégiát enyhítő hatásának vizsgálata	65
5. Diskusszió.....	66

5.1. A DADS tartalmú tapaszok fejlesztésének konklúziói.....	66
5.2. A kapszaicin tartalmú tapaszok fejlesztésének konklúziói.....	70
6. Új eredmények összefoglalása	75
7. Tudományos eredmények gyakorlati hasznosíthatósága	76
8. Jövőbeni tervek	77
9. Irodalom jegyzék.....	78
10. Publikációs jegyzék.....	91
10.1. Az értekezés alapját képező publikációk.....	91
10.2. Egyéb eredeti közlemények.....	91
10.3. Kongresszusi poszter prezentációk.....	92
11. Köszönetnyilvánítás	93

Rövidítések jegyzéke

AITC: Allil-izotiocianát amely a mustárolajban található (Allyl IsoThioCyanate)

BME-VBK-SZAKT: Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

DADS: Diállil-diszulfid (DiAllyl-DiSulfide)

FTIR: Fourié transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier-Transform InfraRed spectroscopy)

H₂S: Hidrogén-szulfid

HPLC: Nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia (High Performance Liquid Chromathography)

HTV: Magas hőmérsékleten térhálósodó szilikon kaucsukok (High Temperature Vulcanizing)

IVRT: *In vitro* hatóanyag leadási teszt (*In Vitro* Release Test)

IVPT: *In vitro* hatóanyag permeációs teszt (*In Vitro* Permeation Test)

LTV: Alacsony hőmérsékleten térhálósodó szilikon kaucsukok (Low Temperature Vulcanizing)

NSAID: Nem szteroid gyulladáscsökkentők (Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs)

NMR: Magmágneses Rezonancia Spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy)

OSC: Természetben előforduló szerves kénvegyületek (Organic Sulfur Compounds)

PB: Foszfát puffer (Phosphate Buffer)

PBS: Foszfát pufferrel kiegészített fiziológiás sóoldat (Phosphate Buffered Saline)

PDMS: Poli(dimetil-sziloxán) (Poly DiMethyl Siloxane)

PSA: Nyomásérzékeny ragasztó (Pressure Sensitive Adhesive)

PTE ÁOK: Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

RTV: Szobahőmérsékleten térhálósodó szilikon kaucsukok (Room Temperature Vulcanizing)

SST: Szomatosztatin (SomatoStatine)

SST-LI: Szomatosztatin-szerű immunreakció (SST-Like Immunreactivity)

TRPA1: Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1

TRPV1: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1

TTS: Transzdermális terápiás rendszerek (Transdermal Therapeutic Systems)

1. Bevezetés, célkitűzések

Munkám a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar (PTE ÁOK) Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék (korábban Szervetlen Kémia Tanszék) (továbbiakban: BME-VBK-SZAKT) közös projektje révén született. A két nagy múltú intézményben komoly hagyománya van mind a szilikonok orvosi célú felhasználásának, mind a fájdalomcsillapító gyógyszerek fejlesztésének.

A PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében hosszú évtizedek óta, kutatók több generációja foglalkozik a neurogén gyulladás és fájdalom mechanizmusainak elméleti hátterével és ezek alapján új típusú fájdalomcsökkentő és gyulladásgátló hatóanyagok kifejlesztésével. A kutatócsoport fő témája a kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződések, valamint az azokon megtalálható Tranziens Receptor Potenciál (TRP) receptorcsaládba tartozó ioncsatornák, ill. az idegvégződésekől felszabaduló pro- és antiinflammatorikus neuropeptid mediátorok szerepe a fájdalom és gyulladás kialakulásában, továbbá az ezen érzőidegvégződések aktivációjával megvalósítható fájdalomérzet-csökkentés, -csillapítás. A fájdalom akár krónikus, akár akut, a társadalom egyik leggyakoribb egészségügyi problémája, így kezelése, a terápiás módszerek folyamatos fejlesztése kulcsfontosságú. A különböző gyógyszerhatóanyagok bejuttatásának gyakori megoldása a bőrön keresztül történő adagolás, ám a klasszikus módszerek (kenőcs, oldat) több hátránnyal járnak (pontatlan adagolás, ruházat és környezet szennyezése). Erre kínálnak modern megoldást az úgynevezett transzdermális terápiás rendszerek (Transdermal Therapeutic Systems, TTS).

A BME-VBK-SzAKT-on az 1950-es évek óta folynak kutatások a szilikonokkal (a szilíciumorganikus vegyületek egy népes családjával) kapcsolatban. Az elmúlt évtizedekben rengeteg eredmény, tapasztalat halmozódott fel ezen vegyületcsalád előállításával, alkalmazásával kapcsolatban. Szilikonokkal az élet számos területén találkozhatunk, műszaki, élelmiszeripari, és - a jelen munka szempontjából kiemelten fontos - orvosi területen. Felhasználásuk leggyakoribb, és talán legismertebb területe az implantátum technika, ahol felhasználásuk a szervek korrekciójától, pótlásától (pl. szemlencse, ízületek), egészen a kozmetikai beavatkozásokig terjed. A szilikonok sajátos tulajdonságainak köszönhetően az implantátum technikában népszerű, jól bevált anyagok, amely területen a BME Szervetlen Kémia Tanszékén sok évtizednyi szaktudás és tapasztalat halmozódott fel. A tanszéken az

1980-as évek óta foglalkoznak szilikon polimer alapú transzdermális tapaszok fejlesztésével, amelyhez több szabadalom és számos publikáció köthető.

Jelen munkám során a két kutatócsoport tapasztalatait egyesítve végeztem az új típusú fájdalomcsillapító hatóanyagok bőrön át történő bejuttatására alkalmas, szilikon polimer mátrix alapanyagú, megfelelő terápiás tulajdonságokkal rendelkező transzdermális készítmények kifejlesztését, és azok tulajdonságainak vizsgálatát.

Munkám során az alábbi célokat kívántam elérni:

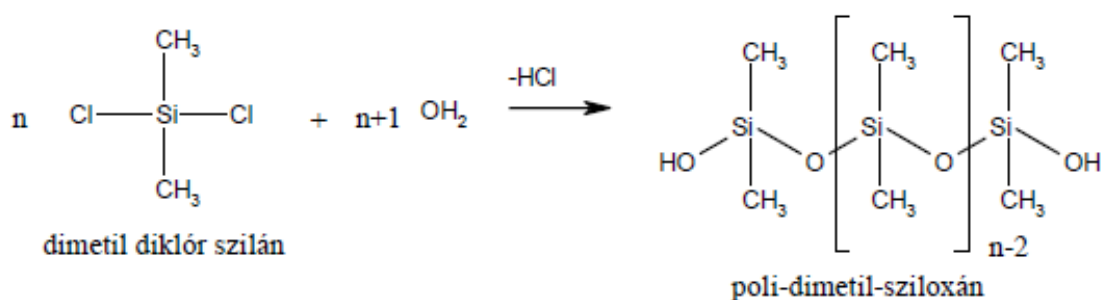
1. Gyógyászati és technológiai is megfelelő szulfidonor vegyület kiválasztása. A vegyület tulajdonságaihoz optimalizált szilikon polimer mátrix rendszer kifejlesztése.
2. A kiválasztott rendszer vizsgálata, minősítése.
3. Kapszaicin hatóanyagtartalmú transzdermális rendszer kifejlesztése, minősítése.
4. A kapszaicin-tartalmú transzdermális rendszer preklinikai vizsgálata *in vitro* és *in vivo* rendszerekben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Szilikon polimerek, kaucsukok

2.1.1. Kémiai szerkezet és tulajdonságok

A hétköznapi nyelvvezetben szilikonokként, azaz pontosabb kémiai megnevezéssel a szerves polysziloxánokként ismert anyagok alapvetően szervesetlen polimerek. A „szilikon” elnevezés F.S. Kipping angol kémikustól származik (ami a kémiai nevezéktan szerint egyébként helytelen név), aki szerves szilíciumkémiai kutatásának kezdetén azt tette fel, hogy a dimetil-diklór-szilán hidrolízisekor az acetonnal (dimetil-ke-ton) analóg szilícium vegyület, a dimetil-szilikon keletkezik: Ez a folyamat azonban, mint később tisztázódott, nem megy végbe, hanem ahogy azt később megállapították, a hidrolízis során dimetil-polisziloxánok keletkeznek. Ellenben a termékeket hagyománytiszteletből továbbra is szilikonoknak nevezték. A szilikon polimer alapvázát a szervesetlen sziloxán-lánc alkotja, ami a szilikátok és a kvarc építőeleme is.



1. ábra: poli-(dimetilsziloxán) sematikus előállítása és képlete

A poli-meta-kovászav típusú polysavak savas hidrogénjeit fém kationokkal helyettesítve a hőálló és hajlékony azbeszthez, átlátszó csillámhoz és a sokféle szilikátokhoz jutunk. A hidroxil-csoportokat szerves (alkil-, aril-, alkenil-) csoportokkal helyettesítve kapjuk a szilikonokat. A dimetil-polisziloxánok a szilikon-elasztomerek, illetve olajok alapanyagai. A szervesetlen alapú szilikátok szerves kombinációi tehát más, új, rugalmas, hidrofób, hideg- és hőálló polimerekhez vezetnek, amelyeknek tulajdonságai lényegesen különböznek a szilikátokétól (azbeszt, üveg, porcelán, cement stb.), inkább a természetes kaucsukokra, műanyagokra emlékeztetnek, azzal a különbséggel, hogy azoknál sokkal szélesebb hőmérsékleti tartományban használhatóak. A szilikon polimerek különböző funkciós monomer egységekből építhetők fel. Ezeknek a monomereknek a kombinálásával (valamint a szerves

csoportok változtatásával) különböző szerkezetű (lineáris, elágazó, térhálós), a legkülönbözőbb fizikai és kémiai tulajdonságokkal (polaritás, olajállóság, lúgállóság, hő- és hidegállóság, térhálósíthatóság) rendelkező termékek állíthatók elő. Így különböző viszkozitású folyadékokra és olajokra, a legkülönbözőbb polimerizációs fokú plasztikus kaucsuk alapanyagokra és a gyantaszzerűen rideg anyagokra oszthatjuk fel a szilikonokat. ¹

A szilikonoknak, különösen a metil-szilikon termékeknek, igen kedvező az úgynevezett vízlepergető (hidrofób) tulajdonsága. Ezáltal porózus hidrophil felületeken (pl. üveg, textil, fa, papír, bőr, vakolat stb.) tartós hidrofób felületet lehet használatukkal kialakítani.²

A szilikonok felületi feszültsége igen kicsi, kb. 20 mN/m. Ebből az is következik, hogy nemcsak vízlepergetők, hanem oleofóbok is, vagyis a legtöbb szerves műanyaggal nem elegyíthetőek.

Ez azt jelenti, hogy azokra nem tapadnak, sőt csúsztatják azokat. Ezért tudja a műanyagipar formaleválasztó anyagként használni a metil-szilikon olaj készítményeket.

A folyékony szilikonok viszkozitása - különösen a metil-szilikon folyadékoké és olajoké - a hőmérséklettől függően csak kis mértékben változik, a paraffin szénhidrogén olajokénál lényegesen kisebb mértékben. A jelenséget azzal lehet magyarázni, hogy a metil-szilikon olajok molekulái alacsony hőmérsékleten a termodinamika törvényei szerint legstabilabb, gömbszerű gombolyag szerkezetet vesznek fel.

Ez a szerkezet a hőmérséklet emelkedésekor elkezd „kitekerekedni”, majd a növekvő felület miatt, a molekulák közötti kölcsönhatások erőssége megnő, és ez ellensúlyozza a viszkozitás csökkenését, amelyet a hőmérséklet emelkedése okoz.

Ha megnöveljük a szilícium atomon levő szerves csoport méretét, pl. a metil-csoport helyett fenil-csoportokkal, akkor az ideális gombolyag szerkezet kialakulását gátoljuk. Ekképpen a viszkozitás hőmérsékleti koefficiense romlik, és közelít a szénhidrogén olajokra jellemző értékek felé.

A szilikon polimereknek nem minden esetben előnyös az a tulajdonsága, hogy nagy az abszorpciós képességük. A szilikon gumik gáz- és vízgőz-áteresztő képessége azonban jól hasznosítható, például a kontaktlencsék alapanyagául használt kopolimerekben a szilikon rész biztosítja a szaruhártya megfelelő oxigén-ellátottságát.

2.1.2. Élettani hatás

A szilikonok fiziológiai szempontból indifferensek, az emberi és állati szövetekre ártalmatlanok, szöveti reakciókat nem okoznak, az enzimatis rendszerek nem tudják megemészteni ezeket, azaz nincs táptalaj effektusuk.

Előnyös tulajdonságaik miatt főleg különböző implantátumok készítésére alkalmasak, mivel:

- hővel, vízgőzzel, plazmakezeléssel, γ -sugárral vagy etilénoxid gázzal sterilizálhatók,
- víztaszítóak,
- nincs haemolizáló hatásuk,
- a morfológiai vizsgálatok szerint szövetbarátok.

Az orvosi gyakorlat számára többféle implantátum és segédeszköz készül szilikonokból. A lágy implantátumok között több olyan van, amelyik szilikonokból készül. ^{3,4}

2.1.3. A szilikon polimerek típusai, a térhálósítás módszerei

HTV (High Temperature Vulcanizing) kaucsukok

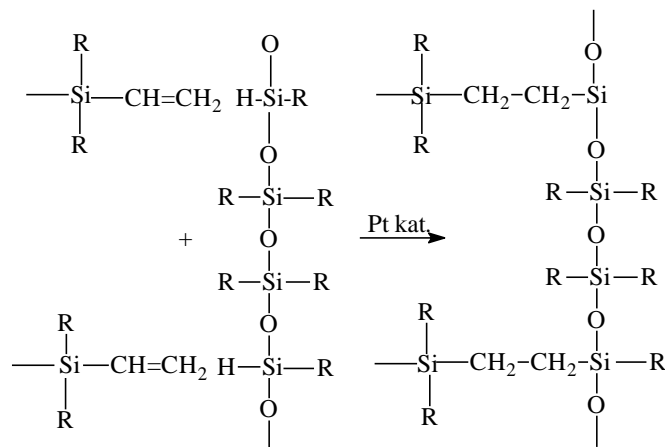
Ezekhez a kaucsukokhoz nagy molekulatömegű, pasztaszerű szilikon polimereket használnak, valamint sok töltő és erősítő anyagot, a térhálósítást pedig peroxid-vegyületekkel végzik, az alábbi reakció szerint:



Erre a célra felhasználhatóak különböző alkil-, aril-, alkoil-, aroil- mono- és di-peroxidok, de használnak még peroxi-szilánokat és cink-peroxidot is. Mint az elnevezés is mutatja, a reakció végbemeneteléhez magas hőmérséklet (peroxidtól függően 100-160 °C) szükséges.⁵ Ezekből az anyagokból elsősorban préselt, fröccspréselt és extrudált ipari forma termékeket (alkatrészek, csövek, szalagok) készítenek.⁶

LTV (Low Temperature Vulcanizing) kaucsukok

Ezek a kaucsukok lehetnek alacsony és magas viszkozitású (folyadék vagy paszta) anyagok, a közös bennük, hogy viszonylag alacsony hőmérsékleten (szobahőmérsékletnél magasabb) térhálósodnak, úgynevezett addíciós mechanizmussal. Ezen mechanizmus lényege a hidroszililezési reakció, amely során a szilikon láncon elhelyezkedő vinil-csoportra addicionálódik a térhálósító komponens Si-H csoportja, az alábbiak szerint:



2. ábra: Az addíciós mechanizmusú szilikonok térhálósodása: A szilikon láncon elhelyezkedő vinilcsoportra (szén-szén kettős kötést tartalmazó funkciós csoport) addicionálódik a térhálósító komponens Si-H csoportja, ezzel a lineáris szilikon láncok között szén-szén keresztkötéseket kialakítva

Addíciós mechanizmus szerint térhálósodó szilikon kaucsukokból léteznek szoba- (RTV) és magas hőmérsékleten (HTV) is térhálósítható termékek, ám magas árak miatt elsősorban csak az egészségügyi ipar használja ezeket, mivel ott a reakció „tisztasága” (semmilyen bomlási és kondenzációs melléktermék nem keletkezik) sokkal fontosabb az alapanyag áránál.¹

RTV (Room Temperature Vulcanizing) kaucsukok

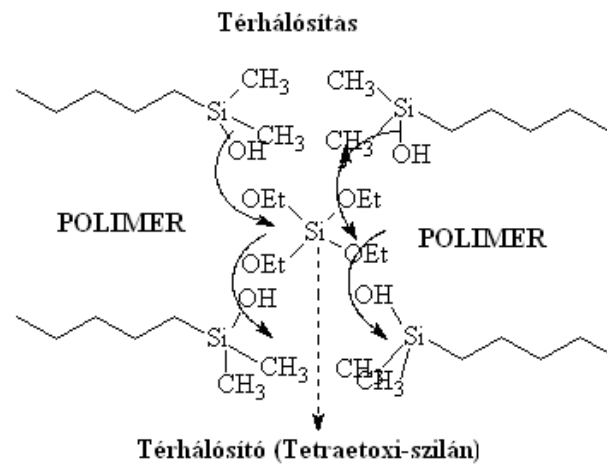
Az úgynevezett RTV-1 és RTV-2 kódjelű, kondenzációval térhálósodó polimereket, ill. pasztákat vázlatosan a következő módon készítik:

Ciklikus, vagy lineáris oligomereket savas, vagy lúgos katalizátorok jelenlétében polimerizálják, ill. polikondenzálják és ilyenkor a célnak megfelelően 1000 - 40000 mPas viszkozitású folyékony, -OH végű, reaktív polimereket állítanak elő.⁷

A megfelelő viszkozitású polimerben a folyékonyság biztosítása érdekében finomra őrölt kvarclisztet, lágyítóként trimetilsziloxi-csoporttal terminált szilikon olajat kevernek össze, így megfelelő folyóképességű pasztát kapnak, amelyet elsősorban formalevételi anyagként

használnak. A térhálósítás tetraetoxi-szilán és dibutil-ón(II)-dilaurát iniciátor keverékével történik.⁸

Az -OH végű láncpolimereket a tetra-etoxi-szilán alkohol kilépésével, szobahőmérsékleten térhálósítja és rugalmas gumi képződik, amelyet elsősorban térkitöltésre és például a fogászatban mintalevonati anyagként használnak:



3. ábra: Kondenzációs szilikon kaucsuk térhálósodása: A lineáris szilikon polimer láncok összekötése tetra-etoxi-szilán és dibutil-ón(II)-dilaurát iniciátor keverékével történik. Az -OH végű láncpolimereket a tetra-etoxi-szilán alkohol kilépésével, szobahőmérsékleten térhálósítja.

2.1.4. A szilikon gumik töltőanyagai, adalékai

A töltőanyagok nélküli, önmagában térhálósított szilikon polimer mechanikai szempontból nagyon korlátozottan használható-végtermék, melynek a szakítószilárdsága az 1 MPa-t sem érné el. Úgynevezett *“aktív” töltőanyagok* alkalmazásával (például a nagy diszperzitású pirogén kvasav /aerosil vagy más néven fehérkorom/, pl.: Wacker T-30) a szakítószilárdság jelentősen javítható. Általában 150-300 m²/g BET felülettel rendelkező 30-50 nm szemcsenagyságú töltőanyag használatos.

Az *“inaktív”* (nem erősítő) töltőanyagokkal egy egész sor egyéb tulajdonság állítható be, mint az önthatóság, Shore-A keménység, E-modulus, vegyszer- és olajállóság. Ilyen töltőanyagok a kvarcliszt, kréta, kaolin, melyek a sziloxán-láncok közötti kohéziós erőket növelik, különösen a fehérkorom esetében, mert hidrogénhíd-kötés jön létre a töltőanyag és a sziloxán-lánc között.

Speciális töltőanyagok segítségével a végtermékkel szemben támasztott további különleges igényeket lehet teljesíteni: *800-1200 BET számú acetilén korommal töltve elektromosan vezetőképessé gumit kapunk*, cink-oxiddal a hővezető képesség növelhető, az alumínium-hidroxid az elektromos erózióállóságért és ívállóságért felelős.⁹

A hőállóság ún. stabilizátorokkal növelhető, ezek közül legismertebb a vas(III)-oxid, továbbá a cérium, mangán, titán és cirkon oxidjai, stb. *Pigmentekkel* tetszés szerinti színárnyalatra színezhethők a szilikonok.

Tapadásközvetítők alkalmazásával a szilikon gumi fémre, vagy műanyagra felvihető és így jól tapadó, rugalmas erőátviteli alkatrészek gyárthatók. Pl.: tengelykapcsoló, ablakszigetelő szilikon szalagok.¹⁰

2.2. Transzdermális terápiás rendszerek

2.2.1. Áttekintés

A transzdermális terápiás rendszerek (TTS) a kényelmes, pontos, biztonságos és fájdalommentes adagolás kiváló módját nyújtják a farmakoterápiában¹¹. Ez a különleges gyógyszerforma az 1970-es években jelent meg, a terápiás gyakorlatban régóta (szinte az őskor óta) bőrön keresztüli hatóanyag bejuttatásra szolgáló kenőcsök, krémek, oldatok koncepciójának továbbfejlesztéseként. Ezen készítmények alkalmazásakor már viszonylag hamar megfigyelték, hogy az így bejuttatott hatóanyag szisztémás hatást is kifejt. A kenőcsök, krémek jelentős hátránya egyrészt az adagolás pontatlansága, másrészt, hogy óhatatlanul szennyeznek a környezetet, a ruházatot. Ennek első megoldása a bekent terület lefedése volt (gyógyszeres kötés, pakolás). Ezen megoldások tekinthetőek a TTS-ek közvetlen őseinek, és a szerkezet finomításával a már megfigyelt szisztémás hatás is elérhetővé vált.

A bőrön keresztüli gyógyszer bejuttatásnak több fontos terápiás előnye is van. Egyrészt a nagy felszívó felület, amelyet a bőr biztosít, másrészt, a hatóanyag a portális keringés, és ezáltal az ún. „first pass effektus” kikerülésével, közvetlenül a szisztémás keringésbe juttatható. (A szájon át (*per os*, p.o.) bevett hatóanyagok többsége a gasztrointesztinális rendszerből történő felszívódás után a májban részben metabolizálódik („first pass effektus”), ezért a hatóanyag csak egy bizonyos mennyisége jut a szisztémás keringésbe). Ebből következően kisebb dózis alkalmazása is elegendő, így az esetleges káros mellékhatások megjelenésének vagy a túladagolásnak az esélye lényegesen kisebb, ami a transzdermális adásmód további

előnye. Ezen kívül – a p.o. bevett gyógyszerformákkal ellentétben, ahol a szükséges segédanyagok a gyógyszer tömegének akár 75-80%-át alkotják (bizonyos esetekben allergénként vagy egyéb módon károsító, zavaró anyagként viselkedve), egy TTS-ből csak és kizárólag a hatóanyag szívódik fel a bőrön át, kis dózisban, és hosszabb időn keresztül folyamatosan. A gyógyszeres terápia egyik alapkövetelménye, hogy a hatóanyag plazmakoncentrációja folyamatos, egyenletes, megfelelő értékű és lehetőleg hosszan tartó legyen. Ez egy viszonylag sok kihívással rendelkező, és bonyolult feladat. A probléma klasszikus megoldása mindenképpen a parenterális (emésztőrendszeren kívüli) adagolás, ám ez alapvetően csak infúzióval, vagy depot (raktár, tartály) injekciókkal oldható meg. Ennek két fő problémája van, egyrészt folyamatos orvosi, de legalább is egészségügyi felügyeletet igényel, így otthon nehezen (illetve nem) megoldható, ezen kívül ezek az adagolási módok fájdalommal, kellemetlenséggel járnak. Ennek kiküszöbölésére lehetséges megoldás az úgynevezett retard (nyújtott hatású) szájon át alkalmazott gyógyszerformák, ám ezek még mindig rendelkeznek a per os adagolás számos hátrányával. Egyrészt a felszívódási profil nagyban függ a gastrointestinalis rendszer állapotától, a hatóanyag megfelelő plazma koncentrációjának biztosítása továbbra is szabályos adagolást, felügyeletet igényel, szemben például azzal, hogy egy jól megkonstruált TTS akár napokig képes a hatóanyagot folyamatos, megfelelő dózisban adagolni.

Az esetlegesen nem megfelelő alkalmazás miatt (például a beteg elfelejti bevenni a tablettát, vagy többet vesz be az előírtnál) létrejövő adagolási hibák is komoly kockázatot jelenthetnek, úgymint a terápiás hatás elmaradása, vagy éppen elenkezőleg, túladagolás vagy mérgezés. A transzdermális terápiás rendszerek alkalmazása esetén ezeknek a problémáknak lényegesen alacsonyabb a kockázata. Fontos ugyanakkor, hogy a TTS-eknek is léteznek bizonyos alkalmazási korlátai, amelyeket a rendszer tervezése, fejlesztése során figyelembe kell venni. A fő korlátozó tényezők a hatóanyag fizikokémiai paraméterei: sajnos nem minden hatóanyag felel meg azon perem-feltételeknek, melyek a sikeres transzdermális alkalmazáshoz szükségesek. Néhány alapvető, gyakorlati szabály: kismolekulás hatóanyag (jellemzően 1000 Dalton alatti molekulatömeg), viszonylag alacsony olvadáspont (150°C alatti), valamint a lipofil karakterű közegben (maga a tapasz mátrixa, valamint a bőr felsőbb rétegei) és a hidrofil közegben (véráram, szövetek, szöveti folyadék) való egyaránt megfelelő oldhatóság.^{12–15}

2.2.2. A különböző transzdermális terápiás rendszerek típusai

A transzdermális terápiás rendszerek szerkezetük vagy kémiai összetételük alapján csoportosíthatók. Kémiai összetételük alapján a következőképpen oszthatók fel: hidrofil jellegű szerves kopolimerek (pl. poliolkok, poliéterek stb.) és szilikon alapú rendszerek (hidrofób vagy módosított amfifil szerkezet), utóbbiak a dolgozat szempontjából kiemelt fontosságuk miatt az előző fejezetben részletesen be lettek mutatva.

Fontosabb szerves polimerek amelyeket TTS-ek gyártására használnak ^{16,17} :

Cellulóz: Az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló biopolimer, mivel mint poliszacharid, széles körben megtalálható a természetben. Különböző cellulózszármazékok, mint például a hidroxipropil-metilcellulóz (HPMC), fizikai-kémiai térhálósító komponenseket tartalmaznak, ezzel elérve, hogy az anyag hidrogéllé formulálható legyen. A cellulózszármazékok közül a HPMC-t széles körben használják széleskörű elérhetősége, könnyű felhasználhatósága és jó biokompatibilitása miatt, kiváló filmképző képessége és biológiai lebonthatósága miatt. A gyógyszeriparban általában gyógyszerhordozó mátrixként használják, de az egyik legérdekesebb cellulózalapú polimer tapasz alapanyagként.

A HPMC-t a legfontosabb hidrofil vivőanyagként tekintik a szabályozott hatóanyag-leadó rendszerek előállításához. A HPMC egyik jelentős tulajdonsága a magas duzzadási képessége, amely jelentős hatással van a hatóanyag felszabadulási kinetikájára.

Kitozán: A kitozán a cellulóz után a legnagyobb mennyiségben előforduló polimer. Ez egy természetes eredetű, alapvetően tengeri ízeltlábúakból előállított, biokompatibilis, bifunkcionális és biológiailag lebomló amino-poliszacharid. Figyelemre méltó tulajdonságai alkalmassá teszik bizonyos orvosi alkalmazásokra, többek között a gyógyszeripar számára. Ellenben fontos megjegyezni, hogy a kitozán filmek gyenge mechanikai tulajdonságai, vízállósága és alacsony hőstabilitása problémássá teszi, mint TTS alapanyag. Ezen hátrányok kiküszöbölésére a kitozánt sokszor szintetikus vagy természetes polimerrel keverik.

Dextrán: A dextrán egy természetes vízben oldódó polimer, amely alapvetően elágazásokat tartalmaz, előállítása kémiai módszerekkel vagy baktériumok segítségével történhet. A polimer vízoldható formáját jelenleg orvosi környezetben használják. A hidroxilcsoportok túlzott mennyisége miatt a polimer szerkezetében a hidrogél forma kialakításához szükséges egy specifikus térhálós kötőanyag. A dextránnak van néhány hátránya, többek között a magas költség. Emellett súlyosabb anafilaxiás tüneteket okozhat. A reakciókat a dextrán természetes eredetéből fakadó és nehezen eltávolítható reaktív antitestjei

okozzák, amelyek a vazóaktív mediátorok felszabadulását indítják el. Előfordulásuk csökkenthető különböző kémiai előkezeléssel.

Nátrium-alginát: A nátrium-alginát egy természetes és anionos makromolekula. Nem mérgező, bőségesen előforduló (költséghatékony), biológiailag lebomló, megújuló, biokompatibilis és korlátozottan vízálló. Ezen kívül az alginát szövetkompatibilis, és felhasználható a TTS-ek előállítására, gyógyszerek szabályozott kibocsátása céljából.

Ezen előnyök miatt az alginát nagy figyelmet kapott az orvostudományban. Az alginátnak van néhány hátránya is, többek között a mechanikai tulajdonságok változékonysága (amely a természetes eredetre vezethető vissza) és az ionok kimosódása, amelyek instabilitáshoz vezetnek.

Poli(kaprolaktám): A poli(kaprolaktám) a félkristályos szintetikus poliészterek csoportjába tartozik. A polimer viszonylag olcsó és nem mérgező, ami előnyös választás az orvosbiológiai alkalmazásokban való felhasználásra.

Akrilát kopolimerek: Az akrilpolimerek akrilsav, metakrilsav és ezek észtereinek, valamint az akrilamid és az akrilnitril polimerei. A metakrilsav észterei képezik az akrilgyanták alapját, amelyeket orvosi eszközökhöz használnak. A metil-metakrilátot alkalmazzák a legtöbbször a többi monomerhez képest, ez egy szerves vegyipar által óriási volumenben előállított, olcsó, könnyen hozzáférhető alapanyag. Előnyeik még a viszonylag jó mechanikai tulajdonságaik. A hátrányai az akrilátoknak a mindig a térhálós polimerben visszamaradó monomer tartalom, amely erősen mérgező, és irritatív hatású, ezt mindig figyelembe kell venni, és valahogy ki kell küszöbölni ha TTS-ként akarjuk használni.

Sztirol-etilén-butilén blokkopolimerek: Ezen kopolimerek biokompatibilis elasztomerek. Termoplasztikusak, a triblokk kopolimerekből készült elasztomerek azért érdekesek, mert magas hőmérsékleten folyékonyak, de szobahőmérsékleten elasztomerként viselkednek. Van néhány előnyük, mint például az, hogy kiküszöbölhető a térhálósítás. A megerősített formulák megfelelnek a transzdermális tapaszok fejlesztéséhez szükséges követelményeknek, mivel kielégítően teljesítik a biofarmáciai tulajdonságokat és megfelelő mechanikai tulajdonságokat mutatnak.

Poli(vinil-pirollidon): A poli(vinil-pirollidon) avagy povidon egy amorf, higroszkópos, szintetikus polimer. Ez egy lineáris, nem ionos, és vízben oldódó polimer. Széles körben használják a kozmetikumokban, a gyógyászatban, és gyógyszer hordozóként jó oldhatósága, és a gyógyszerkészítményekkel való kompatibilitása miatt. Bár népszerű kozmetikai összetevőként ismert, és gyógyszeripari segédanyagként is bevált, van néhány ismert hátránya,

amely korlátozza a használatát. A povidon és származékainak ismert hibái a következők: súlyos allergiás reakciók, bőr alatti granulómák.¹⁸

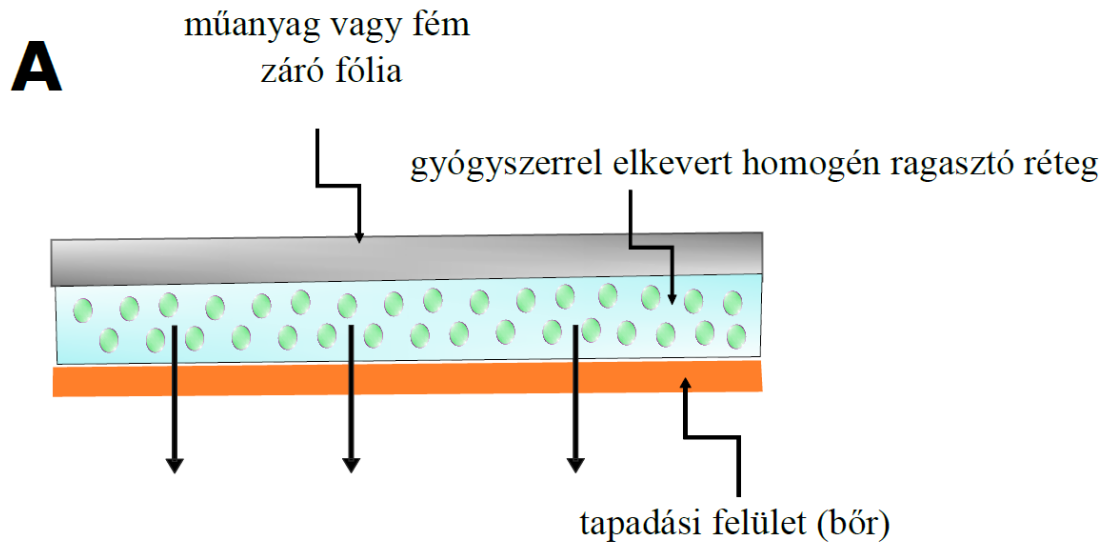
Szerkezetük szerint lehetnek:

Passzív TTS-ek, amikor a hatóanyag bejutása a bőrfelületbe való beoldódás útján történik (kiforrott, nagy tömegben alkalmazott technológiák)^{19,20}

1. Egy, illetve több rétegű adhéziós polimer-diszperzió alapú (4. ábra)
2. Membrán-szabályozott („reservoir”) típusú (5. ábra)
3. Polimer mátrixon keresztüli diffúzióval szabályozott (6. ábra)
4. Mikroresevoir típusú rendszerek. (7. ábra)

Aktív TTS-ek, amikor a hatóanyag bejutását valamilyen egyéb módszerrel javítjuk, gyorsítjuk (kísérleti, illetve legalábbis nagyon új, kiforratlan technológiák):

5. Iontoforézis alapú rendszerek
6. Mikrotűs rendszerek

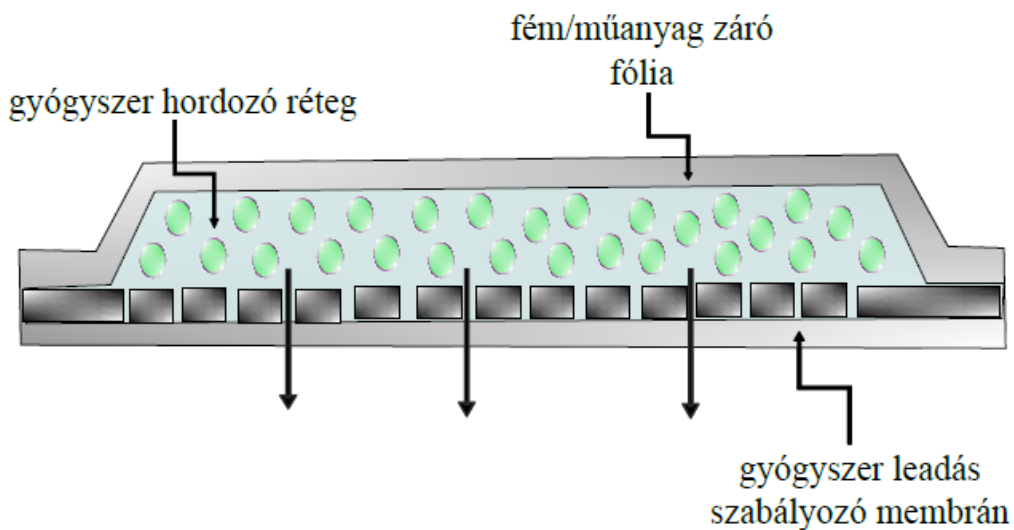


- 4. ábra:** Az adhezív polimer-diszperziós rendszer vázlatos felépítése: A hordozó fóliára (alumínium, vagy hatóanyagot át nem eresztő polimer fólia) felvitt, a bőrhöz való tapadást biztosító, nyomásérzékeny ragasztó réteg (pressure sensitive adhesive PSA), és az abba belekevert gyógyszer-hatóanyag

Az adhezív polimer-diszperziós rendszerek a TTS-ek legkorábbi, legegyszerűbb variációi. Ezen rendszerek kiválóak abból a szempontból, hogy szerkezetük csak egy hordozó fóliára (alumínium, hatóanyagot át nem eresztő polimer fólia) felvitt, a bőrhöz való tapadást biztosító, nyomásérzékeny ragasztó rétegből (pressure sensitive adhesive PSA), és az abba belekevert gyógyszer-hatóanyagból áll. A hatóanyag-leadás úgy történik, hogy a farmakon az egyszerű mátrix diffúzió szabályai szerint kiáramlik a tapaszból, és eljut a felszívódás helyére. A rendszer előnye a viszonylag egyszerű felépítés, ezáltal az egyszerű gyárthatóság, a manapság roppant népszerű, részben hagyományos tapasztalaton alapuló, gyógyszernek nem minősülő tapasz készítmények szinte minden esetben ezt a felépítés követik. A megoldás fő hátránya, hogy a kialakításából adódóan a gyógyszer felszabadulásának kinetikája egyáltalán nem egyenletes, a terápia kívánalmaknak való megfelelés nem igazán optimális.

A szakirodalom némely helyeken külön altípusként, mint úgynevezett „vapor tapasz” hivatkozik az ilyen, hatóanyagként illóolajokat, vagy más könnyen párolgó anyagot tartalmazó tapaszokra.

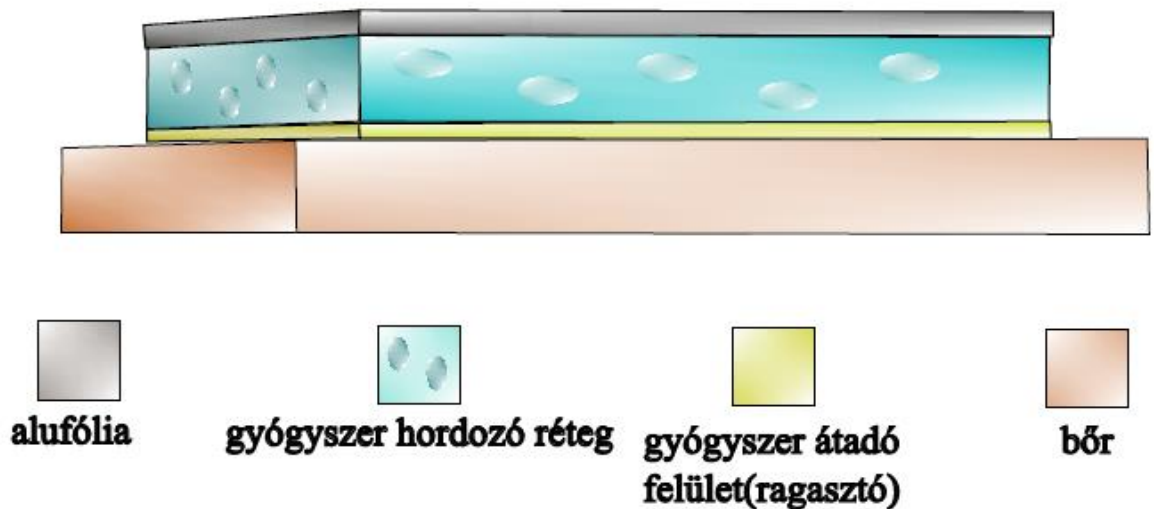
Ezen megoldásokra különösen jellemző a kiszámíthatatlan, de legalább is szabálytalan hatóanyag-leadás, a rendszer egyszerű továbbfejlesztése a több rétegű adhezív polimer diszperziós rendszerek megalkotása, amelyeknél már jóval erőteljesebben szabályozható a hatóanyag-leadás. Ezen tapasztalások úgy készülnek, hogy több, a bőrtől távolodva egyre nagyobb mennyiségű hatóanyagot tartalmazó réteget építenek egymásra. A felépítés lényege, hogy a növekvő diffúziós utat a hatóanyag növekvő koncentrációja kompenzálja. Ezen felépítéssel jó esetben elérhető már az optimálist közelítő leadási profil, ám értelemszerűen az előállítás bonyolultsága, illetve a tapasztalás vastagsága az előző típushoz képest növekszik.



- 5. ábra:** A membrán-szabályozott rendszer, amelynek felépítése a következő: a hatóanyag egy át nem eresztő (fém vagy műanyag anyagú) záróréteg és egy hatóanyagot meghatározott mennyiségben átteresztési képes (szabályozó hatású) polimer membrán között helyezkedik el.

A gyógyszerleadás szempontjából a membrán-szabályozott rendszerek rendelkeznek a legkedvezőbb tulajdonságokkal. Az ilyen típusú tapasztalások általános felépítése a következő: a hatóanyag egy át nem eresztő (fém vagy műanyag anyagú) záróréteg és egy hatóanyagot meghatározott mennyiségben átteresztési képes (szabályozó hatású) polimer membrán között helyezkedik el. A hatóanyagot a két réteg között vagy szilárd hordozó anyagban (poliizobutilén, nagy polimerizációs fokú poliol, stb.) diszpergált formában, vagy a membránon átoldódni nem képes folyékony segédanyagban (például szilikon olaj, polietilén-glikol) oldott formában helyezik el.

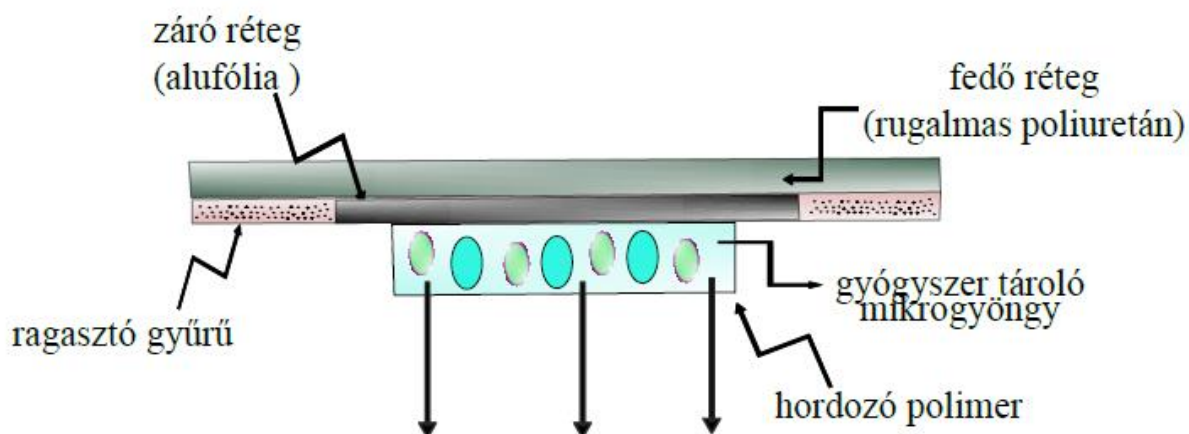
A membrán bőrrel érintkező felületét a lehető legvékonyabb rétegben adhezív réteggel vonják be, ez biztosítja a tökéletes érintkezést. Az 1970-es, '80-as években a komolyabb kockázattal rendelkező hatóanyagok bejuttatására szolgáló transzdermális készítmények közül ilyen típusúak voltak az első, nagy mennyiségben elterjedt és bevált gyógyszerformák. Így elmondható, hogy ezek a rendszerek jól beváltak, sok klinikai és technológiai tapasztalat halmozódott fel velük. Egyetlen hátrányuk, hogy a gyógyszer folyékony fázisban van a szabályozó membrán alatt. Ez azt a kockázatot rejti, hogy ha a membrán a gyártás vagy az alkalmazás alatt megsérül, a hatóanyag tényleges fizikai-kémiai kontroll nélkül áramlik ki, amely komoly terápiás kockázatot rejt magában (túladagolás, mérgezés). Ezen kívül alkalmazhatósági korlátot jelent az, hogy az ilyen típusú TTS nem vágható, a dózis mennyisége nem változtatható meg, a gyártás során meghatározott dózis-mennyiséggel kell az alkalmazó orvosnak kalkulálni.



6. ábra: A nem adhezív polimer mátrixon keresztüli diffúzióval szabályozott TTS, a hatóanyag egy megfelelően kiválasztott polimer mátrixban van oldva, esetleg egyenletesen diszpergálva. Ilyenkor a hatóanyag-leadás a mátrix (keverék) összetételével nagyon pontosan beállítható.

A nem adhezív polimer mátrixon keresztüli diffúzióval történő szabályozás esetén, a hatóanyag egy megfelelően kiválasztott polimer mátrixban van oldva, esetleg egyenletesen diszpergálva. Ilyenkor a hatóanyag-leadás a mátrix (keverék) összetételével nagyon pontosan beállítható.

Az elkészült keverékből meghatározott geometriájú formatesteket készítenek, majd a hatóanyag leadó részen túlnyúló zárórétegen elhelyezett adhezív réteggel oldják meg a tapasz bőrfelülethez való rögzítését. Ezzel a megoldással sikeresen kiküszöbölhető a membrán szabályozott rendszerek fő problémája, a szabályozó membrán sérülése esetén előforduló túlzott hatóanyag kiáramlás, hiszen ezen rendszerek esetén a hatóanyag-leadási profil a tömbfázisú hordozómembránból a bőrfelületre való kioldódás határozza meg. A mátrix-segédanyag-hatóanyag rendszerrel könnyedén beállítható nulladrendű, de akár egészen bonyolult kinetikájú hatóanyag-leadási profil is, ez szintén a rendszer előnyös tulajdonságai közé tartozik. Ezen tapaszok erős hátránya - a membrán rendszerekhez hasonlóan - a darabolhatóság, és ezáltal a flexibilis dozirozhatóság hiánya.



7. ábra: A „mikroreservoir” tapasz-típus is a vastagabbak közé tartozik, a hatóanyag-leadás kinetikáját a rendszer bonyolultsága okán több fizikai kémiai paraméter határozza meg. A rendszer felépítése vázlatosan a következő: a hatóanyagot egy hidofil (vizes fázisú) polimer oldatban szuszpendálják, majd ezt a keveréket homogénean diszpergálják egy hidrofób karakterű (poliuretán, szilikon-származék, stb.) mátrix polimerben.

A két jellemző jól kombinálható a „mikroreservoir” típusú rendszerekben. Ez a tapasz-típus is a vastagabbak közé tartozik, a hatóanyag-leadás kinetikáját a rendszer bonyolultsága okán több fizikai kémiai paraméter határozza meg. A rendszer felépítése vázlatosan a következő: a hatóanyagot egy hidofil (vizes fázisú) polimer oldatban szuszpendálják, majd ezt a keveréket homogénean diszpergálják egy hidrofób karakterű (poliuretán, szilikon-származék, stb.) mátrix polimerben. A roppant instabil, mikrocseppekből álló rendszert a hidrofób mátrix

gyors térhálósításával stabilizálják. A szintén pontosan definiált formatestekre itt már felvisznek egy egész felületet beborító adhezív réteget (általában szilikon alapanyagú nyomásérzékeny ragasztót (PSA)). A kioldódás itt egy roppant bonyolult fizikai-kémiai egyenletekkel leírható folyamat, mivel lényegében minden hidrophil csepp/hidrofób mátrix határvonal egy membránfelületnek tekinthető, és meghatározó paraméter a két fázisban való megoszlási hányados, valamint a csepp, és ezáltal a membrán mérete. A paraméterek – oldhatósági viszonyok a két fázisban - beállításától függően a kioldódási kinetika mozgatóereje lehet a megoszlás, vagy a diffúziós sebesség. A gondosan beállított paraméterű tapasztalás esetén megoldható egy szinte tökéletesen nulladrendű hatóanyag-leadási kinetika. Bizonyos korlátozásokkal, de ezen kialakítás esetén már megoldható a darabolhatóság.

Aktív TTS-ek

Az iontoforézis egyszerű meghatározás szerint olyan elektromos potenciál alkalmazása, amely állandó elektromos áramot tart fenn a bőrön keresztül, és fokozza az ionizált, valamint a nem ionizált molekulák bejuttatását. Ez a technika képes a bőrön keresztül bejuttatható vegyületek körének bővítésére. A máj first pass effektusának megkerülésével és a betegekkel szemben kíméletesebb eljárással járó előnyök mellett az iontoforézis technika számos további előnnyel bír. Például lehetővé teszi a gyógyszer folyamatos vagy pulzáló adagolását (az alkalmazott áramtól függően). Ezen kívül gyógyszeradagolás könnyebben leállítható, a beadott gyógyszer mennyisége ellenőrizhetőbb, mivel a beadott vegyület mennyisége az alkalmazott áramtól, az alkalmazott áram időtartamától és az áramnak kitett bőrfelületről függ. Valamint a poláros molekulák és a nagy molekulatömegű vegyületek bejuttatásának javítása és ezek szisztémás vagy helyi (lokális) adagolásának képessége. Jelentősen csökkenti az egyén közötti és az egyénen belüli gyógyszer szint változékonyságot, mivel a hatóanyag-leadás sebessége jobban függ az alkalmazott áramtól, mint a felhám jellemzőitől.²¹

A mikrotűk ultra-kisméretű tűkből álló tömbök, amelyek jellemzően mikrométeres hosszúságúak (1000 mikrométernél kisebbek), amelyek pórusokat hoznak létre, és lehetővé teszik a gyógyszerek helyi bejuttatását a bőrbe vagy a bőrön keresztül a szisztémás keringésbe. A hagyományos injekciós tűkkel ellentétben a mikrotűk mikrodimenziós és fájdalommentes gyógyszer bejuttatási utakat tesznek lehetővé.

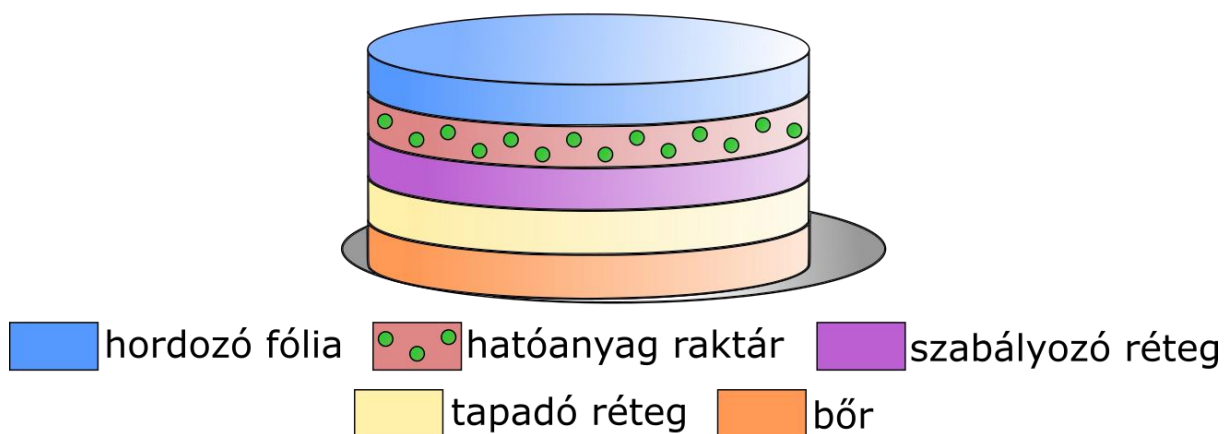
A mikrotűk jobb betegellátást eredményezhetnek, elősegítik a beteg számára a gyógyszeres kezeléshez való alkalmazkodást, mivel nem stimulálják a fájdalommal járó

idegeket, és a tütől féltő betegek nagyobb valószínűséggel használják a mikrotűket, a fájdalommentesség és a minimális invazivitás miatt. Az irodalom alapján öt csoportra oszthatjuk őket tovább: szilárd, bevonatos, üreges, hidrogél és feloldódó.²²

2.3. Szilikon polimerek alkalmazása TTS-ként

A módosított szilikon-polimer alapú rendszerek jól kontrollált és költséghatékony mátrix diffúziós rendszert biztosítanak. A jelen dolgozatban ezzel az eljárással készített, különböző hatóanyagokat tartalmazó transzdermális tapaszokat fejlesztettünk és vizsgáltuk tulajdonságaikat (8. ábra).

Több rétegű szilikon polimer alapú TTS



8. ábra: Módosított szilikon-polimer alapú TTS

Ez a TTS típus több rétegből áll²³. A mátrix-rendszerben a gyógyszer polimer rétegbe van ágyazva, és ezt a réteget a hatóanyagra nézve eltérő diffúziós tulajdonságú, gyógyszermentes szabályozó réteg borítja. A kontrollált hatóanyag-felszabadulási profilt a koncentráció gradiens pontos beállításával lehet elérni a két réteg különböző diffúziós állandói alapján.

A szilikon polimerek alaptípusa a reaktív végcsoportokkal rendelkező dimetil-polisziloxán (PDMS), ami egy lineáris szilikon-polimer és térhálósítva rugalmas szilikogumivá alakul. A PDMS jól használható hordozó mátrixként, térhálósítására két gyakorlati jelentőségű módszer létezik: kondenzációs és addíciós. A kondenzációval előállított polimerekben Si-O-Si kötések a keresztkötések. Az addíciós technika esetében a Si-C-C-Si-kötések biztosítják a keresztkötéseket a PDMS-láncok között.

A kondenzációs polimerek orvosi célokra való felhasználását bonyolítja, hogy az egészségügyben megkívánt követelményeknek megfelelő térhálósító katalizátor előállítására nehéz és drága folyamat.

A módosított szilikon-polimer alapú rendszereket munkacsoportunk fejlesztette ki ^{11,24}, és jól szabályozható és költséghatékony mátrixdiffúziós rendszert biztosít (**8. ábra**). A szilikongumi alapú rendszerünk újdonsága több okból fakad. A szilikon-rendszereknél nem kell membrán, ha van "üres" réteg, akkor az telítődik a hatóanyaggal és ennek állandó telítettsége biztosítja a hatóanyag-leadás állandóságát. A szilikon-polimerek alapja a hidroxilvégződésű dimetil-polisziloxán, egy lineáris vagy organoszilikon polimer, amely keresztkötésekkel rugalmas szilikongumit képezhet. Ezt az anyagot használtuk hordozómátrixként. Az addíciós polimerek szerkezetét nehéz módosítani, míg a kondenzációs polimerek térhálós szerkezetét könnyebb megváltoztatni. A végső mátrixszerkezet könnyen módosítható különböző adalékanyagokkal, hogy javuljon a hatóanyag és a mátrix keveredése. A kondenzációs szilikon-polimer két fő komponensből állítható elő: lineáris, szilanol végződésű dimetil-polisziloxánból és tetraetoxi-szilánból. ^{25(p20)}

A mátrix optimális összetételét egyértelműen jelzi a hatóanyag diffúziós tulajdonsága a mátrixban, amely jól leírható a diffúziós állandóval.

Az addíciós polimerek térhálós szerkezete sokkal alkalmasabb orvosi felhasználásra (**2. ábra**). Ennek az oka, hogy a végső szerkezet csak magát a biológiailag indifferens poli(dimetilsziloxán) láncokat tartalmazza, valamint a térhálósodás folyamatának katalizátorát, amely nem más, mint fém platina, ami szintén biológiailag indifferens, gyógyászatban használt anyag. A végső mátrixszerkezetet különböző adalékokkal lehet módosítani. Ez javíthatja a hatóanyag és a mátrix keveredését. Az addíciós szilikon polimer két fő komponensből állítható elő: vinil-csoportokat tartalmazó lineáris PDMS-ből (ami platina vegyületet, katalizátort is tartalmaz), és a térhálósítóból, amely hidroszilán (Si-H csoportot tartalmazó) vegyület. A hatóanyag és a segédanyagok beépülnek a TTS polimerbe. A segédanyagok megválasztásánál fontos megjegyezni, hogy ha aminocsoportot (-NH₂ funkciós csoport) tartalmazó vegyületet alkalmazunk, az inaktíválja a platina katalizátort, aminek következtében a térhálósodási reakció nem megy végbe, ez egy fontos limitáló tényező a társítható anyagok megválasztásánál ennél a típusú szilikon polimernél. A viszkózus keverék (az összetételtől függően) körülbelül 30-60 perc alatt térhálósodik 70 °C hőmérsékleten. A vékony szilikon polimer gyenge mechanikai

tulajdonságai miatt hordozó rétegre van szükség. Erre a célra általában fém-, vagy polimer fóliát alkalmaznak széles körben. A polimer keveréket egyrétegű terítési módszerrel lehet felvinni a hordozó rétegre (9. ábra). Az ábrán látható készülék a BME-VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén került kifejlesztésre, valamint ott is készült el, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Gépészmérnöki Karával (BME-GPK) együttműködésben, a készülékhez, és alkalmazott technológiához több szabadalom is fűződik. A berendezés egyszerre egy 25 x 40 cm területű tapasz réteget képes elkészíteni. A réteg maximális vastagsága 2 mm, pontossága 0,05 mm lehet, így egy igen precíz és rugalmasan alkalmazható berendezésről beszélhetünk.



9. ábra: Készülék a polimer egyrétegű szétterítésére: A berendezés egyszerre egy 25 x 40 cm területű tapasz réteget képes elkészíteni. A réteg maximális vastagsága 2 mm, pontossága 0,05 mm lehet

2.4. A krónikus fájdalom háttere és az analgetikus terápia kihívásai

2.4.1A fájdalom patomechanizmusa

A heveny fájdalom a szöveti sérülés és a gyulladás egyik legfontosabb jellemzője. Klinikailag a gyulladást öt kardinális tünet jellemzi: rubor (bőrpír), calor (fokozott hő), tumor (duzzanat), dolor (fájdalom) és functio laesa (funkcióvesztés). Az akut gyulladás egy védekező

válaszreakció, amelyben immunsejtek, erek és molekuláris mediátorok (gyulladásos mediátorok) vesznek részt. A gyulladás funkciója a sejsérülés eredeti okának megszüntetése és a szövetek helyreállításának beindítása. Az akut fájdalom, más néven nociceptív fájdalom, a gyulladás egyik kardinális jellemzője. Az ismert gyulladásos mediátorok többsége úgy okoz fájdalmat, hogy a perifériás idegrendszerben található nociceptív primer afferens neuronok (nociceptorok) receptoraihoz kötődik, amelyek a sérült bőr-, izom- és ízületi szöveteket innerválják. Az ízületi gyulladás, idegsérülés, daganatos megbetegedés és kemoterápia utáni krónikus fájdalom krónikus neuroinflammációval, a perifériás vagy központi idegrendszerben kialakuló helyi gyulladással jár. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a nem neuronális sejtek, például az immunsejtek, a gliasejtek, a keratinociták, a daganatos sejtek és az őssejtek aktív szerepet játszanak a fájdalom patogenezisében és feloldásában ²⁶.

A krónikus fájdalom jelentős klinikai és társadalmi-gazdasági probléma, a világ népességének egyötödét érinti ²⁷. A krónikus fájdalmat tartós nociceptív túlérzékenység jellemzi ²⁸, amelyet a betegek a fájdalom kiváltásához szükséges küszöbértékek jelentős csökkenéseként élnek meg, így az ártalmatlan ingerek fájdalmat okoznak (allodínia), valamint a káros ingerekre adott válaszok felerősödnek a sérülés helyén (elsődleges hiperalgécia) és a környező szövetekben (másodlagos hiperalgécia) ²⁹. A krónikus fájdalom gyakran perifériás szövetkárosodás és tartós gyulladás (gyulladásos fájdalom), vagy a perifériás vagy központi idegrendszer kóros adaptációjának (neuropátiás fájdalom) következménye ³⁰.

A szomatoszenzoros idegrendszert érintő sérülések vagy betegségek paradox módon nemcsak funkcióvesztéshez, hanem fokozott fájdalomérzékenységhez és spontán fájdalomhoz is vezethetnek. Ez a neuropátiás fájdalom, amely általában krónikus, azaz vagy folyamatosan fennáll, vagy visszatérő fájdalmas epizódokkal jelentkezik. A fájdalom etiológiailag különböző, a perifériás vagy a központi idegrendszert érintő rendellenességekből eredhet. Az ok lehet anyagcsere-betegség (pl. diabéteszes neuropátia), neurodegeneratív, vaszkuláris vagy autoimmun betegség, tumor, trauma, fertőzés, toxinoknak való kitettség vagy örökletes betegség. A krónikus fájdalom ismeretlen etiológiájú neurológiai állapotokban, pl. idiopátiás neuropathiákban is előfordul ³¹. A neuropátiás fájdalom mechanizmusairól szerzett jelenlegi ismeretek nagyrészt állatmodelleken alapulnak. Az, hogy a fájdalom mennyire erősen manifesztálódik egy adott neurológiai betegségben, változó. A fájdalom lehet a betegség legmarkánsabb vagy egyedüli megnyilvánulása, mint például a posztherpeszes neuralgiában, vagy előfordulhat, hogy csak az azonos betegségben szenvedő betegek egy alcsoportjában

jelentkezik, mint például a kemoterápia által kiváltott perifériás neuropátiák esetében. Még az azonos neuropátiás fájdalom kiváltó okkal rendelkező betegek között is általában eltérőek a fájdalmas tünetek és jelek ³². Ha azonban a neuropátiás fájdalom jelen van, gyakran okoz jelentős szenvedést és korlátoltságot.

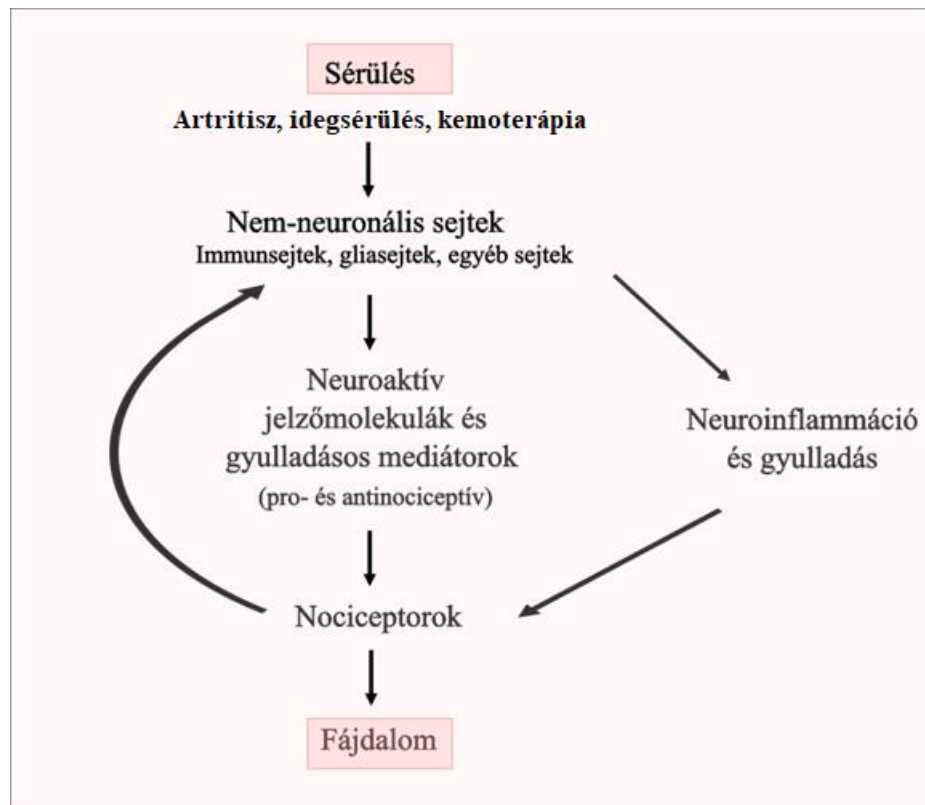
A neuropátiás fájdalom gyanúja esetén specifikus vizsgálatok szükségesek. Amennyiben a fájdalom az idegrendszerből ered, akkor annak lokalizációja megfelel a szomatoszenzoros idegrendszer mögöttes elváltozásának vagy betegségének. Előfordulhat, hogy a fájdalom nem az érintett perifériás ideg vagy gyök teljes innervációs területén érezhető, vagy a fájdalom némileg túlterjed ezeken a határokon. A neuropátiás fájdalom gyanúját más diagnosztikai paraméterek is megerősíthetik. Ezek a jelek szenzoros deficitet vagy eltúlzott reakciókat jelezhetnek a normálisan fájdalmas (hiperalgémia) vagy fájdalommentes ingerekre (allodínia). A neuropátiás fájdalom biztos diagnózisához az ok bizonyítása szükséges, pl. a perifériás neuropátiát megerősítő neurofiziológiai vizsgálatok vagy a gerincvelő sérülését követően a szomatoszenzoros rostpályák érintettségét mutató képalkotó eredmények ^{33,34}.

2.4.2. A neuropátiás fájdalom kezelési módjai

A neuropátiás fájdalom kezelése a nagy kihívást jelent, mert a hagyományos fájdalomcsillapító hatóanyagok, azaz az analgetikumok betegnél nem nyújtanak kielégítő terápiás választ ³⁵, ráadásul a terápia farmakológiai és nem farmakológiai megközelítéseket egyaránt magában foglal. Sajnos, a jelenlegi analgetikus terápiás lehetőségek elégtelenek, nem nyújtanak megfelelő fájdalomcsillapítást és számos egészségügyi és társadalmi káros hatást okoznak. Egy 2020-as felmérés szerint a kezelés alatt álló krónikus fájdalommal küzdő betegek több mint fele arról számolt be, hogy kevésbé vagy egyáltalán nem tudja kontrollálni a fájdalmát ³⁶. A jelenlegi terápiás stratégiák hatástalansága legalábbis részben annak köszönhető, hogy a krónikus fájdalomállapotokban szerepet játszó mechanizmusok egy része tisztázatlan.

A nemzetközi evidence-based medicine eredmények alapján a gabapentin, a pregabalin, a szerotonin- és noradrenalin-visszavétel gátlók, valamint a triciklikus antidepresszánsok az elsőként választandó gyógyszerek. A lidokaint vagy kapszaicint felszabadító bőrtapaszok és a botulinum toxin szubkután (s.c.) injekciója helyi kezelési lehetőségeket kínál. A nem szteroid gyulladáscsökkentők (Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs, NSAID-ok) sajnos nem hatékonyak a neuropátiás eredetű fájdalom ellen. Az opioidokat általában olyan betegek számára tartják fenn, akik nem reagálnak az alacsonyabb mellékhatásokkal rendelkező terápiás

alternatívákra ³⁵. Az értékelés és kezelés e különleges követelményei megkövetelik a neuropátiás fájdalom pontos megjelenítését a vonatkozó klinikai állapotok diagnosztikai osztályozásában ³⁷.



10. ábra: A nem-neuronális sejtek, neuronok és a gyulladás/neuroinflammáció közötti kölcsönhatások különböző fájdalomállapotokban különböző noxák hatására. A nem neuronális sejtek különböző irányokban modulálhatják a fájdalmat azáltal, hogy pro- vagy antinociceptív mediátorokat termelnek ²⁶.

A krónikus fájdalom kialakulása és fenntartása a központi idegrendszer számos területén bekövetkező hosszú távú változásokkal jár, amelyeket sejt- és molekuláris szintű adaptációk jellemeznek ³⁸.

2.4.2. Szulfiddonor molekulák

A hidrogén-szulfid (H_2S) egy ubiquiter gáznemű neurotranszmitter, amely bizonyítottan kulcsszerepet játszik a központi és perifériás idegrendszer különböző élettani folyamataiban, például a fájdalom modulációjában és a gyulladásban is ³⁹.

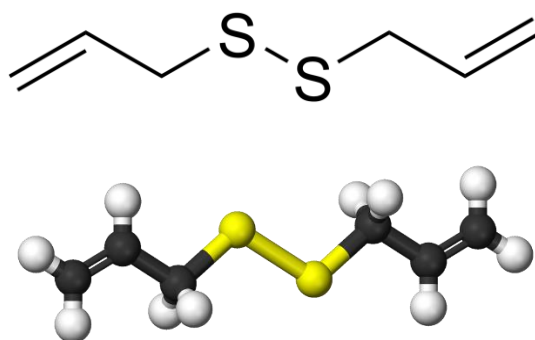
Az endogén és exogén eredetű szulfidok számos biológiai folyamatot, jelátviteli útvonalat modulálnak, beleértve az energetikai diszfunkciókat, apoptózist, gyulladási válaszokat és oxidatív stresszre adott válaszokat.⁴⁰ A hidrogén-szulfidnak a krónikus fájdalom modulációjában betöltött szerepe azonban ellentmondásos, azaz lassan felszabadulva védőfunkciókat lát el, de gyorsan felszabadulva pro-inflammatorikus hatásokat fejt ki ⁴¹. Ezzel összefüggésben a közelmúltban végzett vizsgálatok bebizonyították, hogy a lassan felszabaduló H_2S -donorok exogén adagolása csillapította az osteoarthritis okozta és a neuropátiás fájdalmat, így ezek a vegyületek potenciális terápiás eszközzé válhatnak a gyulladási fájdalom kezelésében ⁴². Más vizsgálatok egyéb lassan felszabaduló H_2S -vegyületek, például a diallil-diszulfid (DADS) antinociceptív hatását is kimutatták az osteoarthritis vagy az idegsérülés okozta neuropátiás fájdalom modelljeiben ⁴³. Egyes vizsgálatok szerint a H_2S donorjainak szisztémás adagolása enyhíti az akut, valamint a neuropátiás fájdalmat ^{44 45}. A H_2S inhalálása szintén hatékonyan bizonyult a neuropátiás fájdalom csillapításában ⁴⁶. A megfelelő antinociceptív hatás eléréséhez a H_2S -nek lassan kell felszabadulnia bármely szulfiddonor molekulából ⁴¹.

A lassan felszabaduló szulfiddonor molekulák tárolására és felszabadítására képes optimális hordozórendszerek hiánya azonban továbbra is kihívást jelent a farmakoterápiában, főként a rövid plazma felezési idő, a gyenge stabilitás és a kényelmetlen beadási módok miatt ⁴⁷.

A szulfiddonor molekulák a természetben előforduló szerves kénvegyületek (OSC) és szintetikus H_2S -donorok csoportjába sorolhatók ⁴⁷. A természetes OSC-k közé tartoznak a fokhagyma (*Allium sativum*) farmakológiailag aktív összetevői, mint például a rendkívül reaktív allicin és annak allilszulfid-származékai. Az allilszulfidok figyelemre méltóan stabilabbak, mint az allicin, és képesek H_2S -t felszabadítani fiziológiai körülmények között ^{48,49}. Ezenkívül a fokhagymából származó OSC-k szerkezeti hasonlóságot mutatnak az allil-izotiocianáttal (AITC, amely a mustárolajban található), és képesek a peptiderg primer afferens neuronok AITC-érzékeny alpopulációjának izgatására a Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin

1 (TRPA1) receptor aktiválásán keresztül⁵⁰. A H₂S és donorvegyületeinek potenciális klinikai alkalmazása a gyógyszerkutató fókuszában van⁴⁷.

A fokhagyma allil-szulfidvegyületei közül a diallil-diszulfid (DADS) számos kémiai, élettani és gazdasági előnnyel rendelkezik. Természetes vegyület, amely könnyen hozzáférhető, reprodukálható és elérhető áron beszerezhető. Ezenkívül stabil, és lassan felszabaduló H₂S-donornak tekinthető⁵¹. Ami a biológiai-élettani funkciókat illeti, számos jótékony hatást mutattak ki, többek között gyulladáscsökkentő, antioxidáns, antinociceptív és neuroprotektív hatásokat⁵². Állatkísérletekben az orálisan vagy intraperitoneálisan beadott DADS csillapította a traumás neuropátiás és krónikus gyulladással járó fájdalmat^{53,54}. A klinikai gyakorlatban azonban rendkívül lényeges, hogy a beadás melyik útja biztosítja a leghatékonyabb és legkényelmesebb kezelést a beteg számára, ami felveti a szulfiddonor molekulák esetleges transzdermális alkalmazásának szükségességét. Mivel a H₂S-nek lassan kell felszabadulnia a donorvegyületekből a fájdalomcsillapító hatás elérése érdekében⁴¹, a megfelelő TTS létrehozására van szükség a lassan felszabaduló szulfiddonor molekulák hordozásához és felszabadításához.



11. ábra: DADS kémiai és 3D struktúrája

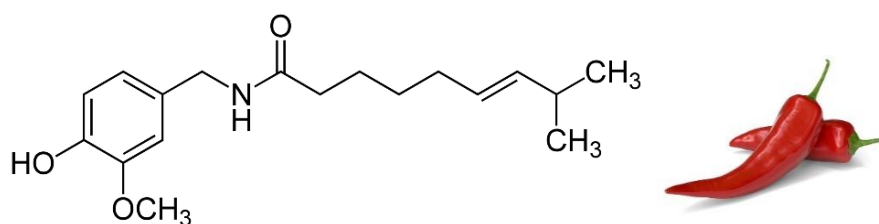
A fent említett előnyös tulajdonságai miatt a DADS-ot választottuk modellvegyületnek erre a célra. A DADS helyileg történő beadásához megfelelő hordozót kell választani. A legegyszerűbb módszer a zúzott fokhagyma felvitele a fájdalmas területre, de valamivel fejlettebb módszer a kenőcs formájában történő alkalmazás. Ennek azonban több hátránya is van: a kenőcs elszínezi a ruhát és erős szaga van (a DADS és a rokon vegyületek illékonyága miatt), ami kellemetlen érzést okozhat.

Mivel a hatóanyag mennyisége és adagolási sebessége egyik módszerrel sem jól szabályozható, ezért valamilyen szilárd, könnyen kezelhető, stabil hordozóanyagot kell

kifejleszteni a hatóanyag számára. Erre a célra szinte magától értetődő a gyógyszeres tapaszforma alkalmazása. Problémát jelenthet azonban, hogy az ismert, bevált tapaszformák többsége valamilyen poláris jellegű gyógyszermolekulák hordozására szolgál. Ez azért problematikus, mert a DADS erősen apoláros, hidrofób jellegű ⁵⁵. Megoldásként a hordozórendszernek egy poli(dimetilsziloxán) polimer mátrixot választottuk, amelyet ritkán használnak erre a célra ⁵⁶. Ellenben jelen esetben pont a szilikon polimer alkalmazása jelenti a megoldást, mivel mint a 2.1.1. fejezetben ismertettem, a szilikonok erősen apoláros jellegű anyagok. Így a „hasonló a hasonlót oldja” fizikai-kémiai alapelv alapján egy PDMS mátrix nagyobb mennyiséget, homogén eloszlásban képes hordozni a DADS-ból.

2.4.3. Kapszaicin és annak terápiás felhasználása

A kapszaicin (transz-8-metil-*N*-vanillil-6-nonénamid) a chilipaprikában és a paprikafélék családjába tartozó hasonló növényekben található hatóanyag. Ezek a növények 0,01-0,02% kapszaicint tartalmaznak, gyakori élelmiszer-adalékanyagok.



12. ábra: Kapszaicin kémiai struktúrája és kapszaicint tartalmazú csípőspaprika.

A kapszaicin gyógyászati előnyeit már több mint százötven éve feltételezik, és számos tanulmányt végeztek állatokon és embereken, hogy megértsék klinikai felhasználását ⁵⁷. A kapszaicin helyi alkalmazása égő fájdalmat okoz az embereknél, ezért farmakológiai eszközként használták a standardizált kísérleti fájdalom előállítására embereknél és kísérleti állatokban. A szisztémásan és lokálisan adagolt kapszaicin akut és hosszú távú farmakológiai hatásait több emlős fajnál is alaposan vizsgálták. A topikális kapszaicin okozta nocicepció vizsgálatát megbízható modellként is alkalmazzák az újonnan kifejlesztett fájdalomcsillapító vegyületek hatékonyságának tesztelésére ⁵⁸.

Fontos, hogy erős algogén hatása ellenére a kapszaicint régóta használják fájdalomcsillapítónak, történelmi adatok alapján már i.e. 7000-ben alkalmazták paprika alapú (kapszaicin tartalmú) készítményeket. A csípős paprika alkoholos kivonatának fájdalomcsökkentő tulajdonságairól szóló első történelmi emlék a fogfájás kezelését említi mint terápiás alkalmazást⁵⁷. Több évtizedes kutatás és fejlesztés után a bőrön keresztül alkalmazott

(topikális bejutattási mód) kapszaicint mint nem opioid fájdalom csökkentő hatóanyagot azonosították, amely kevés mellékhatással enyhíti a fájdalmat.⁵⁹ Emellett a lokális kapszaicin terápiás alkalmazását számos más állapotra is kiterjesztették, például a pikkelysömörös viszketésre, az elhízásra, az urológiai, légúti, szív- és érrendszeri, valamint gyomor-bélrendszeri rendellenességekre és a rákra⁵⁷.

Amióta a kapszaicin farmakológiai alkalmazása a 19. század közepén megkezdődött, a lokális kapszaicin számos különböző koncentrációban és formában, többek között gélekben, krémekben, spray-kben és tapaszokban kapható. A lokális kapszaicin formulái a korai fejlesztés során alacsony koncentrációkat (0,025-0,075 m/m%) tartalmazó krémek és kenőcsök voltak, gyakori és folyamatos alkalmazást igényeltek hosszabb időn keresztül, pl. napi 3-4 alkalmazást legalább hat héten keresztül, ám a tanulmányok eredményei kissé ellentmondásosak voltak⁶⁰. Ám ez betudható annak, hogy a krém forma bőrön keresztüli bejuttatásra sokkal kevésbé megbízható, mint egy modern transzdermális terápiás rendszer, példaként említve egy szilikon polimer alapú TTS-t.

Mivel a szisztémás terápiákat krónikus fájdalom esetén potenciálisan súlyos mellékhatások (pl. kognitív zavarok és szédülés) kísérik, gyakran nem kielégítő fájdalomcsillapítás mellett,⁶⁵ a perifériás idegrendszer rendellenességei miatt fellépő neuropátiás fájdalom enyhítésére gyakran helyi kezeléseket (pl. kapszaicin és helyi érzéstelenítők) alkalmaznak⁶⁶.

A magas dózisban (8 m/m%) kapszaicint tartalmazó transzdermális tapasz (Qutensa) hatásmechanizmusa hogy deszenzitiválja a fájdalomérző idegvégződéseket az alkalmazás helyén, ezért alkalmas neuropátiás fájdalmak (például diabétesz, herpesz) csillapítására⁶¹. A lokális alkalmazást követően elért szisztémás koncentrációk tartományában (<58 nM) a kapszaicin nem indukálja vagy gátolja a citokróm P450 enzimeket a májban, és valószínűleg nem befolyásolja más gyógyszerek metabolizmusát sem⁶². Így a helyileg alkalmazott kapszaicin nem mutat gyógyszer-kölcsönhatásokat, és biztonságosan alkalmazható más általánosan használt fájdalomcsillapítókkal kombinálva. A topikális kapszaicin csak szerény mellékhatásokat mutat, amelyek közül a leggyakoribbak a vérnyomás kis mértékű átmeneti emelkedése, valamint helyi reakciók, mint például égő fájdalom, erythema és viszketés az alkalmazás helyén^{63 64}.

A kapszaicint a Nemzetközi Fájdalomkutató Társaság Neuropátiás Fájdalom Szakcsoportja (Neuropathic Pain Special Interest Group of the International Association for the

Study of Pain) másodvonalbeli gyógyszerként ajánlja a perifériás neuropátiás fájdalom kezelésére³⁵.

A lokális kapszaicin biztonságossága tehát jól validált, és kis koncentrációk esetén nem is jellemzőek az olyan mellékhatások, mint a kezeléskor bekövetkező járulékos fájdalom, az erythema vagy a hőérékenység csökkenése. Ezért kevésbé jelentenek komoly problémát⁵⁷, mivel megfelelő bejuttatási rendszerrel, például jól szabályozott TTS-el tovább csökkenthető a kockázat.

A kapszaicin transzdermális tapaszban történő alkalmazása optimális a nagy bőrfelületek célzott kezelésére, míg a fókuszált elváltozásokba (pl. Morton-neuroma vagy intraorális posztoperatív fájdalom) bejuttatható kapszaicint tartalmazó injekciók fejlesztés alatt állnak⁶⁷. A kapszaicin által kiváltott fájdalomcsillapítás neurobiológiai mechanizmusainak megértése fontos a terápia további javításához.

A kapszaicin-indukált analgézia kiváló modellt a nociceptív primer afferensek krónikus fájdalomállapotok kialakulásához és fenntartásához való hozzájárulásának vizsgálatára is. A kapszaicin különböző dózisaival különböző mértékű és időtartamú analgéziát eredményeznek a primer afferens végződések működésére és szerkezetére gyakorolt eltérő hatások révén. Az alacsony dózissal kapszaicinnal elért átmeneti szerény fájdalomcsillapítás a kapszaicinreceptorok deszenzitizációját és az idegvégződések rövid távú defunkcionalizációját foglalja magában, míg a nagy dózissal kapszaicinnal elért, több hónapig tartó, tartós fájdalomcsillapítás az afferens végződések ablációján keresztül történő hosszú távú defunkcionalizáció közvetítésével jön létre. A neuropátiás fájdalom analgetikus kezeléséhez az axonális végződések kapszaicin által közvetített TRPV1/Ca²⁺/kalpain-mediált ablációja szükséges. A jövőben kapszaicin indukálta analgézia hátterében álló molekuláris mechanizmusok feltárása javítani fogja a neuropátiás fájdalom perifériás mechanizmusainak megismerését⁵⁷.

Kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok a kereskedelemben is kaphatóak. A bemelegítő hatás elérése érdekében, sporttevékenység előtt használva növeli a lágyrészek véráramlását. A kapszaicin jótékony hatása a peptiderg nociceptor idegvégződésekben levő Tranziens Receptor Potenciális Vanilloid 1 (TRPV1) ioncsatornák aktiválásán alapul, ami neuropeptidok felszabadulását okozza. A kapszaicint tartalmazó krémek és kenőcsök hátránya, hogy alkalmazásuk során szennyezik a kezét, és a megfelelő kézmosás elmaradása esetén

irritálhatja a nyálkahártyákat és a szemeket. Ez különösen problémás a kontaktlencsét viselő egyéneknél.

2.4.4. Alacsony koncentrációjú kapszaicin alkalmazása transzdermális terápiában

Számos, elsősorban helyileg alkalmazható, kapszaicin tartalmú gyógyszer és gyógyhatású készítmény kapható kereskedelmi forgalomban, melyeket főleg ízületi és izomfájdalmak enyhítésére használnak (pl. Dr. Chen, Capsicole, Salonpas Hot stb., kapszaicin tartalmuk 0,025-0,1 % között van). Ezek azonban a kapszaicint csak a felületi bőrrétegbe juttatják be, és az adagolás módja sem szabályozható.

Ismert olyan alacsony kapszaicin koncentrációjú (<0,1%) tapasz is, amely neuropátiás fájdalom kezelésére szolgál, azonban ebből a kapszaicin kioldódása rövid távú és nem egyenletes.

3. A kísérletekhez felhasznált módszerek és anyagok

3.1. Szulfid típusú hatóanyagokat leadó transzdermális rendszerek fejlesztése

3.1.1. Vegyszerek

A propilén-glikolt (a.r.), polietilén-glikolt (a.r.), ként (lab. grade) és nátrium-szulfidot (lab. grade) a Reanal cégtől vásároltuk. A tetrabutil-ammónium-jodidot (98.0 %) és az allil-bromidot (98.0 %) a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk.

Az R-5 és R-20, kondenzációs keresztkötésű polidimetilsziloxán-(α , ω)-diol, Oxam katalizátor és M350 polidimetilsziloxán olaj a T-Silox Kft-től, élelmiszeripari minőségben, Magyarországról származott.

Minden reagens és anyag tisztítás nélkül került felhasználásra.

3.1.2. Műszeres vizsgálatok

Az előállított diallil-diszulfid tisztaságát és szennyező profilját az alábbi műszeres módszerekkel vizsgáltuk:

Az IR-spektrumokat egy Perkin Elmer Spectrum Two FTIR műszerrel vettük fel, UATR fejjel.

Az ^1H NMR spektrumokat CDCl_3 oldatban, szobahőmérsékleten, Varian Unity Inova 500 spektrométeren (500 MHz az ^1H NMR spektrumokhoz) vettük fel, az oldószer deutérium jelét zárójelként, TMS-t pedig belső standardként használva. A kémiai eltolódások (d) és a csatolási állandók (J) ppm-ben, illetve Hz-ben vannak megadva.

A tömegspektrumokat (MS) GC/MS QP- 2010 spektrométerrel (EI, 70 eV) vettük fel. A diallil-diszulfid analízisét GC/MS QP - 2010 tömegspektrométerrel végeztük. A használt kapilláris oszlop ZB5-MSI 30 m hosszú és 0,25 mm átmérőjű volt. A körülmények a következők voltak: az oszlop hőmérséklete 80 °C-on kezdődött, majd 250 °C-ra emelkedett; hordozógázként héliumot használtunk 1 ml/perc lineáris áramlással.

A HPLC-MS méréseket egy Shimadzu LCMS-2020 készülékkel végeztük, amely Reprospher 100 C18 (5 μm ; 100x3 mm) oszloppal és pozitív-negatív kettős ionforrással (DUIS \pm) felszerelt, négypólusú MS analizátorral volt felszerelve 50-1000 m/z tartományban. A kromatográfiás elválasztást gradiens elúcióval végeztük, az A eluens (0,1 % hangyasav vízben : acetonitril 19:1) és a B eluens (0,1 % hangyasav vízben : acetonitril 1:19) használatával. Az áramlási sebességet 1 ml/perc értékre állítottuk be. A kezdeti állapot 0% B eluens volt, majd 1 percig lineárisan 100 % B eluensre váltottunk, 1-től 3,5 percig 100 % B eluens maradt; majd

3,5-től 4,5 percig visszatértünk a kezdetihez közeli állapothoz 5 % B eluenssel és 5 percig tartottuk. Az oszlop hőmérsékletét szobahőmérsékleten tartottuk, az injektálási térfogat 1 μ l volt.

3.1.3. Diallil-diszulfid előállítása

Először nátrium-diszulfid-oldatot készítettünk kénnel és nátrium-diszulfiddal az alábbiak szerint: 6,4 g (0,2 mol) ként, 48 g (0,2 mol) nátrium-szulfidot, és ezt 150 ml desztillált vízben oldottuk fel egy gömb lombikban. Az oldatot kevertettük és egy órán át 60 °C-on melegítettük, majd szobahőmérsékletre hűtöttük, és papírszűrőn szűrjük. A barnászörös színű oldathoz 0,5 g tetrabutyl-ammónium-jodidot adtunk fázistranszfer-katalizátorként. 36,3 g (0,3 mol) allil-bromidot cseppenként adtunk hozzá 20 perc alatt, és a reakcióelegy hőmérsékletét növeltük. A hozzáadás után a reakcióelegyet jéggel hűtöttük. A kapott elegyet 300 ml dietil-éterrel extraháltuk. A szerves fázist egy éjszakán át vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk. A szerves fázist rotációs vákuumbepárlókészülékkel pároltuk be az oldószer eltávolítására. Ezután a maradék fázist alacsony vákuumban desztilláltuk. A frakciót 45-60°C-on és 106 Pa-on gyűjtöttük. 25,8 g világossárga színű, intenzív fokhagymaszagú olajat kaptunk, amely 88,3 %-os hozammal a diallil-diszulfid volt.⁵⁶

A funkciós csoportot FTIR (UATR, cm^{-1}) segítségével azonosítottuk: 3081 (=C-H); 3009 (-CH₂); 2979 (-CH₂); 1634(C=C); 1422(C-S);

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3,33(d, 4H), 5,16(m, 4H), 5,84(m, 2H)

Ezek után megmértük az anyag oldhatóságát, a klasszikus módszer szerint, egy kémcsőbe addig adagoltuk az oldószert a vizsgált anyaghoz, amíg egy fázis nem alakult ki.

oldhatóság propilén-glikolban: 0,05 g DADS /g propilénglikol

oldhatóság polietilén-glikol 400-ban: 0,3 g DADS /g polietilénglikol 400-ban

oldhatóság M-350 metil-szilikonolajban: 0,4 g DADS/g olajban

3.1.4. Szilikonmembránok előállítása

A kísérletekben használt membránmintákat teflon lapon állítottuk elő. Az M-350 szilikonolajat poli-dimetil-sziloxán-(α,ω)-diol R-5 és R-20 oligomerben oldottuk. Ezt követően keverés mellett Oxam keresztkötőt adtunk a keverékhez. A keverékeket homogenizáltuk és 0,4 mm vastagságban a teflonasztalon elterítettük. A filmet szobahőmérsékleten térhálósítottuk. A mintákat 72 órán át pihentettük, majd ezt követően megvizsgáltuk. A fejlesztési munka során

kipróbáltunk egy kisebb viszkozitású, így rövidebb polimer láncú, ezzel nagyobb térháló sűrűségű mátrixot eredményező lineáris polimert (Oxam R-5), valamint egy nagyobb viszkozitásút (Oxam R-20).

Az előkísérletek alapján a nagyobb viszkozitású (Oxam R-20) lineáris polimer bizonyult az alkalmasabbnak a további fejlesztési munkákra, az ebből készült minták összetételét az alábbiakban közöljük.

A minták összetétele a következő volt:

R-5: 85-95 m/m %

Oxam: 5 m/m%

M-350 szilikonolaj: 0-10 m/m %

R-20: 80-90 m/m %

Oxam: 10 m/m%

M-350 szilikonolaj: 0-10 m/m %

3.1.5. Diállil-diszulfid tartalmú transzdermális tapaszok előállítása

A kísérletekben használt TTS-mintákat 0,4 mm vastagságú alumínium fóliára laminált papír rétegre öntve állítottuk elő. A DADS-ot a szilikon kaucsukba kevertük. Alapanyagunk a polidimetilsziloxán-(α , ω)-diol R-20 volt. A DADS-ot M350-ben feloldottuk és a szilikon alapanyaghoz adtuk. Miután az összetevőket lemértük, keverés mellett Oxam keresztkötőanyagot adtunk a keverékhez. A keverékeket homogenizáltuk és 0,4 mm vastagságban a hordozófóliára terítettük. A réteg térhálósítása szobahőmérsékleten történt, a térhálósodási idő 30 perc volt. A mintákat 48 órán át pihentettük, majd ezt követően megvizsgáltuk. A fejlesztési munka során nagyságrendileg 20 különböző mátrix összetétel kipróbálása után jutottunk el az *in vitro* tesztlésre alkalmas összetételekhez, amelyeket az alábbiakban közlünk.

Az *in vitro* tesztelt minták összetétele a következő volt:

R20: 83 m/m%, 78m/m%,

Oxam: 10 m/m%

M350 szilikonolaj: 5 m/m%, 10 m/m%.

DADS: 2 m/m%

3.1.6. A membrán diffúzió mérése

A DADS diffúziós tulajdonságait a szilikon (PDMS) membránon keresztül egy *in vitro* membránpermeációs rendszer segítségével vizsgáltuk. A membrán vastagságát és olajtartalmát változtattuk, és mind az időeltolódást, mind az állandósult permeációs sebességet mértük. A membránt a membrán permeációs rendszer két félcellája közé helyeztük el.

Összesen 25 ml foszfát-puffer sóoldatot 25 m/m% etanollal (PBS-E25) hatóanyag nélkül helyeztünk a receptor térbe. A donor fázisba összesen 10^{-3} M DADS-ot tartalmazó PBS-E25-t adtunk. Minden előre meghatározott időpontban mintát vettünk, és UV/VIS spektrofotométerrel (Perkin-Elmer Lambda 25) 207 nm-en vizsgáltuk a mintát. A DADS tartalmat előzetesen felvett kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

$$D = \frac{l^2}{6 t_0}$$

- 1. egyenlet:** Diffúziós állandó számítása Daynes időeltolódásos módszerével. Ahol D : a diffúziós állandó; l : a membrán vastagsága, t_0 : a késleltetési idő

Az időeltolódást és az állandósult permeációs sebességet a koncentráció vs. t profilokból határoztuk meg. A diffúziós állandókat az időkésleltetésből határoztuk meg az (1.) egyenlet segítségével⁶⁸.

3.1.7. A DADS-tartalmú transzdermális tapaszok *in vitro* hatóanyag leadásának mérése

Az *in vitro* vizsgálatokat kétféle módon végeztük. Először egy indikatív mérést végeztünk egy Franz-cellában, amely a statikus és vertikális szubkután hatóanyag kioldódást modellezi. A második módszerrel a tapaszokat egy átfolyócellás eszközben vizsgáltuk, amely a vérben oldódó gyógyszerkoncentrációt utánozza.

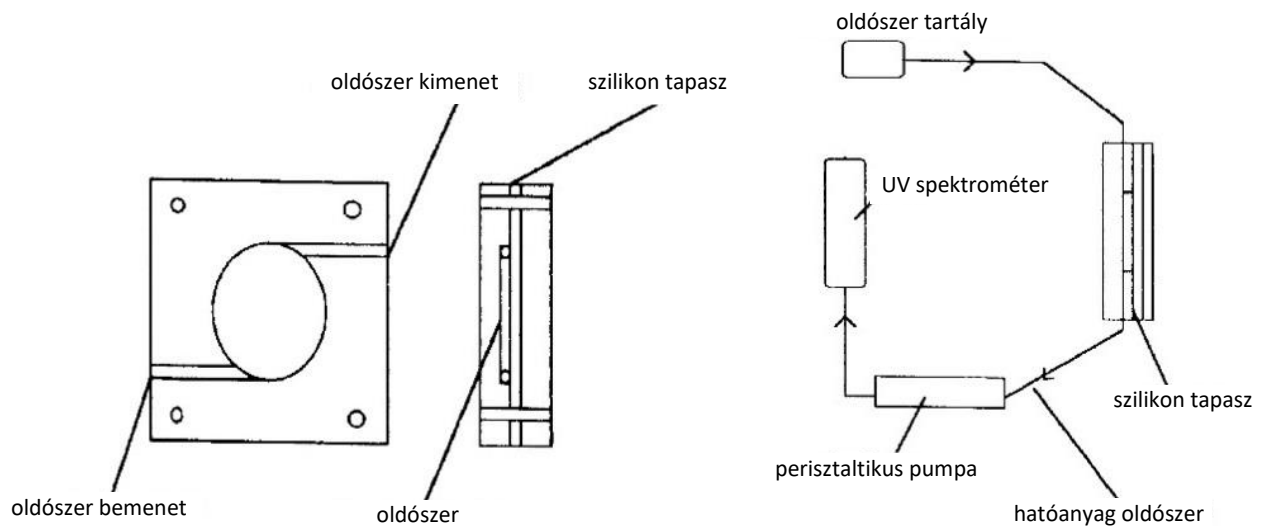


13. ábra: Franz típusú kioldódás mérő cella: A készülék a BME Üvegtechnikai műhelyében készült, irodalmi leírások alapján⁶⁹

Mérés a Franz-cellában

In vitro hatóanyag leadási vizsgálatokat (In Vitro Release Test, IVRT) végeztünk, ehhez egy módosított, helyben gyártott Franz típusú diffúziós cellát használtunk a tapasztalásból történő DADS leadás modellezésére IVRT esetén.

A receptor fázis foszfát puffer (PBS pH $7,4 \pm 0,15$) 25% m/m etanol tartalommal volt szobahőmérsékleten. A vizsgálat 3 órán át tartott, a keverési sebesség 450 rpm volt. A hatóanyag koncentrációját spektrofotométerrel (Perkin-Elmer Lambda 25) 207 nm-en vizsgáltuk.



14. ábra: Átfolyócella

Mérés az átfolyócellában

A tapaszok mintáit (egyenként $12,56 \text{ cm}^2$) $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ -on, átfolyócellában vizsgáltuk a hatóanyag leadás megállapítása céljából (**14. ábra**). Az áramlási sebesség (PBS, 25% etanol) 25 ml/h volt, és a DADS-tartalmat óránként határoztuk meg spektrofotométerrel (Perkin-Elmer Lambda 25); a vizsgálat 6 órán keresztül tartott.

3.2. Kapszaicin hatóanyagot leadó transzdermális rendszerek fejlesztése

3.2.1. Vegyszerek

A glicerint (Ph. Eur.), a poliszorbát 20-at (Ph.Eur.) és a kalcium-karbonátot (a.r.) a Molar cégtől vásároltuk.

Az RT-601A+B addíciós térhálósítós szilikon polimer a Wacker Gmbh-tól került beszerzésre. A kapszaicin (min. 95 %) a Chillies Export House Limited-től került beszerzésre.

Minden reagens és anyag, tisztítás nélkül került felhasználásra.

3.2.2. A kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok előállításához szükséges előkísérletek

A kapszaicint tartalmazó rendszer kifejlesztése során az előző fejezetekben, a diallil-diszulfid tartalmú rendszer kifejlesztéséhez használt elővizsgálati módszereket (3.1.2., 3.1.3., 3.1.4., 3.1.6.) alkalmaztuk. A kapszaicines rendszer fejlesztését bonyolította, hogy a kémiailag eltérő mátrix miatt végül szükségessé vált kétféle segédanyag okán jóval többféle mátrixösszetételt kellett vizsgálnunk.

Általános leirat a membrán diffúziós elővizsgálatok során használt minta összetételekhez:

Glicerín	0 -15 m/m%
RT-601 A	76-90 m/m%
RT-601 B	7,6-10m/m%

Általános leirat a kioldódási elővizsgálatok során használt minta összetételekhez:

Kapszaicin	0,1-1 m/m%
Glicerín	0,5-15 m/m%
Poliszorbát 20	0,5-10 m/m%
RT-601 A	66-81 m/m%
RT-601 B	7,4-9,9 m/m%

3.2.3. Kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok előállítása

Az állatkísérletekben használt TTS mintákat 0,04 mm vastag, alumínium fóliára laminált papír fólián készítettük el. Alap polimerünk az RT-601 A volt (ami polidimetil-(α , ω)-divinil-sziloxán láncokat és térhálósító katalizátort tartalmaz). A kapszaicint gliceriben, melegítés közben oldottuk, majd belekevertük a szilikon alapanyagba. Kalcium-karbonáttal

hígított kristályos kapszaicint is adtunk keverékünkhöz. Szükség esetén további folyékony glicerint is adtunk a mátrixhoz és emulgensként poliszorbát 20-at is adtunk keverékünkhöz.

Az elegyhez keverés közben RT-601 B térhálósítót adtunk, majd homogenizáltuk azt, ezután 0,4 mm vastagságban a hordozófoliára terítettük. A réteget 70 ° C hőmérsékleten térhálósítottuk. A művelet 60 percig tartott. Ezt követően erre a rétegre egy második, szabályozó réteget terítettünk, amely nem tartalmazott kapszaicint, csak glicerint és poliszorbátot. A második réteget ezután 70 ° C hőmérsékleten, 60 percig térhálósítottuk. A mintákat 48 órán át pihentettük, és utána megvizsgáltuk. Nagyságrendileg 40 féle előkísérleti recept kipróbálása után jutottunk el két olyan lehetséges összetételhez, amelyet alkalmasnak ítéltünk az állatkísérleti tesztekhez. Az állatkísérletekhez végül kétféle összetételben készítettük el a tapaszokat, egy alacsonyabb (1 mg/g kapszaicin) és egy magasabb (2,3 mg/g kapszaicin) hatóanyagtartalmú mintát.

A minták összetétele 1 mg/g és 2,3 mg/g volt a következők szerint:

1. táblázat: Az állatkísérletekhez felhasznált tapaszok bemérési táblázata

	Alacsony dózisú kapszaicin tapasz	Nagy dózisú kapszaicin tapasz
1. réteg 0,4 mm vastagságú		
Kapszaicin triturációja	3,60 m/m%	8,36 m/m%
Kapszaicin oldat	3,75 m/m%	5,58 m/m%
Glicerin	13,16 m/m%	10,52 m/m%
Poliszorbát 20	3,95 m/m%	5,69 m/m%
RT 601 A	69,32 m/m%	62,84 m/m%
RT 601 B	7,83 m/m%	6,98 m/m%
2. réteg (szabályozó) 0,1 mm vastagságú		
Glicerin	12,05 m/m%	11,88 m/m%
Poliszorbát 20	4,0 m/m%	3,43 m/m%
RT 601 A	74,21 m/m%	76,21 m/m%
RT 601 B	9,69 m/m%	8,46 m/m%
Összes kapszaicin	1 mg / g tapasz	2,3 mg / g tapasz



15. ábra: Az elkészült tapaszok, állatkísérletekhez előkészítve (3X6 cm méret), a stancoló szerszámmal

3.2.4. A kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszok *in vitro* hatóanyag leadásának mérése

Az *in vitro* vizsgálatokat kétféleképpen végeztük. Először egy validált Franz cellában mértünk⁶⁹, amely modellezi a statikus és vertikális bőrön keresztüli gyógyszer felszívódást. A második módszerben a tapaszokat átáramló cellás eszközzel vizsgáltuk, amely utánozza az oldott gyógyszer koncentrációjának változását a vérben, hasonlóan a DADS tartalmú tapaszok vizsgálatához.

A hatóanyag leadás és a bőrön keresztüli permeáció vizsgálata Franz diffúziós cellával

In vitro hatóanyag leadási tesztek (IVRT) és *in vitro* permeációs tesztek (IVPT) végeztünk. Franz típusú diffúziós cellát (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, USA) használtunk a tapaszokból származó kapszaicin felszabadulásának modellezésére az IVRT vizsgálatok során, és humán hőelvásztott epidermiszen (HSE) keresztüli gyógyszer penetráció vizsgálata esetén, az IVPT során. A HSE elkészítése a következő volt: a humán bőrmintát vízfürdőbe helyeztük ($60 \pm 0,5$ ° C), és az epidermiszt elválasztottuk a dermisztől. Körülbelül 250 mg tapaszt ($1,77 \text{ cm}^2$) használtunk donor fázisként. A tapaszokat közvetlenül a donorkamrába helyeztük IVRT esetén. IVPT esetén a donort és a receptor fázist HSE választotta el.

A receptor fázis termosztált foszfát puffer (PBS, pH $7,4 \pm 0,15$) volt 25 m/m% etanol tartalommal, $32 \text{ ° C} \pm 0,5 \text{ ° C}$ hőmérsékleten. A vizsgálat 24 órán át tartott. A keverési sebesség 450 fordulat / perc volt. A gyógyszer koncentrációját nagy teljesítményű folyadékromatográfiával (HPLC) vizsgáltuk. A HPLC elemzést Shimadzu NEXERA X2 HPLC rendszeren (Shimadzu Corporation, Tokió, Japán) végeztük. Kinetex C18 150 mm \times 4,6 mm-es 3 μm -es (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) oszlopot használtunk. Az izokratikus elúció során HPLC minőségű víz és acetonitril 30:70 arányú használtuk eluensként 1 ml / perc áramlási sebességgel. Az eluálást megelőzően az eluent gázmentesítettük és 0,45 μm pórusméretű üvegszűrőn átszűrtük. A futási idő 4 perc volt, a kapszaicin retenciós ideje 2,3 perc volt. A detektálás fényelnyelés mérésen alapult az alkalmazott hullámhossz $280 \pm 4 \text{ nm}$ volt. 20 μl mintatérfogatot injektáltunk, és az eluálást 25 ° C minta-hőmérsékleten és 45 ° C oszlop-hőmérsékleten hajtottuk végre.

Matematikai értékelés

Az adatok 6 kísérlet mérési eredményeinek átlagai, \pm szórás. A tapaszok felszabadulási és áthatolási profilját kaptuk meg. Kiszámítottuk a felszabadult és permeált kapszaicin kumulatív mennyiségét/ $\text{cm}^2/24$ óra mennyiségben kifejezve. A fluxus (J) a felszabadult és áteresztett kapszaicin kumulatív mennyiségének ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) és az idő négyzetgyökéhez viszonyított meredeksége ($h_1 / 2$) volt az IVRT vizsgálat esetén, és az idő (h) volt az IVPT esetében.⁷⁰

Átfolyócella

A tapaszok mintáit az előzőekben már ismertetett módon teszteltük, Lásd a 3.1.7. fejezetben.

3.2.5. A bőrpermeáció vizsgálata Raman mikroszkóppal

A tapaszmintákat (1,77 cm²) 3 órán át 32 ° C-on helyeztük a bőrfelületre. A kezelt bőrmintákat lefagyasztottuk (10 µm vastag keresztmetszettel) Leica CM1950 kriosztáttal (Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Németország). A mikrotonnal vágott bőrmintákat alumínium felületre helyeztük, a szubkután részével a lemez teteje felé. A Raman-spektroszkópiai méréseket egy CCD kamerával és dióda lézerrel felszerelt Thermo Fisher DXR diszperzív Raman spektrométerrel (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) végeztük.

A mérések során 780 nm hullámhosszú lézer fényforrást használtunk, 24 mW maximális teljesítménnyel, minimalizálva a fluoreszcencia hatását. A mérésekhez használt mikroszkopikus lencse 50-szeres nagyítású, a lyuk nyílása 25 µm volt. A kémiai térképezés esetén 200 × 1800 µm területet vizsgáltunk; a léptetés mérete függőlegesen és vízszintesen 50 µm volt. Mindegyik spektrumot 16 szkennelésből állítottuk elő, 2 másodperces expozíciós idővel. Összesen 205 spektrumot regisztráltunk. A kezelt és kezeletlen bőrmintákat elemezve referenciaként kapszaicint használtunk. Az adatgyűjtést és elemzést az OMNICTM8.2 for Dispersive Raman szoftvercsomaggal (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) végeztük.

3.2.6. Az *in vivo* vizsgálatok bemutatása

Kísérleti állatok

A vizsgálatokat 200-250 g tömegű hím Wistar patkányokon végeztük (ToxiCoop Zrt., Magyarország). A patkányokat a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében, szokásos kórokozótól mentes körülmények között, szabadon hozzáférhető standard állat táppal és vízzel tartottuk. A kísérletek megfelelnek a 40/2013., II. 14. Magyar kormányrendelet a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről előírásainak, az Európai Közösségek Tanácsának 2010/63/EU irányelvének és a Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség (IASP) követelményeinek. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (PTE MÁB) hagyta jóvá (BA02 / 2000-8 / 2018, 2018.8.18. engedélyszám).

Az állatok hátbőrét kereskedelmi forgalomban kapható szőrtelenítő krémmel szőrtelenítettük a tarkótól a csípőig, ketamin és xilazin altatásban (80 és 10 mg / kg i.p.), 2 nappal azelőtt, hogy az állatok kísérletekben részt vettek volna.

A hátsó talp műtéti bemetszése

Az állatokat nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg i.p.) altattuk. Az egyik hátsó végtag talpi felületét povidon-jóddal kezeltük. A műtétnek alávetett oldalakat randomizáltuk. A talpi felületet szikével 10 mm sebhosszon bemetsztük. A bemetszés mélysége elérte az izomréteget.

A sebet két 6,0-os varrattal lezártuk és povidon-jóddal kezeltük. A kapszaicint tartalmazó transzdermális tapaszokat 2 ütemben helyeztük el. Az első kísérletsorozatban a tapaszokat rögzítettük a háti bőrre, közvetlenül a talpmetszés után, amikor a pentobarbitál érzéstelenítés még tartott (azonnali alkalmazás).⁷¹

Más kísérletekben 18 órával a metszés után helyeztük fel a tapaszokat (késleltetett alkalmazás). A tapaszok mérete 3x6 cm volt. A tapaszokat kereskedelmi ragasztószalaggal rögzítettük az állatokra. Kontrollként tapasz nélküli ragasztószalagot alkalmaztunk. A kapszaicint tartalmazó és a kontroll tapaszok is hat órán keresztül maradtak az állatokon, majd a hat óra elteltével a hátsó talpak hő kiváltotta fájdalomküszöbét mértük, emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel (Experimetria Kft., Magyarország). A patkányok mindkét hátsó lábát külön-külön a vízbe merítettük (**13. ábra**). A vizet 30 ° C-ról 51 ° C-ra melegítettük, 24 ° C/perc sebességgel. A melegítést egy pedál állítja le, amikor az állat kihúzza lábfejét a vízből, ekkor a készülék rögzíti a víz hőmérsékletét. Az állatok a kísérletezőhöz és a műszerhez háromszori próbaméréssel lettek beszoktatva, majd a kezelés kiértékeléséhez ezeket, mint alapértékeket vettük figyelembe. A posztoperatív fájdalomként megjelenő termális allodínia kialakulását a hőküszöb csökkenésével igazoltuk a transzdermális tapasz felhelyezése előtt. A kísérleteket 10 állaton végeztük.

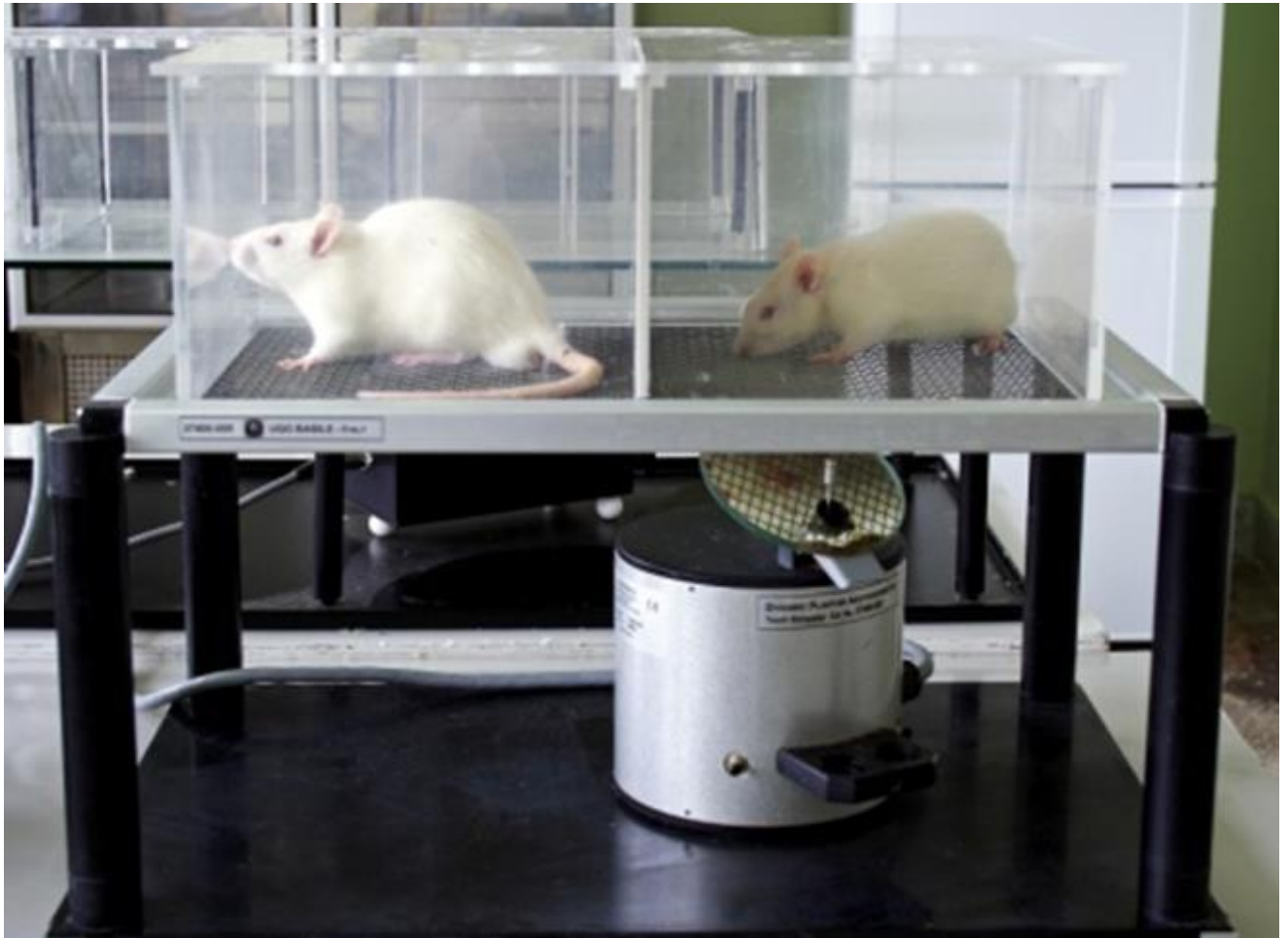


16. ábra: A hő kiváltotta fájdalomküszöb mérése

Karragén által kiváltott talpgyulladás

A karragént fiziológiás sóoldatban oldottuk fel enyhe melegítéssel (3% m/v). A karragént intraplantárisan (i.pl. 100 μ l) injektáltuk a patkányok egyik hátsó talpába. A kontralaterális végtagot nem kezeltük [8]. A kapszaicin tartalmú transzdermális tapaszokat az állatok hátára rögzítettük, 18 órával a karragén injekció után. A tapaszok mérete 3x6 cm volt. A tapaszokat kereskedelmi ragasztószalaggal rögzítettük az állatokra. Kontrollként tapasz nélküli ragasztószalagot használtunk. Hat órával később a hátsó végtag mechanikai fájdalomküszöbét dinamikus plantáris eszteziometriával detektáltuk (Ugo Basile, Olaszország). A vizsgálat előtt 10 perccel helyeztük el a patkányokat a műszer rekeszeibe. A stimulátor által kifejtett erő 5 másodperc alatt elérte az 50 g-ot. A nocifenzív reakciót (a hátsó végtag elemelése, megrázása) kiváltó érték automatikusan megjelent a kijelzőn.

A tényleges kísérlet előtt három kontroll mérést végeztünk. A karragén-kezelés következtében megjelenő mechanikai hiperalgémia kialakulását a mechano-nociceptív küszöb csökkenésével igazoltuk a transzdermális tapasz felhelyezése előtt (**17. ábra**). A kísérleteket 14 állaton végeztük.



17. ábra: A mechanikai fájdalom küszöb mérése

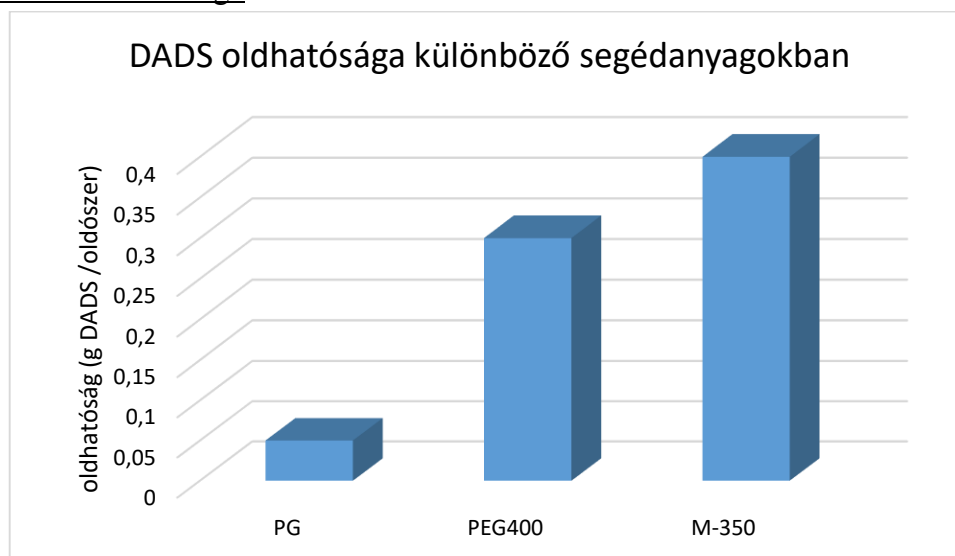
Statisztikai analízis

Az eredményeket statisztikailag értékeltük és elemeztük egyirányú (*in vivo* vizsgálatok) vagy kétirányú varianciaanalízissel (*in vitro* kísérletek), majd Bonferroni többszörös összehasonlító tesztjét követtük Prism for Windows szoftverrel (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA (USA)). Az adatok 6 kísérlet átlagértékei, \pm szórás ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ ** és $P < 0,001$ *** a kontrollhoz képest).^{70,72}

4. Eredmények

4.1. Szulfid tartalmú tapaszok vizsgálata

4.1.1. A DADS oldhatósága

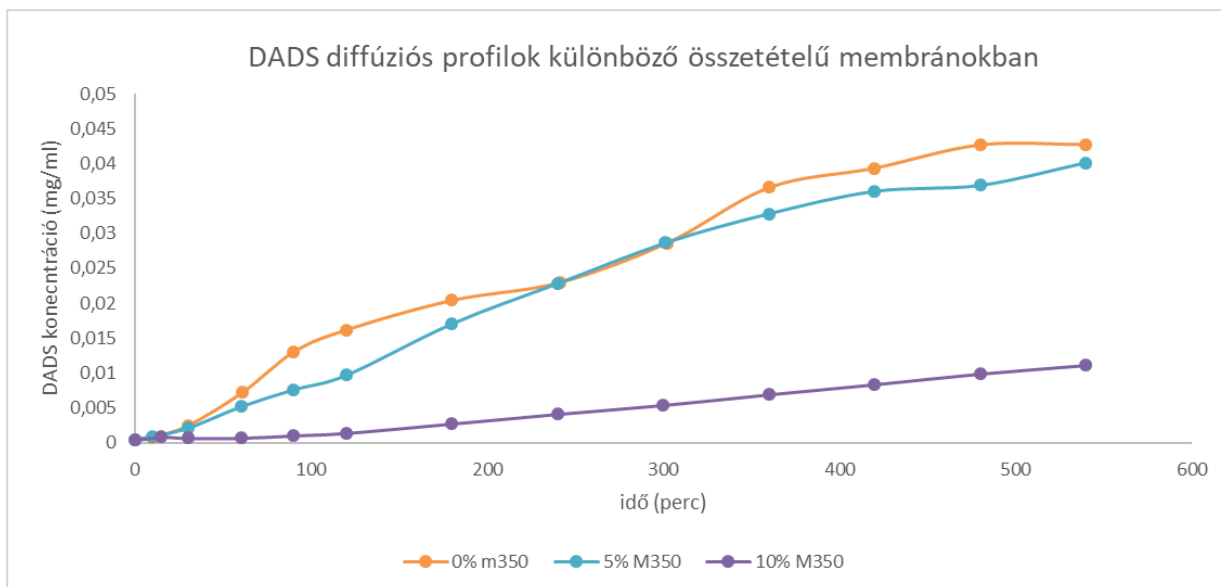


18. ábra: A DADS oldhatósága oszlop diagram formájában ábrázolva, jól megfigyelhető hogy mennyivel jobb oldószere a DADS-nak a szilikon olaj, mint a másik két potenciális jelölt anyag.

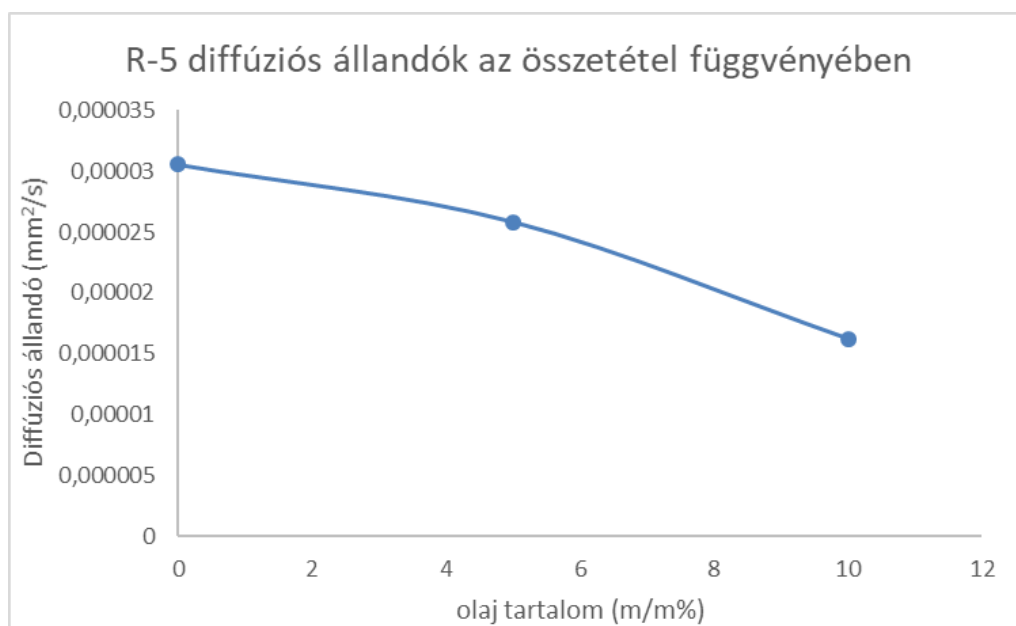
A legmegfelelőbb segédanyag megtalálása érdekében megvizsgáltuk a DADS oldhatóságát különböző anyagokban. Ehhez a vizsgálathoz megelőző elővizsgálatok alapján a PG-t, a PEG 400-at és az M-350-et választottuk ki, amelyek egyrészt nem lépnek kölcsönhatásba a kiválasztott hatóanyaggal, valamint orvosi alkalmazásra beváltak. A legjobb oldhatóságot (0,4 g DADS/g szilikonolaj) dimetil-szilikonolajban mértük, PEG-400-ban alacsonyabb (0,3 g DADS/g PEG400), PG-ben pedig egészen csekély a hatóanyag oldhatósága (0,05 g DADS/g PG). Ezen eredmények alapján egyértelműen a szilikonolaj a legjobb választás folyékony segédanyagként.

4.1.2. A membrándiffúziós mérés eredményei

A megfelelő segédanyag kiválasztása után elkészítettük a membránokat, és megvizsgáltuk a DADS diffúzióját. Az R-5 lineáris polimer alapú membránok vizsgálatakor az eredmények között meglehetősen nagy szórást tapasztaltunk, ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a DADS megfelelően regulált diffúziójához valószínűleg túl nagy a polimer térhálósűrűsége. Az anomáliák jól megfigyelhetőek a **19.** és **20. ábrán**, az eredményeket összefoglalja a **2. táblázat**.



19. ábra: A DADS diffúziója különböző olaj tartalmú szilikonmembránokon keresztül. Ezen ábrán is megfigyelhető, hogy a hatóanyag membránon keresztüli diffúziójának idejét milyen komolyan befolyásolja a folyékony segédanyag (szilikonolaj) jelenléte, ám a várthoz képest eltérő összefüggést látunk, amit jól mutat a következő ábra.



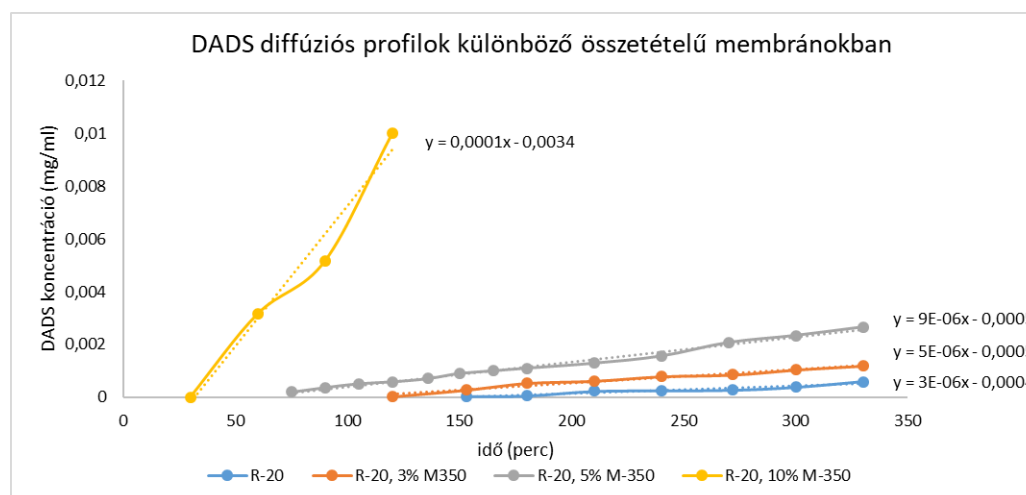
20. ábra: Az olajtartalom hatása a DADS diffúziós képességére a szilikonmembránokon keresztül.

2. táblázat: A különböző szilikonmembránok készletelési idő értékei, és az abból számolt diffúziós állandói. Megállapítható, hogy a hatóanyag diffúziós állandója csökken a szilikonolaj mennyiségének növekedésével, ami pontosan ellentétes az elvárt hatással.

minta	l (mm)	t ₀ (sec)	D (mm ² /sec)	olaj tartalom
R-5	0,165	900	0,0000305	0
R-5, 5% M-350	0,155	1000	0,0000258	5
R-5, 10% M-350	0,35	3600	0,0000162	10

Ezután tértünk át az R-20 alapú mátrixok vizsgálatára. Itt már jóval átláthatóbb összefüggéseket tapasztaltunk. A folyékony segédanyag tartalom és a diffúziós állandó összefüggésének alapos vizsgálata (a négyféle közölt összetételen kívül az előkísérletek során további méréseket végeztünk a szélsőértékek megállapításához) megállapítottuk, hogy a hatóanyag diffúziós állandója növekszik a szilikonolaj mennyiségének növekedésével (**3. táblázat**).

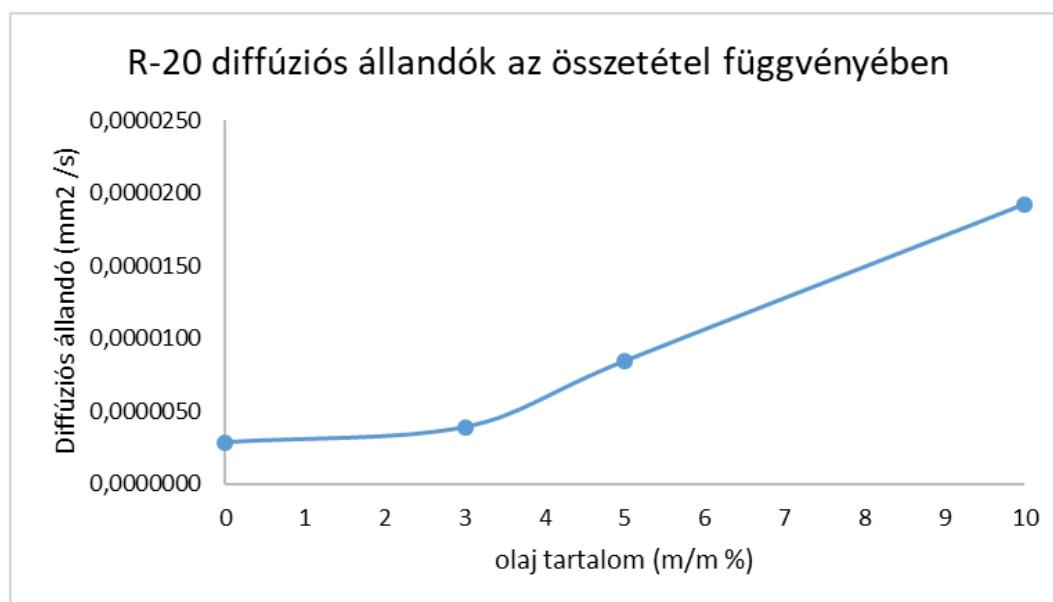
A mért adatok alapján a 3%-os szilikonolaj-tartalom a küszöbérték; a segédanyag e mennyiségéig alig változik a hatóanyag diffúziós tulajdonsága a mátrixban. E mennyiség felett azonban a diffúziós állandó változása arányos az olaj mennyiségének növekedésével (**21. ábra** és **22. ábra**).



21. ábra: A DADS diffúziója különböző olaj tartalmú szilikonmembránokon keresztül. Ezen ábrán is megfigyelhető, hogy a hatóanyag membránon keresztüli diffúziójának idejét milyen komolyan befolyásolja a folyékony segédanyag (szilikon olaj) jelenléte, valamint a mennyisége, amely korrelál a minél gyorsabb membránon keresztüli átjutással.

3. táblázat: A különböző szilikonmembránok késleltetési idő értékei, és az abból számolt diffúziós állandói. Megállapítható, hogy a hatóanyag diffúziós állandója növekszik a szilikonolaj mennyiségének növekedésével, valamint megfigyelhető egy fajta küszöbérték a 3%-os olajtartalomnál, amit még szemléletesebbé tesz a következő **22. ábra**.

minta	l (mm)	t0 (sec)	D (mm ² /sec)	olaj tartalom
R-20	0,37	8000	0,0000029	0
R-20, 3% M-350	0,375	6000	0,0000039	3
R-20, 5% M-350	0,39	3000	0,0000085	5
R-20, 10% M-350	0,485	2040	0,0000192	10



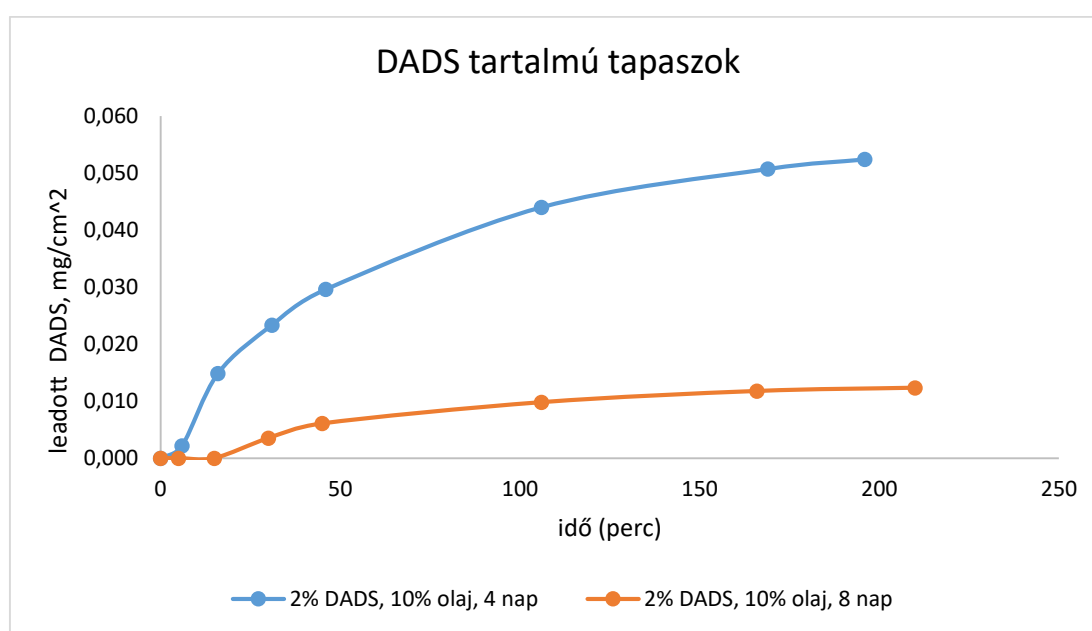
22. ábra: Az olajtartalom hatása a DADS diffúziós képességére a szilikonmembránokon keresztül. A görbén jól megfigyelhető, hogy a 3%-os szilikonolaj-tartalom a küszöbérték; a segédanyag ezen mennyiségéig alig változik a hatóanyag diffúziós tulajdonsága a mátrixban. E mennyiség felett azonban a diffúziós állandó változása arányos az olaj mennyiségének növekedésével.

4.1.3. A hatóanyag leadás stabilitásának vizsgálata Franz-diffúziós cellával

Két különböző élettartamú (4 és 8 napos) tapaszokat vizsgáltunk *in vitro* hatóanyag leadási teszttel (IVRT) (**23. ábra**). A minta térháló szerkezete a korábbi eredmények alapján ²⁴ legalább 3 nap alatt stabilizálódik a tárolási körülmények (szobahőmérséklet, normál páratartalom) között. Ezért a minta hatóanyagleadási tulajdonságait a negyedik napon vizsgáltuk. Ugyanezen időtartam elteltével határoztuk meg a hatóanyagleadás stabilitását, mivel ekkor a hatóanyagleadási tulajdonságok változása nem függ össze a mátrix szerkezetének változásával.

Az IVRT mérés során a 4 napos tapaszokból 3 órán belül lényegesen nagyobb mennyiségű DADS szabadult fel, mint a 8 napos tapaszokból.

A 8 napos tapaszoknál szignifikánsan alacsonyabb volt a felszabadulási érték. Maga a felszabadulás mértéke (IVRT) releváns információt tartalmaz az élettartam alapján történő összehasonlításhoz ⁶⁹.

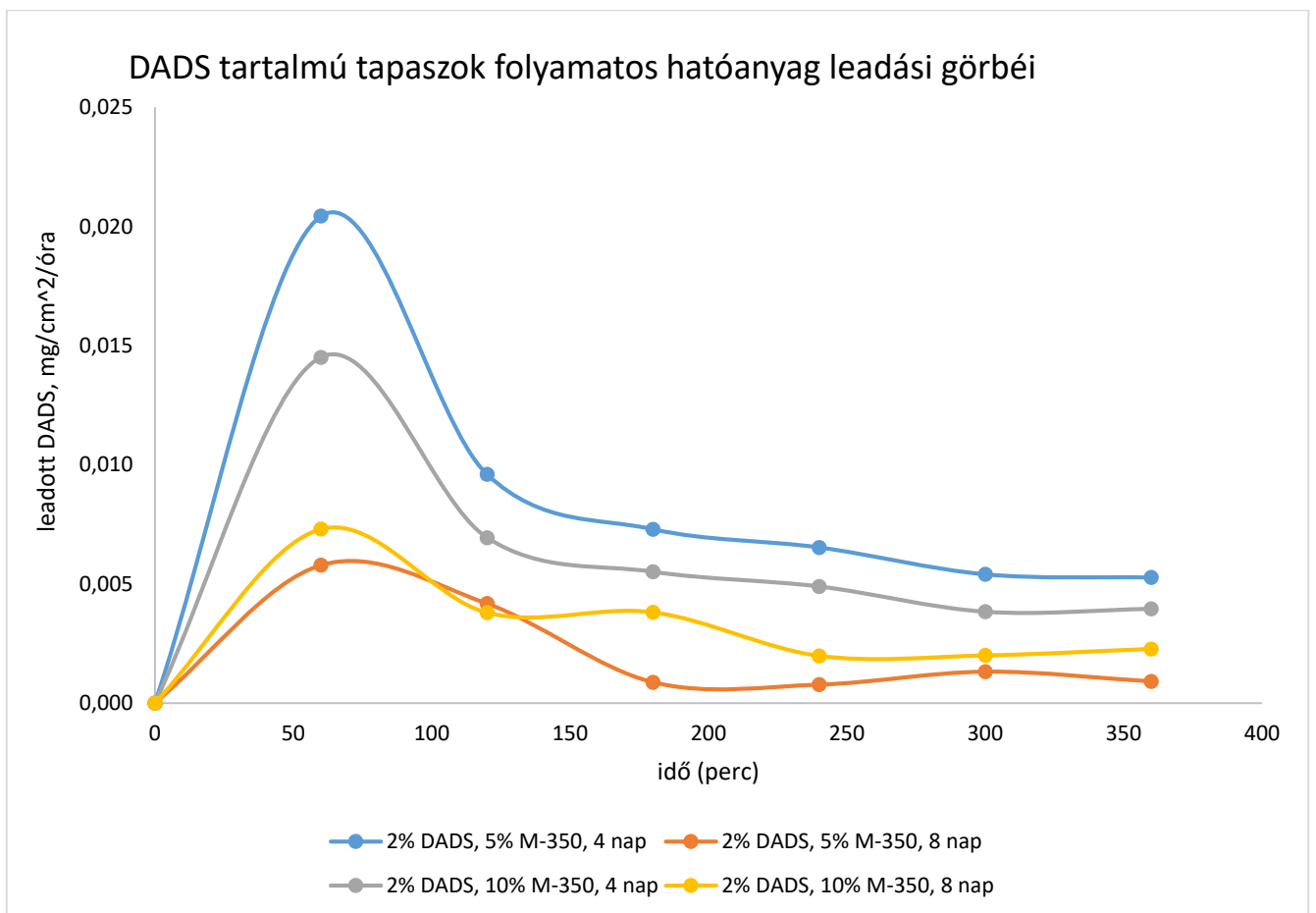


23. ábra: A minták kumulatív hatóanyag leadási görbéi a Franz-cellás mérés során. Megfigyelhető, hogy a mérés során a 4 napos tapaszokból 3 órán belül lényegesen nagyobb mennyiségű DADS szabadult fel, mint a 8 napos tapaszokból.

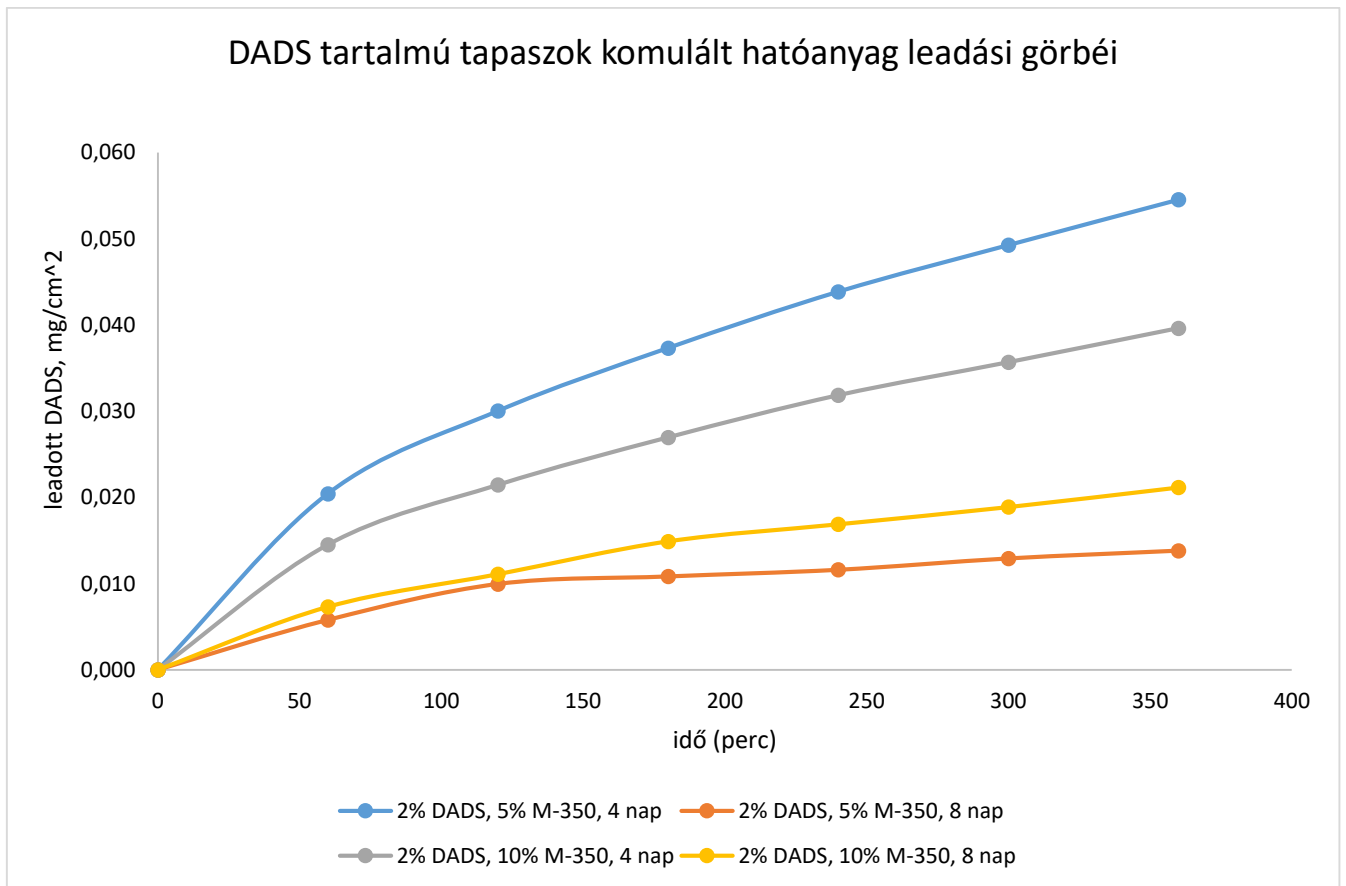
4.1.4. A hatóanyag leadás vizsgálata átfolyócellával

Két különböző szilikonolaj-tartalmú (5 és 10 m/m%) tapaszt vizsgáltunk módosított IVRT-vel. A mérés során a 4 napos tapasztokból 6 órán belül lényegesen nagyobb mennyiségű DADS szabadult fel újra, mint a 8 naposokból.

Az átfolyócellában a tapasztok hatóanyag-felszabadulásának szabályozását követtük nyomon. Az idősebb DADS-tapaszt idővel jobban szabályozott hatóanyag leadást mutatott, de a felszabaduló mennyiség kisebb volt (**24. ábra** és **25. ábra**).



24. ábra: A minták folyamatos hatóanyag leadási sebessége az átfolyó cellában. Ezen a típusú nézetten jól megfigyelhető az úgynevezett „ugrás” jelenség, azaz az első 1-2 órában a tárolás közben a tapaszt legfelső rétegében feldőlő hatóanyag fokozott leadása, valamint az is, hogy az eltelt idővel (a tapaszt „idősödésével”) ez az „ugrási” effektus csökken, a hatóanyag leadási görbe jobban követi a nullad rendű leadási kinetikát.

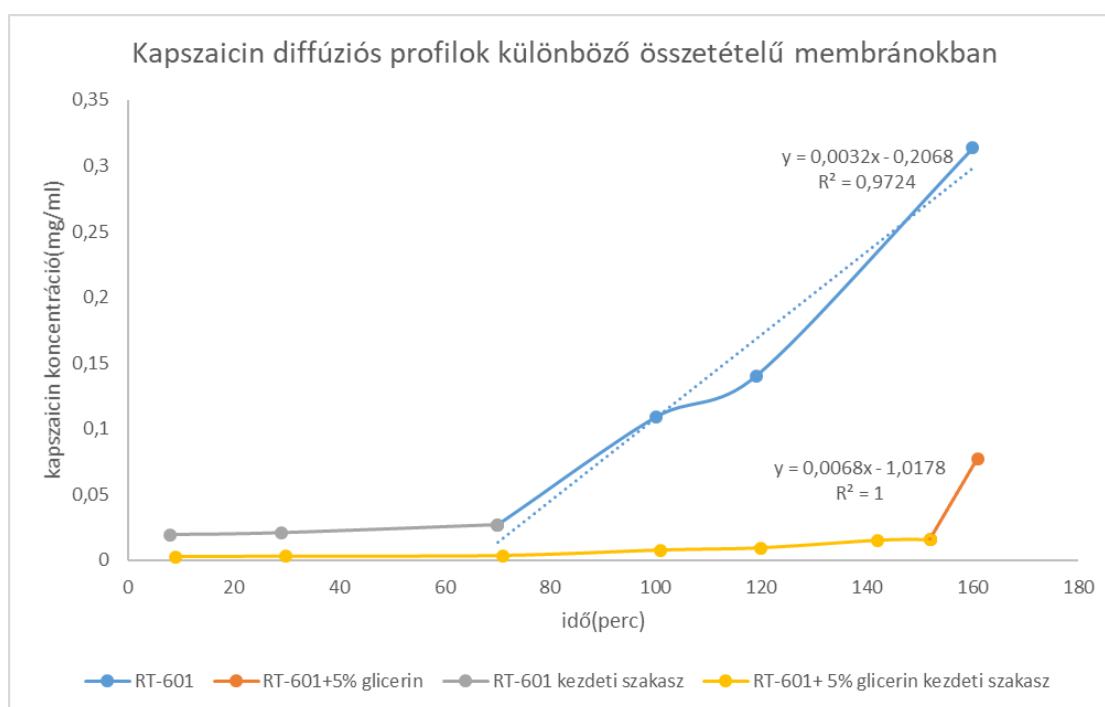


25. ábra: A minták kumulált hatóanyag leadási üteme az átfolyó cellában. Az idő előrehaladtával (a tapasz „idősödésével”) a leadási görbe meredeksége csökken, azaz hatóanyagleadási görbe jobban követi a nulladrendű leadási kinetikát.

4.2. A kapszaicin tartalmú tapaszok vizsgálata

4.2.1. A kapszaicin tapaszok kifejlesztéséhez szükséges elővizsgálatok eredményei

Az először elvégzett membrán diffúziós vizsgálatok (26. ábra) egyik fontos tanulsága volt, hogy az egészségügyi szempontok alapján (lásd 2.1.3. fejezet) kiválasztott addíciós mechanizmusú Wacker RT-601 polimer nehezen elegyíthető a glicerinnel, méréseink alapján a maximális oldhatóság 4-5 m/m% glicerinnel. A glicerint nagyobb mennyiségben alkalmazva az idő teltével (mennyiségtől függően 3-7 nap) a mátrix és a folyékony segédanyag szételegyednek, a glicerinnel egy része kidiffundál a polimer mátrixból.



26. ábra: Kapszaicin diffúziója csak glicerint tartalmazó addíciós szilikon membránokon keresztül.

Az ábrán jól megfigyelhető, hogy a késleltetési idő (t_0) kisebb a tiszta, glicerint nem tartalmazó membránok esetén.

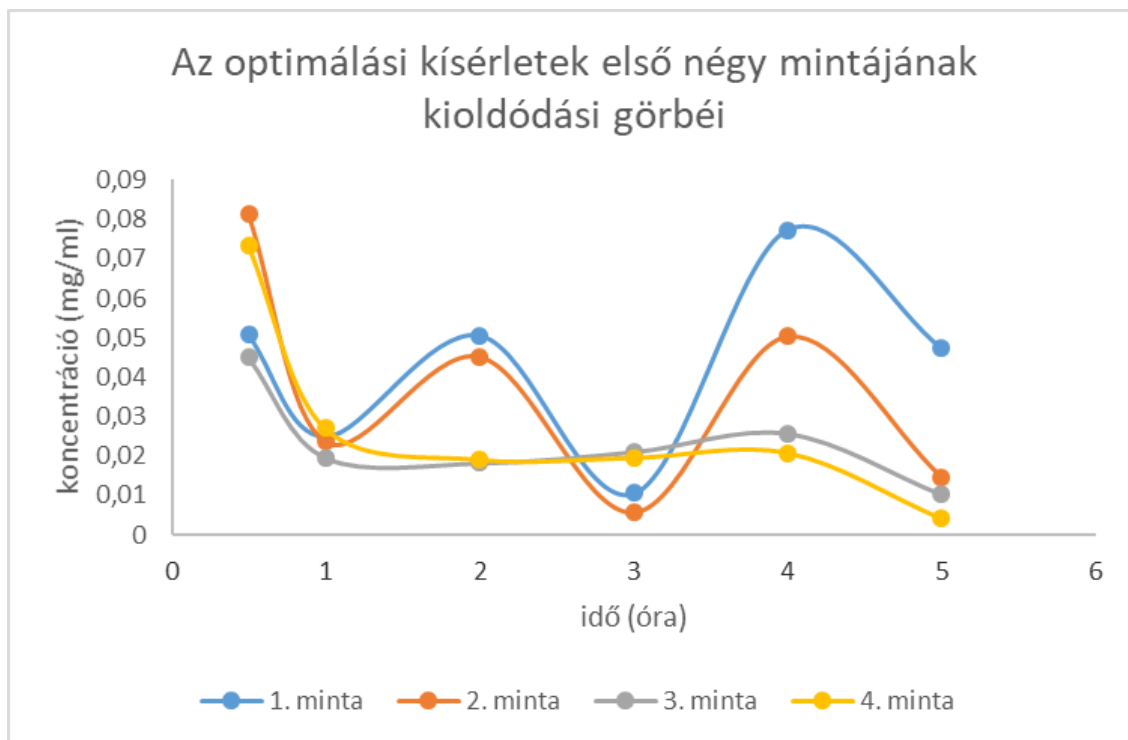
4. táblázat: A különböző szilikonmembránok késleltetési idő értékei, és az abból számolt diffúziós állandói. Megállapítható, hogy a hatóanyag diffúziós állandója csökken a glicerintartalom megjelenésével.

minta	l (mm)	t_0 (sec)	D (mm ² /sec)	glicerinnel tartalom
RT-601	0,1	61,5	0,000027	0
RT-601, 5% glicerinnel	0,1	149	0,000011	5

A **26. ábrán** megfigyelhető jelenséget még jobban mutatja a **4. táblázat**. Itt látható, hogy a kapszaicin diffúziós állandója közel háromszor nagyobb „üres” membrán esetében, mintha 5 m/m% glicerint tartalmaz a membrán. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a membrán donor oldali felületén belépő kapszaicin a szilikonban kismértékben oldódik, így viszonylag hamar átjut a membránon, míg ha a membrán tartalmaz glicerint, a kapszaicin először beoldódik a glicerinbe, és csak akkor kezd átdiffundálni a membránon, amikor már a hatóanyag telítette a folyékony segédanyag-fázist.

Ám az adatokból az is jól látszik, hogy 5 m/m% glicerintartalom esetén is viszonylag kicsi a kapszaicin diffúziós állandója, valamint az is probléma, hogy a kapszaicin oldhatósága glicerinben is alacsonynak mondható (0,01g kapszaicin/g glicerint). Ezért a kívánt mennyiségű kapszaicin-tartalom eléréséhez növelni kell a mátrix glicerintartalmát, de mint korábban említettük, ez sajnos fizikai-kémiai korlátok miatt a glicerintartalom egyszerű növelésével nem megoldható.

Ezért azt a megoldást választottuk, hogy a glicerint mellett poliszorbát-20-at, egy a gyógyszer technológiában jól ismert emulgenst alkalmaztunk. További vizsgálataink során kismennyiségű (~2 g összes tömegű), szilárd kapszaicint és kétféle segédanyagot is tartalmazó mintákat készítettünk. Ezeket - a diallil-diszulfid tartalmú készítményeknél már ismertetett módon - a saját gyártású egyszerűsített Franz-cellás, statikus kioldódási módszerrel vizsgáltuk, hogy a kioldódási ütemeket össze tudjuk hasonlítani (**27. ábra**). Az első két minta esetén ~1 % kapszaicint tartalmazó mintákat vizsgáltunk, de a görbéken megfigyelhető, hogy ilyen mennyiség mellett a mátrix nem képes a szabályozott hatóanyagleadásra. Ezután a 3.2.2. fejezetben ismertetett alsó küszöbértékű, 0,1% hatóanyag tartalmú mintákat készítettünk. Ezeknél már megfigyelhető a szabályozott hatóanyagleadás, ám a leadott hatóanyag mennyisége nem elégséges.



27.

ábra: A legelső minták kioldódási görbéi: jól megfigyelhető a magasabb kapszaicin tartalmú minta teljesen szabályozatlan hatóanyag leadása.

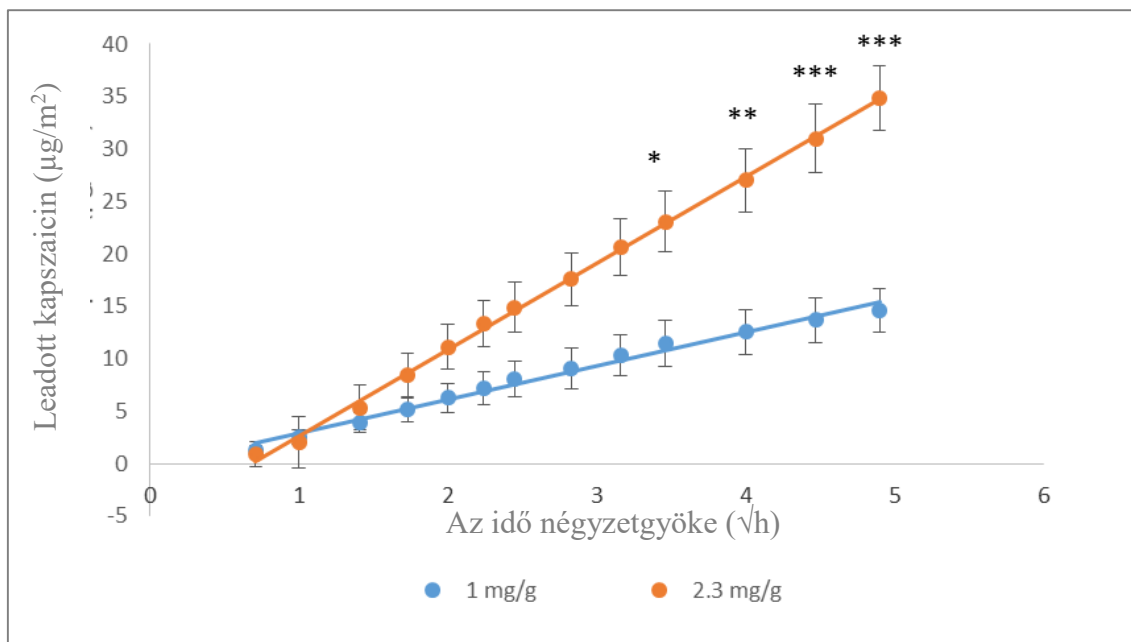
Ezt az anomáliát (alacsony kapszaicin tartalom/jól szabályozott hatóanyag leadás kontra magas kapszaicin tartalom/szabályozatlan hatóanyag kiáramlás) végül úgy oldottuk fel, hogy a rendszerbe a további szükséges kapszaicint szilárd formában, inert hordozóval (kalcium-karbonát) készült porhígítás formájában vittük be a mátrixba.

Mivel a kapszaicin szobahőmérsékleten szilárd, viszonylag magas olvadáspontú és meglehetősen alacsony tenziójú anyag, így az öregítési vizsgálatoknál nem figyeltünk meg olyan jelenségeket, mint a diallil-diszulfid esetén.

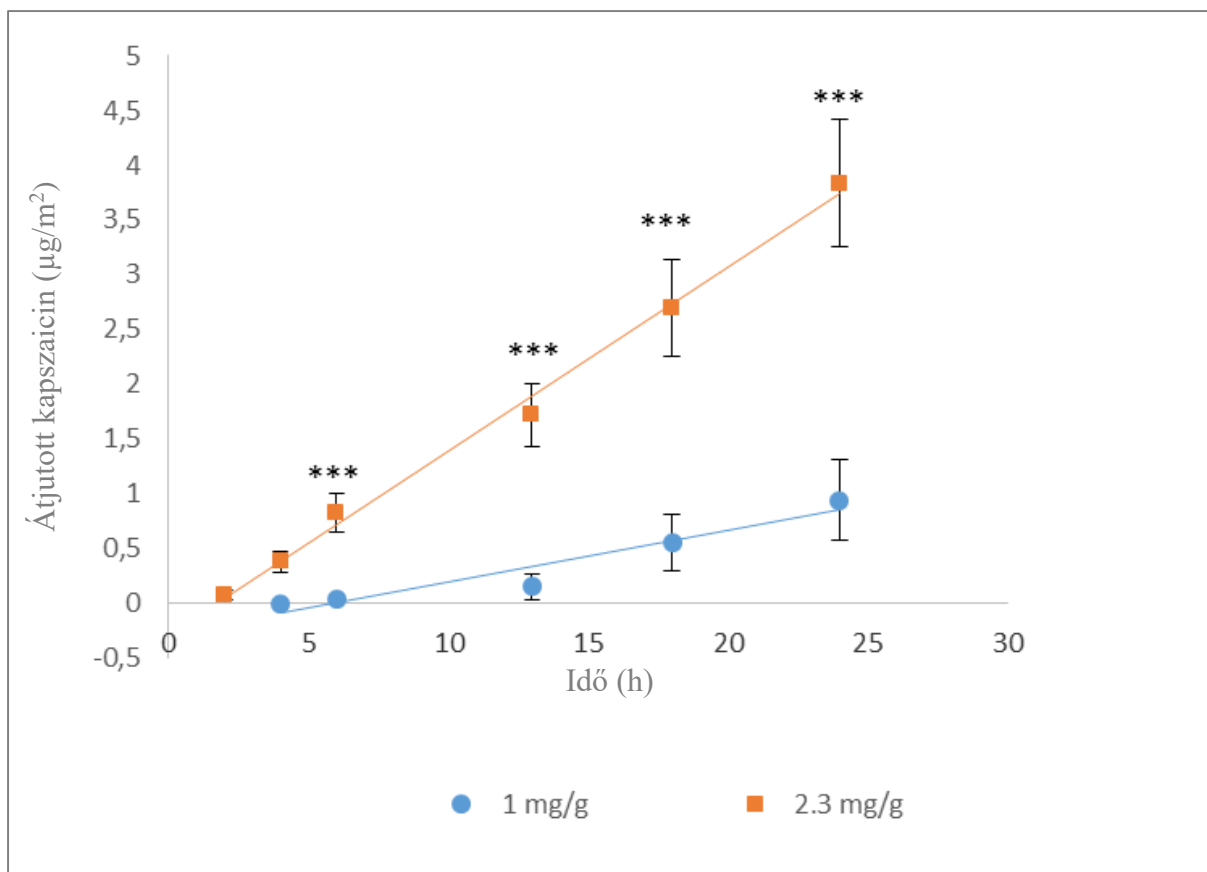
További 35 összetételt kipróbálva jutottunk el az összetettebb, és forrásigényesebb mérésekhez is alkalmas összetételekig, melyek vizsgálati eredményeit a következő fejezetekben ismertetem.

4.2.2. A kapszaicin tartalmú tapaszok hatóanyag leadási tulajdonságai Franz cellás vizsgálatok során

Két különböző kapszaicin-tartalmú (1 és 2,3 mg/g) tapaszt vizsgáltunk IVRT-vel (**28. ábra**) és IVPT-vel (**29. ábra**). Az IVRT mérés során 24 órán belül lényegesen nagyobb mennyiségű kapszaicint adott le a 2,3 mg/g tapasz, mint az 1 mg/g hatóanyagtartalmú. Az IVPT mérés során az IVRT-hez képest lényegesen kevesebb gyógyszer oldódott ki a tapaszból a mérőtérbe. Ennek oka elsősorban a bőr azon tulajdonsága, hogy a penetrált hatóanyag egy részét magában tartja. A két külön kapszaicin tartalmú készítmény közötti különbség hasonló volt az IVRT kísérleteknél tapasztaltakkal. A magasabb kapszaicin-koncentrációjú tapaszok nagyobb permeabilitási értékeket eredményeztek. Maga a hatóanyagleadás mértéke (IVRT) nem nyújt releváns információt a hatóanyag penetrációról. Fontos megvizsgálni a bőrön keresztüli behatolást (IVPT), hogy kiderüljön a gyógyszer, illetve a hatóanyagleadó rendszer kölcsönhatása a bőrrel. A felszabadulási és átérésztési profilokat fluxusértékekkel jellemeztük (**5. táblázat**). A fluxusértékek a kapszaicin felszabadulásának és áthatolásának sebességét mutatják a különböző tapaszokból.



28. ábra: A tapasz leadott kapszaicin kumulatív mennyisége µg / cm²-ben 24 óra alatt, jól megfigyelhető a megkívánt nulladrendű leadási kinetika. (p <0,05, * p <0,01 ** és p <0,001 ***)



29. ábra: A permeált kapszaicin kumulatív mennyisége $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ -ben 24 óra alatt. Habár nagyobb szórással, és kisebb intenzitással, de kapszaicin továbbra is közel nulladrendű kinetika szerint jut át a modell bőr rétegen, ezzel teljesítve a vele szemben támasztott követelményeket

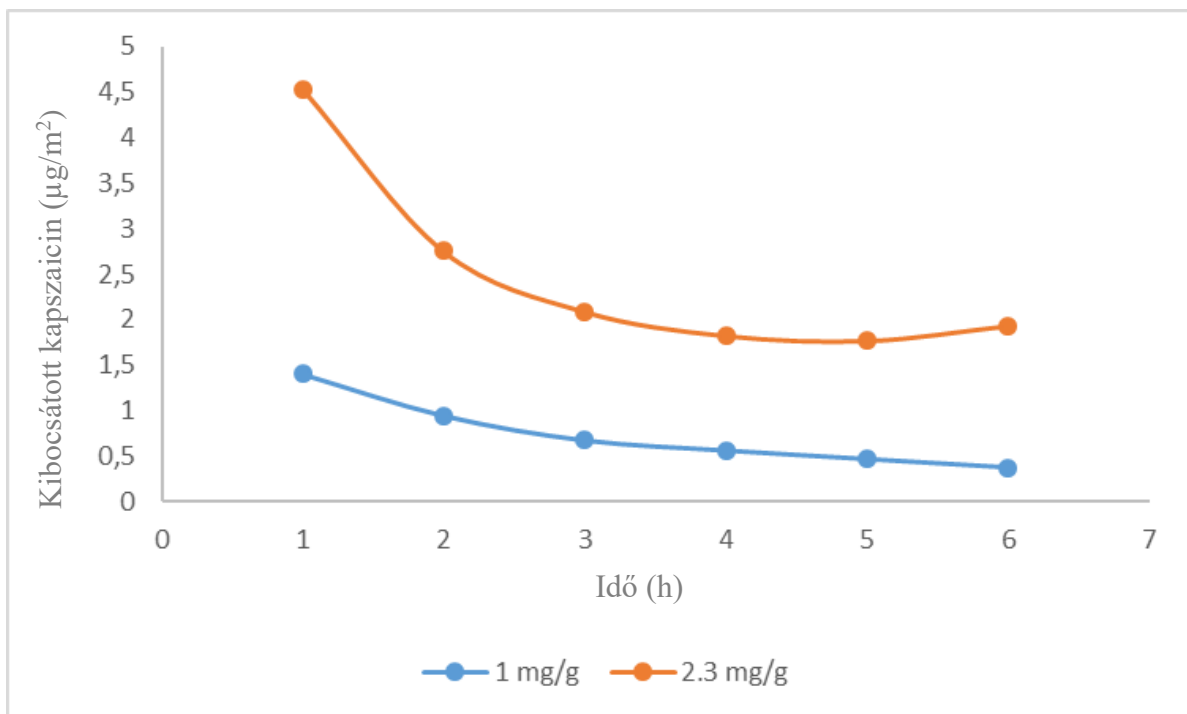
($p < 0,001$ ***)

5. táblázat: A felszabadult és penetrált kapszaicin fluxusértékei.

	IVRT	IVPT
1 mg/g tapasz	3,2215	0,0466
2,3 mg/g tapasz	8,233	0,1672

4.2.2. A hatóanyagleadási vizsgálat eredményei átáramló cellában

A már ismeretett két különböző kapszaicin tartalmú (1 és 2,3 mg/g) tapaszt egy módosított IVRT módszerrel is vizsgáltunk. A mérés során lényegesen nagyobb mennyiségű kapszaicint adott le a 2,3 mg/g-os tapaszt 6 órán belül, szemben az 1 mg/g-ossal. Átfolyócellában a tapasztok gyógyszer leadásának jobban szabályozott mértékét figyeltük meg. A magasabb kapszaicin tartalmú tapaszt idővel jobban szabályozza a gyógyszer felszabadulását, azaz a hatóanyagleadás kinetikája közelíti az ideálisnak tekintett nullad rendű kinetikai modellt. Ez az eredmény azért biztató, mert mint korábban ismertettem, az átfolyócellás mérési mód a vérplazma koncentrációt hivatott modellezni, amely a várt szisztémás hatás kifejtése miatt kulcsfontosságú.

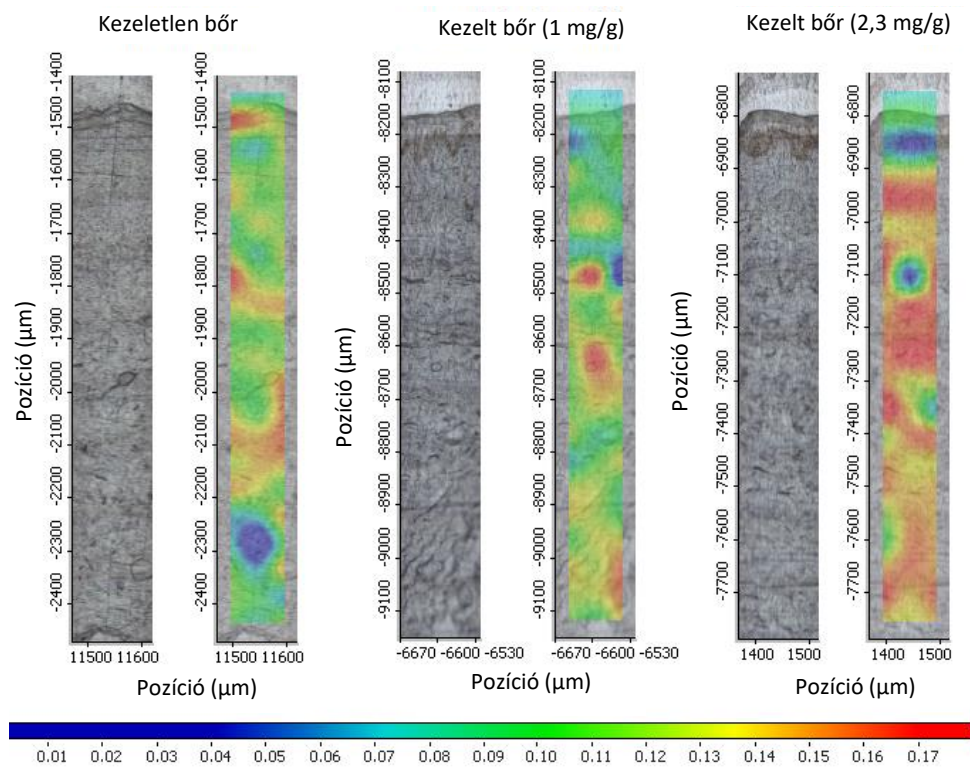


30. ábra: A felszabadult kapszaicin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) az idő függvényében. Átfolyó cellában a tapasztok gyógyszerleadásának jobban szabályozott mértékét figyeltük meg.

4.2.3. A Raman-spektroszkópia eredményei

A Raman-spektroszkópiás vizsgálatok során meghatároztuk a kapszaicin bőrbe való behatolási képességének különbségeit a különböző bőrrészekben. A Raman-korrelációs térkép a behatolt gyógyszer jelenlétét mutatja az emberi bőr különböző rétegeiben, a bőrfelülettől a dermiszig a tapasztokkal történő kezelés után. Spektrális térképeket készítettünk annak érdekében, hogy kimutassuk a kapszaicin jelenlétét az emberi bőr különböző régióiban. A kapszaicin spektrum ujjlenyomat-területét összehasonlítottuk a kezelt és kezeletlen emberi bőr spektrumával.

A tapasztok Raman-korrelációs képeit a **31. ábra** mutatja. A Raman-korrelációs képek a kapszaicin jelenlétét mutatják be az emberi bőr különböző régióiban. Az IVRT és az IVPT eredményekkel való korrelációban a 2,3 mg/g tapasztnál hatékonyabb penetráció tapasztalható, mint az 1 mg/g tapasztnál. A kapszaicint a dermiszben és az epidermiszben mutattuk ki.



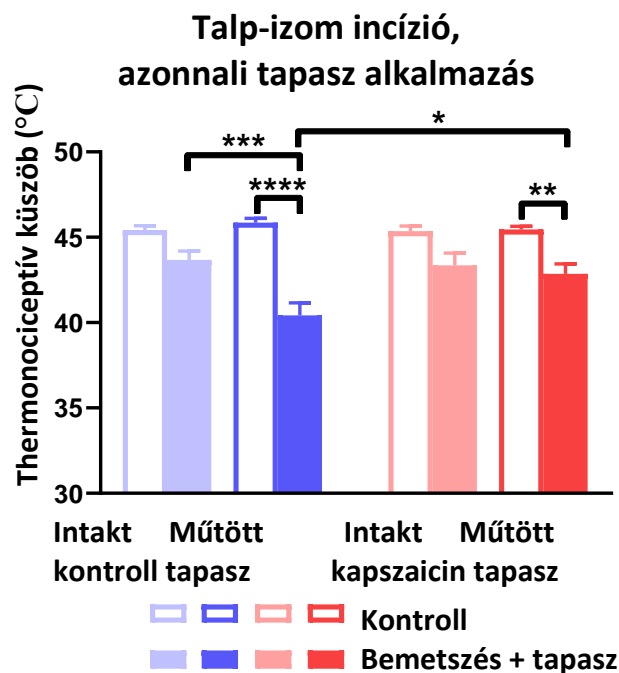
31. ábra: Raman-korrelációs képek a kapszaicin eloszlására az emberi bőrben tapasztokkal történő kezelés után. A kezeletlen bőr kontrollként is megjelenik. A gyógyszer koncentrációjának színekódolása: piros> sárga> zöld> kék.

4.2.4. A kapszaicint tartalmazó tapaszok termális allodíniát enyhítő hatásának vizsgálata

A tapasz felhelyezésével végzett kísérletekben közvetlenül a hátsó talpak bemetszése után a műtéti beavatkozás csökkentette a fájdalmas hőküszöböt a kontroll tapaszokkal kezelt állatokban az alapértékhez, valamint az ellenoldali, műtetlen talphoz képest. A műtött talp termonociceptív küszöbe a kapszaicinnel kezelt patkányokban még mindig alacsonyabb volt, mint a megfelelő kiindulási érték, de szignifikánsan nagyobb volt, mint a ragasztószalaggal ellátott kontroll állatok műtött lábainak küszöbértéke. A kapszaicinnel kezelt patkányok ellenoldali, ép talpainak hőérzékenysége nem különbözött a műtét előtt vett alapértéktől. A ragasztószalag nem volt hatással a hátsó végtagok fájdalmas hőküszöbére (32. ábra).

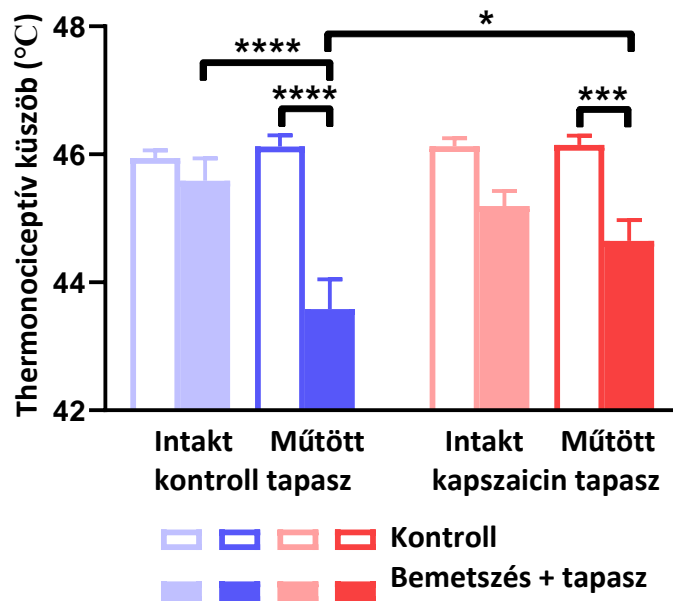
Késleltetett tapasz alkalmazásával végzett kísérletek során a talp incízió jelentősen csökkentette a fájdalomküszöböt az ellenoldali sértetlen talpakhoz és a megfelelő kiindulási értékekhez képest. A kapszaicin nélküli kontroll tapaszok nem javították ezt az állapotot.

A kapszaicin tartalmú tapaszok megemelték a termonociceptív küszöböt a kontroll tapaszhoz képest, de ez a fájdalmas hőküszöb még mindig alacsonyabb volt, mint a műtét előtti kontroll érték. Sem a kontroll, sem a kapszaicint tartalmazó tapaszok nem változtatták meg az ép talpak termonociceptív küszöbét (33. ábra).



32. ábra: A tapasz felhelyezésével végzett kísérletekben közvetlenül a hátsó talpak bemetszése után a műtéti beavatkozás csökkentette a fájdalmas hőküszöböt a kontroll tapaszokkal kezelt állatokban az alapértékhez, valamint az ellenoldali, műtetlen talphoz képest. A műtött talp termonocéptív küszöbe a kapszaicinnel kezelt patkányokban még mindig alacsonyabb volt, mint a megfelelő kiindulási érték, de szignifikánsan nagyobb volt, mint a ragasztószalaggal ellátott kontroll állatok műtött lábainak küszöbértéke. A kapszaicin tartalmú tapasszal kezelt patkányok ép talpainak hőérzékenysége nem különbözött a műtét előtt mért alapértéktől

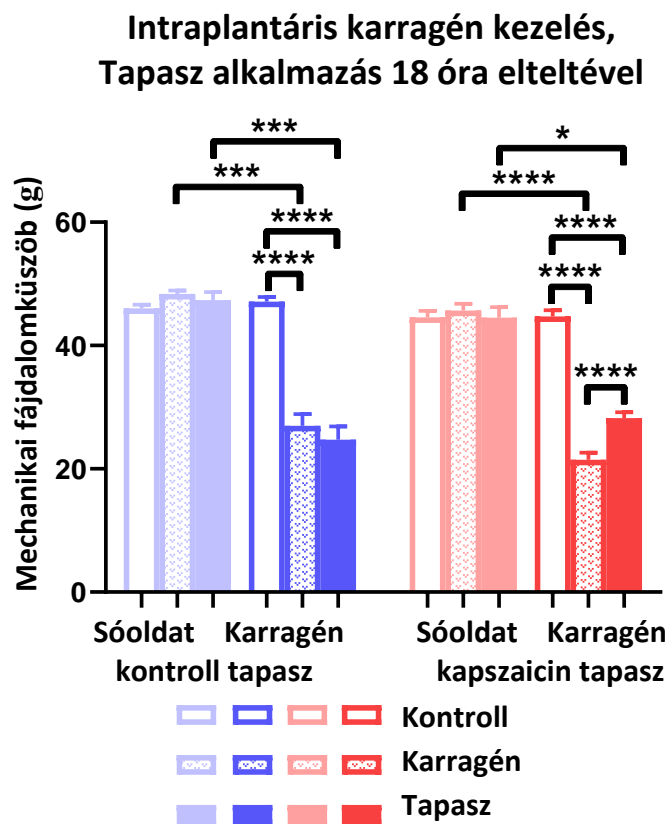
**Talp-izom incízió,
tapasz alkalmazás 18 óra elteltével**



33. ábra: A késleltetett kezeléssel végzett kísérletek során a kapszaicin tartalmú tapaszok megemelték a termikus fájdalomküszöbét a kontroll tapaszhoz képest. A mért hőküszöb még mindig alacsonyabb volt, mint a talp preoperatív kontroll hőküszöbe, de a kapszaicin tapasz szignifikáns mértékben megemelte a hőküszöböt a kontroll, hatóanyag nélküli tapaszhoz képest.

4.2.5. A kapszaicint tartalmazó tapaszok karragén kiváltotta mechanikus hiperalgéziát enyhítő hatásának vizsgálata

A karragén csökkentette a mechanikai fájdalomküszöböt, amelyet a beavatkozás után 18 órával észleltek mértünk a kontroll és a kapszaicin tartalmú tapaszokkal kezelt patkányokban, összehasonlítva az ellenoldali talppal. A karragénnel kezelt talpak mechanikus küszöbértékei továbbra is csökkentek a kontralaterális talpakhoz képest, a 6 órás kapszaicin tapaszokkal végzett kezelés vagy kontrolljuk után. A karragén-injektált talpak küszöbét a kapszaicin-kezelés szignifikánsan megemelte a tapasz felvitele előtt kimutatott értékhez képest. A sóoldattal injektált kontralaterális talpak nem mutattak fokozott érzékenységet (34. ábra).



34. ábra : A karragénnel kezelt hátsó végtagok mechanonociceptív küszöbét a kapszaicin-kezelés szignifikánsan megemelte a tapasz felvitele előtt kimutatott értékhez képest.

5. Diszkusszió

5.1. A DADS tartalmú tapaszok fejlesztésének konklúziói

Munkám e része során céлом az volt, hogy kifejlesszek egy, később *in vivo* vizsgálatokra is alkalmas TTS rendszert, amely kielégítően képes szulfidonor molekula hordozására, és szabályozott kibocsátására. Kísérleteinkhez magunk állítottuk elő a DADS hatóanyagot. Ehhez módosítottuk az irodalomban szokásos receptúrát, ami lehetővé tette a DADS jobb hozamú és nagyobb tisztaságú előállítását. A 90%-os tisztaságú anyag használata sokkal könnyebbé és egyértelműbbé tette a kioldódási vizsgálatok értelmezését ⁵⁶.

Az elvégzett kísérletek során összefüggést találtam a DADS diffúziós sebessége és a tapaszok olaj tartalma között. A legjobb oldhatóságot a dimetil-szilikonolajjal értük el, a 3 m/m%-os küszöbérték jelentősen megváltoztatta a gyógyszer diffúziós tulajdonságait a mátrixban. A Franz-cellában 4 és 8 napos tapaszokat vizsgáltunk, és a 8 napos tapaszoknál szignifikánsan alacsonyabb volt a hatóanyagleadás értéke. Az átfolyócellában a régebbi tapasz idővel jobban szabályozott hatóanyag leadást mutatott, de a felszabaduló mennyiség kisebb volt.

Azt is kimutattuk, hogy a szilikonokban lévő vegyületek tulajdonságai abszolút szükségesek annak meghatározásához, hogy alkalmasak-e TTSként való felhasználásra. Mivel a DADS egy apoláris vegyület, a szilikonmátrixban való diffúzióját megkönnyíthette a szilikonmátrixszal kompatibilis apoláris folyékony fázis használata. Erre a célra a legmegfelelőbb a poli(dimetilsziloxán) olaj (M350), amelyben a DADS jól oldódik, a telített oldat 0,4 g/g DADS-t tartalmaz.

A különböző koncentrációjú szilikonolajat (0%, 3%, 5%, 10%) tartalmazó membránokban a DADS diffúziója a membránon keresztül a szilikonolaj mennyiségének emelkedésével fokozódott. A 3%-os szilikonolaj-koncentráció nem volt elegendő ahhoz, hogy a mátrixban folytonos folyadék fázis alakuljon ki, így a DADS diffúziója csak kis mértékben növekedett. Ezzel szemben az 5%-os szilikonolaj-koncentráció a diffúziós állandó háromszoros növekedését eredményezte, sőt, a 10%-os szilikonolaj-koncentráció tízszeres növekedést eredményezett.

Ezekkel az eredményekkel olyan szilikonmátrixokat állítottunk elő, amelyek egyetlen réteg 2% DADS-ból és 5% és 10% M350 szilikonolajból álltak, és megvizsgáltuk, hogy képesek-e stabilizálni az illékony DADS-tartalmat. Kutatásunk során először Franz-cellás

kioldódás vizsgálatokat végeztünk, mivel azt széles körben használják a transzdermálisan alkalmazható gyógyszerek vizsgálatára ^{73,74}. A vizsgálathoz az előzetes membrán diffúziós mérések alapján 10% szilikonolajat tartalmazó mintákat vizsgáltunk az elkészítéstől számított 4 és 8 nap elteltével. Az IVRT-mérések azt mutatták, hogy a 8 napig tárolt mintákban egyötöd annyi DADS oldódott, mint a 4 napig tárolt mintákban. A **23. ábra** jól mutatja, hogy a 4 napos minta esetében a DADS 10 perc után kimutatható volt a kioldó folyadékban, míg a 8 napos minta esetében csak 30 perc után volt kimutatható. A tárolás során az illékony hatóanyag folyamatosan távozik a készítmény mátrixából, főként a felszínhez közeli rétegekből, amelyet az idő előrehaladtával egyre nehezebb pótolni a mélyebb rétegekből. Eredményeink azt mutatják, hogy a tapasz könnyen felszabaduló hatóanyagtartalma 4 nap alatt 80%-kal csökkent, ami rávilágít további más szulfiddonor vegyületek vizsgálatának szükségességére.

Vizsgáltuk a hatóanyag leadást az átáramló-cella modellünk segítségével is, mivel ez jobb modellt ad a hatóanyag felszabadulására a tapasz alkalmazása során. A minta felülete előtt elhaladó folyadék modellezi a véráramlást, amely a hatóanyagot a szervezet szöveteihez szállítja. Ebben az esetben a folyadék hatóanyagtartalmának koncentrációgradiense nem állandó, mivel a hatóanyag-kioldódás következtében a mátrix folyadékkal érintkező rétegében mindenképp csökken a hatóanyag mennyisége. Ez a mátrixon belüli hatóanyag-diffúzió révén pótlódik, de a hatóanyagban szegényebb réteg időbeli vastagodásával ez már egyre nehezebben pótlódik. Ezért csökken egy idő után a kioldódott hatóanyag mennyisége, ám a vizsgált időtartam alatt ez a hatás viszonylag alacsony, így a hatóanyag koncentrációgradiensét elméletileg nem csökkenőnek, hanem állandónak tekinthetjük.

Ezek az eredmények összhangban vannak a Franz cellás kísérletek során elért eredményekkel. A hatóanyag oldódása minden minta esetében hasonlóan zajlik. A 4 napos minták esetében a 10%-os szilikonolajos mintákban a hatóanyagveszteség nagyobb, mint az 5%-os mintákban, tehát az 5%-os szilikonolajos minták több hatóanyagot adnak le. A hatóanyagveszteség a tárolás során tovább növekszik, így a mintákban visszamaradó DADS mennyisége mindkét mintában (5% és 10% szilikonolaj) majdnem azonos lesz, így a kioldódási görbék szinte átfedik egymást. A kumulatív hatóanyagleadási görbéket (**24. ábra**) vizsgálva azonban látható, hogy a 8 napig tárolt minták hatóanyagtartalma annak illékonyasága miatt jelentősen csökkent, de a magasabb szilikonolaj tartalmú mintában még mindig több DADS oldódott a szilikonolajban, így az ebből a mintából felszabaduló hatóanyag teljes mennyisége nagyobb, mint az 5% M350-et tartalmazó mintáé.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szilikonolaj elősegíti a DADS diffúzióját, és ez a felhasznált szilikonolaj mennyiségével arányosan növekszik. A DADS illékonyága azonban magas, így a hatóanyag mennyisége az idő múlásával folyamatosan csökken, és a szilikonolaj mennyiségének hatása a hatóanyag felszabadulásának sebességére idővel megszűnik.

Tekintettel arra, hogy a eredményeink alapján a DADS alkalmas a transzdermális formában történő alkalmazásra, a továbbiakban szükségesnek tartjuk a vegyület illékonyágának a csökkentését a TTS fejlesztés során.

A természetben előforduló természetes eredetű szerves szulfid molekulák (organic sulfur compounds, „OSC”) a H₂S biológiai hatásaihoz hasonlóan képesek jótékony hatást kifejteni a gyulladásos és fájdalomfolyamatokban^{52,75}. A fokhagyma - amely az Allium növény nemzetség legfontosabb tagját képviseli - OSC-kben igen gazdag zöldségnek számít⁷⁶. A fokhagyma világszerte népszerű konyhai alapanyagként szolgál, és évszázadok óta széles körben használják gyógynövényként. A fokhagyma OSC-anyagai közé tartozik az allicin (diallil-tioszulfínát), amely vizes közegben instabil. Az allicin olajban oldódó származékaira bomlik: diallil-szulfidra (DAS), diallil-diszulfidra (DADS) és diallil-triszulfidra (DATS)^{47,76}. Az allilszulfidok felelősek a fokhagyma csípősségéért, normál körülmények között (szobahőmérséklet, oxigén és páratartalom) nagyobb stabilitást mutatnak, mint az allicin, és fiziológiai körülmények között képesek H₂S-t felszabadítani^{48,75}.

A fokhagymából származó OSC-k, mint például a DADS, szerkezetileg hasonlóak a TRPA1 receptor agonistához, az AITC-hez, így nem meglepő, hogy képesek aktiválni a TRPA1-et⁷⁷. A TRPA1 - amely a TRP receptor család tagja - egy nem szelektív kationcsatorna, amely fontos szerepet játszik a gyulladás és a fájdalomérzet közvetítésében⁷⁸⁻⁸⁰. A receptor aktiválása a cisztein oldalláncokkal való konjugációt és diszulfidhidak kialakulását követően következik be, hasonlóan a H₂S TRPA1-re gyakorolt hatásához⁸¹.

Mivel a peptiderg primer afferensek TRP-csatornákon keresztül történő aktiválása és számos mediátor molekula újbóli felszabadulása ezekből a rostokból nagymértékben részt vesz a krónikus fájdalomállapotok patomechanizmusában, a neurogén gyulladás ezen komponensei kétségtelenül a krónikus fájdalomkezelés fókuszában állnak⁸². A krónikus fájdalom nemcsak a betegek számára jelent komoly egyéni terhet, hanem világszerte jelentős problémát jelent a közegészségügy és a társadalom számára is. A krónikus neuropátiás fájdalom traumás

idegsérülés, cukorbetegség, neurodegeneratív rendellenességek és vírusfertőzések esetén jelentkezhet, míg a krónikus gyulladási fájdalom gyakran kísérője gyulladási rendellenességeknek, mint például az osteoarthritis stb.)^{27,82-85}.

A közelmúltban került publikálásra, hogy a DADS enyhítette a traumás neuropátiás fájdalmat egy ülőideg-ligációs modellben, ha szájon át adják⁵⁴, valamint hogy csökkentette a Complete Freund-féle adjuváns által kiváltott gyulladási fájdalmat, intraperitoneális adás után⁵³. Hasonlóképpen, a H₂S inhalálása, valamint az alkil-szulfid molekula, a dimetil-triszulfid (DMTS) intraperitoneális injekciója szintén mérsékelte a diabéteszes, illetve a traumás neuropátiás fájdalmat^{86,87}. A TRPA1 receptort aktiváló szulfidvegyületek részvétele a nocicepcióban, valamint a kapszaicin - egy másik TRP-csatorna, a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptor erős agonistája - széles körű alkalmazása transzdermális tapaszok formájában neuropátiás fájdalom kezelésére⁸⁸, felvetette a kérdést, hogy a TRPA1-et stimuláló szerek, mint például a H₂S és donorvegyületei, alkalmazhatók-e transzdermális terápiás rendszer formájában. A transzdermális alkalmazás előnyei a következők: (1) alkalmas krónikus alkalmazásra, (2) folyamatos és stabil plazmaszint érhető el, (3) a máj first pass effektusa könnyen megkerülhető, (4) a hatóanyag beadása a tapasz eltávolításával könnyen abbahagyható, és (5) a tapasz darabolásával az adagolás kényelmesen módosítható.

Mivel a H₂S szerepét a fájdalom modulációjában és a gyulladásban az alkalmazás dózisa és felszabadulási sebessége befolyásolja, a lassan felszabaduló szulfid donorok csillapíthatják a nociceptív és neuropátiás fájdalmat. Ezért kulcsfontosságú egy olyan megfelelő TTS létrehozása, amely képes lassan felszabaduló szulfid donor molekulák tárolására és felszabadítására. Az elmúlt években számos lassan felszabaduló szulfid donor vegyületet fejlesztettek ki, mint például a GYY4137, ADT-OH, AP39, AP67, AP123 és FW1256, valamint tioészter alapú H₂S-donorokat⁸⁹⁻⁹⁵, felvetve e vegyületek lehetséges hatékonyságát krónikus neuropátiás és gyulladási fájdalom szindrómákban. Bár számos erőfeszítést tettek a lassan felszabaduló H₂S-donorok transzdermális adagolásának lehetővé tételére érdekében⁹⁶⁻⁹⁸, az optimális mátrix/hordozó rendszer kialakítása még mindig megoldatlan probléma.

Mivel a DADS bizonyítottan lassan és tartósan szabadítja fel a H₂S-t⁹⁹, szerkezete hasznos mintaként szolgált más lassan felszabaduló H₂S-donorok tervezéséhez is⁹⁵; egyéb előnyei mellett ésszerű volt a vizsgálatunk kísérleteit DADS-szal végezni.

Összefoglalva, a jelen munka eredményei azt mutatják, hogy a poli(dimetilsziloxán) alapú mátrix kémiaiilag semleges szerkezete alkalmas a szulfid alapú hatóanyagok bejuttatására. Ezen túlmenően a DADS megfelelő modell vegyületként szolgál a szulfidtartalmú anyagok transzdermális terápiás rendszerének kifejlesztéséhez, így kiváló alapot biztosít a transzdermális tapaszok jövőbeli fejlesztéséhez más ígéretes, lassan felszabaduló szulfid donor molekulákkal.

5.2. A kapszaicin tartalmú tapaszok fejlesztésének konklúziói

Bemutatott munkám ezen szakasza során olyan transzdermális tapaszokat készítettünk és teszteltünk, amelyek szabályozottan, az ideális nulladrendű kinetikát jól közelítve adják le a kapszaicin hatóanyagot. TTS technológiánk a módosított szilikon-polimer alapú diffúziós gradiens által szabályozott rendszer volt, amely optimális gyógyszerkibocsátást és költséghatékony technológiát biztosított. Kétféle tapaszt állítottunk elő térhálósított szilikonpolimer módszerrel, amely különböző kapszaicin-koncentrációkat tartalmazott, és „in vitro” és „in vivo” körülmények között vizsgáltuk azokat ¹⁰⁰.

Az általunk hordozó mátrixként használt szilikonpolimer apoláris tulajdonságokkal rendelkezik. Mivel a kapszaicin relatív poláris jelleget mutat (a szilikon mátrixhoz képest), az apoláris mátrixban polárisabb környezetet kellett létrehozni, hogy elősegítsük a megfelelő mennyiségben történő hatóanyag leadást, ehhez pedig arra volt szükség, hogy a hatóanyag molekulái megfelelően mozogjanak a szilikon mátrix belsejében. ¹⁰¹. A kapszaicin nagyon jól oldódik alkoholokban, de a rövidebb szénláncú egyértékű alkoholok illékony vegyületek, és káros hatással vannak az emberi bőrre. Oldószerként a legegyszerűbb háromértékű alkoholt, a glicerint használtuk. Viszonylag jól oldja a kapszaicint és bőrbarát. A glicerint azonban oldhatatlan a szilikon oligomerekben, ezért emulgeálószerként használtunk annak érdekében, hogy azt a mátrixban egyenletesen tudjuk eloszlatni. Mint az elővizsgálatok során kiderült, a kapszaicinnal telített glicerint nem tartalmaz elegendő hatóanyagot ahhoz, hogy megfelelő gyógyszer leadási kinetikát lehessen elérni a gyógyszer megfelelő mennyiségben történő leadásához, ezért más utat választottunk. Úgy fejlesztettük az összetételt, hogy a további kapszaicin bevitelét szilárd kapszaicinnek a mátrixban való diszpergálásával oldottuk meg. Ez azért jelentett technológiai problémát, mivel a nagyon kevés szilárd kapszaicin mennyisége bizonytalanná tette volna a homogén eloszlást.

Ezért többféle megoldás kipróbálása után arra jutottunk, hogy kalcium-karbonáttal porhígítást készítettünk belőle, a pontos adagolás és a gyógyszer homogén eloszlásának

biztosítása érdekében. A porhígítás és a törzsoldat megfelelő arányának kikísérletezésével párhuzamosan fontos probléma volt megoldani a megfelelőhatóanyag leadási kinetikát is. Így további kísérletek során a gyógyszer tartalmazó rétegre gyógyszermentes, glicerint is tartalmazó szabályozó rétegekkel kísérleteztünk. A tapasz összetétel fejlesztés második szakasza során már ezzel a kiegészítővel készítettünk mintákat, így a kapszaicin akadálytalanul, de csak a kívánt mennyiségben diffundálhatott ki a tapaszból.

A körülbelül 40 féle összetétel kipróbálása után eljutottunk addig, hogy már állatkísérletes célokra is megfelelő minőségű tapaszokat állítsunk elő. Így a több száz elvégzett mérés kiértékelése alapján az *in vivo* kísérletekhez sikerült leszűkíteni a lehetséges összetételek spektrumát, a további vizsgálatokhoz 1 mg/g és 2,3 mg/g kapszaicint tartalmazó tapaszokat készítettünk és teszteltünk.

Az átfolyócellákban végzett hatóanyagleadási vizsgálatokban a gyógyszer a nagyobb hatóanyagtartalmú tapaszból sokkal nagyobb mennyiségben oldódott ki, és a kioldódás mértéke 3 óra elteltével beállt az egyenletes, $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{óra}$ értékre. A kezdeti nagy hatóanyagfelszabadulás annak a következménye, hogy a szabályozó réteg kezdetben - az alatta található gyógyszer tartalmú rétegből - már kapszaicinnal telítődött. A kioldódás vizsgálat első órájában a gyógyszer először ebből a telített rétegből oldódik ki. A kioldódás mértéke - a gyógyszer rövid diffúziós útja miatt - nagy. A szabályozó rétegből felszabaduló gyógyszer az alatta levő rétegben oldott hatóanyagból pótlódik, de a diffúziós távolság növekedése miatt a kioldódás mértéke csökken, majd az egyensúly beállása után állandó marad. Ez ugyanaz a jelenség, ami a DADS tartalmú tapaszoknál is megfigyelhető, és az ilyen típusú tapaszok sajátosságának tekinthető. Ez az eredmény azért biztató, mert mint korábban ismertettem, az átfolyó cellás mérési mód a vérplazma koncentrációt hivatott modellezni, amely a várt szisztémás hatás kifejtése miatt kulcsfontosságú.

Alacsonyabb gyógyszer tartalmú tapasz esetén a szabályozó réteg nem tud telítődni kapszaicinnal. A gyógyszer leadás alacsonyabb szintről indul, és ez az érték az idő múlásával kissé, de folyamatosan csökken a növekvő diffúziós út miatt.

Ennek következtében a kioldódási tesztben megfigyelt jelenségek abból adódnak, hogy a nagyobb koncentrációjú tapasz szabályozó rétege majdnem telített a gyógyszerrel, és a kapszaicint folyamatosan adagolja a folyékony közegben a gyógyszer tartalmazó rétegből

történő diffúzióval. Ez a jelenség nem fordul elő a kisebb gyógyszer tartalmú tapaszban, és a növekvő diffúziós távolság egyre csökkenő hatóanyag-kioldódási értéket eredményez.

Másrészt kijelenthető, hogy a szabályozó réteg mindkét összetételben eleget tesz elvárt funkciójának. A mátrix-diffúziós tapaszoknál megfigyelt exponenciális koncentráció-csökkenés helyett egy lassan csökkenő felszabadulási görbe figyelhető meg.

Hasonló jelenség figyelhető meg a hatóanyagleadási vizsgálatokban (IVRT) Franz cellában. Az alacsonyabb kapszaicin tartalmú tapaszból lényegesen kisebb a gyógyszerleadás értéke. A humán bőrön végzett permeációs vizsgálat (IPVT) szerint a gyógyszer penetrációja kisebb volt az alacsonyabb gyógyszer tartalmú tapaszból, és a kapszaicin bőrön való átjutása is hosszabb időt igényelt. Magasabb hatóanyagtartalmú tapaszokban a vegyület a vizsgálati időtartam fele alatt már átjut a bőrön. Az átjutott hatóanyag mennyisége itt sokkal nagyobb, mint az arányosan elvárható.

Az eredmények azt mutatják, hogy az általunk alkalmazott rétegekombináció esetén minél nagyobb a gyógyszer tartalom, annál jobb a kívánt nulladrendű gyógyszer leadási kinetika. A hosszan tartó, szabályozott hatóanyagleadást a Raman mikroszkópos vizsgálatok is megerősítették. A gyógyszer a magasabb kapszaicin-tartalmú tapaszokból egyenletesen és tartósan behatolt a bőrszövetbe. A tapaszok elkészítéséhez használt eszközök és módszerek az ipari gyártást modellezik. Ezért az alkalmazott technológiák - kisebb módosításokkal - kisüzemi gyártáshoz is adaptálhatók.

A nagy koncentrációban (8%) kapszaicint tartalmazó tapaszok engedélyezettek a posztherpeszes neuralgia kezelésére¹⁰². Ezeknek a tapaszoknak a hatásmechanizmusa magában foglalja a primer nociceptor idegvégződések tranziens receptor potenciális vanilloid 1 (TRPV1) ioncsatornáinak erős és tartós aktiválását, majd deszenzitizációját. A csatornák megnyílása az idegvégződések kórosan megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját idézi elő, amely citoskeletális és mitokondriális károsodáshoz vezet. A fájdalomérző idegvégződések 12-14 hétig nem működnek, hosszan tartó fájdalomcsillapítást biztosítva^{62,103}. A helyi kapszaicin általi defunkcionalizáció csak a bőr nociceptorait érinti, a kapszaicin nem jut be a keringésbe olyan koncentrációban, hogy szisztémás mellékhatásokat okozzon.¹⁰⁴

Klinikai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a sokkal kisebb kapszaicin-koncentrációt tartalmazó transzdermális rendszerek is hatékonyak lehetnek a neuropátiás fájdalom ellen. A csak 0,04% kapszaicint tartalmazó tapasz a betegek 60,1% -án enyhítette a posztherpetikus

neuropátiás fájdalmat, ezeknél a betegeknél átlagosan 28,2% -os fájdalomcsillapító hatás mérték a 12 hetes klinikai vizsgálat alatt¹⁰⁵. A poszt-herpetikus vagy a diabéteszes neuropátiás fájdalomtól szenvedő vegyes betegcsoport 0,625% kapszaicint tartalmazó transzdermális tapasz fájdalomcsillapító hatását tapasztalta.¹⁰⁶

Elgondolkodtató lehet, hogy egy ilyen alacsony kapszaicin-tartalom hogyan fejthet ki hatékony fájdalomcsillapító hatást. A mélyebb mozgásszervi és ízületi területeken kialakult antinociceptív hatás nem magyarázható csak a bőr alatti idegvégződések deszenzitizálásával¹⁰⁴. A TRPV1 ioncsatornák aktiválása és az ebből következő sejten belüli Ca^{2+} koncentráció emelkedése neuropeptid felszabadulást indukál, de nem károsítja az idegvégződéseket. Ezen peptidek hozzájárulnak többek között a vazodilatációhoz és a plazma extravazációhoz, így pl. a calcitonin gén-rokon peptid (calcitonin gene-related peptide, CGRP) és a P-anyag (substance P, SP). Más peptideknek, például a szomatosztatinnak (SST) vagy az endogén opioidoknak fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatása lehet¹⁰⁷. A szomatosztatin szisztémás antinociceptív hatását állatkísérletek is igazolták^{108,109}. A transzdermálisan adott kapszaicin a bőr alsó rétegeiben eléri a szomatosztatin tartalmú idegvégződések, melyekből a TRPV1 ioncsatorna aktivációja révén felszabadítja a szomatosztatint, ami a véráramba kerülve szisztémás fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatást okoz.

Embereken végzett 21 napos vizsgálatok adatai szerint a helyi kapszaicinoid-kezelés szisztémás fájdalomcsillapító hatása összefügg a szomatosztatin-koncentráció szignifikáns növekedésével a plazmában. Az elvégzett vizsgálatok fő újdonsága, hogy az SST szerű immunválasz (SST-like immunoreactivity, SST-LI) háromszoros emelkedését észlelték a kapszaicinoidra adott válaszként az 1. napon. A 21 napos vizsgálat végén nem volt különbség az SST-LI szintek között a helyi kapszaicinoid kezelés előtt és után, mivel a kapszaicin-érzékeny idegvégződések ismételt ingerlése a neurális SST-raktárak kimerüléséhez vezet. Ám feltételezhető, hogy a kapszaicinoiddal való napi kezelést 21 napon keresztül ismétlődően alkalmazva, a szervezet folyamatosan képes az SST-t felszabadítani, amely hosszú távú, centrálisan és perifériásan közvetített fájdalomcsillapító hatást fejtett ki az idegvégződések és a gyulladós sejtek SST-receptoraira hatva.¹¹⁰

A patkány ágyéki gerincvelőjének II. rétegében szomatosztatin immunreaktív struktúrákat detektáltak, amelyeket a szomatosztatin által kiváltott fájdalomcsillapítás anatómiai alapjaként javasoltak¹¹¹. Az sst4 receptor mRNS expresszióját az egér és az emberi

neuronális fájdalomérzet útvonalának különböző szintjein detektálták¹¹². A szomatosztatin fájdalomcsillapító hatása, beleértve a neuropátiás fájdalmat, szelektív sst₄ receptor agonistával reprodukálható volt^{113,114}.

Összefoglalva, ezen munkában vizsgált transzdermális tapaszunk lehetőséget nyújt alacsony dózisu, helyi kapszaicin kezelésre anélkül, hogy szennyezné a felhasználó kezét vagy ruházatát, és a tapaszok méretre vágásával lehetővé teszi a kapszaicin pontos adagolását. Az általunk fejlesztett technológiával előállított TTS megfelelő hatóanyagleadási kinetikát mutat, amelyet más hatóanyagokkal is ki lehet használni. Transzdermális rendszerünket rutin – Franz cellás, Raman-spektroszkópiai és saját fejlesztésű - átáramló cellás - *in vitro* teszteknek vetettük alá. Véleményünk szerint az átáramló cellák körülményei pontosabban modellezik a bőrszövetekben zajló folyamatokat, és ez által a tapaszból történő hatóanyagleadást. A nociceptio jól bevált állatmodelljeit választottuk transzdermális rendszerünk vizsgálatához. A növekvő hőmérsékletű vízfürdő nem széles körben ismert módszer, annak ellenére, hogy a műtéti talp bemetszéses fájdalom modellben validálták opioidokkal és NSAID-okkal¹¹⁵. A teljes talp felület hőnek való kitettsége komoly előnyt jelent a műtéti metszési modellben, mivel a talp különböző területein eltérő fokú hiperalgécia mutatkozhat. Ez a gyakorlatban komoly kihívást jelent, még ha nem is teszi lehetetlenné a mechanikai tesztelést. Éppen ellenkezőleg, a klasszikus karragén által kiváltott talp-gyulladás lehetővé teszi a mechanikus hiperalgécia könnyű és hatékony tesztelését dinamikus plantáris eszteziometriával¹¹⁶. A karragén által kiváltott talp-gyulladáson átesett állatok nem mutatnak hő hiperalgéciaát. Ezek a módszerek alkalmasak lehetnek más transzdermális terápiás rendszerek tesztelésére is.

6. Új eredmények összefoglalása

Munkám során kitűzött céljaim között szerepelt, hogy kifejlesszek olyan TTS-eket, amelyek fájdalomcsillapító hatásukat TRPA1 aktiváló hatóanyag (szulfiddonor molekulák), valamint TRPV1 aktiváló hatóanyag bőrön keresztüli bejuttatásával (kapszaicin) fejtik ki. További céljaim között szerepelt ezen rendszerek tesztelése, minősítése mind *in vitro* mind *in vivo* körülmények között. PhD munkám során az alábbi új eredményeket értem el:

1. Membrán- és mátrix-diffúziós kísérletek eredményei alapján kifejlesztettünk egy szilikon polimer alapú, szulfiddonor molekula hordozására optimalizált TTS-t, amelyben modell hatóanyagként diallil-diszulfidot alkalmaztunk. A rendszer fejlesztése során kidolgoztuk a megfelelő polimer-segédanyag kombinációt, amely alkalmas szulfid tartalmú vegyületek hordozására, képes annak megfelelő leadására, valamint tapasztalatokat gyűjtöttünk az ilyen típusú, illékony hatóanyagok alkalmazásával kapcsolatosan.

2. A DADS hatóanyag tartalmú TTS modellek *in vitro* vizsgálata során megállapítottuk, hogy közel nulladrendű hatóanyag-leadási kinetikájú rendszerek kifejlesztése illékony szulfiddonor molekulák esetén is lehetséges.

3. Hosszas fejlesztő munkával, membrán- és mátrix-diffúziós, valamint egy- és több réteget tartalmazó minták vizsgálatai alapján, számos lehetséges kombinációt kipróbálva kifejlesztettünk egy szilikon polimer alapú, kapszaicin hatóanyagtartalmú TTS-t ami teljesen biokompatibilis rendszer, a hatóanyag homogén eloszlású, és a készítmény hosszú távon stabil.

4. *In vitro* vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a kifejlesztett kapszaicin tartalmú TTS-ek hosszú távon, nulladrendű kinetikának megfelelően adják le hatóanyagukat, egyenletesen és megbízhatóan. Megállapítottuk, hogy a kifejlesztett rendszerből a leadott kapszaicin hatékonyan penetrál át a bőrön, így megfelelő mennyiségben adódik le a szisztémás hatás kifejtése érdekében.

5. *In vivo* vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az elkészült kapszaicines TTS-ek többféle állatkísérleti modellben (patkány, műtéti sebzés okozta fájdalom modell és karragén indukált gyulladás okozta fájdalom modell) hatékonyan, jól kimutatható módon csökkentik az akut fájdalmat.

Ezeket a kísérleteket olyan körülmények között végeztük el, hogy azok már preklinikai eredményként szolgáljanak egy későbbi fázishoz, melyben célunk az elért eredmények alapján egy gyakorlatban hasznosítható gyógyszer megalkotása.

7. Tudományos eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

A kutatócsoportunk által kifejlesztett, és szabadalmaztatás alatt álló TTS innovatív szerkezeti felépítése, a szilikon polimer mátrix megfelelő hordozóanyagot biztosít olyan kismolekulájú, szerves hatóanyagok (pl. kapszaicinoidok, allil-szulfidok) számára, amelyek az új típusú fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatóanyagok fejlesztésében jelentős terápiás potenciállal rendelkeznek. Ennek a szerkezeti felépítésnek köszönhetően az alacsony dózisú kapszaicint tartalmazó TTS hosszú időn keresztül biztosítja a hatóanyag egyenletes sebességű bejutását a bőrbe.

Az alacsony dózisú kapszaicint tartalmazó TTS segítségével :

- (1) hatékony fájdalomcsillapítás érhető el az érzőidegek funkció kiesése ill. a kezdeti fájdalomkeltő hatás nélkül;
- (2) egyenletes sebességű, hosszan tartó hatóanyagleadás biztosítható;
- (3) a hatóanyag a bőr mélyebb rétegeibe is bejuttatható;
- (4) a terápiás hatás a tapasz eltávolításával bármikor megszüntethető;
- (5) a tapasz méretre vágásával az alkalmazandó dózis egyszerűen beállítható;
- (6) a kezek és a ruházat szennyeződése könnyedén elkerülhető.

A helyileg alkalmazott alacsony dózisú kapszaicin nem szteroid gyulladáscsökkentőkkel (NSAID-okkal) történő kombinációja mind a neurológiai, mind a reumatológiai klinikai gyakorlatban előforduló, tapasztalati alapokon nyugvó terápiás lehetőség a krónikus degeneratív többbűzleti gyulladás kezelésére, ám ezen kombinált hatanyagú terápiának a pontos mechanizmusa még nem tisztázott.

8. Jövőbeni tervek

Az általunk kifejlesztett TTS-ben az alacsony dózisú kapszaicin hordozóanyaga egy szilikon polimer mátrix, melyben a térhálósított szerkezetnek köszönhetően a hatóanyag egyenletesen oszlik el a tapaszban, így biztosítva annak egyenletes és hosszan tartó felszabadulását. Az innovatív hordozóanyagnak és az új típusú fájdalomcsillapító hatásmechanizmusnak köszönhetően számos előnye van a forgalomban lévő nagy dózisú tapaszokkal, ill. krémekkel szemben. Kiemelendő, hogy ezen előnyök az alacsony dózisú kapszaicinnek más hatóanyaggal történő kombinációja esetén is megmaradnak.

Mivel az alacsony dózisú kapszaicin a TRPV1 receptor tartós, alacsony intenzitású aktivációját okozza, és lokálisan értágító anyag felszabadulását váltja ki, így logikusan következik, hogy a gyulladt terület fokozódó vérellátása potenciálisan elősegítheti az egyéb fájdalomcsillapító anyagok (pl. NSAID-ok) felszívódását.

Kutatócsoportunk célja tehát az alacsony dózisú kapszaicin TTS továbbfejlesztése, melynek során a kapszaicint egy olyan NSAID-al tervezzük kombinálni, amelynek oldhatósága szilikonmátrixban apoláris vagy poláris oldószerrel jól szabályozható. Az alacsony dózisú kapszaicin és az NSAID-ok újszerű, egy tapaszban történő kombinációja egyedülálló, hiánypótló termék a fájdalomcsillapító készítmények piacán, amelyre óriási igény mutatkozik a neurológiai és reumatológiai betegellátásban. A TTS elkészítéséhez használt eszközök és módszerek az ipari gyártást modellezik, így az alkalmazott technológiák kisebb módosításokkal kisüzemi gyártáshoz is jól alkalmazhatók.

9. Irodalom jegyzék

1. Hong IK, Lee S. Cure kinetics and modeling the reaction of silicone rubber. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2013;19(1):42-47. doi:10.1016/j.jiec.2012.05.006
2. A Review on Silicone Rubber | SpringerLink. Accessed June 26, 2023. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40009-013-0150-2>
3. Hydrophilisation of silicone rubber for medical applications - Hron - 2003 - Polymer International - Wiley Online Library. Accessed June 26, 2023. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pi.1273>
4. Chen D, Yi S, Fang P, Zhong Y, Huang C, Wu X. Synthesis and characterization of novel room temperature vulcanized (RTV) silicone rubbers using octa[(trimethoxysilyl)ethyl]-POSS as cross-linker. *Reactive and Functional Polymers*. 2011;71(4):502-511. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2010.12.010
5. Bueche AM. The curing of silicone rubber with benzoyl peroxide. *Journal of Polymer Science*. 1955;15(79):105-120. doi:10.1002/pol.1955.120157909
6. Mechanical properties and antibacterial activity of peroxide-cured silicone rubber foams - Park - 2008 - Journal of Applied Polymer Science - Wiley Online Library. Accessed June 26, 2023. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.28750>
7. The action of tin compounds in condensation-type RTV silicone rubbers - van Der Weij - 1980 - Die Makromolekulare Chemie - Wiley Online Library. Accessed June 26, 2023. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/macp.1980.021811211>
8. Tang Y, Tsiang R. Rheological, extractive and thermal studies of the room temperature vulcanized polydimethylsiloxane. *Polymer*. 1999;40(22):6135-6146. doi:10.1016/S0032-3861(98)00830-1
9. Altenbuchner A, Barthel H, Perisser T, Rsch L, Weis J. Adsorption of Polydimethylsiloxane on Hydrophilic and Silylated Fumed Silica. Investigations by Differential Scanning Calorimetry. In: Auner N, Weis J, eds. *Organosilicon Chemistry Set*. Wiley-VCH Verlag GmbH; 2005:763-772. doi:10.1002/9783527620777.ch119c

10. Han R, Li Y, Zhu Q, Niu K. Research on the preparation and thermal stability of silicone rubber composites: A review. *Composites Part C: Open Access*. 2022;8:100249. doi:10.1016/j.jcomc.2022.100249
11. Pastore MN, Kalia YN, Horstmann M, Roberts MS. Transdermal patches: history, development and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172(9):2179-2209. doi:10.1111/bph.13059
12. Aliyar H, Schalau G. Recent developments in silicones for topical and transdermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(7):827-839. doi:10.4155/tde.15.39
13. Bird D, Ravindra NM. Transdermal drug delivery and patches—An overview. *Med Devices Sens*. 2020;3(6). doi:10.1002/mds3.10069
14. Pujari P, Sangar MOS, Mulla DJS. An Overview Of The Transdermal Drug Delivery System. 2022;10(5).
15. Ramadon D, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv and Transl Res*. 2022;12(4):758-791. doi:10.1007/s13346-021-00909-6
16. Sabbagh F, Kim BS. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2022;341:132-146. doi:10.1016/j.jconrel.2021.11.025
17. Kandavilli S, Nair V, Panchagnula R. Polymers in Transdermal Drug Delivery Systems.
18. Kurakula M, Rao GSNK. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;60:102046. doi:10.1016/j.jddst.2020.102046
19. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery*. 2006;13(3):175-187. doi:10.1080/10717540500455975
20. فون ي, فھر ة, لائل ت, ؤرون ي. Transdermal Drug Delivery System.

21. Wang Y, Thakur R, Fan Q, Michniak B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):179-191. doi:10.1016/j.ejpb.2004.12.008
22. Ita K. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:1116-1127. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.019
23. Pieńkowska K, Jamróiewicz M, Zebrowska M, Sznitowska M, Centkowska K. Technology of an adhesive silicone film as drug carrier in transdermal therapy. I: Analytical methods used for characterization and design of the universal elastomer layers. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;56:131-138. doi:10.1016/j.jpba.2011.04.011
24. Wagner Ö. Development of a New Silicon-Based Transdermal System. I. Study of Silicone Elastomers and Effect of Liquid Ingredients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1998;24(3):243-252. doi:10.3109/03639049809085616
25. Wagner Ö, Hencsei P, Liptay G. Development of a new silicone base transdermal therapeutic system.
26. Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*. 2016;354(6312):572-577. doi:10.1126/science.aaf8924
27. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*. 2006;10(4):287-287. doi:10.1016/j.ejpain.2005.06.009
28. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences*. 2003;26(12):696-705. doi:10.1016/j.tins.2003.09.017
29. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science*. 2000;288(5472):1765-1768. doi:10.1126/science.288.5472.1765
30. Murnion BP. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust Prescr*. 2018;41(3):60-63. doi:10.18773/austprescr.2018.022

31. Scholz J, Finnerup NB, Attal N, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*. 2019;160(1):53-59. doi:10.1097/j.pain.0000000000001365
32. Cavaletti G, Alberti P, Frigeni B, Piatti M, Susani E. Chemotherapy-Induced Neuropathy. *Curr Treat Options Neurol*. 2011;13(2):180-190. doi:10.1007/s11940-010-0108-3
33. Cruccu G, Finnerup NB, Jensen TS, et al. Trigeminal neuralgia: New classification and diagnostic grading for practice and research. *Neurology*. 2016;87(2):220-228. doi:10.1212/WNL.0000000000002840
34. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630-1635. doi:10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59
35. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(14)70251-0
36. Cohen SP, Vase L, Hooten WM. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *The Lancet*. 2021;397(10289):2082-2097. doi:10.1016/S0140-6736(21)00393-7
37. Moore RA, Chi CC, Wiffen PJ, Derry S, Rice AS. Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for neuropathic pain. Cochrane Pain, Palliative and Supportive Care Group, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015;2019(5). doi:10.1002/14651858.CD010902.pub2
38. Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler EJ, Zachariou V, Narita M. Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends in Neurosciences*. 2015;38(4):237-246. doi:10.1016/j.tins.2015.02.001
39. Gerasimova E, Lebedeva J, Yakovlev A, Zefirov A, Giniatullin R, Sitdikova G. Mechanisms of hydrogen sulfide (H₂S) action on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*. 2015;303:577-585. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.036

40. Panthi S, Chung HJ, Jung J, Jeong NY. Physiological Importance of Hydrogen Sulfide: Emerging Potent Neuroprotector and Neuromodulator. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1-11. doi:10.1155/2016/9049782
41. Guo J, Li G, Yang L. Role of H₂S in pain: Growing evidences of mystification. *European Journal of Pharmacology*. 2020;883:173322. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173322
42. Batallé G, Cabarga L, Pol O. The Inhibitory Effects of Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donors in the Mechanical Allodynia, Grip Strength Deficits, and Depressive-Like Behaviors Associated with Chronic Osteoarthritis Pain. *Antioxidants*. 2019;9(1):31. doi:10.3390/antiox9010031
43. Bai X, Batallé G, Pol O. The Anxiolytic and Antidepressant Effects of Diallyl Disulfide and GYY4137 in Animals with Chronic Neuropathic Pain. *Antioxidants*. 2021;10(7):1074. doi:10.3390/antiox10071074
44. Donatti AF, Araujo RM, Soriano RN, Azevedo LU, Leite-Panissi CA, Branco LGS. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2014;738:49-56. doi:10.1016/j.ejphar.2014.05.023
45. Lucarini E, Micheli L, Martelli A, et al. Efficacy of isothiocyanate-based compounds on different forms of persistent pain. *JPR*. 2018;Volume 11:2905-2913. doi:10.2147/JPR.S161882
46. Kida K, Marutani E, Nguyen RK, Ichinose F. Inhaled hydrogen sulfide prevents neuropathic pain after peripheral nerve injury in mice. *Nitric Oxide*. 2015;46:87-92. doi:10.1016/j.niox.2014.11.014
47. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical Pharmacology*. 2018;149:110-123. doi:10.1016/j.bcp.2017.11.014
48. Song Z, Zhao L, Ma T, et al. Progress and perspective on hydrogen sulfide donors and their biomedical applications. *Medicinal Research Reviews*. 2022;42(5):1930-1977. doi:10.1002/med.21913

49. Zhao Y, Zhang WD, Liu XQ, et al. Hydrogen Sulfide and/or Ammonia Reduces Spermatozoa Motility through AMPK/AKT Related Pathways. *Sci Rep.* 2016;6(1):37884. doi:10.1038/srep37884
50. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(34):12248-12252. doi:10.1073/pnas.0505356102
51. Liang HF, Lin CC, Wu KM. Breaking through the dilemma of whether to continue nursing: Newly graduated nurses' experiences of work challenges. *Nurse Education Today.* 2018;67:72-76. doi:10.1016/j.nedt.2018.04.025
52. Song X, Yue Z, Nie L, Zhao P, Zhu K, Wang Q. Biological Functions of Diallyl Disulfide, a Garlic-Derived Natural Organic Sulfur Compound. Durazzo A, ed. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2021;2021:1-13. doi:10.1155/2021/5103626
53. Porta A, Rodríguez L, Bai X, et al. Hydrogen Sulfide Inhibits Inflammatory Pain and Enhances the Analgesic Properties of Delta Opioid Receptors. *Antioxidants.* 2021;10(12):1977. doi:10.3390/antiox10121977
54. Wang G, Yang Y, Wang C, et al. Exploring the role and mechanisms of diallyl trisulfide and diallyl disulfide in chronic constriction-induced neuropathic pain in rats. *Korean J Pain.* 2020;33(3):216-225. doi:10.3344/kjp.2020.33.3.216
55. Gîtin L, Dinică R, Neagu C, Dumitrascu L. Sulfur compounds identification and quantification from *Allium* spp. fresh leaves. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2014;22(4):425-430. doi:10.1016/j.jfda.2014.04.002
56. Yuan X ke, Chen X qing, Jiang X yu, Nie Y li. Synthesis, characterization and bioactivity evaluation of diallyl disulfide. *J Cent South Univ Technol.* 2006;13(5):515-518. doi:10.1007/s11771-006-0079-4
57. Arora V, Campbell JN, Chung MK. Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain. *Pharmacology & Therapeutics.* 2021;220:107743. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107743

58. Wallace M, Duan R, Liu W, Locke C, Nothaft W. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study of the T-Type Calcium Channel Blocker ABT-639 in an Intradermal Capsaicin Experimental Pain Model in Healthy Adults. *Pain Med*. Published online December 16, 2015:pnv068. doi:10.1093/pm/pnv068
59. Szolcsányi J, Pintér E. Transient receptor potential vanilloid 1 as a therapeutic target in analgesia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013;17(6):641-657. doi:10.1517/14728222.2013.772580
60. Derry S, Moore RA. Topical capsaicin (low concentration) for chronic neuropathic pain in adults. Cochrane Pain, Palliative and Supportive Care Group, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;2019(5). doi:10.1002/14651858.CD010111
61. Backonja M, Wallace MS, Blonsky ER, et al. NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind study. *The Lancet Neurology*. 2008;7(12):1106-1112. doi:10.1016/S1474-4422(08)70228-X
62. Babbar S, Chanda S, Bley K. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes *in vitro* by capsaicin. *Xenobiotica*. 2010;40(12):807-816. doi:10.3109/00498254.2010.520044
63. Simpson DM, Gazda S, Brown S, et al. Long-Term Safety of NGX-4010, a High-Concentration Capsaicin Patch, in Patients with Peripheral Neuropathic Pain. *Journal of Pain and Symptom Management*. 2010;39(6):1053-1064. doi:10.1016/j.jpainsymman.2009.11.316
64. Gálvez R, Navez ML, Moyle G, et al. Capsaicin 8% Patch Repeat Treatment in Nondiabetic Peripheral Neuropathic Pain: A 52-Week, Open-Label, Single-Arm, Safety Study. *The Clinical Journal of Pain*. 2017;33(10):921-931. doi:10.1097/AJP.0000000000000473
65. Bannister K, Sachau J, Baron R, Dickenson AH. Neuropathic Pain: Mechanism-Based Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020;60(1):257-274. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021524

66. Pickering G, Martin E, Tiberghien F, Delorme C, Mick G. Localized neuropathic pain: an expert consensus on local treatments. *DDDT*. 2017;Volume 11:2709-2718. doi:10.2147/DDDT.S142630
67. Rollyson WD, Stover CA, Brown KC, et al. Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014;196:96-105. doi:10.1016/j.jconrel.2014.09.027
68. Tojo K, Sun Y, Ghannam M, Chien YW. Simple Evaluation Method of Intrinsic Diffusivity for Membrane-Moderated Controlled Release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1985;11(6-7):1363-1371. doi:10.3109/03639048509059868
69. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies | SpringerLink. Accessed June 26, 2023. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-010-9522-9>
70. Zsikó S, Csányi E, Kovács A, Budai-Szűcs M, Gácsi A, Berkó S. Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro. *Scientia Pharmaceutica*. 2019;87(3):19. doi:10.3390/scipharm87030019
71. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996;64(3):493-502. doi:10.1016/0304-3959(95)01441-1
72. Bakonyi M, Gácsi A, Kovács A, Szűcs MB, Berkó S, Csányi E. Following-up skin penetration of lidocaine from different vehicles by Raman spectroscopic mapping. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;154:1-6. doi:10.1016/j.jpba.2018.02.056
73. Shelke S, Pathan I, Shinde G, et al. Poloxamer-Based In Situ Nasal Gel of Naratriptan Hydrochloride Deformable Vesicles for Brain Targeting. *BioNanoSci*. 2020;10(3):633-648. doi:10.1007/s12668-020-00767-5
74. Shinde G, Desai P, Shelke S, Patel R, Bangale G, Kulkarni D. Mometasone furoate-loaded aspasomal gel for topical treatment of psoriasis: formulation, optimization, *in vitro* and *in vivo* performance. *Journal of Dermatological Treatment*. 2022;33(2):885-896. doi:10.1080/09546634.2020.1789043

75. Zhao Y, Biggs TD, Xian M. Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chem Commun.* 2014;50(80):11788-11805. doi:10.1039/C4CC00968A
76. Corvino A, Frecentese F, Magli E, et al. Trends in H₂S-Donors Chemistry and Their Effects in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants.* 2021;10(3):429. doi:10.3390/antiox10030429
77. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(34):12248-12252. doi:10.1073/pnas.0505356102
78. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, et al. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiological Reviews.* 2020;100(2):725-803. doi:10.1152/physrev.00005.2019
79. Souza Monteiro De Araujo D, Nassini R, Geppetti P, De Logu F. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2020;24(10):997-1008. doi:10.1080/14728222.2020.1815191
80. Manolache A, Babes A, Madalina Babes R. Mini-review: The nociceptive sensory functions of the polymodal receptor Transient Receptor Potential Ankyrin Type 1 (TRPA1). *Neuroscience Letters.* 2021;764:136286. doi:10.1016/j.neulet.2021.136286
81. Pozsgai G, Bátaí IZ, Pintér E. Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels: TRPA1-mediated effects of sulfide and polysulfides. *British Journal of Pharmacology.* 2019;176(4):628-645. doi:10.1111/bph.14514
82. Seidel MF, Hügle T, Morlion B, et al. Neurogenic inflammation as a novel treatment target for chronic pain syndromes. *Experimental Neurology.* 2022;356:114108. doi:10.1016/j.expneurol.2022.114108
83. Sá KN, Moreira L, Baptista AF, et al. Prevalence of chronic pain in developing countries: systematic review and meta-analysis. *PR9.* 2019;4(6):e779. doi:10.1097/PR9.0000000000000779

84. Dineen J, Freeman R. Autonomic Neuropathy. *Semin Neurol.* 2015;35(04):458-468. doi:10.1055/s-0035-1558983
85. Murnion BP. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust Prescr.* 2018;41(3):60-63. doi:10.18773/austprescr.2018.022
86. Li H, Liu S, Wang Z, Zhang Y, Wang K. Hydrogen sulfide attenuates diabetic neuropathic pain through NO/cGMP/PKG pathway and μ -opioid receptor. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245(9):823-834. doi:10.1177/1535370220918193
87. Dombi Á, Sánta C, Bártai IZ, et al. Dimethyl Trisulfide Diminishes Traumatic Neuropathic Pain Acting on TRPA1 Receptors in Mice. *IJMS.* 2021;22(7):3363. doi:10.3390/ijms22073363
88. Blair HA. Capsaicin 8% Dermal Patch: A Review in Peripheral Neuropathic Pain. *Drugs.* 2018;78(14):1489-1500. doi:10.1007/s40265-018-0982-7
89. Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GY4137): New Insights Into the Biology of Hydrogen Sulfide. *Circulation.* 2008;117(18):2351-2360. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467
90. Jia J, Xiao Y, Wang W, et al. Differential mechanisms underlying neuroprotection of hydrogen sulfide donors against oxidative stress. *Neurochemistry International.* 2013;62(8):1072-1078. doi:10.1016/j.neuint.2013.04.001
91. Szczesny B, Módis K, Yanagi K, et al. AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide.* 2014;41:120-130. doi:10.1016/j.niox.2014.04.008
92. Kulkarni-Chitnis M, Njie-Mbye YF, Mitchell L, et al. Inhibitory action of novel hydrogen sulfide donors on bovine isolated posterior ciliary arteries. *Experimental Eye Research.* 2015;134:73-79. doi:10.1016/j.exer.2015.04.001
93. Gerő D, Torregrossa R, Perry A, et al. The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular

- endothelial cells in vitro. *Pharmacological Research*. 2016;113:186-198. doi:10.1016/j.phrs.2016.08.019
94. Huang CW, Feng W, Peh MT, Peh K, Dymock BW, Moore PK. A novel slow-releasing hydrogen sulfide donor, FW1256, exerts anti-inflammatory effects in mouse macrophages and in vivo. *Pharmacological Research*. 2016;113:533-546. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.032
95. Yao H, Luo S, Liu J, et al. Controllable thioester-based hydrogen sulfide slow-releasing donors as cardioprotective agents. *Chem Commun*. 2019;55(44):6193-6196. doi:10.1039/C9CC02829C
96. Hasegawa U, Van Der Vlies AJ. Design and Synthesis of Polymeric Hydrogen Sulfide Donors. *Bioconjugate Chem*. 2014;25(7):1290-1300. doi:10.1021/bc500150s
97. Marwah MK, Shokr H, Sanchez-Aranguren L, Badhan RKS, Wang K, Ahmad S. Transdermal Delivery of a Hydrogen Sulphide Donor, ADT-OH Using Aqueous Gel Formulations for the Treatment of Impaired Vascular Function: an Ex Vivo Study. *Pharm Res*. 2022;39(2):341-352. doi:10.1007/s11095-021-03164-z
98. Rong F, Wang T, Zhou Q, et al. Intelligent polymeric hydrogen sulfide delivery systems for therapeutic applications. *Bioactive Materials*. 2023;19:198-216. doi:10.1016/j.bioactmat.2022.03.043
99. Liang D, Wu H, Wong MW, Huang D. Diallyl Trisulfide Is a Fast H₂S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides. *Org Lett*. 2015;17(17):4196-4199. doi:10.1021/acs.orglett.5b01962
100. Nalamachu S, Gudin J. Characteristics of Analgesic Patch Formulations. *Journal of Pain Research*. 2020;13:2343-2354. doi:10.2147/JPR.S270169
101. McConville C, Andrews GP, David Woolfson A, Karl Malcolm R. Effect of the incorporation of hydroxy-terminated liquid silicones on the cure characteristics, morphology, and release of a model protein from silicone elastomer-covered rods. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;124(1):805-812. doi:10.1002/app.35080

102. Abrams RMC, Pedowitz EJ, Simpson DM. A critical review of the capsaicin 8% patch for the treatment of neuropathic pain associated with diabetic peripheral neuropathy of the feet in adults. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2021;21(3):259-266. doi:10.1080/14737175.2021.1874920
103. Kaale E, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J. Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;30(4):1331-1337. doi:10.1016/S0731-7085(02)00476-4
104. Anand P, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*. 2011;107(4):490-502. doi:10.1093/bja/aer260
105. Martini C h., Yassen A, Krebs-Brown A, et al. A novel approach to identify responder subgroups and predictors of response to low- and high-dose capsaicin patches in postherpetic neuralgia. *European Journal of Pain*. 2013;17(10):1491-1501. doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00329.x
106. Moon JY, Lee PB, Kim YC, Lee SC, Nahm FS, Choi E. Efficacy and Safety of 0.625% and 1.25% Capsaicin Patch in Peripheral Neuropathic Pain: Multi-Center, Randomized, and Semi-Double Blind Controlled Study. *Pain Physician*.
107. Pethő G, Bölcskei K, Füredi R, et al. Evidence for a novel, neurohumoral antinociceptive mechanism mediated by peripheral capsaicin-sensitive nociceptors in conscious rats. *Neuropeptides*. 2017;62:1-10. doi:10.1016/j.npep.2017.02.079
108. Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*. 2004;38(6):377-384. doi:10.1016/j.npep.2004.07.005
109. Spampinato S, Romualdi P, Candeletti S, Cavicchini E, Ferri S. Distinguishable effects of intrathecal dynorphins, somatostatin, neurotensin and s-calcitonin on nociception and motor function in the rat. *Pain*. 1988;35(1):95-104. doi:10.1016/0304-3959(88)90281-3

110. Horváth K, Boros M, Bagoly T, et al. Analgesic topical capsaicinoid therapy increases somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Neuropeptides*. 2014;48(6):371-378. doi:10.1016/j.npep.2014.10.001
111. Rosenthal BM, Ho RH. An electron microscopic study of somatostatin immunoreactive structures in lamina II of the rat spinal cord. *Brain Research Bulletin*. 1989;22(2):439-451. doi:10.1016/0361-9230(89)90071-3
112. Kecskés A, Pohóczky K, Kecskés M, et al. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20):7788. doi:10.3390/ijms21207788
113. Kántás B, Börzsei R, Szőke É, et al. Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24):6245. doi:10.3390/ijms20246245
114. Sándor K, Elekes K, Szabó Á, et al. Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *European Journal of Pharmacology*. 2006;539(1):71-75. doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.082
115. Füredi R, Bölcskei K, Szolcsányi J, Pethő G. Effects of analgesics on the plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 2009;605(1):63-67. doi:10.1016/j.ejphar.2008.12.035
116. Bártai IZ, Horváth Á, Pintér E, Helyes Z, Pozsgai G. Role of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel and Somatostatin sst4 Receptor in the Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Sodium Polysulfide and Dimethyl Trisulfide. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9. Accessed June 27, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00055>

10. Publikációs jegyzék

10.1. Az értekezés alapját képező publikációk

László, S.; Hajna, Z.; Egyed, A.; Pintér, E.; Wagner, Ö. Development of a Silicone-Based Polymer Matrix as a Suitable Transdermal Therapeutic System for Diallyl Disulfide. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1182. <https://doi.org/10.3390/ph15101182>

IF: 5.215

László, S.; Bártai, I.Z.; Berkó, S.; Csányi, E.; Dombi, Á.; Pozsgai, G.; Bölskei, K.; Botz, L.; Wagner, Ö.; Pintér, E. Development of Capsaicin-Containing Analgesic Silicone-Based Transdermal Patches. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1279. <https://doi.org/10.3390/ph15101279>

IF: 5.215

10.2. Egyéb eredeti közlemények

Weisz E, Szűcs ZP, Farkas J, Grimm A, Rácz G, **László S** Ruttkay T (2022) Innovative artificial lesions to mimic difficult airway pathology in cadavers, supporting airway management training. *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 44, pp. 43-48 <https://doi.org/10.1016/j.tacc.2022.04.009>

IF: 0.870

Nemes B, **László S**, Zsidó BZ, Hetényi C, Feher A, Papp F, Varga Z, Szőke É, Sándor Z and Pintér E (2023) Elucidation of the binding mode of organic polysulfides on the human TRPA1 receptor. *Front. Physiol.* 14:1180896. doi: 10.3389/fphys.2023.1180896

IF: 4.755

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények kumulatív impakt faktora: 10.43

Az összes publikáció kumulatív impakt faktora: 16.055

10.3. Kongresszusi poszter prezentációk

László Sz., Bártai I. Z. , Pozsgai G. , Wagner Ö. , Pintér E. Silicone based transdermal delivery system for diallyl disulfide X. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (IDK2021) Pécs, Magyarország 2021

László Sz., Bártai I. Z. , Pozsgai G. , Wagner Ö. , Pintér E. Silicone based transdermal delivery system for diallyl disulfide 6th World Congress on Hydrogen Sulfide in Biology & Medicine Budapest, Magyarország 2022

László Sz., Pozsgai G. , Wagner Ö. , Pintér E. Development of analgesic silicone-based transdermal patches, 3rd Regional Congress of Physiological Societies and the 5th Congress of Croatian Physiological Society Plitvice, Horvátország 2022

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Pintér Erika professzor asszonynak, aki lehetőséget biztosított számomra az intézetben folyó kutatómunkához való csatlakozásra, és folyamatosan szakmailag és emberileg is mindig mellettem áll. Hálásan köszönöm neki, hogy lelkiismeretes témavezetésének köszönhetően megismerhettem a farmakológia tudományának szépségét, és elsajátíthattam tőle a tudományhoz szükséges tudást és készségeket.

Köszönettel tartozom társtémavezetőmnek, Dr. Wagner Ödön egyetemi docens úrnak, hogy hatalmas szakmai- és élettapasztalatával folyamatosan segítségemre volt, munkám során végig segített és támogatott.

Hálával tartozom „tiszteletbeli konzulensemnek”, Dr. Hajna Zsófiának, akihez mindig bátran fordulhattam, és akinek szakmai tanácsaira mindig számíthattam. Köszönöm neki, hogy páratlan lelkesedésével, valamint a kutatómunka iránti szenvedélyes és állhatatos elkötelezettségével mindig új lendületet és hatékony segítséget tudott adni.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Farmakológiai és Farmaoterápiai Intézetbeli munkatársaimnak, elsősorban Dr. Pozsgai Gábornak, hogy nagy tudásával és pártatlan éleslátásával folyamatosan segítségemre volt, és segített a helyes úton maradni.

Ezúton szeretném megköszönni a felmerülő farmakológiai és biológiai jellegű gyakorlati problémák megoldásában nyújtott folyamatos szakmai segítséget Göntér Kittinek, Dombi Ágnesnek és Dr. Bártai István Zoárdnak.

Hálás köszönettel tartozom a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékének munkatársainak prof. Dr. Nyulászi László és Dr. Gyurcsányi Róbert tanszékvezető uraknak, hogy lehetővé tették számomra, hogy a technológiai és analitikai munkáimat tanszékükön végezhessem. Valamint köszönetemet szeretném kifejezni kollégáimnak, elsősorban laboratóriumi közvetlen kollégámnak, Dr. Kelemen Zsoltnak, hogy munkám során végig támogatott, még a diállil-diszulfidos kísérletek alatt is. Ezúton szeretném megköszönni a felmerülő problémák megoldásában nyújtott folyamatos szakmai segítséget az SZAKT HPLC labor munkatársainak, valamint a Szegedi Tudomány Egyetem Munkatársainak, elsősorban Dr. Berkó Szilviának.

Végezetül, de nem utolsósorban hála illeti szeretett családomat, hogy mindvégig támogattak, a legnehezebb pillanatokban is.

Article

Development of a Silicone-Based Polymer Matrix as a Suitable Transdermal Therapeutic System for Diallyl Disulfide

Szabolcs László^{1,2}, Zsófia Hajna^{1,3,*}, Attila Egyed⁴, Erika Pintér^{1,3}  and Ödön Wagner²

¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Szigeti u. 12., H-7624 Pécs, Hungary

² Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology and Biotechnology, Budapest University of Technology and Economics, Műegyetem rkp. 3., H-1111 Budapest, Hungary

³ Molecular Pharmacology Research Group, Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Ifjúság ú. 20., H-7624 Pécs, Hungary

⁴ Medicinal Chemistry Research Group, Research Centre for Natural Sciences, Magyar Tudósok Körútja 2., H-1117 Budapest, Hungary

* Correspondence: zsofia.hajna@aok.pte.hu; Tel.: +36-72-538-212

Abstract: There is an unmet need for novel therapeutic tools relieving chronic pain. Hydrogen sulfide (H₂S) is highly involved in pain processes; however, the development of ideal matrices for sulfide donor compounds remains a great pharmaceutical challenge. We aimed to establish a suitable transdermal therapeutic system (TTS) using the H₂S donor diallyl disulfide (DADS) as a model compound. After the preparation of DADS, its solubility was investigated in different liquid excipients (propylene glycol, polyethylene glycol, silicone oil) and its membrane diffusivity was assessed in silicone matrices of different compositions. Drug-releasing properties of DADS-containing patches with different silicone oil contents were determined with Franz and flow-through cells. We found a correlation between the liquid excipient content of the patch and the diffusion rate of DADS. DADS showed the best solubility in dimethyl silicone oil, and the diffusion constant was proportional to the amount of oil above the 3 m/m% threshold value. The 8-day-old patch showed a significantly lower, but better-regulated, drug release over time than the 4-day-old one. In conclusion, the silicone-based polymer matrix developed in this study is suitable for stable storage and optimal release of DADS, providing a good basis for a TTS applied in chronic pain.

Keywords: diallyl disulfide; hydrogen sulfide; TRPA1 receptor; transdermal therapeutic systems; silicone; membrane diffusion



Citation: László, S.; Hajna, Z.; Egyed, A.; Pintér, E.; Wagner, Ö.

Development of a Silicone-Based Polymer Matrix as a Suitable Transdermal Therapeutic System for Diallyl Disulfide. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1182. <https://doi.org/10.3390/ph15101182>

Academic Editors: Zoilo Gonzalez, Juan Dominguez-Robles and Ana Ferrandez-Montero

Received: 17 August 2022

Accepted: 16 September 2022

Published: 23 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic pain, affecting one fifth of the world's population [1,2], is often caused by neuropathic states and inflammatory conditions of various etiology [3–5].

Hydrogen sulfide (H₂S) is a ubiquitous gasotransmitter, participating in numerous physiological processes, such as pain modulation and inflammation [6]. In order to achieve a proper antinociceptive effect, H₂S has to be released slowly from any sulfide donor molecule [7]. Therefore, the potential clinical application of H₂S and its donor compounds is in the focus of modern medicine [8]. However, the lack of optimal carrier systems being able to store and liberate slow-release sulfide donor molecules remains a challenging pharmaceutical purpose mainly because of short plasma half-life, poor stability, and inconvenient routes of administration [8,9].

Sulfide donor molecules can be divided into naturally occurring organosulfur compounds (OSCs) and synthetic H₂S donors [8]. Natural OSCs include the pharmacologically active constituents of garlic (*Allium sativum*), such as the highly reactive allicin and its allyl sulfide derivatives. Allyl sulfides are remarkably more stable than allicin and are able to release H₂S under physiological conditions [10,11]. Moreover, garlic-derived OSCs show

structural similarities with allyl isothiocyanate (AITC, found in mustard oil) and they are able to excite an AITC-sensitive subpopulation of peptidergic primary sensory neurons via the activation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor [12].

Among the allyl sulfide compounds of garlic, diallyl disulfide (DADS) shows numerous chemical, physiological, and commercial advantages. First of all, DADS is a natural compound that is readily available, easily reproducible, and cheap. Moreover, it is also stable and can be regarded as a slow-release H₂S donor [13]. Regarding the biological functions, it has been shown to exert a number of beneficial effects, e.g., anti-inflammatory, antioxidant, antinociceptive, and neuroprotective effects, among others [14,15]. In animal experiments, orally or intraperitoneally administered DADS attenuated traumatic neuropathic and chronic inflammatory pain [16,17]. However, in the clinical practice it is highly essential which route of administration provides the most effective and most comfortable treatment for the patient, raising the necessity of potential transdermal application of sulfide-donor molecules. Since H₂S has to be released slowly from its donor compounds in order to achieve analgesic effect [7], the establishment of an appropriate transdermal therapeutic system (TTS) is needed for carrying and liberating slow-release sulfide donor molecules. Because of its aforementioned advantageous characteristics, DADS was chosen as a model compound for this purpose.

The topical administration of DADS requires the selection of a suitable carrier. The simplest method is the application of crushed garlic to the painful area, but a slightly more advanced method is to apply it in the form of an ointment. However, this has several drawbacks: the ointment stains clothing and has a strong odor (due to the volatility of DADS and related compounds) which can cause discomfort.

Since the amount and rate of delivery of the active product is not well controlled by either method, it is necessary to develop some kind of stable carrier for the active substance. For this purpose, the use of a pharmaceutical patch form is almost self-evident. The most commonly used patch forms are designed to carry drug molecules of some polar character; however, DADS has a highly apolar, hydrophobic character [18]. As a solution, we chose to prepare the carrier system from a poly-dimethyl siloxane polymer matrix, which is rarely used for this purpose [19].

The TTSs provide an excellent mode of accurate, safe, and painless dosing in drug therapy. Dermal absorption systems can be categorized on the basis of their structure or their chemical composition [20]. According to the structure, they can be single- or multilayer adhesive polymer dispersion-based type [21], membrane-controlled type, polymer-matrix-controlled diffusion type, “micro-reservoir” type systems, and a novel technology of microfabricated microneedles [22]. Based on their material there are hydrophilic organic copolymers (e.g. polyols, polyethers, etc.) and silicone-based systems (hydrophobic or modified amphiphilic structure). However, currently established polymers (e.g., polyether, polyurethane) are unsuitable because the essentially reactive sulfides can interact with the matrix structure, degrading the active substance itself as well as the carrier polymer.

From the point of view of drug release, membrane-controlled systems possess the most favorable characteristics. Their only disadvantage is that the drug is in the liquid phase under the control membrane, so the patch cannot be cut and the dose rate cannot be varied. Adhesive polymer dispersion systems are excellent in this respect, but the kinetic of drug release is suboptimal. The two characteristics are well combined in “micro-reservoir” type systems, but these are expensive to produce. This type of TTS is thicker than others and release is controlled by diffusion through the polymer matrix [23]. The construction of the polymer matrix from organic polymers is complicated due to solubility and other chemical properties [24].

Modified silicone-based polymer systems have been developed by our workgroup [25,26], and provide well-controlled and cost-effective matrix diffusion systems (Figure 1). The basis of silicone polymers is hydroxyl terminated dimethylpolysiloxane, a linear organosilicon polymer which can be cross-linked to form elastic silicone rubber. We used this material as support matrix. In polymers produced by condensation, Si–O–Si bonds are the cross-links.

The structure of addition polymers is difficult to modify, whereas the cross-linked structure of condensation polymers is more easily altered. The final matrix structure can be easily modified with different additives to improve the mixing of the active ingredient and the matrix. The condensing silicone polymer can be prepared from two main components: linear hydroxyl terminated dimethylpolysiloxane and tetraethoxy-silane [27].

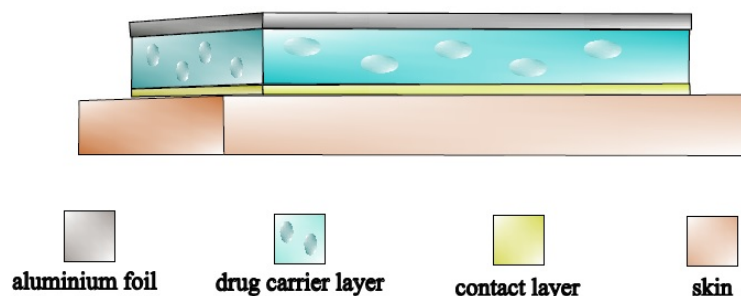


Figure 1. Modified silicone-based polymer matrix-controlled diffusion TTS.

The optimal composition of the matrix is clearly indicated by the diffusion properties of the drug in the matrix, which can be well described by the diffusion constant. Based on the literature, matrices containing different amounts of apolar excipients (silicone oil) were investigated and possible compositions were selected, on the basis of which the experimental patches were prepared [28,29].

The active ingredient and adjuvants are incorporated into the polymer of the TTS. The viscous mixture cures in about 30–60 min at room temperature, depending on the composition. A carrier layer is required due to poor mechanical properties of the silicone polymer. Usually, a metal or polymer film is utilized. The polymer mixture can be applied to the carrier layer by a single-layer spreading method.

Based on these data, the present study aimed to develop and investigate a silicone-based polymer matrix that is suitable for the application of the slow-release H₂S-donor DADS in a transdermal therapeutic system. The main objective of our experiments was to find a suitable carrier for the promising sulfide-containing active substances.

2. Results

2.1. Solubility of DADS

In order to find the most suitable adjuvant, we investigated the solubility of DADS in different materials. For this study we selected PG, PEG 400, and M-350, which were approved for medical application. The best solubility (0.4 g DADS/g silicone oil) was detected in dimethyl silicone oil, lower solubility was measured in PEG400 (0.3 g DADS/g PEG400), and the lowest solubility was observed in PG (0.05 g DADS/g PG). These results clearly indicate the superiority of the silicone oil over the organic materials.

2.2. Results of Membrane Diffusion Measurement

After the selection of the proper adjuvant, the preparation of the membrane was carried out, and the diffusion of DADS was investigated (Figure 2). We found that the diffusion constant of the drug increases with increasing amount of silicone oil (Table 1). Based on the measured data, a silicone oil content of 3% is the threshold value; up to this amount of excipient, there is barely a change in the diffusion properties of the drug in the matrix. However, above this amount, the change in the diffusion constant is proportional to the increase in the amount of oil (Figure 3).

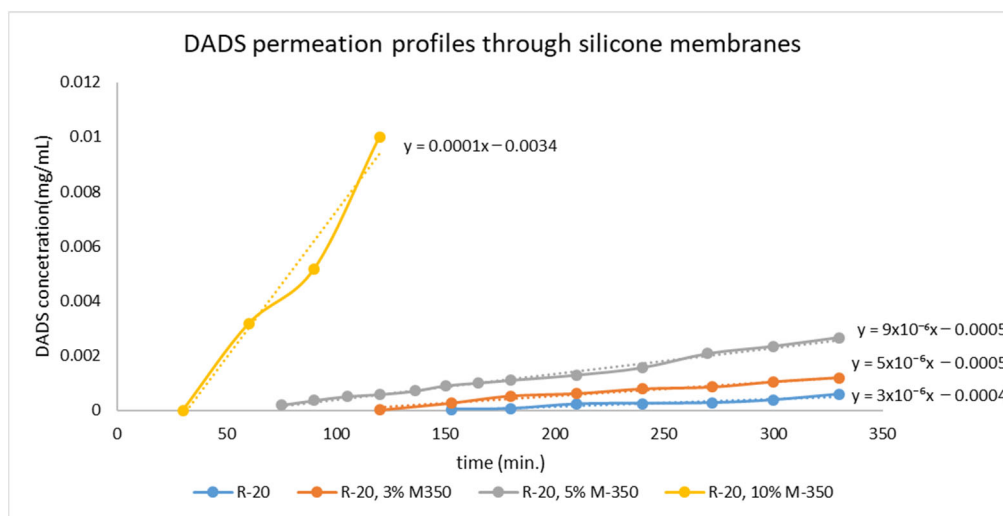


Figure 2. DADS permeation through different silicone membranes.

Table 1. Diffusivities and time lags of different silicone membranes.

Sample	l (mm)	t ₀ (s)	D (mm ² /s)	
R-20		0.37	8000	2.85×10^{-6}
R-20, 3% M-350		0.375	6000	3.91×10^{-6}
R-20, 5% M-350		0.39	3000	8.45×10^{-6}
R-20, 10% M-350		0.485	2040	1.92×10^{-5}

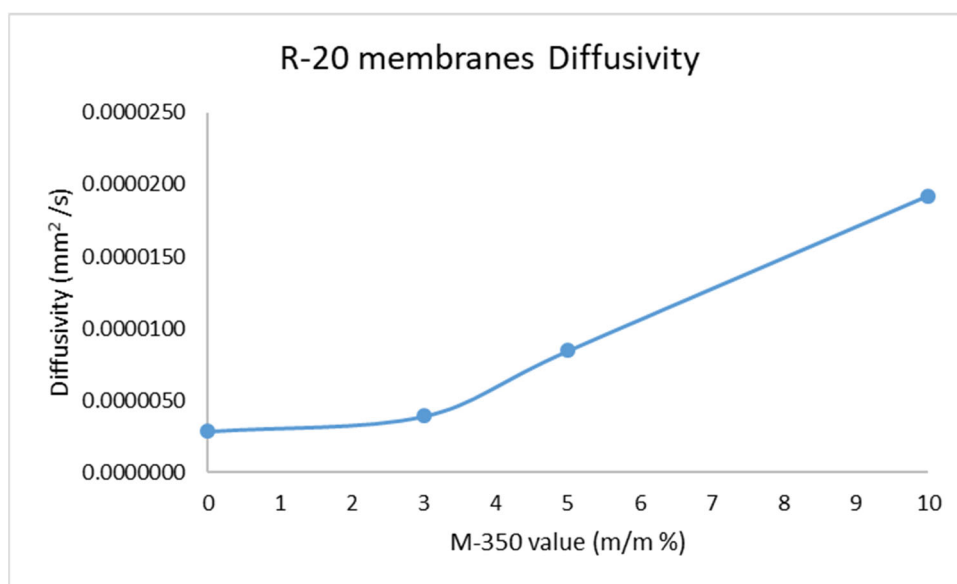


Figure 3. Effect of filler value on the DADS diffusivity through the silicone membranes.

2.3. Investigation of Stability of the Drug Release with Franz Diffusion Cell

Dermal patches with two different lifetimes (4 and 8 days) were studied with in vitro release test (IVRT) (Figure 4). The cross-linked structure of the sample stabilizes in at least 3 days under preconstruction conditions, based on previous results [25]. Therefore, we investigated the drug delivery properties of the sample on the fourth day. After the same time period, we determined the stability of the delivery, since at this time the change in the drug delivery properties is not related to the change in the matrix structure.

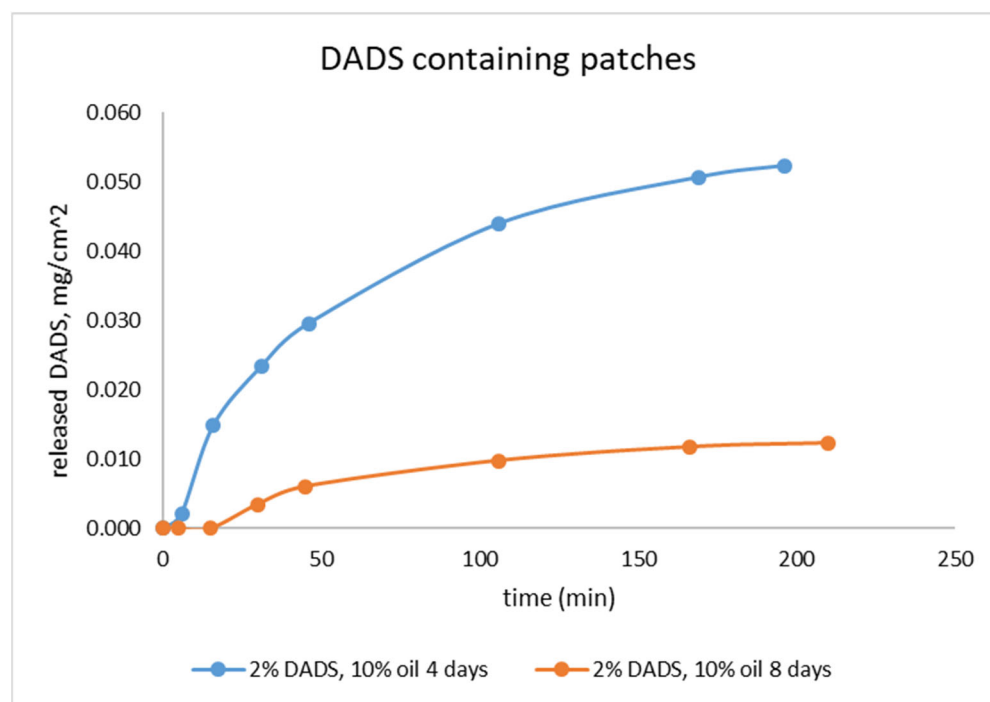


Figure 4. The cumulative release rate of the samples in the Franz cell.

In the IVRT measurement, a substantially larger amount of DADS was released from the 4-day-old patches within 3 h compared to 8-day-old ones. The 8-day-old patches had significantly lower release value. The extent of release (IVRT) itself holds relevant information for comparison based on lifetime [30].

2.4. Investigation of Drug Release with Flow-Through Cell

Dermal patches with two different silicone oil content (5 and 10 m/m%) were studied by modified IVRT. In the measurement, substantially larger amount of DADS was released from the 4-day-old patches within 6 h compared to 8-day-old ones.

In the flow-through cell, the regulation of drug release of the patches was monitored. The older DADS patch had a better regulated drug release over time, but the released amount was lower (Figure 5).

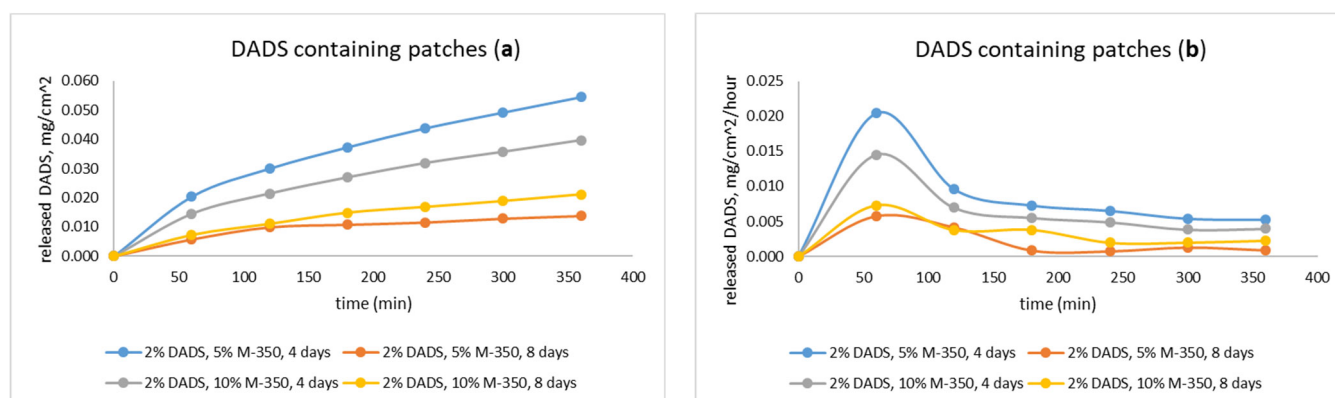


Figure 5. The cumulative (a) and continuous (b) release rate of the samples in the flow-through cell.

3. Discussion

In this study, we have found a correlation between the diffusion rate of DADS and the liquid excipient content of the patches. The best solubility was achieved with the dimethyl silicone oil, with a 3 m/m% threshold value significantly changing the diffusion properties

of the drug in the matrix. In the Franz cell we studied 4- and 8-day-old patches, and the 8-day-old patch had a significantly lower release value. In the flow-through cell, the older patch showed a better regulated drug release over time, but the released amount was smaller.

We have modified the usual recipe of the literature, enabling the production of DADS with better yield and higher purity. The use of a 90% purity material made the interpretation of the leaching assays much easier and clearer [19].

We have also demonstrated that the properties of the compounds in silicones were absolutely necessary to determine whether they were suitable for use in the transdermal formulation. As DADS is an apolar compound, its diffusion in the silicone matrix could be facilitated by the use of an apolar liquid phase compatible with the silicone matrix. The most suitable for this purpose is polydimethylsiloxane oil (M350), in which DADS is very soluble, the saturated solution containing 0.4 g/g DADS.

In membranes containing different concentrations of silicone oil (0%, 3%, 5%, 10%), the diffusion of DADS through the membrane increased with rising amount of silicone oil. The 3% concentration of silicone oil was not enough to allow a continuous liquid phase to form in the matrix, so the diffusion of DADS only slightly increased. In contrast, the 5% concentration of silicone oil led to a threefold increase in the diffusion constant; moreover, the 10% concentration of silicone oil resulted in a tenfold increase.

With these results, we prepared silicone matrices consisting of a single layer of 2% DADS and 5% and 10% M350 silicone oil and investigated its ability to stabilize the volatile DADS content. Our tests were first performed in the Franz cell, as it is widely used for the investigation of transdermal applicable drugs [31,32], with samples containing 10% silicone oil after 4 and 8 days from preparation. IVRT measurements showed that the volatility of DADS was preserved, with samples stored for 8 days having one fifth as much DADS dissolved as samples stored for 4 days. Figure 4 clearly shows that in the case of the 4-day-old sample, DADS was detectable in the leachate after 10 min, whereas in the case of the 8-day-old sample it was only detectable after 30 min. During storage, the volatile active ingredient is continuously removed from the matrix of the formulation, mainly from the layers close to the surface, which becomes increasingly difficult to replace from the deeper layers as time goes on. Our results show that the readily releasable drug content of the patch was reduced by 80% in 4 days, which highlights the necessity of the investigation of further other sulfide donor compounds for this purpose.

We also investigated the release of the active substance using our flow cell model, as it gives a better model for the drug release during patch application. The fluid that passes in front of the sample surface models the blood flow that carries the drug to the tissues of the body. In this case, the drug content of the fluid can be considered to be zero at all times, so the concentration gradient of the drug is not theoretically decreasing, but is considered to be constant.

These results are in accordance with those gained with the Franz cell experiments. The dissolution of the active substance has a similar course for all samples. For the 4-day-old samples, the loss of active ingredient in the 10% silicone oil samples is greater than in the 5% samples, so that more active ingredient is released from the 5% silicone oil samples. The drug loss increases further during storage, so that the amount of DADS remaining in the samples will be almost the same in both samples (5% and 10% silicone oil), so that the dissolution curves almost overlap. However, when looking at the cumulative drug release curves (Figure 5a), it can be seen that the samples stored for 8 days had a significant reduction in drug content due to their volatility, but the higher silicone oil content sample still had more DADS dissolved in the silicone oil, so the total amount of drug released from this sample is more than the sample containing 5% M350.

These results show that silicone oil promotes the diffusion of DADS and this increases proportionally with the amount of silicone oil used. However, the volatility of DADS is high, so that the amount of active ingredient decreases steadily with time, and the effect of the amount of silicone oil on the rate of release of the active ingredient is eliminated

over time. Further work should definitely address the issue of reducing the volatility of DADS, as our results suggest that the compound would be suitable for use in a transdermal formulation.

Naturally occurring OSCs are able to exert beneficial effects in inflammatory and pain processes, similarly to the biological actions of H₂S [10,15,30]. Garlic—representing the most important member of the *Allium* family of plants—is regarded one of the richest vegetable in OSCs [33]. Garlic serves as a popular culinary ingredient all over the world and has been widely used as a herbal medicine for many centuries. OSCs of garlic include allicin (diallyl thiosulfinate) that is unstable in aqueous media. Allicin decomposes into its oil-soluble derivatives: diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS), and diallyl trisulfide (DATS) [8,33]. Allyl sulfides are responsible for the pungency of garlic, they show greater stability than allicin under normal conditions (room temperature, oxygen, and humidity), and are able to liberate H₂S under physiological circumstances [10,11].

Garlic-derived OSCs, such as DADS, are structurally similar to the TRPA1 receptor agonist AITC, so it is not surprising that they can activate TRPA1 [12]. TRPA1—being a member of the Transient Receptor Potential (TRP) receptor superfamily—is a nonselective cation channel that is highly involved in the mediation of inflammation and pain sensation [34–36]. The activation of the receptor occurs following the conjugation with its cysteine residues and the formation of disulfide bridges, similarly to the effect of H₂S on TRPA1 [37].

As the activation of peptidergic primary afferents via TRP channels and the release of several mediator molecules from these fibers are highly involved in the pathomechanism of chronic pain states, these components of the neurogenic inflammation are undoubtedly in the focus of chronic pain management [5]. Chronic pain means not only a serious individual burden for the patients but also a major problem for public health and society worldwide. Chronic neuropathic pain can occur upon traumatic nerve lesion, diabetes, neurodegenerative disorders, and viral infections, while chronic inflammatory pain often accompanies inflammatory disorders such as osteoarthritis, etc.) [1–5].

Recently, DADS was reported to relieve traumatic neuropathic pain in a sciatic nerve ligation model when given orally [16], as well as to attenuate Complete Freund's Adjuvant-induced inflammatory pain when given intraperitoneally [17]. Similarly, the inhalation of H₂S, as well as the intraperitoneal injection of the alkyl sulfide molecule dimethyl trisulfide (DMTS), have also been shown to diminish diabetic and traumatic neuropathic pain, respectively [38,39]. The involvement of TRPA1 activator sulfide compounds in nociception, as well as the extensive use of capsaicin—the potent agonist of another TRP channel, the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) receptor—in form of transdermal patches for neuropathic pain [40], raised the question of whether TRPA1-stimulating agents, such as H₂S and its donor compounds, could be applied in the form of a transdermal therapeutic system. Advantages of transdermal administration are the following: (1) it is suitable for chronic application, (2) continuous and stable plasma level can be achieved, (3) first pass metabolism can be readily bypassed, (4) the administration of the drug can be ceased easily with the removal of the patch, and (5) the dosage can be conveniently modified by cutting the patch.

Since the role of H₂S in pain modulation and inflammation is influenced by the dose and release rate of application (low-dose H₂S donors, as well as slow H₂S releasing agents, may attenuate nociceptive and neuropathic pain, while high-dose and/or fast-released H₂S acts proinflammatory [6,7,9]), it is crucial to establish an appropriate TTS being able to carry and liberate slow-release sulfide donor molecules. In recent years, a number of slow-release sulfide donor compounds have been developed, such as GYY4137, ADT-OH, AP39, AP67, AP123, and FW1256, as well as thioester-based H₂S donors [41–47], raising the possible efficacy of these compounds in chronic neuropathic and inflammatory pain syndromes. Although several efforts have been made in order to enable the transdermal delivery of slow-release H₂S donors [48–50], the establishment of an optimal matrix/carrier system is still an unsolved problem.

Since DADS was proven to release H₂S in a slow and sustained manner [13], its structure has also served as a useful template for designing other slow-release H₂S donors [47]; beside its other advantages, it was reasonable to perform the experiments of our study with DADS.

In summary, the results of the present work demonstrate that the chemical inertness of the poly-dimethyl siloxane-based matrix makes it suitable for the delivery of sulfide-based active substances. In addition, DADS serves as an adequate model compound for the development of a transdermal therapeutic system for sulfide-containing substances, thus providing an excellent basis for the future development of transdermal patches with other promising slow-release sulfide donor molecules.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

Propylene glycol, polyethylene glycol, sulfur, and sodium sulfide were purchased from Reanal, Hungary. Tetrabutyl ammonium iodide and allyl bromide were purchased from Sigma-Aldrich.

R-20TM, condensation cross-linkable polydimethylsiloxane-(α , ω) -diol, OxamTM catalyst, and M350 polydimethylsiloxane oil were from T-Silox Ltd., Hungary.

All reagents and materials were used without purification.

4.2. Instrumental

IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum Two FTIR instrument with a UATR head. ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at room temperature, on a Varian Unity Inova 500 spectrometer (500 MHz for ¹H NMR spectra), with the deuterium signal of the solvent as the lock and TMS as the internal standard. Chemical shifts (δ) and coupling constants (J) are given in ppm and Hz, respectively. Mass spectra (MS) were obtained by a GC/MS QP-2010 spectrometer (EI, 70 eV). Analysis of diallyl disulfide was carried out on a GC/MS QP-2010 spectrometer. The capillary column used was ZB5-MSI, 30 m in length and 0.25 mm in diameter. Conditions were as follows: column temperature began at 80 °C, then increased to 250 °C; helium was used as carrier gas at a linear flow of 1 mL/min. HPLC-MS measurements were performed using a Shimadzu LCMS-2020 device equipped with a Reprospher 100 C18 (5 μ m; 100 \times 3 mm) column and positive-negative double ion source (DUIS \pm) with a quadrupole MS analyzer in a range of 50–1000 m/z . Sample was eluted with gradient elution using eluent A (0.1% formic acid in water: acetonitrile 19:1) and eluent B (0.1% formic acid in water: acetonitrile 1:19). Flow rate was set to 1 mL/min. The initial condition was 0% B eluent, followed by a linear gradient to 100% B eluent by 1 min, from 1 to 3.5 min 100% B eluent was retained; and from 3.5 to 4.5 min, back to initial condition with 5% B eluent and retained to 5 min. The column temperature was kept at room temperature and the injection volume was 1 μ L.

4.3. Production of Diallyl Disulfide

First, sodium disulfide solution was prepared by sulfur and sodium disulfide as follows: 6.4 g (0.2 mol) sulfur and 48 g (0.2 mol) sodium sulfide were dissolved in 150 mL distilled water in a round bottom flask. The solution was stirred and heated at 60 °C in one hour, and after that it was cooled to room temperature and filtrated in paper filter. To the brownish-red solution, 0.5 g tetrabutyl-ammonium iodide was added as phase transfer catalyst. A total of 36.3 g (0.3 mol) allyl bromide was added dropwise in 20 min and the temperature of the reaction mixture increased. After addition, the reaction mixture was cooled with ice. The resulting mixture was extracted with 300 mL ether. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ overnight. The organic phase was performed on rotary evaporator under aspirator pressure to eliminate the solvent. Then, the residual phase was distilled in low vacuum. The fraction at 45–60 °C and 0.8 torr. was gathered. A total of 25.8 g oil with light yellow color and intensive garlic smell was obtained as the diallyl disulfide with the yield of 88.3%.

The function group was identified by FTIR (UATR, cm^{-1}): 3081 (=C-H); 3009 (-CH₂); 2979 (-CH₂); 1634 (C=C); 1422 (C-S);

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3.33 (d, 4H), 5.16 (m, 4H), 5.84 (m, 2H).

4.4. Production of Silicone Membranes

Membrane samples used in experiments were prepared on a Teflon desk. Silicone oil M350 was dissolved in raw material poly-dimethyl siloxane-(α , ω)-diol R-20. After that, Oxam cross-linker was added to the mixture under stirring. Mixtures were homogenized and spread on the Teflon desk at a thickness of 0.4 mm. The film was cross-linked at room temperature. Samples were rested for 72 h and examined afterward.

The composition of samples was the following:

R20TM: 80–90 m/m%.

OxamTM: 10 m/m%.

Silicone oil M-350: 0–10 m/m%.

4.5. Production of Diallyl Disulfide Containing Transdermal Patches

TTS samples used in experiments were prepared on a paper substrate laminated on aluminum foil of 0.4 mm thickness. DADS was mixed into silicone matrix carriers. Our raw material was polydimethylsiloxane-(α , ω)-diol R-20TM. DADS was dissolved in M350 and was added to the silicone stock. If needed, fumed silica was added, too. After the components were weighed, OxamTM cross-linker was added to the mixture under stirring. Mixtures were homogenized and spread on the supporting film at a thickness of 0.4 mm. The layer was cross-linked at room temperature. The procedure was finished in 30 min. Samples were rested for 48 h and examined afterwards.

The composition of samples was the following:

R20TM: 83%, 78%.

OxamTM: 10%.

Silicone oil M350: 5%, 10%.

DADS: 2%.

4.6. Measurement of Membrane Diffusion

The permeation of DADS through the silicone (PDMS) membrane with oil was investigated by using an in vitro membrane permeation system. The thickness and the oil content in the membrane were varied and both the time lag and the steady-state rate of permeation were measured. The membrane was mounted between the two half-cells of the membrane permeation system. A total of 25 mL of phosphate-buffered saline with 25 m/m% ethanol (PBS-E25) without drug was placed into the receptor compartment. A total of 10^{-3} M DADS containing PBS-E25 was added into the donor compartment. At each of the predetermined time intervals, a sample was withdrawn and analyzed by a UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 25) at 207 nm.

$$D = \frac{l^2}{6t_0} \quad (1)$$

Equation (1). Diffusivity by the time lag method of Daynes.

The time lag and the steady-state rate of permeation were then determined from the concentration vs. t profiles. The diffusion constants were determined from the time lags using Equation (1) [28].

4.7. Measurement of the In Vitro Release of DADS-Containing Transdermal Patches

In vitro testing was performed in two ways. First, we performed an indicative measurement in a Franz cell, which models the static and vertical subcutaneous drug dissolution. In the second method, the patches were examined in a flow-through cell device that mimics the dissolute drug concentration in the blood.

4.7.1. Measurement in the Franz Cell

In vitro release tests (IVRTs) were performed. A modified local fabricated Franz type diffusion cell was used to model the DADS release from the patches in case of IVRT.

The receptor phase was phosphate buffer (PBS pH 7.4 ± 0.15) and 25% *w/w* ethanol 96% at RT. The investigation lasted for 3 h. The stirring speed was 450 rpm. The concentration of the drug was examined by a spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 25) at 207 nm.

4.7.2. Measurement in the Flow-Through Cell

Samples (12.56 cm² each) of patches were tested for drug release in a flow-through cell at $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 6). The flow rate (PBS, 25% ethanol) was 25 mL/h, and the DADS content was determined hourly with a spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 25); the investigation lasted for 6 h (Figure 7).

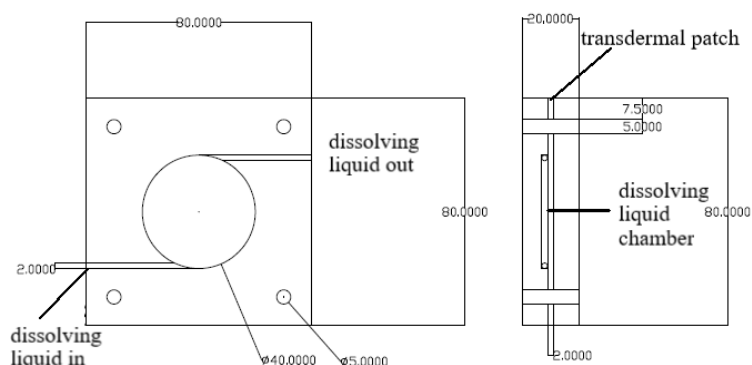


Figure 6. The flow-through cell.

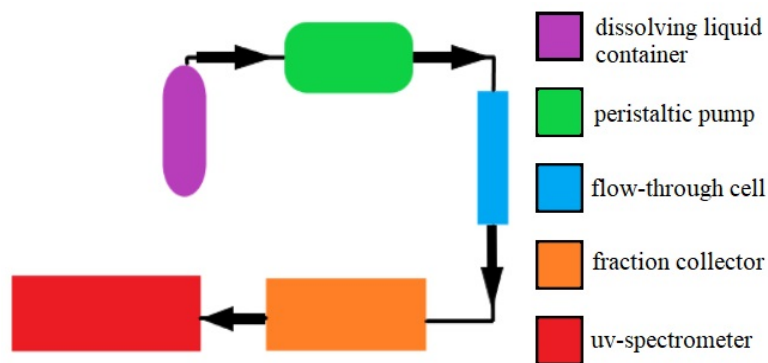


Figure 7. Measurement with flow-through cell.

Author Contributions: Conceptualization, E.P., Ö.W., and Z.H.; methodology, S.L.; investigation, S.L. and A.E.; resources, E.P.; data curation, S.L.; writing—original draft preparation, S.L., Ö.W., and A.E.; writing—review and editing, Z.H. and E.P.; visualization, E.P. and S.L.; supervision, Ö.W. and E.P.; project administration, Z.H.; funding acquisition, E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Our research was funded by OTKA_NKFIH-K-134214. Project no. TKP2021-EGA-13 was implemented with the support provided from the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary, financed under the EGA-13 funding scheme; National Research, Development and Innovation Office (PharmaLab, RRF-2.3.1-21-2022-00015).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: We would like to thank Zsolt Kelemen and Gábor Pozsgai for expert assistance with the editing. The authors are grateful to Kitti Göntér for drawing Figure 1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Breivik, H.; Collett, B.; Ventafridda, V.; Cohen, R.; Gallacher, D. Survey of Chronic Pain in Europe: Prevalence, Impact on Daily Life, and Treatment. *Eur. J. Pain* **2006**, *10*, 287–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sá, K.N.; Moreira, L.; Baptista, A.F.; Yeng, L.T.; Teixeira, M.J.; Galhardoni, R.; de Andrade, D.C. Prevalence of Chronic Pain in Developing Countries: Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Rep.* **2019**, *4*, e779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dineen, J.; Freeman, R. Autonomic Neuropathy. *Semin. Neurol.* **2015**, *35*, 458–468. [[CrossRef](#)]
4. Murnion, B.P. Neuropathic Pain: Current Definition and Review of Drug Treatment. *Aust. Prescr.* **2018**, *41*, 60–63. [[CrossRef](#)]
5. Seidel, M.F.; Hügler, T.; Morlion, B.; Koltzenburg, M.; Chapman, V.; MaassenVanDenBrink, A.; Lane, N.E.; Perrot, S.; Ziegler-Gänsberger, W. Neurogenic Inflammation as a Novel Treatment Target for Chronic Pain Syndromes. *Exp. Neurol.* **2022**, *356*, 114108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Physiological Roles of Hydrogen Sulfide in Mammalian Cells, Tissues and Organs | Physiological Reviews. Available online: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00028.2021> (accessed on 12 August 2022).
7. Guo, J.; Li, G.; Yang, L. Role of H₂S in Pain: Growing Evidences of Mystification. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *883*, 173322. [[CrossRef](#)]
8. Powell, C.R.; Dillon, K.M.; Matson, J.B. A Review of Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors: Chemistry and Potential Therapeutic Applications. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *149*, 110–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Whiteman, M.; Perry, A.; Zhou, Z.; Bucci, M.; Papapetropoulos, A.; Cirino, G.; Wood, M.E. Phosphinodithioate and Phosphoramidodithioate Hydrogen Sulfide Donors. In *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*; Handbook of Experimental Pharmacology; Moore, P.K., Whiteman, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 337–363. ISBN 978-3-319-18144-8.
10. Zhao, Y.; Biggs, T.D.; Xian, M. Hydrogen Sulfide (H₂S) Releasing Agents: Chemistry and Biological Applications. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11788–11805. [[CrossRef](#)]
11. Song, Z.; Zhao, L.; Ma, T.; Osama, A.; Shen, T.; He, Y.; Fang, J. Progress and Perspective on Hydrogen Sulfide Donors and Their Biomedical Applications. *Med. Res. Rev.* **2022**, *42*, 1930–1977. [[CrossRef](#)]
12. Bautista, D.M.; Movahed, P.; Hinman, A.; Axelsson, H.E.; Sterner, O.; Hogestatt, E.D.; Julius, D.; Jordt, S.-E.; Zygmunt, P.M. Pungent Products from Garlic Activate the Sensory Ion Channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12248–12252. [[CrossRef](#)]
13. Liang, D.; Wu, H.; Wong, M.W.; Huang, D. Diallyl Trisulfide Is a Fast H₂S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4196–4199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hernández-Cruz, E.Y.; Silva-Islas, C.A.; Maldonado, P.D.; Pedraza-Chaverri, J.; Carballo-Villalobos, A.I. Antinociceptive Effect of Garlic Garlic Preparations and Derivative compounds. *Eur. J. Pain* **2022**, *26*, 947–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Song, X.; Yue, Z.; Nie, L.; Zhao, P.; Zhu, K.; Wang, Q. Biological Functions of Diallyl Disulfide, a Garlic-Derived Natural Organic Sulfur Compound. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2021**, *2021*, 5103626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wang, G.; Yang, Y.; Wang, C.; Huang, J.; Wang, X.; Liu, Y.; Wang, H. Exploring the Role and Mechanisms of Diallyl Trisulfide and Diallyl Disulfide in Chronic Constriction-Induced Neuropathic Pain in Rats. *Korean J Pain* **2020**, *33*, 216–225. [[CrossRef](#)]
17. Porta, A.; Rodríguez, L.; Bai, X.; Batallé, G.; Roch, G.; Pouso-Vázquez, E.; Balboni, G.; Pol, O. Hydrogen Sulfide Inhibits Inflammatory Pain and Enhances the Analgesic Properties of Delta Opioid Receptors. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1977. [[CrossRef](#)]
18. Gîtin, L.; Dinică, R.; Neagu, C.; Dumitrascu, L. Sulfur Compounds Identification and Quantification from *Allium* spp. Fresh Leaves. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 425–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Yuan, X.; Chen, X.; Jiang, X.; Nie, Y. Synthesis, Characterization and Bioactivity Evaluation of Diallyl Disulfide. *J. Cent. South Univ. Technol.* **2006**, *13*, 515–518. [[CrossRef](#)]
20. Mashak, A.; Rahimi, A. Silicone Polymers in Controlled Drug Delivery Systems: A Review. *Iran. Polym. J.* **2009**, *18*, 279–295.
21. Sabbagh, F.; Kim, B.S. Recent Advances in Polymeric Transdermal Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2022**, *341*, 132–146. [[CrossRef](#)]
22. Tanner, T.; Marks, R. Delivering Drugs by the Transdermal Route: Review and Comment. *Skin Res. Technol.* **2008**, *14*, 249–260. [[CrossRef](#)]
23. Hoffman, A.S. The Origins and Evolution of “Controlled” Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 153–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pastore, M.N.; Kalia, Y.N.; Horstmann, M.; Roberts, M.S. Transdermal Patches: History, Development and Pharmacology. *Br. J. Pharm.* **2015**, *172*, 2179–2209. [[CrossRef](#)]
25. Wagner, Ö. Development of a New Silicon-Based Transdermal System. I. Study of Silicone Elastomers and Effect of Liquid Ingredients. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 243–252. [[CrossRef](#)]
26. Wagner, Ö.; Hencsei, P.; Liptay, G. Development of a New Silicone Base Transdermal Therapeutic System. *Silicon Chem.* **2002**, *1*, 223–227. [[CrossRef](#)]

27. Wagner, Ö. Development of a New Silicone-base Transdermal Therapeutic System II Study of Study of trifunctional ingredients. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 1187–1194. [[CrossRef](#)]
28. Wagner, Ö. A New Transdermal System I. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **1991**, *35*, 169–176.
29. Tojo, K.; Sun, Y.; Ghannam, M.; Chien, Y.W. Simple Evaluation Method of Intrinsic Diffusivity for Membrane-Moderated Controlled Release. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1985**, *11*, 1363–1371. [[CrossRef](#)]
30. Ng, S.-F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for in Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441. [[CrossRef](#)]
31. Shelke, S.; Pathan, I.; Shinde, G.; Agrawal, G.; Damale, M.; Chouthe, R.; Panzade, P.; Kulkarni, D. Poloxamer-Based In Situ Nasal Gel of Naratriptan Hydrochloride Deformable Vesicles for Brain Targeting. *BioNanoScience* **2020**, *10*, 633–648. [[CrossRef](#)]
32. Shinde, G.; Desai, P.; Shelke, S.; Patel, R.; Bangale, G.; Kulkarni, D. Mometasone Furoate-Loaded Aspasomal Gel for Topical Treatment of Psoriasis: Formulation, Optimization, in Vitro and in Vivo Performance. *J. Dermatol. Treat.* **2022**, *33*, 885–896. [[CrossRef](#)]
33. Corvino, A.; Frecentese, F.; Magli, E.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Scognamiglio, A.; Caliendo, G.; Fiorino, F.; Severino, B. Trends in H2S-Donors Chemistry and Their Effects in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* **2021**, *10*, 429. [[CrossRef](#)]
34. Talavera, K.; Startek, J.B.; Alvarez-Collazo, J.; Boonen, B.; Alpizar, Y.A.; Sanchez, A.; Naert, R.; Nilius, B. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 725–803. [[CrossRef](#)]
35. Souza Monteiro de Araujo, D.; Nassini, R.; Geppetti, P.; De Logu, F. TRPA1 as a Therapeutic Target for Nociceptive Pain. *Expert Opin. Ther. Targets* **2020**, *24*, 997–1008. [[CrossRef](#)]
36. Manolache, A.; Babes, A.; Madalina Babes, R. Mini-Review: The Nociceptive Sensory Functions of the Polymodal Receptor Transient Receptor Potential Ankyrin Type 1 (TRPA1). *Neurosci. Lett.* **2021**, *764*, 136286. [[CrossRef](#)]
37. Pozsgai, G.; Bártai, I.Z.; Pintér, E. Effects of Sulfide and Polysulfides Transmitted by Direct or Signal Transduction-Mediated Activation of TRPA1 Channels: TRPA1-Mediated Effects of Sulfide and Polysulfides. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 628–645. [[CrossRef](#)]
38. Li, H.; Liu, S.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Wang, K. Hydrogen Sulfide Attenuates Diabetic Neuropathic Pain through NO/CGMP/PKG Pathway and μ -Opioid Receptor. *Exp. Biol. Med.* **2020**, *245*, 823–834. [[CrossRef](#)]
39. Dombi, Á.; Sánta, C.; Bártai, I.Z.; Kormos, V.; Kecskés, A.; Tékus, V.; Pohóczky, K.; Bölskei, K.; Pintér, E.; Pozsgai, G. Dimethyl Trisulfide Diminishes Traumatic Neuropathic Pain Acting on TRPA1 Receptors in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3363. [[CrossRef](#)]
40. Blair, H.A. Capsaicin 8% Dermal Patch: A Review in Peripheral Neuropathic Pain. *Drugs* **2018**, *78*, 1489–1500. [[CrossRef](#)]
41. Li, L.; Whiteman, M.; Guan, Y.Y.; Neo, K.L.; Cheng, Y.; Lee, S.W.; Zhao, Y.; Baskar, R.; Tan, C.-H.; Moore, P.K. Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GYY4137): New Insights Into the Biology of Hydrogen Sulfide. *Circulation* **2008**, *117*, 2351–2360. [[CrossRef](#)]
42. Jia, J.; Xiao, Y.; Wang, W.; Qing, L.; Xu, Y.; Song, H.; Zhen, X.; Ao, G.; Alkayed, N.J.; Cheng, J. Differential Mechanisms Underlying Neuroprotection of Hydrogen Sulfide Donors against Oxidative Stress. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 1072–1078. [[CrossRef](#)]
43. Szczesny, B.; Módos, K.; Yanagi, K.; Coletta, C.; Le Trionnaire, S.; Perry, A.; Wood, M.E.; Whiteman, M.; Szabo, C. AP39, a Novel Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Stimulates Cellular Bioenergetics, Exerts Cytoprotective Effects and Protects against the Loss of Mitochondrial DNA Integrity in Oxidatively Stressed Endothelial Cells in Vitro. *Nitric Oxide* **2014**, *41*, 120–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kulkarni-Chitnis, M.; Njie-Mbye, Y.F.; Mitchell, L.; Robinson, J.; Whiteman, M.; Wood, M.E.; Opere, C.A.; Ohia, S.E. Inhibitory Action of Novel Hydrogen Sulfide Donors on Bovine Isolated Posterior Ciliary Arteries. *Exp. Eye Res.* **2015**, *134*, 73–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gerő, D.; Torregrossa, R.; Perry, A.; Waters, A.; Le-Trionnaire, S.; Whatmore, J.L.; Wood, M.; Whiteman, M. The Novel Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors AP123 and AP39 Protect against Hyperglycemic Injury in Microvascular Endothelial Cells in Vitro. *Pharmacol. Res.* **2016**, *113*, 186–198. [[CrossRef](#)]
46. Huang, C.W.; Feng, W.; Peh, M.T.; Peh, K.; Dymock, B.W.; Moore, P.K. A Novel Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, FW1256, Exerts Anti-Inflammatory Effects in Mouse Macrophages and in Vivo. *Pharmacol. Res.* **2016**, *113*, 533–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yao, H.; Luo, S.; Liu, J.; Xie, S.; Liu, Y.; Xu, J.; Zhu, Z.; Xu, S. Controllable Thioester-Based Hydrogen Sulfide Slow-Releasing Donors as Cardioprotective Agents. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 6193–6196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hasegawa, U.; van der Vlies, A.J. Design and Synthesis of Polymeric Hydrogen Sulfide Donors. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1290–1300. [[CrossRef](#)]
49. Marwah, M.K.; Shokr, H.; Sanchez-Aranguren, L.; Badhan, R.K.S.; Wang, K.; Ahmad, S. Transdermal Delivery of a Hydrogen Sulphide Donor, ADT-OH Using Aqueous Gel Formulations for the Treatment of Impaired Vascular Function: An Ex Vivo Study. *Pharm. Res.* **2022**, *39*, 341–352. [[CrossRef](#)]
50. Rong, F.; Wang, T.; Zhou, Q.; Peng, H.; Yang, J.; Fan, Q.; Li, P. Intelligent Polymeric Hydrogen Sulfide Delivery Systems for Therapeutic Applications. *Bioact. Mater.* **2023**, *19*, 198–216. [[CrossRef](#)]

Article

Development of Capsaicin-Containing Analgesic Silicone-Based Transdermal Patches

Szabolcs László^{1,2}, István Z. Batai^{2,3}, Szilvia Berkó⁴ , Erzsébet Csányi⁴ , Ágnes Dombi^{2,3}, Gábor Pozsgai^{2,3,*}, Kata Bölcskei^{2,3}, Lajos Botz⁵, Ödön Wagner¹ and Erika Pintér^{2,3} 

¹ Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology and Biotechnology, Budapest University of Technology and Economics, Műegyetem rkp. 3, H-1111 Budapest, Hungary

² Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Szigeti u. 12, H-7624 Pécs, Hungary

³ Molecular Pharmacology Research Group, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Ifjúság ú. 20, H-7624 Pécs, Hungary

⁴ Institute of Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Faculty of Pharmacy, University of Szeged, Eötvös str. 6, H-6720 Szeged, Hungary

⁵ Department of Pharmaceutics and Central Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Honvéd u. 3., H-7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: pozsgai.gabor@pte.hu; Tel.: +36-72-536-217

Abstract: Transdermal therapeutic systems (TTSs) enable convenient dosing in drug therapy. Modified silicone-polymer-based patches are well-controlled and cost-effective matrix diffusion systems. In the present study, we investigated the substance release properties, skin penetration, and analgesic effect of this type of TTS loaded with low-dose capsaicin. Release properties were measured in Franz diffusion cell and continuous flow-through cell approaches. Capsaicin was detected with HPLC-UV and UV spectrophotometry. Raman spectroscopy was conducted on human skin samples exposed to the TTS. A surgical incision or carrageenan injection was performed on one hind paw of male Wistar rats. TTSs were applied to the epilated dorsal skin. Patches were kept on the animals for 6 h. The thermal hyperalgesia and mechanical pain threshold of the hind paws were detected. Patches exhibited controlled, zero-order kinetic capsaicin release. According to the Raman mapping, capsaicin penetrated into the epidermis and dermis of human skin, where the target receptors are expressed. The thermal pain threshold drop of the operated rat paws was reversed by capsaicin treatment compared to that of animals treated with control patches. It was concluded that our modified silicone-polymer-based capsaicin-containing TTS is suitable for the relief of traumatic and inflammatory pain.

Keywords: transdermal therapeutic system; capsaicin; silicone; addition polymer



Citation: László, S.; Batai, I.Z.; Berkó, S.; Csányi, E.; Dombi, Á.; Pozsgai, G.; Bölcskei, K.; Botz, L.; Wagner, Ö.; Pintér, E. Development of Capsaicin-Containing Analgesic Silicone-Based Transdermal Patches. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1279. <https://doi.org/10.3390/ph15101279>

Academic Editor: Mary J. Meegan

Received: 2 August 2022

Accepted: 13 October 2022

Published: 18 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Transdermal therapeutic systems (TTSs) provide an excellent mode for convenient, accurate, safe, and painless dosing of drugs [1,2]. Transdermal absorption systems can be categorized according to either their structure or their chemical composition. Regarding structure, they can be adhesive-polymer-dispersion-based, membrane-controlled, polymer-matrix-controlled diffusion-type, and “micro-reservoir”-type systems. Based on their compositions, there are hydrophilic organic copolymers (e.g., polyols, polyethers, etc.) and silicone-based systems (hydrophobic or modified amphiphilic).

The drug release of membrane-controlled systems possesses the most favorable characteristics. Their disadvantage is that the drug is in a liquid phase under the control membrane. The TTS cannot be cut, and the dose rate cannot be changed. Adhesive polymer dispersion systems can be sliced without damaging the TTS, but they exhibit suboptimal release kinetics. “Micro-reservoir”-type systems bear both advantageous characteristics, but

their production is expensive. This type of TTS is thicker than the others, and the release is controlled by diffusion through the polymer matrix [3]. Construction of the polymer matrix from organic polymers is complicated due to solubility and other chemical issues. Modified silicone-polymer-based techniques provide well-controlled and cost-effective matrix diffusion systems. In the present study, we develop and investigate capsaicin-containing modified silicone-polymer-based transdermal patches (Figure 1).

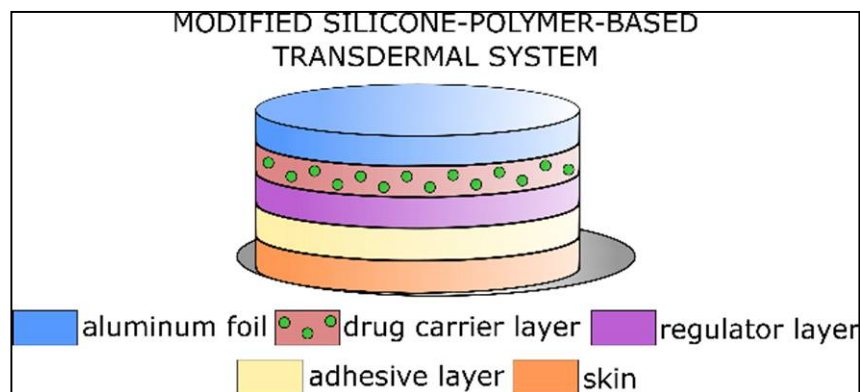


Figure 1. Modified silicone-polymer-based matrix-controlled diffusion TTS.

Such a TTS consists of several layers [4]. The drug is embedded in a polymer layer covered by a regulator layer with special diffusion properties. A controlled drug release profile can be achieved by precisely adjusting the concentration gradient based on different diffusion constants in the two layers (Figure 1).

The basis of silicone polymers is dimethylpolysiloxane (PDMS), a linear organosilicon polymer crosslinked to form elastic silicone rubber. PDMS can be used as a support matrix. There are two main conventional methods to crosslink PDMS: condensation and addition. In polymers produced through condensation, Si-O-Si bonds are the crosslinkers (Figure 2). In addition polymers, Si-C-C-Si bonds provide the crosslinks between PDMS chains (Figure 3). It is difficult to purify condensation polymers to medical grade. Another problem is that polycondensation requires a tin (Sn) catalyst that is not biocompatible.

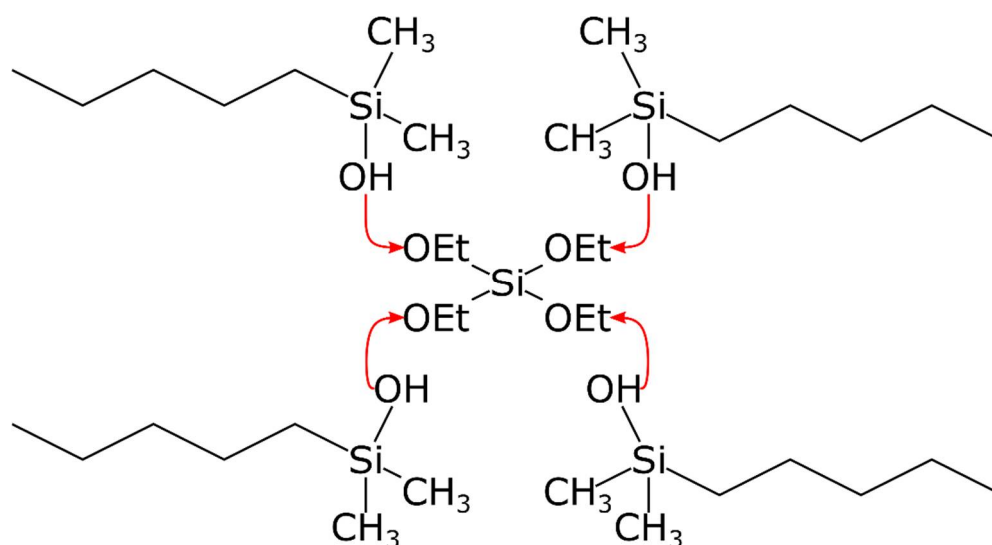


Figure 2. Scheme of silicone polymerization by condensation.

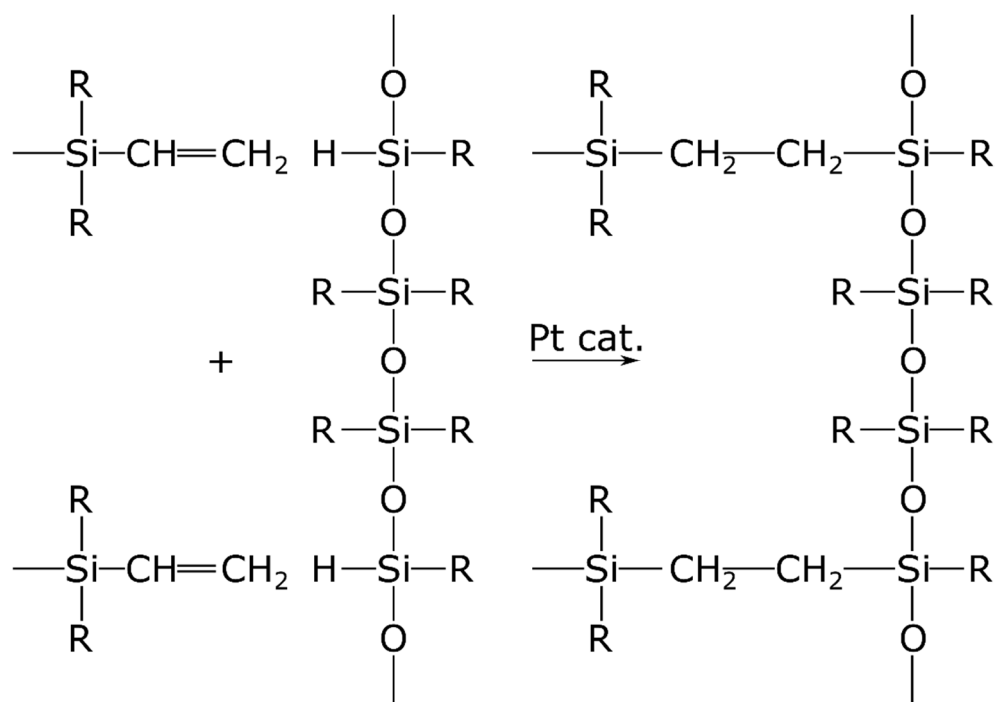


Figure 3. Scheme of silicone polymerization by addition. The “+” sign indicates addition of the two ethenyl groups in the top and bottom left of the figure to respective silicon atoms of the polysiloxane to the right of the “+” sign. The product of the reaction is shown in the right.

The crosslinked structure of addition polymers is more suitable for medical use (Figure 3). It is possible to transform the final matrix structure with additives. This can improve the admixing of the active ingredient to the matrix. Addition silicone polymers can be prepared from two main components: linear PDMS with vinyl groups and a crosslinker containing a hydro-silane compound and a platinum. These substances are biocompatible. The active ingredient and adjuvants are incorporated into the polymer [5]. The viscous mixture cures in 30–60 min at 70× depending on the composition. A carrier layer is required due to poor mechanical properties of the silicone polymer. Usually, a metal or polymer film is utilized (Figure 1). The polymer mixture can be applied to the carrier layer using a single-layer spreading method (Figure 4).

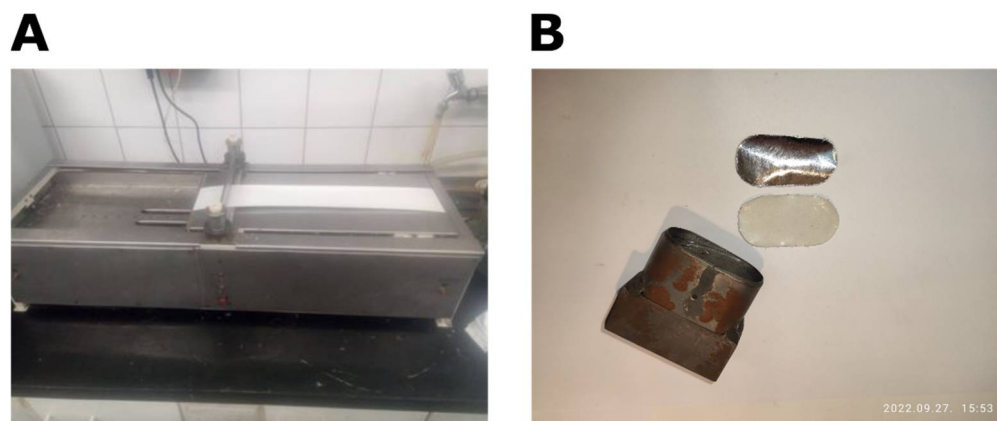


Figure 4. Apparatus for single-layer spreading of the polymer (A). Two pieces of the modified silicone polymer TTS (B). On the top is the aluminum film that is included to improve mechanical properties. On the bottom is the adhesive layer that touches the skin. The punching tool used to cut the TTS to size is also visible.

Capsaicin-containing transdermal patches are commercially available. Topical capsaicinoid therapy effectively alleviates pain in several diseases, including rheumatoid arthritis, osteoarthritis, low back pain, and neuropathic pain [6–10]. It also increases blood flow in soft tissues before sports activity to achieve a warming effect. Capsaicin-containing creams and ointments have the disadvantages of contaminating hands and potentially irritating mucous membranes and eyes. This is especially problematic in individuals wearing contact lenses.

Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are most commonly applied to relieve osteoarthritis-related pain [11]. The topical use of low-dose capsaicin combined with NSAIDs is a widely accepted therapy in osteoarthritic pain, but the exact mechanism is still under investigation [12]. Ercan et al. presented evidence for the potentiating effect of capsaicin with diclofenac. In a carrageenan-induced inflammation model, topical application of a capsaicinoid-containing patch enhanced the anti-inflammatory effect of diclofenac in rats [13].

The beneficial effect of capsaicin relies on the activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channels on peptidergic nociceptor nerve endings and the subsequent release of neuropeptides. The antinociceptive effect of TRPV1 activation is transmitted by somatostatin release from the nerve endings [14,15]. Our previous study established that topical capsaicinoid (nonivamide) therapy diminished chronic low back pain in patients. Nonivamide proved to be efficient in functional tests, such as the ODI (effect of pain on everyday life) and VAS (visual analog scale of pain sensation) [16]. Nonivamide treatment induced a three-fold increase in the plasma somatostatin level of the patients.

In the present work, we measure the *in vitro* release and transdermal penetration of capsaicin using a Franz diffusion cell and Raman microscopy. The antinociceptive effect of the TTS was also tested with the help of *in vivo* animal studies. Thermal hyperalgesia was measured in response to surgical incision of the hind paw in rats. Carrageenan-induced mechanical allodynia was detected with dynamic plantar esthesiometry in rats.

2. Results

2.1. *In Vitro* Experiments

2.1.1. Drug Release and Permeation Investigated with Franz Diffusion Cell

Dermal patches with two different capsaicin contents (1 and 2.3 mg/g) were studied through IVRT (*in vitro* release test; Figure 5) and IVPT (*in vitro* penetration test; Figure 6).

In the IVRT measurement, a substantially larger amount of capsaicin was released from the 2.3 mg/g patches within 24 h compared to the 1 mg/g ones. In the IVPT measurement, significantly less of the drug was delivered to the receptor chamber compared to IVRT. This mainly was due to the barrier function of the stratum corneum layer of the skin. The difference between the formulations with two distinct capsaicin contents was similar to that seen in IVRT experiments. Patches with a higher capsaicin concentration yielded higher permeability values. The extent of release (IVRT) itself did not provide relevant information on permeation. It was important to examine the permeation through the skin (IVPT) to reveal the interactions of the drug and the drug delivery system with the skin.

The release and permeation profiles were characterized by flux values (Table 1). Flux values showed the rates of release and permeation of capsaicin from different patches.

We compared the *in vitro* release kinetics of our modified silicone-polymer patch to a commercially available reference patch (Figure 5). The commercial patch was of the adhesive polymer dispersion type. Even the smaller dose of our TTS (1 mg/g) exhibited a larger capsaicin release than the reference patch. The release kinetics of the modified silicone-polymer patch were closer to zero-order than those of the commercial one. This was suggested by the R-squared values of linear curve fit (Figure 5; 0.8785 for the commercial reference patch, 0.9879 for the 1 mg/g patch, and 0.9986 for the 2.3 mg/g modified silicone-polymer patch).

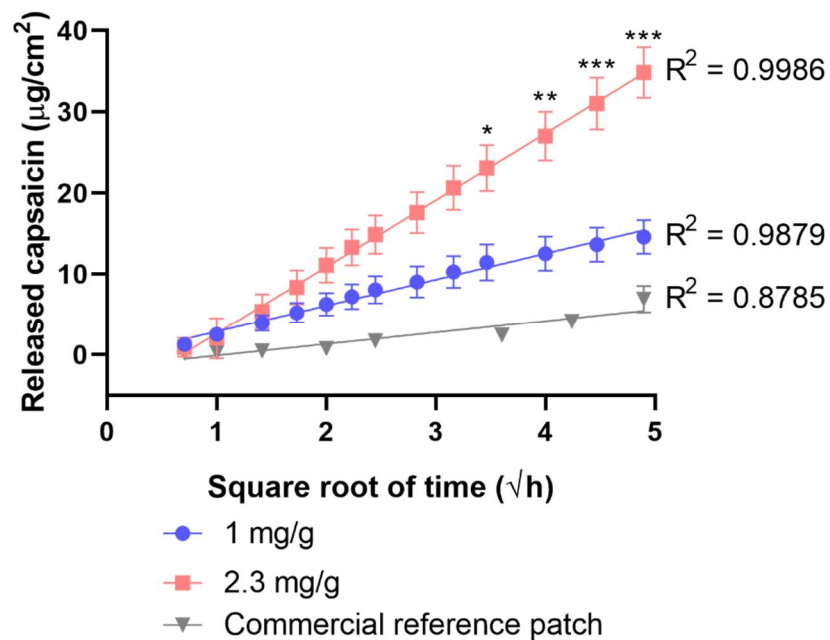


Figure 5. The cumulative amount of released capsaicin in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ over 24 h ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; and $p < 0.001$, ***).

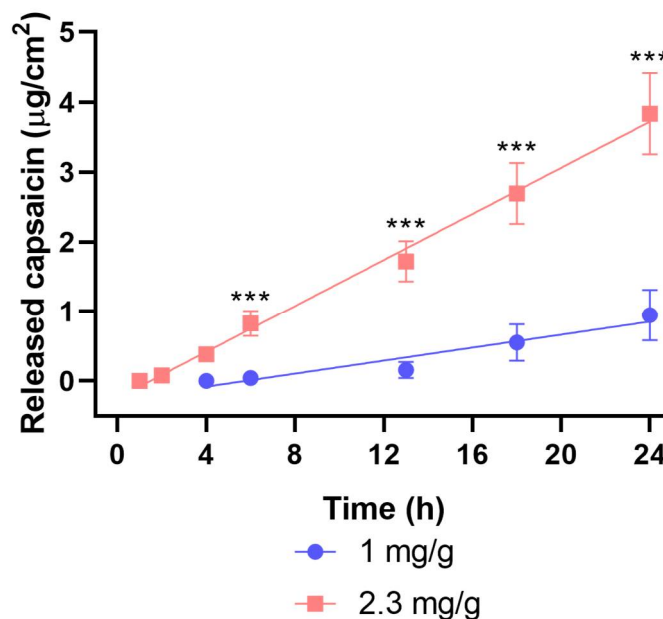


Figure 6. The cumulative amount of permeated capsaicin in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ over 24 h ($p < 0.001$, ***).

Table 1. Flux values of released and permeated capsaicin.

Dose	IVRT ¹	IVPT ²
1 mg/g patch	3.2215	0.0466
2.3 mg/g patch	8.233	0.1672

¹ IVRT—in vitro release test; ² IVPT—in vitro permeation test.

2.1.2. Results of Drug Release with Flow-Through Cell

Dermal patches with two different capsaicin contents (1 and 2.3 mg/g) were studied by modified IVRT. A substantially larger amount of capsaicin was released from the 2.3 mg/g patches within 6 h compared to the 1 mg/g ones. The regulation of drug release of the

patches was monitored in a flow-through cell. The patch containing more capsaicin had better-regulated drug release over time (Figure 7).

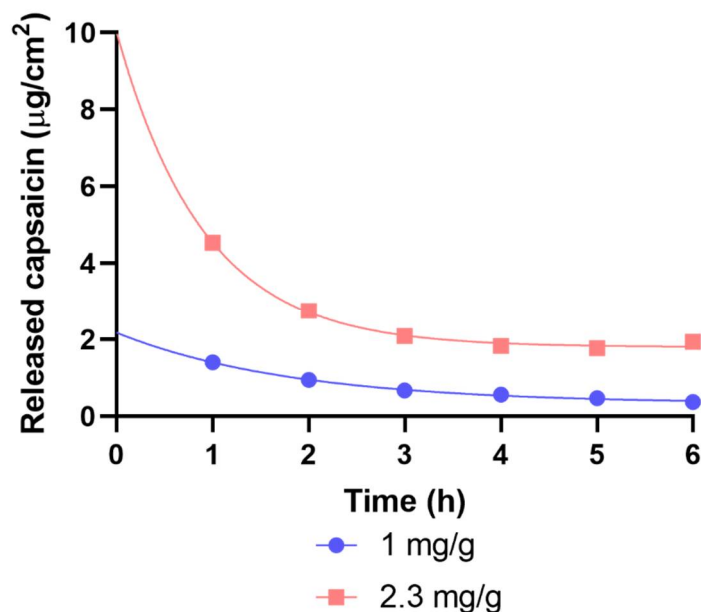


Figure 7. The released capsaicin in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ over 6 h.

2.1.3. Results of Raman Spectroscopy

During the Raman experiments, the differences in the localization in the skin regions of capsaicin were determined.

The Raman correlation map showed the presence of the penetrated drug in the different layers of the human skin, from the skin surface to the dermis, after the treatment with patches. Spectral maps were constructed in order to detect the presence of capsaicin in the different regions of the human skin. The fingerprint area of the capsaicin spectrum was compared with the spectra of patch-treated and untreated human skin.

The Raman correlation maps of the patches are shown in Figure 8. The Raman correlation maps demonstrated the presence of capsaicin in different regions of human skin. In correlation with the IVRT and IVPT results, more effective penetration was seen with the 2.3 mg/g patch than with the 1 mg/g one. Capsaicin was detected in the dermis and epidermis.

2.2. Results of In Vivo Experiments

2.2.1. The Capsaicin-Containing Dermal Patch Alleviates Heat Hyperalgesia

In experiments with patch application immediately after the incision of hind paws, surgical intervention decreased the thermal pain threshold in animals treated with control patches compared to the baseline value, as well as to the contralateral intact paw. The thermal pain threshold of the operated paws in capsaicin-treated rats was still lower than the respective baseline value, but it was significantly larger than the threshold of the operated legs of bandage-treated control animals. The thermal sensitivity of the intact paws of capsaicin-treated rats did not differ from the baseline value taken before surgery. Adhesive bandages had no effect on the thermal pain threshold of hind paws (Figure 9).

In experiments with delayed patch application, the surgical incision of paws significantly reduced the pain threshold compared to contralateral intact paws and respective baseline values. Control patches without capsaicin failed to improve this condition. Capsaicin-releasing patches elevated the thermal pain threshold compared to the control patch. The mitigated threshold was still lower than the baseline of the paw. Neither control nor capsaicin-containing patches changed the hyperalgesia of intact paws (Figure 10).

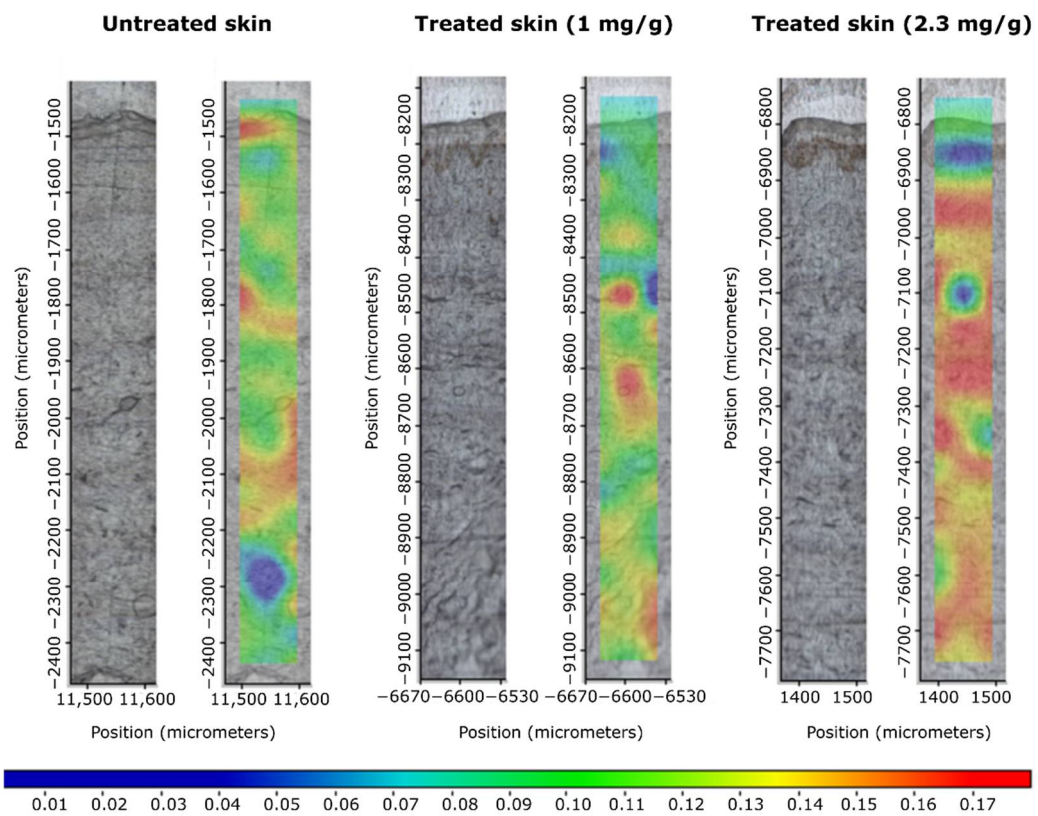


Figure 8. Raman correlation maps for the distribution of capsaicin in human skin after treatment with patches. Untreated skin is also displayed as control. Color coding of drug content: red > yellow > green > blue.

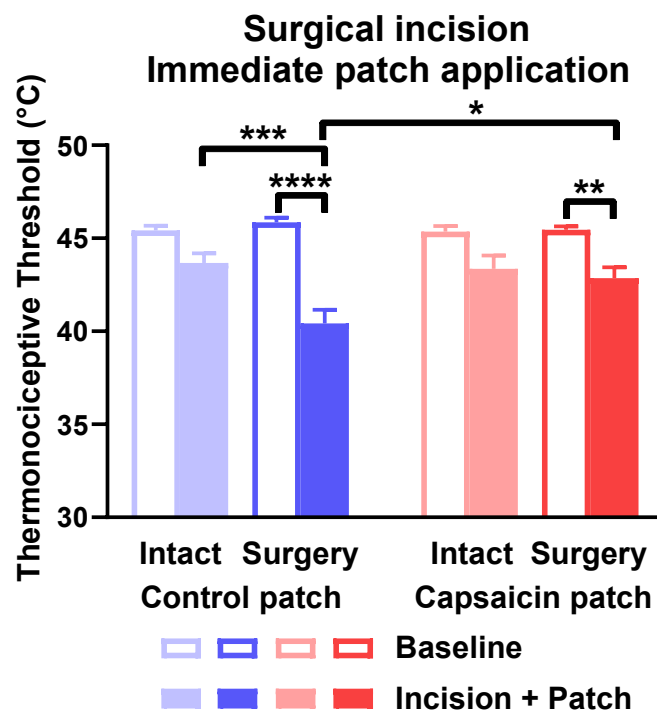


Figure 9. Capsaicin-releasing dermal patch applied right after surgical incision of the hind paw relieved thermal hyperalgesia of the paw. Thermal hyperalgesia is indicated by the painful heat threshold and is shown in degrees of Celsius. * is $p < 0.05$; ** is $p < 0.01$; *** is $p < 0.001$; **** is $p < 0.0001$. $n = 9-10$.

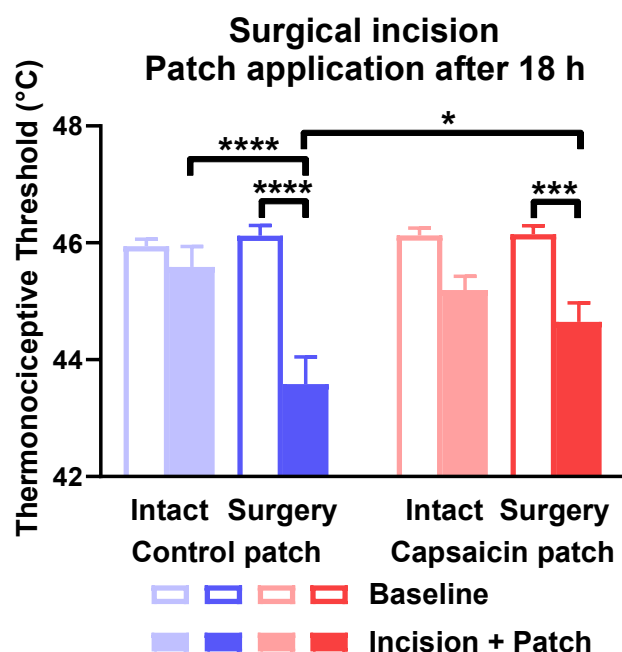


Figure 10. Capsaicin-releasing dermal patch applied 18 h after surgical incision of the hind paw relieved thermal hyperalgesia of the paw. Thermal hyperalgesia is indicated by the painful heat threshold and is shown in degrees of Celsius. * is $p < 0.05$; *** is $p < 0.001$; **** is $p < 0.0001$. $n = 9$.

2.2.2. The Capsaicin-Containing Dermal Patch Mitigates Carrageenan-Evoked Mechanical Hyperalgesia

Carrageenan reduced the mechanical pain threshold detected 18 h after challenge in rats treated with both adhesive tape and capsaicin-containing patches compared to the contralateral paw. The mechanical thresholds of carrageenan-treated paws were still reduced compared to contralateral paws after 6 h of treatment with capsaicin patches or the control. The threshold of carrageenan-injected paws was significantly elevated by capsaicin treatment compared to the value detected before patch application. Contralateral paws injected with saline did not show any sensitization (Figure 11).

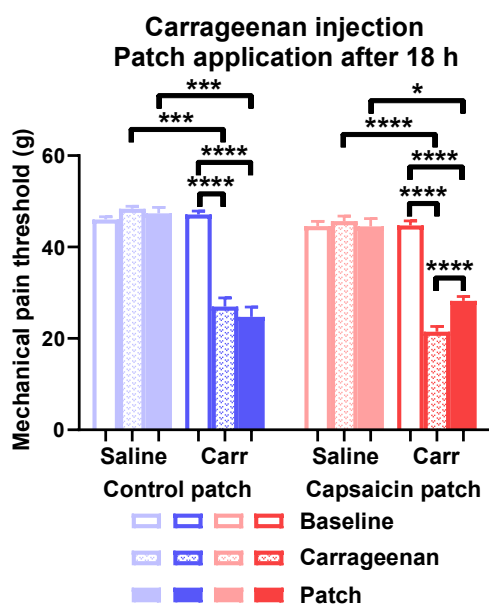


Figure 11. Capsaicin-releasing transdermal patch applied 18 h after challenge alleviated carrageenan-induced mechanical paw hyperalgesia. Mechanical pain threshold of the hind paws is shown in g. * is $p < 0.05$; *** is $p < 0.001$; **** is $p < 0.0001$. $n = 9-14$.

3. Discussion

In this study, controlled-release capsaicin-containing patches were prepared and tested. Our transdermal patch was a modified silicone-polymer-based diffusion-gradient-controlled system, providing optimal drug release and cost-effective therapy. Patches were produced with an addition-crosslinked silicon polymer method containing two different capsaicin concentrations and tested under “in vitro” and “in vivo” conditions [17].

Addition-type silicone has very apolar properties. Since capsaicin shows a polar character, polar environments had to be created in the apolar matrix to promote its delivery in the right amount and to move properly inside the silicone matrix [18]. Capsaicin is very soluble in alcohols, but shorter-chain monohydric alcohols are volatile compounds and exert detrimental effects in human skin. The simplest trivalent alcohol, glycerol, was used as a solvent. This skin-friendly compound dissolves capsaicin relatively well. However, glycerol is insoluble with silicone oligomers; therefore, we used an emulsifier to achieve even distribution in the matrix. Since glycerol saturated with capsaicin does not contain enough capsaicin to adequately deliver the desired amount of the drug, solid capsaicin was dispersed in the matrix. A small, required amount of highly potent solid capsaicin would have made the homogeneous distribution uncertain. Capsaicin was subjected to powder dilution (trituration) with calcium carbonate to ensure precise dosing and homogeneous drug distribution. A drug-free control layer, which also contained glycerol, was applied to the drug-containing layer so that capsaicin could diffuse through it unimpeded, but only in the desired amount. One mg/g and 2.3 mg/g capsaicin-containing patches were prepared and tested.

In the flow-through cell dissolution test, it was found that the drug was dissolved from the patch with the higher drug content at a much higher rate, and the dissolution rate returned to a uniform 2 mg/cm^2 after 3 h. The initial high drug release was due to the diffusion saturation of the regulatory layer with capsaicin from the underlying drug-containing layer. In the first hour of the dissolution test, the drug dissolved from this saturated layer. The rate of dissolution was high because of the short diffusion path of the drug. The drug released from the control layer was replaced by the layer below, but due to the increase in the diffusion distance, the drug release value reduced and remained constant.

In the case of the patch with lower drug content, the control layer could not saturate with capsaicin. Drug release started from a lower level, and this value decreased slightly but continuously over time because of the increasing diffusion pathway.

In consequence, the phenomena observed in the dissolution test were due to the fact that, in the case of the patch containing a larger drug concentration, the control layer was almost saturated with the drug and continuously replenished the capsaicin flowing into the liquid medium due to diffusion from the drug-containing layer. In the case of the patch with a smaller drug content, this replacement did not occur, and the increasing diffusion distance could not be compensated for by the diffusion rate. On the other hand, it can be stated that the control layer fulfilled its expected function in both patches. Instead of an exponential decrease in the matrix diffusion, only a slowly decreasing release curve could be observed.

A similar trend was shown in the drug release studies (IVRT) in the Franz cell, with significantly lower drug release from the lower-capsaicin patch. According to the human dermal permeation study (IPVT), the permeation of the drug was more superficial from the lower-drug patch, and the penetration of capsaicin also required longer time. In patches with a higher ingredient content, the compound already passed through the skin in half the time compared to the amount of the transferred active ingredient and was much larger than proportionately expected.

The results showed that, in the case of the layer combination we used, the higher the drug content, the better the desired zero-order drug release kinetics. Prolonged, controlled release was also confirmed by Raman microscopic examinations. In the case of the patch with a higher capsaicin content, the drug penetrated evenly and permanently

into the skin tissue. The devices and methods used to make the patches modeled industrial production. Therefore, the patches could be adapted for small-scale production with minor modifications.

Dermal patches containing large concentrations (8%) of capsaicin are licensed for the treatment of neuropathic pain, such as postherpetic neuralgia and diabetic neuropathy [19].

The mechanism of action of these patches involved a strong and sustained activation of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channels of primary nociceptor nerve endings. The opening of channels causing pathologically increased intracellular Ca^{2+} concentration of nerve endings leads to cytoskeletal and mitochondrial damage. Nociceptor nerve endings are defunctionalized for 12–14 weeks, providing long-lasting analgesia.

Thus, the nociceptor function of the nerve fibers and substance P (SP) release—which is thought to be important signal for pain neurotransmission—also becomes impaired for extended period [20,21]. These processes have been considered as potential mechanisms of the analgesic action of topical capsaicin treatment, but several clinical studies proved that SP receptor antagonists failed to be analgesics [22]. Anand and Bley (2011) suggested that capsaicin has limited potential for transdermal delivery across human skin and that it causes defunctionalization only of the cutaneous nociceptors [23].

Data corroborate that transdermal systems containing much smaller than defunctionalizing doses of capsaicin might also be effective against neuropathic pain. A dermal patch containing only 0.04% capsaicin alleviated postherpetic neuropathic pain in 60.1% of the patients, 28.2% of whom exhibited increasing analgesia throughout 12 weeks [24]. A mixed patient group suffering from either postherpetic or diabetic neuropathic pain experienced analgesic effects of a transdermal patch containing 0.625% capsaicin [25].

It might be puzzling how such a small capsaicin content might exert effective analgesia. Antinociceptive effects developed in the deeper musculoskeletal and joint areas could not be explained by the desensitization of the cutaneous afferents [23]. The activation of TRPV1 ion channels and consequent elevation of intracellular Ca^{2+} concentration induces neuropeptide release but does not damage the nerve endings. Many of these peptides contribute to vasodilatation and plasma extravasation (e.g., substance P and calcitonin gene-related peptide). Other peptides, such as somatostatin or endogenous opioids might possess analgesic and anti-inflammatory actions [26]. The systemic antinociceptive effect of somatostatin was proved in animal studies [14]. Human data also proposed that the systemic analgesic effect of topical capsaicinoid treatment is related to the remarkable increase in somatostatin concentration in the plasma [16].

In addition to the peripheral action, somatostatin exerts a central analgesic effect as well [27]. Somatostatin immunoreactive structures were detected in lamina II of the lumbar spinal cord of a rat and were proposed as the anatomical basis for somatostatin-induced analgesia [28]. The expression of SSTR4 receptor mRNA was detected at various levels of the murine and human neuronal pathways of pain sensation [29]. The analgesic effect of somatostatin, including neuropathic pain, could be reproduced by selective sst_4 receptor agonists [29].

Figure 12 and Table 2 outline the benefits of the modified silicone-polymer TTS over other types of transdermal systems. Membrane-controlled systems exhibit excellent drug release kinetics, but they cannot be dosed by cutting the TTS (Figure 12A, Table 2). Drugs in adhesive-type patches can be dosed by cutting and have simple structures, resulting in cost-effective production. However, the drug release of this TTS type is unregulated (Figure 12B, Table 2). Micro-reservoir systems possess better release kinetics and can be cut to size. On the other hand, they are thicker than other TTS types. This results in inferior flexibility and worse fit to the skin surface (Figure 12C, Table 2). Classical matrix diffusion transdermal patches can be dosed by cutting, as well as display good flexibility and fit to the skin. Nevertheless, their production might be complicated and expensive, and their drug release kinetics fall short of those of membrane-controlled systems (Figure 12D, Table 2). The modified silicone-polymer TTS described in our study combined the advantageous flexibility and cuttable property of matrix diffusion systems with a simpler, less expensive

production process and close to zero-order drug release kinetics rivaling those of membrane-controlled patches (Figure 12E, Table 2). Altogether, the modified silicone-polymer TTS had optimal characteristics for accurate and low-cost transdermal drug delivery.

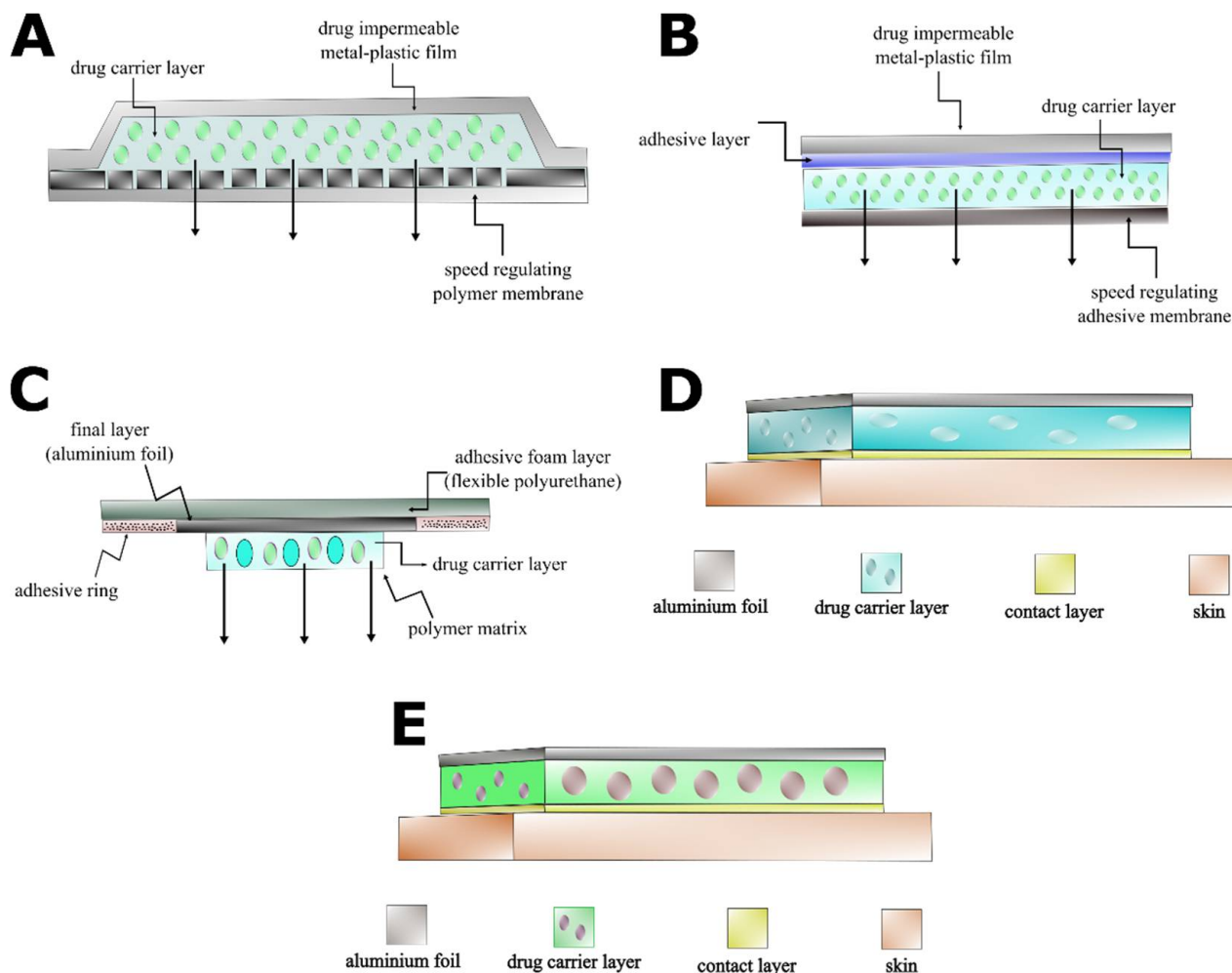


Figure 12. Schematic structures of the most frequent types of transdermal drug delivery systems. The figure shows the membrane-controlled (A), drug in adhesive (B), micro-reservoir (C), classical matrix diffusion (D) and modified silicone-polymer (E) systems.

Table 2. Comparison of properties of the most frequent types of transdermal therapeutic systems.

Type of TTS	Drug Release Kinetics	Dosing by Cutting	Flexibility
Membrane-controlled	close to zero-order	no	good
Drug in adhesive	unregulated	yes	good
Micro-reservoir	regulated	no	poor
Classical matrix diffusion	regulated	yes	good
Modified silicone-polymer	close to zero-order	yes	good

In summary, the transdermal patch described in the present paper offered the opportunity of low-dose topical capsaicin treatment without contaminating the hands or clothing and allowing for precise dosing by cutting the patches to size. Moreover, our technology offered outstanding release kinetics that might be exploited with other pharmaceuticals. Our transdermal system was subjected to both routine—Franz cell and Raman spectroscopy—and innovative—flow-through cell—in vitro testing. In our opinion, circumstances in the flow-through cell modeled those in the cutaneous tissues during the

release of the active substance from the dermal patch more precisely. We chose well-established animal models of nociception to investigate our transdermal system. The increasing-temperature water bath is not a widely known method, despite being validated in a surgical paw incision pain model with opioids and NSAIDs [30]. The exposition of the whole paw surface to heat is a profound advantage in the surgical incision model because different areas of the paw might exhibit different grades of hyperalgesia. This practically makes mechanical testing at least challenging, if not impossible. To the contrary, classical carrageenan-induced paw inflammation enables easy and effective testing of mechanical hyperalgesia by dynamic plantar esthesiometry [31]. Animals undergoing carrageenan-induced paw inflammation do not exhibit heat hyperalgesia. These methods might be well-suited for the testing of other transdermal therapeutic systems.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

RT-601 A™ addition-crosslinkable polydimethylsiloxane- (α , ω)-divinyl and RT-601 B™ crosslinker were from Wacker GmbH, Munich Germany. Glycerol was purchased from Molar Chemicals Ltd., Halásztelek, Hungary. Polysorbate 20 was obtained from Molar Chemicals Ltd., Halásztelek, Hungary. Capsaicin was purchased from Chillies Export House Limited, Virudhunagar, Tamil Nadu, India.

4.2. Production of Capsaicin-Containing Transdermal Patches

TTS samples used in animal experiments were prepared on a paper substrate laminated on aluminum foil of 0.4 mm thickness. Capsaicin was mixed into silicone matrix carriers. Our raw material was RT-601 A™ addition-crosslinkable polydimethylsiloxane- (α , ω)-divinyl. Capsaicin was dissolved in glycerol by heating and was added to the silicone stock. Crystalline capsaicin was also added to our mixture. Capsaicin was diluted with calcium carbonate. Calcium carbonate as an inert excipient was added to the samples only to ensure accurate balancing. If needed, liquid glycerol and polysorbate 20 were added. RT-601 B crosslinker was added to the mixture under stirring. After the components were weighed, mixtures were homogenized and spread on a supporting film at a thickness of 0.4 mm. The layer was crosslinked at 70 °C. The procedure was finished in 60 min. After that, we spread a second regulator layer (Figure 1) that did not contain capsaicin, only glycerol and polysorbate. The second layer was crosslinked at 70 °C for 60 min. Samples were rested for 48 h and examined afterwards. We made two compositions: a lower (1 mg/g capsaicin) and a higher (2.3 mg /g capsaicin) capsaicin-containing sample. The compositions of samples of 1 mg/g and 2.3 mg/g were as follows (Tables 3 and 4).

Table 3. Chemical composition of the low-dose capsaicin patch (1 mg/g).

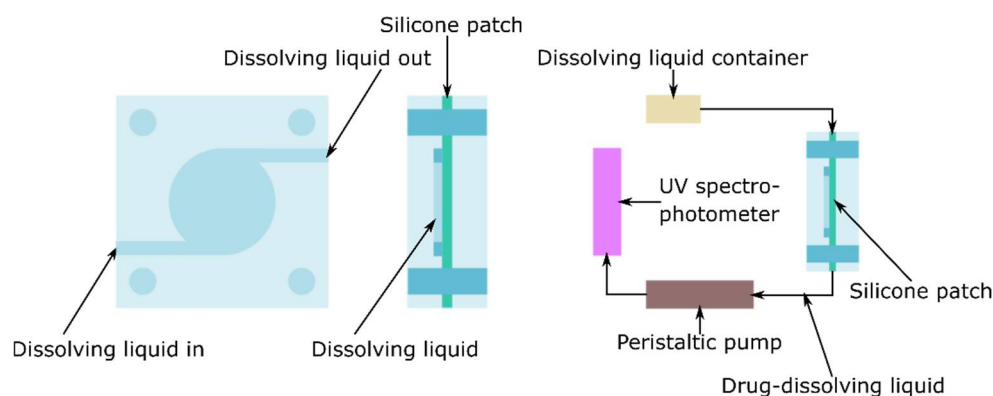
Patch Layer	Layer Thickness	Component	Content
Drug carrier layer	0.4 mm	Capsaicin (solid, triturated)	3.60%
		Capsaicin (solution)	3.75%
		Glycerol	13.16%
		Polysorbate 20	3.95%
		RT 601 A	69.32%
		RT 601 B	7.83%
Regulator layer	0.1 mm	Glycerol	12.05%
		Polysorbate 20	4.00%
		RT 601 A	74.21%
		RT 601 B	9.69%
Total capsaicin content			1 mg/g patch

Table 4. High-dose capsaicin patch.

Patch Layer	Layer Thickness	Component	Content
Drug carrier layer	0.4 mm	Capsaicin (solid, triturated)	8.36%
		Capsaicin (solution)	5.58%
		Glycerol	10.52%
		Polysorbate 20	5.69%
		RT 601 A	62.89%
		RT 601 B	6.98%
Regulator layer	0.1 mm	Glycerol	11.88%
		Polysorbate 20	3.43%
		RT 601 A	76.21%
		RT 601 B	8.46%
Total capsaicin content			2.3 mg/g patch

4.3. Measurement of the In Vitro Release of Capsaicin-Containing Transdermal Patches

In vitro testing was performed in two ways. First, we measured in a Franz cell [32], which modeled the static and vertical subcutaneous drug dissolution. In the second method, patches were examined in a flow-through cellular device that mimicked the dissolute drug concentration in the blood (Figure 13).

**Figure 13.** Flow-through cell.

4.3.1. Investigation of Drug Release and Permeation with Franz Diffusion Cell

In vitro release tests (IVRTs) and in vitro permeation tests (IVPTs) were performed. A vertical Franz-type diffusion cell (Hanson Microette™ Topical and Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, Los Angeles, CA, USA) was used to model the capsaicin release from the patches in the case of the IVRT, as well as drug permeation through human heat-separated epidermis (HSE) in the case of the IVPT. The preparation of HSE was the following: excised human subcutaneous fat-free skin was placed in a water bath (60 ± 0.5 °C), and the epidermis was separated from the dermis.

Around 250 mg of each patch (1.77 cm^2) was used as the donor phase. The patches were placed in the donor chamber directly in the case of the IVRT. In the case of the IVPT, the donor and receptor phases were separated by HSE.

The receptor phase was thermostated phosphate buffer (PBS pH 7.4 ± 0.15) and 25% *w/w* 96% ethanol at $32 \text{ °C} \pm 0.5 \text{ °C}$. The investigation lasted for 24 h. The stirring speed was 450 rpm. The concentration of the drug was examined by high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC analysis was carried out with a Shimadzu NEXERA X2 HPLC system (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). A Kinetex C18 $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ packed with a $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) column was used. Acetonitrile in a ratio of 30:70 with a flow rate of 1 mL/min was applied during isocratic elution with HPLC-grade water. Prior to the elution, the eluent was degassed and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ pore size glass filter funnel. The run time was 4 min, and the retention time of capsaicin was 2.3 min . Detection was performed via absorption at $280 \pm 4 \text{ nm}$. A sample

volume of 20 μL was injected, and the elution was carried out at a sample temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$ and a column temperature of 45 $^{\circ}\text{C}$.

4.3.2. Mathematical Evaluation

The data were the averages of the results of 6 experiments \pm standard deviations. Release and permeation profiles of the patches were obtained. The cumulative amounts of capsaicin released and permeated per cm^2 at 24 h were calculated. The flux (J) was the slope of the cumulative amounts of released and permeated capsaicin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus the square root of time ($\text{h}^{1/2}$) in the case of the IVRT and versus time (h) in the case of the IVPT [33].

4.3.3. Flow-Through Cell

Samples (12.56 cm^2 each) of patches were tested for modified IVRT in a flow-through cell (4 cm diameter and 5 cm^3 sample volume) at 37 $^{\circ}\text{C}$. The flow rate (PBS, 5% *w/w* glycerol) was 25 mL/h, and the capsaicin content was determined hourly with a spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 25, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). Detection was performed via absorption at 227 nm.

4.4. Investigation of Skin Permeation with Raman Microscopy

Excised human subcutaneous fat-free skin (epidermis and dermis) was obtained from a Caucasian female patient who underwent abdominal plastic surgery. Samples of patches (1.77 cm^2) were placed on the skin surface for 3 h at 32 $^{\circ}\text{C}$. The treated skin samples were frozen and sectioned (10 μm thick cross-sections) with a Leica CM1950 cryostat (Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Germany).

The microtomed skin samples were placed on an aluminum surface with the SC towards the top of the plate.

Raman spectroscopic measurements were performed with a Thermo Fisher DXR Dispersive Raman Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) equipped with a CCD camera and a diode laser.

A laser light source of 780 nm wavelength was used with a maximum power of 24 mW, minimizing the effect of fluorescence. The microscopic lens used for the measurements had 50 \times magnification, and the aperture of the pinhole was 25 μm . In the case of chemical mapping, a 200 $\mu\text{m} \times 1800 \mu\text{m}$ area was investigated; the step size was 50 μm both vertically and horizontally. Each spectrum was produced from 16 scans with an exposure time of 2 s. Altogether, 205 spectra were registered. For analyzing the treated vs. untreated skin samples, capsaicin was used as a reference. Data acquisition and analysis were accomplished using OMNICTM8.2 Dispersive Raman software package (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

4.5. In Vitro Measurement

4.5.1. Animals

Male Wistar rats of 125–150 g in weight were purchased from ToxiCoop Zrt., Budapest, Hungary. The rats were kept at the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School University of Pécs, under standard pathogen-free conditions with freely available food pellets and water. Experiments conformed to the 40/2013., II. 14. Hungarian Government regulation on the protection of animals used for scientific purposes, to the European Communities Council Directive 2010/63/EU, and to the requirements of the International Association for the Study of Pain (IASP). Experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary (license number BA02/2000-8/2018, 28/02/2018). The dorsal skin of the animals was epilated with commercial epilation cream from the nape to the hip under ketamine and xylazine anesthesia (80 and 10 mg/kg i.p.) 2 days before the animals participated in experiments.

4.5.2. Surgical Incision of the Hind Paw

Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.), and the plantar surface of one hind paw was treated with povidone iodine. Sides subjected to surgery were randomized. The paw was incised at a wound length of 10 mm with a scalpel. The depth of the incision reached the muscle layer. The wound was closed with two 6.0 sutures and treated with povidone iodine [26,30]. Capsaicin-releasing dermal patches were applied according to 2 schedules. In one set of experiments, patches were attached to the dorsal skin right after the paw incision when the pentobarbital anesthesia still lasted (immediate application). In other experiments, patches were applied 18 h after the incision (delayed application). The size of the patches was 3 cm × 6 cm. Patches were fixed to the animals with commercial adhesive bandages. Adhesive bandages without dermal patches were used as the control. Patches were kept on the animals for 6 h in both experimental designs. After the six-hour interval, the thermal pain threshold of the hind paws was measured with increasing-temperature water bath (Experimetria Kft., Budapest, Hungary). Both hind legs of rats were submerged into water separately.

The water was heated from 30 °C to 51 °C with a velocity of 24 °C/min. The heating was stopped by a foot switch when the animal removed the paw from the water, and water temperature was recorded. The animals were habituated to handling by the experimenter and the instrument 3 times, and baseline values were taken.

4.5.3. Carrageenan-Induced Paw Inflammation

Carrageenan was dissolved in physiological saline under gentle heating (3% *m/v*). Carrageenan was injected intraplantarly into one hind paw of rats. The contralateral paw was injected with saline [31]. Capsaicin-loaded dermal patches were applied to the backs of animals 18 h after carrageenan injection. The size of the patches was 3 cm × 6 cm. Patches were fixed to the animals with commercial adhesive tape. Bandages without dermal patches were used as the control. Six hours later, the mechanical pain threshold of the hind paws was detected by dynamic plantar esthesiometry (Ugo Basile, Gemonio, Italy). Rats were placed into the compartments of the instrument 10 min before the test. The force exerted by the stimulator reached 50 g in 5 s. The value inducing nocifensive behavior was automatically displayed. Baseline measurements were performed 3 times before the actual experiment. Lowered pain threshold was confirmed by the detection of mechanical hyperalgesia before the application of transdermal patches.

4.5.4. Statistical Analysis

The results were evaluated and analyzed statistically with one-way (in vivo studies) or two-way (in vitro experiments) analyses of variance, followed by Bonferroni's multiple comparisons test using Prism from Windows software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA, access date: 1st of January, 2022). The data were the means of the results of 6 experiments ± standard deviations ($p < 0.05$ was *, $p < 0.01$ was **, and $p < 0.001$ was *** vs. control) [34,35].

5. Conclusions

Our silicone-based TTS displayed long-lasting, controlled, dose-dependent release and permeation of capsaicin. The higher-dose (2.3 mg/g) capsaicin-containing TTS was capable to deliver the active ingredient to the target receptors in the dermis and exerted systemic antinociceptive action.

We presumed that activation of the TRPV1 ion channels on the sensory nerve endings in the patch-treated dorsal skin exerted the release of inflammatory neuropeptides, such as SP and CGRP, inducing local warmth and painful redness. In addition, antinociceptive mediators, such as somatostatin and opioid peptides, were released from the central peripheral endings of the primary afferents, regulating the pain pathway. The systemic analgesic effect of the low-dose capsaicin patch could be explained by these sensocrine regulatory mechanisms.

Further experiments involving a TTS loaded with various detergents and other excipients possessing unexplored potentials may offer further optimization of substance release and increased therapeutic value.

Author Contributions: Conceptualization, E.P., Ö.W. and L.B.; methodology, G.P. and S.L.; validation, I.Z.B. and S.L.; investigation, S.L., I.Z.B., S.B., K.B. and Á.D.; resources, E.P.; data curation, S.L., G.P., E.C. and S.B.; writing—original draft preparation, G.P., S.B. and S.L.; writing—review and editing, E.C.; supervision, E.P., Ö.W. and L.B.; project administration, G.P. and E.C.; funding acquisition, E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Project no. TKP2021-EGA-13 was implemented with the support provided from the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary and financed under the EGA-13 funding scheme. Our research was funded by OTKA_NKFI-K-134214 and OTKA FK 132454 from the National Research, Development, and Innovation Office, Hungary.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Medical School at the University of Pécs (license number BA02/2000-8/2018, 28/02/2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: We would like to thank Kitti Göntér for expert assistance with the editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Izgelov, D.; Davidson, E.; Barasch, D.; Regev, A.; Domb, A.J.; Hoffman, A. Pharmacokinetic Investigation of Synthetic Cannabidiol Oral Formulations in Healthy Volunteers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *154*, 108–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tanner, T.; Marks, R. Delivering Drugs by the Transdermal Route: Review and Comment. *Ski. Res. Technol.* **2008**, *14*, 249–260. [[CrossRef](#)]
- Pastore, M.N.; Kalia, Y.N.; Horstmann, M.; Roberts, M.S. Transdermal Patches: History, Development and Pharmacology: History of Transdermal Patches. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 2179–2209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mojsiewicz-Pieńkowska, K.; Jamrógiewicz, M.; Zebrowska, M.; Sznitowska, M.; Centkowska, K. Technology of an Adhesive Silicone Film as Drug Carrier in Transdermal Therapy. I: Analytical Methods Used for Characterization and Design of the Universal Elastomer Layers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 131–138. [[CrossRef](#)]
- Tomanek, A. *Silicone und Technik*; Hanser, Carl: München, Germany, 1990; ISBN 978-3-446-16032-3.
- Deal, C.L.; Schnitzer, T.J.; Lipstein, E.; Seibold, J.R.; Stevens, R.M.; Levy, M.D.; Albert, D.; Renold, F. Treatment of Arthritis with Topical Capsaicin: A Double-Blind Trial. *Clin. Ther.* **1991**, *13*, 383–395.
- Cameron, M.; Gagnier, J.J.; Little, C.V.; Parsons, T.J.; Blümle, A.; Chrubasik, S. Evidence of Effectiveness of Herbal Medicinal Products in the Treatment of Arthritis—Part 1: Osteoarthritis. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 1497–1515. [[CrossRef](#)]
- De Leon-Casasola, O. New Developments in the Treatment Algorithm for Peripheral Neuropathic Pain. *Pain Med.* **2011**, *12*, S100–S108. [[CrossRef](#)]
- Chrubasik, S.; Weiser, T.; Beime, B. Effectiveness and Safety of Topical Capsaicin Cream in the Treatment of Chronic Soft Tissue Pain. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 1877–1885. [[CrossRef](#)]
- Guedes, V.; Castro, J.P.; Brito, I. Topical Capsaicin for Pain in Osteoarthritis: A Literature Review. *Reumatol. Clin.* **2018**, *14*, 40–45. [[CrossRef](#)]
- Frerick, H.; Keitel, W.; Kuhn, U.; Schmidt, S.; Bredehorst, A.; Kuhlmann, M. Topical Treatment of Chronic Low Back Pain with a Capsicum Plaster. *PAIN* **2003**, *106*, 59–64. [[CrossRef](#)]
- Persson, M.S.M.; Stocks, J.; Walsh, D.A.; Doherty, M.; Zhang, W. The Relative Efficacy of Topical Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Capsaicin in Osteoarthritis: A Network Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Osteoarthr. Cartil.* **2018**, *26*, 1575–1582. [[CrossRef](#)]
- Ercan, N.; Uludag, M.O.; Agis, E.R.; Demirel-Yilmaz, E. The Anti-Inflammatory Effect of Diclofenac Is Considerably Augmented by Topical Capsaicinoids-Containing Patch in Carrageenan-Induced Paw Oedema of Rat. *Inflammopharmacology* **2013**, *21*, 413–419. [[CrossRef](#)]
- Szolcsányi, J. Forty Years in Capsaicin Research for Sensory Pharmacology and Physiology. *Neuropeptides* **2004**, *38*, 377–384. [[CrossRef](#)]
- Silverman, H.A.; Chen, A.; Kravatz, N.L.; Chavan, S.S.; Chang, E.H. Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 590261. [[CrossRef](#)]

16. Horváth, K.; Boros, M.; Bagoly, T.; Sándor, V.; Kilár, F.; Kemény, Á.; Helyes, Z.; Szolcsányi, J.; Pintér, E. Analgesic Topical Capsaicinoid Therapy Increases Somatostatin-like Immunoreactivity in the Human Plasma. *Neuropeptides* **2014**, *48*, 371–378. [[CrossRef](#)]
17. Nalamachu, S.; Gudin, J. Characteristics of Analgesic Patch Formulations. *JPR* **2020**, *13*, 2343–2354. [[CrossRef](#)]
18. McConville, C.; Andrews, G.P.; Woolfson, A.D.; Karl Malcolm, R. Effect of the Incorporation of Hydroxy-Terminated Liquid Silicones on the Cure Characteristics, Morphology, and Release of a Model Protein from Silicone Elastomer-Covered Rods. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124*, 805–812. [[CrossRef](#)]
19. Abrams, R.M.C.; Pedowitz, E.J.; Simpson, D.M. A Critical Review of the Capsaicin 8% Patch for the Treatment of Neuropathic Pain Associated with Diabetic Peripheral Neuropathy of the Feet in Adults. *Expert Rev. Neurother.* **2021**, *21*, 259–266. [[CrossRef](#)]
20. Bley, K.R. TRPV1 Agonist Approaches for Pain Management. In *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp. 325–347.
21. Kaale, E.; Van Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmartens, J. Determination of Capsaicinoids in Topical Cream by Liquid-Liquid Extraction and Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 1331–1337. [[CrossRef](#)]
22. Hill, R. NK1 (Substance P) Receptor Antagonists—Why Are They Not Analgesic in Humans? *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 244–246. [[CrossRef](#)]
23. Anand, P.; Bley, K. Topical Capsaicin for Pain Management: Therapeutic Potential and Mechanisms of Action of the New High-Concentration Capsaicin 8% Patch. *Br. J. Anaesth.* **2011**, *107*, 490–502. [[CrossRef](#)]
24. Martini, C.H.; Yassen, A.; Krebs-Brown, A.; Passier, P.; Stoker, M.; Olofsen, E.; Dahan, A. A Novel Approach to Identify Responder Subgroups and Predictors of Response to Low- and High-Dose Capsaicin Patches in Postherpetic Neuralgia: Capsaicin in Postherpetic Neuralgia. *EJP* **2013**, *17*, 1491–1501. [[CrossRef](#)]
25. Moon, J.-Y.; Lee, P.-B.; Kim, Y.-C.; Lee, S.-C.; Nahm, F.S.; Choi, E. Efficacy and Safety of 0.625% and 1.25% Capsaicin Patch in Peripheral Neuropathic Pain: Multi-Center, Randomized, and Semi-Double Blind Controlled Study. *Pain Physician* **2017**, *20*, 27–35.
26. Pethő, G.; Bölskei, K.; Füredi, R.; Botz, B.; Bagoly, T.; Pintér, E.; Szolcsányi, J. Evidence for a Novel, Neurohumoral Antinociceptive Mechanism Mediated by Peripheral Capsaicin-Sensitive Nociceptors in Conscious Rats. *Neuropeptides* **2017**, *62*, 1–10. [[CrossRef](#)]
27. Spampinato, S.; Romualdi, P.; Candeletti, S.; Cavicchini, E.; Ferri, S. Distinguishable Effects of Intrathecal Dynorphins, Somatostatin, Neurotensin and s-Calcitonin on Nociception and Motor Function in the Rat. *Pain* **1988**, *35*, 95–104. [[CrossRef](#)]
28. Rosenthal, B.M.; Ho, R.H. An Electron Microscopic Study of Somatostatin Immunoreactive Structures in Lamina II of the Rat Spinal Cord. *Brain Res. Bull.* **1989**, *22*, 439–451. [[CrossRef](#)]
29. Kecskés, A.; Pohóczky, K.; Kecskés, M.; Varga, Z.V.; Kormos, V.; Szőke, É.; Henn-Mike, N.; Fehér, M.; Kun, J.; Gyenesi, A.; et al. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7788. [[CrossRef](#)]
30. Brennan, T.J.; Vandermeulen, E.P.; Gebhart, G.F. Characterization of a Rat Model of Incisional Pain. *Pain* **1996**, *64*, 493–502. [[CrossRef](#)]
31. Morris, C.J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. *Methods Mol. Biol.* **2003**, *225*, 115–121. [[CrossRef](#)]
32. Ng, S.-F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441. [[CrossRef](#)]
33. Zsikó, S.; Csányi, E.; Kovács, A.; Budai-Szűcs, M.; Gácsi, A.; Berkó, S. Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro. *Sci. Pharm.* **2019**, *87*, 19. [[CrossRef](#)]
34. Bakonyi, M.; Gácsi, A.; Kovács, A.; Szűcs, M.-B.; Berkó, S.; Csányi, E. Following-up Skin Penetration of Lidocaine from Different Vehicles by Raman Spectroscopic Mapping. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *154*, 1–6. [[CrossRef](#)]
35. Zsikó, S.; Csányi, E.; Kovács, A.; Budai-Szűcs, M.; Gácsi, A.; Berkó, S. Novel In Vitro Investigational Methods for Modeling Skin Permeation: Skin PAMPA, Raman Mapping. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 803. [[CrossRef](#)]