ZRÍNYI MIKLÓS
NEMZETVÉDELMI EGYETEM

Karvaly Gellért Balázs gyógyszerész százados

A kénmustár bőrfelszínről történő penetrációjának vizsgálata *in vivo* mikrodialízis modell segítségével

Doktori (PhD) értekezés

témavezető:
Prof. Dr. Fűrész József orvos ezredes MD, PhD
egyetemi magántanár

2008. BUDAPEST

ZRÍNYI MIKLÓS NEMZETVÉDELMI EGYETEM
BOLYAI JÁNOS KATONAI MŰSZAKI KAR
KATONAI MŰSZAKI DOKTORI ISKOLA

Karvaly Gellért Balázs gyógyszerész százados

A kénmustár bőrfelszínről történő penetrációjának vizsgálata *in vivo* mikrodialízis modell segítségével

Doktori (PhD) értekezés

témavezető:
Prof. Dr. Fűrész József orvos ezredes MD, PhD
egyetemi magántanár

Jóváhagyom!

Budapest, 2008. április -n.

(Prof. Dr. Fűrész József o. ezds.)

2008. BUDAPEST

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS……...……..…….…….……. 1

1.1 A kutatási probléma megfogalmazása……..…….…….……. 1

1.1.1 A tömegpusztító fegyverek létéből adódó fenyegetés és a NATO ezzel kapcsolatos védelempolitikájának pillérei…….…… 1

1.1.2 A mérgező harcanyagok csoportosítása…….. 3

1.1.3 A kénmustár veszélyforrásként történő jellemzése...…….. 3

1.1.4 A kénmustár elleni egészségügyi védelem formái, a bőrexpozíció jelentősége és a megelőző bőrfelszíni készítmények alkalmazásának előnyei…….……..… 6

1.2 Célkitűzések……. 9

1.3 A kénmustár bőrfelszínről történő felszívódásában szerepet játszó biológiai tényezők…….……..……..….. 10

1.3.1 Az emberi bőr szerkezete……...…….....……... 10

1.4 A kénmustár bőrfelszínről történő felszívódásának jellemzői és következményei…. 12

1.5 A kénmustár bőrbe jutásának bőrfelszíni profilaxis útján történő megakadályozásával kapcsolatos korábbi eredmények áttekintése…….……..... 15

1.6 A kénmustár bőrbe jutásának vizsgálatára kifejlesztett modellek……..... 18

1.7 A mikrodialízis helye a bőrben történő mintavétel módszerei között……. 20

2. VIZSGÁLATI ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK…….…… 23

2.1 Vegyszerek, gázok és készítmények…….……...…… 23

2.2 Eszközök…….…...…….. 23

2.3 Módszerek…….....…… 24

2.3.1 Gázkromatográfiás mérések……..…….. 24

2.3.2 Oldatok és minták méréshez történő előkészítése …….....…….. 26

2.3.3 Mikrodialízis…….....… 27

2.3.4 Állatkísérletek……...…….…….. 31

2.3.5 Profilaktikus készítmények felvitele a bőrre……... 33

2.3.6 Mikroszkópos szövettani vizsgálatok…….. 33

2.3.7 Eredmények kiértékelése……...……. 33

3. EREDMÉNYEK…….…….……. 34

3.1 A tiodiglikol mennyiségi meghatározása mikrodializátumokban…….....….... 34

3.2 A tiodiglikol mikrodialízissel történő kinyerése……..……... 35

3.3 A bőrfelszínre felvitt kénmustár felszívódásának idő- és dózisfüggése…….. 37

3.4 A kénmustár bőrfelszínről történő felszívódása következtében kialakuló szöveti morfológiai elváltozások….……..…….. 44

3.5 Bőrfelszíni védőkészítmények hatékonyságának vizsgálata……... 45

3.6 Tiodiglikol kimutatása a hypodermisben bőrfelszínről történő felszívódását követően……... 50

4. DISZKUSSZIÓ…….…… 51

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK……...……. 64

6. AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁRA VONATKOZÓ AJÁNLÁSOK……. 65

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁVAL KAPCSOLATBAN MEGJELENT SAJÁT PUBLIKÁCIÓK……..... 66

FELHASZNÁLT IRODALOM…….. 68

FÜGGELÉK……...……... 86

AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

ANOVA	variancia analízis
AUC	a kísérleti időszakban a subcutan extracelluláris térben kapott tiodiglikol koncentrációgörbe alatti terület
$\underline{AUC}$	a kísérleti időszakban a subcutan extracelluláris térben kapott tiodiglikol koncentrációgörbék alatti területértékek számtani közepe
$AUC_{0\text{-}60}$	a kénmustár felvitele utáni 0-60. perc között a subcutan extracelluláris térben kapott tiodiglikol koncentrációgörbe alatti terület
$\underline{AUC}_{0\text{-}60}$	a kénmustár felvitele utáni 0-60. perc között a subcutan extracelluláris térben kapott tiodiglikol koncentrációgörbék alatti területek számtani közepe
$c_{0\text{-}20}$	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben mért koncentrációja a kénmustár felvitele utáni 0-20. perc között
$\underline{c}_{0\text{-}20}$	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben, a kénmustár felvitele utáni 0-20. perc között mért koncentráció-értékeinek számtani közepe
C_{dial}	a tiodiglikol mikrodializátumban mérhető koncentrációja
C_{oldat}	a tiodiglikol koncentrációja a vizsgált oldatban (*in vitro* kísérletekben)
C_{perf}	a tiodiglikol koncentrációja a dializáló oldatban (*in vitro* kísérletekben)
c_{TDG}	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben mért koncentrációja
c_{max}	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben mért maximális koncentrációja
$\underline{c}_{max}$	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben mért maximális koncentráció-értékeinek számtani közepe
CBRN	vegyi, biológiai, radiológiai és nukleáris fegyverek összefoglaló rövidítése
HFBA	heptafluorvajsavanhidrid
HMT	hexametiléntetramin
IPPSF	izolált perfundált sertésbőr lebeny
LCt_{50}	egyszeri expozíció esetén a populáció felének elpusztulását eredményező légtéri koncentráció-idő szorzat
LD_{50}	ötvenszázalékos halálos dózis
LOD	kimutatási határ (a minőségi kimutatás alsó koncentrációhatára)
LOQ	mennyiségi kimutatási határ
PFPD	pulzáló lángfotometriás detektor

PFPE	perfluorpoliéter
PTFE	politetrafluoretilén (teflon)
R^2	determinációs együttható
RR%	kinyerési hányados
SM	2,2'-diklórdietilszulfid; kénmustár
SOD	szuperoxid-dizmutáz
$t_{max;0-360}$	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben, SM-expozíció során mért maximális koncentrációjának eléréséhez szükséges idő
$\underline{t}_{max;0-360}$	a tiodiglikol subcutan extracelluláris térben, SM-expozíció során mért maximális koncentrációjának eléréséhez szükséges idők számtani közepe
TDG	2,2'-tiodietanol; tiodiglikol
TDG-HFBA	tiodiglikol-heptafluorvajsav diészter
TDP-HFBA	tiodipropanol-heptafluorvajsav diészter
TDP	3,3'-tiodipropanol; tiodipropanol

1. BEVEZETÉS

1.1 A kutatási probléma megfogalmazása

1.1.1 A tömegpusztító fegyverek létéből adódó fenyegetés és a NATO ezzel kapcsolatos védelem-politikájának pillérei

A lendületes tudományos és ipari fejlődés, valamint a fegyverkezési versenyek következményeként a XX. században új fegyver-kategóriaként jelentek meg a modern tömegpusztító (vegyi, biológiai és nukleáris, majd a radiológiai, ún. piszkos) fegyverek. Az első világháború kirobbanása és a hidegháborús szembenállás századvégi enyhülése között ezek az eszközök sok ország hadrendjébe bekerültek, és alkalmazásukra is számos – a Szovjetunió megszűnése után pedig további néhány – esetben sor került [1-5]. A tömegpusztító fegyverek az emberiség és az élhető környezet minden egyéb eszköznél hatékonyabb és teljesebb elpusztítására adnak lehetőséget, ezért azok használatát, illetve az azzal való fenyegetést a civilizált világ elfogadhatatlannak tartja. Ezt tükrözően az ezredfordulóig nonproliferációs egyezmények sora került aláírásra, nagyszabású leszerelési programok indultak meg, továbbá a tömegpusztító fegyverek terjedését korlátozni hivatott nemzetközi egyezmények léptek életbe, melyek végrehajtását szintén nemzetközi szervezetek felügyelik [6-9].

A vegyi, biológiai, radiológiai és nukleáris (CBRN) fegyverekkel összefüggő fenyegetés részben katonai, részben környezeti jellegű. A katonai fenyegetés megtestesítői egyes, e fegyverek megszerzésére törekvő és/vagy az azokkal kapcsolatos kereskedelemben érdekelt, a nonproliferációs egyezményektől sok esetben távol maradó államok, valamint a terrorizmus kategóriájába sorolt eszközök használatától vissza nem riadó szervezetek [1,10]. Komoly biztonsági kockázatot jelent, hogy a problémával kapcsolatos egyetértés és az erőfeszítések ellenére a felhalmozott készletek teljes megsemmisítése máig nem történt meg, sőt, tárolásukkal és biztonságos őrzésükkel kapcsolatban számos helyen komoly kétségek merültek fel [11,12]. A helyzetet súlyosbítja, hogy e fegyverek előállításával, szállításával, tárolásával és alkalmazásával kapcsolatos tudás jelentős része már nincs kontroll alatt [12]. A vonatkozó nemzetközi egyezményektől távol maradó államok készleteik fenntartásával kimondott vagy kimondatlan regionális fenyegetés hordozói, legtöbbjük ráadásul továbbra is törekszik arzenáljának bővítésére.

Sajnálatos módon ezek az államok politikai szándékaik elérése céljából tudásuk, erőforrásaik és készleteik terrorista szervezetek részére történő továbbadásától sem riadnak vissza [13,14]. Tömegpusztító fegyver összetevőjeként használható vegyülettel legutóbb Nagy-Britanniában követtek el merényletet [5].

Környezeti kockázatot a korábban előállított készletek nem előrelátó – tárolási céllal vagy éppen a tőlük való megszabadulás érdekében történő – elhelyezése, valamint a fegyveres konfliktusokban bevetett, ám fel nem robbant lövedékek felszínre kerülése jelent. E készletek – melyek léte a világ több pontján egyre fokozódó környezeti-ökológiai veszélyt rejt magában – közül néhány a közelmúltban balesetek okozójává is vált [15-19].

Valószínű, hogy a tömegpusztító fegyverek minden nemzetközi erőfeszítés ellenére veszélyt fognak jelenteni a jövőben az euro-atlanti régió országai számára, így hazánk számára is. A fenyegetés kezelése komplex védelmi (felderítési, vegyivédelmi, védelem-egészségügyi és kiképzési) feladatokat jelent. Ezt felismerve az Észak-Atlanti Szerződés Szervezete az ezredforduló óta ismét kiemelt figyelmet fordít CBRN fegyverek elleni védelmi képességeinek fenntartására és fejlesztésére. 1999-ben, hazánk csatlakozásával egyidőben a NATO tagállamainak kormányfői meghirdették a Védelmi Képességek Kezdeményezést (Defence Capabilities Initiative), melyben megfogalmazták, hogy a NATO számára a tömegpusztító fegyverek és célbajuttató eszközeik proliferációja jelenti az egyik potenciális veszélyforrást. Ezzel párhuzamosan dolgozták ki a Tömegpusztító Fegyverek Kezdeményezést (Weapons of Mass Destruction Initiative) [20]. A 2002-es prágai NATO-csúcstalálkozón nyolc, a katonai műveletek sikerességének szempontjából kulcsfontosságú területet jelöltek meg, melyek egyike a vegyi, biológiai, radiológiai és nukleáris védelem volt. Ugyanekkor öt, a területet érintő védelmi kezdeményezés (NBC Defence Initiatives) került megfogalmazásra [21]. 2004-ben az isztambuli csúcstalálkozón az állam- és kormányfők meghirdették a Terrorizmus Elleni Védelem Programot (Defence Against Terrorism Program), mely egyik eleme a tömegpusztító fegyverek észlelése, elhárítása, valamint az ellenük való védekezés [22]. A 2006-ban Rigában tartott csúcstalálkozón pedig ismét megerősítésre került, hogy a tömegpusztító fegyverek elleni védekezés képességeinek fejlesztése a NATO-n belül továbbra is kiemelten fontos terület [23]. A NATO legmagasabb döntéshozói szintjén deklarált elkötelezettség jelenti így a területen folyó védelem-egészségügyi kutatás-fejlesztési tevékenységek legfontosabb keretét.

1.1.2 A mérgező harcanyagok csoportosítása

A tömegpusztító fegyverek egyik fő típusát a vegyi fegyverek képezik. *Halász* és *Grósz* definíciója szerint „a vegyi fegyver olyan eszközrendszer, amelynek rendeltetése az élőerők harcképtelenné tétele bizonyos anyagok mérgező tulajdonságán keresztül. Ez magában foglalja a mérgező vegyi harcanyagot és annak a célbajuttató és szétszórásra szolgáló eszközeit." [24] A vegyi fegyverek további osztályozása gyakran az összetevőként használható mérgező harcanyagok tulajdonságai szerint történik. Gyakori a hatásmechanizmus szerinti felosztás; eszerint megkülönböztetjük az *idegmérgeket* (melyek az acetilkolinészteráz enzimet visszafordíthatatlanul bénítva halálos idegrendszeri tüneteket idéznek elő), a *hólyaghúzó mérgeket* (ezek változatos módon ható vegyületek, a bőrre jutva azonban mindegyikük hólyagképződést eredményez), a *szisztémásan ható mérgeket* (melyek az oxigén-transzportot bénítva általános szöveti hipoxiát okoznak), a *tüdőre ható mérgeket* (ezek az alsó légutakban súlyos ödémát idéznek elő), a *könnyfakasztó mérgeket* (melyek a szem és a felső légutak súlyos irritációjával fejtik ki hatásukat), a *hánytató mérgeket* (ezek hatása az akut arzén-mérgezés következményeivel egyezik meg), valamint a *pszichotikumokat* (ezek kolinerg agonista vegyületek, melyek a központi idegrendszer élettani működésébe avatkoznak be)[1] [25].

A mérgező harcanyagok besorolása lehetséges az alkalmazott koncentráció-tartományban okozott halálos sebesülések gyakorisága alapján is: ilyen megközelítésben az ideg-, a hólyaghúzó, a tüdőre és a szisztémásan ható mérgeket a *halálos*, míg a könnyfakasztó és hánytató mérgeket, valamint a pszichotikumokat a *nemhalálos* mérgező harcanyagok csoportjába sorolják. A megkülönböztetés harmadik fontos szempontja a terep, eszközök és ruházat szennyezésének időtartama: ez alapján különbséget teszünk az *illanó* (pl. szarin, klórpikrin, cianhidrogén) és *maradó* (pl. szomán, 3-kinuklidinilbenzilát) mérgek között [25].

1.1.3. A kénmustár veszélyforrásként történő jellemzése

A mérgező harcanyagok egyik kiemelten veszélyes csoportját a hólyaghúzó vegyületek jelentik, melyek katonai szempontból legfontosabb képviselője a kénmustár[2]

---

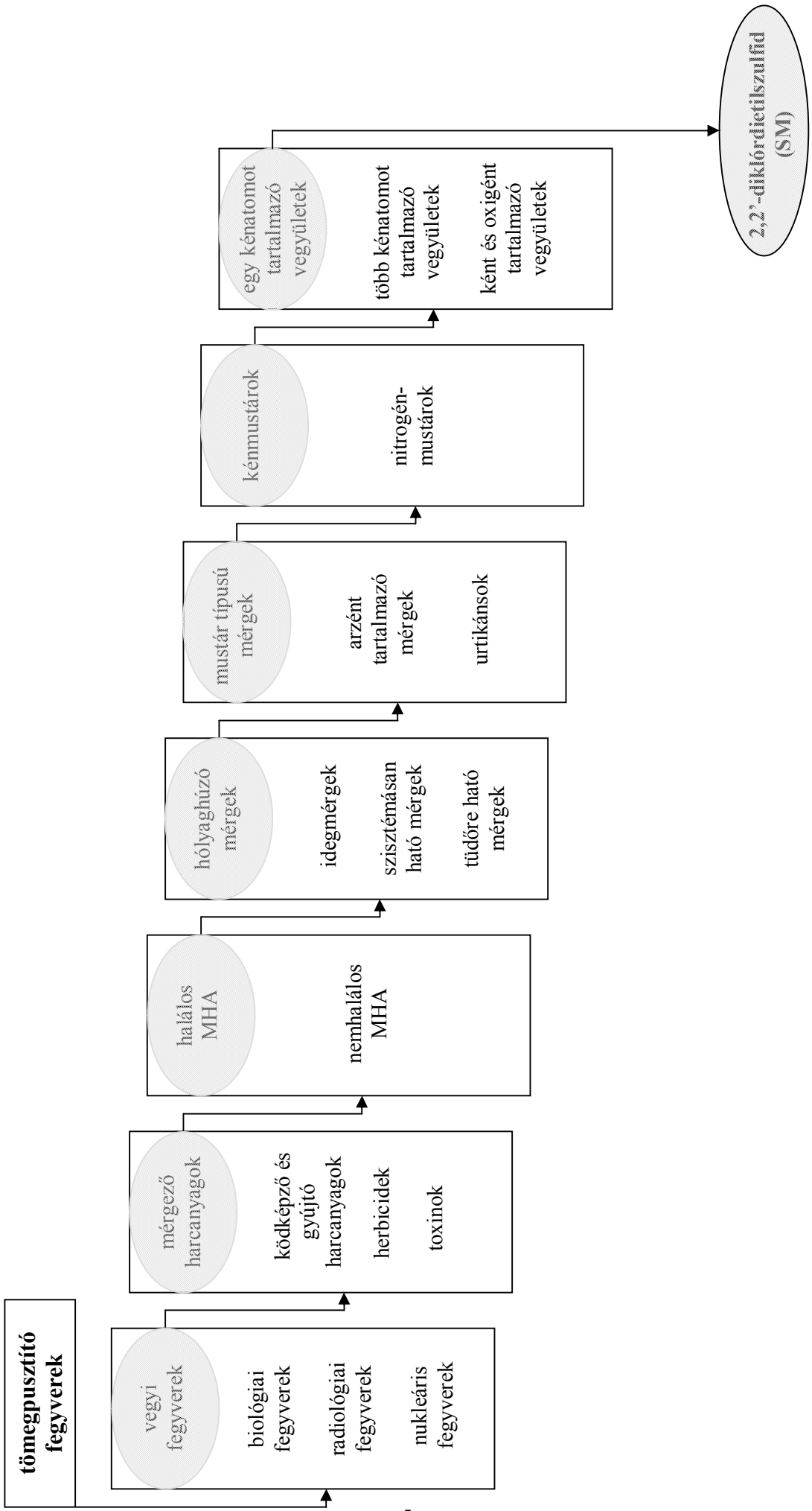
[1] Tágabb értelemben a vegyi fegyverek közé sorolják a *toxinokat,* a *herbicideket*, továbbá a *ködképző-* és *gyújtófegyvereket* is.

[2] Az értekezésben szereplő fontosabb vegyületek szerkezeti képlete a Függelékben szerepel.

(2,2'-diklórdietilszulfid; SM). A rendkívül súlyos és elhúzódóan gyógyuló sérüléseket okozó méreg toxicitása alapján a halálos, fizikai tulajdonságai alapján a maradó harcanyagok közé tartozik (*1. ábra*) [27]. A XX. században vegyi fegyverek komponenseként számos hadseregben rendszeresítésre került, és sok konfliktusban – a mérgező harcanyagok közül a legtöbb alkalommal – be is vetették (**I. táblázat**) [1,29]. Célbajuttatásához a múltban különböző típusú tüzérségi lövedékeket, bombákat, rakétákat használtak, ez azonban elméletileg számos további módon megoldható [30,31]. Az SM a nemzetközi Vegyi Fegyver Egyezménytől [9] távol maradó legtöbb (ha nem az összes) állam haderejének harcanyag-készletében megtalálható [1]. Alkalmazásának veszélyét növeli, hogy előállítása prekurzorként használt ipari vegyületek felhasználásával, korlátozott felszerelés birtokában megvalósítható, szintéziséhez nyílt forrásokban található információ [32], az előállított méreg tárolása pedig észrevétlenül megoldható [31,33]. További veszélyforrást jelentenek a felügyeleten kívüli SM-készletek: a már említett meglévő környezeti-ökológiai kockázaton felül a mérgező harcanyagok által okozott, ismertté vált balesetek nagy része is ehhez a méreghez köthető [17,18,34-36].

I. táblázat: Fontosabb példák a kénmustár bevetésére a XX. században [37-40].

1917. július 12-13.	Első harctéri alkalmazása: a német fél kénmustárt tartalmazó lövedékeket vet be Ypres-nél (Belgium)
1917-18	Az I. világháború legnagyobb élőerő-veszteséget okozó mérgező harcanyagává válik
1935	Olaszország beveti Etiópia megszállásakor
1937-45	A japán hadsereg Kína megszállása során alkalmazza többször
1963-67	Az egyiptomi hadsereg a jemeni polgárháborúba történő beavatkozása során veti be
1982-88	Irak iráni katonai és civil célpontok ellen gyakran beveti; az áldozatok száma több mint ötvenezer
1988	Kurdok lakta iraki falvak lakossága ellen Szaddam Huszein hadserege alkalmazza; többezer ember sebesül meg súlyosan



1. ábra: Az SM elhelyezése a tömegpusztító fegyverek rendszerében hatásmechanizmus szerint [25,27,28 alapján].

II. táblázat: A kénmustár fizikai tulajdonságai [18].

relatív molekulatömeg	159,08
fagyáspont	kb. 15 °C
forráspont	kb. 216 °C
telített légtéri koncentráció	900 mg m^{-3} (25 °C)
sűrűség	1,27 g ml^{-1} (20 °C)

Az SM hatékony alkalmazását fizikai és kémiai tulajdonságai változatos körülmények között teszik lehetővé (**II. táblázat**). Sűrűsége miatt légtérbe kerülésekor a vegyület nagyrészt a talajszinthez közel kerül [18,36]. Magas forráspontja és alacsony gőznyomása miatt tartósan szennyezi a terepet, melyről eltávolítása rendkívül nehéz [41]. Toxicitása nyílt terepen kb. 15 °C környezeti hőmérséklet felett számottevő [18]. Vízben alig oldódik (telítési koncentrációja 20 °C-on 0,9 mg ml^{-1}), azonban korlátlanul elegyedik a legtöbb szerves oldószerrel [42]. A hígítatlan SM kémiailag stabil, ezért tárolása – különösen stabilizálószer hozzáadását követően – hosszú időn át lehetséges. Más vegyületekkel történő elegyítésével olvadáspontja csökkenthető (így akár fagypont alatti környezeti hőmérsékleten is hatékonyan alkalmazható keverék nyerhető), emellett lehetőség van szabályozott részecskeméretű aeroszol formájában történő előállítására – ennek célja az alsó légutakba történő behatolásának elősegítése – és viszkozitásának növelésére; utóbbi eljárás a bőrről, szemből, eszközökről és a terepről történő eltávolítását tovább nehezíti [43].

1.1.4 A kénmustár elleni egészségügyi védelem formái, a bőrexpozíció jelentősége és a megelőző bőrfelszíni készítmények alkalmazásának előnyei

Az SM akut hatásai elsősorban a szemet, a légutakat és a bőrt, emellett a gyakori sejtosztódást mutató szöveteket (vörös csontvelő, bélhám) és a központi idegrendszert érintik [36,44,45]. A lehetséges egészségügyi beavatkozásokat sokszor aszerint csoportosítják, hogy azokra a kontaminációt megelőzően vagy azt követően kerül sor. Eszerint az alábbi megközelítések jönnek számításba: (1) *készítmények expozíció előtti alkalmazása,* melyek a harcanyag megkötését, detoxifikálását, penetrációjának záróréteg létesítésével történő megakadályozását, vagy a tünetek fellépéséhez vezető biokémiai

folyamatok inhibícióját célozza; (2) *személyi mentesítés*, amely a testfelszínre jutó folyadék halmazállapotú harcanyag megkötését, detoxifikálását, vagy eltávolítását célzó, az expozíciót követően végrehajtott beavatkozás; (3) *antidotum adása*, amely szintén posztexpozíciós beavatkozásként a már felszívódott SM semlegesítésére, vagy a tünetek fellépéséhez vezető biokémiai folyamatok inhibíciójára irányul; végül (4) *posztexpozíciós terápia*, amely a manifesztálódott tünetekkel rendelkező sérültek ellátását, életvédelmét foglalja magába. Míg a bőr védelmére elvben mindegyik megközelítés alkalmazható, a szem védelme szempontjából csak a (2)-(4), a légutak és a szisztémás bejutáskor érintett szervek védelme érdekében pedig csak a (3) és (4) megközelítés jelenthet megoldást.

Az SM által okozott sérülések orvosi ellátásának problémája a felsorolt szervek egyike esetében sem megoldott [36]. Általánosan elfogadott ajánlás jelenleg csak az SM mérgezettek személyi mentesítésére és osztályozására van, emellett a kialakult tünetek fekvőbeteg-intézeti kezelésével kapcsolatban nőtt jelentősen a tapasztalatok száma az elmúlt években [36,39,44-47]. A sérülések kezelésével kapcsolatos nehézségek a vegyület fizikai és kémiai tulajdonságaival, illetve hatásmechanizmusával függenek össze. Nagy problémát jelent, hogy az SM csak extrém nagy dózisban okoz azonnali helyi irritációt, a tünetek legtöbbször az expozíció után több órával lépnek fel [48]. A késői manifesztáció ellenére ugyanis a molekuláris szintű patológiás folyamatok a kontaktust követően percek alatt végbemennek, ami a tünetek kialakulását megelőző posztexpozíciós beavatkozás lehetőségét időben rendkívüli mértékben korlátozza [48,49]. A harcanyag a létfontosságú intracelluláris makromolekulákkal minden sejttípusban kovalens kötést létesít, ezen felül pedig számos extracelluláris mátrix fehérjéhez kapcsolódik [36,42,50]. A nagyszámú biokémiai elváltozás párhuzamos fellépése miatt a racionális terápia kifejlesztéséhez bonyolult patomechanizmus tisztázására van szükség. E patomechanizmus-komplexről részleges ismereteink vannak [48].

A bőr kontaminációjának jelentősége kiemelkedő. Bőrünk – nagy kiterjedése miatt – a légtérbe kerülő harcanyaggal leggyakrabban érintkező szervünk: a múltban a dokumentált sérülések több mint 80%-a – részben vagy egészében – bőrfelszíni expozíció eredménye volt [36,48]. A kialakuló bőrelváltozások a sebesültek tartós harcképtelenségét okozzák. Megelőzésük, gyógyításuk elvi lehetőségei közül ma a nagyon korlátozottan alkalmazható személyi mentesítésen kívül kizárólag a posztexpozíciós terápia vonatkozásában állnak rendelkezésre a védelem-egészségügyben alkalmazható eljárások [46,50]. A közelmúltban mindazonáltal megnőtt az érdeklődés a bőrt az SM ellen hatékonyan védő profilaktikus készítmények iránt, melyek közül a bőrfelszínen

alkalmazható összetételek különösen ígéretesnek bizonyultak. Aktuális feladat ezért olyan vizsgálati rendszerek megalkotása, amelyek segítségével ezek eredményességének hiteles vizsgálata, összehasonlítása végrehajtható. Hasonló védőkészítmények foglalkozás-egészségügyi területen – elsősorban a munkahelyi környezettel összefüggő kontakt dermatitisek kialakulásának megelőzése végett – történő használata széles körben elterjedt. Használatukat előnyössé teszi, hogy (1) felvitelük és eltávolításuk szakértelmet nem igényel, (2) a test bármely részén alkalmazhatók, (3) alkalmazásuk a védőruházathoz képest minimális fizikai és pszichés stresszt okoz, (4) kisebb a túlérzékenységi bőrreakciók kialakulásának veszélye, mint a hagyományos védőelemek (kesztyű, maszk, stb.) használatakor, (5) előállítási költségük – a vegyivédelmi ruházat és más megelőzési formák költségeihez viszonyítva – alacsony, (6) a szervezet élettani folyamatait minimálisan befolyásolják, és (7) eltávolításuk könnyen és gyorsan megoldható [51,52]. Néhány, az SM-expozíció profilaxisában használható bőrfelszíni készítmény engedélyezése a humán gyógyászatban történő alkalmazásra mára elérhető közelségbe került. E szereket a védőruházat elemeinek kapcsolódási pontjainál tervezik használni, továbbá olyan esetekben, mikor védőruházat felöltésére nincs mód [52-54]. Hazánk fegyveres, rend-, polgár- és katasztrófavédelmi erőinek állománya, valamint az egészségügyi ellátást nyújtó szakszemélyzet kontaminált környezetben történő szolgálatteljesítésének elősegítése érdekében fontos, hogy a jövő korszerű védőkészítményei közül a hatékonyság és biztonságosság szempontjából egyaránt megfelelő formuláció kiválasztásra kerülhessen. Ehhez szükséges, hogy rendelkezésünkre álljanak olyan biológiai modellek, melyek alkalmasak a készítmények hatékonyságának hiteles vizsgálatára és összehasonlítására.

1.2 Célkitűzések

- Munkám során alapvető célkitűzésem egy *in vivo* kísérletes modell megalkotása volt, mely alkalmas a bőrfelszínre jutó mérgező harcanyagok penetrációjának, valamint a harcanyagok és a bőrfelszín kontaktusát megakadályozó készítmények és eljárások hatékonyságának vizsgálatára.

- Az állatkísérletes modell kifejlesztése során szempontként vettem figyelembe, hogy a modell alkalmazható legyen

  - különösen veszélyes anyagok tartós felvitelére, azok párolgásának megakadályozásával;
  - a bőrön áthatoló vegyületek, illetve metabolitjaik koncentrációjának folyamatos nyomon követésére.

- Célul tűztem ki a mikrodialízis technika mintavételi módszerként történő adaptálását. Célom volt a mintavétel körülményeinek részletes vizsgálata és optimalizálása *in vitro* és *in vivo* környezetben.

- Célom volt a modell vegyületként alkalmazott kénmustár penetrációjának kimutatására alkalmas specifikus analit azonosítása, továbbá mennyiségi analitikai módszer kidolgozása a kiválasztott analit koncentrációjának kis térfogatú (<80 µl) vizes mintákban történő meghatározásához.

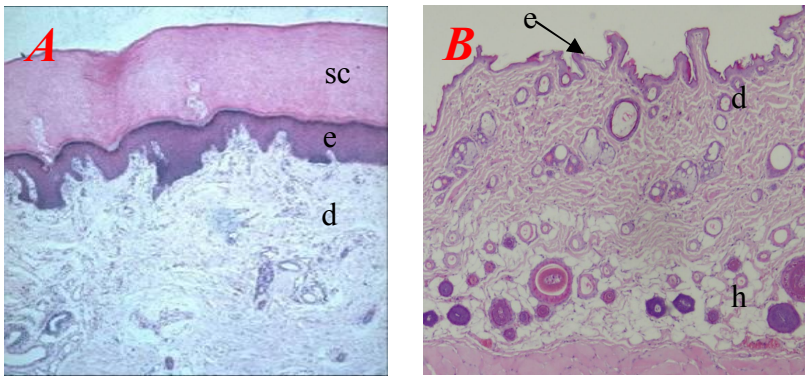
- A modell kísérletes tesztelésének részeként célom volt

  - a kénmustár penetrációjának jellemzése a bőrfelszínre felvitt mennyiséggel összefüggésben;
  - szakirodalomból ismert, mások által fejlesztett és vizsgált védőkészítmények hatékonyságának jellemzése;
  - egy eddig kénmustár ellen preventív szerként nem alkalmazott készítmény tesztelése.

1.3 A kénmustár bőrfelszínről történő felszívódásában szerepet játszó biológiai tényezők

1.3.1 Az emberi bőr szerkezete

A kültakaró az emberi test tömegének felnőtt korban kb. 10%-át kitevő, 1,5-2,0 m^2 összterületű létfontosságú szerv [55]. Amellett, hogy elsődleges szerepet játszik belső szerveink fizikai védelmében a külső – fizikai, kémiai és biológiai – behatásokkal szemben, a testhőmérséklet szabályozásával kapcsolatos létfontosságú, valamint fontos érzékszervi funkcióval is rendelkezik. Élettani feladatai közé tartozik még egyes, a szisztémás keringésből érkező vegyületek kiválasztása, az elektrolit-háztartás egyensúlyának fenntartásában illetve a sérült bőrön keresztül bejutó kórokozók eliminációjában való részvétel, továbbá a bőrfelszínről felszívódó vegyületek kémiai átalakítása [55-57].



2. ábra: (*A*) emberi tenyér [58] és (*B*) vándorpatkány hasi bőréből [saját felvétel] készült metszetek. Hematoxilin-eozin festés, 400x nagyítás. *sc:* stratum corneum, *e:* epidermis, *d:* dermis, *h:* hypodermis.

A bőrt morfológiai és funkcionális sajátságok alapján három rétegre – epidermis, dermis és hypodermis – szokás osztani (*2. ábra*). A külvilággal érintkező epidermis legkülső rétege a 15-25 sejtsor képezte stratum corneum, melyet teljesen differenciálódott, elhalt keratinociták alkotnak lamelláris lipidmátrixba ágyazódva; utóbbit szőrtüszők és az izzadtságmirigyek kivezető csövei döfik át számos ponton. A s. corneum elsősorban nagy sűrűsége, alacsony víztartalma, valamint a vegyületek aktív transzportját végrehajtó egységek hiánya miatt a bőrfelszínre jutó vegyületek penetrációjának sebességét

leghatékonyabban korlátozó réteg [59]. A s. corneum egésze vagy az intercelluláris lipidmátrix eltávolításakor az abszorpció sebessége sokszorosára nő [60,61]. A s. corneumon keresztül történő felszívódás passzív folyamat, melyet részben a biológiai rendszert (a vegyület által az intercelluláris bilipid csatornákban megtett úthossz, a s. corneum hőmérséklete, a pilosebaceus egységek száma az exponált területen), részben pedig a toxikánst tartalmazó összetételt (a vehikulum minősége, továbbá a vegyület koncentrációja és s. corneumban érvényes diffuzivitása) jellemző értékek határoznak meg [59,60]. Az előzőekből következően a felszívódás sebessége minden vegyület esetében testtájanként eltérő és ennek mértéke a vegyületek fizikai, kémiai tulajdonságaival is összefügg [59].

A s. corneum alatt az élő epidermis helyezkedik el. Ennek legalsó rétege a stratum basale, mely nagyobbrészt őssejtekből és a differenciálódás kezdeti fázisában lévő keratinocitákból, valamint az epidermist a bazális membránhoz horgonyzó sejtekből áll. A keratinociták differenciálódásukkal egyidejűleg a bőrfelszín felé tolódnak, és azzal párhuzamos rétegeket (s. spinosum, s. granulosum, egyes testtájakon pedig efelett s. lucidum) alkotnak. Az epidermis kisebb mennyiségben más funkciót betöltő sejteket (melanociták, Langerhans-sejtek, Merkel-sejtek) is tartalmaz.

Az epidermist és az alatta elhelyezkedő dermist a bazális membrán rögzíti szorosan egymáshoz. A közvetlenül a bazális membrán alatt húzódó dermis papillarét nagyobbrészt sejtes állomány alkotja (ez főleg fibroblastokból, emellett hízósejtekből és makrofágokból áll), míg a mélyebben fekvő dermis reticularét nagyrészt kollagént, elasztint és retikuláris rostokat tartalmazó amorf, vegyes proteoglikán mátrix teszi ki. A bőrfüggelékek többsége (az apokrin és ekkrin mirigyek, valamint a pilosebaceus egység) utóbbi rétegbe ágyazódik. A bőrfelszínről penetráló xenobiotikumok szisztémás keringésbe történő szállítását végző kapilláris erek legnagyobb számban a dermis papillarében futnak, a bőr termoregulációs képességét biztosító arteriovenosus anastomosisok azonban a bőr egészét behálózzák. A dermis kemo-, mechano- és hőszenzitív idegrostokkal gazdagon innervált, ezek jelentős része a bazális membránig fut és a s. basaleban található Merkel-sejtekkel asszociált. Sűrű hálózatot főleg a dermis papillarében alkotó nyirokrendszere az immunválasz fellépését, a nagyobb méretű szöveti törmelékek elszállítását, továbbá a szöveti nyomás fenntartását segíti elő. A bőr legalsó rétegét (hypodermis) zsírszövet alkotja, amelyben a bőrt ellátó nagyobb idegek és erek találhatók. Ez a réteg testünk hőszigetelésének legfontosabb eleme, egyben lipofil vegyületek raktározásának és az energiatermelésnek is fontos közege [56,57,59].

1.4 A kénmustár bőrfelszínről történő felszívódásának jellemzői és következményei

A kénmustár gőz, aeroszol vagy folyadékcsepp formájában kerül a bőrfelszínre. A kontaktus során rendkívül gyorsan áthatol a s. corneumon és bejut a bőr élő szöveteibe [60-62]. Korábbi vizsgálatokban a harcanyag becsült penetrációs sebessége fedetlen emberi bőrön keresztül, 21 °C-os környezeti hőmérsékleten 1-4 µg cm^{-2} min^{-1} volt [62]. Csupasz tengerimalacban ugyanez az érték 2,0 µg cm^{-2} min^{-1} [63], sertésben 411±175 µg cm^{-2} h^{-1} (kb. 6,8±2,9 µg cm^{-2} min^{-1}) [64], patkányban 7 µg cm^{-2} min^{-1} [65]. Az SM perkután toxicitási adatait a **III. táblázat** mutatja.

III. táblázat: A kénmustár perkután toxicitási adatai [66].

SM gőz bőrtüneteket kiváltó légtéri koncentráció-idő szorzata	50 mg min m^{-3}
SM gőz populáció 50%-át harcképtelenné tevő légtéri koncentráció-idő szorzata	1000-2000 mg min m^{-3}
SM gőz akut perkután LCt_{50}	10 000 mg min m^{-3}
SM folyadék minimális erythematogen dózisa	10-20 µg cm^{-2}
SM folyadék populáció 50%-át harcképtelenné tevő dózisa	800 mg
SM folyadék akut perkután LD_{50}	100 mg kg^{-1}

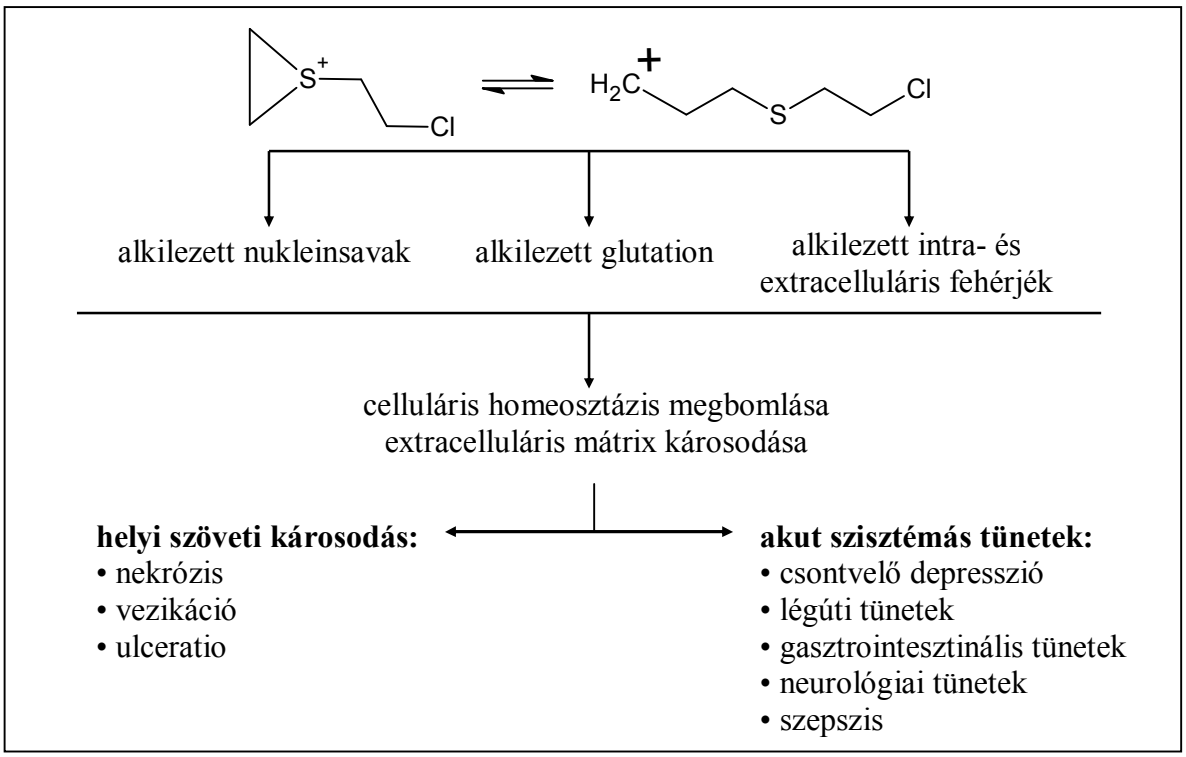
A bejutó SM nagy része a szisztémás keringésbe továbbítódik, kisebb hányada azonban megoszlik a bőrben [60,61]. Sejtmembránokon keresztül történő transzportját elősegítő mechanizmust nem ismerünk; a vegyület passzív diffúzióval jut át azokon [62]. Bőrfelszínről történő felszívódásának, valamint bőrön belüli megoszlásának karakterisztikáját kémiai és fizikai folyamatok igen komplex rendszere határozza meg: *Riviere* és mtsai az SM intradermális kinetikáját 8 rekeszes modellel írták le, mely nemlineáris sebességi állandót is tartalmazott [60]. Mára az is igazolásra került, hogy a korábban közölt eredményekkel szemben a bőrben az SM rezervoárt képez, annak felső rétegeiben [67].

Becslések szerint a bőrfelszínről penetráló SM 10-50 %-a vízzel spontán módon reagálva episzulfóniummá alakul. Az SM hatékonyságának kulcsát az jelenti, hogy az episzulfóniumionnal tautomer karbéniumion nagy affinitással kapcsolódik nukleofil csoportok heteroatomjaihoz (kén, nitrogén, oxigén), melyekben a sejtek működésében

szerepet játszó endogén molekulák, valamint a szöveti struktúrát adó extracelluláris fehérjék rendkívül gazdagok [42,48]. Az episzulfóniumion a DNS nitrogénatomjaihoz (és kisebb mértékben oxigénatomjaihoz) történő kapcsolódása iniciálja a sejt nekrózisához vezető legfontosabb folyamatokat [48]. Emellett alkileződnek az RNS-ek, számos fehérje (különösen a metioninban gazdag proteinek) és kis molekulasúlyú endogén vegyületek (melyek között az elváltozások kialakulása szempontjából a glutation tűnik a legfontosabbnak; *3. ábra*) [68,69]. Többféle nukleofil jelenlétében az egyes reakciók kompetitív módon játszódnak le. *Papirmeister* és mtsai bemutatják *Stein* (1946) korábban nem publikált vizsgálatait, melyek során szisztematikusan összehasonlította az SM 135-féle, a toxicitás, valamint a terápia szempontjából fontosnak tűnő nukleofil ágens iránti affinitását. Ezek közül az episzulfóniumion a leggyorsabban a ditiofoszfátionhoz, különböző alkilditiofoszfát és alkilditiofoszfonát ionokhoz, ortoaminotiofenolhoz és a tioformátionhoz kapcsolódott. Jelentősnek tekinthető még a vegyület tioszulfátion és cisztein iránti affinitása (ezeknek antidotumként történő felhasználásához sokáig reményt fűztek, sőt, az *N*-acetilcisztein alkalmazhatóságát még a közelmúltban is vizsgálták). Ennél sokkal lassabban játszódik le a reakció a terápiás céllal szintén tesztelt 2,3-dimerkaptopropanollal, hexametiléntetraminnal (HMT), és jodidionnal. A patomechanizmusban szerepet játszó endogén molekulákkal lejátszódó reakciók, valamint a tiodiglikol képződésének sebességi állandói az *in vitro* vizsgálatokban legalkalmasabb ellenszernek talált tioszulfátionnal lejátszódó kondenzáció sebességi állandójához állnak közel [42].

Az SM bőrfelszínről történő felszívódását követően kialakuló helyi tünetek súlyossága testtájanként különböző. *Sinclair* a testtájakat az elváltozást kiváltó minimiális koncentráció-idő szorzat (érzékenység – *„threshold”*) és az azonos SM dózis bőrre jutásakor kialakuló klinikai tünetek súlyossága (válaszkészség – *„vulnerability”*) alapján csoportosította. Nagy érzékenységű, nagy válaszkészségű területként jellemezte a nyakat, a scrotumot és a fenéktájékot; kis érzékenységű, nagy válaszkészségű tájékként a hónaljat és a penist [70]. *Watson* és *Griffin* adatai szerint hétezer, az első világháborúban SM bevetése eredményeként megsebesült katona leggyakrabban sérült testtája a scrotum, az arc és a perianalis tájék volt [41]. Negyven, SM-expozíciót elszenvedő iráni veterán sérüléseinek 48%-a a nemi szervet, ugyanannyi a hátat, 44%-a a mellkasi-hasi régiót, ugyanannyi az alsó végtagok elsősorban lágyékközeli részét, 41%-a pedig a hónaljat érintette [45]. *Willems* 65 iráni sérült vizsgálatakor a hónalj, a nemi szervek, az ágyék, valamint a könyék- és térdhajlat érintettségét találta kiemelkedően gyakorinak és súlyosnak [46]. A

fentiekkel szemben a tenyér és a talp sérülése mindegyik betegcsoportban ritka és enyhe volt, azonban ezek gyógyulása különösen lassúnak bizonyult [41,45,46,70]. Különösen érzékenynek tűnnek tehát azok a régiók, melyeken a bőr vékonyabb, hőmérséklete és nedvességtartalma magasabb, továbbá a bőrfelület fedett; a vastagabb s. corneummal borított testtájak ezzel szemben hatékonyabb gátat képeznek. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a vegyületek bőrfelszínről történő felszívódását általánosan meghatározó törvényekkel [59,71].



3. ábra: A kénmustár által okozott elváltozások kialakulásának fő lépései ([42,62,66] alapján). Az ábrán az endogén molekulákkal végbemenő reakcióban részt vevő episzulfóniumion szerkezeti képlete látható.

A bőrben kialakuló klinikai kép az epidermist és a dermist alkotó sejtek masszív nekrózisa következtében fellépő aspecifikus szöveti immunválasz, valamint a bazális membrán zóna és a dermis extracelluláris fehérjéin történő hibás antigénfelismerés következménye [49,72-74]. A lokális sérülések lefolyása három-öt fázisra osztható: a kezdeti – gőzexpozíció esetén általában 1-12 óra, folyadék bőrre jutásakor többnyire 1-3 óra tartamú – tünetmentes szakaszt erythema kialakulása, majd hólyagok megjelenése, súlyosabb esetben fekélyesedés illetve tályogképződés, végül gyógyulási periódus követi [47,66]. Az első észlelhető tünet típusosan a felszívódás helyén jelentkező erythema, melyet viszkető-égő érzés, nagy mennyiségű SM bejutását követően pedig intenzív

fájdalom kísér. Alkalmanként látható ödéma is képződik. Az expozíció legjellemzőbb következménye a 2-18 óra után láthatóvá váló vékony falú hólyagok kialakulása (vezikáció), mely az epidermis és a dermis szeparációjának, illetve a szétváló rétegek között keletkező ödémás területek összefüggővé válásának az eredménye [49]. Egy 10 µg tömegű csepp teljes felszívódása hólyagképződést eredményez [75]. A nagyobb hólyagok falának rupturája nagyon gyakori; a laesio súlyos felülfertőződésének veszélye ilyenkor rendkívül nagy [66]. Gyakori a revezikáció, amely napokkal az expozíciót követően (akár a hólyagok gyógyulásának megkezdődése után) jelentkezik [18,66]. Nagyon súlyos esetben a hólyagképződés a mély dermisben játszódik le vagy teljesen elmarad; a bőr mindkét esetben teljes vertikumában roncsolódik, és az érintett területen tályog képződik [44]. A laesiok gyakori kísérője a hiper- vagy hipopigmentáció, ami a gyógyulást követően tartósan (akár permanensen) megmarad [46]. Ismételt expozíció esetén gyakran túlérzékenység alakul ki (feltehetően az SM endogén molekulákkal képzett adduktjaival szemben), amely típusosan kontakt dermatitisként jelentkezik [66].

A harcanyag transzdermális felszívódása súlyos szisztémás tüneteket is okoz, melyek közül a legfontosabbak a csontvelői haemopoesis károsodása, a szekunder obstruktív légúti stenosis, továbbá a gastrointestinalis és központi idegrendszeri tünetek [45,46,48,76]. Az azonnali irritáció elmaradása növeli a súlyos mérgezés veszélyét. Halált legtöbbször az érintett szövetekben kialakuló szekunder infekció vagy a légúti obstrukció okoz [44,46].

1.5 A kénmustár bőrbe jutásának bőrfelszíni profilaxis útján történő megakadályozásával kapcsolatos korábbi eredmények áttekintése

Már az 1930-as években felismerték, hogy az SM bőrbe jutása bőrfelszíni védőréteg kialakításával jelentősen mérsékelhető. A vizsgálatok eredményeként az Egyesült Államok hadseregében ebben az időszakban rendszeresítésre került *M-5* jelzéssel egy petróleum alapú védőkenőcs. A készítmény aktív összetevője 1,3,4,6-tetraklór-7,8-difenil-2,5-diiminoglikoluril volt, amely szobahőmérsékleten, katalitikus mennyiségű víz jelenlétében az SM-et atoxikus származékává, 2,2'-diklórdietilszulfoxiddá alakítja át. Az *M-5* mindazonáltal intenzív bőrirritációt okozott, ezért később kivonásra került a hadrendből [18].

Chilcott és mtsai számos összetétel profilaktikus hatékonyságát vizsgálták emberi bőrmintákon *in vitro*, sertésekben pedig *in vivo* körülmények között. Fedett bőrön végzett kísérletekben az SM penetrációját kevés készítmény gátolta. Leghatékonyabbnak egy

bőrvédő krém bizonyult, amely 20% HMT-t tartalmazott: ez az összetétel a harcanyag bejutási sebességét és a 72 óra alatt felszívódó mennyiséget egyaránt 80±8,5%-kal mérsékelte [77]. Sertésekben végrehajtott *in vivo* kísérletekben az *in vitro* vizsgálatok eredményei megerősítésre kerültek [52].

Egy cink-oxidot, cink-kloridot és dimetilpolisziloxánt tartalmazó, petróleum alapú gél hatékonyságát *Kenar* és mtsai igazolták: a készítmény tengerimalacokban mérsékelte az SM által okozott erythemát, az epidermis sejtes állományának nekrózisát, a bőr fekélyesedését, a gyulladásos mediátorok szöveti extracelluláris koncentrációját és az epidermisz elválását a dermisztől. Az összetétel az ödéma képződést nem befolyásolta. Érdekes eredmény, hogy a további reaktív komponensek (alfa-tokoferol vagy aluminium-szilikát) hozzáadásával előállított készítmények a fenti elváltozásokat kevésbé mérsékelték; használatuk eredményeként csak a nekrózis és az ulceratio csökkent számottevően. Ezt a szerzők nem magyarázzák, ám – tekintettel arra, hogy a készítmények mennyiségi összetételét nem közölték – nem kizárt, hogy az egyes összetevők a készítményekben különböző koncentrációban fordultak elő, és ez okozta ez eltérő szöveti választ [78].

A bőrfelszínre jutó SM által okozott elváltozások megelőzésére alkalmas helyi profilaktikumok fejlesztésével kapcsolatban az Egyesült Államok Védelmi Minisztériuma által koordinált kutatások eredményei kiemelkedőnek tekinthetők a kísérleti elvek, a módszerfejlesztés és a kifejlesztett reaktív komponensek, illetve készítmények száma és hatékonysága tekintetében egyaránt. A kifejlesztett összetételek vivőanyagait perfluorpoliéterek (PFPE) folyadék halmazállapotú elegyei és az azokban diszpergált, nanoméretű politetrafluoretilén (PTFE) szemcsék képezik [53,79-90]. A PFPE-t és PTFE-t optimálisan 50-50 % arányban tartalmazó alapösszetétel az SM csepp és a s. corneum között önmagában is hatékony gátat képez, kémiai reakció viszont nem játszódik le a készítmény komponensei és a harcanyag között [79,82,91]. A bőrre 150 µm vastagságban felvitt PFPE/PTFE szuszpenzió folyadék halmazállapotú SM bőrfelszínre történő felvitelét követően a vizsgált elváltozások mértékét 80±10%-kal mérsékelte, SM gőz ellen azonban gyakorlatilag hatástalannak bizonyult [53,91].

E probléma megoldását segítheti, hogy a PFPE/PTFE keverékek kémiai inertsége lehetőséget nyújt a kénmustárt atoxikus származékká átalakító vegyületek összetevőként történő alkalmazására [91,92]. E célból számos jelölt vegyületcsoportot vizsgáltak, melyek között makroszemcsés anyagok és nanorészecskeként előállított vegyületek egyaránt szerepeltek [91]. E vizsgálatok során – a korábbiakhoz hasonlóan – kiemelkedően

hatékonynak találták az 1,3,4,6-tetraklór-7,8-difenil-2,5-diiminoglikolurilt. Az SM átalakulása hagyományos szemcseméretű glikolurilt tartalmazó, PFPE/PTFE keverék bázisú gélben 4 perc alatt 99%-os hatékonysággal lejátszódik. A vegyület alkalmazásának hátránya, hogy a detoxifikálással párhuzamosan más folyamatok is végbemennek, ezek során pedig toxikus termékek (pl. 1,2,2'-triklórdietilszulfid, 2,2'-diklórdietilszulfon) is képződhetnek [93].

Más PFPE/PTFE alapú összetételek a hagyományos szemcseméretű HMT-t vagy származékait (különböző *N*-oktadecil-hexaminium halidokat, illetve pentafluorbenzil-hexaminium bromidot) tartalmazzák, egyéb aktív összetevők (glutation, cisztein, szulfhidril-csoportokkal szubsztituált ceramidok és koleszterin, valamint kálium-2,3-butándion-monoximát) mellett. A reaktív komponenseket makromolekulákhoz kapcsolták, hogy bőrbe történő penetrációjukat megakadályozzák [80]. A kálium-2,3-butándion-monoximátot a mérgező harcanyagok bőrfelszíni dekontaminálása céljából a kanadai haderőnél rendszeresített oldat is tartalmazza [79,92].

A reaktív összetevők jelentős csoportját képezik az SM-et nagy sebességgel detoxifikáló nanorészecskék, melyek destruktív adszorpció során hatástalanítják a harcanyagot. Az átalakulás során oxidáció vagy oxidatív elimináció játszódik le. A részecskék anyaga elemi fém, illetve fémvegyület (fémötvözet, fémoxid, polioxometallát, fémkomplex – bevonat nélkül vagy polimer bevonattal ellátva), más esetekben polimer (pl. poliszeszkvioxánok). A részecskék átlagos átmérője gyártási technológiától függően 4-20 nm, fajlagos felületük pedig elérheti a 600 m^2 g^{-1}-t [93-95].

A tervezett alkalmazás szerint a védőfilmre a fent említett aktív összetevőket tartalmazó porkeverék vihető fel, mely a filmhez tapadva újabb védőréteget képez. Erre a célra alkalmasnak találták a fémoxid nanorészecskéket, számos polioxometallátot, fémkomplexeket, valamint a poliszeszkvioxánok alkotta részecskéket, melyeket bevonattal is ellátták [81-86]. Szintén alkalmas lehet a hagyományos szemcseméretű hexadekanonsav-2-merkaptoetilamid és az oktadekanonsav-2-merkaptoetilamid [77].

Kísérletek folytak a bőrbe penetráló SM által okozott másodlagos gyulladásos folyamatok, valamint a hólyagképződés gátlására alkalmas készítmények kifejlesztésével kapcsolatban is. *Eldad* és mtsai szuperoxid-dizmutázok (SOD) hatékonyságát igazolták helyi és szisztémás profilaktikumként, tengerimalac modellen. A réz-cink-SOD és a mangán-SOD előkezelés formájában, intradermálisan alkalmazva hatékonyan mérsékelte az elváltozások kialakulását, és a gyógyulási folyamathoz is jelentősen hozzájárult. A

sérülés lefolyásában azonban nem tapasztaltak változást, ha a szuperoxid-dizmutázokat 3 órával az expozíciót követően juttatták be [96].

Más megbetegedések kezelésére használt gyógyszermolekulák, illetve az SM expozíció következtében fellépő biokémiai folyamatokba beavatkozó vegyületek hatékonyságát is vizsgálták. A gyulladásos választ egyes kapszaicin-analógok (olvanil, retroolvanil, oktilhomovanillamid), gyulladáscsökkentők (indometacin, hidrokortizon és *6α*-metilprednizolon), a 2,3-dimerkaptopropanol, továbbá a klórpromazin és a nikotinsavamid jelentősen mérsékelték 70% etilalkoholos/vizes oldatban történő profilaktikus alkalmazás eredményeként [97].

1.6 A kénmustár bőrbe jutásának vizsgálatára kifejlesztett modellek

Az SM bőrfelszínről történő felszívódásának vizsgálatára izolált (*in vitro*, *ex vivo*) és *in vivo* kísérleti modellek kerültek kifejlesztésre. A vegyület rendkívül nagy toxicitása miatt *in vivo* humán kísérletek végrehajtása etikailag elfogadhatatlan, *in vitro* vizsgálatokban azonban – az orvosetikai és emberi jogi szempontok figyelembe vétele mellett – emberi bőr használata elfogadott az SM-mel kapcsolatos toxikológiai kísérletekben. *Chilcott* és mtsai *Franz*-típusú diffúziós cellában vizsgálták az SM bejutását emberi, illetve sertés bőr felhasználásával. A penetráció karakterizálására a harcanyag fluxusa és a penetráló mennyiség figyelembe vételével, ^{35}S-t tartalmazó SM felvitelét követően a bőrfelszín, a bőr és a receptorfolyadék radioaktivitásának mérése alapján került sor [64,77,98]. A diffúziós cella modell fő előnye, hogy a vizsgálatok nagy mintaszámmal, jól reprodukálható körülmények között hajthatók végre [99]. A vaszkularizáció és az intradermális metabolizmust végző enzimek hiányában mindamellett a bőr passzív anyagként viselkedik. Ez, illetve a receptorfolyadék szerves oldószer tartalma az egyes rétegek közötti megoszlási viszonyokat, így a vegyület penetrációjának és megoszlásának jellemzőit sajátosan megváltoztatja [100].

Az izolált kísérleti rendszerek másik típusát a *Riviere*-féle izolált, perfundált sertés bőr lebeny (IPPSF) modell képezi. Ez az *ex vivo* vizsgálati rendszer az élettani funkciók többségét megtartó, vérkeringéssel és metabolikus aktivitással rendelkező bőr használatát teszi lehetővé. Alkalmas a transzdermális felszívódás és az intradermális megoszlás egyidejű, közvetlen jellemzésére, továbbá a kémiai detektálás mellett a szöveti válasz vizsgálatának lehetőségét is nyújtja [101,102]. A szerzők radioaktivitás mérésén alapuló toxikokinetikai rekeszmodellt dolgoztak ki ^{14}C izotóppal jelölt SM bőrfelszínre történő

felvitelét követően [60]. A leírt rekeszmodell igen komplex, azonban kevés adatra épül. A mért radioaktivitás forrásául szolgáló vegyülete(ke)t nem azonosították. Az IPPSF mások által történő adaptálására a harcanyagok bőrfelszínről történő felszívódásával kapcsolatban nincs példa.

Az SM bőrfelszínről történő felszívódásának és a felszívódás következményeinek vizsgálatához kifejlesztett *in vivo* rendszerek egyik típusát az élettani válasz biológiai és fizikai módszerekkel történő vizsgálatán alapuló dózis-válasz modellek képezik. Ezek fejlesztése során azon emlős faj azonosítására törekedtek, amelynek bőre – legalábbis bizonyos életkorban – az emberi bőr szerkezetével és az SM penetrációjára adott reakciójával a legközelibb egyezést mutatja [50]. A vizsgált fajok közül legalkalmasabbnak a sertést [44,49,50] és a csupasz tengerimalacot [103,104] találták. Számos relatív összehasonlítást lehetővé tevő sertés szöveti válasz modell ismert [91,105-109]. *Brown* és mtsai az SM által okozott szöveti elváltozásokat és az exponált terület intradermális véráramlását vizsgálták [108]. *Chilcott* és mtsai mennyiségi összefüggést találtak az SM által okozott laesio – mikroszkópos szövettani vizsgálattal meghatározott – súlyossága, valamint az erythema, a bőrfelszínről időegység alatt elpárolgó vízmennyiség és a hegesedés mértéke között.

Csupasz tengerimalacokban az SM gőz az expozíciós idővel kvalitatív összefüggést mutató heterofil granulocita infiltrációt és celluláris nekrózist váltott ki [68]. Az expozíció időtartama és a fellépő mikrovezikáció mértéke, valamint a *Nikolsky*-tünet intenzitása között azonban mennyiségi dózis-válasz összefüggés volt [103]. Több szerző használta ezt a modellt bőrvédő készítmények hatékonyságának vizsgálatára [78,110,111].

A penetráló SM mennyiségével összefüggő szöveti paraméterek azonosítására – megfelelő vizsgálati végpont kiválasztásával – olyan fajokat is alkalmasnak találtak, melyek bőrének élettani viselkedése jelentősebben különbözik az emberi bőrétől. *Zlotogorski* és mtsai nyulakon végzett kísérleteikben 25-150 $\mu g\ cm^{-2}$ dózistartományban lineáris korrelációt találtak a fülre felvitt mennyiség és a keletkező ödéma mértéke között [112]. Az Egyesült Államok hadseregénél használt vizsgálati rendszerben a nyulak bőrén provokált laesio kiterjedése alapján ítélik meg bőrvédő készítmények folyadék halmazállapotú SM elleni hatékonyságát (az SM gőzzel végzett vizsgálatokhoz a csupasz tengerimalac modellt alkalmazzák) [53,91]. Reaktív bőrvédő vegyületek hatékonyságának elsődleges *in vivo* vizsgálata céljából került kifejlesztésre az egérfül vezikáns modell, melyben az ödéma, a mikrovezikáció és az epidermis sejtjeinek nekrózisát mérték [97,113,114].

A specifikus kiértékelési szempontok révén kiemelkedő jelentőségűek azok az *in vivo* modellek, melyeknél az ítéletalkotás a penetráló harcanyag vagy a bejutása eredményeként megjelenő illetve képződő vegyület(ek) mennyiségének mérésén alapul. *Graham* és mtsai SM sertés bőrére történő felvitelét követően szérum klinikai laboratóriumi paraméterek értékeit, illetve a harcanyag hidrolízis termékeként a vesén át több formában ürülő tiodiglikol (TDG) vizelet-koncentrációját követték 7 napon át. A klinikai laboratóriumi értékek a teljes kísérleti időszakban a normál tartományokon belül maradtak. A TDG koncentráció – amely az SM felvitele előtt kimutatási határ alatt volt – azonban a vizeletben 6-8 óra alatt maximumot ért el, majd további 7 napig mérhető volt [115].

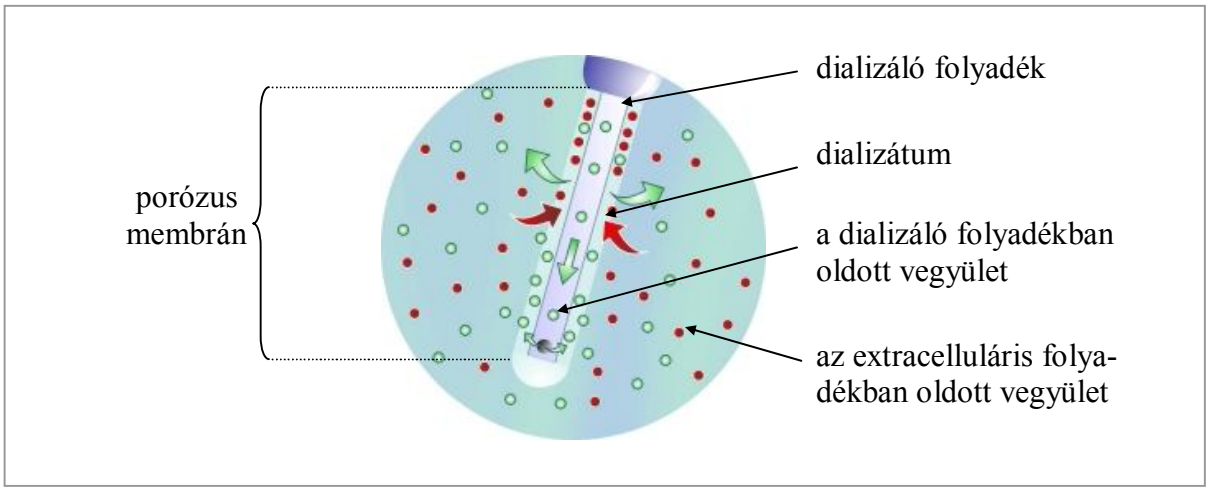
Patkányokban is több modell kifejlesztésre került, melyekben az SM vizelet- és székletürülési kinetikáját, szisztémás metabolizmusát vizsgálták [61,65]. *Kulkarni* és mtsai több, szisztémás profilaxis céljából vizsgált vegyület hatékonyságának LD_{50} alapján történő meghatározását patkányokban végezték [116].

1.7 A mikrodialízis helye a bőrben történő mintavétel módszerei között

A vegyületek bőrfelszínről történő felszívódásának vizsgálatára használt kémiai detektáláson alapuló módszerek csoportosíthatók aszerint, hogy a vizsgálatot radioaktív izotóppal jelölt vagy „hideg” (radioaktív izotópot nem tartalmazó) vegyülettel végezzük. Jelölt molekulák kimutatására az expozíciót követően eltávolított szövetekben szcintillációs számláló vagy autoradiográfiás vizsgálat segítségével nyílik lehetőség [60,61,117]. Az izotópos vizsgálatok előnye, hogy a radioaktivitás más szervekben, a keringésben és az exkrétumokban történő mérésével a felszívódó vegyület sorsáról átfogó, kvalitatív kép nyerhető. Ezek a kimutatási eljárások mindazonáltal nem nyújtanak információt a sugárzást kibocsátó molekula természetéről, így az ágens szabad és fixált frakcióinak azonosításához, valamint az anyavegyület és a képződő metabolitok mennyiségének méréséhez további eljárásokra van szükség. Jelöletlen vegyületek felszívódásának vizsgálatakor kedvelt módszer az analit-koncentráció biopsziával vett mintákban történő mérése. E módszerrel az adott felviteli területen egyetlen mintához jutunk, így kinetikai információ nem nyerhető [106,118]. A másik gyakran használt technika a vákuummal vagy kantariddal provokált hólyagképződés, mely során azok bennékének analittartalmát határozzák meg [119]. Ezt a modellt – a hólyagképzés technikájával összefüggésben – leginkább szisztémás bevitelt követő vizsgálatokban

találták hasznosnak, ám perkután kísérletek során történő alkalmazására is van példa [120]. Emellett ma is gyakori eljárás, hogy vér- vagy vizeletmintákban mért koncentrációk alapján jellemzik egy ágens transzdermális felszívódását, ez azonban nem nyújt információt annak bőrön belüli sorsáról [121].

A mikrodialízis vízben jól oldódó vegyületek vizsgálatára kifejlesztett mintavételi technika, amely alkalmas azok koncentrációjának az extracelluláris térben történő nyomon követésére [122,123]. A mintavétel egy 200-500 µm külső átmérőjű kanül segítségével történik. A kanül két, koncentrikusan összeépített csőből, valamint az azok végéhez illesztett féligáteresztő membránból áll. A dialízis során a katéterben sóoldat áramlik [122]. A membrán pórusméretétől függően adott részecskeméret-tartományba eső anyagok a membrán falán keresztül a katéterbe diffundálnak, és az elfolyó oldatban (melyet dializátumnak nevezünk) kimutathatók (*4. ábra*).

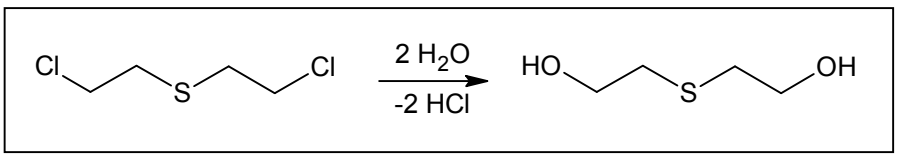


4. ábra. A mikrodialízissel történő mintavétel elve. A katétert két, koncentrikusan elhelyezkedő cső alkotja: a dializáló folyadék a belső csövön keresztül érkezik, és a külső csőben áramlik a mintagyűjtő egységhez. Az analit a membrán porózus falán keresztül, diffúzió révén jut a külső csőbe. (A *CMA Microdialysis Ab* engedélyével [124].)

A mikrodialízis technika kedvező vizsgálati módszer az extracelluláris tér vizsgálatához. Inert anyaga, kis átmérője és a dializáló oldat lassú áramlása miatt a katéter jelenléte a vizsgált szövetben minimális válaszreakciót indukál: a minták gyűjtése patkányok bőrében legalább 24 órán át folytatható a szövet fiziológiás állapotának jelentős megváltozása nélkül [125]. A módszer segítségével a felviteli pont környezetében akár néhány perces időfelbontással sokpontos adatsorok nyerhetők. A minták sejteket és – a membrán pórusméretének megfelelő megválasztása esetén – makromolekulákat nem tartalmaznak, így mérésük közvetlenül, vagy rövid feldolgozást követően lehetővé válik [126-128]. Összehasonlító vizsgálatokban a mikrodialízissel és más módszerekkel nyert

minták analittartalmát több szervben, így a bőrben is nagyon hasonlónak találták [129-133]. Egyes vegyületek bőrfelszínről történő felszívódásának vizsgálata során pedig a mikrodialízis akkor is alkalmasnak bizonyult, amikor – az analit tulajdonságaiból eredően – más, helyi mintavételi technika nem nyújtott megfelelő eredményt [134].

A mikrodialízis módszer farmako- és toxikokinetikai kísérletek elfogadott eszköze, emellett alkalmazását a humán neurointenzív ellátás eszközeként is alkalmazzák [135,136]. Segítségével elsősorban gyógyszermolekulák [137], emellett fémek [128,138], oldószerek [139,140], ipari vegyületek [127,141] és mérgek [142] szervezeten belüli sorsát tanulmányozták. A módszer mérgező harcanyagokkal kapcsolatos vizsgálatokban történő használatát korábban nem publikálták.



5. ábra: A kénmustár tiodiglikollá történő átalakulásának sztöchiometriai egyenlete.

2. VIZSGÁLATI ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Vegyszerek, gázok és készítmények

A mikrodialízis kísérleteket 26 °C-on temperált helyiségben végeztem, melynek hőmérsékletét a használt készítmények, oldatok átvették a vizsgálatok megkezdése előtt.

A kénmustárt (90% tisztaságú) az MH Vegyi Anyag Ellátó Központ bocsátotta rendelkezésre. Tisztaságát 90 naponként gázkromatográfiás vizsgálattal ellenőriztem; a kémiai bomlás mértéke összességében 1% alatt volt. A tiodiglikolt (2,2'-thiodiethanol >99%), a tiodipropanolt (3,3'-thiodipropanol 98%; TDP), a heptaflurovajsavanhidridet (heptafluorobutyric anhydride derivatization grade; HFBA) és a trietilamint (triethylamine puriss.) a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest) szállította. A benzol (benzene SupraSolv®), a metilalkohol (methanol SupraSolv®), a desztillált víz (LichroSolv®) és a 25% vizes ammónia oldat (ammonia solution 25% for analysis) a Merck Kft. (Budapest) terméke volt. A 100% etilalkoholt (ethanol absolute extra pure) a Reanal Rt. (Budapest) forgalmazta.

A kromatográfiás mérésekhez 99,999 % tisztaságú gázokat – nitrogént, hidrogént és szintetikus levegőt – használtam (Messer Hungarogáz Kft., Budapest).

Az *in vivo* mikrodialízisek során dializáló oldatként Ringer-oldatot (Humán Rt., Gödöllő) alkalmaztam. A HP01 kódot egy nanorészecskéket és antioxidánsokat tartalmazó bőrvédő készítmény, a HP02 jelölést a Fomblin Y45® néven, ipari lubrikánsként forgalmazott összetétel (Solvay Solexis S.p.A., Bollate) kapta; HP03 kóddal a Pasta Zinci Oxydatit (FoNo VI) jelöltem (Naturland Hungary Kft., Budapest). Az altatáshoz CP-Ketamin 10% inj. ad us. vet. injekciót (115,3 mg ml^{-1} ketamin-hidroklorid; CP-Pharma HmbH, Burgdorf) és Xylavet 2% inj. ad us. vet. injekciót (23,3 mg ml^{-1} xylazin-hidroklorid; CEVA-Phylaxia Vet. Biol. Co. Kft, Budapest) használtam.

2.2 Eszközök

A méréseket pulzáló lángfotometriás detektorral (PFPD) felszerelt Varian CP-3800 gázkromatográfon végeztem. A mintákat Varian CP-8400 Autosampler mintaadagoló injektálta (CP-Analitika Kft., Budapest). Az elválasztás CP-Sil 8 CB low bleed típusú kapilláris oszlopon (kolonnahossz: 30 m, kolonnaátmérő: 0,25 mm, filmvastagság: 0,25 µm) történt (CP-Analitika Kft., Budapest). A detektor R647 típusú

fotonsokszorozóval működött. Az adatokat VarianStar GC Workstation v6.20 alkalmazás rögzítette.

A mikrodialízis rendszer egy CMA-102 pumpából, CMA-20 katéterből (membránhossz: 1 cm, vágóérték: 20 kDa) és egy CMA-142 frakciógyűjtő egységből állt (CMA Microdialysis Ab, Solna). A katéter végeihez 15 cm hosszú, 120 µm belső átmérőjű műanyag csövet csatlakoztattam a gyártó által forgalmazott adapterek segítségével. A dializáló oldatot CMA 1,0 ml-es mikrofecskendőből továbbítottam. A dializátumokat 300 µl térfogatú polipropilén edényekbe gyűjtöttem (CMA Microdialysis Ab, Solna).

Az SM felviteléhez Hamilton™ 5,0 µl térfogatú mikrofecskendőt használtam (CP Analitika Kft, Budapest). A mikrofecskendő térfogat-leadásának reprodukálhatóságát 1, 2, 3 és 5 µl térfogatokra a kísérletek megkezdése előtt tömegméréssel megvizsgáltam; azok relatív szórása minden térfogat esetében 1% alatt volt (n=5). A cseppet az előkísérletek során üveglappal, a dózis-válasz összefüggések, valamint a készítmények hatékonyságának meghatározásakor szilikon/PTFE szeptummal ellátott műanyag kupakkal (r=4,5 mm; h=4 mm; Sigma-Aldrich Kft., Budapest) fedtem. A kupakot Loctite Palma SuperBond univerzális ragasztóval (Henkel Hungary Kft., Budapest) rögzítettem.

A mérési eredmények feldolgozása, a kalkulált paraméterek kiszámítása és a statisztikai vizsgálatok elvégzése Microsoft® Excel 2002 alkalmazással történt (Microsoft Hungary Kft., Budapest), saját készítésű adattáblák felhasználásával.

2.3 Módszerek

2.3.1 Gázkromatográfiás mérések

A tiodiglikol kimutatása heptafluorvajsav-anhidriddel képzett észtere formájában történt. A mennyiségi analízisek során kísérő standard módszert alkalmaztunk [143]. Kísérő standard vegyületként 3,3'-ditiodipropanolt használtunk, melynek szintén heptafluorvajsav-diészterét detektáltuk (6. *ábra*).

A mérési módszer kialakítását követően használt paramétereket a **IV. táblázat** mutatja. Minden 10. minta lemérése után oldószer injektálásával kifűtöttem a rendszert, hogy az interferáló komponensek jelenléte kizárható legyen. A jel-zaj arányt (SNR) a tiodiglikol-heptafluorvajsav diészter (TDG-HFBA) csúcs magasságának és a csúcs megjelenését megelőző 30 sec intervallumban kapott átlagos rms-zaj amplitudójának

hányadosaként számítottam ki. A zajamplitudót az adatrögzítő szoftver kalkulálta. A kimutatási határ (LOD) kiszámításához az

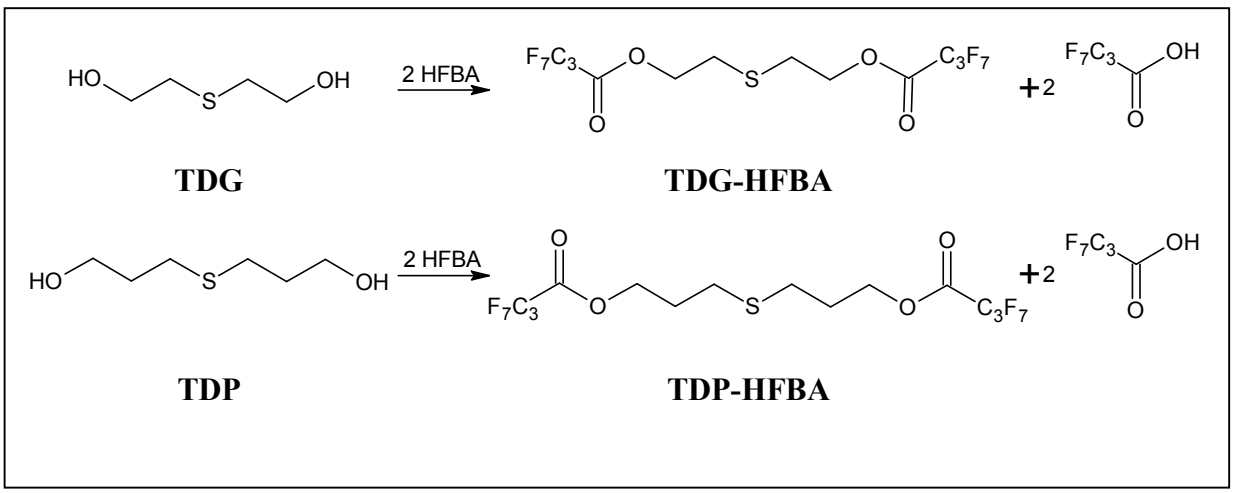
$$LOD = 3{,}3 \times SNR \tag{1}$$

képletet (LOD: a minőségi kimutatás alsó koncentrációhatára), a mennyiségi kimutatási határ (LOQ) megállapításához az alábbi összefüggést használtam:

$$LOQ = 10 \times SNR \tag{2}$$

A pulzáló lángfotometriás detektorral végzett meghatározásoknak a detektor működési elvéből adódó sajátossága, hogy az x és az y változó között másodfokú polinommal leírható összefüggés áll fenn. Az összefüggés lineáris tagjának együtthatója tipikusan elhanyagolhatóan kicsi, ezért ha a konstans tag nem túl nagy, szokás a kapott mérési adatok négyzetgyökét ábrázolni, és ezekre egyenes illesztésével végezni a kalibrációt, valamint az analit ismeretlen mintákban talált koncentrációjának kiszámítását [144]. A mennyiségi analízis alapjául a csúcsmagasság négyzetgyökét vettem. A kimutatási határok között így az alábbi kapcsolat volt érvényes:

$$LOQ = 1{,}82 \times LOD \tag{3}$$



6. ábra: A tiodiglikol és a tiodipropanol heptafluorvajsav-anhidriddel lejátszódó reakciója.

IV. táblázat: A TDG gázkromatográfiás kimutatása során használt beállítások.

injektált mintatérfogat	1,0 µl
injektor hőmérséklet	250 °C
injektálási mód	splitless
injektor öblítése (split time)	2 min
fűtési program	60 °C/2,0 min; → 10 °C/min 175 °C-ig; → 40 °C/min 250 °C-ig; 250 °C/1,0 min
detektor hőmérséklet	200 °C
színszűrő	394 nm
fotonsokszorozó feszültség	490 V
jelrögzítés kezdete (gate delay)	6 msec
jelrögzítés időtartama (gate width)	20 msec
detektor gázok áramlási sebessége	Air1: 17,0 ml min^{-1}; Air2:11,0 ml min^{-1}; H_2: 10,0 ml min^{-1}

2.3.2 Oldatok és minták méréshez történő előkészítése

Törzsoldatok. A benzolos oldatok előállításához 0,05 mmol ml^{-1} trietilamint tartalmazó benzolban, a mérési módszer kifejlesztésekor használt mikrodializátumok előkészítéséhez oldott TDG-t tartalmazó törzsoldatokat használtam, melyeket tömeg szerint mértem be és legfeljebb 10 napig tároltam. A kísérő standard oldatokat TDP 0,05 mmol ml^{-1} trietilamint metilalkoholban tartalmazó benzolos törzsoldatából, hígítással állítottam elő. A törzsoldatok bemérése tömeg szerint történt.

Kalibráló és benzolos oldatok bemérése. A méréseket 0,41 – 3,69 nmol ml^{-1} TDG koncentráció-tartományban végeztem. A műszer kalibrációját a mintasorozatok lemérése előtt, 0,41; 0,82; 1,23; 1,64; 2,05; 2,87 és 3,69 nmol ml^{-1} (50,0; 100,0; 150,1; 200,1; 250,1; 350,1 és 450,2 ng ml^{-1}) TDG-t tartalmazó oldatokkal hajtottam végre. A nemvizes standard oldatok 0,63; 2,10 és 3,19 nmol ml^{-1} (76,6; 255,6; 389,4 ng ml^{-1}) TDG-t és 1,0 nmol ml^{-1} (150 nmol ml^{-1}) TDP-t tartalmaztak. Oldószerük 0,05 mmol ml^{-1} trietilamint tartalmazó benzol volt.

Benzolos oldatok előkészítése. 100 µl TDG-oldatot és ugyanakkora térfogatú, 1,00 nmol ml^{-1} töménységű TDP-oldatot összemértem, és az elegyhez 10 µl HFBA-t adtam. Rázatás (10 Hz, 1 min), majd centrifugálással (3000 rpm, 1 min) történő ülepítés után az elegyet 1 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd 500 µl 5% ammónia oldatot mértem hozzá. Az edény tartalmát rázattam (40 Hz, 5 min), ülepítettem (3000 rpm, 1 min), végül a szerves fázist 100 µl térfogatú mintaszűkítőbe pipettáztam.

A mérési módszer kifejlesztésekor használt mikrodializátumok előkészítése. A dializátumokat SM, védőkészítmények, illetve TDG bőrre történő felvitele *nélkül* folytatott subcutan mintavétellel nyertem, és a gázkromatográfiás elválasztás optimalizálása, valamint a mérési módszer precizitásának vizsgálata során használtam. 10 µl mikrodializátumot 10 µl TDG metilalkoholos oldattal (c_{TDG}=1,65 nmol ml^{-1}), 100 µl 1,0 nmol ml^{-1} töménységű TDP-oldattal és 350 µl abs. etilalkohollal elegyítettem. Az elegyet nitrogén gázáram alatt szárazra pároltam (40 °C; 0,1 bar). A maradékhoz 0,05 mmol ml^{-1} trietilamint tartalmazó benzolt, majd 10 µl HFBA-t adtam. Rázatás (10 Hz, 1 min) után az elegyet 1 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd 500 µl 5% ammónia oldatot mértem hozzá. Az edény tartalmát rázattam (40 Hz, 5 min), ezt követően a szerves fázist 100 µl térfogatú üvegbetétbe pipettáztam.

Az SM, illetve TDG bőrre történő felvitelével végzett kísérletekben nyert mikrodializátumok előkészítése. 10 µl mikrodializátumot 100 µl 1,0 nmol ml^{-1} töménységű TDP-oldattal és 350 µl abs. etilalkohollal elegyítettem. Az elegyet nitrogén gázáram alatt szárazra pároltam (40 °C; 0,1 bar). A maradékhoz 0,05 mmol ml^{-1} trietilamint tartalmazó benzolt, majd 10 µl HFBA-t adtam. Rázatás (10 Hz, 1 min) után az elegyet 1 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd 500 µl 5% ammónia oldatot mértem hozzá. Az edény tartalmát rázattam (40 Hz, 5 min), ezt követően a szerves fázist 100 µl térfogatú üvegbetétbe pipettáztam.

2.3.3 Mikrodialízis

A mikrodialízis kísérletek programjait a 7.*a-e. ábrák* mutatják. A csövek átmosását minden esetben 10 µl min^{-1}, az *in vivo* kísérletek során az ekvilibrációt 1,0 µl min^{-1} áramlási sebesség mellett végeztem. A frakciócsere időzítése és végrehajtása automatikusan történt. Minden katéter egy állatkísérletben került felhasználásra; tárolásuk a felbontást követően desztillált vízben történt. A kísérletek során használt dializáló oldatok az **V. táblázatban** láthatók.

V. táblázat: A vizsgálatok során használt dializáló oldatok.

Kísérlettípus	Dializáló oldat
in vitro vizsgálatok	desztillált víz
in vivo előkísérletek	Ringer-oldat*
in vivo retrodialízis kísérletek	33 nmol ml^{-1} TDG-t tartalmazó Ringer-oldat
in vivo kinyerési kísérletek	Ringer-oldat

*Ringer oldat: $[Na^+]$=147,0 µmol ml^{-1}, $[K^+]$=4,0 µmol ml^{-1}, $[Ca^{2+}]$=2,2 µmol ml^{-1}, $[Cl^-]$=156,0 µmol ml^{-1}

Az áramlási sebesség és a TDG kinyerési hányados összefüggését 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0; 10 és 20 µl min^{-1} áramlási sebesség mellett, *in vitro* környezetben vizsgáltam. A dialízist 82,0 nmol ml^{-1} TDG-t tartalmazó, szobahőmérsékletű oldatban hajtottam végre az oldat folyamatos kevertetésével. Mindegyik áramlási sebesség alkalmazásakor 5-5 frakciót gyűjtöttem, melyek közül a 3-5. minta TDG koncentrációját vettem figyelembe a kinyerési hányados kiszámításakor (*7.a. ábra*). A TDG kinyerési hányadosát az alábbi összefüggés alapján kaptam:

$$RR\% = C_{dial}/C_{oldat} \times 100 \qquad (4)$$

ahol C_{dial} a dializátumban, C_{oldat} a dializált oldatban mért TDG koncentráció.

(a)

esemény	mosás	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés
áramlási sebesség (µl min^{-1})	10	20	10	7,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0
frakciógyűjtés időtartama	4 min	5 x 2 min	5 x 4 min	5 x 5 min	5 x 10 min	5 x 10 min	5 x 15 min	5 x 20 min	5 x 30 min

idő

(b)

esemény	mosás	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés	mintagyűjtés
áramlási sebesség (µl min^{-1})	10	2,0				
frakciógyűjtés időtartama	4 min	15 min	15 min	15 min	15 min	15 min

idő

(c)

esemény	mosás	ekvilibráció	vak	mintagyűjtés	
áramlási sebesség (µl min^{-1})	10	1,0	2,0		
frakciógyűjtés időtartama	4 min	56 min	20 min	30 min	12 x 30 min

5,0 µl SM felvitele ↑ SM letörlése ↑

idő

7.ábra: A kísérletek során használt mikrodialízis beállítások. (a) Az áramlási sebesség és a TDG kinyerési hányadosa közti összefüggés *in vitro* vizsgálata; (b) *in vitro* elő- és utóvizsgálatok; (c) *in vivo* előkísérletek.

(d)

esemény	mosás	mintagyűjtés	kimosás	mintagyűjtés	kimosás	mintagyűjtés
áramlási sebesség (µl min^{-1})	10	2,0				
frakciógyűjtés időtartama	4 min	20 min	60 min	20 min	60 min	20 min

idő

(e)

esemény	mosás	ekvilibráció	vak	mintagyűjtés
áramlási sebesség (µl min^{-1})	10	1,0	2,0	
frakciógyűjtés időtartama	4 min	56 min	20 min	18 x 20 min

SM felvitele

SM letörlése

idő

7.ábra (folyt.): A kísérletek során használt mikrodialízis beállítások. (d) *In vivo* retrodialízis vizsgálatok; (e) *in vivo* kinyerési vizsgálatok.

A mikrodialízis rendszer megfelelő működését mindegyik kísérlet során ellenőriztem. Ennek részeként az edények tömegét minden kísérlet előtt és után 0,1 mg pontossággal lemértem. A kísérletet eredménytelennek minősítettem azokban az esetekben, amikor bármelyik edény visszamért tömege több mint 5%-kal elmaradt a várt tömegtől (a dializátum sűrűségét 1,000 g ml^{-1}-nek tekintettem).

Előfordul, hogy a katéter falát képező membrán az élő szövetben eltömődik; ezt az extracelluláris térben jelen lévő sejttörmelék és fehérjék okozzák [145]. Az eltömődés mértékét az állatkísérletek előtt és után végrehajtott *in vitro* dialízisek segítségével vizsgáltam. Ezekben a vizsgálatokban 82,0 nmol ml^{-1} TDG-t tartalmazó vizes oldatot dializáltam 2,0 µl min^{-1} áramlási sebesség mellett (*7.b ábra*). A vizsgálatok során 30 µl térfogatú frakciókat gyűjtöttem. A kinyerési hányadost a (4) egyenlet segítségével számítottam ki. A katéter felhasználásától eltekintettem, ha az elővizsgálat során kapott átlagos kinyerési hányados szignifikánsan eltért 55,50±5,49 %-tól. Az *in vivo* kísérletet eredménytelennek tekintettem azokban az esetekben, amikor az utóvizsgálat során kapott kinyerési hányados több mint 5%-kal elmaradt az elővizsgálat során kapott értéktől.

Az *in vitro*, illetve *in vivo* körülmények között kapott kinyerési hányados sokszor jelentősen eltér, ezért a kalkulált subcutan koncentráció csak *in vivo* kalibráció során meghatározott kinyerési hányados alapján tekinthető reálisnak [145]. Az *in vivo* kalibrációt retrodialízis módszerrel végeztem, 33 nmol ml^{-1} TDG-t tartalmazó Ringer-oldat dializáló oldatként történő alkalmazásával, 2,0 µl min^{-1} áramlási sebesség mellett. Minden kísérlet során (melyeket A-E betűkkel jelöltem) 3 leadási vizsgálatot végeztem, melyek számtani középértékét vettem. A vizsgálatok során 40 µl térfogatú frakciókat gyűjtöttem. A kinyerési hányadosokat az alábbi egyenlet segítségével számítottam ki:

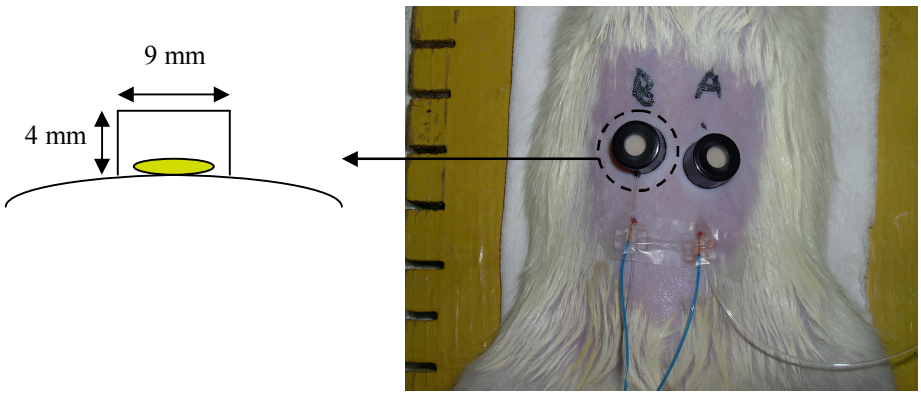
$$RR\% = (1 - C_{dial}/C_{perf}) \times 100 \qquad (5)$$

Az átlagos kinyerési hányadost a kísérletek során kapott RR% értékek számtani közép-értékeként kaptam. A tiodiglikolra vonatkozó átlagos kinyerési hányados 54,1±7,2 % volt.

2.3.4 Állatkísérletek

A kísérleteket 304±16 g testtömegű hím Wistar albinó patkányokon végeztem (Toxi-Coop Kft., Budapest). Az állatokat rácsos fémtetővel ellátott dobozban (30 x 50 x 40 cm), hármasával helyeztem el 12 órás ciklusokban váltakozó megvilágítás mellett, 26 °C-ra

temperált, 70% relatív páratartalmú helyiségben. A felhasználás előtt 1 hétig minden állatot megfigyelés alatt tartottam. Táplálásuk szilárd táppal és vízzel *ad libitum* történt. 2 órával a kísérlet megkezdése előtt a szilárd tápot megvontam.



8. ábra. Kísérlet közben készült fotó. Minden állat hasán két felviteli helyen hajtottam végre a vizsgálatot. A kénmustár cseppet a baloldali rajzon színes korong jelöli.

A kísérletek elején, testsúlymérést követően az állatot 50 mg ttkg^{-1} ketamint és 10 mg ttkg^{-1} xylazint tartalmazó intramuscularis injekcióval altattam, majd a hasi bőrről a szőrt kb. 6 x 4 cm területen elektromos borotvával eltávolítottam. A hasi régió két pontján – melyek egymástól 2 cm távolságra lettek kijelölve – párhuzamos kísérleteket végeztem (*8. ábra*). A bőrbe a felszínnel párhuzamosan, 4 cm hosszan 18G méretű steril injekciós tűt vezettem, majd kihúztam és a helyére hasított műanyag csővel felszerelt 22G átmérőjű tűt szúrtam. A 22G-s tűt kihúztam, és a műanyag cső belsejébe egy katétert vezettem. A műanyag csövet ezt követően hasítással eltávolítottam, és a katétert átlátszó, nem irritáló ragasztószalaggal rögzítettem. A mikrodialízis rendszert ezután 6 percig 10 µl min^{-1} áramlási sebességgel mostam, majd az állatot a dializáló oldat lassú áramoltatása (1,0 µl min^{-1}) mellett 54 percig nyugalomban hagytam. Az ekvilibrációs szakasz végén az áramlás sebességét 2,0 µl min^{-1}-re növeltem, és megkezdtem a frakciógyűjtést (*7.c, 7.e ábra*). Az SM felvitele után a mintavételt 360 percig folytattam. Az altatást 50 mg ttkg^{-1} ketamint és 10 mg ttkg^{-1} xylazin együttes, 120 percenként történő im. adásával tartottam fenn. A kísérlet végén a felviteli területet letöröltem, majd 0,5% nátrium-hipoklorit oldattal alaposan mostam.

A harcanyag felvitelét a *2.2* fejezetben leírt módon hajtottam végre (ld. 24. o.).

2.3.5 Profilaktikus készítmények felvitele a bőrre

A HP01 készítményt vastagabb filmrétegként, 35 perccel az SM applikációja előtt vittem a bőrre; feleslegét közvetlenül az SM feljutattása előtt spatulával óvatosan, nyomóerő kifejtése nélkül eltávolítottam. A HP02 anyagot 15 perccel az SM felvitele előtt alkalmaztam, és a bőrről csak a vizsgálat végén távolítottam el. A HP03 készítmény egy részletét 30 perccel az SM-expozíciót megelőzően vékony filmrétegként vittem fel, és spatulával minimális nyomóerőt alkalmazva azt a bőrbe masszíroztam. Ezt 5 percenként megismételtem, összesen még öt alkalommal. A készítmény feleslegét közvetlenül az SM applikációja előtt spatulával, nyomóerő kifejtése nélkül eltávolítottam.

2.3.6 Mikroszkópos szövettani vizsgálatok[1]

Szövettani minták vételére 24 órával az SM felvitelét követően került sor. A felviteli pontok körüli, kb. 1,5 x 1,5 cm területen a teljes bőrt a fasciával együtt kimetszettem és 8% semleges pufferolt formalinba helyeztem. A metszetek paraffinba történő ágyazását követően preparálásuk hematoxilin-eozin festéssel történt [146].

2.3.7 Eredmények kiértékelése

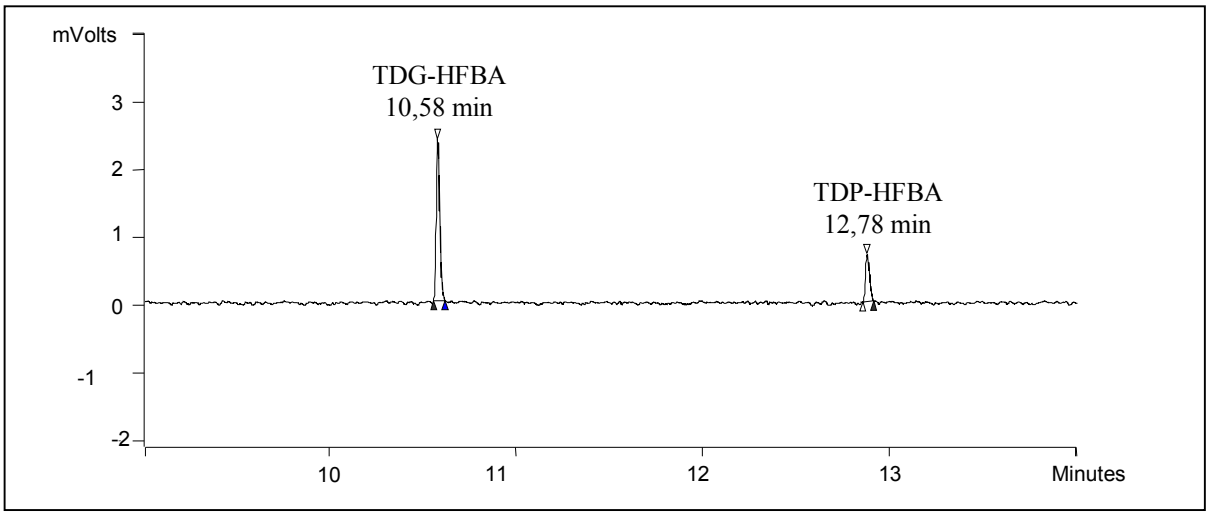
A subcutan TDG koncentrációt az *in vivo* kinyerési hányados figyelembe vételével számítottam ki. A koncentráció-értékeket az adott mintavételi intervallum középidejével szemben ábrázoltam. A görbe alatti területeket a téglalap módszerrel határoztam meg. A toxikokinetikai paraméterek összehasonlítását Kruskal-Wallis nemparaméteres ANOVA, valamint az eloszlás-független többszörös összehasonlítás módszerével [147] végeztem el. Az egyenesek illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét alkalmaztam. A TDG kalibrációs egyenes tengelymetszetének 0-tól való eltérését és az *in vitro* elővizsgálatok kiértékelését egymintás Student *t*-próbával végeztem. A statisztikailag szignifikáns eltérések vizsgálata során 95%-os kétoldalú konfidencia-intervallumot vettem figyelembe.

[1] A szövettani vizsgálatokat az MH Központi Honvédkórház Patológiai Osztályával együttműködésben végeztük.

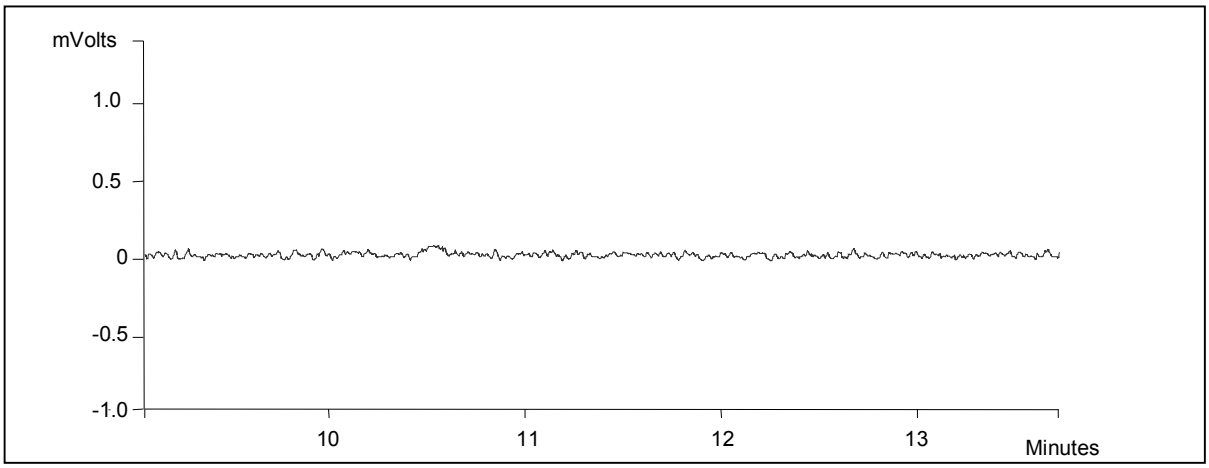
3. EREDMÉNYEK

3.1 A tiodiglikol mennyiségi meghatározása mikrodializátumokban

A TDG-HFBA és a tiodipropanol-heptafluorvajsav diészter (TDP-HFBA) gázkromatográfiás csúcsa a *9.a ábrán* látható. A vegyületek az alkalmazott körülmények között megfelelően kromatografálódtak, detektálásuk alapvonalig történő elválasztásukat követően történt. A TDG-HFBA retenciós ideje 10,58±0,02 perc, a TDP-HFBA retenciós ideje 12,78±0,02 perc volt.



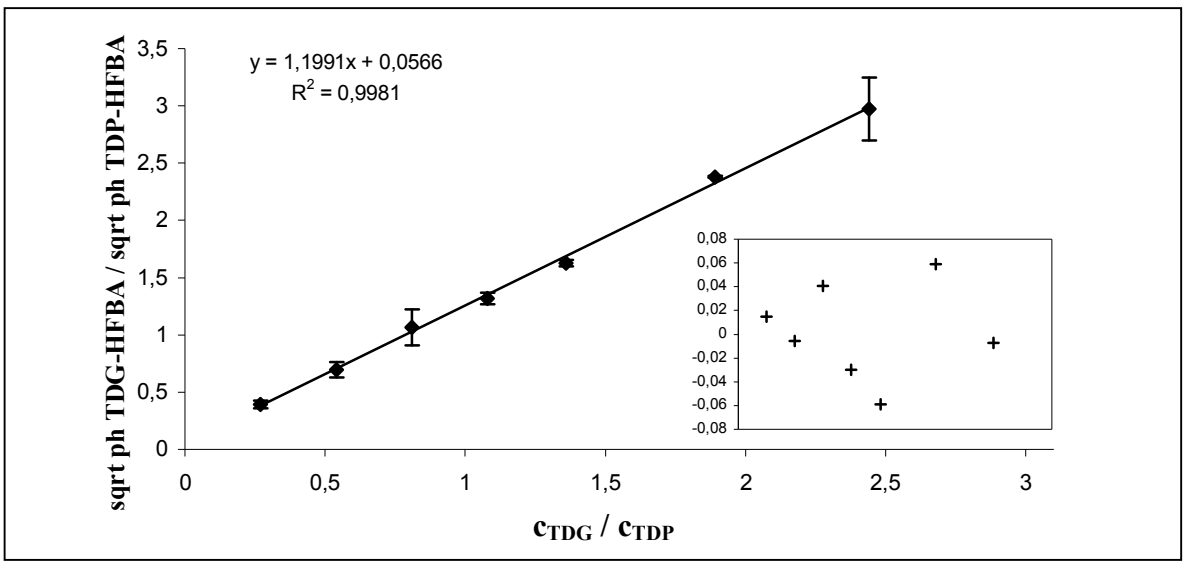
9.a ábra: TDG-HFBA-t (1,64 nmol ml^{-1}) és TDP-HFBA-t (1,00 nmol ml^{-1}) tartalmazó oldat gázkromatogramja.



9.b ábra: TDG-t illetve TDP-t nem tartalmazó minta gázkromatogramja.

A tiodiglikol SM felvitele nélkül gyűjtött *in vivo* mikrodializátumokhoz ismert mennyiségben történő hozzáadásakor a 10,00–13,50. perc közötti tartományban csak az analit és kísérő standard csúcsa volt észlelhető. TDG és TDP hozzáadása nélkül előkészített dializátumok kromatogramján ebben az időintervallumban nem jelent meg csúcs (*9.b ábra*). A TDG minőségi kimutatási határa 0,200 nmol ml^{-1}, a mennyiségi kimutatás alsó határa 0,364 nmol ml^{-1} volt.

A mennyiségi analízis alapját a c_{TDG}/c_{TDP} arány (x-tengely), valamint a TDG-HFBA és a TDP-HFBA esetében kapott csúcsmagasságok négyzetgyökének hányadosa (sqrt ph TDG/sqrt ph TDP, y-tengely) közötti összefüggés képezte. Az összefüggés linearitását 0,41-3,69 nmol ml^{-1} (50,0-450,2 ng ml^{-1}) TDG koncentráció-tartományban vizsgáltam három oldatsorozat lemérésével. A TDG-HFBA csúcs jel-zaj aránya a legkisebb töménységű minta esetében 10,4±0,18 volt; a legtöményebb minta 988±9 mV csúcsmagassággal eluálódott. A c_{TDG}/c_{TDP} arány és a sqrt ph TDG/sqrt ph TDP arány közötti összefüggés lineáris volt (R^2=0,9875-0,9967; $p<0,01$). A mérési sorozatok adatainak átlagolásával kapott értékekre illesztett egyenes meredeksége 1,1992±0,022; y-tengelymetszete 0,0545±0,0313 volt. Az ordináta tengelymetszete nem tért el szignifikánsan 0-tól (*10. ábra*, **VI. táblázat**). A reziduálisok véletlenszerűen oszlottak meg az egyenes felett és alatt, ami az illesztés helyességét alátámasztja.



10. ábra: A c_{TDG}/c_{TDP} arány és a TDG-HFBA, illetve TDP-HFBA csúcsmagasságok négyzetgyökének aránya közötti összefüggés (n=3). A boxban a reziduálisok láthatók.

VI. táblázat: A c_{TDG}/c_{TDP} arány és a TDG-HFBA, illetve TDP-HFBA csúcsmagaságok négyzetgyökének aránya közötti összefüggés vizsgálata során kapott mérési adatok.
sqrt ph: a jelintenzitás négyzetgyöke; SD: standard deviáció; RSD: relatív standard deviáció.

c_{TDG}/c_{TDP}	sqrt ph TDG / sqrt ph TDP					
	1. sorozat	**2. sorozat**	**3. sorozat**	**átlag**	**SD**	**RSD (%)**
0,27	0,37	0,43	0,38	0,39	0,03	7,58
0,54	0,68	0,77	0,64	0.70	0,07	9,83
0,81	1,21	1,09	0,90	1,07	0,16	14,82
1,08	1,37	1,32	1,27	1,32	0,05	3,65
1,36	1,66	1,61	1,61	1,63	0,03	2,01
1,89	2,39	2,37	2,38	2,38	0,01	0,50
2,44	3,24	2,99	2,69	2,97	0,28	9,36

Vizsgáltam a mérési módszer pontosságát és precizitását. A mérési pontosság meghatározásához TDG benzolhoz ismert mennyiségben történő hozzáadásával készült oldatok TDG koncentrációját mértem a három kalibrációs sorozat y-értékeinek átlagolásával kapott pontokra illesztett egyenes segítségével (*10. ábra*). A mért koncentráció-értékek a névleges töménységektől 1,64-7,26%-kal tértek el (**VII. táblázat**). A precizitás vizsgálatához egy, az analitot 0,827 nmol ml^{-1} koncentrációban tartalmazó *in vivo* dializátumot öt alkalommal előkészítettem és lemértem. A mért koncentráció-értékek 1,09-7,01 %-kal tértek el a névleges töménységtől, az átlagos visszamért koncentráció 0,800±0,022 nmol ml^{-1} volt (**VIII. táblázat**).

VII. táblázat: A mérési pontosság meghatározása céljából végzett vizsgálatok eredményei.

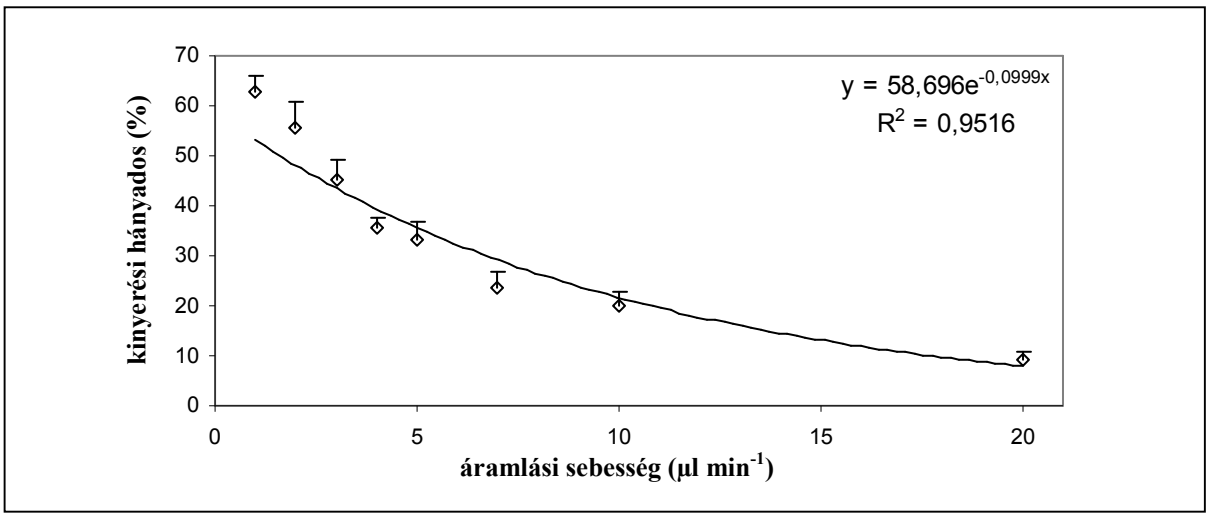
	„A" oldat	**„B" oldat**	**„C" oldat**
mért c_{TDG} (nmol ml^{-1})	0,628	2,096	3,193
névleges c_{TDG} (nmol ml^{-1})	0,615	2,131	3,443
eltérés (%)	2,11	1,64	7,26

VIII. táblázat: A mérési precizitás meghatározása céljából végzett vizsgálatok eredményei (n=5). RSD: relatív standard deviáció.

	c_{TDG} (nmol ml^{-1})	eltérés %
1. minta	0,818	1,09
2. minta	0,783	5,32
3. minta	0,817	1,21
4. minta	0,813	1,69
5. minta	0,769	7,01
átlag	0,800	
SD	0,022	
RSD (%)	2,75	

3.2 A tiodiglikol mikrodialízissel történő kinyerése

A tiodiglikol és a mikrodialízis rendszer kölcsönhatásának vizsgálata céljából a vegyület vizes oldatában 1,0–20 µl min^{-1} áramlási sebesség között végeztem *in vitro* dialízist (*11. ábra*). Az áramlási sebesség növelése a kinyerési hányados folyamatos csökkenését eredményezte: 1,0 µl min^{-1} áramlás mellett utóbbi 62,7%, 20 µl min^{-1} áramlási sebesség alkalmazásakor már csak 9,03% volt. A kinyerési hányados csökkenése az áramlási sebesség változásával exponenciális összefüggést mutatott (R^2=0,9516). A további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat 2,0 µl min^{-1} áramlási sebesség mellett végeztem (a kinyerési hányados ennél 55,50±5,49 % volt).

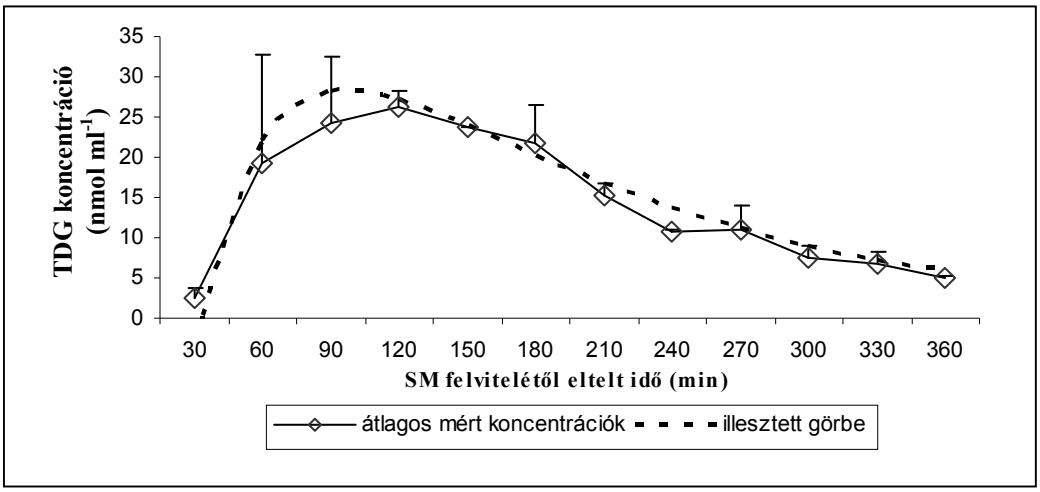


11. ábra: A dializáló oldat áramlási sebessége és a TDG kinyerési hányadosa közötti összefüggés.

Az *in vivo* előkísérletek során 5,0 µl SM bőrfelszínre történő felvitelét követően a cseppet üveglappal fedtem. Az expozíció időtartama 30 perc volt. A TDG minden frakcióban megjelent; az adatok frakciónként vett átlagából felvett koncentráció-profil 120 percig folyamatos emelkedést, majd exponenciális csökkenést mutatott (maximális koncentráció: 26,28 nmol ml^{-1}). Az idő függvényében ábrázolt TDG koncentráció értékekre görbeillesztés volt lehetséges az

$$y = 74{,}2 \times e^{-0{,}007 \times t} - 148{,}8 \times e^{-0{,}0286 \times t} \qquad (6)$$

egyenlet szerint (*7.,12. ábra*).



12. ábra: Az *in vivo* előkísérletek során, 5,0 µl SM felvitelét követően kapott TDG koncentráció-profil (n=3).

Következő lépésként retrodialízis módszerével meghatároztam a TDG *in vivo* kinyerési hányadosát. A kísérletek során használt mikrodialízis beállításokat a *7.d ábra* mutatja, a kísérleti adatokat a **IX. táblázatban** foglaltam össze. A TDG *in vivo* subcutan átlagos kinyerési hányadosa a használt katéter-típusra vonatkozóan 54,1±7,2 % volt.

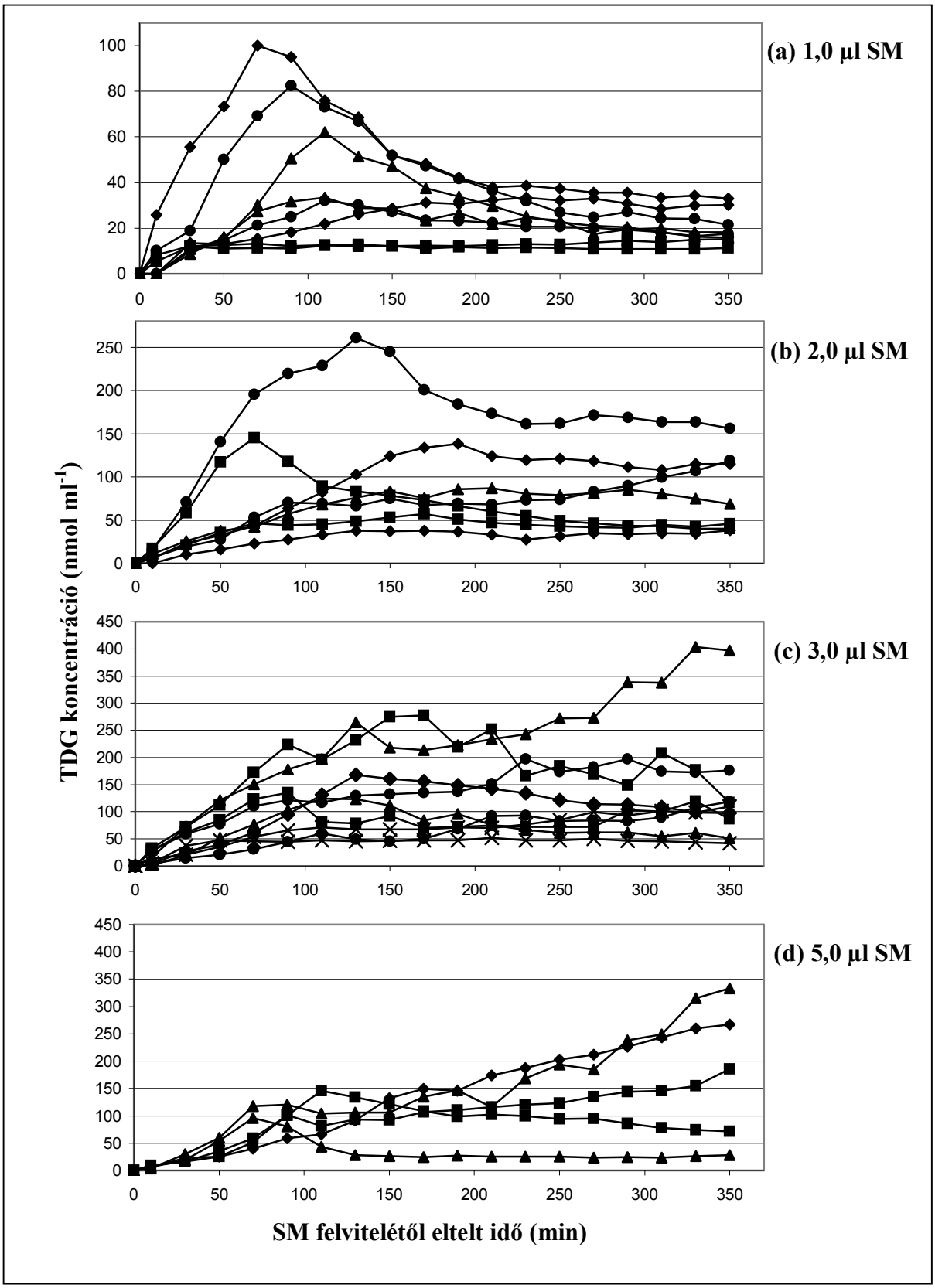
IX. táblázat: A vizsgálatok során használt CMA-20 (1 cm, 20 kDa) mikrodialízis katéter tiodiglikolra vonatkozó *in vivo* kinyerési hányadosának meghatározása retrodialízis módszerrel. Minden kísérlet (A-E) során 3 leadási vizsgálatot végeztem. TDG: tiodiglikol; RR%: a tiodiglikolra vonatkozó kinyerési hányados; SD: standard deviáció.

kísérlet kód	leadási vizsgálat	RR%			átlagos RR% (±SD)
A	A/1	42,3	45,7		
	A/2	47,9			
	A/3	46,8			
B	B/1	54,9	56,2		
	B/2	55,8			
	B/3	58,0			
C	C/1	59,8	58,1		***54,1±7,2***
	C/2	62,5			
	C/3	52,1			
D	D/1	48,2	47,9		
	D/2	48,2			
	D/3	47,4			
E	E/1	62,1	62,8		
	E/2	64,7			
	E/3	61,6			

3.3 A bőrfelszínre felvitt kénmustár felszívódásának idő- és dózisfüggése

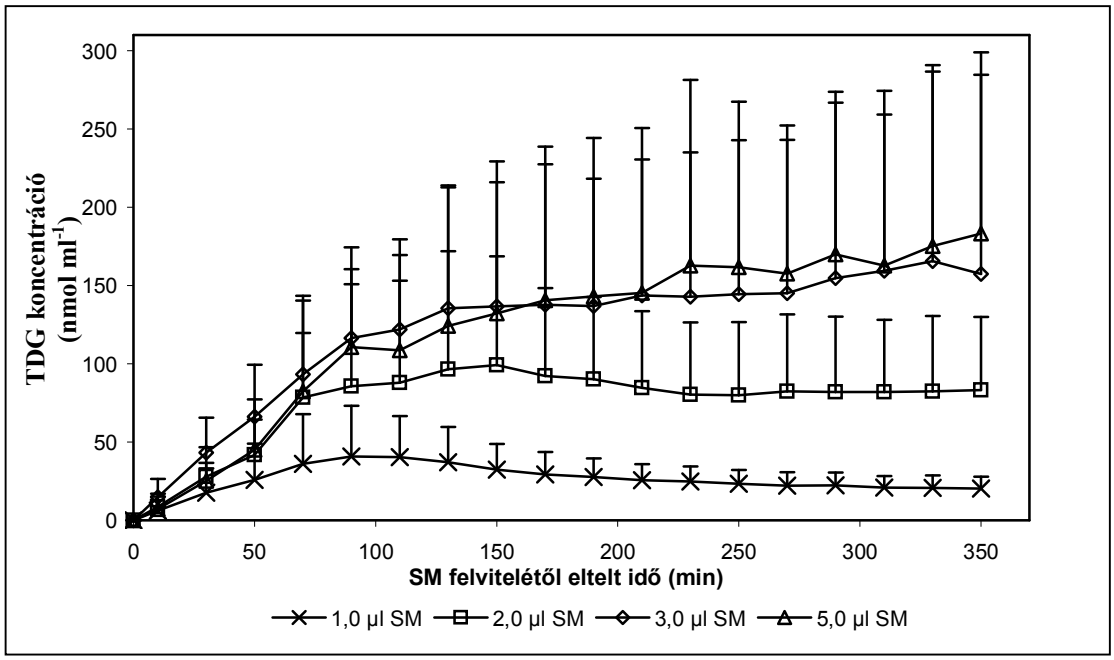
A TDG subcutan koncentrációjának alakulását 1,0 – 5,0 µl SM dózis felvitelét követően vizsgáltam. A bőrfelszínre juttatott cseppet műanyag kupakkal fedtem, az expozíciót 360 percig tartottam fenn. Az egyes térfogatok alkalmazásakor kapott TDG koncentráció-profilokat a *13.a-d. ábra* mutatja.

1,0 µl SM felvitelekor a kísérletek 50 %-ában, 2,0 µl alkalmazása után az esetek 86%-ában mutattam ki TDG-t a méreg felvitelét követően vett első (0-20 min) dializátumban. A vegyület az ezt követően vett mintákban kivétel nélkül jelen volt. 3,0 és 5,0 µl SM felvitelekor minden frakció tartalmazott TDG-t.



13. ábra: (a) 1,0; (b) 2,0; (c) 3,0; és (d) 5,0 µl SM bőrfelszínre történő felvitelét követően kapott tiodiglikol koncentráció-profilok. Az azonos szimbólumok minden dózis esetében egy-egy állatkísérletet jelölnek. Az ordináta skálázása ábránként különböző.

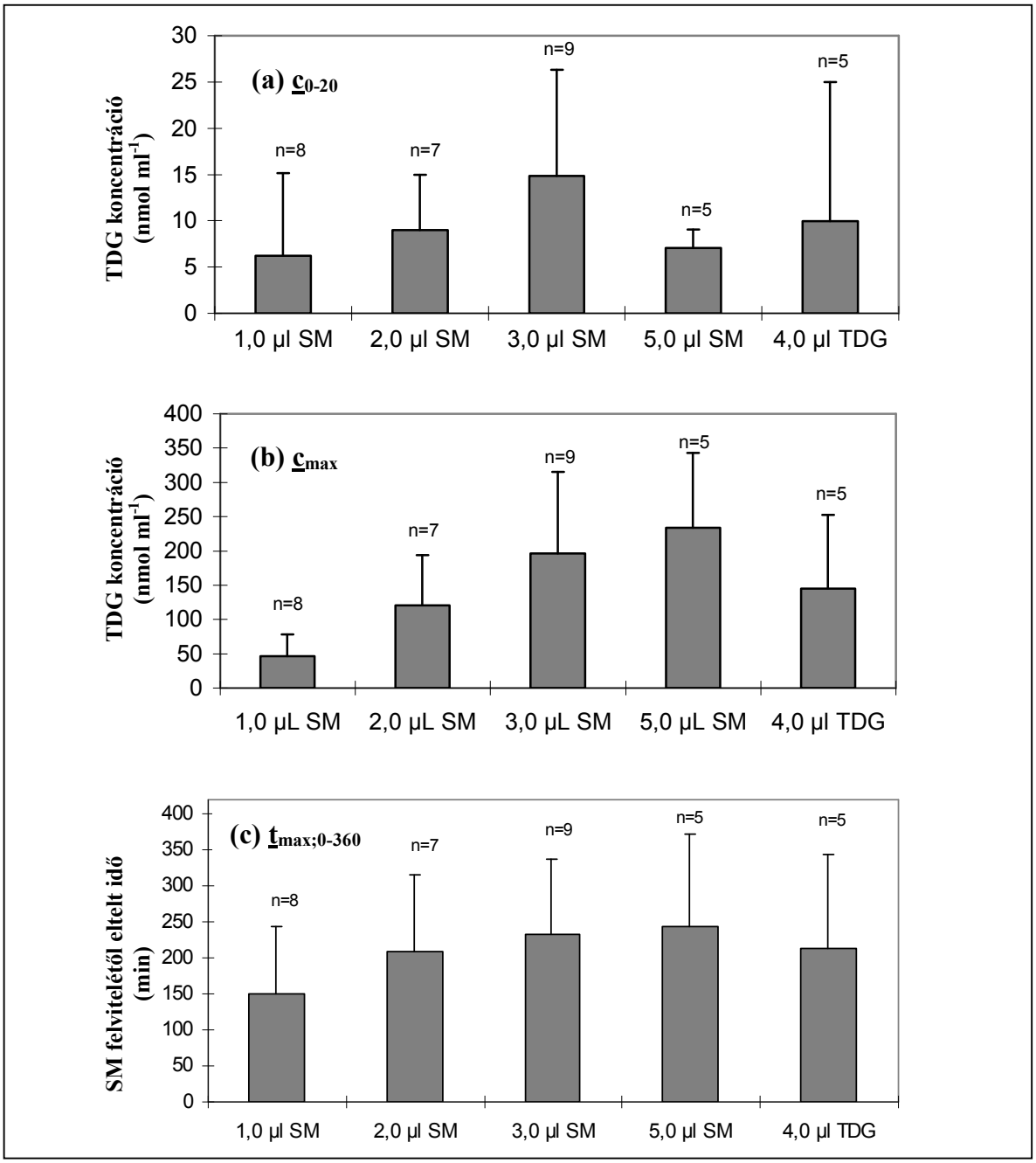
Az egyes mintavételi intervallumokban (0-20 min, 20-40 min stb.) kapott TDG koncentráció-értékeket minden SM-dózis esetében átlagoltam, majd az átlagos értékeket az idő függvényében ábrázoltam (*14. ábra*). Az átlagos koncentráció-értékek alakulása az expozíciós időtartam alatt dózisonként eltérő volt. Az első időszakot minden dózis esetében a koncentrációk gyors emelkedése jellemezte, amely 1,0 µl SM alkalmazásakor 100 percnél, 2,0 µl SM felvitele után pedig 160 percnél ért el maximumot. Ezt követően a TDG koncentráció a mintavételi időszak végéig 1,0 µl SM dózisnál a maximális érték 50%-ára, 2,0 µl SM felvitele után a maximum 84%-ára esett vissza. 1,0 µl SM felvitelét követően a koncentráció-csökkenés 100 és 360 perc között monoton volt, 2,0 µl SM felvitele után viszont – a 160-200 min közötti időszakban tapasztalt csökkenést követően – 200 és 360 perc között konstans átlagos értéket kaptam. 3,0 és 5,0 µl SM alkalmazásakor az átlagos koncentráció-értékek és azok szórásai jelentős hasonlóságot mutattak. Mindkét profil esetében az első időszakot gyorsan emelkedő TDG koncentráció jellemezte, majd a növekedés lelassult. A legnagyobb értékeket (157,12 ill. 183,03 nmol ml^{-1}) a 340-360 perc között gyűjtött dializátumokban kaptam.



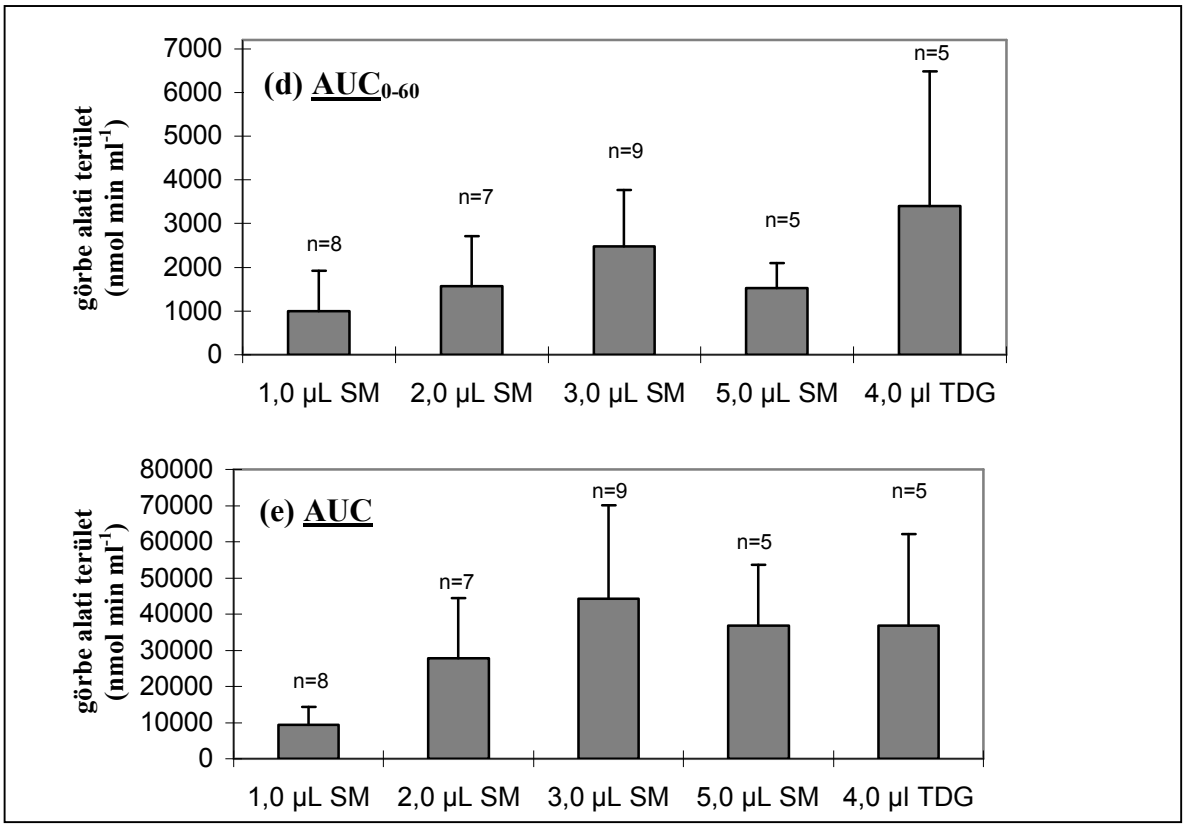
14. ábra: 360 perces átlagos TDG koncentráció-profilok 1,0-5,0 µl SM felvitelét követően.

Az SM dózis és a subcutisban megjelenő TDG-mennyiség között a TDG koncentráció-profilok elemzésével kapott maximális koncentráció (c_{max}), a maximális koncentráció eléréséhez szükséges idő ($t_{max;0-360}$), az első mintában mérhető koncentráció

($c_{0\text{-}20}$), a 0-60. perc között számított görbe alatti terület ($AUC_{0\text{-}60}$), valamint a görbe alatti terület (AUC) átlagos értékeinek vizsgálatával kerestem összefüggést. Az SM dózis emelésekor 1,0-3,0 µl tartományban mindegyik paraméter monoton nőtt (*15.a-e ábra*). A $\underline{c}_{max}$ (R^2=0,9999), az $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ (R^2=0,9826) és az $\underline{AUC}$ (R^2=0,9992) esetében szignifikáns lineáris korrelációt tapasztaltam a fenti dózistartományban az SM mennyisége és a kapott értékek között (*15.b,d* és *e ábra*). A 3,0 és 5,0 µl SM felvitele esetében kapott értékek minden paraméter esetében közeli egyezést mutattak.



15. ábra: 360 perces TDG koncentráció-profilokból számított (a) $\underline{c}_{0\text{-}20}$ és (b) $\underline{c}_{max}$ és (c) $\underline{t}_{max;0\text{-}360}$ értékek 1,0-5,0 µl SM, illetve 4,0 µl TDG felvitelét követően.



15. ábra (folyt.): 360 perces TDG koncentráció-profilokból számított (d) $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ és (e) <u>AUC</u> értékek 1,0-5,0 µl SM, illetve 4,0 µl TDG felvitelét követően.

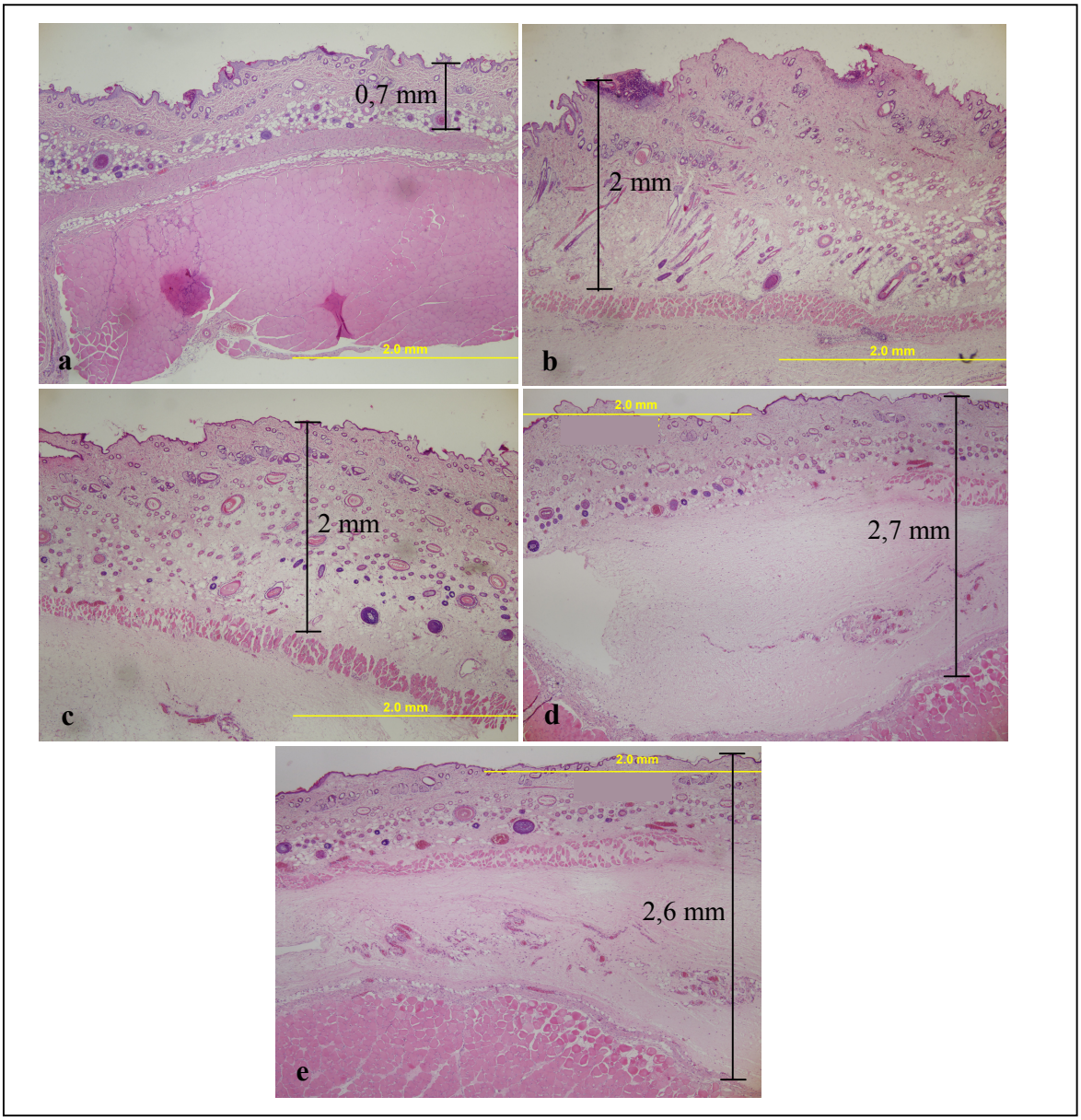
3.4 A kénmustár bőrfelszínről történő felszívódása következtében kialakuló szöveti morfológiai elváltozások

Az SM dózis és a bőrben fellépő szöveti károsodás közötti összefüggést az exponált területekről készült szövettani metszetek mikroszkópos vizsgálatával elemeztem. A kontroll mintáról készült felvételen az epidermis, a dermis, a hypodermis, valamint a subcutan fascia homogén szerkezetű volt és markáns határok mentén elkülönült. Gyulladásra utaló elváltozások nem voltak láthatók, és a bőrben patológiás körülmények között megjelenő sejtek sem voltak kimutathatók. Az átlagos távolság a bőrfelszín és a subcutan fascia között 0,7 mm volt (*16.a ábra*).

1,0 µl SM felvitele után ödémás beszűrődés jelent meg a dermisben és a hypodermisben, amely a subcutan fascia alá terjedt. E rétegek fellazultak, vastagságuk megnőtt, a bőrfelszín és a subcutan fascia közötti távolság a 2 mm-t is elérte. A dermis és a subcutan zsírréteg közötti határ elmosódott, és a rétegek több ponton egymásba csúsztak. A subcutan fasciában számos ponton rések keletkeztek. A dermisben – és kisebb mértékben az epidermisben – heterofil granulociták infiltrációja volt látható (*16.b ábra*).

2,0 µl SM alkalmazását követően ugyanezek az elváltozások súlyosabb formában jelentek meg. A bőrfelszín és a subcutan fascia közötti távolság nem nőtt, azonban a dermis és a subcutan zsírszövet teljesen összeolvadt. A subcutan fascia felszakadozott, helyenként eltűnt (*16.c ábra*).

3,0 µl SM alkalmazásakor a dermis és a subcutan zsírszövet elfolyósodó nekrózisa volt megfigyelhető, ezek a rétegek, továbbá a subcutan fascia gyakorlatilag eltűntek. Emellett a peritoneális vázizom felszíni rostjainak felszakadozása volt megfigyelhető. 5,0 µl SM felvitele után a szövettani kép ettől jelentős eltérést nem mutatott, azonban az érintett terület kiterjedtebb volt (*16.d,e ábra*).



16. ábra: Patkány bőrének a felviteli pontot és környezetét megjelenítő szövettani metszete az SM felvitele után 24 órával. (a) kezeletlen bőr; (b) 1,0 µl SM; (c) 2,0 µl SM; (d) 3,0 µl SM; (e) 5,0 µl SM. Hematoxilin-eozin festés, 40x nagyítás.

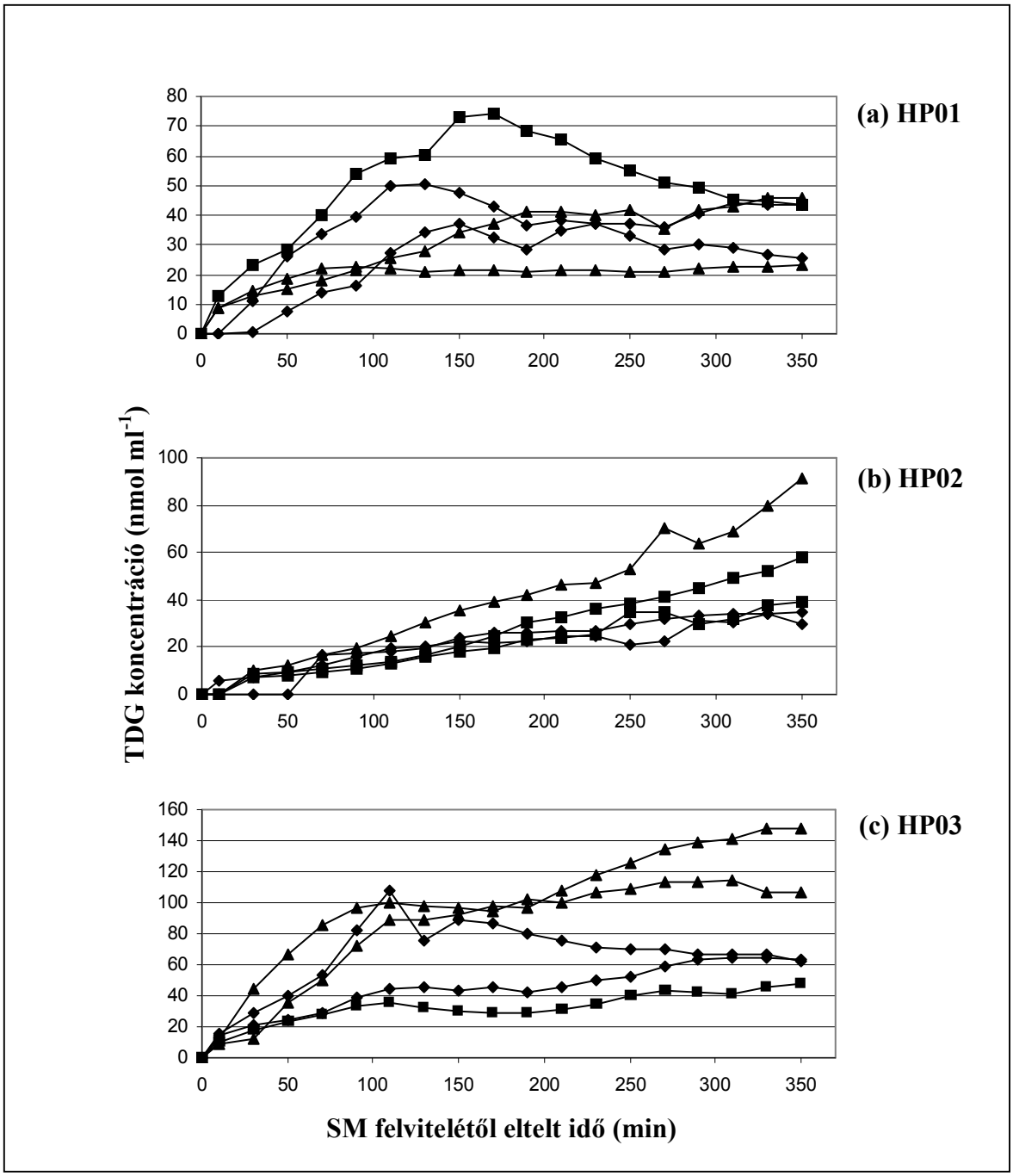
3.5 Bőrfelszíni védőkészítmények hatékonyságának vizsgálata

A modell segítségével három bőrfelszíni készítmény SM bőrbe jutására gyakorolt hatását teszteltem. A készítményeket – melyek közül kettőhöz hasonló összetételt korábban mások hatékonynak találtak [53,78], a harmadik pedig egy korábban hasonló céllal nem vizsgált, nanorészecskéket tartalmazó összetétel volt – előkezelés formájában vittem a bőrfelszínre.

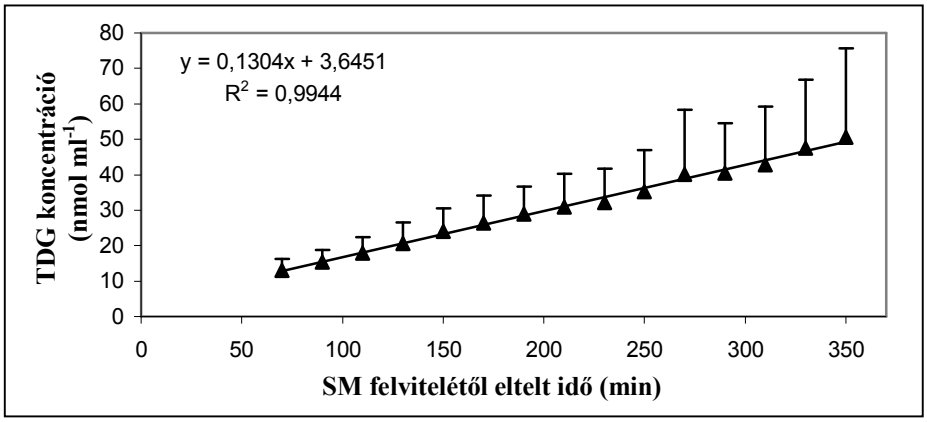
Az egyes védőkészítmények használatakor kapott egyedi TDG koncentráció-profilok a *17.a-c ábrán* láthatók. A HP01 készítmény felvitelét követően a 0-20. perc között

gyűjtött dializátumokban öt eset közül háromban mutattam ki TDG-t. Az analit egy esetben a 20. perc, egy további esetben pedig a 40. perc után jelent meg. A HP02 alkalmazásával végzett öt vizsgálat közül egy esetben mutattam ki TDG-t az első 20 percben gyűjtött mintában, három esetben a 20-40. perc között vett frakcióban, míg egy esetben a vegyület csak 40 perc után jelent meg. A TDG mindkét készítmény használatakor kimutatható volt a kísérletek hátralevő részében nyert dializátumokban. A HP03 készítmény alkalmazásakor a TDG minden vizsgálatban megjelent az első 20 percben vett frakciókban, és minden további dializátumban kimutatható mennyiségben jelen volt.

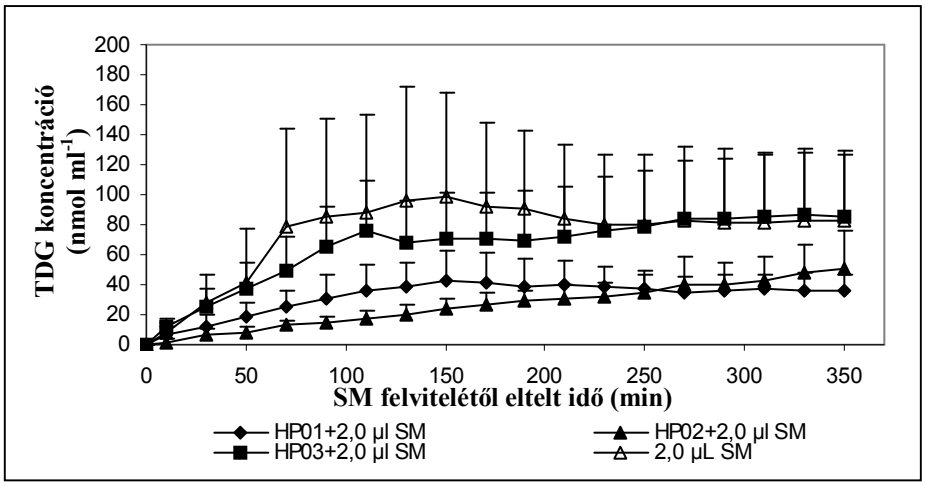
A HP01 felvitelével végzett kísérletekben a kapott átlagos TDG koncentráció a 160. percig emelkedett, majd a mintavételi időszak végére a maximális érték 85%-ára esett vissza. A HP02 készítménnyel történő előkezelést követően az átlagos értékek folyamatos növekedést mutattak. Az SM felvitele utáni 60. és 360. perc között az átlagos TDG koncentráció lineárisan, 0,13 nmol ml^{-1} min^{-1} meredekséggel emelkedett (R^2=0,9944; *18. ábra*). A lineáris emelkedési trend e készítmény alkalmazásakor az egyedi koncentráció-profilokra is jellemző volt (*17.b ábra*). A HP03 készítmény felvitelét követően az átlagos koncentrációk alakulása a 2,0 µl SM előkezelés nélkül történő felvitele után kapott átlagérték-profillal közeli egyezést mutatott, különösen a mintavételi időszak második felében (*19. ábra*).



17. ábra: A hypodermisben mért TDG koncentrációk (a) HP01, (b) HP02, illetve (c) HP03 készítményekkel végzett előkezelést, majd 2,0 µl SM felvitelét követően.

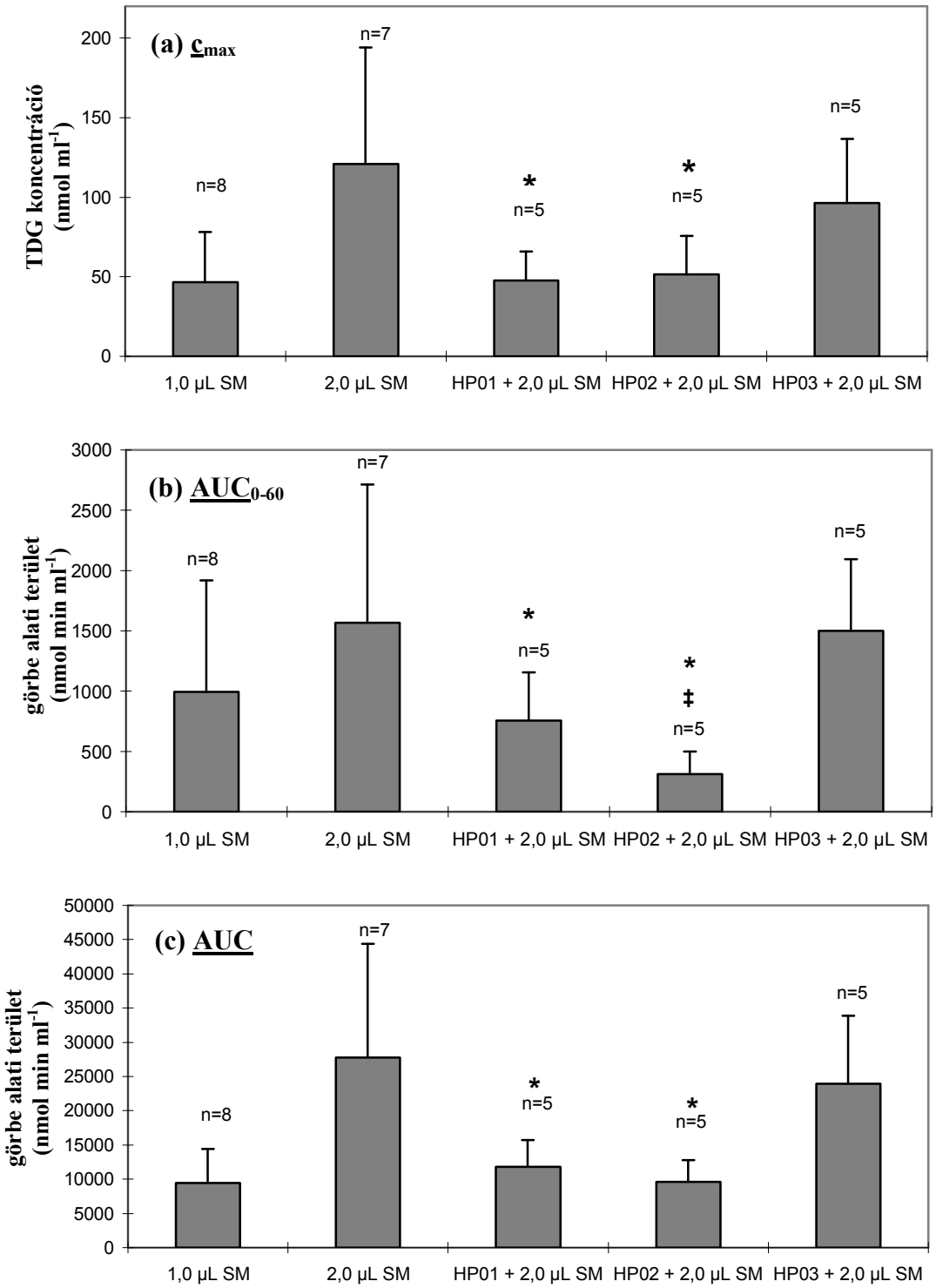


18. ábra. A HP02-vel történő előkezelést, majd 2,0 µl SM felvitelét követően a 60-360. perc között kapott átlagos subcutan TDG koncentráció értékekre illesztett egyenes.



19. ábra. TDG átlagos subcutan koncentrációjának alakulása bőrfelszíni védőkészítményekkel történő előkezelés után.

A HP03 készítmény alkalmazásakor egyik vizsgált érték esetében sem tapasztaltam szignifikáns csökkenést az előkezelés nélkül kapottakhoz képest. A HP01 és a HP02 felvitele után ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabb $\underline{c}_{max}$, $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ és $\underline{AUC}$ értékeket kaptam, mint 2,0 µl SM előkezelés nélkül történő alkalmazásakor. A HP02 felvitele esetében kapott $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ az 1,0 µl SM előkezelés nélkül történő felvitelekor kapott értékhez képest is szignifikánsan alacsonyabb volt (*20.a-e. ábra*).

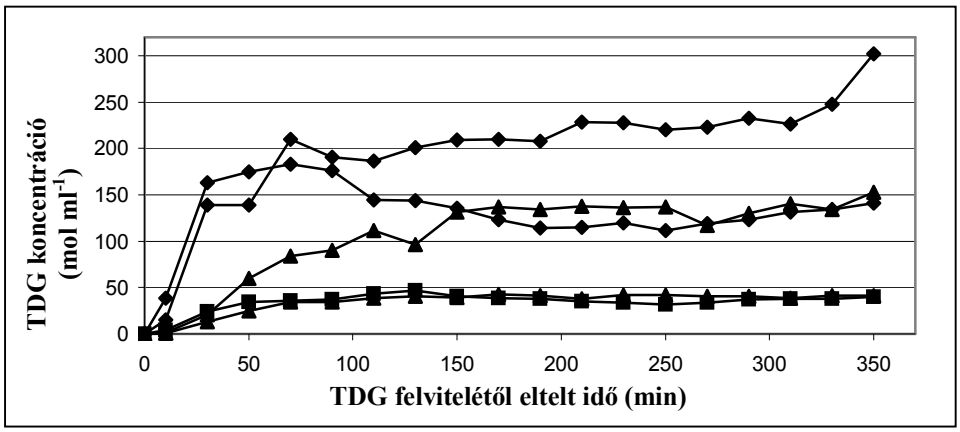


20. ábra. 360 perces subcutan TDG koncentráció-profilokból számított (a) $\underline{c}_{max}$, (b) $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ és (c) $\underline{AUC}$ értékek védőkészítmények felvitelével végzett vizsgálatokban. Összehasonlításképpen feltüntetésre kerültek az 1,0 és 2,0 µl SM előkezelés nélküli felvitelét követően kapott értékek. A * szignifikáns eltérést jelöl a 2,0 µl SM felvitelekor, a ‡ az 1,0 µl SM felvitelekor kapott értéktől ($p<0,05$).

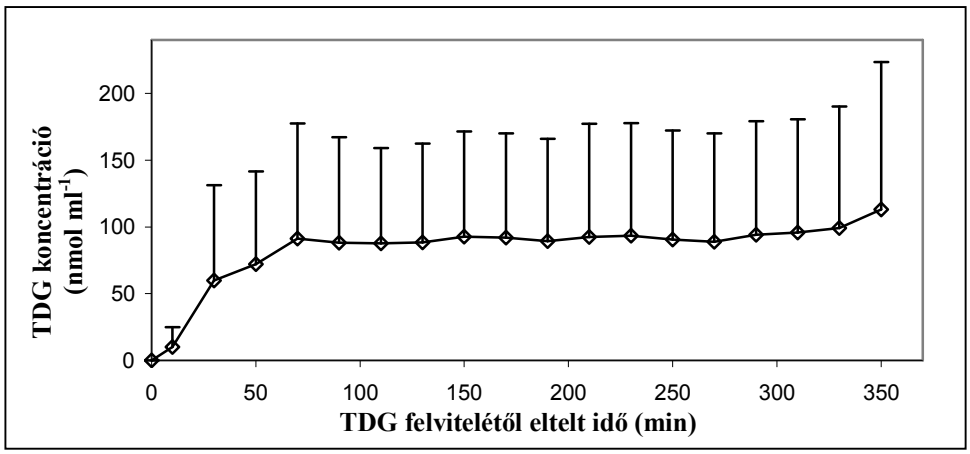
3.6 Tiodiglikol kimutatása a hypodermisben bőrfelszínről történő felszívódását követően

4,0 µl TDG bőrfelszínre történő juttatása után a vegyület az összes kísérletben, azok teljes időtartamában kimutatható volt a subcutan mikrodializátumokban. A koncentrációk az öt sikeres kísérlet mindegyikének kezdeti időszakában gyorsan emelkedtek; ezt követően három esetben platót értek el, egy esetben lassú emelkedést, egy esetben pedig némi csökkenést mutattak. Az átlagos maximális koncentráció 145,4±107,5 nmol ml^{-1}, a $\underline{c}_{max}$ eléréshez szükséges idő 214±129 min volt. Az $\underline{AUC}_{0-60}$ értéke 3406±3074 nmol min ml^{-1}, a teljes kísérleti időtartamra számított görbe alatti terület 36882±25292 nmol min ml^{-1} volt (*15.*, *21., 22. ábra*).

A TDG felvitelével végzett kísérletek során a bőrben nem tapasztaltam morfológiai elváltozást.



21. ábra. Subcutan TDG koncentrációk 4,0 µl TDG bőrfelszínre juttatása után.



22. ábra: A subcutan TDG koncentrációk átlagértékeinek alakulása a mintavételi időszakban 4,0 µl TDG bőrfelszínre juttatása után (n=5).

4. DISZKUSSZIÓ

A bőrön keresztül történő felszívódás számos vegyi harcanyag szisztémás keringésbe kerülésének egyik módját jelenti. Hólyaghúzó vegyi harcanyagok, így az SM bőrbe jutásának azonban sajátos és sokszor legfontosabb következménye, hogy rendkívül súlyos, égési sérüléshez hasonló helyi elváltozások alakulnak ki. Az SM bejutását megakadályozó bőrvédő szerek hatékonyságának vizsgálatára korábban kidolgozott *in vivo* módszerek legnagyobbrészt a szöveti válasszal összefüggő biológiai értékek számszerűsítésén alapulnak. A biológiai paraméterek számszerűsítését magukban foglaló vizsgálatoknak több korlátja van: amellett, hogy reprodukálhatóságuk az egyedek biológiai eltérései miatt olykor kétséges, kiértékelésük során nemegyszer szubjektív módszereket alkalmaznak, aminek hitelessége nehezen ellenőrizhető. További problémát jelent, hogy egy kísérletből legtöbbször kevés adat nyerhető. Mindezek miatt a vizsgálatok során nagy számú állatra van szükség, az eredmények extrapolációjára az alkalmazott dózistartományon kívül, illetve a különböző fajok között pedig még így sincs lehetőség.

Munkám során célom egy *in vivo* vizsgálati modell kifejlesztése volt, amely alkalmas a kénmustár bőrön keresztül történő felszívódásának vizsgálatára, valamint az azt megakadályozó bőrvédő készítmények hatékonyságának meghatározására és összehasonlítására. A modell elvi alapját az a jelenség képezi, hogy a bőrbe bejutó kénmustár mennyiség egy része tiodiglikollá alakul át (*5. ábra*). A TDG a bőrben expozíció hiányában nem mutatható ki, ezért jelenléte a bőr rétegeiben – így a hypodermisben – az SM bejutásának közvetlen bizonyítéka. A hypodermis extracellularis terében folytatott dialízissel nyert mintákban a keletkező TDG megjelenik. Hipotézisem az volt, hogy a penetráló SM mennyiség és a TDG koncentrációkból számítható értékek között olyan összefüggések tárhatók fel, melyek a bőrvédő készítmények által nyújtott védő hatás minőségének és mértékének meghatározására, összehasonlítására adnak lehetőséget.

Korábban az SM, illetve a TDG szöveteltávolítást nem igénylő helyi, specifikus kémiai detektálásán alapuló *in vivo* modellről nem számoltak be. Az értekezésem tárgyát képező vizsgálati módszer alkalmasnak bizonyult az SM bőrfelszínről történő penetrációjának helyi vizsgálatára hidrolízis terméke subcutan extracellularis koncentrációjának tartós, specifikus követése révén. Az eljárás – más, hasonló adatok kinyerését célzó módszerekhez képest is – kisszámú állat felhasználását igényli.

Kísérleteim egy részében a szöveti válasz eredményes vizsgálatára is sor került, ami felveti a modell mások által kifejlesztett – morfológiai, biofizikai vagy klinikai értékelésen alapuló – eljárásaival történő kombinálásának lehetőségét.

A kísérleteinkhez használt vándorpatkány (*rattus norvegicus*) bőrének rétegei számban és felépítésben azonosak az emberi bőr rétegeivel, továbbá közeli a hasonlóság a sejttípusok és kötőszöveti elemek között is. A vegyületek felszívódásának mechanizmusában azonban különbséget okoz, hogy a vándorpatkány legtöbb testtáján a szőrtüszők száma nagyságrendekkel nagyobb mint az embernél, ugyanakkor izzadtságmirigyek – melyek szerepét az SM felszívódásában többen feltételezték – a patkány bőrében nem találhatók [148,149]. A patkány bőre vastagságban jelentősen elmarad az emberi bőrtől: a háton és a hason a bőrfelszíntől a hypodermis aljáig mérhető átlagos távolság kb. 20-40 %-a az emberi bőr esetében mérhetőnek, míg a penetrációt leghatékonyabban akadályozó s. corneum az embernél mért vastagság 25-50 %-át éri el [59]. A patkányok epidermisét 1-2 sejtsor alkotja, vastagsága ezért nem haladja meg a 25 µm-t [148,150]. Az élő epidermis sejtjeinek lipidösszetétele eltér az emberi hámrétegtől, többek között három-hatszoros mennyiségben tartalmaz apoláris lipideket [151]. A bemutatott különbségek alátámasztják a megfigyelést, hogy számos anyag felszívódásának sebessége jelentősen nagyobb a patkány bőrén keresztül [56,148,150]. Ugyanezért azonban a modell nagy érzékenységű vizsgálati környezetnek tekinthető a bőrvédő készítmények hatékonyságának igazolásához [152].

A kísérleti eljárás alapját az a jelenség képezte, hogy az SM csepp és a víz határfelületén gyors hidrolízis játszódik le. *Cohen* korábbi, *Papirmeister* és mtsai által közzétett vizsgálatainak eredménye szerint az SM féléletideje vízben, 37,4 °C-on 2,6 perc [42]. E reakció legnagyobb mennyiségben képződő végterméke a TDG, egy vízben jól oldódó, atoxikus vegyület [42]. A TDG képződése kénmustárból szöveti környezetben irreverzibilis folyamat, melynek lejátszódásához az epidermis és a dermis kedvező közeget nyújtanak [59]. *Chilcott* és mtsai emberi epidermis membránnal végzett *in vitro* vizsgálataikban SM felvitelét követően találtak TDG-t az epidermisben [98]. *Black* és mtsai 318 µg (kb. 250 nl) SM patkányok bőrére történő felvitele után gyűjtött vizelet-mintákban 8 napig mutattak ki – nagyrészt oxidációs terméke, illetve konjugátumok formájában – TDG-t; a legnagyobb ürített mennyiséget pedig 0-6 óra között mérték [153]. Vizsgálataim alátámasztották, hogy a TDG az SM felvitelét követően perceken belül megjelenik a szervezetben.

Bár a TDG különböző mátrixokból történő kimutatására korábban több korszerű

módszert leírtak, ezek nem voltak alkalmazhatók a vegyület mikrodializátumokban történő meghatározására. Első lépésként ezért erre alkalmas mérési eljárást dolgoztam ki, mellyel szemben az alábbi igények merültek fel: (1) fontos volt, hogy a mikrodializátumok méréshez történő előkészítése kis mintatérfogattal végrehajtható legyen; (2) célom volt kísérletenként a lehető legtöbb frakció gyűjtése (azaz a mintavételi időszak minél rövidebb frakciógyűjtési intervallumokra történő felosztása), ezért szükség volt nagy áteresztőképességű eljárás kidolgozására; (3) várható volt, hogy a TDG alacsony koncentrációban lesz jelen több mintában, ezért fontos volt a nagy detektálási érzékenység; (4) fontos szempont volt a költséghatékonyság.

A gyűjtött mikrodializátumok a vizsgált szövet extracelluláris folyadékában található kis molekulatömegű vegyületeket és szervetlen ionokat tartalmazták. Ezek számottevő mennyisége miatt célszerűnek találtam az elválasztást is magában foglaló mérési módszer alkalmazását. Az elválasztást gázkromatográffal oldottam meg, amely a TDG koncentráció biológiai mintákban történő mérésekor egyik leggyakrabban használt elválasztási technika [154]. A mennyiségi vizsgálatokat kísérő standard hozzáadásával végeztem. A TDP – a TDG nagyon hasonló kémiai és kromatográfiás tulajdonságokkal rendelkező homológja – erre a célra korábban alkalmasnak bizonyult a TDG gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel (GC-MS) végzett meghatározása során [155]. A TDG a legtöbb gázkromatográfiás oszlopról aszimmetrikus csúccsal eluálódik, mivel két hidroxilcsoportja révén másodlagos kötést létesít az állófázisok anyagával. Illékonysága, kis molekulatömege és poláris karaktere miatt pedig alacsony polaritású állófázisokon gyakorlatilag nincs retenciója. Ezek a problémák kiküszöbölhetők, ha a TDG gázkromatográfiás kimutatását származékképzést követően végezzük. A származékképzés révén nagyobb molekulatömegű, illékony, ugyanakkor kevésbé poláris vegyület keletkezik, amely kedvező gázkromatográfiás tulajdonságokkal rendelkezik.

A TDG származékképzésekor leggyakrabban szililezési és perfluoracilezési reakciókat alkalmaznak. A szililezési reakció (a TDG hidroxil-csoportjaiban levő hidrogénatom általában trimetilszilil- vagy *terc*-butildimetilszilil csoportra cserélődésével járó átalakítás) jól kromatografálható és érzékenyen kimutatható vegyület képződéséhez vezet. Hátránya azonban, hogy a reakció fűtött (40-80 °C-os) elegyben is lassan játszódik le (30-80 perc), a reakciótermék pedig nedvességre érzékeny [155,156]. Az egyébként igen korrozív szililezőszereket nagyobb mennyiségben tartalmazó minták mérése PFPD detektorral, az égő kamra anyagi tulajdonságai miatt, nem lehetséges [saját adat].

A TDG perfluoracilezőszerekkel lejátszódó észterezési reakciója szintén szimmetrikus

csúccsal eluálódó terméket eredményez. Az eljárás előnye, hogy a reakció enyhe körülmények között, gyorsan végbemegy [157]. A származékképző szer maradéka vízzel elbontható, és a képződő sav a vizes fázisba extrahálható. Vizsgálatainkban heptafluorvajsavanhidridet alkalmaztam, mivel a TDG-HFBA és TDP-HFBA a gázkromatográfiás mérések során megfelelő retenciós idővel, szimmetrikus csúcsként eluálódott. A származékképző szer és a TDG, illetve TDP közötti reakció benzolban, trietilamin jelenlétében, szobahőmérsékleten kb. 2 perc alatt lejátszódott. A benzol oldószerként történő alkalmazása mellett azért döntöttem, mert az a TDG megfelelő oldószerének bizonyult a vizsgált koncentráció-tartományban, egyben aprotikus oldószerként az acilezési reakció megfelelő közege volt [158,159]. További előnyt jelentett, hogy a minta az oldószercsere után kevés mátrix-komponenst tartalmazott.

Apoláris oldószerrel végzett extrakcióval a TDG nem nyerhető ki megfelelő hatékonysággal testfolyadékokból, ezért vérből és vizeletből történő mennyiségi meghatározására korábbi vizsgálatokban szilárd fázisú extrakcióval megoldott tisztítást-töményítést követően került sor [160]. A korábban leírt módszereknél a minták kiindulási térfogata a 100 µl-t meghaladta, ezért azok a mérési eljárással szemben támasztott igényeknek nem feleltek meg. Az általam kifejlesztett eljárásban csak a származékképzéshez szükséges víz→benzol oldószercserét hajtottam végre; a mátrixkomponensek zavaró hatását az elválasztást követően kénszelektív detektor alkalmazásával küszöböltem ki.

Az elválasztáskor kapott – zavaró csúcsokat nem tartalmazó, megfelelő jel-zaj arány melletti kimutatást tükröző – kromatogramok révén gyors méréseket tudtam végezni. A mintákból a mérőrendszerbe kerülő mátrixkomponensek által okozott szennyezés kiküszöbölése céljából a csúcsok megjelenését követően a rendszert 250 °C-ra fűtöttem, és 1 percig ezen a hőmérsékleten tartottam.

A pulzáló lángfotometriás detektor szelektivitása és érzékenysége a hagyományos lángfotometriás detektorét két nagyságrenddel meghaladja, így hasonló koncentráció-tartományban történő méréseket tett lehetővé, mint gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel végzett meghatározások esetében [161]. A mérési pontosság növelése érdekében a kalibrációs egyenest viszonylag szűk koncentráció-tartományban vettem fel. A négyzetgyökvonással transzformált csúcsmagasságokkal felvett kalibrációs összefüggés linearitását az illesztett egyenes determinációs együtthatójának (R^2) 1-hez közeli értéke, valamint a reziduálisok véletlenszerű eloszlása igazolta.

Az analitikai módszer megbízhatóságát két méréssorozatban vizsgáltam. Elsőként a

kalibrációs összefüggés helyességét teszteltem benzolban készített TDG-oldatok analízisével. Ezekben az oldatokban – a kalibráló oldatokhoz hasonlóan – a származékképzési reakción kívül más műveletet nem hajtottam végre. A mért koncentrációk relatív eltérésének mértéke az elméleti értéktől elfogadható volt, mivel az nem haladta meg a kalibrációs összefüggés megállapításakor mért relatív szórások nagyságát. Következő lépésben a TDG vak kísérletek során gyűjtött dializátumokhoz történő hozzáadásával készült minták analízisével vizsgáltam, hogy a víz→benzol oldószercsere során – 10 µl minta térfogatból kiindulva – a TDG és TDP mennyiségének aránya megváltozik-e. A mért koncentrációk véletlenszerű eloszlást mutattak az elméleti érték alatt és felett, ami azt igazolta, hogy az oldószercsere nem torzította a mérési eredményeket. A mért koncentrációk relatív eltérése az elméleti értéktől nem haladta meg a benzolos oldatok esetében talált relatív eltéréseket, amiből az következett, hogy az oldószercsere a mérési hiba nagyságát sem befolyásolta jelentősen. Az eredmények alapján a módszer precizitását elfogadhatónak találtam.

Összességében a fenti vizsgálatok elvégzésével igazolást nyert, hogy a kifejlesztett mérési metodika megbízhatóan alkalmazható a TDG mikrodializátumokban történő mennyiségi meghatározására a TDP kísérő standardként történő alkalmazásával.

A modell fejlesztésének következő lépése a TDG mikrodialízissel történő kinyerésének tanulmányozása volt. A mikrodialízissel történő mintavétel során nem alakul ki az analit egyensúlyi koncentrációja az extracelluláris folyadék és a dializáló oldat között, utóbbi folyamatos áramlása miatt. Ezért a dializátumokban mért analit-koncentráció az interstíciumban szabad formában lévő analit valódi töménységének adott hányada, amely az analit fizikai és kémiai tulajdonságaitól (molekulatömeg, termodinamikai aktivitás, vízoldékonyság, sav-bázis karakter, fehérjekötés mértéke); a mintavételi rendszer jellemzőitől (membrán anyaga, pórusmérete és felületének nagysága, a dializáló oldat összetétele és áramlási sebessége, a katéter geometriai jellemzői); valamint a vizsgált szövetre jellemző paraméterektől és folyamatoktól (örvénydiffúziós paraméterek, helyi véráramlás, szöveti metabolizmus) függ. Az analit koncentráció pontos becsléséhez ezért az adott szöveti körülmények között meg kell határozni az ún. kinyerési hányodost (RR%) [145]. Elsőként a dializáló oldat áramlási sebessége és a TDG kinyerési hányadosa közötti összefüggését vizsgáltam. A kinyerési hányados folyamatosan kevertetett, híg oldatban a közegben és a dializáló oldatban uralkodó hidrosztatikus nyomás állandósága esetén annak koncentrációjától és a diffúzió irányától nem, az áramlási sebességtől azonban függ [162]. Ezt a TDG-re vonatkozóan *in vitro* kísérletben

igazoltam. A kapott RR% értékek csekély szórása a kinyerés jó reprodukálhatóságát jelezte. Az analitikai módszer mintatérfogat-igénye, a tervezett kísérleti időtartam és az analitikai műszer mérési kapacitásának figyelembe vételével a 2,0 µl min^{-1} áramlási sebesség volt optimális. A TDG magas kinyerési hányadosa miatt a további vizsgálatokhoz ezt az áramlási sebességet választottam.

Az *in vitro* kinyerési hányados jellemzően az *in vivo* érték legfeljebb két-háromszorosa [145], ezért a fenti vizsgálatban kapott értékek arra utaltak, hogy az *in vivo* kísérletekben a TDG koncentráció subcutan mikrodialízissel, a kifejlesztett analitikai módszer segítségével követhető. Ezt a sejtést az *in vivo* kalibráció eredménye igazolta.

In vivo kísérletek során győződtem meg arról, hogy a TDG az SM bőrfelszínről történő penetrációját követően subcutan mikrodializátumokban kimutatható. A kísérletekben nagy dózisban vittem fel a harcanyagot és a cseppet a felszívódás elősegítése érdekében üveglappal fedtem (ti. az üveg nem abszorbeálja az SM-et [163]). A kapott koncentráció-profilok és a görbeillesztés eredménye arra utaltak, hogy a TDG megjelenése összefüggésben áll az SM felszívódásával.

Az SM bőrfelszínre jutó mennyisége és a TDG subcutan koncentrációjának alakulása közötti kapcsolatot 1-5 µl SM dózistartományban vizsgáltam. Az SM cseppet ezekben a kísérletekben műanyag kupakkal fedve gőztartályt létesítettem. Ezt a módszert gyakran alkalmazzák folyadékok és gőzök perkután abszorpciójának vizsgálatára [164]. *Dalton* és mtsai kimutatták, hogy az SM különböző gőztartályok légterében széles térfogattartományban, legfeljebb 2 perc alatt konstans koncentrációt ér el [165]. Erre az adatra támaszkodva az SM gőztartályon belüli egyensúlyi koncentrációjának kialakulását pillanatszerűnek tekintettem.

E kísérletek során mindegyik kapott koncentráció-profilra jellemző volt, hogy (1) a TDG legtöbbször 20, de legfeljebb 40 percen belül megjelent és ezt követően a kísérlet végéig kimutatható maradt, bizonyítva, hogy a harcanyag rendkívül gyorsan eljut a mély rétegekig, és a bőrben gyorsan átalakul; (2) a kísérlet kezdeti szakaszában a koncentrációk emelkedtek, míg maximális értéket vagy platót értek el (esetleg az emelkedés a kísérlet végéig megmaradt: ez túlnyomóan 3,0 és 5,0 µl SM alkalmazásakor volt jellemző); valamint (3) a teljes mintavételi időszakot tekintve az adatok egy kísérleten belül látható trendet követtek. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az SM felszívódását követően a TDG képződése azonnal megkezdődik, és meghatározott kinetika szerint alakul a bőrbe jutó SM mennyiségével összefüggésben.

Az, hogy egy állatban két párhuzamos kísérlet kerülhetett végrehajtásra (*7. ábra*),

felvetette annak lehetőségét, hogy védőkészítményt csak az egyik, SM-et azonban mindkét ponton alkalmazva a készítmény hatékonyságát a két vizsgálatban kapott eredményekből kiindulva ítéljem meg. Ennek akkor lett volna jelentősége, ha az egyedek bőrének anatómiai különbségei a kísérleti adatok varianciáját számottevően befolyásolják. Vizsgálataim eredményei ezzel szemben azt mutatják, hogy az azonos állatban végzett kísérletek adatainak eltérése számos esetben nem volt kisebb, mint mikor azokat más állatokban kapott eredményekhez hasonlítottam. Az állatok saját maguk kontrolljaként történő alkalmazásának lehetőségét ezért elvetettem.

Az SM dózis és a TDG koncentrációk közötti összefüggést modellfüggetlen toxikokinetikai jellemzők elemzésével vizsgáltam. Az átlagos TDG koncentráció-profilok alakja összhangban volt a dózis változásával: 1,0 és 2,0 µl SM felvitele után a görbék 100 illetve 160 percnél maximumot adtak, míg 3,0 és 5,0 µl SM dózisnál folyamatos koncentráció-emelkedést észleltem. Utóbbi dózisok esetében a kapott átlagos koncentrációk és azok szórásainak nagy hasonlósága arra utal, hogy a TDG megjelenési sebessége a dializátumokban 3,0 µl SM felvitelekor statisztikusan eléri maximumát, így az ennél nagyobb dózisok alkalmazására a modell nem érzékeny. Bár a $\underline{c}_{0\text{-}20}$ érték nőtt a dózis emelésekor (3,0 µl-ig), a dózis és a $\underline{c}_{0\text{-}20}$ érték közötti összefüggés nem tükrözött egyenes arányosságot, ráadásul a különbség az 1,0 és 2,0 µl SM alkalmazásakor kapott értékekben csekély volt. 5,0 µl SM felvitelét követően, figyelemre méltó módon, a $\underline{c}_{0\text{-}20}$ még a 2,0 µl dózis esetében kapottnál is kisebb volt. Ennek okát nem tártam fel, ám lehetséges magyarázatnak tartom, hogy a vizsgálati rendszer ebben az időszakban még nem érte el az egyensúlyi állapotát. A $\underline{t}_{max;0\text{-}360}$ szintén kis mértékben emelkedett a dózis növelésekor, azonban 2,0 és 5,0 µl felvitt térfogat között valódi emelkedésről nem beszélhetünk. A $\underline{c}_{0\text{-}20}$ és $\underline{t}_{max;0\text{-}360}$ értékeket ezért nem tartom megfelelő értékelési szempontnak. Az 1,0-3,0 µl SM dózistartományban kapott $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$, $\underline{AUC}$ és $\underline{c}_{max}$ értékek közötti lineáris összefüggések azonban igazolták a penetráló SM és a subcutan TDG koncentrációk közötti kapcsolatot. Az összefüggések egyúttal arra engedtek következtetni, hogy a védőkészítmények vizsgálatához 2,0 µl SM dózis alkalmazása célszerű, mivel bőrfelszíni mennyiségének vagy felszívódási kinetikájának megváltozására ez a vizsgálati eljárás érzékeny.

A különböző kísérletek során azonos időintervallumban kapott értékek jelentős eltéréseket mutattak, és az egyes koncentráció-profilok alakja is sokszor különböző volt. Az azonos időintervallumban kapott koncentrációértékek közötti különbség hátterében elméletileg számos jelenség állhat, összefüggésben (a) az SM tisztaságával, hőmérsékletével, (b) az SM-csepp felvitelének módszerével, (c) a bőr anatómiai

sajátosságaival, (d) a mintavételi módszerrel, (e) az SM és a bőrelemek interakciója következtében megváltozó fizikai, kémiai, élettani környezettel, végül (f) a mintaelőkészítési és mérési körülményekkel. A kísérletek tervezésekor törekedtem az eljárások reprodukálhatóságának biztosítására, egyes tényezők reprodukálhatóságát pedig elővizsgálatok során meghatároztam.

A felviteli módszer megfelelő reprodukálhatóságát az eljárások gondos megtervezésével és végrehajtásával biztosítottam. Feltételezésem szerint a tapasztalt eltérésekhez hozzájárulhattak a bőrön a borotválás során ejtett mikrosérülések, ezt azonban részletesen nem vizsgáltam.

A bőr anatómiai sajátosságaiban egyedenként, sőt akár felviteli pontonként jelentős változatosság mutatkozhat. A s. corneum a borotválás során a szövettani metszetek tanúsága szerint legnagyobbrészt eltávolításra került, ezért ez a réteg nagyon csekély mértékben játszhatott szerepet a felszívódásban. Az élő bőrkomponensek (elsősorban a hypodermis) vastagságában fennálló eltérések azonban különbségeket eredményeznek a kinetikai kompartmentek méretében, illetve a bőrfelszín és a katéter közötti diffúziós távolságban (a katéter minden esetben a hypodermis és a subcutan fascia határán helyezkedett el). Eltérés lehet még az adott területen található szőrtüszők számában, valamint a bőr perfúziós statusában. Utóbbi jelentősége kiemelkedő, mivel a penetráló SM eltávolításában a keringés döntő szerepet játszik [61]. Ismert, hogy a ketamin-anaesthesia, az SM penetrációja és a mikrodialízis katéter bevezetése egyaránt hatással van a helyi cirkulációra [108,166,167]. *Riviere* és *Williams* felhívják a figyelmet arra, hogy a bőr véráramlásának szabályozása más szerveknél összetettebb módon történik, annak termoregulációs funkciója miatt. A testhőmérséklet állandó értéken tartása a bőr teljes véráramlásának szabályozásával, továbbá a vér és a szövetek közötti anyagáramlást biztosító („cserélő") kapillárisok és a bőrben nagy számban megtalálható shunt-kapillárisok véráramlásának folyamatos újraszabályozásával történik. A vegyületek által megtett diffúziós távolság így nehezen reprodukálható [168]. Megoldás lehet a „cserélő" kapillárisok véráramlásának folyamatos monitorozása és annak figyelembe vétele a mérési eredmények kiértékelésekor, erre azonban vizsgálataimban nem tértem ki.

Az észlelt különbségekhez hozzájárulhatnak a mintavételi módszerrel kapcsolatos technikai sajátosságok is, melyek közül két, *in vivo* mikrodialízis vizsgálatok során nehezen elkerülhető jelenséget tartok fontosnak kiemelni. Közülük az első a bőrben nyugvó katéter eltömődésének lehetősége, ami a bevezetés eredményeként fellépő, vagy az SM által kiváltott szöveti válasz során következhet be. Az eltömődést szöveti elemek,

vándorló sejtek és az extracelluláris térbe kerülő fehérjék okozhatják reverzibilis vagy irreverzibilis módon. A katéterek *in vitro* utóvizsgálatának célja utóbbi meghatározása volt, a reverzibilis eltömődés viszont nem ellenőrizhető megbízhatóan. A másik gyakran fellépő probléma, hogy a katéter bevezetésekor, az annak mentén fellépő enyhe vérzés után hematoma marad vissza. Az inzerciós pontnál látható volt elhanyagolható mértékű vérzés, ez azonban legfeljebb 15 perc után megszűnt. Hematoma a katéter körül jelent meg, és legfeljebb 60 perc alatt felszívódott.

Korábbi vizsgálatokban azt találták, hogy a patkányok bőrében az élettani viszonyok 30 perc alatt helyreállnak [169] Vizsgálataim végén (a katéter bevezetése után 440 perccel) készült szövettani metszetek egy esetben sem mutattak a katéter körül vérömlenyt, azonban neutrofil infiltrációt igen. *Ault* és mtsai vizsgálataiban lymphocyták csak a bevezetést követő 6. óra végén jelentek meg a katéter környezetében, jelenlétük azonban legalább további 18 órán át nem befolyásolta az általuk vizsgált vegyület (5-fluoruracil) kinyerési hányadosát [125]. A kialakuló szöveti válasz és a kinyerési hányados összefüggésének tisztázása mindamellett további vizsgálatokat igényel.

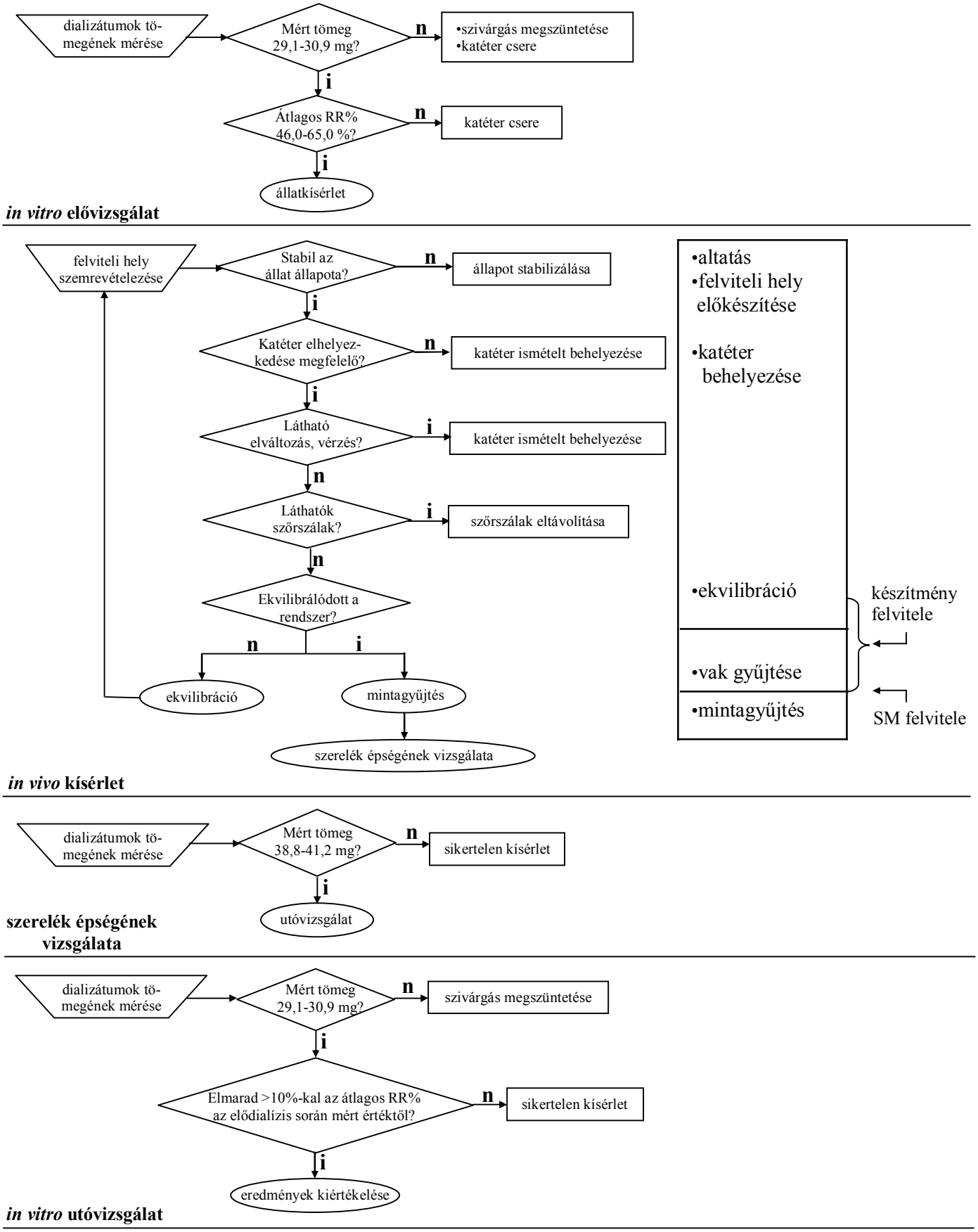
Az SM bejutása intenzív szöveti választ vált ki, aminek során a keletkező ödéma miatt megváltozik a szöveti hidrosztatikai nyomás, kedvezőbbé válnak az SM hidrolízisének feltételei, ugyanakkor megnő a diffúziós úthossz és számolni kell a hígulás és a szöveti diffúziós nyomás hatásával is.

Hozzájárul a vizsgálatok eredményei közötti eltérésekhez a mintaelőkészítési és mérési bizonytalanság is, amely fentebb részletes vizsgálatra és tárgyalásra került.

Az eredményekben tapasztalt jelentősebb különbségek fellépése az SM bőrfelszínről történő felszívódásával kapcsolatban másoktól származó megfigyelésekkel is egybehangzó. *Papirmeister* és mtsai a mélyebb bőrrétegeket elérő SM mennyiségben – azonos dózis alkalmazása estén is – nagy eltéréseket figyeltek meg [62], ami a képződő TDG mennyiségében is szükségszerűen tükröződik. *Riviere* és mtsai ^{14}C-vel jelölt SM-mel végzett kísérleteikben szintén jelentős szórást figyeltek meg az észlelt radioaktivitás intenzitásában [60,170]. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a katéter környezetében keletkező TDG mennyiségében egyedenként jelentős eltérésekkel kell számolni.

TDG bőrfelszínre történő felvitelével végzett kísérleteim eredményei azt igazolták, hogy a felszínesebb bőrrétegekben képződő analit egy része a katéter környezetébe eljut. A kapott görbék alakja ezekben a kísérletekben egymással nagyobb egyezést mutatott, ami – kiemelve a gyors felfutást követően a mintavételi időszak végéig tartó, platót elérő vagy azt megközelítő szakaszt – a szabályozott hatóanyagleadási rendszerek bőrfelszíni

alkalmazásakor kapott telítési görbékhez volt hasonló. A hasonlóság – tekintve, hogy a TDG csepp a bőrfelszínen a kísérleti időszak végén minden esetben látható volt – feltételezésem szerint valódi. Mindazonáltal az egyes kísérletekben kapott c_{max} és AUC értékekben megfigyelt jelentős különbségek azt jelzik, hogy a TDG kinetikai tulajdonságait leíró paraméterek és konstansok a bőrben szintén jelentős eltéréseket mutathatnak. Ez a jelenség legalábbis részben a kísérleti módszerrel függ össze. Ezt támasztja alá, hogy *Benfeldt* és mtsai szalicilsavval végzett vizsgálataikban hasonló megfigyeléseket közöltek [120].



23. ábra: A kifejlesztett vizsgálati modell elvi vázlata.

A módszerfejlesztés utolsó lépéseként azt vizsgáltam, hogy a modell alkalmas-e bőrfelszíni készítmények hatékonyságának megítélésére. A készítmények kiválasztásakor célom olyan összetételek kipróbálása volt, melyek komponenseinek hatékonyságát korábbi vizsgálatokban igazolták. A HP01 több olyan összetevőt is tartalmaz, amellyel az SM biológiai rendszerekben reakcióba lép, annak detoxifikálást eredményezve; hatékonyságát az SM elleni védelem céljából mindazonáltal nem vizsgálták korábban. A HP02 perfluorpropilénoxid lineáris polimerjeinek elegye, melyet több, az SM-mel szemben hatékony fizikai barriert képező összetétel tartalmazott [79]. A HP03 készítmény hasonló a *Kenar* és mtsai által kipróbált védőszerhez, mely a bőrben az SM által kiváltott fekélyesedést hatékonyan csökkentette [78]. Az általuk közölt összetételben is szereplő cink-oxid nanorészecske formájában PFPE/PTFE alapú összetételek komponenseként is ismert [83].

A HP03-mal történő előkezelés egyik vizsgált jellemző szignifikáns csökkenését sem eredményezte. Nem volt változás az egyedi és átlagos TDG koncentráció-profilok lefutásában sem. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a cink-oxid csak akkor adszorbeálja hatékonyan az SM-et, ha nanoméretű szemcsék formájában van a készítményben diszpergálva.

HP02 felvitelével végzett kísérleteim során az $\underline{AUC}$, $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ és $\underline{c}_{max}$ szignifikáns csökkenése a polimerelegy mások [53,79] által megállapított hatékonyságát igazolta. A HP02 a TDG megjelenését a dializátumokban számottevően, a kipróbált készítmények közül egyedüliként késleltette. A TDG koncentráció-profilok reprodukálható, folyamatos emelkedése, valamint az átlagos koncentráció-értékek 60. és 360. perc között nulladrendű kinetika szerint történő növekedése szabályozott SM-leadásra utal. A HP02 az SM felszívódási sebességét a teljes mintavételi időszakban jelentősen mérsékelte, azonban az $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ csökkenése – a TDG késleltetett megjelenésével összhangban – különösen markáns volt. Az eredmények alátámasztják, hogy a HP02 és az SM között kémiai reakció nem játszódik le.

A HP01 készítménnyel végzett vizsgálatok során a TDG öt elvégzett kísérlet közül háromban az első (a másik két alkalommal pedig a 20-40. perc között gyűjtött) dializátumokban már kimutatható volt, a készítmény tehát az SM felszívódását nem késleltette. Az egyedi és átlagos koncentráció-profilok lefutása az 1,0 és 2,0 µl SM felvitele után kapott profilokéhoz hasonlóan alakult, ami azt jelzi, hogy a készítmény jelenléte a felszívódás kinetikájára más módon sem volt hatással. Az $\underline{AUC}$, $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ és $\underline{c}_{max}$ szignifikáns, hasonló (57,5%; 51,7% és 60,6% mértékű) csökkenése mindazonáltal arra

enged következtetni, hogy számottevően kevesebb SM jutott be, mint 2,0 µl SM előkezelés nélkül történő felvitele esetében. Összefoglalva, az eredmények azt mutatják, hogy a HP01 reaktív komponensei az SM egy részét annak bőrfelszínnel történő érintkezése előtt elbontották, azonban a készítmény fizikai barriert nem képezett.

Az eredmények azt igazolják, hogy a modell alkalmas annak kimutatására, ha egy készítmény az SM bőrfelszínről történő felszívódását mérsékeli. Az $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$, az $\underline{AUC}$ és a $\underline{c}_{max}$ változásának vizsgálata lehetővé teszi, hogy megjósoljuk a készítmény hatásmechanizmusát. Tapasztalatom szerint a kénmustár s. corneumtól történő fizikai elszigetelése a felszívódás kinetikáját megváltoztatja. Amíg a védőrétegen az SM át nem hatol, TDG nem jelenik meg a dializátumban, ezért elsősorban az $\underline{AUC}_{0\text{-}60}$ értékében várható jelentős csökkenés. Ezzel szemben a harcanyagot hatékonyan detoxifikáló összetételek várhatóan mindhárom paramétert hasonló mértékben csökkentik, míg a felszívódás kinetikája nem feltétlenül változik meg. A HP01 és HP02 készítmények felvitelét követően kapott görbék alakulásából – a mások által javasoltakkal összhangban – végül az is következik, hogy a legnagyobb fokú védelmet fizikai és kémiai úton ható összetevőket egyaránt tartalmazó készítmények biztosíthatják.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kísérleti munkám során *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel optimalizáltam a mikrodialízis technikát a patkány bőr subcutan szöveti tér vizsgálatára.

2. Mikroanalitikai módszert dolgoztam ki a kénmustár perkután penetrációjának jellemzésére alkalmas specifikus analit, a tiodiglikol vizes fázisból történő kimutatására.

3. Együttműködésben végzett szövettani vizsgálattal jellemeztem a kénmustár patkánybőrre gyakorolt hatását.

4. *In vivo* altatott patkány modellen, mikrodialízis segítségével vizsgáltam a kénmustár perkután penetrációját az idő és a koncentráció függvényében. Félkvantitatív összefüggéseket tártam fel a bőrfelszínre felvitt kénmustár mennyisége és a subcutan tiodiglikol koncentráció-idő görbékből számítható toxikokinetikai jellemzők között. Igazoltam, hogy a kifejlesztett modell alkalmas a kénmustár bőrfelszínről történő felszívódását megakadályozó profilaktikus készítmények vizsgálatára.

5. Egy korábban kénmustár elleni védelemre nem alkalmazott, nanorészecskéket és antioxidánsokat tartalmazó bőrvédő készítményről igazoltam, hogy – feltehetően kémiai kölcsönhatás révén – akadályozza a kénmustár bőrfelszínről történő felszívódását.

6. AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁRA VONATKOZÓ AJÁNLÁSOK

Javaslom a kifejlesztett kémiai analitikai módszer alkalmazását:

- tiodiglikol csekély (akár 15 µl) térfogatú biológiai mintákban (mikrodializátumok, vér, vizelet, nyál, szöveti extracelluláris folyadék) történő mennyiségi meghatározására kénmustárral szembeni expozíció igazolása céljából;
- egyéb mustár típusú hólyaghúzó vegyületek hidrolízis termékeinek mikrodializátumokból és egyéb, csekély (akár 15 µl) térfogatú biológiai mintákból történő mennyiségi meghatározására a mustár típusú hólyaghúzó vegyületekkel szembeni expozíció igazolása céljából.

Javaslom a kifejlesztett állatkísérletes modell alkalmazását:

- a kénmustár bőrfelszínről történő felszívódását megakadályozó védőkészítmények hatékonyságának *in vivo* vizsgálatára és összehasonlítására;
- a kénmustár felszívódásának, valamint az azt meggátló védőkészítmények hatékonyságának többszempontú vizsgálatára a mások által kifejlesztett *in vivo* modellekkel történő kombináció révén;
- mustár típusú hólyaghúzó vegyületek bőrfelszínről történő felszívódásának, valamint az azt megakadályozó védőkészítmények hatékonyságának vizsgálatára hidrolízis termékeik subcutan extracelluláris koncentrációjának monitorozása révén;
- egyéb vegyi harcanyagok bőrfelszínről történő felszívódásának, valamint az azt megakadályozó védőkészítmények hatékonyságának vizsgálatára alkalmas analit subcutan extracelluláris koncentrációjának monitorozása révén;
- mérgek bőrfelszínről történő felszívódásának többszempontú vizsgálatához kifejlesztendő modellek részeként.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁVAL KAPCSOLATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Külföldi lektorált folyóiratban megjelent közlemények:

1. Fűrész J, Gachályi A, Kocsis G, **Karvaly G**, Boldis O: Mass selective detection of amphetamine, metamphetamine and related compounds in urine. *J Chrom Sci* **42** (2004); 259-63.

2. **Karvaly G**, Gachályi A, Fűrész J: Quantitative analysis of the sulfur mustard hydrolysis product thiodiglycol (2,2'-sulfobisethanol) in in vivo microdialysates using gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detection. *J Chrom Sci* **43** (2005); 319-23.

3. **Karvaly G**, Gachályi A, Fűrész J: Application of *in vivo* microdialysis for studying the efficacy of protective preparations against sulfur mustard penetrating the skin. *J Appl Toxicol* **28** (2008); 21-6.

Magyarországi lektorált folyóiratban megjelent közlemények:

1. **Karvaly G**, Halász L, Fűrész J, Solymosi J: Szaddam Huszein vegyi fegyverei. *Hadtudomány* **13** (3-4) (2003); 36-45.

2. **Karvaly G**, Fűrész J, Gachályi A, Mátyus M, Farkas R, Kocsis Gy, Némethné Karpova N, Boldis O: Egyéni mentesítés enzimek alkalmazásával mérgező harcanyagokkal szembeni expozíciót követően. *Honvédorvos* **56** (2004); 315-26.

3. **Karvaly G**, Gachályi A, Boldis O, Mátyus M, Kocsis Gy, Némethné Karpova N, Fűrész J: A fegyverként alkalmazható toxinok méregtani és bioanalitikai vonatkozásai. *Honvédorvos* **56** (2003); 62-77.

4. **Karvaly G**, Gachályi A, Boldis O, Mátyus M, Kocsis Gy, Némethné Karpova N, Fűrész J: A kénmustár sorsa a szervezetben. *Honvédorvos* **56** (2003); 78-95.

Tudományos konferencián bemutatott ill. elhangzott előadások:

1. **Karvaly G**, Boldis O, Némethné Karpova N, Kocsis Gy, Mátyus M, Farkas R, Gachályi A, Fűrész J: A kénmustár minőségi és mennyiségi kimutatása biológiai mintákból. Szóbeli előadás. MH Orvosi Tudományos Tanács Tudományos Konferenciája, Budapest, 2004. március 17.

2. **Karvaly G**, Farkas R, Boldis O, Némethné Karpova N, Gachályi A, Fűrész J: Tiodiglikol mennyiségi meghatározása *in vivo* mikrodializátumokban gázkromatográffal kapcsolt pulzáló lángfotometriás detektor (PFPD) segítségével. Poszter előadás, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Hévíz, 2004. szeptember 22-24.

3. **Karvaly G**, Gachályi A, Fűrész J: Az *in vivo* mikrodialízis alkalmazásának lehetősége a kénmustárral szembeni expozíció tanulmányozásában. Szóbeli előadás. MH Orvosi Tudományos Tanács Tudományos Konferenciája, Budapest, 2005. március 17.

4. **Karvaly G**, Jäckel M, Némethné Karpova N, Gachályi A, Fűrész J: Komplex *in vivo* modell a bőrfelszínre jutó kénmustár penetrációjának tanulmányozására mikrodialízis technika és szövettani vizsgálatok segítségével. Szóbeli előadás. MH Orvosi Tudományos Tanács Tudományos Konferenciája, Budapest, 2006. június 14.

5. **Karvaly G**, Némethné Karpova N, Gachályi A, Fűrész J: *In vivo* modell a bőrfelszínre felvitt kénmustár penetrációjának tanulmányozására mikrodialízis technika segítségével. Szóbeli előadás. Tox'2006 Konferencia, Magyar Toxikológusok Társasága, Galyatető, 2006. október 6.

FELHASZNÁLT IRODALOM

[1] Treble A: Chemical and biological weapons: possession and programs past and present. Center for Nonproliferation Studies, Monterey, 2002. http://cns.miis.edu/research/cbw/possess.htm (2008. április 15.)

[2] Smart JK: History of chemical and biological warfare: an American perspective. In: Zajtchuk R, Bellamy RF (eds): *Textbook of Military Medicine Part 1: Warfare, Weaponry, and the Casualty. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.* Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington DC, 1997. p. 9-86.

[3] Nagao M, Takatori T, Matsuda Y, Nakajima M, Iwase H, Iwadate K: Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway. *Toxicol Appl Pharmacol* **144** (1997); 198-203.

[4] Morita H, Yanagisawa N, Nakajima T, Shimizu M, Hirabayashi H, Okudera H, Nohara M, Midorikawa Y, Mimura S: Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* **346** (1995); 290-3.

[5] (szerző ismeretlen) Mr Alexander Litvinenko – Health Protection Agency Statement. London, 2006. www.hpa.org.uk/hpa/news/articles/press_releases/2006/241106_litvinenko.htm. (2006. november 26.)

[6] Menon B: *Disarmament: a basic guide.* Egyesült Nemzetek Szervezete, New York, 2001.

[7] Treaty on the Non-Proliferation of Nuclear Weapons. http://disarmament.un.org/wmd/npt/npt%20authenticated%20text-English.pdf (2007. december 19.)

[8] Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction. www.opbw.org/convention/documents/btwctext.pdf (2007. december 19.)

[9] Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on Their Destruction. www.opcw.org/docs/cwc_eng.pdf (2007. december 19.)

[10] O'Neil A: Terrorist use of weapons of mass destruction: how serious is the threat? *Aust J Intern Affairs* **57** (2003); 99-112.

[11] Bunn M, Bunn G: Reducing the threat of nuclear theft and sabotage. IAEA Symposium paper SM-367-4-08. Bécs, 2001. október 30. www.iaea.org/NewsCenter/Features/Nuclear_Terrorism/Bunn02.pdf (2007. október 25.)

[12] Bokhari S: The United States dealings with nuclear terrorism: cooperation from prevention. *ISYP J Sci World Aff* **2** (2006); 29-41.

[13] Zanders JP: Assessing the risk of chemical and biological weapons proliferation to terrorists. *Non-Prolif Rev* **6** (1999); 17-34.

[14] U.S. Congress, Office of Technology Assessment: *Proliferation of weapons of mass destruction. Assessing the risks.* OTA-ISC-559, U.S. Government Printing Office, 1993. www.au.af.mil/au/awc/awcgate/ota/9341.pdf (2007. december 19.)

[15] Danish Environmental Protection Agency: Report No. 8 on Dumped Chemical Munitions in the Baltic Sea to the Helsinki Commission. Helsinki Commission Response Group 7th Meeting. Gdynia, Lengyelország, 2006 szeptember 13-15. http://sea.helcom.fi/dps/docs/documents/Response%20Group/HELCOM%20RESPONSE%208,%202007/14_2_CHEMU.pdf (2007. december 19.)

[16] Mazurek M, Witkiewicz M, Popiel S, Sliwakowski M: Capillary gas chromatography-atomic emission spectroscopy-mass spectrometry analysis of sulphur mustard and transformation products in a block recovered from the Baltic Sea. *J Chromatogr A* **919** (2001); 133-45.

[17] Ruhl CM, Park SJ, Danisa O, Morgan RF, Papirmeister B, Sidell FR, Edlich RF, Anthony LS, Himel HN: A serious skin sulfur mustard burn from an artillery shell. *J Emerg Med* **12** (1994); 159-66.

[18] Dacre JC, Goldman M: Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharm Rev* **48** (1996); 289-326.

[19] (szerző ismeretlen) Japan toxic experts visit to Qiqihar. *China Daily*, 2003. augusztus 15. www.chinadaily.com.cn/en/doc/2003-08/15/content_254970.htm (2007. december 19.)

[20] Defence Capabilities Initiative. NATO press release NAC-S(99)69. Észak-Atlanti Szerződés Szervezete, 1999. http://www.nato.int/docu/pr/1999/p99s069e.htm (2007. november 13.)

[21] Prague Summit Declaration. A tagállamok kormány- és államfőinek nyilatkozata a NATO 2002. november 21-22. között tartott csúcsértekezletén. NATO press release (2002)127. http://www.nato.int/docu/pr/2002/p02-127e.htm#pcc (2007. február 13.)

[22] (szerző ismeretlen) Defence Against Terrorism (DAT) Programme. Countering terrorism with technology. www.nato.int/issues/dat/index.html (2007. november 13.)

[23] Riga Summit Declaration. A tagállamok kormány- és államfőinek nyilatkozata a NATO 2006. november 28-29. között tartott csúcsértekezletén. Riga, Lett Köztársaság. www.nato.int/docu/pr/2006/p06-150e.htm (2007. július 16.)

[24] Halász L, Grósz Z: A tömegpusztító fegyverek fajtái, jellemzői. In: *ABV-védelem*. Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem, 2001. p. 5-8.

[25] Takafuji ET, Kok AB: The chemical warfare threat and the military healthcare provider. In: Zajtchuk R, Bellamy RF (eds): *Textbook of Military Medicine Part 1: Warfare, Weaponry, and the Casualty. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.* Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington DC, 1997. p. 111-128.

[26] Saladi RN, Smith E, Persaud AN: Mustard: a potential agent for chemical warfare and terrorism. *Clin Exp Dermatol* **31** (2006); 1-5.

[27] Westing AH: *Weapons of mass destruction and the environment.* Taylor and Francis, 1977. p. 32-3.

[28] Szinicz L: History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* **214** (2005); 167-181.

[29] Gosden CM: The 1988 chemical weapons attack on Halabja, Iraq. In: Alexander Y, Hoenig M (eds): *Super terrorism: biological, chemical and nuclear.* Transnational Publishers, Ardsley, 2001.

[30] Department of Defense: Militarily Critical Technologies List (MCTL). Part II: Weapons of Mass Destruction Technologies. Section I – Means of Delivery Technology. Office of the Under Secretary of Defense for Acquisition and Technology. Washington, DC, 1998. www.fas.org/irp/threat/mctl98-2/p2sec01.pdf (2007. december 19.)

[31] Department of Defense: Militarily Critical Technologies List (MCTL) Part II: Weapons of Mass Destruction Technologies. Section IV: Chemical Weapons Technology. Office of the Under Secretary of Defense for Acquisition and Technology. Washington, DC, 1998. www.fas.org/irp/threat/mctl98-2/p2sec04.pdf (2007. december 19.)

[32] Sartori M: Sulphur compounds. In: *The war gases. Chemistry and analysis.* D. Van Nostrand Co. Inc., 1939. p. 211-270.

[33] Pechura CM, Rall DP: Chemistry of sulfur mustard and Lewisite. In: *Veterans at risk: The health effects of mustard gas and Lewisite.* National Academy Press, Washington, DC, 1993. p. 71-72.

[34] Newmark J, Langer JM, Capacio B, Barr J, McIntosh RG: Liquid sulfur mustard exposure. *Mil Med* **172** (2007); 196-8.

[35] Iyriboz Y: A recent exposure to mustard gas in the United States: clinical findings of a cohort (n=247) 6 years after exposure. *MedGenMed* **6** (2004); 4.

[36] Sidell FR, Urbanetti JS, Smith WJ, Hurst CG: Vesicants. In: Zajtchuk R, Bellamy RF (eds): *Textbook of Military Medicine Part 1: Warfare, Weaponry, and the Casualty. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.* Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington DC, 1997. p. 197-228.

[37] Robinson JP: The developing technology of CBW. In: *The problem of chemical and biological warfare. Volume I: The rise of CB weapons.* Stockholm International Peace Research Institute, Stockholm, 1971. p. 25-124.

[38] Robinson JP: Instances and allegations of CBW, 1914-1970. In: *The problem of chemical and biological warfare. Volume I: The rise of CB weapons.* Stockholm International Peace Research Institute, Stockholm, 1971. p. 125-230.

[39] Safarinejad MR, Moosavi SA, Montazeri B: Ocular injuries caused by mustard gas: diagnosis, treatment, and medical defense. *Mil Med* **166** (2001); 67-70.

[40] Physicians for Human Rights: *Winds of Death: Iraq's use of poison gas against its Kurdish population.* Physicians for Human Rights, Boston, 1989.

[41] Watson AP, Griffin GD: Toxicity of vesicant agents scheduled for destruction by the chemical stockpile disposal program. *Environ Health Perspect* **98** (1992); 259-80.

[42] Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD: Mechanisms of injury. II. Chemical reactions of sulfur mustards. In: *Medical Defense Against Mustard Gas: Toxic Mechanisms and Pharmacological Implications.* CRC Press, Boca Raton, 1991. p. 91-122.

[43] Karvaly G, Fűrész J: Vegyi fenyegetettség. Mustár típusú vegyi anyagok hatásmechanizmusa, új ismeretek, terápiás lehetőségek. Pályamunka a Honvédelmi Minisztérium Oktatási és Tudományos Főosztály részére. Budapest, 2005.

[44] Graham JS, Chilcott RP, Rice P, Milner SM, Hurst CG, Mallner BI: Wound healing of cutaneous sulfur mustard injuries: strategies for the development of improved therapies. *J Burns Wounds* **4** (2007); 1-45.

[45] Balali-Mood M, Hefazi M: The clinical toxicology of sulfur mustard. *Arch Iranian Med* **8** (2005); 162-79.

[46] Willems JL: Clinical management of mustard gas casualties. *Ann Med Milit Belg* **3** (1989); S1-S61.

[47] Bennion SD, David-Bajar K: Cutaneous reactions to nuclear, biological and chemical warfare. In: Zajtchuk R, Bellamy RF (eds): *Textbook of Military Medicine Part 3: Military Dermatology.* Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington DC, 1994. p. 69-110.

[48] Kehe K, Szinicz L: Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* **30** (2005); 198-209.

[49] Smith KJ: The prevention and treatment of cutaneous injury secondary to chemical warfare agents. *Dermatol Clin* **17** (1999); 41-60.

[50] Rice P, Brown RFR, Lam DGK, Chilcott RP, Bennett NJ: Dermabrasion – a novel concept in the surgical management of sulphur mustard injuries. *Burns* **26** (2000); 34-40.

[51] Zhai H, Maibach HI: Barrier creams. In: Zhai H, Maibach HI (eds.): *Dermatotoxicology 6th ed.* CRC Press, Boca Raton, 2004., p. 507-16.

[52] Chilcott RP, Dalton CH, Ashley Z, Allen CE, Bradley ST et al: Evaluation of barrier creams against sulphur mustard: (II) In vivo and in vitro studies using the domestic white pig. *Cutan Ocul Toxicol* **26** (2007); 235-47.

[53] Liu DK, Wannemacher RW, Snider TH, Hayes TL: Efficacy of the topical skin protectant in advanced development. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S41-S45.

[54] Kadar T, Fishbeine E, Meshulam J, Sahar R, Amir A, Barness I: A topical skin protectant against chemical warfare agents. *Isr Med Assoc J* **5** (2003); 717-9.

[55] Cohen DE, Rice RH: Toxic Responses of the skin. In: Klaassen CD (ed): *Casarett and Doull's Toxicology 6th ed.* McGraw-Hill, 2001. p. 653.

[56] Maibach H, Patrick E: Dermatotoxicology. In: Hayes AW (ed): *Principles and methods of toxicology 4th ed.* Taylor and Francis, 2001. p. 1039-84.

[57] Monteiro-Riviere NA: Comparative anatomy, physiology and biochemistry of mammalian skin. In: Hobson DW (ed.): *Dermal and Ocular Toxicology: Fundamentals and Methods.* CRC Press, Boca Raton, 1991. p. 3-71.

[58] (szerző ismeretlen) Uniformed Services University of the Health Sciences. www.usuhs.mil/pat/nlhist/skinthin.htm (2007. július 10.)

[59] Roberts MS, Walters KA: The relationship between structure and barrier function of skin. In: Roberts MS, Walters KA (eds): *Dermal absorption and toxicity assessment*. Marcel Dekker, New York, 1998. p. 1-42.

[60] Riviere JE, Brooks JD, Williams PL, Monteiro-Riviere NA: Toxicokinetics of topical sulfur mustard penetration, disposition, and vascular toxicity in isolated perfused porcine skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **135** (1995); 25-34.

[61] Hambrook JL, Howells DJ, Schock C: Biological fate of sulphur mustard (1,1'-thiobis(2-chloroethane)): uptake, distribution and retention of ^{35}S in skin and in blood after cutaneous application of ^{35}S-sulphur mustard in rat and comparison with human blood in vitro. *Xenobiotica* **23** (1993); 537-61.

[62] Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD: Toxicodynamics of sulfur mustard. II. Absorption and distribution. In: *Medical Defense Against Mustard Gas: Toxic Mechanisms and Pharmacological Implications.* CRC Press, Boca Raton, 1991. p. 80-2.

[63] Logan TP, Millard CB, Shutz M, Schulz SM, Lee RB, Bongiovanni R: Cutaneous uptake of 14C-HD vapor by the hairless guinea pig. *Drug Chem Toxicol* **22** (1999); 375-87.

[64] Chilcott RP, Jenner J, Hotchkiss SAM, Rice P: In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J Appl Toxicol* **21** (2001); 279-83.

[65] Hambrook JL, Harrison JM, Howells DJ, Schock C: Biological fate of sulphur mustard (1,1'-thiobis(2-chloroethane)): urinary and faecal excretion of ^{35}S by rat after injection or cutaneous application of ^{35}S labelled sulphur mustard. X*enobiotica* **22** (1992); 65-75.

[66] Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD: The sulfur mustard injury: description of lesions and resulting incapacitation. In: *Medical Defense Against Mustard Gas: Toxic Mechanisms and Pharmacological Implications.* CRC Press, Boca Raton, 1991. p. 13-42.

[67] Dalton CH, Hattersley IJ, Taylor C, Graham JS: Location of the sulphur mustard skin reservoir in vitro. RTO HFM-149 Symposium: Defense Against The Effects Of Chemical Hazards: Toxicology, Diagnosis, and Medical Countermeasures. Edinburgh, Nagy-Britannia, 2007. október 8-10.

[68] Smith KJ, Graham JS, Moeller RB, Okerberg CV, Skelton H, Hurst CG: Histopathologic features seen in sulfur mustard induced cutaneous lesions in hairless guinea pigs. *J Cutan Pathol* **22** (1995); 260-8.

[69] Somani SM: Toxicokinetics and toxicodynamics of mustard. In: Somani SM (ed.): *Chemical Warfare Agents*. Academic Press Inc., 1992. p. 13-50.

[70] Sinclair DC: The clinical reaction of the skin to mustard gas vapour. *Br J Dermatol Syph* **61** (1949); 113-25.

[71] Monteiro-Riviere NA: Anatomical factors affecting barrier function. In: Zhai H, Maibach HI (eds.): *Dermatotoxicology 6th ed.* CRC Press, Boca Raton, 2004. p. 43-70.

[72] Lindsay CP, Rice P: Assessment of the biochemical effects of percutaneous exposure of sulphur mustard in an *in vitro* human skin system. *Hum Exp Toxicol* **15** (1996); 237-44.

[73] Sabourin CLK, Petrali JP, Casillas RP: Alterations in inflammatory cytokine gene expression in sulfur mustard-exposed mouse skin. *J Biochem Mol Toxicol* **14** (2000); 291-302.

[74] Cowan FM, Broomfield CA, Stojiljkovic MP, Smith WJ: A review of multi-threat medical countermeasures against chemical warfare and terrorism. *Mil Med* **169** (2004); 850-4.

[75] Sidell FR, Smith WJ, Petrali JP, Hurst CG: Sulfur mustard: a chemical vesicant model. In: Zhai H, Maibach HI (eds.): *Dermatotoxicology 6th ed*. CRC Press, Boca Raton, 2004. p. 389-408.

[76] Till GO, Beauchamp C, Menapace D, Tourtellotte W, Kunkel R, Johnson KJ, Ward PA: Oxygen radical-dependent lung damage following thermal injury in rat skin. *J Trauma* **23** (1983); 269-77.

[77] Chilcott RP, Jenner J, Hotchkiss SAM: Evaluation of barrier creams against sulphur mustard. I. In vitro studies using human skin. S*kin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15** (2002); 225-35.

[78] Kenar L, Karayilanoglu T, Yuksel A, Gunhan O, Kose S, Kurt B: Evaluation of protective ointments used against dermal effects of nitrogen mustard, a vesicant warfare agent. *Mil Med* **170** (2005); 1-5.

[79] McCreery: Topical Skin Protectants. U.S. Patent No. 5,607,979. 1997. március 4.

[80] Jenner J, Smith CN, Chilcott RP, Lindsay CD: Barrier cream comprising hexamethylenetetramine or derivative thereof. U.S. Patent No. 6,375,962. 2002. április 23.

[81] Hobson ST, Braue Jr EH, Lehnert EK, Klabunde KJ, Koper OP, Decker S: Active topical skin protectants using reactive nanoparticles. U.S. Patent No. 6,403,653. 2002. június 11.

[82] Hill CL, Hobson ST, Lehnert EK, Klabunde KJ, Decker S, Braue Jr EH, Rhule J, Boring E, Koper OP: Active topical skin protectants using combinations of reactive nanoparticles and polyoxometalates or metal salts. U.S. Patent No. 6,410,603. 2002. június 25.

[83] Braue Jr EH, Hobson ST, Hill CL, Boring E, Rhule J: Active topical skin protectants containing polyoxometalates and/or coinage metal complexes. U.S. Patent No. 6,414,039. 2002. július 2.

[84] Hobson ST, Braue Jr EH, Shea K: Active topical skin protectants using hybrid organic polysesquioxanes. U.S. Patent No. 6,417,236. 2002. július 9.

[85] Klabunde KJ, Koper O, Klabunde JS: Reactive nanoparticles as destructive adsorbents for biological and chemical contamination. U.S. Patent 6,417,423. 2002. július 9.

[86] Hobson ST, Braue Jr EH, White J, Bley R: Active topical skin protectants using polyoxometallates. U.S. Patent No. 6,420,434. 2002. július 16.

[87] Hobson ST, Braue Jr EH, Back D: Active topical skin protectants using polymer coated metal alloys. U.S. Patent No. 6,437,005. 2002. augusztus 20.

[88] Braue Jr EH, Mershon MM, Braue CR, Way RA: Active topical skin protectants containing S-330. U.S. Patent 6,472,438. 2002. október 29.

[89] Hill CL, Xu L, Rhule JT, Boring EA: Polyoxometalate materials, metal-containing materials, and methods of use thereof. U.S. Patent 6,723,349. 2004. április 20.

[90] Klabunde KJ, Bedilo AF, Koper OB, Sigel M: Carbon coated metal oxide nanoparticles. U.S. Patent 6,843,919. 2005. január 18.

[91] Braue Jr EH: Development of a reactive topical skin protectant. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S47-S53.

[92] Wartell MA, Kleinman MT, Huey BM, Duffy LM: Decontamination. In: *Strategies to Protect the Health of Deployed U.S. Forces: Force Protection and Decontamination.* National Academy Press, Washington, DC, 1999. p. 108-37.

[93] Shih ML, Korte WD, Smith JR, Szafraniec LL: Reacions of sulfides with S-330, a potential decontaminant of sulfur mustard in formulations. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S83-S88.

[94] Koper O, Lucas E, Klabunde KJ: Development of reactive topical skin protectants against sulfur mustard and nerve agents. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S59-S70.

[95] Johnson RP, Hill CL: Polyoxometalate oxidation of chemical warfare agent simulants in fluorinated media. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S71-S75.

[96] Eldad A, Ben Meir P, Breiterman S, Chaouat M, Shafran A, Ben-Bassat H: Superoxide dismutase (SOD) for mustard gas burns. *Burns* **24** (1998); 114-9.

[97] Casillas RP, Kiser RC, Truxall JA, Singer AW, Shumaker SM, Niemuth NA, Ricketts KM, Mitcheltree LW, Castrejon LR, Blank JA: Therapeutic approaches to dermatotoxicity by sulfur mustard. I. Modulation of sulfur mustard-induced cutaneous injury in the muse ear vesicant model. *J Appl Toxicol* **20** (2000); S145-S151.

[98] Chilcott RP, Jenner J, Carrick , Hotchkiss SAM, Rice P: Human skin absorption of bis-2-(chloroethyl)sulphide (sulphur mustard) in vitro. *J Appl Toxicol* **20** (2000); 349-55.

[99] Brain KR, Walters KA, Watkinson AC: Investigation of skin permeation in vitro. In: Roberts MS, Walters KA (eds): *Dermal absorption and toxicity assessment.* Marcel Dekker Inc, 1998. p. 161-87.

[100] Collier SW, Bronaugh RL: Receptor fluids. In: Bronaugh RL, Maibach HI (eds): *In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals, and applications.* CRC Press, Boca Raton, 1991. p. 31-49.

[101] Riviere JE: Isolated perfused porcine skin flap. In: Zhai H, Maibach HI (eds.): *Dermatotoxicology 6th ed.* CRC Press, Boca Raton, 2004. p. 563-588.

[102] King JR, Monteiro-Riviere NA: Cutaneous toxicity of 2-chloroethyl methyl sulfide in isolated perfused porcine skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **104** (1990); 167-79.

[103] Snider TH, Matthews MC, Braue Jr EH: Model for assessing efficacy of topical skin protectants against sulfur mustard vapor using guinea pigs. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S55-S58.

[104] Yourick JJ, Dawson JS, Mitcheltree LW: Sulphur mustard induced microvesication in hairless guinea-pigs: effect of short-term niacinamide administration. *Toxicol Appl Pharmacol* **117** (1992); 104-9.

[105] Kadar T, Fishbeine E, Meshulam Y, Sahar R, Chapman S, Liani H, Barness I, Amir A: Treatment of skin injuries induced by sulfur mustard with calmodulin antagonists, using the pig model. *J Appl Toxicol* **20** (2000); S133-S136.

[106] Reid MF, Graham J, Niemuth NA, Singer AW, Janny SJ, Johnson JB: Sulfur mustard-induced skin burns in weanling swine evaluated clinically and histopathologically. *J Appl Toxicol* **19** (1999); S153-S160.

[107] Wormser U, Brodsky B, Green BS, Arad-Yellin R, Nyska A: Protective effect of povidone ointment against skin lesions induced by chemical and thermal stimuli. *J Appl Toxicol* **20** (2000); S183-S185.

[108] Brown RFR, Rice P, Bennett NJ: The use of laser Doppler imaging as an aid in clinical management decision making in the treatment of vesicant burns. *Burns* **24** (1998); 692-8.

[109] Chilcott RP, Brown RFR, Rice P: Non-invasive quantification of skin injury resulting from exposure to sulphur mustard and Lewisite vapours. *Burns* **26** (2000); 245-50.

[110] Karayilanoglu T, Gunhan Ö, Kenar L, Kurt B: The Protective and Therapeutic Effects of Zinc Chloride and Desferrioxamine on Skin Exposed to Nitrogen Mustard. *Mil Med* **168** (2003); 614-617.

[111] Yourick JJ, Clark CR, Mitcheltree LW: Niacinamide pretreatment reduces microvesicle formation in hairless guinea pigs cutaneously exposed to sulfur mustard. *Toxicol Sci* **17** (1991); 533-42.

[112] Zlotogorski A, Goldenhersh M, Shafran A: A model for the quantitative measurement of sulfur mustard skin lesions in the rabbit ear. *Toxicology* **120** (1997); 105-10.

[113] Casillas RP, Mitcheltree LW, Stemler FW: The mouse ear model of cutaneous sulfur mustard injury. *Toxicol Methods* **7** (1997); 381-97.

[114] Babin MC, Ricketts K, Skvorak JP, Gazaway M, Mitcheltree LW, Casillas RP: Systemic administration of candidate antivesicants to protect against topically applied sulfur mustard in the mouse ear vesicant model. *J Appl Toxicol* **20** (2000); S141-S144.

[115] Graham JS, Reid FM, Smith R, Stotts RR, Tucker FS, Shumaker SM, Niemuth NA, Janny SJ: A cutaneous full-thickness liquid sulfur mustard burn model in weanling swine: clinical pathology and urinary excretion of thiodiglycol. *J Appl Toxicol* **20** (2000); S161-S172.

[116] Kulkarni AS, Vijayaraghavan R, Anshoo G, Satish HT, Pathak U, Raza SK, Pant SC, Malhotra RC, Prakash AO: Evaluation of analogues of DRDE-07 as prophylactic agents against the lethality and toxicity of sulfur mustard administered through the percutaneous route. *J Appl Toxicol* **26** (2006); 115-25.

[117] Axelrod DJ, Hamilton JG: Radio-autographic studies of the distribution of lewisite and mustard gas in the skin and eye tissues. *Am J Pathol* **23** (1947); 389-411.

[118] Wormser U, Nyska A: Protective effect of O-phenantroline against mechlorethamine toxicity in the rat liver slice system and in the guinea pig skin. *Arch Toxicol* **65** (1991); 666-670.

[119] Müller M, Stab H, Brunner M, Möller JG, Lackner E, Eichler HG: Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **43** (1999); 2345-9.

[120] Benfeldt E: In vivo microdialysis for the investigation of drug levels in the dermis and the effect of barrier perturbation on cutaneous drug penetration. *Acta Derm-Venereol* **S206** (1999); 1-39.

[121] Wester RC, Maibach HI: Skin permeability. In: Zhai H, Maibach HI: *Dermatotoxicology 6th ed*. CRC Press, 2004. p. 3-12.

[122] Anderson C, Andersson T: Cutaneous microdialysis for human in vivo dermal absorption studies. In: Roberts MS, Walters KA (eds): *Dermal absorption and toxicity assessment*. Marcel Dekker, New York, 1998. p. 231-44.

[123] Schnetz E, Fartasch M: Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier – a promising tool for future research? *Eur J Pharm Sci* **12** (2001); 165-74.

[124] CMA Microdialysis Ab, Solna, Svédország. www.microdialysis.se (2007. július 1.)

[125] Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, Lunte CE: Dermal microdialysis sampling in vivo. *Pharm Res* **11** (1994); 1631-9.

[126] Davies MI, Cooper JD, Desmond SS, Lunte CE, Lunte SM: Analytical considerations for microdialysis sampling. *Adv Drug Deliv Rev* **45** (2000); 169-88.

[127] El-Marbouh L, Arellano C, Philibert C, Evrard P, Poey J, Houien G: In vivo study of percutaneous absorption of 4-chloroaniline using microdialysis in the rat. *Arzneimittel-Forschung* **50** (2000); 1033-6.

[128] Leveque N, Robin S, Makki S, Muret P, Mary S, Berthelot A, Humbert P: Iron concentrations in human dermis assessed by microdialysis associated with atomic absorption spectrometry. *Biol Pharm Bull* **24** (2001); 10-3.

[129] Telting-Diaz M, Scott DO, Lunte CE: Intravenous microdialysis sampling in awake, freely-moving rats. *Anal Chem* **64** (1992); 806-10.

[130] Müller M, Brunner M, Schmid R, Putz EM, Schmiedberger A, Wallner I, Eichler HG: Comparison of three different experimental methods for the assessment of peripheral compartment pharmacokinetics in humans. *Life Sci* **62** (1998); 227-34.

[131] Benfeldt E, Serup J, Menné T: Microdialysis vs. suction blister technique for *in vivo* sampling of pharmacokinetics in the human dermis. *Acta Derm Venereol* **79** (1999); 338-42.

[132] Borg N, Götharson E, Benfeldt E, Groth L, Ståhle L: Distribution to the skin of penciclovir after oral famciclovir administration in healthy volunteers: comparison of the suction blister technique and cutaneous microdialysis. *Acta Derm Venereol* **79** (1999); 274-7.

[133] Brunner M, Schmiedberger A, Schmid R, Jäger D, Piegler E, Eichler HG, Müller M: Direct assessment of peripheral pharmacokinetics in humans: comparison between cantharides blister fluid sampling, in vivo microdialysis and saliva sampling. *Br J Clin Pharmacol* **46** (1998); 425-31.

[134] Sasongko L, Williams KM, Day RO, McLachlan AJ: Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. *Br J Clin Pharmacol* **56** (2003); 551-61.

[135] Elmquist WF, Sawchuk RJ: Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* **14** (1997); 267-88.

[136] Müller M: Microdialysis. *BMJ* **324** (2002); 588-591.

[137] Hansen DK, Davies MI, Lunte SM, Lunte CE: Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci* **88** (1999); 14-27.

[138] Yokel RA, Lidums V, Ungerstedt U: Aluminum mobilization by desferrioxamine assessed by microdialysis of the blood, liver, and brain. *Toxicology* **66** (1991); 313-324.

[139] Gonzales RA, McNabb J, Yim H J, Ripley T, Bungay M: Quantitative microdialysis of ethanol in rat striatum. *Alcohol Clin Exp Res* **22** (1998); 777-788.

[140] Klede M, Schmitz H, Goen T, Fartasch M, Drexler H, Schmelz M: Transcutaneous penetration of toluene in rat skin a microdialysis study. *Exp Dermatol* **14** (2005); 103-8.

[141] McKim Jr JM, McKim Sr JM, Naumann S, Hammermeister DE, Hoffman AD**,** Klaassen CD: *In vivo* microdialysis sampling of phenol and phenyl glucuronide in the blood of unanesthetized rainbow trout: implications for toxicokinetic studies. *Life Sci* **20** (1993); 190-8.

[142] Boutsiouki P, Thompson JP, Clough GF: Effects of local blood flow on the percutaneous absorption of the organophosphorus compound malathion: a microdialysis study in man. *Arch Toxicol* **75** (2001); 321-8.

[143] St Louis RH, Hill Jr HH: Qualitative and quantitative methods of analysis for gas chromatography. In: Clement RE (ed.): *Gas chromatography. Biochemical, biomedical and clinical applications.* John Wiley and Sons, 1990. p. 109-28.

[144] Hill PG, Smith RM: Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *J Chromatogr A* **872** (2000); 203-13.

[145] Stenken JA: Methods and issues in microdialysis calibration. *Anal Chim Acta* **379** (1999); 337-58.

[146] Dr. Krutsay Miklós: *Patológiai technika*. Medicina, Budapest, 1999. p. 148.

[147] Gad SC: Statistics for toxicologists. In: Hayes AW (ed.): *Principles and methods of toxicology 4th ed.* Taylor and Francis, 2001. p. 285-364.

[148] Choi MJ, Zhai H, Maibach HI: Tape stripping method and the stratum corneum. In: Zhai H, Maibach HI (eds): *Dermatotoxicology 6th ed.* CRC Press, 2005. p. 531-48.

[149] Spain KC: The relation between the structure of the epidermis of the rat and the guinea pig, and the proliferative power of normal and regenerating epithelial cells of the same species. *J Exp Med* **21** (1914); 193-202.

[150] Gray GM, Yardley HJ: Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. *J Lipid Res* **16** (1975); 434-40.

[151] Chu DH, Haake AR, Holbrook K, Loomis CA: The structure and development of skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Glodsmith LA, Katz SI (eds.): *Fritzpatrick's Dermatology in General Medicine 6th ed.* McGraw-Hill, 2003. p. 58-88.

[152] Van Ravenzwaay B, Leibold E: The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment. *Hum Exp Toxicol* **23** (2004); 219-25.

[153] Black RM, Hambrook JL, Howells DJ, Read RW: Biological fate of sulfur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane). Urinary excretion profiles of hydrolysis products and β-lyase metabolites of sulfur mustard after cutaneous application in rats. *J Anal Toxicol* **16** (1992); 79-84.

[154] Noort D, Benschop HP, Black RM: Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* **184** (2002); 116-26.

[155] Oshawa I, Kanamori-Kataoka M, Tsuge K, Seto Y: Determination of thiodiglycol, a mustard gas hydrolysis product by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butyldimethylsilylation. *J Chromatogr A* **1061** (2004); 235-41.

[156] Black RM, Muir R: Derivatization reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. *J Chromatogr A* **1000** (2003); 253-81.

[157] Pardasani D, Palit M, Gupta AK, Kanauija PK, Dubey DK: Gas chromatography-mass spectrometry analysis of trifluoracetyl derivatives of precursors of nitrogen and sulfur mustards for verification of chemical weapons convention. *J Chromatogr A* **1059** (2004); 157-64.

[158] Budavari S, O'Neil MJ, Simth A, Heckelman PE (eds): *The Merck Index 11th edition.* Merck and Co. Inc., 1989. p. 1469.

[159] Blau K: Acylation. Practical Applications: Perfluoracyl derivatives. In: Blau K, Halket J*: Handbook of derivatives for chromatography 2nd ed*. John Wiley and Sons, 1993. p. 40-2.

[160] Black RM, Read RW: Detection of trace levels of thiodiglycol in blood, plasma and urine using gas chromatography-electron capture negative-ion chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr* **449** (1988); 261-70.

[161] Amirav A, Jing H: Pulsed flame photometric detector: a novel gas chromatography detector. *Anal Chem* **67** (1995); 539-55.

[162] Plock N, Kloft C: Microdialysis – theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci* **25** (2005); 1-24.

[163] Walton PL, Maynard RL, Murray VSG: Mustard gas (PIM 354). The International Programme on Chemical Safety, 1996. www.inchem.org/documents/pims/chemical/mustardg.htm (1996 szeptember 1.)

[164] McDougal JN, Jepson GW, Clewell III HJ, MacNaughton MG, Andersen ME: A physiological pharmacokinetic model for dermal absorption of vapors in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **85** (1986); 286-94.

[165] Dalton CH, Maidment MP, Jenner J, Chilcott RP: Closed cup vapor systems in percutaneous exposure studies: what is the dose? *J Anal Toxicol* **30** (2006); 165-70.

[166] Conley J, Hunter K, Lundy P, Hamilton M, Sawyer TW: Domestic swine model for the assessment of chemical warfare agent-anesthetic interactions: some effects of sulfur mustard. *Mil Med* **165** (2000); 573-8.

[167] Anderson C, Andersson T, Wardell K: Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol* **102** (1994); 807-11.

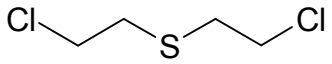
[168] Riviere JE, Williams PL: Pharmacokinetic implications of changing blood flow in skin. *J Pharm Sci* **81** (1992); 601-2.

[169] Groth L, Jorgensen A, Serup J: Cutaneous microdialysis in the rat: insertion trauma and effect of anaesthesia studied by laser Doppler perfusion imaging and histamine release. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **11** (1998); 125-32.

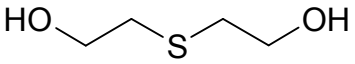
[170] Riviere JE, Smith CE, Budsaba K, Brooks JD, Olajos EJ, Salem H, Monteiro-Riviere NA: Use of methyl salicylate as a simulant to predict the percutaneous absorpion of sulfur mustard. *J Appl Toxicol* **21** (2001); 91-9.

FÜGGELÉK

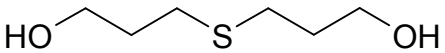
Az értekezésben előforduló fontosabb vegyületek szerkezeti képletei



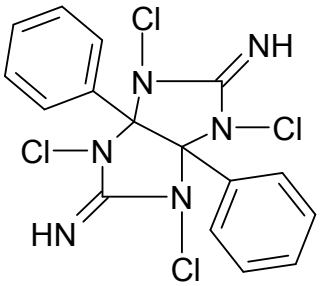
1 2,2'-diklórdietilszulfid (SM)



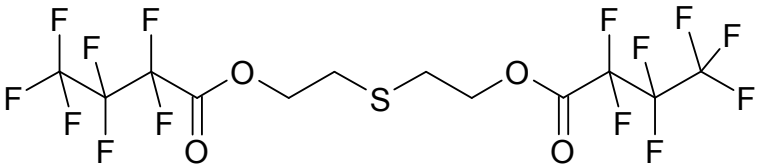
2 2,2'-tiodietanol (TDG)



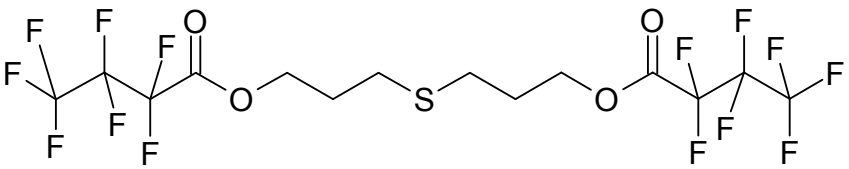
3 3,3'-tiodipropanol (TDP)



4 1,3,4,6-tetraklór-7,8-difenil-2,5-diiminoglikoluril



5 bisz(2-perfluorbutiroxietil)szulfid (TDG-HFBA)



6 bisz(2-perfluorbutiroxipropil)szulfid (TDP-HFBA)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legmélyebb hálával tartozom Prof. Dr. Fűrész József MD, PhD orvos ezredesnek, az Állami Egészségügyi Központ Központi Laboratóriumi Diagnosztikai Osztály osztályvezető főorvosának, MH tudományszervező és laboratóriumi főszakorvosnak, hogy témavezetőmként kezdetektől fogva folyamatosan inspirálta, támogatta és kezdeményezően segítette munkámat, valamint fáradhatatlanul formálta gondolkodásomat. Köszönet illeti őt azért is, hogy kísérletes munkám végzéséhez erőforrásokat biztosított és hogy az eredmények interpretálásában és publikálásában meghatározó szerepet vállalt.

Köszönöm szüleimnek és szeretteimnek, hogy munkám végzésében végig támogattak, azt érdeklődésükkel, tanácsaikkal és számos egyéb módon segítették. Különösen hálás vagyok édesapámnak a toxikokinetikai és statisztikai elemzések megtervezésében és értékelésében nyújtott folyamatos segítségéért.

Köszönöm Prof. Solymosi József, DSc nyá. mérnök ezredesnek, hogy a ZMNE Vegyi és Környezetbiztonsági Tanszék vezetőjeként 2002 október és 2003 szeptember között a Tanszékre befogadott és munkám végzésében rugalmasan támogatott, valamint hogy a ZMNE tudományos rektorhelyetteseként inspirált és támogatásáról biztosított. Hálámat fejezem ki Prof. Halász László, DSc nyá. mérnök ezredesnek, a ZMNE Katonai Műszaki Doktori Iskola vezetőjének folyamatos támogatásáért. Hasonlóképpen köszönet illeti PhD Vincze Árpádot, a ZMNE Katonai Műszaki Doktori Iskola Környezetbiztonság és Katasztrófavédelem tudományszak vezetőjét. Balázs Istvánné főelőadó adminisztratív-szervezési feladatokban nyújtott folyamatos, készséges és rugalmas segítsége révén számos terhet vett le a vállamról, amiért szintén őszinte hálával tartozom.

Hálámat fejezem ki Dr. Gachályi András nyá. mérnök ezredesnek, az MH Dr. Radó György Honvéd Egészségügyi Központ, Tudományos Intézet, Toxikológiai Kutató Osztály osztályvezetőjének a témámmal kapcsolatos kísérletek megszervezésében és lebonyolításában nyújtott segítségéért, az osztály számos erőforrásának rendelkezésemre bocsátásáért, az állatkísérletek végrehajtásával és a mérgező anyagokkal végzett munkával kapcsolatos tudásának átadásáért, valamint az eredmények értelmezésében és közlésében való aktív részvételéért.

Köszönöm az MH Dr. Radó György Honvéd Egészségügyi Központ, Tudományos Intézet, Toxikológiai Kutató Osztályon dolgozó egykori munkatársaimnak, hogy munkám végzésében segítettek és támogattak. Köszönet illeti elsősorban Némethné Karpova Natália

őrnagyot, Nagy Jánosnét és Spiller Bélánét az állatkísérletek lebonyolításában, Boldis Ottót és Farkas Róbertet az analitikai módszer kifejlesztésében, valamint Druskó Krisztián főtörzsőrmestert a minták méréshez történő előkészítésében nyújtott segítségükért. Támogatásáért köszönetemet fejezem ki Dr. Mátyus Mária, MD orvos alezredesnek, Kocsis György mérnök alezredesnek, PhD Berente Bálintnak, Szaniszló Juditnak, Kiss Andreának, Fehérné Oszlánczi Andrea főhadnagynak és Müller Adrienne főtörzsőrmesternek.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Jäckel Márta, MD, PhD o. alezredesnek, az Állami Egészségügyi Központ Patológiai Osztály osztályvezető főorvosának, hogy a szövettani vizsgálatok elvégzésének és kiértékelésének terhét felvállalta, valamint az ezzel kapcsolatos tudását önzetlenül megosztotta velem.

Köszönöm az MH Dr. Radó György Honvéd Egészségügyi Központ, Tudományos Intézet, Kórélettani Kutató Osztály munkatársainak: Dr. Veszely Gizella osztályvezetőnek és PhD Lakatos Zsuzsanna egyetemi magántanárnak, hogy őszinte érdeklődésükkel, az értekezés részletes véleményezésével annak elkészülésében fontos segítséget nyújtottak.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Faludi Gábor, MD, PhD nyá. orvos ezredesnek, az MH Egészségvédelmi Intézet főigazgatójának (2002-2006), illetve Dr. Németh András, MD orvos dandártábornoknak, az MH Dr. Radó György Honvéd Egészségügyi Központ megbízott parancsnokának doktori tanulmányaim és tudományos munkám végzéséhez nyújtott folyamatos, inspiráló vezetői támogatásukért.

Köszönöm Dr. Svéd László, MD, PhD nyá. orvos altábornagynak, hogy 2002-2005 között a HM Egészségügyi Csoportfőnökség csoportfőnökeként, 2005-ben és 2006-ban az MH Egészségügyi Parancsnokság parancsnokaként doktori tanulmányaim végzését támogatta.