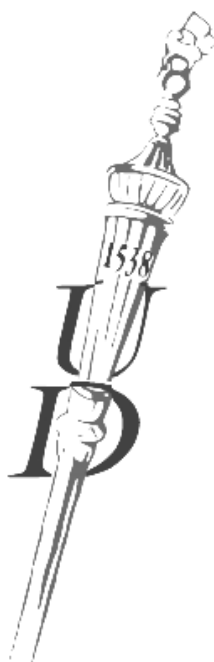


Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ÖNEMULGEÁLÓ RENDSZEREK BEN
ALKALMAZOTT FELÜLETAKTÍV ANYAGOK ÉLŐ
SEJTEKRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK
GYÓGYSZERTECHNOLÓGIAI JELLEMZÉSE**

Dr. Ujhelyi Zoltán

Témavezető: Dr. Kovácsné Dr. Bácskay Ildikó



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2014

ÖNEMULGEÁLÓ RENDSZEREKBE ALKALMAZOTT FELÜLETAKTÍV ANYAGOK
ÉLŐ SEJTEKRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK GYÓGYSZERTECHNOLÓGIAI
JELLEMZÉSE

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Ujhelyi Zoltán okleveles szakgyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Kovácsné Dr. Bácskay Ildikó, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA doktora
Dr. Gáspár Róbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék
könyvtára (Elméleti Tömb, 5. emelet), 2015. január 13. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Antal István, PhD
Dr. Deák György, PhD

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA doktora
Dr. Antal István, PhD
Dr. Deák György, PhD
Dr. Gáspár Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A”
épület tanterme, 2015. január 13. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
1.1. Felületaktív anyagok, önemulgeáló rendszerek.....	5
1.2. A Caco-2 sejtvonal	6
1.3. Sejtéletképességi vizsgálatok	7
2.Célkitűzés	8
3. Anyagok és módszerek.....	9
3.1. Felületaktív anyagok	9
3.2. Felületi feszültség mérése és a CMC meghatározása.....	9
3.3. Hemolitikus aktivitás meghatározása	9
3.4. Sejttenyésztés	10
3.5. Sejt életképességi vizsgálatok, MTT, LDH teszt	11
3.6. Transzepitheliális Ellenállás (TEER) mérése Caco-2 monolayeren.....	12
3.7. Caco-2 membrán transzport vizsgálata	13
3.8. Immunohisztokémia	13
3.9. Statisztikai analízis	14
4.Eredmények és Megbeszélés.....	15
4.1. A felületaktív anyagok fizikai tulajdonsága és toxicitása	15
4.1.1. A tenzidek felületi feszültségre gyakorolt hatása	16
4.2. A tenzidek sejtéletképességre gyakorolt hatása	16
4.2.1. MTT és LDH vizsgálatok.....	16
4.2.2. Caco-2 transzmembrán kísérletek	18
4.2.3. MTT és hemolízis vizsgálatok.....	19
5. Összefoglalás.....	22
6.Közlemények.....	23
7.Előadások	26
8.Poszterek	29
9.Támogatás	32

1. Bevezetés

A hatékony gyógyszeres terápia feltétele a kívánt mennyiségű gyógyszeranyagok megfelelő helyre történő eljuttatása a lehető legegyszerűbb és legkíméletesebb módon. A gyógyszerészeti kutatás intenzív kutatási területe, az új farmakonok, farmakonjelöltek fejlesztése mellett a meglévő hatóanyagok új indikációban vagy módosított dózisban, új gyógyszerformában történő alkalmazása. Számos lehetőség közül a szájon át történő gyógyszerelés egyértelműen a legelterjedtebb és legkedveltebb módja a hatóanyagok szervezetbe. A perorális gyógyszerek esetén a legmagasabb a beteg compliance, ennek a megtartása vagy fokozása terápiás értékű is lehet. A teljes abszorpcióra a hatóanyagok jelentős része képtelen, ezért a preformulálás során a hatóanyagokat oldékonyság és permeabilitás alapján vizsgáljuk meg. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) ez alapján csoportosítja a farmakonokat, így a felszívódás kinetikája mellett azt is képesek vagyunk előre jelezni, hogy milyen gyógyszer technológiai segédanyagok/módszerek szükségesek fenti tulajdonságok módosításához. A BCS II., III., IV. csoportjába tartozó hatóanyagok rossz oldhatósága és/vagy rossz membrán permeáló sajátsága mindenképpen szükségessé teszi fentiek alkalmazását, melyek segítségével az abszorpció és az oldékonyság fokozható. A biofarmáciai tulajdonságok módosíthatóak a gyógyszeranyag fizikai vagy fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltoztatásával, de alkalmazhatunk a gyógyszerformában olyan additív komponenseket is, melyek növelik a vegyület oldhatóságát és ezáltal a biológiai hasznosíthatóságot. Az alkalmazott oldékonyság növelő segédanyagok között tradicionálisan kiemelt szerepet kapnak a különböző típusú amfipatikus szerkezetű felületaktív anyagok. Kísérletsorozatomban különös hangsúlyt fektettem az ön(mikro)emulgeáló rendszerek képzésére alkalmas tenzidek közül, a polietilén glikol származékok, valamint polipropilén glikol származékok vizsgálatára. A tenzidek fiziko-kémiai tulajdonságai közül a szolubilizáló tulajdonságot meghatározó kritikus micellaképzési koncentrációt (CMC) határoztuk meg. A Caco-2 bélhámsejtek életképességére gyakorolt hatást MTT és kiegészítésként LDH citotoxicitási tesztekkel mértük. A vizsgált felületaktív anyagok közül, bizonyos PEG alapú tenzidek alkalmas segédanyagok lehetnek parenterális készítményekben is a hatóanyag biohasznosulásának növelésére. Ezért ebben az esetben ügyelnünk kell a felületaktív anyagoknak a vér elemeivel történő esetleges kölcsönhatására. Ezen tulajdonság felderítésére a tenzidek koncentrációfüggő hemolitikus aktivitását vizsgálhatjuk. Ezért kísérletsorozatunkban meghatároztuk az enterális és

parenterális formulálás során felhasználható tenzidcsoport tagjainak IC_{50} illetve HC_{50} értékeit. A biztonságos terápia elérése érdekében a gyógyszerforma kialakítása során a választott segédanyagok ártalmatlanságát minden esetben igazolnunk kell [Rowinsky és mtsai 1993]. Az ilyen szemlélettel kifejlesztett készítmények képesek az optimális gyógyszerhatás elérése céljából csökkenteni a szervezetbe juttatott hatóanyag mennyiségét, elkerülni a nemkívánatos mellékhatásokat, és a terápiás igényeknek megfelelően, a hatóanyag-felszabadulását, tervezett módon, a megfelelő helyen és időben, meghatározott sebességgel biztosítani.

1.1 Felületaktív anyagok, önemulgeáló rendszerek

A tenzidek aszimmetrikusan poláris szerkezetű vegyületek. Szerkezetük egy viszonylag nagyméretű apoláris részből, és egy poláris fejcsoporti molekularészletből áll. Kémiai tulajdonságuk alapján a felületaktív anyagok négy nagy csoportját különböztetjük meg. Az *anionos tenzidek* esetében a hidrofób molekularészhez negatív töltésű fejcsoport kapcsolódik, a *kationos felületaktív anyagoknál* a hidrofil rész töltése pozitív. A *nemionos tenzidek* hidrofil része nem disszociatív míg, az *amfoter tenzideket* ikerionos feji csoport jellemzi. A felületaktív anyagok asszociációs kolloidok képzésével képesek a vízben oldhatatlan vagy rosszul oldódó farmakonok oldékonyságának növelésére. Kis koncentrációban a felületaktív anyagok monomerként vannak jelen az oldatban. Híg vizes oldatban a termodinamikailag kedvezőbb állapot eléréséhez a tenzidek a levegő/víz határfelületen adszorbeálódnak, így poláris fejcsoportjuk a vízben, hidrofób részük pedig az apoláros levegő fázisban helyezkedik el. A felületi adszorpciónak köszönhetően a felületi feszültség csökken. Ugyancsak a hidrofób effektus megnyilvánulása, hogy a tenzid koncentráció emelésével a felületi feszültség állandóvá válik. Ezen a jellemző koncentráció értéken (kritikus micellaképzési koncentráció, CMC) a hidrofób láncok egymás felé fordulva alakítják ki az energetikailag előnyös környezetet, a hidrofil fejek pedig a vizes közeggel érintkeznek. A kritikus micellaképződési koncentráció eléréséig a rosszul oldódó farmakon oldhatóságát a tenzid csak kis mértékben képes növelni [Rangel-Yagui és mtsai 2005]. Amikor a szolubilizáló szer koncentrációja meghaladja a CMC értéket a micellák képzésével arányosan, lineárisan nő a hatóanyag oldhatósága. A monomeregységek és a micellák viselkedése eltérő, emiatt fontos megvizsgálni a gyógyszerforma kialakításához választott tenzidek tulajdonságait alacsony és relative magas koncentrációban, vizes közegben illetve biológiai környezetben egyaránt.

A vízben nehezen vagy egyáltalán nem oldódó gyógyszeranyagok gasztrointesztinális rendszerbe történő juttatásának még előnyösebb megoldása lehet, ha különböző önemulgeáló illetve ön-mikroemulgeáló rendszereket (SEDDS, SMEDDS) készítünk. Az önemulgeáló rendszerek összetételében tenzidként illetve kotenzidként jelentős százalékban szerepelnek különböző felületaktív komponensek. Az önemulgeáló rendszerekkel történő terápia biztonságos alkalmazhatóságához, a kialakításhoz felhasznált tenzidek biológiai hatásvizsgálata részletes elemzésre szorul. A monokomponensek vizsgálatával részletes információhoz juthatunk egy-egy gyógyszer technológiai szempontból összeállított rendszer biológiai hatásáról, illetve a gyógyszerhordozóba foglalt hatóanyag hasznosulásáról. A bélhámsejteken végzett vizsgálatok hozzásegítenek a megfelelő technológiai sajátosságok elérése mellett jobban tolerálható és magasabb biológiai tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerforma kialakításához.

1.2. A Caco-2 sejtvonal

A per os szervezetbe juttatott készítmények vizsgálatára a Caco-2 immortalizált sejtvonal nemzetközi irodalomban elfogadott *in vitro* modell. A Caco-2 humán colon adenocarcinoma eredetű sejtvonal ugyanis rendelkezik a humán jejunumra jellemző mindazon tulajdonsággal, ami alkalmassá teszi a szájon át történő gyógyszerbevitel és intesztinális felszívódás modellezésére. A sejtek megfelelő tenyésztési körülmények között konfluens sejtréteg, azaz monolayer kialakítására képesek. Az intesztinális epitéliumon keresztül történő transzport folyamatok mindegyike jellemezhető Caco-2 monolayer segítségével. Az immunhisztokémiai feltérképezés során azonban igazolódott, hogy a humán jejunumban lévő szoros sejtkapcsoló struktúrák minőségükben nem, de nyitottságukban eltérnek a Caco-2 monolayeren találhatóaktól. A Caco-2 sejtek között található sejtkapcsoló struktúrák szorosabb kapcsolatot tartanak fent a sejtek között. Azok a segédanyagok tehát, amelyek a zártabb, ezáltal komolyabb barriert jelentő Caco-2 monolayer sejtszövet között jelenlévő junctionok alterációjára képesek, legalább olyan felszívódás fokozó hatással lesznek az *in vivo* biohasznosulás során is. Ennek megfelelően a farmakont *in vitro* modellen átjuttatni képes hatóanyagleadó összetételek számára az *in vivo* barrier rendszer is leküzdhető akadály.

1.3. Sejtéletképességi vizsgálatok

Az élő sejtek, ennek megfelelően a sejt kultúrák modellek sejtjei is folyamatos kapcsolatban vannak környezetükkel. A közeg megváltozását érzékelik, adaptációs képességeik határán belül alkalmazkodnak a megváltozott körülményekhez. Sejtkárosodás akkor jön létre, ha a környezetváltozás olyan mértékű, amit a sejt működésével nem tud kompenzálni. A sejt kultúrákon végzett kísérletek jelentős részénél az életképes és az elpusztult sejtek arányát használjuk markerként az adott farmakon vagy segédanyag toxicitásának jellemzésére. Kísérleteinkben a felületaktív anyagok hatását felhasználási területüknek megfelelően vizsgáltuk. Minden esetben jellemeztük a tenzideket a mitokondriális aktivitásra gyakorolt hatásukkal MTT teszt segítségével. A parenterális (elsősorban iv) felhasználásra is használt tenzidek esetében az a vizsgálatot hemolízis teszttel is elvégeztük. A leginkább per os felhasználásra szánt tenzideknél LDH sejtéletképességi vizsgálatokkal egészítettük ki a citotoxicitási profil meghatározását. Ennek megfelelően tehát minden tenzid esetében a toxicitást két különböző módszerrel teszteltük.

2.Célkitűzés

Az önemulgeáló rendszerek képzéséhez használt felületaktív anyagok gyakran és nagy mennyiségben alkalmazott gyógyszer technológiai segédanyagok. A leggyakrabban választott tenzidek fiziko-kémiai tulajdonságának és élő szervezetre gyakorolt hatásának ismerete meghatározó a biztonságosan alkalmazható gyógyszerforma kialakításához.

Ezeket a szempontokat figyelembe véve, kísérletsorozatunkban a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Felületaktív anyagok szolubilizáló képességének vizsgálata a tenzidek CMC –értékének meghatározásával.
2. A tenzidek bélhámsejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata Caco-2 humán adenocarcinoma sejtvonalon.
3. A parenteráliák formulálásához használt tenzidcsoport, kölcsönhatásának vizsgálata a vér alkotóival.
4. Összefüggések keresése a tenzidek kémiai szerkezete, valamint azok élő szervezetre gyakorolt hatása között.
5. A gyógyszer technológiai szempontból előnyösnek talált tenzidcsoport, Caco-2 egysejtmembránon keresztüli transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata.
6. A biológiai membránon keresztüli transzportváltozás hátterének feltérképezése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felületaktív anyagok

Kísérletsorozatunk során számos gyógyszer technológiai formulálás során alkalmazott tenzidet vizsgáltuk. Különösen nagy hangsúlyt fektettünk a klasszikus és gyógyszerkönyvekben hivatalos felületaktív anyagok mellett, az önmulgeáló rendszerek képzéséhez használt tenzidek vizsgálatára. A kísérletekben használt Labrasol, Lauroglycol 90, Lauroglycol FCC, Capryol 90, Capryol PGMC a Gattefossé (Franciaország) a Cremophor RH40, Cremophor RH60, Cremophor RH410, Cremophor CO 410, Cremophor CO 455, Cremophor A 6, Cremophor A 25, Cremophor WO 7 a BASF (Németország) kutatás támogatási felajánlásai voltak. A vizsgált nátrium-laurylszulfát, poliszorbát 20, poliszorbát 60 és poliszorbát 80 a Sigma Aldrich (Magyarország) termékei.

3.2. Felületi feszültség mérése és a CMC meghatározása

A felületi feszültség mérés során folyadék/gáz határfelületi feszültséget és annak változását mértük. A kritikus micellaképzési koncentráció meghatározásához, számítógép vezérelt két diszpenzeres Sigma 700 típusú tenziométert (Biolin Scientific Inc., Svédország) használtunk. A kísérletet megelőzően a berendezést úgy kalibráltuk, hogy a tiszta víz felületi feszültsége laboratóriumi körülmények között (22°C, ~50% relatív páratartalom) 72 dynes/cm² legyen. A kísérlethez automatizált Du Nüoy pull out ring illetve az ismételt meghatározáshoz Wilhelmy pull out plate módszert használtunk. A micellaképződéshez szükséges kritikus koncentrációt a berendezés által mért felületi feszültségek ábrázolásával állapítottuk meg.

3.3. Hemolitikus aktivitás meghatározása

A tenzidek hemolitikus aktivitásának vizsgálatához egészséges humán önkéntes donorok vérének alkalmaztuk. A vér alakos elemeit centrifugálással szeparáltuk, ezt követően PBS- el öblítettük. A PBS –sel készült, különböző koncentrációjú tenzid oldatokhoz 5×10^7 számú erythrocytát adtunk. 10 perces, 37°C-on történő inkubálás után a mintákat centrifugáltuk. A hemolízis következtében

kiszabaduló hemoglobin abszorbanciáját mértük a felülúszóban. A kontroll kísérlet során az erythrocytákat desztillált vízben inkubáltuk 10 percig, ez alatt végbement a teljes hemolízis. Majd egy végső centrifugálást követően megmértük a felülúszóban lévő, kiszabadult hemoglobin abszorbanciáját. A kontroll minták alapján számított hemolizált sejtek arányát ábrázoltuk a vizsgált koncentráció függvényében.

3.4. Sejttenyésztés

A kísérletekhez használt humán adenokarcinoma sejtvonal az ECACC-tól (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) származott. Az in vitro sejttenyésztés során a sejteket fiziológiás körülményekhez hasonló letapadó sejt kultúrához alkalmas sejttenyésztő edényben, 10 (v/v)% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot 1 (v/v)% nem esszenciális aminosavat és 100 mg/ml gentamicint tartalmazó DMEM tenyésztő médium folyadékban növesztettük CO₂ termosztátban (5% CO₂ atmoszférában) 37°C -on 95 % páratartalom mellett. A sejteken a tápoldat cserét minden 3. napon végeztünk, lamináris áramlású steril fülke alatt. A laminár boks alkalmazásával a sejttenyésztés mikrobális fertőződésének lehetőségét minimálisra csökkentettük. A kultúra kialakítását a telepítő edényben ~10⁶ db sejttel indítottuk. A következő hat napban a sejtek száma exponenciálisan növekedett, majd a hetedik napon elérte a telítési szakaszt, kialakult a letapadó sejtvonalakra jellemző konfluens kultúra. Ebben a stádiumban történt a Caco-2 sejtek passzálása laminár boks alatt. A sejttenyésztő médium eltávolítása után a tápoldat maradékát PBS oldattal lemostuk. A letapadó sejtek szuszpenzióba viteléhez enzimként 0,05 (m/v)% tripszin oldatot valamint kelátképzőként 0,02(m/v)% etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) oldatot használtunk. Az emésztés során a sejteket 2 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a reakciót ötszörös mennyiségű friss médium hozzáadásával állítottuk le. A médiumban lévő szérum inaktiválja a tripszint. A sejtuszuszpenziót ezután 1100 rpm fordulaton, szobahőmérsékleten 6 percen keresztül centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után 10 ml friss médiumban a sejteket szuszpendáltuk. A sejtuszuszpenzióban lévő sejtek számát Bürker kamra segítségével számoltuk. A sejtuszuszpenzió ~10⁶ db sejtet tartalmazó mennyiségét steril telepítő edénybe pipettáztuk, majd a sejteken lévő tápoldat mennyiségét 10 ml-re egészítettük ki. A további vizsgálathoz 22-45 passzázsszám közötti sejteket használtunk.

3.5. Sejt életképességi vizsgálatok, MTT, LDH teszt

Az MTT kísérletek során a Caco-2 sejtek mitokondriális aktivitás változását mértük. Az életképes sejtek mitokondriumainak belső membránjában és mátrixában zajló oxidatív reakciókban résztvevő dehidrogenázok a vízben oldható sárga színű 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) oldatot lila színű vízben oldhatatlan formazán kristályokká redukálják. Tekintettel arra, hogy a mitokondriális elektrontranszport és energiatermelés alapvető feltétele a sejt működésnek, csak a formazán előállítására képes sejteket tekintjük vitálisnak. A lila szín mélysége jól korrelál az életképes sejtek arányával. A vizsgálathoz a Caco-2 sejteket, 7 nap alatt az előző pontban ismertetett módszerrel 96 lyukú tenyésztő plate-ben (10^4 sejt/lyuk) növesztettük. A növesztés során a 3. napon a tenyésztő médiumot lamináris áramlású fülke alatt lecseréltük. A konfluens sejtréteg kialakulását követően különböző koncentrációjú, PBS-ben készült tenzid oldatot pipettáztunk a sejtekre. 30 perces inkubálás után PBS-el készült, 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatra cseréltük a vizsgálati mintákat és 37 °C -on további 3 órán keresztül inkubáltuk. A felülúszó eltávolítása után, a keletkezett formazán kristályokat 150 μ l sósavas 2-propanollal (2-propanol: sósav =25:1) oldottuk fel. Az oldatok abszorbanciáját FLUOstar Optima microplate reader segítségével 570 nm-en mértük. Korrigálásként kivontuk az 570 nm -en mért abszorbancia értékekből a sejtörmelék szuszpenzió, mint háttér 690 nm-en mért abszorbancia értékeit. Az így kapott eredményeket kezeletlen kontroll minták abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a tenzid koncentráció ellenében ábrázoltuk. Az ábrák segítségével meghatároztuk az egyes felületaktív anyagokra jellemző IC_{50} értékeket.

A károsodott sejtekből felszabaduló Laktát-Dehidrogenáz (LDH) enzim extracelluláris aktivitásának mérésével felderíthető a membrán szolubilizációs képesség mértéke. A kísérletekben a korábban ismertetett módon a sejteket 96 lyukú plate-ben növesztettük. A konfluens sejtréteg kialakulását követően különböző koncentrációjú, PBS-ben készült tenzid oldatot pipettáztunk a sejtekre. A sejtet vagy sejtörmeléket nem tartalmazó felülúszókat 30 perc inkubáció után, detektálási célból egy másik 96 lyukú plate-be pipettáztuk. A mintákhoz az LDH-kit részeként megvásárolt katalizátort (Diaforáz/ NAD^+ keverék) és festéket (Iodotetrazólium klorid/Na laktát) 1:45 arányban a vizsgált felülúszóval megegyező mennyiségben hozzáadtuk. A minták abszorbanciáját, 30 perces sötét inkubálás után, FLUOstar Optima microplate reader segítségével 492 nm-en mértük. Az így kapott eredményeket kezeletlen

kontroll minták, valamint a 100% ban sejtpusztító hatású Triton-X 100 abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a tenzid koncentráció ellenében ábrázoltuk. Az ábrák segítségével meghatároztuk az egyes felületaktív anyagokra jellemző IC_{50} értéket, amely a vizsgálati anyag azon koncentrációja ahol a teljes sejtszámhoz viszonyítva az életképes sejtek aránya 50%.

3.6. Transzepitheliális Ellenállás (TEER) mérése Caco-2 monolayeren

A Transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréséhez a sejteket a korábban ismertetett tenyésztési eljárással, azonban ebben az esetben 0,4 μm pórusméretű polikarbonát inzertekre szélesztettük. Az inzerteket 12 lyukú platekbe helyeztük úgy, hogy a plate-be pipettázott tápoldat szintje az inzertek apikális kamrájában lévő tápoldat szintjével azonos legyen. A sejteket ehhez 500 μl -ben vettük fel a bazális kamrába pedig 1500 μl tápoldatot pipettáztunk. A TEER mérés során az apikális és a bazális kamrába helyezett elektródok közötti elektromos ellenállást mértük. A TEER értékek mértékegysége $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$. Mérési körülményként rögzítenünk kell a pH és a hőmérséklet mellett a méréshez közegként használt sejtenyésztő médium pontos összetételét is. Az ellenállás értékek meghatározása előtt a pontos mérés biztosításához az elektródokat a méréshez használt tápoldatban ekvilibráltuk. A sejtek membránra szélesztését követően az első napokban a TEER értékek növekedését, a 4.-5. napon a TEER értékek stagnálását, majd 8.- 10. napon a konfluens sejtréteg előregedése miatt az ellenállás ismételt csökkenését figyeltük meg. A transzport vizsgálatokat a konfluens sejtréteg kialakulását követően, de a TEER értékek csökkenése előtt az ellenállási értékek plató fázisában végeztük. A plató fázisban elvárt TEER értékek tekintetében a nemzetközi irodalomban eltérő adatokat közöltek. Yau Yi Lao és munkatársai 300-540 $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ TEER értékeket mértek míg Braun és munkatársai a mi méréseinkkel harmonizáló 750-800 $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ ellenállást mértek a konfluens réteg kialakulásakor.

3.7. Caco-2 membrán transzport vizsgálata

A felületaktív anyagok paracelluláris transzportra gyakorolt hatását ismert kinetikával permeáló Lucifer yellow festékanyag átjutást monitorozva vizsgáltuk. A kísérletet megelőzően a Caco-2 sejteket Transwell® (0,4 µm pórusméret, 2x10⁵ sejt/inzert) polikarbonát inzerten növesztettük. A sejtek tenyésztése a korábban ismertetett körülmények között történt. Az inzerteken a médiumot 2 naponta lecseréltük. TEER méréseink alapján a transzport kísérletekhez használt stabil Caco-2 monolayer a kiültetést követő 20-30 nap után alakult ki. A sejtek konfluenciáját a két kompartment közötti transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) értékek mérésével követtük nyomon (Millicell-ERS volthometer, Millipore, USA). A mért TEER értékeket az üres inzert ellenállásával és az effektív felülethányaddal korrigáltuk. A transzport kísérletekben a 800 Ohm x cm² feletti TEER értékekkel jellemezhető monolayereket használtuk. Minden minta transzportra gyakorolt hatását három párhuzamos inzerten vizsgáltuk. Az inzerteket HBSS-ben mostuk (37°C, 30 perc). A bazális kamrát akceptor oldatként tiszta HBSS -el töltöttük fel. Az apikális kamrába 40 µg/ml koncentrációjú Lucifer yellow HBSS -el készült oldatát, mint donor oldatot pipettáztuk. A meghatározás során mintát a bazális kamrából 10., 30., 60., és 120. percben vettük. A minták fluoreszenciáját FLUOstar Optima microplate reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével 450 nm-en mértük.

3.8. Immunohisztokémia

A vizsgálatokhoz a Caco-2 sejteket üveg fedőlemezekon növesztettük az előző pontokban ismertetett módon. A konfluens sejtréteg kialakulása után a mintákat 60 percen át kezeltük a kísérletes anyagok HBSS-el készült oldatával. Kontrollként a sejteket tiszta HBSS-el inkubáltuk. A minták eltávolítása után a lemezeket PBS-el (pH 7.3) mostuk majd fixálásként 10 percig metanol aceton 1:1 arányú keverékével kezeltük. Ezután a sejteket anti-ZO-1, anti-claudin-1 , anti-β-catenin primer antitestek 1:200 arányú oldatával inkubáltuk 8 órán át, a nem specifikus antitest kötő helyeket blokkoló a 3%-os szarvasmarha szérum albumin oldattal együtt. Ezt követően a Caco-2 sejteket 60 percen keresztül kezeltük Cy3-al jelölt másodlagos anti-nyúl, IgG 1:400 arányban PBS-ben oldott antitesttel a ZO-1 és a β-catenin, valamint Alexa 488 anti-nyúl IgG 1:400 arányú oldatával a Claudin-1 junkcionális fehérjék jelöléséhez. A Caco-2 sejtek nucleusait a kísérlet során bis-benzimid (Sigma–Aldrich, Magyarország) (10µmol) festékkel

festettük meg. Az inkubálások között a lemezeket három alkalommal mostuk PBS-el. A lemezeket Gel Mount segítségével tárgylemezre rögzítettük majd a jelöléseket NikonEclipse TE2000 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A megjelölt junkcionális fehérjékről a felvételt, Spot RT digital kamera segítségével készítettük.

3.9. Statisztikai analízis

Kísérleteink során kapott eredményeinket statisztikailag a SigmaStat (version 3.1; SPSS, Inc.) segítségével elemeztük. Az eredményeink között ez alapján számított átlagukat tüntettük fel \pm SD. A csoportok összehasonlítását ONE WAY ANOVA módszerrel végeztük, amelyet Tukey's teszt követett. A kísérleti eredményeinket legalább 3 párhuzamos mérés szolgáltatta a különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4.Eredmények és Megbeszélés

4.1. A felületaktív anyagok fizikai tulajdonsága és toxicitása

Munkánk során a hatékony gyógyszeres terápia megvalósulása érdekében formulált korszerű hatóanyagleadó rendszerek képzéséhez használt segédanyagcsoportot vizsgáltuk. A biológiai hasznosíthatóság fokozására használt felületaktív anyagok közül azokat választottuk, amelyek segítségével a BCS II. III. csoportjába tartozó hatóanyagokból ön(mikro)emulgeáló rendszerek képezhetők. Kísérletssorozatunkban különböző szerkezetű és eltérő HLB értékekkel jellemezhető tenzidek élő szervezetre gyakorolt hatását elemeztük. A vizsgált nem ionos tenzidek mindegyike amfifil tulajdonságú észter vegyület, azonban hidrofil feji részükben, valamint észterezettségi fokukban és az észter komponens szénatomszámában is jelentősen eltérnek. A klasszikusnak tekintett poliszorbát vegyületek, mint a gyógyszerári gyógyszerkészítésben és a gyógyszeriparban régóta nagy mennyiségben alkalmazott felületaktív anyagok, viszonyítási alapul szolgáltak a gyógyszer technológiai feladatok megoldásához leggyakrabban választott modern nem ionos tenzidek jellemzéséhez. A vizsgált tenzidek között voltak az önemulgeáló rendszerek képzéséhez tenzidként illetve kotenzidként használt polioxietilén-glikol származékok így a Labrasol[®], a Cremophor RH 40[®], RH 410[®], RH 60[®], WO7[®], a hidrofil molekuláris részben szorbit komponens is tartalmazó Poliszorbát 20, 60, 80 valamint cetil-sztearil alkohol származékok, mint a Cremophor A25[®], A6[®]. A propilén-glikol típusú tenzidek közül a Capryol 90[®] -t és PGMC[®] -t valamint a Lauroglycol 90[®] -t és FCC[®] -t. Az ionos tenzidek közül pedig a Nátrium-lauryl-szulfátot vizsgáltuk.

Az elérhető legtokéletesebb szolubilizáló hatást, sok esetben a gyártók egy terméken belül adott alapszerkezetű tenzidek különböző észter és zsírsav tartalmú keverékeinek kombinálásával érik el. Így a modern hatóanyagleadó rendszerek képzéséhez egy gyári név alatt tulajdonképpen, tenzidkomponensek keverékét javasolják. A komponensek különböző aránya azonban a szerkezet és hatás közötti összefüggések megértését jelentősen megnehezíti. Ennek ellenére az általunk végzett kísérletek eredményeiből a tenzid típusokra jellemző szignifikáns különbségek állapíthatók meg az adott koncentrációjú tenzidek sejtletképessegre gyakorolt hatásai között. Azonban az, hogy a kedvezőbb toxikus karakter a tenzid komponenseknek vagy az eltérő szerkezet felépítési elvnek köszönhető, nem igazolható egyértelműen. Ezen megfontolások

alapján a Gattefossé és a BASF termékeit külön-külön vetettük össze a klasszikus tenzidekkel, illetve a gyártók által rendelkezésünkre bocsátott tenzidcsoporton belül állítottunk fel egyfajta sorrendiséget a tenzidek toxikus karaktere alapján.

4.1.1. A tenzidek felületi feszültségre gyakorolt hatása

A felületi feszültség mérésekor tapasztaltak alapján következtetéseket vonhatunk le az adott tenzid emulgensként vagy koemulgensként történő alkalmazhatóságára a gyógyszerkészítményben. Azon felületaktív anyagok melyek felületi feszültségre gyakorolt hatását alacsony koncentrációban ($CMC \leq 0,1$ V/V%) is kifejtik, a hatóanyagleadó rendszerekben emulgensként nagy mennyiségben alkalmazva biztonságosabb alkalmazást tesznek lehetővé, mint azon származékok melyek CMC –je magasabb ($>0,1$ V/V%) .

Azon tenzidek, amelyek alacsony koncentrációban is alkalmasak micellaképzésre jobb szolubilizáló tulajdonsággal rendelkeznek. Így gyógyszer technológiai alkalmazásuk kívánatosabb mint azon anyagoké melyek előnyös szolubilizáló tulajdonságukat csak magasabb koncentrációban alkalmazva fejtik ki. A fizikai paraméterek meghatározása mellett a biztonságos alkalmazhatóságot szem előtt tartva, fontos a tenzidek élő szervezetre gyakorolt hatásának elemzése is.

4.2. A tenzidek sejtéletképességre gyakorolt hatása

4.2.1. MTT és LDH vizsgálatok

A tenzidek sejtéletképesség változásra gyakorolt hatását MTT citotoxicitási teszttel vizsgálatuk. A kísérletek során az életképes Caco-2 sejtek mitokondriumainak belső membránjában és mátrixában zajló oxidatív reakciókban résztvevő dehidrogenázok aktivitását mértük. A propilén glikol származékokat vizsgálva bizonyos esetekben a feltételezett mitokondriális aktivitás csökkenés olyan kismértékű volt, hogy ezen anyagok toxikus karaktere az MTT teszt segítségével nem volt kimutatható. Ezen tenzidek vizsgálatához ezért szükséges volt LDH sejtéletképességi vizsgálat elvégzése is. Szemben az MTT vizsgálatokkal az extracelluláris laktát dehidrogenáz

megjelenése a sejt működési zavara előtt már a citoplazma membrán károsodását követően azonnal mérhető.

A Gattefossé tenzidjeinek vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy minden felületaktív anyag membránkárosító hatása a koncentráció emelésével növekszik. A Capryol PGMC, Lauroglycol 90 és a Lauroglycol FCC hatására bekövetkező mitokondriális aktivitás csökkenés csak magas koncentrációkban mérhető, így a tenzidcsoport citotoxicitási profiljának felvételéhez szelektívebbnek bizonyult a Caco-2 sejtvonal esetében szenzitívebb vizsgálat, az extracelluláris LDH aktivitás meghatározása. Az MTT vizsgálat során megállapított IC_{50} értékek sorrendisége megegyezik az LDH teszt alapján számított IC_{50} értékek sorrendjével.

A mérések alapján a Polietilén glikol származékok minden esetben alacsonyabb koncentrációban okozták a sejtek pusztulását, mint a propilén glikolok. A magasabb HLB-vel jellemezhető Poliszorbát vegyületek bizonyultak a legtoxikusabbnak, míg az ugyancsak PEG alapú Labrasol[®] esetében a szorbit komponens hiánya magasabb IC_{50} értékekhez vezetett. A vegyületek kémiai szerkezetét figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a nem-ionos hidrofíl rész nagysága növeli a citotoxicitást. Abban az esetben, ha a hidrofíl rész azonos, akkor a szénlánc növelésével a CMC és a citotoxicitás is csökken. A poliszorbátok esetén a szorbit komponens jelenléte csökkenti az IC_{50} értékét, tehát növeli a toxikus tulajdonságot. A Labrasol[®] esetén, tekintettel arra, hogy mono-, di-, és triglicerid komponenseket egyaránt tartalmaz és polietilén glikol származék, emelkedik az IC_{50} értéke, tehát a citotoxicitás csökken. Abban az esetben viszont, ha a hidrofíl rész változik polietilén glikolról propilén glikolra (HLB érték csökken), a molekula „lipofilabb”, akkor a tenzidmolekulán belül a monoészter aránya határozza meg a citotoxicitást. A szénlánc növekedésével a CMC és a citotoxicitás is csökken.

Fontos megállapítani, hogy a tenzid keverékek nem bizonyultak toxikusabbnak, mint azonos koncentrációjú alkotóik önmagukban. A Buyukozturk és munkatársai által korábban végzett vizsgálatokkal ellentétben kísérleteinkben nem találtuk additívnak a toxikus tulajdonságot [Buyukozturk és mtsai 2010]. A hidrofíl karakterű (HLB: 14-16,7), rendkívül jó szolubilizáló képességű Poliszorbát vegyületek és a Labrasol[®] sokkal alacsonyabb kritikus micellaképzési koncentrációval (CMC) jellemezhetőek, mint a lipofil karakterű (HLB: 4–6) propilén glikol észterek, azaz a Capryol 90, Capryol PGMC, Lauroglycol 90 és a Lauroglycol FCC. A Poliszorbátok -CMC értékük alatt- monomerként lépnek kapcsolatba a bélhámsejtek membránjával, megváltoztatva annak fiziológiás tulajdonságait. A koncentráció növelésével a

CMC eléréséig nő a jelen lévő tenzid monomerek reakciókészsége, ami a sejtek permeabilitás változásához és károsodásához is vezethet. A kritikus micellaképzési koncentráció feletti tenzid tartalmú oldat, micellák és monomerek keverékének tekinthető. Ez a rendszer a membrán foszfolipid kettősrétege mellett más membránalkotó, így például membránfehérjék szolubilizálására is képes. A Labrasol[®] bélhámsejtre gyakorolt hatása CMC értéke alatt nem volt kimutatható. Az alacsony koncentrációban képződő micellái miatt (méréseink alapján a Labrasol[®]-nak a legalacsonyabb a CMC-je), a Labrasol[®] szolubilizáló képessége jobb, magas IC₅₀ értékük miatt pedig alkalmazásuk is biztonságosabb, mint a Poliszorbát vegyületeké.

4.2.2. Caco-2 transzmembrán kísérletek

A Lucifer-Yellow átjutási modell a nemzetközi irodalomban elfogadott indikátora a Caco-2 membránon keresztül történő transzportnak. Segítségével információt kaphatunk a bélhámsejtek közötti junkcionális fehérjék jelenlétéről illetve elrendezésük megváltozásáról.

Kísérletsorozatunkban két kompartmentes modellben vizsgáltuk a tenzidek transzepitheliális elektromos ellenállásra (TEER-re) gyakorolt hatását. A TEER meghatározását korábbi kísérletekben használták a tenzidek membránfunkció változásra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Eredményeink alapján a propilén glikol észterek kivételével, nem toxikus koncentrációban vizsgált tenzidek és azok keverékei csökkentették a két kompartment közötti ellenállást, ami a membránstruktúra megváltozását igazolja. Ezen vizsgálati minták a Lucifer yellow Caco-2 monolayeren való átjutásának kinetikáját is megváltoztatták. Transzport kísérleteink eredményei alapján a nem toxikus koncentrációjú Labrasol[®] és a nem toxikus koncentrációban alkalmazott Poliszorbát vegyületek fokozták a fluoreszcens festék átjutási sebességét. A 0,001% -ban használt Poliszorbátot (20, 60, 80) és 0,05%-ban Labrasol[®]-t tartalmazó keverékek Caco-2 membránon keresztüli transzport fokozó hatása nagyobb mértékű volt, mint az önállóan vizsgált komponenseké. Kísérleteink során kapott eredményeinkből feltételeztük, hogy a segédanyagok alkalmazásával paracelluláris transzport fokozódás jött létre. A Lucifer yellow festékanyag fokozott átjutása azonban egyaránt markere lehet a sejtek közti átjutás mellett a fluid fázisú endocitózisnak is. Számos transzport fokozó segédanyag vizsgálatánál azonban igazolták, hogy a paracelluláris út megnyílása elégséges feltétele a hatóanyag átjutás fokozódásának. Ugyanis az AJC legmeghatározóbb alkotói a tight junction fehérjék, így azok redisztribúciója nagymértékben fokozza a membránon keresztül történő anyagáramlást.

A transzport fokozódás háttérében álló membránfunkció változás felderítése érdekében, immunohisztokémiai festéssel jelöltük a Caco-2 monolayer sejtkapcsoló struktúrái közül a ZO-1, Claudin-1 és a β -catenin junkcionális fehérjéket. Az immunohisztokémiai felvételek igazolták, hogy a vizsgált tenzid minták a junkcionális fehérjék átrendeződését, Caco-2 sejtek általi újrafelvételét okozták anélkül, hogy a sejtek pusztulását okozták volna. A kísérletet követően a Caco-2 monolayeren végzett TEER mérés során azt tapasztaltuk, hogy a minták eltávolítása után a membrán két oldala közötti ellenállás legkésőbb 24 óra elteltével a kiindulási értékre visszaállt. Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a transzportfokozódás nem a monolayer megbomlásának tulajdonítható, ezért a hatás reverzibilis.

4.2.3. MTT és hemolízis vizsgálatok

A Cremophor[®] segédanyagok a modern technológiai kihívások kezelésében ugyancsak gyakran és nagy mennyiségben alkalmazott additív komponensek. Ezen tenzidek illetve kotenzidek a hatóanyagok szolubilizáló képessége mellett ugyancsak kölcsönhatásba léphetnek különböző biológiai membránstruktúrákkal, ez által okozva irritációt illetve sejtkárosodást. A vizsgálat célja ebben az esetben is a biztonságosan alkalmazható segédanyag koncentráció megállapítása volt. Az orális formuláció biztonságosságának igazolására a tenzidek Caco-2 membránra gyakorolt hatását vizsgáltuk MTT citotoxicitási teszt segítségével.

A parenterális készítmények hatóanyagául választott gyógyszeranyagok jelentős része a BCS szerinti osztályozás alapján, ugyancsak a II. III. vagy IV. csoportba sorolható. Fent említett tulajdonságaik alapján sok esetben célszerű valamilyen additív komponenes hozzáadásával a parenteráliában lévő hatóanyag oldhatóságát illetve membránpermeabilitását javítani. Az ipari fejlesztés során, számos véráramba juttatott készítmény formulálásához választják segédanyagként a különböző PEG alapú Cremophor[®] anyagokat. Számos előnyös tulajdonságuk ellenére használatuk gondos körültekintést igényel. A véráramba juttatott készítmények esetében vizsgálnunk kell a gyógyszerkészítmény minden alkotójának így az alkalmazott felületaktív anyagoknak a vér elemeivel történő esetleges kölcsönhatását. Ezen tulajdonság felderítésére a tenzidek koncentrációfüggő hemolitikus aktivitását vizsgáltuk.

A sejtelképességi vizsgálatok során a tenzidek koncentrációfüggő károsító hatását figyeltük meg. A vizsgált felületaktív anyagok közül a Cremophor WO7[®] okozta a legkisebb koncentrációban a humán colon adenocarcinoma sejtek pusztulását. Az MTT teszt alapján a mért IC₅₀ értékek szerinti növekvő sorrend a következő: Cremophor[®] WO7 > CO455 > CO410 > A6 > A25 > RH60 valamint RH410 > RH40. A vizsgált tenzidek közül tehát a PEG 40 alapú segédanyagok kevésbé bizonyultak toxikusnak mint a PEG 7, a PEG 35, a PEG 60 valamint a Cetilsztearil alkohol struktúrájú felületaktív anyagok. Az ugyancsak PEG 40 alapú Cremophor CO410[®] és a A Cremophor CO455[®] esetében mérhető alacsonyabb IC₅₀ érték háttérében az áll, hogy ezen anyagok önmagukban keverékek, viszont ezek olyan összetételek amelyeket a gyártó kizárólag külsőleges felhasználásra javasolja.

A hemolízis tesztet elvégezve a tenzidek hemolizáló tulajdonságát ugyancsak koncentráció függőnek találtuk. A teszt során mért HC₅₀ értékek azonos sorrendiséget mutattak az MTT vizsgálat során mért HC₅₀ értékekével. Ugyanakkor a vizsgált felületaktív anyagok bélhámsejtek mitokondriális-funkció változására gyakorolt hatását kevésbé találtuk kifejezettnek, mint ugyanazon vegyületek hemolitikus potenciálját. Ezen megállapítást alátámasztja, hogy a cremophor vegyületek minden esetben az IC₅₀ mellett alacsonyabb HC₅₀ -értékekkel jellemezhetőek.

Mindezek ismeretében elmondható, hogy összefüggés van a vizsgált tenzidek fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint azok bélhámsejtek életképességére illetve vörösvértestek membránjára gyakorolt hatása között. A bélhámsejteken keresztüli hatóanyagátáramlás fokozódása pedig növeli a farmakon szisztémás koncentrációját. A hatóanyag megfelelő koncentrációjának jelenléte a receptor közelében a gyógyszerhatás alapfeltétele. Azonban a hatóanyagkutató és fejlesztés eredményeként létrehozott kémiai anyagok molekulatömege és/vagy lipofilitása olyan nagy, hogy ezek következtében a biohasznosulás sok esetben igen kismértékű. Az amfipatikus felületaktív anyagok szerkezetüknek köszönhetően szolubilizálni képesek a rossz vízoldhatóságú apoláris hatóanyagokat. Micellák képzésével a hatóanyag számára ideális apoláris környezetet biztosítanak a szervezet hidrofíl közegrendszerében. A formulálás szempontjából legelőnyösebb tenzidek már alacsony koncentrációban képesek micellákba rendeződni. Kísérleteink alapján megállapítható hogy, az alacsonyabb CMC vel rendelkező polietilén glikol észterek nem toxikus koncentrációban is képesek a sejt sejt közötti szoros kapcsolatot fenntartó AJC proteinek

átrendezésével, reverzibilisen megváltoztatni a membrán barrier funkcióját valamint az, hogy ezen vegyületeket kombinációkban alkalmazva sejtpusztító hatás nélkül képesek még jelentősebb membrán integritásváltozást okozni.

Ezen összefüggések felismerése hozzájárulhat olyan gyógyszer technológiai gyakorlat megalapozásához, amely a készítményekben legkisebb sejtkárosító hatással bíró segédanyagokat részesíti előnyben. Eredményeink hozzájárulhatnak jobban tolerálható és magasabb biológiai hatás kifejtésére képes önemulgeáló rendszerek kifejlesztéséhez a megfelelő citotoxikus tulajdonságú tenzidek kiválasztása alapján. Ezáltal az alkalmazás biztonságossága tovább javul, amellyel, hogy egyszerűbb és könnyebb gyógyszerelési lehetőséget is nyújthat mind a beteg mind a szakember számára.

5. Összefoglalás

1. A Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén különböző, önemulgeáló rendszerek képzéséhez használt felületaktív anyagokat jellemeztem azok fiziko-kémiai és élő sejtekre gyakorolt hatása alapján.
2. A felületi feszültség változás alapján történő Du Nüoy pull out ring és Wilhelmy pull out plate módszer beállításával meghatároztam a tenzidek kritikus micellaképzési koncentrációját, így jellemeztem ezen segédanyagokat oldékonyság növelő tulajdonságuk alapján.
3. Caco-2 sejtvonalon jellemeztem a felületaktív anyagok bélhámsejtek életképességére gyakorolt hatását MTT illetve LDH teszt segítségével.
4. A parenterális felhasználásra szánt segédanyagok toxikus hatását, humán vörös vértesteken a hemolizáló tulajdonság mérésével vizsgáltam.
5. Kísérletsorozataink alapján megállapítható, hogy összefüggés van a tenzidek szerkezete és citotoxikus karaktere valamint a membrán permeabilitás változásra gyakorolt hatása között, azonban a megállapítások általános igazolására a megvizsgált tenzidtípusok további bővítésére van szükség.
6. Az alacsony CMC mellett magas IC_{50} -nel jellemzett additívek önmagukban és keverékekben alkalmazva is előnyösnek bizonyultak. Ugyanis jobb tolerálhatóságuk mellett reverzibilis membránon keresztüli permeabilitás fokozó tulajdonságuk is jelentős.
7. A tenzidek jellemzése során kapott, koncentrációfüggő sejtmembrán károsító hatást különböző mértékűnek találtuk Caco-2 illetve a humán vvt-k esetében. Ez a tulajdonság igazolja azt, hogy a gyógyszerbiztonság érdekében a toxicitási vizsgálatok során a komponensek élő szervezetre gyakorolt hatását a jövőben az alkalmazás módjának megfelelő sejtvonalon illetve sejteken is szükséges megvizsgálnunk.
8. Kísérleti eredményeim gyakorlati hasznát abban látom, hogy a beállított módszereink alkalmasak a tenzidek új rutin gyógyszerbiztonsági vizsgálatának elvégzéséhez. A gyártók az így kapott IC_{50} illetve HC_{50} értékeket a termékükön feltüntetve segítséget nyújthatnak a formulálást végző szakembernek jól tolerálható és minden szempontból leginkább megfelelő gyógyszerkészítmény kialakításához.

6.Közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/342/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ujhelyi Zoltán
Neptun kód: JLC63G
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtm azonosító: 10036509

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

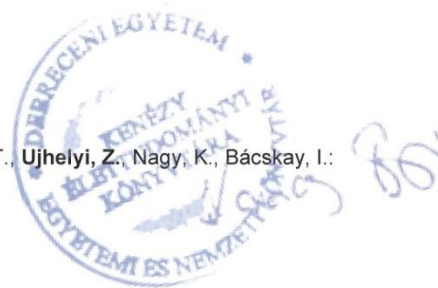
1. **Ujhelyi, Z.**, Róka, E., Fenyvesi, F., Fehér, P., Váradi, J., Réti-Nagy, K., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Assessment of the hemolytic activity and cytotoxicity of different PEG-based solubilizing agents.
Pharmazie. 68, 383-384, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2013.2207>
IF:1.003
2. **Ujhelyi, Z.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Fehér, P., Kiss, T., Veszelka, S., Deli, M., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer.
Eur. J. Pharm. Sci. 47 (3), 564-573, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.005>
IF:2.987





További Közlemények

3. Ujhelyi, J., **Ujhelyi, Z.**, Szalai, A., László, F.J., Cayasso, M., Vecsernyés, M., Pórszász, R.:
Analgesic and anti-inflammatory effectiveness of sitagliptin and vildagliptin in mice.
Regul. Pept. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2014.09.006>
IF:2.014 (2013)
4. **Ujhelyi Z.**, Vecsernyés M., Bácskay I.: Önemulgeáló rendszerek formulálása tenzid
komponenseinek élő sejtekre gyakorolt hatásának ismeretében.
Acta Pharm. Hung. 84 (2), 1-8, 2014.
5. Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Bacsó, Z., Gutay-Tóth, Z., Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L.,
Váradi, J., **Ujhelyi, Z.**, Fehér, P., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fluorescently
Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase
Endocytosis.
PLoS One. 9 (1), e84856, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084856>
IF:3.534 (2013)
6. **Ujhelyi Z.**, Vecsernyés M., Bácskay I.: Mikroemulzió komponenseiként alkalmazott felületaktív
anyagok élő sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata kémiai szerkezetük és micellaképzési
tulajdonságuk alapján.
Acta Pharm. Hung. 83, 1-9, 2013.
7. Bakó, J., Vecsernyés, M., **Ujhelyi, Z.**, Bácskay, I., Borbíró, I., Bíró, T., Borbély, J., Hegedűs, C.:
Composition and characterization of in situ usable light cured dental drug delivery hydrogel
system.
J. Mater. Sci.-Mater. Med. 24 (3), 659-666, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4825-x>
IF:2.379
8. Fehér, P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Váradi, J., Kiss, T., **Ujhelyi, Z.**, Nagy, K., Bácskay, I.:
Topical application of *Sylibum Marianum* extract.
J. Med. Aradean. 14, 5-8, 2011.





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



9. Fenyvesi, F., Kiss, T., Fenyvesi, É., Szente, L., Veszeka, S., Deli, M.A., Váradi, J., Fehér, P.,
Ujhelyi, Z., Tósaki, Á., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Randomly Methylated beta-Cyclodextrin
Derivatives Enhance Taxol Permeability Through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell
Monolayer.

J. Pharm. Sci. 100 (11), 4734-4744, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22666>

IF:3.055

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,972

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,99**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2014.10.22.



7.Előadások

Róka Eszter, Ujhelyi Zoltán

Új alpha-ciklodextrin származékok citotoxicitásának és transzport fokozó hatásának vizsgálata
XI. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2013. október 17-18.

Róka Eszter, Ujhelyi Zoltán, Fehér Pálma, Vecsernyés Miklós, Florent Perret - Bácskay Ildikó
Alfa-ciklodextrin származékok citotoxikus és transzport fokozó hatásának vizsgálata Caco-2
sejtvonalon

*XVI. Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '13, Herceghalom, 2013.
szeptember 30 – október 1.*

Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Vecsernyés Miklós: Felületaktív gyógyszerészi segédanyagok
citotoxicitásának vizsgálata bélhám modell rendszerben

Magyar Klinikai Farmakológusok XIV. Továbbképző Kongresszusa 2012.december 6.- 8.

Fenyvesi Ferenc, Szászné Réti-Nagy Katalin, Bacsó Zsolt, Varga Renáta, Váradi Judit, Bácskay
Ildikó, Fehér Pálma, Ujhelyi Zoltán, Vecsernyés Miklós: Random metilezett bétaciklodextrin
permeabilitásának vizsgálata CaCO-2 sejtrétegen

*XVII. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia és IX. Gyógyszer az Ezredfordulón
Konferencia 2012. augusztus 27-29.*

Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Fehér Pálma, Fenyvesi Ferenc, Váradi Judit, Réti-Nagy Katalin, Róka Eszter, Veszélka Szilvia, Deli Mária, Vecsernyés Miklós: Felületaktív anyagok citotoxicitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

XVII. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia és IX. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia 2012. augusztus 27-29.

Ujhelyi Zoltán, Fehér Pálma, Róka Eszter, Bácskay Ildikó, Vecsernyés Miklós: α -ciklodextrin származékok vizsgálata Caco-2 sejtmodellel

Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '12 MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Bizottság Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai munkabizottsága 2012 szeptember 14.

Róka Eszter, Ujhelyi Zoltán, Bácskay Ildikó

Alpha-ciklodextrin származékok szerkezet-citotoxicitás összefüggésének vizsgálata

DE OEC TDK Konferencia 2011/2012 Debrecen, 2012. február 17.

Ujhelyi Zoltán, Róka Eszter

Felületaktív anyagok szerkezetének és citotoxicitásának összefüggése valamint paracelluláris transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon.

X. Clauder Ottó Emlékverseny Budapest, 2011. október 13-14.

Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér

Pálma, Vecsernyés Miklós: Host- guest complexation of silymarin and ciclodextrin complexation.

Academic Days of Arad, The XXI th Edition, 20-22 May 2011. október 20.

Bácskay Ildikó, Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér

Pálma, Vecsernyés Miklós: Pharmaceutical and cosmetic formulation f silymarin and Silybum Marianum Seed Oil

Academic Days of Arad, The XXI th Edition, 20-22 May 2011. október 20.

Fenyvesi Ferenc, Bácskay Ildikó, Kiss Tímea, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér

Pálma, Vecsernyés Miklós: Nanopharmaceutical Formulation of drugs.

Academic Days of Arad, The XXI th Edition, 20-22 May 2011. október 20.

8. Poszterek

Eszter Róka, Zoltán Ujhelyi, Miklós Vecsernyés, Ildikó Bácskay

Evaluation of the relations between structure and cytotoxic effects and paracellular transport enhancer effect of different α -cyclodextrin derivatives

Balatonfüredi Nyári Konferencia, 2013. augusztus 16-17.

Róka, E., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Váradi, J., Réti-Nagy, K., Fenyvesi, É., Szenté L., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Vecsernyés, M.,

Relation of structure and cytotoxic effects of various α -cyclodextrin derivatives

International Pharmaceutical Federation (FIP) Annual Congress, Dublin, 2013. augusztus 29 - szeptember 5.

Eszter Róka, Zoltán Ujhelyi, Ildikó Bácskay, Ferenc Fenyvesi, Judit Váradi, Pálma Fehér, Katalin Réti-Nagy, Miklós Vecsernyés

Evaluation of the relations between structure and cytotoxic effects and paracellular transport enhancer effect of different α -cyclodextrin derivatives

16th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Sümeg, 2013. Szeptember 12-14.

Ujhelyi Zoltán, Fenyvesi Ferenc, Fehér Pálma, Váradi Judit, Réti-Nagy Katalin, Kéki Sándor, Zsuga Miklós, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó

Silybum Marianum tartalmú mikroemulzió formulálása és vizsgálata

XVII. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia és IX. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia 2012. augusztus 27-29.

Ujhelyi Zoltán, Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Váradi Judit, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó

Felületaktív anyagok és termer rendszerek citotoxicitásának vizsgálata

Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. 2009

Ujhelyi Zoltán, Fenyvesi Ferenc, Kis Gábor, Fehér Pálma, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó
Terner rendszerben alkalmazott felületaktív anyagok vizsgálata
XVI. Gyógyszer technológiai és VIII. Gyógyszer az ezredfordulón Konferencia
Siófok, 2010. október 20-22

Ujhelyi Zoltán, Fenyvesi Ferenc, Kis Gábor, Fehér Pálma,
Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó
Terner rendszerben alkalmazott felületaktív anyagok vizsgálata
Magyar Klinikai Farmakológusok XXII. Továbbképző Kongresszusa

Ujhelyi Zoltán, Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Váradi Judit, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó
Felületaktív anyagok és terner rendszerek citotoxicitásának vizsgálata
Magyar Klinikai Farmakológusok XXI. Továbbképző Kongresszusa

Zoltán Ujhelyi, Ferenc Fenyvesi, Tímea Kiss, Pálma Fehér, Mátyás Pétervár, Gábor Tajti, Sándor
Kéki, Miklós Zsuga, Miklós Vecsernyés, Ildikó Bácskay
Formulation studies of sylibum marianum seed extracts
4th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Bled Slovenia, 2011
szeptember 29-október 1.

Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér Pálma, Sente
Lajos, Fenyvesi Éva, Vecsernyés Miklós
Új generációs β -ciklodextrin származékok a taxol transzportjára gyakorolt hatásának vizsgálata
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. 2009

Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér
Pálma, Veszella Szilvia, Deli Mária, Sente Lajos, Fenyvesi Éva, Vecsernyés Miklós
Metil β ciklodextrin származékok taxol felszívódást elősegítő hatásának in vitro vizsgálata
XVI. Gyógyszer technológiai és VIII. Gyógyszer az ezredfordulón Konferencia
Siófok, 2010. október 20-22

Kiss Tímea Fenyvesi Ferenc, Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér Pálma, Sente Lajos, Fenyvesi Éva, Vecsernyés Miklós

Új generációs β -ciklodextrin származékok a taxol transzportjára gyakorolt hatásának vizsgálata
Magyar Klinikai Farmakológusok XXI. Továbbképző Kongresszusa

Kiss Tímea, Fenyvesi Ferenc, Bácskay Ildikó, Ujhelyi Zoltán, Váradi Judit, Fehér Pálma, Veszella Szilvia, Deli Mária, Sente Lajos, Fenyvesi Éva, Vecsernyés Miklós

Metil β ciklodextrin származékok taxol felszívódást elősegítő hatásának in vitro vizsgálata
Magyar Klinikai Farmakológusok XXII. Továbbképző Kongresszusa

Réti- Nagy Katalin , Bacsó Zsolt, Fenyvesi Éva, Sente Levente, Váradi Judit, Kiss Tímea, Ujhelyi Zoltán, Fehér Pálma, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó, Fenyvesi Ferenc

Fluoreszcens random metilezett béta-ciklodextrin intracelluláris akkumulációjának és in vitro felszívódásának vizsgálata.

*XVI. Gyógyszer-technológiai Konferencia és VIII. Gyógyszer az ezredfordulón Konferencia
Siófok, 2010. október 20-22.*

9. Támogatás



Nemzeti
Kiválóság
Program



ÚJ SZÉCHENYI TERV

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú *Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program* című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



KÖZIGAZGATÁSI ÉS IGAZSÁGÜGYI HIVATAL

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.