

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Innovatív heterogén diszperz rendszerek formulálása és
gyógyszertechnológiai vizsgálata**

Dr. Kósa Dóra

Témavezető: Dr. Ujhelyi Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések.....	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Biológiai barrierek.....	10
2.1.1. Bélhám barrier	11
2.1.2. A bőrham	12
2.2. A biohasznosulás növelésének érdekében használt gyógyszer technológiai segédanyagok.....	13
2.2.1. Vízoldékony sók képzése.....	13
2.2.2. Poláris csoportok beépítése.....	13
2.2.3. Komplexképzés.....	13
2.2.4. Hidrotróp anyagok alkalmazása.....	14
2.2.5. Felületaktív segédanyagok.....	14
2.3. Diszperzitásfok növelése	15
2.3.1. Klasszikus formulációk.....	16
2.3.2. Folyadékkristályok.....	16
2.3.3. Mikrokapszulák.....	19
2.3.3.1. Alginát mikrogöngyök	20
2.4. Célkitűzés	22
3. Anyagok és módszerek.....	23
3.1. Felhasznált anyagok	23
3.2. <i>Plantago lanceolata</i> kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai ..	23
3.2.1. <i>Plantago lanceolata</i> levél kivonása	23
3.2.2. Folyadékkristályok formulálása.....	23
3.2.3. Membrán diffúziós és permeabilitási vizsgálat.....	24
3.2.4. RTCA és transzepitheliális elektromos ellenállás mérés	25
3.2.5. UV-C expozíció HaCaT sejteken.....	25
3.2.6. Antioxidáns tesztek.....	26
3.2.6.1. DPPH gyökfogó aktivitás mérés	26
3.2.6.2. Lipidperoxidáció (MDA)	26
3.3. Peptid tartalmú nátrium-alginát göngyök formulálása és vizsgálatai.....	27
3.3.1. Nátrium-alginát és kalcium-klorid oldatok készítése.....	27
3.3.2. MCH tartalmú alginát göngyök formulálása	27

3.3.3. Bezáródási hatékonyság.....	27
3.3.4. Duzzadási képesség vizsgálata	28
3.3.5. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek	28
3.3.6. Részecskeméret-eloszlás meghatározása	28
3.3.7. <i>In vitro</i> kioldódás vizsgálat	29
3.3.8. Enzimatisz stabilitás	29
3.3.9. Transzport vizsgálat	29
3.3.10. Transzeptitáliis elektromos ellenállás (TEER) mérés	30
3.4. Sejttenyésztés és sejtéltéképességi vizsgálatok	30
3.4.1. <i>In vitro</i> bőr- és bélhám modell.....	30
3.4.2. MTT sejtéltéképességi vizsgálat	31
3.5. Statisztikai analízis	31
4. Eredmények.....	32
4.1. <i>Plantago lanceolata</i> kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai ..	32
4.1.1. <i>Plantago lanceolata</i> levél kivonása	32
4.1.2. Folyadékkristályok formulálása.....	32
4.1.3. <i>In vitro</i> kioldódás vizsgálat	34
4.1.4. HaCaT sejtproliférációs vizsgálat	35
4.1.5. MTT sejtéltéképesség vizsgálat	36
4.1.6. DPPH gyökfogó aktivitás vizsgálat	38
4.1.7. Lipidperoxidáció (MDA) vizsgálat.....	39
4.1.8. UV-C expozíció HaCaT sejteken.....	41
4.2. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai.....	44
4.2.1. MCH tartalmú nátrium-alginát mikrogöngyök formulálása	44
4.2.2. Bezáródási hatékonyság.....	44
4.2.3. Duzzadási képesség meghatározása.....	45
4.2.4. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek	46
4.2.5. Részecskeméret-eloszlás meghatározása	47
4.2.6. <i>In vitro</i> kioldódás vizsgálat	49
4.2.7. Enzimatisz stabilitás	49
4.2.8. MTT sejtéltéképességi vizsgálat	51
4.2.9. Transzport vizsgálat	52
4.2.10. Transzeptitáliis elektromos ellenállás mérések	53
5. Megbeszélés	55
5.1. <i>Plantago lanceolata</i> kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai ..	55

5.2. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai.....	57
5.3. Penterációfokozó vegyületek jelentőségének összegzése a kísérleti eredmények alapján	59
6.1. Összefoglalás.....	60
6.2. Summary	61
7. Irodalomjegyzék.....	62
7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom	62
8. Ábrajegyzék	77
9. Táblázatok jegyzéke	79
10.1. Tárgyszavak	80
10.2. Keywords	80
11. Köszönetnyilvánítás	81
12. Függelék	82
12.1. Támogatás.....	82

Rövidítések

BCS	Biofarmáciai Osztályozási Rendszer	Biopharmaceutical Classification System
Caco-2	Kolorektális adenokarcinóma sejtvonal	Caucasian Colon adenocarcinoma
CMC	Kritikus Micellaképződési Koncentráció	Critical Micelle Concentration
DMEM	Sejttenyésztő médium folyadék	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil	
ECACC	Európai Hitelesített Sejtkultúrák Gyűjteménye	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt
EE	Bezáródási hatékonyság	Encapsulation Efficiency
EWU	Egyensúlyi vízfelvétel	Equilibrium Water Uptake
FBS	Magzati szarvasmarha szérum	Foetal Bovine Serum
GLUT	Glükóz transzporter	Glucose transporter
HaCaT	Human adult skin keratinocytes	
HBBS	Hank's sóoldat	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Hidrogén-klorid	Hydrogen chloride
IC ₅₀		Inhibitory Concentration 50%
IL-1	Interleukin-1	Interleukin-1
LC	Folyadékkristály	Liquid Crystal
LC-ESI-MS	Folyadékkromatográfia-Elektrospray ionizáció-Tömegspektrometria	Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry
MCH	Melanin koncentrálnó hormon	Melanin concentrating hormone
MDA	Malondialdehid	Malondialdehyde
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid	3'-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NaOH	Nátrium-hidroxid	Sodium hydroxide
PBS	Foszfáttal pufferelt sóoldat	Phosphate Buffered Saline
PL	Lándzsás útifű	Plantago Lanceolata
RIA	Radioimmun analízis	Radioimmunoassay
RTCA	Valós idejű sejtelemlés	Real-Time Cell Analysis
SD	Szórás	Standard Deviation

SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp	Scanning Electron Microscopy
SGF	Szimulált gyomornedv	Simulated gastric fluid
SIF	Szimulált bélnedv	Simulated intestinal fluid
TBA	Tiobarbitúrsav	Thiobarbituric-acid
TBARS	Tiobarbitúrsavval reaktív anyagok	Thiobarbituric acid reactive substances
TEER	Transzepiteliális elektromos ellenállás	Transepithelial Electric Resistance
TNF- α	Tumor nekrosis faktor alfa	Tumor necrosis factor alpha

1. Bevezetés

A terápiás gyógyszerhatás létrejöttéhez a hatóanyagot a hatás kifejtéséhez szükséges koncentrációban kell eljuttatnunk a kezelni kívánt célszervhez [1]. Az intravénás beadás kivételével a gyógyszeranyagoknak ehhez először be kell jutniuk a véráramba, ahonnan tovább lépnek az extra- vagy intracelluláris térbe, vagyis a hatás helyére [2]. Ahhoz azonban, hogy ezt biztosítani tudjuk, a gyógyszer technológiai formulálás során több összetett problémával is szembe kell néznünk külsőleg és belsőleg alkalmazott gyógyszerek esetében egyaránt. A készíteni kívánt gyógyszerforma típusát, valamint a formulálás célját több szempont alapján határozzuk meg az alkalmazás módjától függően. A terápiás indikáción kívül kiemelten fontos, hogy a választott hatóanyag a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) alapján melyik osztályba tartozik, vagyis milyen oldhatósági és permeabilitási tulajdonságok jellemzik [3]. A forgalomba hozatali engedéllyel rendelkező gyógyszerek mintegy 40%-ának, míg az új gyógyszerjelölt molekulák közel 90%-ának rossz a vízdoldhatósága és/vagy a permeabilitása [4]. A legtöbb hatóanyag és farmakonjelölt a BCS alapján a II.-III.-IV. osztályba sorolható, vagyis rossz oldhatóság és/vagy rossz membrán permeabilitás jellemzi őket [5]. Formulálás során az egyik legnagyobb kihívást az említett hatóanyagok biohasznosulásának növelése jelenti. A különböző gyógyszer technológiai segédanyagok, illetve módszerek segítségével azonban képesek vagyunk a fent említett tulajdonságok módosítására, amelyek segítségével fokozható az oldékonyság és az abszorpció [6]. A farmakon szempontjából legmegfelelőbb gyógyszerforma kialakítása nemcsak a hatóanyag felszívódását és biohasznosulását növeli, hanem annak terápiás hatását is [7]. A különböző innovatív gyógyszerhordozó rendszerek kialakítása során legnagyobb figyelmünk a hatóanyag diszperzitásának növelésére, valamint a különböző biológiai barrieréken keresztüli transzportjára irányul. A rossz vízdoldékonyságú farmakonokból mikro- és nanorészecskék létrehozásával növelhető a rendszer diszperzitásfoka, amelynek következtében csökken az anyag szemcsemérete, és nő a részecskék fajlagos felülete. Ez a megoldás nagymértékben segíti a hatóanyag felszívódását is, ezáltal növeli annak hatásosságát [8]. A hatóanyag gyógyszerformából történő penetrációját számos tényező befolyásolja. A barrieréken keresztüli transzportot a farmakon szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a felszívódás helye határozzák meg döntően. Formulálás során kulcsfontosságú lehet megfelelő penetrációfokozó segédanyagok alkalmazása, amelyek megkönnyítik, sőt fokozhatják a gyógyszeranyagok felszívódását. Számos tudományos kísérletben igazolták, hogy a lipid típusú felületaktív anyagok képesek módosítani a transz-, illetve paracelluláris transzportot, ezáltal nélkülözhetetlen segédanyagai lehetnek külsőleges és

belsőleges gyógyszerhordozó rendszereknek egyaránt. A membránfehérjéken, illetve foszfolipid komponenseken kívül a felületaktív anyagok képesek szolubilizálni a rosszul oldódó hatóanyagokat is, segítve ezzel a gyógyszer technológiai formulációt [9,10].

Munkám során olyan gyógyszer adminisztrációs területeket kerestünk, amelyeknél a hatékony gyógyszer bejuttatás a legnagyobb kihívást jelenti. Kísérleteimben olyan nagy diszperzitásfokú heterogén diszperz gyógyszerhordozó rendszereket formuláltam és vizsgáltam, amelyek a fent említett gyógyszerelési stratégia eredményes megvalósíthatóságát támogatják. Gyógyszerformulációs kísérleteimben nagy kihívást jelentő külsőleges és belsőleges formulációk kialakítását tűztem ki célul. A két eltérő területen megszerzett tapasztalati tudás hozzájárul olyan gyógyszerformulációs szemlélet kialakításához, amelyet segítségül hívva a legkülönbözőbb terápiás kihívásokat is kezelni lehet. Értekezésemben bemutatom egy kihívásokkal teli külsőleges, és egy komplikált belsőleges gyógyszerforma kialakításának folyamatát. A külsőleges gyógyszerforma kialakításánál a hatóanyagok közül egyértelműen az összetett növényi hatóanyagok jelentik az egyik legnagyobb kihívást. A változatos polaritású növényi extraktumok biológiailag aktív komponenseinek gyenge kémiai stabilitása mellett a bőrön keresztül történő rossz penetrációs képesség nagymértékben korlátozza a gyógyszer technológiai felhasználhatóságukat. A gyógyszerforma kialakításához növényi hatóanyagként a *Plantago lanceolata* bioaktív komponenseit választottuk, amely évszázadok óta ismert, a mai napig elterjedt gyógynövény [11]. A gyógynövény fő komponensei különféle farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, beleértve a gyulladáscsökkentő, vizelethajtó, antibakteriális [12], hepatoprotektív [13] és antioxidáns [14] hatásokat. A gyógyászatban napjainkban leginkább légzőrendszeri betegségek, továbbá bőrsérülések kezelésére alkalmazzák [15], míg a népgyógyászat évszázadokon keresztül használta sebek, égések kezelésére, vérzéscsillapításra is [16]. Bár közzismerten kiváló biztonsági profillal rendelkezik, a hidrolízisre való hajlamból adódó gyenge kémiai stabilitása korlátozza a gyógyszer technológiai felhasználhatóságát [17]. Számos előnyös hatásának ellenére az akteozid magas hidrofíliája miatt limitáltak a gyógynövény lehetséges alkalmazási módjai [18]. A gyógyszertárak polcain szinte kizárólag bevételre szánt, köhögés elleni szirupok formájában található meg, ezért ezeket a tényezőket figyelembe véve esett választásunk erre a hatóanyagra. A fent említett korlátok kiküszöbölésének érdekében külsőleges felhasználású folyadékkristály rendszereket formuláltunk, melyek amellet, hogy védik a *Plantago lanceolata* kivonatot a hidrolízistől, fokozzák annak hatásait is, penetrációfokozó segédanyag tartalma révén pedig növelik az extractum biohasznosulását is [19]. Enterális adminisztrációra szánt

gyógyszerforma fejlesztési kísérleteink során ugyancsak a legnagyobb kihívásokkal igyekeztünk szembeállítani magunkat. Munkám második felében olyan innovatív szilárd gyógyszerhordozó rendszert formuláltam, amely növeli a peptid típusú vegyületek orális biohasznosulását. Ehhez a formuláció során számos, a peptidek kedvezőtlen tulajdonságaiból eredő akadályt kell leküzdeni. A hatóanyag kémiai és fizikai tulajdonsága mellett rendkívüli körülmények között igényel a gastrointestinalis rendszer peptidekre gyakorolt kedvezőtlen rehatásainak megismerése és kiküszöbölése [20]. A gastrointestinalis traktusban történő gyakori peptid degradáció, valamint a peptidek amfifil tulajdonsága mellett is alacsony membrán permeabilitása jelentősen megnehezíti a szájon át bevehető gyógyszerkészítmények előállítását [21]. A polipeptidek általában túl nagy méretűek és polárisak ahhoz, hogy passzívan diffundáljanak a lipidmembránokon keresztül, a legtöbb ismert aktív transzportmechanizmus azonban csak a nagyon kis peptidek sejtfelvételét segíti elő. A hasítható szabad N- és C-terminálisok gyűrűbe zárásával megvédhetjük a peptideket a metabolikus enzimektől minimalizálva ezzel a bélben, vérben, valamint szövetekben történő lebontásukat [22]. Gyógyszertechnológiai szempontból az említett problémákra megoldást jelenthet penetrációfokozó segédanyagokat tartalmazó mukoadhezív polimer alapú innovatív gyógyszerformák előállítása [23,24]. A bevételre szánt peptid tartalmú gyógyszerhordozó rendszer fejlesztéséhez egy jól definiált, kisméretű ciklikus nonadekapeptidet, a melanin koncentráció hormont választottuk modell hatóanyagként, amely a táplálkozási viselkedés, az energia egyensúly és a táplálékfelvétel szabályozásában tölt be fontos szerepet [25–28]. A peptid kiválasztásában fontos szempont volt, hogy kutatócsoportunk korábbi kísérleteiben sikeresen kifejlesztett egy, az MCH mérésére szolgáló radioanalitikai (RIA) módszert [29]. A formuláció során az MCH-ből kalciummal térhálósított nátrium-alginát mikrogöngyöket képeztem nyitott polimerizációs módszerrel a peptid védelmének érdekében [30–33]. A kiválasztott permeációfokozó segédanyagok inkorporálásával sikerült fokozni a hatóanyag orális biohasznosulását, ezért ezek alkalmazása sikeres stratégia lehet az orális peptidbevitel fejlesztésében.

A felhasznált segédanyagok helyes megválasztásával külsőleg, és belsőleg egyaránt hatékony gyógyszeres terápiát érhetünk el a gyógyszertechnológiai formulálás során nagy kihívást jelentő hatóanyagok esetében is. Továbbá, a megfelelő gyógyszerforma kialakításával csökkenthető a szervezetbe juttatott farmakon mennyisége, melynek köszönhetően elkerülhetők a nemkívánatos mellékhatások. Az ilyen szemlélettel kialakított készítmények növelik a betegek terápiában mutatott együttműködését, a gyógyszeres terápia sikerességét.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Biológiai barrierék

Az emberi szervezet biológiai barrierjei mellett, hogy megvédi szerveinket, szöveteinket a környezet káros fizikai, kémiai, illetve biológiai hatásaitól nélkülözhetetlen szerepet töltenek be testünk homeosztázisának fenntartásában [34]. Az említett védelmi funkción kívül a fizioológias barrierék fontos kapcsolódási pontokat jelentenek a különböző szöveti kompartmentek és a külvilág között. Az endotél és epitél sejteket összekapcsoló szoros kötések, a tight junction-ok akadályozzák a sejtek közötti szabad anyagáramlást az ionok, valamint oldott anyagok paracelluláris diffúziójának szabályozásával. Ugyanakkor ezek a sejtkapcsoló struktúrák kihívást jelentenek a gyógyszerek bejuttatásának szempontjából, hiszen a hatóanyagnak a véráramba történő felszívódása, valamint a hatás helyére történő transzportja során át kell jutnia a barrieréken, valamint membránokon egyaránt. A biológiai membránok foszfolipid kettősrétegből álló mozaik struktúrák. Az egymás mellett szorosan illeszkedő lipidmolekulák hidrofób belső része diffúziós gátként számos molekula, valamint ion számára átjárhatatlan. A külvilágtól való teljes elzárkózás azonban káros a sejtek számára, ezért a környezettel való kapcsolatot a membránfehérjék biztosítják. A membránfehérjék legnagyobb része, az ún. integráns membránfehérjék teljesen átérve, stabilan ülnek a lipid kettősrétegben. Legfontosabb képviselőik a különböző receptorok, csatornák, transzporterek, illetve a sejtfelismerésben szerepet játszó fehérjék. Az anyagok membránon történő átjutása a karrier membránfehérjék segítségével történik, amely a koncentráció-grádiens függvényében passzív (facilitált diffúzió) vagy aktív transzportfolyamat (membránpumpa). Előbbi egyik legismertebb példája a sejtek glükóz felvételéért felelős glükóz transzporter (GLUT), míg az utóbbi egyik klasszikus példája a Na^+/K^+ -ATPáz. A csatornafehérjék egy vagy több alegységből álló komplexek, amelyek belső hidrofób csatornája bizonyos anyagok számára átjárható, legnagyobb képviselői az idegrendszerben nélkülözhetetlen funkciót betöltő ioncsatornák. Az anyagtranszporton kívül az integráns membránfehérjék másik fontos szerepe a sejtek környezettel való kapcsolattartása. A külvilág felől érkező kémiai, vagy fizikai információkat a specifikus membránreceptorok érzékelik, amelyek adott jelre konformációváltozással reagálnak, majd egy többtagú jelátviteli láncot aktiválnak. A különböző sejtkapcsoló struktúrák, mint például az okkludin, klaudin vagy a zonula occludens a sejtek tartós összekapcsolásáért felelősek. A sejtek közötti permeabilitás fontos limitáló tényezője a hatóanyag bejutásnak [35].

A membrán extracelluláris tér felé eső felszínén található szénhidrátkomponensei a sejtburrok, vagy más néven glikokalix alkotói.

Gyógyszertechnológiai szempontból fontos kutatási terület a gyógyszerjelölt molekulák barriereken keresztüli permeabilitásának fokozása mind külsőleges, mind pedig belsőleges gyógyszerformák tervezése során. A barrierék közül a sejtmembrán, a vér-agy-gát, a fenesztrált érendothel, a gasztrointesztinális hámszövet, valamint az epidermisz korlátozzák leginkább a farmakonok célszervbe jutását [36]. Kísérletsorozatunkban külsőleges és belsőleges készítményeket egyaránt formuláltunk, ezért a továbbiakban a bél- és bőrhámon keresztüli hatóanyag transzportot szeretném részletezni.

2.1.1. Bélhám barrier

Az emberi emésztőrendszer a gyomorból, a vékonybélből, valamint a vastagbélből áll, melyek közül a vékonybél nagy felületének köszönhetően (200 m^2) a legtöbb szájon át bevehető gyógyszer fő felszívódási helye [37]. A vékonybelet és vastagbelet borító bélhámot egy kutikulás hengerhámszövet alkotja, amely elsődlegesen az emésztőrendszer működésében vesz részt, de emellett szerves része az immunrendszernek is [38]. A vékonybél hámsejtjeinek felszínét kesztyűujjszerűen borító sejtnyúlványok, a mikrobolyhok jelentősen megnövelik a tápanyag felszívó felületét, míg a sejtek közötti speciális kapcsolatok, a tight junction-ok átjárhatatlanná teszik a hámszövetet. A bélhámsejtek közötti intercelluláris kötéseknél négy típusát különböztetjük meg: gap junction, tight junction, dezmoszóma és adherens junkció. Ezek mindegyike különböző integráns fehérjékből áll, amelyek összehangolt működése biztosítja a hám integritását az ionok, metabolitok, valamint makromolekulák paracelluláris transzportjának szabályozásával [39,40]. A réskapcsolatok, vagy más néven gap junction/konnexon a konnexin nevű transzmembrán protein komplexből álló hexamer alakú csatornák, melyek két sejtet mindössze 2 nanométeren belülre hoznak egymástól. A dezmoszómák a kadherin családba tartozó transzmembrán adhézisos fehérjékből álló komplexek, melyek a sejtvázon keresztül kötik össze a szomszédos sejteket 30 nanométeres rést hagyva két sejt között. Az adherens junkciók, más néven zonula adherens, a katenin és a kadherin családok fehérjei által alkotott multiprotein komplexek. Az úgynevezett szoros kapcsolatok (tight junction), vagy más néven zonula occludens, a bélhám legfontosabb összetevői a barrier funkció szempontjából, amelyeket elsősorban a klaudin és az okkludin családok tagjai alkotnak. A körülbelül 35 különböző fehérjékből álló komplexek a laterális és apikális membránok határának közelében helyezkednek el egy folytonos gyűrűt alkotva a sejtek

körül. Szelektív, félig áteresztő barrierként segítik a kisméretű ionok, valamint vízben oldott anyagok paracelluláris téren keresztüli átjutását [41,42]. A legtöbb makromolekula számára kihívást jelent a bélhámsejtek szoros kapcsolódási pontjain keresztüli felszívódás. A gyógyszerjelölt molekulák közül a biomakromolekulák orális úton történő bejuttatása évtizedek óta nagy nehézséget jelent a gyógyszeripar számára, a klinikai gyakorlatban a biomolekulák orális hozzáférhetősége jelenleg az alacsony molekulatömegű peptidekre korlátozódik [37].

2.1.2. A bőrhám

Az emberi bőr szerkezete és működése révén számos feladatot lát el. A szervezetünket érő fizikai, kémiai, illetve mikrobiológiai hatások ellen védő barrierként egyrészt képes megakadályozni az egészségünkre káros anyagok bejutását, másrészt gátolja a vízvesztést [43,44]. Alapvetően a bőrfelszín legfelső, elszarusodó hámsejteket tartalmazó rétege, a stratum corneum alsó sejtsora, az őket összekötő sejtkapcsolatok, valamint a sejtek közötti tér alapállománya alkotják együttesen az említett fizikokémiai barrier [45]. A keratinocitákat összekötő sejtkapcsolatok közül egyesek olyan szorosak, hogy megakadályozzák a sejtek közötti szabad anyagáramlást, míg mások feladata a sejtműködés funkcionális összehangolása. Az egyik legfontosabb sejtkapcsolatot a hám összes rétegében megtalálható dezmoszómák jelentik. Az elmúlt években egyre nagyobb szerepet tulajdonítottak más típusú sejtkapcsolatoknak is, amelyek azonban a felhám (epidermisz) fő barriernek tekintett szarurétegében (stratum corneum) nem mutathatók ki, csak az alsóbb granuláris rétegben (stratum granulosum). Ide tartoznak az úgynevezett szoros kapcsolatok, vagy tight junction-ok, amelyek kialakításában a bél epitél sejtjeinél is ismertetett okkludin, illetve klaudin fehérjék vesznek részt. Fontos megemlíteni a réskapcsolatokat (gap junction/connexon) is, amelyek csakúgy, mint a többi sejttypusnál, a bőrben is hat darab connexin molekulából épülnek fel. Ezek a sejtkapcsolatok funkciójukat tekintve egyrészt megakadályozzák a nagyfokú vízvesztést, másrészt biztosítják a kisméretű molekulák, valamint ionok sejtközi áramlását [43,46]. A stratum corneum alsó sejtsorán kívül a stratum granulosum sejtjei is részt vesznek a fizikokémiai barrier kialakításában, amelyek bizonyos esetekben akár képesek átvállalni a szaruréteg feladatát. A granuláris réteg sejtjeinek fő feladata azonban a barrier funkció szempontjából fontos intercelluláris lipidek termelése, amelyek membrán által határolt sejtüregekben, az ún. Odland-testekben tárolódnak. Az Odland-testek, vagy más néven lamelláris testek által szekretált lipidek (ceramidok, szabad zsírsavak és koleszterin) töltik ki a stratum corneum intercelluláris réseit [47,48].

A gyógyszeranyagok biohasznosulásának növelése állandó kihívás a gyógyszerfejlesztések során, mely problémát több megközelítésből is vizsgálták már. A hatóanyagok felszívódását egyrészt a diszperzitásfok növelésével javíthatjuk megfelelő gyógyszerhordozó rendszer kialakításával. Alternatív megoldásként tovább növelhető az abszorpció különböző segédanyagok hozzáadásával, amelyek képesek módosítani a biológiai barrierék védőfunkcióit.

2.2. A biohasznosulás növelésének érdekében használt gyógyszertechnológiai segédanyagok

A vízben való oldékonyságot a hatóanyag megfelelő kémiai átalakításaival, vagy különböző oldódáselősegítő segédanyagok hozzáadásával növelhetjük [49]. Az oldékonyság növelésére a következő gyógyszertechnológiai lehetőségek vannak:

2.2.1. Vízoldékony sók képzése

Egy anyag bizonyos fizikai-kémiai tulajdonságai, mint például az oldhatóság eltérő lehet só formában, mint a szabad savnak, vagy bázisnak. A megfelelő sóforma oldhatóságára vonatkozóan azonban nincsenek elméleti adatok, ezért a kiválasztás előzetes kísérletek alapján történik. A sóképzés lehetőségei eltérőek savas, illetve bázikus hatóanyagok esetében. Savak vízoldékonyságát legtöbbször alkálifémekkel-, valamint alkáliföldfémekkel alkotott sóikkal növelhetjük (pl. nátrium-benzoát), míg bázisokra a hidroklorid, acetát, tartarát, szulfát, foszfát, nitrát, és karbonát sók jellemzőek (pl. efedrin-hidroklorid) [50].

2.2.2. Poláris csoportok beépítése

A poláris csoportok molekulába történő beépítése kevésbé elterjedt módszer, mivel az átalakítás során különböző változásokkal kell számolnunk, amely érintheti a hatóanyag farmakológiai hatását. Fontos megemlíteni, hogy egy anyag kémiai változtatása sokszor a stabilitás csökkenéséhez is vezethet, amely befolyásolja a későbbi felhasználhatóságot [51].

2.2.3. Komplexképzés

A komplexképződés létrejöhet hidrogénhidak között, poláros molekulák között fellépő dipólus-dipólus kölcsönhatás által, illetve különböző hatóanyagok, valamint hatóanyagok és segédanyagok közötti hidrofób kölcsönhatások révén egyaránt [52]. A folyamat során azonban szintén számolni kell a gyógyszeranyag stabilitásának csökkenésével. A komplexképzés tipikus példája a koffein vízben való oldékonyságát növelő koffein-nátrium-benzoát [51,53].

2.2.4. Hidrotróp anyagok alkalmazása

A hidrotróp segédanyagok olyan hidrofíl poláros csoportokat tartalmazó egy- vagy többértékű alkoholok, valamint ezek étereit és észtereit, amelyek a hatóanyag oldódását feltehetően laza komplexképzéssel, a víz határfelületi feszültségének csökkentésével, vagy hidrogénhidak kialakításával növelik. Erősen hidratálódó tulajdonságuk révén növelik az oldékonyságot, miközben asszociátumot képezhetnek a hatóanyaggal [54]. Ez a mechanizmus szorosan kapcsolódik a komplexképződéshez, amely lényegében egy gyenge kölcsönhatás a hidrotróp anyag valamint a nehezen oldódó hatóanyag között [49]. A hidrotróp segédanyagok ismert jellemzője, hogy oldatban önszerveződnek. A molekuláris szerkezet alapján történő osztályozásuk viszonylag nehéz, mivel számos vegyület rendelkezik hidrotróp tulajdonságokkal. Legismertebb példái az etanol, az aromás alkoholok, az ionos felületaktív anyagok, illetve számos nátrium-só, mint például a nátrium-benzoát, nátrium-citrát, vagy a nátrium-szalicilát [55].

2.2.5. Felületaktív segédanyagok

A felületaktív segédanyagok, vagy más néven tenzidek gyógyszer technológiai jelentősége széleskörű. Az oldás, valamint diszpergálás folyamatának elősegítésén túl az abszorpció fokozásával növelik a hatóanyagok biológiai hasznosíthatóságát, ezért fontos komponensei lehetnek egy új gyógyszerhordozó rendszernek [56]. Szerkezetüket tekintve amfifil vegyületek, amelyek egy viszonylag nagyobb méretű hidrofób részből és egy kisebb hidrofíl fejcsoportból állnak [57]. Kémiai tulajdonságuk szerint a felületaktív anyagok alapvetően két nagy csoportját különböztetjük meg, az ionos és nemionos tenzideket, amelyek egymástól a kationok és az anionok jelenlétében vagy hiányában különböznek [58]. Az ionos felületaktív anyagok molekulafeje elektromos töltést hordoz, amely lehet pozitív vagy negatív töltés is. Ha a töltés pozitív, akkor kationos felületaktív anyagnak nevezzük, míg negatív töltés esetén anionos felületaktív anyagról beszélünk. Az amfoter tenzideket két ellentétes töltésű, ikerionos szerkezet jellemzi. A nemionos felületaktív anyagok hidrofíl részében nincs elektromos töltés, vagyis a molekula nem kerül ionizációra, amikor azt vízben oldjuk [59]. A felületaktív anyagok jellemző tulajdonsága, hogy igen kis koncentrációban, híg vizes oldatban a víz felszínén monomolekuláris réteget alkotnak. Mivel a tenzidek amfifil vegyületek, a hidrofób részüket alkotó szénhidrogén láncok az apoláros levegő, hidrofíl fejcsoportjuk pedig a poláros víz felé orientálódik [60]. A koncentráció növelésével egy meghatározott értéknél, amely az egyes tenzidek esetében igen eltérő lehet megindul a kolloid mérettartományú asszociátumok, az

úgynevezett micellák képződése. A kritikus micellaképződési koncentráció (CMC) elérésével a rosszul oldódó hatóanyagok oldhatósága ugrásszerűen megnő [61].

A hatóanyagon kívül a felületaktív anyagok képesek a membrán fehérje, valamint lipid komponenseinek szolubilizálására egyaránt [62,63]. A biológiai membránok szolubilizációja a tenzid koncentrációjától függően az alábbi meghatározott, egymást követő fázisokból áll, amely során a felületaktív anyag aránya folyamatosan nő, a lipid kettősréteg pedig fokozatosan fragmentálódik és végül szolubilizálódik. Kezdetben kisebb koncentráció mellett a tenzid monomerek beépülnek a foszfolipid kettősrétegbe a membránintegritás megbontása nélkül. A koncentráció emelésével a felületaktív monomerek aggregálódnak, és a membránon belül kis fragmentumokat hoznak létre, amelyek szélét a felületaktív anyagok komplexei fedik le. A CMC elérésekor a foszfolipid kettősréteg megbomlik, és tenzid-lipid micellák, valamint kis membránlemezek keletkeznek [64]. A felületaktív anyagok a membránfehérjék hidrofób részeivel is kölcsönhatásba lépnek. Mivel a membránszolubilizáció eredményeként létrejövő absorpció fokozódás mellett kialakulhat membránkárosodás is, a preformuláció során fontos megvizsgálni a gyógyszerforma kialakításához választott felületaktív segédanyag viselkedését *in vitro* sejtkultúrás rendszeren kisebb, illetve nagyobb koncentrációban egyaránt.

2.3. Diszperzitásfok növelése

Wolfgang Ostwald elmélete szerint a diszperz rendszerek olyan, legalább két komponensből álló keverékek, amelyek közül az egyik apró szemcsékre oszlatva, vagyis diszpergált formában van jelen a másik, összefüggő komponensben [51]. Utóbbi folytonos, mátrix jellegű részt diszperziós közegnek, az elosztatott szemcsés részt pedig diszperz fázisnak nevezzük. Mindkét komponens lehet bármely halmazállapotú [65]. A diszperz rész egyedi méretének nagyságrendje szerint a diszperz rendszereket három csoportra osztjuk. A homogén rendszerek, vagy más néven valódi oldatok részecskéi 1 nm alatti, a kolloid rendszerek, vagy más néven kolloidok szemcséi 1-500 nm közöttiek, míg a heterogén rendszerek, vagy más néven durva diszperz rendszerek részecskéi 500 nm feletti méretűek [66]. Ha a diszperziós fázist nagyjából azonos méretű részecskék alkotják, akkor monodiszperz vagy izodiszperz rendszerről beszélünk, ha pedig különböző méretűek, akkor a rendszer polidiszperz. A diszperz rendszereket aprítással állítjuk elő, amely során amellet, hogy növeljük a részecskék felületét, egymástól független szemcséket hozunk létre. Diszpergálás során a részecskék méreteit a tér mindhárom irányában csökkentjük. A diszperz rendszerek egyik fontos jellemzője a

diszperzitásfok, amely minél nagyobb, annál kisebb a szemcseméret, illetve annál nagyobb a fajlagos felület [67].

2.3.1. Klasszikus formulációk

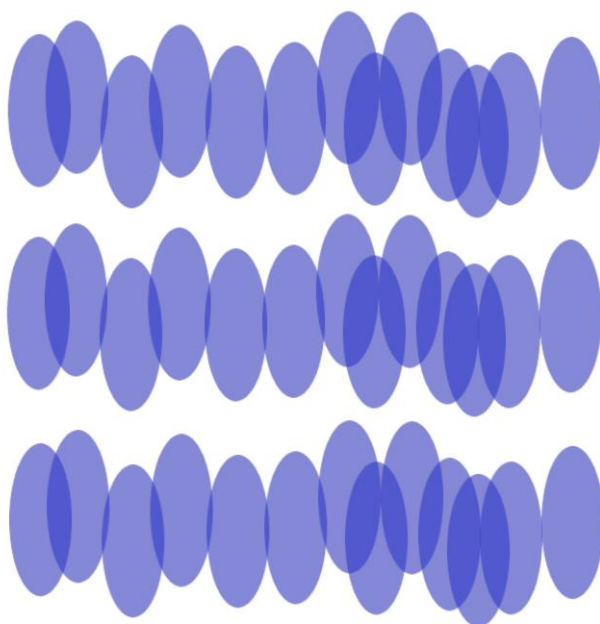
A heterogén diszperz rendszerek közül leggyakrabban a folyékony halmazállapotú emulziókkal és szuszpenziókkal találkozhatunk. Mindkét gyógyszerforma lehet bevételre vagy külső használatra szánt készítmény egyaránt. Az emulzió két egymással nem elegyedő folyékony fázisból áll, amelyben a diszperz fázis $0,1\ \mu\text{m}$ átmerőt meghaladó cseppek formájában van tartósan diszpergálva. A diszperziós közeg alapján megkülönböztetünk olaj a vízben, illetve víz az olajban típusú emulziókat. Az emulzió típusát a fázisok térfogatarányán kívül az alkalmazott emulgensek határozzák meg. Az emulgensek olyan, az emulziókészítés nélkülözhetetlen segédanyagai, amelyek meggátolják a cseppek összefolyását növelve ezáltal a rendszer stabilitását. A csoport egyik legismertebb képviselői a korábban részletezett felületaktív anyagok, vagy más néven tenzidek. Az emulziók alkalmazásának előnye, hogy külsőleg alkalmazva jobb a penetrációs képességük, valamint hidratáló és hűtő hatásuk, mint a tisztán lipofil vagy hidrofil készítményeknek [68]. A szuszpenziók olyan heterogén diszperz rendszerek, amelynek diszperz fázisa szilárd, diszperziós közege pedig folyékony halmazállapotú. A szilárd fázis részecskemérete $0,5\text{--}100\ \mu\text{m}$ között változhat. A szuszpenziók előnye, hogy lehetővé teszik a vízben nem vagy rosszul oldódó hatóanyagok folyékony gyógyszerformában történő adagolását. Az emulziókhoz hasonlóan a szuszpenziók formulálása során is elengedhetetlen a tenzidek alkalmazása, amelyek nedvesítik a szilárd anyag felületét a víz felületi feszültségének csökkentésével [69]. Az említett gyógyszerformák egyik legnagyobb hátránya, hogy termodinamikailag instabil rendszerek. Bennük a diszperz fázis és a diszperziós közeg idővel szétválik, amely akár irreverzibilis folyamat is lehet, ami terápiás hatékonyságukat jelentősen csökkenti [70].

2.3.2. Folyadékkristályok

A folyadékkristály (LC) olyan anyagok összefoglaló megnevezése, amelyek folyadékokra, illetve kristályokra jellemző tulajdonságokat egyaránt mutatnak. Halmazállapotukat tekintve ugyan folyékonyak, azonban számos fizikai tulajdonságuk a kristályokéhoz hasonlóan anizotróp [71]. A folyadékkristályok megnyúlt, hossz tengelyük irányában merev molekulákból álló kristályok megolvadásakor keletkeznek. A molekulák hosszútávú rendezettségének köszönhetően az LC rendszerek megőrzik folyékony tulajdonságukat. Mivel egy meghatározott hőmérsékleten az anyagok átalakulhatnak izotróp folyadékká, a fent említett állapot csak egy

jól definiált hőmérséklet-tartományban alakulhat ki. A folyadékkristályokat két fő csoportba sorolhatjuk. A termotróp rendszerek kialakulását termikus folyamatok befolyásolják. Ezek a hőmérséklettől függően különböző tulajdonságokat mutató fázisokba rendeződhetnek. Sajátos molakulaszerkezetük két fő része a molekula anizotrópiájáért felelős merev mag, valamint a mobilitást biztosító flexibilis oldalláncok. A liotróp rendszerek amfifil molekulákat, valamint vizet tartalmazó oldószer hatása jönnék létre. A liotróp folyadékkristályos anyagokhoz képest nem feltétlenül rendelkeznek alakanizotrópiával, inkább az oldószerben való koncentrációjuk függvényében épülnek fel [72]. A folyadékkristályos rendszerek közös tulajdonsága, hogy molekuláik irány szerint rendezetten helyezkednek el a térben, azonban a szilárd kristályos állapottal ellentétben tömegközéppontjaik nem alkotnak háromdimenziós rácsot [73].

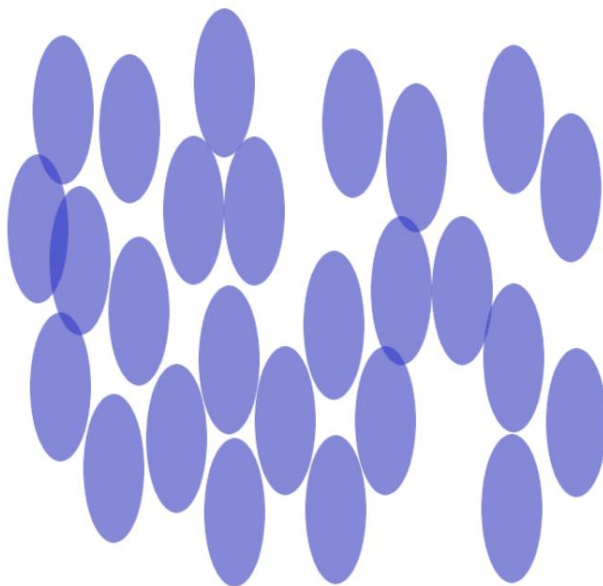
G. Friedel és munkatársai a folyadékkristályok három jellegzetes, a szmektikus, nematikus, és koleszterikus rendeződését írták le [74]. A szmektikus folyadékkristályok molekulái párhuzamos síkokba rendeződnek, a molekulák síkon belüli távolsága, illetve a síkok egymás közötti távolsága azonban véletlenszerű. A szmektikus folyadékkristályok molekuláinak elrendeződését az 1. számú ábra mutatja be.



1. ábra. Szmektikus folyadékkristály

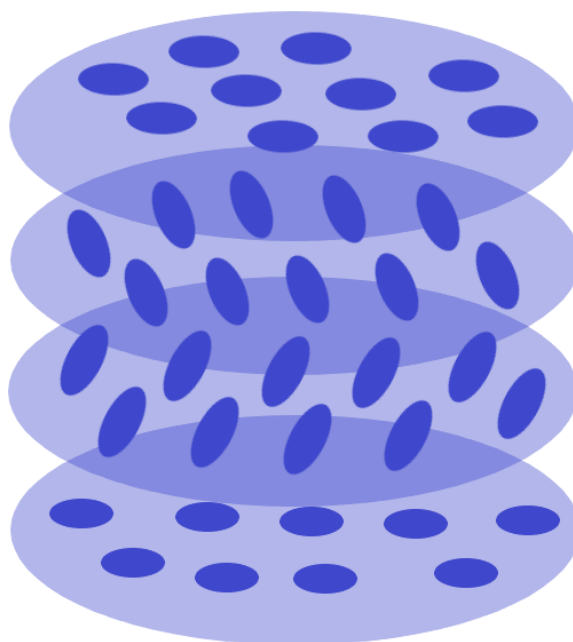
A nematikus rendszerekben a molekulák egymással szintén párhuzamosan állnak, azonban már nem alkotnak síkokat, tehát csak irány szerint rendezettek. A tömegközéppontok elrendeződése

véletlenszerű. A nematikus folyadékkristályok molekuláinak elrendeződését a 2. számú ábra mutatja be.



2. ábra. Nematikus folyadékkristály

A koleszterikus anyagokban a molekulák síkokba rendeződnek, síkon belül pedig párhuzamosak is egymással, viszont két szomszédos síkban lévő molekulák iránya már nem azonos, ugyanakkor nem is véletlenszerű. A tengelyek iránya több síkra nézve periodikus [75]. A koleszterikus folyadékkristályok molekuláinak elrendeződését a 3. számú ábra mutatja be.



3. ábra. Koleszterikus folyadékkristály

Gyógyszertechnológiai szempontból a folyadékkristályok vízből, illetve egy, kettő vagy akár több tenzid keverékéből képződnek meghatározott koncentráció és hőmérséklet-tartományban [76]. Az oldószer koncentrációjától függően a keletkező folyadékkristályos szerkezeteket mezofázisoknak nevezünk. A formuláció során a tenzid koncentrációjának csökkentésével, vagyis az oldószer koncentrációjának növelésével térben egyre rendezettebb, és ezáltal nagyobb viszkozitású fázisok jönnek létre. A megnövekedett viszkozitásnak köszönhetően biztosított az alkalmazás helyén szükséges tartózkodási idő, amely biztosítja a hatóanyag helyi liberációját a megfelelő koncentrációban [77]. Ennek köszönhetően a beteg területen célzott terápia, valamint tartós gyógyszerhatás érhető el, amely a szükséges hatóanyag-dózis, illetve mellékhatások csökkentésével növeli a beteg compliance-t.

2.3.3. Mikrokapszulák

A mikrokapszulák olyan gyógyszerhordozó rendszerek, amelyek a hatóanyag molekuláris diszperz állapotának köszönhetően jelentős mértékben gyorsítják a felszívódást. Mivel a hatóanyag-leadás nagy felületen történik, optimális körülmények között elérhető lehet a teljes hatóanyag mennyiség biohasznosulása [78]. A mikrokapszulák számos előnnyel rendelkeznek. A kapszulázott hatóanyagot hatékonyan védik a gasztrointesztinális traktusban történő enzimatis leomlással szemben, alkalmazásuk pedig lehetőséget biztosít a felhasználás helyén pontosan szabályozott hatóanyag felszabadulásra. Mindemelllett adminisztrációjuk sokkal egyszerűbb és kényelmesebb az alternatív parenterális, szabályozott hatóanyag-felszabadulású dózisformákhoz, mint például a makroméretű implantátumokhoz képest. A különböző mikropartikuláris gyógyszerhordozó rendszerek tehát ígéretes eszközei lehetnek a szájon át bevehető szabályozott hatóanyag-leadást biztosító gyógyszeres terápiának.

A mikrokapszulák vagy mikrogyöngyök olyan gömb alakú mikrorészecskék, amelyek mérete akár 50 nm - 2 mm közötti is lehet. Bár a kapszula szó egy központi magot körülvevő héjszerkezetre utal, a mikrokapszula kifejezés nem csak membránnal körülvett szemcsékre vagy cseppekre vonatkozik, hanem a szilárd fázisú mátrix diszperziókra egyaránt [79]. A mikrokapszulák előállítási módjai, valamint a mikrokapszulázáshoz alkalmazott technikák jelentősen átfedik egymást. A különböző formulációs eljárások kémiai, fizikokémiai, elektrosztatikus és mechanikai módszerekre oszthatók [80]. A kémiai folyamatok közé a határfelületi és az *in situ* polimerizációs módszerek tartoznak. A határfelületi polimerizáció során egy monomer polimerizálódik két egymással nem keveredő vegyület határfelületén. Ha a belső fázis folyékony halmazállapotú, lehetőség van a monomer belső fázisban történő

diszpergálására vagy szolublizálására, majd ezt a keveréket emulgeáljuk a külső fázisban a kívánt részecskeméret eléréséig [81]. A koacervációs eljárással történő mikrokapszulázás a fiziokémiai folyamatok közé tartozik, amely általában három lépésből áll. Első lépésben egy háromfázisú rendszert állítunk elő az egymással nem elegyedő mag-, és falanyagból, valamint a folyékony vivőközezből. Ezt követően megkezdődik a maganyag folyamatos bevonása, amely során a falanyag folyamatosan lerakódik, majd végül megszilárdul a magon [82]. A mikrokapszulázáshoz használt mechanikai módszerek speciális berendezések segítségével történnek. Porlasztásos fagyasztás során a hatóanyagot a bevonó anyag olvadáskában diszpergálják, majd porlasztják. A keletkezett cseppeket hűtéssel szilárdítják meg. Hasonló eljárás a porlasztva szárítás, amely az előzőtől annyiban különbözik, hogy az oldószer elpárologtatása után szilárdul meg a bevonó anyag a cseppek felületén, nem pedig fagyasztás során. A Wurster-féle fluidizációs eljárás során a bevonás a berendezés alján történik, ahol hatóanyagot és a bevonó anyagot is a levegőáramlás irányának megfelelően egyszerre adagolják. A részecskék száradása a kolonna felső részében történik [80].

2.3.3.1. Alginát mikrogyöngyök

A hatóanyag bioadhezív polimer hordozórendszerekbe történő kapszulázása kedvező tulajdonságai miatt széles körben elterjedt módszer az orális biohasznosulás növelésére [83,84]. A természetes polimerek biológiailag biztonságos, inert hordozó mátrixok, mivel nem csak védik a gyógyszert a gasztrointesztinális traktusban történő enzimatis bomlástól, hanem javítják annak felszívódását is [85–87]. Ezenkívül a polimer részecskék növelik a farmakon hatékonyságát azáltal, hogy szabályozott hatóanyag-felszabadulást biztosítanak [31,88]. A barna tengeri moszatból nyert alginát egy biodegradábilis anionos polimer, amelyet előnyös tulajdonságai miatt széles körben használnak számos orvosi biológiai vonatkozásban. Kiváló biokompatibilitása és mukoadhezív tulajdonságai mellett alacsony toxicitása, illetve viszonylag alacsony ára miatt gyakran alkalmazott technológiai segédanyag [89]. Kétértékű kationok, mint például kalciumion jelenlétében oldhatatlan ionos keresztkötésű térhálós komplexeket képez [90]. A folyamat során a Ca^{2+} ionok feltehetően kizárólag az alginát guluronát részeihez kötődnek, majd ezt követően a szomszédos polimerláncok guluronátblokkjai keresztkötésekkel összekapcsolódva gélstruktúrát hoznak létre. Az egyik leggyakrabban használt vegyület az alginát ionos térhálósításához a kalcium-klorid, amely nagyfokú vízdékonyságából adódóan gyors és nehezen kontrollált gélesedést eredményez. A gélesedés lassításának és ellenőrzésének egyik lehetősége a kalcium-szulfát, vagy a kalcium-karbonát alkalmazása, amelyek alacsonyabb oldhatóságuk miatt lassítják a gélesedés sebességét [91].

Korábbi kísérletek alapján az alginát tartalmú partikulumok potenciális gyógyszerhordozói lehetnek fehérje és peptid típusú vegyületeknek. Mukoadhezív tulajdonságának köszönhetően ezek a polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerek nagy mértékben javíthatják a hatóanyag terápiás hatását azáltal, hogy közvetlen kapcsolatot alakítanak ki a célzott terület nyálkahártyájával, növelve ezzel a helyi hatóanyag leadást, valamint felszívódást. Ezenkívül az alginát rendszerek potenciális hordozói lehetnek peptid típusú hatóanyagoknak, mivel előnyös tulajdonságai révén képes izolálni a peptidet a gyomor- és bélrendszer proteolitikus hatásaitól. Az alginát mikrogöngyökből történő hatóanyag penetrációjának, illetve abszorpciójának növelése különböző segédanyagokkal tovább növelhető. Ezek közül a permeációfokozó anyagok alkalmazása a legelterjedtebb módszer peptidek, valamint fehérjék orális bejuttatására, mivel a felszívó hámszövet tulajdonságainak módosításával megkönnyíthetik a transz-, és paracelluláris felszívódást [9]. Továbbá, az alginát mikrogöngyök viszonylag enyhe formulálási körülményei minimalizálják a peptidek denaturációját, megvédve őket a felszabadulásig történő lebomlástól, mely szintén nem elhanyagolható formulálási szempont. Az alginát előnyös tulajdonságait kihasználva különböző penetrációfokozó segédanyagok hozzáadásával tehát olyan innovatív szilárd gyógyszerhordozó rendszert alakíthatunk ki, amely növeli a peptid típusú vegyületek orális biohasznosulását [80–82].

2.4. Célkitűzés

Gyógyszertechnológiai formulálás során az egyik legnagyobb kihívást a hatóanyagok megfelelő biohasznosulása jelenti, amely különböző penetrációfokozó segédanyagok, illetve formulációs módszerek segítségével biztosítható a farmakon oldékonyságának és/vagy abszorpciójának növelése révén. Kísérletsorozatunkban olyan külsőleges és belsőleges gyógyszerhordozó rendszereket formuláltunk és vizsgáltunk, melyek a gyógyszer technológiai formulálás szempontjából kihívásokkal teli hatóanyagokat tartalmaznak.

Ennek megfelelően a következő főbb célokat fogalmaztuk meg:

- különböző innovatív heterogén diszperz rendszerek formulálása, melyek képesek megvédeni a kiválasztott növényi hatóanyagot a hidrolízissel, a polipeptidet pedig a gasztrointesztinális traktus enzimikus emésztésével szemben,
- különböző penetrációfokozó segédanyagok gondos és körültekintő kiválasztása, melyek a barrierfunkciók reverzibilis megváltoztatásával javíthatják a hatóanyag felszívódását,
- az alkalmazott penetrációfokozó segédanyagoknak a hatóanyagok szintetikus membránon keresztül történő permeabilitására gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálata,
- az alkalmazott penetrációfokozó segédanyagok, valamint a formulált összetételek humán sejtekre gyakorolt hatásának tanulmányozása *in vitro* sejteletképességi vizsgálatokkal.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

A munkámhoz használt Gelucire 44/14, Lauroglycol 90, Labrasol, valamint Transcutol HP felületaktív anyagok a Gattefossé (Lyon, Franciaország) ajándékaiként állt rendelkezésünkre. A felhasznált alacsony viszkozitású nátrium-alginát a BÜCHI Labortechnik (Flawil, Svájc) terméke. A sejtkultúrák kísérletekhez használt humán keratinocita sejtvonalat (HaCaT) a Cell Lines Service-től (CLS, Heidelberg, Németország) szereztük be, a humán adenocarcinoma sejtvonal (Caco-2) pedig az ECACC-től (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) származott. A 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid MTT-festéket, DMEM sejttenyésztő médiumot, a foszfát-puffert (PBS), a tripszin-etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), a hőinaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS), az L-glutamint, a nem esszenciális aminosav-oldatot és a penicillin–sztreptomocint a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A 96 lyukú plateket és sejttenyésztő flakákat a VWR International-től (Debrecen, Magyarország) vásároltuk. A TBARS Assay készletet a Cayman Chemical-től (Ann Arbor, MI, USA) vásároltuk. A 2,2-difenil-1-pikril-hidrazilt (DPPH), az abszolút etanolt, az IL-1-et és a TNF-alfát a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

3.2. *Plantago lanceolata* kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai

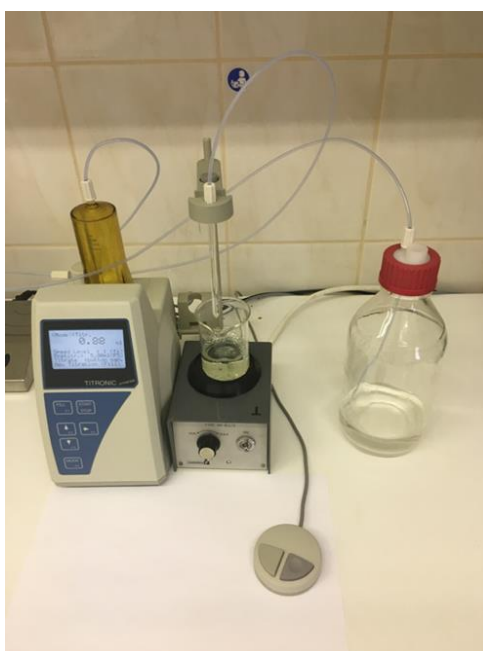
3.2.1. *Plantago lanceolata* levél kivonása

A szárított lándzsás útifű levelek metanolos kivonatát a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékének munkatársai, Prof. Dr. Vasas Gábor és Dr. Gonda Sándor készítették. A kereskedelmi forgalomból vásárolt *P. lanceolata* levél gyógyszerkönyvi standard minőségű volt. A leveleket darálását, majd porítását 30 perces metanolos extrakció követte. Az extraktum szűrését követően a szárítás rotációs vákuum bepárlóban történt.

3.2.2. Folyadékkristályok formulálása

A folyadékkristályos rendszerek formulálása során a komponensek optimális koncentráció tartományát titrálós módszerrel határoztam meg a 4. számú ábrán látható Schott titronic diszpenzer segítségével [72]. Korábbi vizsgálatok alapján felületaktív segédanyagként a

Labrasolt, Lauroglycol 90-et és Gelucire 44/14-et választottuk. A formulálás során első lépésben a szükséges mennyiségű *Plantago lanceolata* kivonatot a tenzidek keverékében oldottam, majd kis részletekben, állandó keverés közben vizet adtam a rendszerhez. Az extraktum mennyisége minden összetétel esetében 5%-nak felelt meg. Annak érdekében, hogy a víztartalomnak a folyadékkristályos szerkezetre gyakorolt hatását tanulmányozhassam, 10% - 90% közötti víztartalmú mintákat készítettem, miközben a Labrasol/Lauroglycol 90 tenzidek arányát állandó 6:1 értéken tartottam. Munkámat a továbbiakban négy különböző összetételű minta vizsgálatával folytattam.



4. ábra. Schott titronic diszpenzer

3.2.3. Membrán diffúziós és permeabilitási vizsgálat

A membrán diffúziós kísérleteket vertikális Franz-diffúziós cellában (Hanson 6-cell Manual Diffusion Test System) végeztem, amely segítségével a hatóanyag felszabadulását vizsgáltam [95]. A mintákat az előzetesen izopropil-mirisztátba áztatott cellulóz-acetát membránokra helyeztük [96]. Receptor fázisként 30 v/v% alkoholt használtam folyamatos mágneses keverés mellett (350 rpm) annak érdekében, hogy segítsem az extraktum komponenseinek oldódását. A receptoroldat hőmérsékletét a fiziológiás bőr hőmérsékletének imitálására 32 °C-on termosztáltam a kísérlet ideje alatt. A receptor közegből előre meghatározott időpontokban (15 percenként 6 órán át) 1,0 mL mintát vettem, amit minden esetben friss receptoroldattal pótoltam. A hatóanyag tartalmát UV-Vis spektrofotométer (Shimadzu, Tokyo, Japan) segítségével határoztam meg 517 nm hullámhosszon.

3.2.4. RTCA és transzepitheliális elektromos ellenállás mérés

A sejtréteg *in vitro* permeabilitását a jól ismert transzepithelialis elektromos ellenállás (TEER) érték mérésével ellenőriztem. A mérés viszonylag egyszerű, váltakozó áramú elektródokat helyezve az apikális és bazális cellákba a mért feszültség értékekből megkapjuk a barrier elektromos ellenállását. A kísérlet során 10^4 sejtet szélesztettem DMEM sejtkultúrás médiumban speciális e-microplatekre. A PSmHaCaT sejtek esetében a gyulladást IL-1-béta és TNF-alfa keverékével indukáltam, a korábban leírtak szerint. Az ellenállást az xCELLigence RTCA eszköz segítségével mértem, az adatokat, mint például a sejtindexet pedig az Integrated RTCA szoftver automatikusan elemezte. A mérési eredményeket a hagyományos TEER mérésekkel támasztottam alá. A TEER méréséhez a HaCaT és PSmHaCaT sejteket DEMEM médiumban 12 lyukú Transwell inzertekre (Corning Transwell Clear, átmérője: 6,5 mm, pórusmérete: 3,0 μ m) szélesztettem 2×10^4 sejt/ 500 μ L sűrűséggel [97]. A TEER értékeket szélesztést követő 6 óra után mértem először, majd 7 napig 12 óránként mértem Millipore Millicell-Ers 00.001 készülék segítségével.

3.2.5. UV-C expozíció HaCaT sejteken

A PL-LC összetételek UV-sugárzással szembeni védő hatását HaCaT keratinocita sejteken vizsgáltam [98]. A sejteket a fentiekben leírt körülmények között tartottam fenn. A HaCaT és PSmHaCaT sejteket 96 lyukú műanyag platekre szélesztettem $10^4/200$ μ L sűrűséggel. A kísérletet a szélesztést követő 5. napon végeztem (amikor az RTCA méréseink szerint a sejtek még nem érték el a teljes konfluens állapotot). A formulációk összetételét annyiban módosítottam, hogy desztillált víz helyett azonos térfogatú DMEM sejtkultúrás médiumot használtam a víz káros hatásainak elkerülése érdekében. Mindkét sejtvonalat az Oriel Sol-UV-4 UV Solar Simulator (Newport, Irvine, CA, USA) segítségével vizsgáltam készítményekkel kezelve, illetve kezelés nélkül egyaránt. Az első kísérlet során a PL-LC összetételekkel dolgoztam, a HaCaT és a PSmHaCaT sejtvonalak két-két csoportjával. UV sugárzást mindkét esetben csak a második csoport kapott. A különböző sejtek életképességét közvetlenül, illetve 12, 24 és 48 órával az expozíciót követően MTT-tesztel vizsgáltam. A kísérlet második részében a sejteket 0,5 v/v% PL-LC összetételekkel inkubáltam 24 órán át (a proliferáció 4. napjától kezdve), majd 6 percig UV-indukált oxidatív stressznek tettem ki őket. A HaCaT sejtek életképességét közvetlenül az expozíciót követően szintén MTT-tesztel vizsgáltam.

3.2.6. Antioxidáns tesztek

3.2.6.1. DPPH gyökfogó aktivitás mérés

A *Plantago lanceolata* tartalmú folyadékkristályok gyökfogó aktivitását DPPH-tesztel vizsgáltam. A DPPH egy stabil szabadgyök, amely különböző antioxidánsok jelenlétében megváltoztatja színét. Kontrollként a megfelelő vak kompozíciók és PL-kivonat 5 v/v% -os vizes diszperzióját használtam (CE). Minden PL kivonatot tartalmazó mintát etanolban (96%) reagáltattam a stabil DPPH gyökökkel. A reakcióelegy 100 μ L mintából, 900 μ L abszolút alkoholból és 2mL etanolos DPPH oldatból (0,06 mM) állt. Az elegyeket 30 percig inkubáltam. Amikor a DPPH reagál egy hidrogén donor antioxidáns vegyülettel, redukálódik. Ez a reakció színváltozással jár, sötét ibolyából halványsárga oldatot kapunk. A nem redukálódott DPPH mennyiségi mérését UV spektrofotométerrel (Shimadzu Spectrophotometer, Tokió, Japán) végeztem 517 nm hullámhosszon. A fotometriás meghatározások háttereként etanolt használtam. Kontrollként *P. lanceolata* kivonatot nem tartalmazó összetételeket használtam. A formulált összetételek jobb antioxidáns tulajdonságának bizonyítására vak *P. lanceolata* kivonatot (5 v/v%) is alkalmaztam. A gyökfogó aktivitás százalékos mértékét (AA% = antioxidáns aktivitás) Mensor és munkatársai módszere alapján határoztuk meg [99]:

$$AA\% = 100 - [((Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100) / Abs_{control}].$$

3.2.6.2. Lipidperoxidáció (MDA)

A reaktív oxigéngyökök lipidperoxidációs folyamatokat képesek generálni a szervezetben. A malondialdehid (MDA) a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjának egyik végterméke a sejtekben. A szabadgyökök emelkedése MDA túltermelést okoz. A lipidperoxidációs vizsgálat szerint a mintában lévő MDA tiobarbitursavval (TBA) reagálva MDA – TBA adduktumot eredményez. A kísérlet során a HaCaT sejteket (1×10^6) először jégen homogenizáltam 300 μ L MDA lízis pufferrel (3 μ L BHT-vel (100), majd centrifugáltam (13 000x g, 10 perc). A felülúszót TBARS Assay Kit-tel (Cayman Chemical) elemeztem. A lipidperoxidáció mértékét a malondialdehid (MDA) és tiobarbitursav (TBA) reakciójából keletkező kolorimetrikus (532 nm) MDA – TBA addukt mérésével határoztam meg.

3.3. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai

3.3.1. Nátrium-alginát és kalcium-klorid oldatok készítése

Az 1,5 m/V% nátrium-alginát-oldat készítéséhez a szükséges 3,30 g alacsony viszkozitású nátrium-alginátot 200 mL desztillált vízben oldottam. Az oldatot 180 percig kevertettem (300 rpm/perc) szobahőmérsékleten a megfelelő homogenitás elérése érdekében.

A 100 mM CaCl_2 oldatot 14,70 g kalcium-klorid-dihidrát 1000 mL desztillált vízben történő oldásával készítettem.

3.3.2. MCH tartalmú alginát gyöngyök formulálása

A folyamat során egy félautomata készülék, a Büchi Encapsulator B 395-Pro (BÜCHI Labortechnik, Svájc) segítségével a hatóanyagot nyitott polimerizációs módszerrel kalciummal térhálósított nátrium-alginát mikrogöngyökbe inkorporáltuk a farmakon védelmének érdekében. A göngyösképzés alapja, hogy a kontrollált áramlású lamináris folyadéksugár egyenlő méretű cseppekre esik szét az optimális frekvenciának (1800 Hz) köszönhető vibrálástól. A formulálni kívánt peptidet finoman eloszlattam 40 mL 1,50%-os nátrium-alginát-oldatban, majd az oldathoz 0,01 v/v% penetrációfokozó segédanyagot adtam (Labrasol/Transcutol HP) a különböző összetételeknek megfelelően. A keveréket ezt követően BD LuerLock típusú fecskendőpumpával csatlakoztattam a készülékhez. Innen a folyadék először 5,00 ml/perc sebességgel a pulzáló kamrába kerül, majd áthalad a fűvókán (80 μm /200 μm /1000 μm) és egyenlő méretű cseppekre esik szét. A cseppek felülete megváltozik az elektród (1000 V) és fűvóka közti elektromos mezőn áthaladva, és az elektrosztatikus taszító erőknek köszönhetően külön jutnak a keményítő folyadékba. A göngyököket 15 percig hagytam keményedni a kalcium-klorid oldatban, majd mosást követően 0,40 μm pórusátmérőjű membránon szűrtem vákuumpumpával. Szűrést követően a terméket 24 órán át fagyaszttva szárítottam -110 °C-on [30].

3.3.3. Bezáródási hatékonyság

A göngyökben lévő bezáródott hatóanyagtartalom meghatározásához a 100 mM kalcium-klorid keményítő folyadékból 1 mL-es mintákat vettem közvetlenül formulálást követően. A peptid koncentrációjának meghatározása radioimmunoassay-vel (RIA) történt a Debreceni

Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak segítségével [29]. A bezáródási hatékonyságot (EE) a következő egyenlettel határoztam meg:

$$EE = \left(\frac{TQ - HQ}{TQ} \right) \times 100$$

amelyben HQ a keményítő folyadékban mért gyógyszer mennyiség, TQ pedig a gyöngyök teoretikus peptid tartalma [93].

3.3.4. Duzzadási képesség vizsgálata

A különböző hatóanyagokkal és előállítási paraméterekkel gyártott mikrokapszulák eltérést mutatnak számos fizikai tulajdonságban, mint például a duzzadás mértékében. Az említett tulajdonság befolyásolja a hatóanyag biofarmáciai viselkedését a szervezetben, valamint meghatározza a további feldolgozhatóságát, például tablettázhatóságukat, bevonhatóságukat, ami szükségessé teszi a mikrokapszulák fizikai paramétereinek előzetes ismeretét. Az alginát gyöngyök duzzadási viselkedését gravimetriásan határoztam meg. A kísérlet során a pontosan bemért 85 mg száraz gyöngyöt 60 percre 100 mL desztillált vízbe helyeztem szobahőmérsékleten. A gyöngyöket ezt követően vákuumpumpával szűrtem, majd ismét megmértem a tömegét. Az egyensúlyi vízfelvételt a következő egyenlet alapján határoztam meg:

$$EWU = \left(\frac{Ws - Wd}{Ws} \right) \times 100$$

amelyben Ws a duzzadt gyöngyök tömege, Wd pedig a száraz gyöngyök kiindulási tömege [100].

3.3.5. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek

A gyöngyök morfológiájának, méretének és felületének elektronmikroszkópos jellemzése Hitachi Tabletop mikroszkóp (TM3030 Plus) (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokió, Japán) segítségével történt Dr. Budai István segítségével a Debreceni Egyetem Műszaki Karán. A mintákat kétoldalú ragasztószalaggal borított lemezre rögzítettük, a mikrokrográfia során 5 kV-os gyorsítófeszültséget használtunk.

3.3.6. Részecskeméret-eloszlás meghatározása

A 200 µm-es fúvókával előállított gyöngyök részecskeméret-eloszlását HoribaPartica LA-950V2 (Horiba, Ltd., Kyoto, Japán) lézerdiffrakciós részecskeméret-eloszlásmérő berendezés

segítségével határoztuk meg, amely nedves üzemmódban, desztillált vízzel (1000× hígítás) működött. A vizsgálat Dr. Móczó János, valamint a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem közreműködésével történt.

3.3.7. *In vitro* kioldódás vizsgálat

A gyöngyökből történő hatóanyagleadás jellemzésére a forgólapátos Erweka DT 800 kioldódás vizsgáló berendezést (Erweka GmbH, Langen, Németország) alkalmaztuk. A vizsgálat során minden esetben 400 mg száraz mintát helyeztem 100 ml pH = 6,80 foszfát-puffer oldatba 37 °C-on. A kioldó közegből meghatározott időközönként (0., 5., 15., 30., 60., 90., 120. perc) 1000 µl mintát vettem, majd a peptid koncentrációját radioimmunoassay-vel mértük Dr. Németh József segítségével [29].

3.3.8. Enzimatisz stabilitás

Az MCH pepszin és pankreatin proetolitikus enzimek jelenlétében bekövetkező enzimatisz lebomlásának [101] vizsgálata során a peptiddel töltött gyöngyöket 100 mL pepszin tartalmú mesterséges gyomornedvhez (szimulált gyomornedv – SGF), illetve pankreatin tartalmú mesterséges bélmedvhez (szimulált bélmedv – SIF) adtam, és 37 °C-on, mérsékelt keverés mellett 100 rpm/perc sebességgel inkubáltam. Az SGF és SIF oldatokat az Európai Gyógyszerkönyv szerint készítettem. A közegekből 120 percen keresztül meghatározott időközönként 1000 µL mintákat vettem, majd azonos térfogatú jéghideg reagenst adtem hozzá az enzimreakció leállítására (0,10 M NaOH SGF és 0,10 M HCl SIF esetében). A mintákat radioimmunoassay-vel mértük [29].

3.3.9. Transzport vizsgálat

A peptid bélrendszerben történő felszívódásának modellezésére humán adenokarcinóma Caco-2 sejtvonalat használtam. A kísérlethez a sejteket először 24 lyukú ThinCert™ poliészter inzeretekre (pórusátmérő: 0,40 µm; Greiner Bio-One International, Mosonmagyaróvár, Magyarország) széleszttem 2×10^5 sejt/cm² sűrűséggel. A sejtek transzepiteliális elektromos ellenállását 2 naponta mértem. A mérések alapján a transzport kísérlethez szükséges stabil monolayer a szélesztést követő 21-28. napon alakult ki, ekkor érték el a TEER értékek az 1000 Ω× cm² körüli értéket. A kísérlet megkezdése előtt az apikális, illetve bazális kompartmentekben a tápközeget médiumról HBSS pufferre cseréltem, majd a sejteket 30 percig 37 °C-on előinkubáltam. A donor oldat 300 mg minta 60 mL PBS pufferben 60 percig történő oldásával készült. Negatív kontrollként HBBS-t használtam. A mintákból minden esetben 400

μ L oldatot pipettáztam az apikális kamrákba. A kísérlet során több összetétel permeabilitását is vizsgáltam, melyek kiindulási peptid koncentrációja minden esetben ugyanannyi volt, eltérés csak a felületaktív segédanyagok típusában volt. A membránon átjutó MCH mennyiségének meghatározásához 60 perc elteltével gyűjtöttem mintákat a bazális kompartmentekből. A mintákat radioimmunoassay-vel elemeztük.

3.3.10. Transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) mérés

A transzport kísérlet alatt a sejtek transzepiteliális elektromos ellenállását 15 percenként mértem a Millipore Millicell-ERS 00001 berendezés segítségével (Waltham, MA, USA). A membránfunkciók regenerálódását a vizsgálatot követő 24 órában monitoroztuk további TEER mérésekkel.

3.4. Sejtenyésztés és sejtleletképeségi vizsgálatok

3.4.1. *In vitro* bőr- és bélhám modell

A sejtes kísérletek során használt HaCaT humán keratinocita és Caco-2 humán adenocarcinoma sejtvonalakat heti rendszerességgű passzálassal tartottam fenn. A sejtek egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy megőrizték differenciációs és proliferációs képességüket, mely többszöri passzálas után is megfigyelhető [102]. A sejtenyésztés során a sejteket fiziológiás körülményekhez hasonló, letapadó sejtkultúrához alkalmas sejtenyésztő edényben növesztettem DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő médium folyadékban 37 °C-on 5 % CO₂ atmoszférában 95 % páratartalom mellett. A médium 2 mM L-glutamint, 100 mg/ml gentamicint, 10 v/v% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS), valamint 1 v/v% nem esszenciális aminosavat tartalmazott. A tápoldatot mindkét sejttípusnál minden 3. napon cseréltem steril körülmények között, lamináris áramlású fülke alatt. A sejtek passzálása a letapadó sejtvonalakra jellemző konfluens sejtréteg kialakulásakor történt. A médium cseréhez hasonlóan a passzálas is sejtlaborban, laminár boxban történt. A folyamat első lépésében óvatosan eltávolítottam a sejtekről az elhasználódott tápoldatot, majd a sejtek felszínén maradt médiumot PBS-oldattal (Phosphate Buffered Saline) mostam le. A letapadó sejtréteget tripszin oldat (TrypLE™ Express, ThermoFisher) segítségével szuszpenzióba vittem. Az emésztés alatt a sejteket 5 percig inkubáltam, majd a reakciót friss médium hozzáadásával állítottam le, amelynek szérum tartalma inaktíválja az enzimet. A sejszuszenziót ezt követően 6 percig, 1100 rpm fordulaton, szobahőmérsékleten centrifugáltam. A lecentrifugált sejtekről óvatosan leszívtam a felülúszót, majd 10 ml tiszta

médiummal szuszpendáltam őket. A szuszpenzióban lévő sejtek számát Bürker kamra segítségével számoltam. A sejtszuszenzióból 10^6 db sejtet tartalmazó mennyiséget steril telepítő edénybe pipettáztam, és a médium mennyiségét kiegészítettem 10 ml-re. A keratinocita sejtek egy csoportját a további vizsgálatokhoz Da Hee Choi és munkatársai [103] munkája alapján TNF-alfa (20 ng/mL) és IL-1-béta (25 ng/mL) proinflammatorikus citokinek kombinációjával kezeltem, hogy TNF-alfa/IL-1-béta indukált humán PSmHaCaT sejteket kapjunk. A további kísérletekhez 10 és 30 passzázs számú sejteket használtam.

3.4.2. MTT sejtéletképességi vizsgálat

A kísérlet során az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje a sárga színű vízdoldható MTT festéket (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) lila színű, vízben oldhatatlan formazán kristályokká redukálják. A módszer szelektív, mert csak az élő sejtek mitokondriumában található aktív dehidrogenáz enzim. A keletkező formazán só sósavas izopropanollal oldatba vihető, és az oldat abszorbanciája spektrofotométerrel mérhető. Az így meghatározott abszorbancia érték korrelál az élő sejtek számával. A sejtéletképességi vizsgálatokhoz a HaCaT és Caco-2 sejteket az előző pontban ismertetett módon 7 napig növesztettem 96 lyukú tenyésztő plate-ben 10^4 sejt/lyuk sűrűséggel. A növesztés során a fáradt médiumot a 3. napon lecseréltem. A konfluens sejtréteg kialakulását követően a tápoldatot eltávolítottam, majd a sejteket meghatározott ideig inkubáltam a vizsgálati mintákkal.

3.5. Statisztikai analízis

Kísérletes eredményeinket a Microsoft Excel 2013 és SigmaStat 4.0 (3.1 verzió; SPSS, Chicago, IL, USA, 2015) segítségével elemeztük. A mért adatokat átlag $\pm$ SD formában közöltük. A csoportok összehasonlítását egyutas ANOVA módszerrel végeztük, amelyet Tukey's teszt követett. A kísérletek során legalább három párhuzamos mérést végeztünk, a különbségeket pedig $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

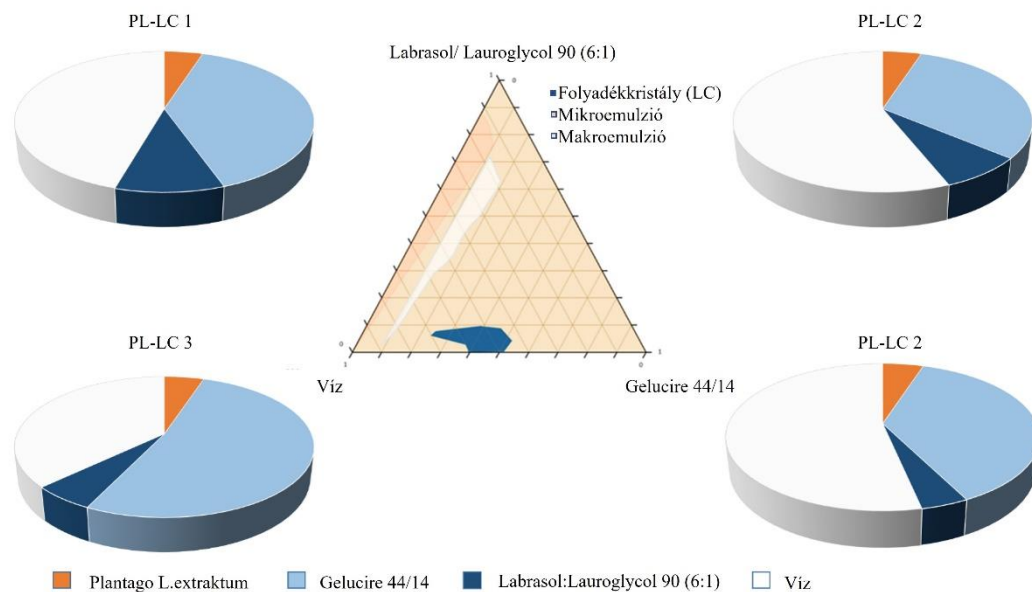
4.1. *Plantago lanceolata* kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai

4.1.1. *Plantago lanceolata* levél kivonása

A *P. lanceolata* levél metanolos kivonása végén 100 g kiindulási anyag 25,2 g *P. lanceolata* kivonatot eredményezett. Az extraktum jellemzése hiteles standardokkal végzett kalibrálás után LC-ESI-MS módszerrel történt [104]. A kivonat 5,99% acteozidot, 2,34% aucubint, valamint 1,21% katalpolt tartalmazott.

4.1.2. Folyadékkristályok formulálása

A folyadékkristályok kialakulásának paramétereit pszeudoterner fázisdiagram segítségével határoztam meg. A Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1) / Gelucire 44/14 / víz pszeudoterner diagram az 5. számú ábrán látható. Annak érdekében, hogy a víztartalomnak a folyadékkristályos szerkezetre gyakorolt hatását tanulmányozzam, különböző víztartalmú (10% - 90%) mintákat készítettem. A titrálás során főként mikroemulziók képződtek. Amikor a víz aránya 90% fölé emelkedett makroemulziók alakultak ki, függetlenül a Labrasol/Lauroglycol 90 és Gelucire 44/14 felületaktív anyagok arányaitól. Ezzel szemben folyadékkristályos rendszerek csak az összetevők egy bizonyos, szűkebb tartományában keletkeztek, amikor a keverék a Labrasol/Lauroglycol 90 tenzid párt 10% alatt tartalmazta. A diagram alapján négy különböző összetételt választottam ki a Labrasol/Lauroglycol 90 állandó 6:1 arányával további vizsgálatokra. A formulációk tiszták és stabilak voltak 4,1–9,9 %-os Labrasol/Lauroglycol 90, valamint 31,1–52 %-os Gelucire 44/14 tartományokban. A kiválasztott PL kompozíciókat az 1. számú táblázat foglalja össze.



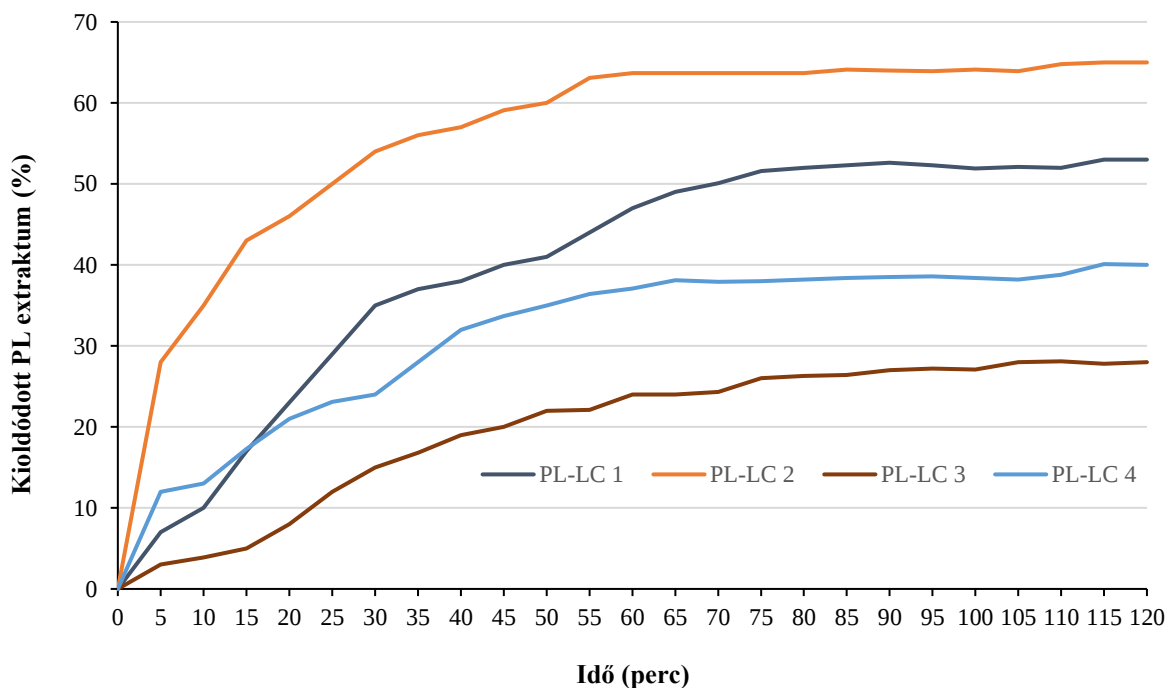
5. ábra. Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1) / Gelucire 44/14 / víz rendszer pszeudoterner fázisdiagramja. A sötétkék terület a folyadékkristályok képződésének tartományát jelöli (LC). A kördiagramok a kiválasztott *Plantago lanceolata* PL-LC összetételek (I–IV) segédanyagainak arányát szemléltetik.

1. táblázat. Formulált LC rendszerek összetétele. A formulált LC rendszerek minden esetben 5% hatóanyagot tartalmaztak változó tenzid- és víztartalom mellett.

Összetétel	<i>P. lanceolata</i> kivonat	Gelucire 44/14	Labrasol/Lauroglycol 90	Víz
I.	1.25 mL (4.95%)	10 mL (39.60%)	2.5 mL (9.90%)	11.5 mL (45.55%)
II.	1.6 mL (4.92%)	10 mL (31.15%)	2.5 mL (7.79%)	18 mL (56.08%)
III.	1.1 mL (5.09%)	11.25 mL (52.08%)	1.25 mL (5.79%)	8 mL (37.04%)
IV.	1.5 mL (5%)	11.25 mL (37.50%)	1.25 mL (4.17%)	16 mL (53.33%)

4.1.3. *In vitro* kioldódás vizsgálat

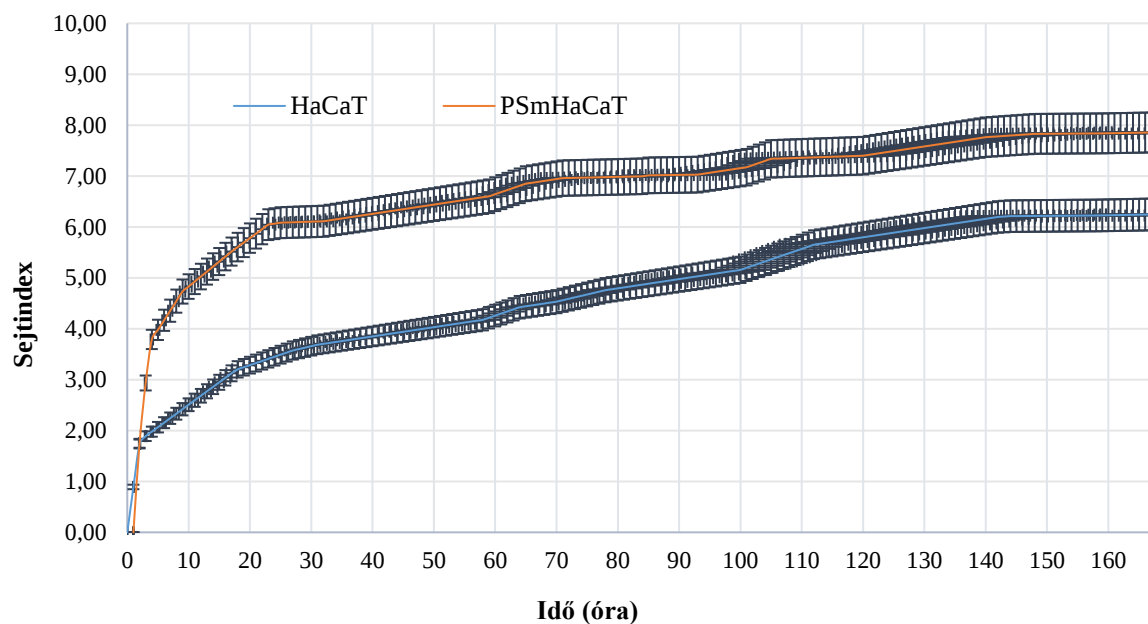
A 6. számú ábra a szintetikus cellulóz-acetát membránon keresztül diffundált *P. lanceolata* kivonat százalékos arányát mutatja az idő függvényében. Az összetételekből felszabadult hatóanyag mennyisége alapján az alábbi csökkenő sorrendet állítottuk fel: PL-LC 2 > 1 > 4 > 3. Eredményeink alapján jobb hatóanyag kioldódás történt azokból a készítményekből, melyek a Labrasol/Lauroglycol 90 tenzid párból többet tartalmaztak. A legjobb diffúziót az I. és II. kompozíció esetében sikerült elérni, ahol a felületaktív anyagok tartománya 9,9 % és 7,8 % volt, a diffundált PL-kivonat mennyisége pedig meghaladta az 50% -ot. A III. és a IV. kompozíció esetében, amelyek kevesebb felületaktív anyagot tartalmaztak, rosszabb hatóanyag diffúziót tapasztaltunk, a felszabadult gyógyszer mennyisége 40% alatt volt.



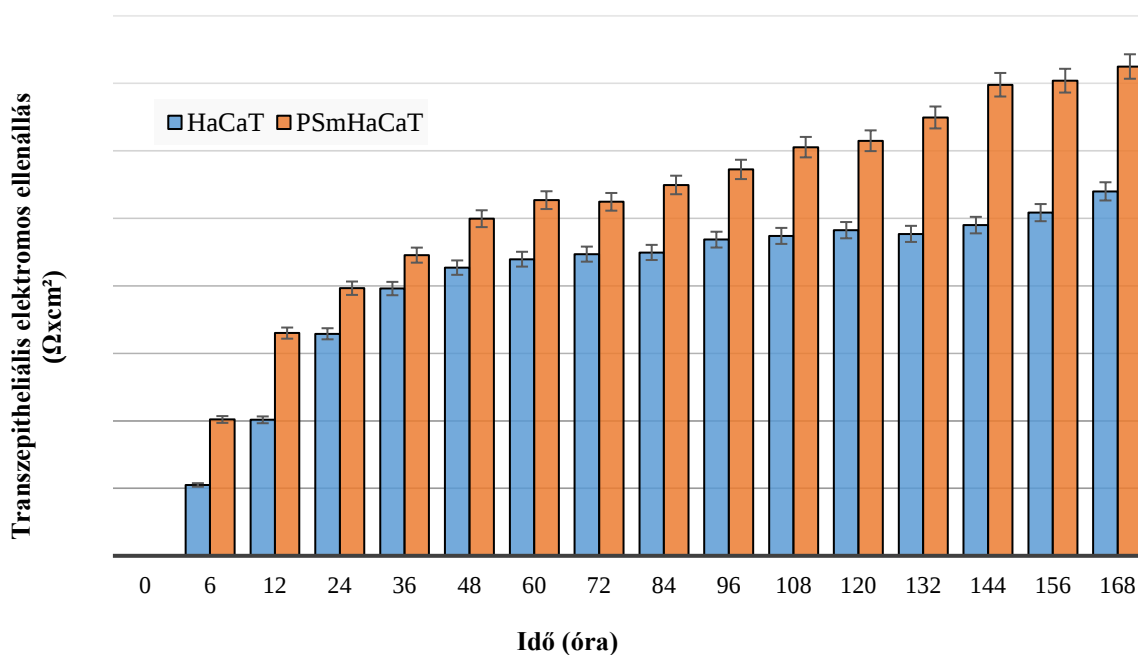
6. ábra. A kompozíciók kioldódás profiljai. A legtöbb hatóanyag az I. és II. összetételekből diffundált, amely a Labrasol/Lauroglycol 90 tenzid párból a legtöbbet (9,90 % és 7,80%) tartalmazta.

4.1.4. HaCaT sejtproliferációs vizsgálat

A proliferációs vizsgálatokat $10^4/200 \mu\text{L}$ sűrűséggel szélesztett HaCaT sejteken végeztem az xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) segítségével. A 7. számú ábra szemlélteti a vizsgált minták között tapasztalt jelentős különbségeket. A HaCaT sejtproliferáció impedancia mérésen alapuló meghatározása azonban a sejtinдекс nyilvánvaló növekedését mutatta mindegyik esetben eltérő proliferációs kinetika mellett. Míg a kezeletlen HaCaT sejtek hét nap elteltével alakították ki a konfluens monolayer sejtréteget, az IL-1-béta - és a TNF-alfa stimulált keratinociták (PSmHaCaT) a gyors proliferáció következtében hamarabb elérték a platófázist. Ezen felül a PSmHaCaT keratinociták magasabb sejtinдекс értékeket mutattak ebben a szakaszban. Ennek megerősítésére a sejtek transzepithelialis elektromos ellenállását is mértem, mely mérések eredménye összhangban van az RTCA tesztekkel. Amint az a 8. számú ábrán is látható, magasabb TEER értékeket figyeltem meg a PSmHaCaT sejteknél, mint a kezeletlen keratinociták esetében.



7. ábra. HaCaT sejtprolifерáció impedancia alapú mérések eredménye.



8. ábra. Transepithelialis elektromos ellenállás (TEER) mérés eredményei.

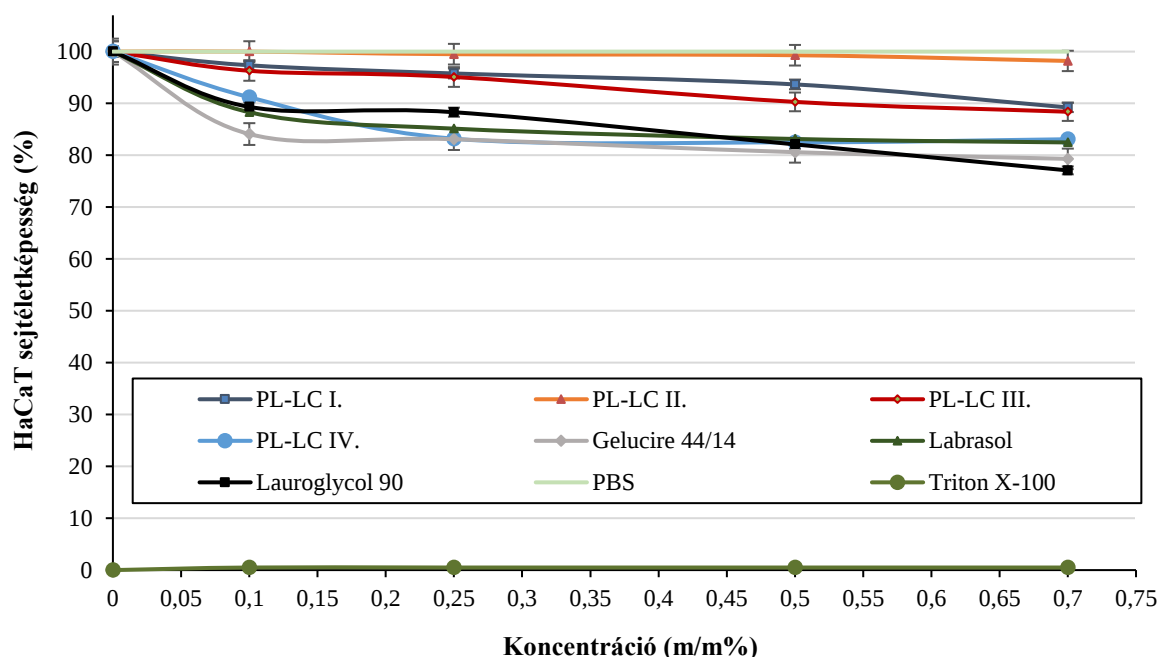
4.1.5. MTT sejtéletképesség vizsgálat

A biztonságos alkalmazás biztosításának érdekében MTT sejtéletképességi vizsgálatokat végeztem HaCaT sejtvonalon. A formulációk citotoxicitását különböző koncentrációkban vizsgáltam. Az egyes összetevőket szintén teszteltem külön-külön. Az LC rendszerek

összetételt annyiban változtattam meg, hogy a vizet azonos mennyiségű DMEM sejtkultúrás médiumra cseréltem. Ez azonban az LC rendszer tulajdonságain nem változtat, mivel a vízhez hasonlóan a DMEM is poláros. A 9. számú ábrán látható, hogy a formulált LC rendszerek, illetve azok összetevői sem befolyásolták jelentősen a sejteletképeséget. A sejteletképeség még magasabb koncentrációk esetében is 50 % felett volt a negatív kontrollhoz képest (foszfát-puffer, PBS). Megállapítottam, hogy az összes kompozíció jól tolerálható. Nem tapasztaltam szignifikáns különbséget az LC-rendszerekkel, illetve a negatív kontrollként alkalmazott PBS-sel kezelt csoportok esetében, bár mind közül a II. összetétel csökkentette legkevésbé a sejteletképeséget.

2. táblázat. MTT teszthez módosított LC rendszerek összetétele. A formulációk összetétele annyiban változott a kísérlet során, hogy a vizet azonos mennyiségű tenyésztő médium folyadékkal helyettesítettem.

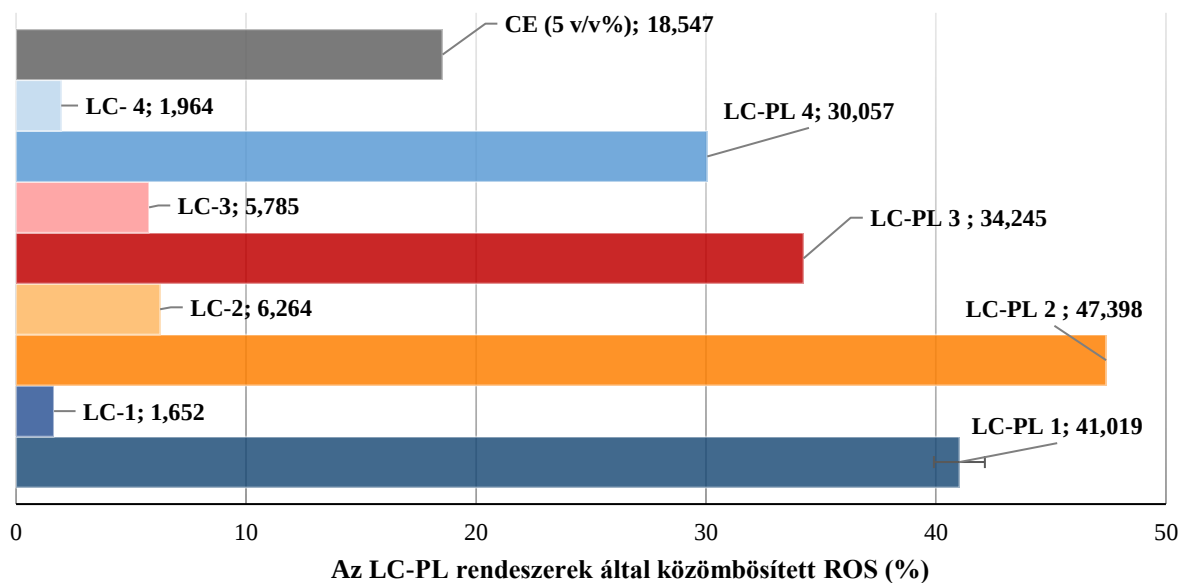
Összetétel	<i>P. lanceolata</i> kivonat	Gelucire 44/14	Labrasol/Lauroglycol 90	DMEM
I.	1.25 mL (4.95%)	10 mL (39.60%)	2.5 mL (9.90%)	11.5 mL (45.55%)
II.	1.6 mL (4.92%)	10 mL (31.15%)	2.5 mL (7.79%)	18 mL (56.08%)
III.	1.1 mL (5.09%)	11.25 mL (52.08%)	1.25 mL (5.79%)	8 mL (37.04%)
IV.	1.5 mL (5%)	11.25 mL (37.50%)	1.25 mL (4.17%)	16 mL (53.33%)



9. ábra. A formulációk, illetve azok komponenseinek toxicitás vizsgálata HaCaT sejtvonalon MTT teszttel. Pozitív kontrollként Triton-X-et; negatív kontrollként foszfát-puffert (PBS) használtam.

4.1.6. DPPH gyökfogó aktivitás vizsgálat

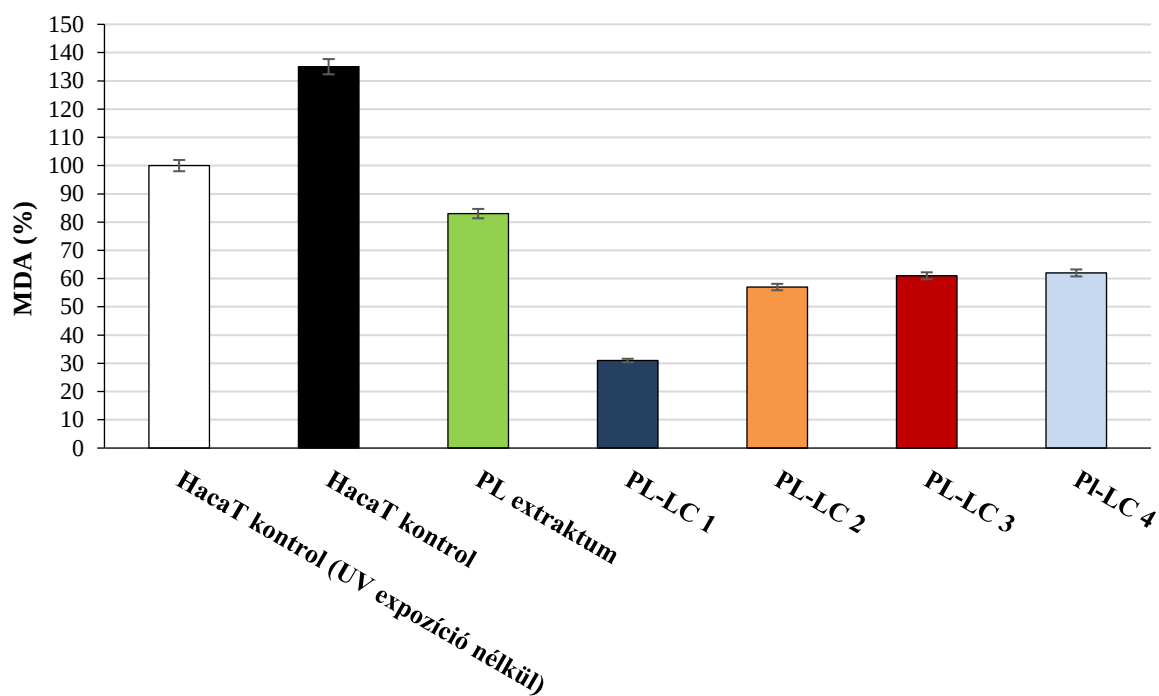
A vizsgálat alapja a DPPH szabadgyök antioxidáns jelenlétében történő színváltozása. A folyadékkristály rendszereket *Plantago lanceolata* kivonattal, illetve anélkül is vizsgáltam. Kontrollként a megfelelő vak formulációkat és 5% *Plantago lanceolata* kivonat vizes diszperzióját (CE) alkalmaztam. Mint azt már korábban említettem, a formulált LC minták szintén 5 v/v% PL kivonatot tartalmaztak. Az antioxidáns aktivitás százalékos arányát DPPH teszttel mértem. A DPPH gyökfogó aktivitást Brand-Williams és mtsai által leírt módszer alapján mértem [105]. Az eredmények alapján szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a vizsgált csoportok között, melyet a 10. számú ábrán csillaggal jelöltem. Az elvégzett vizsgálat megerősítette, hogy az összes kompozíció képes jelentősen gátolni a DPPH oxidációját. Megállapítottam, hogy az I. és a II. összetételek a leghatékonyabbak, ezzel szemben a IV. összetétel mutatta a legkisebb aktivitás, bár antioxidáns kapacitása így is jelentősen magasabbnak bizonyult, mint a kontroll csoporté (CE).



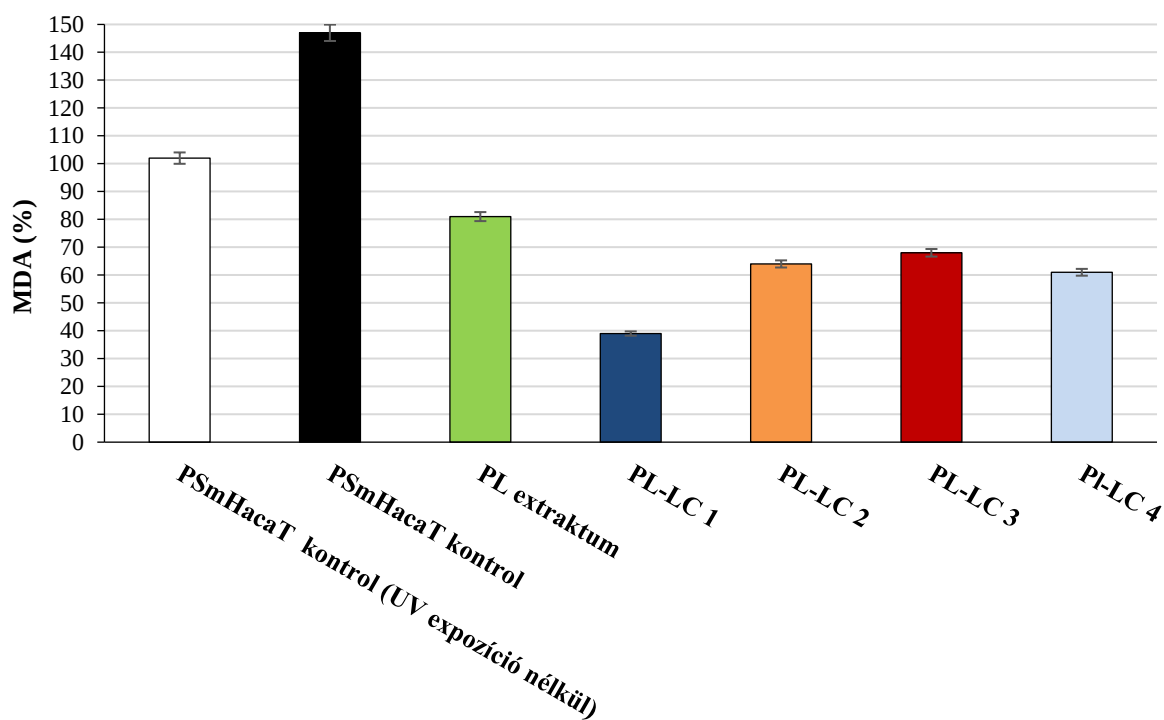
10. ábra. Az LC-PL összetételek által közömbösített reaktív oxigéngyökök százalékos aránya. Pozitív kontrollként 5 v/v% *P. lanceolata* kivonat vizes diszperzióját választottam, negatív kontrollként pedig hatóanyag nélküli folyadékkristályt. A szignifikanciát csillaggal jelöltem (*).

4.1.7. Lipidperoxidáció (MDA) vizsgálat

A formulációk UV sugárzással szembeni védőhatását HaCaT, illetve PSmHaCaT sejteken vizsgáltam. Az *in vitro* antioxidáns aktivitás mérések eredményeit a 11. számú ábra mutatja be. Az MDA szintjében mért különbségek megerősítették a *Plantago lanceolata* kivonat antioxidáns hatékonyságát, és a megfelelően kiválasztott komponensek fontosságát egyaránt. Amellett, hogy az összes formuláció csökkentette az MDA szintet a kontroll csoportokhoz képest, azt tapasztaltam, hogy az I. összetétel (a legnagyobb penetrációfokozó segédanyag tartalommal) esetében jelentősebb ez a csökkenés.



(a)

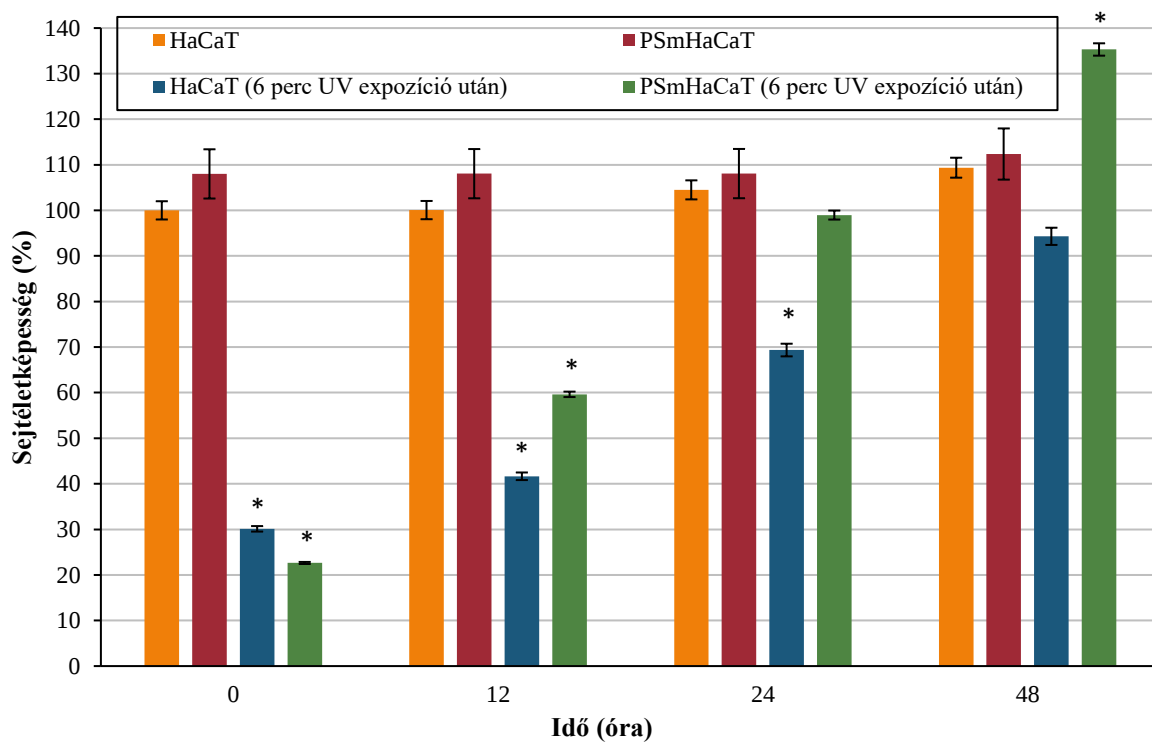


(b)

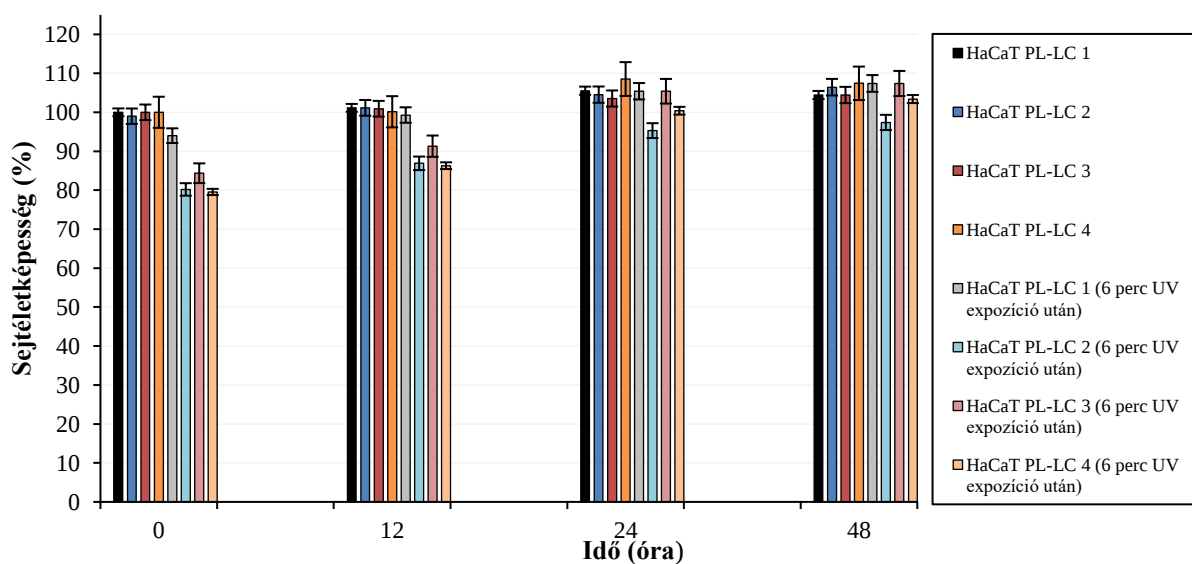
11. ábra. Az LC-PL rendszerek HaCaT (a) és PSmHaCaT (b) sejtek MDA szintjére gyakorolt hatása 6 perc UV expozíciót követően. Pozitív kontrollként PL kivonatot, negatív kontrollként pedig kezeletlen sejteket alkalmaztam.

4.1.8. UV-C expozíció HaCaT sejteken

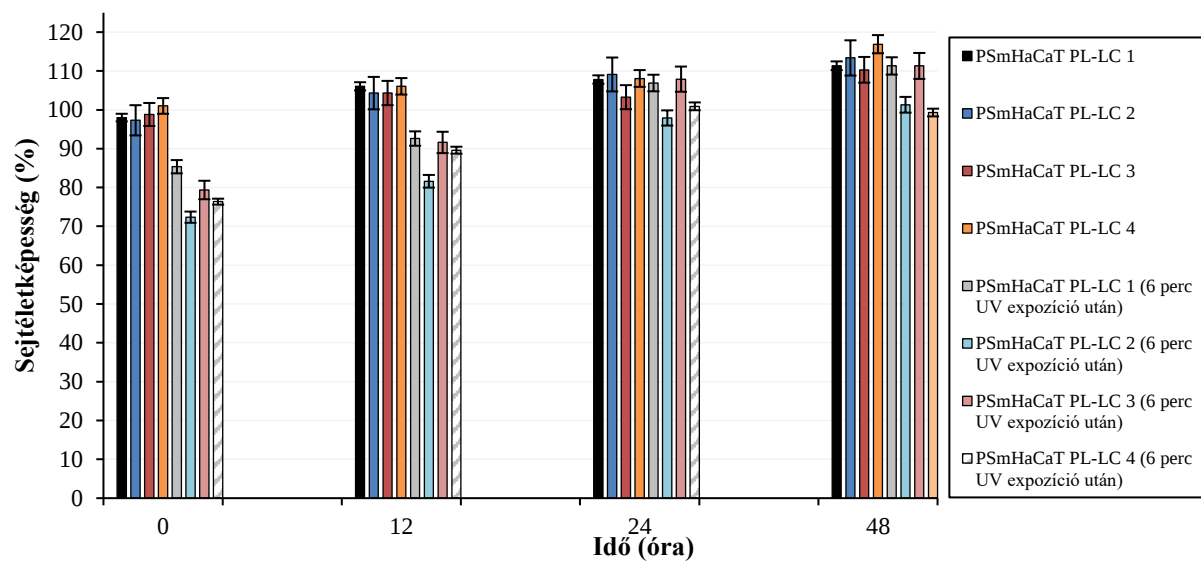
Az LC-PL kompozíciók UV-C besugárzás elleni hatását HaCaT, illetve stimulált keratinocita (PSmHaCaT) sejtvonalakon vizsgáltam. A formulációk összetételét annyiban módosítottam (2. számú táblázat), hogy desztillált víz helyett azonos térfogatú DMEM sejtkultúrás médiumot használtam a víz káros hatásainak elkerülése érdekében. A 12. számú ábra az UV-indukált oxidatív stresszt követő sejtleletképeséget mutatja. Az első kísérletben nem alkalmaztam PL-LC kezelést. Az eredmények alátámasztották az UV-C sugárzás különböző sejtvonalakra kifejtett káros hatását, továbbá megfigyeltem, hogy 6 perc UV-C expozíció a sejtleletképeség jelentős csökkenését eredményezte. A sugárzás által stimulált proliferációs változásokat MTT-teszttel vizsgáltam az expozíciót követő 12., 24. és 48. órában. Azt tapasztaltam, hogy 6 perc UV-C expozíció robusztus PSmHaCaT sejtproliferációt eredményezett. Két nap elteltével az UV-C-stimulált PSmHaCaT sejtek életképesége meghaladta a kezeletlen sejtek életképeségét. A 13. számú ábra PL-LC-vel kezelt sejtek életképeségét mutatja 6 perc UV-C expozíció okozta oxidatív stressz után. Az eredmények alapján a PL-LC kezelés részben gátolta az UV-C sugárzás káros hatásait. A *Plantago lanceolata* kivonat antioxidáns hatása mellett a Labrasol/Lauroglycol 90 penetrációfokozó hatása is érvényesült, mivel az I. és III. kompozícióból, amelyek a tenzid párt nagyobb koncentrációban tartalmazzák, időegység alatt nagyobb mennyiségű hatóanyag került a sejtekbe, növelve ezzel a sejtleletképeséget. Az átfogó elemzés kimutatta, hogy ugyan az LC-PL kezelés nem képes teljes mértékben megvédeni a keratinocitákat, a PSmHaCaT sejtek esetében megfigyelt UV-C expozíció okozta hiperproliferációt azonban megelőzte.



12. ábra. MTT sejtéletképességi vizsgálat eredményei HaCaT, illetve PSmHaCaT sejteken UV expozíciót követő 12., 24., 48. órában. A szignifikanciát csilaggal jelöltem (*).



(a)



(b)

13. ábra. MTT sejtleletkéességi vizsgálat eredményei HaCaT (a), illetve PSmHaCaT (b) sejteken 6 perccel az UV expozíciót követően.

4.2. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai

4.2.1. MCH tartalmú nátrium-alginát mikrogyöngyök formulálása

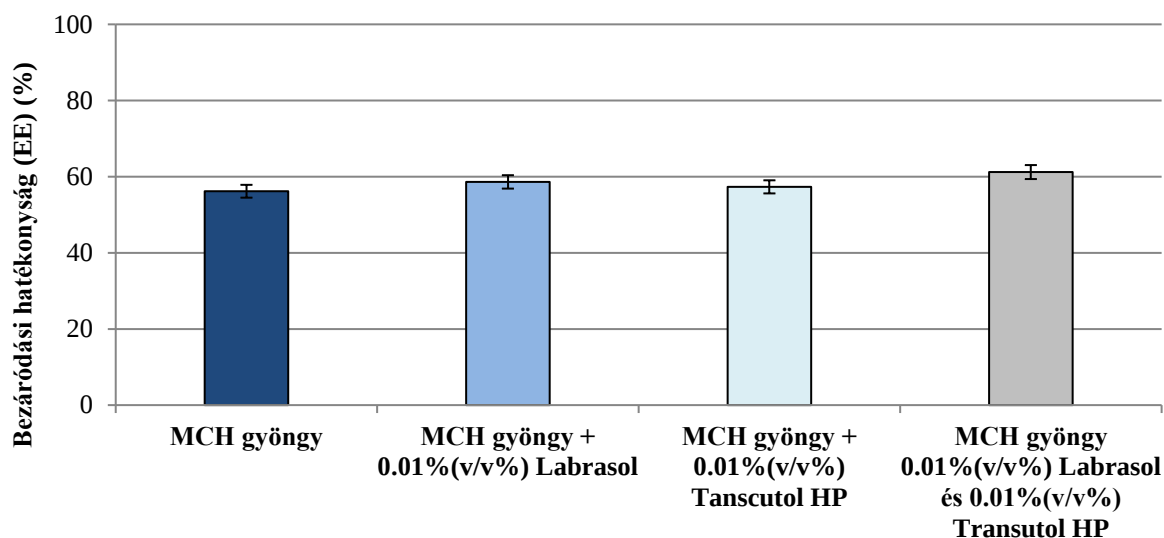
Az MCH-ből előállított négy formuláció összetételét az 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. MCH tartalmú nátrium-alginát mikrogyöngyök formulálásához választott összetételek.

Összetétel	Nátrium-alginát-oldat	Labrasol	Transcutol HP
MCH gyöngy	40 mL	-	-
MCH gyöngy + 0.01% (v/v%) Labrasol	40 mL	0.01% (v/v%)	-
MCH gyöngy + 0.01% (v/v%) Transcutol HP	40 mL	-	0.01% (v/v%)
MCH gyöngy + 0.01% (v/v%) Labrasol és 0.01% (v/v%) Transcutol HP	40 mL	0.01% (v/v%)	0.01% (v/v%)

4.2.2. Bezáródási hatékonyság

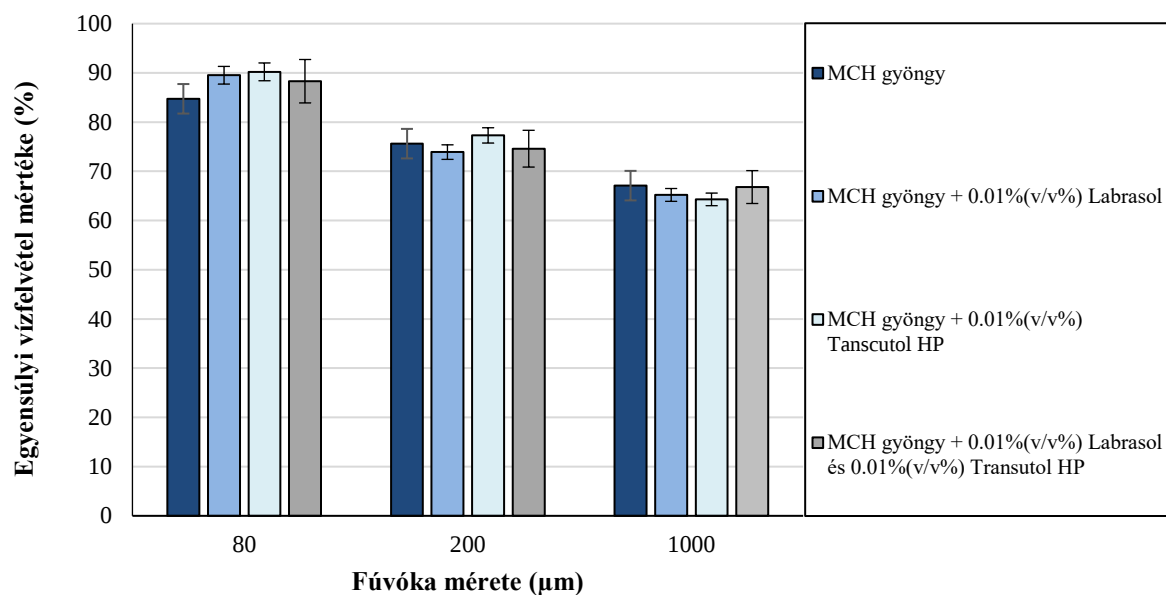
A vizsgálat eredményei alapján a hatóanyag bezáródási hatékonysága az összes összetétel esetében minimum 56 %-os volt. A legalacsonyabb értéket a csak peptidet tartalmazó gyöngyök esetében kaptam, míg a felületaktív Labrasol és Transcutol HP segédanyagokat is tartalmazó minták magasabb mértékű MCH bezáródást mutattak. Az egyes összetételek hatóanyag bezáró képessége között nem tapasztaltam szignifikáns különbséget. A bezáródási hatékonyság mérések eredményeit a 14. ábra foglalja össze.



14. ábra. Bezáródási hatékonyság a különböző MCH tartalmú gyöngyökre vonatkozóan. Bár az egyes összetételek esetében kapott eredmények között nincs szignifikáns különbség, a Labrasol-t és Transcutol HP-t tartalmazó gyöngyök magasabb értéket mutattak.

4.2.3. Duzzadási képesség meghatározása

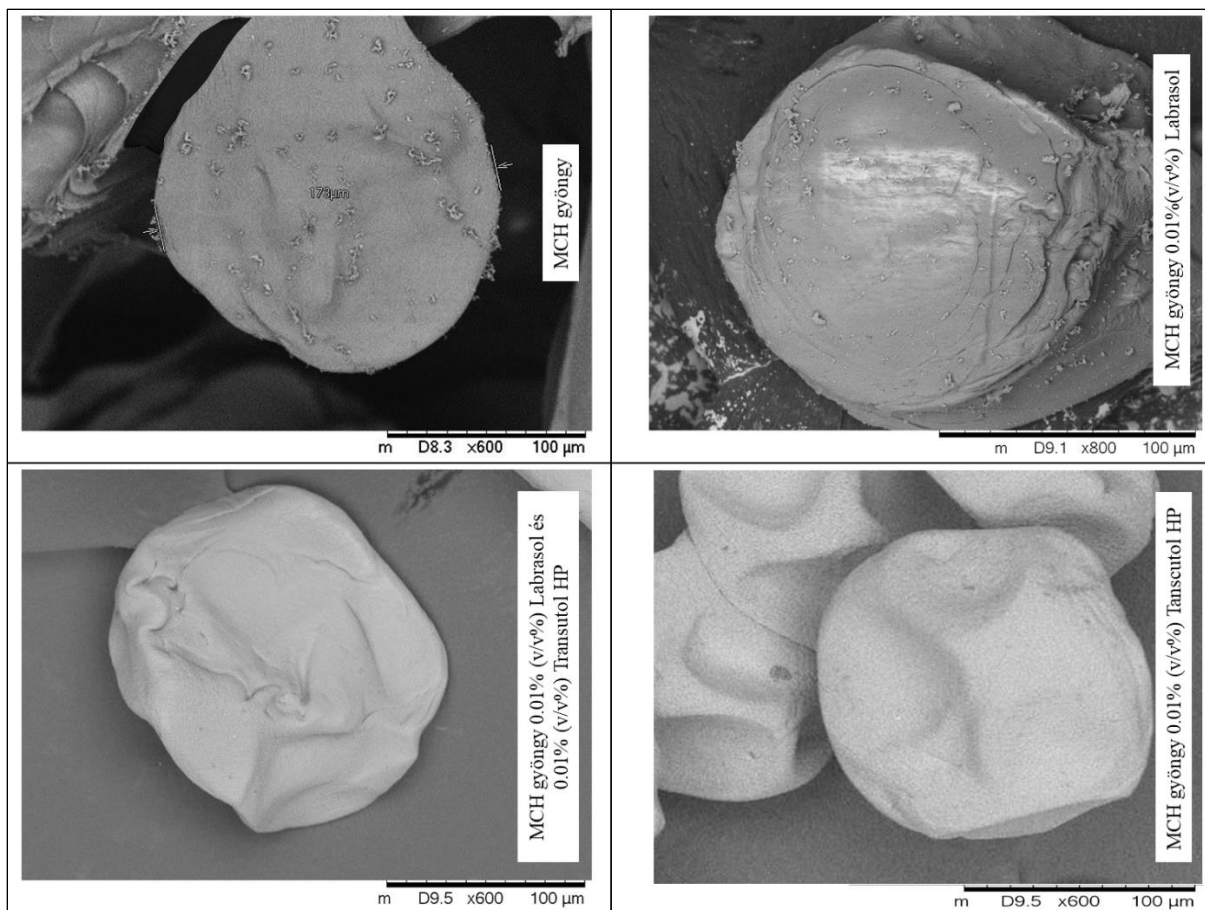
A gyöngyök duzzadási képességét a 15. ábra mutatja be. Az eredmények alapján megfigyeltem, hogy az egyensúlyi vízfelvétel mértéke döntően a szemcsemérettől függő tényező. Minél kisebb a részecskeméret, és ezáltal minél nagyobb a fajlagos felület, annál nagyobb a részecskék vízfelvételi kapacitása. A duzzadási képesség meghatározása hasznos a termékek későbbi felhasználása során, mivel befolyásolja azok alkalmazhatóságát.



15. ábra. A gyöngyök duzzadási viselkedése a formuláláshoz alkalmazott fúvóka méretének függvényében.

4.2.4. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek

Az MCH tartalmú alginát gyöngyök pásztázó elektronmikroszkópos felvételei a 16. ábrán láthatók. A képeken jól látszik, hogy a mikrogöngyök gömb alakú morfológiát mutatnak, felületükön néhány apróbb zúzóddással, melyek valószínűleg a száradási folyamat során alakultak ki. A vizsgálat alátámasztotta, hogy a mikrogöngyök átmérője összhangban van a részecskeméret-eloszlás meghatározás eredményeivel.



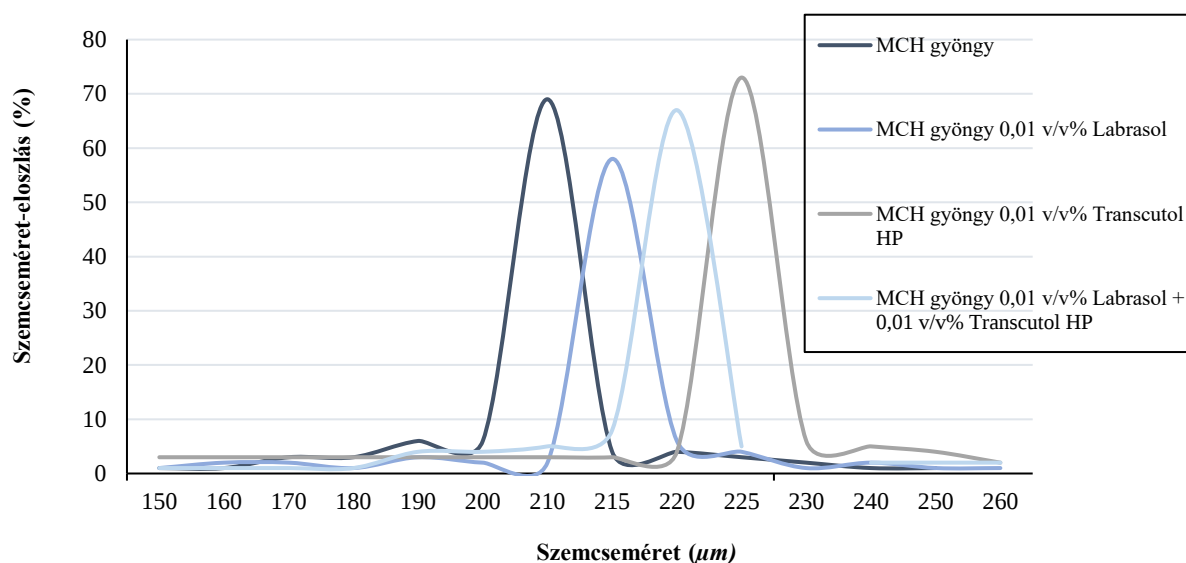
16. ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek az MCH tartalmú alginát gyöngyökről.

4.2.5. Részecskeméret-eloszlás meghatározása

A mikrogöngyöket HoribaPartica LA-950V2 lézerdiffrakciós berendezés segítségével vizsgáltuk. A mért értékeket a 4. táblázatban foglaltam össze. A 17. ábrán összefoglalt eredmények alapján a formulált mikrogöngyök szemcsemérete megközelíti a teoretikus 200 µm-t.

4. táblázat. Lézerdiffrakciós mérésekkel végzett részecskeméret meghatározás eredményei.

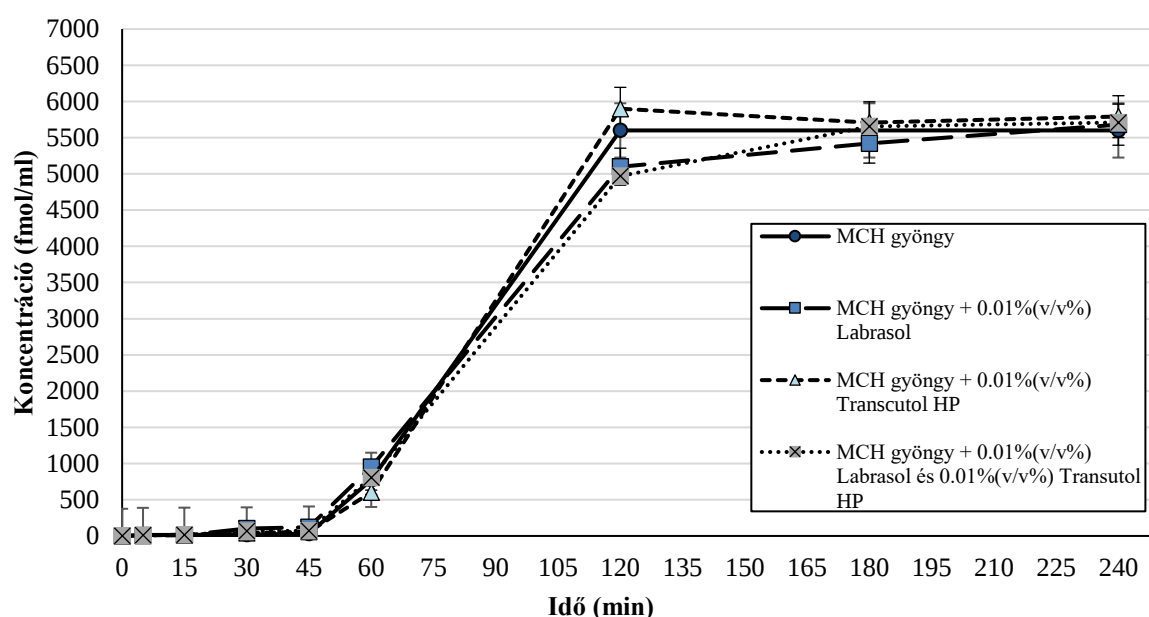
Minta	d(0.1) μm	d(0.9) μm	d(4.3) μm
MCH gyöngy	144.03 $\pm$ 7.37	193.32 $\pm$ 8.25	209.65 $\pm$ 28
MCH gyöngy + 0.01% (v/v%) Labrasol	146.09 $\pm$ 6.21	198.42 $\pm$ 3.63	208.23 $\pm$ 1.56
MCH gyöngy + 0.01% (v/v%) Transcutol HP	141.52 $\pm$ 3.97	205.26 $\pm$ 2.83	220.30 $\pm$ 3.85
MCH gyöngy + 0.01% (v/v%) Labrasol és 0.01% (v/v%) Transcutol HP	146.71 $\pm$ 7.02	199.47 $\pm$ 4.23	211.10 $\pm$ 1.19



17. ábra. A lézerdiffrakciós részecskeméret-eloszlás meghatározás eredményei a térfogattal súlyozott szemcseméret-eloszlás átlaga értékek szerint. A gyöngyök részecskemérete mind a négy készítmény esetében közel van az elméleti 200 μm -es értékhez.

4.2.6. *In vitro* kioldódás vizsgálat

Az *in vitro* kioldódás vizsgálatot pH=6,80 foszfát-puffer oldatban végeztem, a mintákat RIA módszerrel analizáltuk. A kioldódási profilokat a kísérleti adatok ábrázolásával határoztam meg, mely eredményeket az 18. ábrán foglaltam össze. A mért értékek alapján kétfázisú hatóanyagleadás figyelhető meg az összes összetétel esetében. Az MCH kezdetben elnyújtva szabadult fel, az első 60 percben nem lehetett szignifikáns peptid koncentrációt mérni. Egy óra elteltével azonban megindult a hatóanyag robbanásszerű felszabadulása, ahol a bezáródott MCH 68,30 %-a kioldódott a gyöngyökből, majd 120 perc elteltével ez az arány szignifikánsan csökkent.

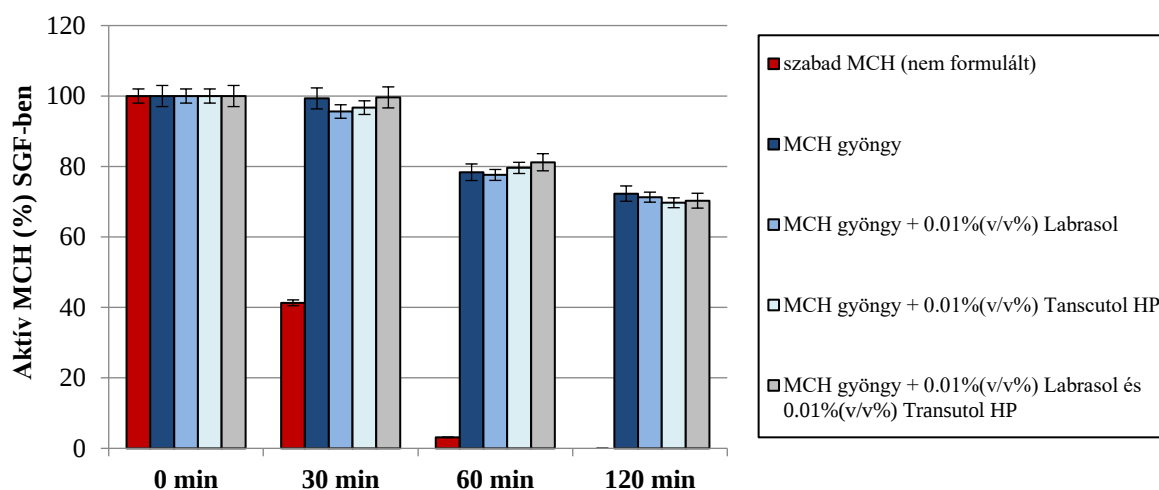


18. ábra. A nátrium-alginát gyöngyökből felszabadult MCH *in vitro* kioldódási profilja foszfát puffer oldatban (pH = 6,80). A peptid ugrásszerű felszabadulása 60 perc után kezdődött, majd 120 perc elteltével érte el a plató fázist.

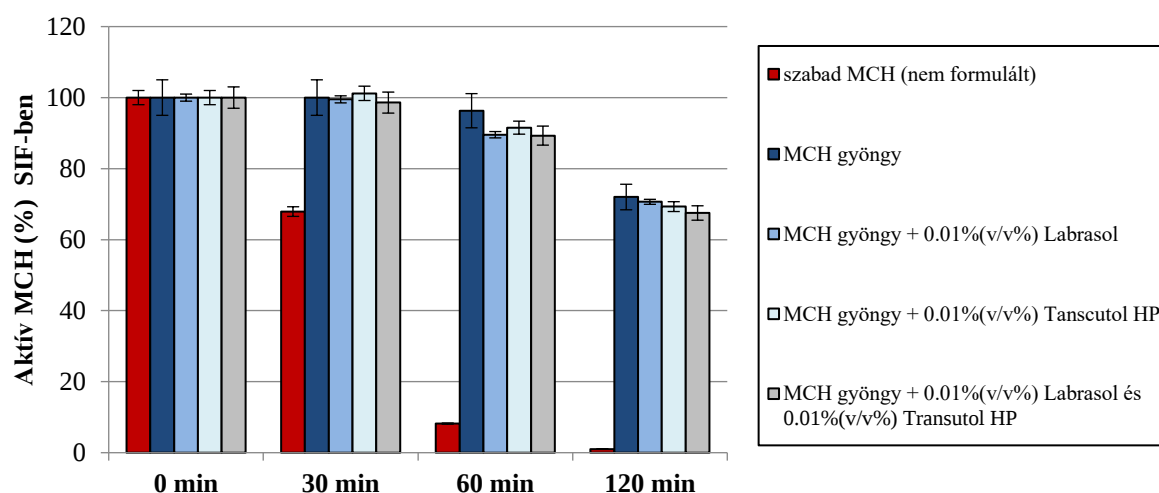
4.2.7. Enzimatiskus stabilitás

Az enzimatiskus stabilitás vizsgálat eredménye alapján a szimulált gyomornedvben történő 30 perces inkubációt követően $3,00 \pm 0,50\%$, szimulált bélmedvben pedig $8,00 \pm 0,50\%$ aktív MCH volt kimutatható a közegből a szabad, nem formulázott minták esetében. A kísérlet során szimulált gyomornedvben 60 perc elteltével teljesen elbomlott a szabad MCH, míg a 2 órás szimulált bélmedvben való inkubáció után mindössze $1,00 \pm 0,50\%$ szabad peptid visszamérés történt. A formulált mikrogöngyök esetében a bezáródott MCH legalább 70%-a védett maradt

a gyomor-, és bélnedv emésztő enzimjeivel szemben. Az eredmények tehát alátámasztották, hogy a formulált készítmények képesek sikeresen megvédeni a modell peptidet a gasztrointesztinális traktusban történő degradációtól. A vizsgálat eredményeit 19. ábra mutatja be.



(a)

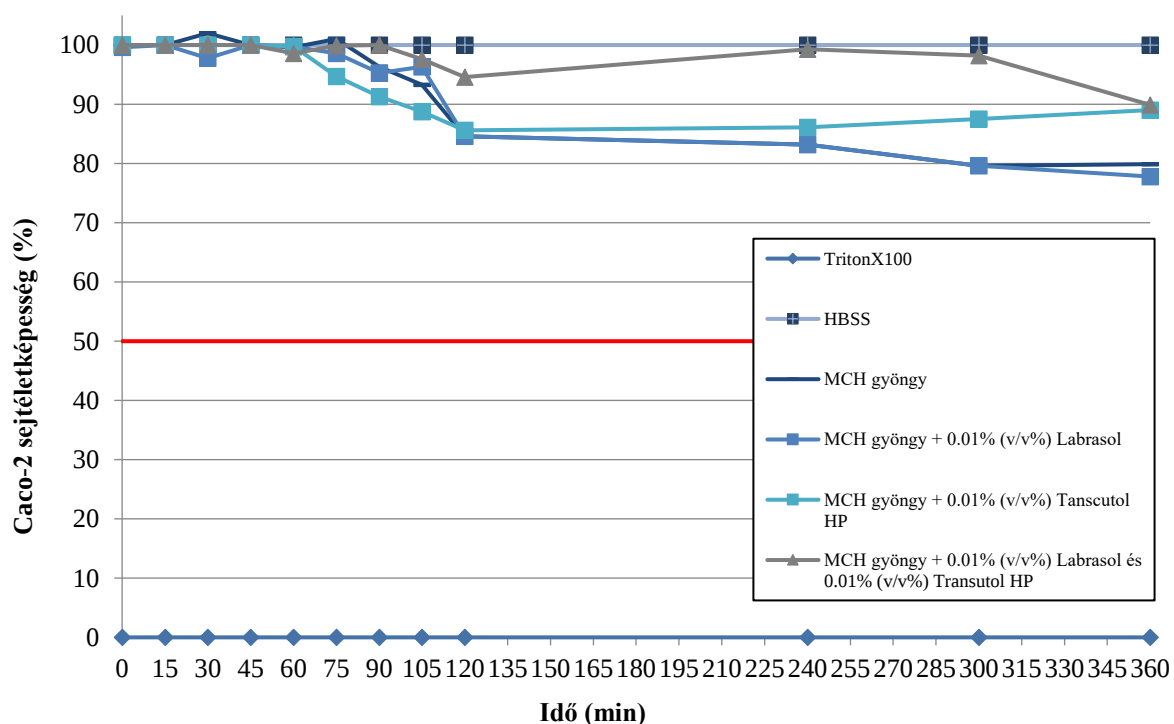


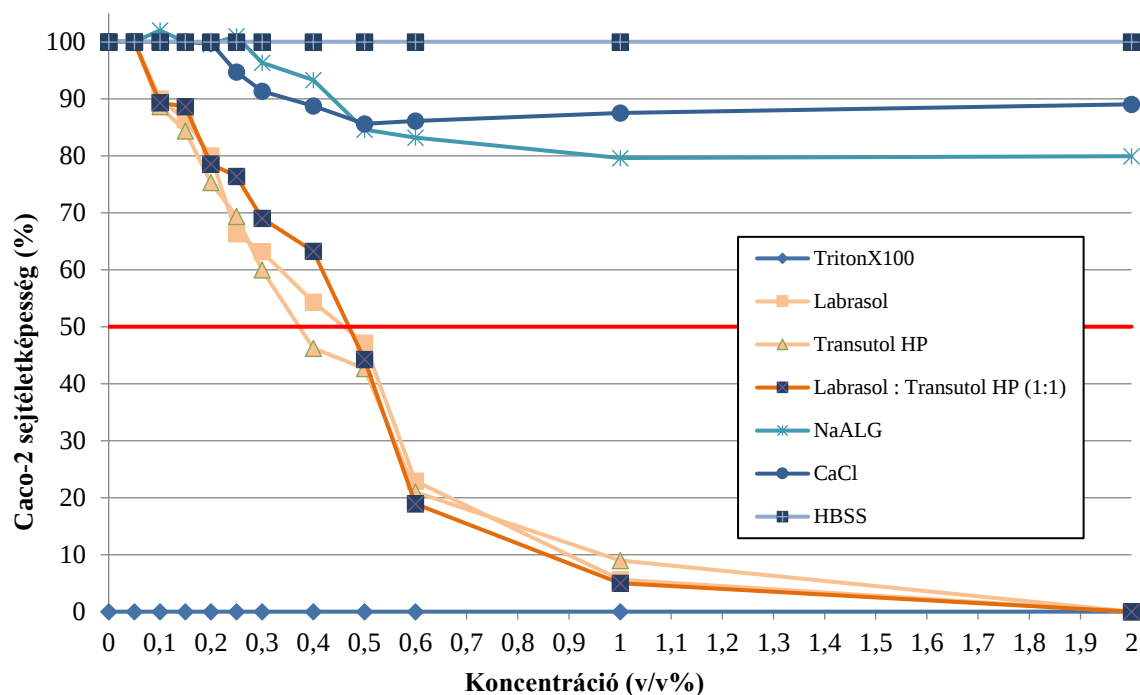
(b)

19. ábra. A nátrium-alginát gyöngyökbe zárt melanin koncentrálnó hormon (MCH) enzimatisz stabilitása: (a) SGF közegben; (b) SIF közegben. Kontrollként mindkét vizsgálat során szabad (nem formulázott) MCH-t alkalmaztunk.

4.2.8. MTT sejtéletképességi vizsgálat

A sejtéletképességi vizsgálat eredményei alapján a felhasznált alap- és segédanyagok az alkalmazott koncentrációban *in vitro* biztonságosnak bizonyultak. Annak ellenére, hogy koncentrációfüggő toxicitás figyelhető meg, a gyöngyképző nátrium-alginát, valamint kalcium-klorid-dihidrát még magasabb koncentrációknál sem mutatott releváns toxicitást. Mivel a 20. ábrán jól látható, hogy a felületaktív segédanyagok jelentősebb toxicitást mutattak nagyobb koncentrációknál, meghatároztuk azok IC_{50} értékeit, mely Labrasol esetében 0,41 v/v%, Transcutol HP esetében 0,37 v/v%, Labrasol:Transcutol HP 1:1 arányú keveréke esetében pedig 0,35 v/v%. A vizsgálat eredményei alapján a 0,01 v/v% penetrációfokozó segédanyagot tartalmazó gyógyszerhordozó rendszerek sem károsították a Caco-2 monolayer sejtréteget.

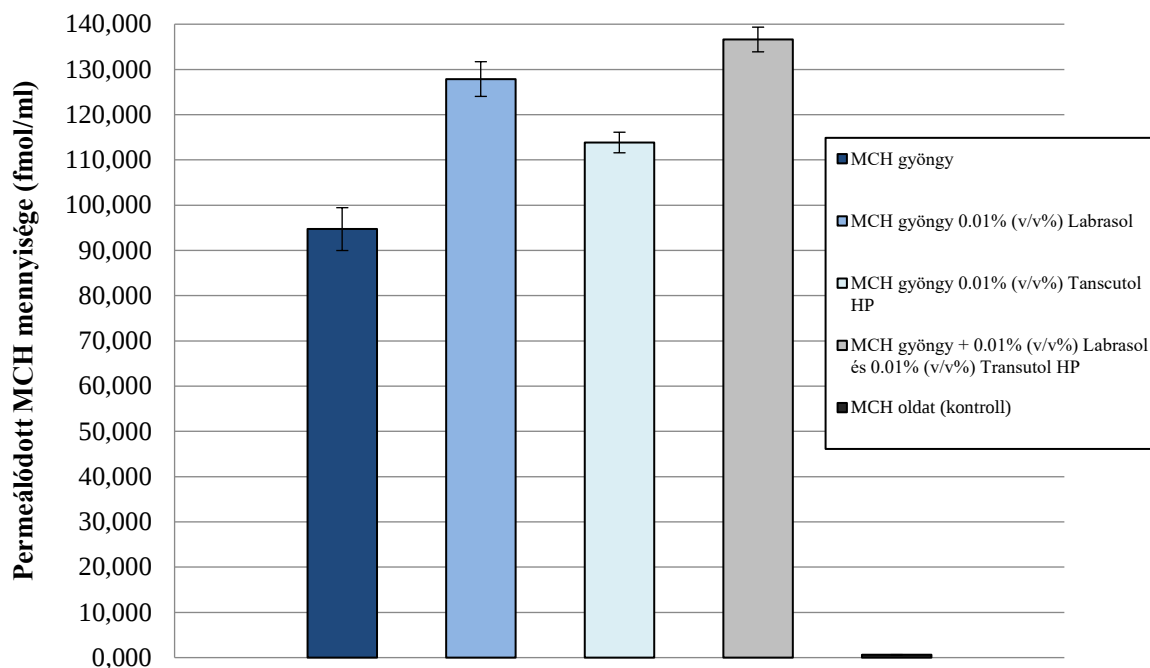




20. ábra. A formulálás során alkalmazott segédanyagok és gyöngyképző komponensek in vitro sejttéletképességi vizsgálatának mérési eredményei. A gyöngyképző nátrium-alginát és kalcium-klorid-dehidrát sem mutatott jelentős toxicitást in vitro, míg a penetrációfokozó segédanyagok (Labrasol, Transcutol HP) nagyobb koncentrációban toxikusnak tűntek. Pozitív kontrollként Triton-X-et használtuk, negatív kontrollként pedig foszfát-pufferoldattal (PBS) kezelt csoportot alkalmaztunk.

4.2.9. Transzport vizsgálat

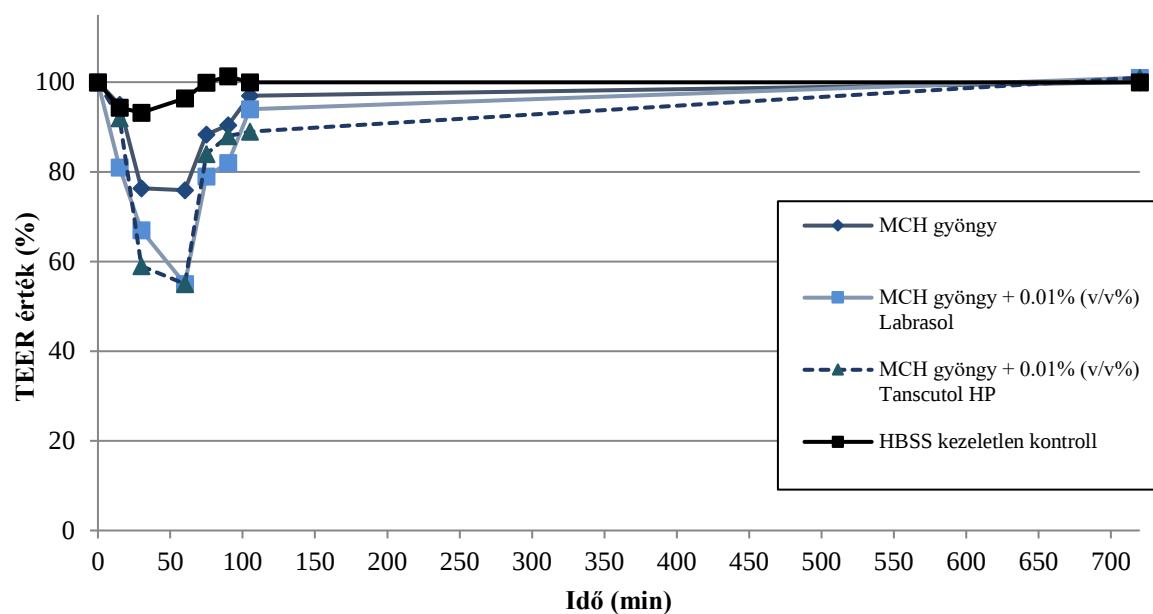
A permeabilitás vizsgálat megkezdése előtt az inzerteket benőtt Caco-2 monolayer a kísérlet megkezdéséhez megfelelően magas ($600 \Omega \times \text{cm}^2$) TEER értéket mutatott, ami a sejtek közti szoros kapcsolódásra utalt. A membránon átjutó peptid mennyiségét a 21. ábra mutatja be. Az eredmények alapján az alginát gyöngyökbe zárt MCH permeabilitása szignifikánsan magasabb volt, mint az anyagot oldott formában tartalmazó minta esetében. A formulációk közül megnövekedett peptid permeabilitást tapasztaltunk penetrációfokozó segédanyagok jelenlétében, ami a sejtek közötti paracelluláris útvonalak megnyílására utalhat.



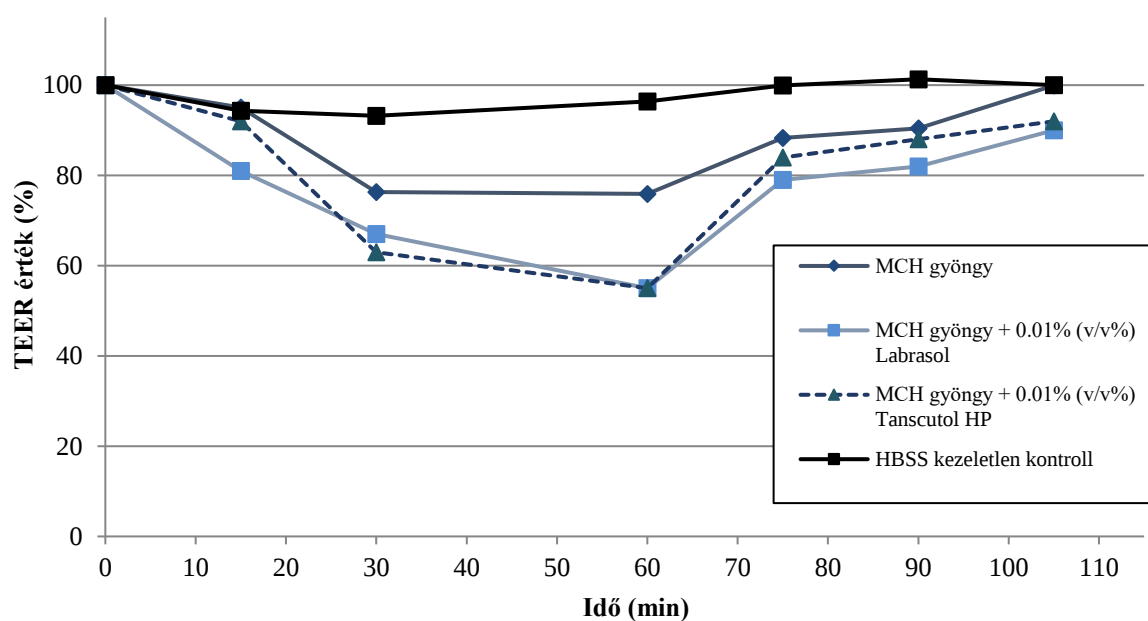
21. ábra. Az MCH Caco-2 epitelsejtrétegen keresztül történő transzportjának eredménye. Penetrációfokozó segédanyagok jelenlétében a peptid permeabilitásának növekedése figyelhető meg.

4.2.10. Transzepiteliális elektromos ellenállás mérések

Transzport vizsgálat közben az inzerteken lévő Caco-2 sejtréteg membránintegritását a TEER értékek folyamatos mérésével vizsgáltam. A kísérlet közben azt tapasztaltam, hogy 30 perc inkubációt követően a minták szignifikánsan csökkentették a sejtek transzepiteliális elektromos ellenállását, majd a 60 perces vizsgálat elteltével a TEER értékek újra elkezdtek emelkedni, amint a sejtekre friss DMEM médium került. A kísérlet végén a transzepiteliális elektromos ellenállás értékei az alapvonal 90%-a felé emelkedtek. Az eredményeket a 22. ábra foglalja össze.



(a)



(b)

22. ábra. Caco-2 bélhámsejtek transzepiteliális elektromos ellenállása: (a) a kísérlet egészére vonatkozóan; (b) az első 100 percre összpontosítva.

5. Megbeszélés

5.1. *Plantago lanceolata* kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai

A fitofarmakonok külsőleges gyógyszeres terápiában betöltött szerepe folyamatosan növekszik a bennük található hasznos kémiai anyagoknak köszönhetően [106,107]. Annak ellenére azonban, hogy a gyógynövények hatása bizonyítottan előnyös, a vegyületek hatékonyságának növelése különböző gyógyszer technológiai formulációs módszerekkel elengedhetetlen [108]. A bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel során ugyanis két fő kihívással kell szembenéznünk. Tekintettel arra, hogy a helyi gyógyszeres terápiával szembeni beteg compliance alacsony, a hatóanyag szolubilizációja, valamint a szarurétegen keresztül történő megfelelő penetrációja mellett kiemelten fontos a kezeléssel szemben tanúsított beteg adherencia is. A fitofarmakonok hatását penetrációfokozó segédanyagokat tartalmazó innovatív gyógyszerformák segítségével növelhetjük a leghatékonyabban [109]. Kísérletsorozatunk első részében célunk egy olyan biztonságos külsőleges gyógyszerforma kialakítása volt, melyből a választott növényi kivonat, a *Plantago lanceolata* bőrön keresztül történő felszívódása fokozott. A folyadékkristályos rendszerek helyi terápiában elért hatékonyságát már korábban leírták [110]. Szerkezetük és kémiai tulajdonságaik hasonlóak a sejtmembránéhoz, melynek köszönhetően lehetővé teszik a gyógyszerek behatolását a szarurétegbe, megkönnyítve ezzel a perkután penetrációt [111,112]. Az utóbbi években jelentős figyelmet kaptak mint potenciális hatóanyagleadó rendszerek, mivel képesek olyan mátrixot kialakítani, amely tartós hatóanyagleadást biztosít, és amely képes megvédeni a hatóanyagot mind a fizikai, mind a kémiai lebomlás ellen [113,114]. Anizotróp jellegükből adódóan részben folyadékokra, részben pedig kristályokra jellemző tulajdonságokat mutatnak [73]. Mindezekon felül a folyadékkristályok képzéséhez olyan felületaktív anyagok szükségesek, amelyek penetrációfokozó hatásukat a vegyületek szolubilizációjával biztosítják [115]. Ezen tulajdonságaik miatt az LC rendszerek nemcsak gyógyszer technológiai szempontból, hanem a biohasznosulás és egész terápiás értéküket számítva is előnyösek. A formuláció során a Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1)/Gelucire 44/14 tenzideket, valamint vizet számunkra megfelelő arányban tartalmazó összetételeket strukturált pszeudoterner fázisdiagram segítségével határoztuk meg, továbbá meghatároztuk a felszabadult hatóanyag mennyiségét is. Az előállított LC rendszerek biokompatibilitását különböző *in vitro* sejtkultúrák vizsgálatokkal elemeztük. Ezekhez a kísérletekhez humán keratinocita HaCaT sejtvonalon kívül TNF-alfa és IL-1 indukált humán PSmHaCaT sejteket

használtunk. A sejtproliferáció impedencia mérésen alapuló meghatározása minden esetben a sejtdex egyértelmű növekedését mutatta. Ezenfelül, a proliferáció kinetikájában is különbséget tapasztaltunk: míg a natív HaCaT sejtek a konfluens sejtréteget 7 nap után érték el, az IL-1 és TNF-alfa stimulált keratinociták (PSmHaCaT) gyorsabb proliferáció következtében hamarabb elérték a platófázist. Mindezek mellett, a PSmHaCaT sejtek magasabb sejtdex értéket mutattak ebben a fázisban. Az elvégzett MTT tesztek megerősítették, hogy a formulált LC rendszerek, valamint azok összetevői sem befolyásolták jelentősen a sejtleletképeséget. A készítmények tehát biztonságosnak bizonyultak. A gyökfogó aktivitás vizsgálat kimutatta, hogy a formulációk jelentős mértékben gátolták a DPPH oxidációját. A tesztelt LC-PL rendszerek közül az I. és II. bizonyult a leghatékonyabbnak, míg a IV. összetétel mutatta a legkisebb aktivitást. A PL-LC készítmények antioxidáns hatását MDA lipidperoxidációs vizsgálattal is ellenőriztük. A vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy a kontroll csoportokhoz képest az összes formuláció képes volt csökkenteni a malondialdehid (MDA) szintet, továbbá azt láttuk, hogy az I. összetétel esetében ez a csökkenés szignifikáns. Eredményeink tehát alátámasztják a penetrációfokozó segédanyagok szerepét az antioxidáns hatás elérésében. Ezt a megfigyelést igazolták az UV-C besugárzás eredményei, mely szerint a sugárzás destruktívan hatott az egyes sejtvonalakra. Hat perc UV-C expozíciót követően ugyanis jelentős sejtleletképeség csökkenést tapasztaltunk. A sugárzást követően végzett MTT teszt alapján jelentős PSmHaCaT sejtproliferációt láttunk. Két nap elteltével a besugárzott PSmHaCaT sejtek életképesége meghaladta a kezeltlen sejtekét. A formulációkkal történő kezelés részben egyértelműen blokkolta az UV-C sugarak káros hatását. Mindezek mellett, a *Plantago lanceolata* kivonat antioxidáns hatása, valamint a Labrasol/Lauroglycol 90 penetrációfokozó hatása is érvényesült, mivel az I. és III. összetételekből, melyek arányaiban többet tartalmaztak a tenzidpárból, nagyobb mennyiségű hatóanyag jutott a sejtekbe. Megfigyeléseink alapján ugyan a PL-LC kezelés nem tudta megvédeni a keratinocitákat, a PSmHaCaT sejtek UV-C sugárzás okozta hiperproliferációját képes volt csökkenteni. Kísérleti eredményeink rámutattak, hogy a felhasználni kívánt segédanyagok és felületaktív anyagok alapvető szerepet játszottak a hatékonyság javításában, ezért megfelelő kiválasztásuk egyaránt rendkívül fontos tényező. Megállapítottuk továbbá, hogy a megfogalmazott PL-LC kompozíciók előnyös lehetőséget biztosítottak a bőr UV-sugárzással szembeni védelmére.

5.2. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai

A biotechnológiai módszerek gyorsütemű fejlődése az elmúlt évtizedekben nagymértékben felgyorsította a terápiában alkalmazott peptid típusú vegyületek, illetve fehérjék nagy mennyiségben történő előállítását, lehetővé téve ezzel a gyógyászatban történő további felhasználásukat [116]. Ezek a készítmények azonban jelenleg szinte kizárólag injekció formájában érhetők el annak ellenére, hogy számos hátrányos tulajdonságuk lesz ezáltal, ezért a különböző alternatív beadási módok fontossága nem kérdéses [117]. Annak ellenére, hogy az injekció formájában beadott peptidek milliók életét mentették már meg, invazív jellegük miatt egy hosszútávú terápiában jelentősen csökkent beteg compliance figyelhető meg. Az említett problémára a peptid típusú gyógyszerjelöltek orális gyógyszerformában történő előállítása jelenthet megoldást, azonban az ilyen típusú hordozó rendszerek fejlesztése a mai napig folyamatos kihívást jelent a gyógyszer technológia számára [118]. A formuláció során ugyanis számos akadályt kell leküzdeni annak érdekében, hogy megfelelő orális biohasznosulást érjünk el. A gasztrointesztinális traktus proteolitikus enzimjei, valamint hatékony barrierjei jelentős mértékben korlátozhatják a peptidek és fehérjék felszívódását [119]. Az említett problémák kiküszöbölésére számos megközelítést említ az irodalom, mint például az enzimgátlás, kémiai módosítás, membrán permeabilitás növelése vagy új típusú hordozó rendszerek kialakítása. Az utóbbi években a peptidek bioadhezív polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerekbe történő kapszulázása ígéretes eredményeket mutatott [120]. Az említett szempontoknak megfelelően kísérletsorozatunk második felében nátrium-alginát alapú gyógyszerhordozó rendszereket formuláltunk, melyhez modell peptidként a melaninkoncentráló hormont (MCH) választottuk. A formulálni kívánt peptid tartalmú alginát gyöngyöket nyitott polimerizációval állítottuk elő a Büchi Encapsulator B-395 Pro készülék segítségével. A választott módszer nagy előnye korábbi fejlesztésekhez képest [83,89], hogy szobahőmérsékleten teszi lehetővé a formulálást, védve ezzel a hatóanyagot az esetleges denaturációtól. A gyöngyök duzzadási képességének mérése során azt az eredményt kaptuk, hogy az egyensúlyi vízfelvétel mértéke a gyöngyök szemcseméretétől függ. A későbbi alkalmazhatóság szempontjából eredményeink alapján a 200 μm -es fűvóka átmérőt találtuk optimálisnak a formuláláshoz. Az elvégzett SEM és DLS mérések [121] megerősítették, hogy a gyöngyök morfológiája az elvárásoknak megfelelő, továbbá a részecskeméret megközelíti a teoretikus 200 μm -t. A gyöngyökbe történő hatóanyag bezáródás meghatározása alapján az alkalmazott alginátgyöngy hordozók legalább 56 %-os bezáródási hatékonyságot mutattak az összes összetétel esetében, melyet a hozzáadott

penetrációfokozók nem befolyásoltak jelentősebben. Méréseink alátámasztották, hogy a formulált rendszerek stabil környezetet biztosítanak a peptid számára azáltal, hogy védelmet nyújtanak a gyomor-béltraktus emésztő enzimeivel szemben. A kioldódás vizsgálatok szerint a gyöngyökbe zárt MCH 68,30 %-a az első hatvan perc alatt felszabadult. Transzport vizsgálataink igazolták, hogy a kapszulázott MCH szintetikus membránon történő permeációja jelentősen nagyobb volt, mint a natív MCH oldaté. Ezenkívül a vizsgálat alátámasztotta azt is, hogy penetrációfokozó segédanyagok jelenlétében tovább nő a permeabilitás, ami a paracelluláris útvonalak megnyitására utaló jelenség [122]. Az eredmény háttérében álló membránkárosodás lehetőségének kizárása érdekében folyamatosan mértük a sejtek transzeptithelialis elektromos ellenállását. A mérések alapján azt tapasztaltuk, hogy a monolayer barrier tulajdonságai a kezeléseket követő 12 órán belül teljesen helyreálltak. Az alkalmazott három penetrációfokozó segédanyag közül tehát egyik sem vezetett a Caco-2 sejtek visszafordíthatatlan károsodásához. Mivel egy új gyógyszerforma tervezésekor kiemelt fontosságú a biztonságosság, a kiválasztott segédanyagok, valamint összetételek toxicitását szintén megvizsgáltuk különböző *in vitro* módszerekkel [123]. Eredményeink megerősítették, hogy a formuláláshoz alkalmazott segédanyagok, illetve az előállított készítmények biztonságosak *in vitro* körülmények között. Összefoglalva eredményeinket elmondható, hogy az alginát alapú gyöngyök, mint gyógyszerhordozó rendszerek potenciális védelmet nyújthatnak a peptidszármazékok gasztrointesztinális enzimikus bontásával szemben. A penetrációfokozók gondos és körültekintő kiválasztása a barrierfunkciók reverzibilis megváltoztatásával javíthatja a hatóanyag felszívódást. Formulációink kiváló gyógyszerészeti tulajdonságainak köszönhetően fontos eszközei lehetnek az új típusú peptid tartalmú gyógyszerhordozó rendszereknek javítva ezáltal a betegek adherenciáját. Eredményeink alapján sikerült bizonyítanunk, hogy az általunk előállított alginát gyöngyök képesek megvédeni a választott modell peptidet, a melanin koncentráló hormont a gyomor- és bélrendszerben történő enzimikus bomlással szemben. Mivel az alginát hordozók különböző amfifil felületaktív anyagokkal való kombinációját még nem vizsgálták korábban, eredményeink bizonyítják, hogy ezek a penetrációfokozók kulcsszerepet játszhatnak a biohasznosulás növelésében.

5.3. Penterációfokozó vegyületek jelentőségének összegzése a kísérleti eredmények alapján

A hatóanyagok helyspecifikus adagolása rendkívül fontos a terápia hatékonyságának növelése, valamint az esetleges mellékhatások csökkentése érdekében. A farmakonok célszervbe történő eljuttatása azonban nagy kihívást jelent a szervezetünket védő biológiai barriereknek köszönhetően. A biológiai gátak alapvető feladata, hogy megvédjék szervezetünket az idegen részecskéktől megteremtve ezzel a belső homeosztázist. Ugyanakkor ezek a mechanizmusok hasonlóképpen korlátozzák a terápiás szerek szervekhez, szövetekhez történő eljutását is, mely nagymértékben csökkenti a terápiás hatékonyságot. Munkánk során olyan gyógyszer technológiai segédanyagokat, illetve módszereket alkalmaztunk, melyek segítségével képesek vagyunk a fent említett akadályok leküzdésére. Kísérletsorozatunkban a két legelterjedtebb adminisztrációs területnek megfelelően topikális és orális gyógyszerformákat terveztünk. Modell hatóanyagként mindkét esetben rossz biohasznosulású anyagokat választottunk, amelyek felszívódását a megfelelő penetrációfokozó segédanyagok alkalmazásával kívántuk megkönnyíteni. A formuláció során alkalmazott tenzideket esetleges sejtkárosító hatásuk miatt több koncentrációban is vizsgáltuk MTT teszt segítségével, melyek közül egyik sem bizonyult *in vitro* citotoxikusnak. Sejtkultúras kísérleteink megerősítették, hogy a penetrációfokozó anyagokat is tartalmazó, azonos hatóanyagtartalmú formulációkból nagyobb mennyiség jutott a sejtekbe. Eredményeink tehát alátámasztották a penetrációfokozó segédanyagok szerepét a terápiás hatás elérésében. Ezen akadályok megkerülése mellett, ezek az újszerű formulációs megközelítések segíthetnek a terápiás szerek célzott helyekre történő eljuttatásában, hogy elkerüljék a terápiás szerek szisztémás expozícióját, és ezáltal csökkentsék a kapcsolódó mellékhatásokat.

6.1. Összefoglalás

Munkánk első felében lándzsás útifű tartalmú külsőleges felhasználású folyadékkristály rendszereket formuláltunk titrálós módszer segítségével. A membrán diffúziós vizsgálat eredményei alapján megállapítottuk, hogy a penetrációfokozó segédanyagok koncentrációfüggő módon növelik a növényi hatóanyag penetrációját. A DPPH, illetve MDA antioxidáns tesztek eredménye a penetrációfokozó segédanyagok antioxidáns hatás elérésében betöltött szerepét is megerősítette. A formulációk UV-C sugárzással szemben nyújtott védő hatásának vizsgálata igazolta, hogy a kezelések részben egyértelműen blokkolták az UV-C sugarak káros hatását. Annak ellenére, hogy a kezelés nem tudta teljes mértékben megvédeni a keratinocita sejteket, a TNF-alfa és IL-1 indukált sejtek UV-C sugárzás okozta hiperproliferációját jelentősen csökkentette. Kísérleti eredményeink alátámasztották, hogy a felhasználni kívánt felületaktív segédanyagok alapvető szerepet töltenek be a növényi hatóanyagok bőrön keresztül történő felszívódásában, ezért megfelelő kiválasztásuk rendkívül fontos tényező a hatékonyság növelése érdekében.

Kísérletsorozatunk második felében orális bevitelre szánt innovatív szilárd gyógyszerhordozó rendszereket terveztünk a peptid típusú hatóanyagok jobb orális biohasznosulásának növelése érdekében. A modell peptidként választott melanin koncentráló hormonból nyitott polimerizációval nátrium-alginát mikrogöngyöket képeztünk. A preformuláció során sikeresen kalibráltuk a formuláláshoz szükséges műszer részegységeit, illetve optimalizáltuk a gyártás paramétereit a reprodukálható göngy alak és méret érdekében. A göngyök fizikai tulajdonságainak vizsgálata igazolta, hogy azok az elvárásoknak megfelelő alakúak, illetve méretűek. A bezáródási hatékonyság mérésének eredményei alapján azt a következtetést állapítottuk meg, hogy az alkalmazott segédanyagok nincsenek hatással a bezáródott hatóanyag mennyiségére. A transzport vizsgálat eredményei alátámasztották, hogy a lipid típusú felületaktív segédanyagokat is tartalmazó összetételekből több hatóanyag képes áthatolni a szintetikus membránon keresztül a bazális folyadékba, jelenlétük tehát fokozza a bélrendszerben történő felszívódást. Az emésztési vizsgálat eredményei alapján a formulált gyógyszerhordozó rendszerek segítségével sikeresen megvédtük a választott modell peptidet a gasztrointesztinális traktus enzimikus körülményeivel szemben. Eredményeink bizonyítják, hogy a különböző amfifil felületaktív anyagok kulcsszerepet játszhatnak a peptidek orális biohasznosulásának növelésében.

6.2. Summary

In the first part of our work *Plantago lanceolata* loaded liquid crystal delivery systems were formulated for external use with the help of titration method. According to the results of *in vitro* permeation study, we found that the penetration enhancing excipients increase the penetration of the drug in a concentration-dependent manner. The results of DPPH and MDA antioxidant assays also confirmed the role of penetration enhancing excipients in antioxidant activity. Tests on the UV-C protection of the formulations demonstrated that the treatments clearly blocked some of the harmful effects of UV-C radiation. Although the treatments could not fully protect keratinocyte cells against radiation, our compositions significantly reduced the UV-C-induced hyperproliferation of TNF- α and IL-1 induced cells. Our experimental results have confirmed that surfactants play a crucial role in transdermal absorption of herbal active ingredients, therefore their proper selection is a major factor to increase efficacy.

In the second part of our experiments, we designed innovative solid drug delivery systems for oral administration to increase oral bioavailability of peptide-type drugs. Peptide-loaded calcium cross-linked alginate beads were formulated from melanin-concentrating hormone by controlled gelification method in order to protect our model peptide. During preformulation, we successfully calibrated the instrument components for the formulation and also optimized the critical parameters for reproducible bead shape and size. Examination of the physical properties of the beads confirmed that their shape and size are both appropriate. Based on the results of the encapsulation efficiency measurements, we concluded that the excipients have no effect on the amount of the entrapped drug. The results of permeability studies confirmed that from the formulations containing lipid-type surfactant excipients are able to penetrate more into the basal fluid across the synthetic membrane, so their presence enhances absorption in the intestinal tract. Based on the results of enzymatic stability evaluation, the formulated drug delivery systems successfully protected the model peptide against the harsh enzymatic conditions of the gastrointestinal tract. Our results confirm that using different amphiphilic surfactants can play a key role in enhancing oral bioavailability of peptide-type drugs.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Robertson, D. Drug Action: The Therapeutic Effect. *Nurse Prescr.* **2017**, *15*, 253–255, doi:10.12968/npre.2017.15.5.253.
2. Feucht, C.; Patel, D.R. Principles of Pharmacology. *Pediatr. Clin. North Am.* **2011**, *58*, 11–19, doi:10.1016/j.pcl.2010.10.005.
3. Charalabidis, A.; Sfouni, M.; Bergström, C.; Macheras, P. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond Guidelines. *Int. J. Pharm.* **2019**, *566*, 264–281, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.041.
4. Kalepu, S.; Nekkanti, V. Insoluble Drug Delivery Strategies: Review of Recent Advances and Business Prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 442–453, doi:10.1016/j.apsb.2015.07.003.
5. Benet, L.Z. The Role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in Drug Development. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 34–42, doi:10.1002/jps.23359.
6. Sareen, S.; Joseph, L.; Mathew, G. Improvement in Solubility of Poor Water-Soluble Drugs by Solid Dispersion. *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, *2*, 12, doi:10.4103/2230-973X.96921.
7. Poole, J.W. Chapter 3 Effects of Formulation and Dosage Form on Drug Bioavailability. In *Principles and Perspectives in Drug Bioavailability*; S. Karger AG, 2015; Vol. 89, pp. 59–89.
8. Ambrus, R.; Alshweiat, A.; Szabó-Révész, P.; Bartos, C.; Csóka, I. Smartcrystals for Efficient Dissolution of Poorly Water-Soluble Meloxicam. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 245, doi:10.3390/pharmaceutics14020245.
9. Ibrahim, Y.H.-E.Y.; Regdon, G.; Hamedelniei, E.I.; Sovány, T. Review of Recently Used Techniques and Materials to Improve the Efficiency of Orally Administered Proteins/Peptides. *DARU J. Pharm. Sci.* **2020**, *28*, 403–416, doi:10.1007/s40199-019-00316-w.

10. Han, Y.; Gao, Z.; Chen, L.; Kang, L.; Huang, W.; Jin, M.; Wang, Q.; Bae, Y.H. Multifunctional Oral Delivery Systems for Enhanced Bioavailability of Therapeutic Peptides/Proteins. *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, *9*, 902–922, doi:10.1016/j.apsb.2019.01.004.
11. Jarić, S.; Kostić, O.; Mataruga, Z.; Pavlović, D.; Pavlović, M.; Mitrović, M.; Pavlović, P. Traditional Wound-Healing Plants Used in the Balkan Region (Southeast Europe). *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *211*, 311–328, doi:10.1016/j.jep.2017.09.018.
12. Fons, F.; Gargadenne, A.; Gueiffier, A.; Roussel, J.L.; Andary, C. Effects of Cinnamic Acid on Polyphenol Production in *Plantago Lanceolata*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 697–702, doi:10.1016/S0031-9422(98)00210-6.
13. YANG, J.; YAN, Y.; LIU, H.; WANG, J.; HU, J. Protective Effects of Acteoside against X-Ray-Induced Damage in Human Skin Fibroblasts. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 2301–2306, doi:10.3892/mmr.2015.3630.
14. Chiou, W.F.; Lin, L.C.; Chen, C.F. Acteoside Protects Endothelial Cells against Free Radical-Induced Oxidative Stress. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *56*, 743–748, doi:10.1211/0022357023501.
15. Oloumi, M.M.; Vosough, D.; Derakhshanfar, A.; Nematollahi, M.H. The Healing Potential of *Plantago Lanceolata* Ointment on Collagenase-Induced Tendinitis in Burros (*Equus Asinus*). *J. Equine Vet. Sci.* **2011**, *31*, 470–474, doi:10.1016/j.jevs.2011.03.014.
16. Jarić, S.; Kostić, O.; Mataruga, Z.; Pavlović, D.; Pavlović, M.; Mitrović, M.; Pavlović, P. Traditional Wound-Healing Plants Used in the Balkan Region (Southeast Europe). *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *211*, 311–328, doi:10.1016/j.jep.2017.09.018.
17. Isacchi, B.; Bergonzi, M.; Iacopi, R.; Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Bilia, A. Liposomal Formulation to Increase Stability and Prolong Antineuropathic Activity of Verbascoside. *Planta Med.* **2016**, *83*, 412–419, doi:10.1055/s-0042-106650.
18. Vertuani, S.; Beghelli, E.; Scalambra, E.; Malisardi, G.; Copetti, S.; Toso, R.D.; Baldisserotto, A.; Manfredini, S. Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. *Molecules* **2011**, *16*, 7068–7080, doi:10.3390/molecules16087068.

19. Czajkowska-Kośnik, A.; Szekalska, M.; Winnicka, K. Nanostructured Lipid Carriers: A Potential Use for Skin Drug Delivery Systems. *Pharmacol. Reports* **2019**, *71*, 156–166, doi:10.1016/j.pharep.2018.10.008.
20. Mahato, R.I.; Narang, A.S.; Thoma, L.; Miller, D.D. Emerging Trends in Oral Delivery of Peptide and Protein Drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2003**, *20*, 153–214, doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v20.i23.30.
21. Aungst, B.J.; Saitoh, H.; Burcham, D.L.; Huang, S.-M.; Mousa, S.A.; Hussain, M.A. Enhancement of the Intestinal Absorption of Peptides and Nonpeptides. *J. Control. Release* **1996**, *41*, 19–31, doi:10.1016/0168-3659(96)01353-3.
22. Nielsen, D.S.; Shepherd, N.E.; Xu, W.; Lucke, A.J.; Stoermer, M.J.; Fairlie, D.P. Orally Absorbed Cyclic Peptides. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8094–8128, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00838.
23. M. Ways, T.; Lau, W.; Khutoryanskiy, V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 267, doi:10.3390/polym10030267.
24. Greimel, A.; Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A. Oral Peptide Delivery: In-Vitro Evaluation of Thiolated Alginate/Poly(Acrylic Acid) Microparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *59*, 1191–1198, doi:10.1211/jpp.59.9.0002.
25. Casatti, C.; Elias, C.; Sita, L.; Frigo, L.; Furlani, V.C.; Bauer, J.; Bittencourt, J.. Distribution of Melanin-Concentrating Hormone Neurons Projecting to the Medial Mammillary Nucleus. *Neuroscience* **2002**, *115*, 899–915, doi:10.1016/S0306-4522(02)00508-0.
26. Marsh, D.J.; Weingarth, D.T.; Novi, D.E.; Chen, H.Y.; Trumbauer, M.E.; Chen, A.S.; Guan, X.-M.; Jiang, M.M.; Feng, Y.; Camacho, R.E.; et al. Melanin-Concentrating Hormone 1 Receptor-Deficient Mice Are Lean, Hyperactive, and Hyperphagic and Have Altered Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 3240–3245, doi:10.1073/pnas.052706899.
27. Ludwig, D.S.; Tritos, N.A.; Mastaitis, J.W.; Kulkarni, R.; Kokkotou, E.; Elmquist, J.; Lowell, B.; Flier, J.S.; Maratos-Flier, E. Melanin-Concentrating Hormone Overexpression in Transgenic Mice Leads to Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 379–386, doi:10.1172/JCI10660.

28. Tritos, N.A.; Maratos-Flier, E. Two Important Systems in Energy Homeostasis: Melanocortins and Melanin-Concentrating Hormone. *Neuropeptides* **1999**, *33*, 339–349, doi:10.1054/npep.1999.0055.
29. Lelesz, B.; Szilvássy, Z.; Tóth, G.K.; Tóth, A.; Enyedi, A.; Felszeghy, E.; Varga, A.; Juhász, B.; Németh, J. Radioanalytical Methods for the Measurement of Melanin Concentrating Hormone (MCH) and Detection Its Receptor in Rat Tissues. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2016**, *310*, 1325–1333, doi:10.1007/s10967-016-4952-9.
30. Kozłowska, J.; Prus, W.; Stachowiak, N. Microparticles Based on Natural and Synthetic Polymers for Cosmetic Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 952–956, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.02.091.
31. Yu, L.; Sun, Q.; Hui, Y.; Seth, A.; Petrovsky, N.; Zhao, C.-X. Microfluidic Formation of Core-Shell Alginate Microparticles for Protein Encapsulation and Controlled Release. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *539*, 497–503, doi:10.1016/j.jcis.2018.12.075.
32. Gombotz, W. Protein Release from Alginate Matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *31*, 267–285, doi:10.1016/S0169-409X(97)00124-5.
33. McClements, D.J. Encapsulation, Protection, and Delivery of Bioactive Proteins and Peptides Using Nanoparticle and Microparticle Systems: A Review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2018**, *253*, 1–22, doi:10.1016/j.cis.2018.02.002.
34. Zihni, C.; Mills, C.; Matter, K.; Balda, M.S. Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 564–580, doi:10.1038/nrm.2016.80.
35. Matsuhisa, K.; Kondoh, M.; Takahashi, A.; Yagi, K. Tight Junction Modulator and Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 509–515, doi:10.1517/17425240902902315.
36. Choudhury, H.; Gorain, B.; Kesharwani, P. Physiology of the Biological Barriers. In *Theory and Applications of Nonparenteral Nanomedicines*; Elsevier, 2021; pp. 79–95 ISBN 9780128204665.
37. Yang, R.; Wei, T.; Goldberg, H.; Wang, W.; Cullion, K.; Kohane, D.S. Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1606596, doi:10.1002/adma.201606596.

38. Ali, A.; Tan, H.; Kaiko, G.E. Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–12, doi:10.3389/fimmu.2020.604054.
39. Slifer, Z.M.; Blikslager, A.T. The Integral Role of Tight Junction Proteins in the Repair of Injured Intestinal Epithelium. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 972, doi:10.3390/ijms21030972.
40. Koch, S.; Nusrat, A. Dynamic Regulation of Epithelial Cell Fate and Barrier Function by Intercellular Junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1165*, 220–227, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04025.x.
41. Groschwitz, K.R.; Hogan, S.P. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124*, 3–20, doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038.
42. Nekrasova, O.; Green, K.J. Desmosome Assembly and Dynamics. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 537–546, doi:10.1016/j.tcb.2013.06.004.
43. Gábor, M.; Lóránt, M.; Éva, R.; Andrea, S.; Egyetem, D.; Egészségtudományi, O.-; Bőrgyógyászati, C. A Bőr Barrier Felépítése , Különös Tekintettel a Keratinocytákra És a Sejtközi Kapcsolatokra – Az Atópiás Dermatitis Kialakulásában Játsszók Szerepük Structure of Skin Barrier , Especially the Keratinocytes and Intercellular Junctions , and Their Role. *BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI Szle.* **2012**, *88*, 72–76, doi:107188/bvsz.2012.88.3.1.
44. Norlén, L. Skin Barrier Structure and Function: The Single Gel Phase Model. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117*, 830–836, doi:10.1038/jid.2001.1.
45. Wertz, P.W. Lipids and Barrier Function of the Skin. *Acta Derm. Venereol.* **2000**, *80*, 7–11, doi:10.1080/000155500750042790.
46. Schneider, I. Paradigm Shift in the Understanding of the Function of the Epiderma and Barrier System. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szle.* **2016**, *92*, 104–110, doi:10.7188/bvsz.2016.92.3.1.
47. Kiselev, M.A. Conformation of Ceramide 6 Molecules and Chain-Flip Transitions in the Lipid Matrix of the Outermost Layer of Mammalian Skin, the Stratum Corneum. *Crystallogr. Reports* **2007**, *52*, 525–528, doi:10.1134/S1063774507030340.

48. Joshi, R. Learning from Eponyms: George F. Odland and Odland Bodies. *Indian Dermatol. Online J.* **2014**, 5, 334, doi:10.4103/2229-5178.137794.
49. Savjani, K.T.; Gajjar, A.K.; Savjani, J.K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 2012, 1–10, doi:10.5402/2012/195727.
50. P. Heinrich Stahl, C.G.W. *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*; 2011; ISBN 978-3-906-39051-2.
51. Rácz, I.; Selmeczi, B. *Gyógyszertechnológia*; 4.; Medicina, 2001; ISBN 963 242 545 6.
52. Loftsson, T. Drug Solubilization by Complexation. *Int. J. Pharm.* **2017**, 531, 276–280, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.087.
53. Higuchi, T.; Lach, J.L. Investigation of Some Complexes Formed in Solution by Caffeine*. *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* **1954**, 43, 349–354, doi:10.1002/jps.3030430609.
54. Soares, B.; Silvestre, A.J.D.; Rodrigues Pinto, P.C.; Freire, C.S.R.; Coutinho, J.A.P. Hydrotrophy and Cosolvency in Lignin Solubilization with Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, 7, acssuschemeng.9b02109, doi:10.1021/acssuschemeng.9b02109.
55. Roy, B.K.; Moulik, S.P. Functions of Hydrotropes (Sodium Salicylate, Proline, Pyrogallol, Resorcinol and Urea) in Solution with Special Reference to Amphiphile Behaviors. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, 203, 155–166, doi:10.1016/S0927-7757(01)01099-8.
56. Muhammad Suhail; Janakiraman, A.K.; Khan, A.; Naeem, A.; Syed Faisal Badshah Surfactants and Their Role in Pharmaceutical Product Development: An Overview. *J. Pharm. Pharm.* **2019**, 6, 72–82, doi:10.15436/2377-1313.19.2601.
57. Sekhon, B.S. Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects. *J. Pharm. Technol. Res. Manag.* **2013**, 1, 43–68, doi:10.15415/jptrm.2013.11004.
58. *Chemistry and Technology of Surfactants*; Richard J., F., Ed.; Blackwell Publishing Ltd, 2006; ISBN 978-14051-2696-0.
59. Schmitt, T.M. *Analysis of Surfactants*; CRC Press, 2001; ISBN 9781135570736.
60. Ward, R.N.; Davies, P.B.; Bain, C.D. Orientation of Surfactants Adsorbed on a

- Hydrophobic Surface. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 7141–7143, doi:10.1021/j100130a005.
61. Kazutami, S.; Robert Y., L.; Howard I., M.; Yuji, Y. *Cosmetic Science and Technology*; John Fedor, 2017; ISBN 978-0-12-802005-0.
 62. Narkar, Y.; Burnette, R.; Bleher, R.; Albrecht, R.; Kandela, A.; Robinson, J.R. Evaluation of Mucosal Damage and Recovery in the Gastrointestinal Tract of Rats by a Penetration Enhancer. *Pharm. Res.* **2008**, 25, 25–38, doi:10.1007/s11095-007-9509-8.
 63. le Maire, M.; Champeil, P.; Møller, J. V Interaction of Membrane Proteins and Lipids with Solubilizing Detergents. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2000**, 1508, 86–111, doi:10.1016/S0304-4157(00)00010-1.
 64. Parsi, K. Interaction of Detergent Sclerosants with Cell Membranes. *Phlebol. J. Venous Dis.* **2015**, 30, 306–315, doi:10.1177/0268355514534648.
 65. Brunaugh, A.D.; Smyth, H.D.C.; Williams III, R.O. Disperse Systems: Suspensions. In; Springer, Cham, 2019; pp. 91–110 ISBN 978-3-030-31744-7.
 66. Mobley, W.C. Dispersed Systems. In *Applied Physical Pharmacy, 2e*; Amiji, M.M., Cook, T.J., Mobley, W.C., Eds.; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2013.
 67. *Aerosol Science: Technology and Applications*; Colbeck, I., Lazaridis, M., Eds.; Wiley, 2014; ISBN 978-1-119-97792-6.
 68. Chang, Q. Emulsion, Foam, and Gel. *Colloid Interface Chem. Water Qual. Control* **2016**, 227–245, doi:10.1016/B978-0-12-809315-3.00011-6.
 69. Brady, J.E.; Senese, F. *Chemistry: Matter and Its Changes*; 4th ed.; Wiley, 2004; ISBN 0-471-21517-1.
 70. Kabalnov, A. Thermodynamic and Theoretical Aspects of Emulsions and Their Stability. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, 3, 270–275, doi:10.1016/S1359-0294(98)80071-X.
 71. Peter J., C.; Michael, H. *Introduction to Liquid Crystals Chemistry and Physics*; CRC Press, 1997; ISBN 9781315272801.
 72. Iwabata, K.; Sugai, U.; Seki, Y.; Furue, H.; Sakaguchi, K. Applications of Biomaterials to Liquid Crystals. *Molecules* **2013**, 18, 4703–4717, doi:10.3390/molecules18044703.
 73. Dierking, I. Chiral Liquid Crystals: Structures, Phases, Effects. *Symmetry (Basel)*.

- 2014**, 6, 444–472, doi:10.3390/sym6020444.
74. Friedel, G. Les États Mésomorphes de La Matière. *Ann. Phys. (Paris)*. **1922**, 9, 273–474, doi:10.1051/anphys/192209180273.
 75. Ukleja, P. Liquid Crystals (Physics). *Encycl. Phys. Sci. Technol.* **2003**, 717–739, doi:10.1016/B0-12-227410-5/00966-2.
 76. Fehér, A.; Csányi, E.; Csóka, I.; Kovács, A.; Erős, I. Thermoanalytical Investigation of Lyotropic Liquid Crystals and Microemulsions for Pharmaceutical Use. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2005**, 82, 507–512, doi:10.1007/s10973-005-0924-y.
 77. Fehér, A.; Erős, E.C. In Situ Forming Lyotropic Liquid Crystalline Systems Containing Metronidazole-Benzozate. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2005**, 15, 343–346, doi:10.1016/S1773-2247(05)50063-7.
 78. Berkland, C.; Kipper, M.J.; Narasimhan, B.; Kim, K. (Kevin); Pack, D.W. Microsphere Size, Precipitation Kinetics and Drug Distribution Control Drug Release from Biodegradable Polyanhydride Microspheres. *J. Control. Release* **2004**, 94, 129–141, doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.011.
 79. Frakolaki, G.; Giannou, V.; Kekos, D.; Tzia, C. A Review of the Microencapsulation Techniques for the Incorporation of Probiotic Bacteria in Functional Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, 61, 1515–1536, doi:10.1080/10408398.2020.1761773.
 80. Singh, M.N.; Hemant, K.S.Y.; Ram, M.; Shivakumar, H.G. Microencapsulation: A Promising Technique for Controlled Drug Delivery. *Res. Pharm. Sci.* **2010**, 5, 65–77.
 81. Wang, J.; Chua, K.M.; Wang, C.-H. Stabilization and Encapsulation of Human Immunoglobulin G into Biodegradable Microspheres. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 271, 92–101, doi:10.1016/j.jcis.2003.08.072.
 82. Kiyoyama, S.; Shiomori, K.; Kawano, Y.; Hatate, Y. Preparation of Microcapsules and Control of Their Morphology. *J. Microencapsul.* **2003**, 20, 497–508, doi:10.1080/0265204031000093096.
 83. Coppi, G.; Iannuccelli, V.; Leo, E.; Bernabei, M.T.; Camerini, R. Chitosan-Alginate Microparticles as a Protein Carrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2001**, 27, 393–400, doi:10.1081/DDC-100104314.

84. Banerjee, A.; Lee, J.; Mitragotri, S. Intestinal Mucoadhesive Devices for Oral Delivery of Insulin. *Bioeng. Transl. Med.* **2016**, *1*, 338–346, doi:10.1002/btm2.10015.
85. Park, C.G.; Huh, B.K.; Kim, S.-N.; Lee, S.H.; Hong, H.R.; Choy, Y. Bin Nanostructured Mucoadhesive Microparticles to Enhance Oral Drug Bioavailability. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *54*, 262–269, doi:10.1016/j.jiec.2017.06.001.
86. Arnaldi, P.; Pastorino, L.; Monticelli, O. On an Effective Approach to Improve the Properties and the Drug Release of Chitosan-Based Microparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *163*, 393–401, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.016.
87. Gupta, V.; Hwang, B.-H.; Doshi, N.; Banerjee, A.; Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Delivery of Exenatide and Insulin Using Mucoadhesive Intestinal Devices. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44*, 1993–2007, doi:10.1007/s10439-016-1558-x.
88. Zhang, Y.; Wei, W.; Lv, P.; Wang, L.; Ma, G. Preparation and Evaluation of Alginate–Chitosan Microspheres for Oral Delivery of Insulin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *77*, 11–19, doi:10.1016/j.ejpb.2010.09.016.
89. Fenyvesi, Z.; Auner, A.; Schmalz, D.; Pásztor, E.; Csóka, G.; Gyires, K.; Marton, S.; Klebovich, I.; Antal, I. Preparation of PH-Sensitive Beads for NSAID Using Three-Component Gel Systems. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 4285–4295, doi:10.1002/jps.21713.
90. Agarwal, V.; Khan, M.A. *Current Status of the Oral Delivery of Insulin*; 2001; Vol. 25, pp. 76–90;.
91. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
92. Rahmani, V.; Sheardown, H. Protein-Alginate Complexes as PH-/Ion-Sensitive Carriers of Proteins. *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 452–461, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.039.
93. Somo, S.I.; Langert, K.; Yang, C.-Y.; Vaicik, M.K.; Ibarra, V.; Appel, A.A.; Akar, B.; Cheng, M.-H.; Brey, E.M. Synthesis and Evaluation of Dual Crosslinked Alginate Microbeads. *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 53–65, doi:10.1016/j.actbio.2017.10.046.
94. Moya, M.L.; Morley, M.; Khanna, O.; Opara, E.C.; Brey, E.M. Stability of Alginate Microbead Properties in Vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 903–912, doi:10.1007/s10856-012-4575-9.

95. Suarato, G.; Spanò, R.; Bertorelli, R.; Diaspro, A.; Athanassiou, A.; Surdo, S. 3D-Printed, Pocket-Size Diffusion Cells for Skin Permeation Investigation. In Proceedings of the EUROSENSORS 2018; MDPI: Basel Switzerland, December 10 2018; p. 945.
96. Karadzovska, D.; Riviere, J.E. Assessing Vehicle Effects on Skin Absorption Using Artificial Membrane Assays. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 569–576, doi:10.1016/j.ejps.2013.02.020.
97. Sha, X.; Yan, G.; Wu, Y.; Li, J.; Fang, X. Effect of Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems Containing Labrasol on Tight Junctions in Caco-2 Cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24*, 477–486, doi:10.1016/j.ejps.2005.01.001.
98. Adom, M.B.; Taher, M.; Mutalabisin, M.F.; Amri, M.S.; Abdul Kudos, M.B.; Wan Sulaiman, M.W.A.; Sengupta, P.; Susanti, D. Chemical Constituents and Medical Benefits of Plantago Major. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 348–360, doi:10.1016/j.biopha.2017.09.152.
99. Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Leitaño, G.G.; Reis, A.S.; Dos, T.C.S. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method . Phytother Res Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free. *Phyther. Res.* **2001**, *130*, 127–130.
100. Taqieddin, E.; Amiji, M. Enzyme Immobilization in Novel Alginate–Chitosan Core-Shell Microcapsules. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1937–1945, doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.034.
101. Ismail, R.; Bocsik, A.; Katona, G.; Gróf, I.; Deli, M.A.; Csóka, I. Encapsulation in Polymeric Nanoparticles Enhances the Enzymatic Stability and the Permeability of the GLP-1 Analog, Liraglutide, Across a Culture Model of Intestinal Permeability. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 599, doi:10.3390/pharmaceutics11110599.
102. Wilson, V.G. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. In; 2013; pp. 33–41.
103. Choi, D.H.; Hwang, H.S. Anti-Inflammation Activity of Brazilin in TNF- α Induced Human Psoriasis Dermatitis Skin Model. *Appl. Biol. Chem.* **2019**, *62*, 46, doi:10.1186/s13765-019-0455-z.
104. Kalantari, A.; Kósa, D.; Nemes, D.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Vecsernyés, M.; Váradi, J.;

- Fenyvesi, F.; Kuki, Á.; Gonda, S.; et al. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems Containing *Plantago Lanceolata*—An Assessment of Their Antioxidant and Antiinflammatory Effects. *Molecules* **2017**, *22*, 1773, doi:10.3390/molecules22101773.
105. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
 106. Zhang, Y.-J.; Gan, R.-Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Li, A.-N.; Xu, D.-P.; Li, H.-B. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules* **2015**, *20*, 21138–21156, doi:10.3390/molecules201219753.
 107. Farnsworth, N.; Akerele, O.; Bingel, A. Medicinal Plants in Therapy. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 336, doi:10.1016/0378-8741(87)90016-X.
 108. Gunasekaran, T.; Haile, T.; Nigusse, T.; Dhanaraju, M.D. Nanotechnology: An Effective Tool for Enhancing Bioavailability and Bioactivity of Phytomedicine. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, S1–S7, doi:10.12980/APJTB.4.2014C980.
 109. Purdon, C.H.; Azzi, C.G.; Zhang, J.; Smith, E.W.; Maibach, H.I. Penetration Enhancement of Transdermal Delivery-Current Permutations and Limitations. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2004**, *21*, 36, doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i2.20.
 110. Yamada, K.; Yamashita, J.; Todo, H.; Miyamoto, K.; Hashimoto, S.; Tokudome, Y.; Hashimoto, F.; Sugibayashi, K. Preparation and Evaluation of Liquid-Crystal Formulations with Skin-Permeation-Enhancing Abilities for Entrapped Drugs. *J. Oleo Sci.* **2011**, *60*, 31–40, doi:10.5650/jos.60.31.
 111. Lopes, L.B.; Speretta, F.F.F.; Bentley, M.V.L.B. Enhancement of Skin Penetration of Vitamin K Using Monoolein-Based Liquid Crystalline Systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *32*, 209–215, doi:10.1016/j.ejps.2007.07.006.
 112. Yu, X.; Du, L.; Zhu, L.; Liu, X.; Zhang, B.; Fu, G.; Jin, Y. Melanoma Therapy with Transdermal Mitoxantrone Cubic Phases. *Drug Deliv.* **2015**, *23*, 1–6, doi:10.3109/10717544.2015.1024898.
 113. Rajabalaya, R.; Musa, M.N.; Kifli, N.; David, S.R. Oral and Transdermal Drug Delivery Systems: Role of Lipid-Based Lyotropic Liquid Crystals. *Drug Des. Devel.*

- Ther.* **2017**, Volume11, 393–406, doi:10.2147/DDDT.S103505.
114. El Maghraby, G.M. Self-Microemulsifying and Microemulsion Systems for Transdermal Delivery of Indomethacin: Effect of Phase Transition. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, 75, 595–600, doi:10.1016/j.colsurfb.2009.10.003.
 115. Kim, B.; Cho, H.-E.; Moon, S.H.; Ahn, H.-J.; Bae, S.; Cho, H.-D.; An, S. Transdermal Delivery Systems in Cosmetics. *Biomed. Dermatology* **2020**, 4, 10, doi:10.1186/s41702-020-0058-7.
 116. Brayden, D.J.; Mersny, R.J. Oral Peptide Delivery: Prioritizing the Leading Technologies. *Ther. Deliv.* **2011**, 2, 1567–1573, doi:10.4155/tde.11.114.
 117. Shaji, J.; Patole, V. Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches. *Indian J. Pharm. Sci.* **2008**, 70, 269, doi:10.4103/0250-474X.42967.
 118. Xin Hua Zhou Overcoming Enzymatic and Absorption Barriers to Non-Parenterally Administered Protein and Peptide Drugs. *J. Control. Release* **1994**, 29, 239–252, doi:10.1016/0168-3659(94)90071-X.
 119. Haddadzadegan, S.; Dorkoosh, F.; Bernkop-Schnürch, A. Oral Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins: Technology Landscape of Lipid-Based Nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, 182, 114097, doi:10.1016/j.addr.2021.114097.
 120. Reinholz, J.; Landfester, K.; Mailänder, V. The Challenges of Oral Drug Delivery via Nanocarriers. *Drug Deliv.* **2018**, 25, 1694–1705, doi:10.1080/10717544.2018.1501119.
 121. Mammadov, R.; Tekinay, A.B.; Dana, A.; Guler, M.O. Microscopic Characterization of Peptide Nanostructures. *Micron* **2012**, 43, 69–84, doi:10.1016/j.micron.2011.07.006.
 122. Alvi, M.M.; Chatterjee, P. A Prospective Analysis of Co-Processed Non-Ionic Surfactants in Enhancing Permeability of a Model Hydrophilic Drug. *AAPS PharmSciTech* **2014**, 15, 339–353, doi:10.1208/s12249-013-0065-8.
 123. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. *Cell Viability Assays*; 2004;



Nyilvántartási szám: DEENK/255/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kósa Dóra

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kósa, D.**, Pető, Á., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Budai, I., Németh, J., Fehér, P., Bácskay, I., Ujhelyi, Z.: Oral Bioavailability Enhancement of Melanin Concentrating Hormone, Development and In Vitro Pharmaceutical Assessment of Novel Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 14 (1), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14010009>
IF: 6.321 (2020)
2. **Kósa, D.**, Pető, Á., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Gonda, S., Vasas, G., Fehér, P., Bácskay, I., Ujhelyi, Z.: Formulation of Novel Liquid Crystal (LC) Formulations with Skin-Permeation-Enhancing Abilities of Plantago lanceolata (PL) Extract and Their Assessment on HaCaT Cells. *Molecules*. 26 (4), 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26041023>
IF: 4.411 (2020)

További közlemények

3. Sinka, D. Z., Doma, E., Szendi, N., Páll, J., **Kósa, D.**, Pető, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szűcs, Z., Gonda, S., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Bácskay, I.: Formulation, Characterization and Permeability Studies of Fenugreek (Trigonella foenum-graecum) Containing Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS). *Molecules*. 27 (9), 2846-, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092846>
IF: 4.411 (2020)





4. Pető, Á., **Kósa, D.**, Haimhoffer, Á., Nemes, D., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Frum, A., Gligor, F. G., Vicaș, L. G., Marian, E., Jurca, T., Pallag, A., Muresan, M., Tóth, Z., Bácskay, I.: Topical Dosage Formulation of Lyophilized *Philadelphus coronarius* L. Leaf and Flower: antimicrobial, Antioxidant and Anti-Inflammatory Assessment of the Plant. *Molecules*. 27 (9), 1-18, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092652>
IF: 4.411 (2020)
5. Ranjous, Y., **Kósa, D.**, Ujhelyi, Z., Regdon, G., Nagy, K. A., Szenti, I., Kónya, Z., Bácskay, I., Sovány, T.: Evaluation of the permeability and in vitro cytotoxicity of functionalized titanate nanotubes on Caco-2 cell line.
Acta Pharm Hung. 91 (1), 31-39, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.33892/aph.2021.91.31-39>
6. Pető, Á., **Kósa, D.**, Haimhoffer, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Sinka, D. Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Gyöngyösi, A., Lekli, I., Szentesi, P., Marton, A., Gombos, I., Dukic, B., Vígh, L., Bácskay, I.: Nicotinic Amidoxime Derivate BGP-15, Topical Dosage Formulation and Anti-Inflammatory Effect.
Pharmaceutics. 13 (12), 2037, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13122037>
IF: 6.321 (2020)
7. Pető, Á., **Kósa, D.**, Fehér, P., Ujhelyi, Z., Sinka, D. Z., Vecsernyés, M., Szilvássy, Z., Juhász, B., Csanádi, Z., Vígh, L., Bácskay, I.: Pharmacological Overview of the BGP-15 Chemical Agent as a New Drug Candidate for the Treatment of Symptoms of Metabolic Syndrome.
Molecules. 25 (2), 429-441, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25020429>
IF: 4.411
8. Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fehér, P., **Kósa, D.**, Arany, P., Nemes, D., Sinka, D. Z., Vasvári, G., Fenyvesi, F., Váradi, J., Bácskay, I.: Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems.
Drug Discovery Today: Technologies. 27, 81-86, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.005>





9. Kalantari, A., **Kósa, D.**, Nemes, D., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Vecsernyés, M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Kuki, Á., Gonda, S., Vasas, G., Gesztelyi, R., Salimi, A., Bácskay, I.: Self-nanoemulsifying drug delivery systems containing *Plantago lanceolata*: an assessment of their antioxidant and antiinflammatory effects.
Molecules. 22 (10), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101773>
IF: 3.098

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,384

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,732**

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, 2022.05.23.



8. Ábrajegyzék

1. ábra. Szmektikus folyadékkristály. (saját szerkesztés)
2. ábra. Nematikus folyadékkristály. (saját szerkesztés)
3. ábra. Koleszterikus folyadékkristály. (saját szerkesztés)
4. ábra. Schott titronic diszpenzer. (saját szerkesztés)
5. ábra. Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1) / Gelucire 44/14 / víz rendszer pszeudoterner fázisdiagramja. (saját szerkesztés)
6. ábra. A kompozíciók kioldódás profiljai. (saját szerkesztés)
7. ábra. HaCaT sejtprolifерáció impedancia alapú mérések eredménye. (saját szerkesztés)
8. ábra. Transepithelialis elektromos ellenállás (TEER) mérés eredményei. (saját szerkesztés)
9. ábra. A formulációk, illetve azok komponenseinek toxicitás vizsgálata HaCaT sejtvonalon MTT tesztel. (saját szerkesztés)
10. ábra. Az LC-PL összetételek által közömbösített reaktív oxigéngyökök százalékos aránya. (saját szerkesztés)
11. ábra. Az LC-PL rendszerek HaCaT (a) és PSmHaCaT (b) sejtek MDA szintjére gyakorolt hatása 6 perc UV expozíciót követően. (saját szerkesztés)
12. ábra. MTT sejtéletképességi vizsgálat eredményei HaCaT, illetve PSmHaCaT sejteken UV expozíciót követő 12., 24., 48. órában. (saját szerkesztés)
13. ábra. MTT sejtéletképességi vizsgálat eredményei HaCaT (a), illetve PSmHaCaT (b) sejteken 6 perccel az UV expozíciót követően. (saját szerkesztés)
14. ábra. Bezáródási hatékonyság a különböző MCH tartalmú gyöngyökre vonatkozóan. (saját szerkesztés)
15. ábra. A gyöngyök duzzadási viselkedése a formuláláshoz alkalmazott fűvóka méretének függvényében. (saját szerkesztés)
16. ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek az MCH tartalmú alginát gyöngyökről. (saját szerkesztés)

17. ábra. A lézerdiffrakciós részecskeméret-eloszlás meghatározás eredményei a térfogattal súlyozott szemcseméret-eloszlás átlaga értékek szerint. (saját szerkesztés)

18. ábra. A nátrium-alginát gyöngyökből felszabadult MCH in vitro kioldódási profilja foszfát puffer oldatban (pH = 6,80). (saját szerkesztés)

19. ábra. A nátrium-alginát gyöngyökbe zárt melanin koncentráló hormon (MCH) enzimátikus stabilitása: (a) SGF közegben; (b) SIF közegben. (saját szerkesztés)

20. ábra. A formulálás során alkalmazott segédanyagok és gyöngyképző komponensek in vitro sejtéletképeségi vizsgálatának mérési eredményei. (saját szerkesztés)

21. ábra. Az MCH Caco-2 epitelsejtrétegen keresztül történő transzportjának eredménye. (saját szerkesztés)

22. ábra. Caco-2 bélhámsejtek transzepiteliális elektromos ellenállása: (a) a kísérlet egészére vonatkozóan; (b) az első 100 percre összpontosítva. (saját szerkesztés)

9. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. Formulált LC rendszerek összetétele. (saját szerkesztés)
2. táblázat. MTT teszthez módosított LC rendszerek összetétele. (saját szerkesztés)
3. táblázat. MCH tartalmú nátrium-alginát mikrogöngyök formulálásához választott összetételek. (saját szerkesztés)
4. táblázat. Lézerdiffrakciós mérésekkel végzett részecskeméret meghatározás eredményei. (saját szerkesztés)

10.1. Tárgyszavak

Plantago lanceolata, folyadékkristály, HaCaT sejtvonal, antioxidáns teszt, melanin koncentrálnó hormon, nátrium-alginát gyöngy, Caco-2 sejtvonal, transzport vizsgálat, felületaktív segédanyag

10.2. Keywords

Plantago lanceolata, liquid crystal, HaCaT cell culture, antioxidant assay, melanin concentrating hormone, sodium-alginate bead, Caco-2 cell culture, permeability test, surfactant

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, hogy munkám során számos szakmai tanácsával segített, a vizsgálatok elvégzésére felkészített.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vecsernyés Miklós Dékán Úrnak és Prof. Dr. Bácskay Ildikó Tanszékvezető asszonynak, hogy lehetőséget biztosítottak a Gyógyszertechnológiai Tanszéken a kísérleti tudományos munkám elvégzésére. Köszönöm továbbá, hogy az elmúlt években mindig segítőkész támogatást nyújtottak, munkámat pedig mindenben maximálisan támogatták.

Hálás vagyok Dr. Pető Ágotának a több mint 12 éve tartó hű barátságáért, rendíthetetlen támogatásáért és megszámálhatatlan tanácsáért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Haimhoffer Ádámnak a rengeteg szakmai és baráti támogatásért egyaránt.

Köszönetet mondok közvetlen munkatársaimnak, akik a kísérleti munka során felvetődött gyakorlati problémák megoldásában segítségemre voltak.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Vasas Gábornak és Dr. Gonda Sándornak a növényi kivonat elkészítéséért. Köszönöm Dr. Budai Istvánnak az elektronmikroszkópos felvételeket. Köszönettel tartozom Dr. Németh Józsefnek a radioimmunoassay vizsgálatokért. Köszönetet mondok Dr. Móczó Jánosnak a lézerdiffrakciós mérésért.

Hálával tartozom szerető családomnak és vőlegényemnek a rengeteg szeretetért és kitartó támogatásért, akiknek köszönhetően soha semmiben nem szenvedtem hiányt.

12. Függelék

12.1. Támogatás

A kísérletes munkát a Richter Gedeon Talentum Alapítvány, továbbá az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 „Debrecen Venture Catapult Program támogatta, illetve a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatás, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.