

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Növényi hatóanyagokat tartalmazó belsőleges  
gyógyszerhordozó rendszerek formulálása és  
vizsgálata**

Dr. Sinka Dávid Zsolt

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó



DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

# **Növényi hatóanyagokat tartalmazó belsőleges gyógyszerhordozó rendszerek formulálása és vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszer technológia tudományágban

Írta: Dr. Sinka Dávid Zsolt okleveles gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó

Az értekezés bírálói:

Dr. Kállai-Szabó Nikolett, PhD  
Dr. Herczeg Mihály, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora  
tagok: Dr. Kállai-Szabó Nikolett, PhD  
Dr. Herczeg Mihály, PhD  
Dr. Katona Gábor, PhD  
Dr. Budai-Szűcs Mária, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK, Egyetemi Gyógyszertár tanterme  
2022.12.07. 11:00

## **Tartalom**

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései ..... | 4  |
| 2. Anyagok és módszerek.....                            | 6  |
| 3. Az értekezés új tudományos eredményei .....          | 14 |
| 4. Diskusszió.....                                      | 21 |
| 5. Összefoglalás.....                                   | 25 |
| 6. A jelölt értekezés témájában közölt publikációi..... | 26 |
| 7. Köszönetnyilvánítás .....                            | 29 |

## 1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A növényi hatóanyagok terápiás felhasználása egyidős az orvoslással, és a modern medicina minden korszakában jelen van. Napjainkban a szintetikus és biológiai úton előállított farmakonok széles választéka mellett is mutatkozik igény a fitofarmakonokra, részben a természetes gyógymódok pozitív megítélése miatt a betegek részéről, részben használatuk számtalan előnye okán.

A növényi hatóanyagok olcsóak és könnyen hozzáférhetők, megelőzésre és terápiára egyaránt alkalmazhatók, a komplex hatóanyagokat tartalmazó gyógynövények esetén szinergista hatással számolhatunk, gyakran kedvező mellékhatás-profil mellett.

A modern, tudományos bizonyítékokon alapuló terápiás gyakorlat azonban számos elvárást támaszt a gyógynövényekkel szemben. Az egységes, jól definiált hatóanyagtartalom és minőségbiztosítás a tradicionálisan használt szárított növényi részek esetében nem mindig biztosítható, a fitofarmakonok fizikai-kémiai tulajdonságai, a vízzoldhatóság, permeabilitás és a stabilitás gyakran rossz, ami elégtelen biohasznosuláshoz vezet.

Az utóbbi évtizedek gyógyszertechnológiai kutatásai között jelentős számban találunk olyanokat, amelyek ezen elvárásoknak megfelelően növényi hatóanyagok biohasznosulásának növelését tűzték ki célul, vagy fizikai-kémiai paramétereik befolyásolásával, vagy modern gyógyszerleadó rendszerekbe történő inkorporálásuk útján.

Doktori értekezésem témájául két gyógynövény biohasznosulásának növelését választottam különböző gyógyszertechnológiai formulációk segítségével. Az első esetben a görögszénát (*Trigonella foenum-graecum*) használtam, mely leginkább antidiabetikus hatása miatt érdemel figyelmet. A szénhidrátbontó enzimek gátlásán keresztül hipoglikémiás hatást vált ki, diabétesz és inzulinrezisztencia terápiájában és prevenciójában egyaránt felhasználható. Emellett antioxidáns, a gasztrointesztinális rendszert érintő, hepatoprotektív és immunmodulátor hatásai is vannak. A görögszéna hatóanyagainak oldhatósága, permeabilitása és stabilitása változó. A modern gyógyszerleadó rendszerek tekintetében több kutatás is foglalkozik görögszénával, illetve komponenseivel, a legtöbb esetben azonban ezek segédanyagként kerülnek a modern gyógyszerleadó rendszerekbe. Kutatómunkám során standardizált görögszénamag kivonatát tartalmazó önmulgeáló rendszereket formuláltam, melyek fizikai paramétereit, illetve antioxidáns hatását vizsgáltam. Transzport kísérleteket végeztem, melyek metabolomikai elemzésével összehasonlíthatóvá vált a növény főbb komponenseinek permeabilitása a natúr kivonat és az önmulgeáló rendszerek esetében. A

SEDDS rendszerek sejtéletképessegre gyakorolt hatását is vizsgáltam a transzport kísérletekhez használt sejtréteg integritás monitorozásával, illetve MTT teszt elvégzésével. Végül pedig a SEDDS rendszerek kioldódásának indirekt vizsgálatát végeztem el keményszelatin és HPMC kapszulákból.

A második esetben máriatövis (*Silybum marianum*) hatóanyagával, a szilimarinnal végeztem kísérleteket. Ez a flavonolignán keverék számos hatása mellett elsősorban hepatoprotektív hatóanyagként, rákos megbetegedések megelőzésére és kezelésére, illetve gasztrointesztinális panaszok esetén használatos. Mind a vízdoldhatósága, mind a felszívódása a vékonybélből rossz. Biohasznosulásának növelését nyújtott hatóanyag-leadású hidrofil mátrix tabletták formulálásával növeltem, különböző típusú Carbopolok felhasználásával. Ezt a technológiát különböző béta-ciklodextrin származékokkal képzett zárványkomplexekkel is kombináltam a vízdékonyság növelésének érdekében. A tabletták fizikai tulajdonságait vizsgáltam, hogy megbizonyosodhassam a termékek tömegegységességének, kopási veszteségének és törési szilárdságának megfeleléséről az Európai Gyógyszerkönyv követelményeinek. Kioldódásvizsgálatokat végeztem szilimarint és ciklodextrinnek komplexált szilimarint tartalmazó, Carbopol alapú hidrofil mátrixtablettákból mesterséges bélnedvben, mesterséges gyomornedvben, és a humán gasztrointesztinális rendszer körülményeit jobban modellező változó közegben. A kioldódási vizsgálatok eredményeinek kiértékelésével kiválasztottam a legelőnyösebb hatóanyag-felszabadulási tulajdonságokat biztosító formulációkat, és összehasonlítottam őket kereskedelmi forgalomban kapható készítménnyel. A legjobb eredményeket mutató összetétel sejtéletképessegre gyakorolt hatását is vizsgálatát MTT teszt elvégzésével.

## **2. Anyagok és módszerek**

### **2.1. Görögszéna kivonat készítése**

A görögszéna kivonat a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékén készült. A gyógyszerkönyvi minőségű görögszénamagot 10.000 rpm fordulatszámon 2 percen keresztül őröltük. 60,0 g őrlemény kivonása 2400 ml forrásban levő metanollal történt 60 percen keresztül, majd a kivonatot szűrtük, és rotációs vákuum-bepárlóval szárítottuk. Így 13,38 g száraz kivonathoz jutottunk. Ezután a száraz kivonatot újra feloldottuk 30,0 ml PBS oldatban, majd sterilre szűrtük 0,22 µm pórusátmérőjű PES membránon. A steril kivonatot 4 °C-on hűtve tároltuk, és 48 órán belül felhasználtuk. A PBS-ben oldott kivonat 7,833 mg/ml trigonellint és 8,258 mg/ml 4-OH-izoleucint tartalmazott.

### **2.2. SEDDS rendszerek formulálása**

A SEDDS rendszerekhez felhasznált izopropil-mirisztát a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől, a Transcutol HP, Labrasol, Kolliphor RH40 és Capryol 90 a Gattefossé-tól (Saint-Priest, Franciaország) került beszerzésre.

A formuláció metodikája a folyékony önemulgeáló rendszerek előállítására általánosan alkalmazott módszernek felelt meg. Az olajos fázist alkotó izopropil-mirisztát, és az emulgensként és koemulgensként használt Transcutol HP, Labrasol, Kolliphor RH40 és Capryol 90 műanyag centrifugacsövekben került összemérésre és keverésre. A folyékony görögszénamag kivonatot és a PBS oldatot ehhez adtam hozzá, majd óvatosan vortexeltem, amíg a keverék látszólag egyneműnek nem tűnt. A SEDDS rendszereket sterilre szűrtem. A további kísérleteket az elkészülést követően azonnal végrehajtottam. A korábban elkészített steril kivonat, a SEDDS komponensek és PBS felhasználásával 5 különböző összetételt formuláltam. Ezek közül egy natúr növényi kivonatot tartalmazott, kettő növényi kivonatot különböző SEDDS rendszerekkel, kettő pedig ezen rendszerek segédanyagait, növényi kivonat nélkül.

### **2.3. Részecskeméret meghatározás**

A SEDDS rendszerek részecskeméret meghatározása Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezéssel történt, dinamikus fényszóráson alapuló módszerrel. A vizsgált összetételek 1 ml mennyiségét 900 ml desztillált vízzel hígítottam. A protokoll szerint a minták 5 percen keresztül

ekvilibrálódtak 25 °C-on, majd 5 mérést végeztem el rajtuk. A kiértékelést az eszköz szoftvere végezte, ehhez a polisztrén-latex refraktív indexét és abszorpciós értékét használtam.

## **2.4. Zéta-potenciál analízis**

A SEDDS rendszerek zéta-potenciálját Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezéssel mértem. A vizsgált összetételek 1 ml mennyiségét 900 ml desztillált vízzel hígítottam. A protokoll szerint a minták 5 percen keresztül ekvilibrálódtak 25 °C-on, majd 5 mérést végeztem el rajtuk. A kiértékelést az eszköz szoftvere végezte.

## **2.5. DPPH antioxidáns teszt**

A SEDDS rendszerek antioxidáns kapacitását DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) antioxidáns teszt útján határoztam meg, amely egy standard, egyszerű kolorimetriás módszer anyagok szabadgyök semlegesítő képességének mérésére. A SEDDS összetételekből és a pozitív kontrollból (1 mg/ml koncentrációjú aszkorbinsavoldat) hígítási sort készítettem, majd az oldatokból 1 ml mintát 2 ml 0,06 mM DPPH reagenssel reagáltattam, melyet a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől szereztünk be. Az antioxidáns hatóanyagokkal reagálva a lila DPPH reagens koncentrációfüggő mértékben sárga színű vegyületté alakul, amely színváltozás abszorbanciáját Shimadzu UV-1900 spektrofotométerrel 517 nm hullámhosszon mértem.

## **2.6. Caco-2 sejtvonal**

A Caco-2 humán adenokarcinóma sejtvonal a European Collection of Cell Cultures-től (ECACC, Public Health England, Salisbury, UK) került beszerzésre. A sejteket műanyag sejtenyésztő flaskákban tartottam fent, sejtenyésztő médiumban („Dulbecco’s modified eagle’s medium”), 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú, magas páratartalmú atmoszférában, 37 °C-on. A sejteket hetente passzáltam. A kísérletekhez felhasznált sejtek passzázsszáma 20 és 40 között volt.

## **2.7. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns teszt**

A szuperoxid-dizmutáz enzim az oxigén-metabolizmus során keletkező szuperoxid szabadgyökök lebontását katalizálja, így rendkívül fontos antioxidáns védelmi mechanizmusnak képezi részét szinte minden élő sejtben, amely oxigénnek van kitéve. A SOD

teszt elvégzéséhez a Caco-2 sejteket 12 lyukú plate-re szélesztettem, lyukanként 100.000 sejtszámmal. A sejtek hat napon át nőttek magas CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában, 37 °C hőmérsékletű inkubátorban. A kísérlet előtt a médiumot eltávolítottam a sejtekről, és minden vizsgálandó összetétel 100x hígítású mintájából 1 ml-t adtam hozzájuk, ezután egyórás inkubáció következett 37 °C-on. A teszt során pozitív kontrollként 1 mg/ml koncentrációjú aszkorbinsav-oldatot használtam, 100x hígításban, negatív kontrollként pedig PBS oldatot. A SOD enzimaktivitás vizsgálatát a Cayman Chemicals (Cat. 706002, Cayman, Ann Arbor, MI, USA) antioxidáns assay kit segítségével végeztem, a gyártó által megadott protokollt követve. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztem.

## **2.8. Permeabilitási vizsgálatok**

A Caco-2 humán colon epithel sejtek sejtréteget alkotva tight junction-t képesek kialakítani egymás között, ezáltal felhasználhatók az anyagok paracelluláris felszívódásának modellezésére a sejtrétegen keresztül. Emellett transzport és efflux fehérjék expresszálása által többféle transzcelluláris felvételi utat is képesek modellezni.

A transzport kísérletekhez a Caco-2 sejteket 24 lyukú plate-be helyezett polikarbonát membrán inzertekre szélesztettem, inzertenkénti 80.000 sejtszámmal. A médiumot minden 3-4 nap elteltével frissre cseréltem. A transzepitheliális elektromos ellenállást (TEER) Millicell ERS-2 voltóhmeter chopstick elektródpárjának használatával mértem. A kísérleteket azokon az inzerteken kezdtem meg, amelyeken a sejt monolayer 800 és 1000  $\Omega\text{cm}^2$  közötti TEER értékeket mutatott.

A transzport kísérletek kivitelezéséhez az inzerteket új 24 lyukú plate-be helyeztem. Indításkor a vizsgálandó összetétel 400  $\mu\text{l}$  mennyiségét az inzert apikális kamrájába pipettáztam. A bazális kamrába 1000  $\mu\text{l}$  PBS került, melyből azonnal, a 0. időpillanatban 50  $\mu\text{l}$  mintát vettem, majd később a vizsgálat 15., 30., 60., 120., és 240. percében is.

A transzport kísérlet során az öt vizsgálandó összetétel, valamint PBS oldat, mint negatív kontroll mintáit használtam. Minden összetételen négy párhuzamos mérést végeztem.

A vizsgálat során az inzertek bazális kamráiból vett minták feldolgozása a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékén történt, LC-MS módszer segítségével.



## **2.9. A sejtréteg integritásának utánkövetése a permeabilitási vizsgálatok végeztével**

A sejtréteg integritását a TEER értékek monitorozásával ellenőriztem. A permeabilitási vizsgálat során a Caco-2 sejtek közötti tight junction-ök képesek fellazulni, ami a TEER csökkenését eredményezi. Az életképes sejtek közötti sejtréteg integritás azonban rövid idő alatt helyreáll a vizsgálat végeztével. A permeabilitási vizsgálatok előtt mért TEER értékeket feljegyeztem, majd a 2 óra időtartamú vizsgálat végeztével, a minták eltávolítása és friss sejtenyésző médium hozzáadása után ismét TEER-t mértem. Újabb 2 óra elteltével megismételtem a TEER mérést, majd a vizsgálat kezdetét követő 24. órában újra. A sejtingegritás ellenőrzése során pozitív kontrollként Triton-X-100 oldattal (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) kezeltem az inzertekre szélesztett sejteket.

## **2.10. MTT citotoxicitási vizsgálat**

A Caco-2 sejtek életképességét a mintákkal történő kezelés után MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) citotoxicitási teszt segítségével vizsgáltam. Az MTT egy sárga színű molekula, amelyet az élő, aktív metabolizmussal rendelkező sejtek felvéve mitokondriális enzimeik által lila színű formazánná alakítanak át. Az intracelluláris formazán képződése kolorimetriásan mérhető. A kísérlethez a sejteket 96 lyukú plate-re szélesztettem lyukankénti 10.000 sejttszámmal, és 7 napon keresztül növesztettem őket párásított, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú atmoszférában, 37°C-on. A citotoxicitási tesztek előtt a sejtenyésző médiumot eltávolítottam a sejtekről, majd mostam őket. A mintaoldatokkal egy 30 percig tartó inkubációs időtartamon át kezeltem a sejteket, majd eltávolítottam róluk. Ezután újabb 3 óra inkubáció következett sejtenyésző médiumban, amelyhez 0,5 mg/ml MTT oldatot adtam (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). A sejtek mitokondriális enzimeit által átalakított lila formazán kristályokat 25:1 arányú izopropanol:sósav oldattal oldottam fel a plate aljáról, az oldatok abszorbanciáját pedig FLUOstar OPTIMA Microplate Reader berendezéssel mértem 570 nm hullámhosszon, 690 nm háttér mellett. A sejttúlélést a negatív kontrollként PBS-el kezelt sejtekhez viszonyított százalékos arányban fejeztem ki.

Az első esetben a sejtek életképességét a SEDDS összetételekkel történő kezelés után vizsgáltam. Negatív kontrollként PBS oldatot, pozitív kontrollként Triton X-100 kezelést alkalmaztam. A vizsgálandó összetételekből hígítási sorozatot készítettem a formuláció 100, 200, 300, 400, 500, és 1000-szeres hígításával, ezek mintáit adtam a sejtekhez az MTT teszt során.

A második esetben a tablettázáshoz felhasznált 4 különböző Carbopolból oldatsorozatot készítettem 150 mg polimer feloldásával 900 ml desztillált vízben, majd ezt tovább hígítva. Az oldatok mintáit adtam 30 perces inkubációs időre a sejtekhez. Negatív kontrollként PBS oldatot használtam.

A harmadik teszt során a kiválasztott tablettáformuláció kioldódási vizsgálata során vett mintákat adtam a sejtekhez a 30 perces inkubáció idejére. Negatív kontrollként PBS oldatot használtam.

### **2.11. Antioxidáns hatású anyagok módosított kioldódási vizsgálata kapszulából**

A SEDDS összetételekkel módosított kioldódási vizsgálatot végeztem, amely módszer kidolgozásához a **Li és mtsai**, illetve **Kalantari és mtsai** által leírt kísérleteket vettem alapul. 1 ml mennyiséget töltöttem az összetételekből kemény zselatin és HPMC kapszulatokba (Capsugel, Inc., Morristown, NJ, USA). 3 kapszulát 100 ml desztillált vízbe helyeztem szobahőmérsékleten, és 120 rpm fordulatszámmal kevertettem. 1 ml mintát vettem a zselatinkapszula esetében a vizsgálat 10., 20. és 30. percében, a HPMC kapszula esetében pedig a 15., 30., 45., 60. percében.

A mintákat 2 ml 0,06 mM DPPH reagenshez adtam, majd az így keletkezett oldat abszorbanciáját Shimadzu UV-1900 spektrofotométerrel mértem 517 nm hullámhosszon.

### **2.12. Szilimarín**

A szilimarint a *Silybum marianum* növény magjaiból a **Kahol és mtsai** által leírt módszer szerint állították elő a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén. A máriatövis magokat hűtötték és porították, az őrleményt zsírtalanították. A kivonás acetonitrillel történt, az így nyert szilimarint vákuumban koncentrálták be, majd szűrték és szárították. A szilimarinpor nem tartalmazott oldószermaradványokat. A HPLC-MS analitika a standardoknak megfelelő bioaktív flavonolignánokat határozott meg.

### **2.13. Tablettapréseles**

A hidrofil mátrix alapjaként 4 különböző Carbopol típust használtam fel: Carbopol 71G, Noveon® AA-1 Polycarbophil USP, Carbopol 974 PNF, és Carbopol 971P, a minták a The Lubrizol Corporation cégtől (Wickliffe, Ohio, USA) kerültek beszerzésre.

A szilimarín komplexálásához 4 különböző béta-ciklodextrin származékot használtam fel: a (2-Hidroxi)propil- $\beta$ -ciklodextrin ( $DS \sim 3 \pm 1$ ) (HPBCD), Heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciklodextrin, metilált  $\beta$ -ciklodextrin ( $DS \sim 12$ ), és random metil- $\beta$ -ciklodextrin ( $DS \sim 12$ ) a CycloLab R&D Kft.-től került beszerzésre (Budapest, Hungary).

A négyféle polimert tartalmazó tablettákon túl a Carbopoloikat és a négyféle komplexképzőt kombinálva összesen 20 különböző szilimarín hatóanyagú hidrofil mátrixtablettát formuláltam.

Tablettázási segédanyagként Mg-sztearátot, talkumot, dibázikus kalcium-foszfátot (Hungaropharma Zrt., Magyarország), és Ludipress®-t (BASF, Ludwigshafen, Németország) használtam fel.

Minden termék 70 mg szilimarínt tartalmazott hatóanyagként. A szilimarín-ciklodextrin komplexeket tartalmazó tabletták esetében a komplexek fizikai keverékként készültek. A hatóanyag és a ciklodextrin-származék 1:1 mólarányban került összemérésre, és mozsárban dörzsöléssel homogenizáltam őket. 150 mg Carbopolt használtunk minden tablettához. Tablettázási segédanyagként 15 mg Mg-sztearát, 5 mg talkum, 10 mg dibázikus kalcium-foszfát és az 500 mg tablettá végtömeghez szükséges mennyiségű Ludipress került felhasználásra tablettánként. A segédanyagok biztosították a glidáns, lubrikáns, antiadhezív és kötő hatást. A tabletták komponenseit dörzsmozsárba mértem össze, homogenizáltam, majd kézi tablettázógéppel préseltem őket, 50 N préserővel.

## **2.14. Gyógyszerforma vizsgálatok (Ph. Eur. 9.)**

### *2.14.1. Tömegegységesség*

A tömegegységességet 20 tablettá felhasználásával vizsgáltam, ezek tömegét analitikai mérlegen egyenként lemértem, majd kiszámoltam az átlagtömeget. Az átlagtól való legnagyobb eltérést százalékos értékben adtam meg.

### *2.14.2. Kopási veszteség*

A tabletták kopási veszteségét Erweka TA40 berendezés segítségével vizsgáltam (Heusenstamm, Németország). 20 tabletta teljes tömegét gondos portalanítás után analitikai mérlegen lemértem, majd a készülék forgódobjába helyeztem őket. A dob 100 fordulata után, melyre 4 perc alatt került sor, ismét portalanítottam a tabletták felszínét, majd lemértem a tömegüket.

#### *2.14.3. Törési szilárdság*

A tabletták törési szilárdságát Erweka TBH30M berendezés segítségével vizsgáltam (Heusenstamm, Németország). 10 tabletta eltöréséhez szükséges erőt mértem le egymás után, majd a mérések átlagát vettem a tabletták törési szilárdságának. A gyógyszerforma vizsgálatokhoz használt minden mérési módszer és eszköz összhangban állt az Európai Gyógyszerkönyv 9. kiadásával.

### **2.15. Mátrix tabletták kioldódási vizsgálatai**

A kioldódási vizsgálatokat Erweka DT 800 Dissolution Tester berendezéssel végeztem, forgólapátos módszerrel (Heusenstamm, Németország).

Az **első esetben** a szilimarín kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofíli mátrix tablettákból mesterséges bélnedvben. A mesterséges bélnedv literenként 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ot tartalmazott, a pH-t pedig 0,1 M NaOH oldattal állítottam be 6,8-re, az Európai Gyógyszerkönyv 9. kiadásának megfelelően. A vegyszereket a Hungaropharma Zrt.-től szereztük be. A közeg hőmérséklete  $37 \pm 0,5$  °C volt a vizsgálat teljes időtartama alatt, és 100 rpm fordulatszámmal folyamatosan kevertettem. Minden tabletta 900 ml kioldóközegbe került, mind a 4 különböző formuláció esetében 4 párhuzamos mérést végeztem. A vizsgálat időtartama 780 perc volt, ezalatt 16 alkalommal 4 ml mennyiségű mintát vettem a kioldóközezből, melyet azonnal pótoltam.

A **második esetben** a szilimarín kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofíli mátrix tablettákból mesterséges gyomornedvben. A mesterséges gyomornedv összetétele literenként 2,0 g NaCl és 80,0 ml 1 M sósav volt, 1,2 pH értékkel, az Európai Gyógyszerkönyv 9. kiadásának megfelelően. A vegyszereket a Hungaropharma Zrt.-től szereztük be. A közeg hőmérséklete  $37 \pm 0,5$  °C volt a vizsgálat teljes időtartama alatt, és 100 rpm fordulatszámmal folyamatosan kevertettem. Minden tabletta 900 ml kioldóközegbe került, mind a 4 különböző

formuláció esetében 4 párhuzamos mérést végeztem. A vizsgálat időtartama 780 perc volt, ezalatt 16 alkalommal 4 ml mennyiségű mintát vettem a kioldóközezből, melyet azonnal pótoltam.

A **harmadik esetben** a különböző ciklodextrin származékokkal komplexált szilimarin kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofil mátrix tablettákból mesterséges bélnedvben. A közeg hőmérséklete  $37\pm 0,5$  °C volt a vizsgálat teljes időtartama alatt, és 100 rpm fordulatszámmal folyamatosan kevertettem. Minden tabletta 900 ml kioldóközegebe került, mind a 16 különböző formuláció esetében 4 párhuzamos mérést végeztem. A vizsgálat időtartama 780 perc volt, ezalatt 16 alkalommal 4 ml mennyiségű mintát vettem a kioldóközezből, melyet azonnal pótoltam.

A **negyedik esetben** a különböző ciklodextrin származékokkal komplexált szilimarin kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofil mátrix tablettákból változó közegben. Ehhez a berendezés forgókosaras módszerét használtam. A vizsgálat első órájában a tabletták mesterséges gyomornedvbe kerültek, ebből 15 percenként 4 ml mintát vettünk. Ezután a közeget mesterséges bélnedvre cseréltük, és további 6 óráig végeztük a vizsgálatot, minden 30 percben 4 ml mintavétellel.

A közeg hőmérséklete  $37\pm 0,5$  °C volt a vizsgálat teljes időtartama alatt, és 100 rpm fordulatszámmal folyamatosan kevertettem. Minden tabletta 900 ml kioldóközegebe került, a különböző formulációk esetében 4 párhuzamos mérést végeztem.

A vizsgálat során vett mintákat spektrofotometriás módszerrel mértem, 287 nm hullámhosszon, Shimadzu UV-1601 UV-VIS spektrofotométer használatával (Kyoto, Japán). Referenciaként 70 mg szilimarint oldottam fel desztillált vízben, majd szűrtem, és lemértem az abszorbanciáját. A kioldóközezből vett minták abszorbanciáját a referencia abszorbancia százalékában fejeztem ki.

### 3. Az értekezés új tudományos eredményei

#### 3.1. SEDDS rendszerek részecskeméret-meghatározása

A Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezéssel végzett, dinamikus fényszóráson alapuló részecskeméret-meghatározás során az egyik SEDDS rendszer átlagos részecskeátmérője 859 nm, míg a másik összetételé 65,5 nm volt. A vizsgálat eredményei alapján az előbbi formuláció ön-mikroemulgeáló rendszernek tekinthető (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS), míg az utóbbi ön-nanoemulgeáló rendszernek (self-nanoemulsifying drug delivery system, SNEDDS). Megjegyzendő azonban, hogy az önemulgeáló rendszerek nomenklatúrája nem egységes a szakirodalomban, ezért ezek a kategóriák vitathatóak.

#### 3.2. SEDDS rendszerek zéta-potenciál analízise

A Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezés segítségével meghatározott zéta-potenciál az első összetétel esetében -71,3 mV volt, a második összetétel esetében pedig -38,5 mV. A zéta-potenciál nagysága mV mennyiségben megadva a vizsgált rendszer stabilitását mutatja meg, 30-40 mV közötti érték közepes stabilitást, 40-60 mV közötti érték jó, 61 mV feletti érték pedig kiváló stabilitást jelent. A zéta-potenciál analízis alapján az első összetétel stabilitása kiváló, a második összetételé pedig közepesnek tekinthető.

#### 3.3. DPPH antioxidáns teszt

A DPPH antioxidáns teszt során a mintaoldatot 0,06 mM DPPH reagenssel elegyítettem, és az oldat színváltozásának abszorbanciáját mértem. A szabadgyökgátló kapacitást a következő egyenlet szerint számoltam ki:

$$I\% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

ahol  $A_0$  a 0,06 mM DPPH reagens abszorbanciája,  $A_s$  pedig a minta abszorbanciája.

A görögszénamag kivonatot tartalmazó összetételek antioxidáns kapacitása alacsonyabb koncentrációban elmarad a pozitív kontrollként használt aszkorbinsav oldatétól, magasabb koncentrációban azonban megközelíti, vagy akár el is éri azt. Azok az összetételek,

melyek csak a SEDDS rendszerek segédanyagait tartalmazzák, növényi kivonatot nem, koncentrációtól függetlenül elhanyagolható antioxidáns hatással bírnak.

### **3.4. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns teszt**

Az in vitro SOD enzimaktivitási tesztet Caco-2 sejteken végeztem el. A pozitív kontrollként aszkorbinsavval kezelt sejtek SOD aktivitását 100%-nak vettem, és az ehhez viszonyított enzimaktivitás értékével számoltam.

A növényi kivonatokat tartalmazó SEDDS összetételekkel kezelt sejtek SOD aktivitása magasabb értéket mutatott, mint az egyszerű görögszénamag kivonattal kezelt sejtek esetében tapasztalt érték. Erre lehetséges magyarázat, hogy a penetrációfokozó segédanyagoknak köszönhetően a sejtek nagyobb mennyiségben vették fel a növényi kivonat antioxidáns komponenseit, így azok jobban befolyásolták az enzimaktivitást. Az enzimaktivitáson alapuló sejtes antioxidáns teszt a korábban leírt, DPPH reagensen alapuló kémcsőkísérlethez képest a mindkét esetben pozitív kontrollként használt aszkorbinsavnál nagyobb antioxidáns kapacitást mutatott az egyik SEDDS formuláció vonatkozásában. Azok az összetételek, melyek csak a SEDDS segédanyagokat tartalmazták, szintén mutattak némi antioxidáns hatást, amely valamivel magasabb volt, mint a negatív kontrollként használt PBS oldat esetében tapasztalt, de nem tekinthető számottevőnek.

### **3.5. Görögszéna komponensek permeabilitási vizsgálatai**

A transzport kísérletekhez felhasznált inzerteken kialakult sejtrétegek TEER értékei 800 és 1000  $\Omega\text{cm}^2$  között voltak. A Növénytani Tanszéken végzett komplex metabolomikai vizsgálat során összesen 13 vegyületet sikerült kimutatni a transzport mintákból.

A kivonatot nem tartalmazó összetételek és a negatív kontrollként használt PBS esetében a várakozásnak megfelelően nem tudtuk felszívódott komponensek nyomát kimutatni. A SEDDS összetételek esetében minden vegyületre vonatkoztatva jelentősen nagyobb mennyiségű növényi komponens jutott át a membránon a kísérlet során, mint az egyszerű görögszénamag kivonatot tartalmazó összetételből. Ez alátámasztotta az elméletet az önemulgeáló rendszerek penetrációfokozó hatásáról. Az alapvetően alacsonyabb vízdékonyságú vagy permeabilitású komponenseken túl a SEDDS formulációk a vízdékonny, jól felszívódó vegyületek penetrációját is fokozták, ami ezekben az esetekben is

megnövekedett biohasznosuláshoz vezethet. Míg egyes vegyületek esetében a natúr kivonat felszívódása nem mutat szignifikáns különbséget a negatív kontroll permeabilitási görbéjéhez képest, a SEDDS rendszerek a natúr kivonattól és a negatív kontrolltól is minden esetben szignifikánsan eltérő görbét eredményeztek. Egymástól azonban a legtöbb esetben nem különböztek szignifikánsan, a transzport kísérlet kiértékelése után nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy bármelyik formuláció jobb penetrációfokozó tulajdonsággal rendelkezne a másikonál.

### **3.6. A sejtréteg integritása**

A sejtréteg integritását a TEER értékek monitorozásával ellenőriztem, az adott időpontokban mért TEER értékeket rögzítettem, és a transzport kísérlet megkezdése előtti TEER értéket 100%-nak véve, ennek arányában vizsgáltam.

A transzport vizsgálatok végeztével a kezdeti TEER értékek csökkentek, a vizsgálat befejeztével azonban, friss sejtenyésző médium hozzáadása után ismét nőni kezdtek, és 24 órával a vizsgálat végpontja után visszaálltak a kiindulási értékek 90%-a feletti értékre. A vizsgált mintákkal való kezelés hatására a tight junction-ok valamelyest lazultak, később azonban lassan regenerálódtak, és az értékek helyreállása a sejtek túlélését mutatja a formulációkkal történő kezelés után. A pozitív kontrollként alkalmazott Triton-X hatására a sejtréteg TEER értékének csökkenése nagyobb és permanens volt, a sejtek nem éltek túl a kezelést.

### **3.7. MTT citotoxicitási vizsgálat**

Az MTT teszt elvégzése után a túlélő sejtek százalékos arányát a mintaoldatok koncentrációjának függvényében vizsgáltam. A negatív kontrollként használt PBS oldattal történő kezelés utáni sejt viabilitást tekintettem 100%-nak.

A pozitív kontrollként használt Triton-X kezelés 6,7% sejt viabilitást eredményezett. Az MTT tesztek eredményei alapján a görögszéna kivonatot és a SEDDS komponenseket is jól tolerálták a sejtek, a viabilitási értékek minden esetben 74% felett voltak. A 70% feletti sejttúlélési arány alapján kijelenthető egy anyagról, hogy nem toxikus. A natúr görögszéna kivonat mutatta a legmagasabb sejttúlélési arány, míg a különböző SEDDS összetételek



citotoxicitási értékei között nem volt szignifikáns különbség. A sejttéteképesség és a mintakonzentráció között nem találtam összefüggést.

### 3.8. Indirekt kioldódási vizsgálat

Az indirekt kioldódási vizsgálat során a megadott időpontokban mintát vettem a kioldóközegből. A mintákat DPPH reagenssel reagáltattam, majd lemértem az abszorbanciájukat. A minták oxidatív szabadgyököket semlegesítő képességét az alábbi egyenlettel számoltam ki:

$$I\% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

ahol  $A_0$  a 0,06 mM koncentrációjú DPPH reagens abszorbanciája,  $A_s$  pedig a DPPH-val reagált minta abszorbanciája. A kioldóközeg szabadgyököket semlegesítő képessége egyenesen arányos a kapszulákból kioldódott antioxidáns növényi komponensek koncentrációjával. Pozitív kontrollként lemértem 100 ml desztillált vízzel hígított görögszéna kivonat antioxidáns kapacitását, valamint a SEDDS segédanyagok teljes antioxidáns kapacitását 100 ml desztillált vízzel hígítva, mint negatív kontrollt. A keményszselatin kapszulák 30 perc után kezdtek el szétesni, míg a HPMC kapszulákból 60 perc elteltével is volt hatóanyag-felszabadulás. A kioldódás egyenletes és elnyújtott volt mindkét kapszulatok esetében. Az egyes összetételek kioldódása között nem volt jelentős eltérés.

### 3.9. Gyógyszerforma vizsgálatok

#### 3.9.1. Tömegegységesség

A tömegegységesség vizsgálata alapján az átlagtömegtől való maximális eltérés minden esetben a 9. Európai Gyógyszerkönyv által megengedett maximális 5% alatt volt. A legnagyobb eltérést a Carbopol 71G mátrixalkotót tartalmazó tabletták esetében kaptam, a ciklodextrinnel nem komplexált összetételnél. A legkisebb eltérést a Carbopol 974 PNF tartalmú tabletták mutatták, itt 0,5% alatt volt az átlagtömegtől való eltérés.

#### 3.9.2. Kopási veszteség

A kopási veszteség minden tabletaösszetétel esetében a 9. Európai Gyógyszerkönyv által megengedett maximális 1%-nál alacsonyabb volt. A legnagyobb kopási veszteséget a Carbopol 71G polimert tartalmazó tabletták esetében tapasztaltam, a másik három mátrixalkotóból készített tabletták esetében nem volt számottevő különbség a kopási veszteség értékei között.

### *3.9.3. Törési szilárdság*

A törési szilárdság vizsgálata alapján a tabletták megfelelően lettek préselve. A Carbopol 71G polimert tartalmazó tabletták bizonyultak a legkevésbé ellenállónak, míg a másik három mátrixalkotót tartalmazó tableta törési szilárdságában nem mutatkozott jelentős különbség.

A tabletták gyógyszerforma vizsgálatai alapján kijelenthető, hogy a kézi tablettázógéppel megfelelő fizikai paraméterekkel rendelkező terméket hoztam létre, minden mintám megfelelt a Gyógyszerkönyvben leírt feltételeknek.

## **3.10. Carbopolok citotoxicitása**

A tabletták formulálásához felhasznált négy Carbopol citotoxicitását MTT teszt segítségével vizsgáltam Caco-2 sejtvonalon. A vizsgálat eredményei alapján nem tudtam összefüggést kimutatni a sejtleletképeség és a kezelés mintáinak Carbopol koncentrációja között. A legmagasabb sejtleletképeséget a Noveon esetében tapasztaltam.

## **3.11. Szilimarin kioldódása mátrixtablettákból**

A kioldódási vizsgálatok első sorozatában a szilimarin kioldódását vizsgáltam a Carbopol-alapú mátrixtablettákból. A kioldódási görbék alapján kijelenthető, hogy mind a négy Carbopol elnyújtott, egyenletes hatóanyag-leadást biztosított. Eltérések tapasztalhatók azonban a felszabadult hatóanyag teljes mennyiségében. A Carbopol 971P és Noveon polimerek biztosították a legmagasabb szilimarin felszabadulást a mátrixból 780 perc elteltével. A vizsgálat igazolta, hogy a Carbopolok megfelelő alapot jelentenek nyújtott hatóanyag-leadású hidrofíli mátrixtabletták formulálásához.

### **3.12. Ciklodextrinekkal komplexált szilimarin kioldódása mátrix tablettákból**

A kioldódási vizsgálatok második sorozatában a hatóanyag felszabadulását vizsgáltam abban az esetben, ha a hidrofil mátrix technológiát a ciklodextrinekkal történő molekuláris kapszulázással kombináljuk. A 4 különböző Carbopolból és a négyféle  $\beta$ -ciklodextrin származékból összesen 16 különböző összetételű tablettát formuláltam. A kioldódási görbék összehasonlítása után két Carbopolt (Noveon és Carbopol 974 PNF) tudtam kiválasztani, amelyekből a vizsgálat 780 perce alatt a legnagyobb mennyiségű szilimarin szabadult fel.

### **3.13. Szilimarin kioldódása mesterséges gyomornedvben**

A kioldódási vizsgálatok harmadik sorozatában a szilimarin kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofil mátrix tablettákból mesterséges gyomornedvben, melynek pH-ja 1,2. A hatóanyagot HPBCD-vel komplexáltam. Itt minden Carbopol esetében elnyújtott és egyenletes kioldódást tapasztaltam, de a folyamat sokkal lassabb volt, mint a mesterséges bélnedv esetében. A 780 perces vizsgálat végére a tablettákból kioldódott szilimarin mennyisége 14% és 37% közé esett.

### **3.14. Szilimarin kioldódása változó közegben**

A kioldódási vizsgálatok negyedik sorozatában az első órában a kioldóközeg mesterséges gyomornedv volt, amit ezután lecseréltem mesterséges bélnedvre, és további 6 órán át folytattam a kísérletet. A cél a Carbopol mátrixokból történő kioldódás vizsgálata volt a humán gasztrointesztinális rendszert leginkább modellező pH-jú környezetben. Mind a 16 Carbopol-ciklodextrin kombinációt megvizsgáltam. Ebben az esetben a kioldódott szilimarin mennyisége kevesebb volt a korábban mesterséges bélnedvben elvégzett kísérletekhez képest, részben a vizsgálat rövidebb ideje miatt, részben az első óra savas közege miatt, amely befolyásolja a polimerek gélképzését. A vizsgálatok alapján két kombináció esetében lényegesen jobb hatóanyag-felszabadulással számolhatunk, mint a többi formulációnál. Ezek a metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol 974 PNF, illetve Noveon alapú mátrixtabletták voltak.

### **3.15. Szilimarin kioldódásának összehasonlítása különböző formulációkból**

A kioldódási vizsgálatok eredményei alapján két Carbopol-ciklodextrin kombinációt tudtam kiválasztani, amelyek a legalkalmasabbnak bizonyultak az elnyújtott hatóanyag-leadás és ezáltal a megnövelt biohasznosulás elérésére. Összehasonlításképpen a metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarint és Noveont, illetve Carbopol 974 PNF-et tartalmazó formulációk, valamint egy kereskedelmi forgalomban kapható 70 mg szilimarin tartalmú készítmény, egy konvencionális keményszelatin kapszula kioldódásvizsgálatát is elvégeztem változó közegben. Míg az utóbbi esetében a szilimarin kioldódása egy óra után elérte a maximumot, a mátrix tabletták nyújtott hatóanyag-leadása 6 órával a kísérlet kezdete után is tartott. A ciklodextrinnek történő komplexálás növelte a hatóanyag oldékonyságát, így jobb kioldódást eredményezett. A gyári készítmény kioldódási görbéje a 15. perctől szignifikánsan különbözött a mátrixtablettákétól, míg a mátrixtabletták görbéi nem különböztek egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.

### **3.16. Noveon alapú mátrix tabletták citotoxicitási vizsgálata**

Végül megismételtem a kioldódási vizsgálatot a legjobb hatóanyag-felszabadulási tulajdonságokat mutató Noveon és metilált béta-ciklodextrin kombinációval, melyből a korábbi kísérletek alapján a legtöbb szilimarin oldódott ki. A vizsgálat során a kioldóközezből vett mintákat MTT teszthez használtam fel. Nem találtam összefüggést a túlélő sejtek százalékos aránya és a tablettakomponensek koncentrációja között. A sejtéletképesség minden esetben 70% felett volt, egyes esetekben közel 100%. A vizsgálat alapján a készítményünk biokompatibilisnek (citokompatibilisnek) tekinthető.

## 4. Diszkusszió

A természetes, növényi hatóanyagokat tartalmazó belsőleges készítmények iránti érdeklődés fokozott igényt teremt a megfelelő, modern gyógyszerhordozó rendszerekbe történő inkorporálásra, hogy a rossz stabilitású és biohasznosulású fitofarmakonok hatékony és kiszámítható terápiás felhasználását lehetővé tegyék.

A görögszéna egy többféle terápiás célra is alkalmazható gyógynövény, mely elsősorban diabétesz és inzulinrezisztencia esetén tűnik potenciális szernek mind a kezelés, mind a prevenció szempontjából. A kutatómunkám első része során két különböző SEDDS összetételt formuláltam görögszénamag standardizált kivonatából.

A rossz orális biohasznosulás a gyógyszerformulálás egyik legnagyobb kihívása. Az alacsony vízdékonyság, rossz felszívódás és idő előtti degradáció pedig a nem megfelelő orális biohasznosulás fő okai. A megfelelő paraméterekkel rendelkező SEDDS rendszerek javíthatják a lipofil, alacsony permeabilitású, és nem kellőképpen stabil molekulák biohasznosulását.

Kutatómunkám során két különböző SEDDS rendszert formuláltam standardizált görögszénakivonatból, melyek egyike a mikro-, a másik pedig a nanoemulziós mérettartományba esett, megfelelő stabilitással bírtak, és javították a növényi komponensek biohasznosulását.

A kivonat és a SEDDS formulációk antioxidáns hatásait kétféle módszerrel, in vitro kémiai és Caco-2 sejtkultúrák tesztelével vizsgáltam. A DPPH reagens segítségével elvégzett teszt alapján a görögszénamag kivonatot tartalmazó összetételek antioxidáns kapacitása alacsonyabb koncentrációban elmarad az aszkorbinsav oldatétól, magasabb koncentrációban azonban megközelíti, vagy akár el is éri azt. A SOD enzimaktivitáson alapuló sejtes antioxidáns tesztek alapján a SEDDS-ként formulált összetételekkel kezelt sejtek esetében magasabb antioxidáns hatást tapasztaltam, mint az egyszerű görögszénamag kivonattal kezelt sejtek esetében. Erre lehetséges magyarázat, hogy a penetrációfokozó segédanyagoknak köszönhetően a sejtek nagyobb mennyiségben vették fel a növényi kivonat antioxidáns komponenseit, így azok jobban befolyásolták az enzimaktivitást. Korábban leírták, hogy a növényi komponensek antioxidáns kapacitása penetrációfokozókkal növelhető.

A permeabilitási vizsgálataimmal 13 görögszéna komponens in vitro felszívódását vizsgáltam Caco-2 sejteken, köztük 5 szteroid szaponinét, 6 flavonoid glükozidét, a 4-OH-izoleucinét és a trigonellinét. A két SEDDS formuláció permeabilitása szignifikánsan magasabb

volt mind a 13 növényi metabolit esetében, mint a natúr görögszéna kivonaté, de egymástól jelentősen eltérő felszívódási paramétereket nem mutattak. A transzport vizsgálatok után a membránintegritást TEER utánkövetéssel ellenőriztem.

Végrehajtottam a SEDDS formulációk kioldódásának indirekt vizsgálatát keményzselatin és HPMC kapszulatokokból. A keményzselatin kapszula egyenletes és elnyújtott hatóanyag-leadást biztosított 30 percen keresztül, ezután szétesett. A HPMC kapszulatokból több mint 60 percen keresztül történt hatóanyag-leadás, ebben az esetben is egyenletesen és elnyújtottan. A kioldódott hatóanyagokat DPPH reagens használatával, közvetett módon mértem, kihasználva a görögszéna komponensek antioxidáns tulajdonságait. Több tanulmányt is találunk, melyek a növényi hatóanyagokat tartalmazó SEDDS rendszerek előnyösebb hatóanyag-felszabadulási tulajdonságait írják le különböző gyógyszerformákból.

A citotoxicitást MTT teszt segítségével vizsgáltam. Az eredmények azt mutatják, hogy a növényi kivonatot és a SEDDS formulációkat is jól tolerálták a Caco-2 sejtek.

A szilimarín számos hatással bír, ezek közül elsődlegesek hepatoprotektív sajátosságai. Legfőbb hátránya rendkívül alacsony biohasznosulása, mely a terápiás hatását is befolyásolja. A biohasznosulás növelésére lehetőségünk van a vízdékonyság, a permeabilitás, a metabolizmus és az exkréció megváltoztatásával is. A kutatómunkám során különböző béta-ciklodextrin származékokat használtam a szilimarín vízdékonyságának növelése céljából. A ciklodextrinek széles körben használt segédanyagok a gyógyszerészetben az oldékonyság, a biohasznosulás és a stabilitás növelésére, illetve az irritáció és az inkompatibilitás elkerülésére. A komplexálást fizikai keverékként végeztem a **Ghosh és mtsai** által leírt módszer alapján, akik leírták az így készült komplexek stabilitási állandóját és fázisoldhatósági tulajdonságait. A kutatás során **Yeh és mtsai** publikációjára alapoztam, akik egy szintén sok komponensből álló növényi származék, a San Huang Shel Shin Tang komplexálásával tudták növelni annak vízdékonyságát és hatékonyságát nemcsak in vitro modelleken, de in vivo állatkísérletek során is.

A nyújtott hatóanyag-leadás biztosításához a hidrofíl mátrix tablettákat választottam. Ez egy viszonylag olcsó technológia, a gyártás nem igényel speciális berendezést vagy eszközöket a konvencionális tabletták készítéséhez szükségesén túl.

A Carbopolok jól ismert segédanyagok topikális gélek formulálása során, karboxilcsoportjaiknak köszönhetően a közeg pH-ja befolyásolja az általuk képzett gélfázisból történő kioldódást. Az általam a mátrixtabletták alapjaként felhasznált négy Carbopol citotoxicitását MTT teszt segítségével vizsgáltam Caco-2 sejtvonalon. A kísérlet eredményei alapján a Carbopol koncentrációja és a kezelés utáni sejtleletképeség között nem található összefüggés. A legmagasabb sejtleletképeséget a Noveonnal kezelt sejtek esetében tapasztaltam, de egyik polimer sem bizonyult toxikusnak.

A szilimariból, illetve a szilimarin-ciklodextrin zárványkomplexekből és a Carbopolokból összesen 20 különböző összetételű tablettát készítettem kézi tablettázógéppel. Ezek fizikai paramétereit az Európai Gyógyszerkönyv 9. kiadása szerint a tömegegységesség, a kopási veszteség és a törési szilárdság vizsgálataival ellenőriztem. Minden formuláció megfelelt a Gyógyszerkönyv által meghatározott követelményeknek mindhárom vizsgálat esetében, ezek alapján mind a tabletták összetétele, mind az előállítási módszer alkalmasnak bizonyult.

Hidrofil mátrixtablettákba inkorporált szilimarin kioldódása mesterséges bélnedvben elnyújtottnak és egyenletesnek bizonyult mind a négy Carbopol típus esetében. A legnagyobb mennyiségű hatóanyag a Carbopol 971P és Noveon polimerekből szabadult fel. A vizsgálat igazolta azon hipotézisemet, miszerint a Carbopolok megfelelő alapot jelentenek szilimarin hatóanyagú, nyújtott hatóanyag-leadású hidrofil mátrixtabletták formulálásához

A különböző ciklodextrinekkel komplexált szilimarint tartalmazó mátrixtabletták kioldódása mesterséges bélnedvben hasonlóan egyenletes és elnyújtott volt, az összesen 16 különböző összetétel között azonban lényeges eltérések mutatkoztak a felszabadult farmakon teljes mennyisége között. Míg a zárványkomplexet képző ciklodextrin származékok között nem látszott különbség, az egyes Carbopolok esetében azonban igen. A kioldódási görbék összehasonlítása után két Carbopolt (Noveon és Carbopol 974 PNF) tudtam kiválasztani, amelyekből a vizsgálat 780 perce alatt a legnagyobb mennyiségű szilimarin szabadult fel.

Az 1,2 pH-jú mesterséges gyomornedvben HPBCD-vel komplexált szilimarint tartalmazó hidrofil mátrix tabletták kioldódását vizsgáltam. A farmakon felszabadulása ebben az esetben is elnyújtott és egyenletes volt, ugyanakkor lényegesen lassabb, mint a mesterséges bélnedvben. A 780 perces vizsgálat végére a hatóanyagnak legfeljebb mindössze 37%-a oldódott ki. Az alacsony pH-n lényegesen kisebb mértékű kioldódás a Carbopol-mátrixból az

orális terápiára nézve kedvező tulajdonság, így ugyanis kevesebb hatóanyag szabadul fel a gyomorban, a farmakonliberáció elsősorban a vékonybélben történik.

A szilimarin-ciklodextrin zárványkomplexeket tartalmazó, összesen 16 különböző összetételű tablettát változó pH-jú kioldóközegben is vizsgáltam. Ebben az esetben a kísérlet első órájában a médium mesterséges gyomornedv volt, amit ezután lecseréltem mesterséges bélnedvre, amelyben további 6 órán keresztül folytattam a kísérletet, így próbálva *in vitro* módszerekkel minél jobban modellezni a humán gasztrointesztinális rendszerre jellemző pH-viszonyokat. A kioldódási vizsgálatok alapján két formulációt tudtam kiválasztani, amelyek a lehetséges terápiás felhasználás szempontjából a legkedvezőbb tulajdonságokat mutatták: a metilált béta-ciklodextrinnel kombinált Carbopol 974 PNF-et, illetve Noveont.

A két kiválasztott formuláció kioldódási görbáját összehasonlítottam egy kereskedelmi forgalomban kapható konvencionális szilimarin keményszselatin kapszula kioldódási görbéjével. Utóbbi esetében a szilimarin kioldódása egy óra után elérte a maximumot, a mátrix tabletták nyújtott hatóanyag-leadása 6 órával a kísérlet kezdete után is tartott. A ciklodextrinekkal történő komplexálás növelte a hatóanyag oldhatóságát, így jobb kioldódást eredményezett.

A legalkalmasabbnak talált tablettáformuláción elvégzett MTT teszt magas sejtelétképességi értékeket mutatott, igazolva a tabletták biztonságos alkalmazhatóságát.



## 5. Összefoglalás

Doktori tanulmányaim során növényi hatóanyagok biohasznosulásának növelésével foglalkoztam. A célom az volt, hogy olyan modern gyógyszerleadó rendszereket formuláljak, amelyekkel a szárított növényi részeknél vagy a száraz kivonatoknál jobban ki lehet használni a fitofarmakonok hatását, olcsón és egyszerűen előállíthatók megfelelő minőségben, orális bevitelük könnyű, és nem citotoxikusak.

A kutatómunka első részében görögszéna száraz kivonatából készítettem SEDDS formulációkat különböző tenzidek felhasználásával. A vizsgálatok alapján a megfelelő összetétellel elérhető stabil mikro- vagy nanoemulziós rendszer, amely megfelelő antioxidáns hatással rendelkezik, és a növényi komponensek lényegesen nagyobb mennyiségben szívódnak fel belőle, mint az egyszerű kivonatból a bélhámsejteken. Továbbá könnyen tölthető kemény zselatin vagy HPMC kapszulába, ezáltal egyszerűen adagolható, és nem citotoxikus. Ezzel a megoldással egy jobb biohasznosulású formulációhoz jutottam, mely hatékonyabbá teheti elsősorban a diabétesz és az inzulinrezisztencia megelőzését és kezelését egy természetes, komplex fitofarmakon tartalmú növényi hatóanyag segítségével.

A kutatómunka második részében máriatövisből kivont szilimarinból készítettem Carbopol alapú hidrofil mátrix tablettákat, ezt a technológiát ciklodextrinekkal történő molekuláris kapszulázással is kombináltam. Így a vizsgálataim alapján a gyógyszerkönyvi követelményeknek megfelelő tabletták készíthetők, melyekkel biztosított a hatóanyag elnyújtott és egyenletes kioldódása a humán gasztrointesztinális rendszer pH viszonyai között, de elsősorban a vékonybélben, magasabb pH-jú környezetben. A módosított hatóanyag-leadás és a jobb oldhatóság együttesen jobb biohasznosulást eredményezhet. A tabletták és a mátrixalkotó polimerek bélhámsejtekre nem toxikusak, bevitelük egyszerű, és a konvencionális gyógyszerformákhoz képest lényeges terápiás előnnyel rendelkeznek.

## 6. A jelölt értekezés témájában közölt publikációi



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/389/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sinka Dávid Zsolt

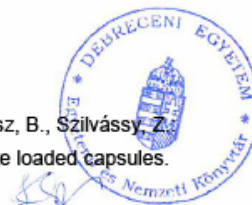
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. 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: 4.927 (2021)
2. Sinka, D. Z., Hagymási, A., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Jurca, T., Németh, S., Popa, D. E., Bácskay, I.: Critical Evaluation of Modified-Release Formulation Containing *Silybum Marianum* Extract for Oral Application. *Farmacia*. 67 (5), 806-819, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.31925/farmacis.2019.5.9>  
IF: 1.607

### További közlemények

3. Haimhoffer, Á., Vasvári, G., Budai, I., Béres, M., Deák, Á., Németh, N., Váradi, J., Sinka, D. Z., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: In Vitro and In Vivo Studies of a Verapamil-Containing Gastroretentive Solid Foam Capsule. *Pharmaceutics*. 14 (2), 1-18, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14020350>  
IF: 6.525 (2021)
4. Bácskay, I., Sinka, D. Z., Józsa, L., Vasas, G., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Juhász, B., Szilvássy, Z.: Formulation and investigation of turmeric extract and sodium benzoate loaded capsules. *Acta Pharm Hung*. 91 (1), 11-20, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.33892/aph.2021.91.11-20>





5. 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: 6.525
6. Józsa, L., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., **Sinka, D. Z.**, Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szabó, J., Kalló, G., Vasas, G., Bácskay, I., Fehér, P.: Formulation of Creams Containing Spirulina Platensis Powder with Different Nonionic Surfactants for the Treatment of Acne Vulgaris.  
*Molecules*. 25 (20), 1-23, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204856>  
IF: 4.411
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. Hegedűs, C., Muresan, M., Badale, A., Bombicz, M., Varga, B., Szilágyi, A. T., **Sinka, D. Z.**, Bácskay, I., Popoviciu, M., Magyar, I., Szarvas, M. M., Szöllősi, E., Németh, J., Szilvássy, Z., Pallag, A., Kiss, R.: SIRT1 Activation by Equisetum Arvense L. (Horsetail) Modulates Insulin Sensitivity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats.  
*Molecules*. 25 (11), 2541-2561, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25112541>  
IF: 4.411
9. Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Horváth, L., Budai, I., Trencsényi, G., Béres, M., Dobó Nagy, C., Váradi, J., Bácskay, I., Ujhelyi, Z., Fehér, P., **Sinka, D. Z.**, Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: Development and Characterisation of Gastroretentive Solid Dosage Form Based on Melt Foaming.  
*AAPS PharmSciTech*. 20 (7), 1-11, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-019-1500-2>  
IF: 2.401





10. Vasvári, G., Csontos, B., Sovány, T., Regdon, G. J., Bényei, A., Váradi, J., Bácskay, I., Ujhelyi, Z., Fehér, P., **Sinka, D. Z.**, Nguyen, T. L. P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: Development and Characterisation of Modified Release Hard Gelatin Capsules, Based on In Situ Lipid Matrix Formation.  
*AAPS PharmSciTech.* 19 (7), 3165-3176, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-018-1146-5>  
IF: 2.608
11. 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>

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,826**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
6,534**

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

Debrecen, 2022.08.15.



## **7. Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Bácskay Ildikó dékánhelyettes és tanszékvezető asszonynak a szakmai iránymutatásért és kutatómunkám koordinálásáért, valamint hogy bekapcsolódhattam a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végzett munkába.

Köszönettel tartozom Dr. Fehér Pálmának, akitől már TDK hallgatóként rengeteg segítséget és támogatást kaptam, melyek hatására diplomám megszerzése után a tudományos élet felé vettem az irányt.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Vecsernyés Miklós Dékán Úrnak, hogy lehetőséget biztosított a tudományos munka végzésére a Gyógyszertechnológiai Tanszéken.

Köszönetet mondok a Gyógyszertechnológiai Tanszék valamennyi munkatársának, és a publikációk társszerzőinek a közös munka során nyújtott önzetlen segítségükért és támogatásukért.

