

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Gyógyszerészeti tartósítószeres biokompatibilitási vizsgálata különböző sejt kultúrák modell rendszereken

Dr. Nemes Dániel

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

„Amit az ember átlátni s megismerni fáradság nélkül nem tud, azt közönségesen inkább azoknak tulajdonítja, mely apárúl fiúra, mint valamely igazság, axiómaképp ment át; mintsem annak józan s egészséges létét vagy nemlétét önerejével vizsgálná meg; inkább a régi szokás göröncsös útján izzad élte fogytáig, mintsem pillanatokig eszét fárasztaná egy kissé jobb szisztéma és simább út feltalálása végett.”

Gróf sárvárfelsővidéki Széchenyi István: *Hitel 1830, Pest*

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke:	4
I. Bevezetés	7
II. Irodalmi áttekintés	9
II./1. Folyékony, orális gyógyszerformák tartósítószeri	9
II./2. Parabének	11
II./3. Szorbátok.....	13
II./4. Parabének, szorbátok mikrobiális vonatkozásai	14
II./5. Citotoxicitási vizsgálatok, az MTT-teszt	15
II./6. A Neutral Red-teszt.....	17
II./7. A Caco-2 sejtvonala.....	20
II./8. <i>Galleria mellonella</i> , mint modellszervezet:.....	20
III. Célkitűzés	24
IV. Anyagok és módszerek	26
IV/1. Kísérletek során felhasznált anyagok	26
IV./2. Sejttenyésztés módszertana, anyagai	26
IV./3. Sejtéletképességi vizsgálatok	27
IV./4. <i>Galleria mellonella</i> lárva befecskendezéses kísérletek	28
IV./5. Antimikrobiális vizsgálatok.....	28
IV./6. Izopropil-szorbát szintézise, tisztítása	29
IV./7. Áramlási citometriás mérések	30
IV./8. Kromatográfias mérések.....	31
IV./9. Statisztikai analízis	31
V. Eredmények.....	33
V./1. Egyszerű segédanyag-tartósítószer interakciók vizsgálata.	33
V./2.. Tartósítószer-segédanyag citotoxicitási és antimikrobiális interakciók vizsgálata komplex koszolvens rendszerekkel.....	35
V./2.1. Tartósítószer-segédanyag citotoxicitási interakciók vizsgálata komplex koszolvens rendszerekkel.	35
V./2.2. Tartósítószer-segédanyag antimikrobiális interakciók vizsgálata komplex koszolvens rendszerekkel	38
V./3. Szorbát, benzoát és propionát sók citotoxicitási vizsgálata.	43
V./4. Különböző szorbinsav származékok biokompatibilitási és antimikrobiális vizsgálata 45	
V./4.1. Különböző szorbinsav származékok biokompatibilitási vizsgálata	45
V./4.2. Különböző szorbinsav származékok antimikrobiális vizsgálata	49
V./5. Különböző illóolaj tartalmú emulziók formulációja, biokompatibilitási és antimikrobiális vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal	51
V./5.1. Különböző illóolaj tartalmú emulziók biokompatibilitási vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal	53
V./5.2. Különböző illóolaj tartalmú emulziók antimikrobiális vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal	56
V./6. Különböző parabének citotoxicitási és antimikrobiális vizsgálata.	59
V./6.1. Különböző parabének citotoxicitási vizsgálata.	60
V./6.2. Különböző parabének antimikrobiális vizsgálata.....	61
VI. Megbeszélés	64
VII. Összefoglalás	71
VIII. Conclusion.....	72
IX. Hivatkozások.....	73
Tárgyszavak	93

Anyagi támogatás	94
Köszönetnyilvánítás	95
Függelékek	97
Publikációs lista, disszertáció alapját képző közlemények	101

Rövidítések jegyzéke:

- MTT** – 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid, CAS: 298-93-1
- NR** – 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid, Neutrálvörös festék, CAS: 553-24-2
- Caco-2** – Cancer-coli 2, humán colorectális immortalizált adenocarcinóma sejtvonal
- parabén** – *p*-hidroxi-benzoésav (CAS: 99-96-7) alkil észterei
- PBS** – phosphate buffered saline, fiziológiás sóoldat foszfát pufferrel
- Ph. Eur.** – Pharmacopoeia Europaea, Európai Gyógyszerkönyv.
- FoNo** – Formulae Normales, Szabványos Vényminták
- Ph. Hg.** – Pharmacopoeia Hungarica, Magyar Gyógyszerkönyv
- OGYÉI** – Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet
- MIC** – minimum inhibitory concentration, minimum gátló koncentráció
- OECD** – Organisation for Economic Co-operation and Development, Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet
- NAD(P)H** – nikotinamid-adenin-dinukleotid-(foszfát)
- MTS** – 5-[3-(karboximetoxi)fenil]-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2-(4-szulfopenil)-2H-tetrazólium só, CAS: 138169-43-4
- XTT** – 2,3-bisz(2-metoxi-4-nitro-5-szulfopenil)-5-[(fenilamino)-karbonil]-2H-tetrazólium só, CAS: 111072-31-2
- WST** – Water Soluble Tetrazolium, vízoldható tetrazólium
- NRU** – neutral red uptake, neutrálvörös felvétel
- NRR** – neutral red release, neutrálvörös leadás
- ATP** – adenzin-trifoszfát, CAS: 56-65-5
- LDH** – laktát-dehidrogenáz
- DMSO** – dimetil-szulfoxid, CAS: 67-68-5
- DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Dulbecco által módosított Eagle féle tápközeg
- MEM** – Minimal Essential Medium, minimális esszenciális tápközeg
- EDTA** – etilén-diamin-tetraecetsav, CAS: 60-00-4
- EUCAST** – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antimikrobiális Érzékenység Tesztelésével
- PES** – poli(éter-szulfon)
- SEM** – standard error of the mean, az átlag standard hibája

ANOVA –analysis of variance, varianciaanalízis

HLB – hydrophilic-lipophilic balance, hidrofil-lipofil egyensúly

CFU – colony forming unit, telepkepző egység

RPM – rotation per minute, másodpercenkénti fordulatszám

DLS – dynamic light scattering, dinamikus fényszórás

HPLC – high-performance liquid chromatography, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

IC₅₀ – inhibitory concentration 50, inhibitorikus koncentráció 50

SEDDS – self-emulsifying drug delivery systems, önemulgeáló gyógyszerhordozó rendszer

LD₅₀ – lethal dose 50, halálos dózis 50

n.sz. – nem szignifikáns

I. Bevezetés

Mi is a tartósítás? Maga a fogalom sokféleképpen értelmezhető. Elsősorban szerves, de akár szervetlen anyagok mikrobiológiai vagy kémiai bomlásának megelőzésére tett lépéseket jelent, hiszen ugyanúgy tartósításnak hívjuk az egyszerű befőttkésztést, mint a mumifikálást, de akár egy festmény állagmegóvását is. Doktori értekezésem témája ugyanakkor egy ennél jóval szűkebb területet, az antimikrobiális tartósítószerüket foglalja magába, azon belül is a bevételre szánt, folyékony gyógyszerformákban (és étrendkiegészítőkben) előforduló vegyületeket. Ezen szerek pontos funkcióját könnyebb megérteni, ha a latin nyelvhez nyúlunk vissza. A tartósítószerüket angol „preservative”-nek hívja, magára a tartósításra, mint műveletre pedig „preservation/conservation”-ként találhatunk rá a nemzetközi szakirodalomban. Ezen szavak a latin „servō” azaz „tartani, figyelni, őrizni” ige és a „con-” azaz „együtt”, illetve a „pre-” azaz „előtt, elé” előtagok összetételéből keletkeztek.¹

Ez az etimológiai háttér megvilágítja, hogy mik a legfőbb különbségek egy tartósítószer és egy antibiotikum, fertőtlenítőszer vagy egyéb gyógyászatban alkalmazott antimikrobiális szer között. Amíg a felsorolt szerek fő célja, hogy adott mennyiségben, adott idő alatt elpusztítsanak minden elérhető vagy arra érzékeny kórokozót (legyen az egy műtéti bőrfelület vagy egy fungális eredetű agyhártyagyulladás), addig a tartósítószerüknél megkövetelt a széles hatásspektrum (*előre* fedjen le minden lehetséges mikróbát), a stabilitás (a termék folyamatos *őrzése*), ugyanakkor elegendő -cid hatás helyett, a -sztatikus is (*együtt tartani* a készítményt a kezdeti csíraszámmal).² Egy gyógyszer fejlesztése során kiemelt figyelmet fordítunk a hatóanyag sajátosságaira (hidrolízis, fotolízis, termolízis, oldékonyság stb.). Ugyanakkor a tartósítószerüknek változatos körülmények (pH, egyéb segédanyagok stb.) között is hatékonyak kell lenniük, nem nehezíthetik a termék fejlesztését sajátos tulajdonságaikkal és nem léphetnek nem kívánatos interakcióba a termék más összetevőivel.^{3,4} Szándékosan választottam a termék kifejezést, hiszen a kísérleteim során használt anyagok (parabének, szorbátok, benzoátok, propionátok) nemcsak a gyógyszeriparban, hanem az élelmiszer- és kozmetikai iparban is elterjedtek, mindennap érintkezésbe kerülünk velük a reggeli fogmosástól kezdve az esti hidratáló arckrém használatáig.

Habár több évtizede használatban vannak ugyanazok a vegyületek, mégsem mondhatjuk azt, hogy a velük kapcsolatos tudományos szakirodalom könyvtárakat tölthetne meg. A tartósítószerük nem állnak a tudományos érdeklődés középpontjában, a velük foglalkozó publikációk általában alacsony idézettséggel bírnak. Azonban, ahogyan az később olvasható, a legtöbb tartósítószer esetén nem ismert a pontos antimikrobiális hatásmechanizmus és egyes

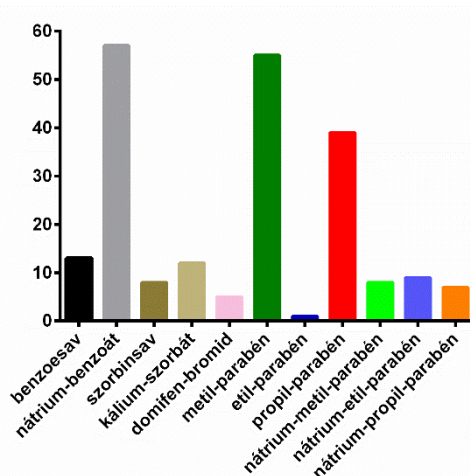
tanulmányok mind a mai napig új (általában nem kívánatos) biológiai hatásokra tudnak rávilágítani.⁵ Miközben a hagyományos szintetikus kémia az antibiotikumok területén egyre lassabban tud új vegyületeket felmutatni és lázasan folyik a keresés új, természetes eredetű antibiotikum csoportok után, az ismert és alkalmazott tartósítószer kovalens módosítására, új tartósítószer fejlesztésére rendkívül kevés példát találunk^{6,7} A természetes tartósítószer kivételt képeznek, azonban a benzalkónium-alternatívájaként mind a mai napig új vegyületként hirdetett polyquad vagy SofZia[®] is múlt századbeli illetve 2007/2008-as felfedezésűek.⁸⁻¹⁰

Az aktív szintetikus kémiai fejlesztések elmaradása és a tudományos érdeklődés hiánya miatt rengeteg felderítetlen szerkezet-hatás összefüggés és segédanyag-segédanyag interakció vár még leírásra a tartósítószer tématerületén belül. Emiatt doktori munkám során tartósítószer kölcsönhatásait (parabének-nyákok/tenzidek; parabének-koszolvensok/tenzidek; tartósítószer-illóolajok) és kémiai struktúráját (szorbátok-szorbátészterek; elágazó-nyílt láncú parabének, szorbátok/propionátok/benzoátok só hatása) vizsgáltam a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén gyógyszer technológiai formuláció, *in vitro/in vivo* toxicitás és külső segítséggel végzett antimikrobiális vizsgálatok révén.

II. Irodalmi áttekintés

II./1. Folyékony, orális gyógyszerformák tartósítószerrei

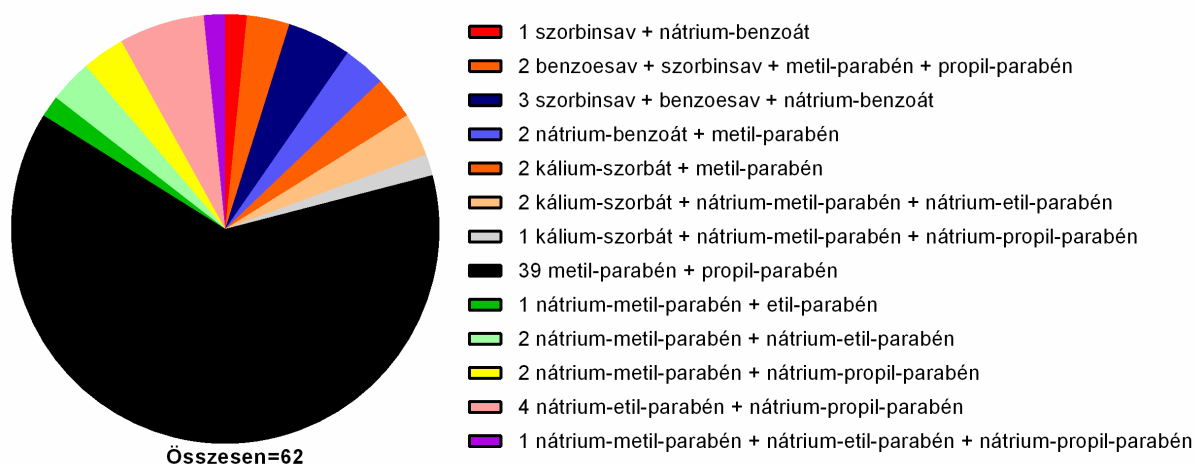
Az Európai Parlament és Tanács 1333/2008/EK rendeletének definíciója szerint a tartósítószer „olyan anyagok, amelyek a mikroorganizmusok okozta romlás megakadályozásával meghosszabbítják az élelmiszerek eltarthatóságát, és/vagy védelmet biztosítanak a kórokozó mikroorganizmusokkal szemben”.¹¹ Alapvető tény, hogy a vizes közeg kedvez a különböző mikroorganizmusok növekedésének, ezért az élelmiszerek mellett többadagos, akár ízjavítóként cukrokat is tartalmazó gyógyszerkészítményeket, étrendkiegészítőként forgalmazott termékeket is szükséges tartósítani. Történetileg visszatekintve, a FoNo. I. kiadásában az egyetlen tartósított, bevételre szánt készítmény a *Mixtura sedativa compositus* volt, mely nátrium-benzoátot tartalmazott.¹² A FoNo. III. kiadásában lehet először találkozni a metil-parabénnel, mint a *Solutio ophthalmica zinci sulfurici* komponense.¹³ Az 1954-es Ph. Hg. V-ben jelent meg a ma is ismert *Solutio conservans*, mely 20 m/m% metil-parabént tartalmazott, ez csökkent a későbbiekben a jelenleg is hivatalos 10 százalékra.¹⁴ Ezek után az addig túlnyomórészt tartósítószer nélküli vagy egyéb szerrel tartósított FoNo.-ban illetve gyógyszerkönyvekben hivatalos készítmények egyre szélesebb körének receptúrájában jelent meg a tartósító oldat, nem csak a folyadékok, hanem a kenőcsök között is. A ma érvényes előiratok szinte mind a metil-parabén tartalmú *Solutio conservans*-t tartalmazzák, kivételt jelent a 2/2013 MAG közlemény 3. része által érvényben lévő *Sirupus simplex*, ami szorbinsavat tartalmaz illetve a szemészeti felhasználásra szánt készítmények melyek tiomerzált vagy benzalkónium-kloridot (ideértve az állatorvosi FoNo.-ban szemészeti indikációval rendelkező FoNo. VII.-es *Solutio acidi borici* 2%-ot).¹⁵⁻¹⁷



1. ábra: Törzskönyvi engedéllyel rendelkező gyógyszerek tartósítószerrei gyakoriság alapján, az OGYÉI gyógyszeradatbázisában található alkalmazási előiratok alapján. A keresésbe bevont gyógyszerformák: belsőleges emulzió, belsőleges emulziós csepp, belsőleges oldat, belsőleges oldatos csepp, belsőleges szuszpenzió, granulátum,

granulátum belsőleges szuszpenzióhoz, koncentrátum belsőleges szuszpenzióhoz, szájnyalvagykahártyán alkalmazott oldatos spray, szirup, por belsőleges szuszpenzióhoz, pezsgőtabletta, por belsőleges oldathoz, lágy kapszula. Az egyes gyógyszerformákhoz tartozó készítmények alkalmazási előírata egyesével lett átnézve. A különböző kategóriákban összesen 164 készítményben volt tartósítószer, és a szerek a különböző kombinációk miatt összesen 230-szor fordultak elő. Egy készítmény több hatáserősségű változatát külön számoltam. Saját gyűjtés, mely a 2021. márciusi állapotokat tükrözi.

A ma, Magyarországon törzskönyvezett készítményekben előforduló mikrobiológiai tartósítószerekről készített saját gyűjtésemet mutatja be az 1. ábra, amin látható, hogy négy nagy csoportba sorolhatóak a törzskönyvezett gyógyszerek tartósítószerei. A leggyakoribbak valamilyen *p*-hidroxi-benzosav alkil észter vagy ezek nátrium sói. A 230 tartósítószer előfordulás 58,2%-át 135-öt adtak (metil-parabén: 63, etil-parabén: 1, propil-parabén: 41, nátrium-metil-parabén: 12, nátrium-etil-parabén: 10, nátrium-propil-parabén: 8) a parabének. Második legnagyobb csoport a benzoátoké 70 előfordulással, 30,2%-os aránnyal (benzoosav: 13, nátrium-benzoát: 57). Ezután következik húsz alkalommal valamilyen szorbát (8,6%; szorbinsav: 8 kálium-szorbát: 12), míg a kationos felületaktív anyagokat a domifen-bromid képviseli egy termékcsalád több hatáserősségében, négy illetve egy másik készítményben egy alkalommal.



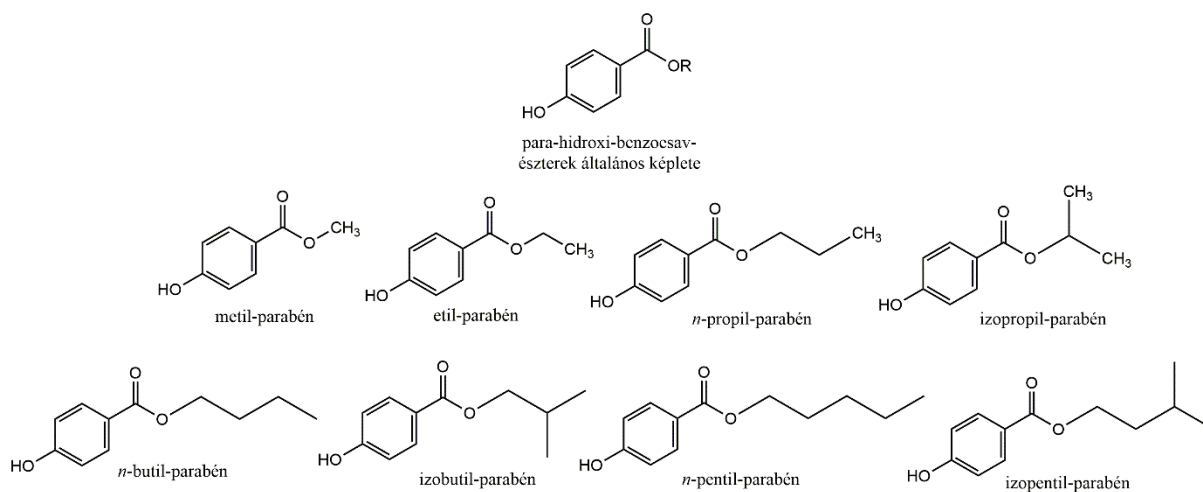
2. ábra: Törzskönyvi engedéllyel rendelkező gyógyszerek tartósítószer kombinációi az OGYÉI gyógyszeradatbázisában található alkalmazási előíratok alapján. A keresésbe bevont gyógyszerformák: belsőleges emulzió, belsőleges emulziós csepp, belsőleges oldat, belsőleges oldatos csepp, belsőleges szuszpenzió, granulátum, granulátum belsőleges szuszpenzióhoz, koncentrátum belsőleges szuszpenzióhoz, szájnyalvagykahártyán alkalmazott oldatos spray, szirup, por belsőleges szuszpenzióhoz, pezsgőtabletta, por belsőleges oldathoz, lágy kapszula. Az egyes gyógyszerformákhoz tartozó készítmények alkalmazási előírata egyesével lett átnézve. A különböző kategóriákban összesen 164 készítményben volt tartósítószer, ebből 62 tartalmazott legalább 2 tartósítószert. Egy készítmény több hatáserősségű változatát külön számoltam. Saját gyűjtés, mely a 2021. márciusi állapotokat tükrözi.

Ahogy az a 2. ábrán is látható, ha több tartósítószer is része egy készítménynek, akkor az az esetek döntő többségében két vagy több parabént jelent. Nagyon alacsony a parabént nem tartalmazó variációk száma és szintén ritka valamilyen parabén együttes jelenléte más vegyületcsaláddal, illetve felületaktív szer sehol sem szerepel.

Az alábbiakban a disszertációmban több kísérletben is vizsgált *p*-hidroxi-benzoosav észterek és a szorbátok szakirodalmi áttekintése következik, a jelenleg hatályos európai

jogsabályok és tudományos publikációk alapján, a felhasználás, biztonságosság és mellékhatások tekintetében.

II./2. Parabének



3. ábra: A disszertációban vizsgált parabének szerkezeti képletei és a vegyületsorozat általános képlete. Az ábrát ChemDraw Professional 17.0 szoftverrel szerkesztette dr. Kelemen Viktor kollégám.

A para-hidroxi-benzoésav észterei a parabének, melyek antimikrobiális hatása és tartósítószerként való alkalmazása már az 1950-es évek óta ismert.^{18,19} Rengeteg különböző szerkezetű funkciós csoport észtereshítheti a kiindulási vegyületet, de léteznek kálium sók vagy deuterizált vegyületek is.²⁰ Habár manapság főleg szintetikus úton állítják elő őket, több különböző fajban találtak már parabéneket, így növényekből vagy baktériumokból is izolálták őket.^{21,22} Viszonylag egyszerű szerkezetük miatt rengeteg faj metabolitjának számítanak, sőt természetes forrásokból még új módosulatokat is azonosítottak az elmúlt években.²³ Ahogy azt a hazai példákon keresztül is bemutattam, a múlt század közepén terjedtek el széles körben, mint tartósítószer, hiszen a mikrobiológiailag hatékony koncentráció tartományban íztelenek, szagtalanok, kémiai alapvetően stabilak.¹⁹ Előnyös tulajdonságaik mellett minden felhasználási területükön (gyógyszerek, élelmiszerek kozmetikai termékek) jellemző, hogy kombinációban alkalmazzák őket.²⁴ A parabének antimikrobiális hatásáról elmondható, hogy fajoként kell meghatározni a MIC értéket, nem lehet általánosan lefedni a vegyületcsalád spektrumát, mivel egyformán találunk rezisztens és érzékeny fajokat a gombák, a Gram pozitív és a Gram negatív baktériumok köréből is.²⁵ Toxikológiai szempontból releváns, hogy az Európai Parlament és Tanács kozmetikai termékekről szóló 1223/2009/EK rendeletének parabénekről szóló részét az utóbbi évtizedben kétszer is szigorították.²⁶ A két szigorítás törölte a felhasználható származékok közül az izobutil-, izopropil-, fenil-, benzil- és pentil-parabént és ezek sóit valamint csökkentette megmaradt vegyületek maximálisan alkalmazható koncentrációját.^{27,28} Élelmiszeripari segédanyagként csak a metil- illetve az etil-parabén illetve

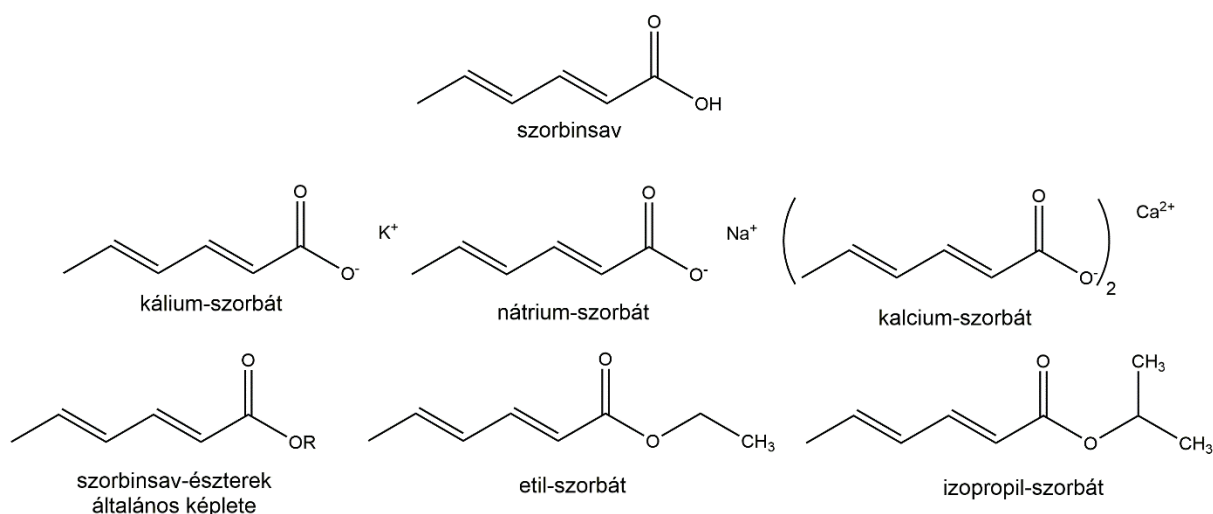
ezek nátrium sói alkalmazhatóak.¹¹ Minek köszönhető az eltérő szabályozás és a 2014-ben bekövetkezett szigorítás?

A parabének káros hatásai alapvetően két nagy csoportra bonthatóak, egyrészt allergizáló, kontakt dermatitist okozó bőrön kifejtett hatásukra, másrészt a humán endokrin rendszerre gyakorolt különböző hatásaikra. 2019-ben az Amerikai Kontakt Dermatitisz Társaság az év „(non)allergene” vegyületének választotta a parabéneket és részletes szakirodalmi áttekintő cikket készített a vegyületek allergizáló, bőrproblémákat okozó hatásairól.²⁰ A parabének ilyen jellegű veszélyei valószínűleg mindannyiunk által ismertek, hiszen a különböző kozmetikumok, tisztálkodószerek már évek óta hirdetik magukat parabén mentesnek, mint egyfajta marketing szlogen. A szerzők a rendelkezésre álló publikációk részletes áttekintése után arra jutottak, hogy az előző században felfedezett és veszélyessége miatt azóta monitorozott parabén allergia sokkal ritkább, mint azt gondoltuk.²⁹ Európai kutatók már felvetik annak a lehetőségét is, hogy elhagyják a normál bőrgyógyászati allergén tesztelés vegyületei közül ezeket az észtereket (a tesztelés általában több, különböző szerkezetű parabén keverékével történik).³⁰ Ezen folyamatok mögött azonban különböző hatások állnak. Egyfelől az érzékenyebb módszerek, a betegek többszöri, alaposabb tesztelése miatt, ma már pontosabban meg lehet állapítani, hogy valaki valóban allergiás tüneteket produkál-e. Ugyanakkor a kezdeti tudományos eredmények miatt a különböző kozmetikai (és egyéb) termékekben szabályozva lett a parabének maximális koncentrációja és napjainkban valóban alacsonyabb az a mennyiségű érzékenyítő anyag, amivel kapcsolatba kerülünk, így ez is okozhatja a javuló statisztikai eredményeket. Fontos tudni azonban, hogy ezzel párhuzamosan más, alternatív kozmetikai tartósítószer allergiás incidenciája nőtt, így a parabének negligálásával veszélyesebb vegyületek használata felé terelhetik az ipart a jogalkotók és a közvélemény.^{20,30} Ugyanakkor az érzékeny, sérült bőrfelületek, nyílt sebek kezelésére használt termékekben lévő parabének könnyebben felszívódnak, váltanak ki allergiás reakciót.³¹

A parabének biztonságosságát az endokrin rendszerre gyakorolt hatásuk kérdőjelezi meg igazán. Az előbb említett szakirodalmi összefoglaló szerzői egy másik, parabének toxikológiájával kapcsolatos áttekintőt is írtak, mely részletezi a jelenleg is rendelkezésre álló kutatási eredményeket.³² 1997-98-ban jelentek meg az első tudományos tanulmányok, melyek *in vitro* receptorkötődési és *in vivo* állatkísérletek alapján kimutatták a vegyületcsoport gyenge kötődési készségét ösztrogén receptorokhoz.^{30,31} A szerkezet-hatás kapcsolatot gyorsan kimutatták és egyértelmű összefüggést találtak a hidrofób jelleg és a receptoraffinitás között, de a leggyakrabban alkalmazott rövid, nyílt láncú származékok aktivitását minimálisnak találták.^{35,36} Ennek ellenére viszonylag sok tanulmány kezdett el foglalkozni a parabének és az

endokrin rendszer összefüggéseivel, a vegyületek toxikológiájával, az expozíció mértékével. Sikerült parabéneket visszamérni gyógyszerek használata után a vizeletből, anyatejből, gyermek zoknikról, élelmiszerekből és a szennyvízből is.³⁷⁻⁴¹ Állatkísérletekben bizonyították, hogy az anyának beadott parabének az utód patkányok szociális viselkedését, a hímivarszervek fejlődését is befolyásolják.^{42,43} Emberek esetén kimutatták, hogy parabének főként a vizelettel ürülnek, azonban a parabént tartalmazó termékek elhagyása után még 3 napig kimutathatók a parabének, továbbá összefüggés van a nők vizeletének parabén tartalma és a menstruációs ciklusuk zavarai, a pajzsmirigyhormon szintjük és a gyermekeik születéskor várható súlya és fejkörmérete illetve gyermekek esetén az asztma prevalenciája között.⁴⁴⁻⁴⁸ Masztekómiából származó szövetminták 99%-ból kimutatható volt legalább 1 és 60%-ból legalább 5 észter.⁴⁹ Ugyanakkor leszögezendő, hogy a szakirodalmi adatok döntő többsége retrospektív, nem pedig tervezett klinikai tanulmány, így nem lehet kizárni más tényezők oki szerepét a felsorolt és a további megfigyelt biológiai hatások tekintetében. Megjegyzendő, hogy a receptor affinitási, aktivitási tanulmányok továbbra is sokkal kevésbé potens szernek jegyzik a parabéneket, mint más, ismert karcinogén anyagokat, például a biszfenol A-t.^{32,50} Az átlag ember széleskörű környezeti expozíciójához nem fér kétség, így mindenképpen javasolandó csökkenteni a vegyületek ipari felhasználását addig, amíg elegendő számú megbízható tanulmány nem bizonyítja a direkt összefüggést a feltételezett hatásokkal. A jelenlegi európai szabályozás (Európai Gyógyszerügynökség EMA/CHMP/SWP/272921/2012 vitairata, az Európai Bizottság SANTE-2017-11668 irányelve) szerint a parabéneket minden gyógyszer betegtájékoztatójában lehetséges allergénekként kell feltüntetni, illetve a metil-parabén esetén 0,2%, propil-parabén esetén 2 mg/ttkg/nap az elfogadható maximális koncentráció/dózis.^{51,52}

II./3. Szorbátok



4. ábra: A disszertációban vizsgált szorbátok szerkezeti képletei. Az ábrát ChemDraw Professional 17.0 szoftverrel szerkesztette dr. Kelemen Viktor kollégám.

A szorbátok, a 2,4-hexadiénsav, azaz a szorbinsav sói, észterei. Az anyamolekula nevét a madárberkenye (*Sorbus aucuparia*) latin neve után kapta, miután a fa gyümölcse gazdag a vegyületben és innen izolálták először.^{53,54} Egyszerű szerkezete miatt ez is egy, az élővilág széles körében elterjedt antimikrobiális és antioxidáns tulajdonságú vegyület.⁵⁵⁻⁵⁷ Élelmiszer és gyógyszeripari felhasználásáról tartósítószerként már 1945-től kezdve találhatóak publikációk, melyek leírták gomba ellenes hatását és toxikológiáját.^{2,58} A különböző toxicitási vizsgálatok eredményei évtizedek óta a szorbinsav és a kálium-szorbát biztonságosságát bizonyítják segédanyagként, komolyabb felmerülő aggály nélkül.⁵⁹⁻⁶² Más segédanyagokkal összehasonlítva alacsony kockázatú a vegyületcsalád.⁶³ Egy, a napi maximális dózis tízszeresével patkányokat kezelő tanulmány csak viszonylag kis mértékű máj és vese károsodást, valamint genotoxicitást tapasztalt.⁶⁴ Szintén patkányokon kísérletezve, apoptotikus és gyulladáshoz vezető mediátor gének expresszióját vizsgálva csak kifejezetten magas, az engedélyezett adagokat jóval meghaladó dózisok esetén tudtak szignifikáns különbséget találni a kontrollhoz képest.⁶⁵ Kísérletes körülmények között minimálisan gátolta nyúl tracheális cíliumainak mozgását benzalkónium-kloridhoz képest.⁶⁶ Összességében kijelenthető, hogy csak a hosszú távon, nagy mennyiségben bevitt szorbátok tudnak esetleges károsodást okozni, melynek esélye minimális.⁶⁷ Allergizáló hatásuk szintén elhanyagolható, főleg más tartósítószerrel összehasonlítva.⁶⁸ A parabénekhez hasonlóan azonban jellemző, hogy férfiak gyakrabban mutatnak bőrreakciót mindkét csoportra, mint a nők.⁶⁹ Antimikrobiális hatásukat tekintve elsősorban gombák és Gram pozitív baktériumokra hatnak.⁷⁰ A savi formát és kálium sóját engedélyezte kozmetikumok, élelmiszerek valamint állati takarmányok segédanyagaként az EU.^{11,26,71}

II./4. Parabének, szorbátok mikrobiális vonatkozásai

Mindkét vegyületcsoport pontos antimikrobiális mechanizmusa ismeretlen. Általános magyarázattal szolgál az ún. gyenge sav elmélet, ami szerint a tartósítószerként használt gyenge karbonsavak (citromsav, tejsav, benzoésav stb. és ezek sói, észterei) a sejtmembránon pH függő módon átjutnak, a citoszol semleges kémhatásán disszociálnak és elsavanyítják azt.⁷² Sejtkárosító hatásuk egyrészt az intracelluláris pH csökkentése, másrészt a savmaradék ion különböző hatásai miatt következik be.⁷³⁻⁷⁵ Alátámasztja az elméletet, hogy mindkét vegyületcsoport esetén mértek pH függést, mely valószínűleg a membránon való átjutást akadályozza, azonban mindenképpen mutatja a protonáltsági foknak és az antimikrobiális hatásnak a kapcsolatát.^{76,77} Ugyanakkor parabének esetén leírtak több, különböző hatást, így a légzési lánc és különböző ioncsatornák gátlását és membrán károsítást is.⁷⁸⁻⁸⁰ Szorbinsav esetén

is állapítottak meg a gyenge sav elméletnek ellenmondó hatásokat.^{81,82} Összességében kijelenthető, hogy a különböző eredmények nem adnak összefogó képet a vegyületek hatásmechanizmusáról, mely konzisztens szerkezetben leírná, mik azok a molekuláris támadáspontok, ahol kifejtik hatásukat. Sokkal inkább „pillanatfelvételeknek” tekintendők ezek a publikációk, amik egy-egy aspektusát világítják meg a tartósítószeres antimikrobiális hatásának, melyet remélhetőleg egy vagy több későbbi tanulmány fog egységes keretek között rendszerezni.

Parabénnal szembeni lehetséges rezisztencia útvonal a hidrolízis, majd a dekarboxiláció útján fenollá alakítás.^{83,84} Léteznek emellett speciális és általános transzporterek is.^{85,86} Szorbátok esetén is leírtak specifikus dekarboxilázokat, melyek 1,3-pentadiénné alakítják a szorbinsavat de különböző, szorbinsavra specifikus efflux pumpákat is.^{81,82} Laboratóriumi evolúció során megfigyelték, hogy egyes fajok miközben adaptálódtak a folyamatos benzoát jelenléhez, elvesztették antibiotikum rezisztenciájukat, valamint több tanulmány leírta a gyenge sav rezisztencia és a specifikus antibiotikum rezisztencia kapcsolatát.⁸⁹⁻⁹¹

Érdemes még megjegyezni a parabének és a szorbátok humán mikrobiomra gyakorolt hatásait hiszen képesek befolyásolni egyes fajok relatív gyakoriságát, illetve genetikai változást előidézni bennük.⁹²⁻⁹⁴ Állatkísérletek esetén is bizonyított, hogy a születéstől tartó, alacsony, határértékek alatti metil-parabén bevitel módosítja a kontroll állatokhoz képest a bélrendszer metagenomikai összetételét.⁹⁵

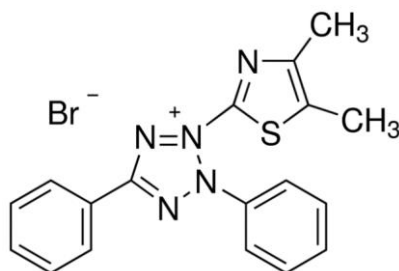
II./5. Citotoxicitási vizsgálatok, az MTT-teszt

Napjainkban erős politikai és közéleti nyomás van a kutatókon, hogy lehetőség szerint mérsékeljék a kutatások során az állatkísérletek mértékét.⁹⁶ Már az ötvenes évek végén megjelent a 3R, mint vezérelv, mely a helyettesítés (*replace*), csökkentés (*reduce*) és a tökéletesítés (*refine*) hármásával kívánta mérsékelni a tudományos célra felhasznált állatok számát és azok szenvedéseit. Ugyanakkor ezzel párhuzamosan az *in vitro* technikák továbbra sem élveznek teljes körű elfogadottságot, aktív munka folyik olyan eljárások kifejlesztésére, validálására, melyek az *in vivo* vizsgálatok számát csökkenthetik.⁹⁷⁻⁹⁹ A probléma gyökere, hogy az alapkutatásokban használt módszerek megbízhatósága és az ellenőrző hatóságok által várt megbízhatóság nem egyezik, ezért már évtizedek óta igyekeznek harmonizálni a különböző elvárásokat a kutatók.¹⁰⁰ Az OECD és az Európai Unió közreműködésével ezen munka eredményeként születtek meg 2005-ben az *in vitro* toxikológiai technikák validálásának

feltételeit előíró irányelvek^{101,102} Azóta több eljárásrend is kidolgozásra került, melyek az új szemléletet képviselő számítógépes modellezés validálására irányulnak.¹⁰³

A disszertációban alkalmazott MTT és NR tesztek az Európai Bizottság 440/2008/EK rendelete alapján vegyi anyagok biztonságosságának értékelésekor alkalmazhatóak.¹⁰⁴ A Caco-2 sejtvonal mikronukleusz vizsgálattal, megfelelő validálással az Európai Bizottság 2017/735 rendelete szerint alkalmazható genotoxicitás meghatározására.^{105,106}

Az MTT-teszt egy enzimatikusan katalizált redox reakció, mely a tetrazólium gyűrűt tartalmazó festék redukált és oxidált formájának eltérő színén alapszik. **Mosmann** fejlesztette ki proliferáció és citotoxicitás mérésre 1983-ban.¹⁰⁷



5. ábra: Az MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) szerkezeti képlete. Forrás: <https://www.sigmaaldrich.com>

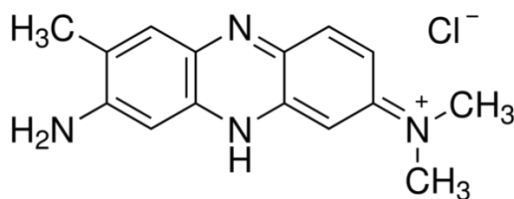
Az MTT-teszt a közvélekedéssel ellentétben direkt módon nem a sejtek mitokondriális aktivitásától függ. Gyenge pozitív töltése és hidrofób karaktere miatt a molekula átjut a sejtmembránon és a sejten belül bárhol lokalizált NAD(P)H függő oxidoreduktáz és dehidrogenáz enzimek katalizálják a reakciót, ami során a tetrazólium gyűrű felnyílik és töltését elveszti a vegyület.^{108,109} A NAD(P)H mellett egyéb elektrondonorok is szerepet játszanak a folyamatban, így például a szukcinát vagy a piruvát. Az oldhatatlan formazán só elsősorban a sejten belül raktározódik, azonban a különböző sejtvonalak esetén excitózisa is lehetséges.¹¹⁰ Az oldhatatlansága miatt végpont jelzéses az MTT-teszt, az ebből fejlesztett további tetrazólium származékok (MTS, XTT, WST-k) a sejtbe negatív vagy semleges mivoltuk miatt nem vagy csak kis mértékben jutnak be, ezért valamilyen intermedier elektron akceptorra van szükségük, ami a membrán külső oldalán lévő redukcóra képes enzimek teljesítményét megsokszorozza.¹⁰⁸ Előnyük, hogy a redukált termék vízoldható. A módszer citotoxicitás és sejtproliferáció valamint egyéb módszerekkel kombinálva a légzési lánc és a sejt oxidoredukciós kapacitásának mérésére alkalmazható. Gyors, egyszerűen kivitelezhető, hiszen a képződő formazán só koncentrációja spektrofotometriásan mérhető. Fals eredményeket olyan esetekben kaphatunk, amikor az adott vegyület nem közvetlen nekrozist vagy apoptózist okoz, hanem tartósan befolyásolja a sejt oxidoredukciós potenciálját, akár növelve, akár csökkentve azt.^{111,112} Azonban mivel több úton is képes redukálni a sejt az MTT-t, speciális enzimikus gátlószerek esetén is mérhetünk minimális átalakulást, ami arra utal, hogy a sejtek a kezelést

túléltek.¹¹³ További hátrány, hogy maga a vegyület toxikus, bőr-, szem- és tüdőirritáló hatású és feltehetően genetikai károsodást képes okozni.¹¹⁴

A 440/2008/EK rendelet B.40A. része alapján (mely egyenértékű az OECD TG 431 módszerével) *in vitro* bőrkorrózió („bőr irreverzibilis károsodása, nevezetesen vizsgálati anyag négy órán át tartó alkalmazását követően látható szövetelhalás az epidermiszen át és a dermiszben”) megállapítására alkalmas az MTT-teszt. A protokoll szerint 3D-s funkcionális *stratum corneum*-mal rendelkező rekonstruált epidermiszt tartalmazó emberi bőrmoddellre van szükség, mely feltétlenül emberi keratinocitákból áll. A különböző modellek egyedi validálást és finomhangolást igényelnek. Közös pont, hogy legalább 2 párhuzamos mérést kell elvégezni minden csoport esetén, pozitív kontrollként erősen savas vagy lúgos oldatok, a negatív kontrollként fiziológiás sóoldat vagy víz elfogadhatók. A 0,3-1 mg/ml-es MTT oldatban 3 órát tölt a bőrminta, majd izopropanollal oldják és 540 és 595 nm között mérik abszorbanciáját. A sejteletképességet a negatív kontroll százalékos arányában kell megadni (mely 100%-nak tekintendő). Egy tipikus bőrmoddellen, az EpiDerm™-en az alábbi kimeneteli eredmények lehetségesek: korrozív az anyag, ha 3 perces expozíció elteltével 50%-nál kisebb az életképesség vagy egy óra expozíció után kisebb, mint 15%. Minden más esetben az anyag nem korrozív. A különböző bőrmoddelleken egyesével kell beállítani a küszöb értékeket a korrozív hatás eldöntésére minta vegyszerek segítségével, melyek besorolása már ismert. Az Európai Bizottság 2017/735 rendelete újabb felhasználásra validálta az MTT-tesztet, *in vitro* bőrszenzibilizáció tanulmányozása esetén sejteletképesség mérésére (B.60. rész; egyenértékű az OECD 442D protokollal). Ezesetben a módszer kiegészíti a luciferáz-aktivitás mérést, kontrollként szolgál, hogy a transzfektált HaCaT keratinocita sejtek elszenvednek-e sejteletképesség csökkenést a vegyszeres kezelések hatására. A rendelet 4 órás inkubációt ír elő a festékekkel és a sejtek lizálása után 600 nm-en méret az abszorbanciát. Az MTT-teszteket a bőrkorróziós vizsgálatban előírt protokollhoz hasonlóan végeztem Caco-2 sejteken.

II./6. A Neutral Red-teszt

A neutrálvörös egy fenazin származék, melyet a sejtek fagocitózis útján vesznek fel a sejtmédiumból, 1985-ben **Borenfreund és Puerner** használták először citotoxicitás mérésére.¹¹⁵



6. ábra: A Neutral Red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) szerkezeti képlete. Forrás: <https://www.sigmaaldrich.com>

Citotoxicitás mérésére kétféleképpen használható. Egyrészt úgy, hogy a sejteket a káros behatás után kezeljük a tápfolyadékkal, melyben neutrálvörös reagenst oldottak és a felvett festék mennyiségét mérjük, a sejtek szolubilizálása után spektrofotometriásan (NRU – *Neutral Red Uptake assay*).¹¹⁶ Másrészt úgy, hogy a sejtekkel a médiumból előzetesen felvetetjük a festéket és a behatás után vizsgáljuk, hogy mennyi festéket adnak le membrán/lizoszóma károsodás következtében egy kioldó közegben, majd ezt spektrofotometriásan mérjük (NRR – *Neutral Red Release assay*).¹¹⁷ A módszer alapja, hogy a festék semleges pH-n nem vagy csak gyengén töltött, emiatt a negatív potenciálú sejtmembránon könnyen átjut, a lizoszómák erősen savanyú közegében töltötté válik és mivel a lizoszómák belső membránja töltésű így már nem tud kijutni.^{118,119} A lizoszómák savas kémhatásának fenntartása ATP működtette protonpumpákat igényel. Ezek miatt alacsonyabb sejtleletképeséget NR teszt esetén az alábbiak miatt tapasztalhatunk: 1. a sejt nekrozisa, apoptozisa, 2. sejtmembrán/lizoszóma membrán károsodása, 3. az ATP szint csökkenése vagy a protonpumpák gátlása.¹²⁰ A módszer jól kvantifikálható, gyors, egyszerű, olcsó, stabil és nem toxikus maga a festék és változatos körülmények között, sokféle sejtvonalon alkalmazható.^{121–123} Akut orális toxicitás meghatározására jó érzékenységgel, de alacsony specificitással használható, így a toxikus anyagok monitorozására alkalmas jobban.¹²⁴ Kevésbé informatív olyan anyagok esetén, melyek nem nekrozist vagy apoptozis okoznak, hanem specifikusan a lizoszómák membránját támadják, ilyenkor hamis eredmények adhat a teszt.^{125–127}

A 440/2008/EK rendelet B.41. része alapján (mely egyenértékű az OECD TG 432 módszerével) *in vitro* fototoxicitás mérésére („olyan akut toxikus reakció, amelyet a bőr előbb bizonyos vegyi anyagoknak, majd azután fénynek való expozíciója idéz elő, vagy amelyet hasonlóan, valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzása idézi elő”) a neutrálvörös felvételi teszt alkalmazható. A kísérleteket 96 lyukú plate-en nem konfluens egér fibroblaszt Balb/c 3T3 sejteken kell végezni, melyek fotoszenzitivitását folyamatosan figyelemmel kell követni. A két párhuzamos plate-en elvégzett 8 különböző koncentráció értéken vizsgált vegyszer esetén ügyelni kell rá, hogy a használt pufferek, oldószer ne legyenek citotoxikusak, ne lépjenek interakcióba a vizsgált szerrel, a fényelnyelést ne zavarják. A besugárzáshoz használt normál és szűrt napfénystimulátorokat doziméterrel kell ellenőrizni. A sejteket sötétben először 60 percig kell inkubálni a minta oldatokkal, majd 50 percig sugárzásnak kitéve, a kontroll plate ekkor is sötétben marad. 24 órával később 50 µg/ml neutrálvörös reagenst tartalmazó médiummal 3 óráig kell inkubálni a plate-eket, majd savanyított víz és etanol elegyével kell előhívni, és a rendeletben részletezett képletek segítségével kell megadni a fototoxicitás mértékét. Doktori tanulmányaim alatt az általánosan

elterjedt NR protokoll Caco-2 sejtekhez módosított verzióját alkalmaztam.¹²⁸ 2 órára rövidítettem az inkubációs időt, mivel ezek a sejtek három óra után nagymértékű festékfelvételük miatt csak a legextrémebb behatásokra mutattak sejtéletképesség csökkenést.

Az MTT- és az NR-tesztek szakirodalmi összevetéséből látszik, hogy sok különböző vegyület és sejtvonala esetén is képesek hasonló értékeket mutatni, így növényvédő szerek, e-cigaretta folyadékok, növényi kivonatok, fenolos vegyületek valamint vegyszerek széles spektrumú szűrő vizsgálata során.^{122,129-133} Ugyanakkor nem egy tanulmány számol be a két teszt eltérő eredményeiről azonos vizsgálati elrendezésben. Klorokin endotheliális toxicitásának vizsgálata során a neutrálvörös reagenst eleve csak lizoszóma festéknek használták, mivel a szerről ismert a lizoszómákat befolyásoló hatása, míg a citotoxicitást MTT-vel mérték.¹³⁴ Glikolízis inhibitorokat (2-dezoxiglükóz, 3-brómpiruvát, lonidamin) vizsgálva megállapították, hogy az MTT-teszt hamis eredményt ad más módszerekkel összehasonlítva, többek között a neutrálvörössel, mely pontosan mérte a citotoxicitást.¹¹² Rézkomplexeket vizsgálva szintén az NR-teszt bizonyult jobb pontosságúnak.¹³⁵ Nemszteroid gyulladáscsökkentőket humán vékonybél epithél sejtvonalaon vizsgálva ugyanakkor, az MTT-tesztet találták érzékenyebbnek.¹³⁶ Ugyancsak érzékenyebb volt az MTT-teszt kobalt-klorid agyi eredetű sejtvonalaon történő vizsgálata során az NR-hez képest.¹³⁷ Elektromos ellenállást monitorozó sejtéletképesség mérő módszerekkel szemben mindkét technika rosszabb eredményeket mutatott.¹³⁸ A sejtekről nem tökéletesen eltávolítható nanopartikulomok esetén a spektrofotometriás mérések során lehet hibás eredményekre számítani, az abszorbancia növekedése miatt.¹³⁹ Ugyanakkor kadmium-klorid májsejtvonalaon végzett összehasonlító citotoxicitási vizsgálatában az MTT és az NR bizonyult pontosabbnak az LDH és a totálprotein módszereknél.¹⁴⁰ Mivel a legtöbb vizsgált vegyület biológiai hatása a sejtekre nem merül ki a nekrozisban vagy az apoptózisban, mely a sejtek egyértelmű pusztulását jelentik, ezért a különböző vizsgált koncentráció tartományokban eltérő mértékben befolyásolják a kezelt sejtek homeosztázisát. Le kell szögezni, hogy a két, eltérő mechanizmussal működő sejtéletképességi teszt eltérő gyenge pontokkal (és erősségekkel) bír, így könnyen előfordulhat, hogy egy adott molekula vizsgálata esetén az egyik módszer hamis eredményt mutat. Ezért rendkívül fontos a tesztek összekötése, párhuzamos alkalmazása, mivel így kiküszöbölhető, hogy téves következtetést vonjunk le, csak egy módszerre alapozva hipotézisünket.

Mind a parabének, mind a szorbátok esetén kevés publikáció áll rendelkezésre, mely az előbb említett módszereket alkalmazta volna sejtéletképesség mérésére. Wong-Kilbourne humán konjunktivális epithél és immortalizált 10.014 pRSV-T corneális epithél sejteken a metil-parabén MTT-teszttel mérve viszonylag alacsony, 0,005-0,0075% illetve 0,0075-0,01%

közötti IC₅₀ értékeket mutatott a két sejtvonalon, mely alacsonyabb volt a benzalkónium-klorid értékeinél is.¹⁴¹ Ugyanakkor azonos módszerrel mérve, a HuGu humán gingivális fibroblaszt sejtvonalon 0,2%-os koncentráció sem okozott 50%-ot elérő sejtkárosodást.¹⁴² Vérből izolált neutrofil granulocitákon szintén MTT-teszt szerint a 0,3%-os metil-parabén sem csökkentette 20%-nál jobban a sejtéletképességet.¹⁴³ HUVEC sejtvonalon pedig 48 órával az inkubáció után állapították meg MTT-teszttel 7 µg/ml IC₅₀ értéket.¹⁴⁴ Fontos megemlíteni, hogy az egyes kísérletek eltérő protokoll szerint alkalmazták a tetrazólium gyűrű felnyílásával járó reakciót, így az eredmények összehasonlíthatósága korlátozott.

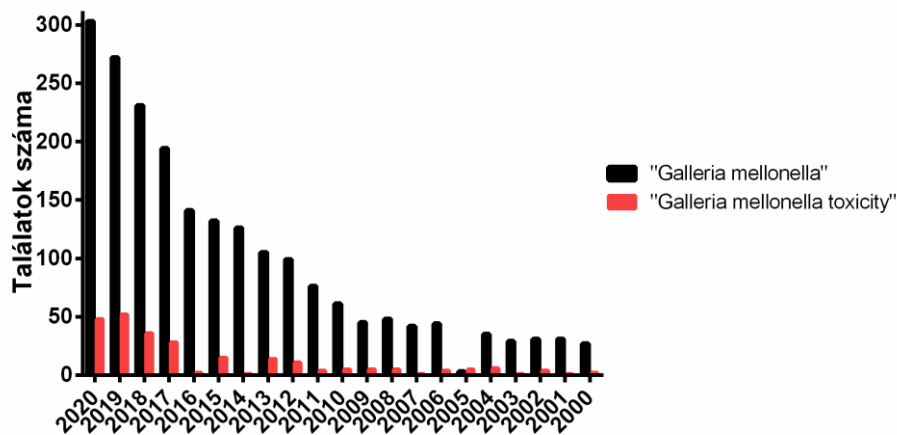
II./7. A Caco-2 sejtvonal

A Caco-2 egy 72 éves kaukázusi rasszú férfi elsődleges vastagbél daganatából izolált, epitheliális, adherens, hipertetraploid sejtvonal.^{145–147} Differenciáció során konfluens monolayert alakítanak ki és a sejtek morfológiájukat és funkcionalitásukat tekintve, a vékonybél enterocitáinak feleltethetőek meg, polarizáltak.^{148,149} A rengeteg specifikus transzporter fehérje illetve az *in vivo* körülményekhez hasonló sejt-sejt közötti kapcsolat miatt általánosan elterjedt modellrendszer sejtenyészti inzertekre szélesztve a különböző hatóanyagok, vegyületek felszívódásának vizsgálatára.^{150–152} A transzporton kívül a különböző hatóanyagok Caco-2 sejteken belüli metabolizmusának, valamint magának a Caco-2 sejteknek, mint farmakológiai célpontnak a tanulmányozása is gyakori.^{153–156} A sejtvonalat alkalmazza a mikrobiológia is, a monolayer és különböző bélrendszeri patogén vagy probiotikus fajok közötti interakció vizsgálatára, ahol a mikrobák tapadását vagy a monolayeren való átjutását, invázióját vizsgálják.^{157–159} Citotoxicitás mérésére is széleskörben elterjedt a legkülönbözőbb vegyületek, mikrobiális toxinok esetén.^{160–162} A sejtvonal hátránya, hogy a valós vékonybél hám több, egymással interakcióban álló sejtípusból épül fel, így pontos modellezésre nem képes, nem termel a vékonybélre jellemző nyálka polimereket, illetve nem tökéletesen azonosan képezi le az *in vivo* megtalálható transzportereket és enzimeket és szorosabbak a sejt-sejt *tight junction* kapcsolatok, mint *in vivo*.¹⁶³

II./8. *Galleria mellonella*, mint modellszervezet:

Az *in vitro* kísérleteknél erősebb bizonyító erővel bírnak az *in vivo*, élő szervezeteken elvégzett vizsgálatok, melyek szabályozása az Európai Unióban az Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelvén alapszik. Az irányelv kiterjed a gerinces állatokra és a lábasfejűekre és rendkívül szigorú előírásokat fogalmaz meg az érintett fajokkal kapcsolatban. A tudományos körökben a toxikológiai vagy farmakológiai tesztek legjobban elfogadott modellszervezete a rágcsáló modell, ezen belül is a patkány vagy egér modell. Gyakorlati

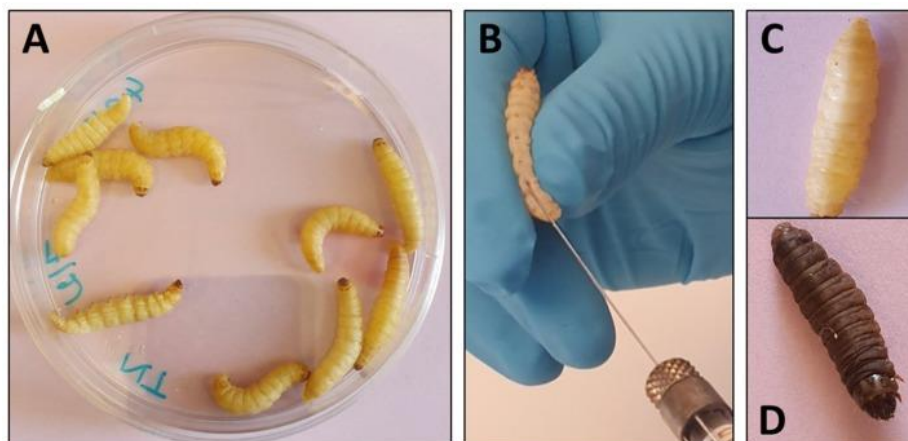
alkalmazásuk azonban számos korlátba ütközik az említett irányelv által megszabott keretek miatt. Használatuk etikai engedélyhez kötött, mely csökkenti a kutató mozgásterét, ha a kísérlet lefolyása közben szeretne a kezeléseken változtatni, továbbá jelentős adminisztratív teherrel jár már magának az engedélynek a megszerzése is. Az állatok életkörülményeinek biztosítása szintén speciális állatházat igényel megfelelő személyzettel és eszközökkel, táppal, alommal és maguk az állatok is költségesek (Sprague-Dawley hím patkányok, 250-300 g: nettó kb. 11.000 Ft, 2021. februári piaci helyzet alapján) ráadásul a saját tenyészet fenntartása is nehézkes az emlősök aránylag hosszú vemhessége és alacsony szaporulata miatt.



7. ábra: Találatok száma az adott kifejezésekre a PubMed (National Library of Medicine, Amerikai Egyesült Államok) kereső felületén. A keresés 2021.03.12-én történt, minden dokumentum típusban.

A mikrobiológia már régóta alkalmazza az azonos fajú, de különböző törzsbe tartozó kórokozók virulenciájának összehasonlítására a *Caenorhabditis elegans* fonálférget illetve a *Drosophila melanogaster* ecetmuslicát.^{164,165} Azonban ezen fajoknál előnyösebb a *Galleria mellonella*, a nagy viaszmolylárvája (hernyója), mely az előbb említett fajokkal szemben akár 37 °C-on is életképes, ezért a hőmérsékletfüggő bakteriális virulencia faktorok kifejeződését is meg lehet vele figyelni.¹⁶⁶ Ez egy növekvő népszerűségnek örvendő mikrobiológiai modellrendszer, melyet az elmúlt években kezdtek el toxikológiai vizsgálatokra alkalmazni.

A lárva mind sejtes, mind humorális immunválasszal is rendelkezik, melyek alapvető hasonlóságot mutatnak az emlősök immunrendszerének bizonyos elemeivel.¹⁶⁷ Előbbi csoportba tartoznak a hemociták, melyek különböző típusai részt vesznek a fagocitózisban, a tokképzésben és a röggképződésben, valamint homológ fehérjék vannak a humán neutrofil granulocitákkal, míg utóbbi csoportba különböző opszoninok és antibakteriális fehérjék tartoznak (lizozim, defenzinek stb.).¹⁶⁷ Az immunrendszer különös ismertetőjegye még a melanizáció, mely a lokálisan aktiválódó fenoloxidáz enzimek működésének eredményeként melanint termel, amitől a lárván az érintett területek barna foltként jelennek meg. A foltok megjelenése helyi immunreakciót, tokképződést, szöveti károsodást jelent.¹⁶⁸



8. ábra: A: Egészséges *G. mellonella* lárvák Petri-csészében. B: *G. mellonella* lárvák befecskendezése kísérleti anyaggal a bal utolsó lábánál. C: Egészséges lárva. D: Teljes testfelületen melanizált, elhullott vagy hamarosan elhulló lárva. Forrás: ¹⁶⁹

A mikrobiológiában azonban nemcsak a különböző patogének közötti különbségtételre, hanem *in vivo* terápiák, antimikrobiális szerek hatásának tesztelésére is használják, melyből egyenesen következik a különböző vegyületek toxicitás mérésének lehetősége. Jellemzően csak antibiotikumok, antifungális szerek tesztelésével foglalkoztak kezdetben, azonban hamar kiderült, hogy a lárva által mutatott relatív toxicitás arányosan hasonló az egereken vagy patkányokon megfigyelthez.¹⁷⁰ Azonban már más vegyületek, például különböző szénlánc hosszúságú ionos 1-alkil-3-metilimidazol kloridok esetén is más modellszervezetekkel összehasonlítható eredményeket kaptak.¹⁷¹ A faj ugyanakkor érzékeny a különböző oldószerekre, mint például a DMSO ezért fontos mindig az oldószerrel, formulációs közeggel is kontroll mérést végezni.¹⁷² A legújabb tanulmányok már különböző felületű lipid nanokapszulákat illetve fém nanorészecskéket vizsgáltak a lárvákban és alkalmasnak találták őket további gyógyszer technológiai formulációk tesztelésére.^{173–175} Az egyszerű mortalitás megfigyelése mellett ugyanakkor lehetőség van további információ kinyerésére az állatokból, lehet vizsgálni mozgásukat, hemocita számukat vagy szöveti léziójukat a befecskendezett anyagok hatására.^{174,176} **Loh és munkatársai** egy komplexebb kiértékelési rendszert dolgozott ki a mortalitási vizsgálatokhoz, ahol az egyes csoportokat pontozni lehet mozgási hajlandóságuk (nem mozdul, stimulációra megmozdul, stimulációra mozog, stimuláció nélkül mozog), a bábozódás mértéke (nincs gubó, részleges gubó, teljes gubó képződés) és a melanizáció (teljesen fekete a lárva, fekete és barna foltok száma, nincs melanizáció) alapján.¹⁷⁷

A gyakorlatban a kísérletek befecskendezéssel történnek általában a bal utolsó lábba egy vékony tűvel. Lehetséges még az etetés és az erőltetett etetés is, mint vegyület bejuttatási mód, azonban előbbi nem garantál biztos térfogatot, míg utóbbi munkaigényesebb. A lárvákat a különböző befolyásoló faktorok hatásának csökkentése érdekében érdemes legalább 1 napig

éheztetni, illetve kb. 10-15 °C-os hőmérsékleten hűteni. Inkubáció során kerülni kell a közvetlen fényt, mely zavarólag hat rájuk.

A faj, mint modellszervezet ugyanakkor több hátránnyal is bír. A legfontosabb, a nem teljes genom szekvenáltság és a fenotípusos variáció. Jelenleg még nem állnak rendelkezésre állandósult törzsek ismert fenotípusokkal (genotípusokkal) ellenőrzött kereskedőknél, amik mindig ugyanolyan lárvákat eredményeznek, csak egyes kistermelőktől lehet őket beszerezni, akik elsősorban eleségállatnak tenyésztik őket. Befolyásolják a lárvák reakcióját a kezelés előtti körülmények, így a hőmérséklet és az éhezés.^{178,179} Ugyanakkor ezek a tényezők jobban érintik a mikrobiológiai vizsgálatokat, mivel a két élőszervezet (a patogén és a lárva) interakcióját jobban módosítják az egyedenként eltérő gének és immunrendszer, mint az egyedek reakcióját egy-egy vegyületre. Összességében a *G. mellonella* egy új, a rágcsáló modellnél olcsóbb és egyszerűbben használható modellszervezet toxicitási vizsgálatokra, azonban jelenleg még nem érdemes közvetlenül mg/ttkg-ban kifejezett LD₅₀ értékek meghatározására használni. Ehelyett az *in vitro* toxicitási adatok kiegészítésére és az *in vivo* toxicitás előrejelzésére tudjuk használni, valamint a különböző vegyületek, formulációk egymáshoz képest mért toxicitását lehet könnyen, olcsón (20 db 2-3 cm-es lárva kb. 500 Ft, 2021. februári piaci helyzet alapján) meghatározni.

III. Célkitűzés

Doktori kutatómunkám kezdeti célja az volt, hogy a Gyógyszertechnológiai Tanszéken rendelkezésre álló, rutinszerűen végzett citotoxicitási vizsgálatok segítségével átfogóbb képet kapjak a folyékony gyógyszerformákban gyakran használt tartósítószer sejtkárosító hatásának természetéről, módosíthatóságáról. A szakirodalom ugyanis kevésbé foglalkozik ezen vegyületek sejtleletképessegre gyakorolt hatásával, különösen kevés a humán sejtvonalakon végzett kísérlet és a technológiai segédanyagokkal való interakció keresése. Az évek során a kezdetben alkalmazott Caco-2 sejtvonal és MTT-teszt, a későbbiekben NR-teszttel, *G. mellonella* befecskendezéssel, áramlási citometriával valamint antimikrobiális tesztekkel egészült ki, melyek segítségével a citotoxicitáson túlmenően, már komplex képet lehet kapni a vizsgált vegyületek biokompatibilitásáról. Mivel a téma teljes kibontásához molekuláris biológiai és mikrobiológiai módszerek intenzív alkalmazására lenne szükség, mely túlmutat a gyógyszertechnológia tématerületén, az elvégzett kísérletsorozatok különböző témakörökben, más-más kérdésfelvetéssel indultak, nem épültek szorosan egymásra, hanem a rendelkezésre álló metodikákkal, a gyógyszerformulációhoz kapcsolódóan igyekeztek egyes anyagokat, jelenségeket vizsgálni. Kérdésfelvetéseink az alábbiak voltak:

- 1. Módosítják-e más technológiai segédanyagok a tartósítószer citotoxicitását?**
Korábbi TDK munkámra épülően, metil-parabén és benzalkónium-klorid esetén Caco-2 sejteken, MTT-teszttel vizsgáltuk, hogy tapasztalható-e emelkedett vagy csökkent sejtkárosodás tenzid és viszkozitásnövelő polimer oldat hozzáadása esetén.
- 2. Módosítják-e adott technológiai segédanyag-kombinációk a tartósítószer sejtkárosító hatását humán és mikrobiális sejteken?** Metil-, etil-, *n*-propil- és *n*-butil-parabént formuláltunk két komplex kozszolvens rendszerben, melyek különböző citotoxicitású oldószereket és tenzideket tartalmaztak. Caco-2 sejteken MTT-teszttel vizsgáltuk a citotoxicitást és *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* fajokon az antimikrobiális hatást mikrodilúciós módszerrel.
- 3. Tartósítószerként alkalmazott karbonsavak különböző sói azonos mértékben csökkentik-e a sejtleletképesseget?** Szorbinsav, benzoésav és propionsav nátrium, kálium és kalcium sóját hasonlítottunk össze Caco-2 sejteken NR és MTT-teszttel, hogy a kísérő ionok citotoxicitást befolyásoló hatását vizsgáljuk.
- 4. Miben különböző a sejtkárosító hatása a szorbát-észtereknek a szorbinsavhoz képest?** Szorbinsavat, kálium-szorbátot, etil-szorbátot és izopropil-szorbátot hasonlítottunk össze, hogy megvizsgáljuk, a szorbát-észterek toxicitása és gátló/ölő hatása, hogyan viszonyul az

anyamolekulához képest. A biokompatibilitást Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel és áramlási citometriával, *G. mellonella* lárvákon befecskendezéssel, az antimikrobiális hatást pedig *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* fajokon idő-ölés teszttel vizsgáltuk.

5. Milyen biokompatibilitási interakciók lépnek fel illóolajok és tartósítószer között?

Citrom, rozsmaring és borsmenta illóolaját formuláltuk emulzióként, mint lehetséges tartósítószerket és ezek hatását vizsgáltuk Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel, *G. mellonella* lárvákon befecskendezéssel, valamint *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* fajokon mikrodilúciós módszerrel. Az emulziókat kálium-szorbáttal is kiegészítettük, hogy szinergizmusokat találjunk.

6. Mennyiben eltérő a konstitúciós izomer parabének sejtkárosító hatása? *n*-Propil-,

izopropil-, *n*-butil-, izobutil-, *n*-pentil-, izopentil-parabén vízdékonyságát, citotoxicitását vizsgáltunk Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel, valamint *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* fajokon mikrodilúcióval, hogy az elágazó és nem elágazó szénláncú észterek közötti szerkezet-hatás összefüggéseket feltárjuk.

IV. Anyagok és módszerek

IV/1. Kísérletek során felhasznált anyagok

A kísérletsorozatokban felhasznált tartósítószerket a Magyarországon kereskedelmi forgalomban elérhető legfinomabb minőségben szereztük be (ahol lehetséges volt, gyógyszerkönyvi minőségben).

Alfa Aesar (Kandel, Németország) gyártmány volt a kálium-szorbát (CAS szám: 24634-61-5 tisztaság: 99%), kálium-benzoát (582-25-2, 99%), kalcium-benzoát-hidrát (2090-05-3, 98%), a *n*-propil-para-hidroxibenzoát (94-13-3, 99+%), az izopropil-para-hidroxibenzoát (4191-73-5, 98%), az izobutil-para-hidroxibenzoát (4247-02-3, 98%), a *n*-pentil-para-hidroxibenzoát (6521-29-5, 98%), a benzalkónium-klorid (68424-85-1) és a 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid (Neutrálvörös festék, NR, 553-24-2, 100%).

Az Acros (Geel, Belgium) terméke volt az etil-para-hidroxibenzoát (120-47-8, 99%).

TCI (Zwijndrecht, Hollandia) gyártmány volt a kalcium-szorbát (7492-55-9, 95+%), a nátrium-szorbát (7757-81-5, 98+%), a nátrium-propionát (137-40-6, 98+%), a kálium-propionát (327-62-8, 98+%), a kalcium-propionát (4075-81-4, 98+%), a *n*-butil-para-hidroxibenzoát (94-26-8, 99+%), az etil-szorbát (2396-84-1, 98+) és az izopentil-para-hidroxibenzoát (6521-30-8, 98+%).

Sigma-Aldrich gyártmány volt a 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid (MTT, 298-93-1, 97.5+%) és a xantán gumi (11138-66-2).

A Molar Chemicals Kft.-től (Halásztelek, Magyarország) szereztük be a szorbinsavat (110-44-1, Ph. Eur. 9.), a nátrium-benzoátot (532-32-1, Ph. Eur. 10.), a glicerint (56-81-5, Ph. Eur. 9.), a poliszorbát 20-at (9005-64-5, Ph. Eur. 9.), a metil-para-hidroxibenzoátot (99-76-3, Ph. Eur. 9.), a rozsmaring illóolajat (84604-14-8, Ph. Eur. 9.), a citrom illóolajat (8008-56-8, Ph. Eur. 9.), a borsmenta illóolajat (8006-90-4, Ph. Eur. 9.) és az etanolt (64-17-5, 96%, Ph. Eur. 9.). Szintén a Molar Chemicals-tól származott a 2-hidroxietyl-cellulóz (9004-62-0, Ph. Eur. 9.), amelyből a Mucilago hydroxyethylcellulosi (2/2013 MAG közlemény 3. rész) készült a Gyógyszertechnológiai Tanszék gyakorlati laboratóriumában.¹⁵

A Gattefossé (Lyon, Franciaország) bocsájtotta nagylelkűen rendelkezésünkre a Labrasol[®] és a Capryol[®] PGMC termékeket.

IV./2. Sejtenyésztés módszertana, anyagai

A kísérletekhez használt 86010202 katalógusszámú Caco-2 sejtek az ECACC-tól (Salisbury, Egyesült Királyság) származtak. A sejtenyésztő tápoldat összetétele az alábbi volt: Sigma-Aldrich D5648 katalógusszámú DMEM médium, mely 4,5 g/L D-glükózt, fenolvörös

indikátort, 0,584 g/L L-glutamint tartalmazott, melyet 3,7 g/L molekuláris biológiai minőségű nátrium-hidrogén-karbonáttal (Sigma-Aldrich), 10 $\text{V}/\text{V}\%$ F9665 katalógusszámú dél-amerikai eredetű foetális szarvasmarha szérummal (Sigma-Aldrich), 1 $\text{V}/\text{V}\%$ 13-114E katalógusszámú Lonza (Bázel, Svájc) MEM nem esszenciális aminosav oldattal és 1 $\text{V}/\text{V}\%$ 17-602E katalógusszámú Lonza penicillin (10,000 NE/ml) – streptomycin (10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oldattal egészítettünk ki és szűrtünk sterilre. A médium elkészítés után két héttel 35050061 katalógusszámú GlutaMAX™ (Thermo-Fisher, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) stabilizált L-alanin-L-glutamin dipeptid tartalmú oldattal került kiegészítésre 1:100 arányban. Pontos összetétel az 1. függelékben olvasható. A sejtvonalak hetenként egyszer kerültek passzálásra; tripszin-EDTA emésztést követően 75 cm^2 területű felültkezelte flaskákba szélesztettük őket majd 5% CO_2 tartalmú atmoszférában, 37 °C-on nőttek a passzálások között. Minimum 20 és maximum 40 passzázsszámú sejtek kerültek felhasználásra a kísérletekben. Minden sejtekkel kapcsolatos műveletet előzetesen fertőtlenített lamináris áramlású fülkében végeztünk. A PBS oldat a Tanszéken került előállításra, Sigma-Aldrich D5652 katalógusszámú PBS porból további 1,85 gramm/L dinátrium-hidrogén-foszfát hozzáadásával, sterilre szűréssel. A sejtenyészetek fenntartása a Gyógyszertechnológiai Tanszék sejtlaborjában folyt, TDK hallgatóim segítségével.

IV./3. Sejtéletképességi vizsgálatok

A sejteket passzálás után 96 lyukú mikroplate-ekre szélesztettük ~1 millió sejt/plate koncentrációban, 100 μl médiumos sejtszuszpenzió/lyuk mennyiséggel. 1 hét után a használt médium eltávolításra került és a tesztoldatokat valamint a kontrollként használt PBS oldatot 100 μl térfogatban a plate-ekre pipettáztuk, a kísérletekben megadott, változó lyuk/csoport számban. Csak a 96 lyukú plate belső, 60 lyukját használtuk, a külső oldalon lévő lyukakat nem. A sejteket egységesen, 30 percig inkubáltuk a tesztoldatokkal, majd ezeket eltávolítottuk és a reagensek hígított oldatait pipettáztuk a sejtekre. Ez MTT esetén az 5 mg/ml koncentrációjú törzsoldat PBS történő tízszeres hígítását, míg NR esetén a 33,3 mg/ml törzsoldat sejtenyésztő médiummal történő azonos arányú hígítását jelentette. Ezután 37 °C-on tartottuk a plate-eket, előbbi teszt esetén 3, utóbbi esetén 2 óra időtartamig. Az előhívás és a kiértékelés azonos protokoll szerint történt, a reagensek eltávolítása után 25:1 arányú izopropil-alkohol (67-63-0, Ph. Eur. 9. Molar Chemicals) – 1 M sósav (7647-01-0, Ph. Eur. 10. Molar Chemicals) oldattal és osztott pipettával történő alapos mosással roncsoltuk a sejteket és alakítottunk ki homogén oldatokat a plate lyukjaiban. Az első kísérletsorozat során egy FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) készülékkel mértük az abszorbanciát, 570 nm majd 690 nm

hullámhosszon, előbbi értékekből az utóbbit kivonva, a plate-eket rázatva. Az összes többi vizsgálatnál egy időközben a Gyógyszerésztudományi Kar által beszerzett Multiskan Go (Thermo-Fisher, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) készüléket alkalmaztunk. Ezen a készüléken 565 nm és 540 nm hullámhosszon mértük az abszorbanciát MTT-teszt, illetve az NR-teszt esetén és a plate-ek négy sarkában lévő üres lyukakat használtuk a háttér felvételéhez. Ezen lyukak kezelést nem kaptak, a kezelt plate-ekkel azonos módon kerültek előhívásra így csak a plate saját elnyelését mérhettük velük, átlagos elnyelésüket kivontunk a kezelt lyukak mért abszorbancia értékeiből. A vizsgálatok a Gyógyszertechnológiai Tanszék laborjában kerültek elvégzésre, TDK hallgatóim segítségével.

IV./4. *Galleria mellonella* lárva befecskendezési kísérletek

A hatodik fejlődési stádiumban lévő *G. mellonella* lárvákat a Bugs World Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A lárvákat érkezésük után megtisztítottuk és új, szellőző edényekbe helyeztük és kb. 10 °C-on, sötét helyen tároltuk 1-2 napig majd felmelegítettük őket szobahőmérsékletre a kísérletekhez. Mind az első, mind a második átválogatás során kiszelektáltuk az elpusztult vagy túl kicsi példányokat így csak egészséges 2-3 cm közötti egyedeket használtunk, melyek melanizáció jelét nem mutatták. Kontrollként minden alkalommal PBS-t alkalmaztunk, a befecskendezett mennyiség 20 µl volt minden oldat esetén. A befecskendezésre az utolsó lábacska utáni farki területen került sor egy 29G-s tűvel és egy inzulin tollal. A lárvákat ezután kezelési csoportonként szellőző edényekbe tettük és sötét, 30 °C-os helyre helyeztük. Életképességüket a megadott időpontokban, finom fizikai kontaktussal ellenőriztük.

A különböző szorbát származékok vizsgálata során Dr. Pfliegler Valter Péter, a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék munkatársa segített, a kísérletet is a Tanszék laboratóriumában végeztük, míg a későbbi *in vivo* vizsgálatokat már a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztem, TDK hallgatóim segítségével. A módszer betanulására is Dr. Pfliegler Valter Péter segítségével került sor az előbb említett kísérlet során.

IV./5. Antimikrobiális vizsgálatok.

A tartósítószeres mikrobákra gyakorolt hatását *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 43300™), *Candida albicans* (ATCC® 10231™), *C. parapsilosis* (ATCC® 22019™) és *C. glabrata* (ATCC® 90030™) referencia törzseken vizsgáltuk. A bakteriális sejteket Mueller-Hinton, míg a gomba sejteket RPMI-1640 médiumban növesztettük, szélesztettük. Kísérleteink vagy az

EUCAST E.Dis 5.1 és E.Def 7.3.2. mikrodilúciós módszerei szerint végeztük vagy idő-ölés teszteket hajtottunk végre.^{180,181}

A mikrodilúciós módszer esetén egy 96 lyukú mikroplate-re 100 µl bakteriális vagy fungális inokulumot pipettáztunk, előbbiek esetén $5 \cdot 10^5$ sejt/ml, utóbbiak esetén $2 \cdot 10^3$ sejt/ml koncentrációban. Ehhez 100 µl tesztoldatot (adott vegyszer/formuláció a megfelelő mikrobiális médiumban oldva) adtunk lyukanként és 24 órára 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Ezután az egyes lyukak abszorbanciáját Multiskan Go spektrofotométerrel mértük, 492 nm hullámhosszon a fungális, 600 nm hullámhosszon a bakteriális sejtek esetén. Akkor ítéltük jelentős gátló hatásúnak a tesztelt anyagot, ha a kontrollhoz képest legalább 50%-os turbiditás csökkenést észleltünk.¹⁸² A turbiditás mértéket az abszorbancia alapján számoltuk: $100\% \cdot (A_{\text{lyuk}} - A_{\text{háttér}}) / (A_{\text{kezeletlen}} - A_{\text{háttér}})$. A kezeletlen, csak inokulumot és plusz 100 µl médiumot tartalmazó lyukak mellett a háttérként használt lyukakba 200 µl médium/optikai denzitást mutató hígított formuláció került. A vizsgált anyagokat mindig az adott törzsnek megfelelő médiumba oldottuk törzsoldatként, olyan koncentrációban, hogy a 200 µl-re történő kiegészítést követően kialakuljon a vizsgálni kívánt koncentráció.

Az idő-ölés kísérletek¹⁸³ esetén 5 ml térfogatú tenyésztő csövekben, a gomba sejtek $1 \cdot 10^5$ sejt/ml, míg a bakteriális sejtek $1 \cdot 10^6$ - 10^7 koncentrációban kerültek szélesztésre, 7-es pH-ra beállított RPMI-1640 illetve Mueller-Hinton tápfolyadékokban. *C. albicans* esetén 100 µl felülúszót távolítottunk el adott időközönként, amiket tízszeres hígítás után $4 \cdot 30$ µl mennyiségben Sabouraud dextróz agar táptalajra szélesztettünk és inkubáltunk 35 °C-on 48 órán át. *E. coli* és *S. aureus* esetén az azonos módon hígított felülúszókat azonos mennyiségben Mueller-Hinton táptalajra szélesztettük és inkubáltuk azonos módon.

Az antimikrobiális vizsgálatokat mindegyikére a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében került sor, az Intézet munkatársai, dr. Kovács Renátó László egyetemi tanársegéd, Nagy Fruzsina és Tóth Zoltán PhD hallgatók végezték a kísérleteket és a kiértékelést. Az abszorbancia mérését a már korábban említett Multiskan Go készülékkel én végeztem.

IV./6. Izopropil-szorbát szintézise, tisztítása

Kísérleteinkhez mi magunk szintetizáltuk a kereskedelmi forgalomban reális áron nem beszerezhető izopropil-szorbátot. 11,7 ml, 0,15 mmol izopropil-alkoholhoz 100 ml száraz diklór-metánt adtunk argon atmoszféra alatt és 0 °C-ra hűtöttük. 2 ekvivalens (24,2 ml, 0,3 mmol) száraz piridinhez 1 ekvivalens (20 ml, 0,15 mmol) szorbinsavat adtunk. A reakcióelegyet egy éjszakát át szobahőn kevertettük. Ezután 2 ml vizet adtunk hozzá és további

1 órán át kevertük majd 300 ml diklór-metánnal hígítottuk és telített nátrium-hidrogén-szulfáttal és nátrium-karbonáttal kétszer-kétszer átmostuk. A szerves fázisokat egyesítettük és magnézium-szulfáton szárítottuk, majd a szárítószert kiszűrtük, az oldószert lepároltuk, a nyersteget vákuum alatt desztilláltuk. A desztillálást követően flash oszlopkromatográfiával (eluens: *n*-hexán:etil-acetát 99:1) tisztítottuk a nyersteget, így nyerve a sárga, gyümölcsös illatú izopropil-szorbátot (9 g, 40% összhozam).

A reakciót és az azt követő tisztításokat Kelemen Viktor PhD hallgatóval végeztük a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Tanszékén, a reakció tervezésében és a szükséges műveletekben segítségünkre voltak Prof. Dr. Herczegh Pál, Prof. Dr. Borbás Anikó, Róth Józsefné, Bodza Márta és a Szerves Kémiai Tanszék munkatársa Balla Sára.

IV./7. Áramlási citometriás mérések

Méréseinkhez egy BD FACSAarray (BD Biosciences, Németország) áramlási citométert használtunk. 5*3 millió Caco-2 sejtet gyűjtöttünk közvetlenül a passzálás folyamata során, a tripszines emésztést és centrifugálást követően. A sejtek adott mennyiségű szuszpenzióit fél óráig kezeltük a tesztelt anyagaink 0,75 ^m/_v%-os oldataival, amiket sejttenyésztő médiumban oldottunk. Ezután a sejteket centrifugáltuk, eltávolítottuk a mintákat tartalmazó médiumot és óvatosan hideg PBS-ben mostuk őket, majd újra centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után annexin-kötő pufferrel (Thermo-Fisher) 1 millió sejt/ml koncentrációjú sejt szuszpenziókat alakítottunk ki. A szuszpenziót 100 µl mennyiségben új centrifugacsövekbe mértük és 5 µl Alexa Fluor™ 647 festékkel jelölt annexin V-öt (Thermo-Fisher, A13201 katalógusszám) és 1 µl 100 µg/ml koncentrációjú propídium-jodid (Sigma-Aldrich) oldatot adtunk hozzájuk. A festés 15 percig történt jég fürdőben majd ezután azonnal sor került az áramlási citometriás mérésekre. A propídium-jodid gerjesztése 532 nm hullámhosszú lézernyalábbal történt, detektálása 564 és 606 nm közötti tartományban történt (Yellow-A, sárga csatorna az ábrákon). Az annexin V AlexaFluor™ 647 esetén 635 nm és 653–669 nm voltak a megfelelő értékek (Red-A, vörös csatorna az ábrákon). A kiértékelésre FCS Express 6 (De Novo Software, Amerikai Egyesült Államok) szoftverrel került sor. Az FSC-SSC diagramon a nem sejtes elemek kerültek szelektálásra míg a FSC-A-FSC-W diagramon a duplikált elemek. A megmaradó 8000-10.000 találatot a propídium-jodid – annexin diagramon elemeztük és ábráztuk kvadráns kapuk felállításával.

Az áramlási citometriás mérések műszeres részére a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében Rebenku István segítségével került sor, a kiértékelést is ő végezte.

IV./8. Kromatográfiai mérések

A különböző nyílt és elágazó alkil láncú parabéneket az előző kísérletekhez hasonlóan 96 $\text{v}/\text{v}\%$ -os etil-alkoholban oldottuk úgy, hogy 10 $\text{m}/\text{v}\%$ -os törzsoldatokat készítsünk. Mind az oldékonyság meghatározás, mind a citotoxicitási és antimikrobiális kísérletek ezen oldatok hígításával, centrifugálásával és a felülúszó 0,2 μm pórusú (PES anyagú hidrofílfecskendőszűrő) membránszűrésével történt. A HPLC mérésekhez a PBS-sel 0,1 $\text{m}/\text{v}\%$ -ra hígított oldatok 0.864 $\text{v}/\text{v}\%$ etanolt tartalmaztak, melyeket egy Merck-Hitachi ELITE LaCrom készülékkel (Hitachi, Tokió, Japán) vizsgáltunk, ami L-2130 pumpával, gázmentesítővel, automata injektorral és L-2300-as kolonna fűtővel valamint fotodiódás detektorral volt felszerelve. Az Agilent HC-C18(2) (150x4,6 mm) típusú oszlopot 25°C-ra termosztáltuk, a detektálási tartomány 200-400 nm között volt. A mozgó fázis kromatográfiai tisztaságú metanol volt 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az eredmények analízisét a készülék szoftverével elemeztük. Az injektált minták 10 μl térfogatúak voltak, 1:9 arányban tartalmazták a hígított etanolos oldatokat és a mozgó fázist. A vízoldékonyságot a 256 nm-en korábban felvett kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, a minták abszorbancia csúcsait hasonlítottuk össze a kalibrációs görbével.

A mérésekre a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén került sor, a méréseket Dr. Haimhoffer Ádám PhD hallgató végezte.

IV./9. Statisztikai analízis

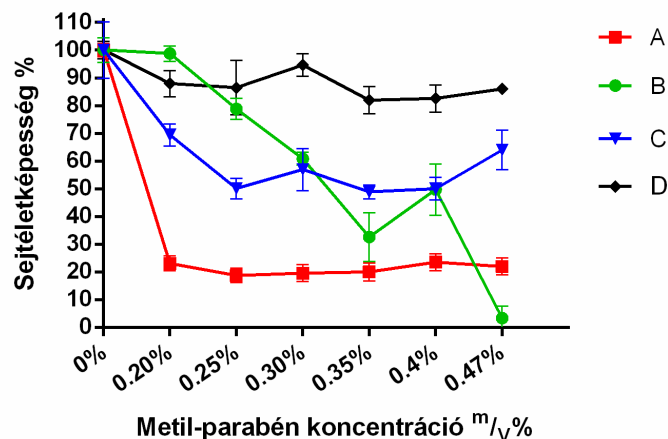
A statisztikai számításokhoz és a diagramok ábrázolásához GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Amerikai Egyesült Államok) szoftvert alkalmaztam. Az ábrákon a kezelt csoportok átlagát, valamint az átlag standard hibáját (SEM) ábrázoltam. A programban nem lehetséges az x és y tengelyek feliratai esetén a tizedes elválasztó pontról vesszőre változtatása, így ezek angolszász szokás szerint pontként kerültek feltüntetésre. Statisztikai vizsgálatok elvégzése előtt az egyes adatsorokat Shapiro-Wilk illetve Kolmogorov-Smirnov tesztnel vettem alá az adatsorokat a normális eloszlás vizsgálata végett. Ha valamely teszt megfelelőnek ítélte az adott adatsort, azt normális eloszlásúnak tekintettem. Ha nem, nemparametrikus tesztet alkalmaztam a továbbiakban; két adatsornál Mann-Whitney-próbát, több adatsornál Kruskal-Wallis-próbát. Ezután a normális eloszlású adatsorok varianciáját Bartlett-próbával hasonlítottam össze, ha ezen teszten különböző varianciát tapasztaltam 2 mintás Welsch-próbát vagy több adatsor esetén Kruskal-Wallis próbát alkalmaztam. Azonos variancia esetén került sor 2 mintás t-próbára vagy több adatsor esetén egyszempontos varianciaanalízisre (ANOVA). Utólagos analízisként Tukey-Kramer teszt került elvégzésre. Az

adott ábránál a vonatkozó próba feltüntetésre kerül. Minden tesztünk esetén az alfa 0.05 volt és kétoldalú próbákat végeztem. A számolt p-értékek egységes jelölése a kísérletek eredményeit bemutató ábrák alatti statisztikai elemzésben: n.sz. = nem szignifikáns; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$. A *G. mellonella* lárvák túlélését ábrázoló Kaplan-Meier görbe esetén az egyes csoportokat Mantel-Cox próbával és Gehan-Breslow-Wilcoxon próbával elemeztem.

V. Eredmények

V./1. Segédanyag-tartósítószer interakciók vizsgálata.

Az első kísérletsorozat folyamán Caco-2 sejteken vizsgáltam két, magisztrális gyógyszerkészítésben alkalmazott tartósítószer, a metil-parabént és a benzalkónium-kloridot MTT-teszt segítségével. A felületaktív anyagokkal való keverékek vizsgálata a Gyógyszertechnológiai Tanszéken korábban elvégzett kutatómunka alapján ötlött fel bennünk, mivel korábbi kutatások révén számos tenzidről rendelkezésre áll citotoxicitási adat ezen a sejtvonalon¹⁸⁴. Korábbi TDK munkámhoz kapcsolódó kísérleteimben azt tapasztaltam, hogy a tartósítószeres sejtkárosító hatása jelentősen nő, ha előbbi vegyületsoporttal kombinálva vizsgáljuk őket. Doktori munkám kezdetén azonban arra is kíváncsiak voltunk, hogy más segédanyagok, melyek a folyékony gyógyszerformákban jelen lehetnek, vajon tudnak-e citoprotektív hatást kifejteni. Mivel el akartuk kerülni, hogy csak a tenzidek toxikus hatása elnyomja a tartósítószerét, a korábbi kutatások során megállapított IC₅₀ értékek feleként határoztuk meg a tenzidek koncentrációját. A metil-parabént poliszorbát 20-szal, míg a benzalkónium-kloridot a Labrasol®-al együtt vizsgáltam. Habár a benzalkónium-klorid nem orálisan alkalmazott tartósítószer, kísérletes vizsgálatát az indokolta, hogy a metil-parabéntől teljesen eltérő, felületaktív, szolubilizáló mechanizmussal fejti ki citotoxikus aktivitását, így a segédanyag-interakciókat szélesebb körben tudtuk vizsgálni.¹⁸⁵ Ugyanígy az egyes összetételek, kombinációk kiválasztásánál célunk nem a valós, törzskönyvezett készítmények pontos szimulációja volt, hanem az esetleges sejtkárosító hatást erősítő vagy tompító kölcsönhatások megtalálása, vizsgálata.



9. ábra: A metil-parabén citotoxicitása poliszorbát 20-szal és polimerrel kombinálva Caco-2 sejteken MTT-teszttel mérve. Az egyes mérési pontok hat lyuk abszorbanációjának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtelétképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanációjának átlaga alapján került kiszámításra. **A** kezelés: metil-parabén és 0,004 % poliszorbát 20; **B** kezelés: metil-parabén; **C** kezelés: metil-parabén és 0,004 % poliszorbát 20 és 30 % 2-hidroxietil-cellulóz nyák; **D** kezelés: metil-parabén és 0,004 % poliszorbát 20 és 40 %

2-hidroxietyl-cellulóz nyák. A metil-parabén *Solutio conservans* (2/2013 MAG közlemény 3. rész), míg a polimer *Mucilago hydroxyethylcellulosi* (2/2013 MAG közlemény 3. rész) formájában került a sejtekre.

A, B, C, D kezeléseket esetén ábrázolt értékek:

0 m/v%: 100%, ±2,4%; 100,0% ±4,5%; 100,0% ±10,1%; 100,0% ±3,2%

0,20 m/v%: 23,1%, ±2,7%; 98,7% ±2,8%; 69,4% ±4,0%; 87,9% ±4,7%

0,25 m/v%: 18,7% ±2,6%; 78,8% ±3,8%; 50,1% ±3,7%; 86,4% ±9,8%

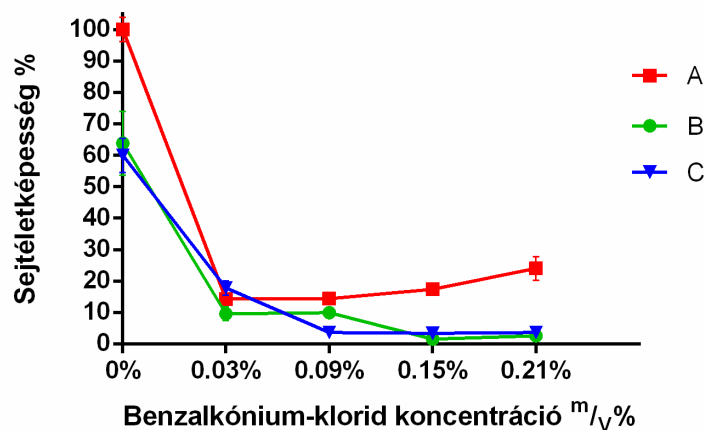
0,30 m/v%: 19,6% ±3,0%; 60,8% ±2,3%; 56,9% ±7,6%; 94,6% ±4,1%

0,35 m/v%: 20,0% ±3,3%; 32,6% ±8,8%; 48,9% ±2,5%; 81,9 ±4,9%

0,4 m/v%: 23,5% ±3,0%; 49,7% ±9,3%; 50,0% ±4,1%; 82,6% ±4,9%

0,47 m/v%: 22,0% ±3,0%; 3,4% ±4,3%; 64,0% ±7,2%; 86,0% ±1,6%

A **9. ábrán** a poliszorbát 20 hozzáadása után egyértelműen látszott a tenzid citotoxicitást potenciórozó hatása. Minden vizsgált koncentráció esetén rendkívül alacsony, 20% körüli sejtleletképeséget mértünk, míg a csak metil-parabénnel kezelt sejtek esetén magasabb életképességről indulva, fokozatosan csökkenő tendencia figyelhető meg. A 3 m/v% 2-hidroxietyl-cellulózt tartalmazó *Mucilago hydroxyethylcellulosi* képes a két másik vegyület sejtkárosító hatását jelentősen tompítani, még pedig koncentrációfüggő módon.



10. ábra: A benzalkónium-klorid citotoxicitása Labrasol[®]-al és polimerrel kombinálva Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve. Az egyes mérési pontok hat lyuk abszorbanciájának átlagát és ± SEM-et jelzik. A sejtleletképeség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. **A** kezelés: benzalkónium-klorid; **B** kezelés: benzalkónium-klorid és 0,17 % Labrasol[®]; **C** kezelés: benzalkónium-klorid és 0,17 % Labrasol[®] és 30 % 2-hidroxietyl-cellulóz nyák; A polimer *Mucilago hydroxyethylcellulosi* (2/2013 MAG közlemény 3. rész) formájában került a sejtekre.

A, B, C kezeléseket esetén ábrázolt értékek:

0 m/v%: 100,0% ±3,9%; 63,8% ±10,2%; 60,0 ±5,4%

0,03 m/v%: 14,3% ±1,1%; 9,6% ±2,2%; 17,8 ±2,3%

0,09 m/v%: 14,4% ±1,6%; 9,9% ±2,0%; 3,6 ±0,7%

0,15 m/v%: 17,4% ±1,9%; 1,5% ±0,5%; 3,4 ±0,6%

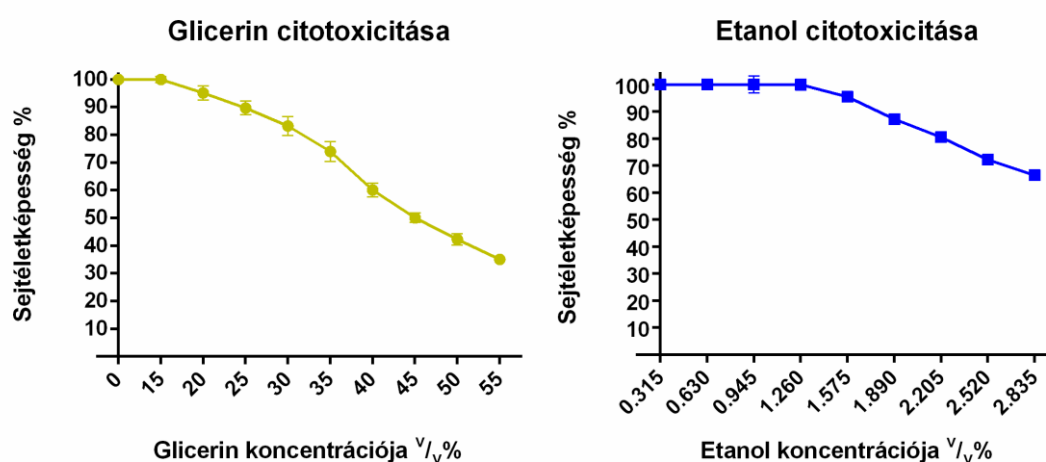
0,21 m/v%: 24,0% ±3,7%; 2,6% ±1,1%; 3,6 ±0,5%

A **10. ábrán** látható, hogy a benzalkónium-klorid és a Labrasol[®] szintén potenciórozták egymás hatását, azonban a polimer semmilyen védő hatást nem tudott mutatni. Kísérleteinket elvégeztük metil-parabén - Labrasol[®] és benzalkónium-klorid – poliszorbát 20 párosításokkal is, azonban hasonló eredményt kaptunk – a nyák nem tudta növelni a sejtleletképeséget. Ezek alapján az additív citotoxikus hatás a tartósítószer és a tenzidek között általánosnak tekinthető, azonban a viszkozitásnövelőként alkalmazott polimerek védő hatása csak esetleges.

V./2. Tartósítószer-segédanyag citotoxicitási és antimikrobiális interakciók vizsgálata komplex kozszolvens rendszerekkel.

V./2.1. Tartósítószer-segédanyag citotoxicitási interakciók vizsgálata komplex kozszolvens rendszerekkel.

Az előző kísérletsorozat mutatta, hogy lehetséges a tartósítószer-citotoxicitását mérséklő és növelő interakciókat is találni, ha más, gyógyszer-technológiában alkalmazott segédanyagokkal együtt vizsgáljuk őket. Továbbra is a folyékony, bevételre szánt gyógyszerformák tématerületén kutatva döntöttünk úgy, hogy komplex kozszolvens rendszereket képzünk, melyek egyrészt egy vízzel jól elegyedő oldószerből, másrészt egy modern tenzidből állnak. Az egyes rendszerek összeállításánál ismét a korábbi kutatásokhoz nyúltunk vissza, és egy nagy HLB értékű és nagy citotoxicitású (poliszorbát 20: HLB: 16,7; IC_{50} : 0,004 v/v%) valamint egy alacsony HLB értékű és citotoxicitású (Capryol® PGMC: HLB: 5, IC_{50} : >1 v/v%) felületaktív anyagot választottunk. Ezekhez kerestünk kozszolvenseket, a szakirodalmi adatok alapján nagyobb sejtkárosító hatással bíró etanolt és a kevésbé sejtkárosító glicerint. Először a Caco-2 sejteken MTT-tesztel vettem fel a két vegyület citotoxicitási profilját (11. ábra). A különböző sejtes mérésekben Pető Ágota gyógyszerészhallgató segített.



11. ábra: Glicerín és etanol citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve. Az egyes mérési pontok esetén tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

A glicerín és az etanol esetén ábrázolt értékek koncentráció szerinti növekvő sorrendben:

glicerín: 100% \pm 0,5%; 100% \pm 1,1%; 95,1 \pm 2,5%; 89,7% \pm 2,5%; 83,2% \pm 3,4%; 74% \pm 3,6%; 60,1 \pm 2,5%; 50,1% \pm 1,7%; 42,3% \pm 2%; 35,1% \pm 0,4%

etanol: 100% \pm 0,2%; 100% \pm 1,8%; 100 \pm 3,1%; 100% \pm 2%; 95,4% \pm 1,7%; 87,2% \pm 0,5%; 80,5 \pm 1,1%; 72,2% \pm 0,9%; 66,4% \pm 1%

Ezek alapján rendszereinket az egyes komponensek egyedi IC_{50} értékeinél alacsonyabb koncentrációkból állítottuk össze, hogy a segédanyagok együttes hatását tudjuk megfigyelni és ne egy adott segédanyag citotoxicitása fedje el az esetleges interakciót:

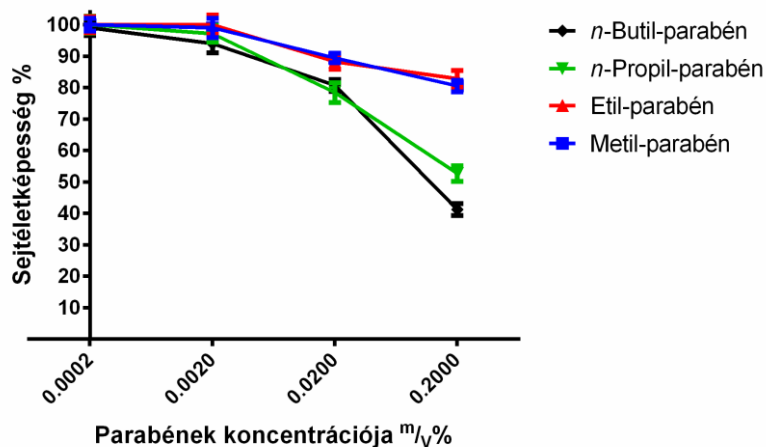
1. rendszer: 30 ‰ glicerin, 0,002 ‰ poliszorbát 20, 0,2 ‰ parabén, PBS oldószer

2. rendszer: 1,4 ‰ etanol, 0,5 ‰ Capryol® PGMC, 0,2 ‰ parabén, PBS oldószer

	1. rendszer	2. rendszer
Parabének	0,2 ‰, fokozatosan hígítva	
Glicerin	30 ‰, fokozatosan hígítva	-
Poliszorbát 20	0,002 ‰, fokozatosan hígítva	-
Capryol PGMC™	-	0,5 ‰, fokozatosan hígítva
Etanol	-	1,4 ‰, fokozatosan hígítva
PBS	oldószer a tízszeres, százszoros és ezerszeres hígításhoz	

1. táblázat: Citotoxicitási vizsgálatokhoz használt oldatok pontos összetétele.

A rendszerekben metil-, etil-, *n*-propil- és *n*-butil-parabént oldottunk és Caco-2 sejtvonalon figyeltük meg MTT-tesztel a citotoxicitás változását. Ehhez a rendszereket hígítottuk, 0,2; 0,02; 0,002 és 0,0002 ‰ parabén tartalomra, így természetesen az oldószerek és a tenzidek is azonos mértékben hígultak. A rendszerekben vizsgált kombinált parabének mellett azonban kontrollként arra is kíváncsiak voltunk, hogy az egyes vegyületek alkoholos törzsoldatai milyen sejtkárosító hatással bírnak önmagukban, a rendszerekben lévő egyéb gyógyszer technológiai segédanyagok nélkül.



12. ábra: Parabének citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és ± SEM-et jelzik. A sejtleletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A parabéneket 96 ‰-os etil-alkoholban oldottuk úgy, hogy 10 ‰-os törzsoldatokat alkossunk, majd ezekből hígítottuk PBS-sel a mintaoldatokat, melyekkel a sejteket kezeltük.

A metil-, etil-, *n*-propil-, és *n*-butil-parabén esetén ábrázolt értékek:

0,0002 ‰: 100,0% ±2%; 100% ±2,5%; 100% ±2,7%; 99% ±2,5%

0,002 ‰: 99% ±3,1%; 100% ±3,1%; 97,1 ±2,7%; 94% ±2,9%

0,02 ‰: 89,4% ±1,5%; 88,2% ±2,3%; 78,4 ±3,1%; 80,7% ±1,9%

0,2 ‰: 80,5% ±1,8%; 82,8% ±2,7%; 52,7 ±2,5%; 41,2% ±1,9%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

0,2% metil vs etil: n.sz.

0,2% metil vs. propil: **

0,2% metil vs. *n*-butil: ****

0,2% etil vs. propil: **

0,2% etil vs. *n*-butil: ****

0,2% propil vs. *n*-butil: n.sz.

0,02% metil vs. etil: n.sz.

0,02% metil vs. propil: **

0,02% metil vs. *n*-butil: *

0,02% etil vs. propil: *

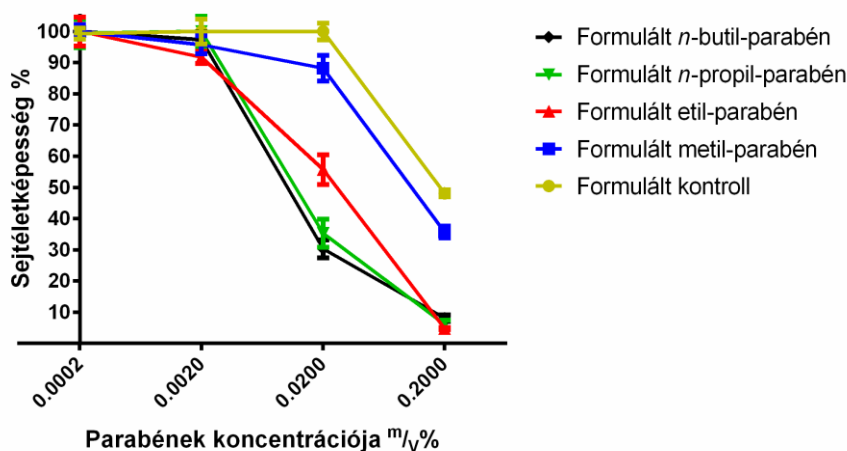
0,02% etil vs. *n*-butil: n.sz.

0,02% propil vs. *n*-butil: n.sz.

Az alacsonyabb koncentrációk esetén a kezelt csoportok között nem szignifikánsak a különbségek.

A **12. ábrán** látható eredmények egyértelműen mutatják, hogy a szénlánc hossz növeli a citotoxicitást, a *n*-butil-parabén fejt ki a legnagyobb sejtkárosító hatást, ezt a *n*-propil-parabén követi, majd az etil- és a metil-parabén. A *n*-butil-*n*-propil és a metil-etil párosok egymástól

nem voltak szignifikánsan különbözőek, a két tandem viszont nagyobb koncentráció tartományban egymástól szignifikánsan különbözött.



13. ábra: Parabének citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve az 1. rendszerben formulálva. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

A metil-, etil-, *n*-propil-, és *n*-butil-parabén és a formulált kontroll esetén ábrázolt értékek:

0,0002 m/v %: 100,0% \pm 2,1%; 100% \pm 4,6%; 99,4% \pm 4,6%; 100% \pm 2,3%; 99,3% \pm 1,8%

0,002 m/v %: 95,7% \pm 2,9%; 91,7% \pm 2%; 100 \pm 4,9%; 97,3% \pm 2,6%; 100% \pm 4,0%

0,02 m/v %: 88,2% \pm 4,1%; 55,7% \pm 4,8%; 35,3 \pm 4,5%; 30,3% \pm 2,9%; 100% \pm 2,7%

0,2 m/v %: 35,7% \pm 1,9%; 4,8% \pm 0,3%; 6,2 \pm 1,3%; 8,1% \pm 1,1%; 48,1% \pm 1,1%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

0,2% formulált kontroll vs. metil: *

0,2% formulált kontroll vs. etil: ****

0,2% formulált kontroll vs. *n*-propil: ****

0,2% formulált kontroll vs. *n*-butil: ****

0,2% metil vs. etil: ****

0,2% metil vs. *n*-propil: ****

0,2% metil vs. *n*-butil: ****

0,2% etil vs. *n*-propil: n.sz.

0,2% etil vs. *n*-butil: n.sz.

0,2% *n*-propil vs. *n*-butil: n.sz.

0,02% formulált kontroll vs. metil: *

0,02% formulált kontroll vs. etil: ****

0,02% formulált kontroll vs. *n*-propil: ****

0,02% formulált kontroll vs. *n*-butil: ****

0,02% metil vs. etil: ****

0,02% metil vs. *n*-propil: ****

0,02% metil vs. *n*-butil: ****

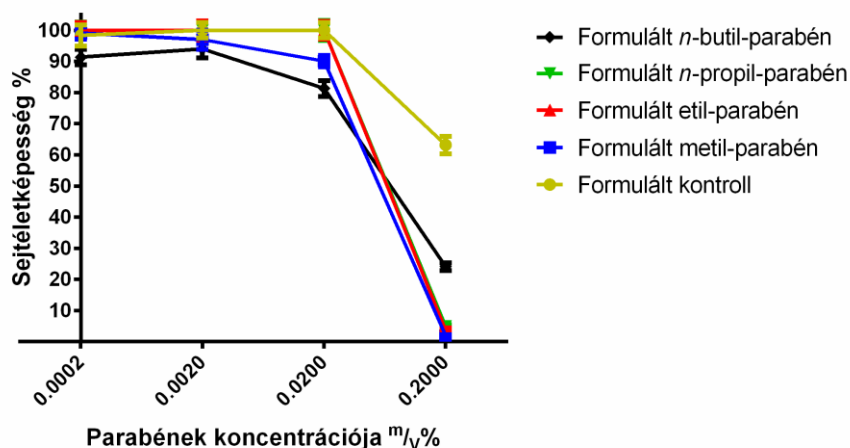
0,02% etil vs. *n*-propil: ***

0,02% etil vs. *n*-butil: ***

0,02% *n*-propil vs. *n*-butil: n.sz.

Az alacsonyabb koncentrációk esetén a kezelt csoportok között nem szignifikánsak a különbségek.

Az első rendszerben formulált parabének, a vizes-etanolos oldatokhoz nagyon hasonló görbéket mutatnak. (13. ábra) A két legmagasabb koncentráción a metil- illetve az egyik esetén az etil-parabén is kevésbé toxikus, mint a *n*-butil- és a *n*-propil-parabén, amely vegyületek egymástól szignifikánsan nem elkülöníthető sejtéletképességi adatokat produkáltak. A formulált kontroll nem fejtett ki toxikus hatást a legnagyobb koncentráció kivételével.



14. ábra: Parabének citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve a 2. rendszerben formulálva. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

A metil-, etil-, *n*-propil-, és *n*-butil-parabén és a formulált kontroll esetén ábrázolt értékek:

0,0002 m/v %: 99,1% \pm 2%; 100% \pm 2,5%; 100% \pm 2,7%; 91,4% \pm 2,5%; 98,4% \pm 3,4%

0,002 m/v %: 97% \pm 3,1%; 100 \pm 3,1%; 100% \pm 2,7%; 94% \pm 2,9%; 100% \pm 2,5%

0,02 m/v %: 90,1% \pm 1,8%; 100 \pm 2,9%; 100% \pm 3,2%; 81,3% \pm 2,6%; 100% \pm 2,5%

0,2 m/v %: 2% \pm 0,2%; 3,7 \pm 0,7%; 4,9% \pm 0,6%; 24,1% \pm 1,2%; 63,2% \pm 2,8%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

0,2% formulált kontroll vs. metil: ****

0,2% formulált kontroll vs. etil: ****

0,2% formulált kontroll vs. *n*-propil: ****

0,2% formulált kontroll vs. *n*-butil: ****

0,2% metil vs. etil: n.sz.

0,2% metil vs. *n*-propil: n.sz.

0,2% metil vs. *n*-butil: **

0,2% etil vs. *n*-propil: n.sz.

0,2% etil vs. *n*-butil: **

0,2% *n*-propil vs. *n*-butil: **

0,02% formulált kontroll vs. metil: *

0,02% formulált kontroll vs. etil: n.sz.

0,02% formulált kontroll vs. *n*-propil: n.sz.

0,02% formulált kontroll vs. *n*-butil: **

0,02% metil vs. etil: *

0,02% metil vs. *n*-propil: *

0,02% metil vs. *n*-butil: *

0,02% etil vs. *n*-propil: n.sz.

0,02% etil vs. *n*-butil: *

0,02% *n*-propil vs. *n*-butil: *

Az alacsonyabb koncentrációk esetén a kezelt csoportok között nem szignifikánsak a különbségek.

A második rendszerben az előzőktől lényegesen eltérő eredményt kaptunk. (14. ábra) A legtümönyebb koncentráción a *n*-butil-parabén kevésbé volt toxikus, ellenben a másik három származék közel teljes sejtpusztulást okozott. A második legmagasabb koncentráció értéken a metil- és a *n*-butil-parabén bizonyultak kis mértékben toxikusnak, míg az etil- és a *n*-propil-parabén nem voltak toxikusak. A formulált kontroll hatása itt is elhanyagolható volt a legnagyobb koncentráció kivételével.

V./2.2. Tartósítószer-segédanyag antimikrobiális interakciók vizsgálata komplex korszolvens rendszerekkel.

Az antimikrobiális vizsgálatok során a citotoxicitási vizsgálatoktól eltérő koncentrációkat alkalmaztunk, mivel szakirodalmi adatok alapján a nagyon alacsony koncentrációk esetén már biztosan nem tapasztaltunk volna gátló hatást. Választott parabén koncentrációink ezért a 0,1; 0,15; 0,25 m/v % értékek voltak, így az alkoholos oldatok és a második rendszer etanol tartalma rendre 0,7, 1,05 és 1,75 v/v % volt. Az ábrák zsúfoltságának elkerülése érdekében a rendszerek

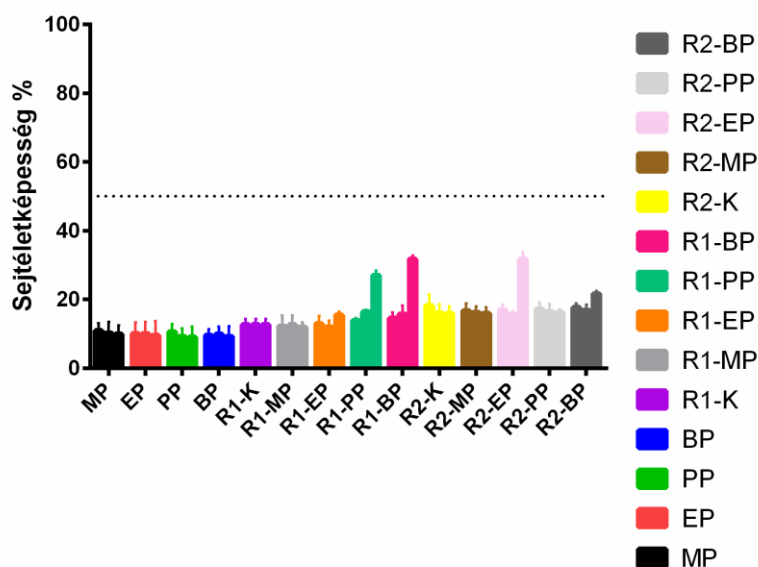
R1 és R2 rövidítéssel szerepelnek az ábrákon, MP a metil-parabén, EP az etil-parabén, PP a *n*-propil-parabén, míg BP a *n*-butil-parabén tartalmú mintákat jelöli.

A mikrobiális kísérleteket a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének munkatársai, dr. Kovács Renátó László és Nagy Fruzsina végezték. Ha a kezdeti sejtszámhoz képest legalább 50%-os csökkenés figyelhető meg egy szer esetén, akkor jelentős gátló hatás feltételezhető az adott faj ellen. Ezt a küszöb értéket jelen ábrán és minden további esetben szaggatott vonal jelzi. Az EUCAST E.Dis 5.1 és E.Def 7.3.2. protokollok szerinti mikrodilúciós módszer egyszerűen kivitelezhető, a mikrobiális inokulum és a megfelelő tápfolyadékban oldott antimikrobiális szer összekeverésén alapul. Az esetlegesen bekövetkező gátló hatás a kontrollhoz mért alacsonyabb turbiditáson, sejtkoncentráción keresztül mérhető. A módszer végpontjelzéses, időbeli lefutást nem mértünk.

	1. rendszer (R1-MP, R1-EP, R1-PP, R1-BP)	2. rendszer (R2-MP, R2-EP, R2-PP, R2-BP)	Alkoholos kontroll (MP, EP, PP, BP)
Parabén	0 m/v% (csak R1-K és R2-K), 0,1 m/v%, 0,15 m/v%, 0,25 m/v%		
Glicerín	30 v/v%, fokozatosan hígítva	-	-
Poliszorbát 20	0,002 v/v%, fokozatosan hígítva	-	-
Capryol PGMCTM	-	0,5 v/v%, fokozatosan hígítva	-
Etanol	-	1,4 v/v%, fokozatosan hígítva	1,4 v/v%, fokozatosan hígítva
RPMI-1640 médium	oldószer az antifungális tesztekhez		
Mueller-Hinton médium	oldószer az antibakteriális tesztekhez		

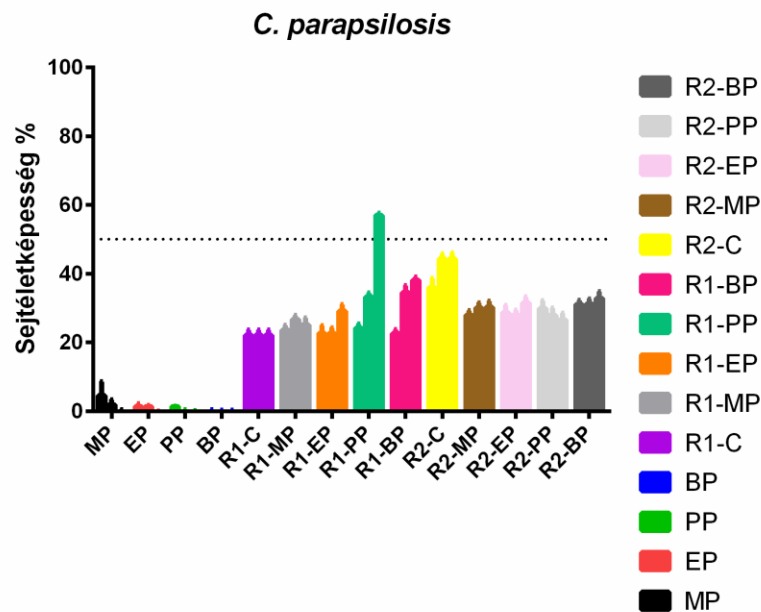
2. táblázat: Antimikrobiális vizsgálatokhoz használt oldatok pontos összetétele.

C. albicans



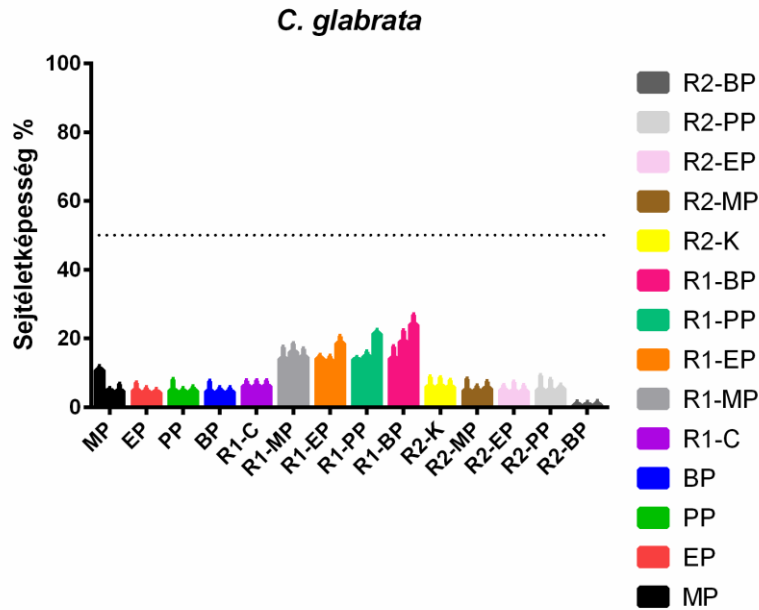
15. ábra: Parabének alkoholos oldatainak (MP-BP) és a formulázott rendszereiknek (R1-K-R1-BP; R2-K-R2-BP) antimikrobiális hatása *C. albicans* referencia törzs ellen. A sejtelétképesség százalékos értéke csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A pontok két lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A vizsgált koncentrációk egymás mellett, kezelésként csoportosítva kerültek feltüntetésre, balról jobbra: 0,1 m/v%; 0,15 m/v%; 0,25 m/v%.

A *C. albicans* gombafaj a leggyakoribb patogén *Candida* faj, melyet nagyon gyakran alkalmaznak antimikrobiális hatás vizsgálatára, így kézenfekvő volt számunkra, hogy ezen faj ellen vizsgáljuk a formulált rendszereket. Minden esetben alacsony életképességet tapasztaltunk, azonban a formuláció enyhén, de növelte a fungális sejtek túlélését. (15. ábra) Több esetben megfigyeltük, hogy a sejtleletkéesség a koncentráció növekedésével fordítottan arányos.



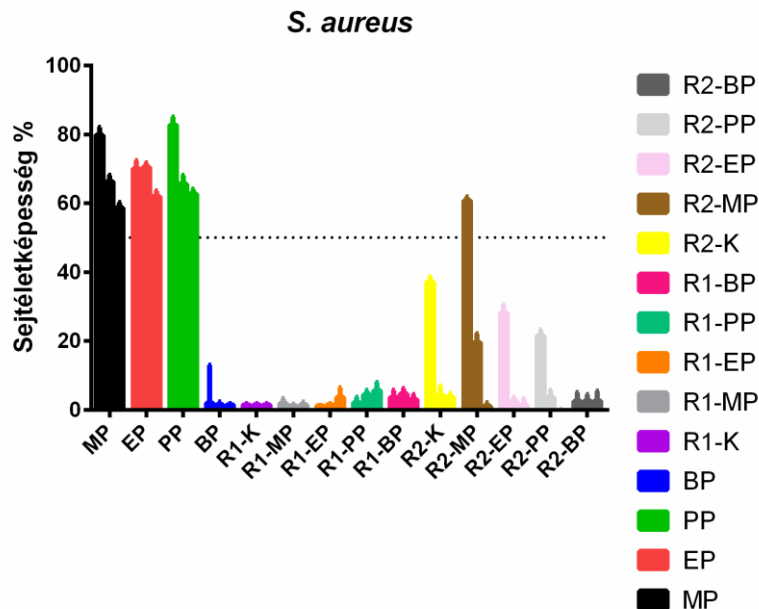
16. ábra: Parabének alkoholos oldatainak (MP-BP) és a formulázott rendszereiknek (R1-K-R1-BP; R2-K-R2-BP) antimikrobiális hatása *C. parapsilosis* referencia törzs ellen. A sejtleletkéesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A pontok két lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A vizsgált koncentrációk egymás mellett, kezelésként csoportosítva kerültek feltüntetésre, balról jobbra: 0,1 $m/v\%$; 0,15 $m/v\%$; 0,25 $m/v\%$.

A *C. parapsilosis* a többi *Candida* fajtól eltérő, egyedi sejtfal szerkezettel rendelkezik, emiatt általánosságban nagyobb rezisztenciát mutat antifungális szerekkel szemben¹⁸⁶. Esetünkben megfigyelhetjük, hogy míg a parabének alkoholos oldatai teljesen elpusztították a gomba sejteket, addig a formulációk rontották a parabének hatásosságát és a növekvő koncentráció növelte a sejtleletkéességet több esetben is, akár 50%-ot meghaladó mértékben is. (16. ábra)



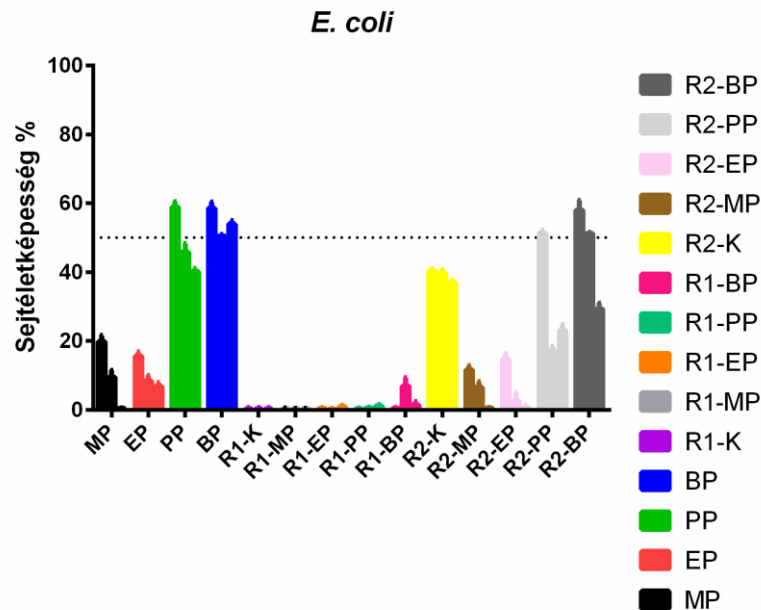
17. ábra: Parabének alkoholos oldatainak (MP-BP) és a formulázott rendszereiknek (R1-K-R1-BP; R2-K-R2-BP) antimikrobiális hatása *C. glabrata* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A pontok két lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A vizsgált koncentrációk egymás mellett, kezelésként csoportosítva kerültek feltüntetésre, balról jobbra: 0,1 $m/v\%$; 0,15 $m/v\%$; 0,25 $m/v\%$.

C. glabrata a *C. albicans*-nál kevésbé elterjedt, de így is gyakori oportunistá patogén faj. A korábbiakhoz képest eltérő érzékenységet tapasztalunk, hiszen az első rendszerben formulált parabének kevésbé voltak hatékonyak, mint az alkoholos oldatok vagy a második rendszerben formulált parabének. (17. ábra)



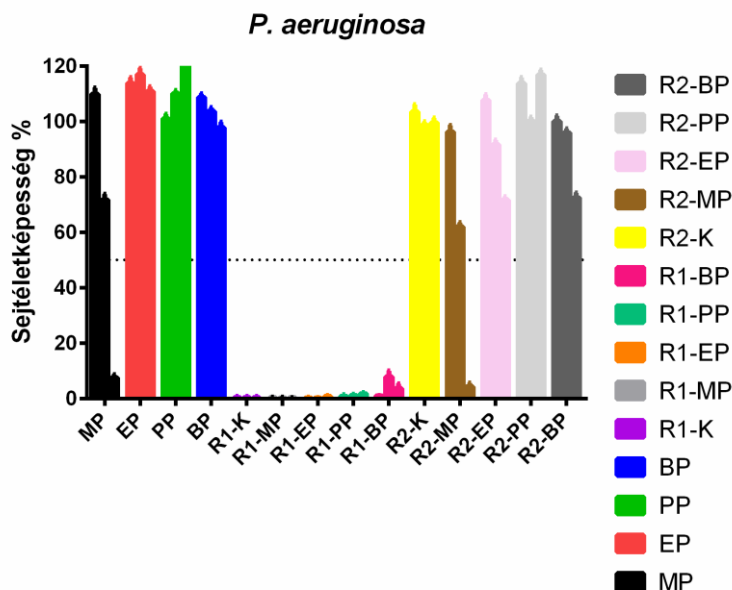
18. ábra: Parabének alkoholos oldatainak (MP-BP) és a formulázott rendszereiknek (R1-K-R1-BP; R2-K-R2-BP) antimikrobiális hatása *S. aureus* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A pontok két lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A vizsgált koncentrációk egymás mellett, kezelésként csoportosítva kerültek feltüntetésre, balról jobbra: 0,1 $m/v\%$; 0,15 $m/v\%$; 0,25 $m/v\%$.

A Gram pozitív coccus *S. aureus* egy antibakteriális szerek tesztelésére gyakran alkalmazott modell, ráadásul elterjedt patogén, ezért döntöttünk mi is a használata mellett. Az alkoholos oldatok esetén egyedül a *n*-butil parabén tudott gátló hatást kifejteni. Mind az első rendszerben lévő glicerin és poliszorbát 20 önmagában is teljes sejtpusztulást okozott, akárcsak a második rendszer esetén a Capryol® PGMC és az etanol keveréke. (18. ábra) Ellenben negatív interakciót tapasztalhatunk a legalacsonyabb koncentrációjú metil-parabén esetén, ami a második rendszerben formulálva kevésbé volt hatásos, mint a formuláció közege önmagában.



19. ábra: Parabének alkoholos oldatainak (MP-BP) és a formulázott rendszereiknek (R1-K-R1-BP; R2-K-R2-BP) antimikrobiális hatása *E. coli* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A pontok két lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A vizsgált koncentrációk egymás mellett, kezelésenként csoportosítva kerültek feltüntetésre, balról jobbra: 0,1 m/v%; 0,15 m/v%; 0,25 m/v%.

A Gram negatív pálca *E. coli* szintén általánosan elterjedt különböző mikrobiológiai kísérletek esetén, mint modellszervezet, ráadásul kórokozóként, szennyezőként is gyakran előfordul. A 19. ábrán látható, hogy az etanolos oldatok esetén a hosszabb szénláncú származékok kevésbé voltak hatékonyak, az első rendszer teljes sejthalált okozott, míg a második rendszer esetén szintén megfigyelhetjük, hogy a formuláció önmagában hatékonyabb, mint a *n*-propil- és *n*-butil-parabénnel együtt.



20. ábra: Parabének alkoholos oldatainak (MP-BP) és a formulázott rendszereiknek (R1-K-R1-BP; R2-K-R2-BP) antimikrobiális hatása *P. aeruginosa* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. A pontok két lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A vizsgált koncentrációk egymás mellett, kezelésként csoportosítva kerültek feltüntetésre, balról jobbra: 0,1 $m/v\%$; 0,15 $m/v\%$; 0,25 $m/v\%$

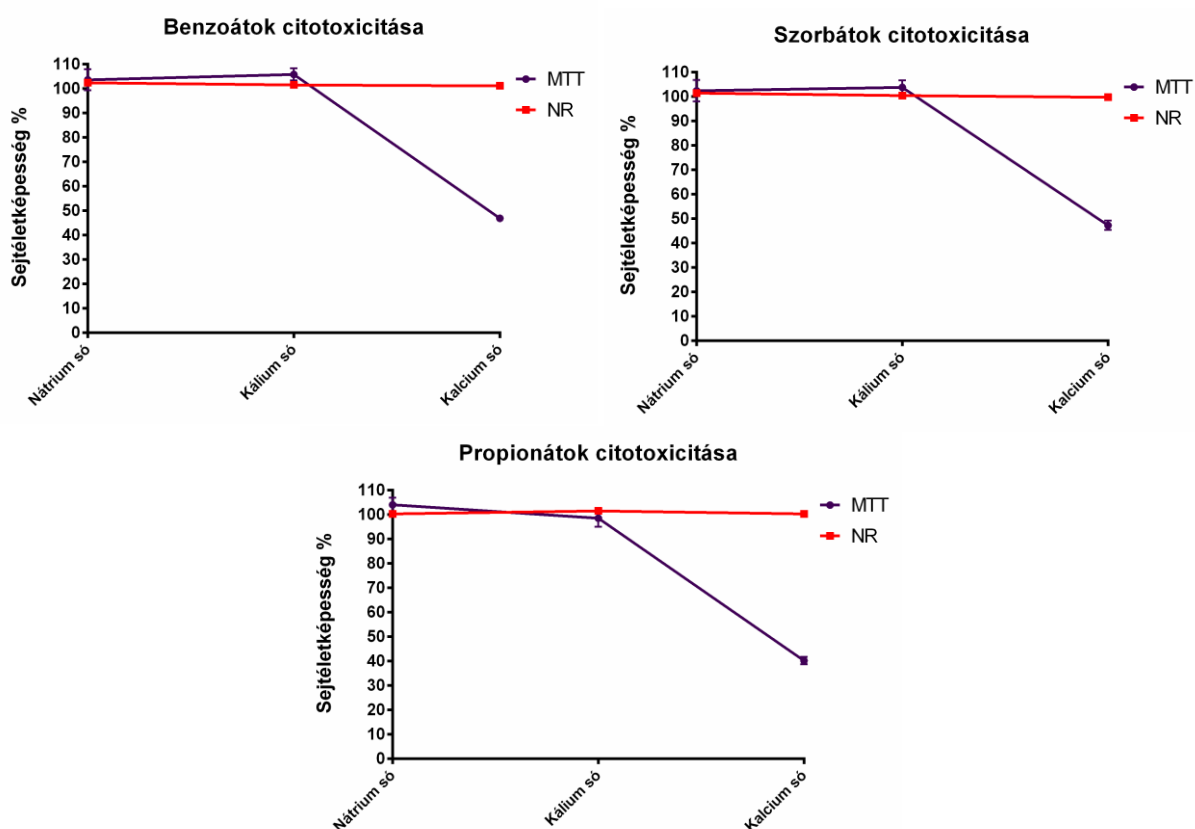
A *P. aeruginosa* köztudottan különösen ellenálló az antibiotikumokkal szemben, így kíváncsiak voltunk, hogy a formulációk tudnak-e javítani a parabének hatékonyságán ezen faj ellenében. A **20. ábrán** látható, hogy egyes kezelések esetén még a kontrollnál is nagyobb abszorbancia volt mérhető, mely stressz indukálta szaporodásnak felel meg.¹⁸⁷ Az első rendszer ismét teljes sejthalált okozott, míg a többi esetben a metil-parabén bizonyult a leghatékonyabb tartósítószernek. A második rendszer hatékonyan növelte mind önmagához, mind az alkoholos oldatokhoz képest az etil- és a *n*-butil-parabén hatását.

Összességében kijelenthető az eredmények alapján, hogy a vizsgált négy, leggyakrabban alkalmazott *p*-hidroxi-benzoésav alkil észter citotoxicitása, illetve antimikrobiális hatása nagymértékben módosul a jelenlévő egyéb, gyógyszer technológiai segédanyagok által, illetve nem állítható fel univerzális, minden körülményre, illetve fajra érvényes hatásossági sorrend a származékok között.

V./3. Szorbát, benzoát és propionát sók citotoxicitási vizsgálata.

A szorbinsav, benzoésav, illetve a propionsav elterjedt tartósítószer, azonban a vegyületek vízoldhatósága korlátozott, ezért nagy mennyiségű vizet tartalmazó, vagy a vizet oldószerként használó termékek esetén sóikat részesítik előnyben (**1. ábra**). Ez elsősorban a kálium-szorbátot, a nátrium-benzoátot és a kálium- illetve nátrium-propionátot jelenti a mindennapi gyakorlatban. Azonban kíváncsiak voltunk arra, hogy azonos savmaradékion koncentráció esetén az egyes sók oldatai eltérő citotoxicitási profillal bírnak-e, van-e a kísérő

ionnak valamilyen sejtelétképességet befolyásoló tulajdonsága. Az Európai Unió engedélyezési gyakorlata is mutatja, hogy az egyes sók külön vegyületnek tekintendők, minden egyes származékra egyedi vizsgálatok szükségesek.¹⁸⁸ A hivatkozott rendelet törli az engedélyezett élelmiszeripari segédanyagok közül a kalcium-szorbátot a szorbinsav és kálium-szorbát mellől, mivel nem áll rendelkezésre megfelelő genotoxicitási adat és a felhívás ellenére egy forgalmazó/előállító sem nyújtotta be a hiányzó kísérletes eredményeket. Új citotoxicitási módszerként a Neutral Red (NR) tesztet vezettük be, mely azt méri, hogy mennyi festéket vesznek fel a sejtek a médiumból, a tartósítószeres kezelés után és eltérő működéséből adódóan kiegészíti az MTT-tesztet. Méréseinket Caco-2 sejteken végeztük. A mérések kivitelezésében Mező Mirtill gyógyszerészhallgató segített.



21. A, B, C ábra: Benzoátok, (A) szorbátok (B) és propionátok (C) citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT és NR-teszttel mérve, 0,1 m/v% savmaradékion koncentráció értéken sóoldatban oldva. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanációjának átlagát és ± SEM-et jelzik. A sejtelétképesség százalékos értéke a csak a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll sejtek abszorbanációjára alapján került kiszámításra.

A nátrium-benzoát, kálium-benzoát és kalcium-benzoát esetén ábrázolt értékek (21. A ábra):

MTT-teszt: 103,6% ± 4,3%; 105,8% ± 2,5%; 46,9% ± 1,3% **NR-teszt:** 102,4% ± 0,2%; 101,5 ± 0,5%; 101,1% ± 0,5%

A nátrium-szorbát, kálium-szorbát és kalcium-szorbát esetén ábrázolt értékek (21. B ábra):

MTT-teszt: 102,4% ± 4,4%; 103,8% ± 2,9%; 47,3% ± 1,9% **NR-teszt:** 101,4% ± 0,5%; 100,4 ± 0,6%; 99,7% ± 1%

A nátrium-propionát, kálium-propionát és kalcium-propionát esetén ábrázolt értékek (21. C ábra):

MTT-teszt: 104% ± 2,9%; 98,5% ± 3,5%; 40,2% ± 1,5% **NR-teszt:** 100,3% ± 0,5%; 101,5 ± 0,5%; 100,3% ± 0,7%

A statisztikai analízis eredménye két mintás t-próba alapján:

minden egyéb propionát vs. kalcium-propionát: ****

minden egyéb szorbát vs. kalcium-szorbát: ****

A statisztikai analízis eredménye Mann-Whitney teszt alapján:

minden egyéb benzoát vs. kalcium-benzoát: ****

Egyéb esetekben a kezelt csoportok között nem voltak szignifikánsak a különbségek.

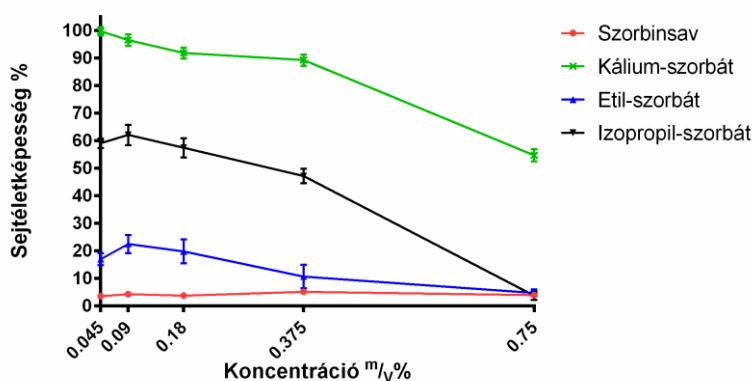
Az eredményeken látszik, hogy az MTT-teszt esetén jelentős életképesség csökkenés csak a kalcium sók esetén volt megfigyelhető, míg az NR-teszt semmilyen életképesség csökkenést nem mutatott. (21. A, B, C ábra) Párhuzamosan mikrodilúciós antimikrobiális vizsgálatokat is végeztünk, melyek nem mutattak jelentős eltérést az egyes sók eredményei között a különböző alkáli-, alkáliföldfém ionok tekintetében.

V./4. Különböző szorbinsav származékok biokompatibilitási és antimikrobiális vizsgálata.

Kísérletsorozatunk alapját egy 2007-es közlemény adta, melyben különböző oldalláncokkal rendelkező szorbinsav észtereket vizsgáltak antimikrobiális szempontból, hogy a szerkezet-hatás között korrelációt találjanak, mely matematikailag is leírható a különböző szerkezeti csoportok és a gátlás mértéke tekintetében.¹⁸⁹ A tartósítószer kovalens módosítása, ezáltal az aktív vegyületfejlesztés különösen ritka, ezért saját módszereinkkel szeretnénk volna megvizsgálni a toxicitását és antimikrobiális hatását néhány, a publikációban szereplő vegyületnek. A közleményben leírt több mint negyven szorbinsav-észter közül a felhasználást figyelembe véve csak a jobb vízoldékonyságú származékokkal akartunk foglalkozni, valamint az aromás, illetve nitrogén tartalmú észtereket is kizártuk az esetleges nagyobb toxicitás miatt. Így két egyszerű alkil-láncú vegyületet, az etil-szorbátot és az izopropil-szorbátot hasonlítottuk össze szorbinsavval és kálium-szorbáttal. Az etil-szorbát kereskedelmi forgalomban elérhető volt, míg az izopropil-szorbát szintetizálásában és tisztításában a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémia Tanszékének munkatársai segítettek, prof. dr. Herczegh Pál, prof. dr. Borbás Anikó, dr. Kelemen Viktor, dr. Szűcs Zsolt, Róth Józsefné, Bodza Márta és a Szerves Kémiai Tanszék munkatársa Balla Sára.

V./4.1. Különböző szorbinsav származékok biokompatibilitási vizsgálata.

A sejtéletképességet Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel mértük. Új módszerként *in vivo* toxicitást is vizsgáltunk, *Galleria mellonella* lárvákon, melyekbe a különböző koncentrációjú anyagokat fecskendeztünk be, illetve áramlási citométerrel is vizsgáltuk, hogy a négy anyag nekrotikus vagy apoptotikus hatású-e.



22. ábra: Szorbinsav származékok citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtleletképeség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

A szorbinsav, kálium-szorbát, etil-szorbát és izopropil-szorbát esetén ábrázolt értékek:

0,045^{m/v}%: 3,6% \pm 0,2%; 99,8% \pm 1,5%; 17% \pm 2,2%; 59,1% \pm 1,7%

0,09^{m/v}%: 4,3% \pm 0,1%; 96,6 \pm 2,1%; 22,5% \pm 3,3%; 62,1% \pm 3,7%

0,18^{m/v}%: 3,8% \pm 0,1%; 91,9 \pm 2%; 19,9% \pm 4,3%; 57,4% \pm 3,5%

0,375^{m/v}%: 5,1% \pm 0,3%; 89,3 \pm 2%; 10,7% \pm 4,3%; 47,2% \pm 2,6%

0,75^{m/v}%: 4% \pm 0,3%; 54,7 \pm 2,2%; 4,8% \pm 1,2%; 3,8% \pm 1,6%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

0,045^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ****

0,045^{m/v}% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: ***

0,045^{m/v}% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,09^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ****

0,09^{m/v}% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: ***

0,09^{m/v}% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,18^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ****

0,18^{m/v}% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: ***

0,18^{m/v}% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,375^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ****

0,375^{m/v}% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: **

0,375^{m/v}% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,75^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ***

0,75^{m/v}% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: n.sz.

0,75^{m/v}% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: ****

0,045^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,045^{m/v}% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: ***

0,045^{m/v}% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,09^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,09^{m/v}% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: ***

0,09^{m/v}% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,18^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,18^{m/v}% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: ****

0,18^{m/v}% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,375^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,375^{m/v}% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: ****

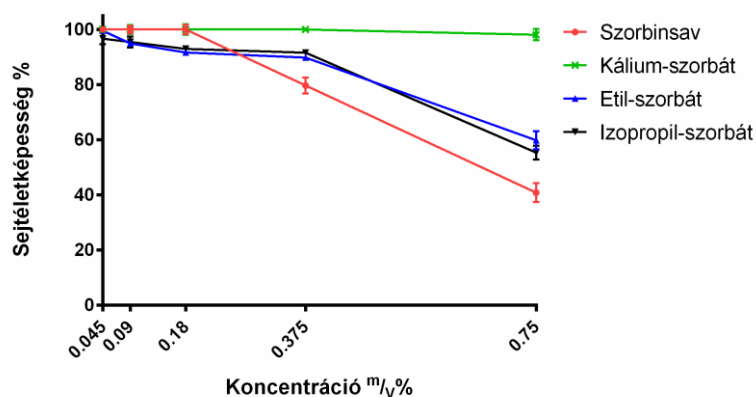
0,375^{m/v}% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: **

0,75^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,75^{m/v}% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: **

0,75^{m/v}% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.

A **22. ábrán** látható MTT-teszt eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált szorbinsav származékok legtöbbje koncentrációfüggő módon csökkenti a sejtleletképeséget, ellenben a szorbinsav esetén minden vizsgált koncentráció értéken rendkívül alacsony citotoxicitás látható. Az észterek értékei a szorbinsav és a kálium-szorbát között helyezkednek, mely utóbbi vegyület még a legnagyobb vizsgált koncentráción is 50% feletti sejtleletképeséget mutatott.



23. ábra: Szorbinsav származékok citotoxicitása Caco-2 sejteken NR-tesztel mérve. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtleletképeség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

A szorbinsav, kálium-szorbát, etil-szorbát és izopropil-szorbát esetén ábrázolt értékek:

0,045^{m/v}%: 100% \pm 1%; 100% \pm 1,1%; 99,6% \pm 0,4%; 96,7% \pm 2,1%

0,09^{m/v}%: 100% \pm 0,1%; 100 \pm 1,6%; 95% \pm 0,7%; 95,5% \pm 2%

0,18^{m/v}%: 100% \pm 0,1%; 100 \pm 1,9%; 91,7% \pm 0,9%; 93% \pm 1%

0,375^{m/v}%: 79,7% \pm 2,9%; 100 \pm 0,5%; 89,9% \pm 0,9%; 91,6% \pm 1%

0,75^{m/v}%: 40,8% \pm 3,4%; 98,2 \pm 2%; 59,8% \pm 3,3%; 55,3% \pm 2,5%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

0,045^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: n.sz.

0,045^{m/v}% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: n.sz.

0,045^{m/v}% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.

0,09^{m/v}% szorbinsav vs. kálium-szorbát: n.sz.

0,045^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,045^{m/v}% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: n.sz.

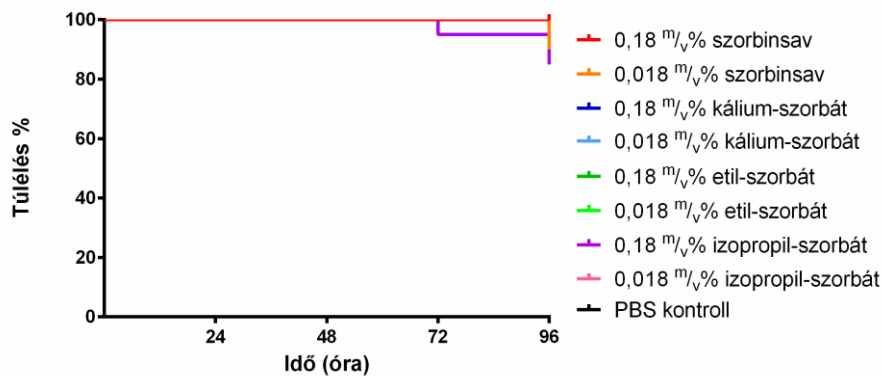
0,045^{m/v}% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.

0,09^{m/v}% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.

0,09^m/v% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: *
 0,09^m/v% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: *
 0,18^m/v% szorbinsav vs. kálium-szorbát: n.sz.
 0,18^m/v% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: *
 0,18^m/v% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: *
 0,375^m/v% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ****
 0,375^m/v% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: n.sz.
 0,375^m/v% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: **
 0,75^m/v% szorbinsav vs. kálium-szorbát: ****
 0,75^m/v% szorbinsav vs. izopropil-szorbát: **
 0,75^m/v% kálium-szorbát vs. izopropil-szorbát: ****

0,09^m/v% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: *
 0,09^m/v% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.
 0,18^m/v% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.
 0,18^m/v% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: *
 0,18^m/v% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.
 0,375^m/v% szorbinsav vs. etil-szorbát: n.sz.
 0,375^m/v% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: ***
 0,375^m/v% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.
 0,75^m/v% szorbinsav vs. etil-szorbát: ***
 0,75^m/v% kálium-szorbát vs. etil-szorbát: ****
 0,75^m/v% etil-szorbát vs. izopropil-szorbát: n.sz.

Az NR-teszt PBS oldatban mért enzimátikus átalakulás helyett sejt tápfolyadékából történő festék felvételét méri, ezért joggal feltételeztük, hogy az MTT-teszttől eltérő citotoxicitást tapasztalunk. A mérések visszaigazolták ezt, sokkal kisebb citotoxicitás volt megfigyelhető minden koncentráció esetén. (23. ábra) A leghígabb oldatok nem mutattak egyáltalán sejtkárosító hatást, míg a töményebbek esetén ugyanaz a relatív toxicitási sorrend alakult ki, mint az MTT-teszt esetén. A szorbinsav volt a legtoxikusabb, míg a kálium-szorbát a legkevésbé toxikus és a két észter ezen anyagok között helyezkedett el.

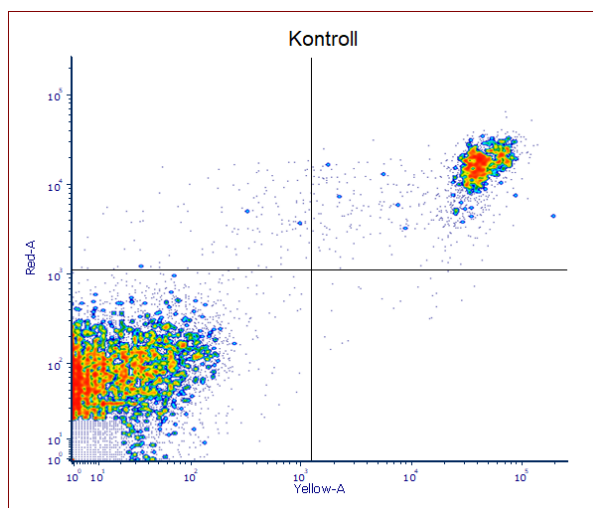


24. ábra: Szorbinsav származékok hatása *G. mellonella* lárvákra. Az egyes kezelt csoportok 20 lárvát tartalmaztak és 20 µl oldattal lettek befecskendezve. **Az egyes egyedek elpusztulásának ideje:**

24 óra: 0; 48 óra: 0; 72 óra: 1 db – 0,18^m/v% izopropil-szorbát; 1 db – 0,018^m/v% izopropil-szorbát
 96 óra: 2 db – 0,018^m/v% szorbinsav; 1 db – 0,018^m/v% etil-szorbát; 2 – 0,18^m/v% izopropil-szorbát; 2 – 0,018^m/v% izopropil-szorbát

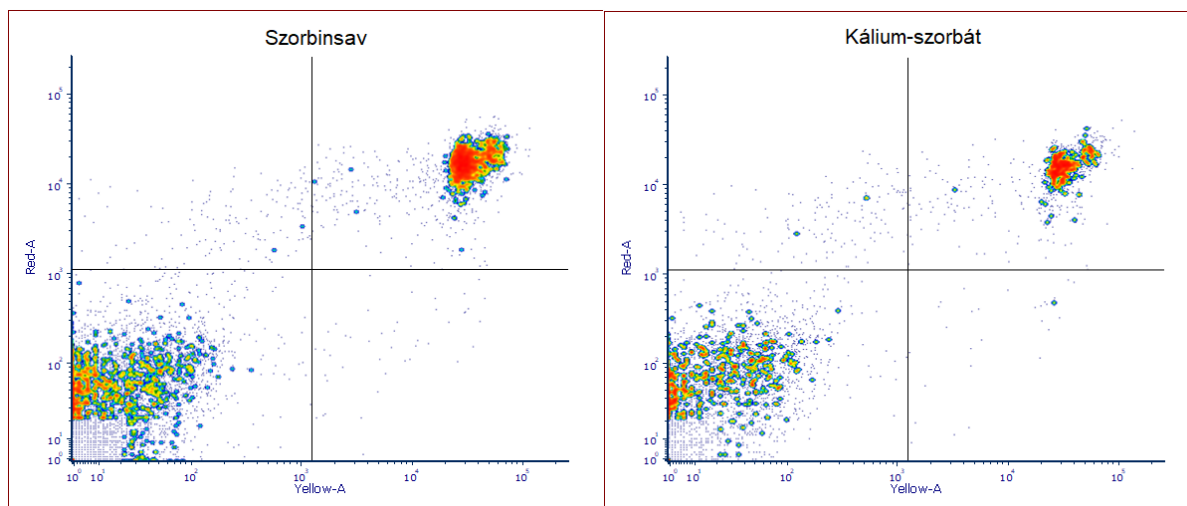
Az egyes csoportok túlélési görbéi sem Mantel-Cox próbával, sem Gehan–Breslow–Wilcoxon próbával nem voltak szignifikánsan különbözőek.

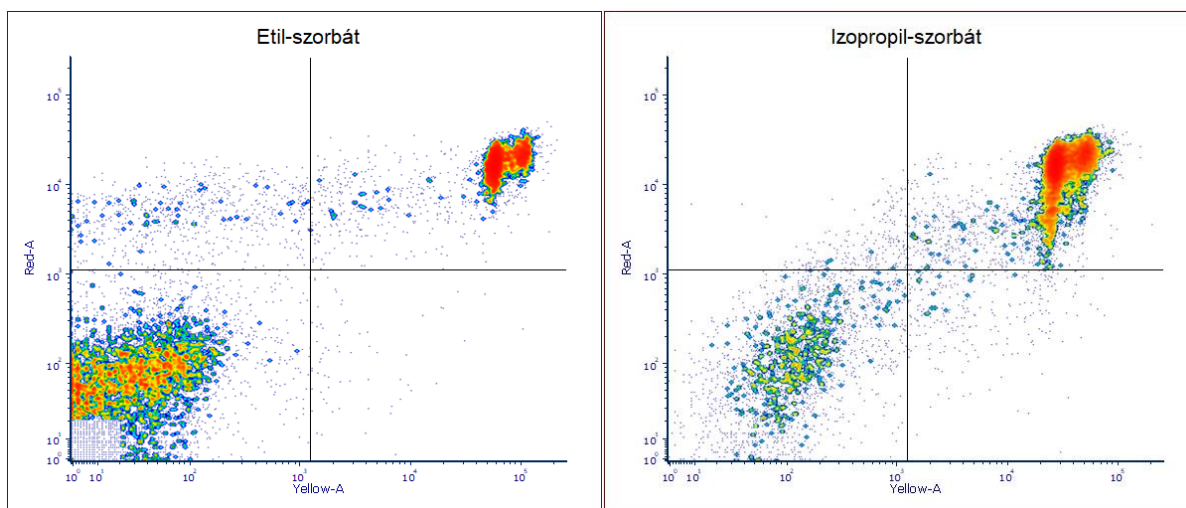
Az *in vitro* kísérletek kiegészítéseképpen alkalmaztunk *Galleria mellonella* lárvákat. A mérésekre Dr. Pfliegler Valter Péter betanításával, a Debreceni Egyetem Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén került sor. Habár a kísérlet vége felé több állat is elpusztult az észterrel kezelt csoportból, a Kaplan-Meier görbék statisztikai elemzése a kísérlet egész időtartamát vizsgálva nem mutat szignifikáns különbséget a csoportok között. (24. ábra)



25. ábra: Kezeletlen Caco-2 sejtek áramlási citometriás analízise propídium-jodiddal és annexin V-el festve. A háromszori ismétlés alapján számolt átlagos sejt megoszlás a bal felső (PI+, AV -), jobb felső (PI+, AV+) a bal alsó (PI-, AV-) és a jobb alsó (PI-, AV+) kvadránsok között \pm SEM: 1,4% \pm 0,1%; 18,1% \pm 1,2%; 80,3% \pm 1,3%; 0,3% \pm 0,0%

Az egyes vegyületek eltérő citotoxikus hatását a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében Rebenku István segítségével mértük áramlási citometriát alkalmazva, annexin V és propídium-jodid festéssel. A propídium-jodid egy DNS-hez kötődő, membránon átpenetrálni nem képes festék, ezért az elpusztult sejteket jelöli meg. Az annexin V képes az apoptotizáló sejtek membránján feldúsuló foszfatidilszerinhez kötődni. A nem festődő sejtek az élő sejtek (bal alsó kvadránsok az ábrákon), a csak propídium-jodiddal festődő sejtek a nekrotikus sejtek (bal felső kvadráns), a mindkét festékkel festődő sejtek az apoptotikus sejtek (jobb felső kvadráns), a csak annexinnel jelzett sejtek pedig elvértve fordultak csak élő (jobb alsó kvadráns). A **25. ábrán** látható, hogy a kezeletlen sejtek 80%-a élő volt, csupán 20%-uk volt vagy nekrotikus vagy apoptotikus.





26. A, B, C, D ábra: 0,75 %-os oldatokkal kezelt Caco-2 sejtek áramlási citometriás analízise propidium-jodiddal és annexin V-el festve. A háromszori ismétlés alapján számolt átlagos sejt megoszlás a bal felső (PI+, AV -), jobb felső (PI+, AV+) a bal alsó (PI-, AV-) és a jobb alsó (PI-, AV+) kvadránsok között \pm SEM:

26. A. szorbinsav: $1,9\% \pm 0,1\%$, $29,3\% \pm 0,4\%$, $68,2\% \pm 0,4\%$, $0,5\% \pm 0,0\%$.

26. B. kálium-szorbát: $4\% \pm 0,2\%$, $27,9\% \pm 2,1\%$, $67,5\% \pm 2,2\%$, $0,5\% \pm 0,1\%$.

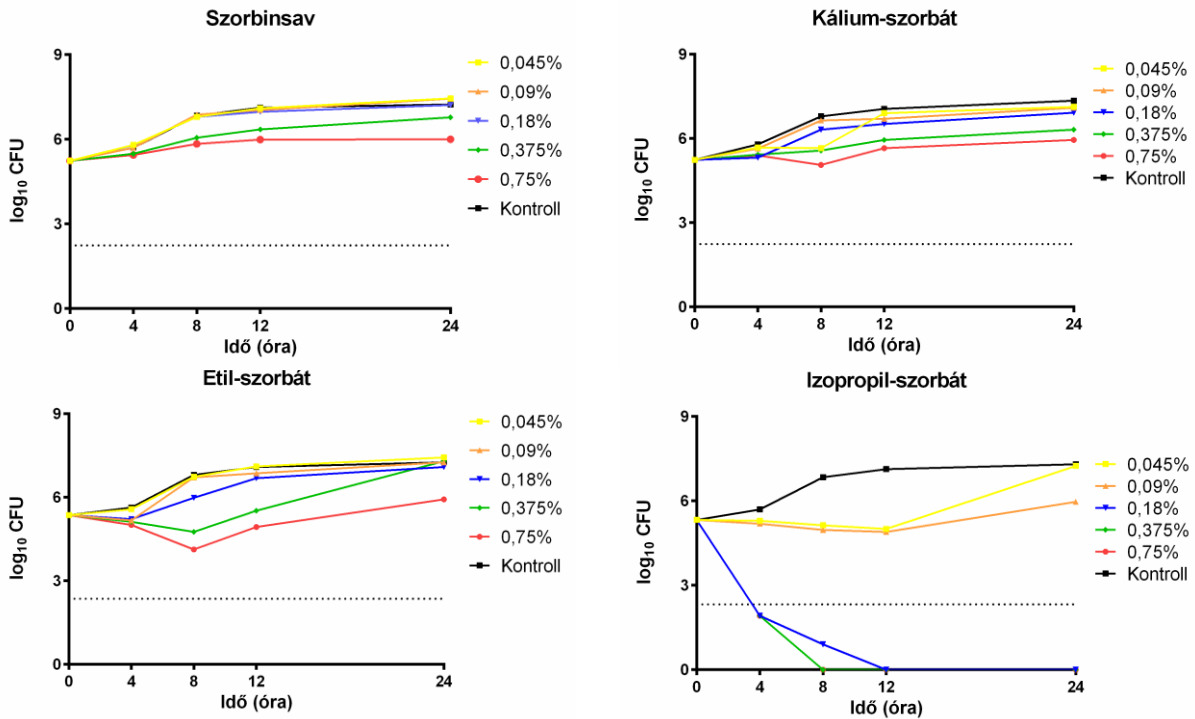
26. C. etil-szorbát: $6,5\% \pm 0,1\%$, $28,5\% \pm 0,3\%$, $64,3\% \pm 0,5\%$, $0,6\% \pm 0,0\%$.

26 D. izopropil-szorbát: $1,9\% \pm 0,1\%$, $67,8\% \pm 0,4\%$, $27,3\% \pm 0,4\%$, $3\% \pm 0,1\%$.

A **26. A, B, C ábrákon** látható, hogy a kezelések az szorbinsav, a kálium- és az etil-szorbát esetén átlagosan 64-68%-ra csökkentették a túlélő sejtek arányát és 28-29%-ra nöött az apoptotikus sejtek aránya. Az izopropil-szorbát jelentősen eltérő viselkedést mutatott, mivel a detektált sejtek 68%-a apoptotikus volt és csupán 27%-uk élt túl. (**29. B ábra**)

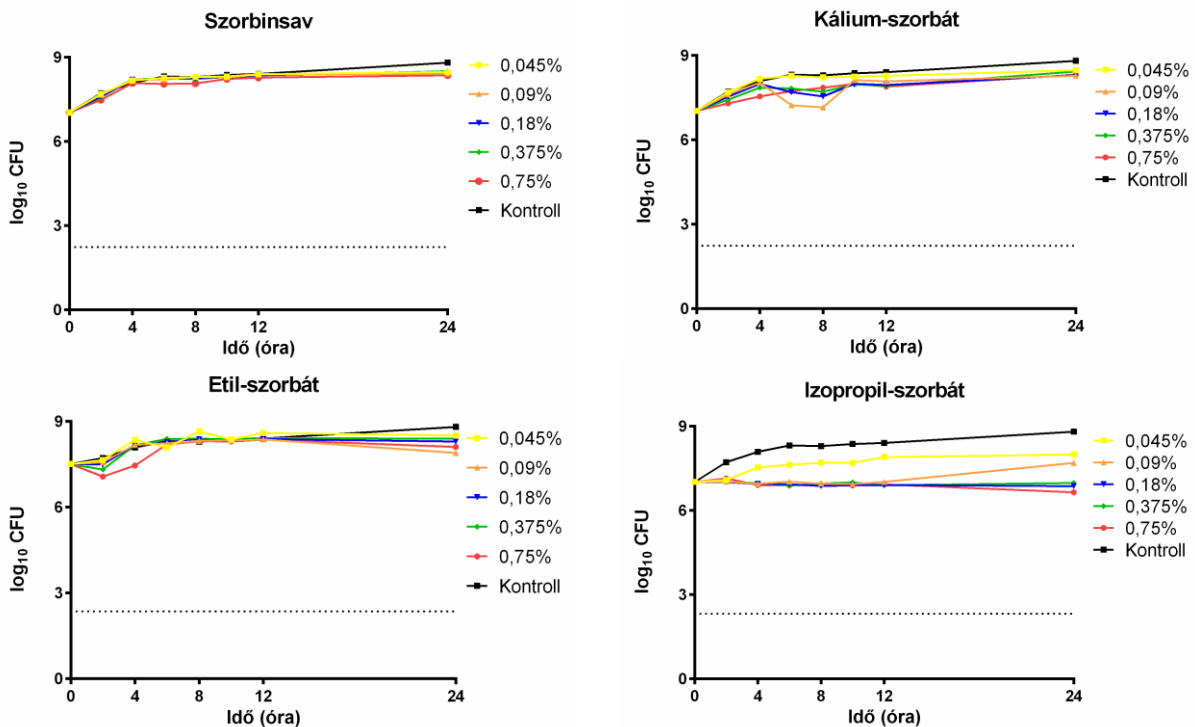
V./4.2. Különböző szorbinsav származékok antimikrobiális vizsgálata.

A mikrobiális kísérleteket a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének munkatársai, dr. Kovács Renátó László, Nagy Fruzsina és Tóth Zoltán végezték. Ezeket az eddigiektől eltérően nem mikrodilúciós, hanem idő-ölés (time-kill) kísérlettel vizsgáltuk, a kevesebb vizsgálandó anyagnak köszönhetően. Ez a módszer sokkal munkaigényesebb, ugyanakkor pontos képet ad a vizsgált anyagok antimikrobiális hatásának időbeli lefutásáról, mivel az adott időpillanatokban kioltás történik és egyedileg meghatározásra kerül az aktuális telepképző egység (CFU) szám. A korábbiaktól eltérően csupán három fajra csökkentettük a felhasznált referencia törzsek számát, egy gombát (*C. albicans*), egy Gram pozitív (*S. aureus*) és egy Gram negatív (*E. coli*) baktériumot alkalmaztunk. Az 50%-os telepképző egység csökkenést ezen ábrákon is szaggatott vonal jelzi.



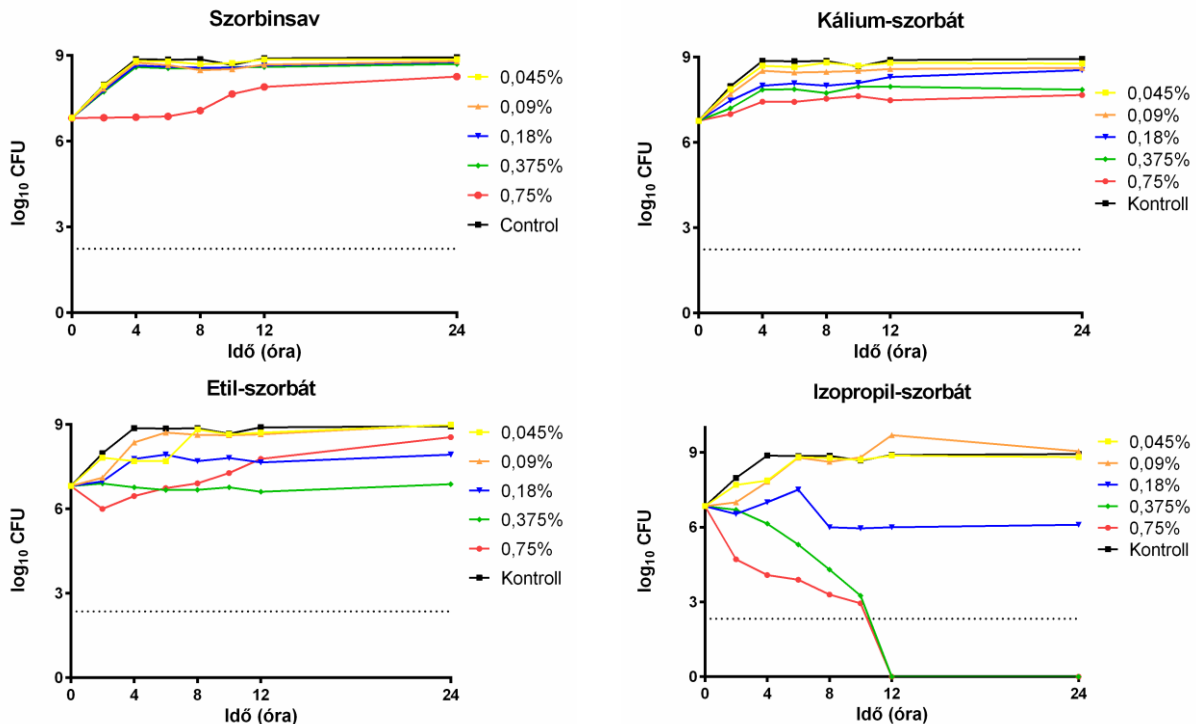
27. A, B, C, D ábrák: Szorbinsav származékok hatása *C. albicans* referencia törzs ellen.

Az antifungális kísérletek azt mutatják, hogy a szorbinsav és a kálium-szorbát csupán a legmagasabb, 0,75 m/v%-os koncentráción tudott gyenge sztatikus hatást mutatni. (27. A, B. ábrák) Ezzel szemben az etil-szorbát a 0,375 v/v% és a 0,75 v/v% koncentrációk esetén is kis mértékű ölést mutatott a 8. óráig. (27. C ábra) Az izopropil-szorbát 0,18 v/v% koncentráció alatt a 12. óráig fungisztatikus, e fölött minden esetben fungicid hatással bírt (27. D ábra)



28. A, B, C, D ábrák: Szorbinsav származékok hatása *S. aureus* referencia törzs ellen.

A Gram pozitív baktérium nagyon ellenállónak bizonyult a különböző kezelésekkel szemben, a kezdeti CFU szám növekedett a különböző vegyületek jelenléte mellett is. (28. A, B, C ábra) Csupán az izopropil-szorbát volt képes a mikroorganizmus szaporodását a kísérlet végéig gátolni, de csak a 0,18^{v/v}% és e feletti koncentrációk esetén. (28. B ábra)



29. A, B, C, D ábrák: Szorbinsav származékok hatása *E. coli* referencia törzs ellen.

Az utolsó vizsgált fajon hasonló eredményeket kaptunk, mint korábban. A 29. D ábrán látható, hogy míg az izopropil-szorbát a két legnagyobb koncentráció esetén baktericid hatású, az ezeket követő 0,18^{v/v}% koncentráción pedig bakteriosztatikus, addig a többi szer csupán a legnagyobb töménységben volt sztatikus és ott sem 24 órán át tartott a hatás. (29. A, B, C ábra)

Összességében megállapítható volt a szorbinsav alkil észterek, ezeken belül is az izopropil-szorbát jelentősen eltérő biokompatibilitása és antimikrobiális hatása a kiindulási vegyülethez és annak kálium sójához képest.

V./5. Különböző illóolaj tartalmú emulziók formulációja, biokompatibilitási vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal.

A szakirodalomban ismert, hogy a különböző növényi illóolajok jelentős antimikrobiális hatással bírnak akár rezisztens kórokozókkal szemben is.¹⁹⁰ Azonban ezt a hatást nem csak rövid ideig, terápiásan vagy fertőtlenítési céllal lehet használni, hanem hosszú távon, akár tartósítás céljára is alkalmazható.¹⁹¹⁻¹⁹³ Emiatt gondoltuk úgy, hogy a Gattefossé cég modern gyógyszer technológiai segédanyagait felhasználva (melyek biokompatibilitását korábban vizsgáltuk a Gyógyszer technológiai Tanszéken) emulziós rendszereket formulálunk. A

hatóanyag standardizálása miatt, gyógyszerkönyvi (Ph. Eur. 9.) minőségű borsmenta (*Menthae piperitae aetheroleum*), citrom (*Limonis aetheroleum*) és rozmaring (*Rosmarini aetheroleum*) illóolajat használtunk. Habár az ismert, hogy emulzióként hatékonyabbak az illóolajok, arra is kíváncsiak voltunk, hogy egy hagyományos tartósítószerrel, a kálium-szorbáttal kiegészítve, hogyan módosulnak a készítmény antimikrobiális és biokompatibilitási paraméterei. A sejtelmeképességi vizsgálatokat Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel, az *in vivo* toxicitást *G. mellonella* lárvákon, míg a kórokozók elleni hatékonyságot mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk. Az illóolajok műbizonylat szerinti összetétele a 2. Függelékben olvasható.

Az emulziók összeállításában Fekete Helga és Gyulai Renáta gyógyszerészhallgatók segítettek. Szakirodalmi adatok alapján 4% olaj tartalommal kezdtünk kísérletezni, melyet 3:1 arányban osztottunk meg az illóolaj és a semleges lenolaj között, melyet a hivatkozott publikáció az Ostwald-féle érés csökkentésére javasolt.¹⁹⁴ A gyakorlatban azonban azt tapasztaltuk, hogy nem befolyásolja kedvezően a lenolaj alkalmazása az emulzió stabilitását. Emulgeálószerként Labrasol ALF[®]-t, poliszorbát 20 és 80 tenzideket hasonlítottunk össze, melyek közül egyértelműen az első bizonyult a leghatékonyabbnak, utóbbiak esetén az emulzió szinte azonnal szétvált. Azonban a Labrasol ALF[®] önmagában nem bizonyult elegendőnek egy stabil emulzió kialakítására, ezért egyrészt koszolvensként glicerint és propilén-glikolt, valamint viszkozitásnövelőként xantán gumit és tragakantát próbáltunk ki. Végül, több, hasonló stabilitást mutató összetételt formuláltunk, melyek 10 ^{V/V}% vagy 30 ^{V/V}% glicerint, 2 mg/ml xantán gumit és 0,5/1/1,5/2 ^{V/V}% Labrasol ALF[®]-t tartalmaztak. A különböző emulziókban centrifugálással próbáltuk a fázis szeparációt elősegíteni 2000-4000 RPM-en, 4-6 percen keresztül. Az azonos illóolaj tartalmú emulziókat egyre növekvő fordulaton, egyre hosszabb ideig centrifugáltuk, egészen addig, amíg az összes formuláció közül csak egy maradt stabil. A végső receptúrák az alábbiak voltak:

1. 4 ^{V/V}% borsmenta illóolaj, 2 ^{V/V}% Labrasol ALF[®], 30 ^{V/V}% glicerint, 64 ^{V/V}% víz, 2 mg/ml xantán gumi
2. 4 ^{V/V}% rozmaring illóolaj, 2 ^{V/V}% Labrasol ALF[®], 30 ^{V/V}% glicerint, 64 ^{V/V}% víz, 2 mg/ml xantán gumi
3. 4 ^{V/V}% citrom illóolaj, 1,5 ^{V/V}% Labrasol ALF[®], 10 ^{V/V}% glicerint, 84,5 ^{V/V}% víz, 2 mg/ml xantán gumi

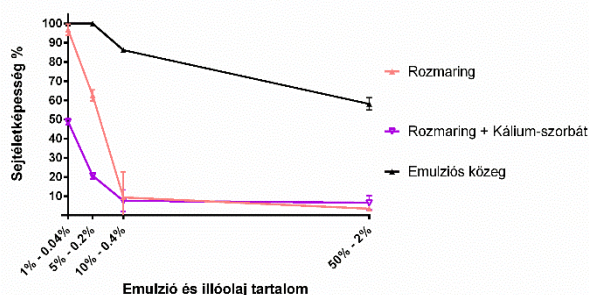
Mind a három emulziót vizsgáltuk önmagában és 2 mg/ml kálium-szorbáttal kiegészítve. Minden kísérlet előtt frissen készítettük el a mintákat, jeges fürdőbe mártott centrifuga csőben mértük össze a xantán gumi kivételével a komponenseket és egy IKA T25 ULTRA-TURRAX[®] (IKA-Werke Staufen, Németország) homogenizálóval 11.000 RPM fordulaton öt percig, egy

S25D-10G-KS homogenizáló szerszámmal kevertük a mintákat, miközben a csövek kupakkal voltak lezárva, amin csak a szerszámnak megfelelő nagyságú lyuk volt, így minimalizálva a hatóanyag elpárolgását, hőbomlását. A homogenizálás után hozzáadtuk a mintákhoz a megfelelő mennyiségű xantán gumit és rázással oldottuk. A xantán gumi hozzáadásával a minták optikai denzitása megnőtt, ezért a Tanszéken lévő Zetasizer Nano DLS készülékkel nem tudtuk a részecskeméretet és annak időbeli változását megmérni.

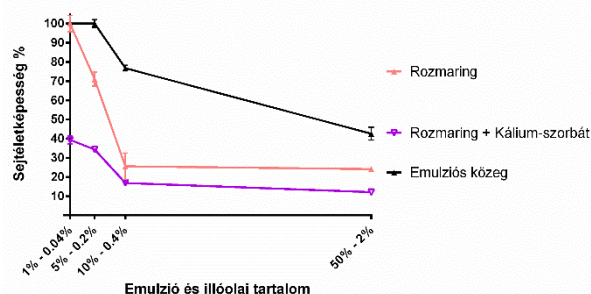
V./5.1. Különböző illóolaj tartalmú emulziók biokompatibilitási vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal.

Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz a mintákat PBS-el hígítottuk 50%, 10%, 5% és 1% emulzió tartalomra, így az eredeti illóolaj és kálium-szorbát koncentráció arányosan hígult.

Illóolaj emulziók citotoxicitása MTT-teszt alapján



Illóolaj emulziók citotoxicitása NR-teszt alapján



30. A, B ábra: Rozmaring illóolaj tartalmú emulziók citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT és NR-teszttel mérve. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

Az emulziós közeg, a rozmaring illóolaj, valamint a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók MTT-teszt esetén ábrázolt értékei (30. A ábra):

1^{V/v%}: 100% \pm 1,2%; 96,9% \pm 2,9%; 48,9% \pm 1,6%

5^{V/v%}: 100% \pm 0,7%; 62,6% \pm 2,9%; 20,7% \pm 1,7%

10^{V/v%}: 86,2% \pm 1,2%; 9,3% \pm 13,3%; 7,6% \pm 5,7%

50^{V/v%}: 58,1% \pm 3,2%; 3,5% \pm 1,3%; 6,6% \pm 3,7%

Az emulziós közeg, a rozmaring illóolaj, valamint a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók NR-teszt esetén ábrázolt értékei (30. B ábra):

1^{V/v%}: 100% \pm 1,2%; 100% \pm 4,2%; 39,4% \pm 2,1%

5^{V/v%}: 100% \pm 2%; 71% \pm 3,6%; 34,3% \pm 0,5%

10^{V/v%}: 76,8% \pm 1,5%; 25,6% \pm 6,9%; 16,9% \pm 1,4%

50^{V/v%}: 46,2% \pm 3,4%; 24,1 \pm 1%; 12,1% \pm 1%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

MTT-teszt (30. A ábra):

- 1^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: n.sz.
- 1^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 5^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 10^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: ****
- 10^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: n.sz.
- 50^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****

- 1^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 5^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: ****
- 5^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 10^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 50^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: ****
- 50^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: n.sz.

NR-teszt (30. B ábra):

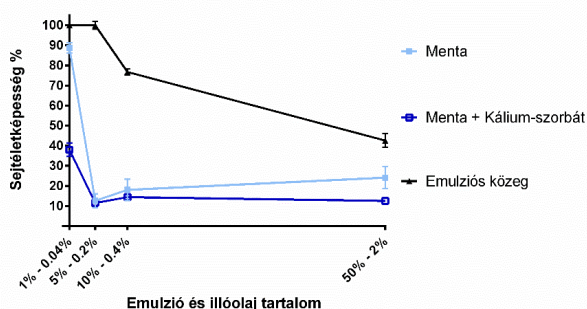
- 1^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: n.sz.
- 1^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 5^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 10^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: ****
- 10^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: n.sz.
- 50^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****

- 1^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 5^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: ****
- 5^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 10^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring + k.-szorbát: ****
- 50^{V/v%} emulziós közeg vs. rozmaring: ****
- 50^{V/v%} rozmaring vs. rozmaring + k.-szorbát: **

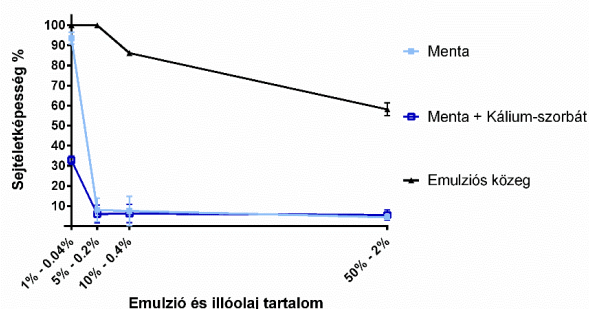
A rozmaring illóolaj tartalmú emulziók vizsgálata során látszik, hogy az MTT- és a NR-teszt eredményei nagyon hasonlóak. (30. A, B ábra) Az emulziós közeg még rendkívül nagy koncentráció esetén is csak alacsony fokú citotoxicitást okoz, 5^{V/v%} koncentráción és alatta

pedig a rozmaring illóolajjal kezelt sejtek több, mint a fele életben maradt. Ellenben a kálium-szorbát jelentősen csökkentette minden koncentráció esetén a sejtéletképességet.

Illóolaj emulziók citotoxicitása NR-teszt alapján



Illóolaj emulziók citotoxicitása MTT-teszt alapján



31. A, B ábra: Borsmenta illóolaj tartalmú emulziók citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT és NR-teszttel mérve. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra.

Az emulziós közeg, a borsmenta illóolaj, valamint a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók MTT-teszt esetén ábrázolt értékei (31. A ábra):

1^{V/v%}: 100% \pm 1,2%; 93,6% \pm 3%; 32,8% \pm 2,1%

5^{V/v%}: 100% \pm 0,7%; 8% \pm 5,8%; 6% \pm 4,4%

10^{V/v%}: 86,2% \pm 1,2%; 7,5% \pm 7%; 6,2% \pm 4,5%

50^{V/v%}: 58,1% \pm 3,2%; 4,4% \pm 1,3%; 5,5% \pm 2,6%

Az emulziós közeg, a borsmenta illóolaj, valamint a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók NR-teszt esetén ábrázolt értékei (31. B ábra):

1^{V/v%}: 100% \pm 1,2%; 88,7% \pm 2,6%; 38% \pm 3,4%

5^{V/v%}: 100% \pm 2%; 12,6% \pm 3,5%; 11,5% \pm 0,6%

10^{V/v%}: 76,8% \pm 1,5%; 18% \pm 5,3%; 14,4% \pm 0,9%

50^{V/v%}: 46,2% \pm 3,4%; 24,1% \pm 5,5%; 12,5% \pm 0,9%

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

MTT-teszt (31. A ábra):

1^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: *
 1^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 5^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 5^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.
 10^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: ****
 10^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.
 50^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****

1^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 5^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: ****
 5^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.
 10^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 50^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: ****
 50^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.

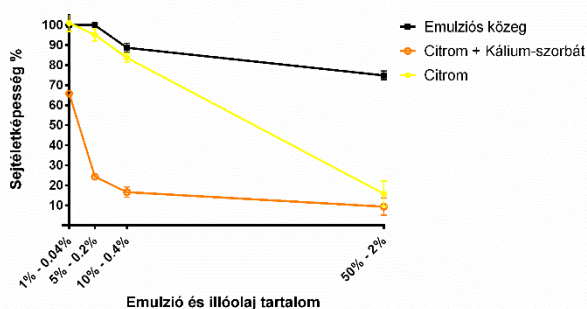
NR-teszt (31. B ábra):

1^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: **
 1^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 5^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 5^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.
 10^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: ****
 10^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.
 50^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****

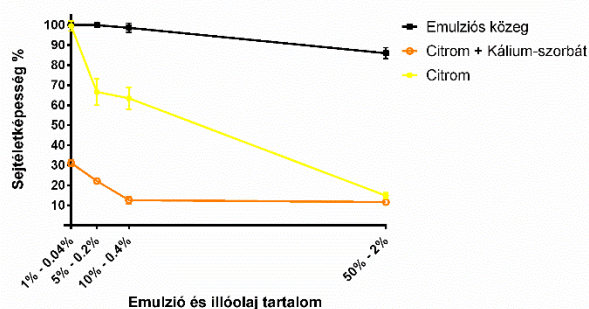
1^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 5^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: ****
 5^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz.
 10^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****
 50^{V/v%} emulziós közeg vs. borsmenta: ****
 50^{V/v%} borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: *

A borsmenta illóolaj tartalmú emulzióknál a rozmaring illóolajat tartalmazókhöz hasonló tendenciák voltak megfigyelhetők, azonban összességében alacsonyabb sejtéletképességi értékeket mértünk, főleg a kálium-szorbátot is tartalmazó emulziók esetén és a két különböző összetételű, illóolajat tartalmazó emulzió között nem volt szignifikáns különbség a legtöbb koncentráció esetén. (31. A, B ábra)

Illóolaj emulziók citotoxicitása MTT-teszt alapján



Illóolaj emulziók citotoxicitása NR-teszt alapján



32. A, B ábra: Citrom illóolaj tartalmú emulziók citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT és NR-teszttel mérve. Az egyes mérési pontok tizenkét lyuk abszorbanációjának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak PBS pufferrel kezelt kontroll sejtek abszorbanációjára alapítva került kiszámításra.

Az emulziós közeg, a citrom illóolaj, valamint a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók MTT-teszt esetén esetén ábrázolt értékei (32. A ábra):

$1^{\vee}/v\%$: $100\% \pm 1\%$; $101,1\% \pm 4,3\%$; $65,8\% \pm 0,7\%$ $5^{\vee}/v\%$: $100\% \pm 0,9\%$; $95,2\% \pm 3,1\%$; $24,3\% \pm 1\%$
 $10^{\vee}/v\%$: $88,7\% \pm 2,2\%$; $83,7\% \pm 2,3\%$; $16,6\% \pm 2,6\%$ $50^{\vee}/v\%$: $74,9\% \pm 2,2\%$; $15,8\% \pm 6,3\%$; $9,3\% \pm 4,4\%$

Az emulziós közeg, a citrom illóolaj, valamint a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók NR-teszt esetén esetén ábrázolt értékei (32. B ábra):

$1^{\vee}/v\%$: $100\% \pm 1\%$; $99,6\% \pm 2,5\%$; $31,1\% \pm 1,8\%$ $5^{\vee}/v\%$: $100\% \pm 1,4\%$; $66,6\% \pm 6,6\%$; $22,1\% \pm 1,1\%$
 $10^{\vee}/v\%$: $98,7\% \pm 2,2\%$; $63,5\% \pm 5,5\%$; $12,6\% \pm 1,8\%$ $50^{\vee}/v\%$: $86\% \pm 2,8\%$; $14,8\% \pm 1,5\%$; $11,6\% \pm 0,6\%$

A statisztikai analízis eredménye ANOVA és Tukey-Kramer teszt alapján:

MTT-teszt (32. A ábra):

$1^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: n.sz.
 $1^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $5^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $10^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: n.sz.
 $10^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $50^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****

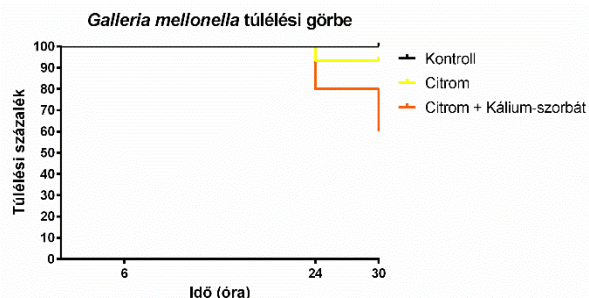
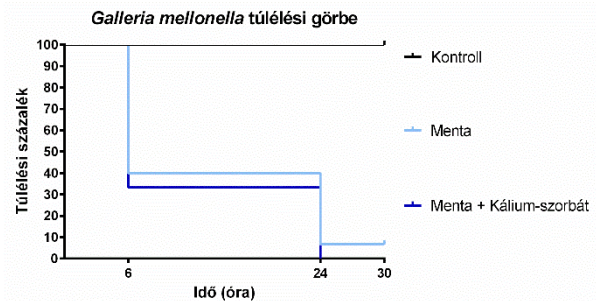
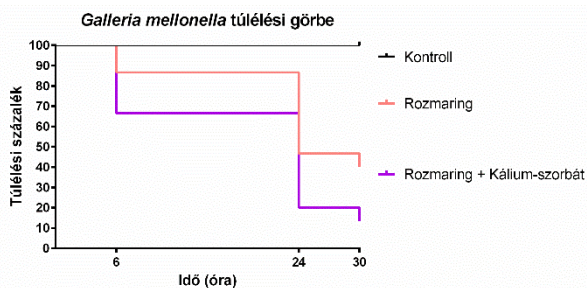
$1^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $5^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: n.sz.
 $5^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $10^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $50^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: ****
 $50^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: n.sz.

NR-teszt (32. B ábra):

$1^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: n.sz.
 $1^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $5^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $10^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: ****
 $10^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $50^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****

$1^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $5^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: ****
 $5^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $10^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: ****
 $50^{\vee}/v\%$ emulziós közeg vs. citrom: ****
 $50^{\vee}/v\%$ citrom vs. citrom + k.-szorbát: n.sz.

A három illóolaj közül, mind az emulziós rendszert, mind az illóolaj tartalmú emulziót tekintetbe véve, a citrom illóolaj produkálta a legkisebb citotoxicitást mindkét teszt esetében. (32. A, B ábra) A kálium-szorbát hozzáadása azonban ez esetben is jelentősen növelte a sejtkárosodás mértékét.



33. A, B, C ábra: Illóolaj tartalmú emulziók hatása G. mellonella lárvákra. Az egyes kezelt csoportok 15 lárvát tartalmaztak és 20 μ l oldattal lettek befecskendezve. Kontrollként a két emulziós közeget és PBS-t is vizsgáltunk, azonban mivel egyik csoport esetén sem történt elhalálozás, ezeket egységesen „Kontroll”-ként ábrázoltam. Az egyes elhalálozások ideje:

6 óra: 2 db – rozmaring illóolaj; 9 db – borsmenta illóolaj, 5 db – rozmaring + k.-szorbát; 10 db – borsmenta + k.-szorbát
 24 óra: 1 db – citrom illóolaj; 6 db rozmaring illóolaj, 5 db borsmenta illóolaj, 3 db – citrom illóolaj + k.-szorbát; 7 db rozmaring + k.-szorbát; 5 db – borsmenta + k.-szorbát
 30 óra: 1 db rozmaring illóolaj; 3 db – citrom illóolaj + k.-szorbát; 1 db rozmaring + k.-szorbát;

Statisztikai analízis eredménye Mantel-Cox (első érték) és Gehan–Breslow–Wilcoxon (második érték) próba eredményei alapján:

33. A ábra:

emulziós közeg vs. citrom: n.sz./n.sz.
citrom vs. citrom + k.-szorbát: */*

emulziós közeg vs. citrom + k.-szorbát: */*

33. B ábra:

emulziós közeg vs. borsmenta + k.-szorbát: ****/****
borsmenta vs. borsmenta + k.-szorbát: n.sz./n.sz.

emulziós közeg vs. borsmenta: ****/****

33. C ábra:

emulziós közeg vs. rozmarying: **/***
rozmarying vs. rozmarying + k.-szorbát: n.sz./n.sz.

emulziós közeg vs. rozmarying + k.-szorbát: ****/****

Ábrák összehasonlító elemzése:

citrom vs. rozmarying: **/***
citrom vs. borsborsmenta: ****/****
citrom + k.-szorbát vs. rozmarying: n.sz./n.sz.
citrom + k.-szorbát vs. borsborsmenta: ****/****
rozmarying vs. borsmenta: **/***
rozmarying + k.-szorbát vs. borsmenta: n.sz./n.sz.

citrom vs. rozmarying + k.-szorbát: ****/****
citrom vs. borsborsmenta + k.-szorbát: ****/****
citrom + k.-szorbát vs. rozmarying + k.-szorbát: **/***
citrom + k.-szorbát vs. borsmenta + k.-szorbát: ****/****
rozmarying vs. borsmenta + k.-szorbát: **/***
rozmarying + k.-szorbát vs. borsmenta + k.-szorbát: */*

Az *in vivo* eredmények alapján nagyon jól elkülönül a legtoxikusabb borsmenta, az alig toxikus citrom és a kettő között elhelyezkedő rozmarying illóolajat tartalmazó formuláció. A kálium-szorbát minden esetben növelte az elhalálozott állatok mennyiségét és/vagy korábbi halálához vezetett.

V./5.2. Különböző illóolaj tartalmú emulziók antimikrobiális vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal.

Miután megállapítottuk, hogy egyes emulziók már 5 $V/V\%$ koncentráció esetén is citotoxikusak, valamint, hogy a borsmenta esetén jelentős *in vivo* toxicitásra kell számítani, a mikrobiális kísérleteket 2,5 $V/V\%$ koncentráción kezdtük el, felező hígításokkal, mikrodilúciós módszert alkalmazva. A formulációk optikai denzitása miatt, a csak emulziót tartalmazó hígítási sort vettük háttérnek az abszorbancia mérésnél. Ún. checkerboard tesztet szerettünk volna végrehajtani, mely két antimikrobiális szer szinergiáját hivatott feltérképezni úgy, hogy két hígítási sort képzünk, ahol az egyik szer állandó koncentrációja mellett a másik szer koncentrációja hígul és fordítva.¹⁹⁵ A nagy mennyiségű minta és a háromszori ismétlésszám miatt csak egy hígítási sort vettünk fel, így minden kísérletünk esetén a kálium-szorbát eredeti, 2 mg/ml-es koncentrációja mellett volt kihígítva az adott emulzió. A Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének munkatársai, dr. Kovács Renátó László, Nagy Fruzsina és Tóth Zoltán végezték a vizsgálatokat.

Emulzió koncentráció Formuláció	2,5 $V/V\%$	1,25 $V/V\%$	0,625 $V/V\%$	0,313 $V/V\%$	0,156 $V/V\%$	0,078 $V/V\%$	0,039 $V/V\%$
Emulziós közeg 1 (1,5 $V/V\%$ Labrasol ALF, 10 $V/V\%$ glicerin)	100% ±3,8%	100% ±5,6%	100% ±5,8%	100% ±9,3%	100% ±1,1%	100% ±6,8%	100% ±5,9%

Emulziós közeg 2 (2 $\frac{v}{v}\%$ Labrasol ALF, 30 $\frac{v}{v}\%$ glicerin)	51,6% $\pm 0,3\%$	70,4% $\pm 0,5\%$	81,8% $\pm 1,6\%$	95,2% $\pm 4,3\%$	96,9% $\pm 2,5\%$	96,5% $\pm 3,1\%$	97,8% $\pm 3,7\%$
Citrom	41,5% $\pm 0,8\%$	52% $\pm 0,2\%$	60,6% $\pm 2,7\%$	69,7% $\pm 4,1\%$	70,5% $\pm 4,6\%$	74,3% $\pm 4,7\%$	87% $\pm 2,2\%$
Citrom + kálium-szorbát	15,6% $\pm 1,1\%$	16,4% $\pm 0,5\%$	18,9% $\pm 0,5\%$	21,7% $\pm 1\%$	22,4% $\pm 2,1\%$	24,4% $\pm 2\%$	36,9% $\pm 2,6\%$
Rozmaring	21,7% $\pm 1,7\%$	35,9% $\pm 1\%$	47,8% $\pm 4\%$	55,2% $\pm 3,4\%$	65,4% $\pm 1,3\%$	72% $\pm 2,8\%$	90,8% $\pm 3,3\%$
Rozmaring + kálium-szorbát	8,5% $\pm 0,4\%$	10,5% $\pm 0,4\%$	16% $\pm 0,6\%$	20,8% $\pm 1,2\%$	23,9% $\pm 1,8\%$	26,8% $\pm 3,1\%$	40,9% $\pm 0,8\%$
Borsmenta	0% $\pm 1,3\%$	0,7% $\pm 0,5\%$	0,9% $\pm 0\%$	7% $\pm 0,2\%$	18,3% $\pm 2,2\%$	32,4% $\pm 2,2\%$	63,5% $\pm 3,7\%$
Borsmenta + kálium-szorbát	3,3% $\pm 1,8\%$	2,1% $\pm 0,9\%$	-0,7% $\pm 0,3\%$	0,3% $\pm 0,1\%$	3,2% $\pm 0,2\%$	7,9% $\pm 0,7\%$	26,5% $\pm 0,7\%$
Kálium-szorbát 2 mg/ml	42,5% $\pm 1,3\%$						

3. táblázat: Illóolaj tartalmú emulziók hatása *C. albicans* referencia törzs ellen. A sejéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. Az értékek három lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A további, felező koncentrációkban vizsgálva nem volt tapasztalható antimikrobiális hatás. A kálium-szorbát koncentrációja az azzal kiegészített emulziók esetén mindig 2 mg/ml.

A gomba sejtek különösen érzékenyek voltak az illóolajokkal szemben, még alacsony koncentrációk is jelentős gátlást eredményeztek. **(1. táblázat)** Az emulziós közegek közül az első semmilyen hatást nem fejtett ki és a második sem volt képes 50% alá szorítani a kezelést túlélő gomba sejtek optikai denzitását. Az illóolajok között a toxicitási vizsgálatok során látott erőssorrend alakult ki hatás tekintetében, így a leggyengébb antifungális tulajdonsága a citrom illóolaj tartalmú emulzióknak volt, ezeket követték a rozmaring tartalmúak végül pedig a borsmenta illóolaj tartalmúak. A kálium-szorbát hozzáadása minden illóolaj esetén jelentősen növelte a gátló hatást, a kálium-szorbát hatását pedig már nagyon kevés illóolaj is növelni tudta.

Emulzió koncentráció	2,5 $\frac{v}{v}\%$	1,25 $\frac{v}{v}\%$	0,625 $\frac{v}{v}\%$
Formuláció			
Emulziós közeg 1 (1,5 $\frac{v}{v}\%$ Labrasol ALF, 10 $\frac{v}{v}\%$ glicerin)	26,9% $\pm 2,2\%$	65,6% $\pm 5,7\%$	94,6% $\pm 2,6\%$
Emulziós közeg 2 (2 $\frac{v}{v}\%$ Labrasol ALF, 30 $\frac{v}{v}\%$ glicerin)	13,3% $\pm 1,8\%$	64,7% $\pm 7\%$	84,2% $\pm 1,7\%$
Citrom	40,3% $\pm 1,6\%$	80,3% $\pm 7\%$	99% $\pm 2,1\%$
Citrom + kálium-szorbát	59% $\pm 8,1\%$	78,3% $\pm 7\%$	86,7% $\pm 2,2\%$
Rozmaring	4,4% $\pm 2,2\%$	21,9% $\pm 6,8\%$	80,1% $\pm 3,9\%$
Rozmaring + kálium-szorbát	5,2% $\pm 2,1\%$	35,8% $\pm 4,4\%$	99,3% $\pm 9,2\%$
Borsmenta	0% $\pm 1,6\%$	22,2% $\pm 7,7\%$	91,6% $\pm 9,6\%$
Borsmenta + kálium-szorbát	2,2% $\pm 0,6\%$	21,5% $\pm 4,3\%$	70,5% $\pm 1,3\%$
Kálium-szorbát 2 mg/ml	82,8% $\pm 8,7\%$		

4. táblázat: Illóolaj tartalmú emulziók hatása *S. aureus* referencia törzs ellen. A sejtleletkéesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanáciája alapján került kiszámításra. Az értékek három lyuk abszorbanációjának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A további, felező koncentrációkban vizsgálva nem volt tapasztalható antimikrobiális hatás. A kálium-szorbát koncentrációja az azzal kiegészített emulziók esetén mindig 2 mg/ml.

Az eredmények azt mutatják, hogy már maguk az emulziós közegek is jelentős antimikrobiális hatással bírtak ezen faj ellen a legnagyobb koncentrációban. (**2. táblázat**) Ehhez képest a citrom illóolaj ennél gyengébb eredményt produkált és a kálium-szorbát hozzáadása is csak rontotta a növényi komponens hatását. A rozmaring illóolaj és a borsmenta illóolaj egymáshoz hasonló értékeket produkáltak, azonban míg a borsmenta kálium-szorbáttal kiegészítve enyhén hatékonyabb volt, a rozmaring esetén csökkent a kálium-szorbátot is tartalmazó emulzió hatása a normál emulzióhoz képest. A hígítások hatására gyorsan csökkent minden emulzió gátló képessége.

Emulzió koncentráció Formuláció	2,5 V/v%	1,25 V/v%	0,625 V/v%	0,313 V/v%	0,156 V/v%	0,078 V/v%	0,039 V/v%
Emulziós közeg 1 (1,5 V/v% Labrasol ALF, 10 V/v% glicerin)	66,8% $\pm 3,8\%$	65,6% $\pm 5,6\%$	73,5% $\pm 5,8\%$	74,5% $\pm 9,3\%$	79,8% $\pm 1,1\%$	81,3% $\pm 6,8\%$	84,3% $\pm 5,9\%$
Emulziós közeg 2 (2 V/v% Labrasol ALF, 30 V/v% glicerin)	86% $\pm 0,3\%$	74,3% $\pm 0,5\%$	68,2% $\pm 1,6\%$	65,6% $\pm 4,3\%$	64,4% $\pm 2,5\%$	71,4% $\pm 3,1\%$	81,8% $\pm 3,7\%$
Citrom	87,6% $\pm 1,5\%$	82,5% $\pm 0,6\%$	79,9% $\pm 2,7\%$	84,6% $\pm 2,4\%$	85,4% $\pm 1\%$	92,3% $\pm 3,2\%$	91,1% $\pm 1,5\%$
Citrom + kálium-szorbát	28,9% $\pm 0,1\%$	20,5% $\pm 0,8\%$	19,1% $\pm 1\%$	19,3% $\pm 2,1\%$	20,5% $\pm 2,4\%$	19,2% $\pm 2,1\%$	18,8% $\pm 1,8\%$
Rozmaring	80,3% $\pm 1\%$	75,6% $\pm 0,1\%$	79,1% $\pm 2\%$	70,1% $\pm 0,2\%$	74,3% $\pm 2,6\%$	79,6% $\pm 2,7\%$	75,7% $\pm 1\%$
Rozmaring + kálium-szorbát	21% $\pm 0,4\%$	20,1% $\pm 0,3\%$	18,1% $\pm 0,9\%$	18,1% $\pm 1,6\%$	18,1% $\pm 0,9\%$	19,2% $\pm 1,2\%$	18,1% $\pm 0,6\%$
Borsmenta	0,2% $\pm 0,3\%$	80,1% $\pm 1,6\%$	82,4% $\pm 2,7\%$	71,8% $\pm 0,2\%$	71,5% $\pm 1,2\%$	68,9% $\pm 0,7\%$	80,5% $\pm 0,1\%$
Borsmenta + kálium-szorbát	0,1% $\pm 0,3\%$	11,7% $\pm 0\%$	12,6% $\pm 0,6\%$	16% $\pm 0,7\%$	15,8% $\pm 0,5\%$	14,7% $\pm 0,3\%$	16,9% $\pm 0,5\%$
Kálium-szorbát 2 mg/ml	22,7% $\pm 0,7\%$						

5. táblázat: Illóolaj tartalmú emulziók hatása *E. coli* referencia törzs ellen. A sejtleletkéesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanáciája alapján került kiszámításra. Az értékek három lyuk abszorbanációjának átlagát és \pm SEM-et jelzik. A további, felező koncentrációkban vizsgálva nem volt tapasztalható antimikrobiális hatás. A kálium-szorbát koncentrációja az azzal kiegészített emulziók esetén mindig 2 mg/ml.

A Gram negatív *E. coli* vizsgálatai azt mutatták, hogy a legtöbb esetben nincs, vagy csak minimális koncentráció függés tapasztalható a kezelések során. (**3. táblázat**) Az illóolajok nem tudtak az emulziós közegnél lényegesen nagyobb gátlást elérni és csupán a borsmenta illóolaj

tudott a legmagasabb koncentráción gátlást biztosítani, valamint a kálium-szorbáttal additív hatást eredményezni.

Összességében megállapítható volt, hogy az illóolajok jelentősen eltérő toxicitást és antimikrobiális hatást mutatnak, ugyanakkor alacsony koncentráció tartományban toxicitásuk minimális. Bizonyos összetételek ilyenkor is gátló hatással bírtak adott fajokon és kálium-szorbáttal keverve hatásuk megnőtt, de nem volt tapasztalható szinergizmus.

V./6. Különböző parabének citotoxicitási és antimikrobiális vizsgálata.

A parabének vegyületcsaládjából az élelmiszer-, gyógyszer- és kozmetikai ipar leggyakrabban a metil-, az etil-, a *n*-propil- és a *n*-butil-parabént vagy ezek kombinációit alkalmazza tartósítószerként. Egyúttal ezeket a vegyületeket gyakran vonják be különböző kutatásokba, míg a kevésbé gyakran használt parabénekről szóló tanulmányokkal adós a szakirodalom. Ugyanakkor, a szorbátok esetén elvégzett összehasonlító vizsgálatot alapul véve, kíváncsiak voltunk, hogyha a ritkán alkalmazott vegyületeket is teszteljük, milyen különbségeket találunk. Azért, hogy valóban a kémiai szerkezet különbözőségét tudjuk megfigyelni, a szénlánc elágazását választottuk, mint szerkezeti tényezőt és az egyes származékokat azonos koncentráció értéken akartuk vizsgálni. Az alkil láncban 3, 4 és 5 szénatommal rendelkező nyílt és elágazó észtereket párba rendeztük és vizes közegben vizsgáltuk citotoxicitásukat és antimikrobiális hatásukat. Irodalmi adatok híján azonban először a vizes közegben mért maximális vízdékonyság meghatározására volt szükség HPLC segítségével, mely vizsgálatokban Dr. Haimhoffer Ádám tanszéki kollégám segített.

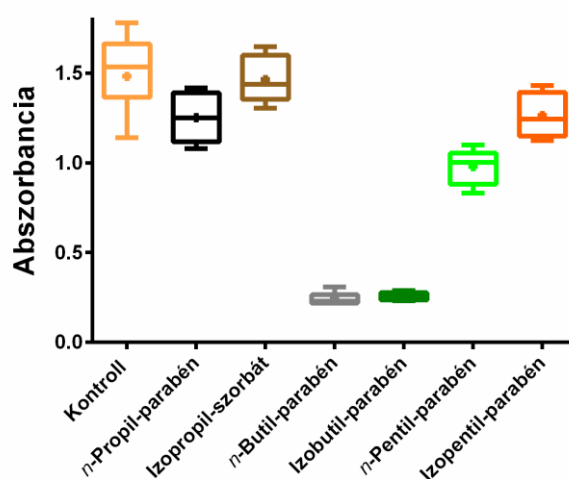
Név	Koncentráció \pm SEM (^m / _v %)	tR (perc)	logP
<i>n</i> -Propil-parabén	0,02495 \pm 0,0002	2,147	2,29
Izopropil-parabén	0,04838 \pm 0,0006	2,1	2,12
<i>n</i> -Butil-parabén	0,02319 \pm 0,00001	2,198	2,71
Izobutil-parabén	0,02365 \pm 0,00002	2,186	2,69
<i>n</i> -Pentil-parabén	0,01002 \pm 0,00008	2,298	3,12
Izopentil-parabén	0,01932 \pm 0,00009	2,271	3,04

6. táblázat: Parabének vízdékonysága, retenciós ideje és kalkulált logP értéke. A koncentráció és retenciós idő értékek három párhuzamos mérés átlagát jelzik. A logP értékeket ChemDraw Professional 17.0 szoftverrel kalkulálta dr. Kelemen Viktor kollégám.

A 4. táblázat eredményein látszik, hogy a 3 és 5 szénatomos észtereknél az elágazó forma közel kétszer jobb vízdékonysággal bír, mint a nyílt láncú forma, míg a 4 szénatomos észtereknél közel azonosak az értékek. A retenciós idők és a kalkulált logP értékek alapján feltételezhető a magasabb lipofilitás a nyílt láncú észtereknek esetén, azonban ennek teljes mértékű bizonyítása további fizikai-kémiai meghatározásokat igényel.

V./6.1. Különböző parabének citotoxicitási vizsgálata.

A parabéneket ezután szénatom szám alapján párosával azonos koncentrációkon vizsgáltuk, az alacsonyabb vízdékonyságú észter maximális vízben oldható koncentrációján. Ez *n*-propil- és izopropil-parabén esetén 0,025 m/v%-ot, *n*-butil és izobutil-parabén esetén 0,023 m/v%-ot, míg *n*-pentil- és izopentil-parabén esetén 0,01 m/v%-ot jelentett. *G. mellonella* lárvákat is vizsgáltunk, az etanol tartalom miatt azonban minden esetben teljes mortalitást mutattak. A sejtleletképeségi eredményeket az egyes csoportok közötti differencia jobb láthatósága végett „dobozok és bajszok” diagramon ábrázoltam, ahol a doboz a két középső kvartilist jelöli, a kereszt az átlagot, a dobozon belüli vonal a mediánt, míg a dobozon túl nyúló bajszok a minimális és a maximális értéket. A sejtes kísérletekben Tari Ákos gyógyszerészhallgató segített.



34. ábra: Nyílt és elágazó láncú parabének citotoxicitása Caco-2 sejteken MTT-tesztel mérve. A parabéneket 96 %/v%-os etil-alkoholban oldottuk úgy, hogy 10 m/v%-os törzsoldatokat alkossunk, majd ezekből hígítottuk PBS-sel a mintaoldatokat. Az eredmények 6 párhuzamos lyukat jelölnek.

Átlagos abszorbancia ±SEM értékek és kontrollhoz viszonyított százalékos sejtleletképeségi értékek ±SEM:

PBS-el kezelt kontroll: 1,483 ±0,1

0,025 m/v% *n*-propil-parabén: 1,252 ±0,06; 84,4% ±3,7%

0,025 m/v% izopropil-parabén: 1,464 ±0,1; 98,8% ±3,4%

0,023 m/v% *n*-butil-parabén: 0,242 ±0,01; 16,3% ±0,9%

0,023 m/v% izobutil-parabén: 0,257 ±0,01; 17,3% ±0,6%

0,010 m/v% *n*-pentil-parabén: 0,979 ±0,04; 66,1% ±2,5%

0,010 m/v% izopentil-parabén: 1,264 ±0,05; 85,2% ±3,2%

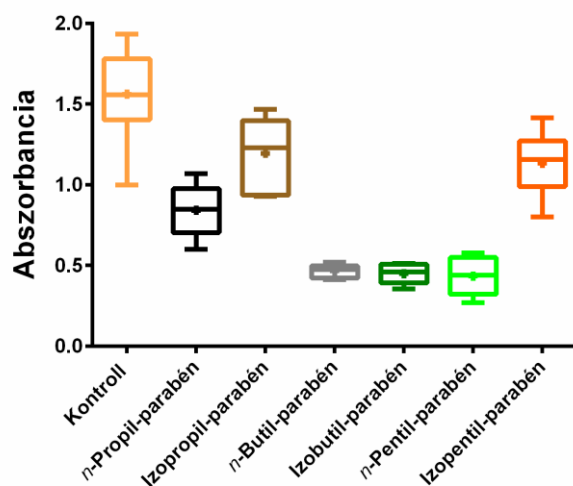
A statisztikai analízis eredménye 2 mintás t-próba alapján:

n-propil-parabén vs. izopropil-parabén: *

n-butil-parabén vs. izobutil-parabén: n.sz.

n-pentil-parabén vs. izopentil: **

Az eredményeken látszik, hogy a páratlan szénatomot tartalmazó származékok esetén szignifikáns volt a sejtleletképeségbeli különbség, mégpedig úgy, hogy a nyílt láncúak voltak mindig citotoxikusabbak. (34. ábra) A *n*-butil és az izobutil származékok között azonos koncentráció esetén nem volt különbség, azonban ezek toxikusabbnak bizonyultak a másik két párosnál.



35. ábra: Nyílt és elágazó láncú parabének citotoxicitása Caco-2 sejteken NR-tesztel mérve. A parabéneket 96 %-os etil-alkoholban oldottuk úgy, hogy 10 ^m/_v%-os törzsoldatokat alkossunk, majd ezekből hígítottuk PBS-sel a mintaoldatokat. Az eredmények 6 párhuzamos lyukat jelölnek.

Átlagos abszorbancia \pm SEM értékek és kontrollhoz viszonyított százalékos sejtleletkéességi értékek \pm SEM:

PBS-el kezelt kontroll: 1,561 \pm 0,07

0,025 ^m/_v% n-propil-parabén: 0,841 \pm 0,07; 53,9% \pm 4,5%

0,025 ^m/_v% izopropil-parabén: 1,195 \pm 0,09; 76,5% \pm 5,8%

0,023 ^m/_v% n-butil-parabén: 0,466 \pm 0,02; 29,9% \pm 1,1%

0,023 ^m/_v% izobutil-parabén: 0,449 \pm 0,03; 28,8% \pm 1,6%

0,010 ^m/_v% n-pentil-parabén: 0,435 \pm 0,05; 27,8% \pm 3,1%

0,010 ^m/_v% izopentil-parabén: 1,134 \pm 0,08; 72,6% \pm 5,4%

A statisztikai analízis eredménye 2 mintás t-próba alapján:

n-propil-parabén vs. izopropil-parabén: ****

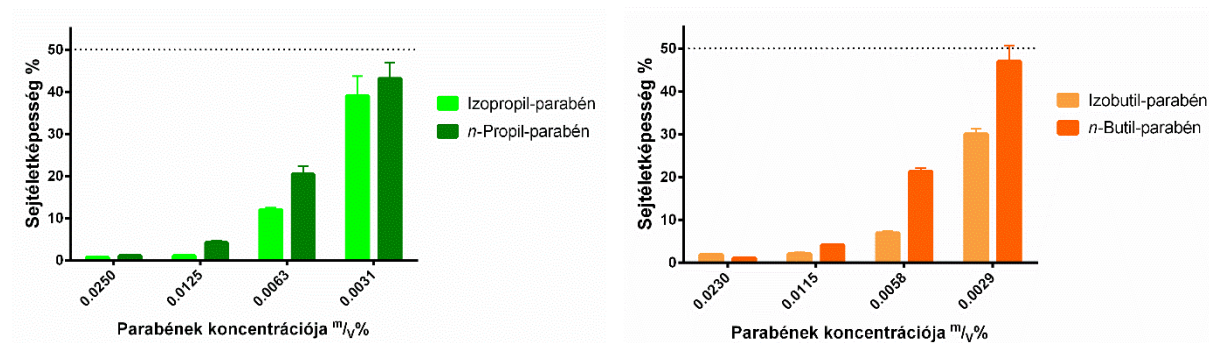
n-butil-parabén vs. izobutil-parabén: n.sz.

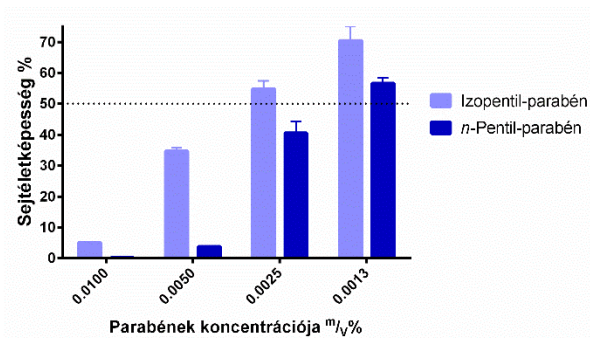
n-pentil-parabén vs. izopentil: *

A 35. ábrán látható, hogy az NR-teszt az MTT-hez nagyon hasonló eredményt mutatott, az egyetlen lényeges különbség, a n-pentil-parabén nagyobb citotoxicitása volt.

V.6.2. Különböző parabének antimikrobiális vizsgálata.

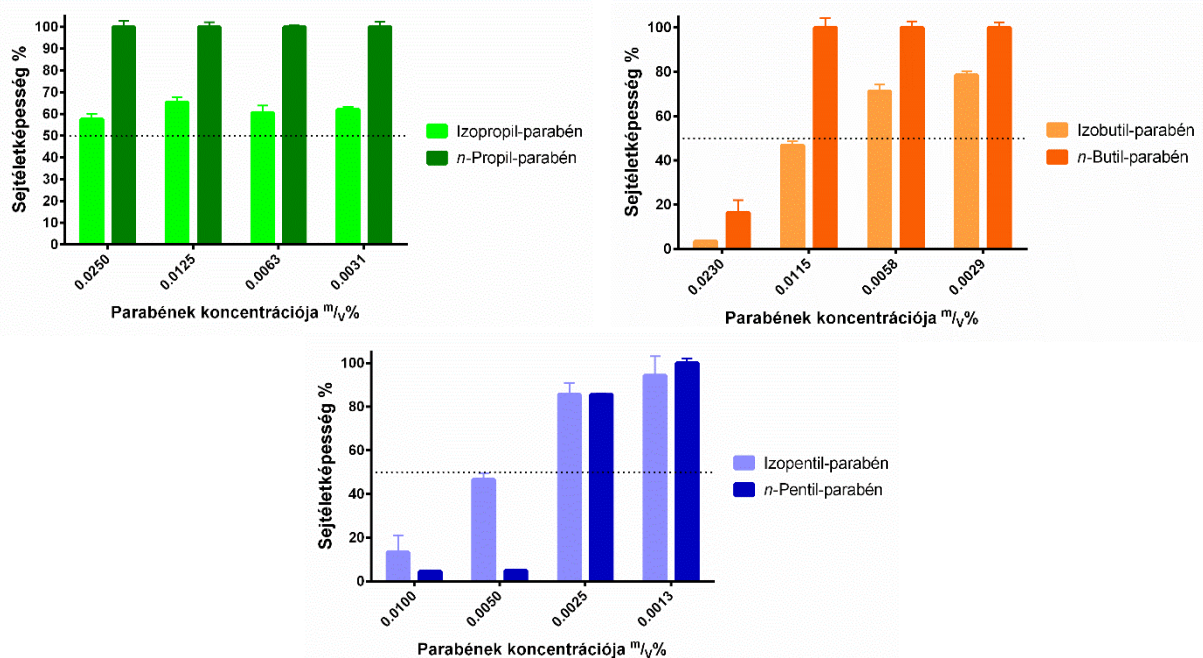
Mikrodilúciós módszert alkalmazva, az előzőekben is alkalmazott három fajon vizsgáltuk az észter párok antimikrobiális hatását, felező koncentrációkban. A Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének munkatársai, dr. Kovács Renátó László, Nagy Fruzsina és Tóth Zoltán végezték a vizsgálatokat.





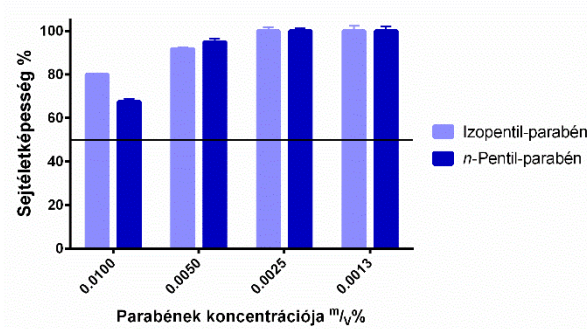
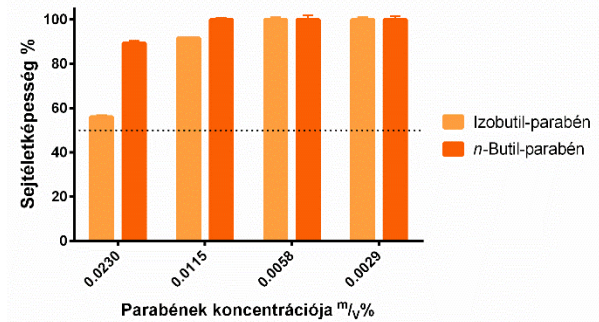
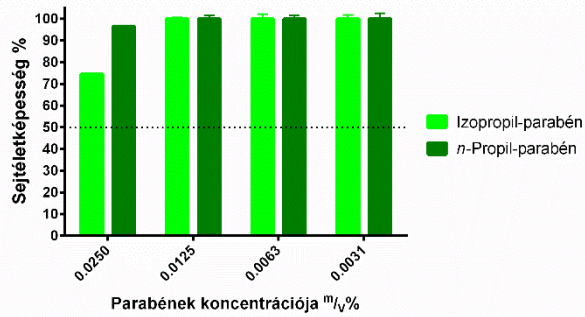
36. A, B, C ábra: Nyílt és elágazó láncú parabének hatása *C. albicans* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. Az értékek három lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik.

Az antifungális hatás tekintetében az látható, hogy a szénlánc hossz növekedésével csökken a vegyületek hatása és hogy a nyílt láncú forma kevésbé hatékony. (36. ábra A, B) Ez alól a *n*-pentil-parabén-izopentil-parabén páros képez kivételt, ahol a *n*-pentil-parabén volt hatékonyabb, ugyanakkor ezek a vegyületek a legalacsonyabb koncentrációban már nem tudtak legalább 50%-os gátlást biztosítani, a többi vegyülettel ellentétben. (36. ábra C)



37. A, B, C ábra: Nyílt és elágazó láncú parabének hatása *S. aureus* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. Az értékek három lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik.

Gram pozitív referencia törzsünk viszonylag ellenállóan bizonyult a parabénekkal szemben. Az izopropil- és izobutil-parabén hatékonyabb volt nem elágazó párnájánál, (37. ábra A, B) ugyanakkor az izopentil nagyobb koncentráció esetén kisebb gátló hatást fejtett ki, mint a *n*-pentil-parabén, (37. ábra C) ellenben alacsony koncentrációban közel azonos eredményt mutatott a két szer.



38. A, B, C ábra: Nyílt és elágazó láncú parabének hatása *E. coli* referencia törzs ellen. A sejtéletképesség százalékos értéke a csak médiummal kezelt kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. Az értékek három lyuk abszorbanciájának átlagát és \pm SEM-et jelzik.

Az *E. coli* szinte teljesen érzéketlen volt a vizsgált koncentráció tartományban, azonban az előző két fajnál megfigyelt tendenciák az elágazó és nem elágazó származékok hatására vonatkozóan ennél a fajnál is megismétlődtek. (38. ábra A, B, C)

Összességében megállapítható, hogy azonos koncentráción mérve eltérő biológiai aktivitást mutatnak az elágazó és nem elágazó parabének, mely tulajdonságokat érdemes a termékfejlesztésénél figyelembe venni.

VI. Megbeszélés

Doktori tanulmányaim végére sikerült rutinszerű alkalmazásban egymáshoz kapcsolni két *in vitro* és egy *in vivo* toxicitást mérő technikát. A *G. mellonella* modell szervezet mellett az MTT- és NR-tesztek alkalmazása három gyorsan, olcsón, egyszerűen, párhuzamosan elvégezhető metodikát egyesít egy protokollban, az eltérő erősségek és gyengeségek jól kiegészítik egymás. Ezáltal jobb szenzitivitás és specificitás érhető el, mint a rendszerek külön-külön történő használatával, valamint a citotoxicitáson túllépve, már biokompatibilitást lehet vizsgálni. A szakirodalomban jelenleg csupán egy példa található MTT-teszt és *Galleria* lárva együttes alkalmazására különböző toxicitási vizsgálatok során.¹⁹⁶

Caco-2 sejtvonalon MTT- és NR-teszttel egyszerre dolgozva a korábbi kutatások az alábbi eredményekre jutottak. Réz-oxid nanopartikulomok esetén nagyon jó közelítéssel, mindössze 2 µg/ml különbséggel mértek IC₅₀ értéket.¹⁹⁷ Magnézium-oxid nanopartikulomok és mikotoxin keverékek esetén szintén nagyon hasonló eredményeket kaptak kutatók a két módszerrel.^{198,199} Növényi kivonatok esetén a kivonat összetételétől függően változott, hogy az MTT vagy az NR mutatott-e alacsonyabb életképességet, ugyanakkor nagyságrendbeli eltérés nem volt az eredmények között.²⁰⁰ Reaktív oxigén gyököket képző apoptotikus gomba metabolitok is egyedileg mutattak kisebb vagy nagyobb citotoxicitást a két módszerrel, általános minta nélkül.²⁰¹ Biguanid származékok vizsgálata során azt találták, hogy a vegyületek membrán károsító hatás miatt az NR volt érzékenyebb, ezt LDH-teszttel igazolták vissza.²⁰² Ahogy az a szakirodalom áttekintése alapján látható, a Caco-2 sejtek esetén minden vizsgált anyagnál egyedileg kell az eredményeket kiértékelni és a két teszt eredményeit összevetni, mivel nem jelenthető ki, hogy citotoxicitás mérésére a sejtvonalon csak az MTT vagy csak az NR módszer fogadható-e el.

Módosítják-e más technológiai segédanyagok a tartósítószeres citotoxicitását? Az első kísérletsorozat eredményei azt mutatják, hogy a tenzidek és tartósítószeres jelentősen növelik egymás citotoxicitását, azonban ezek az eredmények nem meglepőek. Magyarázatot igényel viszont a 2-hidroxietyl-cellulóz nyák protektív hatása. A Caco-2 sejtek különösen érzékenyek benzalkónium-kloridra, annak membránkárosító hatása miatt, valamint a Labrasol®-ről is ismert, hogy toxikusabb vegyület, mint a poliszorbát 20.^{184,203} A benzalkónium-klorid és SEDDS komponensek, emulgensek szinergista citotoxicitása is ismert a szakirodalomban.²⁰⁴ A metil-parabén és a poliszorbát IC₅₀ értékei magasabbak, mint a másik vizsgált vegyület párnak, így a polimer védőhatást tudott kifejteni, mely az irodalomban nem példa nélküli.²⁰⁵ A benzalkónium-kloridról azt is leírták, hogy ugyanolyan proteinázzal

kombinálva, összehasonlítva más felületaktív anyagokkal képes oldani a Caco-2 sejtekre rétegzett nyálkareteget.²⁰⁶ Ugyanez a kísérlet azt is bebizonyította, hogy a Caco-2 sejtek a védő polimer réteg eltávolítása után érzékenyebbek voltak a citotoxikus behatásokra. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy más felületaktív tartósítószer (pl. cetrimid) és más gyenge karbonsav típusú tartósítószer (parabének, szorbátok, benzoátok) esetén is igazolható-e ez a trend, hogy a sejtekre rétegzett polimerek védő hatását előbbi vegyületcsoport képes csökkenteni, míg utóbbiak esetén a védő hatás megfigyelhető marad. Összességében sikerült egy egyedi segédanyag-segédanyag interakciót találni, amit azonban további kísérleteknek kell követnie, hogy hasonló, citoprotektív kölcsönhatásokat találhassunk.

Módosítják-e adott technológiai segédanyag-kombinációk a tartósítószeres sejt-károsító hatását humán és mikrobiális sejteken? A második kísérletsorozat egyik legérdekesebb jelensége, a parabének két rendszerben mért eltérő citotoxicitása. Szakirodalmi példák azt mutatják, hogy a hosszabb szénláncú származékok toxikusabbak a rövidebb szénláncúaknál. MTT-teszttel vizsgálva Caco-2 sejteken a parabének interakcióját triklozánnal, azt találjuk, hogy a butil-parabénnel nagyobb sejt-károsodást okoz a triklozán, mint a metil-parabénnel.²⁰⁷ MCF7 humán emlődaganat sejt-vonalon MTT-teszttel mérve szintén azt találták, hogy a metil-parabén kevésbé toxikus.²⁰⁸ Mi magyarázza a második rendszerben a butil-parabén kiugró értékét a legnagyobb koncentráció esetén? **Lakeram és munkatársai** azt találták, hogy ha Caco-2 sejtekkel benőtt sejttenyésztő inzeretekre metanolos-pufferes törzsoldatot pipettáznak etil-, propil-, vagy butil-parabén tartalommal, akkor az akceptor fázisban nem *p*-hidroxibenzoésav, hanem metil-parabén található.²⁰⁹ Hasonlót állatkísérletes bőrmodellen is kimutattak.²¹⁰ **Lakeram és munkatársainak** további kutatásai kimutatták, hogy a Caco-2 sejtek speciális transz-észteráz aktivitással rendelkeznek, etanol jelenlétében a metil-, a propil- és a butil-parabén is etil-parabénné alakul. Az enzimek hatékonyabban alakítják át a rövidebb szénláncú, mint a hosszabbak szénláncú származékokat és az etanol nagyobb koncentrációja elősegíti működésüket, ezért a második rendszer magasabb etanol tartalma feltehetően elősegítette a metil-parabén etil-parabénné történő átalakulását. Utóbbi toxikusabb származék, ezért ronthatta a metil-parabén által mutatott sejtéletképességet, míg a butil-parabén esetén a kevésbé toxikus etil-parabén képződött. Ugyanakkor egyéb hatásokat kell feltételeznünk, mivel a transz-észterifikáció csak a metil-parabén alacsonyabb sejtéletképességi értékét magyarázza, a butil-parabénét nem, mivel az a továbbra is toxikus etil-parabénné alakul. További vizsgálatokat igényel, hogy a Capryol® PGMC jelenléte esetlegesen, hogyan befolyásolta a sejtek metabolizmusát. Az antimikrobiális eredmények esetén kevés esetben lehet megfigyelni szénlánc hosszától függő gátlást, mely azonban mikrobák esetén nem

feltétlenül példa nélküli.⁴¹ Propil- és etil-parabén hosszútávú eltarthatósági vizsgálatot végeztek *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* bevonásával és nem találtak több hét után sem szignifikáns különbséget a két származék esetén, mely megerősíti eredményeinket.²¹¹ Minden baktérium faj nagyobb mértékben érzékeny volt a glicerint és Labrasol[®] tartalmazó első rendszerre, mint az alkoholos oldatokra vagy a második rendszerre. A szakirodalomban ismeretes, hogy a Labrasol[®] jó antimikrobiális hatással bír, például *Mycobacterium tuberculosis* ellen, ahol teljes sejtfal dezintegrációt okozott.²¹² Feltételezzük, hogy ez a segédanyag magyarázza a formuláció kiemelkedő antimikrobiális eredményeit. Ugyanakkor ismert negatív kölcsönhatás is tenzidek és parabének között, például kationos felületaktív anyagok csökkentették butil-parabén felvételét és gátló hatását *E. coli* esetén.²¹³ Összességében megállapítható, hogy rendszereink komplex összetétele miatt, a megfigyelt kiugró értékeket, jelenségeket további elemzésnek kellene alávetni, hogy megértsük az eredmények mögött álló pontos folyamatokat.

Ez a két kísérletsorozat rávilágít arra, hogy a különböző, folyékony gyógyszerformákban használatos segédanyagok képesek egymás citotoxicitását, antimikrobiális hatását módosítani. Az ehhez hasonló interakciók kutatásával a készítmények irritáló hatása (bőrfelületen/nyálkahártyán) mérsékelhető, mikrobiológiai védelmük növelhető lenne. Utóbbi esetben az egyéb, potencírozó segédanyagok kedvező hatása miatt a szükséges tartósítószer mennyiség lecsökken, ami természetesen kisebb mértékű és ritkábban elforduló mellékhatásokat eredményezne.

Tartósítószerként alkalmazott karbonsavak különböző sói azonos mértékben csökkentik-e a sejtleletképeséget? A különböző sók vizsgálata esetén az NR-teszttel nem láttunk citotoxicitást, ugyanakkor az MTT-teszt esetén igen. Ennek egyik magyarázata a sók melletti kísérő kalcium ion jelenléte, annak a kalcium háztartást befolyásoló hatása. Ismert, hogy a külső kalcium ion áram (12 perces hosszúságban monitorozva) növeli az intracelluláris kalcium szintet Caco-2 sejteken, a mitokondriumból mobilizálva az ionokat.²¹⁴ Leírták azt is, hogy a külső pufferben lévő kalcium ion szint befolyásolja a Caco-2 sejtek antioxidáns kapacitását, ami így áttételesen befolyásolhatta a sejtek formazán előállítási képességeit.²¹⁵ A jelenség pontosabb tanulmányozásához más vegyületek esetén is szükséges elvégezni a kísérleteket, amelyek szintén csak a kísérő ion minőségében térnek el (kloridok, szulfátok, egyszerű karbon savak sói). Ha minden esetben azt tapasztaljuk, hogy az MTT-teszt a kalcium sókat a nátrium és kálium sókkal összehasonlítva, azonos savmaradékion koncentráción hibásan, toxikusnak mutat, míg az NR-teszt (és/vagy áramlási citometria) nem, akkor kalciumot tartalmazó vegyületek esetén az MTT-teszt a vizsgálatokban nem alkalmazható. A jelenség

pontos okának kiderítéséhez további molekuláris biológiai mérések lennének szükségesek. Ugyanakkor első használata során az NR-teszt jól vizsgázott, hiszen nem adott fals eredményt, hanem helyesen jelezte a sejtek túlélését.

Miben különböző a sejtkárosító hatása a szorbát-észtereknek a szorbinsavhoz képest? A szorbát-észterekkel kapcsolatos kutatásunkat elindító tanulmány a szorbinsavnál nagyobb antimikrobiális potenciálról számolt be, mind az etil-, mind az izopropil-szorbát esetén, azonban minket is meglepett az idő-ölés kísérletek eredménye.¹⁸⁹ A kimagasló aktivitás és az áramlási citometriás mérések során tapasztalt fokozott sejtkárosító hatás magyarázata feltételezésünk szerint az izopropil-szorbát pont megfelelő logP értéke. A membránon való átjutáshoz szükséges lipofilitás és a megfelelő koncentráció eléréséhez szükséges vízdékonyság épp ennél a vegyületnél van a legjobb arányban, viszonylag rövid szénlánc miatt. Szalicilsav származékok esetén kimutatták, hogy a szénlánc két atommal történő megnyújtásával már egy nagyságrendbeli különbség is elérhető enzimikus gátlás esetén, így mi is feltételezzük, hogy a szerkezet okozza a jelentősen nagyobb hatást.²¹⁶ Feltételezésünk alátámasztásához hosszabb szénláncú származékok vizsgálatára is szükség van, mivel a rövidebb származéknál, az etil-szorbátnál már látjuk, hogy nincs megnövekedett aktivitás. Egy másik lehetséges válasz, a mind a Caco-2 mind a mikrobiális sejtek esetén jelenlévő valamilyen efflux pumpa vagy enzim (pl dekarboxiláz) csökkent hatékonysága az észter ellen, annak eltérő szerkezete miatt.⁸⁷ Az eredeti tanulmányból hiányzó toxicitási adatokat saját méréseinkkel pótoltuk. Eltérő sejtvonalak esetén ismert, hogy a szorbátok NR-teszttel mérve, az általunk vizsgálthoz hasonló koncentráció esetén alacsony citotoxicitást mutatnak.²¹⁷ Kísérleteinkben a kálium-szorbát az MTT-teszt során a szakirodalmi adatokhoz hasonló sejtleletképeségi értékeket mutatott.¹⁷⁹ A szorbinsav, az etil-szorbát és az izopropil-szorbát esetén nem tudjuk eredményeinket meglévő publikációkkal összehasonlítani, mivel ezeket a vegyületeket ezekkel a módszerrel még nem vizsgálták. A *G. mellonella* befecskendezés eredményei a neutrálvíz életképeségi vizsgálattal mutatnak átfedést, hiszen az adott koncentráció esetén nem tapasztaltunk sem jelentős mortalitást, sem jelentős citotoxicitást. A szakirodalomban fellelhető publikációk, melyek tartósítószereket vizsgáltak, azt mutatják, hogy a sejtes vizsgálatok eredményei jól korrelálnak a lárva eredményeivel, amit így mi is meg tudunk erősíteni.^{219,220} Azonban míg ezen tanulmányokban csak egy sejtes módszert vetettek össze az *in vivo* adatokkal, mi a hiba csökkentésére két módszerrel dolgoztunk, melyek jól kiegészítették egymást. A meglévő adatok birtokában érdemes lenne az izopropil-szorbátot további, nagyobb bizonyító erejű vizsgálatoknak alávetni.

Az ilyen szorbát-észterek a jelenleginél hatékonyabb származékokat eredményezhetnek, amik oldékonyságuk szerint mind hidrofil, mind lipofil közegben alkalmazhatóak lennének. A parabének endokrin rendszerre gyakorolt tisztázatlan hatások miatt kevésbé allergizáló és irritáló, ugyanakkor hatékony, zsíroldékony tartósítószer(ek)re van szüksége a különböző iparágaknak. A legegyszerűbb megoldás parabének és a hozzájuk hasonló (imidazolidinil/diazolidinil-karbamid, metil-izotiazolinon stb.) vegyületek veszélyességének csökkentésére új generációs, biztonságos, modern vegyületek bevezetése. Erre kínál lehetőséget a szorbát-észterek aktív kutatása, XXI. századi választ nyújtva a múlt századból örökölt problémákra.

Milyen biokompatibilitási interakciók lépnek fel illóolajok és tartósítószer között?

Az illóolajok tartósítószerként való használata nehézkes a hőbomlásra, illékonyságra ezáltal hatóanyag csökkenésre való hajlamuk miatt. Ezt tudja áthidalni az emulzióként történő formulálásuk, mely megfelelő stabilitást biztosít az antimikrobiális hatásért felelős vegyületeknek.²²¹ Sikeresen alkalmazott egy spanyol kutatócsoport ilyen vegyületeket eper lekvárok tartósítására különböző gombákkal szemben.¹⁹⁴ A kutatók egy további publikációja alapján gondoltunk arra, hogy mi magunk is olyan illóolaj tartalmú emulziókat formulálunk, melyeket egyéb, gyengén antimikrobiális szerekkel egészítünk ki.²²² Választásunk ekkor esett a kálium-szorbátra, mint engedélyezett tartósítószerre, illóolajként pedig gyógyszerkönyvi minőségben elérhető citrom, borsmenta és rozmaring illóolajakat választottunk. A három illóolaj eltérő kémiai összetétellel bír, mely jól látszik a toxicitást bemutató ábrákon. Az illóolajok komplex fitokémiai összetétele (2. Függelék) miatt, csak magukat az illóolajokat érdemes toxicitási szempontból összehasonlítani, nem pedig egyes komponenseiket. A három illóolajat eddig egy tanulmány sem alkalmazta olyan kísérletekben, ahol toxicitást mértek volna. A biztonsági adatlapokon szereplő értékek pontosan az ellentétét mutatják a sejtes kísérletekben mért toxicitási sorrendnek, hiszen a patkány *per os* LD₅₀ citrom illóolaj esetén 2460 mg/ttkg, rozmaring esetén 6600 mg/ttkg, borsmentánál, pedig nincs feltüntetve a faj és az adagolási út (12438 mg/ttkg). Az eltérés okát mindenképpen az emulziós közegben lévő anyagoknak és azok illóolajonként különböző összetételében érdemes keresni. Ugyanakkor, mivel a három használt toxicitási módszer ugyanazt a sorrendet mutatta, ismétlés helyett magasabb bizonyító erejű modellen lenne érdemes további toxicitást vizsgálni. Antimikrobiális szempontból nem találtunk szinergista hatást, amikor is a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók legalább egy nagyságrend különbséggel hatékonyabbak lettek volna, mint a kálium-szorbát és az emulzió külön-külön. Kivételt képez a borsmenta tartalmú emulzió és a kálium-szorbát az *E.coli* esetén a legnagyobb koncentrációban, azonban a hígabb keverékek esetén is

csak additív hatás látszik. Tanulmányokban a citrom illóolaj és a kálium-szorbát additív hatására van példa *Alicyclobacillus acidoterrestris* ellenében, a két szer együttesen minden vizsgált esetben teljes mértékben gátolta a faj germinációját, azonban pontos antimikrobiális értékelést a szerzők nem készítettek.²²³ Egy másik tanulmányban ugyanolyan fajokon vizsgálva a két szert, szinte azonos spektrumot és hatékonyságot figyelhetünk meg.²²⁴ Azonban mivel nem találtunk szinergizmusra utaló jeleket, a kísérlet esetleges folytatásában más szerrel (pl. nátrium-benzoát) lenne érdemes próbálkozni, illetve ha a szinergizmus megtalálható, akkor feltétlenül érdemes hosszútávú stabilitási vizsgálatot gázkromatográfiás mérésekkel végezni, mindeközben figyelni az illóolaj komponensek bomlását, párolgását. A szinergizmus lehetővé tenné mindkét komponens koncentrációjának radikális csökkentését, együttes alkalmazásuknak ennek hiányában mikrobiológiai, toxicitási előnyei nincsenek.

A tartósítószer az előbbieken tárgyaltakhoz hasonlóan kedvező antimikrobiális kölcsönhatásokat alakíthatnak ki más segédanyagokkal, hatóanyagokkal, azonban a pontos párosítások megállapításához további kísérletek szükségesek. Az illóolajok ugyanakkor jó alapot biztosítanak ilyen vizsgálatokhoz, mivel jelentős inhibitorikus potenciállal bírnak, ezért megfelelően formulálva, bizonyos területeken (ahol jellegzetes illatuk és ízük nem zavaró vagy épp előnyös) alternatívát nyújthatnak a manapság alkalmazott tartósítószer helyett.

Mennyiben eltérő a konstitúciós izomer parabének sejtkárosító hatása? Utolsó kísérletsorozatunkban ritkán alkalmazott, elágazó láncú parabéneket hasonlítottunk össze. A különböző publikációk általában csak a metil-, etil-, propil-, butil-parabén négyesét vizsgálják, elhanyagolva a további elágazó láncú, aromás vagy hosszabb alkil láncú származékokat, ezért rendkívül kevés tanulmány elérhető az általunk vizsgált vegyületekről. Megfigyelhető az eredményeken, hogy a 3 és az 5 szénatomot tartalmazó származékok mind vízdékonyságukat, mind citotoxicitásukat tekintve hasonlóan viselkednek, az elágazó származékok jobb vízdékonysággal és alacsonyabb toxicitással bírnak. Ellenben a 4 szénatomos észterek nagyon hasonló eredményeket mutattak. Ismert a szakirodalomban az ilyen páros-páratlan szénláncú származékok közötti eltérés, mely másodlagos kötőerők eltérő hatásával magyarázható.²²⁵ Az ilyen homológ sorokban megfigyelhető a vegyületek fizikai tulajdonságainak eltérése, ezáltal biológiai hatásuk is különböző.^{226,227} Ezt a hatást azonban csak a vízdékonyság és a humán citotoxicitás kapcsán találtuk meg, a mikróbák inkább az elágazó vagy a nyílt származékok vonatkozásában mutattak különböző eredményeket. Különböző toxikológiai és sejtes eredményeken az látszik, hogy vizsgálati módszerenként változik az eltérő szénlánc hosszúságú és szerkezetű parabének biológiai hatása, legyen szó genotoxicitásról, vízi fajokról vagy enzimatis gátlásról.^{228–230} Eredményeinket

magyarázhatják a különböző humán és mikrobiális észterázok eltérő affinitásai (melyek genetikai polimorfizmusból adódnak) az eltérő szerkezetű észterekhez. Humán mikroszóma frakciók esetén bizonyították az eltérő bontási képességet a nyílt és elágazó láncú parabének esetén.²³¹ Bakteriális észterázokról is kimutattak hasonló variabilitást és specifikus parabén lebontó enzimek jelenlétét.^{232,233} Mindezek azonban további enzimkinetikai, molekuláris biológiai vizsgálatokat igényelnek.

Ezen vizsgálatok azért is fontosak, mivel a parabének, a Bevezetésben említett káros hatásainak kiküszöbölésére az egyik lehetséges út a vegyületcsoport teljes lecserélése, a másik viszont a kovalens módosítás. Ismert ugyanis, hogy például a halogénezés képes a *p*-hidroxibenzoésav származékok ösztrogén receptor agonista hatását erősíteni, de akár antagonist hatást is okozhat a szerkezet megfelelő módosítása.^{234,235} Ezért feltételezhető, hogy aktív szerkezetmódosításokkal lehetséges kevesebb mellékhatással bírni, ám mikrobiálisan hatékony vegyületeket szintetizálni, ezért minél inkább megismerjük a vegyületcsoport szerkezet-hatás összefüggéseit, annál hatékonyabban tudunk megfelelő módosításokat végezni rajtuk.

VII. Összefoglalás

Doktori tanulmányaim során folyékony, bevételre szánt tartósítószeres citotoxicitási, illetve később biokompatibilitási elemzését végeztem, segédanyag-segédanyag interakciókat keresve, tartósítószeres biokompatibilitását szerkezetükkel összefüggően vizsgálva. Az elért, új tudományos eredmények az alábbiak:

1. Az MTT és az NR citotoxicitási tesztek és a *G. mellonella* lárva toxikológiai vizsgálatát összekapcsolva egy gyorsan, párhuzamosan, egyszerűen és olcsón elvégezhető, biokompatibilitást mérő, további kísérletek szempontjából prediktív értékkel bíró vizsgálati protokollt alkottam.
2. Sikertelenül koszolvens-tenzid rendszerek, valamint tenzid-nyák rendszerek és parabének vonatkozásában segédanyag-segédanyag interakciókat felfedezni, amik citoprotektív, valamint antimikrobiális hatás szempontjából további kutatásokra, potenciálra adnak lehetőséget.
3. A szorbinsavnak és kálium sójának különböző szorbát észterekkel történő első összehasonlító toxicitási és antimikrobiális vizsgálatát végeztem el. Az izopropil-szorbát kiemelkedő baktericid és fungicid hatást mutatott, ami további kísérletek elvégzésére ad okot. Megfelelő kiindulási alapot jelentenek eredményeink ezen, több fajon elvégzendő antimikrobiális vizsgálatokhoz és gerincesek bevonásával lefolytatandó toxicitási tanulmányokhoz is.
4. Elsőként sikertelenül különböző para-hidroxi-benzoésav észterek esetén a páros /páratlan és az elágazó/nyílt alkiláncnak a vízdékonyságra, humán citotoxicitásra és mikrobiális gátlásra gyakorolt hatásait leírni, az eddigieknél több konstitúciós izomer bevonásával.

VIII. Conclusion

During my PhD studies, I carried out the cytotoxicity and later biocompatibility analysis of liquid preservatives intended for oral application, looking for excipient-excipient interactions, examining the biocompatibility of preservatives related to their structure. The new scientific results are as follows:

1. Combining the MTT and NR cytotoxicity tests and the toxicological assessment of *G. mellonella* larvae, a rapid, parallelly executable, simple and inexpensive biocompatibility test protocol was created with predictive role for further experiments.
2. Excipient-excipient cytoprotective and antimicrobial interactions were discovered between parabens and cosolvent-surfactant systems/surfactant-mucus systems and parabens of which provide opportunities for further research relating their advantageous utilization.
3. First biocompatibility and antimicrobial activity comparison of sorbic acid and its potassium salt with different sorbate esters. Isopropyl sorbate showed outstanding bactericidal and fungicidal activity, which can lead to further studies. Our results provide a firm basis for these new experiments involving multiple species of pathogens and toxicity studies with vertebrates.
4. For the first time, the effects of even/odd and branched/open alkyl chains on different para-hydroxybenzoic acid esters were described regarding their respective water solubility, human cytotoxicity and antimicrobial activity, involving more constitutional isomers as previously seen.

IX. Hivatkozások

1. Wiktionary, the free dictionary. Accessed March 24, 2021. https://en.wiktionary.org/wiki/Wiktionary:Main_Page
2. Puls DD, Lindgren LF, Cosgrove FP. Sorbic acid as a fungistatic agent for certain pharmaceutical preparations. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed)*. 1955;44(2):85-87. doi:10.1002/jps.3030440209
3. Bíró T, Bocsik A, Jurišić Dukovski B, et al. New Approach in Ocular Drug Delivery: In vitro and ex vivo Investigation of Cyclodextrin-Containing, Mucoadhesive Eye Drop Formulations. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:351-360. doi:10.2147/DDDT.S264745
4. Kovács A, Péter-Héderi D, Perei K, et al. Effects of Formulation Excipients on Skin Barrier Function in Creams Used in Pediatric Care. *Pharmaceutics*. 2020;12(8). doi:10.3390/pharmaceutics12080729
5. Yadav M, Lomash A, Kapoor S, Pandey R, Chauhan NS. Mapping of the benzoate metabolism by human gut microbiome indicates food-derived metagenome evolution. *Sci Rep*. 2021;11(1):5561. doi:10.1038/s41598-021-84964-6
6. Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E, Ziemert N. Antibiotic drug discovery. *Microb Biotechnol*. 2016;9(5):541-548. doi:10.1111/1751-7915.12388
7. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019;51:72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
8. Gibbs DE, Stein JM, Rockett J, Nicovich-Cushing G, Anderson M, Carmichael C. Opti-Free chemical disinfectant: a safety study with various soft contact lenses. *CLAO J*. 1989;15(1):57-60.
9. Kahook MY, Noecker RJ. Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofZia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears. *Cornea*. 2008;27(3):339-343. doi:10.1097/ICO.0b013e31815cf651
10. Kumar S, Singh T, Ichhpujani P, Vohra S. Ocular Surface Disease with BAK preserved Travoprost and Polyquaternium 1(Polyquad) preserved Travoprost. *Rom J Ophthalmol*. 2019;63(3):249-256.
11. *Az Európai Parlament és a Tanács 1333/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az élelmiszer-adalékanyagokról (EGT-vonatkozású szöveg)*. Vol 354.; 2008. Accessed March 15, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj/hun>
12. *Formulae Normales I. - Szabványos Vényminták*. I. Magyarországi Gyógyszerész Egyesület; 1940.
13. *Formulae Normales III. - Szabványos Vényminták*. III. Egészségügyi Kiadó; 1954.
14. *Pharmacopoeia Hungarica V. - Magyar Gyógyszerkönyv*. Vol III. V. Egészségügyi Kiadó; 1954.

15. OGYÉI Főigazgatóság 2/2013-MAG számú közleménye. Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet. Accessed March 15, 2021. <https://ogyei.gov.hu/22013>
16. *Formulae Normales Veterinariae IV. - Szabványos Állatgyógyászati Vényminták. IV.* Press GT Kft.; 2013.
17. *Formulae Normales VII. - Szabványos Vényminták. VII.* Melania; 2003.
18. Siegel M. Fungistatic activity of methylparaben and propylparaben. *Antibiot Chemother (Northfield)*. 1953;3(5):478-480.
19. Aalto TR, Firman MC, Rigler NE. p-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives*: I. Uses, Antibacterial and Antifungal Studies, Properties and Determination. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed)*. 1953;42(8):449-457. doi:10.1002/jps.3030420802
20. Fransway AF, Fransway PJ, Belsito DV, et al. Parabens. *Dermatitis*. 2019;30(1):3-31. doi:10.1097/DER.0000000000000429
21. Zhang W-M, Wang W, Zhang J-J, et al. Antibacterial Constituents of Hainan Morinda citrifolia (Noni) Leaves. *J Food Sci*. 2016;81(5):M1192-1196. doi:10.1111/1750-3841.13302
22. Jianmei C, Bo L, Zheng C, Huai S, Guohong L, Cijin G. Identification of ethylparaben as the antimicrobial substance produced by *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Microbiol Res*. 2015;172:48-56. doi:10.1016/j.micres.2014.11.007
23. Quévrain E, Domart-Coulon I, Pernice M, Bourguet-Kondracki M-L. Novel natural parabens produced by a Microbulbifer bacterium in its calcareous sponge host *Leuconia nivea*. *Environmental Microbiology*. 2009;11(6):1527-1539. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01880.x
24. Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol*. 2005;43(7):985-1015. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
25. Sapra A, Kumar P, Kakkar S, Narasimhan B. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of p-hydroxy benzoic acid derivatives. *Drug Res (Stuttg)*. 2014;64(1):17-22. doi:10.1055/s-0033-1349866
26. *Az Európai Parlament és a Tanács 1223/2009/EK rendelete (2009. november 30.) a kozmetikai termékekről (EGT-vonatkozású szöveg)*. Vol 342.; 2009. Accessed March 15, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/hun>
27. *Commission Regulation (EU) No 358/2014 of 9 April 2014 Amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products Text with EEA Relevance*. Vol 107.; 2014. Accessed March 15, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/358/oj/eng>
28. *Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 Amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products Text with EEA Relevance*. Vol 282.; 2014. Accessed March 15, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1004/oj/eng>

29. Atwater AR, Petty AJ, Liu B, et al. Contact dermatitis associated with preservatives: Retrospective analysis of North American Contact Dermatitis Group data, 1994 through 2016. *J Am Acad Dermatol*. Published online February 9, 2021. doi:10.1016/j.jaad.2020.07.059
30. Weth MMG der, Ferrer-Guillén B, Ortiz-Salvador JM, et al. Is time to remove parabens from standard patch test batteries? Retrospective study of 10 461 patients. *Allergy*. 2020;75(11):2997-2999. doi:https://doi.org/10.1111/all.14460
31. Pažoureková S, Hojerová J, Klimová Z, Lucová M. Dermal absorption and hydrolysis of methylparaben in different vehicles through intact and damaged skin: using a pig-ear model in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2013;59:754-765. doi:10.1016/j.fct.2013.07.025
32. Fransway AF, Fransway PJ, Belsito DV, Yiannias JA. Paraben Toxicology. *Dermatitis*. 2019;30(1):32-45. doi:10.1097/DER.0000000000000428
33. Lemini C, Silva G, Timossi C, et al. Estrogenic effects of p-hydroxybenzoic acid in CD1 mice. *Environ Res*. 1997;75(2):130-134. doi:10.1006/enrs.1997.3782
34. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;153(1):12-19. doi:10.1006/taap.1998.8544
35. Blair RM, Fang H, Branham WS, et al. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci*. 2000;54(1):138-153. doi:10.1093/toxsci/54.1.138
36. Fang H, Tong W, Shi LM, et al. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(3):280-294. doi:10.1021/tx000208y
37. Dodge LE, Kelley KE, Williams PL, et al. Medications as a source of paraben exposure. *Reprod Toxicol*. 2015;52:93-100. doi:10.1016/j.reprotox.2015.02.002
38. Dualde P, Pardo O, F Fernández S, Pastor A, Yusà V. Determination of four parabens and bisphenols A, F and S in human breast milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019;1114-1115:154-166. doi:10.1016/j.jchromb.2019.03.004
39. Freire C, Molina-Molina J-M, Iribarne-Durán LM, et al. Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities. *Environ Int*. 2019;127:592-600. doi:10.1016/j.envint.2019.04.013
40. Sugiura J, Nakajima M. Simultaneous determination of nine preservatives in food by liquid chromatography with the aid of coagulant in the clean-up process. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2017;34(5):695-704. doi:10.1080/19440049.2017.1293302
41. Selvaraj KK, Sivakumar S, Sampath S, Shanmugam G, Sundaresan U, Ramaswamy BR. Paraben resistance in bacteria from sewage treatment plant effluents in India. *Water Sci Technol*. 2013;68(9):2067-2073. doi:10.2166/wst.2013.447

42. Guerra MT, Sanabria M, Leite GAA, et al. Maternal exposure to butyl paraben impairs testicular structure and sperm quality on male rats. *Environ Toxicol.* 2017;32(4):1273-1289. doi:10.1002/tox.22323
43. Kawaguchi M, Morohoshi K, Imai H, Morita M, Kato N, Himi T. Maternal exposure to isobutyl-paraben impairs social recognition in adult female rats. *Exp Anim.* 2010;59(5):631-635. doi:10.1538/expanim.59.631
44. Harley KG, Kogut K, Madrigal DS, et al. Reducing Phthalate, Paraben, and Phenol Exposure from Personal Care Products in Adolescent Girls: Findings from the HERMOSA Intervention Study. *Environ Health Perspect.* 2016;124(10):1600-1607. doi:10.1289/ehp.1510514
45. Nishihama Y, Yoshinaga J, Iida A, et al. Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. *Reprod Toxicol.* 2016;63:107-113. doi:10.1016/j.reprotox.2016.05.010
46. Berger K, Gunier RB, Chevrier J, et al. Associations of maternal exposure to triclosan, parabens, and other phenols with prenatal maternal and neonatal thyroid hormone levels. *Environ Res.* 2018;165:379-386. doi:10.1016/j.envres.2018.05.005
47. Vrijens K, Van Overmeire I, De Cremer K, et al. Weight and head circumference at birth in function of placental paraben load in Belgium: an ENVIRONAGE birth cohort study. *Environ Health.* 2020;19(1):83. doi:10.1186/s12940-020-00635-5
48. Quirós-Alcalá L, Hansel NN, McCormack MC, Matsui EC. Paraben exposures and asthma-related outcomes among children from the US general population. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(3):948-956.e4. doi:10.1016/j.jaci.2018.08.021
49. Barr L, Metaxas G, Harbach C a. J, Savoy LA, Darbre PD. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J Appl Toxicol.* 2012;32(3):219-232. doi:10.1002/jat.1786
50. Majhi PD, Sharma A, Roberts AL, et al. Effects of Benzophenone-3 and Propylparaben on Estrogen Receptor-Dependent R-Loops and DNA Damage in Breast Epithelial Cells and Mice. *Environ Health Perspect.* 2020;128(1):17002. doi:10.1289/EHP5221
51. European Medicines Agency. Use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use. European Medicines Agency. Published September 17, 2018. Accessed April 25, 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/use-methyl-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use>
52. European Commission. Annex to the European Commission guideline on “Excipients in labelling and package leaflet of medicinal products for human use.” European Medicines Agency. Published September 17, 2018. Accessed April 25, 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human>
53. Brunner U. Some antifungal properties of sorbic acid extracted from berries of rowan (*Sorbus aucupatia*). *Journal of Biological Education.* 1985;19(1):41-47. doi:10.1080/00219266.1985.9654685

54. Bobinaitė R, Grootaert C, Van Camp J, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of the extracts isolated from the pomace of rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.). *Food Res Int.* 2020;136:109310. doi:10.1016/j.foodres.2020.109310
55. Shabir G, Anwar F, Sultana B, et al. Antioxidant and antimicrobial attributes and phenolics of different solvent extracts from leaves, flowers and bark of Gold Mohar [*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf]. *Molecules.* 2011;16(9):7302-7319. doi:10.3390/molecules16097302
56. Esquivel-Ferriño PC, Favela-Hernández MJM, Garza-González E, Waksman N, Ríos MY, del Rayo Camacho-Corona M. Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico. *Molecules.* 2012;17(7):8471-8482. doi:10.3390/molecules17078471
57. Engel F, Pinto LH, Del Ciampo LF, et al. Comparative toxicity of physiological and biochemical parameters in *Euglena gracilis* to short-term exposure to potassium sorbate. *Ecotoxicology.* 2015;24(1):153-162. doi:10.1007/s10646-014-1367-7
58. Deuel HJ, Alfin-Slatee R, Weil CS, Smyth HE. Sorbic Acid as a Fungistatic Agent for Foods. *Journal of Food Science.* 1954;19(1-6):1-12. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1954.tb17417.x
59. Würigler FE, Schlatter J, Maier P. The genotoxicity status of sorbic acid, potassium sorbate and sodium sorbate. *Mutation Research Letters.* 1992;283(2):107-111. doi:10.1016/0165-7992(92)90141-4
60. Walker R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Addit Contam.* 1990;7(5):671-676. doi:10.1080/02652039009373932
61. 4: Final Report on the Safety Assessment of Sorbic Acid and Potassium Sorbate. *Journal of the American College of Toxicology.* 1988;7(6):837-880. doi:10.3109/10915818809078711
62. EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), Younes M, Aquilina G, et al. Opinion on the follow-up of the re-evaluation of sorbic acid (E200) and potassium sorbate (E202) as food additives. *EFSA J.* 2019;17(3):e05625. doi:10.2903/j.efsa.2019.5625
63. Canavez ADPM, Corrêa G de OP, Isaac VLB, Schuck DC, Lorencini M. Integrated approaches to testing and assessment as a tool for the hazard assessment and risk characterization of cosmetic preservatives. *Journal of Applied Toxicology.* n/a(n/a). doi:https://doi.org/10.1002/jat.4156
64. Abo-EL-Sooud K, Hashem MM, Badr YA, et al. Assessment of hepato-renal damage and genotoxicity induced by long-term exposure to five permitted food additives in rats. *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25(26):26341-26350. doi:10.1007/s11356-018-2665-z
65. Raposa B, Pónusz R, Gerencsér G, et al. Food additives: Sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine, and tartrazine modify the expression of NFκB, GADD45α, and MAPK8 genes. *Physiol Int.* 2016;103(3):334-343. doi:10.1556/2060.103.2016.3.6

66. Wang C, Deng Q, Han D, Zhang L. Effects of Benzalkonium Chloride and Potassium Sorbate on Airway Ciliary Activity. *ORL*. 2012;74(3):149-153. doi:10.1159/000337830
67. Piper JD, Piper PW. Benzoate and Sorbate Salts: A Systematic Review of the Potential Hazards of These Invaluable Preservatives and the Expanding Spectrum of Clinical Uses for Sodium Benzoate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017;16(5):868-880. doi:https://doi.org/10.1111/1541-4337.12284
68. Walters RM, Khanna P, Hamilton M, Mays DA, Telofski L. Human Cumulative Irritation Tests of Common Preservatives Used in Personal Care Products: A Retrospective Analysis of Over 45 000 Subjects. *Toxicol Sci*. 2015;148(1):101-107. doi:10.1093/toxsci/kfv158
69. Schnuch A, Mildau G, Kratz E-M, Uter W. Risk of sensitization to preservatives estimated on the basis of patch test data and exposure, according to a sample of 3541 leave-on products. *Contact Dermatitis*. 2011;65(3):167-174. doi:https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01939.x
70. Lim K, Mustapha A. Effects of cetylpyridinium chloride, acidified sodium chlorite, and potassium sorbate on populations of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus on fresh beef. *J Food Prot*. 2004;67(2):310-315. doi:10.4315/0362-028x-67.2.310
71. *A Bizottság (EU) 2016/2023 végrehajtási rendelete (2016. november 18.) a nátrium-benzoát, a kálium-szorbát, a hangyasav és a nátrium-formiát valamennyi állatfaj takarmány-adalékanyagaként történő engedélyezéséről (EGT-vonatkozású szöveg)*. Vol 313.; 2016. Accessed March 15, 2021. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2016/2023/oj/hun
72. Mira NP, Teixeira MC, Sá-Correia I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *OMICS*. 2010;14(5):525-540. doi:10.1089/omi.2010.0072
73. Bowman JP, Lee Chang KJ, Pinfold T, Ross T. Transcriptomic and phenotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains possessing different growth efficiencies under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(14):4836-4850. doi:10.1128/AEM.00315-10
74. Pandey R, Vischer NOE, Smelt JPPM, et al. Intracellular pH Response to Weak Acid Stress in Individual Vegetative *Bacillus subtilis* Cells. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(21):6463-6471. doi:10.1128/AEM.02063-16
75. Bagar T, Altenbach K, Read ND, Benčina M. Live-Cell Imaging and Measurement of Intracellular pH in Filamentous Fungi Using a Genetically Encoded Ratiometric Probe. *Eukaryot Cell*. 2009;8(5):703-712. doi:10.1128/EC.00333-08
76. Warth AD. Relationships between the resistance of yeasts to acetic, propanoic and benzoic acids and to methyl paraben and pH. *Int J Food Microbiol*. 1989;8(4):343-349. doi:10.1016/0168-1605(89)90005-6

77. Lues JFR, Theron MM. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(12):1126-1129. doi:10.1089/fpd.2012.1220
78. Ito S, Yazawa S, Nakagawa Y, Sasaki Y, Yajima S. Effects of alkyl parabens on plant pathogenic fungi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2015;25(8):1774-1777. doi:10.1016/j.bmcl.2015.02.049
79. Bredin J, Davin-Régli A, Pagès J-M. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(6):1013-1015. doi:10.1093/jac/dki110
80. Flasiński M, Gawryś M, Broniatowski M, Wydro P. Studies on the interactions between parabens and lipid membrane components in monolayers at the air/aqueous solution interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2016;1858(4):836-844. doi:10.1016/j.bbamem.2016.01.002
81. Stratford M, Anslow PA. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid preservative." *Lett Appl Microbiol.* 1998;27(4):203-206. doi:10.1046/j.1472-765x.1998.00424.x
82. Abbott DA, Knijnenburg TA, de Poorter LMI, Reinders MJT, Pronk JT, van Maris AJA. Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(6):819-833. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00242.x
83. Valkova N, Lépine F, Valeanu L, et al. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(6):2404-2409. doi:10.1128/AEM.67.6.2404-2409.2001
84. Valkova N, Lépine F, Bollet C, Dupont M, Villemur R. *prbA*, a gene coding for an esterase hydrolyzing parabens in *enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* strains. *J Bacteriol.* 2002;184(18):5011-5017. doi:10.1128/jb.184.18.5011-5017.2002
85. Rushton L, Sass A, Baldwin A, Dowson CG, Donoghue D, Mahenthiralingam E. Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):2972-2980. doi:10.1128/AAC.00140-13
86. Davin-Regli A, Chollet R, Bredin J, Chevalier J, Lepine F, Pagès JM. *Enterobacter gergoviae* and the prevalence of efflux in parabens resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):757-760. doi:10.1093/jac/dkl023
87. Plumridge A, Melin P, Stratford M, et al. The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in *Aspergillus* spp. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(8):683-692. doi:10.1016/j.fgb.2010.04.011
88. Piper P, Mahé Y, Thompson S, et al. The *pdr12* ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* 1998;17(15):4257-4265. doi:10.1093/emboj/17.15.4257

89. Creamer KE, Ditmars FS, Basting PJ, et al. Benzoate- and Salicylate-Tolerant Strains of *Escherichia coli* K-12 Lose Antibiotic Resistance during Laboratory Evolution. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(2). doi:10.1128/AEM.02736-16
90. Reyes-Fernández EZ, Schuldiner S. Acidification of Cytoplasm in *Escherichia coli* Provides a Strategy to Cope with Stress and Facilitates Development of Antibiotic Resistance. *Sci Rep.* 2020;10(1):9954. doi:10.1038/s41598-020-66890-1
91. Shin B, Park C, Imlay JA, Park W. 4-Hydroxybenzaldehyde sensitizes *Acinetobacter baumannii* to aminoglycosides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(5):2323-2335. doi:10.1007/s00253-018-8791-1
92. Quirós-Alcalá L, Buckley JP, Boyle M. Parabens and measures of adiposity among adults and children from the U.S. general population: NHANES 2007-2014. *Int J Hyg Environ Health.* 2018;221(4):652-660. doi:10.1016/j.ijheh.2018.03.006
93. Peng Q, Chang H, Wang R, et al. Potassium sorbate suppresses intestinal microbial activity and triggers immune regulation in zebrafish (*Danio rerio*). *Food Funct.* 2019;10(11):7164-7173. doi:10.1039/c9fo01237k
94. Hrnčirova L, Hudcovic T, Sukova E, et al. Human gut microbes are susceptible to antimicrobial food additives in vitro. *Folia Microbiol (Praha).* 2019;64(4):497-508. doi:10.1007/s12223-018-00674-z
95. Hu J, Raikhel V, Gopalakrishnan K, et al. Effect of postnatal low-dose exposure to environmental chemicals on the gut microbiome in a rodent model. *Microbiome.* 2016;4(1):26. doi:10.1186/s40168-016-0173-2
96. Koplin JJ, Gyngell C. Emerging moral status issues. *Monash Bioeth Rev.* 2020;38(2):95-104. doi:10.1007/s40592-020-00124-y
97. Rehberger K, Kropf C, Segner H. In vitro or not in vitro: a short journey through a long history. *Environ Sci Eur.* 2018;30(1). doi:10.1186/s12302-018-0151-3
98. Halappanavar S, Nymark P, Krug HF, Clift MJD, Rothen-Rutishauser B, Vogel U. Non-Animal Strategies for Toxicity Assessment of Nanoscale Materials: Role of Adverse Outcome Pathways in the Selection of Endpoints. *Small.* Published online February 9, 2021:e2007628. doi:10.1002/sml.202007628
99. Elmore E, Siddiqui S, Navidi M, Steele VE, Redpath JL. Correlation of in vitro chemopreventive efficacy data from the human epidermal cell assay with animal efficacy data and clinical trial plasma levels. *J Cell Biochem.* 2005;95(3):571-588. doi:10.1002/jcb.20426
100. Balls M, Blaauboer B, Brusick D, et al. Report and Recommendations of the CAAT/ERGATT Workshop on the Validation of Toxicity Test Procedures. *Altern Lab Anim.* 1990;18(1_part_1):313-337. doi:10.1177/026119299001800131.1
101. Series on Testing and Assessment: Testing for Human Health - OECD. Accessed March 13, 2021. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmenttestingforhumanhealth.htm>

102. Hartung T, Bremer S, Casati S, et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *Altern Lab Anim.* 2004;32(5):467-472. doi:10.1177/026119290403200503
103. Patterson EA, Whelan MP, Worth AP. The role of validation in establishing the scientific credibility of predictive toxicology approaches intended for regulatory application. *Comput Toxicol.* 2021;17. doi:10.1016/j.comtox.2020.100144
104. A Bizottság 440/2008/EK rendelete (2008. május 30.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról (EGT-vonatkozású szöveg). Vol 142.; 2008. Accessed March 11, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/440/oj/hun>
105. A Bizottság (EU) 2017/735 rendelete (2017. február 14.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról (EGT-vonatkozású szöveg). Vol 112.; 2017. Accessed March 14, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/735/oj/hun>
106. Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ Mol Mutagen.* 2010;51(3):251-259. doi:10.1002/em.20539
107. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
108. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology Annual Review.* Vol 11. Elsevier; 2005:127-152. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7
109. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785-796. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006
110. D'Alessandro S, Corbett Y, Parapini S, et al. Malaria pigment accelerates MTT - formazan exocytosis in human endothelial cells. *Parasitology.* 2019;146(3):399-406. doi:10.1017/S0031182018001579
111. Shiraishi H, Toyoda A. The use of a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide-based colorimetric assay in the viability analysis of the filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2021;85(3):739-742. doi:10.1093/bbb/zbaa050
112. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47. doi:10.1186/s13104-015-1000-8

113. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311
114. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide powder, BioReagent, cell culture, insect cell culture, >= 97.5 % HPLC | 298-93-1 | Sigma-Aldrich. Accessed March 14, 2021. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m5655?lang=hu®ion=HU>
115. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 1985;24(2):119-124. doi:10.1016/0378-4274(85)90046-3
116. Schrage A, Hempel K, Schulz M, Kolle SN, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data. *Altern Lab Anim*. 2011;39(3):273-295. doi:10.1177/026119291103900311
117. Zuang V. The Neutral Red Release Assay: A Review. *Altern Lab Anim*. 2001;29(5):575-599. doi:10.1177/026119290102900513
118. Nemes Z, Dietz R, Lüth JB, Gomba S, Hackenthal E, Gross F. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*. 1979;35(11):1475-1476. doi:10.1007/BF01962793
119. Xu H, Ren D. Lysosomal Physiology. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:57-80. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071649
120. Filman DJ, Brawn RJ, Dandliker WB. Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *J Immunol Methods*. 1975;6(3):189-207. doi:10.1016/0022-1759(75)90064-2
121. Gomez-Gutierrez JG, Bhutiani N, McNally MW, et al. The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment in vitro. *Biotechnic & Histochemistry*. 2020;0(0):1-9. doi:10.1080/10520295.2020.1802065
122. Clothier R, Gómez-Lechón MJ, Kinsner-Ovaskainen A, et al. Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. *Toxicology in Vitro*. 2013;27(4):1347-1356. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.015
123. Mannerström M, Toimela T, Sarkanen J-R, Heinonen T. Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017;121(S3):109-115. doi:<https://doi.org/10.1111/bcpt.12790>
124. Prieto P, Cole T, Curren R, et al. Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD50>2000 mg/kg): results of an ECVAM validation study. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013;65(3):344-365. doi:10.1016/j.yrtph.2012.11.013
125. Cudazzo G, Smart DJ, McHugh D, Vanscheeuwijck P. Lysosomotropic-related limitations of the BALB/c 3T3 cell-based neutral red uptake assay and an alternative

- testing approach for assessing e-liquid cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2019;61:104647. doi:10.1016/j.tiv.2019.104647
126. Fotschki B, Laparra JM, Sójka M. Raspberry Polyphenolic Extract Regulates Obesogenic Signals in Hepatocytes. *Molecules*. 2018;23(9). doi:10.3390/molecules23092103
127. Johnson C, Kannan TR, Baseman JB. Cellular vacuoles induced by *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin originate from Rab9-associated compartments. *PLoS One*. 2011;6(7):e22877. doi:10.1371/journal.pone.0022877
128. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1125-1131. doi:10.1038/nprot.2008.75
129. Na N, Guo H, Zhang S, Li Z, Yin L. In vitro and in vivo acute toxicity of fenpyroximate to flounder *Paralichthys olivaceus* and its gill cell line FG. *Aquat Toxicol*. 2009;92(2):76-85. doi:10.1016/j.aquatox.2008.12.006
130. Davis B, To V, Talbot P. Comparison of cytotoxicity of IQOS aerosols to smoke from Marlboro Red and 3R4F reference cigarettes. *Toxicology in Vitro*. 2019;61:104652. doi:10.1016/j.tiv.2019.104652
131. Vajrabhaya L-O, Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of *Clinacanthus nutans* through dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide and neutral red uptake assays. *Eur J Dent*. 2016;10(1):134-138. doi:10.4103/1305-7456.175701
132. Luke AM, Patnaik R, Kuriadom ST, Jaber M, Mathew S. An in vitro study of *Ocimum sanctum* as a chemotherapeutic agent on oral cancer cell-line. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(1):887-890. doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.030
133. Bacanlı M, Anlar HG, Başaran AA, Başaran N. Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. *Turk J Pharm Sci*. 2017;14(2):95-107. doi:10.4274/tjps.07078
134. Gregório P, da Cunha RS, Biagini G, et al. Chloroquine may induce endothelial injury through lysosomal dysfunction and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021;414:115412. doi:10.1016/j.taap.2021.115412
135. Gomez Perez M, Fourcade L, Mateescu MA, Paquin J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry*. 2017;535:43-46. doi:10.1016/j.ab.2017.07.027
136. Allen CN, Harpur ES, Gray TJ, Hirst BH. Toxic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in a human intestinal epithelial cell line (HCT-8), as assessed by the MTT and neutral red assays. *Toxicol In Vitro*. 1991;5(3):183-191. doi:10.1016/0887-2333(91)90016-7
137. Gómez-Arnaiz S, Tate RJ, Grant MH. Cytotoxicity of cobalt chloride in brain cell lines - a comparison between astrocytoma and neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2020;68:104958. doi:10.1016/j.tiv.2020.104958

138. Lindl T, Lewandowski B, Schreyögg S, Stäudte A. An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. *Altern Lab Anim.* 2005;33(6):591-601. doi:10.1177/026119290503300614
139. Mello DF, Trevisan R, Rivera N, et al. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* 2020;315:108868. doi:10.1016/j.cbi.2019.108868
140. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006;160(2):171-177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
141. Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA. Comparative Toxicity of Preservatives on Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelial Cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009;25(2):113-119. doi:10.1089/jop.2008.0098
142. Tabatabaei MH, Mahounak FS, Asgari N, Moradi Z. Cytotoxicity of the Ingredients of Commonly Used Toothpastes and Mouthwashes on Human Gingival Fibroblasts. *Front Dent.* 2019;16(6):450-457. doi:10.18502/fid.v16i6.3444
143. Nowak K, Jabłońska E, Radziwon P, Ratajczak-Wrona W. Identification of a novel target for the action of endocrine disrupting chemicals: inhibitory effect of methylparaben on human neutrophil functions. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27(6):6540-6548. doi:10.1007/s11356-019-07388-w
144. Mohammadzadeh-Aghdash H, Sohrabi Y, Mohammadi A, Shanehbandi D, Dehghan P, Ezzati Nazhad Dolatabadi J. Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry.* 2018;257:211-215. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.020
145. Trainer DL, Kline T, McCabe FL, et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 1988;41(2):287-296. doi:10.1002/ijc.2910410221
146. Adachi A, Koenig S, Gendelman HE, et al. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J Virol.* 1987;61(1):209-213. doi:10.1128/JVI.61.1.209-213.1987
147. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1977;59(1):221-226. doi:10.1093/jnci/59.1.221
148. Cui M, Klopot A, Jiang Y, Fleet JC. The Effect of Differentiation on 1,25 dihydroxyvitamin D₃-Mediated Gene Expression in the Enterocyte-Like Cell Line, Caco-2. *J Cell Physiol.* 2009;218(1):113-121. doi:10.1002/jcp.21574
149. Jalal F, Jumarie C, Bawab W, et al. Polarized distribution of neutral endopeptidase 24.11 at the cell surface of cultured human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem J.* 1992;288(Pt 3):945-951. Accessed March 14, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1131978/>

150. Henri J, Lancelleur R, Delmas J-M, Fessard V, Huguet A. Permeability of the Cyanotoxin Microcystin-RR across a Caco-2 Cells Monolayer. *Toxins (Basel)*. 2021;13(3). doi:10.3390/toxins13030178
151. Jin R, Shang J, Teng X, et al. Characterization of DPP-IV Inhibitory Peptides Using an In Vitro Cell Culture Model of the Intestine. *J Agric Food Chem*. Published online February 25, 2021. doi:10.1021/acs.jafc.0c05880
152. Obinu A, Burrai GP, Cavalli R, et al. Transmucosal Solid Lipid Nanoparticles to Improve Genistein Absorption via Intestinal Lymphatic Transport. *Pharmaceutics*. 2021;13(2). doi:10.3390/pharmaceutics13020267
153. Plageman LR, Pauletti GM, Skau KA. Characterization of acetylcholinesterase in Caco-2 cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(7):480-486. doi:10.1177/153537020222700712
154. Ershad M, Shigenaga MK, Bandy B. Differential protection by anthocyanin-rich bilberry extract and resveratrol against lipid micelle-induced oxidative stress and monolayer permeability in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Food Funct*. Published online March 10, 2021. doi:10.1039/d0fo02377a
155. Nallathambi R, Poulev A, Zuk JB, Raskin I. Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Reduces Inflammation and Oxidative Stress and Restores Tight Junction Barrier Function in Caco-2 Colon Cells. *Nutrients*. 2020;12(6). doi:10.3390/nu12061623
156. Qiu Z, Deng W, Hong Y, et al. Biological Behavior and Lipid Metabolism of Colon Cancer Cells are Regulated by a Combination of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 and ATP Citrate Lyase. *Onco Targets Ther*. 2021;14:1531-1542. doi:10.2147/OTT.S282906
157. McCormick BA. The use of transepithelial models to examine host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(1):77-81. doi:10.1016/s1369-5274(02)00003-6
158. dos Santos PA, Pereira ACM, Ferreira AF, de Mattos Alves MA, Rosa ACP, Freitas-Almeida AC. Adhesion, invasion, intracellular survival and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEP-2, Caco-2 and T-84 cell lines. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015;107(5):1225-1236. doi:10.1007/s10482-015-0416-4
159. Van Deun K, Pasmans F, Van Immerseel F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *Br J Nutr*. 2008;100(3):480-484. doi:10.1017/S0007114508921693
160. İnci D, Aydın R, Vatan Ö, Zorlu Y. A potent drug candidature of Cu(II) pyrazino[2,3-f][1,10]phenanthroline complexes with bioactive ligands: synthesis, crystal structures, biomolecular interactions, radical scavenging and cytotoxicities. *J Biomol Struct Dyn*. Published online August 18, 2020:1-19. doi:10.1080/07391102.2020.1808070
161. Alamdary SZ, Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae* following intestinal epithelial cells infection. *Microb Pathog*. 2020;149:104543. doi:10.1016/j.micpath.2020.104543

162. D'Angeli F, Malfa GA, Garozzo A, et al. Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Juglans regia* L. Pellicle Extract. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2). doi:10.3390/antibiotics10020159
163. Lemmens G, Van Camp A, Kourula S, Vanuytsel T, Augustijns P. Drug Disposition in the Lower Gastrointestinal Tract: Targeting and Monitoring. *Pharmaceutics*. 2021;13(2). doi:10.3390/pharmaceutics13020161
164. Brassinga AKC, Sifri CD. The *Caenorhabditis elegans* Model of Legionella Infection. *Methods Mol Biol*. 2019;1921:371-397. doi:10.1007/978-1-4939-9048-1_24
165. Chambers MC, Jacobson E, Khalil S, Lazzaro BP. Consequences of chronic bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2019;14(10):e0224440. doi:10.1371/journal.pone.0224440
166. Konkel ME, Tilly K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect*. 2000;2(2):157-166. doi:10.1016/s1286-4579(00)00272-0
167. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7(3):214-229. doi:10.1080/21505594.2015.1135289
168. Zdybicka-Barabas A, Mak P, Jakubowicz T, Cytryńska M. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2014;87(1):1-12. doi:10.1002/arch.21175
169. Jemel S, Guillot J, Kallel K, Botterel F, Dannaoui E. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. *Microorganisms*. 2020;8(3). doi:10.3390/microorganisms8030390
170. Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*. 2017;10. doi:10.1186/s13104-017-2757-8
171. Megaw J, Thompson TP, Lafferty RA, Gilmore BF. *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere*. 2015;139:197-201. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.06.026
172. Suay-García B, Alemán-López PA, Bueso-Bordils JI, Falcó A, Antón-Fos G, Pérez-Gracia MT. New solvent options for in vivo assays in the *Galleria mellonella* larvae model. *Virulence*. 2019;10(1):776-782. doi:10.1080/21505594.2019.1659663
173. Cé R, Silva RC, Trentin DS, et al. *Galleria mellonella* Larvae as an In Vivo Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(3):1486-1494. doi:10.1166/jnn.2020.17170
174. Moya-Andérico L, Vukomanovic M, Cendra MDM, et al. Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. *Chemosphere*. 2021;266:129235. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129235

175. Sezer Tuncsoy B, Tuncsoy M, Gomes T, et al. Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Tissue Accumulation and Antioxidant Enzymes of *Galleria mellonella* L. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2019;102(3):341-346. doi:10.1007/s00128-018-2529-8
176. Coates CJ, Lim J, Harman K, et al. The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid. *Cell Biol Toxicol*. 2019;35(3):219-232. doi:10.1007/s10565-018-09448-2
177. Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4(5):419-428. doi:10.4161/viru.24930
178. Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2008;165(1):5-12. doi:10.1007/s11046-007-9069-9
179. Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*. 2012;3(6):497-503. doi:10.4161/viru.21972
180. EUCAST: AST of yeasts. Accessed August 30, 2020. https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/
181. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9(8):ix-xv. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x
182. Shehata AS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison between the Standardized Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 Method and a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-[(Sulphenylamino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide- Based Method for Testing Antifungal Susceptibility of Dermatophytes. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3668-3671. doi:10.1128/JCM.01242-08
183. Nagy F, Vitális E, Jakab Á, et al. In vitro and in vivo Effect of Exogenous Farnesol Exposure Against *Candida auris*. *Front Microbiol*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.00957
184. Ujhelyi Z, Fenyvesi F, Váradi J, et al. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47(3):564-573. doi:10.1016/j.ejps.2012.07.005
185. McLaughlin M, Gilea MA, Earle MJ, Seddon KR, Gilmore BF, Kelly SA. Characterization of ionic liquid cytotoxicity mechanisms in human keratinocytes compared with conventional biocides. *Chemosphere*. 2021;270:129432. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129432
186. Pérez-García LA, Csonka K, Flores-Carreón A, et al. Role of Protein Glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Front Microbiol*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00306

187. Arora P, Kumar A, Vishwakarma RA, Riyaz-UI-Hassan S. A natural association of a yeast with *Aspergillus terreus* and its impact on the host fungal biology. *FEMS Microbiol Lett*. Published online March 13, 2021. doi:10.1093/femsle/fnab032
188. A Bizottság (EU) 2018/98 rendelete (2018. január 22.) az 1333/2008/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet II. és III. mellékletének és a 231/2012/EU bizottsági rendelet mellékletének a kalcium-szorbát (E 203) tekintetében történő módosításáról (EGT-vonatkozású szöveg.). Vol 017.; 2018. Accessed March 15, 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/98/oj/hun>
189. Narasimhan B, Judge V, Narang R, Ohlan R, Ohlan S. Quantitative structure–activity relationship studies for prediction of antimicrobial activity of synthesized 2,4-hexadienoic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007;17(21):5836-5845. doi:10.1016/j.bmcl.2007.08.037
190. Sienkiewicz M, Łysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb Drug Resist*. 2012;18(2):137-148. doi:10.1089/mdr.2011.0080
191. Kringel DH, Lang GH, Dias ÁRG, Gandra EA, da Rosa Zavareze E. Impact of encapsulated orange essential oil with β -cyclodextrin on technological, digestibility, sensory properties of wheat cakes as well as *Aspergillus flavus* spoilage. *J Sci Food Agric*. Published online March 11, 2021. doi:10.1002/jsfa.11211
192. Buldain D, Gortari Castillo L, Marchetti ML, Julca Lozano K, Bandoni A, Mestorino N. Modeling the Growth and Death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* Essential Oil at Different pH Conditions. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2). doi:10.3390/antibiotics10020222
193. da Silva BD, Bernardes PC, Pinheiro PF, Fantuzzi E, Roberto CD. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Sci*. 2021;176:108463. doi:10.1016/j.meatsci.2021.108463
194. Ribes S, Fuentes A, Talens P, Barat JM. Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams. *Food Chemistry*. 2016;211:92-99. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.040
195. Jiang T, Tang J, Wu Z, Sun Y, Tan J, Yang L. The combined utilization of Chlorhexidine and Voriconazole or Natamycin to combat *Fusarium* infections. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):275. doi:10.1186/s12866-020-01960-y
196. Zhang K, Ding W, Sun J, et al. Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. *Biochimie*. 2014;107 Pt B:203-210. doi:10.1016/j.biochi.2014.03.014
197. Abudayyak M, Guzel E, Özhan G. Cupric Oxide Nanoparticles Induce Cellular Toxicity in Liver and Intestine Cell Lines. *Adv Pharm Bull*. 2020;10(2):213-220. doi:10.34172/apb.2020.025

198. Mahmoud A, Ezgi Ö, Merve A, Özhan G. In Vitro Toxicological Assessment of Magnesium Oxide Nanoparticle Exposure in Several Mammalian Cell Types. *Int J Toxicol*. 2016;35(4):429-437. doi:10.1177/1091581816648624
199. Clarke R, Connolly L, Frizzell C, Elliott CT. Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. *Toxicon*. 2014;90:70-81. doi:10.1016/j.toxicon.2014.07.019
200. Alam F, Najum us Saqib Q, Waheed A. Cytotoxic activity of extracts and crude saponins from *Zanthoxylum armatum* DC. against human breast (MCF-7, MDA-MB-468) and colorectal (Caco-2) cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17. doi:10.1186/s12906-017-1882-1
201. Prosperini A, Juan-García A, Font G, Ruiz MJ. Reactive oxygen species involvement in apoptosis and mitochondrial damage in Caco-2 cells induced by enniatins A, A1, B and B1. *Toxicology Letters*. 2013;222(1):36-44. doi:10.1016/j.toxlet.2013.07.009
202. Creppy EE, Diallo A, Moukha S, Eklü-Gadegbeku C, Cros D. Study of Epigenetic Properties of Poly(HexaMethylene Biguanide) Hydrochloride (PHMB). *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(8):8069-8092. doi:10.3390/ijerph110808069
203. Narai A, Arai S, Shimizu M. Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants. *Toxicol In Vitro*. 1997;11(4):347-354. doi:10.1016/s0887-2333(97)00026-x
204. Lam HT, Le-Vinh B, Phan TNQ, Bernkop-Schnürch A. Self-emulsifying drug delivery systems and cationic surfactants: do they potentiate each other in cytotoxicity? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(2):156-166. doi:10.1111/jphp.13021
205. Calejo MT, Cardoso AMS, Marques EF, et al. In vitro cytotoxicity of a thermoresponsive gel system combining ethyl(hydroxyethyl) cellulose and lysine-based surfactants. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;102:682-686. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.033
206. Lam HT, Le N-MN, Phan TNQ, Bernkop-Schnürch A. Mucolytic self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) containing a hydrophobic ion-pair of proteinase. *Eur J Pharm Sci*. Published online December 1, 2020:105658. doi:10.1016/j.ejps.2020.105658
207. Oliver M, Kudłak B, Wiczerzak M, et al. Ecotoxicological equilibria of triclosan in Microtox, XenoScreen YES/YAS, Caco2, HEPG2 and liposomal systems are affected by the occurrence of other pharmaceutical and personal care emerging contaminants. *Science of The Total Environment*. 2020;719:137358. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137358
208. Dagher Z, Borgie M, Magdalou J, Chahine R, Greige-Gerges H. p-Hydroxybenzoate esters metabolism in MCF7 breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(11):4109-4114. doi:10.1016/j.fct.2012.08.013
209. Lakeram M, Paine AJ, Lockley DJ, Sanders DJ, Pendlington R, Forbes B. Transesterification of p-hydroxybenzoate esters (parabens) by human intestinal (Caco-2) cells. *Xenobiotica*. 2006;36(9):739-749. doi:10.1080/00498250600738637

210. Oh SY, Fujii M, Takeda Y, et al. The effect of ethanol on the simultaneous transport and metabolism of methyl p-hydroxybenzoate in excised skin of Yucatan micropig. *Int J Pharm.* 2002;236(1-2):35-42. doi:10.1016/s0378-5173(02)00005-4
211. Lather A, Sharma S, Khatkar A. Naringenin derivatives as glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors: synthesis, antioxidants, antimicrobial, preservative efficacy, molecular docking and in silico ADMET analysis. *BMC Chem.* 2020;14(1). doi:10.1186/s13065-020-00693-3
212. Hussain A, Singh SK. Evidences for anti-mycobacterium activities of lipids and surfactants. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016;32(1):7. doi:10.1007/s11274-015-1965-4
213. Fukahori M, Akatsu S, Sato H, Yotsuyanagi T. Effects of the structures of polyoxyethylene alkyl ethers on uptake of butyl p-hydroxybenzoate by *Escherichia coli* and its antibacterial activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1996;44(12):2335-2337. doi:10.1248/cpb.44.2335
214. Carrasco-Pozo C, Pastene E, Vergara C, Zapata M, Sandoval C, Gotteland M. Stimulation of cytosolic and mitochondrial calcium mobilization by indomethacin in Caco-2 cells: Modulation by the polyphenols quercetin, resveratrol and rutin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2012;1820(12):2052-2061. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.015
215. Zhou J, Gao G, Zhang S, et al. Influences of calcium and magnesium ions on cellular antioxidant activity (CAA) determination. *Food Chemistry.* 2020;320:126625. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126625
216. Li L, Tavallaie MS, Xie F, et al. Identification of lipid-like salicylic acid-based derivatives as potent and membrane-permeable PTP1B inhibitors. *Bioorganic Chemistry.* 2019;93:103296. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103296
217. Smith CN, Alexander BR. The relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation. *Toxicol In Vitro.* 2005;19(7):963-969. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.014
218. Qu D, Jiang M, Huang D, et al. Synergistic Effects of The Enhancements to Mitochondrial ROS, p53 Activation and Apoptosis Generated by Aspartame and Potassium Sorbate in HepG2 Cells. *Molecules.* 2019;24(3). doi:10.3390/molecules24030457
219. Maguire R, Duggan O, Kavanagh K. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell Biol Toxicol.* 2016;32(3):209-216. doi:10.1007/s10565-016-9329-x
220. Allegra E, Titball RW, Carter J, Champion OL. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. *Chemosphere.* 2018;198:469-472. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.175
221. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel).* 2017;4(3). doi:10.3390/medicines4030058

222. Ribes S, Fuentes A, Talens P, Barat JM. Combination of different antifungal agents in oil-in-water emulsions to control strawberry jam spoilage. *Food Chem.* 2018;239:704-711. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.002
223. Maldonado MC, Aban MP, Navarro AR. Chemicals and lemon essential oil effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability. *Braz J Microbiol.* 2013;44(4):1133-1137. doi:10.1590/s1517-83822013000400015
224. Demirok Soncu E, Özdemir N, Arslan B, Küçükaya S, Soyer A. Contribution of surface application of chitosan–thyme and chitosan–rosemary essential oils to the volatile composition, microbial profile, and physicochemical and sensory quality of dry-fermented sausages during storage. *Meat Science.* 2020;166:108127. doi:10.1016/j.meatsci.2020.108127
225. Hu Y, Miao K, Zha B, Miao X, Xu L, Deng W. Side chain position, length and odd/even effects on the 2D self-assembly of mono-substituted anthraquinone derivatives at the liquid/solid interface. *RSC Adv.* 2015;5(113):93337-93346. doi:10.1039/C5RA18434G
226. Burnett EK, Ai Q, Cherniawski BP, Parkin SR, Risko C, Briseno AL. Even–Odd Alkyl Chain-Length Alternation Regulates Oligothiophene Crystal Structure. *Chem Mater.* 2019;31(17):6900-6907. doi:10.1021/acs.chemmater.9b01317
227. Price NPJ, Jackson MA, Hartman TM, et al. Branched Chain Lipid Metabolism As a Determinant of the N-Acyl Variation of *Streptomyces* Natural Products. *ACS Chem Biol.* 2021;16(1):116-124. doi:10.1021/acscchembio.0c00799
228. Güzel Bayülken D, Ayaz Tüylü B. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of some paraben esters on human peripheral lymphocytes. *Drug Chem Toxicol.* 2019;42(4):386-393. doi:10.1080/01480545.2018.1457049
229. Dobbins LL, Usenko S, Brain RA, Brooks BW. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2009;28(12):2744-2753. doi:10.1897/08-523.1
230. Vo TTB, Jung E-M, Choi K-C, Yu FH, Jeung E-B. Estrogen receptor α is involved in the induction of Calbindin-D9k and progesterone receptor by parabens in GH3 cells: A biomarker gene for screening xenoestrogens. *Steroids.* 2011;76(7):675-681. doi:10.1016/j.steroids.2011.03.006
231. Jewell C, Bennett P, Mutch E, Ackermann C, Williams FM. Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochemical Pharmacology.* 2007;74(6):932-939. doi:10.1016/j.bcp.2007.06.022
232. Amin A, Chauhan S, Dare M, Bansal AK. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;75(2):206-212. doi:10.1016/j.ejpb.2010.03.001
233. Ozaki H, Sugihara K, Watanabe Y, et al. Comparative study of the hydrolytic metabolism of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, heptyl- and dodecylparaben by microsomes of various rat and human tissues. *Xenobiotica.* 2013;43(12):1064-1072. doi:10.3109/00498254.2013.802059

234. Sasaki K, Terasaki M. Estrogen agonistic/antagonistic activity of brominated parabens. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25(21):21257-21266. doi:10.1007/s11356-018-2600-3
235. Jakopin Ž. Assessment of the endocrine-disrupting potential of halogenated parabens: An in silico approach. *Chemosphere*. 2021;264(Pt 1):128447. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128447

Tárgyszavak

Tárgyszavak: citotoxicitás, biokompatibilitás, tartósítószer, MTT-teszt, NR-teszt, *G. mellonella*, Caco-2 sejtvonal, antimikrobiális vizsgálatok, parabének, szorbátok

Keywords: cytotoxicity, biocompatibility, preservatives, MTT-assay, Neutral Red-assay, *G. mellonella*, Caco-2 cell line, antimicrobial tests, parabens, sorbates

Anyagi támogatás

Doktori tanulmányaimat a Richter Gedeon Tálatum Alapítványa (1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.) támogatta és ezúton szeretném megköszönni az Alapítvány Kuratóriumának, hogy doktori tanulmányokra való jelentkezésemkor kutatási tervemet támogatásra alkalmasnak találta. A kísérletekhez szükséges anyagok, eszközök beszerzését az Alapítvány nagylelkű kutatási kerete tette lehetővé, melyért végtelenül hálás vagyok. Doktori munkámat támogatták továbbá az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 és az 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 projektek ösztöndíjai, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 projekt. A disszertáció alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04) támogatta. A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalinnak, aki azóta támogatta kutatómunkámat, hogy 2014. egy őszi napján besétáltam az irodájába és kijelentettem, hogy szeretnék tartósítószerrel foglalkozni TDK munka keretein belül. Neki, az általa teremtett munkakörülményeknek és légkörnek, a szakmai és emberi segítségének köszönhető a disszertáció létrejötte. Bármilyen kutatási ötletemet, új módszer használatára tett javaslatomat elfogadta és bátorított a mindennapok során, és kiállt mellettem, mikor arra szükség volt.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vecsernyés Miklós Imre tanszékvezető dékánnak a folyamatos támogatásért. Az ő munkájának is köszönhető, hogy a Gyógyszertechnológiai Tanszék egy olyan hely, ahol értékes kutatómunka folyik, folyhat.

Doktori tanulmányaim egyik legnagyobb ajándékának azokat a hallgatókat tartom, akikkel együtt dolgozhattam, konzulensük lehettem. A velük töltött munka mindig energiával töltött fel és üde színfolt volt a szürke hétköznapiakban. Hálás vagyok, hogy többüket ma már barátomnak nevezhetem. Ők Dr. Pető Ágota, Dr. Mező Mirtill, Dr. Poczok Nikolett, Dr. Nagy Olívia Gréta, Fekete Helga, Gyulai Renáta, Tari Ákos voltak.

Nem mehetek el szó nélkül a Gyógyszertechnológiai Tanszék és a Gyógyszerész Tudományi Kar Dékáni Hivatalának munkatársai mellett, akikkel naponta találkoztam és munkájukkal hozzájárultak az elmúlt négy évem sikereihez, a kísérletek lefolytatásának gördülékénységéhez. Köszönöm Nagyné Vaszily Máriának, Lakatos Szilviának és Antalné Sipos Szilviának, hogy támogatták munkámat és bármikor hozzájuk fordulhattam segítségért. Külön köszönöm a galenusi gyakorlatok során a segítséget Szilágyi Erikának és a sejtlaborral kapcsolatos teendőikben Horányiné Körei Máriának. Lehetetlen számba venni, hogy a Tanszék további tagjai szakmai segítségükkel vagy egy-két jó szóval hányszor könnyítettek aktuális terheimen. Ők név szerint Dr. Ujhelyi Zoltán, Dr. Siposné Dr. Fehér Palma Eszter, Dr. Vasvári Gábor, Dr. Arany Petra, Dr. Kósa Dóra, Dr. Józsa Liza, Dr. Fenyvesi Ferenc, Dr. Váradí Judit, Dr. Rusznyák Ágnes, Pardiné Komóczi Anikó, Bátoriné Pataki Brigitta. Külön köszönetet szeretnék mondani a HPLC mérésekért és baráti támogatásért Dr. Haimhoffer Ádámnak.

Tartósítószerrel szóló tudományos értekezés csonka lenne mikrobiológiai kísérletek nélkül, ezért végtelen hálával adózom az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársainak, Dr. Kovács Renátó László adjunktusnak, Nagy Fruzsina és Tóth Zoltán PhD hallgatóknak, amiért idejüket és energiájukat nem kímélve segítették tudományos munkámat.

Az izopropil-szorbát szintézisével és tisztításával kapcsolatban köszönettel tartozom a Gyógyszerészi Kémia Tanszék munkatársainak Dr. Herczegh Pálnak, Dr. Borbás Anikónak, Dr. Szűcs Zsoltnak, Róth Józsefnének és Bodza Mártának és a Szerves Kémiai Tanszék munkatársának Balla Sárának. Külön köszönöm a munkát és az éveken át tartó támogatást barátomnak, Dr. Kelemen Viktornak.

A szorbátokkal kapcsolatos áramlási citometriai mérések miatt köszönettel tartozok Rebenku István tudományos segédmunkatársnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet munkatársának és Hajdu Péter Béla adjunktusnak, a Fogorvosi Biokémiai nem önálló Tanszék munkatársának.

A *G. mellonella* modellszervezet bemutatása miatt és az első, lárvákkal lefolytatott kísérletben nyújtott segítségért köszönettel tartozok Dr. Pfliegler Valter Péter adjunktusnak, a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék munkatársának.

A Gyógyszerésztudományi Kar jelenlegi és volt dolgozói közül rengetegen segítettek szakmai tudásukkal, hozzáállásukkal vagy barátságukkal az elmúlt évek alatt, többek között, Dr. Csávás Magdolna, Dr. Gyöngyösi Alexandra, Dr. Zilinyi Rita, Dr. Czeglédi András, Dr. Bak István, Dr. Lekli István, Dr. Szőke Kitti, Dr. Czompa Attila, Prof. Dr. Halmos Gábor, Dr. Oláh Gábor, Dr. Harda Kristóf Máté, Serbán Sándorné, Dr. Horváth László, Zágonyiné Szabó Henrietta Alexandra és Dr. Szűcs Zsolt.

Dr. Csoma Eszternek, Dr. Tósaki Árpádnak és Dr. Gergely Lajosnak köszönöm a fáradhatatlan munkát melyet a Doktori Iskolánkért végeznek.

Végül, de nem utolsó sorban, óriási hálával tartozok páromnak, Vojtonovszki Melindának amiért végig velem volt ezen a hosszú úton. Köszönöm barátaimnak, családomnak, hogy támogattak és segítettek.

A Gyógyszertechnológiai Tanszéken eltöltött bő négy évem nem csupán az egyetemi doktori disszertációhoz kapcsolódó kutatómunkával telt. Végtelenül hálás vagyok az Úrnak, hogy olyan lehetőségekkel, feladatokkal ajándékozott meg, amik által mind emberileg, mind szakmailag tapasztalhattam, fejlődhettem. Ezeket az élményeket semmiért sem cserélném el és egy pillanatig sem bánom, hogy belevágtam doktori tanulmányaimba.

1. Függelék: Sejttenyésztő médium és oldatok pontos formulációja:

	Sejttenyésztő médium	PBS	MEM nem esszenciális aminosav oldat	Antibiotikum mix	Glutamax™
Komponens/Koncentráció	g/L				
CaCl ₂	0,2				
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0,0001				
MgSO ₄	0,09767				
KCl	0,4	0,2			
NaHCO ₃	+3,7				
NaCl	6,4	8			
NaH ₂ PO ₄	0,109	1,15+1,85			
KH ₂ PO ₄		0,2			
L-Alanil-L-Glutamin	—				43,444
L-Alanin			0,89		
L-Aszparagin			1,321		
L-Aszparaginsav			1,33		
L-Arginin • HCl	0,084				
L-Cisztin • 2HCl	0,0626				
L-Glutamin	0,584		1,47		
Glicin	0,03		0,75		
L-Hisztidin • HCl • H ₂ O	0,042				
L-Izoleucin	0,105				
L-Leucin	0,105				
L-Lizin • HCl	0,146				
L-Metionin	0,03				
L-Fenilalanin	0,066				
L-Prolin			1,15		
L-Szerin	0,042		1,05		
L-Treonin	0,095				
L-Triptofán	0,016				
L-Tirozin • 2Na • 2H ₂ O	0,10379				
L-Valin	0,094				
Kolin-klorid	0,004				
Folsav	0,004				
Inozit	0,0072				
Niacinamid	0,004				
D-Pantoténsav • ½Ca	0,004				
Piridoxál • HCl	0,004				
Riboflavin	0,0004				
Tiamine • HCl	0,004				
D-Glükóz	4,5				
Fenol vörös • Na	0,0159				
Penicillin • K				10 ⁷ IU	
Streptomycin SO ₄				10	

2. Függelék: Ph. Eur. 9. minőségű Limonis, Menthae piperitae és Rosmarini aetheroleum műbizonylat szerinti összetétele:

Limonis aetheroleum	Menthae piperitae aetheroleum	Rosmarini aetheroleum
β-pinén 14,1%	Savszám 0,3	Savszám 0,072
szabinén 1,8%	limonén 2,3%	α-pinén 11,6%
limonén 67,5%	1,8-cineol 4,7%	kamfén 4,9%
β-kariofilén 0,1%	menton 24,9%	β-pinén 8,3%
α-terpineol 0,1%	mentofurán 2,7%	β-mircén 1,4%
nerál 0,9%	izo-menton 4,1%	limonén 2,5%
neril-acetát 0,2%	mentil-acetát 5,2%	cineol 44,6%
geraniál 1,4%	izo-pulegol 0,1%	p-cimol 1,3%
geranil-acetát 0,2%	mentol 40,8%	kámfor 10,7%
bepárlási maradék 1,8%	karvon <1%	bornil-acetát 1,1%
	1,8-cineol:limonén 2%	α-terpineol 1,8%
		összes borneol 2,3%
		verbenon <0,4%



Nyilvántartási szám: DEENK/54/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nemes Dániel

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10060419

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Nemes, D.**, Kovács, R. L., Nagy, F., Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, V. P., Rebenku, I., Hajdu, P., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 143, 1-9, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>
IF: 3.616 (2019)
- Nemes, D.**, Ujhelyi, Z., Arany, P., Pető, Á., Fehér, P., Váradi, J., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Biocompatibility investigation of different pharmaceutical excipients used in liquid dosage forms. *Pharmazie.* 73 (1), 16-18, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2018.7098>
IF: 0.82
- Nemes, D.**, Kovács, R. L., Nagy, F., Mező, M., Poczok, N., Ujhelyi, Z., Pető, Á., Fehér, P., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms: assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity. *Molecules.* 23 (7), 1-19, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071827>
IF: 3.06





További közlemények

4. 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: 3.267 (2019)
5. Jakab, Á., Tóth, Z., Nagy, F., **Nemes, D.**, Bácskay, I., Kardos, G., Emri, T., Pócsi, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Physiological and transcriptional response of Candida parapsilosis to exogenous tyrosol.
Appl. Environ. Microbiol. 85 (20), e01388-e01419, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01388-19>
IF: 4.016
6. 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>
7. Bácskay, I., **Nemes, D.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Fehér, P., Vecsernyés, M., Ujhelyi, Z.: Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development.
In: Cytotoxicity / Tulay Askin Celik, Intech Open, London, 132-146, 2018.
8. 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: 17,877

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7,496

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, 2021.02.16.

