

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Növényi hatóanyagokat tartalmazó belsőleges gyógyszerhordozó rendszerek formulálása és vizsgálata

Dr. Sinka Dávid Zsolt

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. Gyógynövények és növényi hatóanyagok a gyógyászatban.....	7
2.2. Görögszéna	8
2.3. Szilimarin.....	9
2.4. A biohasznosulás növelésének lehetőségei	11
2.5. Önemulgeáló rendszerek	13
2.6. Nyújtott hatóanyag-leadás	15
2.7. Mátrix tabletták.....	16
2.8. Ciklodextrinek	18
2.9. Caco-2 sejtvonal	19
3. Célkitűzések	21
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1. Görögszéna kivonat készítése.....	24
4.2. SEDDS rendszerek formulálása	24
4.3. Részecskeméret meghatározás	25
4.4. Zéta-potenciál analízis	26
4.5. DPPH antioxidáns teszt	26
4.6. Caco-2 sejtvonal	26
4.7. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns teszt.....	27
4.8. Permeabilitási vizsgálatok	27
4.9. A sejtréteg integritásának utánkövetése a permeabilitási vizsgálatok végeztével.....	28
4.10. MTT citotoxicitási vizsgálat.....	28
4.11. Antioxidáns hatású anyagok módosított kioldódási vizsgálata kapszulából	29
4.12. Szilimarin.....	30
4.13. Tablettapréseles	30
4.14. Gyógyszerforma vizsgálatok (Ph. Eur. 9.)	32
4.14.1. Tömegegységesség.....	32
4.14.2. Kopási veszteség	32
4.14.3. Törési szilárdság	32
4.15. Mátrix tabletták kioldódási vizsgálatai.....	33
4.16. Statisztikai kiértékelés	34
5. Eredmények.....	35

5.1. SEDDS rendszerek részecskeméret-meghatározása.....	35
5.2. SEDDS rendszerek zéta-potenciál analízise.....	36
5.3. DPPH antioxidáns teszt	36
5.4. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns teszt.....	37
5.5. Görögszéna komponensek permeabilitási vizsgálatai	38
5.6. A sejtréteg integritása	41
5.7. MTT citotoxicitási vizsgálat.....	42
5.8. Indirekt kioldódási vizsgálat.....	43
5.9. Gyógyszerforma vizsgálatok	45
5.9.1. Tömegegységesség	45
5.9.2. Kopási veszteség.....	46
5.9.3. Törési szilárdság	47
5.10. Carbopolok citotoxicitása	48
5.11. Szilimarín kioldódása mátrixtablettákból.....	48
5.12. Ciklodextrinekkal komplexált szilimarín kioldódása mátrix tablettákból.....	49
5.13. Szilimarín kioldódása mesterséges gyomornedvben.....	53
5.14. Szilimarín kioldódása változó közegben	54
5.15. Szilimarín kioldódásának összehasonlítása különböző formulációkból	57
5.16. Noveon alapú mátrix tabletták citotoxicitási vizsgálata	58
6. Diszkusszió.....	60
6.1. A görögszéna kivonatot tartalmazó SEDDS formulációk kutatási eredményeinek diszkussziója.....	60
6.2. A szilimarint tartalmazó mátrixtabletták kutatási eredményeinek diszkussziója.....	63
6.3. Új tudományos eredmények összefoglalása	65
7. Összefoglalás.....	67
8. Summary	68
9. Irodalomjegyzék.....	69
9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	69
9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke	83
10. Ábrajegyzék	86
11. Táblázatok jegyzéke	88
12. Tárgyszavak	89
13. Keywords	89
14. Köszönetnyilvánítás	90

Rövidítések jegyzéke

BCS Rendszer)	Biopharmaceutical Classification System (Biofarmáciai Osztályozási Rendszer)
Caco-2	immortalizált humán kolorektális adenokarcinoma sejtvonal
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	ethilen-diamine-tetraaceticacid (etilén-diamin-tetraecetsav)
EGTA	egtazic acid (egtazinsav)
HEPES puffer	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, ikerionos szulfonsav
HPBCD	hidroxipropil-béta-ciklodextrin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
HPMC	hidroxipropil-metil-cellulóz
LC	Liquid Chromatography (folyadékkromatográfia)
MS	Mass Spectrometry (tömegspektrometria)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium bromid
PBS	Phosphate Buffered Saline (foszfát pufferelt sóoldat)
PEG	polietilén-glikol
PES	poliéter-szulfon (membrán)
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia (Európai Gyógyszerkönyv)
RNS	ribonukleinsav
RPM	Round Per Minute (fordulatszám percenként)
SEDDS rendszer)	Self Emulsifying Drug Delivery System (önemulgeáló gyógyszerhordozó rendszer)
SMEDDS	Self Microemulsifying Drug Delivery System (ön-mikroemulgeáló gyógyszerhordozó rendszer)
SNEDDS	Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (ön-nanoemulgeáló gyógyszerhordozó rendszer)
SOD	szuperoxid-dizmutáz
TEER	Transepithelial Electrical Resistance (transzepitheliális elektromos ellenállás)

1. Bevezetés

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

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

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

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

Doktori értekezésem témájául két gyógynövény biohasznosulásának növelését választottam különböző gyógyszer technológiai formulációk segítségével. Az első esetben a görögszénát (*Trigonella foenum-graecum*) használtam, mely leginkább antidiabetikus hatása miatt érdemel figyelmet. A szénhidrátbontó enzimek gátlásán keresztül hipoglikémiás hatást vált ki, diabétesz és inzulinrezisztencia terápiájában és prevenciójában egyaránt felhasználható. Emellett antioxidáns, a gasztrointesztinális rendszert érintő, hepatoprotektív és immunmodulátor hatásai is vannak. A görögszéna hatóanyagainak oldhatósága, permeabilitása és stabilitása változó. A hatóanyagtartalomra standardizált szárított görögszénamag-kivonatot ön-emulgeáló gyógyszerhordozó rendszerekké formuláltam, melyeknek vizsgáltam a fizikai paramétereit, antioxidáns hatását, felszívódási tulajdonságait, és kioldódását az adagolást megkönnyítő kapszulákból.

A második esetben máriatövis (*Silybum marianum*) hatóanyagával, a szilimarinnal végeztem kísérleteket. Ez a flavonolignán keverék számos hatása mellett elsősorban hepatoprotektív hatóanyagként, daganatos megbetegedések megelőzésére és kezelésére

kiegészítő terápiaként, illetve gasztrointesztinális panaszok esetén használatos. Mind a vízdoldhatósága, mind a felszívódása a vékonybélből rossz. Biohasznosulásának növelését nyújtott hatóanyag-leadású hidrofil mátrix tabletták formulálásával növeltem, ezt a technológiát ciklodextrinekkel képzett zárványkomplexekkel is kombináltam. A tabletták fizikai tulajdonságait vizsgáltam, valamint a belőlük történő hatóanyag felszabadulást különböző pH-jú közegben, így a kioldódási görbéket összehasonlítva meghatároztam a biohasznosulás növelésére legalkalmasabb összetételt.

A természetes, növényi eredet nem feltétlenül jelent biztonságos alkalmazhatóságot, ezért az általam készített formulációk biokompatibilitását is szem előtt tartva sejtleletképeségi vizsgálatokat végeztem a kísérletek során felhasznált összetételekkel és anyagokkal történő kezelés után.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Gyógynövények és növényi hatóanyagok a gyógyászatban

A gyógynövények használata egyidős az orvoslással, archeológiai leletek alapján már több tízezer évre visszamenőleg is találunk bizonyítékot növények gyógyító céllal történő felhasználásáról. A korai kultúrákban az írásbeliség megjelenésével a betegségeket vagy tüneteiket enyhítő növényekről szerzett tudás könnyen átadhatóvá vált, lehetőséget adva a megfigyeléseken alapuló növényi terápiák fejlődésének és elterjedésének. A tradicionális orvoslásban használt formulációk listája hosszú és változatos, a zúzaléktól a főzeteken, forrázatokon, szirupokon át a kúpokig és kenőcsökig. A tudományos szemlélet kialakulásával a növényi hatóanyagok a farmakológia részévé váltak, és a gyógyszergyártás hajnalán is rendkívül meghatározó volt a növényi izolátumok szerepe, például a mákból (*Papaver somniferum*) kivont alkaloidoké, melyek közül kiemelt jelentőségű a morfin, és amelyek napjaink bizonyítékokon alapuló orvoslásában is fontos szerepet töltenek be [1]. A szintetikus kémia segítségével lehetőség nyílt ismert növényi hatóanyagok hatásosságának növelésére, illetve mellékhatásprofiljuk előnyösebbé tételére, ahogy a fűzfa (*Salix alba*) kérgében megtalálható szalicin és származékai, a szalicilátok, például a szalicilsav és az acetilszalicilsav esetében is láthatjuk [2]. Egyes esetekben növényekben megtalálható hatóanyagok mintájára állítottak elő szintetikus vegyületeket, ahogy a kecskeruta (*Galega officinalis*) bioaktív komponense, a guanidin szolgált a biguanidok hatóanyagcsoportjának mintájaként [3].

A tradicionális orvoslás napjainkban is komoly szerepet kap, kiemelkedően fontos például egyes ázsiai régiókban. A nyugati kultúrában is megfigyelhető ugyanakkor egyfajta trend, mely a természetes, vagy természetesnek tartott gyógymódokat részesíti előnyben a szintetikus farmakonokkal szemben. Társadalmi szinten vonzóvá teheti a fitoterápiát a konvencionális terápiához viszonyított olcsósága, és hogy orvos által kiállított recept nélkül is elérhető. Szintén a beteg terápia iránti compliance-ét javítja, hogy a nem kívánt mellékhatások előfordulási gyakorisága alacsonyabb tendenciát mutat a szintetikus gyógyszerekhez képest. A gyógynövények felhasználási lehetőségei betegségek széles spektrumát ölelik fel, és nem korlátozódnak az akut kezelésre, a krónikus és preventív terápiában is használhatók, komplex fitokemikália tartalmuk szinergista hatást eredményezhet [4].

Nem hagyhatunk azonban figyelmen kívül olyan tényezőket, amelyek a fitoterápia alkalmazása ellen szólnak. A gyógynövények használata az esetek jelentős részében empirikus tapasztalatokon alapul, és nélkülözi a kellő tudományos, elsősorban klinikai és toxikológiai

vizsgálatokat, melyek a hatásosságát és biztonságosságát bizonyítanák. A hatóanyagtartalomra történő standardizálás illetve a hatóanyagtartalom stabilitása, valamint a megfelelő minőségbiztosítás lehetséges ugyan, de nem általános [5]. Igaz, hogy a nem kívánt mellékhatások száma alacsonyabb, azonban a komplementer terápiaként alkalmazott gyógynövények hatóanyagai interakcióba léphetnek egymással, vagy a konvencionális kezelés részeként szedett gyógyszerek hatóanyagaival, ennek eredménye lehet elhanyagolható, életveszélyes, vagy hosszútávú szervi problémákat okozó hatás is [6]. Ez különösen igaz olyan esetekben, mikor a növényi készítményeket fogyasztó beteg nem megfelelő, szakmai forrásból tájékozódik, hiszen a fitoterápia iránti érdeklődés teret enged az ezt kihasználó, kizárólag rövidtávú anyagi haszonszerzést célul kitűző vállalkozásoknak is. A tapasztalatokon alapuló felhasználást lassan leváltó tudományos bizonyítékokon alapuló használat pedig újabb kérdéseket vetett fel, melyek sok esetben a fitofarmakonok biohasznosulásával kapcsolatosak: mennyi növényi hatóanyag, és milyen gyorsan abszorbeálódik az adminisztráció után, illetve a metabolizáció és elimináció hogyan befolyásolja a hatásukat. Egyre több gyógynövényről lehet elmondani, hogy bár a tudományos kutatások alátámasztották az empirikus tapasztalatokat, sőt egyéb hatásokat is leírtak, a hatóanyagok fizikai-kémiai tulajdonságai miatt biofarmáciai szempontból a használatuk problémás, oldékonyságuk, permeabilitásuk, illetve stabilitásuk alacsony és egyes esetekben kiszámíthatatlan biohasznosuláshoz vezet. Ez megnehezíti a konvencionális növényi formulációk adagolásának kiszámítását, illetve olyan adagolást tesz szükségessé, amely a beteg compliance csökkenését vonja maga után [7].

2.2. Görögszéna

A görögszéna (*Trigonella foenum-graecum*) egy elsősorban a Földközi-tenger keleti régiójában, Marokkóban, Egyiptomban, és nem utolsósorban Indiában termesztett fűszernövény. Erős íze és illata miatt szárított és őrölt magját előszeretettel használják keleti ételek ízesítésére, Dél-Kelet Ázsiában több jellegzetes fűszerkeveréknek és fogásnak képezi az alapját. Emellett a tradicionális orvoslás is számtalan céllal használja gyógynövényként ezekben a kultúrákban [8]. A görögszénának több farmakológiai hatását is leírták, ezek között találunk karminatív, gyomormotilitást stimuláló, antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antikarcinogén és hepatoprotektív hatásokat [9]. A növény antidiabetikus hatása szintén kutatások tárgyát képezte és képezi. Mind a mag, mind pedig annak metanolos, etanolos és vizes kivonata hipoglikémiás hatást vált ki a szénhidrátbontó enzimek gátlásán, illetve a

vércukorszint csökkentésén keresztül [10]. Ezeken túl leírták a görögszéna immunmodulátor hatását is, mely a makrofágok stimulálása által jön létre [11].

A görögszénát a gyógyszer technológia is többféle céllal használja, mint modern gyógyszerleadó rendszerek segédanyagát. A hidrogélt képző rostjai alkalmassá teszik orális gyógyszerformák biohasznosulás-növelésére és hatóanyag-leadás módosítására, akár egyéb növényi hatóanyagok esetében is [12]. A görögszéna komponensek felhasználása penetrációt fokozó segédanyagokként szintén kutatások fókuszában van [13].

Napjainkban görögszénamagból készült termékek széles választéka kapható kereskedelmi forgalomban. Ezek többnyire örölt görögszénamagból készült kapszulák vagy granulátumok, annak ellenére, hogy a kutatások alapján a növényi drog száraz kivonatának használata hatásosabb és kevesebb mellékhatással jár, mint a szárított növényi részeké [14]. Találunk példát néhány rendhagyó formulációra is, például hatóanyagként görögszénát tartalmazó gabonapehelyre, amelyet diabetes mellitus-ban szenvedő betegek étrendjének kiegészítésére szántak [15]. A modern gyógyszerleadó rendszerek tekintetében több kutatás is foglalkozik görögszénával, illetve komponenseivel, például a növényi hatóanyaggal töltött polimer nanopartikulumok esetében, amely készítmény célja a biohasznosulás fokozása [16], a legtöbb esetben azonban a görögszénamag komponensei segédanyagként kerülnek a modern gyógyszerleadó rendszerekbe [17]. A görögszéna hatóanyagainak Caco-2 sejteken való permeabilitása széles skálán mozog, jól és rosszul felszívódó vegyületeket egyaránt találunk köztük [18], azonban penetrációfokozókkal, például béta-ciklodextrinnekkel ez javítható [19].

2.3. Szilimarín

A szilimarín a máriatövis (*Silybum marianum*) hatóanyaga. Egy flavonolignán keverék, amely már a flavonolignán kutatások kezdete óta nagy figyelmet kap [20]. Az alkotóelemeit HPLC-tandem MS módszerrel választották el. A fő bioaktív komponensei a szilibin A és B, izoszilibin A és B, szilikrisztin A és B, szilidianin, valamint három további vegyület, melyek közül kettő valószínűleg szilibin sztereoizomer, egy pedig izoszilibin sztereoizomer [21].

Az említett flavonoidok többféle hatással rendelkeznek, többek között antioxidáns, tumorelles és sejtregeneráló hatásokkal [22]. Ezen tulajdonságai miatt a máriatövis évszázadok óta használják gyógynövényként, elsősorban máj- és epebetegségek kezelésére, valamint antidepresszánsként, amely összefüggésben állhat a történelmi hipotézissel, miszerint a melankóliát „rossz epe” vagy májjal kapcsolatos problémák okozzák [23].

A bizonyítékokon alapuló orvoslás a 20. század második felében kezdett el foglalkozni a máriatövissel. A kutatások több különböző farmakológiai hatást írtak le, mind külsőlegesen, mind belsőlegesen használat esetén. A szilimarinnak van gyulladás- és erythema-ellenes, valamint bőrvédő hatása [24]. Az antioxidáns tulajdonságai megakadályozzák az oxidatív stresszt és segítenek a bőrrák kialakulásának megelőzésében [25][26]. A külsőlegesen használt szilimarin hatással van a bőr enzimatis (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz, glutation-reduktáz, glutation-S-transzferáz) és nem enzimatis fiziológiás védelmi mechanizmusaira, így csökkenti a reaktív oxidatív szabadgyökök képződését, ami a gyulladás és a tumoros megbetegedésekhez vezető oxidatív stressz legfőbb oka [27].

A szilimarin azonban elsősorban belsőlegesen kerül felhasználásra, mint hepatoprotektív hatóanyag, rákos megbetegedések megelőzésére és kezelésére, gasztrointesztinális panaszok esetén, nephropathia, kardiopulmonaris problémák és neuropátia esetén, valamint különböző toxinok antidótumaként [28][29][30][31]. Az orálisan alkalmazott szilimarin hatásai között ott találjuk az RNS polimeráz I, a riboszomális RNS szintézis és proteoszintézis stimulálását, szabadgyököket semlegesítő képességet valamint a celluláris glutationszint emelését, ami a lipid peroxidációt gátolja, a hepatocitákból történő miofibroblaszt képződés akadályozását, és a membránpermeabilitás szabályozását, amivel növeli a membrán stabilitását xenobiotikus eredetű sérülés esetében.

A rendelkezésre álló hatékony hepatoprotektív farmakonok alacsony száma miatt a szilimarin hatásai és alkalmazási lehetőségei fontos kutatási témát jelentenek. Már az 1. századból is találunk feljegyzést kezdetleges máriatövis formulációról, ennek az alapja növényi nedv és méz volt [23]. Napjainkban a szilimarin orális bevitele konvencionális tablettákat vagy kapszulákat jelent, melyek porított máriatövis kivonatot tartalmaznak. Jóval kevesebb olaj, szirup, vagy szuszpenzió típusú terméket találunk kereskedelmi forgalomban. Ugyanakkor a szilimarin a biofarmáciai osztályozási rendszer (**1. táblázat**) IV. csoportjába tartozik, rosszul oldódik vízben és rosszul szívódik fel a gasztrointesztinális rendszerből, ami limitált biohasznosuláshoz vezet, és korlátozza a lehetőségeket gyógyszerforma terén is. A farmakológiai hatások jobb kihasználásához modernbb készítmények szükségesek [32]. Különböző tanulmányok eltérő eredményeket írnak le, egyes esetekben az orálisan bevitt szilimarin 20-50 százalékanak felszívódását tapasztalták a gasztrointesztinális traktusból [33], más esetben viszont rendkívül alacsony, 0,73 százaléknál alacsonyabb biohasznosulást tapasztaltak a vérplazma vizsgálata után [34].

		Oldhatóság	
		magas	alacsony
Permeabilitás	magas	I. (pl. metoprolol)	II. (pl. ketoprofen)
	alacsony	III. (pl. aciklovir)	IV. (pl. szilimarín)

1. táblázat. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS).

A szilimarín oldhatóságának és biohasznosulásának növelését számtalan kutatás tűzte ki célul, több megoldási lehetőséget is vizsgálva. A limitáló tényezőkön túllépni próbáló módszerek között találunk új kémiai származékokat, melyek funkciós csoportok hozzáadásával, só- vagy komplexképzéssel javíthatják a szilimarín komponensek oldhatóságát [35]. A gyógyszer technológiai fejlesztések célozhatják az oldhatóság növelését, vagy a felszívódás fokozását is. Ezek lehetnek modern gyógyszerformák, mint például mikroemulziók, önmulgeáló rendszerek, szilárd diszperziós rendszerek, lebegő tabletták. Találunk kutatásokat, melyek különböző hordozóanyagokat vizsgálnak, például lipid nanopartikulumokat, polimer micellákat, fulvosavakat, vagy komplex hordozórendszereket, amilyenek a liposzómák és targetált liposzómák, fitoszómák [36][37][38][39].

2.4. A biohasznosulás növelésének lehetőségei

A perorális gyógyszerbevitel több különböző szempontból is a preferált adminisztrációs útnak számít. A modern gyógyszerfejlesztés és gyógyszeripari kutatások számára megkerülhetetlen a hatóanyagok orális biohasznosulásának növelése. Az elmúlt évtizedekben a farmakonok sokfélesége nőtt, és az alacsony biohasznosulás okainak egyre jobb megértésével teret nyertek a különböző gyógyszerhordozó rendszerek. Alacsony orális biohasznosulást eredményezhet például a rossz felszívódás, alacsony vízoldhatóság, preszisztémás metabolizmus, a first pass effect, és az efflux mechanizmusoknak való kitettség [40].

Elsősorban a rossz vízoldhatóságú farmakonok esetében lehetséges megoldás prodrug használata. A prodrugok olyan vegyületek, melyek önmagukban nem rendelkeznek farmakológiai aktivitással, de a szervezetbe kerülve kémiai vagy enzimatisz úton bioaktív hatóanyaggá alakulnak. A prodrug fizikai-kémiai tulajdonságai eltérhetnek a hatóanyagétól, így lehetőséget adnak vízoldékony, jobb felszívódású, vagy a vér-agy gáton átjutó vegyület bejuttatására. Az oldékonyság növelésére a leggyakoribb megoldást a foszfát- illetve aminosav-észter prodrugok jelentik [41]. A prodrugok használatának limitáló tényezői között azonban ott

találjuk nem megfelelő szelektivitást a szöveti felvétel terén, és a reaktív metabolitok képződésének magas kockázatát [42].

A kémiai módosítás során a molekulába poláris funkciós csoportokat építenek be, például karboxil-, keto-, aminocsoportokat, melyek javítják a vízzel való interakciót [43]. Növényi hatóanyagok esetében az észterifikáció [44] és a PEGiláció [45] is képes javítani a vízdoldhatóságot, ezáltal a biohasznosulást is növelni.

A mikronizáció az egyik legmegbízhatóbb technológia szilárd anyagok oldhatóságának növelésére, melynek során a részecskék méretét jellemzően 10 µm alá csökkentik. A kisebb részecskeméret, egyenletesebb részecskeméret-eloszlás, egységesebb részecske alak, megfelelőbb felületi sajátosságok és agglomerációs viselkedés megnövelik az oldódási sebességet, ezáltal jobb biohasznosuláshoz vezetnek. A leggyakrabban alkalmazott mikronizációs technológiák a fizikai őrlés, a porlasztva szárítás, és a szuperkritikus folyadék módszer. Az alkalmazott technológia meghatározza a termék oldékonyság szempontjából lényeges paramétereit [46].

A polimer mikroszférákat a gyógyászat számos területén használják. Méretük 1 és 1000 µm közé esik, gyógyszerhordozó rendszerekként programozott hatóanyag-leadást lehet velük elérni, amelynek alapja az adminisztráció utáni gélképző sajátságuk, vagy a részecskék lassú degradációja, amelynek során a farmakon lassan a szervezetbe kerül [47]. A technológia *in vitro* és *in vivo* kísérletek alapján jelentősen javítja a biohasznosulást [48].

A nanopartikulumok használatával rossz vízdoldhatóságú farmakonok felszívódása és biodisztribúciója, ezáltal biohasznosulása is javítható [49]. A fitoterápiában alkalmazott hatóanyagok esetén számos ígéretes eredményt látunk a rossz oldhatóságú, permeabilitású, stabilitású, vagy nem megfelelő disztribúcióval rendelkező, esetleg gyorsan metabolizálódó vegyületek tulajdonságainak javítására. Nanopartikulumok létrehozhatók például magas nyomású homogenizációval, komplex koacervációval, ko-precipitációval, nanoprecipitációval, szuperkritikus folyadék módszerrel. A különböző típusú, például polimer, szilárd lipid, mágneses, szervesetlen nanopartikulumok, vagy quantum dot-ok különböző paraméterekkel rendelkeznek [50].

A liposzómák foszfolipid kettősréteggel határolt vezikulumok, melyekbe rossz vízdoldhatóságú vagy oldhatatlan hatóanyagokat is inkorporálhatunk. A szolubilizáló képességük mellett magas a biokompatibilitásuk, és strukturálisan is hasonlóak a biológiai membránokhoz, ami népszerű kutatási témává teszi őket a rosszul oldódó vagy rosszul

felszívódó farmakonok non-invazív orális adagolásának biohasznosulás-növelésére. A növényi komponensek foszfolipid-komplexei kiemelt jelentőségűek, külön néven, fitoszómaként is szokás rájuk hivatkozni, és különösen a szilimarinnal és a kurkuminnal kapcsolatban találunk nagy számban publikációkat [51]. A liposzómák hátrányai közé tartozik azonban instabilitásuk a gasztrointesztinális traktusban, a viszonylag nagy méretük ($0,025\ \mu\text{m} - 2,5\ \mu\text{m}$), ami megnehezíti a felszívódásukat, és hogy a legtöbb kutatás *in vitro* eredményeket mutat be, így hiányoznak az *in vivo* farmakokinetikai adatok [52].

A szilárd diszperziók formulálása során a szemcseméretet a lehető legkisebbre csökkentik, így javítják a hatóanyag nedvesedési tulajdonságait. Az előállítás általában olvasztással vagy oldószer elpárologtatással történik, az eredmény pedig az esetek többségében amorf termék [53]. Az alacsony vízdoldhatóságú hatóanyagok kioldódási profiljának javításával a szilárd diszperziók jelentős biohasznosulás-növelést képesek elérni [54]. A szolid diszperziós technológia elterjedésének talán legfontosabb limitáló tényezője a léptéknövelés nehézsége, főleg a farmakon fizikai-kémiai tulajdonságainak fenntartása a feldolgozás és gyártás során. A megfelelő gyógyszerforma kidolgozása is kihívást jelent nagyobb léptékben, mert a felhasznált polimerek, mint a polietilén-glikolok és egyéb viaszos anyagok, és a tablettázás során meglágyulhatnak, vagy olvadhatnak [55].

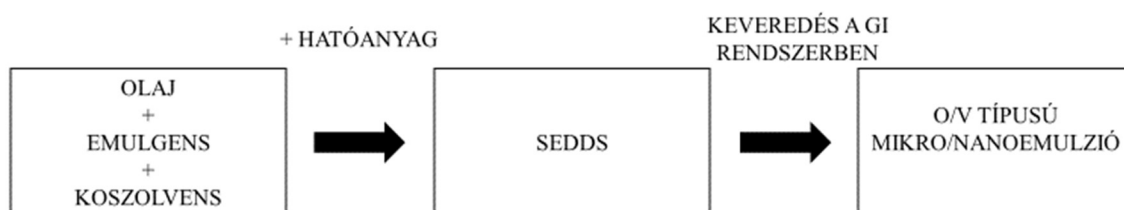
A gasztrointesztinális rendszer felső traktusából felszívódó hatóanyagok orális biohasznosulásának növelése lehetséges gasztroretentív tabletták útján. Ezek általában polimer alapú rendszerek, melyek sűrűsége alacsonyabb, mint a gyomornedvé, így annak felszínén lebegnek, miközben elnyújtva és egyenletesen adják le a hatóanyagot. A hatóanyag-leadás többnyire gélesedés útján történik a vizes közegben, és magasabb, egyenletes plazmakoncentrációt eredményez [56]. Ugyanakkor a technológia nem jelent megoldást az instabil, vagy a vékonybél proximális traktusában nem megfelelően felszívódó farmakonok esetében [57].

A biohasznosulás növelésének széles körben használt és sokoldalú módszere a különböző önemulgeáló rendszerek formulálása.

2.5. Önemulgeáló rendszerek

Az önemulgeáló gyógyszerhordozó rendszerek (Self-Emulsifying Drug Delivery Systems, SEDDS) természetes vagy szintetikus olajokból, emulgensekből és koszolvensekből álló, ideális esetben izotropikus keverékek, melyek orális bevétel után, a gasztrointesztinális

rendszer hidrofíl közegében, a perisztaltika keverő hatására olaj-a-vízben mikro- vagy nanoemulziót képeznek (**1. ábra**), mely tartalmazza a hatóanyagot [58]. A SEDDS rendszerek könnyen előállíthatók, kemény- vagy lágyzselatin kapszulákba töltve könnyen adagolhatók, és számottevő növekedést képesek elérni lipofil farmakonok oldhatósági és permeabilitási tulajdonságaiban, ami a biohasznosulás jelentős növekedéséhez vezet [59]. Antioxidáns hatású anyagok esetében a biohasznosulás és a hatékonyság is nő [60], ami jobb beteg compliance-hez vezet [61].



1. ábra. SEDDS rendszerek formulációjának sémája.

A mikro- és nanoemulziók közötti legfontosabb különbségek a cseppméret és a stabilitás. A nanoemulziós cseppek 100 nm alatti mérettartományba, a mikroemulziós cseppek pedig 200 és 300 nm közé esnek. A mikroemulziók termodinamikailag stabil rendszerek, és spontán is képződhetnek, míg a nanoemulziók kinetikus stabilitást mutatnak, és külső energia befektetése szükséges a létrehozásukhoz [62]. Ezen általánosnak tekinthető elvek ellenére azonban az ön-mikroemulgeáló rendszerek (SMEDDS) és ön-nanoemulgeáló rendszerek (SNEDDS) nevezéktana a szakirodalomban vitatott [63].

A növényi hatóanyagok SM/NEDDS formulációi komoly potenciált rejtenek. Segítségükkel megkerülhetők az olyan terápiás limitáló tényezők, mint a nem megfelelő kémiai stabilitás a hidrolízisre való hajlam miatt [64], a rossz vízdoldhatóság, illetve a rossz felszívódás és disztribúció. A SEDDS formulációk segítségével nem csak a stabilitás, az oldhatóság és a permeabilitás növelhető, de a kioldódási profil javításával a nyújtott hatóanyag-leadás is elérhető, és a gasztrointesztinális rendszer károsodása is könnyebben elkerülhető [65][66]. A technológia meggyőző eredményeket mutat például szilimarinnal [67] és indirubinnal [68] biohasznosulásának növelésében.

2.6. Nyújtott hatóanyag-leadás

A tabletta a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerforma. Alkalmazása könnyű, gyors, kényelmes, és nem igényel szaktértelmet, ami jobb beteg compliance-hez vezet. Nemcsak a legtöbb szilárd, de egyes folyékony hatóanyagok is alkalmasak tabletták előállítására, a megfelelő segédanyagok megválasztásával. A gyógyszerforma lehetővé teszi a farmakonok pontos adagolását, a fizikai és kémiai stabilitás biztosítását, tárolása és szállítása egyszerű, az előállítás gépesítéssel nagy léptékben sem igényel hosszú vagy bonyolult technológiai folyamatot, és a termék alakja, mérete, színe könnyen változtatossá tehető, ami megkönnyíti a megkülönböztetést [69].

A megfelelő technológia megválasztásával a hatóanyag felszabadulása és felszívódása a tablettákból szabályozható, ezen szempontok alapján megkülönböztethetünk konvencionális, illetve módosított hatóanyag-leadású tablettákat, utóbbin belül pedig késleltetett, nyújtott, és szakaszos (pulzatív) hatóanyag-leadású tablettákat. Depókészítményeknek nevezzük a szervezetben raktárt képező, folyamatos hatóanyag-felszabadulást, ennek következtében pedig állandó, egyenletes plazmakoncentrációt biztosító formulációkat [70].

A módosított hatóanyag-leadás előnyei közé tartozik a gyakori gyógyszeresedés elkerülése, ezáltal javul a beteg compliance, és kisebb az esély az adagolás elmulasztására. A farmakon vérszintje kisebb intervallumban ingadozik, könnyebb elkerülni a túladagoláshoz vagy alacsony felezési idejű gyógyszerek esetében aluldozírozáshoz vezető „csúcs-völgy” (peak-valley) hatás (2. ábra). A mellékhatások kockázata is csökkenhet [71].



2. ábra. Különböző módosított hatóanyag-leadású rendszerek kioldódási profiljai.

Nyújtott hatóanyag-leadás kialakítása többféle úton lehetséges: kémiai módszerekkel (pl. sóképzés, észter- vagy éterképzés), fiziológiai módszerekkel (pl. alkalmazás helyének

megválasztása, metabolizmust vagy exkréciót befolyásoló hatóanyagok kombinálása), és technológiai módszerekkel (pl. zárványkomplex kialakítása, bevonóanyag, vázszerkezet) [71].

A nyújtott hatóanyag-leadású készítményekkel a nulladrendű kinetikájú kioldódási profil elérése a cél, melynek során a farmakon plazmakoncentrációja állandó, kioldódás esetében ez állandó felszabadulási sebességet jelent. A megfelelő formulációval lehetőség nyílik a nulladrendűhöz hasonló, nagyon lassú elsőrendű kinetikájú profil elérésére, tehát a hatóanyag plazmakoncentrációja exponenciálisan változik az idő függvényében [71].

Az elmúlt évtizedekben többféle technológia került kifejlesztésre, amellyel elérhető a hatóanyag nyújtott felszabadulása. A többretegű Geomatrix® tabletták, a lyukkal ellátott magon alapuló Procise®, a „gyűrűs fánk” alakú (donut-shaped) tabletták és az ozmotikus minipumpák mind alkalmasak a közel-nulladrendű kinetika elérésére, azonban rendkívül összetett technológiák, és a készítmények gyártása ipari léptékben viszonylag drága [72].

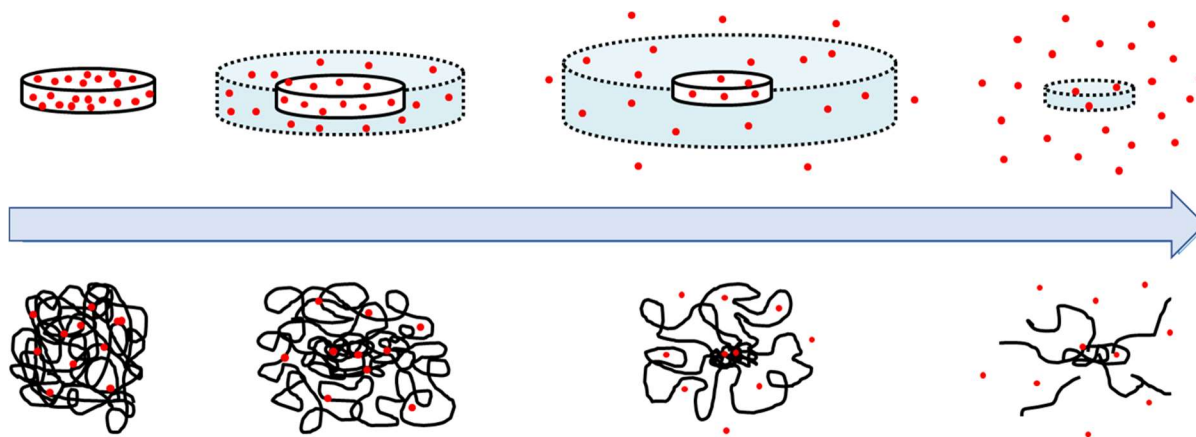
2.7. Mátrix tabletták

A korábban bemutatott, hatóanyag-leadást módosító technológiák mellett fokozott érdeklődés irányul egyéb, nyújtott hatóanyag-leadású rendszerek felé, amennyiben a felhasznált segédanyagok és az előállítás költségei nem túl magasak a konvencionális gyógyszerformákhoz képest. A mátrix tabletták a legnépszerűbb modern gyógyszerleadó rendszerek közé tartoznak, részben azért, mert nem szükséges hozzájuk bonyolult vagy drága gyártási folyamat, és a megfelelő mátrixalkotó polimer kiválasztásával a farmakon felszabadulása könnyen és jól irányítható [73].

A mátrix tabletták hatóanyagot, polimert, és tablettázási segédanyagokat tartalmaznak. Előállíthatók direkt préseléssel, de akár száraz vagy nedves granulálás után is. A kész tabletták bevonhatók valamilyen külső réteggel, ami hozzájárulhat a hatóanyag-felszabadulás helyének megválasztásához, például gyomorsav-rezisztens bevonat esetén, vagy tartalmazhatja a farmakon telítő dózist, ami így a bevétel után gyorsan felszabadul.

Maga a mátrix a farmakon vagy farmakonok, illetve polimer vagy polimerek, például hidrofíl gélképző anyagok kellően homogén elegye. Ezek a típusú polimerek vizes közegben, például a gyomorban vagy a vékonybélben duzzadnak, gél képeznek, miközben térfogatuk megnő. Először a tabletta felszíne, majd idővel a teljes tabletta elgélesedik, amíg a szilárd tablettamag el nem tűnik, és a rendszer egy kocsonyás, erodálódó polimer gyógyszerhordozóvá

válí (3. ábra). A mátrixban a magas hatóanyag koncentráció hatására nő a kémiai potenciál és a termodinamikai aktivitás. A farmakon elsősorban a gélfázis mikropórusain keresztül szabadul fel, diffúzió útján. A gélréteg így szabályozni is képes a felszabadulás sebességét, amely közel lineárisrá válik [74].



3. ábra. Hidrofil mátrixtabletták működési sémája.

A Carbopólok nagy molekulatömegű akrilsav polimerek, divinil-alkohol, illetve polialkenil-éter keresztkötésekkel. A keresztkötött Carbopol polimerek nem oldódnak vízben, de gyorsan hidratált gömbökké duzzadnak, ami magas viszkozitást eredményez hidrófil közegben. Ezen tulajdonságuknak köszönhetően elterjedt a felhasználásuk kozmetikai és háztartási cikkekben [75].

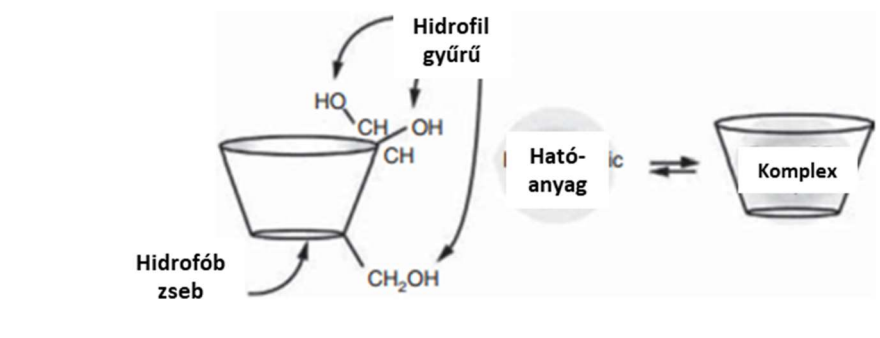
A gyógyszerészetben a Carbopólok elsősorban szintén viszkozitásnövelő segédanyagokként használtak kenőcsökben, krémekben, gélekben, szuszpenziókban és transzdermális gél rezervoárokban, illetve bioadhezív tulajdonságaikat is kihasználhatjuk bukkális, fülészeti, intesztinális, nazális, vaginális és rektális készítményekben. Mivel vizes közegben gél képeznek, alkalmasak hidrófil mátrix tabletták alapját képező polimernek, mind mesterséges gyomornedvben, mind pedig mesterséges bélnedvben megfelelő duzzadási tulajdonságokat mutatnak elnyújtott, közel-nulladrendű kinetikájú hatóanyag-felszabadulás eléréséhez. A gélesedett tablettamátrix nem oldódik és nem is erodálódik, a farmakon a keresztkötések miatt képes a hidrogélben maradni, magas koncentrációja miatt azonban lassan kioldódik, amit a polimer szabályoz. A kioldódás pontos paraméterei a konkrét Carbopol típus duzzadási és hidratációs tulajdonságaitól függenek, amit a molekuláris struktúra határoz meg [76].

2.8. Ciklodextrinek

A zárványkomplexek előnyösebb kémiai vagy biológiai tulajdonságokat képesek mutatni, mint a vendégmolekulák önmagukban. Ez megnyilvánulhat többek között jobb vízoldhatóságban, kioldódásban, vagy biohasznosulásban, vagy megnövelt fizikai-kémiai stabilitásban [77]. A komplexképző ciklodextrinekkel több kutatás is foglalkozott már a Debreceni Egyetem Gyógyszertechológiai Tanszékén, előnyös lehetőséget jelentenek a szilimarín komponenseihez hasonlóan rossz oldhatóságú molekulák oldékonyságnövelésére akár szilárd gyógyszerformák formulálása esetén is.

A ciklodextrinek ciklikus oligoszacharidok, amelyek több lényeges tulajdonságukban is eltérnek lineáris megfelelőiktől. Képesek zárványkomplexet képezni többféle lipofil farmakonnal, ezáltal növelve a vízoldhatóságot és a stabilitást, fokozva a penetrációs készséget, valamint javítva a kioldódási profilt [78]. Emellett nem toxikusak, így népszerű segédanyagok mind a gyógyszer-, mind az élelmiszeriparban [79].

Szerkezet szerint három nagy csoportba soroljuk őket a gyűrűs struktúrát alkotó alfa-D-glükopiranoz egységek száma alapján: alfa- (hat), béta- (hét), és gamma-ciklodextrinek (nyolc egység). A legnagyobb számban a különböző béta-ciklodextrin származékok használata elterjedt. A komplexálódás során (4. ábra) a ciklodextrin gyűrű belső, lipofil „zsebébe” csapdázódik a vendégmolekula, elektrosztatikus kölcsönhatásoknak, van der Waals-erőknek, illetve hidrogénkötéseknek köszönhetően. A komplex külső gyűrűje hidrophil tulajdonságokat mutat. A farmakon-ciklodextrin zárványkomplexek képzésére többféle módszert is leírtak, ezek közül a leggyakoribbak a ko-precipitáció, a duzzasztás, az oldószer-elpárologtatás, a fagyasztva szárítás, és a fizikai keverés [80].

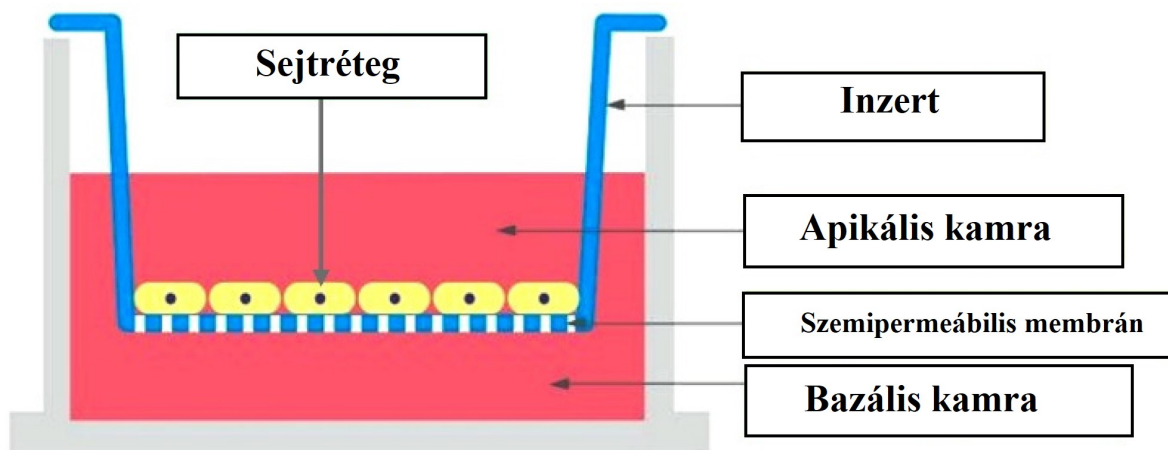


4. ábra. Ciklodextrin zárványkomplex képződése.

2.9. Caco-2 sejtvonal

Mivel az orális gyógyszerbevitel a legnépszerűbb hatóanyagbeviteli út, fokozott az igény olyan sejtkultúrák modellrendszerére, amely monolayer-t alkotva jól leképezik a bélnyálkahártyát, és *in vitro* kísérletek során alkalmasak a felszívódási tulajdonságok vizsgálatára [81].

A Caco-2 sejtvonal humán colon adenokarcinoma eredetű sejtvonal, mely az enterociták számos morfológiai és funkcionális tulajdonságát mutatja. A sejtek extracelluláris mátrix fehérjék és adhéziós molekulák segítségével tapadnak le és alkotnak monolayer-t, tight junction-öket kialakítva a sejtréteg tagjai között. Transzport és efflux fehérjéket is expresszálnak, így paracelluláris és transzcelluláris abszorpciós folyamatok modellezésére is alkalmazhatók. A sejtréteget általában szemipermeábilis membránra szélesztik (5. ábra), amely a vizsgált anyagokat átereszt, így a membránon átjutott farmakon mennyisége mutatja a sejtek által felvett farmakonmennyiséget [82]. A Caco-2 permeabilitási tesztek elterjedtek a vékonybélben történő felszívódás és orálisan adagolt hatóanyagok biohasznosulásának *in vitro* modellezésére, többek között növényi hatóanyagok, például a rosszul oldódó és rosszul felszívódó kurkumin [83] és szilimarín [84] esetén is.



5. ábra. Sejtkultúrák permeabilitási vizsgálat sematikus ábrája.

A Caco-2 sejtkultúrák megfelelőek a SEDDS rendszerek vizsgálatára is, lehetőségessé teszik például a tight junction-ökre kifejtett hatásuk vizsgálatát [85], a biohasznosulás növelésének mérését [86], penetrációfokozó hatásuk összehasonlítását [87] és akár az intesztinális peptid felszívódás tanulmányozását [88]. Emellett a Caco-2 sejtek alkalmas

modellt jelentenek az orálisan adagolt, vékonybélben felszívódó hatóanyagok, gyógyszerformák és gyógyszerhordozó rendszerek biokompatibilitási és citotoxicitási hatásainak vizsgálatára is [89].

3. Célkitűzések

Kutatómunkám során célul tűztem ki növényi hatóanyagok biohasznosulásának javítását modern gyógyszer technológiai formulációk felhasználásával, nagy hangsúlyt fektetve a készítmények megfelelő biokompatibilitására (alacsony citotoxicitására).

A kutatás két fő részre osztható. Az **első részben** inzulinrezisztencia és kettes típusú cukorbetegség prevenciójára és kezelésére alkalmazható görögszénamag kivonatát használtam. A görögszéna farmakológiai hatással rendelkező komponensei között megtalálhatjuk a biofarmáciai osztályozás rendszer több csoportjának képviselőit is. A metabolitok vízdékonysága és permeabilitási sajátságai változóak, emellett vannak köztük instabil vegyületek is.

Célul tűztem ki:

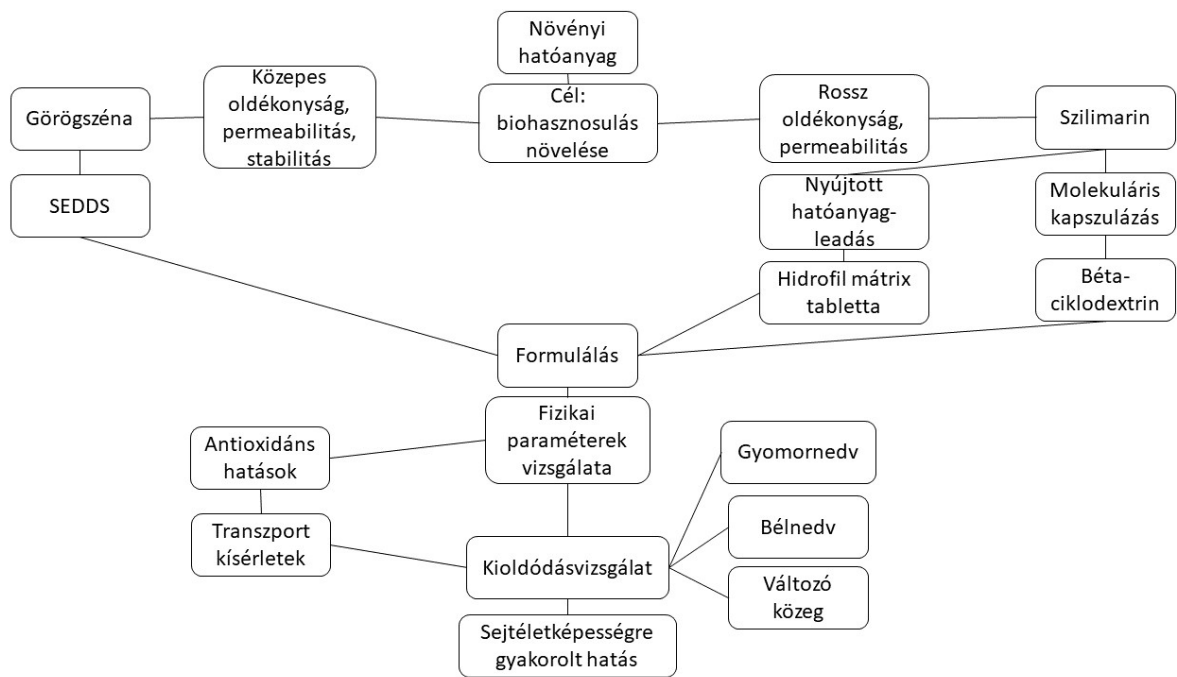
1. standardizált görögszénamag kivonatát tartalmazó önemulgeáló rendszerek formulálását, melyekkel egyaránt lehetségessé válik a növényi metabolitok vízdékonyságának, felszívódásának és stabilitásának fokozása.
2. az általam formulált önemulgeáló rendszerek fizikai paramétereinek vizsgálatát, úgymint a SEDDS típusát megadó részecskeméret meghatározása, valamint a rendszer stabilitását mutató zéta-potenciál mérése.
3. a növényi kivonat és a SEDDS formulációk antioxidáns tulajdonságainak vizsgálatát.
4. transzport kísérletek elvégzését, melyek metabolomikai elemzésével összehasonlíthatóvá válik a növény főbb komponenseinek permeabilitása a natúr kivonat és az önemulgeáló rendszerek esetében.
5. a SEDDS rendszerek sejtleletképessegre gyakorolt hatásának vizsgálatát a transzport kísérletekhez használt sejtréteg integritás monitorozásával, illetve MTT teszt elvégzésével.
6. végül pedig a SEDDS rendszerek kioldódásának indirekt vizsgálatát keményszelatin kapszulákból.

A kutatómunka **második részében** elsősorban májbetegségek kezelésére és megelőzésére használt szilimarin formulációit vizsgáltam, mely rosszul oldódó és rosszul felszívódó hatóanyag.

Célul tűztem ki:

1. szilimarín hatóanyagot tartalmazó hidrófil mátrix tabletták előállítását, különböző típusú Carbopólok felhasználásával.
2. a szilimarín komplexálását különböző béta-ciklodextrin származékokkal, a vízdékonyság növelésének érdekében, és a komplexált szilimarint tartalmazó Carbopól alapú hidrófil mátrix tabletták formulálását.
3. az általam készített tabletták gyógyszerforma vizsgálatainak elvégzését, hogy megbizonyosodhassam a termékek tömegegységességének, kopási veszteségének és törési szilárdságának megfeleléséről az Európai Gyógyszerkönyv követelményeinek.
4. a Carbopólok sejtleletképessegre gyakorolt hatásának vizsgálatát MTT teszt elvégzésével.
5. kioldódásvizsgálatok elvégzését szilimarint és ciklodextrinokkal komplexált szilimarint tartalmazó, Carbopól alapú hidrófil mátrixtablettákból mesterséges bélnedvben, mesterséges gyomornedvben, és a humán gasztrointesztinális rendszer körülményeit jobban modellező változó közegben.
6. a kioldódási vizsgálatok eredményeinek kiértékelését, a legelőnyösebb hatóanyag-felszabadulási tulajdonságokat biztosító formulációk kiválasztását, és összehasonlítását kereskedelmi forgalomban kapható készítménnyel.
7. a legjobb eredményeket mutató összetétel sejtleletképessegre gyakorolt hatásának vizsgálatát MTT teszt elvégzésével.

A kutatómunka célkitűzéseit a **6. ábrán** ábrázoltam.



6. ábra. Kísérleti terv.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Görögszéna kivonat készítése

A görögszéna kivonat a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékén készült. A gyógyszerkönyvi minőségű (Ph. Eur. 10.) görögszénamagot Retsch GM 200 Grin-domix berendezéssel őröltük 10.000 rpm fordulatszámon, 2 percen keresztül. 60,0 g őrlemény kivonása 2400 ml forrásban levő metanollal történt visszafolyó hűtés mellett 60 percen keresztül, majd a kivonatot Whatman szűrőpapíron keresztül szűrtük, majd rotációs vákuumbepárlóval szárítottuk. Így 13,38 g száraz kivonathoz jutottunk. Ezután a száraz kivonatot újra feloldottuk 30,0 ml PBS oldatban, majd sterilre szűrtük 0,22 µm pórusátmérőjű PES membránon. A steril kivonatot 4 °C-on hűtve tároltuk, és 48 órán belül felhasználtuk. A PBS-ben oldott kivonat 7,833 mg/ml trigonellint és 8,258 mg/ml 4-OH-izoleucint tartalmazott.

4.2. SEDDS rendszerek formulálása

A SEDDS rendszerekhez felhasznált izopropil-mirisztát a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől, a Transcutol HP, Labrasol, Kolliphor RH40 és Capryol 90 a Gattefossé-tól (Saint-Priest, Franciaország) került beszerzésre (2. táblázat).

	Összetétel	Főbb felhasználás
Transcutol HP	nagy tisztaságú dietilén-glikol-monoetil-éter	koszolvensként orális formulációkban, oldószer és oldékonyságnövelő
Labrasol	kaprilokaproil-makrogol-8-gliceridek, kaprilokaproil-polioxil-8-gliceridek, polioxil gliceridek	habok kialakítása, szolubilizálószer, o/v emulgens mikroemulziókban
Kolliphor RH40	polioxil ricinusolaj	szolubilizálószer, emulgens
Capryol 90	propilén-glikol-monokaprilát	szolubilizálószer, koemulgens mikroemulziók képzésénél

2. táblázat. SEDDS rendszerekhez felhasznált segédanyagok [90][91][92][93].

A formuláció metodikája a folyékony önemulgeáló rendszerek előállítására általánosan alkalmazott módszernek felelt meg [94]. Az olajos fázist alkotó izopropil-mirisztát, és az emulgensként és koemulgensként használt Transcutol HP, Labrasol, Kolliphor RH40 és Capryol 90 műanyag centrifugacsövekben került összemérésre és keverésre. A folyékony görögszénamag kivonatot és a PBS oldatot ehhez adtam hozzá, majd óvatosan vortexeltem, amíg a keverék látszólag egyneműnek nem tűnt. A SEDDS rendszereket sterilre szűrtem 0,2 µm pórusátmérőjű PES membránon, ez a sejtes kísérletek utáni sejtréteg integritás

utánkövetésének érdekében volt szükséges. A további kísérleteket az elkészülést követően azonnal végrehajtottam.

A korábban elkészített steril kivonat, a SEDDS komponensek és PBS felhasználásával 5 különböző összetételt formuláltam. Az egyes formulációk összetétele a **3. táblázatban** látható.

	TFG	S1	TFG+S1	S2	TFG+S2
Görögszéna kivonat	6 ml	-	6 ml	-	6 ml
PBS	3 ml	6 ml	-	6 ml	-
izopropil-mirisztát	-	1 ml	1 ml	0,25 ml	0,25 ml
Transcutol HP	-	1 ml	1 ml	1,5 ml	1,5 ml
Labrasol	-	1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
Kolliphor RH40	-	-	-	0,5 ml	0,5 ml
Capryol 90	-	-	-	0,25 ml	0,25 ml

3. táblázat. A vizsgált formulációk összetétele.

4.3. Részecskeméret meghatározás

A SEDDS rendszerek részecskeméret meghatározása Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezéssel történt, dinamikus fényszóráson alapuló módszerrel. A dinamikus fényszórás évtizedek óta bevett módszer diszperz rendszerek átlagos részecskeátmérőjének és részecskeméret-eloszlásának vizsgálatához, mert gyors, nem invazív, és alacsony koncentrációban könnyen elvégezhető [95]. A vizsgált összetételek 1 ml mennyiségét 900 ml desztillált vízzel hígítottam. A protokoll szerint a minták 5 percen keresztül ekvilibráálódtak 25 °C-on, majd 5 mérést végeztem el rajtuk. A kiértékelést az eszköz szoftvere végezte, ehhez a polisztrén-latex refraktív indexét és abszorpciós értékét használtam.

4.4. Zéta-potenciál analízis

Az elektrokinetikai potenciál vagy zéta-potenciál a részecske felszínét beburkoló tapadó és az elmozduló folyadékréteg között létrejövő nyírási síkban mérhető, és szorosan kapcsolódik a kolloid stabilitáshoz, illetve a koaguláció sebességéhez. A SEDDS rendszerek zéta-potenciálját Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezéssel mértem [96]. A vizsgált összetételek 1 ml mennyiségét 900 ml desztillált vízzel hígítottam. A protokoll szerint a minták 5 percen keresztül ekvilibráálódtak 25 °C-on, majd 5 mérést végeztem el rajtuk. A kiértékelést az eszköz szoftvere végezte.

4.5. DPPH antioxidáns teszt

A SEDDS rendszerek antioxidáns kapacitását DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) antioxidáns teszt útján határoztam meg, amely egy standard, egyszerű kolorimetriás módszer anyagok szabadgyök semlegesítő képességének mérésére [97]. A kísérlet során 1 mg/ml koncentrációjú aszkorbinsavoldatot használtam pozitív kontrollként. A SEDDS összetételekből és a pozitív kontrollból hígítási sort készítettem, majd az oldatokból 1 ml mintát 2 ml 0,06 mM DPPH reagenssel reagáltattam, melyet a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől szereztünk be. Az antioxidáns hatóanyagokkal reagálva a lila DPPH reagens koncentrációfüggő mértékben sárga színű vegyületté alakul, amely színváltozás abszorbanciáját Shimadzu UV-1900 spektrofotométerrel 517 nm hullámhosszon mértem.

4.6. Caco-2 sejtvonal

A Caco-2 humán adenokarcinóma sejtvonal a European Collection of Cell Cultures-től (ECACC, Public Health England, Salisbury, UK) került beszerzésre. A sejteket műanyag sejtenyésző flaskákban tartottam fent, sejtenyésző médiumban („Dulbecco’s modified eagle’s medium”, 3,7 g/l NaHCO₃-tal, 10% hő-inaktivált szarvasmarha embrió szérummal, 1% nem esszenciális aminosavakkal, 1% L-glutaminnal, 100 IU/ml penicillinnel, és 100 IU/ml sztreptomocinnel), 5% CO₂-tartalmú, magas páratartalmú atmoszférában, 37 °C-on. A sejteket hetente passzáltam UV lámpával csíramentesített, lamináris áramlású bokszaiban, aszeptikus körülmények között, steril eszközöket és anyagokat felhasználva, izopropanollal fertőtlenített felületeken. A használt médiumot eltávolítottam, a sejteket PBS oldattal mostam, hogy a médium és az elhalt sejtek maradványait eltávolítsam. Ezután tripszin-EDTA oldatot (0,05% (m/v) tripszin és 0,02% (m/v) EDTA) adtam a sejtekhez, hogy felváljanak a flaska aljától, 6

percig inkubáltam őket, majd médiumot adtam hozzá, semlegesítve az emésztőenzimet. 6 percnyi 1100 rpm fordulatszámon történő centrifugálás után eltávolítottam a felülúszót, a leülepített sejteket 10 ml friss médiummal reszuszpendáltam, majd sejtszámot vizsgáltam mikroszkóp alatt, Bürker-kamrás módszerrel. A szuszpenzióból annyit pipettáztam az új flaskába, hogy 1 millió sejtet tartalmazzon, majd friss médiummal 10 ml-re egészítettem ki a folyadék mennyiségét. A kísérletekhez felhasznált sejtek passzázsszáma 20 és 40 között volt.

4.7. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns teszt

A szuperoxid-dizmutáz enzimnek három típusa létezik, ezek a citoplazmában, a mitokondriumban, illetve az extracelluláris térben találhatók meg. Az enzim az oxigén-metabolizmus során keletkező szuperoxid szabadgyökök lebontását katalizálja, így rendkívül fontos antioxidáns védelmi mechanizmusnak képezi részét szinte minden élő sejtben, amely oxigénnek van kitéve [98]. A SOD teszt elvégzéséhez a Caco-2 sejteket 12 lyukú plate-re szélesztettem, lyukanként 100.000 sejtszámmal. A sejtek hat napon át nőttek magas CO₂ tartalmú atmoszférában, 37 °C hőmérsékletű inkubátorban. A kísérlet előtt a médiumot eltávolítottam a sejtekről, és minden vizsgálandó összetétel 100x hígítású mintájából 1 ml-t adtam hozzájuk, ezután egyórás inkubáció következett 37 °C-on. A teszt során pozitív kontrollként 1 mg/ml koncentrációjú aszkorbinsav-oldatot használtam, 100x hígításban, negatív kontrollként pedig PBS oldatot. A kezelés és az inkubációs idő letelte után a sejteket mechanikusan, gumipálca segítségével választottam el a plate aljától, 10 percen keresztül centrifugáltam (4 °C, 1000x g), majd a sejtsapadékot 20 mM HEPES pufferben (1 mM EGTA, 210 mM mannitol, és 70 mM szukróz/g szövet) homogenizáltam és centrifugáltam 15 percig (10.000x g, 4 °C). A felülúszó SOD enzimaktivitásának vizsgálatát a Cayman Chemicals (Cat. 706002, Cayman, Ann Arbor, MI, USA) antioxidáns assay kit segítségével végeztem, a gyártó által megadott protokollt követve. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztem.

4.8. Permeabilitási vizsgálatok

A Caco-2 humán colon epithel sejtek sejtréteget alkotva tight junction-t képesek kialakítani egymás között, ezáltal felhasználhatók az anyagok paracelluláris felszívódásának modellezésére a sejtrétegen keresztül. Emellett transzport és efflux fehérjék expresszálása által többféle transzcelluláris felvételi utat is képesek modellezni [99].

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

A transzport kísérletek kivitelezéséhez az inzerteket új 24 lyukú plate-be helyeztem. Indításkor a vizsgálandó összetétel 400 μl mennyiségét az inzert apikális kamrájába pipettáztam. A bazális kamrába 1000 μl PBS került, melyből azonnal, a 0. időpillanatban 50 μl mintát vettem, majd később a vizsgálat 15., 30., 60., 120., és 240. percében is. A bazális kamrából vett mintákat PBS oldattal pótoltam. A kísérlet ideje alatt a sejteket inkubátorban tartottam (37 °C, 35 rpm kevertetés).

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

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

4.9. A sejtréteg integritásának utánkövetése a permeabilitási vizsgálatok végeztével

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

4.10. MTT citotoxicitási vizsgálat

A Caco-2 sejtek életképességét a mintákkal történő kezelés után MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) citotoxicitási teszt segítségével vizsgáltam.

Az MTT egy sárga színű molekula, amelyet az élő, aktív metabolizmussal rendelkező sejtek felvéve mitokondriális enzimeik által lila színű formazánná alakítanak át. Az intracelluláris formazán képződése kolorimetriásan mérhető [101]. A kísérlethez a sejteket 96 lyukú plate-re szélesztettem lyukankénti 10.000 sejttszámmal, és 7 napon keresztül növesztettem őket párásított, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, 37°C-on. A citotoxicitási tesztek előtt a sejttenyésztő médiumot eltávolítottam a sejtekről, majd mostam őket. A mintaoldatokkal egy 30 percig tartó inkubációs időtartamon át kezeltem a sejteket, majd eltávolítottam róluk. Ezután újabb 3 óra inkubáció következett sejttenyésztő médiumban, amelyhez 0,5 mg/ml MTT oldatot adtam (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). A sejtek mitokondriális enzimeit által átalakított lila formazán kristályokat 25:1 arányú izopropanol:sósav oldattal oldottam fel a plate aljáról, az oldatok abszorbanciáját pedig FLUOstar OPTIMA Microplate Reader berendezéssel mértem 570 nm hullámhosszon, 690 nm háttér mellett. A sejttúlélést a negatív kontrollként PBS-el kezelt sejtekhez viszonyított százalékos arányban fejeztem ki.

Az első esetben a sejtek életképességét a TFG, TFG+S1 és TFG+S2 összetételekkel történő kezelés után vizsgáltam. Negatív kontrollként PBS oldatot, pozitív kontrollként Triton X-100 kezelést alkalmaztam. A vizsgálandó összetételekből hígítási sorozatot készítettem a formuláció 100, 200, 300, 400, 500, és 1000-szeres hígításával, ezek mintáit adtam a sejtekhez az MTT teszt során.

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

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

4.11. Antioxidáns hatású anyagok módosított kioldódási vizsgálata kapszulából

A TFG+S1 és TFG+S2 összetételekkel módosított kioldódási vizsgálatot végeztem, amely módszer kidolgozásához a Li és mtsai [102], illetve Kalantari és mtsai [64] által leírt kísérleteket vettem alapul. 1 ml mennyiséget töltöttem az összetételekből kemény zselatin és HPMC kapszulatokba (Capsugel, Inc., Morristown, NJ, USA). 3 kapszulát 100 ml desztillált vízbe helyeztem szobahőmérsékleten, és 120 rpm fordulatszámmal kevertettem. 1 ml mintát

vettem a zselatinkapszula esetében a vizsgálat 10., 20. és 30. percében, a HPMC kapszula esetében pedig a 15., 30., 45., 60. percében.

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

4.12. Szilimarín

A szilimarint, melynek fő hatóanyagkomponensei a szilibin A és B, izoszilibin A és B, szilikrisztin A és B, illetve szilidianin, a *Silybum marianum* növény magjaiból a Kahol és mtársai által leírt módszer szerint állították elő [103] a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén. A máriatövis magokat hűtötték és porították, az őrleményt zsírtalanították. A kivonás acetonitrillel történt, az így nyert szilimarint vákuumban koncentrálták be, majd szűrték és szárították, ezután pedig tovább tisztították acetonitrillel, amit újabb szűrés és szárítás követett. A szilimarinpor nem tartalmazott oldószermaradványokat. A HPLC-MS analitika a standardoknak megfelelő bioaktív flavonolignánokat határozott meg.

4.13. Tablettapréseles

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

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

A négyféle polimert tartalmazó tablettákon túl a Carbopolokat és a négyféle komplexképzőt kombinálva összesen 20 különböző szilimarín hatóanyagú hidrofíl mátrixtablettát formuláltam (**4. táblázat**).

	HPBCD	Heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin	metilált β -ciklodextrin	random metil- β -ciklodextrin
Carbopol 71G	F1	F2	F3	F4
Noveon	F5	F6	F7	F8
Carbopol 974 PNF	F9	F10	F11	F12
Carbopol 971P	F13	F14	F15	F16

4. táblázat. Polimerek és komplexképzők kombinációi.

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

Minden formuláció 70 mg szilimarint tartalmazott hatóanyagként. A szilimarín-ciklodextrin komplexeket tartalmazó tabletták esetében a komplexek fizikai keverékként készültek, amely egy egyszerű, külön segédanyagok felhasználása nélkül is megvalósítható komplexálási módszer, és a korábbi vizsgálatok alapján megfelelő a biohasznosulás növeléséhez, emellett az így készült komplexek stabilitási állandóját 722 K^{-1} értékként írták le [104]. A hatóanyag és a ciklodextrin-származék 1:1 molarányban került összemérésre, és mozsárban homogenizáltam őket. 150 mg Carbopolt használtunk minden tablettához. Tablettázási segédanyagként 15 mg Mg-sztearát, 5 mg talkum, 10 mg dibázikus kalcium-foszfát és az 500 mg tablettá végtömeghez szükséges mennyiségű Ludipress került felhasználásra tablettánként (**5. és 6. táblázat**). A segédanyagok biztosították a glidáns, lubrikáns, antiadhezív és kötő hatást. A tabletták komponenseit dörzsmozsárba mértem össze, homogenizáltam, majd kézi tablettázógéppel préseltem őket, 50 N préserővel.

Szilimarín	70 mg
Carbopol	150 mg
Mg-sztearát	15 mg
Talkum	5 mg
Dibázikus kalcium-foszfát	10 mg
Ludipress	250 mg

5. táblázat. Szilimarint tartalmazó mátrix tabletták összetétele.

Szilimarín	70 mg
Béta-ciklodextrin származék	189 mg
Carbopol	150 mg
Mg-sztearát	15 mg
Talkum	5 mg
Dibázikus kalcium-foszfát	10 mg
Ludipress	61 mg

6. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó mátrix tabletták összetétele.

4.14. Gyógyszerforma vizsgálatok (Ph. Eur. 9.)

4.14.1. Tömegegységesség

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

4.14.2. Kopási veszteség

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

4.14.3. Törési szilárdság

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

4.15. Mátrix tabletták kioldódási vizsgálatai

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

Az **első esetben** a szilimarín kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofíli mátrix tablettákból mesterséges bélnedvben. A mesterséges bélnedv literenként 6,8 g KH_2PO_4 -ot tartalmazott, a pH-t pedig 0,1 M NaOH oldattal állítottam be 6,8-re, az Európai Gyógyszerkönyv 9. kiadásának megfelelően. A vegyszereket a Hungaropharma Zrt.-től szereztük be. A közeg hőmérséklete $37 \pm 0,5$ °C volt a vizsgálat teljes időtartama alatt, és 100 rpm fordulatszámmal folyamatosan kevertettem. Minden tabletta 900 ml kioldóközegbe került, mind a 4 különböző formuláció esetében 4 párhuzamos mérést végeztem. A vizsgálat időtartama 780 perc volt, ezalatt 16 alkalommal 4 ml mennyiségű mintát vettem a kioldóközezből, melyet azonnal pótoltam.

A **második esetben** a szilimarín kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofíli mátrix tablettákból mesterséges gyomornedvben. A mesterséges gyomornedv összetétele literenként 2,0 g NaCl és 80,0 ml 1 M sósav volt, 1,2 pH értékkel, az Európai Gyógyszerkönyv 9. kiadásának megfelelően. A vegyszereket a Hungaropharma Zrt.-től szereztük be. A közeg hőmérséklete $37 \pm 0,5$ °C volt a vizsgálat teljes időtartama alatt, és 100 rpm fordulatszámmal folyamatosan kevertettem. Minden tabletta 900 ml kioldóközegbe került, mind a 4 különböző formuláció esetében 4 párhuzamos mérést végeztem. A vizsgálat időtartama 780 perc volt, ezalatt 16 alkalommal 4 ml mennyiségű mintát vettem a kioldóközezből, melyet azonnal pótoltam.

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

A **negyedik esetben** a különböző ciklodextrin származékokkal komplexált szilimarín kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofíli mátrix tablettákból változó közegben. Ehhez a berendezés forgókosaras módszerét használtam. A vizsgálat első órájában a tabletták mesterséges gyomornedvbe kerültek, ebből 15 percenként 4 ml mintát vettünk. Ezután a

közeget mesterséges bélnedvre cseréltük, és további 6 óráig végeztük a vizsgálatot, minden 30 percben 4 ml mintavétellel.

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

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

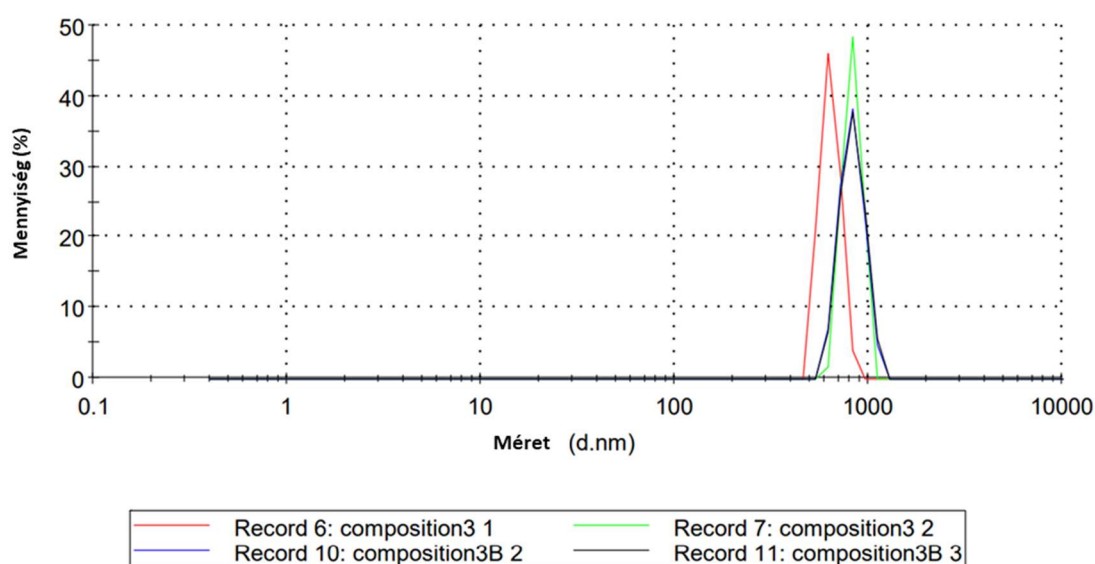
4.16. Statisztikai kiértékelés

Az adatokat Microsoft Excel 2013 szoftver segítségével kezeltem és ábrázoltam átlagként $\pm$ S.D., statisztikai kiértékeléséhez GraphPad Prism szoftvert használtam (9-es verzió; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A csoportok összehasonlítását kétirányú ANOVA-t követő Tukey teszttel végeztem el, a különbséget akkor tekintettem szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$.

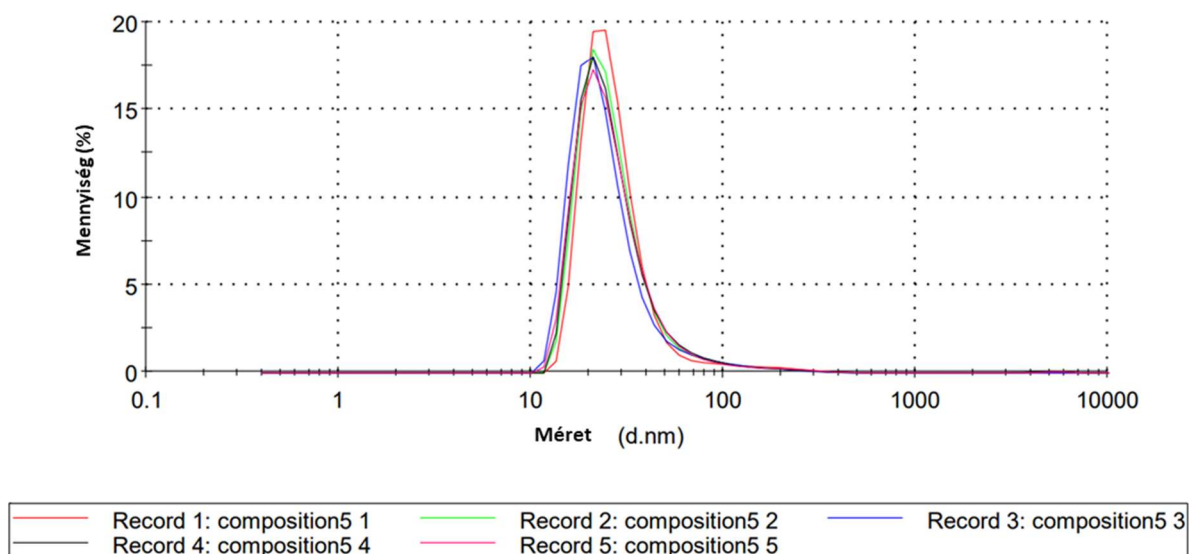
5. Eredmények

5.1. SEDDS rendszerek részecskeméret-meghatározása

A Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezéssel végzett, dinamikus fényszóráson alapuló részecskeméret-meghatározáshoz a polisztrén részecskékre jellemző 1.59 refraktív indexet és 0,010 abszorpciós értéket használtam, így kaptam meg a TFG+S1 (7. ábra) és TFG+S2 (8. ábra) összetételek részecskeméret-eloszlását. A TFG+S1 összetétel átlagos részecskeátmérője 829 nm, míg a TFG+S2 összetételé 65,5 nm volt. A vizsgálat eredményei alapján a TFG+S1 formuláció ön-mikroemulgeáló rendszernek tekinthető (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS), míg a TFG+S2 ön-nanoemulgeáló rendszernek (self-nanoemulsifying drug delivery system, SNEDDS). Megjegyzendő azonban, hogy az önemulgeáló rendszerek nomenklatúrája nem egységes a szakirodalomban, ezért ezek a kategóriák vitathatóak.



7. ábra. TFG+S1 önemulgeáló rendszer részecskeméret-eloszlási grafikonja.



8. ábra. TFG+S2 önemulgeáló rendszer részecskeméret-eloszlási grafikonja.

5.2. SEDDS rendszerek zéta-potenciál analízise

A Malvern Zetasizer Nano ZSP berendezés segítségével meghatározott zéta-potenciál a TFG+S1 összetétel esetében -71,3 mV volt, a TFG+S2 összetétel esetében pedig -38,5 mV (7. táblázat). A zéta-potenciál nagysága mV mennyiségben megadva a vizsgált rendszer stabilitását mutatja meg, 0-5 mV közötti érték gyors koagulációt vagy flokkulációt jelez, 10-30 mV között instabilitást, 30-40 mV közötti érték közepes stabilitást, 40-60 mV közötti érték jó, 61 mV feletti érték pedig kiváló stabilitást [105]. A zéta-potenciál analízis alapján a TFG+S1 összetétel stabilitása kiváló, TFG+S2 összetételé pedig közepesnek tekinthető.

Formuláció	Zéta-potenciál	Szórás
TFG+S1	-71,3 mV	11,8 mV
TFG+S2	-38,5 mV	7,47 mV

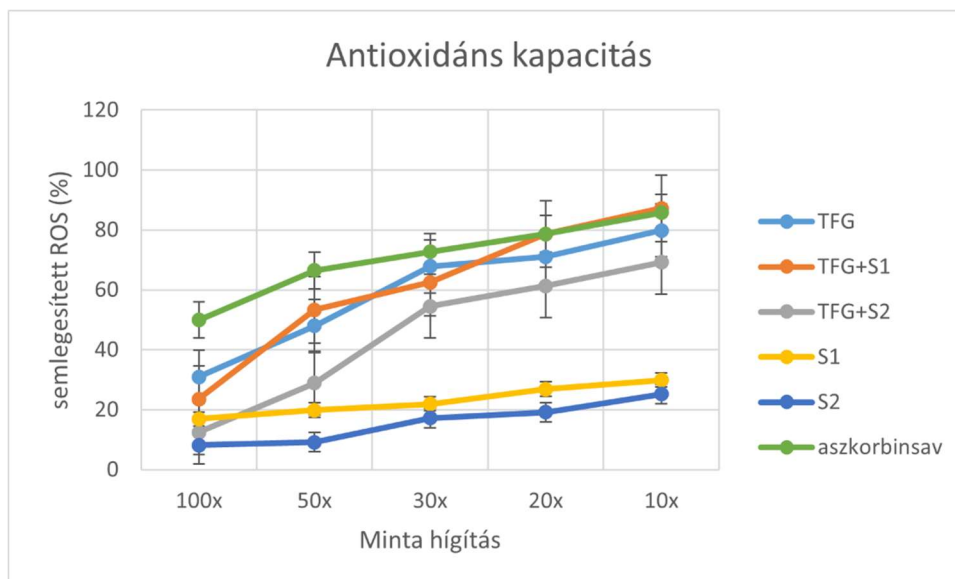
7. táblázat. SEDDS formulációk zéta-potenciálja.

5.3. DPPH antioxidáns teszt

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

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

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

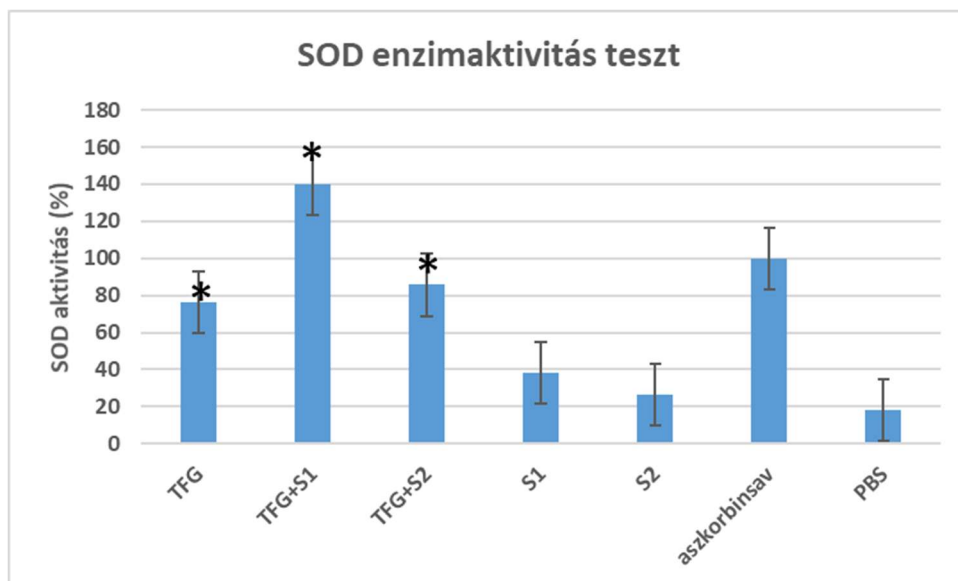


9. ábra. DPPH teszttel mért antioxidáns kapacitás.

A különböző koncentrációjú minták által semlegesített oxidatív szabadgyökök százalékos arányát a **9. ábrán** ábrázoltam. A grafikonon látható, hogy a TFG, TFG+S1 és TFG+S2, tehát a görögszénamag kivonatot tartalmazó összetételek antioxidáns kapacitása alacsonyabb koncentrációban elmarad a pozitív kontrollként használt aszkorbinsav oldatétól, magasabb koncentrációban azonban megközelíti, vagy a TFG+S1 formuláció esetében akár el is éri azt. Az S1 és S2 összetételek, melyek csak a SEDDS rendszerek segédanyagait tartalmazzák, növényi kivonatot nem, koncentrációtól függetlenül elhanyagolható antioxidáns hatással bírnak.

5.4. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns teszt

Az *in vitro* SOD enzimaktivitási tesztet Caco-2 sejteken végeztem el. A pozitív kontrollként aszkorbinsavval kezelt sejtek SOD aktivitását 100%-nak vettem, és az ehhez viszonyított enzimaktivitás értékét a **10. ábrán** ábrázoltam.

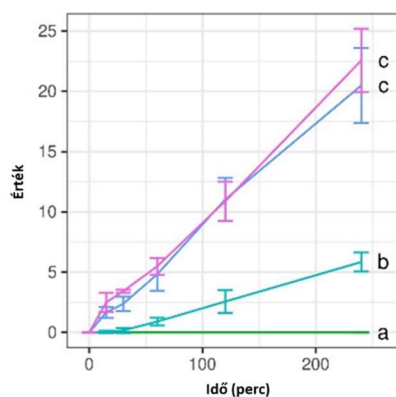


10. ábra. SOD enzimaktivitás teszt eredménye.

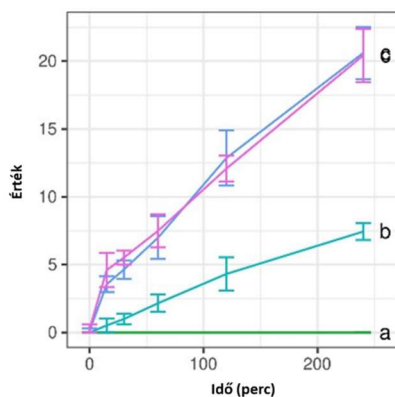
A grafikonon látható, hogy a TFG+S1 és TFG+S2 összetételekkel kezelt sejtek SOD aktivitása magasabb értéket mutatott, mint az egyszerű görögszénamag kivonat TFG-vel kezelt sejtek esetében tapasztalt érték. Erre lehetséges magyarázat, hogy a penetrációfokozó segédanyagoknak köszönhetően a sejtek nagyobb mennyiségben vették fel a növényi kivonat antioxidáns komponenseit, így azok jobban befolyásolták az enzimaktivitást. Az enzimaktivitáson alapuló sejtes antioxidáns teszt a korábban leírt, DPPH reagensen alapuló kémcsőkísérlethez képest a mindkét esetben pozitív kontrollként használt aszkorbinsavnál nagyobb antioxidáns kapacitást mutatott a TFG+S1 formuláció vonatkozásában. Az S1 és S2 összetételek, melyek csak a SEDDS segédanyagokat tartalmazták, szintén mutattak némi antioxidáns hatást, amely valamivel magasabb volt, mint a negatív kontrollként használt PBS oldat esetében tapasztalt, de nem tekinthető számottevőnek.

5.5. Görögszéna komponensek permeabilitási vizsgálata

A transzport kísérletekhez felhasznált inzerteken kialakult sejtrétegek TEER értékei 800 és 1000 Ωcm^2 között voltak. A permeabilitási teszt során vett mintákból kimutatott komponensek koncentrációja alapján grafikonon ábrázoltam a felszívódott görögszéna komponensek mennyiségét az idő függvényében (**11-13. ábra**). A Növénytani Tanszéken végzett komplex metabolomikai vizsgálat során összesen 13 vegyületet sikerült kimutatni a transzport mintákból.



4-OH-isoleucin

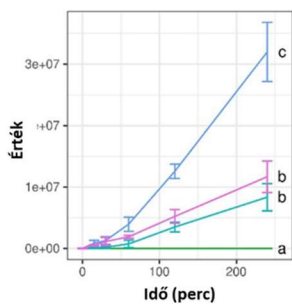


Trigonellin

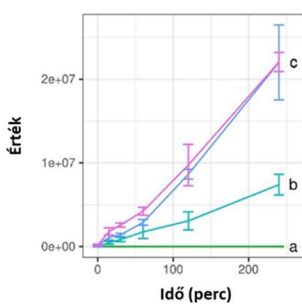
Tmt

— PBS	— S2	— TFG+S1
— S1	— TFG	— TFG+S2

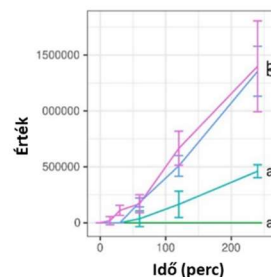
11. ábra. A fő görögszéna komponensek: 4-OH-isoleucin és trigonellin permeabilitási görbéi.



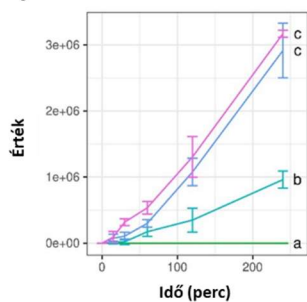
Szteroid szaponin 1



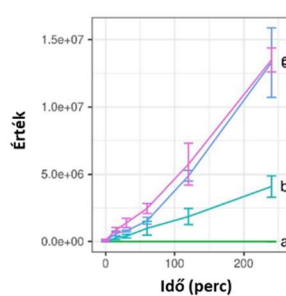
Szteroid szaponin 2



Szteroid szaponin 3

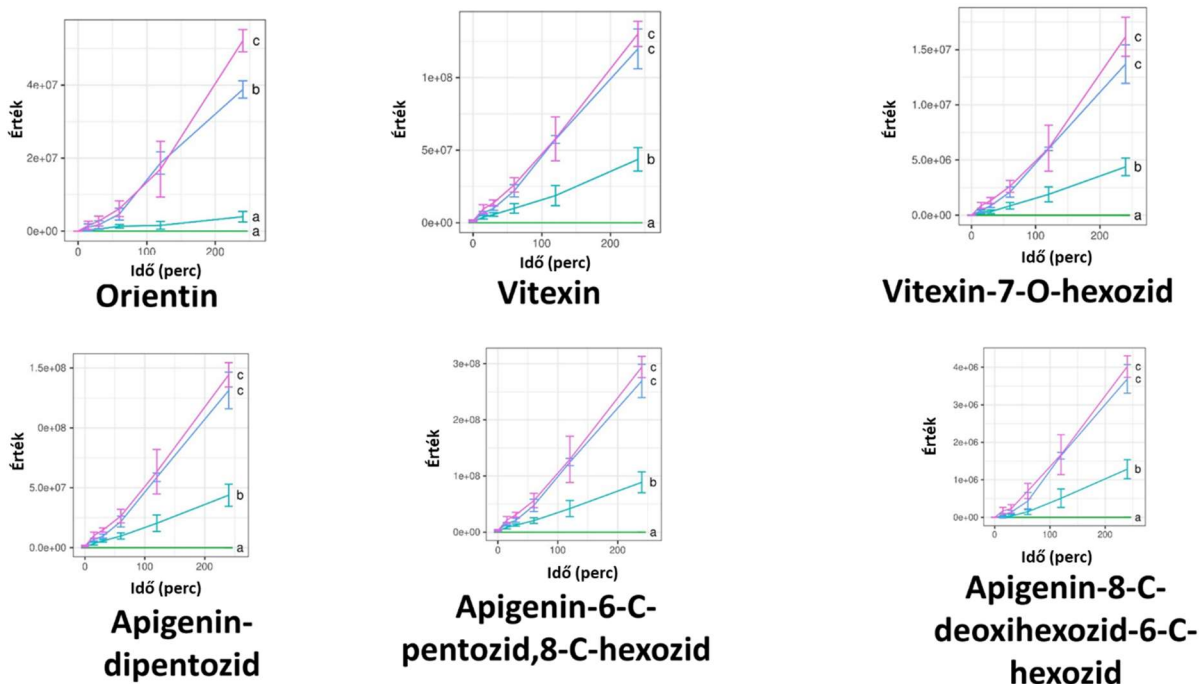


Szteroid szaponin 4



Szteroid szaponin 5

12. ábra. A görögszénamag kivonatból kimutatott 5 különböző szteroid szaponin permeabilitási görbéi. A színek megegyeznek a 11. ábrával.



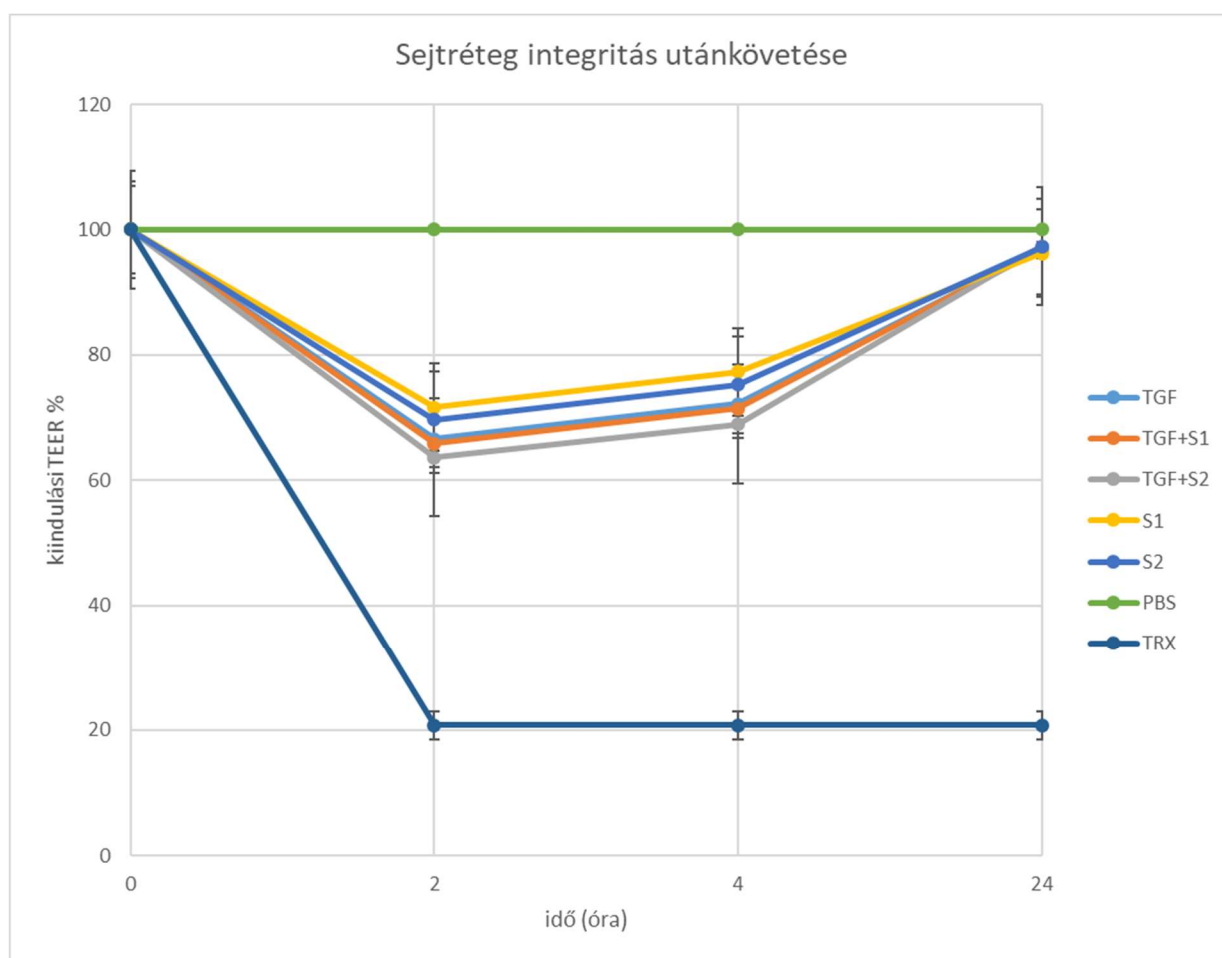
13. ábra. A görögszénamag kivonatból kimutatott 6 különböző flavonoid permeabilitási görbéi. A színek kódok megegyeznek a 11. ábrával.

Az S1, S2 és a negatív kontrollként használt PBS esetében a várakozásnak megfelelően nem tudtuk felszívódott komponensek nyomát kimutatni, a görbék minden esetben végig egymással és a grafikon x tengelyével átfedésben futnak. A TFG+S1 és TFG+S2 összetételek esetében minden vegyületre vonatkoztatva jelentősen nagyobb mennyiségű növényi komponens jutott át a membránon a kísérlet során, mint az egyszerű görögszénamag kivonatot tartalmazó TFG összetételből. Ez alátámasztotta az elméletet az önemulgeáló rendszerek penetrációfokozó hatásáról. Az alapvetően alacsonyabb vízdékonyságú vagy permeabilitású komponenseken túl a SEDDS formulációk a vízdékonny, jól felszívódó vegyületek penetrációját is fokozták, ami ezekben az esetekben is megnövekedett biohasznosuláshoz vezethet. A permeabilitási görbék Tukey HSD post-hoc teszttel kerültek összehasonlításra, a különböző betűkkel jelölt görbék szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$). A statisztikai analízis is alátámasztja, hogy míg egyes vegyületek esetében a TFG minta felszívódása nem mutat szignifikáns különbséget a negatív kontroll permeabilitási görbéjéhez képest, a TFG+S1 és TFG+S2 a TFG-től és a negatív kontrolltól is minden esetben szignifikánsan eltérő görbét eredményezett. Egymástól azonban a legtöbb esetben nem különböztek szignifikánsan, a transzport kísérlet kiértékelése után nem lehet egyértelműen

kijelenteni, hogy bármelyik formuláció jobb penetrációfokozó tulajdonsággal rendelkezne a másiknál.

5.6. A sejtréteg integritása

A sejtréteg integritását a TEER értékek monitorozásával ellenőriztem, az adott időpontokban mért TEER értékeket rögzítettem, és a transzport kísérlet megkezdése előtti TEER értéket 100%-nak véve, ennek arányában ábrázoltam (**14. ábra**).



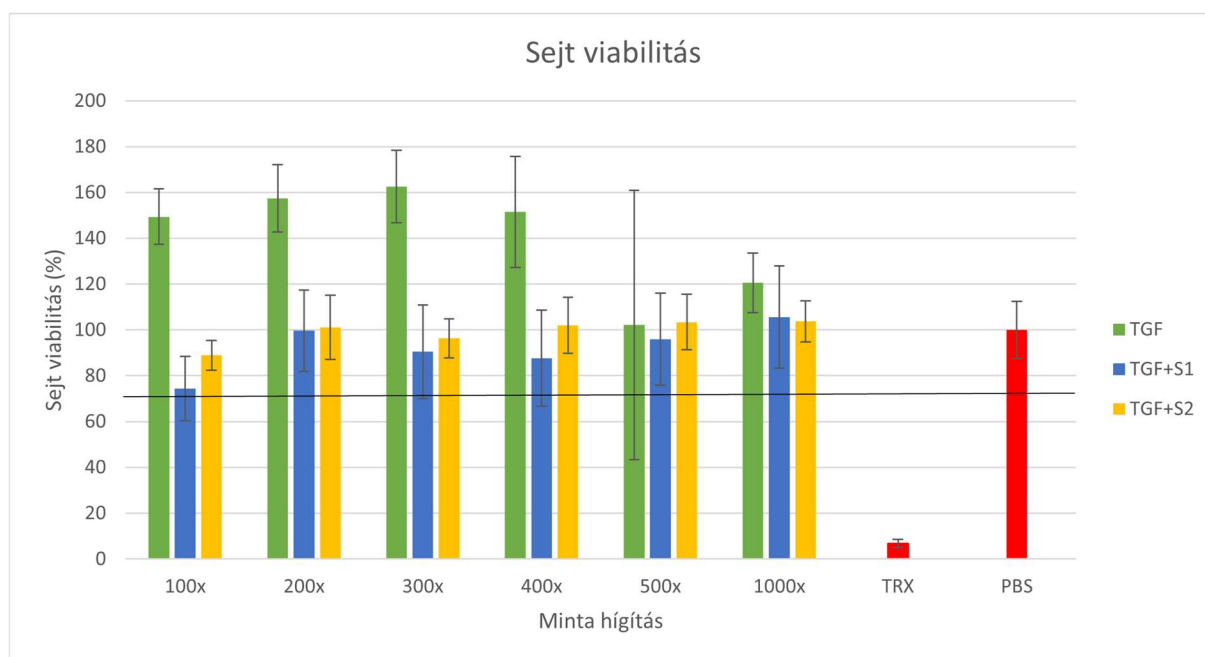
14. ábra. Sejtréteg TEER változásának követése.

A transzport vizsgálatok végeztével a kezdeti TEER értékek csökkentek, a vizsgálat befejeztével azonban, friss sejtenyészítő médium hozzáadása után ismét nőni kezdtek, és 24 órával a vizsgálat végpontja után visszaálltak a kiindulási értékek 90%-a feletti értékre. A

vizsgált mintákkal való kezelés hatására a tight junction-ok valamelyest lazultak, később azonban lassan regenerálódtak, és az értékek helyreállása a sejtek túlélését mutatja a formulációkkal történő kezelés után. A pozitív kontrollként alkalmazott Triton-X hatására a sejtréteg TEER értékének csökkenése nagyobb és permanens volt, a sejtek nem éltek túl a kezelést.

5.7. MTT citotoxicitási vizsgálat

Az MTT teszt elvégzése után a túlélő sejtek százalékos arányát a mintaoldatok koncentrációjának függvényében ábrázoltam (**15. ábra**). A negatív kontrollként használt PBS oldattal történő kezelés utáni sejt viabilitást tekintettem 100%-nak.



15. ábra. Sejt viabilitás görögszénamag kivonatot tartalmazó formulációkkal való kezelés után.

A pozitív kontrollként használt Triton-X kezelés 6,7% sejt viabilitást eredményezett. Az MTT tesztek eredményei alapján a görögszéna kivonatot és a SEDDS komponenseket is jól tolerálták a sejtek, a viabilitási értékek minden esetben 74% felett voltak. A 70% feletti sejttúlélési arány alapján kijelenthető egy anyagról, hogy nem toxikus, az ISO 10993-5:2009(E) standard orvosi eszközök és *in vitro* citotoxicitási tesztek biológiai értékelésére vonatkozó

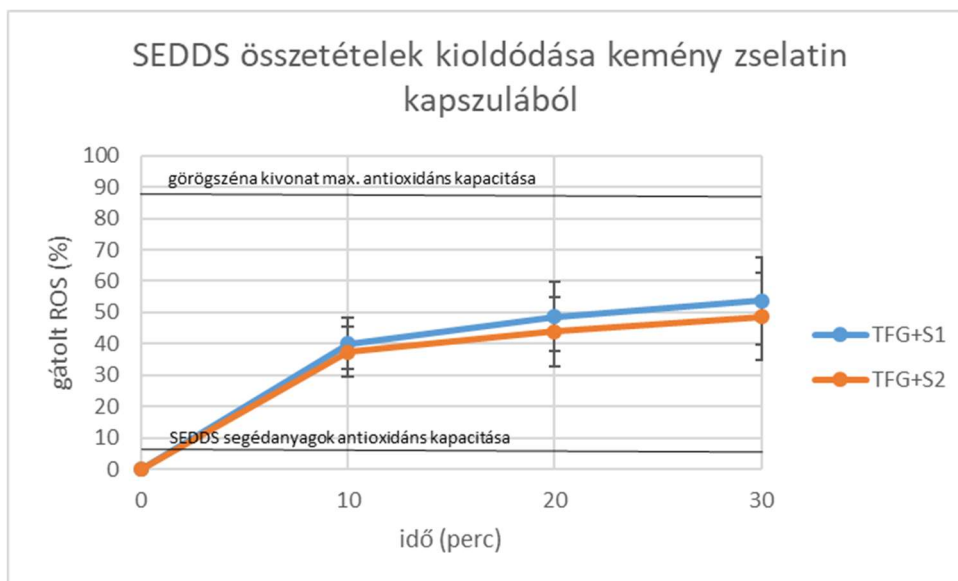
irányelvei alapján [106]. A TFG minta esetében 100% feletti viabilitási értékeket is tapasztaltam, ami valószínűleg a növényi kivonat magas antioxidáns tartalmával magyarázható, mely felerősíti az MTT redukcióját. A natúr görögszéna kivonat mutatta a legmagasabb sejttúlélési arány, míg a különböző SEDDS összetételek citotoxicitási értékei között nem volt szignifikáns különbség. A sejtleletkéesség és a mintakonzentráció között nem találtam összefüggést. Minden sejt viabilitási érték 6 párhuzamos mérés átlagát mutatja. A különböző minták átlagai minden koncentrációban egyirányú ANOVA tesztet követő Tukey tesztel kerültek összehasonlításra egymással, amely nem mutatott szignifikáns eltérést a különböző formulációk esetén tapasztalt sejtleletkéességi értékek között ($p < 0,05$).

5.8. Indirekt kioldódási vizsgálat

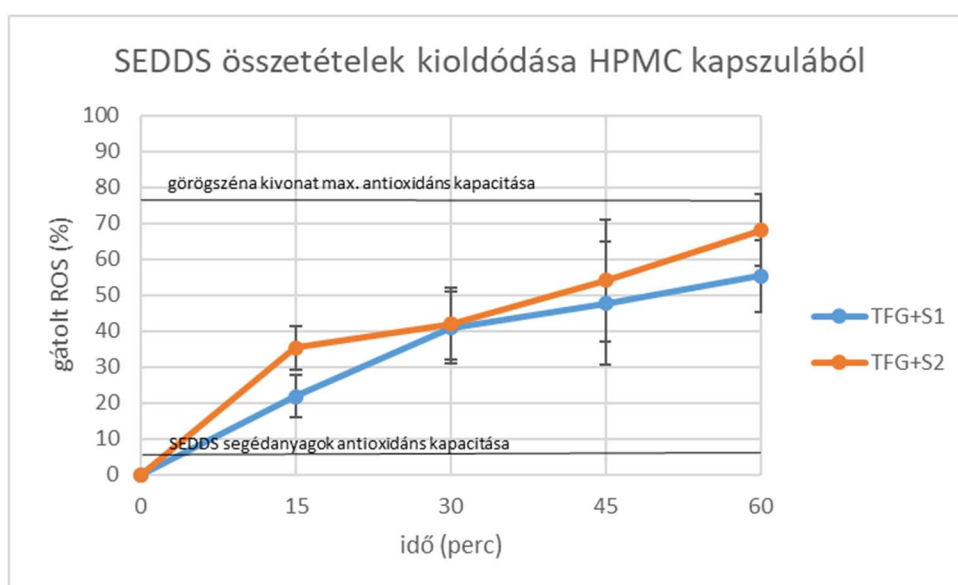
Az indirekt kioldódási vizsgálat során a megadott időpontokban mintát vettem a kioldóközegből. A mintákat DPPH reagenssel reagáltattam, majd lemértem az abszorbanciájukat. Így grafikonon tudtam ábrázolni a minták oxidatív szabadgyököket semlegesítő képességét, amit az alábbi egyenlettel számoltam ki:

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

ahol A_0 a 0,06 mM koncentrációjú DPPH reagens abszorbanciája, A_s pedig a DPPH-val reagált minta abszorbanciája. A kioldóközeg szabadgyököket semlegesítő képessége egyenesen arányos a kapszulákból kioldódott antioxidáns növényi komponensek koncentrációjával. Pozitív kontrollként lemértem 100 ml desztillált vízzel hígított görögszéna kivonat antioxidáns kapacitását, valamint a SEDDS segédanyagok teljes antioxidáns kapacitását 100 ml desztillált vízzel hígítva, mint negatív kontrollt. A keményszelatin kapszulák 30 perc után kezdtek el szétesni (**16. ábra**), míg a HPMC kapszulákból 60 perc elteltével is volt hatóanyag-felszabadulás (**17. ábra**).



16. ábra. SEDDS összetételek kioldódása keményzselatin kapszulákból.



17. ábra. SEDDS összetételek kioldódása HPMC kapszulákból.

Minden adatpont 5 párhuzamos mérés átlagát mutatja szórással. A görbék alapján elmondható, hogy a kioldódás egyenletes és elnyújtott volt mindkét kapszulatok esetében. A különböző összetételek kioldódási értékeinek átlagai minden időpontban Kolmogorov-Smirnov teszttel kerültek összehasonlításra, amely nem mutatott szignifikáns különbséget a kioldódási profilokban ($p < 0,05$).

5.9. Gyógyszerforma vizsgálatok

5.9.1. Tömegegységesség

A tömegegységesség vizsgálata alapján az átlagtömegtől való maximális eltérés minden esetben a 9. Európai Gyógyszerkönyv által megengedett maximális 5% alatt volt. A legnagyobb eltérést a Carbopol 71G mátrixalkotót tartalmazó tabletták esetében kaptam, a ciklodextrinnel nem komplexált összetételnél. A legkisebb eltérést a Carbopol 974 PNF tartalmú tabletták mutatták, itt 0,5% alatt volt az átlagtömegtől való eltérés. A **8. táblázat** 20 tabletta átlagos tömegét mutatja, és az attól való maximális eltérést szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták esetén. A **9. táblázat** 20 tabletta átlagos tömegét mutatja, és az attól való maximális eltérést ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták esetén. A kombinációk számozása a **4. táblázat** szerint történt.

	71G	Noveon	971 PNF	974 PNF
átlagos tömeg (mg)	504.8	497.9	496.1	494.8
maximális eltérés (mg)	±17.5	±4.9	±8.6	±2.5

8. táblázat. Szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták átlagos tömege, és az attól való maximális eltérés.

	F1.	F2.	F3.	F4.	F5.	F6.	F7.	F8.
átlagos tömeg (mg)	498.1	499.8	497.2	499.3	504.8	494.7	497.4	495.7
maximális eltérés (mg)	±7.3	±8.9	±6.4	±7.8	±8.2	±5.6	±5.8	±9.4
	F9.	F10.	F11.	F12.	F13.	F14.	F15.	F16.
átlagos tömeg (mg)	494.7	497.9	497.8	497.3	503.7	500.7	495.4	496.1
maximális eltérés (mg)	±2.4	±9.3	±4.9	±6.4	±2.5	±7.4	±5.9	±4.5

9. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták átlagos tömege, és az attól való maximális eltérés.

5.9.2. Kopási veszteség

A kopási veszteség minden tabletaösszetétel esetében a 9. Európai Gyógyszerkönyv által megengedett maximális 1%-nál alacsonyabb volt. A legnagyobb kopási veszteséget a Carbopol 71G polimert tartalmazó tabletták esetében tapasztaltam, a másik három mátrixalkotóból képzett tabletták esetében nem volt számottevő különbség a kopási veszteség értékei között. A **10. táblázatban** 20 tablettának a kopási veszteséget vizsgáló berendezés 100 fordulata előtti, illetve utáni tömege közötti különbség van feltüntetve a kopási veszteséget vizsgáló berendezés 100 fordulata előtt, illetve után, szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták esetén. A **11. táblázatban** 20 tablettának a kopási veszteséget vizsgáló berendezés 100 fordulata előtti, illetve utáni tömege közötti különbség van feltüntetve a kopási veszteséget vizsgáló berendezés 100 fordulata előtt, illetve után, ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták esetén. A kombinációk számozása a **4. táblázat** szerint történt.

	71G	Noveon	971 PNF	974 PNF	
kopási veszteség	49.2	26.2	27.2	24.0	mg
	0.54	0.29	0.27	0.26	%

10. táblázat. Szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták kopási vesztesége.

	F1.	F2.	F3.	F4.	F5.	F6.	F7.	F8.	
kopási veszteség	43.8	45.9	53.9	43.8	28.3	28.7	22.9	30.7	mg
	0.44	0.46	0.5	0.44	0.28	0.32	0.23	0.31	%
	F9.	F10.	F11.	F12.	F13.	F14.	F15.	F16.	
kopási veszteség	27.7	20.9	34.8	34.8	30.2	46.1	38.6	33.7	mg
	0.25	0.21	0.35	0.35	0.3	0.46	0.39	0.34	%

11. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofíl mátrix tabletták kopási vesztesége.

5.9.3. Törési szilárdság

A törési szilárdság vizsgálata alapján a tabletták megfelelően lettek préselve, a széttörésükhöz a konvencionális tablettákhoz képest nagyobb erőhatás szükséges. Mivel a mátrixtablettáknek nem kell szétesniük a gasztorintesztinális rendszerben, ez a felhasználás szempontjából előnyös. A Carbopol 71G polimert tartalmazó tabletták bizonyultak a legkevésbé ellenállónak, míg a másik három mátrixalkotót tartalmazó tabletta törési szilárdságában nem mutatkozott jelentős különbség. A **12. táblázat** a 10 tabletta eltöréséhez szükséges erők átlagát mutatja, Newtonban kifejezve, szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták esetén. A **13. táblázat** a 10 tabletta eltöréséhez szükséges erők átlagát mutatja, Newtonban kifejezve, ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták esetén. A kombinációk számozása a **4. táblázat** szerint történt.

	71G	Noveon	971 PNF	974 PNF
átlagos törési szilárdság (N)	327	493	493	492

12. táblázat. Szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták törési szilárdsága.

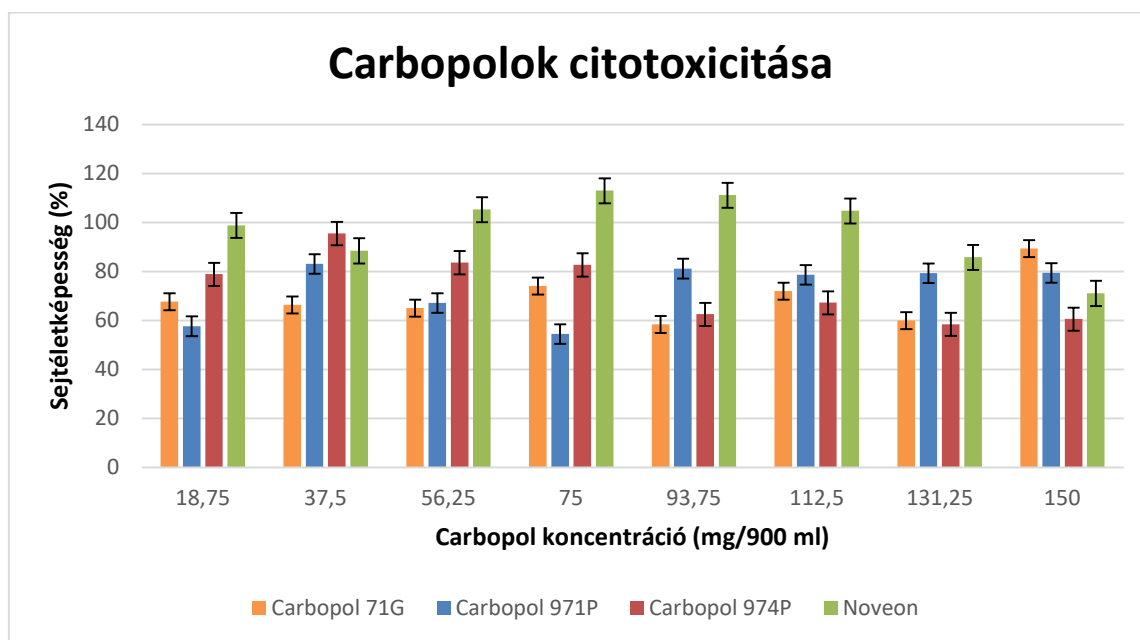
	F1.	F2.	F3.	F4.	F5.	F6.	F7.	F8.
átlagos törési szilárdság (N)	310	342	337	316	484	488	495	473
	F9.	F10.	F11.	F12.	F13.	F14.	F15.	F16.
átlagos törési szilárdság (N)	487	480	476	486	508	487	510	489

13. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták törési szilárdsága.

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

5.10. Carbopolok citotoxicitása

A tabletták formulálásához felhasznált négy Carbopol citotoxicitását MTT teszt segítségével vizsgáltam Caco-2 sejtvonalon. A vizsgálat eredményei alapján nem tudtam összefüggést kimutatni a sejtleletkéesség és a kezelés mintáinak Carbopol koncentrációja között. A legmagasabb vizsgált koncentráció 150 mg Carbopol volt, 900 ml vízben oldva, ami egy mátrixtablettának megfelelő mennyiség. A legmagasabb sejtleletkéességet a Noveon esetében tapasztaltam. A **18. ábrán** láthatók az MTT teszt eredményei, a túlélő sejtek százalékos arányát ábrázoltam a Carbopol koncentráció függvényében. A negatív kontrollként használt, PBS-el kezelt sejtek túlélését vettem 100%-nak. Minden adatpont 5 párhuzamos mérés átlagát mutatja, szórással.



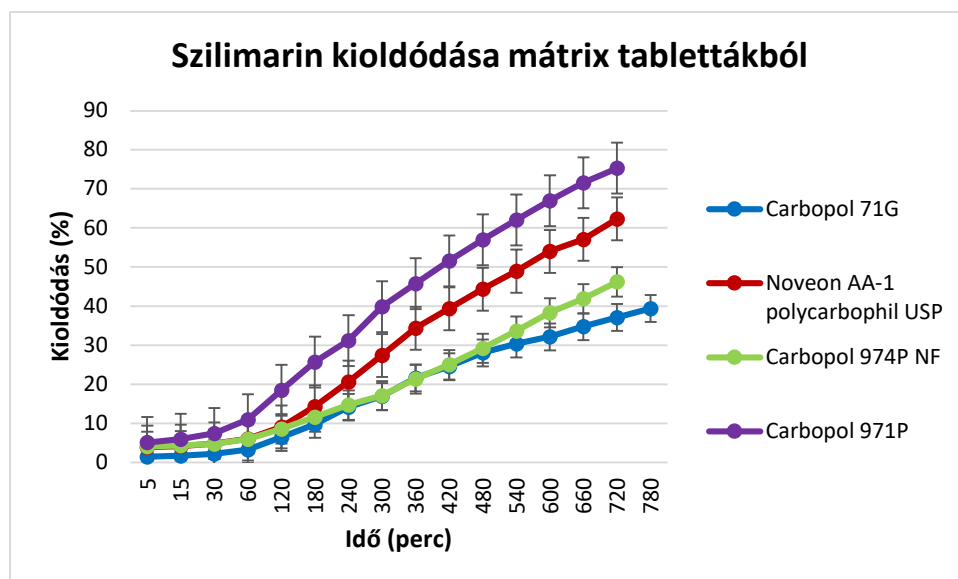
18. ábra. Carbopolok citotoxicitása.

5.11. Szilimarín kioldódása mátrixtablettákból

A kioldódási vizsgálatok első sorozatában a szilimarín kioldódását vizsgáltam a Carbopol-alapú mátrixtablettákból. A **19. ábrán** az adott időpontban levett minta szilimarintartalmát ábrázoltam a referenciaoldat százalékában. Minden adatpont négy párhuzamos mérés átlagát mutatja, szórással. A kioldódási görbék alapján kijelenthető, hogy mind a négy Carbopol elnyújtott, egyenletes hatóanyag-leadást biztosított. Eltérések tapasztalhatók azonban a felszabadult hatóanyag teljes mennyiségében. A Carbopol 971P és Noveon polimerek biztosították a legmagasabb szilimarín felszabadulást a mátrixból 780 perc

elteltével. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 60. percében mutatkozott a Carbopol 971P és a Carbopol 71G között. A vizsgálat 780. percében mind a négy kioldódási görbe szignifikánsan különbözött egymástól.

A vizsgálat igazolta, hogy a Carbopolok megfelelő alapot jelentenek nyújtott hatóanyag-leadású hidrofíli mátrixtabletták formulálásához.

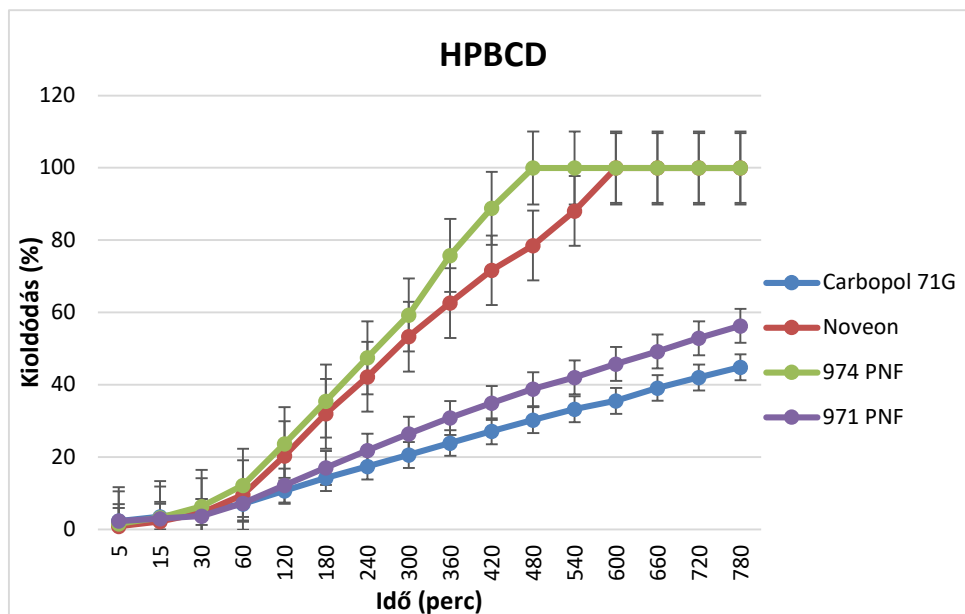


19. ábra. Szilimarin kioldódása különböző polimereket tartalmazó mátrix tablettákból.

5.12. Ciklodextrinekkal komplexált szilimarin kioldódása mátrix tablettákból

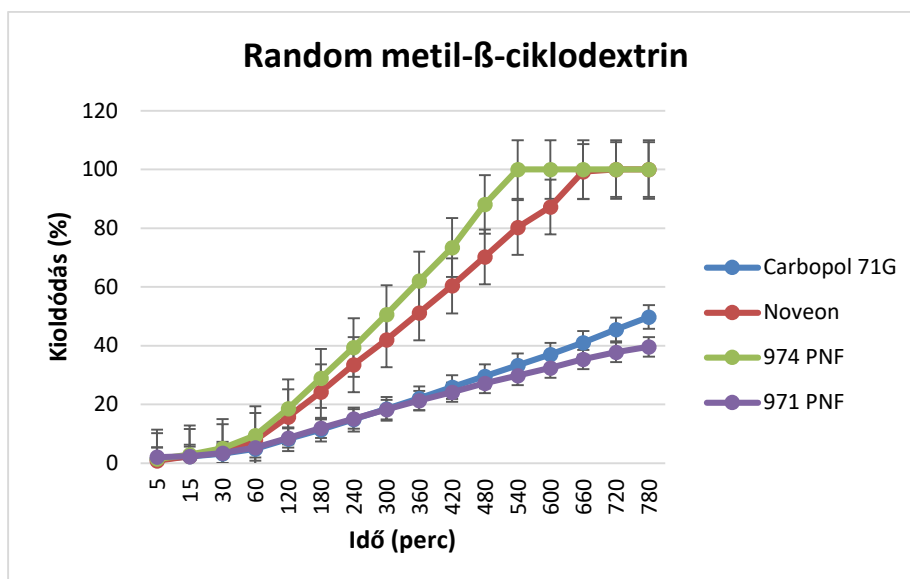
A kioldódási vizsgálatok második sorozatában a hatóanyag felszabadulását vizsgáltam abban az esetben, ha a hidrofíli mátrix technológiát a ciklodextrinekkal történő molekuláris kapszulázással kombináljuk. A 4 különböző Carbopolból és a négyféle β -ciklodextrin származékból összesen 16 különböző összetételű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

A HPBCD-vel komplexált szilimarin kioldódása a **20. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga, szórással. A kioldódott hatóanyag mennyisége a legmagasabb a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében volt, elérte a referenciaoldathoz viszonyított 100%-os kioldódást. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 60. percében volt, a 974 PNF és 71G között. A vizsgálat 240. percében minden kioldódási görbe szignifikánsan különbözött egymástól.



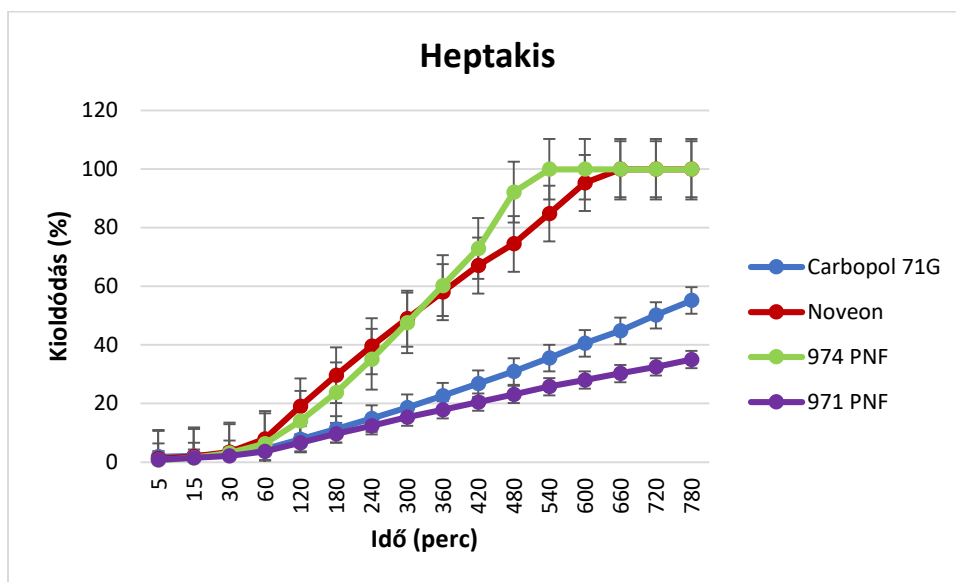
20. ábra. HPBCD-vel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból.

A random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból a **21. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga szórással. A legtöbb hatóanyag a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében szabadult fel, ezekben az esetekben a referenciaoldathoz képest 100%-os kioldódást tapasztaltam. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 120. percében tapasztalható a Carbopol 974 PNF és 71G, illetve a 974 PNF and 971P között. A Noveon és Carbopol 974 PNF kioldódási görbék nem különböztek egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.



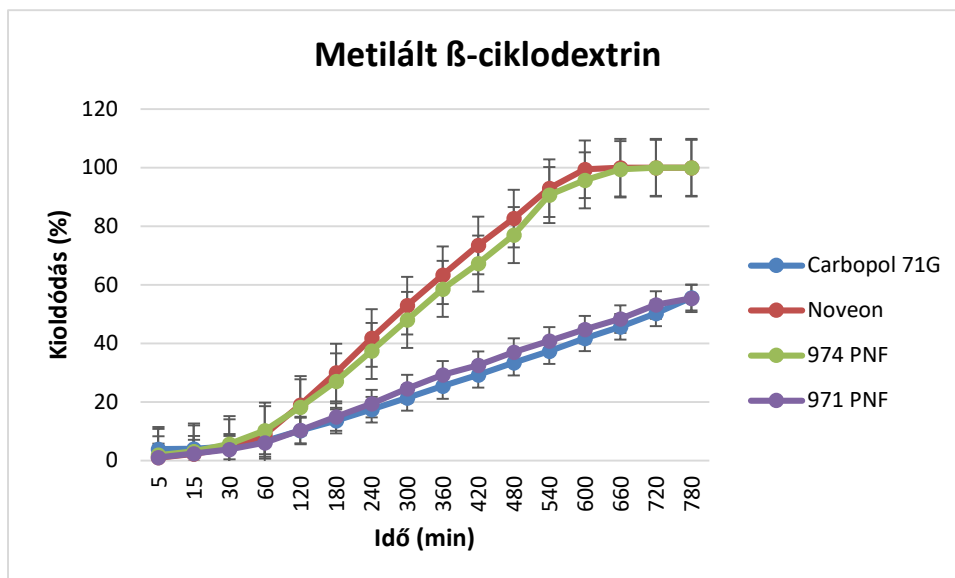
21. ábra. Random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból.

A Heptakis ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból a **22. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga, szórással. A kioldódott hatóanyag mennyisége a legmagasabb a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében volt, elérte a referenciaoldathoz viszonyított 100%-os kioldódást. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 60. percében volt, a 971P és a Noveon között. A vizsgálat 480. percében minden kioldódási görbe szignifikánsan különbözött egymástól.



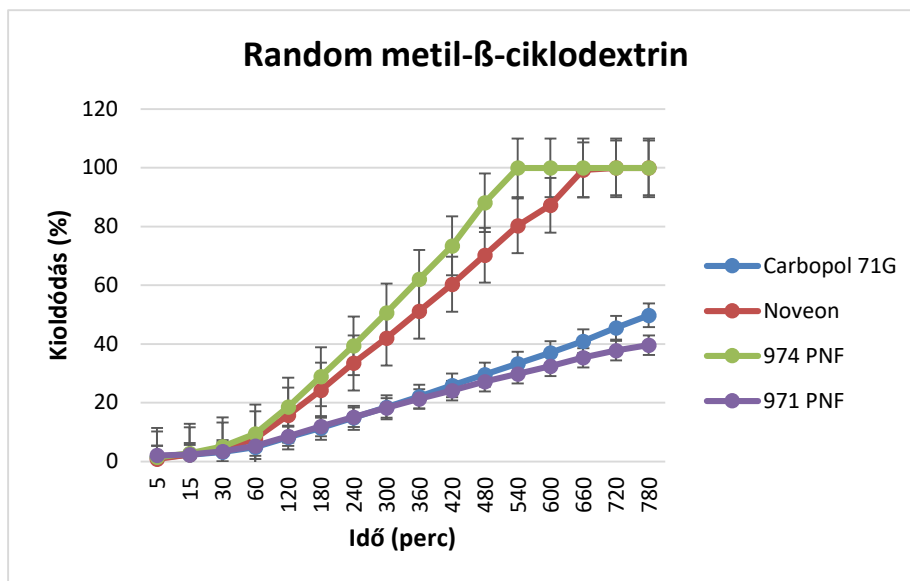
22. ábra. Heptakis ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból.

A metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból a **23. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga, szórással. A kioldódott hatóanyag mennyisége a legmagasabb a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében volt, ezekben az esetekben a referenciaoldathoz képest 100%-os kioldódást tapasztaltam. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 180. percében volt, a 71G és a Noveon között. A Noveon és a 974 PNF, illetve a 71G és 971P kioldódási görbéi között nem volt szignifikáns különbség a vizsgálat végéig.



23. ábra. Metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarín kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból.

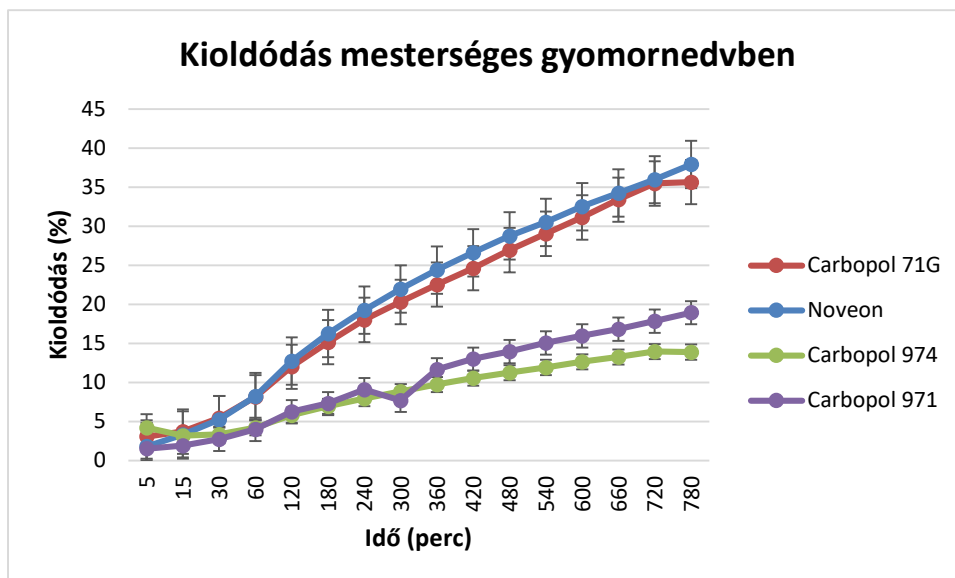
A random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarín kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból a **24. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga szórással. A legtöbb hatóanyag a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében szabadult fel, ezekben az esetekben a referenciaoldathoz képest 100%-os kioldódást tapasztaltam. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 120. percében tapasztalható a Carbopol 974 PNF és 71G, illetve a 974 PNF and 971P között. A Noveon és Carbopol 974 PNF kioldódási görbék nem különböztek egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.



24. ábra. Random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból.

5.13. Szilimarinnel kioldódása mesterséges gyomornedvben

A kioldódási vizsgálatok harmadik sorozatában a szilimarinnel kioldódását vizsgáltam Carbopol alapú hidrofíll mátrix tablettákból mesterséges gyomornedvben, melynek pH-ja 1,2. A hatóanyagot HPBCD-vel komplexáltam. Itt minden Carbopol esetben elnyújtott és egyenletes kioldódást tapasztaltam, de a folyamat sokkal lassabb volt, mint a mesterséges bélnedv esetében. A 780 perces vizsgálat végére a tablettákból kioldódott szilimarinnel mennyisége 14% és 37% közé esett. A kioldódási görbék a **25. ábrán** láthatók. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga, szórással. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 5. percében volt, a 974 PNF és a Noveon között. A Noveon és 71G kioldódási görbéi között nem volt szignifikáns különbség a vizsgálat végéig.

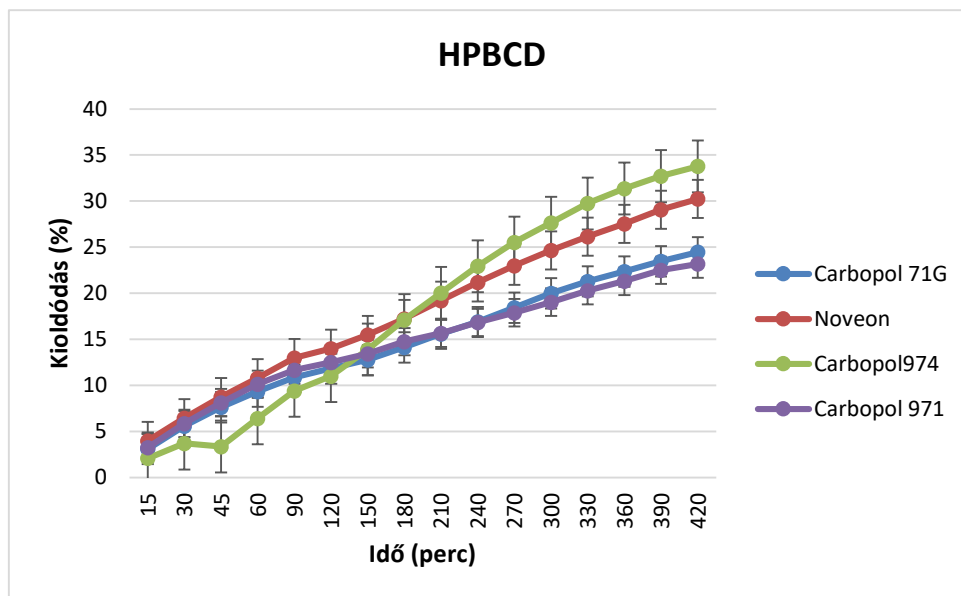


25. ábra. HPBCD-vel komplexált szilimarinnak különböző polimerekkel tartalmazó mátrix tablettákból mesterséges gyomornedvben.

5.14. Szilimarinnak kioldódása változó közegben

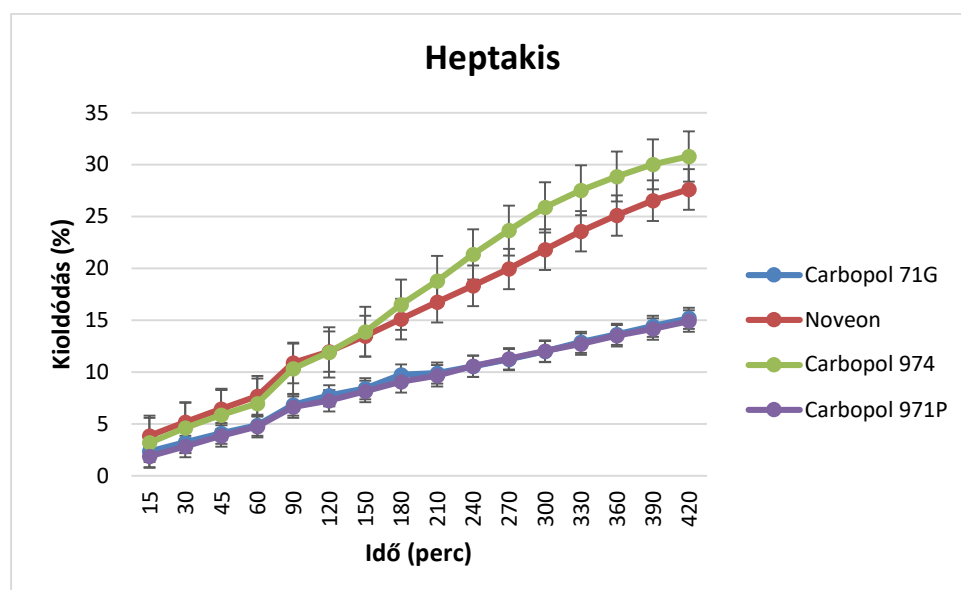
A kioldódási vizsgálatok negyedik sorozatában az első órában a kioldóközeg mesterséges gyomornedv volt, amit ezután lecseréltem mesterséges bélnedvre, és további 6 órán át folytattam a kísérletet. A cél a Carbopol mátrixokból történő kioldódás vizsgálata volt a humán gasztrointesztinális rendszert leginkább modellező pH-jú környezetben. Mind a 16 Carbopol-ciklodextrin kombinációt megvizsgáltam. Ebben az esetben a kioldódott szilimarinnak mennyisége kevesebb volt a korábban mesterséges bélnedvben elvégzett kísérletekhez képest, részben a vizsgálat rövidebb ideje miatt, részben az első óra savas közege miatt, amely befolyásolja a polimerek gélképzését. A kioldódási görbék összehasonlításával kiválaszthatóak a legjobb hatóanyag-felszabadulást biztosító Carbopol-ciklodextrin kombinációk.

A HPBCD-vel komplexált szilimarinnak kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból változó közegben a **26. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga. A legtöbb hatóanyag a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében szabadult fel, de mind a négy Carbopolból alacsony volt a felszabadulás, 24-34% közé esett a referenciaoldathoz viszonyítva. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 30. percében található a Carbopol 71G és a 974 PNF között. A 971P és a 71G nem különbözött egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.



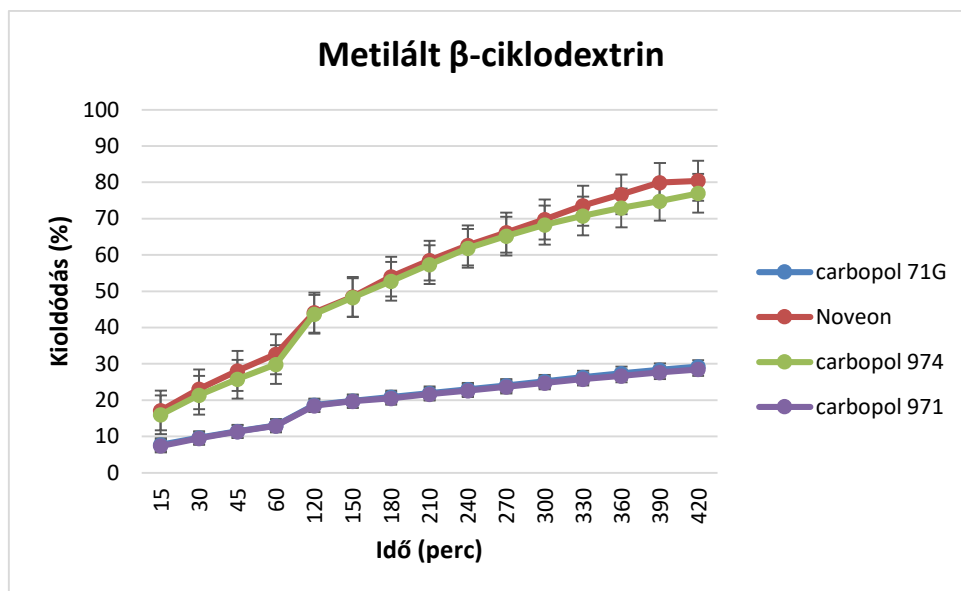
26. ábra. HPBCD-vel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben.

A Heptakis ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból változó közegben a **27. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga. A legtöbb hatóanyag a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében szabadult fel, de mind a négy Carbopolból alacsony volt a felszabadulás 15-31% közé esett a referenciaoldathoz viszonyítva. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 15. percében található a Carbopol 71G és a Noveon között. A 971P és a 71G nem különbözött egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.



27. ábra. Heptakis ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben.

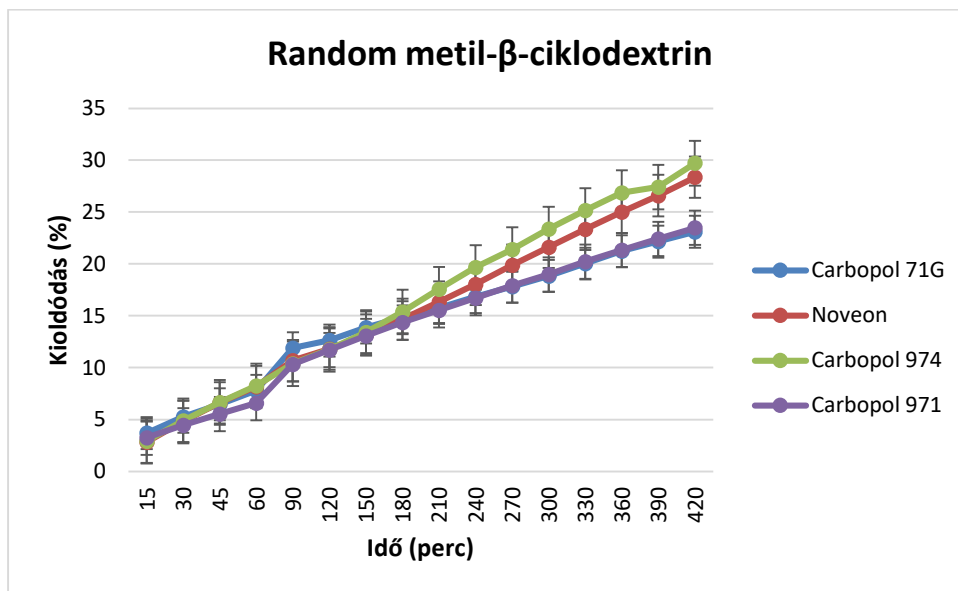
A metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból változó közegben a **28. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga. A legtöbb hatóanyag a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében szabadult fel, ezekben az esetekben meghaladta a referenciaoldathoz viszonyított 75%-ot. A másik két Carbopolból csak kis mennyiségű szilimarinnel szabadult fel, 30%-nál alacsonyabb mennyiség a referenciaoldat viszonylatában. A Carbopol 974 PNF és a Noveon szignifikánsan különbözött a 71G-től és a 971P-től a vizsgálat kezdetétől, egymástól viszont a vizsgálat végéig nem.



28. ábra. Metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben.

A random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból változó közegben a **29. ábrán** látható. Minden adatpont négy párhuzamos vizsgálat átlaga. A legtöbb hatóanyag a Carbopol 974 PNF és a Noveon esetében szabadult fel, de mind a négy Carbopolból alacsony volt a felszabadulás, nem érte el a referenciaoldathoz viszonyított 30%-ot. Az első szignifikáns különbség a vizsgálat 15.

percében található a Carbopol 71G és a 974 PNF között. A 971P és a 71G nem különbözött egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.



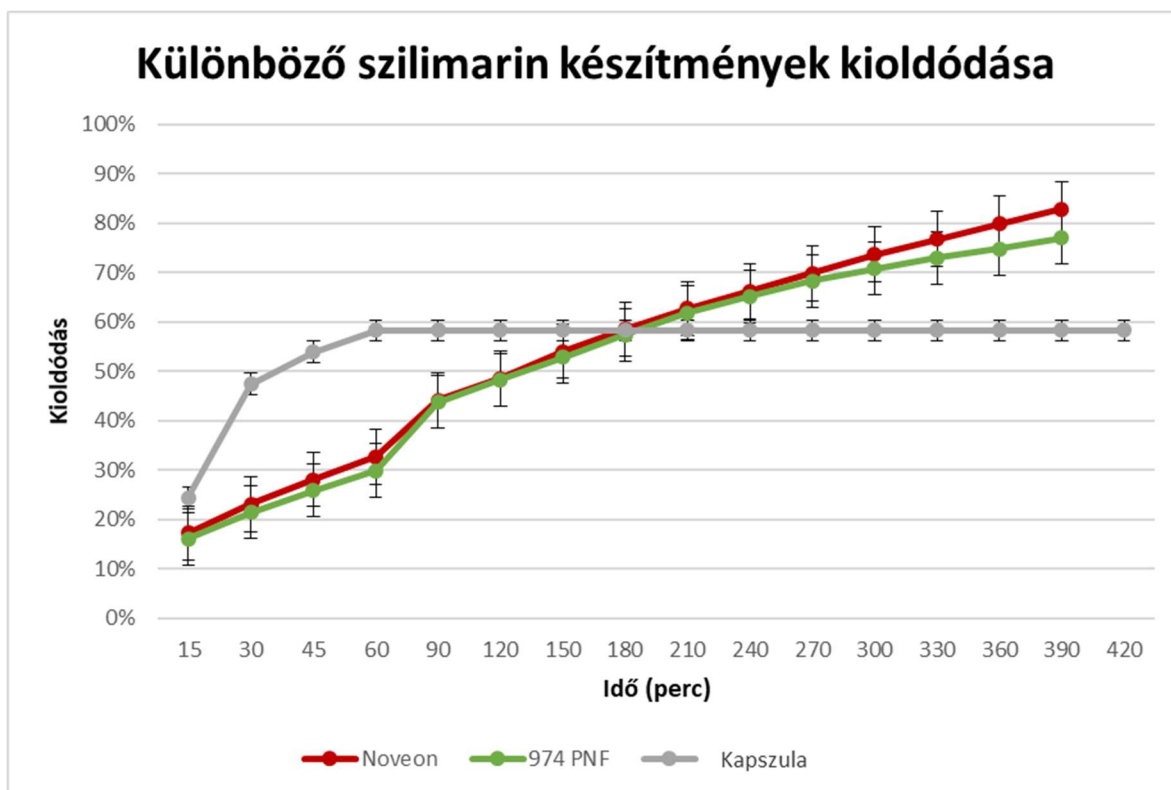
29. ábra. Random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben.

A vizsgálatok alapján két kombináció esetében lényegesen jobb hatóanyag-felszabadulással számolhatunk, mint a többi formulációnál. Ezek a metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol 974 PNF, illetve Noveon alapú mátrixtabletták voltak.

5.15. Szilimarinnel kioldódásának összehasonlítása különböző formulációkból

A kioldódási vizsgálatok eredményei alapján két Carbopol-ciklodextrin kombinációt tudtam kiválasztani, amelyek a legalkalmasabbnak bizonyultak az elnyújtott hatóanyag-leadás és ezáltal a megnövelt biohasznosulás elérésére. Összehasonlításképpen egy kereskedelmi forgalomban kapható 70 mg szilimarinnel tartalmú készítmény, egy konvencionális keményzselatin kapszula kioldódásvizsgálatát is elvégeztem változó közegben. A **30. ábrán** láthatók a metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarinnel és Noveont, illetve Carbopol 974 PNF-et tartalmazó formulációk, valamint a gyári készítmény kioldódási görbéi. Míg az utóbbi esetében a szilimarinnel kioldódása egy óra után elérte a maximumot, a mátrix tabletták nyújtott

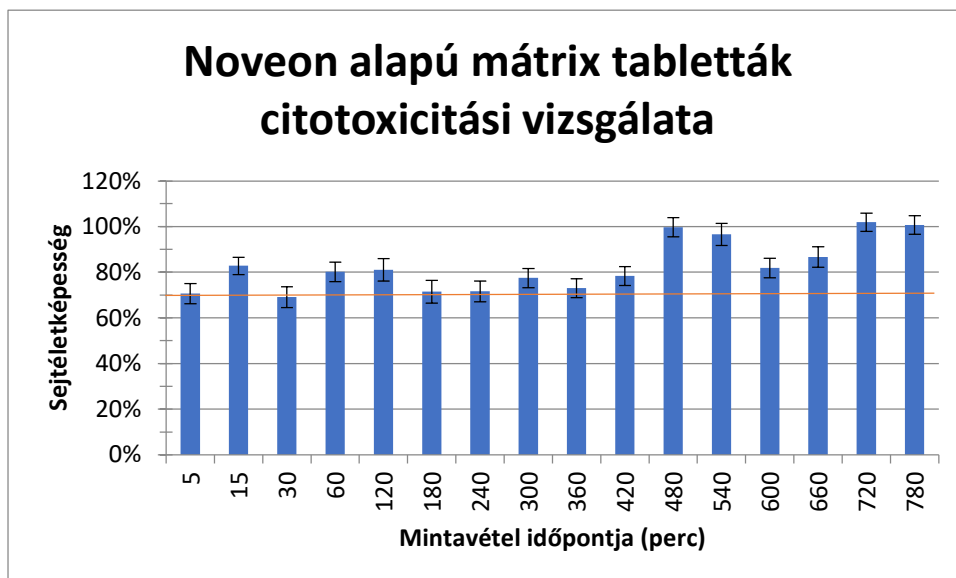
hatóanyag-leadása 6 órával a kísérlet kezdete után is tartott. A cikodextrinekkal történő komplexálás növelte a hatóanyag oldékonyságát, így jobb kioldódást eredményezett. Minden adatpont négy párhuzamos mérés eredménye. A gyári készítmény kioldódási görbéje a 15. perctől szignifikánsan különbözik a mátrixtablettákétól, míg a mátrixtabletták görbéi nem különböztek egymástól szignifikánsan a vizsgálat végéig.



30. ábra. Konvencionális keményszelatin kapszula, valamint metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarint és Noveont, illetve Carbopol 974 PNF-et tartalmazó mátrixtabletták hatóanyag-leadása.

5.16. Noveon alapú mátrix tabletták citotoxicitási vizsgálata

Végül megismétltem a kioldódási vizsgálatot a legjobb hatóanyag-felszabadulási tulajdonságokat mutató Noveon és metilált béta-ciklodextrin kombinációval, melyből a korábbi kísérletek alapján a legtöbb szilimarín oldódott ki. A vizsgálat során a kioldóközegből vett mintákat MTT teszthez használtam fel. Az eredmények a **31. ábrán** láthatók, minden adatpont 5 párhuzamos mérés átlagát mutatja, szórással. Nem találtam összefüggést a túlélő sejtek százalékos aránya és a tablettakomponensek koncentrációja között. A sejtleletképeség minden esetben 70% felett volt, egyes esetekben közel 100%. A vizsgálat alapján a készítmény biokompatibilisnek (citokompatibilisnek) tekinthető.



31. ábra. Noveon alapú mátrix tabletták citotoxicitási vizsgálata.

6. Diszkusszió

6.1. A görögszéna kivonatot tartalmazó SEDDS formulációk kutatási eredményeinek diszkussziója

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

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

A görögszéna fő farmakológiai komponenseinek stabilitási, oldékonysági és felszívódási paraméterei széles skálán mozognak. A 4-OH-izoleucin egy növényekben nem kifejezetten gyakori, nem proteinogén aminosav. Az inzulinrezisztenciára gyakorolt hatását az inzulinszekréció stimulálásának tulajdonítják magas vércukorszint esetében [107][108]. Ennek értelmében a görögszéna antidiabetikus gyógynövénynek tekinthető [109]. Az aminosavak biohasznosulásának legfőbb limitáló tényezője a felszívódás, amelynek fokozása jelenleg is számos kutatás témája, többféle megközelítésben, többek között abszorpciófokozó segédanyagokkal, kémiai módosítással, és liposzómákkal [110][111].

A görögszéna emellett tartalmaz dioszgenin-glükozidokat, amelyekből a gasztointesztinális traktusban dioszgenin szabadul fel. A vegyület segíti a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek regenerációját, valamint a máj glükoneogenezis egyes enzimeinek down-regulációját [108]. A dioszgenin egy szteroid szaponin alacsony biohasznosulással, ami penetrációfokozókkal javítható mind *in vitro* Caco-2 sejtmodelleken, mind *in vivo* állatkísérletekben [112].

A trigonellin egy inzulinrezisztenciás állapot javításához többféleképpen hozzájárulni képes alkaloid. Csökkenti a bélrendszerből történő glükózfelvételt, és segíti a béta-sejtek regenerációját [113]. A trigonellin vízóldékonysága jó [114], de a permeabilitása közepes, amelynek javítása különböző nanoformulációkkal jelenleg is kutatások tárgyát képezi [115].

Az apigenin gátolja az α -glukozidáz aktivitást, és fokozza az inzulinszekréciót [116]. A flavonoid orális biohasznosulása rossz, de megfelelő nanoformulációkkal [115], szilárd diszperziókkal [114], és szubmikro-emulziókkal [117] javítható.

A rossz orális biohasznosulás a gyógyszerformulálás egyik legnagyobb kihívása. Az alacsony vízdékonyság, rossz felszívódás és idő előtti degradáció pedig a nem megfelelő orális biohasznosulás fő okai [118][119]. A megfelelő paraméterekkel rendelkező SEDDS rendszerek javíthatják a lipofil, alacsony permeabilitású, és nem kellőképpen stabil molekulák biohasznosulását [120][121].

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

A SEDDS rendszerek hasznos technológiának bizonyultak a vízdékonyság és a biohasznosulás javítására, léptéknövelésük egyszerű, emellett bizonyos esetekben csökkenthetik a metabolizmust és megkerülhetik a máj first pass effektjét [122][94]. Ugyanakkor rendelkeznek hátrányokkal is, ezek közé sorolható a kis hatóanyag-kapacitás, az esetleges hatóanyag szivárgás, stabilitási problémák, és a választható gyógyszerformák erősen korlátozott száma [123].

A görögszéna és komponensei a modern hatóanyag-leadó rendszerek formulációja során leginkább segédanyagok szerepét töltik be, SEDDS rendszerekbe történő inkorporációjuk korábban nem volt kutatás tárgya.

A munkám során formulált két különböző, görögszéna szárított alkoholos kivonatát tartalmazó SEDDS összetétel fizikai paramétereinek vizsgálata alapján a TFG+S1 összetétel egy 829 nm átlagos részecskeátmérőjű ön-mikroemulgeáló rendszer (SMEDDS), míg a TFG+S2 egy 65,5 nm átlagos részecskeátmérőjű ön-nanoemulgeáló rendszer (SNEDDS). Ezek a kategóriák nevezéktani szempontból erősen vitatottak a szakirodalomban. A zéta-potenciál analízis alapján a TFG+S1 összetétel stabilitása kiváló (-71,3 mV), TFG+S2 összetételé pedig közepesnek tekinthető (-38,5 mV). Mindkét formuláció fizikai paraméterei megfelelőnek bizonyultak.

A kivonat és a SEDDS formulációk antioxidáns hatásait kétféle módszerrel, *in vitro* kémiai és Caco-2 sejtkultúrák tesztel vizsgáltam. A DPPH reagens segítségével elvégzett teszt alapján a TFG, TFG+S1 és TFG+S2, tehát a görögszénamag kivonatot tartalmazó összetételek antioxidáns kapacitása alacsonyabb koncentrációban elmarad az aszkorbinsav oldatétól, magasabb koncentrációban azonban megközelíti, vagy a TFG+S1 formuláció esetében akár el is éri azt. Az S1 és S2 összetételek, melyek csak a SEDDS rendszerek segédanyagait

tartalmazzák, növényi kivonatot nem, koncentrációtól függetlenül elhanyagolható antioxidáns hatással bírnak, a várakozásnak megfelelően. A SOD enzimaktivitáson alapuló sejtes antioxidáns tesztek alapján a TFG+S1 és TFG+S2, tehát a SEDDS-ként formulált összetételekkel kezelt sejtek esetében magasabb antioxidáns hatást tapasztaltam, mint az egyszerű görögszénamag kivonat TFG-vel kezelt sejtek esetében. Erre lehetséges magyarázat, hogy a penetrációfokozó segédanyagoknak köszönhetően a sejtek nagyobb mennyiségben vették fel a növényi kivonat antioxidáns komponenseit, így azok jobban befolyásolták az enzimaktivitást. Korábban leírták, hogy a növényi komponensek antioxidáns kapacitása penetrációfokozókkal növelhető [124]. A TFG+S1 formuláció az aszkorbinsavnál nagyobb antioxidáns kapacitást mutatott. Az S1 és S2 összetételek, melyek csak a SEDDS segédanyagokat tartalmazták, szintén mutattak némi antioxidáns hatást, amely azonban nem tekinthető számottevőnek.

A permeabilitási vizsgálataimmal 13 görögszéna komponens *in vitro* felszívódását vizsgáltam Caco-2 sejteken, köztük 5 szteroid szaponinét, 6 flavonoid glükozidét, a 4-OH-izoleucinét és a trigonellinét. A két SEDDS formuláció permeabilitása szignifikánsan magasabb volt mind a 13 növényi metabolit esetében, mint a natúr görögszéna kivonaté, de egymástól jelentősen eltérő felszívódási paramétereket nem mutattak. Hasonló eredményeket írtak le SEDDS rendszerekbe inkorporált filligenin és tektorigenin növényi hatóanyagok *in vitro* és *in vivo* permeabilitási vizsgálatai során [125][126]. A transzport vizsgálatok után a membránintegritást TEER utánpótlással ellenőriztem.

Végrehajtottam a SEDDS formulációk kioldódásának indirekt vizsgálatát keményszselatin és HPMC kapszulatokból. A keményszselatin kapszula egyenletes és elnyújtott hatóanyag-leadást biztosított 30 percen keresztül, ezután szétesett. A HPMC kapszulatokból több mint 60 percen keresztül történt hatóanyag-leadás, ebben az esetben is egyenletesen és elnyújtottan. A kioldódott hatóanyagokat DPPH reagens használatával, közvetett módon mértem, kihasználva a görögszéna komponensek antioxidáns tulajdonságait, a Kalantari és mtsai által leírt módszer alapján [64]. Több tanulmányt is találunk, melyek a növényi hatóanyagokat tartalmazó SEDDS rendszerek előnyösebb hatóanyag-felszabadulási tulajdonságait írják le különböző gyógyszerformákból [65][64][126].

A citotoxicitást MTT teszt segítségével vizsgáltam. Az eredmények azt mutatják, hogy a növényi kivonatot és a SEDDS formulációkat is jól tolerálták a Caco-2 sejtek. Bizonyos esetekben 100% feletti sejt viabilitási értékeket kaptam, amit a görögszéna kivonat magas antioxidáns tartalma okozhatott, megnövelve az MTT átalakítás mértékét [127][128]. A

biokompatibilitás kulcsfontosságú paraméter a SEDDS formulációk és általában a penetrációfokozók esetében [129].

6.2. A szilimarint tartalmazó mátrixtabletták kutatási eredményeinek diszkussziója

A **szilimarin** számos hatással bír, ezek közül elsődlegesen hepatoprotektív sajátságai [130]. Elhanyagolható mellékhatásokkal rendelkező természetes farmakonként magasabb beteg compliance várható a terápiától [28]. Habár találunk tanulmányokat, melyek jobb májvédő hatást mutató farmakonokat írnak le [131], a szilimarin még mindig ezen terápiás terület legeredményesebb hatóanyagai között van, így érdemes célpontja a biohasznosulásának javítását célzó tudományos kutatásoknak. Ennek okán vizsgáltam máriatövis kivonatát tartalmazó orális bevételre szánt, módosított hatóanyag-leadású mátrix tablettákat.

A szilimarin legfőbb hátránya rendkívül alacsony biohasznosulása, mely a terápiás hatását is befolyásolja [32]. A biohasznosulás növelésére lehetőségünk van a vízdékonyság, a permeabilitás, a metabolizmus és az exkréció megváltoztatásával is [36][132]. A kutatómunkám során különböző béta-ciklodextrin származékokat használtam a szilimarin vízdékonyságának növelése céljából. A ciklodextrinek széles körben használt segédanyagok a gyógyszerészetben az oldékonyság, a biohasznosulás és a stabilitás növelésére, illetve az irritáció és az inkompatibilitás elkerülésére orális, rektális, nazális és transzdermális bevétel esetén egyaránt [133]. A komplexálást fizikai keverékként végeztem a Ghosh és mtsai által leírt módszer alapján [104], akik leírták az így készült komplexek stabilitási állandóját és fázisoldhatósági tulajdonságait. A kutatás során Yeh és mtsai [134] publikációjára alapoztam, akik egy szintén sok komponensből álló növényi származék, a San Huang Shel Shin Tang komplexálásával tudták növelni annak vízdékonyságát és hatékonyságát nemcsak *in vitro* modelleken, de *in vivo* állatkísérletek során is.

A nyújtott hatóanyag-leadás biztosításához a hidrofil mátrix tablettákat választottam. Ez egy viszonylag olcsó technológia, a gyártás nem igényel speciális berendezést vagy eszközöket a konvencionális tabletták készítéséhez szükségesén túl. Több kutatás vizsgálta a béta-ciklodextrinnek történő komplexálás hatását hidrofil mátrix technológiával kombinálva, és magasabb biohasznosulást írtak le rossz vízdékonyságú farmakonok, például karbamazepin [135], nikardipin [136], diklofenák [137] és teofillin [130] esetében.

A Carbopolok jól ismert segédanyagok topikális gélek formulálása során, karboxilcsoportjaiknak köszönhetően a közeg pH-ja befolyásolja az általuk képzett gélfázisból

történő kioldódást [138]. Az általam a mátrixtabletták alapjaként felhasznált négy Carbopol citotoxicitását MTT teszt segítségével vizsgáltam Caco-2 sejtvonalon. A kísérlet eredményei alapján a Carbopol koncentrációja és a kezelés utáni sejtleletképeség között nem található összefüggés. A legmagasabb sejtleletképeséget a Noveonnal kezelt sejtek esetében tapasztaltam, de egyik polimer sem bizonyult toxikusnak.

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

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

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

Az 1,2 pH-jú mesterséges gyomornedvben HPBCD-vel komplexált szilimarint tartalmazó hidrofil mátrix tabletták kioldódását vizsgáltam. A farmakon felszabadulása ebben az esetben is elnyújtott és egyenletes volt, ugyanakkor lényegesen lassabb, mint a mesterséges bélnedvben. A 780 perces vizsgálat végére a hatóanyagnak legfeljebb mindössze 37%-a oldódott ki. Az alacsony pH-n lényegesen kisebb mértékű kioldódás a Carbopol-mátrixból az orális terápiára nézve kedvező tulajdonság, így ugyanis kevesebb hatóanyag szabadul fel a gyomorban, a farmakonliberáció elsősorban a vékonybélben történik. A Carbopoloik tehát megfelelő polimer alapot jelentenek olyan farmakonokból történő hidrofil mátrix tabletták

képzésére, amelyek károsíthatják a gyomornyálkahártyát, vagy ellenkezőleg, károsodást szenvedhetnek el a gyomorban. A növényi hatóanyagok között mindkét esetre nagy számban találunk példát.

A szilimarín-ciklodextrin zárványkomplexeket tartalmazó, összesen 16 különböző összetételű tablettát változó pH-jú kioldóközegben is vizsgáltam. Ebben az esetben a kísérlet első órájában a médium mesterséges gyomornedv volt, amit ezután lecseréltem mesterséges bélnedvre, amelyben további 6 órán keresztül folytattam a kísérletet, így próbálva in vitro módszerekkel minél jobban modellezni a humán gasztrointesztinális rendszerre jellemző pH-viszonyokat. A kioldódott szilimarín mennyisége kevesebb volt a korábban mesterséges bélnedvben elvégzett kísérletekhez képest, részben a vizsgálat rövidebb ideje miatt, részben az első óra savas közege miatt, amely befolyásolja a polimerek gélképzését. A kioldódási vizsgálatok alapján két formulációt tudtam kiválasztani, amelyek a lehetséges terápiás felhasználás szempontjából a legkedvezőbb tulajdonságokat mutatták: a metilált béta-ciklodextrinnel kombinált Carbopol 974 PNF-et, illetve Noveont.

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

A ciklodextrinek toxicitása évtizedek óta vizsgált kérdés [139][140][141], de tanulmányok a különböző béta-ciklodextrin származékok eltérő és erősen koncentrációfüggő citotoxicitási tulajdonságait mutatták ki [142][143]. A legalkalmasabbnak talált tablettáformuláción elvégzett MTT teszt magas sejttételeképességi értékeket mutatott, igazolva a tabletták biztonságos alkalmazhatóságát.

6.3. Új tudományos eredmények összefoglalása

A kísérletes munkám során elért új tudományos eredmények összefoglalása:

- Görögszénamag kivonatából megfelelő fizikai paraméterekkel rendelkező önemulgeáló rendszereket formuláltam, melyek jellegét és stabilitását részecskeméret-meghatározással és zéta-potenciál analízissel vizsgáltam.

- A SEDDS rendszerek és a kivonat antioxidáns hatását *in vitro* kémiai és sejtes antioxidáns teszttel igazoltam, utóbbi esetében a SEDDS rendszerek magasabb hatást mutattak az egyszerű kivonatnál.
- Permeabilitási vizsgálatok elvégzésével bizonyítottam, hogy a SEDDS rendszerekből jelentősen nagyobb mennyiségben szívódik fel mind a 13 hatóanyag-komponens, mint az egyszerű kivonatból.
- Kemény zselatin és HPMC kapszulatok felhasználásával a SEDDS rendszerek egyenletes, elnyújtott kioldódása is elérhető a gasztrointesztinális traktusban, amit indirekt kioldódási vizsgálattal igazoltam.
- A SEDDS formulációk citokompatibilitását MTT teszt segítségével, illetve a permeabilitási teszt során felhasznált sejtréteg integritásának utánkövetésével vizsgáltam, a formulációk egyik esetben sem bizonyultak citotoxikusnak.
- Szilimarinból és ciklodextrinekkel komplexált szilimarinból Carbopol alapú hidrofíl mátrixtablettákat formuláltam, melyek fizikai paramétereik vizsgálata alapján megfeleltek a 9. Európai Gyógyszerkönyv követelményeinek.
- A különböző összetételű tablettákkal kioldódási vizsgálatokat végeztem mesterséges bélnedvben, mesterséges gyomornedvben, és változó közegben. A kioldódási profilok alapján ki tudtam választani a legalkalmasabb összetételt az egyenletes, nyújtott szilimarin-felszabadulás eléréséhez. Ezt kereskedelmi forgalomban levő konvencionális szilimarinkészítmény kioldódásával is összehasonlítottam.
- A tabletták citokompatibilitását *in vitro* MTT teszttel ellenőriztem, amely mind a Carbopolok, mind pedig a készítmények esetében alacsony citotoxicitást mutatott.

7. Összefoglalás

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

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

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

8. Summary

During my PhD studies, the focus of my research was the bioavailability enhancement of herbal drugs. My aim was to formulate modern drug delivery systems which are able to make better use of the beneficial effect of phytopharmacocons than dried plant parts, cost-effective and simple to produce in proper quality, easy to administer orally, and not cytotoxic.

In the first part of my work SEDDS formulations were prepared of dried extract of fenugreek seed with the use of different emulsifiers. According to my examinations, stabile micro- or nanoemulsion systems can be formulated with a proper composition, which possess high antioxidant capacity and significantly increase the intestinal permeability of active herbal components compared to the native fenugreek extract. Furthermore, they easily can be filled into hard gelatine or HPMC capsules, therefore administration is simple, and they do not show cytotoxic properties. With this technology, a formulation with better oral bioavailability was achieved, and it can make the prevention and therapy of diabetes and insulin resistance with a natural herbal drug product containing complex phytopharmacocons.

In the second part of my work Carbopol based hydrophilic matrix tablet were formulated of silymarin extracted from milk thistle. This technology was also combined with molecular encapsulation by cyclodextrins. According to my examinations, the tablets met the requirements of the European Pharmacopoea 9th Edition, and enabled sustained pharmacon dissolution on the pH of the human gastrointestinal system. The modified release and the improved solubility can lead to enhanced bioavailability. The tablets and the matrix forming polymers are safe and non-toxic, their administration is simple, and they have significant therapeutic benefits compared to the conventional dosage forms.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Li, F.-S.; Weng, J.-K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat. Plants* **2017**, *3*, 17109.
2. Kulikova, O.I.; Stvolinsky, S.L.; Migulin, V.A.; Andreeva, L.A.; Nagaev, I.Y.; Lopacheva, O.M.; Kulichenkova, K.N.; Lopachev, A. V; Trubitsina, I.E.; Fedorova, T.N. A new derivative of acetylsalicylic acid and carnosine: synthesis, physical and chemical properties, biological activity. *DARU J. Pharm. Sci.* **2020**, *28*, 119–130.
3. Gan, S.C.; Barr, J.; Arief, A.I.; Pearl, R.G. Biguanide-Associated Lactic Acidosis: Case Report and Review of the Literature. *Arch. Intern. Med.* **1992**, *152*, 2333–2336.
4. Abdel-Aziz, S.M.; Aeron, A.; Kahil, T.A. Health Benefits and Possible Risks of Herbal Medicine BT - Microbes in Food and Health. In; Garg, N., Abdel-Aziz, S.M., Aeron, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp. 97–116 ISBN 978-3-319-25277-3.
5. Hl, R.; Hs, Y.; Vm, C.; Bp, S.; Kumar, V. AN OVERVIEW OF HERBAL MEDICINE. *Int. J. Pharm. Sci.* **2009**, *1*, 1–20.
6. Gouws, C.; Hamman, J.H. What are the dangers of drug interactions with herbal medicines? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2020**, *16*, 165–167.
7. Atul Bhattaram, V.; Graefe, U.; Kohlert, C.; Veit, M.; Derendorf, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 1–33.
8. Snehlata, H.S.; Payal, D.R. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): An overview. *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.* **2011**, *2*, 169–187.
9. Yadav, U.C.S.; Baquer, N.Z. Pharmacological effects of *Trigonella foenum-graecum* L. in health and disease. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 243–254.
10. Zia, T.; Hasnain, S.N.; Hasan, S.K. Evaluation of the oral hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* L. (methi) in normal mice. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *75*, 191–195.
11. Bin-Hafeez, B.; Haque, R.; Parvez, S.; Pandey, S.; Sayeed, I.; Raisuddin, S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 257–265.

12. Abhilash, M.B.; Kumar, D.; Deepti, A.; Nair, A.; Greet, V.; An-Katrien, V.; Mieke, V.D.D.; Das Sivadasan, S.; Maliakel, B.; Chakrapani PS, B.; et al. Enhanced absorption of curcuminoids and 3-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid from fenugreek galactomannan hydrogel beadlets: A natural approach to the co-delivery of lipophilic phytonutrients. *J. Funct. Foods* **2021**, *79*, 104405.
13. Alqahtani, A.; Raut, B.; Khan, S.; Mohamed, J.M.; Fatease, A.A.; Alqahtani, T.; Alamri, A.; Ahmad, F.; Krishnaraju, V. The Unique Carboxymethyl Fenugreek Gum Gel Loaded Itraconazole Self-Emulsifying Nanovesicles for Topical Onychomycosis Treatment. *Polym.* **2022**, *14*.
14. Jyothi, D.; Koland, M.; Priya, S.; James, J. Formulation of Herbal Capsule Containing Trigonella Foenum-Graecum Seed Extract for the Treatment of Diabetes. *J. Young Pharm.* **2017**, *9*, 352–356.
15. Jain, M. Process Optimization for Formulating Trigonella foenum-graecum and Gymnema sylvestre Added Vegetable Cereal Mix Using Response Surface Methodology. *J. Nutr. Heal. Food Eng.* **2016**, *4*, 416–428.
16. Bire, P.; TRIVEDI, S.S.; Durugkar, N.; Umekar, M. Formulation and Cytotoxic Characterization of Trigonella foenum Loaded Polymeric Nanoparticles. *J. Drug Deliv. Ther.* **2020**, *10*, 187–192.
17. Adimoolam, S.; Phonhaxa, S. Trigonella-foenum graecum l. seed mucilage-based mucoadhesive microspheres of diclofenac sodium. *J. Anal. Pharm. Res.* **2018**, *7*, 114–119.
18. TAOFEEK, O. Molecular Docking and Admet Analyses of Photochemicals from Nigella sativa (blackseed), Trigonella foenum-graecum (Fenugreek) and Anona muricata (Soursop) on SARS-CoV-2 Target. *Sci. Prepr.* **2020**, 0–2.
19. Okawara, M.; Tokudome, Y.; Todo, H.; Sugibayashi, K.; Hashimoto, F. Effect of β -cyclodextrin derivatives on the diosgenin absorption in Caco-2 cell monolayer and rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 54–59.
20. Biedermann, D.; Vavříková, E.; Cvak, L.; Křen, V. Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1138–1157.
21. Kuki, Á.; Nagy, L.; Deak, G.; Nagy, M.; Zsuga, M.; Keki, S. Identification of

- Silymarin Constituents: An Improved HPLC–MS Method. *Chromatographia* **2011**, *75*.
22. Frascini, F.; G, D.; D, E. Pharmacology of Silymarin. *Clin. Drug Investig.* **2002**, *22*, 51–65.
 23. Ross, S.M. Milk thistle (*silybum marianum*): An ancient botanical medicine for modern Times. *Holist. Nurs. Pract.* **2008**, *22*, 299–300.
 24. Gažák, R.; Sedmera, P.; Vrbacký, M.; Vostálová, J.; Drahota, Z.; Marhol, P.; Walterová, D.; Křen, V. Molecular mechanisms of silybin and 2,3-dehydrosilybin antiradical activity-role of individual hydroxyl groups. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 745–758.
 25. Katiyar, S.K.; Meleth, S.; Sharma, S.D. Silymarin, a flavonoid from milk thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11b⁺ cells in mouse skin. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 266–271.
 26. Katiyar, S.K. Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects (Review). *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 169–176.
 27. Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Róka, E.; Juhász, B.; Varga, B.; Bombicz, M.; Priksz, D.; Bácskay, I.; et al. Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended *Silybum marianum* against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes. *Molecules* **2016**, *21*.
 28. Jin, J.; Sklar, G.E.; Min Sen Oh, V.; Chuen Li, S. Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 269–286.
 29. Karimi, G.; Vahabzadeh, M.; Lari, P.; Rashedinia, M.; Moshiri, M. “Silymarin”, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2011**, *14*, 308–317.
 30. Kren, V.; Walterová, D. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czechoslov.* **2005**, *149*, 29–41.
 31. Mahli, A.; Koch, A.; Czech, B.; Peterburs, P.; Lechner, A.; Haunschild, J.; Müller, M.; Hellerbrand, C. Hepatoprotective effect of oral application of a silymarin extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Clin. Phytoscience* **2015**, *1*, 5.

32. Ferenci, P. Silymarin in the treatment of liver diseases: What is the clinical evidence? *Clin. liver Dis.* **2016**, *7*, 8–10.
33. Javed, S.; Kohli, K.; Ali, M. Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern. Med. Rev.* **2011**, *16*, 239–249.
34. Wu, J.-W.; Lin, L.-C.; Hung, S.-C.; Chi, C.-W.; Tsai, T.-H. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 635–641.
35. Křen, V.; Kubisch, J.; Sedmera, P.; Halada, P.; Příkrylová, V.; Jegorov, A.; Cvak, L.; Gebhardt, R.; Ulrichová, J.; Šimánek, V. Glycosylation of silybin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2467–2474.
36. Javed, S.; Kohli, K.; Ahsan, W. Solubility and Dissolution Enhancement of Silymarin with Fulvic Acid Carrier.; 2016.
37. Panapisal, V.; Charoensri, S.; Tantituvanont, A. Formulation of microemulsion systems for dermal delivery of silymarin. *AAPS PharmSciTech* **2012**, *13*, 389–399.
38. Theodosiou, E.; Purchartová, K.; Stamatis, H.; Kolisis, F.; Křen, V. Bioavailability of silymarin flavonolignans: Drug formulations and biotransformation. *Phytochem. Rev.* **2014**, *13*.
39. Yang, G.; Zhao, Y.; Feng, N.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Dang, B. Improved dissolution and bioavailability of silymarin delivered by a solid dispersion prepared using supercritical fluids. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 194–202.
40. Gomez-Orellana, I. Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 419–433.
41. Müller, C.E. Prodrug Approaches for Enhancing the Bioavailability of Drugs with Low Solubility. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 2071–2083.
42. Dufès, C. Chapter 6 - Brain Delivery of Peptides and Proteins. In; Van Der Walle, C.B.T.-P. and P.D., Ed.; Academic Press: Boston, 2011; pp. 105–122 ISBN 978-0-12-384935-9.
43. Kansara, H.; Panola, R.; Mishra, A. Techniques used to Enhance Bioavailability of BCS Class II Drugs: A Review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **2015**, *7*, 82–93.

44. Feng, S.; Wang, L.; Shao, P.; Sun, P.; Yang, C.S. A review on chemical and physical modifications of phytosterols and their influence on bioavailability and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 5638–5657.
45. Peng, J.-R.; Qian, Z.-Y. Drug delivery systems for overcoming the bioavailability of curcumin: not only the nanoparticle matters. *Nanomedicine* **2014**, *9*, 747–750.
46. Vandana, K.R.; Prasanna Raju, Y.; Harini Chowdary, V.; Sushma, M.; Vijay Kumar, N. An overview on in situ micronization technique – An emerging novel concept in advanced drug delivery. *Saudi Pharm. J.* **2014**, *22*, 283–289.
47. Saralidze, K.; Koole, L.H.; Knetsch, M.L.W. Polymeric Microspheres for Medical Applications. *Materials (Basel)*. 2010, *3*, 3537–3564.
48. Gaber D, Abdoun S, Alfuraihy A, Altasan B, A.A. Superhydrophobic Surface for Enhancing the Bioavailability of Salbutamol Sulfate from Cross-Linked Microspheres: Formulation, Characterization, and in vivo Evaluation. *Drug Des Devel Ther.* **2021**, 2869–2884.
49. Jia, L. Nanoparticle Formulation Increases Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs: Approaches Experimental Evidences and Theory. *Curr. Nanosci.* **2005**, *1*, 237–243.
50. Gunasekaran, T.; Haile, T.; Nigusse, T.; Dhanaraju, M.D. Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, S1-7.
51. Lu, M.; Qiu, Q.; Luo, X.; Liu, X.; Sun, J.; Wang, C.; Lin, X.; Deng, Y.; Song, Y. Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents. *Asian J. Pharm. Sci.* **2019**, *14*, 265–274.
52. Lee, M.-K. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics* **2020**, *12*.
53. Schittny, A.; Huwyler, J.; Puchkov, M. Mechanisms of increased bioavailability through amorphous solid dispersions: a review. *Drug Deliv.* **2020**, *27*, 110–127.
54. Vasconcelos, T.; Sarmiento, B.; Costa, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 1068–1075.

55. Sinha, S.; Ali, M.; Baboota, S.; Ahuja, A.; Kumar, A.; Ali, J. Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 518–527.
56. Le, T.N.; Her, J.; Sim, T.; Jung, C.E.; Kang, J.K.; Oh, K.T. Preparation of Gastro-retentive Tablets Employing Controlled Superporous Networks for Improved Drug Bioavailability. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21*, 320.
57. Shaha, S.; Jayvadan, P.; Pundarikakshudu, K.; Patel, N. An overview of a gastro-retentive floating drug delivery system. *Asian J. Pharm. Sci.* **2009**, *4*.
58. Ito, Y. Drug delivery systems. *Photochem. Biomed. Appl. From Device Fabr. to Diagnosis Ther.* **2018**, 231–275.
59. Neslihan Gursoy, R.; Benita, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 173–182.
60. Tripathi, S.; Kushwah, V.; Thanki, K.; Jain, S. Triple antioxidant SNEDDS formulation with enhanced oral bioavailability: Implication of chemoprevention of breast cancer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12*, 1431–1443.
61. Date, A.A.; Desai, N.; Dixit, R.; Nagarsenker, M. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1595–1616.
62. Pavoni, L.; Perinelli, D.R.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G.F. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **2020**, *10*, 135.
63. Chatterjee, N.; Shi, J.; García-Closas, M. Developing and evaluating polygenic risk prediction models for stratified disease prevention. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 392–406.
64. Kalantari, A.; Kósa, D.; Nemes, D.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Vecsernyés, M.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Kuki, Á.; Gonda, S.; et al. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems Containing *Plantago lanceolata*—An Assessment of Their Antioxidant and Antiinflammatory Effects. *Mol.* **2017**, *22*.
65. Zhang, L.; Zhang, lanying; Zhang, M.; Pang, Y.; Li, Z.; Zhao, A.; Feng, J. Self-emulsifying drug delivery system and the applications in herbal drugs. *Drug Deliv.*

- 2015**, 22, 475–486.
66. Verma, R. Recent Developments in Self-microemulsifying Drug Delivery System: An Overview. *Asian J. Pharm.* **2020**, 13, 59–72.
 67. Wu, W.; Wang, Y.; Que, L. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, 63, 288–294.
 68. Chen, Z.Q.; Liu, Y.; Zhao, J.H.; Wang, L.; Feng, N.P. Improved oral bioavailability of poorly water-soluble indirubin by a supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 7, 1115–1125.
 69. Tiwari, D. Unit Dosages Form-Tablet An Overview. **2015**, 1, 8–36.
 70. Rácz I., S.B. *Gyógyszertechológia*; Medicina Könyvkiadó: Budapest, 2001;
 71. Modi, S.; Gaikwad, P.; Bankar, V.; Pawar, S. Sustained release drug delivery system: A review. *Int. J. Pharm. Res. Dev.* **2011**, 2.
 72. Moodley, K.; Pillay, V.; Choonara, Y.E.; du Toit, L.C.; Ndesendo, V.M.K.; Kumar, P.; Cooppan, S.; Bawa, P. Oral drug delivery systems comprising altered geometric configurations for controlled drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 18–43.
 73. Bose, A.; Wong, T.W.; Singh, N. Formulation development and optimization of sustained release matrix tablet of Itopride HCl by response surface methodology and its evaluation of release kinetics. *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* **2013**, 21, 201–213.
 74. Swaleh, M.; Nisa, Z.; Ali, S.; Khan, M.A.; Rizvi, M.; Shehnaz, S. A Detailed Review on Oral Controlled Release Matrix Tablets. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2020**, 64, 27–38.
 75. Bonacucina, G.; Martelli, S.; Palmieri, G.F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. *Int. J. Pharm.* **2004**, 282, 115–130.
 76. Hosmani, A.; Thorat, Y.S.; Kasture, P. V Carbopol and its Pharmaceutical Significance: A Review. *Pharm. Rev.* **2006**, 4.
 77. Carneiro, S.B.; Costa Duarte, F.Í.; Heimfarth, L.; Siqueira Quintans, J. de S.; Quintans-Júnior, L.J.; Veiga Júnior, V.F. da; Neves de Lima, Á.A. Cyclodextrin–Drug Inclusion

- Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
78. Maestrelli, F.; Cirri, M.; De Luca, E.; Biagi, D.; Mura, P. Role of Cyclodextrins and Drug Solid State Properties on Flufenamic Acid Dissolution Performance from Tablets. *Pharm.* **2022**, *14*.
 79. Kurkov, S. V.; Loftsson, T. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 167–180.
 80. Wadhwa, G.; Kumar, S.; Chhabra, L.; Mahant, S.; Rao, R. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2017**, *89*, 39–58.
 81. Meunier, V.; Bourrié, M.; Berger, Y.; Fabre, G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* **1995**, *11*, 187–194.
 82. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stamatii, A.; Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **2005**, *21*, 1–26.
 83. Wahlang, B.; Pawar, Y.B.; Bansal, A.K. Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *77*, 275–282.
 84. Piazzini, V.; Rossetti, C.; Bigagli, E.; Luceri, C.; Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C. Prediction of Permeation and Cellular Transport of Silybum marianum Extract Formulated in a Nanoemulsion by Using PAMPA and Caco-2 Cell Models. *Planta Med.* **2017**, *83*, 1184–1193.
 85. Sha, X.; Yan, G.; Wu, Y.; Li, J.; Fang, X. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24*, 477–486.
 86. Patel, M.H.; Sawant, K.K. Self microemulsifying drug delivery system of lurasidone hydrochloride for enhanced oral bioavailability by lymphatic targeting: In vitro, Caco-2 cell line and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *138*, 105027.
 87. Sangsen, Y.; Wiwattanawongsa, K.; Likhitwitayawuid, K.; Sritularak, B.; Wiwattanapatapee, R. Comparisons between a self-microemulsifying system and lipid nanoparticles of oxyresveratrol on the physicochemical properties and Caco-2 cell permeability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2017**, *119*, 1600053.

88. Liu, J.; Werner, U.; Funke, M.; Besenius, M.; Saaby, L.; Fanø, M.; Mu, H.; Müllertz, A. SEDDS for intestinal absorption of insulin: Application of Caco-2 and Caco-2/HT29 co-culture monolayers and intra-jejunal instillation in rats. *Int. J. Pharm.* **2019**, *560*, 377–384.
89. Natoli, M.; Leoni, B.D.; D'Agnano, I.; Zucco, F.; Felsani, A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. Vitro.* **2012**, *26*, 1243–1246.
90. Sullivan, D.W.J.; Gad, S.C.; Julien, M. A review of the nonclinical safety of Transcutol®, a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE) used as a pharmaceutical excipient. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2014**, *72*, 40–50.
91. McCartney, F.; Jannin, V.; Chevrier, S.; Boulghobra, H.; Hristov, D.R.; Ritter, N.; Miolane, C.; Chavant, Y.; Demarne, F.; Brayden, D.J. Labrasol® is an efficacious intestinal permeation enhancer across rat intestine: Ex vivo and in vivo rat studies. *J. Control. release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *310*, 115–126.
92. Tran, Thuy, Rades, Thomas, Müllertz, A. Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine and Kolliphor® RH40 using experimental design. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, *13*, 536–545.
93. Ukai, H.; Imanishi, A.; Kaneda, A.; Kimura, E.; Koyama, M.; Morishita, M.; Katsumi, H.; Yamamoto, A. Absorption-Enhancing Mechanisms of Capryol 90, a Novel Absorption Enhancer, for Improving the Intestinal Absorption of Poorly Absorbed Drugs: Contributions to Trans- or Para-Cellular Pathways. *Pharm. Res.* **2020**, *37*, 248.
94. Assi, R.A.; Abdulbaqi, I.M.; Ming, T.S.; Yee, C.S.; Wahab, H.A.; Asif, S.M.; Darwis, Y. Liquid and solid self-emulsifying drug delivery systems (Sedds) as carriers for the oral delivery of azithromycin: Optimization, in vitro characterization and stability assessment. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1–29.
95. Ross Hallett, F. Particle size analysis by dynamic light scattering. *Food Res. Int.* **1994**, *27*, 195–198.
96. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351.
97. Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N.K. Estimation of antiradical properties of

- antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* **2012**, *130*, 1036–1043.
98. Sun, Y.; Oberley, L.W.; Li, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 497–500.
 99. van Breemen, R.B.; Li, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, *1*, 175–185.
 100. Pires, C.L.; Praça, C.; Martins, P.A.T.; Batista de Carvalho, A.L.M.; Ferreira, L.; Marques, M.P.M.; Moreno, M.J. Re-Use of Caco-2 Monolayers in Permeability Assays-Validation Regarding Cell Monolayer Integrity. *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
 101. Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*.
 102. Li, W.; Yi, S.; Wang, Z.; Chen, S.; Xin, S.; Xie, J.; Zhao, C. Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies. *Int. J. Pharm.* **2011**, *420*, 161–171.
 103. Kahol A, Singh K, Tandon S, K.S. Process for Isolation of Hepatoprotective Agent Silymarin from Seeds of the Plant *Silybum marianum*. 2001, Indian Patent, 06309678.
 104. Ghosh, A.; Biswas, S.; Ghosh, T. Preparation and evaluation of silymarin β -cyclodextrin molecular inclusion complexes. *J. Young Pharm.* **2011**, *3*, 205–210.
 105. Kumar, A.; Dixit, C.K. 3 - Methods for characterization of nanoparticles. In; Nimesh, S., Chandra, R., Gupta, N.B.T.-A. in N. for the D. of T.N.A., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp. 43–58 ISBN 978-0-08-100557-6.
 106. International Organization for Standardization UNI EN ISO 10993-5:2009, “Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: In Vitro Cytotoxicity Testing”. 2009.
 107. Avalos-Soriano, A.; De la Cruz-Cordero, R.; Rosado, J.L.; Garcia-Gasca, T. 4-Hydroxyisoleucine from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): Effects on Insulin Resistance Associated with Obesity. *Molecules* **2016**, *21*.
 108. Fuller, S.; Stephens, J.M. Diosgenin, 4-hydroxyisoleucine, and fiber from fenugreek: mechanisms of actions and potential effects on metabolic syndrome. *Adv. Nutr.* **2015**,

- 6, 189–197.
109. Eddouks, M.; Lemhadri, A.; Hebi, M.; El Hidani, A.; Zeggwagh, N.A.; El Bouhali, B.; Hajji, L.; Burcelin, R. Capparis spinosa L. aqueous extract evokes antidiabetic effect in streptozotocin-induced diabetic mice. *Avicenna J. phytomedicine* **2017**, *7*, 191–198.
 110. Trommelen, J.; Tomé, D.; van Loon, L.J.C. Gut amino acid absorption in humans: Concepts and relevance for postprandial metabolism. *Clin. Nutr. Open Sci.* **2021**, *36*, 43–55.
 111. Renukuntla, J.; Vadlapudi, A.D.; Patel, A.; Boddu, S.H.S.; Mitra, A.K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* **2013**, *447*, 75–93.
 112. Okawara, M.; Tokudome, Y.; Todo, H.; Sugibayashi, K.; Hashimoto, F. Effect of β -Cyclodextrin derivatives on the diosgenin absorption in caco-2 cell monolayer and rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 54–59.
 113. Zhou, J.; Chan, L.; Zhou, S. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3523–3531.
 114. Alshehri, S.M.; Shakeel, F.; Ibrahim, M.A.; Elzayat, E.M.; Altamimi, M.; Mohsin, K.; Almeanazel, O.T.; Alkholief, M.; Alshetali, A.; Alsulays, B.; et al. Dissolution and bioavailability improvement of bioactive apigenin using solid dispersions prepared by different techniques. *Saudi Pharm. J.* **2019**, *27*, 264–273.
 115. Dewanjee, S.; Chakraborty, P.; Mukherjee, B.; De Feo, V. Plant-Based Antidiabetic Nanoformulations: The Emerging Paradigm for Effective Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2217.
 116. Salehi, B.; Venditti, A.; Sharifi-Rad, M.; Kręgiel, D.; Sharifi-Rad, J.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Santini, A.; Souto, E.B.; Novellino, E.; et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1305.
 117. Abcha, I.; Souilem, S.; Neves, M.A.; Wang, Z.; Nefatti, M.; Isoda, H.; Nakajima, M. Ethyl oleate food-grade O/W emulsions loaded with apigenin: Insights to their formulation characteristics and physico-chemical stability. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 953–962.
 118. Aungst, B.J. Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs

- with poor membrane permeation or presystemic metabolism. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 979–987.
119. Boyd, B.J.; Bergström, C.A.S.; Vinarov, Z.; Kuentz, M.; Brouwers, J.; Augustijns, P.; Brandl, M.; Bernkop-Schnürch, A.; Shrestha, N.; Prétat, V.; et al. Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *137*, 104967.
 120. Gupta, S.; Kesarla, R.; Omri, A. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharm.* **2013**, *2013*, 848043.
 121. Baghel, P.; Roy, A.; Verma, S.; Satapathy, T.; Bahadur, S. Amelioration of lipophilic compounds in regards to bioavailability as self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Futur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *6*, 21.
 122. Singh, B.; Beg, S.; Khurana, R.K.; Sandhu, P.S.; Kaur, R.; Katore, O.P. Recent advances in self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2014**, *31*, 121–185.
 123. Czajkowska-Košnik, A.; Szekalska, M.; Amelian, A.; Szymańska, E.; Winnicka, K. Development and evaluation of liquid and solid self-emulsifying drug delivery systems for atorvastatin. *Molecules* **2015**, *20*, 21010–21022.
 124. Makuch, E.; Nowak, A.; Günther, A.; Pelech, R.; Kucharski, Ł.; Duchnik, W.; Klimowicz, A. Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of eugenol by the esterification of eugenol to new derivatives. *AMB Express* **2020**, *10*, 187.
 125. Wang, L.; Yan, W.; Tian, Y.; Xue, H.; Tang, J.; Zhang, L. Self-Microemulsifying Drug Delivery System of Phillygenin: Formulation Development, Characterization and Pharmacokinetic Evaluation. *Pharmaceutics* **2020**, *12*.
 126. Zhang, Y.; He, L.; Yue, S.; Huang, Q.; Zhang, Y.; Yang, J. Characterization and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system containing tectorigenin, an isoflavone with low aqueous solubility and poor permeability. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 632–640.

127. Shoemaker, M.; Cohen, I.; Campbell, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *93*, 381–384.
128. Bernhard, D.; Schwaiger, W.; Crazzolara, R.; Tinhofer, I.; Kofler, R.; Csordas, A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* **2003**, *195*, 193–199.
129. Ujhelyi, Z.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Fehér, P.; Kiss, T.; Veszélka, S.; Deli, M.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 564–573.
130. Pina, M.E.; Veiga, F. The influence of diluent on the release of theophylline from hydrophilic matrix tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 1125–1128.
131. Kantah, M.; Kumari, A.; He, F.; Sollano, J.D.; Alagozlu, H.; Ch, M.; Lorenzetti, A.; Morita, Y.; Marotta, F. An Orally-Bioavailable Glutathione-Based Hepatoprotective Compound in Experimental Acute Liver Injury: More Effective than Silymarin and YHK. *J. Gastrointest. Dig. Syst.* **2016**, *6*, 1–5.
132. Shamama, J.; Kanchan, K.; Mushir, A. Reassessing Bioavailability of Silymarin. *Altern. Med. Rev.* **2011**, *16*, 239–249.
133. Tiwari, G.; Tiwari, R.; Rai, A.K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2010**, *2*, 72–79.
134. Yeh, Y.-L.; Ting, W.-J.; Kuo, W.-W.; Hsu, H.-H.; Lin, Y.-M.; Shen, C.-Y.; Chang, C.-H.; Padma, V.V.; Tsai, Y.; Huang, C.-Y. San Huang Shel Shin Tang beta-cyclodextrin complex augmented the hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 150.
135. Koester, L.S.; Xavier, C.R.; Mayorga, P.; Bassani, V.L. Influence of beta-cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *55*, 85–91.
136. Al-Zein, H.; Sakeer, K.; Alanazi, F. Designing an extended release waxy matrix tablet containing nicardipine–hydroxy propyl β cyclodextrin complex. *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* **2011**, *19*, 245–253.
137. Kasperek-Nowakiewicz R., Zimmer Ł., Grochowicz M.J., Kierys A., and P.E. No

Title. „*Acta Pol. Pharm.* **2017**, *t.74*, 1901–1911.

138. Perez-Marcos, B.; Ford, J.L.; Armstrong, D.J.; Elliott, P.N.; Rostron, C.; Hogan, J.E. Influence of pH on the release of propranolol hydrochloride from matrices containing hydroxypropylmethylcellulose K4M and carbopol 974. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 330–334.
139. Bellringer, M.E.; Smith, T.G.; Read, R.; Gopinath, C.; Olivier, P. beta-Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **1995**, *33*, 367–376.
140. Gergely, V.; Sebestyén, G.; Virág, S. Toxicity Studies of Beta-Cyclodextrin BT - Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins.; Szejtli, J., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1982; pp. 109–113.
141. Li, P.; Song, J.; Ni, X.; Guo, Q.; Wen, H.; Zhou, Q.; Shen, Y.; Huang, Y.; Qiu, P.; Lin, S.; et al. Comparison in toxicity and solubilizing capacity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with different degree of substitution. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 347–356.
142. Kiss, T.; Fenyvesi, F.; Bácskay, I.; Váradi, J.; Fenyvesi, É.; Iványi, R.; Szente, L.; Tósaki, Á.; Vecsernyés, M. Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 376–380.
143. Kiss, T.; Fenyvesi, F.; Pasztor, N.; Feher, P.; Varadi, J.; Kocsan, R.; Szente, L.; Fenyvesi, E.; Szabo, G.; Vecsernyes, M.; et al. Cytotoxicity of different types of methylated beta-cyclodextrins and ionic derivatives. *Pharmazie* **2007**, *62*, 557–558.

9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Sinka Dávid Zsolt

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Sinka, D. Z., Doma, E., Szendi, N., Páll, J., Kósa, D., Pető, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szűcs, Z., Gonda, S., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Bácskay, I.: Formulation, Characterization and Permeability Studies of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Containing Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS). *Molecules*. 27 (9), 2846-, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092846>
IF: 4.927 (2021)
2. Sinka, D. Z., Hagymási, A., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Jurca, T., Németh, S., Popa, D. E., Bácskay, I.: Critical Evaluation of Modified-Release Formulation Containing Silybum Marianum Extract for Oral Application. *Farmacia*. 67 (5), 806-819, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.31925/farmacis.2019.5.9>
IF: 1.607

További közlemények

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





5. Pető, Á., Kósa, D., Haimhoffer, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., **Sinka, D. Z.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Gyöngyösi, A., Lekli, I., Szentesi, P., Marton, A., Gombos, I., Dukic, B., Vígh, L., Bácskay, I.: Nicotinic Amidoxime Derivate BGP-15, Topical Dosage Formulation and Anti-Inflammatory Effect.
Pharmaceutics. 13 (12), 2037, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13122037>
IF: 6.525
6. Józsa, L., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., **Sinka, D. Z.**, Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szabó, J., Kalló, G., Vasas, G., Bácskay, I., Fehér, P.: Formulation of Creams Containing Spirulina Platensis Powder with Different Nonionic Surfactants for the Treatment of Acne Vulgaris.
Molecules. 25 (20), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204856>
IF: 4.411
7. Pető, Á., Kósa, D., Fehér, P., Ujhelyi, Z., **Sinka, D. Z.**, Vecsernyés, M., Szilvássy, Z., Juhász, B., Csanádi, Z., Vígh, L., Bácskay, I.: Pharmacological Overview of the BGP-15 Chemical Agent as a New Drug Candidate for the Treatment of Symptoms of Metabolic Syndrome.
Molecules. 25 (2), 429-441, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25020429>
IF: 4.411
8. Hegedűs, C., Muresan, M., Badale, A., Bombicz, M., Varga, B., Szilágyi, A. T., **Sinka, D. Z.**, Bácskay, I., Popoviciu, M., Magyar, I., Szarvas, M. M., Szöllősi, E., Németh, J., Szilvássy, Z., Pallag, A., Kiss, R.: SIRT1 Activation by Equisetum Arvense L. (Horsetail) Modulates Insulin Sensitivity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats.
Molecules. 25 (11), 2541-2561, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25112541>
IF: 4.411
9. Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Horváth, L., Budai, I., Trencsényi, G., Béres, M., Dobó Nagy, C., Váradi, J., Bácskay, I., Ujhelyi, Z., Fehér, P., **Sinka, D. Z.**, Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: Development and Characterisation of Gastroretentive Solid Dosage Form Based on Melt Foaming.
AAPS PharmSciTech. 20 (7), 1-11, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-019-1500-2>
IF: 2.401





10. Vasvári, G., Csontos, B., Sovány, T., Regdon, G. J., Bényei, A., Váradi, J., Bácskay, I., Z., Fehér, P., Sinka, D. Z., Nguyen, T. L. P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: Development and Characterisation of Modified Release Hard Gelatin Capsules, Based on In Situ Lipid Formation.
AAPS PharmSciTech. 19 (7), 3165-3176, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-018-1146-5>
IF: 2.608
11. Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fehér, P., Kósa, D., Arany, P., Nemes, D., Sinka, D. Z., Váradi, J., Bácskay, I., Fenyvesi, F.: Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems.
Drug Discovery Today: Technologies. 27, 81-86, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.005>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,826

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

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

Debrecen, 2022.08.15.



10. Ábrajegyzék

1. ábra. SEDDS rendszerek formulációjának sémája (saját ábra).
2. ábra. Különböző módosított hatóanyag-leadású rendszerek kioldódási profiljai. Forrás: Somodi Orsolya: Nem konvencionális gyógyszerformák alkalmazásával kapcsolatos gyógyszerészi tanácsadás. Egyetemi doktori (PhD) értekezés, Semmelweis Egyetem, Gyógyszertudományok Doktori Iskola, Budapest, 2017.
3. ábra. Hidrofil mátrixtabletták működési sémája. Forrás: <https://api.intechopen.com/media/chapter/49600/media/image159.png> (Letöltve: 2022.07.25.)
4. ábra. Ciklodextrin zárványkomplex képződése. Forrás: <https://www.researchgate.net/profile/Ajay-Semalty/publication/261621580/figure/fig2/AS:669136896147463@1536546076394/Complexation-of-drugs-inside-the-hydrophobic-cavity-of-CDs-CD-Cyclodextrin.png> (Letöltve: 2022.07.25.)
5. ábra. Sejt kultúra permeabilitási vizsgálat sematikus ábrája. Forrás: https://www.mdpi.com/mps/mps-05-00017/article_deploy/html/images/mps-05-00017-g001.png (Letöltve: 2022.07.25.)
6. ábra. Kísérleti terv. (saját ábra)
7. ábra. TFG+S1 önmulgeáló rendszer részecskeméret-eloszlási grafikonja. (saját ábra)
8. ábra. TFG+S2 önmulgeáló rendszer részecskeméret-eloszlási grafikonja. (saját ábra)
9. ábra. DPPH teszttel mért antioxidáns kapacitás. (saját ábra)
10. ábra. SOD enzimaktivitás teszt eredménye. (saját ábra)
11. ábra. A fő görögszéna komponensek: 4-OH-izoleucin és trigonellin permeabilitási görbéi. (saját ábra)
12. ábra. A görögszénamag kivonatból kimutatott 5 különböző szteroid szaponin permeabilitási görbéi. (saját ábra)
13. ábra. A görögszénamag kivonatból kimutatott 6 különböző flavonoid permeabilitási görbéi. (saját ábra)
14. ábra. Sejtréteg TEER változásának követése. (saját ábra)
15. ábra. Sejt viabilitás görögszénamag kivonatot tartalmazó formulációkkal való kezelés után. (saját ábra)
16. ábra. SEDDS összetételek kioldódása keményszselatin kapszulákból. (saját ábra)
17. ábra. SEDDS összetételek kioldódása HPMC kapszulákból. (saját ábra)
18. ábra. Carbopolk citotoxicitása. (saját ábra)
19. ábra. Szilimarín kioldódása különböző polimereket tartalmazó mátrix tablettákból. (saját ábra)

20. ábra. HPBCD-vel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból. (saját ábra)
21. ábra. Random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból. (saját ábra)
22. ábra. Heptakis-szal komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból. (saját ábra)
23. ábra. Metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból. (saját ábra)
24. ábra. Random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból. (saját ábra)
25. ábra. HPBCD-vel komplexált szilimarin kioldódása különböző polimereket tartalmazó mátrix tablettákból mesterséges gyomornedvben. (saját ábra)
26. ábra. HPBCD-vel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben. (saját ábra)
27. ábra. Heptakis-szal komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben. (saját ábra)
28. ábra. Metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben. (saját ábra)
29. ábra. Random metil-béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarin kioldódása a Carbopol alapú mátrixtablettákból, változó közegben. (saját ábra)
30. ábra. Konvencionális keményszselatin kapszula, valamint metilált béta-ciklodextrinnel komplexált szilimarint és Noveont, illetve Carbopol 974 PNF-et tartalmazó mátrixtabletták hatóanyag-leadása. (saját ábra)
31. ábra. Noveon alapú mátrix tabletták citotoxicitási vizsgálata. (saját ábra)

11. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS). (saját táblázat)
2. táblázat. SEDDS rendszerekhez felhasznált segédanyagok. (saját táblázat)
3. táblázat. A vizsgált formulációk összetétele. (saját táblázat)
4. táblázat. Polimerek és komplexképzők kombinációi. (saját táblázat)
5. táblázat. Szilimarint tartalmazó mátrix tabletták összetétele. (saját táblázat)
6. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó mátrix tabletták összetétele. (saját táblázat)
7. táblázat. SEDDS formulációk zéta-potenciálja. (saját táblázat)
8. táblázat. Szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták átlagos tömege, és az attól való maximális eltérés. (saját táblázat)
9. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták átlagos tömege, és az attól való maximális eltérés. (saját táblázat)
10. táblázat. Szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták kopási vesztesége. (saját táblázat)
11. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták kopási vesztesége. (saját táblázat)
12. táblázat. Szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták törési szilárdsága. (saját táblázat)
13. táblázat. Ciklodextrinnel komplexált szilimarint tartalmazó Carbopol alapú hidrofil mátrix tabletták törési szilárdsága. (saját táblázat)

12. Tárgyszavak

Trigonella foenum-graecum, szilimarin, biohasznosulás-növelés, SEDDS, hidrofil mátrix tablettá, ciklodextrin, citokompatibilitás, antioxidáns hatás, permeabilitás, kioldódás

13. Keywords

Trigonella foenum-graecum, silymarin, bioavailability enhancement, SEDDS, hydrophilic matrix tablet, cyclodextrin, cytocompatibility, antioxidant effect, permeability, dissolution

14. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

Köszönetet mondok a Gyógyszertechnológiai Tanszék valamennyi munkatársának, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Fenyvesi Ferencnek, Dr. Váradi Juditnak, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Réti-Nagy Katalinnak, Dr. Nemes Dánielnek, Dr. Arany Petrának, Dr. Józsa Lizának, Dr. Pető Ágotának, Dr. Kósa Dórának, Dr. Rusznyák Ágnesnek, Dr. Haimhoffer Ádámnak, Pardi Sándornénak, Horányiné Körei Máriának, Szilágyi Erikának, Nagy Tündének és Bátoriné Pataki Brigittának, amiért munkájukkal és szakmai támogatásukkal hozzájárultak eredményeimhez. Köszönöm továbbá Vaszily Máriának, Lakatos Szilviának és Antalné Sipos Szilviának, hogy támogatták munkámat és bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért.

Ezúton is szeretném megköszönni az értekezésem alapjául szolgáló közlemények társszerzőinek a közös munka során nyújtott önzetlen segítségüket és támogatásukat. Köszönettel tartozok Prof. Dr. Vasas Gábor tanszékvezető Úrnak és a Növényteni Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy szakmai tanácsaikkal segítették tudományos munkámat.

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