

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Innovatív heterogén diszperz rendszerek
formulálása és gyógyszer technológiai vizsgálata**

Dr. Kósa Dóra

Témavezető: Dr. Ujhelyi Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Innovatív heterogén diszperz rendszerek formulálása és gyógyszer technológiai vizsgálata

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

Írta: Dr. Kósa Dóra okleveles gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Ujhelyi Zoltán

Az értekezés bírálói:

Dr. Bodor Miklós, PhD
Dr. Tábi Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora
tagok: Dr. Bodor Miklós, PhD
Dr. Tábi Tamás, PhD
Dr. Illyés Tünde Zita, PhD
Dr. Czompa Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2022.10.19. 12:30 óra.

Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerfelügyeleti és Gyógyszergazdálkodási Tanszék tanterme.

A nyilvánosságot online módon is biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a kosa.dora@pharm.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2022.10.18.) 16:00 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés és célkitűzés	2
2. Anyagok és módszerek.....	5
3. Eredmények	14
4. Megbeszélés.....	20
5. Összefoglalás	24
6. Köszönetnyilvánítás	25

1. Bevezetés és célkitűzés

A terápiás gyógyszerhatás létrejöttéhez a hatóanyagot a hatás kifejtéséhez szükséges koncentrációban kell eljuttatnunk a kezelni kívánt célszervhez. Az intravénás beadás kivételével a gyógyszeranyagoknak ehhez először be kell jutniuk a véráramba, ahonnan tovább lépnek az extra- vagy intracelluláris térbe, vagyis a hatás helyére. Ahhoz azonban, hogy ezt biztosítani tudjuk, a gyógyszer technológiai formulálás során több összetett problémával is szembe kell néznünk külsőleg és belsőleg alkalmazott gyógyszerek esetében egyaránt. A készíteni kívánt gyógyszerforma típusát, valamint a formulálás célját több szempont alapján határozzuk meg az alkalmazás módjától függően.

A farmakon szempontjából legmegfelelőbb gyógyszerforma kialakítása nemcsak a hatóanyag felszívódását és biohasznosulását növeli, hanem annak terápiás hatását is. A különböző innovatív gyógyszerhordozó rendszerek kialakítása során legnagyobb figyelmünk a hatóanyag diszperzitásának növelésére, valamint a különböző biológiai barrieréken keresztüli transzportjára irányul.

Az emberi szervezet biológiai barrierjei mellett, hogy megvédi szerveinket, szöveteinket a környezet káros fizikai, kémiai, illetve biológiai hatásaitól nélkülözhetetlen szerepet töltenek be testünk homeosztázisának fenntartásában. Ugyanakkor ezek a sejtkapcsoló struktúrák kihívást jelentenek a gyógyszerek bejuttatásának szempontjából, hiszen a hatóanyagnak a véráramba történő felszívódása, valamint a hatás helyére történő transzportja során át kell jutnia a barrieréken, valamint membránokon egyaránt. Gyógyszer technológiai szempontból fontos kutatási terület a gyógyszerjelölt molekulák barrieréken keresztüli permeabilitásának fokozása mind külsőleges, mind pedig belsőleges gyógyszerformák tervezése során. Formulálás során kulcsfontosságú lehet megfelelő penetrációfokozó segédanyagok alkalmazása, amelyek megkönnyítik, sőt fokozhatják a gyógyszeranyagok felszívódását. Számos tudományos kísérletben igazolták, hogy a lipid típusú felületaktív anyagok képesek módosítani a transz-, illetve paracelluláris transzportot, ezáltal nélkülözhetetlen segédanyagai lehetnek külsőleges és belsőleges gyógyszerhordozó rendszereknek egyaránt.

A rossz vízdékonyságú farmakonokból mikro- és nanorészecskék létrehozásával növelhető a rendszer diszperzitásfoka, amelynek következtében csökken az anyag

szemcsemérete, és nő a részecskék fajlagos felülete. Ez a megoldás nagymértékben segíti a hatóanyag felszívódását is, ezáltal növeli annak hatásosságát.

Munkám során olyan gyógyszer adminisztrációs területeket kerestünk, amelyeknél a hatékony gyógyszer bejuttatás a legnagyobb kihívást jelenti. Kísérleteimben olyan nagy diszperzitásfokú heterogén diszperz gyógyszerhordozó rendszereket formuláltam és vizsgáltam, amelyek a fent említett gyógyszerelési stratégia eredményes megvalósíthatóságát támogatják. Gyógyszerformulációs kísérleteimben nagy kihívást jelentő külsőleges és belsőleges formulációk kialakítását tűztem ki célul.

A külsőleges gyógyszerforma kialakításánál a hatóanyagok közül egyértelműen az összetett növényi hatóanyagok jelentik az egyik legnagyobb kihívást. Kísérleteink első részében külsőleges felhasználású növényi kivonatot tartalmazó gyógyszerformát alakítottunk ki, amely hatóanyagként a népgyógyászatban régóta alkalmazott *Plantago lanceolata* bioaktív komponenseit tartalmazta. A változatos polaritású növényi extraktumok biológiailag aktív komponenseinek gyenge kémiai stabilitása mellett a bőrön keresztül történő rossz penetrációs képesség nagymértékben korlátozza a gyógyszer technológiai felhasználhatóságukat. A formulálás során célul tűztük ki egy olyan új típusú folyadékkristály rendszer formulálását, amely amellett, hogy megvédi a lándzsás útifű kivonatot annak hidrolitikus bomlásától, növeli az extractum biohasznosulását is.

Enterális adminisztrációra szánt gyógyszerforma fejlesztési kísérleteink során ugyancsak a legnagyobb kihívásokkal igyekeztünk szembeállítani magunkat. Kísérleteink második részében új típusú bevételre szánt peptid tartalmú készítményt fejlesztettünk, amelyhez modell hatóanyagként a melanin koncentrálné hormon (MCH) választottuk. A formuláció során számos, a peptidek kedvezőtlen tulajdonságaiból eredő akadályt kell leküzdeni. A hatóanyag kémiai és fizikai tulajdonsága mellett rendkívüli körülmények között igényel a gasztrointesztinális rendszer peptidekre gyakorolt kedvezőtlen hatásainak megismerése és kiküszöbölése. Gyógyszerhordozó rendszerként az MCH-ből kalciummal térhálósított nátrium-alginát mikrogöngyöket képeztem nyitott polimerizációs módszerrel a peptid védelmének érdekében. A különböző permeációfokozó segédanyagok inkorporálásával sikerült fokozni az orális biohasznosulást, ezért ezek alkalmazása sikeres stratégia lehet.

A két eltérő területen megszerzett tapasztalati tudás hozzájárul olyan gyógyszerformulációs szemlélet kialakításához, amelyet segítségül hívva a legkülönbözőbb

terápiás kihívásokat is kezelni lehet. Értekezésemben bemutatom egy kihívásokkal teli külsőleges, és egy komplikált belsőleges gyógyszerforma kialakításának folyamatát.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Anyagok

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

2.2. Plantago Lanceolata kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai

2.2.1. Plantago Lanceolata levél kivonása

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

2.2.2. Folyadékkristályok formulálása

A folyadékkristályos rendszerek formulálása során a komponensek optimális koncentráció tartományát titrálós módszerrel határoztam meg a Schott titronic diszpenzer segítségével. Korábbi vizsgálatok alapján felületaktív segédanyagként a Labrasolt, Lauroglycol 90-et és Gelucire 44/14-et választottuk. A formulálás során első lépésben a szükséges mennyiségű *Plantago Lanceolata* kivonatot a tenzidek keverékében oldottam, majd kis

részletekben, állandó keverés közben vizet adtam a rendszerhez. Az extraktum mennyisége minden összetétel esetében 5%-nak felelt meg. Annak érdekében, hogy a víztartalomnak a folyadékkristályos szerkezetre gyakorolt hatását tanulmányozhassam, 10% - 90% közötti víztartalmú mintákat készítettem, miközben a Labrasol/Lauroglycol 90 tenzidek arányát állandó 6:1 értéken tartottam. Munkámat a továbbiakban négy különböző összetételű minta vizsgálatával folytattam.

2.2.3. Membrán diffúziós és permeabilitási vizsgálat

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

2.2.4. RTCA és transzepitheliális elektromos ellenállás mérés

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

2.2.5. UV-C expozíció HaCaT sejteken

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

2.2.6. Antioxidáns tesztek

2.2.6.1. DPPH gyökfogó aktivitás mérés

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

kivonatot (5 v/v%) is alkalmaztam. A gyökfogó aktivitás százalékos mértékét (AA% = antioxidáns aktivitás) Mensor és munkatársai módszere alapján határoztuk meg:

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

2.2.6.2. Lipidperoxidáció (MDA)

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

2.3. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai

2.3.1. Nátrium-alginát és kalcium-klorid oldatok készítése

Az 1,5 m/V% nátrium-alginát-oldat készítéséhez a szükséges 3,30 g alacsony viszkozitású nátrium-alginátot 200 mL desztillált vízben oldottam. Az oldatot 180 percig kevertettem (300 rpm/perc) szobahőmérsékleten a megfelelő homogenitás elérése érdekében. A 100 mM $CaCl_2$ oldatot 14,70 g kalcium-klorid-dihidrát 1000 mL desztillált vízben történő oldásával készítettem.

2.3.2. MCH tartalmú alginát gyöngyök formulálása

A folyamat során egy félautomata készülék, a Büchi Encapsulator B 395-Pro (BÜCHI Labortechnik, Svájc) segítségével a hatóanyagot nyitott polimerizációs módszerrel kalciummal térhálósított nátrium-alginát mikrogyöngyökbe inkorporáltuk a farmakon védelmének érdekében. A gyöngyképzés alapja, hogy a kontrollált áramlású lamináris folyadéksugár egyenlő méretű cseppekre esik szét az optimális frekvenciának (1800 Hz) köszönhető vibrálástól. A formulálni kívánt peptidet finoman eloszlattam 40 mL 1,50%-os nátrium-alginát-oldatban, majd az oldathoz 0,01 v/v% penetrációfokozó segédanyagot adtam (Labrasol/Transcutol HP) a különböző összetételeknek megfelelően. A keveréket ezt követően BD

LuerLock típusú fecskendőpumpával csatlakoztattam a készülékhez. Innen a folyadék először 5,00 ml/perc sebességgel a pulzáló kamrába kerül, majd áthalad a fűvókán (80 µm/200 µm/1000 µm) és egyenlő méretű cseppekre esik szét. A cseppek felülete megváltozik az elektród (1000 V) és fűvóka közti elektromos mezőn áthaladva, és az elektrosztatikus taszító erőknek köszönhetően külön jutnak a keményítő folyadékba. A gyöngyöket 15 percig hagytam keményedni a kalcium-klorid oldatban, majd mosást követően 0,40 µm pórusátmérőjű membránon szűrtem vákuumpumpával. Szűrést követően a terméket 24 órán át fagyasztva szárítottam -110 °C-on.

2.3.3. Bezáródási hatékonyság

A gyöngyökben lévő bezáródott hatóanyagtartalom meghatározásához a 100 mM kalcium-klorid keményítő oldatból 1 mL-es mintákat vettem közvetlenül formulálást követően. A peptid koncentrációjának meghatározása radioimmunoassay-vel (RIA) történt a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak segítségével. A bezáródási hatékonyságot (EE) a következő egyenlettel határoztam meg:

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

amelyben HQ a keményítő oldatban mért gyógyszer mennyiség, TQ pedig a gyöngyök teoretikus peptid tartalma.

2.3.4. Duzzadási képesség vizsgálata

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

$$EWU = \left(\frac{W_s - W_d}{W_s} \right) \times 100$$

amelyben W_s a duzzadt gyöngyök tömege, W_d pedig a száraz gyöngyök kiindulási tömege.

2.3.5. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek

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

2.3.6. Részecskeméret-eloszlás meghatározása

A 200 μm -es fűvókával előállított gyöngyök részecskeméret-eloszlását HoribaPartica LA-950V2 (Horiba, Ltd., Kyoto, Japán) lézerdiffrakciós részecskeméret-eloszlásmérő berendezés segítségével határoztuk meg, amely nedves üzemmódban, desztillált vízzel (1000× hígítás) működött. A vizsgálat Dr. Móczó János, valamint a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem közreműködésével történt.

2.3.7. In vitro kioldódás vizsgálat

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

2.3.8. Enzimatiskus stabilitás

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

2.3.9. Transzport vizsgálat

A peptid bélrendszerben történő felszívódásának modellezésére humán adenokarcinoma Caco-2 sejtvonalat használtam. A kísérlethez a sejteket először 24 lyukú ThinCert™ poliészter inzertekre (pórusátmérő: 0,40 µm; Greiner Bio-One International, Mosonmagyaróvár, Magyarország) szélesztettem 2×10^5 sejt/cm² sűrűséggel. A sejtek transzepiteliális elektromos ellenállását (TEER) 2 naponta mértem. A mérések alapján a transzport kísérlethez szükséges stabil monolayer a szélesztést követő 21-28. napon alakult ki, ekkor érték el a TEER értékek az 1000 Ω×cm² körüli értéket. A kísérlet megkezdése előtt az apikális, illetve bazális kompartmentekben a tápközeget médiumról HBSS pufferre cseréltem, majd a sejteket 30 percig 37 °C-on előinkubáltam. A donor oldat 300 mg minta 60 mL PBS pufferben 60 percig történő oldásával készült. Negatív kontrollként HBBS-t használtam. A mintákból minden esetben 400 µL oldatot pipettáztam az apikális kamrákba. A kísérlet során több összetétel permeabilitását is vizsgáltam, melyek kiindulási peptid koncentrációja minden esetben ugyanannyi volt, eltérés csak a felületaktív segédanyagok típusában volt. A membránon átjutó MCH mennyiségének meghatározásához 60 perc elteltével gyűjtöttem mintákat a bazális kompartmentekből. A mintákat radioimmunoassay-vel elemeztük.

2.3.10. Transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) mérés

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

2.4. Sejttenyésztés és sejtleletképeségi vizsgálatok

2.4.1. In vitro bőr- és bélhám modell

A sejtes kísérletek során használt HaCaT humán keratinocita és Caco-2 humán adenocarcinoma sejtvonalakat heti rendszerességgű passzálassal tartottam fenn. A sejtek egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy megőrizték differenciációs és proliferációs képességüket, mely többszöri passzálas után is megfigyelhető [102]. A sejttenyésztés során a sejteket fiziológiai körülményekhez hasonló, letapadó sejt kultúrához alkalmas sejttenyésztő edényben növesztettem DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő médium folyadékban 37 °C-on 5 % CO₂ atmoszférában 95 % páratartalom mellett. A médium 2 mM L-glutamint, 100 mg/ml gentamicint, 10 v/v% inaktivált főtápis szarvasmarha szérumot (FBS), valamint 1 v/v% nem esszenciális aminosavat tartalmazott. A tápoldatot mindkét sejt típusnál minden 3. napon cseréltem steril körülmények között, lamináris áramlású fülke alatt. A sejtek passzálása a letapadó sejtvonalakra jellemző konfluens sejtréteg kialakulásakor történt. A médium cseréhez hasonlóan a passzálas is sejtlaborban, laminár boxban történt. A folyamat első lépésében óvatosan eltávolítottam a sejtekről az elhasználdott tápoldatot, majd a sejtek felszínén maradt médiumot PBS-oldattal (Phosphate Buffered Saline) mostam le. A letapadó sejtréteget tripszin oldat (TrypLE™ Express, ThermoFisher) segítségével szuszpenzióba vittem. Az emésztés alatt a sejteket 5 percig inkubáltam, majd a reakciót friss médium hozzáadásával állítottam le, amelynek szérum tartalma inaktíválja az enzimet. A sejtuszuszpenziót ezt követően 6 percig, 1100 rpm fordulaton, szobahőmérsékleten centrifugáltam. A lecentrifugált sejtekről óvatosan leszívtam a felülúszót, majd 10 ml tiszta médiummal szuszpendáltam őket. A szuszpenzióban lévő sejtek számát Bürker kamra segítségével számoltam. A sejtuszuszpenzióból 106 db sejtet tartalmazó mennyiséget steril telepítő edénybe pipettáztam, és a médium mennyiségét kiegészítettem 10 ml-re. A keratinocita sejtek egy csoportját a további vizsgálatokhoz Da Hee Choi és munkatársai [103] munkája alapján TNF-alfa (20 ng/mL) és IL-1-béta (25 ng/mL) proinflammatorikus citokinek

kombinációjával kezeltem, hogy TNF-alfa/IL-1-béta indukált humán PSmHaCaT sejteket kapjunk. A további kísérletekhez 10 és 30 passzázs számú sejteket használtam.

2.4.2. MTT sejtéletképességi vizsgálat

A kísérlet során az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje a sárga színű vízdoldható MTT festéket (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) lila színű, vízben oldhatatlan formázán kristályokká redukálják. A módszer szelektív, mert csak az élő sejtek mitokondriumában található aktív dehidrogenáz enzim. A keletkező formázán só sósavas izopropanollal oldatba vihető, és az oldat abszorbanciája spektrofotométerrel mérhető. Az így meghatározott abszorbancia érték korrelál az élő sejtek számával. A sejtéletképességi vizsgálatokhoz a HaCaT és Caco-2 sejteket az előző pontban ismertetett módon 7 napig növesztettem 96 lyukú tenyésztő plate-ben 104 sejt/lyuk sűrűséggel. A növesztés során a fáradt médiumot a 3. napon lecseréltem. A konfluens sejtréteg kialakulását követően a tápoldatot eltávolítottam, majd a sejteket meghatározott ideig inkubáltam a vizsgálati mintákkal.

2.5. Statisztikai analízis

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

3. Eredmények

3.1. *Plantago Lanceolata* kivonat tartalmú folyadékkristályok formulálása és vizsgálatai

3.1.1. *Plantago Lanceolata* levél kivonása

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

3.1.2. Folyadékkristályok formulálása

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

3.1.3. In vitro kioldódás vizsgálat

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

3.1.4. HaCaT sejtproliferációs vizsgálat

A proliferációs vizsgálatokat $10^4/200$ μL sűrűséggel szélesztett HaCaT sejteken végeztem az xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) segítségével. A HaCaT sejtproliferáció impedancia mérésen alapuló meghatározása a sejtinдекс nyilvánvaló növekedését mutatta mindegyik esetben eltérő proliferációs kinetika mellett. Míg a kezeletlen HaCaT sejtek hét nap elteltével alakították ki a konfluens monolayer sejtréteget, az IL-1-béta - és a TNF-alfa stimulált keratinociták (PSmHaCaT) a gyors proliferáció következtében hamarabb érték a platófázist. Ezen felül a PSmHaCaT keratinociták magasabb sejtinдекс értékeket mutattak ebben a szakaszban. Ennek megerősítésére a sejtek transzepithelialis elektromos ellenállását (TEER) is mértem, mely mérések eredménye összhangban van az RTCA tesztekkel. Magasabb TEER értékeket figyeltem meg a PSmHaCaT sejteknél, mint a kezeletlen keratinociták esetében.

3.1.5. MTT sejtleletkéesség vizsgálat

A biztonságos alkalmazás biztosításának érdekében MTT citotoxicitás vizsgálatokat végeztem HaCaT sejtvonalon. A formulációk citotoxicitását különböző koncentrációkban vizsgáltam. Az egyes összetevőket szintén teszteltem külön-külön. Az LC rendszerek összetételét annyiban változtattam meg, hogy a vizet azonos mennyiségű DMEM sejtkultúrás médiumra cseréltem. Ez azonban az LC rendszer tulajdonságain nem változtat, mivel a vízhez hasonlóan a DMEM is poláros. A formulált LC rendszerek, illetve azok összetevői sem befolyásolták jelentősen a sejtleletkéességet. A sejtleletkéesség még magasabb koncentrációk esetében is 50 % felett volt a negatív kontrollhoz képest (foszfát-puffer, PBS). Megállapítottam, hogy az összes kompozíció jól tolerálható. Nem tapasztaltam szignifikáns különbséget az LC-rendszerekkel, illetve a negatív kontrollként alkalmazott PBS-sel kezelt csoportok esetében, bár mind közül a II. összetétel csökkentette legkevésbé a sejtleletkéességet.

3.1.6. DPPH gyökfogó aktivitás vizsgálat

A vizsgálat alapja a DPPH szabadgyök antioxidáns jelenlétében történő színváltozása. A folyadékkristály rendszereket Plantago kivonattal, illetve anélkül is vizsgáltam. Kontrollként a megfelelő vak formulációkat és 5% Plantago kivonat vizes diszperzióját (CE) alkalmaztam. Mint azt már korábban említettem, a formulált LC minták szintén 5 v/v% PL kivonatot tartalmaztak. Az antioxidáns aktivitás százalékos arányát DPPH teszttel mértem. A DPPH gyökfogó aktivitást Brand-Williams és mtsai által leírt módszer alapján mértem. Az

eredmények alapján szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a vizsgált csoportok között. Az elvégzett vizsgálat megerősítette, hogy az összes kompozíció képes jelentősen gátolni a DPPH oxidációját. Megállapítottam, hogy az I. és a II. összetételek a leghatékonyabbak, ezzel szemben a IV. összetétel mutatta a legkisebb aktivitás, bár antioxidáns kapacitása így is jelentősen magasabbnak bizonyult, mint a kontroll csoporté (CE).

3.1.7. Lipidperoxidáz (MDA) vizsgálat

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

3.1.8. UV-C expozíció HaCaT sejteken

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

3.2. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai

3.2.1. Bezáródási hatékonyság

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

3.2.2. Duzzadási képesség meghatározása

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

3.2.3. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek

Az MCH tartalmú alginát gyöngyök pásztázó elektronmikroszkópos felvételei alapján a mikrogyöngyök gömb alakú morfológiát mutatnak, felületükön néhány apróbb zúzódással, melyek valószínűleg a száradási folyamat során alakultak ki. A vizsgálat alátámasztotta, hogy a mikrogyöngyök átmérője összhangban van a részecskeméret-eloszlás meghatározás eredményeivel.

3.2.4. Részecskeméret-eloszlás meghatározása

A mikrogyöngyöket HoribaPartica LA-950V2 lézerdiffrakciós berendezés segítségével vizsgáltuk. A mért értékeket a 4. táblázatban foglaltam össze. Az eredmények alapján a formulált mikrogyöngyök szemcsemérete megközelíti a teoretikus 200 μm -t.

3.2.5. In vitro kioldódás vizsgálat

Az in vitro kioldódás vizsgálatot pH=6,80 foszfát-puffer oldatban végeztem, a mintákat RIA módszerrel analizáltuk. A kioldódási profilokat a kísérleti adatok ábrázolásával határoztam meg. A mért értékek alapján kétfázisú hatóanyagleadás figyelhető meg az összes összetétel esetében. Az MCH kezdetben elnyújtva szabadult fel, az első 60 percben nem lehetett

szignifikáns peptid koncentrációt mérni. Egy óra elteltével azonban megindult a hatóanyag robbanásszerű felszabadulása, ahol a bezáródott MCH 68,30 %-a kioldódott a gyöngyökből, majd 120 perc elteltével ez az arány szignifikánsan csökkent.

3.2.6. Enzimatisz stabilitás

Az enzimatisz stabilitás vizsgálat eredménye alapján a szimulált gyomornedvben történő 30 perces inkubációt követően $3,00 \pm 0,50\%$, szimulált bélmedvben pedig $8,00 \pm 0,50\%$ aktív MCH volt kimutatható a közegből a szabad, nem formulázott minták esetében. A kísérlet során szimulált gyomornedvben 60 perc elteltével teljesen elbomlott a szabad MCH, míg a 2 órás szimulált bélmedvben való inkubáció után mindössze $1,00 \pm 0,50\%$ szabad peptid visszamérés történt. A formulált mikrogyöngyök esetében a bezáródott MCH legalább 70%-a védett maradt a gyomor-, és bélmedv emésztő enzimjeivel szemben. Az eredmények tehát alátámasztották, hogy a formulált készítmények képesek sikeresen megvédeni a modell peptidet a gasztrointesztinális traktuszban történő degradációtól.

3.2.7. MTT sejtéletképességi vizsgálat

A sejtéletképességi vizsgálat eredményei alapján a felhasznált alap- és segédanyagok az alkalmazott koncentrációban in vitro biztonságosnak bizonyultak. Annak ellenére, hogy koncentrációfüggő toxicitás figyelhető meg, a gyöngyképző nátrium-alginát, valamint kalcium-klorid-dihidrát még magasabb koncentrációknál sem mutatott releváns toxicitást. Mivel a felületaktív segédanyagok jelentősebb toxicitást mutattak nagyobb koncentrációknál, meghatároztuk azok IC₅₀ értékeit, mely Labrasol esetében 0,41 v/v%, Transcutol HP esetében 0,37 v/v%, Labrasol:Transcutol HP 1:1 arányú keveréke esetében pedig 0,35 v/v%. A vizsgálat eredményei alapján a 0,01 v/v% penetrációfokozó segédanyagot tartalmazó gyógyszerhordozó rendszerek sem károsították a Caco-2 monolayer sejtréteget.

3.2.8. Transzport vizsgálat

A permeabilitás vizsgálat megkezdése előtt az inzerteket benőtt Caco-2 monolayer a kísérlet megkezdéséhez megfelelően magas ($600 \Omega \times \text{cm}^2$) transzeptithelialis elektromos ellenállás (TEER) értéket mutatott, ami a sejtek közötti szoros kapcsolódásra utalt. Az eredmények alapján az alginát gyöngyökbe zárt MCH permeabilitása szignifikánsan magasabb volt, mint az anyagot oldott formában tartalmazó minta esetében. A formulációk közül

megnövekedett peptid permeabilitást tapasztaltunk penetrációfokozó segédanyagok jelenlétében, ami a sejtek közötti paracelluláris útvonalak megnyílására utalhat.

3.2.9. Transzepiteliális elektromos ellenállás mérések

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

4. Megbeszélés

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

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

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

4.2. Peptid tartalmú nátrium-alginát gyöngyök formulálása és vizsgálatai

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

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

5. Összefoglalás

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

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

6. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Jelölt: Kósa Dóra

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,384

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

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

Debrecen, 2022.05.23.

