

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Gyógyszerészeti tartósítószeres biokompatibilitási vizsgálata különböző sejtkultúrás modell rendszereken

dr. Nemes Dániel

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



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Gyógyszerészeti tartósítószeres biokompatibilitási vizsgálata különböző sejt kultúrák modell
rendszeren

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

Írta: dr. Nemes Dániel okleveles gyógyszerész

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

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

Az értekezés bírálói:

Szabóné Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktora
Dr. Dér Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora

tagok: Szabóné Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktora
Dr. Dér Péter, PhD
Dr. Balogh György Tibor, MTA doktora
Dr. Herczeg Mihály, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021.06.18. 13:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a nemes.daniel@pharm.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2021.06.17.) 20 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	4
II. Célkitűzés	8
III. Anyagok és módszerek.....	10
IV. Eredmények	11
IV./1. Egyszerű segédanyag-tartósítószer interakciók vizsgálata	11
IV./2. Tartósítószer-segédanyag citotoxicitási és antimikrobiális interakciók vizsgálata komplex koszolvens rendszerekkel.....	11
IV./3. Szorbát, benzoát és propionát sók citotoxicitási vizsgálata.....	13
IV./4. Különböző szorbinsav származékok biokompatibilitási és antimikrobiális vizsgálata.....	13
IV./5. Különböző illóolaj tartalmú emulziók formulációja és biokompatibilitási vizsgálata és interakciója kálium-szorbáttal.....	14
IV./6. Különböző parabének citotoxicitási és antimikrobiális vizsgálata.....	16
V. Megbeszélés	17
VI. Összefoglalás	21
Anyagi támogatás és Köszönetnyilvánítás	22

I. Bevezetés

Az Európai Parlament és Tanács 1333/2008/EK rendeletének definíciója szerint a tartósítószer „olyan anyagok, amelyek a mikroorganizmusok okozta romlás megakadályozásával meghosszabbítják az élelmiszerek eltarthatóságát, és/vagy védelmet biztosítanak a kórokozó mikroorganizmusokkal szemben”. Alapvető tény, hogy a vizes közeg kedvez a különböző mikroorganizmusok növekedésének, ezért az élelmiszerek mellett többadagos, akár ízjavítóként cukrokat is tartalmazó gyógyszerkészítményeket, étrendkiegészítőként forgalmazott termékeket is szükséges tartósítani. Ma Magyarországon a törzskönyvezett készítményekben a parabének, a benzoátok és a szorbátok fordulnak elő leggyakrabban, mint mikrobiológiai tartósítószer.

A para-hidroxi-benzoésav észterei a parabének, melyek antimikrobiális hatása és tartósítószerként való alkalmazása már az 1950-es évek óta ismert. Ekkortól terjedtek el széles körben, mint tartósítószer az élelmiszer-, gyógyszer- és kozmetikai iparban hiszen a mikrobiológiailag hatékony koncentráción íztelenek, szagtalanok, kémiaiilag alapvetően stabilak. Jellemző, hogy kombinációban alkalmazzák őket. A parabének antimikrobiális hatásáról elmondható, hogy fajonként kell meghatározni a MIC értéket, nem lehet általánosan lefedni a vegyületcsalád spektrumát, mivel egyformán találunk rezisztens és érzékeny fajokat a gombák, a Gram pozitív és a Gram negatív baktériumok köréből is.

A parabének káros hatásai alapvetően két nagy csoportra bonthatóak, egyrészt allergizáló, kontakt dermatitist okozó bőrön kifejtett hatásukra, másrészt a humán endokrin rendszerre gyakorolt különböző hatásaikra. Előbbivel kapcsolatban szakirodalom arra jutott, hogy a parabén allergia sokkal ritkább, mint azt gondoltuk, egyes kutatók már felvetik annak a lehetőségét is, hogy elhagyják a bőrgyógyászati allergén tesztelés vegyületei közül ezeket az észtereket. Ennek oka az érzékenyebb módszerek, a betegek többszöri, alaposabb tesztelése és hogy kozmetikai termékekben limitált a parabének koncentrációja csökkentve az allergia kialakulásának esélyét. 1997-98-ban jelentek meg az első tudományos tanulmányok, melyek *in vitro* receptorkötődési és *in vivo* állatkísérletek alapján kimutatták a vegyületcsoport gyenge kötődési készségét ösztrogén receptorokhoz. Mind humán, mind állatkísérletes eredmények bizonyítják, hogy a vizeletből mérhető parabén szint (a vizelet az elsődleges exkréciós út) korrelál a menstruációs ciklus zavaraiival, pajzsmirigyhormon szinttel, de születendő utódok anatómiai paramétereivel, viselkedésével. Ugyanakkor leszögezendő, hogy a szakirodalmi adatok döntő többsége retrospektív, nem pedig tervezett klinikai tanulmány, így nem lehet

kizárni más tényezők oki szerepét a felsorolt és a további megfigyelt biológiai hatások tekintetében.

A szorbátok, a 2,4-hexadiénsav, azaz a szorbinsav sói, észterei. Az anyamolekula nevét a madárberkenye (*Sorbus aucuparia*) latin neve után kapta, miután a fa gyümölcse gazdag a vegyületben és innen izolálták először azonban több fajból is kimutatható. Élelmiszer és gyógyszeripari felhasználásáról tartósítószerként már 1945-től kezdve találhatóak publikációk, melyek leírták gomba ellenes hatását és toxikológiáját. A különböző toxicitási vizsgálatok eredményei évtizedek óta a szorbinsav és a kálium-szorbát biztonságosságát bizonyítják segédanyagként, komolyabb felmerülő aggály nélkül. Allergizáló hatásuk szintén elhanyagolható, mérgezéses tüneteket csak a napi maximálisan engedélyezett mennyiség krónikus, sokszoros túllépésével sikerült produkálni. Antimikrobiális hatásukat tekintve elsősorban gombák és Gram pozitív baktériumokra hatnak.

Napjainkban erős politikai és közéleti nyomás van a kutatókon, hogy lehetőség szerint mérsékeljék a kutatások során az állatkísérletek mértékét. Már az ötvenes évek végén megjelent a 3R, mint vezérelv, mely a helyettesítés (replace), csökkentés (reduce) és a tökéletesítés (refine) hármásával kívánta csökkenteni a tudományos célra felhasznált állatok számát és azok szenvedéseit. Ezen törekvésekkel összhangban, kísérleteimben Caco-2 sejtvonalon végeztem citotoxicitási vizsgálatokat MTT és NR tesztek segítségével, mely módszerek illetve sejtvonal különböző EU-s jóváhagyással bírnak in vitro vizsgálatok (Európai Bizottság 440/2008 és 2017/735 rendeletei)

Az MTT-teszt egy enzimatikusan katalizált redox reakció, mely a tetrazólium gyűrűt tartalmazó festék (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid, MTT) redukált és az oxidált formájának eltérő színén alapszik. **Mosmann** fejlesztette ki proliferáció és citotoxicitás mérésre 1983-ban. Az MTT-teszt a közvélekedéssel ellentétben nem a sejtek mitokondriális aktivitásától függ direkt módon. Pozitív töltése miatt a molekula átjut a sejtmembránon és a sejten belül bárhol lokalizált NAD(P)H függő oxidoreduktáz és dehidrogenáz enzimek katalizálják a reakciót, ami során a tetrazólium gyűrű felnyílik és töltését elveszti a vegyület. A NAD(P)H mellett egyéb elektrondonorok is szerepet játszanak a folyamatban, így például a szukcinát vagy a piruvát. A reakcióban keletkező formazán só oldhatatlansága miatt végpont jelzéses az MTT-teszt. Gyors, egyszerűen kivitelezhető, hiszen a képződő formazán só koncentrációja spektrofotometriásan mérhető. Téves eredményeket olyan esetekben kaphatunk, amikor az adott vegyület nem közvetlen nekrozist vagy apoptozist okoz, hanem tartósan befolyásolja a sejt oxidoredukciós potenciálját, akár növelve, akár

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

A neutrálvörös (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid, NR) egy fenazin származék, melyet a sejtek fagocitózis útján vesznek fel a sejtmediumból, 1985-ben **Borenfreund és Puerner** használták először citotoxicitás mérésére. A módszer alapja, hogy a festék semleges pH-n nem vagy csak gyengén töltött, emiatt a negatív potenciálú sejtmembránon könnyen átjut, a lizoszómák erősen savanyú közegében töltötté válik és mivel a lizoszómák belső membránja semleges töltésű így már nem tud kijutni. A lizoszómák savas kémhatásának fenntartása ATP működtette protonpompákat igényel. A sejtek által leadott vagy felvett festék mennyisége spektrofotométerrel mérhető. A módszer pontosságát rontja, ha a lizoszóma membránokat vagy az ATP szintet befolyásoló vegyületekkel kezeljük a sejteket, mivel ekkor nem nekrotikus/apoptotikus sejtek is alacsony életképességet mutatnak. Jól kvantifikálható, gyors, egyszerű, olcsó, stabil, nem toxikus maga a festék és változatos körülmények között, sokféle sejtvonalon alkalmazható.

A Caco-2 egy 72 éves kaukázusi rasszú férfi elsődleges vastagbél daganatából izolált, epitheliális, adherens, hipertetraploid, sejtvonat. Differenciáció során konfluens monolayer alakítanak ki és a sejtek morfológiájukat és funkcionalitásukat tekintve a vékonybél enterocitáinak feleltethetőek meg, polarizáltak. A rengeteg specifikus transzporter fehérje illetve az *in vivo* körülményekhez hasonló sejt-sejt közötti kapcsolat miatt általánosan elterjedt modellrendszer sejttenyésztő inzertekre szélesztve a különböző hatóanyagok, vegyületek felszívódásának vizsgálatára. Citotoxicitás mérésére is széleskörben elterjedt a legkülönbözőbb vegyületek, mikrobiális toxinok esetén. A sejtvonat hátránya, hogy a valós vékonybél hám több, egymással interakcióban álló sejttypusból épül fel, így pontos modellezésre nem képes és nem termel a vékonybéltre jellemző nyálka polimereket.

A mikrobiológia az elmúlt évtizedben kezdte el alkalmazni *Galleria mellonella*, a nagy viaszmolyláróját, az azonos fajú, de különböző törzshe tartozó kórokozók virulenciájának összehasonlítására. A lárva mind sejtes, mind humorális immunválasszal is rendelkezik, melyek alapvető hasonlóságot mutatnak az emlősök immunrendszerének bizonyos elemeivel. Az immunrendszer különös ismertetőjegye még a melanizáció, mely helyi immunreakciót, tokképződést, szöveti károsodást jelent. *In vivo* terápiák, antimikrobiális szerek hatásosságának mérésére is használták, egyúttal ezen vegyületek tolerálhatóságát is mérték. Azonban kiderült, hogy a lárva által mutatott relatív toxicitás arányosan hasonló az egereken vagy patkányokon megfigyelthez. Azóta alkalmazták már különböző szénlánc hosszúságú ionos 1-alkil-3-metilimidazol kloridok lipid nanokapszulák, fém nanorészecskék biokompatibilitásának

megállapítására. Népszerűsége mint toxikológiai modellszervezet folyamatosan nő az elmúlt években. A gyakorlatban a kísérletek befecskendezéssel történnek általában a bal utolsó lábba egy vékony tűvel, de lehetséges még az etetés és az erőltetett etetés is. A faj, mint modellszervezet legnagyobb hátránya ugyanakkor, hogy jelenleg még nem állnak rendelkezésre állandósult törzsek ismert fenotípusokkal (genotípusokkal) ellenőrzött kereskedőknél, amik mindig ugyanolyan lárvákat eredményeznek, csak egyes kistermelőktől lehet őket beszerezni.

II. Célkitűzés

Doktori kutatómunkám kezdeti célja az volt, hogy a Gyógyszertechnológiai Tanszéken rendelkezésre álló, rutinszerűen végzett citotoxicitási vizsgálatok segítségével átfogóbb képet kapjak a folyékony gyógyszerformákban gyakran használt tartósítószer sejtkárosító hatásának természetéről, módosíthatóságáról. Kérdésfeltevéseink az alábbiak voltak:

- 1. Módosítják-e más technológiai segédanyagok a tartósítószer citotoxicitását? Metil-**parabén és benzalkónium-klorid esetén Caco-2 sejteken, MTT-teszttel vizsgáltuk, hogy tapasztalható-e emelkedett vagy csökkent sejtkárosodás tenzid és viszkozitásnövelő polimer oldat hozzáadása esetén.
- 2. Módosítják-e adott technológiai segédanyag-kombinációk a tartósítószer sejtkárosító hatását humán és mikrobiális sejteken? Metil-, etil-, *n*-propil- és *n*-butil-**parabént formuláltunk két komplex kozszolvens rendszerben, melyek különböző citotoxicitású oldószereket és tenzideket tartalmaztak. Caco-2 sejteken MTT-teszttel vizsgáltuk a citotoxicitást és *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* fajokon az antimikrobiális hatást mikrodilúciós módszerrel.
- 3. Tartósítószerként alkalmazott karbonsavak különböző sói azonos mértékben csökkentik-e a sejtéletképességet? Szorbinsav, benzoésav és propionsav nátrium, kálium és kalcium sóját hasonlítottunk össze Caco-2 sejteken NR és MTT-teszttel, hogy a kísérő ionok citotoxicitást befolyásoló hatását vizsgáljuk.**
- 4. Miben különböző a sejtkárosító hatása a szorbát-észtereknek a szorbinsavhoz képest?** Szorbinsavat, kálium-szorbátot, etil-szorbátot és izopropil-szorbátot hasonlítottunk össze, hogy megvizsgáljuk, a szorbát-észterek toxicitása és gátló/ölő hatása, hogyan viszonyul az anyamolekulához képest. A biokompatibilitást Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel és áramlási citometriával, *G. mellonella* lárvákön befecskendezéssel, az antimikrobiális hatást pedig *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* fajokon idő-ölés teszttel vizsgáltuk.
- 5. Milyen biokompatibilitási interakciók lépnek fel illóolajok és tartósítószer között?** Citrom, rozmarying és borsmenta illóolaját formuláltuk emulzióként, mint lehetséges tartósítószerket és ezek hatását vizsgáltuk Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel, *G. mellonella* lárvákön befecskendezéssel, valamint *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* fajokon mikrodilúciós módszerrel. Az emulziókat kálium-szorbáttal is kiegészítettük, hogy szinergizmusokat találjunk.
- 6. Mennyiben eltérő a konstitúciós izomer parabének sejtkárosító hatása? *n*-Propil-, izopropil-, *n*-butil-, izobutil-, *n*-pentil-, izopentil-parabén vízdékonyságát, citotoxicitását**

vizsgáltunk Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel, valamint *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* fajokon mikrodilúcióval, hogy az elágazó és nem elágazó szénláncú észterek közötti szerkezet-hatás összefüggéseket feltárjuk.

III. Anyagok és módszerek

A kísérletsorozatokban felhasznált tartósítószerket a Magyarországon kereskedelmi forgalomban elérhető legfinomabb minőségben szereztük be.

A Gattefossé bocsájtotta nagyilelkűen rendelkezésünkre a Labrasol[®] és a Capryol[®] PGMC termékeket.

A kísérletekhez használt Caco-2 sejtek az ECACC-tól származtak, kiegészített DMEM médiumban lettek tenyésztve. A sejteket passzálás után 96 lyukú mikroplate-ekre szélesztettük. 1 hét után a használt médium eltávolításra került és a tesztoldatokat a plate-ekre pipettáztuk. A sejteket egységesen, 30 percig inkubáltuk a tesztoldatokkal, majd ezeket eltávolítottuk és a reagensek hígított oldatait pipettáztuk a sejtekre. Ezután 37 °C-on tartottuk a plate-eket, MTT-teszt esetén 3, NR-teszt esetén 2 óra időtartamig. A reagensek eltávolítása után alapos mosással és megfelelő előhívó szerrel roncsoltuk a sejteket és alakítottunk ki homogén oldatokat a plate lyukjaiban, amiket spektrofotometriásan mértünk.

A hatodik fejlődési stádiumban lévő *G. mellonella* lárvákat érkezésük után megtisztítottuk és kb. 10 °C-on, sötét helyen tároltuk 1-2 napig, majd felmelegítettük fel őket szobahőmérsékletre a kísérletekhez. Az elpusztult vagy túl kicsi példányokat kiszelektáltuk. A befecskendezésre az utolsó lábacska utáni farki területen került sor. Életképességüket a megadott időpontokban, finom fizikai kontaktussal ellenőriztük.

Az antimikrobiális vizsgálatokra az Orvosi Mikrobiológiai Intézetében került sor, az Intézet munkatársai, dr. Kovács Renátó László egyetemi tanársegéd, Nagy Fruzsina és Tóth Zoltán PhD hallgatók végezték a kísérleteket és a kiértékelést. Az abszorbancia mérését a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztem.

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

A különböző nyílt és elágazó alkil láncú parabéneket etanolos törzsoldataikból hígítva vizsgáltuk. Minden vizsgálathoz ezen PBS-sel történő oldatok hígításával, centrifugálásával és a felülúszó 0,2 µm pórusú membránszűrésével történt. A HPLC mérésekhez a 0,1 m³/v%-ra hígított oldatokat egy Merck-Hitachi ELITE LaCrom készülékkel és Agilent HC-C18(2) (150x4,6 mm) oszloppal vizsgáltuk. A mozgó fázis metanol volt. A vízdékonyságot a 256 nm-en korábban felvett kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

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

IV. Eredmények

IV./1. Egyszerű segédanyag-tartósítószer interakciók vizsgálata.

Az első kísérletsorozat folyamán Caco-2 sejteken vizsgáltam két, magisztrális gyógyszerkészítésben alkalmazott tartósítószer, a metil-parabént és a benzalkónium-kloridot MTT-teszt segítségével. A metil-parabént poliszorbát 20-szal, míg a benzalkónium-kloridot a Labrasol®-al együtt vizsgáltam.

A poliszorbát 20 hozzáadása után minden vizsgált koncentráción rendkívül alacsony, 20% körüli sejtleletképeséget mértünk, míg a 2-hidroxietyl-cellulózt tartalmazó *Mucilago hydroxyethylcellulosi* képes a metil-parabén és a poliszorbát 20 sejtkárosító hatását jelentősen tompítani, még pedig koncentrációfüggő módon.

A benzalkónium-klorid és a Labrasol® szintén potenciózták egymás hatását, azonban a polimer semmilyen védő hatást nem tudott mutatni. Kísérleteinket elvégeztük metil-parabén - Labrasol® és benzalkónium-klorid – poliszorbát 20 párosításokkal is, azonban hasonló eredményt kaptunk – a nyák nem tudta növelni a sejtleletképeséget.

IV./2. Tartósítószer-segédanyag citotoxicitási és antimikrobiális interakciók vizsgálata komplex koszolvens rendszerekkel.

Továbbra is a folyékony, bevételre szánt gyógyszerformák tématerületén kutatva döntöttünk úgy, hogy komplex koszolvens rendszereket képzünk, melyek egyrészt egy vízzel jól elegyedő oldószerből, másrészt egy tenzidből és parabénekből állnak. Rendszereinket az egyes komponensek egyedi IC₅₀ értékeinél alacsonyabb koncentrációkból állítottuk össze, hogy a segédanyagok együttes hatását tudjuk megfigyelni és ne egy adott segédanyag citotoxicitása fedje el az esetleges interakciót:

1. rendszer: 30 % glicerin, 0,002 % poliszorbát 20, 0,2 m/v% parabén, PBS oldószer

2. rendszer: 1,4 % etanol, 0,5 % Capryol® PGMC, 0,2 m/v% parabén, PBS oldószer

A rendszereket hígítottuk, 0,2; 0,02; 0,002 és 0,0002 m/v% parabén tartalomra, így természetesen az oldószer és a tenzidek is azonos mértékben hígultak.

Kontrollként az egyes tartósítószer alkoholos törzsoldatait is vizsgáltuk, hogy milyen sejtkárosító hatással bírnak önmagukban, a rendszerekben lévő egyéb gyógyszer technológiai segédanyagok nélkül. Ezek az eredmények egyértelműen mutatják, hogy a szénlánc hossz növeli a citotoxicitást, a *n*-butil-parabén fejt ki a legnagyobb sejtkárosító hatást, ezt a *n*-propil-parabén követi, majd az etil- és a metil-parabén. A *n*-butil-*n*-propil és a metil-etil párosok a vizsgált koncentrációkon egymástól nem voltak szignifikánsan különbözően, a két tandem viszont nagyobb koncentráción egymástól szignifikánsan különbözött.

Az első rendszerben formulált parabének, a vizes-etanolos oldatokhoz nagyon hasonló eredményeket mutattak, a citotoxicitási sorrend azonos volt.

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

Az antimikrobiális vizsgálatok során eltérő koncentrációkat alkalmaztunk, mivel szakirodalmi adatok alapján a nagyon alacsony koncentrációkon már biztosan nem tapasztaltunk volna gátló hatást. Választott parabén koncentrációink ezért a 0,1; 0,15; 0,25 $\text{m}^{\text{v}}\%$ értékek voltak, így az alkoholos oldatok és a második rendszer etanol tartalma rendre 0,7, 1,05 és 1,75 $\text{v}^{\text{v}}\%$ volt. A mikrodilúciós kísérleteket az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársai, dr. Kovács Renátó László és Nagy Fruzsina végezték.

A *C. albicans* gombafaj vizsgálata során minden esetben alacsony életképességet tapasztaltunk. *C. parapsilosis*. esetén megfigyelhettük, hogy míg a parabének alkoholos oldatai teljesen elpusztították a gomba sejteket, addig a formulációk rontották a parabének hatásosságát és a növekvő koncentráció növelte a sejtéletképességet több esetben is, akár 50%-ot meghaladó mértékben is. A *C. glabrata* a korábbiakhoz képest eltérő érzékenységet mutatott, hiszen az első rendszerben formulált parabének kevésbé voltak hatékonyak, mint az alkoholos oldatok vagy a második rendszerben formulált parabének.

A Gram pozitív coccus *S. aureus* az alkoholos oldatoknak ellenállt, egyedül a *n*-butil parabén tudott gátló hatást kifejteni. Mind az első rendszer, mind a második rendszer kontroll oldalatai, parabének nélkül teljes sejtpusztulást okoztak.

A Gram negatív pálca *E. coli* vizsgálata során az etanolos oldatok esetén a hosszabb szénláncú származékok kevésbé voltak hatékonyak, az első rendszer teljes sejthalált okozott, míg a második rendszer esetén szintén megfigyelhető volt, hogy a formuláció önmagában hatékonyabb, mint az *n*-propil- és *n*-butil-parabénnel együtt.

A *P. aeruginosa* esetén az első rendszer ismét teljes sejthalált okozott, míg a többi esetben a metil-parabén bizonyult a leghatékonyabb tartósítószernek. A második rendszer hatékonyan növelte mind önmagához, mind az alkoholos oldatokhoz képest az etil- és a *n*-butil-parabén hatását.

Összességében kijelenthető az eredmények alapján, hogy a vizsgált négy, leggyakrabban alkalmazott *p*-hidroxibenzoésav alkil észter citotoxicitása, illetve antimikrobiális hatása

nagymértékben módosul a jelenlévő egyéb, gyógyszer technológiai segédanyagok által, illetve nem állítható fel univerzális, minden körülményre illetve fajra érvényes hatásossági sorrend a származékok között.

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

A szorbinsav, benzoésav illetve a propionsav és sóik elterjedt tartósítószer és kíváncsiak voltunk arra, hogy azonos savmaradékion koncentráció esetén az egyes sók oldatai eltérő citotoxicitási profillal bírnak-e, van-e a kísérő ionnak valamilyen sejtleletképeséget befolyásoló tulajdonsága. Új citotoxicitási módszerként a Neutral Red (NR) tesztet vezettük be az MTT-teszt mellett. Méréseinket Caco-2 sejteken végeztük.

Az eredményeken az látszott, hogy az MTT-teszt esetén jelentős, 50%-os életképeség csökkenés csak a kalcium sók esetén volt megfigyelhető, ellenben az NR-teszt semmilyen életképeség csökkenést nem mutatott. Párhuzamosan mikrodilúciós antimikrobiális vizsgálatokat is végeztünk, melyek nem mutattak jelentős eltérést az egyes sók eredményei között a különböző alkáli-, alkáliföldfém ionok tekintetében.

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

Kísérletsorozatunk alapját egy 2007-es közlemény adta, melyben különböző oldalláncokkal rendelkező szorbinsav észtereket vizsgáltak antimikrobiális szempontból, hogy a szerkezet-hatás között korrelációt találjanak. Két egyszerű alkil-láncú vegyület választottunk ki a közleményben ismertettek közül, az etil-szorbátot és az izopropil-szorbátot és összehasonlítottuk őket a szorbinsavval és kálium-szorbáttal. Az etil-szorbát kereskedelmi forgalomban elérhető volt, míg az izopropil-szorbát szintetizálásában és tisztításában a Gyógyszerészi Kémia Tanszékének munkatársai segítettek, prof. dr. Herczegh Pál, prof. dr. Borbás Anikó, dr. Kelemen Viktor, dr. Szűcs Zsolt, Róth Józsefné, Bodza Márta és a Szerves Kémiai Tanszék munkatársa Balla Sára. A sejtleletképeséget Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel vizsgáltunk. Új módszerként *in vivo* toxicitást is vizsgáltunk, *Galleria mellonella* lárvákon, melyekbe a különböző koncentrációjú anyagokat fecskendeztünk be illetve áramlási citométerrel is vizsgáltuk, hogy a négy anyag nekrotikus vagy apoptotikus hatású-e. Az eredeti közlemény toxicitási adatokkal egyáltalán nem szolgált így ezekkel a módszerekkel igyekeztünk minél pontosabb leírást adni a molekulákról.

Az MTT-teszt és az NR-teszt eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált szorbinsav származékok legtöbbje koncentrációfüggő módon csökkenti a sejtleletképeséget. A két észter

a szorbinsav és a kálium-szorbát között helyezkedik el toxicitást tekintve, előbbi a legtoxikusabb, míg utóbbi a legkevésbé toxikus.

Az egyes vegyületek eltérő citotoxikus hatását a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben Rebenku István segítségével mértük áramlási citometriát alkalmazva, annexin V és propidium-jodid festéssel. A kezeltlen sejtek 80%-a élő volt, csupán 20%-uk volt vagy nekrotikus vagy apoptotikus. A kezelések az etil-, kálium-szorbát és a szorbinsav esetén átlagosan 64-68%-ra csökkentették a túlélő sejtek arányát és 28-29%-ra nőtt az apoptotikus sejtek aránya. Az izopropil-szorbát jelentősen eltérő viselkedést mutatott, mivel a detektált sejtek 68%-a apoptotikus volt és csupán 27%-uk élt túl.

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

Az eddigiektől eltérően nem mikrodilúciós, hanem érzékenyebb, ún idő-ölés (time-kill) kísérlettel vizsgáltuk az antimikrobiális hatást. Az antifungális kísérletek azt mutatják, hogy az izopropil-szorbát a *C. albicans* ellen több koncentráción is fungicid hatást mutatott, míg a többi vegyület legfeljebb gyenge sztatikus hatást mutatott a kísérlet feléig. *E. coli* esetén azonos eredményeket kaptunk.

Az *S. aureus* baktérium nagyon ellenállónak bizonyult a különböző kezelésekkel szemben, még bakteriosztatikus hatást sem lehetett megfigyelni a legtöbb esetben.

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

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

A szakirodalomban ismert, hogy a különböző növényi illóolajok jelentős antimikrobiális hatással bírnak akár rezisztens kórokozókkal szemben is. Azonban ezt a hatást nem csak rövid ideig, terápiásan vagy fertőtlenítési céllal lehet használni, hanem hosszú távon, akár tartósítás céljára is alkalmazhatóak. Emiatt gondoltuk úgy, hogy a Gattefossé cég modern gyógyszer technológiai segédanyagait alkalmazva emulziós rendszereket formulálunk. A hatóanyag standardizálása miatt, gyógyszerkönyvi minőségű borsmenta, citrom és rozmaring illóolajat használtunk. Habár az ismert, hogy emulzióként hatékonyabbak az illóolajok, arra is

kíváncsiak voltunk, hogy egy hagyományos tartósítószerrel, a kálium-szorbáttal kiegészítve, hogyan módosulnak a készítmény antimikrobiális és biokompatibilitási paraméterei. A sejttéletképességi vizsgálatokat Caco-2 sejteken MTT- és NR-teszttel, az *in vivo* toxicitást *G. mellonella* lárvákon, míg a kórokozók elleni hatékonyságot mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk.

Több segédanyagot és formulációt próbáltunk végig, a legstabilabb, végső receptúrák az alábbiak voltak:

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

Mind a három emulziót vizsgáltuk önmagában és 2 mg/ml kálium-szorbáttal kiegészítve. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz a mintákat PBS-el hígítottuk 50%, 10%, 5% és 1% emulzió tartalomra, így az eredeti illóolaj és kálium-szorbát koncentráció arányosan hígult.

Mind az MTT-, mind az NR-teszt és a *G. mellonella* befecskendezési vizsgálatok ugyanazt az eredményt mutatták. A legtoxikusabb a borsmenta illóolaj tartalmú emulziók, ezt követik a rozmaring és végül a citrom illóolajjal képzett formulációk. A kálium-szorbát minden esetben jelentősen növelte a sejtkárosodást illetve az egyedek mortalitását.

Miután megállapítottuk, hogy egyes emulziók már 5 $\text{V}/\text{V}\%$ koncentráción is citotoxikusak, valamint, hogy a borsmenta esetén jelentős *in vivo* toxicitásra kell számítani, a mikrobiális kísérleteket 2,5 $\text{V}/\text{V}\%$ koncentráción kezdtük el, felező hígításokkal.

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

Az *S. aureus* és az *E. coli* eredményei változatos képet mutatnak, azonban összességében az általunk célul kitűzött szinergista hatást nem tudtuk egy esetben sem kimutatni, csupán additív hatást tapasztaltunk az illóolajok és a kálium-szorbát között.

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

A szorbátok esetén elvégzett összehasonlító vizsgálatot alapul véve, kíváncsiak voltunk, hogy ha a ritkán alkalmazott parabéneket vizsgálunk, milyen különbségeket találunk. Azért, hogy valóban a kémiai szerkezet különbözőségét tudjuk megfigyelni, a szénlánc elágazását választottuk, mint szerkezeti tényező és az egyes származékokat azonos koncentráción akartuk vizsgálni. Az alkil láncban 3, 4 és 5 szénatommal rendelkező nyílt és elágazó észtereket párba rendeztük és vizes közegben vizsgáltuk citotoxicitásukat és antimikrobiális hatásukat. Irodalmi adatok híján azonban először a vizes közegben mért maximális vízdékonyság meghatározására volt szükség HPLC segítségével, mely vizsgálatokban Dr. Haimhoffer Ádám tanszéki kollégám segített.

Az eredmények szerint a 3 és 5 szénatomos észtereknél az elágazó forma közel kétszer jobb vízdékonysággal bír, mint a nyílt láncú forma, míg a 4 szénatomos észtereknél közel azonosak az értékek. A parabéneket ezután szénatom szám alapján párosával azonos koncentrációkon vizsgáltuk, az alacsonyabb vízdékonyságú észter maximális vízben oldható koncentrációján. Ez *n*-propil- és izopropil-parabén esetén 0,025 m/v%-ot, *n*-butil és izobutil-parabén esetén 0,023 m/v%-ot, míg *n*-pentil- és izopentil-parabén esetén 0,01 m/v%-ot jelentett.

Az MTT- és az NR-teszt szerint a páratlan szénatomot tartalmazó származékok esetén szignifikáns volt a sejtleletképeségbeli különbség, mégpedig úgy, hogy a nyílt láncúak voltak mindig citotoxikusabbak. A *n*-butil és az izobutil származékok között azonos koncentráción nem volt különbség, azonban ezek toxikusabbnak bizonyultak a másik két párosnál.

Mikrodilúciós módszert alkalmazva, az előzőekben is alkalmazott három fajon vizsgáltuk az észter párok antimikrobiális hatását, felező koncentrációkon. A *C. albicans* ellenes hatás a szénlánc hossz növekedésével csökken és a nyílt láncú forma kevésbé hatékony. Ez alól a *n*-pentil-parabén-izopentil-parabén páros képez kivételt, ahol a *n*-pentil-parabén volt hatékonyabb, ugyanakkor ezek a vegyületek a legalacsonyabb koncentráción már nem tudtak legalább 50%-os gátlást biztosítani, a többi vegyülettel ellentétben.

Gram pozitív referencia törzsünk (*S. aureus*) viszonylag ellenállóknak bizonyult a parabénekekkel szemben. Az izopropil- és izobutil-parabén hatékonyabb volt nem elágazó párjánál, ugyanakkor az izopentil nagyobb koncentráción kisebb gátló hatást fejtett ki, mint a *n*-pentil-parabén, ellenben alacsony koncentráción közel azonos eredményt mutatott a két szer.

Az *E. coli* szinte teljesen érzéketlen volt a vizsgált koncentrációkon, azonban az előző két fajnál megfigyelt tendenciák az elágazó és nem elágazó származékok hatására vonatkozóan ennél a fajnál is megismétlődtek.

V. Megbeszélés

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

Módosítják-e adott technológiai segédanyag-kombinációk a tartósítószeres sejtkárosító hatását humán és mikrobiális sejteken? Az első kísérletsorozat eredményei azt mutatják, hogy a tenzidek és tartósítószeres jelentősen növelik egymás citotoxicitását, azonban ezek az eredmények nem meglepőek. Magyarázatot igényel viszont a 2-hidroxietyl-cellulóz nyák protektív hatása. A megfelelő biopolimerrel borított Caco-2 sejtkultúras modell jobban ellenáll a citotoxikus hatásoknak. A benzalkónium-kloridról azt is leírták, hogy képes oldani a Caco-2 sejtekre rétegzett nyálkaréteget.

Módosítják-e adott technológiai segédanyag-kombinációk a tartósítószeres sejtkárosító hatását humán és mikrobiális sejteken? A második kísérletsorozat egyik legérdekesebb jelensége, a parabének két rendszerben mért eltérő citotoxicitása. Szakirodalmi példák azt mutatják, hogy a hosszabb szénláncú származékok toxikusabbak a rövidebb szénláncúaknál. Mi magyarázza a második rendszerben a butil-parabén kiugró értékét a legnagyobb koncentráción? Kutatások kimutatták, hogy a Caco-2 sejtek speciális transzészteráz aktivitással rendelkeznek, etanol jelenlétében a metil-, a propil- és a butil-parabén is etil-parabénné alakul. Az enzimeknek jobb aktivitása van a rövidebb szénláncú, mint a hosszabbak szénláncú származékok felé, és az etanol nagyobb koncentrációja elősegíti működésüket, ezért a második rendszer magasabb etanol tartalma feltehetően elősegítette a metil-parabén etil-parabénné történő átalakulását. Utóbbi toxikusabb származék, ezért ronthatta a metil-parabén által mutatott sejtleletképeséget, míg a butil-parabén esetén a kevésbé toxikus etil-parabén képződött. Ugyanakkor egyéb hatásokat kell feltételeznünk, mivel a transz-észterifikáció csak a metil-parabén alacsonyabb sejtleletképeségi értékét magyarázza, a butil-parabénét nem, mivel az a továbbra is toxikus etil-parabénné alakul. Minden baktérium faj nagyobb mértékben érzékeny volt a glicerint és Labrasolt® tartalmazó első rendszerre, mint az alkoholos oldatokra vagy a második rendszerre. A szakirodalomban ismeretes, hogy a Labrasol® jó antimikrobiális hatással bír, például *Mycobacterium tuberculosis* ellen, ahol teljes sejtfal dezintegrációt

okozott. Feltételezzük, hogy ez a segédanyag magyarázza a formuláció kiemelkedő antimikrobiális eredményeit. Ugyanakkor ismert negatív kölcsönhatás is tenzidek és parabének között, például kationos felületaktív anyagok csökkentették butil-parabén felvételét és gátló hatását *E. coli* esetén. Összességében megállapítható, hogy rendszereink komplex összetétele miatt, a megfigyelt kiugró értékeket, jelenségeket további elemzésnek kellene alávetni, hogy megértsük az eredmények mögött álló pontos folyamatokat.

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

Tartósítószerként alkalmazott karbonsavak különböző sói azonos mértékben csökkentik-e a sejtelképességet? A különböző sók vizsgálata esetén az NR-teszttel nem láttunk citotoxicitást, ugyanakkor az MTT-teszt esetén igen. A jelenség pontosabb tanulmányozásához más vegyületek esetén is szükséges elvégezni a kísérleteket, amelyek szintén csak a kísérő ion minőségében térnek el (kloridok, szulfátok, egyszerű karbon savak sói). Ha minden esetben azt tapasztaljuk, hogy az MTT-teszt a kalcium sókat a nátrium és kálium sókkal összehasonlítva, azonos savmaradékion koncentráción hibásan, toxikusnak mutat, míg az NR-teszt (és/vagy áramlási citometria) nem, akkor kalciumot tartalmazó vegyületek esetén az MTT-teszt a vizsgálatokban nem alkalmazható.

Miben különböző a sejtkárosító hatása a szorbát-észtereknek a szorbinsavhoz képest? A szorbát-észterekkel kapcsolatos kutatásunkat elindító tanulmány a szorbinsavnál nagyobb antimikrobiális potenciálról számolt be, mind az etil-, mind az izopropil-szorbát esetén, azonban minket is meglepett az idő-ölés kísérletek eredménye. A kimagasló aktivitás és az áramlási citometriás mérések során tapasztalt fokozott sejtkárosító hatás magyarázata feltételezésünk szerint az izopropil-szorbát pont megfelelő logP értéke. A membránon való átjutáshoz szükséges lipofilitás és a megfelelő koncentráció eléréséhez szükséges vízdékonyság épp ennél a vegyületnél van a legjobb arányban, viszonylag rövid szénlánc miatt. Feltételezésünk alátámasztásához hosszabb szénláncú származékok vizsgálatára is szükség van, mivel a rövidebb származéknál, az etil-szorbátnál már látjuk, hogy nincs megnövekedett aktivitás. Egy másik lehetséges válasz, a mind a Caco-2 mind a mikrobiális sejtek esetén jelenlévő valamilyen efflux pumpa vagy enzim (pl dekarboxiláz) csökkent

hatékonysága az észter ellen, annak eltérő szerkezete miatt. Az eredeti tanulmányból hiányzó toxicitási adatokat saját méréseinkkel pótoltuk. A szorbinsav, az etil-szorbát és az izopropil-szorbát esetén nem tudjuk eredményeinket meglévő publikációkkal összehasonlítani, mivel ezeket a vegyületeket ezekkel a módszerrel még nem vizsgálták. A meglévő adatok birtokában érdemes lenne további származékokkal felderíteni az egyszerű alkil láncsal bíró szorbát-észterek további antimikrobiális és biokompatibilitási profilját, a jelenleginél hatékonyabb vegyületek után kutatva és/vagy az izopropil-szorbátot további, nagyobb bizonyító erejű vizsgálatoknak alávetni.

Milyen biokompatibilitási interakciók lépnek fel illóolajok és tartósítószer között?

Az illóolajok tartósítószerként való használata nehézkes a hőbomlásra, illékonyságra ezáltal hatóanyag csökkenésre való hajlamuk miatt. Ezt tudja áthidalni az emulzióként történő formulálásuk, mely megfelelő stabilitást biztosít az antimikrobiális hatásért felelős vegyületeknek. A három illóolaj eltérő kémiai összetétellel bír, mely jól látszik a toxicitást bemutató eredményeken. Az illóolajok komplex fitokémiai összetétele miatt, csak magukat az illóolajokat érdemes toxicitási szempontból összehasonlítani, nem pedig egyes komponenseiket. A három illóolajat eddig egy tanulmány sem alkalmazta olyan kísérletekben, ahol toxicitást mértek volna. A biztonsági adatlapokon szereplő értékek pontosan az ellentétét mutatják a sejtes kísérletekben mért toxicitási sorrendnek, hiszen a patkány per os LD₅₀ citrom illóolaj esetén 2460 mg/ttkg, rozmaring esetén 6600 mg/ttkg, borsmentánál, pedig nincs feltüntetve a faj és az adagolási út (12438 mg/ttkg). Az eltérés okát mindenképpen az emulziós közegben lévő anyagoknak és azok illóolajonként különböző összetételében érdemes keresni. Ugyanakkor, mivel a három használt toxicitási módszer ugyanazt a sorrendet mutatta, ismétlés helyett magasabb bizonyító erejű modellen lenne érdemes további toxicitást vizsgálni. Antimikrobiális szempontból nem találtunk szinergista hatást, amikor is a kálium-szorbáttal kiegészített emulziók legalább egy nagyságrend különbséggel hatékonyabbak lettek volna, mint a kálium-szorbát és az emulzió külön-külön. A kísérlet esetleges folytatásában más szerrel (pl. nátrium-benzoát) lenne érdemes próbálkozni, illetve ha a szinergizmus megtalálható, akkor feltétlenül érdemes hosszútávú stabilitási vizsgálatot gázkromatográfiás mérésekkel végezni, mindeközben figyelni az illóolaj komponensek bomlását, párolgását. A szinergizmus lehetővé tenné mindkét komponens koncentrációjának radikális csökkentését, együttes alkalmazásuknak ennek hiányában mikrobiológiai, toxicitási előnyei nincsenek.

Mennyiben eltérő a konstitúciós izomer parabének sejtkárosító hatása? Utolsó kísérletsorozatunkban ritkán alkalmazott, elágazó láncú parabéneket hasonlítottunk össze. A különböző publikációk általában csak a metil-, etil-, propil-, butil-parabén négyesét vizsgálják,

elhanyagolva a további elágazó láncú, aromás vagy hosszabb alkil láncú származékokat, ezért rendkívül kevés tanulmány elérhető az általunk vizsgált vegyületekről. Megfigyelhető az eredményeken, hogy a 3 és az 5 szénatomot tartalmazó származékok mind vízdékonyságukat, mind citotoxicitásukat tekintve hasonlóan viselkednek, az elágazó származékok jobb vízdékonysággal és alacsonyabb toxicitással bírnak. Ellenben a 4 szénatomos észterek nagyon hasonló eredményeket mutattak. Ismert a szakirodalomban az ilyen páros-páratlan szénláncú származékok közötti eltérés, mely másodlagos kötőerők eltérő hatásával magyarázható. Az ilyen homológ sorokban megfigyelhető a vegyületek fizikai tulajdonságainak eltérése, ezáltal biológiai hatásuk is különböző. Ezt a hatást azonban csak a vízdékonyság és a humán citotoxicitás kapcsán találtuk meg, a mikrobák inkább az elágazó vagy a nyílt származékok vonatkozásában mutattak különböző eredményeket. Eredményeinket magyarázhatják a különböző humán és mikrobiális észterázok eltérő affinitásai (melyek genetikai polimorfizmusból adódnak) az eltérő szerkezetű észterekhez. Humán mikroszóma frakciók esetén bizonyították az eltérő bontási képességet a nyílt és elágazó láncú parabének esetén. Bakteriális észterázokról is kimutattak hasonló variabilitást és specifikus parabén lebontó enzimek jelenlétét. Mindezek azonban további enzimkinetikai, molekuláris biológiai vizsgálatokat igényelnek.

VI. Összefoglalás

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

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

Anyagi támogatás és Köszönetnyilvánítás

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

Őszinte hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalinnak. Neki, az általa teremtett munkakörülményeknek és légkörnek, a szakmai és emberi segítségének köszönhető a disszertáció létrejötte.

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

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

Nem mehetek el szó nélkül a Gyógyszertechnológiai Tanszék, a Gyógyszerésztudományi Kar dolgozói, szerzőtársaim munkája mellett, akik mindvégig segítettek a doktori tanulmányokhoz kapcsolódó kísérletek során, nélkülük nem sikerülhetett volna ez az öt év.

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



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

Jelölt: Nemes Dániel

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10060419

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

4. Józsa, L., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Sinka, D. Z., **Nemes, D.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szabó, J., Kalló, G., Vasas, G., Bácskay, I., Fehér, P.: Formulation of Creams Containing Spirulina Platensis Powder with Different Nonionic Surfactants for the Treatment of Acne Vulgaris.
Molecules. 25 (20), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204856>
IF: 3.267 (2019)
5. Jakab, Á., Tóth, Z., Nagy, F., **Nemes, D.**, Bácskay, I., Kardos, G., Emri, T., Pócsi, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Physiological and transcriptional response of *Candida parapsilosis* to exogenous tyrosol.
Appl. Environ. Microbiol. 85 (20), e01388-e01419, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01388-19>
IF: 4.016
6. Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fehér, P., Kósa, D., Arany, P., **Nemes, D.**, Sinka, D. Z., Vasvári, G., Fenyvesi, F., Váradi, J., Bácskay, I.: Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems.
Drug Discovery Today: Technologies. 27, 81-86, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.005>
7. Bácskay, I., **Nemes, D.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Fehér, P., Vecsernyés, M., Ujhelyi, Z.: Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development.
In: Cytotoxicity / Tulay Askin Celik, Intech Open, London, 132-146, 2018.
8. Kalantari, A., Kósa, D., **Nemes, D.**, Ujhelyi, Z., Fehér, P., Vecsernyés, M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Kuki, Á., Gonda, S., Vasas, G., Gesztelyi, R., Salimi, A., Bácskay, I.: Self-nanoemulsifying drug delivery systems containing *Plantago lanceolata*: an assessment of their antioxidant and antiinflammatory effects.
Molecules. 22 (10), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101773>
IF: 3.098

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,877

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

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

Debrecen, 2021.02.16.

