

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr.Ujhelyi Zoltán

**Önemulgeáló rendszerekben alkalmazott felületaktív
anyagok élő sejtekre gyakorolt hatásának
gyógyszertechnológiai jellemzése**

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Önemulgeáló rendszerekben alkalmazott felületaktív
anyagok élő sejtekre gyakorolt hatásának
gyógyszertechnológiai jellemzése**

Dr.Ujhelyi Zoltán

Témavezető: Dr. Kovácsné Dr. Bácskay Ildikó



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| 1. Bevezetés..... | 5 |
| 2. Irodalmi áttekintés..... | 8 |
| 2.1. Felületaktív anyagok | 8 |
| 2.2. Önemulgeáló rendszerek | 10 |
| 2.3. A Caco-2 sejtvonala | 13 |
| 2.4. Sejtéletképességi vizsgálatok | 16 |
| 2.5. Célkitűzés | 18 |
| 3. Metodika..... | 19 |
| 3.1. Felületaktív anyagok | 19 |
| 3.2. Felületi feszültség mérése és a CMC meghatározása..... | 21 |
| 3.3. Hemolitikus aktivitás meghatározása | 23 |
| 3.4. Sejttenyésztés | 24 |
| 3.5. Sejt életképességi vizsgálatok | 25 |
| 3.5.1. MTT teszt | 25 |
| 3.5.2. LDH teszt | 26 |
| 3.6. Transepitheliális Ellenállás (TEER) mérése Caco-2 monolayeren | 27 |
| 3.7. Caco-2 membrán transzport vizsgálata | 28 |
| 3.8. Immunohisztokémia | 29 |
| 3.9. Statisztikai analízis..... | 30 |
| 4. Eredmények..... | 31 |
| 4.1. A CMC meghatározása a felületi feszültség változás mérése alapján..... | 31 |
| 4.2. Sejtéletképességi vizsgálatok | 33 |
| 4.2.1. MTT teszt | 33 |
| 4.2.2. LDH teszt | 35 |
| 4.3. Caco-2 membrán transzport vizsgálata | 36 |
| 4.4. A Transepitheliális Elektromos Ellenállás követése | 38 |
| 4.5. Immunohisztokémia | 39 |
| 4.6. Hemolitikus aktivitás..... | 41 |
| 5. Megbeszélés | 43 |
| 5.1. A felületaktív anyagok fizikai tulajdonsága és toxicitása | 43 |
| 5.1.1. A tenzidek felületi feszültségre gyakorolt hatása | 44 |
| 5.2. A tenzidek sejtéletképességre gyakorolt hatása | 44 |
| 5.2.1. MTT és LDH vizsgálatok..... | 44 |

| | |
|--|--|
| 5.2.2. Caco-2 transzmembrán kísérletek | 46 |
| 5.2.3. MTT és hemolízis vizsgálatok..... | 47 |
| 6.1. Összefoglalás..... | 50 |
| 6.2. Summary | 51 |
| 7. Irodalomjegyzék..... | 52 |
| 7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom | 52 |
| 7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke | 66 |
| 7.3. További közlemények jegyzéke | 67 |
| 8.1 Tárgyszavak | 69 |
| 8.2 Keywords | 69 |
| 9. Köszönetnyilvánítás | 70 |
| 10. Függelék | 71 |
| 10.1. Rövidítések..... | 71 |
| 10.2. Támogatás | 72 |
| 10.3. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények | Hiba! A könyvjelző nem létezik. |

1. Bevezetés

A hatékony gyógyszeres terápia feltétele a kívánt mennyiségű gyógyszeranyagok megfelelő helyre történő eljuttatása a lehető legegyszerűbb és legkíméletesebb módon [Dévay és mtsa 2009.]. A gyógyszerészeti kutatás intenzív kutatási területe, az új farmakonok, farmakonjelöltek fejlesztése mellett a meglévő hatóanyagok új indikációban vagy módosított dózisban, új gyógyszerformában történő alkalmazása. Számos lehetőség közül a szájon át történő gyógyszerelés egyértelműen a legelterjedtebb és legkedveltebb módja a hatóanyagok szervezetbe juttatásának [Sarciaux és mtsai 1994]. A perorális gyógyszerek esetén a legmagasabb a beteg compliance, ennek a megtartása vagy fokozása terápiás értékű is lehet. A gasztrointesztinális rendszer fiziológiás működése, valamint anatómiai struktúrája segíti a felvett táplálék megemésztését, de mindezen körülmények természetesen hatással vannak a *per os* adott gyógyszerek felszívódására is [Varga és mtsai 2012]. A gasztrointesztinális rendszer különböző területeire jellemző pH értékeket, a fiziológiás szekrétumok hatását, valamint az adott terület perisztaltikus motilitását és az emésztőtraktus felszínét alkotó nyálkahártya felületet figyelembe véve a hatóanyag felszívódása szempontjából a vékonybél az optimális szakasz [Davies 1998; Shargel 2000]. A gyomor-bél rendszerből történő felszívódás mértéke összefüggésben van a farmakon vérplazmában megjelenő koncentrációjával, ennek megfelelően befolyásolja a biológiai hatás intenzitását [Shargel 2000; Grass 1997]. A teljes abszorpcióra a hatóanyagok jelentős része azonban képtelen [Jain 2004], ezért a preformulálás során a hatóanyagokat oldékonyság és permeabilitás alapján vizsgáljuk meg. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) ez alapján csoportosítja a farmakonokat, így a felszívódás kinetikája mellett azt is képesek vagyunk előre jelezni, hogy milyen gyógyszer technológiai segédanyagok/módszerek szükségesek fenti tulajdonságok módosításához [Kasim 2004] [1. táblázat]. A BCS II., III., IV. csoportjába tartozó hatóanyagok rossz oldhatósága és/vagy rossz membrán permeáló sajátsága mindenképpen szükségessé teszi fentiek alkalmazását, melyek segítségével az abszorpció és az oldékonyság fokozható [Yang 2005; Au 2001].

A biofarmáciai tulajdonságok módosíthatóak a gyógyszeranyag fizikai vagy fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltoztatásával, de alkalmazhatunk a gyógyszerformában olyan additív komponenseket is, melyek növelik a vegyület oldhatóságát és ezáltal a biológiai hasznosíthatóságot [Fischer és mtsai 2011; Wilson és mtsai 1989].

| <i>1. táblázat</i> <i>Biofarmáciai Osztályozási Rend bemutatása választott hatóanyagok jellemzése alapján</i> | | | |
|--|-------|---|---|
| oldhatóság | | | |
| | | jó | rossz |
| permeabilitás | jó | <u>I. osztály</u> Ketoprofen Efedrin Verapamil Teofillin Szalicilsav Lidokain | <u>II. osztály</u> Atorvasztatin Ciklosporin Ibuprofen Ketokonazol Tamoxifen Warfarin |
| | rossz | <u>III. osztály</u> Amoxicillin Cetirizin Cimetidin Metformin Paracetamol Tetraciklin | <u>IV. osztály</u> Amfotericin B Furoszemid Neomycin Taxol Ritonavir Klorotiazid |

Gyógyszertechológiai szempontból jelentős lehetőség, komplexképző segédanyag alkalmazásával a hatóanyagot kovalens kötések kialakítása nélkül, fizikai kölcsönhatások segítségével olyan zárványkomplexbe kötése, melynek külső felszíne hidrofíli. Többek között a glükopiranoz alegységekből felépülő ciklodextrinek alkalmasak ilyen típusú kölcsönhatás kialakítására. Ezen oligoszacharidokat széles körben alkalmazzák a gyógyszertechnológiai formulálások során mint komplexképző segédanyagot, molekulakomplexek kialakításához [Kiss és mtsai 2010; Avdeef és mtsai 2007]. A gyógyszerforma kialakításához választhatunk olyan segédanyag-hordozó rendszert is, amelyben a farmakon és az additív komponens

molekuláris diszperziót képez [Leuner és mtsai 2000]. A szilárd diszperziós rendszerekből a jobb nedvesíthetőségnek és az egyenletesen eloszlott kisméretű diszpergált részeknek köszönhetően, javul az oldhatóság, ezáltal nő a biohasznosulás [Vasconcelos és mtsai 2007]. Az alkalmazott oldékonyság növelő segédanyagok között tradicionálisan kiemelt szerepet kapnak a különböző típusú amfipatikus szerkezetű felületaktív anyagok [Flaten és mtsai 2008].

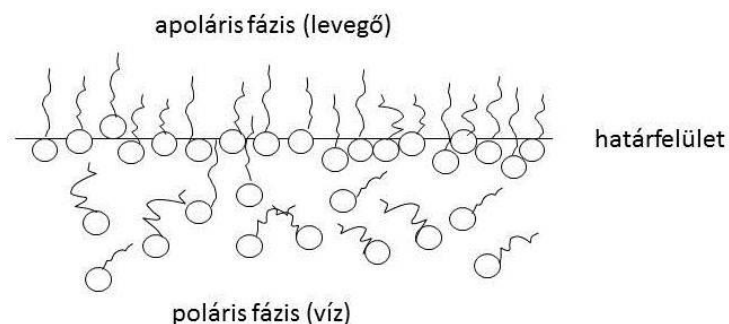
Munkám során elsősorban nem ionos amfifil tenzidek Caco-2 sejtvonalra gyakorolt hatását vizsgáltam, figyelembe véve a vizsgálati minták kémiai szerkezetét és fiziko-kémiai tulajdonságait. A Caco-2, humán adenocarcinoma sejtvonal az orális hatóanyagbevitel nemzetközileg elfogadott in vitro modellje [Hidalgo és mtsai 1989].

Kísérletsorozatomban különös hangsúlyt fektettem az ön(mikro)emulgeáló rendszerek képzésére alkalmas tenzidek közül, a polietilén-glikol származékok, valamint polipropilén-glikol származékok vizsgálatára. A tenzidek fiziko-kémiai tulajdonságai közül a szolubilizáló tulajdonságot meghatározó kritikus micellaképzési koncentrációt (CMC) határoztuk meg. A Caco-2 bélhámsejtek életképességére gyakorolt hatást MTT és kiegészítésként LDH citotoxicitási tesztekkel mértük. A vizsgált felületaktív anyagok közül, bizonyos PEG alapú tenzidek alkalmas segédanyagok lehetnek parenterális készítményekben is a hatóanyag biohasznosulásának növelésére [Li és mtsai 2011]. Ezért ebben az esetben ügyelnünk kell a felületaktív anyagoknak a vér elemeivel történő esetleges kölcsönhatására [Huo és mtsai 2010]. Ezen tulajdonság felderítésére a tenzidek koncentrációfüggő hemolitikus aktivitását vizsgálhatjuk [Normoo és mtsai 2008]. Ezért kísérletsorozatunkban meghatároztuk az enterális és parenterális formulálás során felhasználható tenzidcsoport tagjainak IC_{50} illetve HC_{50} értékeit. A biztonságos terápia elérése érdekében a gyógyszerforma kialakítása során a választott segédanyagok ártalmatlanságát minden esetben igazolnunk kell [Rowinsky és mtsai 1993]. Az ilyen szemlélettel kifejlesztett készítmények képesek az optimális gyógyszerhatás elérése céljából csökkenteni a szervezetbe juttatott hatóanyag mennyiségét, elkerülni a nemkívánatos mellékhatásokat, és a terápiás igényeknek megfelelően, a hatóanyag-felszabadulását, tervezett módon, a megfelelő helyen és időben, meghatározott sebességgel biztosítani.

2. Irodalmi áttekintés

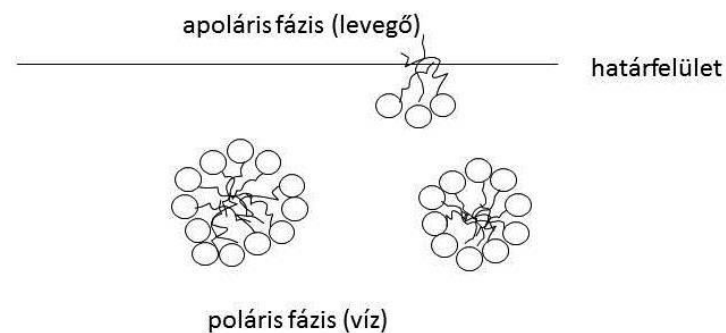
2.1. Felületaktív anyagok

A tenzidek aszimmetrikusan poláris szerkezetű vegyületek. Szerkezetük egy viszonylag nagyméretű apoláris részből, és egy poláris fejcsoporti molekularészletből áll. Kémiai tulajdonságuk alapján a felületaktív anyagok négy nagy csoportját különböztetjük meg. Az *anionos tenzidek* esetében a hidrofób molekularészhez negatív töltésű fejcsoport kapcsolódik, a *kationos felületaktív anyagoknál* a hidrofil rész töltése pozitív. A *nemionos tenzidek* hidrofil része nem disszociatív míg, az *amfoter tenzideket* ikerionos feji csoport jellemzi. A felületaktív anyagok asszociációs kolloidok képzésével képesek a vízben oldhatatlan vagy rosszul oldódó farmakonok oldékonyságának növelésére. Az aszimmetrikusan poláris tenzid molekulák megfelelő körülmények között kolloid méretű asszociátumok képzésére alkalmasak. A tenzidek amfifil vegyületek. A Hardy-Harkins elv alapján a hidrofób molekula részüket alkotó szénhidrogén láncok számára az apoláris környezet, míg hidrofil karakterű fejcsoportjukat tekintve a poláris környezet előnyös energetikailag [Szántó 1987]. Kis koncentrációban a felületaktív anyagok monomerként vannak jelen az oldatban. Híg vizes oldatban a termodinamikailag kedvezőbb állapot eléréséhez a tenzidek a levegő/víz határfelületen adszorbeálódnak, így poláris fejcsoportjuk a vízben, hidrofób részük pedig az apoláris levegő fázisban helyezkedik el [1. ábra]. A felületi adszorpciónak köszönhetően a felületi feszültség csökken.



1. ábra. Amfipatikus molekulák irányítódása határfelületen

Ugyancsak a hidrofób effektus megnyilvánulása, hogy a tenzid koncentráció emelésével a felületi feszültség állandóvá válik. Ezen a jellemző koncentráció értéken a hidrofób láncok egymás felé fordulva alakítják ki az energetikailag előnyös környezetet, a hidrofíl fejek pedig a vizes közeggel érintkeznek [2. ábra]. A kolloid mérettartományú micellák képződése tulajdonképpen pszeudo-fázisszeparáció, mivel a kritikus micellaképzési koncentráció (CMC) felett a tenzid kémiai potenciálja gyakorlatilag konstans [Gilányi 2005].



2. ábra. Asszociációs kolloid micellák képződése hidrofíl közegben

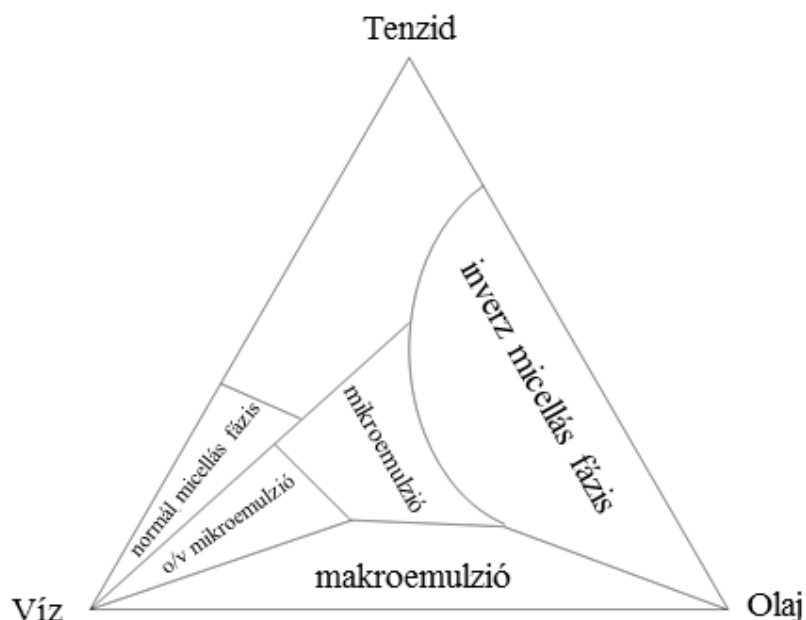
A kritikus micellaképződési koncentráció eléréséig a rosszul oldódó farmakon oldhatóságát a tenzid csak kis mértékben képes növelni [Rangel-Yagui és mtsai 2005]. Amikor a szolubilizáló szer koncentrációja meghaladja a CMC értéket a micellák képzésével arányosan, lineárisan nő a hatóanyag oldhatósága [Kawakami és mtsai 2006]. A tenziddel szolubilizált hatóanyag oldhatósága függ a képzett micellák szolubilizációs képességétől, az alkalmazott felületaktív anyag koncentrációjától, CMC értékétől, a tenzid egyéb fiziko-kémiai paramétert (pH, sóképzés) befolyásoló tulajdonságaitól, valamint természetesen a hatóanyag oldékonyságától [Kawakami és mtsai 2004]. A képződő micellák stabilitása fordítottan arányos a tenzid CMC értékével. Azaz minél kisebb koncentrációban alkalmas a felületaktív anyag micellaképzésre, annál jobban biztosított a micella stabilitása. A micelláris rendszer fennmaradása rendkívül fontos a hatóanyag biohasznosulása szempontjából, mivel a jobb stabilitással jellemezhető micellák ugyanis fiziológiás közegben felhígulva is megtartják szerkezetüket, így a fiziológiás térben is szolubilizálják a hatóanyagot [Kawakami és mtsai 2006]. Szájon át történő kezelés során azonban vizsgálnunk kell a tenzidek kölcsönhatását a bélhámsejtekkel. Annak ellenére, hogy a felületaktív anyagok spontán aggregációja során létrejövő micelláris szerkezet előnyösebb a hatóanyag szolubilizálásához, mint a tenzid monomerek, az önálló alegységek jelenléte is meghatározó lehet. Micellákba rendeződve a

tenzidek a membránban levő fehérjékkel hozhatnak létre kapcsolatot melynek eredményeként kialakulhat felszívódásfokozódás [Korhonen és mtsai 2004]. A tenzid monomerek pedig képesek beépülni a biológiai membránok foszfolipid kettősrétegébe, így a membránszolubilizáció eredményeként létrejövő felszívódás fokozódás mellett létre jöhet irritáció vagy tartós membránkárosodás is [Dimitrijevic és mtsai 2000]. A monomeregységek és a micellák eltérő viselkedése miatt fontos megvizsgálni a gyógyszerforma kialakításához választott tenzidek tulajdonságait alacsony és relative nagy koncentrációban, vizes közegben illetve biológiai környezetben egyaránt [Korhonen és mtsai 2004].

2.2. Önemulgeáló rendszerek

A vízben nehezen vagy egyáltalán nem oldódó gyógyszeranyagok gasztrointesztinális rendszerbe történő juttatásának még előnyösebb megoldása lehet, ha különböző önemulgeáló illetve ön-mikroemulgeáló rendszereket (SEDDS, SMEDDS) készítünk [Zhu JX és mtsai 2013]. Ezen S(M)EDDS –ek lehetőséget nyújtanak olyan, a BCS IV. osztályába tartozó farmakonok per os adására, melyeket korábban csak parenterálisan tudtunk biztonságosan a szervezetbe juttatni [Sagitani és mtsai 1980]. Ezen farmakonok alkalmazhatóságának és hatásosságának optimalizálásáért alkalmazott összetételek sajátja, az igen magas tenzid és kotenzid koncentráció [Colombo és mtsai 2010]. Az önemulgeáló összetételek vizet nem tartalmaznak, csak olajból és tenzidekből álló izotróp keverékek. Ezen rendszerekből vizes közegbe kerülve minimális energiabefektetés hatására, nagy diszperzitásfokú o/v típusú mikroemulzió képződik [Pouton 2000]. A kis részecskeméretű diszperz rendszer kialakításához a gasztrointesztinális traktus motilitása elegendő energiát szolgáltat [Gao P. és mtsai 2003]. A hatóanyagok olaj/víz megoszlási koefficiense és a kialakult cseppméret azonban módosíthatja a farmakonok felszabadulását [Sagar és mtsai 2008]. A vizes közegbe kerülés után a cseppméretet elsődlegesen az alkalmazott tenzid természete és koncentrációja határozza meg. Egy olaj/nemionos tenzid/hatóanyag fázisdiagrammot megszerkesztve meghatározható az az összetétel, ahol az önemulgeálódás maximálisan végbemegy [Sujoy és mtsai 2013].

Mindezek alapján kijelenthető, hogy a megfelelő önemulgeáló közeg kiválasztásához szükséges megállapítani a hatóanyag szolubilizációját a különböző komponensekben, az önemulgeáló régió területét a fázisdiagrammon, valamint az önemulgalódást követően létrejött cseppek méretét [3. ábra].



3. ábra. Olaj/Víz/Emulgens terner rendszer fázisdiagramja

Az önemulgeáló rendszerből történő hatóanyag felszabadulás sebessége fordítottan arányos a keletkezett emulzió részecskeméretével. Az emulgeált cseppek mérete csökkenthető a felületaktív anyag koncentrációjának növelésével. Ezért az önemulgeáló rendszerek összetételében jelentős százalékban szerepelnek különböző felületaktív komponensek. A képződött mikroemulzió termodinamikailag stabil, optikailag izotróp, tiszta diszperziója két, egymással nem elegyedő folyadéknak, amelyet tenzidmolekulák által képzett határfelületi film stabilizál [Tan és mtsai 2011]. A mikroemulziók spontán képződéséhez és a rendszer állandóságának fenntartásához jól megválasztott mennyiségű és tulajdonságú tenzidek, valamint kotenzidek szükségesek. Az alkalmazott felületaktív anyag kis mértékben oldódik a víz- és olaj fázisban, így a határfelületen adszorbeálódik. A kritikus mikroemulzió képződési koncentráció felett alkalmazott tenzidek vizes oldatában, vízben gyakorlatilag oldhatatlan, apoláris anyagot szolubilizálva termodinamikailag stabil, kolloid oldat, o/v vagy v/o mikroemulzió képződik.

A rendszer stabilitásának feltétele, hogy a képződött határfelület feszültsége 0 legyen. A tenzidek és kotenzidek hozzájárulnak a határfelületi nyomáshoz azáltal, hogy a kotenzid és az

olaj penetrálódik a határfelületi filmbe, befolyásolva ezzel annak görbületét, rendezetlenebbé és flexibilisebbé téve azt [Lieberman és mtsai 1989].

Az olaj és a víz közti határfelületi feszültség (γ) megadására szolgál a következő egyenlet:

$$\gamma = \gamma_0 - \pi$$

Ahol γ_0 a tenzid nélküli határfelületi feszültség, π pedig a határfelületi film nyomása. A határfelületi film által elért nagyon alacsony, nulla közeli határfelületi feszültséget tekinthetjük az önemulgeálódás előfeltételének [Lieberman és mtsai 1989]. A mikroemulzió képződés szabadenergiája ($\Delta\tau M$), a Ruckstein összefüggés alapján három komponensű. Az hogy képződik-e mikroemulziós rendszer vagy sem, ezen három energetikai alkotó segítségével a következő egyenlet alapján megállapítható.

$$\Delta\tau M = \Delta\tau_i + \Delta\tau_d + \Delta\tau_e$$

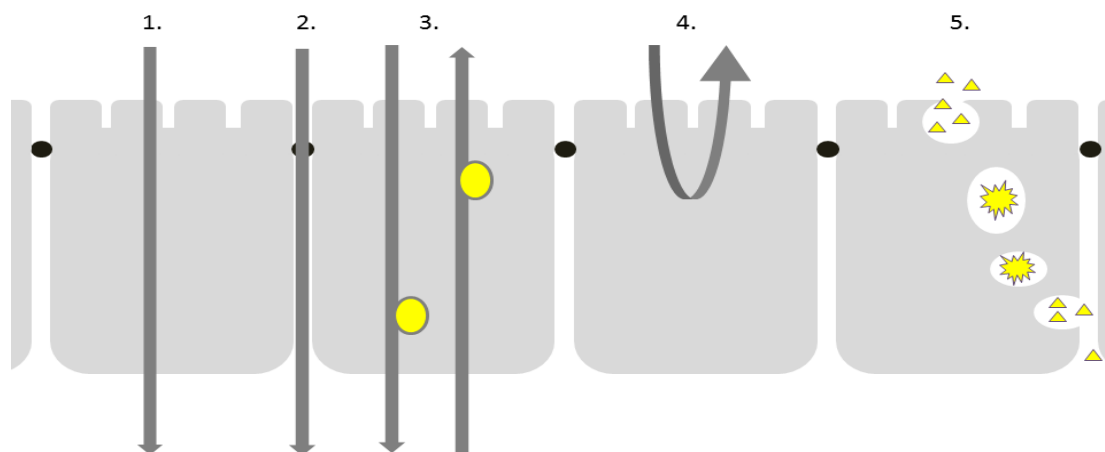
ahol $\Delta\tau_i$ a határfelületi szabadenergia változás, $\Delta\tau_d$ a részecske interakciós energia, $\Delta\tau_e$ a diszpergálási folyamatból származó entrópiaváltozás. Ha $\Delta\tau M < 0$, akkor a diszpergálódás spontán megy végbe [Müller 1991]. A rendszer termodinamikai állandósága lehetőséget biztosít az inkorporált farmakon biztonságos adagolására. Az önemulgeáló rendszerek alkalmazása a nehezen oldódó hatóanyagok gyógyszerformában való alkalmazása mellett, lehetőséget nyújthat a bél lumenéből rosszul permeáló hatóanyagok magasabb biohasznosulásának elérésére. Mivel az önemulgeáló rendszerek képzéséhez felhasznált PEG monoészterek önmagukban is képesek befolyásolni a biológiai barrierék funkcióit [Wang CH és mtsai 2012]. Vízben rosszul oldódó hatóanyagok formulálása során széles körűen és nagy mennyiségben alkalmaznak a PEG monoésztereken kívül más szerkezeti stuktúrájú felületaktív anyagokat is. Az ilyen rendszerekkel történő terápia biztonságos alkalmazhatóságához ezen tenzidek biológiai hatásvizsgálata részletes elemzésre szorul [Menard és mtsai 2012]. A PEG monoészter stuktúrájú Cremophor[®] vegyületek mellett fontos megvizsgálni az önállóan illetve segédemulgensként használt Labrasol[®] -t, mely szerkezetét tekintve mono- di- és trigliceridek polietilén-glikol mono- és di- észtereinek definiált keveréke, valamint a koemulgensként széles körben alkalmazott azonos segédanyag családba tartozó különböző propilén-glikol származékokat is. A monokomponensek vizsgálatával részletes információhoz juthatunk egy-egy gyógyszer technológiai szempontból összeállított rendszer biológiai hatásáról, illetve a gyógyszerhordozóba foglalt hatóanyag hasznosulásáról [Gursoy és mtsai 2003]. A bélhámsejteken végzett vizsgálatok

hozzásegítenek a megfelelő technológiai sajátságok elérése mellett jobban tolerálható és magasabb biológiai tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerforma kialakításához.

2.3. A Caco-2 sejtvonala

Az orálisan adagolt gyógyszerkészítmények prelinkai vizsgálatának egyik meghatározó lépése a készítmény humán sejtvonalon történő vizsgálata [Adachi és mtsai 2001]. Az in vitro körülmények között beállított modellek segítségével információhoz juthatunk a farmakonok és segédanyagok toxicitásáról illetve farmakokinetikai tulajdonságairól [Ritschel 1980]. Az in vitro sejt kultúrákon történő vizsgálat több szempontból előnyösebb az in vitro szöveteken végzett kísérleteknél. A sejt kultúrákban a humán szövettel ellentétben lehetőség van specifikus sejt típusok szelektív tenyésztésére, így vizsgálható az adott sejt típus önálló reakciója az adott kezelésre. A sejt kultúrák sejtjei képesek kisszámú sejtből genetikailag homogén populációt képezni. A kísérleti körülmények standardizálhatóak, így lehetőség van tenyésztési illetve kezelési protokollok kialakítására, ezért a vizsgálatok reprodukálhatósága biztosítottabb. A per os szervezetbe juttatott készítmények vizsgálatára a Caco-2 immortalizált sejt vonal nemzetközileg elfogadott in vitro modell [Sandri és mtsai 2007]. A Caco-2 humán colon adenocarcinoma eredetű sejt vonal ugyanis rendelkezik a humán jejunumra jellemző mindazon tulajdonsággal, ami alkalmassá teszi a szájon át történő gyógyszerbevitel és intesztinális felszívódás modellezésére [Zhao és mtsai 2001]. A sejtek megfelelő tenyésztési körülmények között konfluens sejtréteg, azaz monolayer kialakítására képesek. A monolayer tulajdonképpen polarizált enterocitákból áll, melynek felszínét mikrovillusok borítják. A sejtek közötti szoros kapcsolat fenntartásáért a Caco-2 sejtek között ugyanazon junkcionális fehérjék felelősek, mint a humán jejunumban.

Az intesztinális epitéliumon keresztül történő transzport folyamatok mindegyike jellemezhető Caco-2 monolayer segítségével [Hunter és mtsai 1997] [4. ábra].



4. ábra. Az anyag-transzport lehetséges útvonalai

1. Transzcelluláris passzív transzport, 2. Paracelluláris passzív transzport, 3. Transzcelluláris aktív transzport, 4. Aktív efflux, 5. Transzcitózis

Gyógyszer technológiai szempontból legegyszerűbben kialakítható a megfelelő gyógyszerforma azokból a hatóanyagokból, melyek lipofil tulajdonságúak így sejtmembrán áthatoló képességük igen nagy. A citoplazmán azonban ezek közül csak azok tudnak keresztül haladni, melyeknek víz oldékonysága is megfelelő. Az ilyen tulajdonságú farmakonokat soroljuk a BCS I. csoportjába. Felszívódásuk gyors és teljes mértékű. Több nemzetközi kutatási eredmény is alátámasztja azt a feltételezést, hogy ezen gyógyszeranyagok *passzív transzcelluláris* transzporttal kerülnek felvételre [Pappenheimer és mtsai 1987]. A paracellulárisan elhelyezkedő pórusokon keresztül történő passzív transzport elvileg előnyös felszívódási útvonal lehet peptidok vagy hidrofil kismolekulák számára. Azonban a *paracelluláris passzív* transzport kizárólagossága megkérdőjelezhető [Nellans 1991]. A passzív úton lassan és nem teljesen felszívódó molekulák transzportja során közel azonos hangsúlyt kap a *transzcelluláris* és *paracelluláris* transzport mechanizmus [Artursson és mtsai 2001]. A paracelluláris passzív transzport arányának növelése elérhető a farmakonoknál olyan additív komponens alkalmazásával, melynek hatására a barrier funkciót erősítő junkcionális fehérjék regulációjára kerül sor [Liu és mtsai 1999]. A passzív transzportmechanizmusok mellett sokszor megnyilvánul a sejtet keresztüli *aktív transzport* jelenség is. Specifikus carrier- fehérjék segítségével kerülnek felvételre aminosavak, bizonyos cefalosporinok, ACE

gátlók, vitaminok. A specifikus carrier-fehérjével rendelkező anyagok esetében a transzcelluláris aktív útvonal mindaddig kizárólagos transzport mechanizmusnak tekinthető, amíg a transzportot végző fehérjék nem telítődnek. Az aktív útvonal bezáródásakor a passzív útvonalak is szerephez juthatnak. Abban az esetben azonban, ha az anyag passzív permeabilitása alacsony, a transzcelluláris aktív transzport kiesése felszívódási elégtelenséghez vezethet, így fokozott szerephez juthatnak a fent említett junkcionális fehérje moduláns segédanyagok. Az enterocyták felszínén jelen lévő speciális proteinek közül nem csak a carrier-fehérjékhez való kötődésnek van nagy jelentősége a hatóanyag felszívódás során. Több aktív transzport fehérje ugyanis a bél lumene felé szállítja a farmakont, csökkentve ezáltal annak biohasznosulását. A bélhámsejteken megtalálható *aktív effluxért* felelős fehérjék közül a legjelentősebb a P-glikoprotein (Pgp), de ezen kívül kimutható a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) illetve a Multidrug Resistance 2 (MDR2) aktív efflux fehérje is [Szakács és mtsai 2008]. A hatóanyaggal egy időben adott specifikus efflux fehérje szubsztrát hatására a felszívódás fokozódására kerülhet sor, továbbá növelhetjük a farmakon biztonságosságát [Varma és mtsai. 2005]. Abban az esetben ugyanis, ha az efflux szubsztrát hatóanyag mellé efflux transzporter gátlót is adunk, a farmakon mennyiségének növelése nélkül érhetünk el magasabb biohasznosulást [Collnot és mtsai 2006, Van Asperen és mtsai 1998]. Abban az esetben, ha a farmakon szférikusán képtelen a fent említett mechanizmusok valamelyikére, a hatóanyag felvételre *transzcitotikus* mechanizmus segítségével van lehetőség. A gyógyszerek felszívódásában ennek az útnak jóval kisebb a jelentősége, mint a korábban említett mechanizmusoknak, de kizárólag transzcitózissal képes felszívódni például a B₁₂- vitamin a bél lumenéből [Dix és mtsai 1990]. A transzcitózis folyamata két részből áll. Első lépésként a sejt endocitózissal bekebelezi a transzportálni kívánt farmakont, majd a befűződött vechikulum exocitózissal ürül ki a sejtmembrán egy távolabbi pontján. Több kutatócsoport is részletesen vizsgálta a Caco-2 monolayer megfelelőségét a gasztrointesztinális traktusból történő hatóanyag modellezésére [Lannernas és mtsai 1996]. Kísérleteikben gyors és teljes mértékben elsősorban passzív transzcelluláris úton, valamint lassan és kis mértékben jellemzően passzív paracelluláris úton felszívódó hatóanyagok felszívódását vizsgálták humán jejunumon illetve Caco-2 sejtvonalon. Mindkét esetben a humán felszívódás mértéke volt magasabb [Lannernas és mtsai 1996]. A biohasznosulás eltérésének hátterében több tényező áll. A különbségek értékelésénél figyelembe kell vennünk a felszívó felületek közötti különbséget. Az immunhisztokémiai feltérképezés során igazolódott, hogy a humán jejunumban lévő szoros sejtkapcsoló struktúrák minőségükben nem, de nyitottságukban nagymértékben eltérnek a Caco-2

monolayeren találhatóaktól [Artursson és mtsai 1993]. Azok a segédanyagok tehát, amelyek a zártabb, ezáltal komolyabb barriert jelentő Caco-2 monolayer sejtjei között jelenlévő junkciók alterációjára képesek, legalább olyan felszívódás fokozó hatással lesznek az in vivo biohasznosulás során is. Ennek megfelelően a farmakont in vitro modellen átjuttatni képes hatóanyagleadó összetételek számára az in vivo barrier rendszer is leküzdhető akadály. Amellett tehát, hogy a Caco-2 monolayer megbízható modellként szolgál a gasztrointesztinális rendszer in vitro modellezésére, segítségével háttérbe szoríthatók azon hatóanyagleadó rendszerek, melyek felszívódása in vivo nem lenne megfelelő.

2.4 Sejtéletképességi vizsgálatok

Az élő sejtek, ennek megfelelően a sejt kultúrák modellek sejtjei is folyamatos kapcsolatban vannak környezetükkel. A közeg megváltozását érzékelik, adaptációs képességeik határában belül alkalmazkodnak a megváltozott körülményekhez. Sejtkárosodás akkor jön létre, ha a környezetváltozás olyan mértékű, amit a sejt működésével nem tud kompenzálni. A sejtkárosodást kiváltó primer tényező nagyon sokféle lehet. A primer hatás eredményeként lezajló folyamatok azonban előre megjósolhatóan, mintaszerűen zajlanak. Ilyen másodlagos folyamat lehet a sejtmembrán aspecifikus permeabilitásának megváltozása vagy a sejt valamelyik anyagcsere folyamatának kiesése, azonban bizonyos esetekben mindkét hatás egyaránt megfigyelhető. Az enyhébb változások hatására bekövetkező sejtkárosodás sok esetben reverzibilis. Irreverzibilis változást eredményezhet viszont valamilyen drasztikusabb vagy nagyobb expozícióval járó behatás. Az irreverzibilis változás eredményeként a sejt nekrotikus vagy apoptotikus elhalása következik be. A nekrozis során a sejt passzív elszennvedője a pusztulásnak, míg az apoptózis során a genomjába kódolt program segítségével aktívan vesz részt a sejthalálban. A sejt kultúrákon végzett kísérletek jelentős részénél az életképes és az elpusztult sejtek arányát használjuk markerként az adott farmakon vagy segédanyag toxicitásának jellemzésére. Kísérleteinkben a felületaktív anyagok hatását felhasználási területüknek megfelelően vizsgáltuk. Minden esetben jellemeztük a tenzideket a mitokondriális aktivitásra gyakorolt hatásukkal MTT teszt segítségével.

A BASF által rendelkezésünkre bocsátott tenzidek esetében az esetleges parenterális (elsősorban iv) felhasználás miatt a vizsgálatot hemolízis teszttel is elvégeztük (A gyártó

honlapja alapján). A Gattefossé leginkább per os felhasználásra ajánlott tenzidjeinél LDH sejtéletképességi vizsgálatokkal egészítettük ki a citotoxicitási profil meghatározását. (A gyártó honlapja alapján) Ennek megfelelően tehát minden tenzid esetében a toxicitást két különböző módszerrel teszteltük. A tesztek részletes bemutatására az anyagok és módszerek fejezetben kerül sor.

2.5 Célkitűzés

Az önemulgeáló rendszerek képzéséhez használt felületaktív anyagok gyakran és nagy mennyiségben alkalmazott gyógyszer technológiai segédanyagok. A leggyakrabban választott tenzidek fiziko-kémiai tulajdonságának és élő szervezetre gyakorolt hatásának ismerete meghatározó a biztonságosan alkalmazható gyógyszerforma kialakításához.

Ezeket a szempontokat figyelembe véve, kísérletsorozatunkban a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Felületaktív anyagok szolubilizáló képességének vizsgálata a tenzidek CMC – értékének meghatározásával.
2. A tenzidek bélhámsejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata Caco-2 humán adenocarcinoma sejtvonalon.
3. A parenteráliák formulálásához használt tenzidcsoport kölcsönhatásának vizsgálata a vér alkotóival.
4. Összefüggések keresése a tenzidek kémiai szerkezete, valamint azok élő szervezetre gyakorolt hatása között.
5. A gyógyszer technológiai szempontból előnyösnek talált tenzidcsoport, Caco-2 egysejtmembránon keresztüli transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata.
6. A biológiai membránon keresztüli transzportváltozás hátterének feltérképezése.

3. Metodika

3.1. Felületaktív anyagok

Kísérletsorozatunk során az alábbi táblázatokban feltüntetett tenzideket vizsgáltuk. Különösen nagy hangsúlyt fektettünk a klasszikus és gyógyszerkönyvekben hivatalos felületaktív anyagok mellett, az önemulgeáló rendszerek képzéséhez használt tenzidek vizsgálatára [2.-4. táblázat]. Vizsgálatainkat két nemzetközi vállalat által rendelkezésünkre bocsátott tenzidekkel végeztük. Mind a Gattefossé, mind a BASF termékei mint emulgensek vagy koemulgensek alkalmasak per os felhasználásra kerülő S(M)EDDS –ek formulálására, egyes Cremophor[®] vegyületek pedig parenterális készítmények segédanyagaiként is használhatóak.

2. táblázat

1. csoport: A vizsgált (Gattefossé által rendelkezésünkre bocsátott) propilén-glikol és polietilén-glikol alapú nem ionos felületaktív vegyületek szerkezete

| Védjegyzett név | Kémiai szerkezet | Észter és zsírsav-tartalom | Gyártó | HLB |
|------------------------------------|---|---|------------|-----|
| CAPRYOL 90[®] | Propilén-glikol monokaprilát | Monoészter tartalom 90 % (kaprilsav (C8)) | Gattefossé | 6 |
| CAPRYOL PGMC[®] | Propilén-glikol monokaprilát | Monoészter tartalom 60 % (kaprilsav (C8)) | Gattefossé | 5 |
| LABRASOL[®] | Mono- di- és tri- gliceridek polietilén-glikol mono- és di-észtereinek definiált keveréke | észter tartalom >90% Lauril sav (C12) < 3% Kapril sav (C8) 50–80% Kaprin sav (C10) 20–50% Kaproil sav (C6) < 2% Mirisztin sav (C14) < 1% | Gattefossé | 14 |
| LAUROGLYCOL 90[®] | Propilén-glikol monolaurát | Monoészter tartalom 90% Diészter tartalom 10% laurinsav (C12) 90 % kaprilsav (C8) <0.5 % kaprinsav (C10) < 2 % mirisztinsav (C14) <3 % palmitinsav (C16) < 1 % | Gattefossé | 5 |
| LAUROGLYCOL FCC[®] | Propilén-glikol monolaurát | Monoészter tartalom 45-70 % Diészter tartalom 30-55% laurinsav (C12) 95 % kaprilsav (C8) <0.5 % kaprinsav (C10) < 2 % mirisztinsav (C14) <3 % palmitinsav (C16) < 1 % | Gattefossé | 4 |

3. táblázat

2. csoport: A vizsgált (BASF által rendelkezésünkre bocsátott) cetilsztearil alkohol és polietilén-glikol alapú nem ionos felületaktív vegyületek szerkezete

| Védjegyzett név | Kémiai szerkezet | Észter és zsírsav-tartalom | Gyártó | HLB |
|---|---|----------------------------|--------|------|
| CREMOPHOR A 25 ® | Cetil-(25) sztearil alkohol | | BASF | 15,5 |
| CREMOPHOR A6 ® | Cetil-(6) sztearil alkohol | | BASF | 15,5 |
| CREMOPHOR CO 410 ® | 90% Polietilén-glikol(40)- trihidroxisztearát 10% víz | | BASF | 15 |
| CREMOPHOR CO 455 ® | Polietilén-glikol(40)- trihidroxisztearát | | BASF | 14 |
| CREMOPHOR RH 410 ® | 90% Polietilén-glikol(40)- trihidroxisztearát 10% víz | | BASF | 15 |
| CREMOPHOR RH 60 ® | Polietilén-glikol(60)- trihidroxisztearát | | BASF | 17 |
| CREMOPHOR RH40 ®/ KOLLIPHOR RH40 ® | Polietilén-glikol(40)- trihidroxisztearát | | BASF | 14 |
| CREMOPHOR WO7 ® | Polietilén-glikol(7)-trihidroxisztearát | | BASF | 5 |

4. táblázat

3. csoport: A vizsgált nemionos poliszorbát vegyületek és a felhasznált ionos tenzidek szerkezete

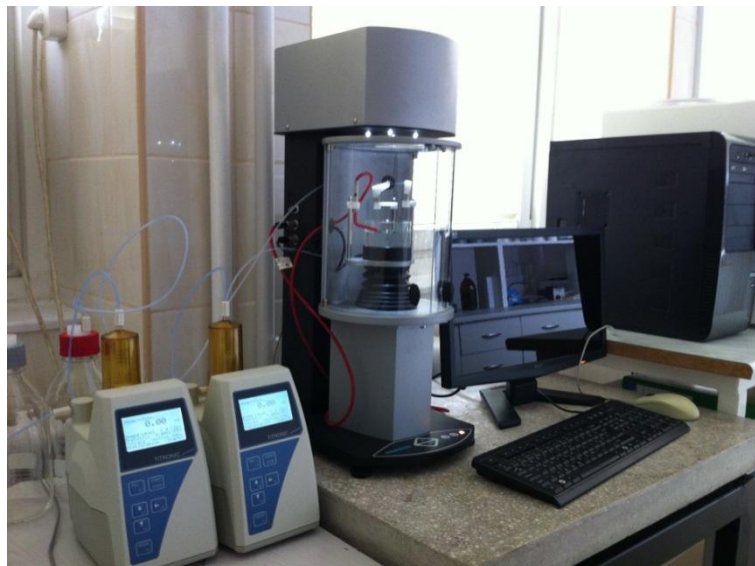
| Védjegyzett név | Kémiai szerkezet | Észter és zsírsav-tartalom | Gyártó | HLB |
|-------------------------------|-------------------------------------|---|---------------|------|
| NÁTRIUM-LAURIL-SZULFÁT | Nátrium-Lauril-Szulfát | | Sigma-Aldrich | 40 |
| POLISZORBÁT 20 | Polietilén- szorbitán monolaurát | Etoxilezett szorbitnak és anhidridjeinek részleges zsírsav, főként laurinsav- észtereiből álló keveréke. | Sigma-Aldrich | 16,7 |
| POLISZORBÁT 60 | Poliethylén- szorbitán monosztearát | Etoxilezett szorbitnak és anhidridjeinek részleges zsírsav, főként sztearinsav - észtereiből álló keveréke. | Sigma-Aldrich | 14,9 |
| POLISZORBÁT 80 | Poliethylén- szorbitán monooleáta | Etoxilezett szorbitnak és anhidridjeinek részleges zsírsav, főként olajsav -észtereiből álló keveréke. | Sigma-Aldrich | 14,7 |

Az általunk végzett kísérletek ennek megfelelően a bélhámsejtekre gyakorolt hatás (IC_{50} -MTT, IC_{50} -LDH), valamint bizonyos esetekben a segédanyagok hemolitikus aktivitásának (HC_{50}) mérésére is kiterjedtek, attól függően, hogy az alkalmazás fő indikációja per os vagy parenterális.

3.2. Felületi feszültség mérése és a CMC meghatározása

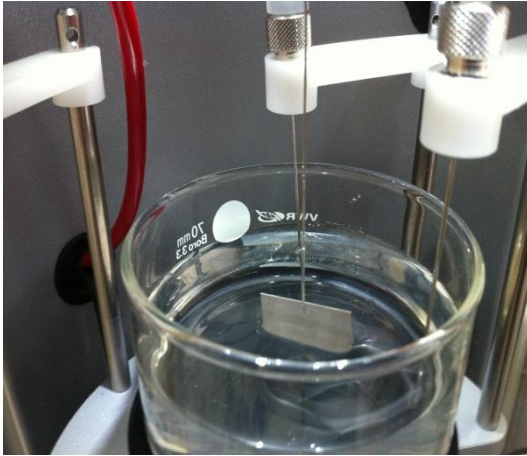
A felületi feszültség mérés során folyadék/gáz határfelületi feszültséget és annak változását mértük. Különbséget teszünk aszerint, hogy a folyadék fázist alkotó részecskék a fázis belsejében vagy a felületén helyezkednek el. A fázis belsejéhez képest ugyanis a felületen lévő részecskék aszimmetrikus erőterben vannak, így energiájuk eltér a fázisban lévőkéhez képest. A felület létrehozása vagy megszüntetése ennek következményeként mindig munkával jár. A tiszta folyadékok egységnyi felületének létrehozásakor végzett munka izoterm reverzibilis körülmények között, azaz a felületi feszültsége tehát e felületnövekedéssel kapcsolatos szabadenergia változással (felületi szabadenergia többlet) egyenlő,

mértékegysége J/m^2 vagy N/m ($Nm/m^2=N/m$). Az oldószer elegyek és oldatok felületi feszültsége a tiszta oldószerétől eltér, mivel e rendszereket egynél többféle molekula alkotja, szükségszerűen tehát a különböző molekulák közti kölcsönhatás a tiszta oldószerétől eltérő lesz. Ennek következtében a felületi feszültség nőhet, vagy csökkenhet. A tiszta oldószerhez felületaktív anyagot keverve a felületi feszültség csökkenése figyelhető meg. A kritikus micellaképzési koncentráció eléréséig a felületen mérhető feszültség csökken, CMC fölött pedig állandósul. CMC értéknek a felületi feszültség mérés során felvett görbe töréspontjához tartozó koncentrációt tekintjük. A kritikus micellaképzési koncentráció meghatározásához, számítógép vezérelt két diszpenzeres Sigma 700 típusú tenziométert (Biolin Scientific Inc., Svédország) használtunk [5.ábra].

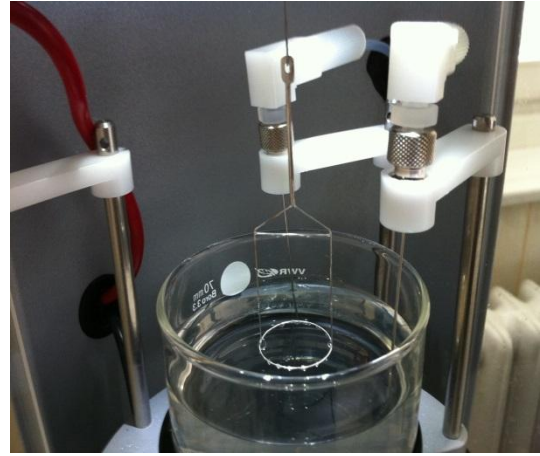


5. ábra. Sigma 700 típusú dupla diszpenzeres tenziométer

A kísérletet megelőzően a berendezést úgy kalibráltuk, hogy a tiszta víz felületi feszültsége laboratóriumi körülmények között ($22^{\circ}C$, $\sim 50\%$ relatív páratartalom) 72 dynes/cm^2 legyen [Lide 1990]. A mérés során a felületaktív anyagok $0,1-1 \text{ v/v\%}$ -os törzsoldatát készítettük el. Ezen törzsoldatok pontos vízzel történő hígítását és az így kapott koncentrációkhoz tartozó felületi feszültség megállapítását a berendezés automatizáltan végezte. A kísérlethez automatizált Du Nüoy pull out ring illetve az ismételt meghatározáshoz Wilhelmy pull out plate módszert használtunk [Du Nüoy és mtsai 1925 valamint Li és mtsai 2008] [6.-7. ábra]. A micellaképződéshez szükséges kritikus koncentrációt a berendezés által mért felületi feszültségek ábrázolásával állapítottuk meg.



6. ábra. Wilhelmy plate



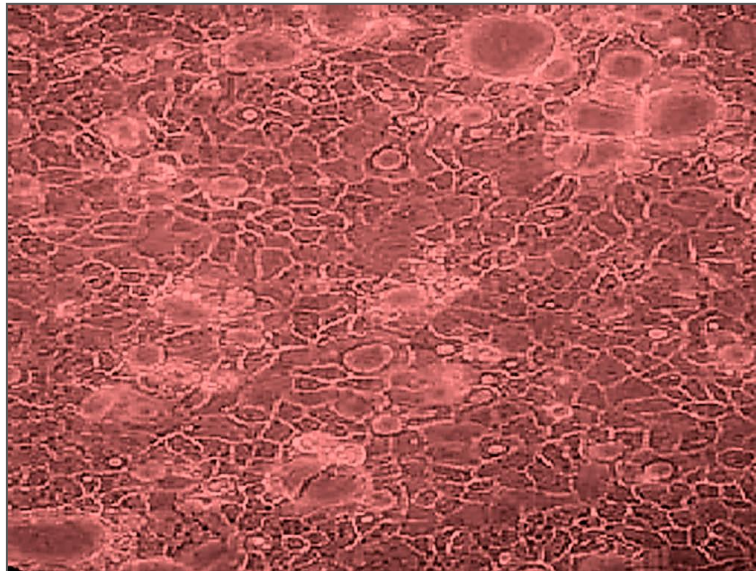
7. ábra. Du Nüoy ring

3.3.Hemolítikus aktivitás meghatározása

A gyógyszerkészítmény intravénás alkalmazhatóságát jellemezhetjük a gyógyszerforma alkotóinak a vér elemeire gyakorolt hatásával [Jiang és mtsai 2011]. A tenzidek hemolítikus aktivitásának vizsgálatához egészséges humán önkéntes donorok vérért alkalmaztuk. A vér alakos elemeit a citráttal koagulált vérből centrifugálással szeparáltuk ($2500 \times G$, 10 perc), ezt követően PBS- el (Phosphate Buffered Saline) háromszor öbítettük [Heyun és mtsai 2012]. A PBS –sel készült, különböző koncentrációjú tenzid oldatokhoz ($pH=7,2$) 5×10^7 számú erythrocytát adtunk. 10 perces, $37^\circ C$ -on történő inkubálás után a mintákat $5000 \times g$ centrifugáltuk. A hemolízis következtében kiszabaduló hemoglobin abszorbanciáját mértük a felülúszóban 540 nm –en FLUOstar Optima microplate reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével. A kontroll kísérlet során az erythrocytákat desztillált vízben inkubáltuk 10 percig, ez alatt végbement a teljes hemolízis. Majd egy végső centrifugálást követően megmértük a felülúszóban lévő, kiszabadult hemoglobin abszorbanciáját 540 nm – en. A kontroll minták alapján számított hemolizált sejtek arányát ábrázoltuk a vizsgált koncentráció függvényében.

3.4. Sejttenyésztés

A kísérletekhez használt humán adenokarcinoma sejtvonal az ECACC-tól (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) származott. Az in vitro sejttenyésztés során a sejteket fiziológias körülményekhez hasonló letapadó sejt kultúrához alkalmas sejttenyésztő edényben, (Nunc; Dánia) 10 (v/v)% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS, Sigma-Aldrich; Magyarország), 1 (v/v)% nem esszenciális aminosavat (Sigma-Aldrich; Magyarország) és 100 mg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich; Magyarország) tenyésztő médium folyadékban növesztettük CO₂ termosztátban (5% CO₂ atmoszférában) 37°C -on 95 % páratartalom mellett. A sejteken a tápoldat cserét minden 3. napon végeztünk, lamináris áramlású steril fülke alatt [Bigansoli és mtsai 1999]. A laminár boks (LAF) alkalmazásával a sejttenyésztet mikrobális fertőződésének lehetőségét minimálisra csökkentettük. A kultúra kialakítását a telepítő edényben ~10⁶ db sejttel indítottuk. A következő hat napban a sejtek száma exponenciálisan növekedett, majd a hetedik napon elérte a telítési szakaszt, kialakult a letapadó sejtvonalakra jellemző konfluens kultúra [8.ábra].



8. ábra. A Caco-2 sejtek tenyésztése során kialakuló konfluens sejtréteg fénymikroszkópos képe (40x)

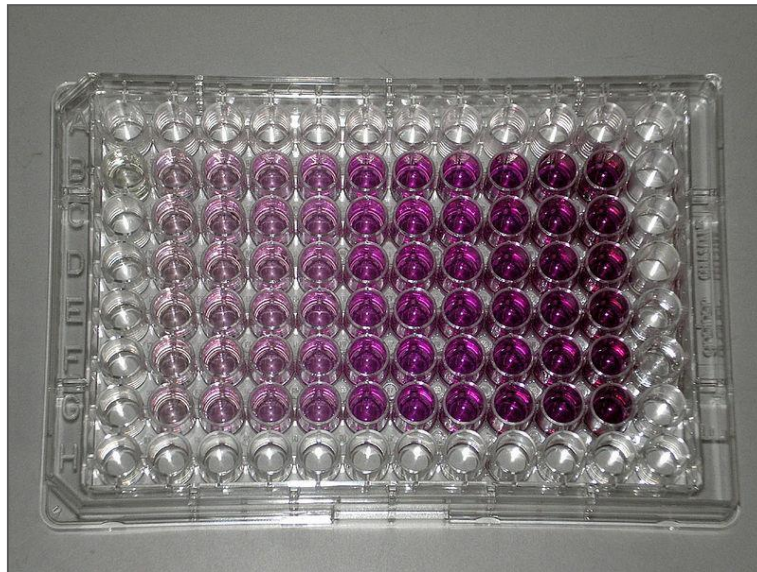
Ebben a stádiumban történt a Caco-2 sejtek passzálása laminár bokszt alatt. A sejttenyésztő médium eltávolítása után a tápoldat maradékát PBS (Phosphate Buffered Saline) oldattal lemostuk. A letapadó sejtek szuszpenzióba viteléhez enzimként 0,05 (m/v)% tripszin oldatot valamint kelátképzőként 0,02(m/v)% etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) oldatot [0,5 % g/l tripszin (Sigma-Aldrich; Magyarország); 0,2 g/l EDTA (Sigma-Aldrich; Magyarország)] használtunk. Az emésztés során a sejteket 2 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a reakciót ötszörös mennyiségű friss médium hozzáadásával állítottuk le. A médiumban lévő szérum inaktiválja a tripszint. A sejtuszuszpenziót ezután 1100 rpm fordulaton, szobahőmérsékleten 6 percen keresztül centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után 10 ml friss médiumban a sejteket szuszpendáltuk. A sejtuszuszpenzióban lévő sejtek számát Bürker kamra segítségével számoltuk. A sejtuszuszpenzió $\sim 10^6$ db sejtet tartalmazó mennyiségét steril telepítő edénybe pipettáztuk, majd a sejteken lévő tápoldat mennyiségét 10 ml-re egészítettük ki. A további vizsgálathoz 22-45 passzázsszám közötti sejteket használtunk.

3.5.Sejt életképességi vizsgálatok

3.5.1.MTT teszt

A kísérletek során a Caco-2 sejtek mitokondriális aktivitás változását mértük. Az életképes sejtek mitokondriumainak belső membránjában és mátrixában zajló oxidatív reakciókban résztvevő dehidrogenázok a vízben oldható sárga színű 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) oldatot lila színű vízben oldhatlan formazán kristályokká redukálják. Tekintettel arra, hogy a mitokondriális elektrontranszport és energiatermelés alapvető feltétele a sejtműködésnek, csak a formazán előállítására képes sejteket tekintjük vitálisnak. A lila szín mélysége jól korrelál az életképes sejtek arányával [Palamakula és mtsai 2004]. A vizsgálathoz a Caco-2 sejteket, 7 nap alatt az előző pontban ismertetett módszerrel 96 lyukú tenyésztő plate-ben (10^4 sejt/lyuk) növesztettük. A növesztés során a 3. napon a tenyésztő médiumot lamináris áramlású fülke alatt lecseréltük. A konfluens sejtréteg kialakulását követően különböző koncentrációjú, PBS-ben készült tenzid oldatot pipettáztunk a sejtekre. 30 perces inkubálás után PBS-el készült, 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatra cseréltük a vizsgálati mintákat és 37 °C- on további 3 órán keresztül inkubáltuk. A felülúszó

eltávolítása után, a keletkezett formazán kristályokat 150 μ l sósavas 2-propanollal (2-propanol: sósav =25:1) oldottuk fel [9.ábra].



9. ábra. A Caco-2 sejtvonalon az MTT teszt során kialakuló formazán kristályok okozta színváltozás a 96 lyukú plate- ben

Az oldatok abszorbanciáját FLUOstar Optima microplate reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével 570 nm-en mértük. Korrigálásként kivontuk az 570 nm -en mért abszorbancia értékekből a sejtörmelék szuszpenzió, mint háttér 690 nm-en mért abszorbancia értékeit [Gursoy és mtsai 2003]. A kísérlet során át nem alakult (feltételezhetően a sejtörmelékhez tapadó) festék nem befolyásolta a meghatározást, tekintettel arra, hogy a redukálatlan MTT-nek nincs elnyelése 570 nm –en. Az így kapott eredményeket kezeletlen kontroll minták abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a tenzid koncentráció ellenében ábrázoltuk. Az ábrák segítségével meghatároztuk az egyes felületaktív anyagokra jellemző IC_{50} (50% mitokondriális enzim inaktiváció) értékeket.

3.5.2.LDH teszt

A felületaktív anyagok membrán szolubilizáló képessége révén a Caco-2 sejtek membrán integritása sérülhet. A károsodott sejtekből felszabaduló Laktát-DeHidrogenáz (LDH) enzim extracelluláris aktivitásának mérésével felderíthető a membrán szolubilizációs képesség mértéke [Martin és mtsai. 1991]. A kísérletekben az MTT teszt bemutatása során ismertett

módon a sejteket 96 lyukú plate-ben növesztettük. A konfluens sejtréteg kialakulását követően különböző koncentrációjú, PBS-ben készült tenzid oldatot pipettáztunk a sejtekre. A sejtet vagy sejtörmelék nem tartalmazó felülúszókat 30 perc inkubáció után, detektálási célból egy másik 96 lyukú plate-be pipettáztuk. A mintákhoz az LDH-kit (Roche Diagnostics; Németország) részeként megvásárolt katalizátort (Diaforáz/NAD⁺ keverék) és festéket (Iodotetrazólium klorid/Na laktát) 1:45 arányban a vizsgált felülúszóval megegyező mennyiségben hozzáadtuk. A minták abszorbanciáját, 30 perces sötét inkubálás után, FLUOstar Optima microplate reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével 492 nm-en mértük. Az így kapott eredményeket kezeletlen kontroll minták, valamint a 100% ban sejtpusztító hatású Triton-X 100 abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a tenzid koncentráció ellenében ábrázoltuk. Az ábrák segítségével meghatároztuk az egyes felületaktív anyagokra jellemző IC₅₀ értéket, amely a vizsgálati anyag azon koncentrációja ahol a teljes sejtszámhoz viszonyítva az életképes sejtek aránya 50%.

3.6. Transepitheliális Ellenállás (TEER) mérése Caco-2 monolayeren

A Transepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréséhez a sejteket a korábban ismertetett tenyésztési eljárással, azonban ebben az esetben 0,4 µm pórusméretű polikarbonát inzertekre (Corning Costar, USA) szélesztettük. Az inzerteket 12 lyukú platekbe (Corning Costar, USA) helyeztük úgy, hogy a plate-be pipettázott tápoldat szintje az inzertek apikális kamrájában lévő tápoldat szintjével azonos legyen. A sejteket ehhez 500 µl-ben vettük fel a bazális kamrába pedig 1500 µl tápoldatot pipettáztunk. A TEER mérés során az apikális és a bazális kamrába helyezett elektródok közötti elektromos ellenállást mértük (Millicell-ERS volthometer, Millipore, USA) [10.ábra].



10. ábra. Millicell ERS-2 TEER meghatározó készülék és az elektródok elhelyezkedése a mérés során

A TEER értékek mértékegysége $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$. Mérési körülményként rögzítenünk kell a pH és a hőmérséklet mellett a méréshez közegként használt sejttenyésztő médium pontos összetételét is. Az ellenállás értékek meghatározása előtt a pontos mérés biztosításához az elektródokat a méréshez használt tápoldatban ekvibráltuk [Yau Yi Lao és mtsai 2004]. A sejtek membránra szélesztését követően az első napokban a TEER értékek növekedését, a 4.-5. napon a TEER értékek stagnálását, majd 8.-10. napon a konfluens sejtréteg előregedése miatt az ellenállás ismételt csökkenését figyeljük meg [Bailey és mtsai 1996]. A transzport vizsgálatokat a konfluens sejtréteg kialakulását követően, de a TEER értékek csökkenése előtt az ellenállási értékék plató fázisában végeztük. A plató fázisban elvárt TEER értékek tekintetében a nemzetközi irodalomban eltérő adatokat közöltek. Yau Yi Lao és munkatársai $300\text{-}540 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ TEER értékeket mértek [Yau Yi Lao és mtsai 2004] míg Braun és munkatársai a mi méréseinkkel harmonizáló $750\text{-}800 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ ellenállást mértek a konfluens réteg kialakulásakor [Braun és mtsai 2000].

3.7.Caco-2 membrán transzport vizsgálata

A biológiai hasznosíthatóság értékelésének egyik módszere a gyógyszerkészítményben lévő hatóanyag megoszlásának vizsgálata [Antal és mtsai 2009]. A kompartmentek közötti megoszlás értékelésére különböző transzportmodelleket alkalmazunk. A felületaktív anyagok paracelluláris transzportra gyakorolt hatását ismert kinetikával permeáló Lucifer yellow festékanyag (Sigma-Aldrich; Magyarország) átjutást monitorozva vizsgáltuk [Fenyvesi és mtsai 2011]. A kísérletet megelőzően a Caco-2 sejteket Transwell[®] ($0,4 \mu\text{m}$ pórusméret, 2×10^5 sejt/inzert) (Corning Costar, USA) polikarbonát inzerten növesztettük. A sejtek tenyésztése a korábban ismertetett körülmények között történt. Az inzerteken a médiumot 2 naponta lecseréltük. TEER méréseink alapján a transzport kísérletekhez használt stabil Caco-2 monolayer a kiültetést követő 20-30 nap után alakult ki. A sejtek konfluenciáját a két kompartment közötti transepitheliális elektromos ellenállás (TEER) értékek mérésével követtük nyomon (Millicell-ERS volthometer, Millipore, USA). A mért TEER értékeket az üres inzert ellenállásával és az effektív felülethányaddal korrigáltuk.

A transzport kísérletekben a $800 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ feletti TEER értékekkel jellemezhető monolayereket használtuk. Minden minta transzportra gyakorolt hatását három párhuzamos

inzerten vizsgáltuk. Az inzerteket HBSS-ben (Hank's Balanced Salt Solution; Sigma Magyarország) mostuk (37°C, 30 perc). A bazális kamrát akceptor oldatként tiszta HBSS -el töltöttük fel. Az apikális kamrába 40 µg/ml koncentrációjú Lucifer yellow HBSS -el készült oldatát, mint donor oldatot pipettáztuk. A meghatározás során mintát a bazális kamrából 10., 30., 60., és 120. percben vettük. A minták fluoreszenciáját FLUOstar Optima microplate reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével 450nm es gerjesztő fény hullámhossz mellett 520 nm-en detektáltuk.

3.8.Immunohisztokémia

A fluoreszcens jelölés alkalmas tetszőleges sejtalkotók detektálására és elkülönítésére az élő mintákon [Krizbai és mtsa 2003]. A módszer használható kvantitatív és kvalitatív elemzésre egyaránt [Stockert és mtsai 2009]. DNS-ben interkalálódó festékekkel lehetséges DNS-t tartalmazó sejtalkotók, mint például a sejtmag vagy a mitokondrium megfigyelése. A sejtfelszíni vagy a sejt belsejében található fehérjék kimutatása a felületükön található specifikus antigének fluoreszcens jelölésével történhet. Primer antitest segítségével jelöljük a megfigyelni kívánt stuktúra alkotót, majd a primer antitesthez kötődő másodlagos antitesttel tesszük láthatóvá a fehérjét. A vizsgálatokhoz a Caco-2 sejteket üveg fedőlemezekon növesztettük az előző pontokban ismertetett módon. A konfluens sejtréteg kialakulása után a mintákat 60 percen át kezeltük a kísérletes anyagok HBSS-el készült oldatával. Kontrollként a sejteket tiszta HBSS-el inkubáltuk. A minták eltávolítása után a lemezeket PBS-el (pH 7.3) mostuk majd fixálásként 10 percig metanol aceton 1:1 arányú keverékével kezeltük. Ezután a sejteket anti-ZO-1 (Invitrogen, USA), anti-claudin-1 (Invitrogen,USA), anti-β-catenin (Sigma–Aldrich, Magyarország) primer antitestek 1:200 arányú oldatával inkubáltuk 8 órán át, a nem specifikus antitest kötő helyeket blokkoló a 3%-os szarvasmarha szérum albumin (BSA) oldattal együtt. Ezt követően a Caco-2 sejteket 60 percen keresztül kezeltük Cy3-al jelölt másodlagos anti-nyúl, IgG (Sigma–Aldrich, Magyarország) 1:400 arányban PBS-ben oldott antitesttel a ZO-1 és a β-catenin, valamint Alexa 488 anti-nyúl IgG 1:400 arányú oldatával a Claudin-1 junkcionális fehérjék jelöléséhez. A Caco-2 sejtek nucleusait a kísérlet során bis-benzimid (Sigma–Aldrich, Magyarország) (10µmol) festékekkel festettük meg. Az inkubálások között a lemezeket három alkalommal mostuk PBS-el. A lemezeket Gel Mount (Biomed, USA) segítségével tárgylemezre rögzítettük majd a jelöléseket NikonEclipse

TE2000 fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon, Japan) vizsgáltuk. A megjelölt junkcionális fehérjékről a felvételt, Spot RT digital kamera (Diagnostic Instruments, USA) segítségével készítettük.

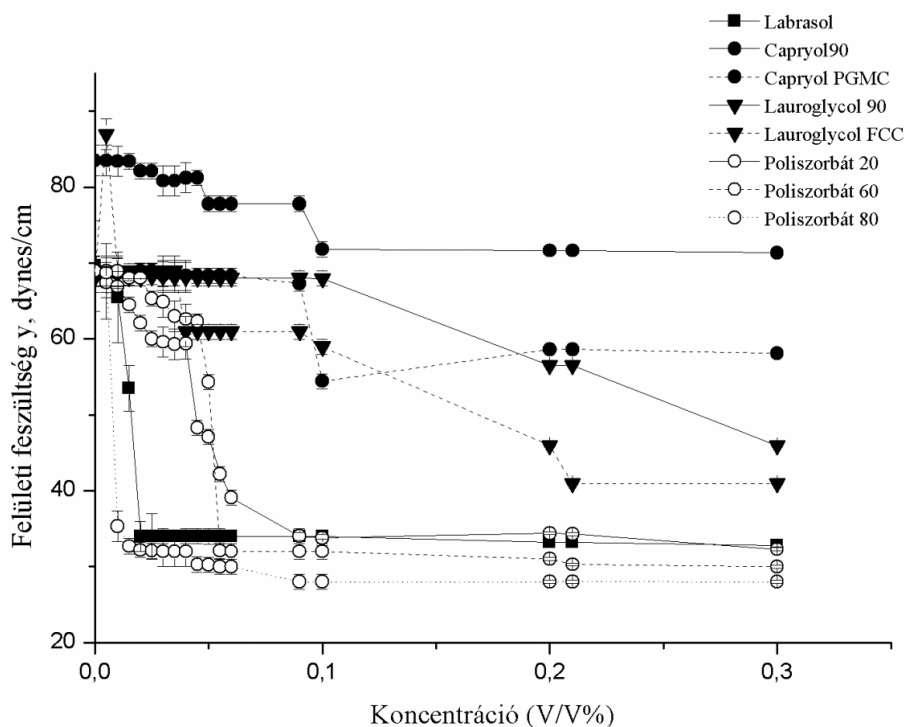
3.9.Statisztikai analízis

Kísérleteink során kapott eredményeinket statisztikailag a SigmaStat (version 3.1; SPSS, Inc.) segítségével elemeztük. Az eredményeink között ez alapján számított átlagukat tüntettük fel \pm SD. A csoportok összehasonlítását ONE WAY ANOVA módszerrel végeztük, amelyet Tukey's teszt követett. A kísérleti eredményeinket legalább 3 párhuzamos mérés szolgáltatta a különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

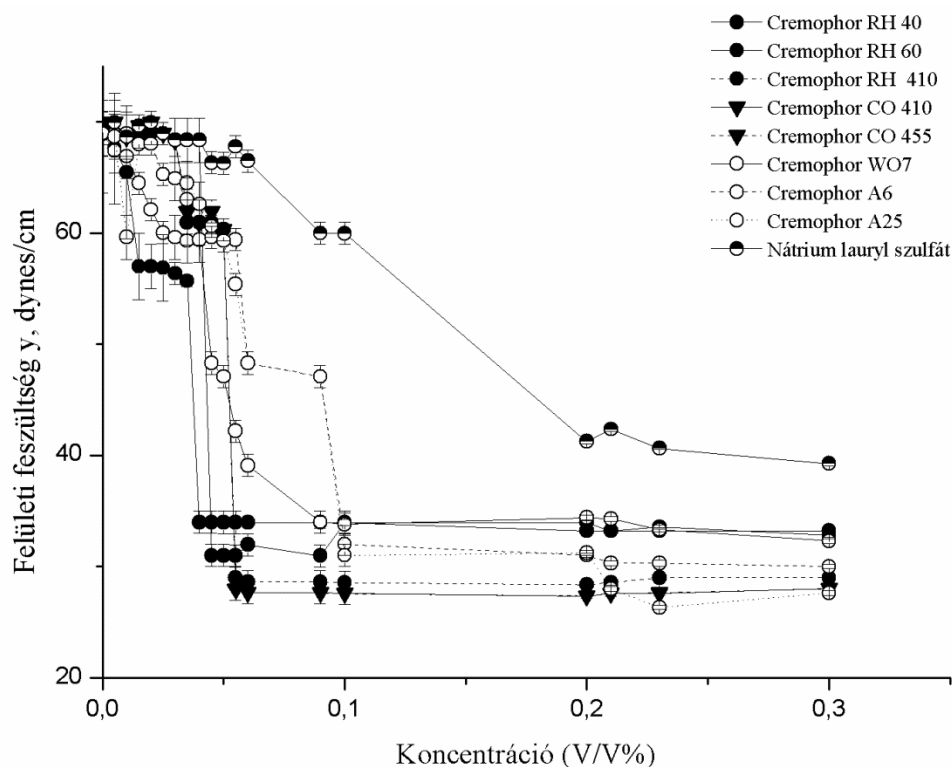
4.Eredmények

4.1. A CMC meghatározása a felületi feszültség változás mérése alapján

A felületi feszültség méréssel meghatározott CMC (micellaképzéshez szükséges minimális koncentráció) vizsgálatnál, mind a Du Nouy pull out ring illetve az ismételt meghatározáshoz használt Wilhelmy pull out plate módszerek igazolták valamennyi vizsgált anyag koncentrációfüggő felületi feszültség csökkentő tulajdonságát. A felületi feszültségeket a koncentráció függvényében ábrázolva megállapíthattuk, hogy a kritikus micellaképzési koncentráció a polioxietilén származékoknál kisebb, mint a hidrofil csoportként propilén glikolt tartalmazó, illetve a cetil sztearil alkohol típusú tenzidek esetében. A legnagyobb micellaképződési koncentrációt a vizsgált anyagok közül a nátrium lauryl szulfát esetében mértük [11.-12. ábra].



11. ábra. A Felületi feszültség értékeinek változása a koncentráció függvényében a vizsgált felületaktív anyagok esetében. (1. és 3. csoport) A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk. (n=5)



12. ábra. A felületi feszültség értékeinek változása a koncentráció függvényében a vizsgált felületaktív anyagok esetében. (2. csoport) A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk. ($n=5$)

A meghatározások során a Labrasol[®] kisebb koncentrációban képzett micellákat mint a Cremophor[®] család tagjai amelyeknél a CMC sorrend RH 40 < RH 60 < RH410 < CO 455 < CO 410 < WO7 volt. A poliszorbát vegyületek micellaképzési koncentrációja mindhárom esetben meghaladta a Labrasol[®]-ra jellemző CMC értékeket. A propilénglikolok között a CMC értékek alapján vett sorrend a Lauroglycol PGMC[®] < Lauroglycol 90[®] < Capryol PGMC[®] < Capryol 90[®] volt [5.Táblázat].

5. táblázat

A különböző tenzidek felületi feszültség változásából származtatott CMC értékei

| Név | CMC (V/V%) | ±SD | Név | CMC (V/V%) | ±SD |
|-------------------------------|---------------|--------|-------------------------------|---------------|--------|
| Cremophor RH 40 [®] | 0,0408 | 0,0010 | Labrasol [®] | 0,0123 | 0,0006 |
| Cremophor RH 60 [®] | 0,0457 | 0,0011 | Capryol 90 [®] | 0,6109 | 0,0016 |
| Cremophor RH 410 [®] | 0,0551 | 0,0022 | Capryol PGMC [®] | 0,4570 | 0,0011 |
| Cremophor CO 410 [®] | 0,0554 | 0,0010 | Lauroglycol 90 [®] | 0,3480 | 0,0010 |
| Cremophor CO 455 [®] | 0,0548 | 0,0014 | Lauroglycol PGMC [®] | 0,2180 | 0,0021 |
| Cremophor WO7 [®] | 0,0901 | 0,0032 | Poliszorbát 20 | 0,0975 | 0,0001 |
| Cremophor A6 [®] | 0,1016 | 0,0012 | Poliszorbát 60 | 0,0581 | 0,0005 |
| Cremophor A25 [®] | 0,1001 | 0,0020 | Poliszorbát 80 | 0,0128 | 0,0031 |
| Nátriumlaurylszulfát | 0,2341 | 0,0018 | | | |

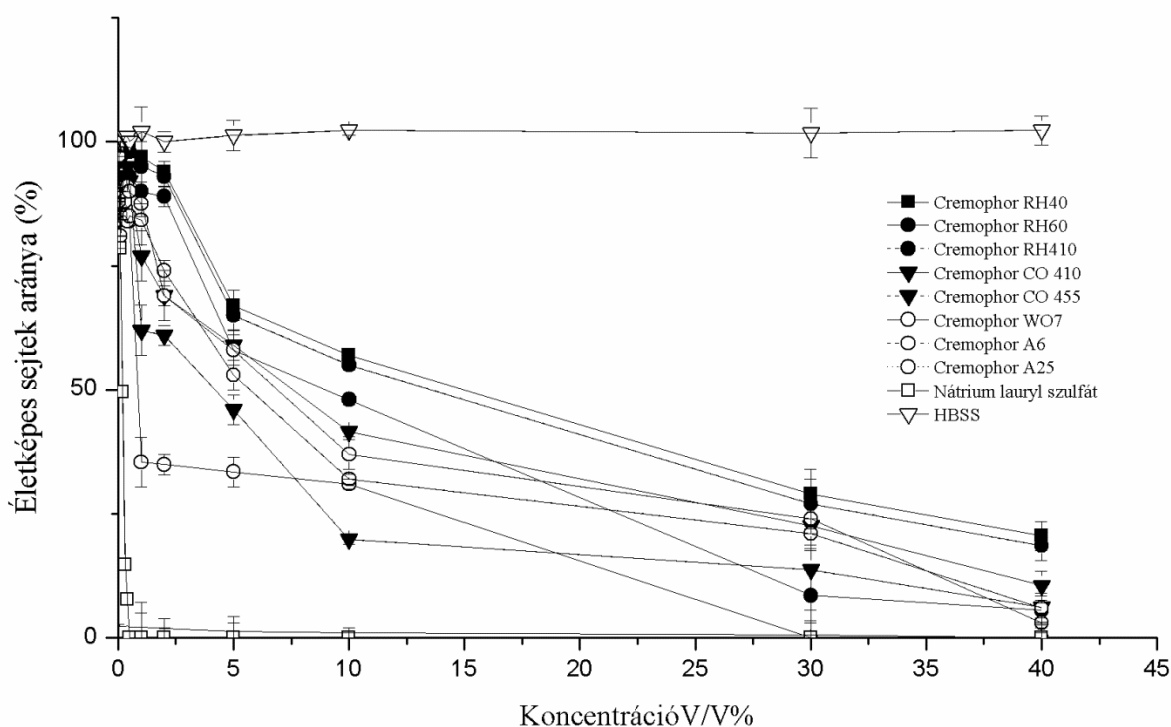
A mért adatokat átlag±SD formában adtuk meg (n=5)

A kritikus micellaképződési koncentráció értékek táblázatos összesítésénél mind a a Du Nouy pull out ring mind a Wilhelmy pull out plate módszer alapján azonos sorrendet kaptunk valamint a párhuzamos mérések között adódott szórás mértéke nem haladta meg a 0,003 dynes/cm értéket [5.táblázat].

4.2.Sejtéletképességi vizsgálatok

4.2.1.MTT teszt

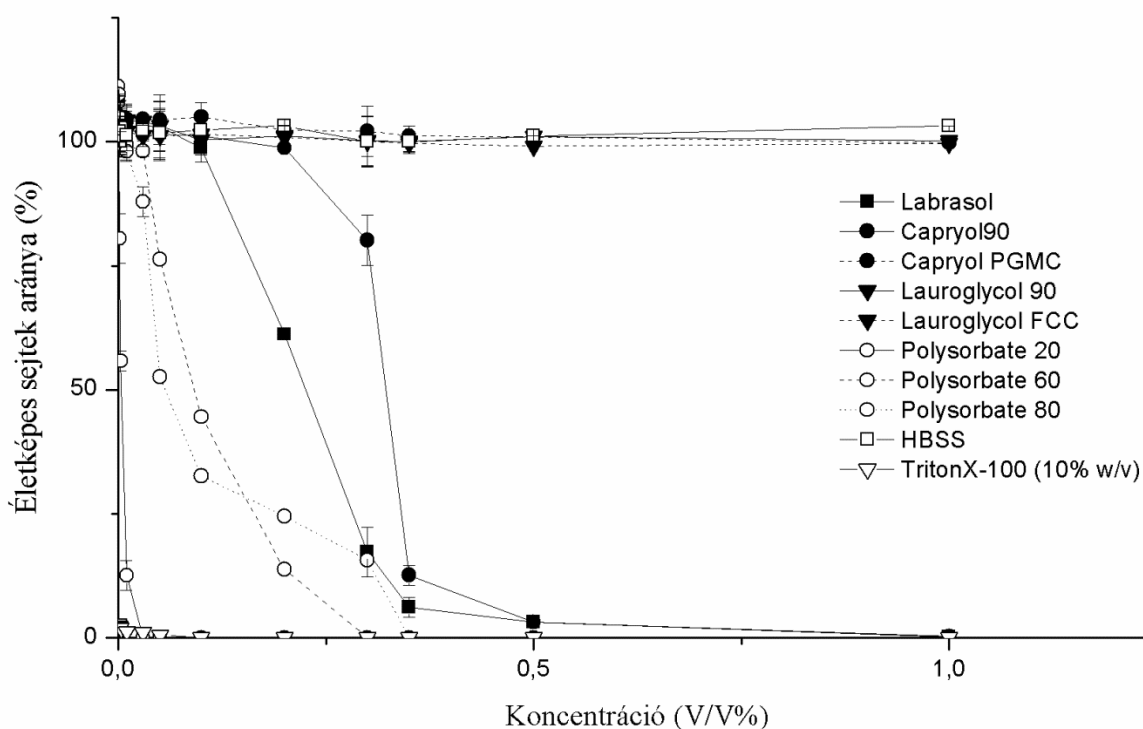
Az MTT citotoxicitási teszt során a Caco-2 sejtek mitokondriális aktivitás változását mértük. A vizsgált felületaktív anyagok sejtéletképességre gyakorolt hatása minden anyag esetében koncentrációfüggő tulajdonságnak bizonyult. A teszt során vizsgált PEG struktúrájú Cremophor[®]-ok nagyobb koncentrációban is jobban tolerálhatónak bizonyultak, mint a Labrasol[®] vagy a propilén glikol alapszerkezetű tenzidek [13. ábra].



13. ábra. Az MTT sejtéletképességi vizsgálat eredményei a 2. tenzid csoport meghatározásánál. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk. (n=5)

A Cremophor[®]/Kolliphor[®] típusú PEG észter típusú vegyületek koncentrációfüggő sejtkárosító hatásgörbe alapján számított IC₅₀ értékük alapján az alábbi sorrendiség mutatkozott: Cremophor[®]/Kolliphor[®] RH40 > RH410 > RH60 > A6 > CO410 > A25 > CO455 > WO7

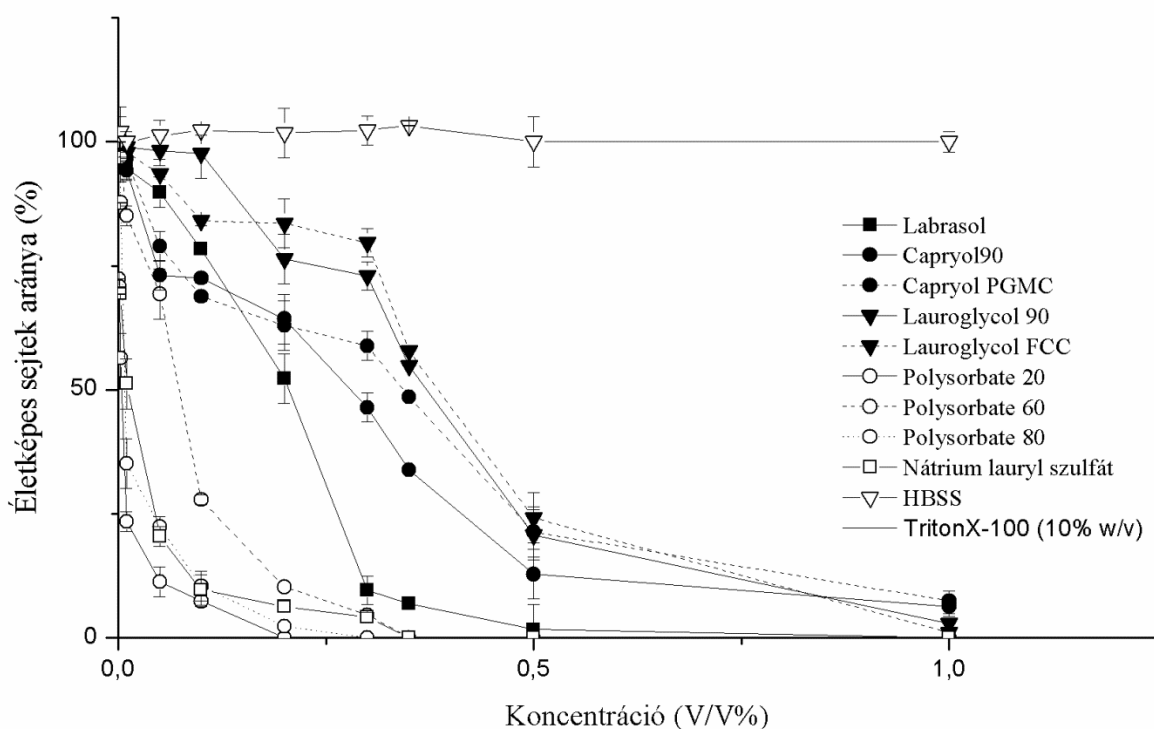
A hidrofíl feji részben szorbit komponenst is tartalmazó poliszorbát vegyületek ugyanakkor valamennyi Gattefossé tenzidnél is kisebb koncentrációban okozott jelentős sejtkárosító hatást [14. ábra]. A poliszorbát vegyületek közül a legalacsonyabb IC₅₀ értékkel sorban a Poliszorbát 20 < Poliszorbát 80 < Poliszorbát 60 volt jellemezhető. A propilén glikol észter csoport tagjai közül a Capryol 90 bizonyult a legtoxikusabbnak. MTT citotoxicitási teszttel vizsgálva a Capryol PGMC, Lauroglycol 90 és Lauroglycol FCC esetében gyakorlatilag nem volt kimutatható sejtkárosító hatás a Caco-2 sejteken. A vizsgált felületaktív anyagok közül a legtoxikusabbnak egyértelműen az ionos nátrium lauryl szulfát bizonyult. Ez az eredmény harmonizál a nemzetközi irodalomban korábban közölt mérésekkel [Antonie és mtsai 1989].



14. ábra. Az MTT sejtleképességi vizsgálat eredményei az 1. és 3. tenzid csoport esetében A mért adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában ábrázoltuk. ($n=5$)

4.2.2.LDH teszt

Az LDH teszt kiértékelésekor minden vizsgált tenzidnél egyértelműen megállapítható koncentrációfüggő sejtkárosító hatást tapasztaltunk. Az LDH teszt eredményeként számított IC_{50} értékek alapján a következő sorrendet állítottuk fel: Lauroglycol FCC[®] > Lauroglycol 90[®] > Capryol PGMC[®] > Capryol 90[®] > Labrasol[®] > poliszorbát vegyületek > Nátrium lauryl szulfát. A vizsgált felületaktív anyagok membránkárosító hatásának következtében felszabaduló laktátdehidrogenáz (LDH) enzim extracelluláris szintjének mérésekor az egyes tenzidek bélmámsejtekre gyakorolt hatása korrelált az MTT teszt eredményeivel [15. ábra]. Az extracelluláris laktátdehidrogenáz mérésével ugyanakkor, a felületaktív anyagok citoplazma membránkárosító hatása kisebb koncentrációknál is mérhető volt [Weyermann és mtsai 2005].



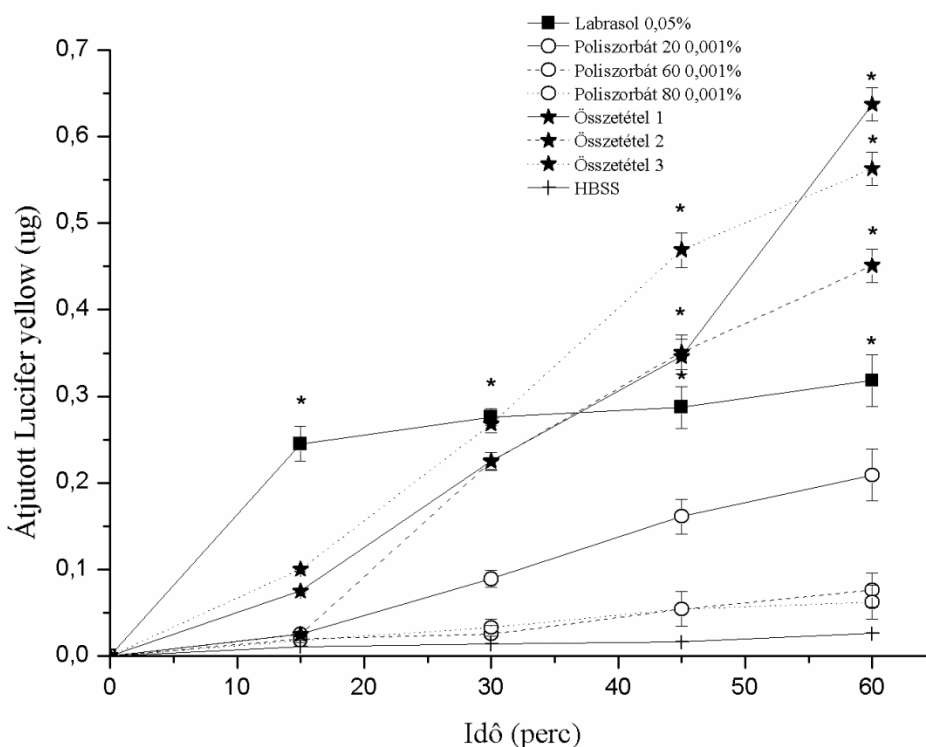
15. ábra. Az LDH sejtéletképességi vizsgálat eredményei az 1. és 3. tenzid csoport esetében. A mért adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában ábrázoltuk. ($n=5$)

Ezért a sejtéletképességi vizsgálatok segítségével a főként orális gyógyszerbevitelre szánt tenzideket az MTT és az LDH vizsgálat alapján számított IC_{50} értékekkel egyaránt jellemeztük.

4.3.Caco-2 membrán transzport vizsgálata

A transzport kísérletekhez a tenzidek nem toxikus koncentrációit illetve azok nem toxikus koncentráció tartalmú keverékeit használtuk. A tenzidek konfluens Caco-2 sejtréteg épségére gyakorolt hatását a membrán két oldala közötti elektromos ellenállás mérésével vizsgáltuk. A TEER mérésekor azt tapasztaltuk, hogy a nem toxikus koncentrációban vizsgált tenzidek közül, szignifikánsan csak a polietilén glikol észterek (Poliszorbát 20, 60, 80) és a Labrasol[®] csökkentették a TEER értékeit. A 0,001% Poliszorbát (20, 60,80) és 0,05% Labrasol[®]

tartalmú keverékek is szignifikánsan csökkentették a TEER értékét a kezeletlen monolayeren mért ellenálláshoz képest [17. ábra]. Ezen adatok ismeretében megvizsgáltuk a Labrasol® és a Poliszorbát vegyületek, Lucifer yellow fluoreszcens festékanyag paracelluláris transzportjára gyakorolt hatását.



16. ábra. A transzport kísérlet során időegység alatt átjutott anyagmennyiségek.

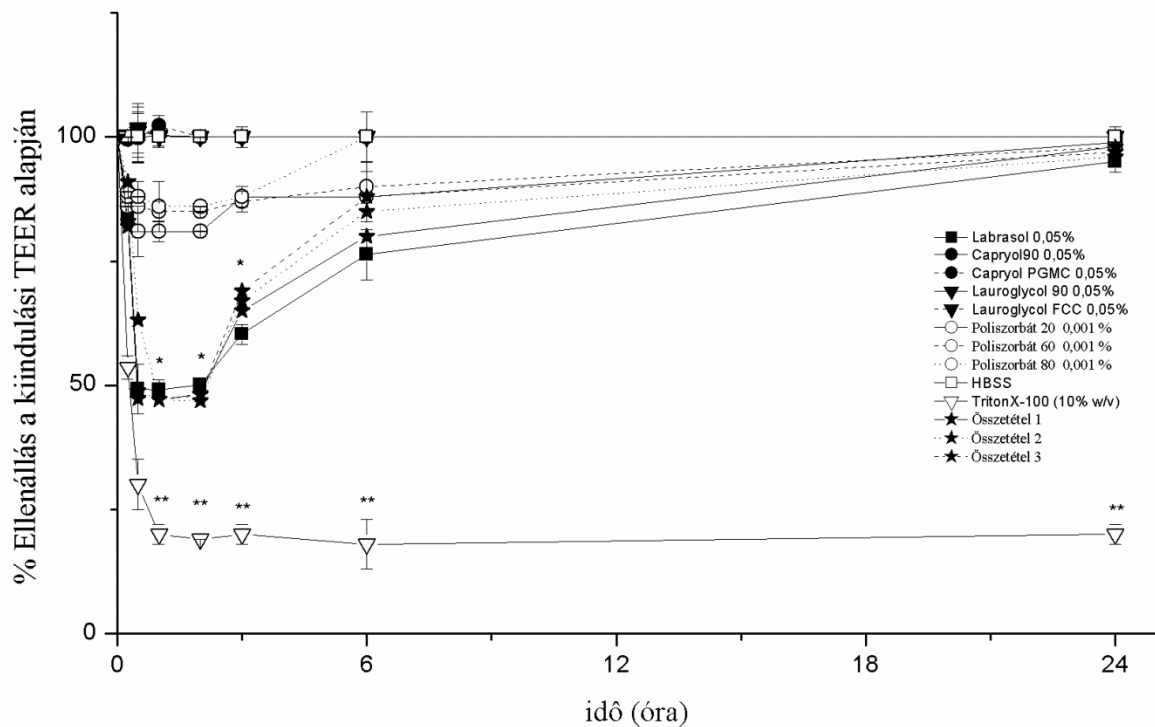
A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk. (n=5) * szignifikáns eredmény

A tenzid koncentrációk a keverék mintaoldatokban: összetétel 1: 0,05% Labrasol, 0,001% poliszorbát20, összetétel 2: 0,05% Labrasol, 0,001% poliszorbát60, összetétel 3: 0,05% Labrasol, 0,001% poliszorbát80

A transzport kísérletek során a propilén glikol észter származékok nem változtatták meg a Lucifer yellow átjutási kinetikáját, azonban a Poliszorbát vegyületek és a Labrasol® viszont szignifikánsan növelte a fluoreszcens festék transzportját [16. ábra]. Tekintettel arra, hogy a festékanyag átjutásának kinetikája nem volt lineáris, ezért a látszólagos permeabilitási együttható (Papp) megadása helyett, a vizsgálati minták hatására időegység alatt átjutott festékanyag koncentrációját ábrázoltuk [16. ábra].

4.4. A Transepitheliális Elektromos Ellenállás követése

A Lucifer yellow festékanyag Caco-2 monolayeren keresztüli paracelluláris transzportjának vizsgálata közben, a membrán két oldala közötti elektromos ellenállás változását regisztráltuk, valamint a kísérletet követő 24 órában utánköveztük.

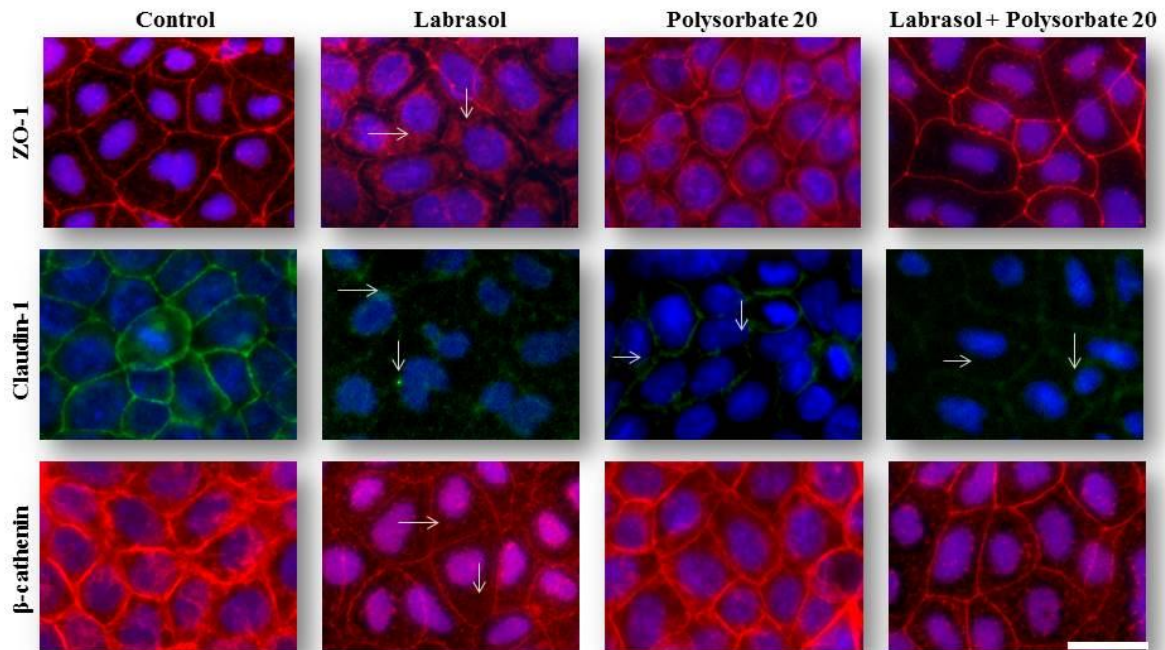


17. ábra. A Transepitheliális Elektromos Ellenállás (TEER) változása a transzport kísérlet során. A mért adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában ábrázoltuk. ($n=3$)

A TEER monitorozása során megfigyeltük, hogy a kezelés közben és után mért alacsony rezisztencia értékek a vizsgálati minta kimosását követően emelkedni kezdtek és a kezelést követő 24. óra múlva a kiindulási értékre visszaálltak [17. ábra]. A TEER értékek 24 órán át tartó követésével bizonyítottuk, hogy a modellvegyület átjutásának ilyen mértékű fokozódásának hátterében, nem azok membránkárosító, hanem paracelluláris transzport fokozó hatása áll.

4.5. Immunohisztokémia

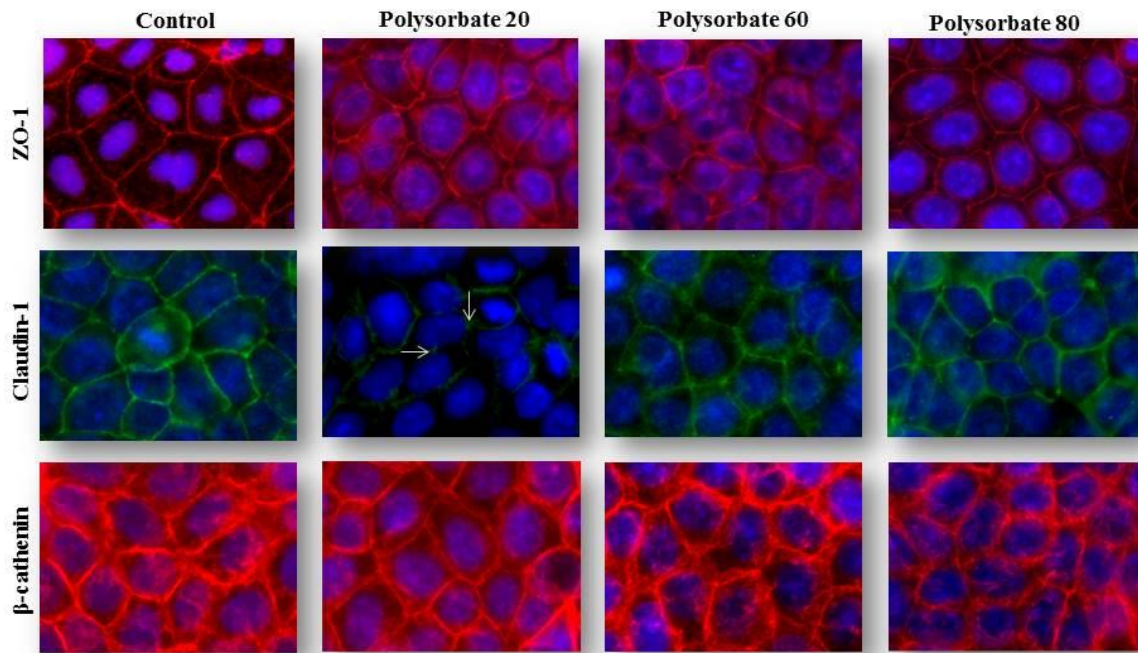
Az immunohisztokémiai vizsgálatokban három szoros jukcionális protein, a ZO-1, Claudin-1 valamint a β -catenin elhelyezkedését vizsgáltuk. A jukcionális fehérjék immunfluoreszcens jelölését követően a Caco-2 sejtek közötti kapcsolatok éles határvonalként rajzolódtak ki a sejtek által képzett intakt monolayerben. A kontrollként használt kezeletlen Caco-2 monolayeren a szoros jukcionális fehérjék a plazmamembránban lokalizálódtak. A kezelések hatására a szoros kapcsolat kialakításáért felelős proteinek lokalizációja ugyan több esetben megváltozott, azonban minden felvételen a sejtek kontúrjai élesek, így egyértelműen kizárható a Caco-2 monolayer integritásának megváltozása.



18. ábra. A Caco-2 monolayer ZO-1, Claudin-1, β -catenin jukcionális fehérjék immunhisztokémiai jelölése.

Az elkészített immunfluoreszcens felvételeken a Labrasol[®] hatása szembevetendő a ZO-1, Claudin-1 és kismértékben megfigyelhető a β -catenin esetében is. Ezeken a felvételeken az ábrákon nyíllal jelölt helyeken festődések jelentek meg a citoplazmában, ami a szoros

junkcionális fehérjék disztribúciójában történt változásra utalhat [18.ábra]. A Poliszorbát 20 vegyület esetében meggyőzően csak a Claudin-1 junkcionális fehérje átrendeződése igazolható. A Poliszorbát 60 és Poliszorbát 80 esetében a junkcionális proteinek átrendeződése nem figyelhető meg [19. ábra].

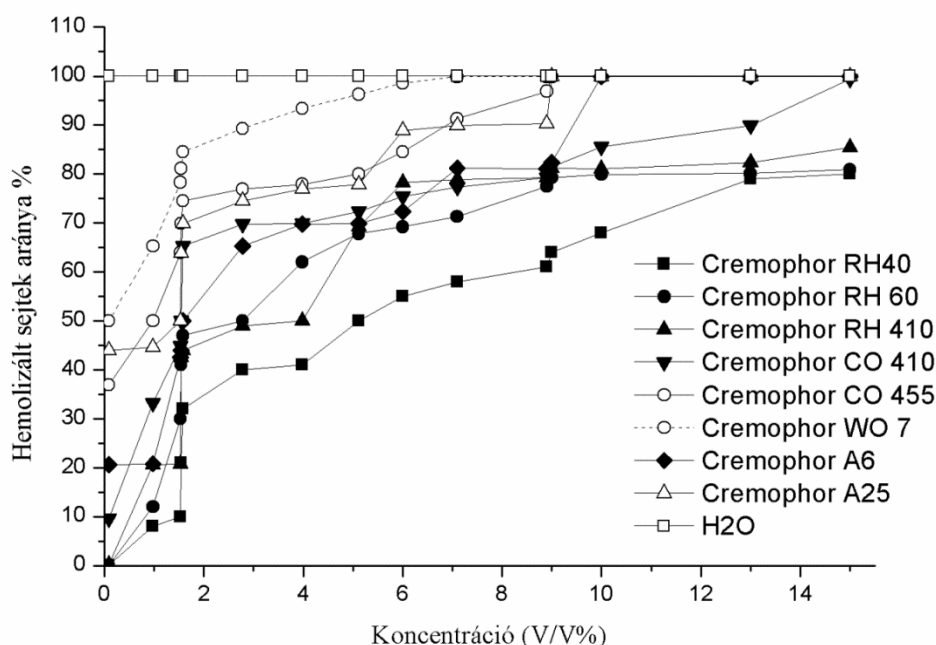


19. ábra. A Caco-2 monolayer ZO-1, Claudin-1, β -catenin junkcionális fehérjék immunhisztokémiai jelölése.

A tenzidek keverékét vizsgálva a Poliszorbát 20 vegyületre jellemző immunhisztokémiai képet kaptunk. Ezen eredmények alapján a transzport kísérletek során tapasztalt fokozott paracelluláris anyagátjutás valamint a kísérletek közben mért transepitheliális ellenállás csökkenés hátterében a sejtkapcsoló struktúrák sejtmembránból citoplazmába történő redisztribúciója állhat.

4.6. Hemolítikus aktivitás

A felületaktív anyagok hemolizáló tulajdonságát desztillált víz, vörösvértestekre gyakorolt károsító hatásával összehasonlítva vizsgáltuk. A hemolítikus aktivitás megállapítása során szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a vizsgált származékok esetén [20. ábra]. A kapott HC_{50} értékek alapján a Cremophor WO7[®] lép legkisebb koncentrációban kölcsönhatásba a vörösvértestekkel, okozva ezzel az erythrocyták membránjának sérülését. A polioxietilén-glikol (7) alapú tenzid után legalacsonyabb HC_{50} értékeket a Cremophor CO 410[®] valamint CO 455 esetén mértünk. Ezen két származék felhasználási területeként a gyártó BASF Kft. kizárólag *ad usum externum* felhasználást javasol, így ez a hatás megerősíti az anyagok felhasználási indikációját. A polioxietilén-glikol származékok, így a Cremophor RH 40[®], RH60 valamint RH410 esetében volt a hemolizált sejtek aránya a legalacsonyabb. A Cetil sztearil alkohol származékok esetében a felülúszóban lévő, kiszabadult hemoglobin abszorbanciája adott koncentrációban a WO7 és CO vegyületeknél alacsonyabb, az RH vegyületeknél viszont jóval magasabb volt.



20. ábra. A vizsgált cetilsztearil alkohol és polietilén-glikol alapú nem ionos felületaktív vegyületek koncentrációfüggő hemolizáló tulajdonságának vizsgálati eredménye. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk. (n=5)

6. táblázat

A vizsgált cetilsztearil alkohol és polietilén-glikol alapú nem ionos felületaktív vegyületek IC_{50} és HC_{50} értékeinek összehasonlítása

| Védjegyzett név | IC_{50} (V/V%) | HC_{50} (V/V%) |
|-------------------------------------|------------------|------------------|
| Cremophor RH40[®] | 14,34±0,35 | 5,12±0,08 |
| Cremophor RH60[®] | 9,01±0,38 | 2,78±0,02 |
| Cremophor RH410[®] | 12,88±0,21 | 3,98±0,08 |
| Cremophor CO 410[®] | 6,71±0,10 | 1,54±0,01 |
| Cremophor CO 455[®] | 4,12±0,11 | 0,98±0,01 |
| Cremophor WO7[®] | 0,67±0,02 | 0,09±0,001 |
| Cremophor A6[®] | 7,33±0,15 | 1,58±0,07 |
| Cremophor A25[®] | 6,45±0,19 | 1,53±0,08 |

A mért adatokat átlag±SD formában adtuk meg. (n=5)

A kapott HC_{50} értékeket, a PEG származékokat jellemző IC_{50} értékekkel összevetve korrelációt találtunk. A két vizsgálat alapján, toxicitási profil szerint felállított sorrend megegyezik [6. táblázat].

5. Megbeszélés

5.1. A felületaktív anyagok fizikai tulajdonsága és toxicitása

Munkánk során egy olyan segédanyagcsoportot vizsgáltunk, amely korszerű hatóanyagleadó rendszerek képzése révén növelni tudja a gyógyszeres terápia hatékonyságát. A biológiai hasznosíthatóság fokozására használt felületaktív anyagok közül azokat választottuk, amelyek segítségével a BCS II. III. csoportjába tartozó hatóanyagokból ön(mikro)emulgeáló rendszerek képezhetők. Kísérletsorozatunkban különböző szerkezetű és eltérő HLB értékekkel jellemezhető tenzidok élő szervezetre gyakorolt hatását elemeztük. A vizsgált nem ionos tenzidok mindegyike amfifil tulajdonságú észter vegyület, azonban hidrofil feji részükben, valamint észterezettségi fokukban és az észter komponens szénatomszámában is jelentősen eltérnek. A klasszikusnak tekintett poliszorbát vegyületek, mint a gyógyszeripari gyógyszerkészítésben és a gyógyszeriparban régóta nagy mennyiségben alkalmazott felületaktív anyagok, viszonyítási alappal szolgáltak a gyógyszer technológiai feladatok megoldásához leggyakrabban választott modern nem ionos tenzidok jellemzéséhez. A vizsgált tenzidok között voltak az önemulgeáló rendszerek képzéséhez tenzidként illetve kotenzidként használt polioxietilén-glikol származékok így a Labrasol[®], a Cremophor RH 40[®], RH 410[®], RH 60[®], WO7[®], a hidrofil molekularészben szorbit komponens is tartalmazó Poliszorbát 20, 60, 80 valamint cetil-sztearil alkohol származékok, mint a Cremophor A25[®], A6[®]. A propilén-glikol típusú tenzidok közül a Capryol 90[®] -t és PGMC[®] -t valamint a Lauroglycol 90[®] -t és FCC[®]-t. Az ionos tenzidok közül pedig a Nátrium-lauryl-szulfátot vizsgáltuk.

Az elérhető legtokéletesebb szolubilizáló hatást, sok esetben a gyártók egy terméken belül adott alapszerkezetű tenzidok különböző észter és zsírsav tartalmú keverékeinek kombinálásával érik el. Így a modern hatóanyagleadó rendszerek képzéséhez egy gyári név alatt tulajdonképpen, tenzidkomponensek keverékét javasolják. A komponensek különböző aránya azonban a szerkezet és hatás közötti összefüggések megértését jelentősen megnehezíti [Ekelund és mtsai 2005]. Ennek ellenére az általunk végzett kísérletek eredményeiből a tenzid típusokra jellemző szignifikáns különbségek állapíthatók meg az adott koncentrációjú tenzidok sejtletképessegre gyakorolt hatásai között. Azonban az, hogy a kedvezőbb toxikus karakter a tenzidkomponenseknek vagy az eltérő szerkezet felépítési elvnek köszönhető, nem igazolható egyértelműen. Ezen megfontolások alapján a Gattefossé és a BASF termékeit

külön külön vetettük össze a klasszikus tenzidekkel, illetve a gyártók által rendelkezésünkre bocsátott tenzidcsoporton belül állítottunk fel egyfajta sorrendiséget a tenzidek toxikus karaktere alapján.

5.1.1. A tenzidek felületi feszültségre gyakorolt hatása

A felületi feszültség mérésekor tapasztaltak alapján következtetéseket vonhatunk le az adott tenzid emulgensként vagy koemulgensként történő alkalmazhatóságára a gyógyszerkészítményben [Singh és mtsai 2009]. Azon felületaktív anyagok melyek felületi feszültségre gyakorolt hatásukat kis koncentrációban ($CMC \leq 0,1$ V/V%) is kifejtik, a hatóanyagleadó rendszerekben emulgensként nagy mennyiségben alkalmazva biztonságosabb alkalmazást tesznek lehetővé, mint azon származékok, melyek CMC -je magasabb ($>0,1$ V/V%) [5. táblázat] .

Azon tenzidek, amelyek kis koncentrációban is alkalmasak micellaképzésre jobb szolubilizáló tulajdonsággal rendelkeznek. Így gyógyszer technológiai alkalmazásuk kívánatosabb mint azon anyagoké melyek előnyös szolubilizáló tulajdonságukat csak nagyobb koncentrációban alkalmazva fejtik ki. A fizikai paraméterek meghatározása mellett a biztonságos alkalmazhatóságot szem előtt tartva, fontos a tenzidek élő szervezetre gyakorolt hatásának elemzése is.

5.2. A tenzidek sejtéletképességre gyakorolt hatása

5.2.1. MTT és LDH vizsgálatok

A tenzidek sejtéletképesség változásra gyakorolt hatását MTT citotoxicitási teszttel vizsgálatuk. A kísérletek során az életképes Caco-2 sejtek mitokondriumainak belső membránjában és mátrixában zajló oxidatív reakciókban résztvevő dehidrogenázok aktivitását mértük [Mosmann 1983]. A propilén glikol származékokat vizsgálva bizonyos esetekben a feltételezett mitokondriális aktivitás csökkenés olyan kismértékű volt, hogy ezen anyagok toxikus karaktere az MTT teszt segítségével nem volt kimutatható. Ezen tenzidek vizsgálatához ezért szükséges volt LDH sejtéletképességi vizsgálat elvégzése is [Grant és

mtsai 1992]. Szemben az MTT vizsgálattal az extracelluláris laktát dehidrogenáz megjelenése a sejt működési zavara előtt már a citoplazma membrán károsodását követően azonnal mérhető [Korzeniewski és mtsa. 1983].

A Gattefossé tenzidjeinek vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy minden felületaktív anyag membránkárosító hatása a koncentráció emelésével növekszik. A Capryol PGMC, Lauroglycol 90 és a Lauroglycol FCC hatására bekövetkező mitokondriális aktivitás csökkenés csak nagy koncentrációkban mérhető, így a tenzidcsoport citotoxicitási profiljának felvételéhez szelektívebbnek bizonyult a Caco-2 sejtvonal esetében szenzitívebb vizsgálat, az extracelluláris LDH aktivitás meghatározása [Fotakis és mtsai 2006]. Az MTT vizsgálat során megállapított IC_{50} értékek sorrendisége megegyezik az LDH teszt alapján számított IC_{50} értékek sorrendjével.

A mérések alapján a Polietilén glikol származékok minden esetben kisebb koncentrációban okozták a sejtek pusztulását, mint a propilén glikolok. A magasabb HLB-vel jellemezhető Poliszorbát vegyületek bizonyultak a legtoxikusabbnak, míg az ugyancsak PEG alapú Labrasol[®] esetében a szorbit komponens hiánya magasabb IC_{50} értékekhez vezetett. A vegyületek kémiai szerkezetét figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a nem-ionos hidrofíl rész nagysága növeli a citotoxicitást. Abban az esetben, ha a hidrofíl rész azonos, akkor a szénlánc növelésével a CMC és a citotoxicitás is csökken. A poliszorbátok esetén a szorbit komponens jelenléte csökkenti az IC_{50} értékét, tehát növeli a toxikus tulajdonságot. A Labrasol[®] esetén, tekintettel arra, hogy mono-, di-, és triglicerid komponenseket egyaránt tartalmaz és polietilén glikol származék, emelkedik az IC_{50} értéke, tehát a citotoxicitás csökken. Abban az esetben viszont, ha a hidrofíl rész változik polietilén glikolról propilén glikolra (HLB érték csökken), a molekula „lipofilabb”, akkor a tenzidmolekulán belül a monoészter aránya határozza meg a citotoxicitást. A szénlánc növekedésével a CMC és a citotoxicitás is csökken.

Fontos megállapítani, hogy a tenzid keverékek nem bizonyultak toxikusabbnak, mint azonos koncentrációjú alkotóik önmagukban. A Buyukozturk és munkatársai által korábban végzett vizsgálatokkal ellentétben kísérleteinkben nem találtuk additívnak a toxikus tulajdonságot [Buyukozturk és mtsai 2010]. A hidrofíl karakterű (HLB: 14-16,7), rendkívül jó szolubilizáló képességű Poliszorbát vegyületek és a Labrasol[®] sokkal alacsonyabb kritikus micellaképzési koncentrációval (CMC) jellemezhetőek, mint a lipofil karakterű (HLB: 4–6) propilén glikol észterek, azaz a Capryol 90, Capryol PGMC, Lauroglycol 90 és a Lauroglycol FCC. A Poliszorbátok -CMC értékük alatt- monomerként lépnek kapcsolatba a bélhámsejtek membránjával, megváltoztatva annak fiziológiás tulajdonságait [Dimitrijevic és mtsai 2000].

A koncentráció növelésével a CMC eléréséig nő a jelen lévő tenzid monomerek reakciókészsége, ami a sejtek permeabilitás változásához és károsodásához is vezethet [Ayala-Bravo és mtsai 2003]. A kritikus micellaképzési koncentráció feletti tenzid tartalmú oldat, micellák és monomerek keverékének tekinthető [Dimitrijevic és mtsai 2000]. Ez a rendszer a membrán foszfolipid kettősrétege mellett más membránalkotó, így például membránfehérjék szolubilizálására is képes [Lin, H és mtsai 2007]. A Labrasol[®] bélhámsejtre gyakorolt hatása CMC értéke alatt nem volt kimutatható. Az kis koncentrációban képződő micellái miatt (méréseink alapján a Labrasol[®]-nak a legalacsonyabb a CMC-je), a Labrasol[®] szolubilizáló képessége jobb, magas IC₅₀ értékük miatt pedig alkalmazásuk is biztonságosabb, mint a Poliszorbát vegyületeké.

5.2.2. Caco-2 transzmembrán kísérletek

A Lucifer yellow átjutási modell a nemzetközi irodalomban elfogadott indikátora a Caco-2 membránon keresztül történő transzportnak [Konsoula és mtsai 2005]. Segítségével információt kaphatunk a bélhámsejtek közötti junkcionális fehérjék jelenlétéről illetve elrendezésük megváltozásáról.

Kísérletsorozatunkban két kompartmentes modellben vizsgáltuk a tenzidek transepitheliális elektromos ellenállásra (TEER-re) gyakorolt hatását [El-Sayed és mtsai 2002]. A TEER meghatározását korábbi kísérletekben használták a tenzidek membránfunkció változásra gyakorolt hatásának vizsgálatára [Takahashi és mtsai 2002][Saha és mtsai 2000]. Eredményeink alapján a propilén glikol észterek kivételével, nem toxikus koncentrációban vizsgált tenzidek és azok keverékei csökkentették a két kompartment közötti ellenállást, ami a membránstruktúra megváltozását igazolja [Fenyvesi és mtsai 2011]. Ezen vizsgálati minták a Lucifer yellow Caco-2 monolayeren való átjutásának kinetikáját is megváltoztatták [Hamid és mtsai 2009]. Transzport kísérleteink eredményei alapján a nem toxikus koncentrációjú Labrasol[®] és a nem toxikus koncentrációban alkalmazott Poliszorbát vegyületek fokozták a fluoreszcens festék átjutási sebességét. A 0,001% -ban használt Poliszorbátot (20, 60, 80) és 0,05%-ban Labrasol[®]-t tartalmazó keverékek Caco-2 membránon keresztüli transzport fokozó hatása nagyobb mértékű volt, mint az önállóan vizsgált komponenseké. Kísérleteink során kapott eredményeinkből feltételeztük, hogy a segédanyagok alkalmazásával paracelluláris transzport fokozódás jött létre. A Lucifer yellow festékanyag fokozott átjutása azonban egyaránt markere lehet a sejtek közti átjutás mellett a fluid fázisú endocitózisnak is [Swanson

és mtsai 1985]. Számos transzport fokozó segédanyag vizsgálatánál azonban igazolták, hogy a paracelluláris út megnyílása elégséges feltétele a hatóanyag átjutás fokozódásának [Mukaizawa és mtsai 2009]. Ugyanis az AJC legmeghatározóbb alkotói a tight junction fehérjék, így azok redisztribúciója nagymértékben fokozza a membránon keresztül történő anyagáramlást [Alhamoruni és mtsai. 2010].

A transzport fokozódás háttérében álló membránfunkció változás felderítése érdekében immunohisztokémiai festéssel jelöltük a Caco-2 monolayer sejtkapcsoló struktúrái közül a ZO-1, Claudin-1 és a β -catenin junkcionális fehérjéket [Deli és mtsai. 2009]. Az immunohisztokémiai felvételek igazolták, hogy a vizsgált tenzid minták a junkcionális fehérjék átrendeződését, Caco-2 sejtek általi újrafelvételét okozták anélkül, hogy a sejtek pusztulását okozták volna. A kísérletet követően a Caco-2 monolayeren végzett TEER mérés során azt tapasztaltuk, hogy a minták eltávolítása után a membrán két oldala közötti ellenállás legkésőbb 24 óra elteltével a kiindulási értékre visszaállt. Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a transzportfokozódás nem a monolayer megbomlásának tulajdonítható, ezért a hatás reverzibilis [Muendoerfer és mtsai 2010].

5.2.3. MTT és hemolízis vizsgálatok

A Cremophor[®] segédanyagok a modern technológiai kihívások kezelésében ugyancsak gyakran és nagy mennyiségben alkalmazott additív komponensek. Ezen tenzidek illetve kotenzidek a hatóanyagok szolubilizáló képessége mellett ugyancsak kölcsönhatásba léphetnek különböző biológiai membránstruktúrákkal, ez által okozva irritációt illetve sejtkárosodást [Bandivadekar és mtsai 2013]. A vizsgálat célja ebben az esetben is a biztonságosan alkalmazható segédanyag koncentráció megállapítása volt. Az orális formuláció biztonságosságának igazolására a tenzidek Caco-2 membránra gyakorolt hatását vizsgáltuk MTT citotoxicitási teszt segítségével.

A parenterális készítmények hatóanyagául választott gyógyszeranyagok jelentős része a BCS szerinti osztályozás alapján, ugyancsak a II. III. vagy IV. csoportba sorolható. Fent említett tulajdonságaik alapján sok esetben célszerű valamilyen additív komponenes hozzáadásával a parenteráliában lévő hatóanyag oldhatóságát illetve membránpermeabilitását javítani [Li és mtsai 2011]. Az ipari fejlesztés során, számos véráramba juttatott készítmény

formulálásához választják segédanyagként a különböző PEG alapú Cremophor[®] anyagokat. Számos előnyös tulajdonságuk ellenére használatuk gondos körültekintést igényel. A véráramba juttatott készítmények esetében vizsgálnunk kell a gyógyszerkészítmény minden alkotójának így az alkalmazott felületaktív anyagoknak a vér elemeivel történő esetleges kölcsönhatását [Li és mtsai. 2011]. Ezen tulajdonság felderítésére a tenzidek koncentrációfüggő hemolitikus aktivitását vizsgáltuk [Nornoo és mtsai 2008].

A sejteletképességi vizsgálatok során a tenzidek koncentrációfüggő károsító hatását figyeltük meg. A vizsgált felületaktív anyagok közül a Cremophor WO7[®] okozta a legkisebb koncentrációban a humán colon adenocarcinoma sejtek pusztulását. Az MTT teszt alapján a mért IC₅₀ értékek szerinti növekvő sorrend a következő: Cremophor[®] WO7 > CO455 > CO410 > A6 > A25 > RH60 valamint RH410 > RH40. A vizsgált tenzidek közül tehát a PEG 40 alapú segédanyagok kevésbé bizonyultak toxikusnak, mint a PEG 7, a PEG 35, a PEG 60 valamint a Cetilsztearil alkohol struktúrájú felületaktív anyagok. Az ugyancsak PEG 40 alapú Cremophor CO410[®] és a Cremophor CO455[®] esetében mérhető alacsonyabb IC₅₀ érték háttérben az áll, hogy ezen anyagok önmagukban keverékek, viszont ezek olyan összetételek, amelyeket a gyártó kizárólag külsőleg felhasználásra javasolja.

A hemolízis tesztet elvégezve a tenzidek hemolizáló tulajdonságát ugyancsak koncentráció függőnek találtuk. A teszt során mért HC₅₀ értékek azonos sorrendiséget mutattak az MTT vizsgálat során mért HC₅₀ értékekével. Ugyanakkor a vizsgált felületaktív anyagok bélhámsejtek mitokondriális-funkció változására gyakorolt hatását kevésbé találtuk kifejezettnek, mint ugyanazon vegyületek hemolitikus potenciálját. Ezen megállapítást alátámasztja, hogy a cremophor vegyületek minden esetben az IC₅₀ mellett alacsonyabb HC₅₀-értékekkel jellemezhetőek.

Mindezek ismeretében elmondható, hogy összefüggés van a vizsgált tenzidek fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint azok bélhámsejtek életképességére illetve vörösvértestek membránjára gyakorolt hatása között. A bélhámsejteken keresztüli hatóanyagátáramlás fokozódása pedig növeli a farmakon szisztémás koncentrációját. A hatóanyag megfelelő koncentrációjának jelenléte a receptor közelében a gyógyszerhatás alapfeltétele. Azonban a hatóanyagkutató és fejlesztés eredményeként létrehozott kémiai anyagok molekulatömege és/vagy lipofilitása olyan nagy, hogy ezek következtében a biohasznosulás sok esetben igen kismértékű [Lipinski 2000]. Az amfipatikus felületaktív anyagok szerkezetüknek köszönhetően szolubilizálni képesek a rossz vízoldhatóságú apoláris hatóanyagokat. Micellák

képzésével a hatóanyag számára ideális apoláris környezetet biztosítanak a szervezet hidrofíli közegrendszerében. A formulálás szempontjából legelőnyösebb tenzidok már kis koncentrációban képesek micellákba rendeződni. Kísérleteink alapján megállapítható hogy, az alacsonyabb CMC vel rendelkező polietilén-glikol észterek nem toxikus koncentrációban is képesek a sejt sejt közötti szoros kapcsolatot fenntartó AJC proteinek átrendezésével, reverzibilisen megváltoztatni a membrán barrier funkcióját valamint az, hogy ezen vegyületeket kombinációkban alkalmazva sejtpusztító hatás nélkül képesek még jelentősebb membrán integritásváltozást okozni.

Ezen összefüggések felismerése hozzájárulhat olyan gyógyszer technológiai gyakorlat megalapozásához, amely a készítményekben legkisebb sejtkárosító hatással bíró segédanyagokat részesíti előnyben. Eredményeink hozzájárulhatnak jobban tolerálható és magasabb biológiai hatás kifejtésére képes önmulgeáló rendszerek kifejlesztéséhez a megfelelő citotoxikus tulajdonságú tenzidok kiválasztása alapján. Ezáltal az alkalmazás biztonságossága tovább javul, amellett, hogy egyszerűbb és könnyebb gyógyszerelési lehetőséget is nyújthat mind a beteg mind a szakember számára.

6.1. Összefoglalás

1. A Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén különböző, önemulgeáló rendszerek képzéséhez használt felületaktív anyagokat jellemeztem azok fiziko-kémiai és élő sejtekre gyakorolt hatása alapján.
2. A felületi feszültség változás alapján történő Du Nüoy pull out ring és Wilhelmy pull out plate módszer beállításával meghatároztam a tenzidek kritikus micellaképzési koncentrációját, így jellemeztem ezen segédanyagokat oldékonyság növelő tulajdonságuk alapján.
3. Caco-2 sejtvonalon jellemeztem a felületaktív anyagok bélhámsejtek életképességére gyakorolt hatását MTT illetve LDH teszt segítségével.
4. A parenterális felhasználásra szánt segédanyagok toxikus hatását, humán vörös vértesteken a hemolizáló tulajdonság mérésével vizsgáltam.
5. Kísérletsorozataink alapján megállapítható, hogy összefüggés van a tenzidek szerkezete és citotoxikus karaktere valamint a membrán permeabilitás változásra gyakorolt hatása között, azonban a megállapítások általános igazolására a megvizsgált tenzid típusok további bővítésére van szükség.
6. Az alacsony CMC mellett magas IC_{50} -nel jellemzett additívek önmagukban és keverékekben alkalmazva is előnyösnek bizonyultak. Ugyanis jobb tolerálhatóságuk mellett reverzibilis membránon keresztüli permeabilitás fokozó tulajdonságuk is jelentős.
7. A tenzidek jellemzése során kapott, koncentrációfüggő sejtmembrán károsító hatást különböző mértékűnek találtuk Caco-2 illetve a humán vvt-k esetében. Ez a tulajdonság igazolja azt, hogy a gyógyszerbiztonság érdekében a toxicitási vizsgálatok során a komponensek élő szervezetere gyakorolt hatását a jövőben az alkalmazás módjának megfelelő sejtvonalon illetve sejteken is szükséges megvizsgálnunk.
8. Kísérleti eredményeim gyakorlati hasznát abban látom, hogy a beállított módszereink alkalmasak a tenzidek új rutin gyógyszerbiztonsági vizsgálatának elvégzéséhez. A gyártók az így kapott IC_{50} illetve HC_{50} értékeket a termékükön feltüntetve segítséget nyújthatnak a formulálást végző szakembernek jól tolerálható és minden szempontból leginkább megfelelő gyógyszerkészítmény kialakításához.

6.2. Summary

1. New generation of surface active agents as Self Emulsifying Drug Delivery System components have been characterized at the Department of Pharmaceutical Technology, University of Debrecen, according to their physio-chemical properties and their effects on cell viability.
2. To determine the CMC as solubilising ability of the surfactants, Nüoy pull out ring and Wilhelmy pull out plate method has been installed.
3. For the cytotoxicity evaluation of the surfactants, two markers of toxicity were employed: the plasma membrane integrity as characterized by LDH release and the mitochondrial dehydrogenase activity by the reduction of MTT by viable Caco-2 human adenocarcinoma cells.
4. Hemolytic activity of tensides for parenteral application has been investigated by the concentration that induces hemolysis in 50 percent of the erythrocytes (HC_{50}).
5. According to our series of cytotoxicity investigations, it can be concluded that there is connection between the chemical properties, the toxic character and the effect on paracellular transport alteration ability of the tensides, however for the guiding principle on the connections further investigations are necessary.
6. Excipients with low CMC and high IC_{50} values may refer to good ability of micelle solubilization and increase drug permeability on Caco-2 monolayers with safer applicability of surfactants.
7. The concentration dependent toxic effect of the excipients was different in Caco-2 viability test and hemolytic activity measurements. According to this observation in case of specific application field of the tensides specific assay suggested to determine cell viability to avoid the over or underestimation of the cytotoxicity of toxic agents in vitro studies.
8. The benefit of our investigation might be that novel pharmaceutical safety rutin tests has been installed, that can be used for industrial purposes. The evaluation of citotoxic and hemolytic activity properties of the tensides could be a valuable supplement of safety data sheets in the future. Our methods, and these results ensure useful data for the selection of the suitable, more tolerable tensides, cotensides and tenside mixtures or SMEDDS formulations.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom

Adachi Y., Suzuki H., Sugiyama Y., 2001 Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vitro function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm. Res.* 18(12). 1660-8.

Alhamoruni A., Lee A.C., Wright K.L., Lavrin M., O'Sullivan S.E.: 2010 Pharmacological effects of cannabinoids on the Caco-2 cell culture model of intestinal permeability. *Journ. Pharmacol Exp Ther.* 335 (1) 92-102.

Antonie J.L.; 1989. The Sodium Laurylsulphate-Induced Skin Irritation Is Almost Not Influenced By The Ph Of The Solution. *Journal of investigative Dermatology* 92, 1, 136-136.

Artursson P. Karlsson J.: 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175. 880-885.

Artursson P.: 1993. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.* 10.1123-1129.

Artursson P. Palm K., Luthman K.: 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46. 27-43.

Au, J.L.: 2001. Determinants of drug delivery and transport to solid tumors, *J.Control. Release*, 74, 31-46.

Ayala-Bravo, H. Quintanar-Guerro, D., Naik, A., Kalia, Y.N., Cornejo-Bravo, J.M., Ganem Quintanar, A.: 2003. Effects of sucrose oleate and sucrose laurate on in vivo human stratum corneum permeability. *Pharm. Res.* 20 (8), 1267–1273.

Avdeef, A.: 2007. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs, *Adv. Drug Del. Rev* 59,568-590.

Bailey A.C., Bryla P., Malick A.W., 1996. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Adv. Drug Delivery Rev.* 22(1-2) 85-103.

Bandivadekar M, Pancholi S., Kaul-Ghanekar R., Choudhari A., Koppikar S.: 2013. Single-non-ionic surfactant based self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation, characterization, cytotoxicity and permeability enhancement study. *Drug Dev Ind Pharm* 39,5, 696-703.

Bigansoli E. Cavenaghi, L.A., Rossi, R., Brunati, M.C., Nolli, M.L.: 1999. Use of Caco-2 cell culture model for the characterisation of intestinal absorption of antibiotics. *Farmacol.* 54, 594-599.

Buyukozturk, F. Benneyan, J.C., Carrier, R.L.: 2010. Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J. Control. Release* 142 (1), 22–30.

Braun A., Hämmerle S., Suda K., Rothen-Rutishauser B., Günthert M., Krämer S.D., Wunderli-Allenspach H.: 2000. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 11 (2) s51- s60.

Collnot E.M., Blades C., Wempe M.F., Hyatt J., Navaro L., Edgar K.J., Schaefer U.F., Lehr C.M.: 2006. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical. efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *Journal Of Controlled Release*, 111,1-2, 35-40.

Colombo, D.: 2010. Bioavailability Of Sandimmun (R) Versus Sandimmun Neoral(R): A Meta-Analysis Of Published Studies, : *International Journal Of Immunopathology And Pharmacology* 203,4,1177-1183.

Davies, N.M.: 1998. Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen, The first 30 years. *Clin Pharmacokinet*, 34, 2, 101.

Deli, M. et al.: 2009. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (4), 892–910.

Dévay A., Antal I.: 2009. A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai. *Medicina*, Budapest 43-52.

Dimitrijevic, D. Shaw A.J., Florence A.T.: 2000. Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 157–162.

Dix CJ, Hassan I.F., Obray H.Y., Shah R., Wilson G.: 1990. The Transport Of Vitamin-B12 Through Polarized Monolayers Of Caco-2 Cells *Gastroenterology*. 98, 5 , 1272-1279.

Du Noüy, Pierre Lecomte.: 1925. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. *The Journal of General Physiology* 7 (5): 625–633.

Ekelund K., Östh K., Pahlstorp C., Björk E., Unvenlund S., Johansson, F.: 2005. Correlation between epithelial toxicity and surfactant structure as derived from the effects of polyethylenoxide surfactants on Caco-2 monolayers and pig nasal mucosa. *J. Pharm. Sci.* 94 (4), 730–744.

El-Sayed, Ginski M., Rhodes C., Ghandehar, H.: 2002. Transepithelialtransport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *J. ControlRelease* 81 (3), 355–365.

Fenyvesi F, Kiss T., Fenyvesi E., Szenté L., Veszéka S., Deli M.A., Váradi J., Fehér P., Ujhelyi Z., Tosaki A., Vecsernyes M., Bácskay I.: 2011. Randomly Methylated beta-Cyclodextrin Derivates Enhance Taxol Permeability Through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayer. *J. Pharm. Sci.* 100 , 11, 4734-4744.

Fischer, S.M., Brandl, M., Fricker, G.: 2011. Effect of the non-ionic surfactant poloxamer 188 on passive permeability of poorly soluble drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 416–422.

Flaten G.L., Luthman K., Vasskog T., Brandl M.: 2008. Drug permeability across phospholipid vesicle-based barrier - The effect of tensides, co-solvents and pH changes on barrier integrity and on drug permeability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34: 173-180.

Fotakis G., Timbrell J. A.: 2006.: In vitro cytotoxicity assays. Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Letters.* 160, 171-177.

Gao, P. Rush B.D., Pfund W.P., Huang T., Bauer J.M., Morozowich W., Kuo M.S., Hageman M.J.: 2003. Development of a supersaturable SEDDS formulation of Paclitaxel with improved oral bioavailability *J. Pharm. Sci.*, 92. 2386–2398.

Gilányi T.: 2005. *Kolloidkémia: Nanorendszerek és határfelületek* (Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 34-36, 65-67, 74-75.

Grant, R.L. Yao C., Gabaldon D., Acosta D.: 1992. Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicology* 76, 153–176.

Grass, G.M.: 1997. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 23, 199-219.

Gursoy N. Garrigue J.S., Razafindratsita A., Lambert G., Benita, S.: 2003. Excipient effects on in vitro cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system. *Journ. Pharm. Sci.* 92, 2411-2418.

Hamid, A.K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A.: 2009. The effects of common solubilizing agents on intestinal membrane barrier functions and membrane toxicity in rats. *Int. J. Pharm.* 379, 100–108.

Heyun W. Yakai F., Fang Z., Yuan W., Khan M.: 2012. Co-electrospun blends of PU and PEG as potential biocompatible scaffolds for small- diameter vascular tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 32,8, 2306-2315.

Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T.: 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96(3):736-49.

Hunter J. Barry H.H.: 1997; Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*.25.2-3.129-157.

Huo M., Zhang Y., Zhou A., Yu D., Wu Y., Li J., Li H.: 2010. Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug. *IntJ.Pharm.* 394: 162-173.

Jain, R.K.: 2004. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics, *Nat. Med.*,4, 806-813.

Jiang H. Wang X.B., Li C.Y., Li J.S., Xu F.J., Mao C., Yang W.T., Shen J.: 2011. Improvement of hemocompatibility of polycaprolactone film surfaces with zwitterionic polymer brushes. *Langmuir* 27,18,20 11575-11581.

Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L.: 2004. Molecular properties of WHO Essential Drugs and Provisionel Biopharmaceutical Classification, *Mol. Pharm.*, 1, 85-96.

Kawakami, K, Oda N., Miyoshi K., Funaki T., Ida Y.: 2006. Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents, *Eur. J. Pharm.Sci.* 208,7-14.

Kawakami, K, Miyoshi K, Ida Y.: 2004. Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of Gelucire 44/14 and cosolvent. *J. Pharm.Sci.* 93, 1471-1479.

Konsoula R., Barile F.A.: 2005. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells *Toxicology in Vitro* 19 675–684.

Korhonen, M., Hirvonen J., Peltonen L., Antikainen O., Yrjanainen L., Yliruusi J.: 2004. Formation and characterization of three-component-sorbitan monoester surfactant, oil and water-creams. *Int. J. Pharm.* 269 (1), 227–239.

Korzeniewski C., Callewaert DM.: 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 64(3):313-320.

Krizbai I.A., Deli M.A. 2003. Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier. *Cell Mol Biol.* 49(1):23-31.

Lannernas H.Palm K., Fagerholm U.: 1996. Correlation between paracellular and transcellular drug permeability in the human jejunum and Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* 127. 103-107.

Lide, D.R., 1990. Handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data 71st edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Li X, Yue Y., Zhou Y., Fan Y., Fan C., Huang Y., Wu F., Liu Y.: 2011. An oil-free microemulsion for intravenous delivery of diallyltrisulfide: Formulation and evaluation. *Int.J.Pharm.* 407(1-2): 158-166.

Li, X., Zhang, G., Bai, X., Sun, X., Wang, X., Wang, E., et al. 2008. Highly conducting graphene sheets and Langmuir–Blodgett films. *Nature Nanotechnology* 3, 538 – 542.

Lieberman, HA et al; 1989. *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, 1c 335-350, 567-594.

Lin, H., Gebhardt M., Bian S., Kwon K.A., Shim C.K., Chung S.J., Kim D.D.: 2007. Enhancing effect of surfactants on fexofenadine. HCl transport across the human nasal epithelial cell monolayer. *Int. J. Pharm.* 330, 12–31.

Lipinski C.A.: Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journ. of Pharmacological and Toxicological Meth.*, 44. 234-249.

Liu, D.Z., LeCluyse, E., Thakker, D.R. 1999. Dodecylphosphocholine-mediated enhancement of paracellular permeability and cytotoxicity in Caco-2 cell monolayers, *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 88.1161–1168.

Martin A. Clynes M.: 1991. Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests. *In Vitro Cell Dev.* 27 A 183-184.

Menard, N. Tsapis N., Poirier C., Arnauld T., Moine L., Lefoulon F., Péan J.M., Fattal E.: 2012. Drug solubilization and in vitro toxicity evaluation of lipoamino acid surfactants. *Int. J. Pharm.* 28;423(2):312-20.

Miller, J.M. Beig A., Krieg B.J., Carr R.A., Borchardt T.B., Amidon G.E., Amidon G.L., Dahan A.: 2011. The solubility–permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation. *Mol. Pharm.* 8 (5), 1848–1856.

Mosmann T.: 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63.

Muendoerfer M., Schaefer U.F., Koenig P., Walk J.S., Loos P., Balbach S., Eichinger T., Lehr C.M.: 2010. Online monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing. *Int J Pharm.* 392(1-2):134-40.

Mukaizawa F., Taniguchi K., Miyake M., Ogawarw K., Odomi M., Higaki K., Kimura T., 2009. Novel absorption system containing polyamines and bile salts enhances drug transport via both transcellular and paracellular pathways across Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 367, 103–108.

Müller, R.M.; 1991. *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 660-664.

Nellans H.N. 1991. Paracellular intestinal transport: Modulation of adsorption. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 7. 339-364.

Normoo A.O., Osborne D.W., Chow D.S.L.: 2008. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: Formulation, cytotoxicity and hemolysis. *Int.J.Pharm.*349:108-116.

Palamakula A, Khan M.A.: 2004. Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q10 Self-emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS). *Int J Pharm* 273(1-2):63-73.

Pappenheimer JR, Reiss K.R.: 1987 Contribution Of Solvent Drag Through Intercellular-Junctions To Absorption Of Nutrients By The Small-Intestine Of The Rat. *Journal Of Membrane Biology*. 100.2.123-136.

Pouton, C.W.: 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: nonemulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl. 2), 93–98.

Rangel-Yagui CO, Pessoa A Jr, Tavares LC: 2005. Micellar Solubilization of drugs. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 2, 147-65.

Ritschel, WA.: 1982. *Handbook of Basic Pharmacokinetics*, 2nd edition, Drug Intelligent Publications, Hamilton, USA

Rowinsky E.K., Eisenhauer E.A., Chaudhry V., Arbuck S.G., Donehower R.C.: 1993. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin.Oncol.* 20:1-15.

Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferri, F., Gibin, S., Zambito, Y., Di Colo, G., Caramella, C., 2007. Nanoparticles based on N-trimethylchitosan: evaluation of absorption properties using in vitro (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 68–77.

Sagar S.R., Anderson B.D.: 2008. What determines drug solubility in lipid vehicles: Is it predictable ? *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 638–656.

Sagitani, H., Friberg S.E.: 1980. Micro-emulsion systems with a non-ionic cosurfactant. *J. Disper. Sci. Technol.* 1 (2), 151–164.

Saha, P., Kou J.H.: 2000. Effect of solubilizing excipients on permeation of poorly water-soluble compounds across Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 403–411.

Sarciaux Jm., Acar L., Sado PA., 1995. Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. *Int. Journ. Pharmaveut.* 120 (2) 127-136.

Shargel, L.: 2000. *Applied biopharmaceutical and Pharmacokinetics* 4th edition, McCraw-Hill, medical Publishing Division, New York, USA

Singh B, Bandopadhyay S, Kapil R, Singh R, Katare O.: 2009. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 26(5):427-521.

Stockert J.C., Villanueva A., Cristóbal J., Cañete M. 2009. Improving images of fluorescent cell labeling by background signal subtraction. *Biotech Histochem.* 84(2):63-8.

Sujoy P., Amiya K.J.: 2013. Physico-chemical studies on ionic liquid microemulsion: Phase manifestation, formation dynamics, size, viscosity, percolation of electrical conductance and spectroscopic investigations on 1-butyl-3-methyl imidazolium methanesulfonate water/Tween 20 n-pentanol/n-heptane pseudoternary system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 419, 113-124.

Swanson, J.A., Yirinec, B.D., Silverstein, S.C., 1985. Phorbol esters and horseradish peroxidase stimulate pinocytosis and redirect the flow of pinocytosed fluid in macrophages. *J. Cell. Biol.* 100, 851–859.

Szakacs, G. Váradi A. Özvegy-Laczka C. Sarkadi B.: 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox): *Drug Discovery Today* 13, 9-10, 379-393.

Szántó F.: 1987 *A Kolloidkémia Alapjai. Gondolat, Budapest*, 241-245.

Tan T.T.Y., Liu S., Zhang Y, Han M.Y., Selvan S.T., 2011. Microemulsion Preparative Methods (Overview). *Comprehensive Nanoscience and Technology* 5,399-441.

Takahashi, Y., Kondo H., Yasuda T., Watanabe T., Kobayashi S.I., Yokohama S.: 2002. Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 246, 85–94.

Van Asperen, J., van Tellingen O, van der Valk MA, Rozenhart M, Beijnen JH. 1998. Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A, *Clinical Cancer Research* Volume: 4 Issue: 10 Pages: 2293-2297.

Varma, MN. Panchagnula R.: 2005. Enhanced food sterilization through inclination of the container walls and geometry modifications. *International Journal Of Heat And Mass Transfer*, 48, 18, 3753-3762.

Varga B., Kassai F., Gyertyán I.: 2012. Interactions of CB1 and mGlu(5) receptor antagonists in food intake, anxiety and memory models in rats, *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, 103, 2 , 425-430.

Vasconcelos T., Sarmaneto B., Costa P., 2007. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug. Discov. Today* 12, 23-24.

Wang C.H. Qiao L., Zhang Q., Yan H., Liu K.: 2012. Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through direct chemisorption of FITC-Tat-PEG₆₀₀-b-poly(glycerol monoacrylate), *Int. Journ. Pharm.* 430,(1-2) 372-380.

Weyermann, J. Lochmann D., Zimmer A.: 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376.

Wilson CG,: 1989. *Physiological pharmaceuticals-Biological Barriers to drug Absorption*, Chapter 6, Ellis Harwood Series in Pharmaceutical Thechnology, Chichester UK,

Zhao Y., Le J., Abraham M.H., Hersey A., Eddershaw P.J., Luscombe C.N., Boutina D., Beck G, Sherborne B., Cooper I., Platts J.A.: 2001. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure–activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90, (6), 749–784.

Zhu J.X., Tang D.,Feng L., Zheng Z.G.,Wang R.S.,Wu A.G.,Duan T.T., He B., Zhu Q.: 2013. Development of self-microemulsifying drug delivery system for oral bioavailability enhancement of berberine hydrochloride. *Drug Development And Industrial Pharmacy* 39,3 499-506.

Yang, A.D., Bauer T.W., Camp E.R., Somcio R., Liu W., Fan F., Ellis L.M.,Qiao L.,Zhang Q.,Yan H., Liu K.: 2005. Improving Delivery of Antineoplastic Agents with Anti-vascular Endothelial Growth Factor Therapy, *Cancer*, 103,1561-1570.

Yau Y.L., Yung-Hsiand C., Tong-tong L., Cheng L., Xiaoming C., Roland E.W., Cheng K.C. 2004. Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system fro predicting in vivo oral bioavailability. *Drug metab. Dispos.* 32(9) 937-942.

www.basf.com [2012.03.12.]

www.gatttefosse.com [2012.03. 12.]

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/342/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ujhelyi Zoltán
Neptun kód: JLC63G
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10036509

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ujhelyi, Z.,** Róka, E., Fenyvesi, F., Fehér, P., Váradi, J., Réti-Nagy, K., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Assessment of the hemolytic activity and cytotoxicity of different PEG-based solubilizing agents.
Pharmazie. 68, 383-384, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2013.2207>
IF:1.003
2. **Ujhelyi, Z.,** Fenyvesi, F., Váradi, J., Fehér, P., Kiss, T., Veszelka, S., Deli, M., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer.
Eur. J. Pharm. Sci. 47 (3), 564-573, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.005>
IF:2.987



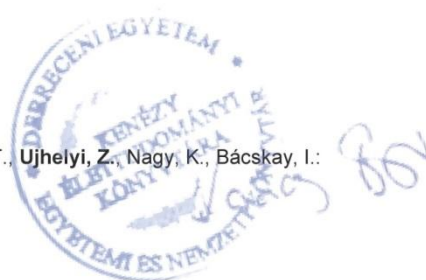
Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518–600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu

7.3. További közlemények jegyzéke



További Közlemények

3. Ujhelyi, J., **Ujhelyi, Z.**, Szalai, A., László, F.J., Cayasso, M., Vecsernyés, M., Pórszász, R.:
Analgesic and anti-inflammatory effectiveness of sitagliptin and vildagliptin in mice.
Regul. Pept. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2014.09.006>
IF:2.014 (2013)
4. **Ujhelyi Z.**, Vecsernyés M., Bácskay I.: Önemulgeáló rendszerek formulálása tenzid komponenseinek élő sejtekre gyakorolt hatásának ismeretében.
Acta Pharm. Hung. 84 (2), 1-8, 2014.
5. Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Bacsó, Z., Gutay-Tóth, Z., Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., **Ujhelyi, Z.**, Fehér, P., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fluorescently Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase Endocytosis.
PLoS One. 9 (1), e84856, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084856>
IF:3.534 (2013)
6. **Ujhelyi Z.**, Vecsernyés M., Bácskay I.: Mikroemulzió komponenseiként alkalmazott felületaktív anyagok élő sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata kémiai szerkezetük és micellaképzési tulajdonságuk alapján.
Acta Pharm. Hung. 83, 1-9, 2013.
7. Bakó, J., Vecsernyés, M., **Ujhelyi, Z.**, Bácskay, I., Borbíró, I., Bíró, T., Borbély, J., Hegedűs, C.:
Composition and characterization of in situ usable light cured dental drug delivery hydrogel system.
J. Mater. Sci.-Mater. Med. 24 (3), 659-666, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4825-x>
IF:2.379
8. Fehér, P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Váradi, J., Kiss, T., **Ujhelyi, Z.**, Nagy, K., Bácskay, I.:
Topical application of Sylibum Marianum extract.
J. Med. Aradean. 14, 5-8, 2011.





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



9. Fenyvesi, F., Kiss, T., Fenyvesi, É., Szente, L., Veszélka, S., Deli, M.A., Váradi, J., Fehér, P.,
Ujhelyi, Z., Tósaki, Á., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Randomly Methylated beta-Cyclodextrin
Derivatives Enhance Taxol Permeability Through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell
Monolayer.
J. Pharm. Sci. 100 (11), 4734-4744, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22666>
IF:3.055

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,972

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,99**

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, 2014.10.22.



8.1 Tárgyszavak

Felületaktív anyagok, Önemulgeáló rendszerek, CMC, Caco-2 sejtvonala, Cytotoxicitás, MTT, LDH, Hemolízis, Paracelluláris transzport, Immunohisztokémia

8.2 Keywords

Surfactants, Self-emulsifying systems, CMC, Caco-2 cells, Cytotoxicity, MTT, LDH, Hemolysis, Paracellular transport, Immunohistochemistry

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Vecsernyés Miklós tanszékvezető docens úrnak, hogy hozzájárult kutatómunkám elvégzéséhez a Gyógyszertechnológiai Tanszéken.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Kovácsné Dr. Bácskay Ildikónak, az önzetlen segítségért, támogatásáért és szemléletformáló, építő jellegű szakmai észrevételéért.

Köszönöm a Gyógyszertechnológiai Tanszék valamennyi munkatársának, munkámhoz nyújtott segítségükért.

Hálával tartozom szerető családomnak a hitért, a szeretetért és a támogatásért, amiben nekik köszönhetően sohasem szenvedtem hiányt.

10. Függelék

10.1. Rövidítések

| | |
|------------------------|--|
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| AJC | Apical Junctional Complex |
| BCRP | Breast Cancer Resistance Protein |
| BCS | biopharmaceutical classification system |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| Caco-2 | Caucasian Colon adenocarcinoma |
| CMC | Critical Micelle Concentration |
| DNS | Dezoxiribonukleinsav |
| EDTA | Ethilen-Diamine-Tetraaceticacid |
| FBS | Foetal bovine serum |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| HC₅₀ | Haemolytic Concentration 50% |
| HLB | Hydrophilic-lipophilic balance |
| IC₅₀ | Inhibitory Concentration 50% |
| LAF | Laminar Air Flow |
| LDH | Lactat Dehydrogenase |
| MDR2 | Multidrug Resistance 2 |
| MTT | 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetazolium-bromid |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PEG | Polyethylene glycol |
| Pgp | P-glikoprotein |
| SD | Standard Deviation |
| SEDDS | Self Emulsifying Drug Delivery System |
| SMEDDS | Self Micro-Emulsifying Drug Delivery System |
| TEER | Trans-Epithelial Electric Resistance |

10.2. Támogatás



Nemzeti
Kiválóság
Program



ÚJ SZÉCHENYI TERV

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú *Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program* című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



KÖZIGAZGATÁSI ÉS IGAZSÁGÜGYI HIVATAL

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujsechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.