

ACTA

PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

1.

2017

APHGAO 87, (043) 1–36. (2017)



A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

<i>Bakonyi Mónika, Berkó Szilvia, Budai-Szűcs Mária, Kovács Anita, Spaits Tamás, Samu Gyöngyi, Csányi Erzsébet: In vitro bőrmodellek, mint a hatékony gyógyszerformulálás eszközei</i>	3
<i>Koncz Szabolcs, Gáll Zsolt, Kolcsár Melinda: Összehasonlító anxietásmérés humán megfigyeléssel és EthoVision XT viselkedéselemző szoftverrel emelt labirintus teszten</i>	13
<i>Varga Erzsébet, Domokos Erzsébet, Fogarasi Erzsébet, Ștefănesu Ruxandra, Fülöp Ibolya, Croitoru Mircea Dumitru, Laczkó-Zöld Eszter: A <i>Prunus spinosa</i> L. termés fenolos komponenseinek vizsgálata és antioxidáns hatása</i>	19
<i>Jakab Géza, Fülöp Viktor, Sántha Konrád, Szerőcsei Debóra, Balogh Emese, Antal István: Önemulgeáló hatóanyag-felszabadító rendszerek, mikroemulziók és nanoemulziók formulálási lehetőségei . . .</i>	27

CONTENTS

<i>Bakonyi, M., Berkó, S., Budai-Sziűcs, M., Kovács, A., Spaits, T., Samu, G., Csányi, E.:</i> <i>In vitro</i> skin models in the optimization of skin formulations	3
<i>Koncz S., Gáll Z., Kolcsár M.:</i> Measuring anxiety with behavior analysis software and comparing human observations with EthoVision XT in the elevated plus maze paradigm	13
<i>Veszelyné Kotán E., Mészáros, Á.:</i> Therapeutic practice of bisphosphonate use and related Pharmaceutical issues II.	23
<i>Jakab G., Fülöp V., Sántha K., Szerőcsei D., Balogh E., Antal I.:</i> Formulation possibilities of self-emulsifying drug delivery systems, microemulsions and nanoemulsions	27

Acta Pharmaceutica Hungarica: www.mgyt.hu

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu

Felelős kiadó: Prof. Dr. Szőkő Éva

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530

Adószám: 19000754–2–42

Előfizetési díj egész évre: 6000 Ft + 300 Ft áfa
Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 700 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: ColorToys Bt.

***In vitro* bőrmodellek, mint a hatékony gyógyszerformulálás eszközei**

BAKONYI MÓNIKA¹, BERKÓ SZILVIA¹, BUDAI-SZŰCS MÁRIA¹, KOVÁCS ANITA¹, SPAITS TAMÁS², SAMU GYÖNGYI², CSÁNYI ERZSÉBET¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet, Eötvös utca 6., 6720 Szeged,

²Egis Gyógyszergyár Zrt. Körmenyi Gyáregység, Mátyás kir. u. 65., 9900 Körmeny

Summary

BAKONYI, M., BERKÓ, S., BUDAI-SZŰCS, M., KOVÁCS, A., SPAITS, T., SAMU, G., CSÁNYI, E.: ***In vitro skin models in the optimization of skin formulations***

Background: Transdermal drug delivery is assumed to have a growing importance in drug development recently, thus it is crucial to optimize the penetration properties of drug into/through the skin. Most of the current developments rely on the use of appropriate *ex vivo* animal or artificial models. However, the limited availability of human skin and the increasing restrictions in connection with animal testing encouraged the search for suitable artificial skin models.

Method: For the review, we have searched the databases of scientific and medical research to collect the available publications about the *in vitro* skin models. Furthermore, we overviewed the methods of the DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) database and the guidelines of Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD).

Results: *In vitro* skin models have advantages like reproducibility, relatively low cost, easy storage, uncomplicated handling, and they offer a possibility for rapid screening and faster optimization of skin formulations. Furthermore, their composition can be easily modified which allows studying the relationship between certain pathological conditions and barrier function. However, the limitations of these models are needed to be taken into account.

Conclusion: This review attempts to provide an overview of the most frequently used models, focusing on their limitations and advantages. Accessibility, easiness of the application, cost and the respective limitations have to be considered in order to choose the most appropriate *in vitro* model for the particular objective.

Keywords: *in vitro* models, human skin, animal skin, topical formulations, skin therapy

Összefoglaló

Bevezetés: A hatóanyag *in vivo* anyagból való felszabadulásának, bőrbe jutásának, illetve a bőr, mint biológiai membránon keresztüli diffúziójának modellezése a topikális készítmények fejlesztéséhez nélkülözhetetlen. Az utóbbi években komoly törekvések folynak különféle alternatív modellek kidolgozására. Ez alapvető fontosságú a humán bőr nehéz elérhetősége és a világszerte növekvő állatkísérletek elleni tiltakozások miatt. Ezért célul tűztük ki a bőrpenetrációt modellező vizsgáló módszerek szakirodalmi kutatását.

Módszerek: Az összefoglaló közlemény megírásához áttekintettük a rendelkezésre álló tudományos adatbázisok témában megjelent publikációit, továbbá az Európai Bizottság keretében működő Közös Kutatóközpont által elfogadott, publikus, tényeken és jogi követelményeken alapuló DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) módszerleírásait és a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) irányelveit.

Eredmények: Általánosságban az *in vitro* vizsgálatokhoz használt modellek nagy előnye, hogy reprodukálható eredményeket biztosítanak szemben a humán bőrön keresztül végzett kísérletekkel, melyeknél igen nagy intra- és interindividuais eltéréseket kaphatunk. Emellett a mérési körülmények könnyen standardizálhatók, így nő a reprodukálhatóság. Továbbá könnyű kezelhetőségük miatt gyors vizsgálatokat tesznek lehetővé, így alkalmasak nagy áteresztőképességű vizsgálatok elvégzéséhez a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában. Előállításuk viszonylag egyszerű, és tulajdonságaik változtatásával az egy adott készítmény fejlesztését szolgáló paraméter hatását külön vizsgálhatjuk, vagy akár bizonyos patológias állapotokra jellemző tulajdonságokat hozhatunk létre. Mindezek mellett a mesterséges membránok tárolása egyszerű, nem igényel hűtést vagy tároló oldatot. Hátrányuk azonban, hogy még gondos tervezés esetén sem tudják biztosítani az *in vivo* körülményeket.

Összegzés: Ezen összefoglalóban bemutatjuk a hatóanyag bevitel vizsgálatára alkalmas modelleket, beleértve a modellek főbb jellemzőit, előnyeiket és korlátaikat, továbbá néhány nemzetközi irányelv ismertetését.

Kulcszavak: *in vitro* modell, bőrmódel, transzdermális hatóanyagbevitel, szövettenyésztés, topikális készítmény

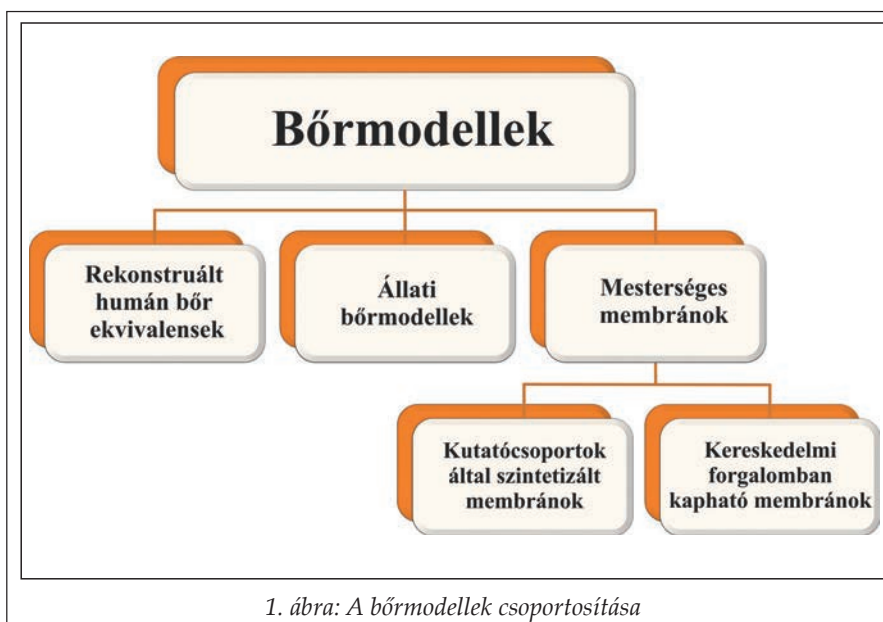
1. Bevezetés

A penetrációs vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében irányadó lehet az Európai Bizottság keretében működő Közös Kutatóközpont (Joint Research Centre – JRC) által működtetett DB-ALM adatbázis (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation), amely olyan jól definiált állatkísérleteket helyettesítő módszereket ír le, amelyek felhasználhatók mind a biomedicina területén, mind a hatósági biztonságosság értékelésben.

Emellett, az *in vitro* kísérletek tervezéséhez támaszt adhat az OECD TG 428 protokoll [1], míg az *in vivo* módszerekre az OECD TG 427 irányelv [2] ad iránymutatást. Az úgynevezett hármas adatsomag megközelítés” (Triple Pack approach) szerint, a humán kísérletek kiválthatók egy 1) *in vivo* állat; 2) *in vitro* állat; és 3) *in vitro* humán bőr-abszorpciós vizsgálat eredményéből számolt korrelációval, így a humán kísérletek elvégzése nem szükséges (**1. egyenlet**) [3].

$$\text{humán in vivo abszorpció} = \frac{\text{in vivo patkány abszorpció} \times \text{in vitro humán abszorpció}}{\text{in vitro patkány abszorpció}} \quad (1)$$

A bőrpenetrációs modelleket csoportosítva, először a rekonstruált humán bőr ekvivalenseket, azaz szövettényészeteket mutatjuk be, majd az állati bőrmodelleket, végül pedig a mesterséges membránokat, azokon belül is az egyes kutatócsoportok által szintetizált modelleket és a kereskedelmi forgalomban elérhető membránokat (**1. ábra**).



1. ábra: A bőrmodellek csoportosítása

2. Rekonstruált humán bőr ekvivalensek

A rekonstruált humán bőr ekvivalenseket 3 csoportra oszthatjuk: egyikük a rekonstruált humán epidermisz (RHE), amely csak egyfajta sejtípust tartalmaz, a humán epidermiszt is felépítő keratinocitát, így szerkezete nem komplex. Másik fajtájuk, a teljes bőrmodell (FT = full thickness), mely elhalt- és élő epidermiszt, ill. dermiszt, valamint már fibroblasztokat is tartalmaz [4]. Szerkezetük összetettebb, de a bőrfüggelékek még ebből a típusból is hiányoznak [5]. Ezek mellett előállíthatók komplex három dimenziós szövettényészetek, amelyeket még egyéb sejtípusokkal is kiegészítettek, így szerkezetük jobban közelít a humán bőréhez [4].

Az **I. táblázat** a különböző sejtípusokat tartalmazó szövettényészetek alkalmazását, előnyét és hátrányát foglalja össze [6]

A rekonstruált humán epidermiszt használják a legszélesebb körben: alkalmazható bőrirritáció, bőrroncsolódás, fototoxicitás, epidermális genotoxicitás, transzdermális hatóanyagbevitel, bőr érzékenység és metabolizmus tesztekhez. Előnye, hogy számos elérhető, validált típusa ismert, melyek paraméterei sztenderdizáltak. Hátránya, hogy barrier funkciója szinte elhanyagolható a humán bőrhöz viszonyítva [7, 8], emellett csak egyfajta sejtípust tartalmaz, így szerkezete nem komplex és validálása főleg biztonságossági tesztekhez történik meg, nem penetráció vizsgálatokhoz.

A melanocitákat, azaz festéksejteket is tartalmazó RHE-t fényérzékenység és pigmentáció vizsgálatára használják főleg a kozmetikai iparban, a gyógyszerfejlesztésben nem elterjedt modell.

A teljes bőr modelleket a bőrön keresztüli penetráció, illetve sebgyógyulás vizsgálatára, emellett bakteriális adhézió tanulmányozására használják. Előnye, hogy tulajdonságai meghatározottak, a kereskedelmi forgalomban több modell is elérhető például GraftSkin[®], EpiDermFT[®] és Pheninon[®]. Hátránya, hogy előállítása költséges és rövid a sejtek élettideje.

A teljes bőr modelleket is ki lehet egészíteni melanocitákkal, így vizsgálható segítségükkel a melanocita sti-

I. táblázat

Szövettenyészetek fajtái

Típus	Alkalmazhatóság	Előnyök	Hátrányok
RHE	- bőrirritáció teszt - bőrroncsolódás teszt - fototoxicitás - epidermális genotoxicitás - transzdermális hatóanyag bevitel - bőr érzékenység - metabolizmus	- számos elérhető, validált modell - sztenderdizált paraméterek	- barrier funkció hiányos alacsony komplexitás, nincs sejtek közötti kommunikáció - csak biztonságossági tesztekhez optimalizáltak
RHE + melanociták	- fényérzékenység - pigmentáció vizsgálata	- bőr pigmentáció tanulmányozására sztenderdizálva	- gyógyszerfejlesztésben nem meghatározó (inkább kozmetológiai iparban)
FT modellek	- perkután abszorpció - sebgyógyulás - bakteriális adhézió vizsgálata	- sztenderdizált, kereskedelmi forgalomban elérhető modellek - jól használható a sebgyógyulás modellezésére	- drága - sejtek rövid életidővel rendelkeznek
FT+ melanociták	- melanocita stimuláló fehérjék tanulmányozása - vitiligo patogenezisében szerepet játszó faktorok felderítése	- vitiligo kezelésére fejlesztett gyógyszerek tesztelése lehetséges - melanogenezis kutatásokra alkalmas	- nincsenek elfogadott szabványok
FT+ Langerhans	- allergének meghatározása - epidermális Langerhans sejtek érése és migrációjának vizsgálata	- immunokompetens modell a szenzitizációs potenciál meghatározására	- nem sztenderdizált modell - sejtvonalat használ (bonyolult tenyésztés)
FT+ endoteliális sejtek+ szubkutisz	- angiosztatikus terápia vizsgálat - zsír metabolizmus vizsgálata	- meghatározható a gyógyszerek zsírszövetre és angiogenezisre gyakorolt hatása - hosszú használat lehetséges	- nem sztenderdizált modell - kevésbé kidogozott technika
FT+ őssejtek	- epidermális fejlődés vizsgálata - sebgyógyulás - pigmentációs zavarok - autológ transzplantáció vizsgálata	- betegség modellek széles spektrumának tenyésztésére használható	- előállítása, felhasználása összetett technológiát igényel
FT+ szőrtüszők	- hatóanyag penetráció vizsgálata	- szőrtüszők hatása a penetrációra vizsgálható	- alacsony áteresztőképességű módszer - más bőrfüggelékek hiányoznak
Explantáció	- epiteliális migráció, antigén prezentáló sejtek aktivációjának megfigyelése - mikrobiom hatása a bőrgyulladásra - idegi kapcsolatok és hatások	- minden sejtípus jelen van - beteg bőr is használható speciális gyógyszer vizsgálatokhoz	- kevés mennyiségű bőr elérhető - donorok közti különbségek
Explantáció+ szőrtüszők	- szőrtüsző fejlődés molekuláris folyamatainak vizsgálata	- <i>de novo</i> szőrtüsző képződés vizsgálata - hasonló a fiziológias bőr környezethez	- nincsenek meghatározott fázisai a szőrtüsző növekedésnek - kifejlődött szőrtüszők növekedése nem vizsgálható

muláló fehérjék hatása és a vitiligo patogenezise. Hátránya, hogy nem léteznek belőle elfogadott sztenderdek.

A Langerhans sejteket is tartalmazó teljes bőrszövettenyészetek használhatók allergének feldeírítésére és a Langerhans sejtek vizsgálatára. Hátrányuk, hogy nincsenek a kereskedelmi forgalomban kapható kész modellek.

A teljes vastagságú szövettenyészetek endoteliális sejtekkel és zsírsejtekkel kiegészítve alkalmazhatók az erekre és zsírra való hatás vizsgálatára is, azonban ebből sincsenek forgalomban kész modellek.

Az őssejteket is tartalmazó modellek lehetőséget nyújtanak az epidermális fejlődés tanulmányozására, emellett a sebgyógyulás, pigmentációs zavarok és autológ transzplantáció (saját szövet átültetése más helyre) elemzésére és az őssejtek széles körű differenciálódásának következtében sokféle vizsgálathoz használhatók. Tenyésztésük azonban rendkívül összetett technológiát igényel.

A szórtüszőkkel kiegészített teljes vastagságú bőrmodelleket a hatóanyag penetráció vizsgálatához használják, mivel ebben a folyamatban fontos lehet a szórtüszők szerepe [6]. Hátrányuk, hogy bonyolult előállításuk miatt időigényes a felhasználásuk.

Az explantáció, azaz kimetszett élő szövetnek mesterséges táptalajra való kiültetése és továbbtenyésztése, széles körben alkalmazható az alapkutatóban, azonban elérhetősége korlátozott és a donorok között nagy különbségek lehetnek.

A szórtüszőkkel kiegészített explantációk a szórtüszőben zajló folyamatok modellezésére adnak lehetőséget.

Az RHE előállítása emberi keratinociták valamilyen inert szűrőn (pl. polikarbonát) való te-

nyésztésével történik, körülbelül 14 nap alatt. Tenyésztésük során OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) irányelvek sokaságának kell megfelelniük, amely magában foglalja többek között az életképesség, a barrier funkció, a morfológia, a reprodukálhatóság és a minőség ellenőrzés követelményeit [9].

A II. táblázatban három kereskedelmi forgalomban kapható RHE modell SkinEthic® (SkinEthic Laboratories, Nice, France), EpiDerm® (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) és EpiSkin® (L'Oréal, Paris, France) tulajdonságait foglaltuk össze [10].

Az EpiDerm® emberi eredetű epidermális keratinocitákat tartalmaz. A modellt vegyi anyagok, gyógyszerek és bőrápolási termékek tesztelésére alkalmazzák az OECD Test Guideline (TG) 439 iránymutatásai alapján [9]. A GMP követelményeknek megfelelően állítják elő *in vitro* – *in vivo* korreláció vizsgálathoz. Több típusa és továbbfejlesztett változata létezik: EpiDerm®TM, EpiDerm®FT, EpiDerm®SIT. A különböző típusok lipid összetétele kicsit változik, és vannak köztük metabolikusan és mitotikusan is aktívak, melyek pontosabban szemléltetik az emberi bőr viselkedését a nem élő vagy állati bőr modelleket használó kutatások eredményeinél. A SkinEthic® modell fiatal férfi donor elsődleges keratinocita sejtjeit tartalmazza. Méretét tekintve 0,5 cm² felületű modell, bőrirritációs vizsgálatokra használják. Az EpiSkin® modell felnőtt női keratinocita sejtekből áll. Méretét tekintve 1,07cm² felületű. Használható az OECD TG 431 guideline szerinti bőr korróziós és TG 439 bőr irritációs vizsgálatra [9, 11]. Az Európai Közösségek Bizottsága 761/2009/EK rendeletének III. mellékletének értelmében mind az

II. táblázat

Kereskedelmi forgalomban kapható szövettenyészetek összehasonlítása

		EpiDerm®	SkinEthic®	EpiSkin®
Morfológia	Hasonlóság	minden humán epidermisz réteg megtalálható benne	hasonló struktúra a humán epidermiszhez dezmoszómák, keratohialin és lamelláris granulák	minden epidermisz réteg megtalálható
	Különbség	eltérő sejt alakok	lipid cseppek minden rétegben jelen vannak (humán bőrben nem)	stratum corneum vastagabb, mint a humán bőrben bazális sejtek, granuláris sejtek eltérő alakúak
Lipid összetétel		foszfolipid és di/triglicerid tartalom hasonló több ceramid koleszterin és szabad zsírsav kevesebb	kevesebb foszfolipid és szfingomielin több di- és triglicerid, lényegesen több ceramid	több ceramid, di- és triglicerid

EpiSkin[®], mind az EpiDerm[®] modellek alkalmasak *in vitro* bőrirritációs vizsgálatok kivitelezésére.

A II. táblázatból leolvasható, hogy morfológiájuk, bár nagyrészt megegyezik a humán epidermiszével, kisebb eltérések mégis találhatóak a sejtek alakjában vagy méretében. Minden modellről elmondható, hogy bennük a lipidek mennyisége eltér a humán epidermisztől: kevesebb szabad zsírsavat és foszfolipidet tartalmaznak, míg a ceramidokból több található bennük és a lipidek szerkezete is különbözik. Ezek az eltérések magyarázatot adhatnak a szövettenyészetek csekély barrier funkciójára [10].

Flaten és mtsai. flufenaminsav tartalmú kenőcs penetrációját vizsgálták humán stratum corneumon (SC), epidermiszen, teljes vastagságú bőrön és az EpiDerm[®] RHE szövettenyészetben. Kísérleteik eredményei alapján jóval magasabb volt a penetráció a szövettenyészetben keresztül, illetve az EpiDerm[®] esetén nem tapasztaltak késleltetési időt a penetráció során, ami a barrier hiányára utal [12].

Schmook mtsai.-val a Graftskin[®] (élő bőr ekviválens) és a Skinethic[®] (RHE) modelleken keresztüli penetrációt hasonlított össze a humán és sertés bőrrel négy dermatológiában használatos hatóanyag segítségével: szalicilsavval, hidrokortizonnal, klotrimazollal és terbinafinnal. A vizsgált komponensek tulajdonságaitól függően különböző korrelációt kaptak. A hidrofób klotrimazolt Graftskin[®] modellel vizsgálva 900-szoros flux értéket, míg a szalicilsavra a Skinethic[®] szövettenyészetrel hétszeres értéket mértek a humán bőrhöz viszonyítva [13].

Dumont és munkatársai által publikált összefoglaló cikk, a bőrön keresztüli biohasznosulás vizsgálatára alkalmazható jelentősebb *in vitro* és *in silico* módszereket foglalja össze. Leírja, hogy a bőrmódel átteresztőképessége kb. 10-szer magasabb a rekonstruált humán epidermisz esetén, és 3-4-szor magasabb a teljes vastagságú modelleken keresztül, mint a kadaver bőrön, melyet koffein, tamoxifen, és hidrokortizon hatóanyagok vizsgálatával tanulmányoztak [14].

Összefoglalva, a szövettenyészetek előnyei, hogy a tenyésztés után azonnal felhasználhatók, így gyors vizsgálatokat tesznek lehetővé, eredményeik reprodukálhatók, emellett mivel a penetráció során a késleltetési idő elhanyagolható, néhány óra is elég egy kísérlet elvégzéséhez. Továbbá vizsgálható velük a bőr metabolizmusa is, illetve a vivőanyagok penetrációra való hatásának tanulmányozása is lehetséges [6].

Hátrányuk, hogy rendkívül magas permeabi-

litási értékek jellemzőek rájuk, emellett előállítá-
suk és felhasználásuk bonyolult és költséges, speciális tárolási körülményeket és speciális tápoldat alkalmazását igényelik, valamint az életképességük rövid [4, 15, 16].

Szerepük azonban vitathatatlan, főleg a kozmetikai iparban az irritációs tesztek vonatkozásában, az állatkísérletek betiltása óta.

3. *Ex vivo* modellek

A transzdermális hatóanyag penetráció vizsgálatára széleskörűen használtak az *ex vivo* modellek, azaz élő szervezetből kimetszett szövetek.

Azt, hogy az egyes fajok bőre közötti korreláció milyen mértékű, azaz mennyire helyettesíthetők egymással, főleg a szövetben található szabad zsírsavak és trigliceridek mennyisége, illetve a szőrtüszők sűrűsége határozza meg.

A leginkább releváns modelleknek a sertés bőr tekinthető, mivel a stratum corneum és az epidermisz vastagsága nagyon hasonló a humán bőréhez. Tanulmányok alapján, a stratum corneum vastagsága a sertésbőrben 21-26 μm , az epidermisz pedig 66-72 μm , amely hasonló a humán bőr paramétereivel (stratum corneum 6-19 μm , epidermisz 70 μm) [17]. Legmegfelelőbb a sertés fülről vett bőr, mivel a szőrtüszők mennyisége itt közelít leginkább az emberéhez: négyzetcentiméterenként 20 darab található belőlük, míg az embernél 14-32 darab. Emellett az érhálózat és a kollagén elrendeződés, illetve a glikoszfinolipid és ceramid tartalom is hasonló [18, 19].

A másik igen gyakran használt szövet, a rágcsálólókból vett bőr (egér, patkány, tengerimalac), mivel ezen állatok tenyésztése a legegyszerűbb kis méretűk, egyszerű gondozásuk és alacsony költségeik miatt. Ezek közül is jobban preferáltak a szőrtelen fajok, mivel ezek jobban hasonlítanak a humán bőr tulajdonságaira. Összességében azonban a rágcsálók, főleg az egerek bőrén keresztül jóval magasabb abszorpciós értékeket mérhetünk, mivel bőrük vastagsága nagyjából $\frac{1}{4}$ része a humán bőrének [18, 20].

Fontos megjegyezni, hogy ezek a szövetek körültekintő kezelést igényelnek, mivel tulajdonságaikat megváltoztathatják a nem megfelelő tárolási körülmények, a minta előkészítés során szenvedett sérülések vagy a rosszul megválasztott kísérleti módszerből eredő változások, így hamis eredményekhez vezethetnek [10]. Ezért a stratum corneum épségét, integritását minden vizsgálat előtt ellenőrizni szükséges. Első lépésként mindig vizuális vizsgálatlall kell kezdeni, nincsenek-e lát-

ható sérülések. Ezt követően a bőrt a mérőcellába rögzíteni kell, és az egyensúly beálltára várni, mivel a sejtek hidratációjával egyes apró rések esetlegesen bezáródnak (pl. szőrtüszők). Az integritás vizsgálatára alkalmazható a bőr elektromos ellenállásának vagy transzepidermális vízvesztésének mérése, továbbá referens anyag penetrációjának vizsgálata (pl. trícium tartalmú víz) [21, 22].

4. Mesterséges membránok

A mesterséges membránok egyszerű és reprodukálható alternatívát nyújtanak a hatóanyag penetráció alapvető fizikai-kémiai mechanizmusainak tanulmányozására, beleértve a vivőanyag és membrán közötti kölcsönhatásokat. Alkalmassak a gyógyszer fejlesztés korai szakaszában a nagy átteresztőképességű vizsgálatokhoz: irányutatást adnak arra vonatkozóan, hogy a kutatás további szakaszaiban mely formulációk érdemesek a biológiai membránokon történő penetrációs vizsgálat validálására is, és segítenek az összetételek gyors és hatékony optimalizálásában [10, 23, 24].

4. 1. Kutatócsoportok által szintetizált membránok

4. 1. 1. Szilikon alapú membránok

A modellek között igen elterjedtek a szilikon membránok, amelyek anyaga a poli(dimetil-sziloxán) (PDMS). A szilikon membránokat már az 1970-es években használták a különböző készítményalapokból történő hatóanyag felszabadulás vizsgálatára [25]. Előnyük, hogy nem reakcióképesek, stabilak, azonban hátrányuk, hogy lipofil karakterük miatt nem alkalmasak hidrofил komponentek vizsgálatára [26, 27].

A problémára megoldásként Miki és mtsai. egy polietilén-glikol (PEG) 6000- PDMS kopolimert állítottak elő, és ezzel impregnáltak egy poli(tetrafluoretilén) szűrőt. Az így kapott modellben igazolták PEG 6000 tartalmú mikrodomének jelenlétét, amely lehetőséget biztosít a hidrofил komponentek diffúziójára is. A diffúziós cellákon végzett kísérletek során jó korrelációt kaptak a humán bőrral. A membrán PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay, ld. később) modellben is alkalmazható, így használatával hasznos következtetéseket vonhatunk le a perkután abszorpcióra vonatkozóan [28].

Másik fajtája a szilikon membránoknak egy polikarbonát- PDMS kopolimer, amely a humán bőrhöz hasonlóan több fázisú és váltakozó polaritású.

Segítségével kvantitatív módon következtethetünk az *in vivo* hatóanyag penetráció mértékére [29].

Karadzovska és mtsai. szilikon olaj és izopropil-mirisztát elegyével vonták be egy polivinilidén-fluorid szűrő felszínét, és így bőrral jól korreláló modellt kaptak, amely a bőrpenetráció modellezése mellett a stratum corneumban raktárt képző hatóanyagok elkülönítésére is alkalmas [30].

4. 1. 2. Lipid alapú membránok

– PAMPA

A PAMPA modellben található membrán egy hidrofил szűrőt tartalmaz, ami n-dodekánban oldott foszfatidilkolinnal van borítva [31]. Előnyét az adja, hogy gyorsabb, könnyebb és jelentősen olcsóbb, mint a sejtvonalakon illetve biológiai membránokon végzett vizsgálatok. Azonban mivel csak passzív folyamatokat képes modellezni, ezért az olyan molekulák viselkedéséről, melyek transzportja valamilyen aktív folyamat által érintett, nem ad reális képet. Hátránya továbbá, hogy szerkezete nem adja vissza a bőr kettős lipid szerkezetét [32].

A skin-PAMPA modell a bőrrben található ceramidok analógiájára, szintetikus ceramidokat tartalmaz és a teljes vastagságú bőrral hasonló penetrációs tulajdonságokat mutat, emellett a szintetikus lipidek tárolása egyszerűbb és stabilitásuk is kedvezőbb [10, 33, 34]. A kialakított biomimetikus modell a tesztek alapján képes az *ex vivo* humán bőrron kapott adatok becslésére, így jó alternatívája lehet a bőrron keresztüli permeabilitás vizsgálatának [35, 36].

– Foszfolipid vezikulum alapú permeációs próba (Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay, PVPA)

A PVPA tesztek foszfolipid vezikulum rétegei építik fel, amelyek cellulóz észter szűrővel vannak alátámasztva, illetve annak pórusaiba inkorporálva.

Előállításuk során a liposzómákhoz tojás foszfatidilkolint használnak, melyet etanol tartalmú foszfát pufferben oldanak, az elkészült diszperziót 0,8 illetve 0,4 μm pórusátmérőjű membránszűrőkön extrudálják és a cellulóz észter szűrő pórusaiba juttatják centrifugálással.

Az elkészült membránt 21 hatóanyagra vizsgálták egy saját tervezésű cellával. A donor fázist az adott hatóanyag telített oldata alkotta, míg az akceptor fázis foszfát puffer volt. Adott időpontokban az akceptor fázis teljes mennyiségét új pufferre cserélték, és a lecserélt oldatban spektrofotó-

metriásan mérték a penetrálódott hatóanyag mennyiségét. A kapott eredményeket a humán bőrön keresztüli penetrációra vonatkozó irodalmi értékekkel vetették össze, és jó egyezést találtak.

A PVPA modellnek további 2 változata is elkészíthető: a PVPA_c membránban a liposzómákat koleszterin és tojás foszfátidilkolin építi fel, míg a PVPA_s membrán liposzómáit pedig a bőrben megtalálható lipidekből állítják elő (ceramidból, koleszterinből, szabad zsírsavakból, koleszteril-szulfátból és foszfátidilkolinból) [37].

Kittayanond és *mtsai.* is kísérleteztek liposzómákból készült membrán előállításával és vizsgálatával. A liposzómák előállításához szintetikus lipideket használtak fel: ceramidot, koleszterint, zsírsavakat, és koleszterin-szulfátot 37,7: 28,3: 17,0: 17,0 arányban.

Az előállítás során a lipideket membránszűrőn (2 µm pórusméretű Nucleopore) extrudálták a fázisátalakulási hőmérséklet alatt. Feltehetően a membránszűrő pórusaiban liposzómák rakódtak le, amelyet megszárítottak és kalcium-kloriddal kezeltek, hogy a lipid kettősréteg redős szerkezetet vegyen fel, majd ismét megszárították, és ezután penetrációs vizsgálatokat végeztek az elkészült modellel.

Az elkészült membránt elektronmikroszkópos és diffúziós vizsgálatoknak vetették alá, illetve vizsgálták a vízpára áteresztő képességét is, és kielégítő eredményeket kaptak [38].

– *Stratum corneum helyettesítő membrán (Stratum Corneum Substitute, SCS)*

Egy másik lipid alapú membrán az SCS, amely porózus anyagból épül fel és a stratum corneumban található lipidekhez hasonló szintetikus lipidekkel van borítva [39, 40].

Előnye, hogy a lipid összetétel könnyen változtatható, így vizsgálható az egyes lipidek befolyása a barrier funkcióra, illetve létrehozható bizonyos patológiás állapotokra jellemző lipid összetételű membrán is [41].

A membrán előállítása során meghatározott tömegarányú szintetikus ceramid, szabad zsírsav és koleszterin keverékét oldják kloroform és metanol elegyében, majd az oldószert elpárologtatják, és újra oldják hexán és etanol elegyében. Ezután az oldatot egy 50 nm pórusátmérőjű polikarbonát szűrőlemezre porlasztják.

A membránt diffúziós kísérletekben vizsgálták. A vizsgált hatóanyagok a para-amino-benzoésav (PABA) illetve az etil- és butil- paraamino-benzoésav voltak, amelyeknél a lipofilitás a szénlánc hosszával nő. A kísérletek során vizsgálták a rétegvastagságnak, a hatóanyagok lipofilitásának és a membrán lipid összetételének hatását a penetrációra.

Az eredmények alapján, az optimális rétegvastagság a 12 µm- ez felett meg leginkább a humán stratum corneumon keresztül mért penetrációs értékeknek. Észrevették továbbá, hogy a késleltetési idő annál kisebb, minél lipofilebb a vizsgált hatóanyag. A legmagasabb penetrációs értéket a közepes lipofilitású etil-PABA-nál mérték, a szénlánc hosszának csökkentése vagy növelése esetén is csökkent a membránon keresztüli penetrációs érték. Emellett az eredmények azt mutatták, hogy a membrán lipid összetételének változtatása jelentős befolyással van a permeabilitásra [42].

4. 2. Kereskedelmi forgalomban elérhető membránok

A szintetikus membránok általában polimer makromolekulák vékony rétegeiből állnak, amelyek meghatározzák a rajtuk keresztül történő ható-

III. táblázat

Kereskedelmi forgalomban elérhető mesterséges membránok jellemzői

	Gyártó	Anyag	Pórusméret	Felhasználás
Silastic® 500-1	Dow Corning Corporation, MI	szilikon és műanyag keveréke	nem meghatározott	orvostudomány
Supor®	Gelman Sciences, MI	poliéterszulfon	0,45 µm	biológia, gyógyszerészet, sterilizés
Cuprophan® 150M	Akzo Nobel Faser, Germany	cellulóz	nem meghatározott	hemodialízis
Millipore HAWP®	Millipore, MA	cellulóz acetát ftalát	0,45 µm	analitika, kutatás
TF-PTFE®	Gelman Sciences, MI	politetrafluoroetilén (PTFE) membrán polipropilén alátámasztással	0,45 µm	sterilizés

IV. táblázat

Nitroglicerín penetrációja különböző membránokon keresztül

	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	24 óra alatt penetrálódott nitroglicerín mennyiség ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
Friss humán bőr	22,1 ± 2	520 ± 54
Szörtelen egér bőr	30,5 ± 6	716 ± 152
Fagyasztott humán bőr	33,2 ± 8	781 ± 185
A sejtkultúra	299,4 ± 28	2553 ± 167
B sejtkultúra	235,2 ± 39	2248 ± 288
C sejtkultúra	178,9 ± 19	1833 ± 159
D sejtkultúra	174,5 ± 8	1730 ± 157
Silastic® 500-1	431,7 ± 95	2508 ± 98
Supor®	432,7 ± 37	2007 ± 253
Cuprophan® 150M	523,0 ± 69	2210 ± 73
Millipore HAWP®	387,3 ± 22	1926 ± 130
TF-PTFE®	63,9 ± 7	1603 ± 166

anyag diffúziót. Általánosságban ezek a membránok a diffúziós kísérletek során 2 funkciót láthatnak el: a bőr struktúrájának modellezése és/vagy minőségi kontroll a hatóanyagok diffúziós tulajdonságai között. A minőség ellenőrzésre használt

membránokkal szemben, mint például a cellulóz észter vagy poliszulfon, gyakran inkább az az elvárás, hogy csupán alátámasztásként működjenek, mintsem barrierként [43].

Egy kísérletben több, kereskedelemben kapható,

V. táblázat

Bőrmodellek előnyei és hátrányai

Modell	Előnyök	Korlátok
Szilikon	reprodukálható eredmények alacsony költség tárolás egyszerű	nem lipid alapú kis hasonlóság a SC-mal nem biológiai eredetű
PAMPA	reprodukálható alacsony költség hosszú eltartási idő	szintetikus lipidek/ nem lipid alapú lipid szerkezet nem meghatározott/ kis hasonlóság a SC-mal nem biológiai eredetű
PVPA	reprodukálható lipid összetétel könnyen változtatható relatív alacsony költségek tárolás egyszerű	lipid szerkezet nem meghatározott nem biológiai eredetű
SCS	SC lipid összetételével megegyezik reprodukálható lipid összetétel könnyen változtatható relatív alacsony költségek	egyelőre nem használják a formuláció optimalizálásához nem biológiai eredetű
Rekonstruált humán bőr ekvivalens	állandó permeabilitás összevetve a humán bőrrel	nagyobb permeabilitás kérdéses barrier funkció magas költség
Sertés fül	könnyen beszerezhető (vágóhídi szemét)	állat kora befolyásolja a bőr vastagságát szőr eltávolítása szükséges- bőr sérülhet tárolás nehézkes
Rágcsáló bőr	kis méret, egyszerű tenyésztés, szörtelen fajok elérhetőek	etikai engedély szükséges nagyon vékony, nagy permeabilitású bőr szórtüszők nagy mennyiségben
Humán bőr	leginkább releváns modell	etikai engedély szükséges magasabb inter- és intaindividuális különbségek különböző források: kor, nem, rassz, plasztikai sebészet, amputáció különböző anatómiai részek: has, mell, hát stb. tárolás nehézkes

különböző célokra használt membránon keresztül vizsgálták a nitroglicerín diffúzióját [44]. A membránok jellemzőit a **III. táblázat** foglalja össze.

További kísérletek során a nitroglicerín penetrációját vizsgálták humán bőrszöveten, szőrtelen egérbőrön és különböző szövettenyészetben keresztül is. A kapott flux (felületegységen 1 óra alatt penetrálódott mennyiség) és 24 óra alatt penetrálódott mennyiségek nagy eltéréseket mutattak a különböző membránokon keresztül (**IV. táblázat**).

A **IV. táblázatból** leolvasható, hogy a szintetikus membránokon keresztül többszörös flux értéket mértek a humán és állati bőrrel összehasonlítva, egyedül a TF-PTFE® membránon mért érték közelítette meg azt. A szövettenyészetekkel összehasonlítva azonban nagyságrendileg hasonló értékeket kaptak.

Egy másik piacon lévő membrán a Folioxane®, amely egy többrétegű szilikon membrán, lipofil karakterrel. Az orvostudományban harmadfokú égések terápiája során a bőr helyettesítésére használják, de számos kutatócsoport használta bőrpenetrációs vizsgálatok modellezésére [45-47]. A Folioxane® membrán validálásához a 17β -ösztradiol penetrációját vizsgálták 24 órán keresztül a membránon, humán bőrön és patkány bőrön keresztül. A 6. óráig a penetráció kinetikája megegyezett mindhárom membrán esetén, azonban ez után a patkány bőrön keresztül magasabb értékeket mértek, míg a szilikon membrán és a humán bőr szinte azonos értékeket mutatott [45].

A 2012-ben Merck Millipore cég, kimondottan a bőrpenetráció modellezésére fejlesztette ki az úgy-

nevezett Strat-M® membránt, melyet 2 poliéterszulfon réteg épít fel. A rétegek szintetikus lipidek keverékével impregnáltak és alattuk egy poliolefin réteg található. A membrán rétegeiben lefelé haladva a pórusok mérete nő [46] (**2. ábra**).

A poliéterszulfon polimert membránszűrőkben alkalmazzák gyakran, oldatok, szemcseppek sterilizálására használják.

A Strat-M® membrán segítségével vizsgálható hatóanyagok, kozmetológiai aktív anyagok, készítmények, tisztítószeres, peszticidek és kemikáliák transzdermális diffúziója és biztonsága.

Előnyei közé tartozik, hogy diffúziós tulajdonságai nagyban korrelálnak a humán diffúziós vizsgálatokkal, minimális variabilitás jellemzi, hosszú időn keresztül eltartható, nincsenek speciális tárolási igényei, emellett nem igényel előkészítést a használata, így a humán bőr gazdaságos alternatívája.

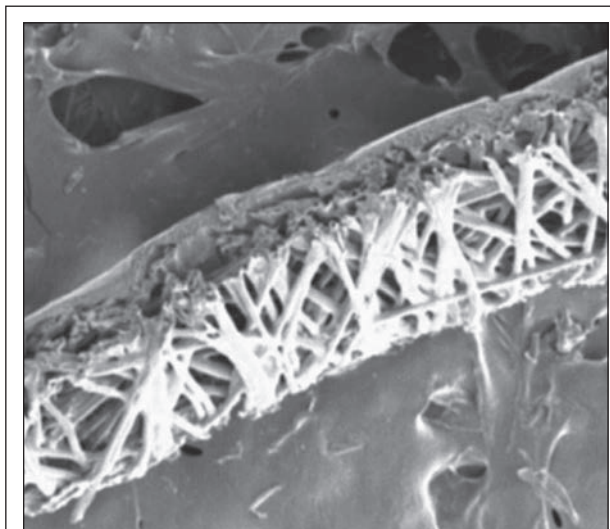
A gyártó több Franz cellás diffúziós teszttel vizsgálta a membránon keresztüli permeabilitást. A humán bőrön kapott értékekhez viszonyítva, közel 1:1 korrelációt kaptak a legtöbb vizsgált hatóanyagra.

Vizsgálták továbbá a Strat-M® membránon és humán bőrszöveten keresztül átáramlott koffein oldat mennyiségét 8 óra alatt, 5-5 különböző Franz-cellás mérésben. Míg a Strat-M® membrán esetén az értékek közel egyformák voltak, 8 %-os variációs koefficiens mellett, addig humán bőrön mért értékek nagy eltéréseket mutatnak, a variabilitás 72 % volt. Ez azt mutatja, hogy a Strat-M® membránnal végzett kísérletek reprodukálhatósága jóval nagyobb a humán bőrrel végzettekkel szemben.

Egy másik kísérletben a penetrációfokozók hatását vizsgálták a Strat-M® membránon és humán bőrön keresztüli hatóanyag penetrációjára nézve. Megállapították, hogy a Strat-M® membrán alkalmas a penetrációfokozók hatásának modellezésére is [46].

5. Összefoglalás

A jelen publikációban bemutatott modelleket az **V. táblázat** foglalja össze. Minden membránnak megvannak a maga előnyei és hátrányai. Az ideális bőrmódel kiválasztása tehát nem könnyű feladat, számos tényezőt kell figyelembe venni, például a modell elérhetőségét, felhasználhatóságát az adott kísérlethez, a költségeit és korlátait. Ezek együttes mérlegelése nyújthat segítséget a választásban.



2. ábra: A Strat M® membrán keresztmetszeti elektronmikroszkópos képe

IRODALOM

1. OECD: *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, (2004).
2. OECD: *Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, (2004).
3. OECD: *Guidance notes on dermal absorption*. Series on testing and assessment No. 156, (2011) 1–72.
4. Van Gele, M., et al.: T Expert Opinion on Drug Delivery, 8(6), 705-720 (2011).
5. Semlin, L., et al.: *In vitro models for human skin disease*. Drug Discov Today, 16(3-4), 132-9 (2011).
6. Mathes, S.H., H. Ruffner, Graf-Hausner, U.: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69, 81-102 (2014).
7. Netzlaff, F., et al.: Eur J Pharm Biopharm, 60(2), 167-78 (2005).
8. Netzlaff, F., et al.: *Altern Lab Anim*, 34(5), 499-513 (2006).
9. chemicals, O.g.f.t.t.o.: *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*. (No. 439).
10. Flaten, G.E., et al.: Eur J Pharm Sci 75, 10-24 (2015).
11. OECD: *Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, (2014) Section 4.
12. Wagner, H., et al.: J Control Release 75(3), 283-295 (2001).
13. Schmook, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A.: Int J Pharm, 215(1-2), 51-56 (2001).
14. Dumont Coralie, P.P., Asturiol David, Worth A.: *Applied In Vitro Toxicology*, 1(2), 147-164 (2015).
15. Summary, E.E.D.-A.M.: *Reconstructed skin models for percutaneous absorption testing - Summary* (2010).
16. Henning, A., Schaefer, U.F., Neumann, D.: Eur J Pharm Biopharm, 72(2), 324-31 (2009).
17. Jacobi, U., et al.: *Skin Res Technol*, 13(1), 19-24 (2007).
18. Godin, B., Touitou, E.: *Adv Drug Deliv Rev* 59(11), 1152-1161 (2007).
19. Dick, I.P., Scott, R.C.: J Pharm Pharmacol, 44(8), 640-645 (1992).
20. Schaefer, U.F., Hansen, S., Schneider, M., Luengo Contreras, J., Lehr, C.M.: *Models for skin absorption and skin toxicity testing*, ed. K. Kim, Ehrhardt, K.-J. 2008, New York: Springer.
21. OECD: *Guidance document for the conduct of skin absorption studies number 28*. OECD Series on Testing and Assessment, (2004).
22. Ng, S.F., et al.: AAPS PharmSciTech, 11(3), 1432-41 (2010).
23. Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M.E.: Int J Cosmet Sci, 34(6), 536-45 (2012).
24. Oliveira, G., et al.: Int J Pharm, 420(2), 216-22 (2011).
25. Nakano, M., Patel, N.K.: J Pharm Sci, 59(7), 985-8 (1970).
26. Loftsson, T., Konradsdottir, F., Masson, M.: Int J Pharm, 326(1-2), 60-8 (2006).
27. Oliveira, G., et al.: Int J Pharm, 393(1-2), 61-7 (2010).
28. Miki, R., et al.: Eur J Pharm Sci, 66, 41-49 (2015).
29. Feldstein, M.M., et al.: J Control Release, 52(1-2), 25-40 (1998).
30. Karadzovska, D., Riviere, J.E.: Eur J Pharm Sci, 50(5), 569-576 (2013).
31. Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K.: J Med Chem, 41(7), 1007-10 (1998).
32. Faller, B.: *Curr Drug Metab*, 9(9), 886-92 (2008).
33. Sinko, B., et al.: *Chem Biodivers*, 6(11), 1867-74 (2009).
34. Sinko, B., et al.: Eur J Pharm Sci, 45(5), 698-707 (2012).
35. Vizseralek, G., et al.: Eur J Pharm Sci, 76, 165-72 (2015).
36. Balazs, B., et al.: J Pharm Sci, 105(3), 1134-40 (2016).
37. Flaten, G.E., et al.: Eur J Pharm Sci 27(1), 80-90 (2006).
38. Kittayanond, D., Ramachandran, C., Weiner, N.: *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 43(3), 149-160 (1992).
39. Bouwstra, J.A., et al.: *Prog Lipid Res*, 42(1), 1-36 (2003).
40. Groen, D., et al.: *Biochim Biophys Acta*, 1778(10), 2421-9 (2008).
41. Ochalek, M., et al.: Eur J Pharm Biopharm, 81(1), 113-20 (2012).
42. de Jager, M., et al.: *Pharm Res*, 23(5), 951-960 (2006).
43. Ng, S.F., et al.: *Archives of Pharmacol Research*, 35(4), 579-593 (2012).
44. Minghetti, P., et al.: J Pharm Pharmacol, 51(6), 673-678 (1999).
45. Aghazarian, V., et al.: *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(12), 1277-1282 (1999).
46. Olejnik, A., Goscianska, J., Nowak, I.: J Pharm Sci, 101(11), 4032-45 (2012).
47. Benaouda, F., et al.: *Soft Matter*, 9(42), 10165-10173 (2013).

Összehasonlító anxiétásmérés humán megfigyeléssel és EthoVision XT viselkedéselemző szoftverrel emelt labirintus teszten

KONCZ SZABOLCS, GÁLL ZSOLT*, KOLCSÁR MELINDA

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gheorghe Marinescu u., 38, 540139, Marosvásárhely, Románia

*Levelező szerző: gall.zsolt@umftgm.ro

Summary

KONCZ S., GÁLL Z, KOLCSÁR M.: *Measuring anxiety with behavior analysis software and comparing human observations with EthoVision XT in the elevated plus maze paradigm*

Introduction: The reproduction of anxiety in laboratory animals is a renewing problem whenever a new drug is to be tested for its anxiolytic effect. Some gold-standard tests, such as the elevated plus maze test, are always considered to be used as reference. However, many controversial results for different anxiolytics were reported in elevated plus maze test. The analysis methods used by different labs could be the source of variability of the results. Human observations were the most commonly used since the 90's, when behavior analysis software appeared. In each lab, specific procedures for reducing bias in ethopharmacological experiments were implemented, but the performance of human observers was rarely compared to software assisted analysis.

Methods: Four analysts and 24 trials were involved, each analyst having to do all the analyses during which they had to register eight parameters. All trials were also analyzed with the EthoVision XT (Noldus IT, Netherlands).

Results: Several crucial parameters of the elevated plus maze test were significantly different between the analysts ($p < 0.05$). The results registered by human observers were summarized and compared to the results of automatic analysis, which showed significant difference in the case of closed arm entry and total distance ($p < 0.001$).

Conclusions: In this study, it was shown that despite all precautionary measures taken to reduce the variability and bias among observers the results were clearly different from those registered by behavior analysis software. As a conclusion, it can be stated that the behavior analysis methods need some kind of standardization in order to be comparable between labs, preferably the use of the same software and/or settings.

Key-words: anxiety, elevated plus maze, behavior analysis, ethopharmacology.

Összefoglalás

Bevezető: Egy új szer anxiolitikus hatásának bizonyítására, laboratóriumi állatokon a szorongás reprodukálható modellezésére van szükség, ami állandó kihívást jelent. Az emelt labirintus teszt ma is referenciaként használt gold-standard-nak tekinthető. E teszt segítségével vizsgált különböző szorongásoldókkal kapcsolatban sok azonban az ellentmondásos eredmény, amelyek forrásai különböző laboratóriumok eltérő elemzési módszereiben is keresendők. A humán analízisen alapuló szorongásmérések voltak a 90-es évekig a leggyakrabban használtak, amikor aztán a viselkedésmérés elemzésére szoftverek jelentek meg. Az egyes laboratóriumokban speciális eljárásokat vezettek be az etofarmakológiai vizsgálatok hibalehetőségeinek kiküszöbölésére, mégis az emberi megfigyelésen alapuló teljesítmény alig mérhető egy-egy szoftver segítette elemzés teljesítményéhez képest.

Módszerek: Négy humán megfigyelő, egyenként 24 vizsgálatban regisztrált nyolc paramétert elemzett. Minden vizsgálat paramétereit az EthoVision XT (Noldus IT, Hollandia) szoftver segítségével is elemeztük.

Eredmények: Számos esetben, közöttük az emelt labirintus teszt kulcsfontosságú paramétere is, szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) mutattak az egyes elemzők között. A humán megfigyelők által regisztrált eredmények összegzése után összehasonlítottuk azokat a szoftver automatikus analízise során nyert eredményekkel és itt is szignifikáns különbségek ($p < 0,001$) voltak a zárt kari belépések és a megtett táv esetén.

Következtetések: Minden elővigyázatossági intézkedés ellenére, aminek célja a humán megfigyelők okozta hibalehetőségek kizárása volt (egyének közötti variabilitás a szubjektív értékelésben), a személyek által kapott mérések eredményei jelentősen eltértek a viselkedést elemző szoftver eredményeitől. Mindebből az következik, hogy a viselkedéselemzési módszerek kidolgozásánál szükség van valamilyen szabványosításra annak érdekében, hogy a különböző laboratóriumok eredményei összehasonlíthatóak legyenek, azt is beleértve, hogy az egységes értelmezéshez célszerű lenne ugyanazt a szoftvert és ugyanazokat a beállításokat használni.

Kulcs-szavak: szorongás, emelt labirintus, viselkedés elemzés, etofarmakológia.

Bevezetés

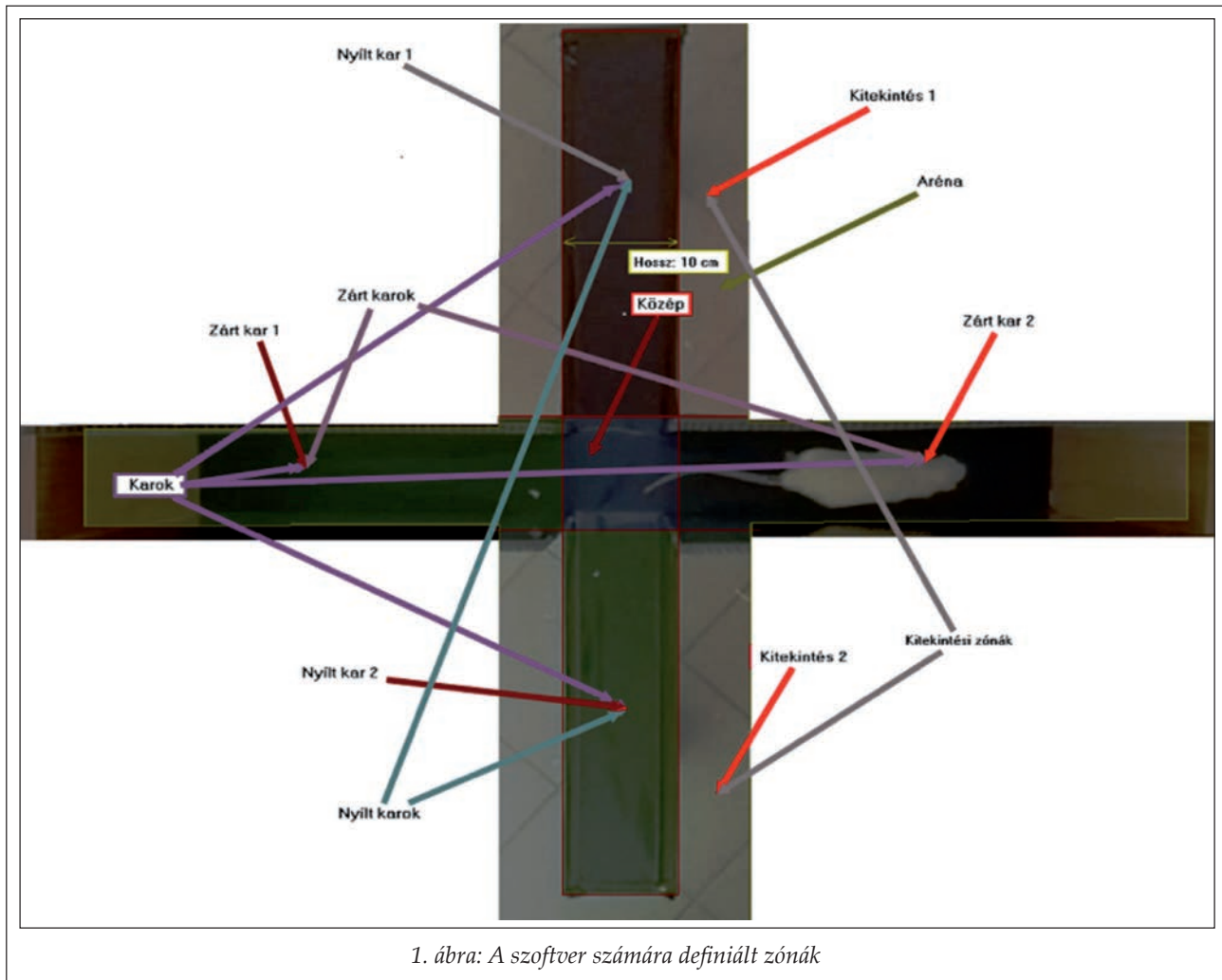
A szorongásos zavar világszerte a gyakori pszichiátriai betegségek közé tartozik és gyakran társul más kórképekkel is [1]. A szorongást oldó vegyü-

tek kutatása számos preklinikai és klinikai kísérlet tárgya, melyek célja a meglévő vegyületekhez képest hatékonyabb és kedvezőbb mellékhatásprofilal rendelkező szerek kifejlesztése [2]. A preklinikai fázisban nagyobb számú hatóanyag

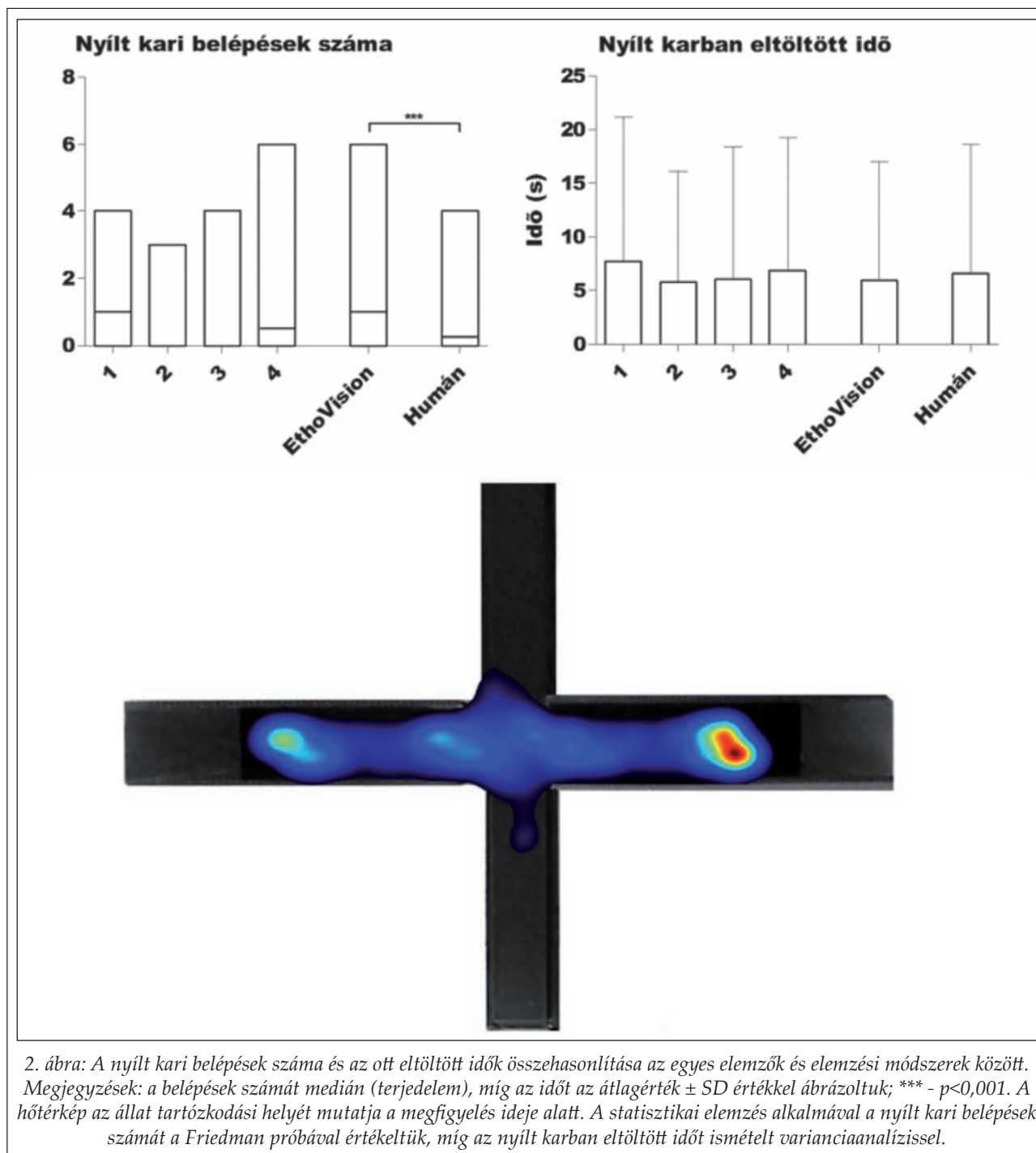
kerül kipróbálásra, amely során következtetni lehet az adott vegyület hatásosságára az emberi szervezetben is. Ehhez elengedhetetlen a szorongásos zavar állatkísérletben való oly mértékű reprodukálása, amely a lehető legközelebb áll az emberi szorongásos állapothoz. Számos módszer közül a leggyakrabban használt az emelt kereszt-paló teszt (EPM) [2–4], amely a benzodiazepinek (BZD) és BZD-receptoron ható szerek anxiétással kapcsolatos hatásainak felmérésére a legalkalmasabb [5]. Az apparátus a földtől megemelt két zárt és két nyílt karból áll, amelyet egy középső rész köt össze. A rágcsálók természetes viselkedésüknek megfelelően elkerülik a magas és nyílt helyeket, s a labirintus zárt részét részesítik előnyben, így a kísérleti állat viselkedését a tesztkörnyezetben a terep felderítésének motiváló ereje és a világos, nyitott területek iránti averzió konfliktusa határozza meg. Egy szorongásoldó hatóanyag alkalmazása esetén az állat explorációs tevékenysége a nyílt karon megnövekszik, illetve a magasság ellenére kitekintést is végezhet. A protokoll alapján

egy hatóanyag anxiolitikumnak tekinthető, amennyiben növeli az állat nyílt-kari preferenciáját [5, 6]. A nyílt kari aktivitáson kívül a teljes lokomotor aktivitásfokozódás és bizonyos testtartási formák képesek egy-egy szernek anti-anxiogén jellegét kiemelni [9,10].

Az állat viselkedésének kvantifikálása megtörténhet humán megfigyelésen alapuló elemzéssel és viselkedéselemző szoftverekkel ill. különböző hardverek segítségével is [7, 8, 11]. A viselkedéselemző szoftverek különböző képfeldolgozási algoritmusokat használnak és a kapott eredményeket egy idő-tér koordináta rendszerré alakítják. A nyers adatbázisból számos helyváltoztatással, testtartással és elhelyezkedéssel kapcsolatos viselkedésforma azonosítható és kiszámítható, így kijelenthető, hogy a szoftveres elemzés nyújtja a legtöbb információt időegység alatt. Az elemzés lebonyolítható valós időben vagy utólag is, ami tovább egyszerűsíti a kísérletek kivitelezését, csökkenti a szükséges megfigyelők számát. Ha az elemzés humán megfigyelőkkel történik, főleg a teljes loko-



1. ábra: A szoftver számára definiált zónák

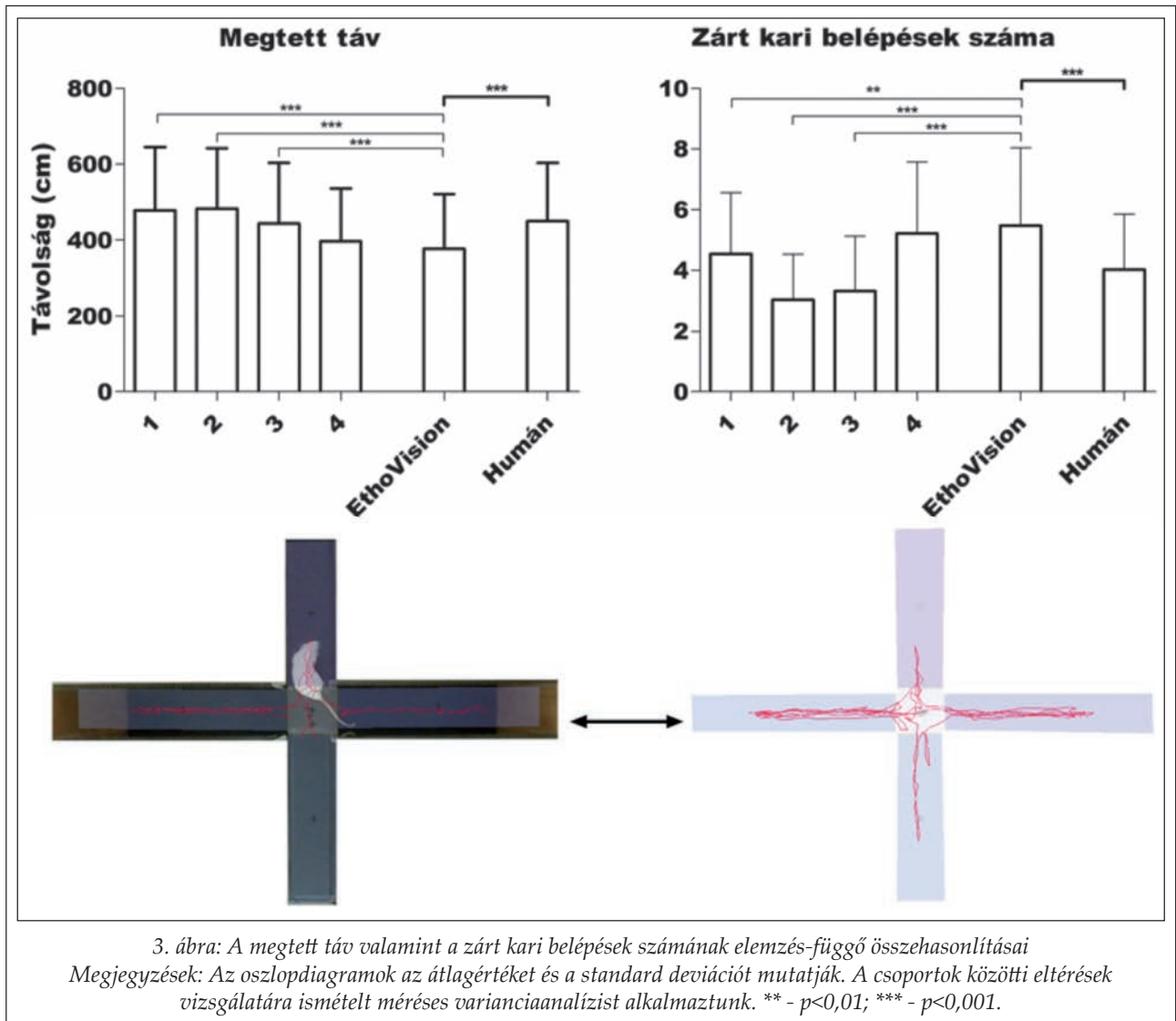


motor aktivitás felmérését (méretarányos számítás) vagy egyes testtartási formákat illetően, jelentős szubjektív eltérésekre lehet számítani (megtett táv mérés, kíváncsiskodó kitekintések, stb.). Bizonyos szerek (pl. antiepileptikumok) esetén különböző szorongás-teszteket használva eltérő eredményekhez jutottak a kutatók [12], amelynek akár a kiértékelés is lehet az oka. Ezért célkitűzéseink: a szorongásvizsgálatok eredményeinek objektív megítélése, felmérve a humán megfigyelésből és

az automata elemzésből származó adatok pontosságát; az etogram egyes elemeinek helyes korrelálása az indukált szorongással.

Kísérleti rész

A kísérletben huszonnégy felnőtt, hím Wistar patkányt használtunk. Az állatokat a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Biobázisa biztosította. A kísérletek és az állatok eltartása az



etikai bizottság jóváhagyásával, az Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelvei szerint történt. A kísérlet előtt az állatok semmilyen kezelést nem kaptak. A labirintus a földtől 60 cm-es magasságban lévő két zárt (50 cm x 10 cm) és két nyílt (50 cm x 10 cm) karból állt. A zárt karok félig áttetsző és fedetlen falakkal (40 cm) rendelkeztek. A patkányokat az előzőekben már leírt protokoll [5, 6] alapján az emelt labirintus közepére helyeztük szembe az egyik nyílt karral, majd öt percig megfigyelés alatt tartottuk, miközben a tevékenységüket videofelvételre rögzítettük egy digitális videokamerával, melyet a labirintus középpontja fölé helyeztünk.

A humán megfigyeléseket négy elemző végezte, akik a kísérlet végén 24 videofelvételt értékeltek ki, külön-külön. Az értékelés alatt 8 paramétert követtek: a zárt és nyílt karokban, valamint a közép zónában eltöltött idő és belépések száma, a

„kitekintés”-zóna érintések, illetve becslés alapján az állat által megtett távolság. Az automata elemzéseket az EthoVision XT 11 (Noldus Information Technology, Hollandia) viselkedéselemző szoftver segítségével végeztük. Az apparátus különböző részeit (zárt-, nyílt karok, közép-, „kitekintés”-zóna) először definiáltuk a szoftver számára (1. ábra). A detekciós beállítások után a szoftver teljes egészében észlelve az állatot, három pontban határozta meg annak részeit (fej, test, farok). Ezeket a pontokat regisztrálva egy koordináta rendszerben és az adatokat összevetve a definiált zónákkal kiszámolta a különböző részekben eltöltött időt és az ezekben való belépések számát. A megtett távot, az elemző által előzőleg meghatározott méretarányhoz viszonyítva határozta meg. A szoftver segítségével 22 paramétert mértünk, az előbb felsoroltak mellett további mozgással, testtartással és kitekintéssel kapcsolatos viselkedésformákat: se-

besség, mozgás/mozdulatlanság frekvenciája és összideje, nyújtott/normális/összehúzott testtartás kumulatív idejét, a mártó-zónák érintésének latencia idejét és összidejét, az egyes karokból történő kitekintéseket (zárt-nyílt, zárt-közép, közép-nyílt). A humán megfigyelések során kapott eredményeket összehasonlítottuk a szoftver által szolgáltatott adatokkal. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 5 segítségével végeztük és szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ alatti értéket tekintettük.

Eredmények

A nyílt karban eltöltött időt illetően a humán értékelések között egyenként és összehasonlítva azokat a szoftver értékeivel nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés ($p > 0,05$). A nyílt kari belépések száma sem különbözött az egyes elemzők között, viszont azok összesítéséből származó adathalmaz jelentősen eltért a szoftver mérési eredményétől ($p < 0,001$) (2. ábra).

A humán értékelések során kapott adatok az egyes elemzők között statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak viszont a többi 7 paraméter esetében ($p < 0,001$). Ezek a következők voltak: zárt-kari belépések száma, zárt karban eltöltött idő, nyílt-kari belépések száma, közép zónába történő belépések száma, közép zónában eltöltött idő, megtett út hossza és „kitekintés”-zóna érintések száma.

A humán és a szoftver elemzések összehasonlítása során az egyes állatok által megtett táv 3 elemző esetén is jelentősen eltért a szoftver által mért értéktől ($p < 0,001$). Ugyancsak három elemző jutott statisztikailag eltérő eredményre a zárt kari belépések számát tekintve ($p < 0,001$) (3. ábra). A zárt-kari belépések számát és a zárt karban, centrális zónában eltöltött időt valamint a „kitekintés”-zóna érintések számát illetően is két elemző mindig szignifikánsan különböző eredményre jutott az automata értékeléshez képest.

Megbeszélés

Régen a hagyományos elemzések a teremben jelenlevő két megfigyelő pillanatnyi feljegyzésein alapultak [5]. A módszer legkézenfekvőbb hátránya, hogy a későbbiekben nincs lehetőség az értékelések újbóli ellenőrzésére. A kísérletek videofelvételen való rögzítése, nemcsak az ellenőrzéseket tette lehetővé, de az elemzés megbízhatóságát is növelte, a többszöri elemzések kivitelezhetősége által. A papír alapú lejegyzéseket felváltották különböző szoftverek, amelyek segítségével bevezet-

hető volt számos paraméter, ezzel megalapozva a félautomata elemzési módszereket [13]. Ebben még mindig érvényesültek az emberi megfigyelés korlátai, mint a figyelem terjedelme és az egyének közötti eltérések megléte. Ezzel szemben az automata elemzések fejlesztésével és optimalizálásával mindezek kiküszöbölése mellett, a laboratóriumok közötti értékelési különbségek is jelentősen csökkentek. Az automata elemzés alapja és feltétele az állat felismerése a videofelvételen, és végigkövetése az egész kísérlet alatt a szoftver által. Egy elemzésre szánt videofelvétel általában 15-25 képkockát tartalmaz másodpercenként. Mindegyik képkocka több pixelből tevődik össze. A szoftver a képkockákat megvizsgálva, különbséget von pixelenként egy megadott statikus háttérkép (amelyen az apparátus látható, az állat nélkül) és a felvételen megjelenő állat között, melynek a mozgását egy koordináta rendszerben regisztrálja [7,11].

A nyílt karokban eltöltött idő és belépések száma esetében a 4 megfigyelő mérése azonosságot mutatott, szignifikáns különbség nélkül. Ezek a szorongásmérés szempontjából a legfontosabb paraméterek, amelyből a nyílt-kari preferencia is származtatható [14]. A patkányok természetükből adódóan elkerülik az apparátus nyílt részeit [5], és ez a humán megfigyelők értékei is igazolták jelenlegi kísérletünkben. Mivel az állatok a teszt idejének kevesebb, mint 3%-át töltik a nyílt karokon, az itteni tevékenységek mérése egyszerűbbé vált az emberi megfigyelés számára és azonos. Érdeemes azonban kiemelni, hogy a 4 elemző eredményeit összesítve a humán megfigyelések eltérést mutatnak a szoftver által mért értékhez képest. Ez arra utal, hogy egy referenciasíkon való áthaladás (kilépés a nyílt karra) egyáltalán nem egyértelmű az emberi szem számára. Ezt egyesek a négy végtag helyzetével mások az állat képzeletbeli középpontjának áthaladásával mérik, ami lényegesen hozzájárul az elemzők közti variabilitáshoz.

A zárt karok esetén az elemzők értékelése három esetben tért el a szoftver értékeitől. Az állatok explorációs tevékenysége a kísérlet alatt nagyrészt, a közép zónán keresztül, a két zárt karra korlátozódott. Így a regisztrációs hiba lehetősége is megnőtt ezen paraméterek esetén. Egy másik paraméter az állatok aktivitását leíró megtett táv, amelynek mérését kevésbé írják elő a különböző protokollok, mivel a pontos meghatározása megfigyelés alapján nehezen kivitelezhető [2, 5]. Az egyes megfigyelők között a mi kísérletünkben is különbségeket találtunk, amely nagyobb aktivitás esetén akár még számottevőbb lehet. Egyes szerek

az állat mozgással kapcsolatos tevékenységének növelése vagy csökkentése által, szignifikáns különbségeket okozhatnak a nyílt-kari preferencia paraméterében, a kontroll csoporthoz viszonyítva [15]. Ennek a paraméternek az egységes mérése fontos, mivel általa kiküszöbölhető egyes szerek álpozitív vagy álnegatív hatása, amely valójában nem korrelál a szorongásra kifejtett hatásokkal.

A szoftver és humán elemzések során kapott eredmények átlagértékeit statisztikailag összehasonlítva az egyes elemzők értékeihez képest észleltünk lényeges eltéréseket, de a szoftver által mért értékek illeszkednek az összesített mérési tartományba. A nyílt karban eltöltött idő esetében a 4 megfigyelő mérése nem mutatott szignifikáns eltérést a szoftver értékeihez képest. A legnagyobb eltérés a megtett táv esetén volt, amely mérése különböző beállításokkal tovább optimalizálható [16]. Lényeges előnye az automata elemzésnek még, az emberi elemzéssel szemben, hogy minden értékelés alkalmával azonos algoritmus alapján határozza meg ezeket az értékeket, így a nem valószínű különbségek előfordulásának lehetőségét jelentősen csökkenti.

Következtetések

Az anxiatásmérésben az eredmények kiértékelését számos tényező befolyásolhatja, a humán elemzés még a szigorúan meghatározott protokollok esetében is jelentős egyéni eltéréseket mutatva. Ezzel szemben a viselkedést elemző szoftverek, azonos algoritmust követve, pontosabb adatokat szolgáltatnak és a különböző kutatólaboratóriumok eredményeit összehasonlíthatóvá teszik.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Studium-Prospero Alapítvány és a Magyar Tudományos Akadémia pályázata (0347/26.02.2016) finanszírozta.

IRODALOM

1. Goldstein-Piekarski, A.N., Williams, L.M., Humphreys, K.: Transl. Psychiatry. Nature Publishing Group; 6, 847 (2016).
2. Griebel, G., Holmes, A.: Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group; 12, 667–87 (2013).
3. Campos, A.C., Fogaca, M. V., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., et al.: Rev. Bras. Psiquiatr. Associação Brasileira de Psiquiatria (ABP); 35, S101–11 (2013).
4. Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A.: Brazilian J. Med. Biol. Res. 30:289–304 (1997).
5. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M.: J. Neurosci. Methods. 14, 149–67 (1985).
6. Walf, A.A., Frye, C.A.: Nat. Protoc. Nature Publishing Group; 2, 322–8 (2007).
7. Spink, A.J., Tegelenbosch, R.A.J., Buma, M.O.S., Noldus, L.P.J.J.: Physiol. Behav. 73, 731–44 (2001).
8. Pham, J., Cabrera, S.M., Sanchis-Segura, C., Wood, M.A.: Automated scoring of fear-related behavior using EthoVision software. J. Neurosci. Methods. (2009).
9. Weiss, S.M., Wadsworth, G., Fletcher, A., Dourish, C.T.: Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 265–71 (1998).
10. Holmes, A., Parmigiani, S., Ferrari, P.F., Palanza, P., Rodgers, R.J.: Physiol. Behav. 71, 509–16 (2000).
11. Noldus, L.P.J.J., Spink, A.J., Tegelenbosch, R.A.J.: Behav. Res. Methods. Instrum. Comput. 33, 398–414 (2001).
12. Munro, G., Erichsen, H.K., Mirza, N.R.: Neuropharmacology. 53, 609–18 (2007).
13. Telonis, A.G., Margarity, M. Phobos: Neurosci. Lett. Elsevier Ireland Ltd; 599, 81–5 (2015).
14. Cruz, A.P.M., Frei, F., Graeff, F.G.: Pharmacol. Biochem. Behav. 49, 171–6 (1994).
15. Dawson, G.R., Tricklebank, M.D.: Trends Pharmacol. Sci. 16, 33–6 (1995).
16. Detrait, E., Brohez, C., Hanon, E., De Ryck, M.: Proc. Meas. Behav., 141–4. (2010).

A *Prunus spinosa* L. termés fenolos komponenseinek vizsgálata és antioxidáns hatása

*VARGA ERZSÉBET¹, DOMOKOS ERZSÉBET², FOGARASI ERZSÉBET³, ȘTEFĂNESU RUXANDRA¹, FÜLÖP IBOLYA³, CROITORU MIRCEA DUMITRU³, LACZKÓ-ZÖLD ESZTER¹

¹Farmakognózia és fitoterápia tanszék, Gyógyszerészeti Kar, Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, 540139 Țirgu Mureș, Gh. Marinescu 38

²Gyógyszerészeti botanika tanszék, Gyógyszerészeti Kar, Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, 540139 Țirgu Mureș, Gh. Marinescu 38

³Toxicológia és biofarmácia tanszék, Gyógyszerészeti Kar, Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, 540139 Țirgu Mureș, Gh. Marinescu 38

*Levelező szerző: e-mail: erzsebet.varga@umftgm.ro

Summary

VARGA, E., DOMOKOS, E., FOGARASI, E., ȘTEFĂNESU, R., FÜLÖP, I., CROITORU, M. D., LACZKÓ-ZÖLD, E.: **Polyphenolic compounds analysis and antioxidant activity in fruits of *Prunus spinosa* L.**

Introduction: *Prunus spinosa* L. (blackthorn, sloe) is a common species in the wild flora of Europe. Marmalade, syrup, and alcoholic beverages have been prepared from fruits. In folk medicine they are used due to the astringent effect. However there are few studies on these indigenous fruits. According to the literature they contain tannins, anthocyanins, sugars, vitamin C etc.

Methods: Our objective is to determine the antioxidant activity as related to their phenolic composition. For this purpose we prepared extracts using methanol, methanol-water (1: 1) and water. The antioxidant activity was determined by DPPH method and by photochemiluminescens (PCL) method. The total polyphenols, total anthocyanins and flavonoids were determined by colorimetric methods. Individual polyphenols were identified by a RP-HPLC-UV/VIS method.

Results: The antioxidant activity decreased in the extracts as follows: methanol > methanol-water > water ($IC_{50} = 1.33$ mg/ml for DPPH; $11.94 \mu\text{mol AAE/ml}$ for PCL > $IC_{50} = 1.87$ mg/ml for DPPH; $10.35 \mu\text{mol AAE/ml}$ for PCL > $IC_{50} = 15.29$ mg/ml for DPPH, $1.89 \mu\text{mol AAE/ml}$ for PCL) which is correlated with the total polyphenol content ($369 \text{ mg/100g} > 244 \text{ mg/100g} > 101 \text{ mg/100g}$) and total anthocyanin content ($37.11 \text{ mg/100 g} > 16.33 \text{ mg/100g} > 7.76 \text{ mg/100g}$). The flavonoid content is similar in the three extracts (between $35.82 - 37.32 \text{ mg/100 g}$). The HPLC analysis shows high chlorogenic and neochlorogenic acid levels, followed by glycosides of quercetin.

Conclusions: Our results demonstrated that blackthorn fruits are a rich source of phenolic compounds, with antioxidant activity, which are best extracted with methanol or methanol-water.

Key-words: *Prunus spinosa* L., polyphenols, antioxidant activity

Összefoglaló

Bevezetés: *Prunus spinosa* L. (kökény) Európa flórájában honos, igen elterjedt faj. Terméséből ízet, szirupot és kökénypálinkát készítenek. A népgyógyászatban asztringens hatásáért alkalmazzák. Kevés kutatás foglalkozik a hazai kökényterméssel. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy hatóanyagai a cserzőanyagok, az antociánok, cukrok, a C vitamin és más tartalmi anyagok.

Módszerek: Célunk meghatározni az antioxidáns kapacitást és annak összefüggését a fenolos vegyületekkel. Ennek érdekében metanolos, metanol-vizes (1: 1) és vizes kivonatokat készítettünk. Az antioxidáns kapacitást DPPH módszerrel és fotokemilumineszcencián alapuló módszerrel (PCL) határoztuk meg. Kolorimetriás módszert használtunk az összpolicenol-antocián és -flavonoid tartalom meghatározására. A polifenolos komponensek azonosítására az RP-HPLC-UV/VIS módszert alkalmaztuk.

Eredmények: Az antioxidáns kapacitás a kivonatokban a következőképpen csökken: metanol > metanol-víz > víz ($IC_{50} = 1,33 \text{ mg/ml}$ a DPPH-nál; $11,94 \mu\text{mol AAE/ml}$ a PCL-nél > $IC_{50} = 1,87 \text{ mg/ml}$ a DPPH; $10,35 \mu\text{mol AAE/ml}$ a PCL-nél > $IC_{50} = 15,29 \text{ mg/ml}$ DPPH-nál, $1,89 \mu\text{mol AAE/ml}$ a PCL-nél) ami összefüggésben van az összpolicenol ($369 \text{ mg/100g} > 244 \text{ mg/100g} > 101 \text{ mg/100g}$) és összantocián tartalommal ($37,11 \text{ mg/100 g} > 16,33 \text{ mg/100g} > 7,76 \text{ mg/100g}$). A flavonoid tartalom megközelítőleg ugyanazon koncentrációkat mutatja mindhárom kivonatban ($35,82 - 37,32 \text{ mg/100 g}$ közötti értékek). A HPLC analízis magas klorogénsav és neoklorogénsav tartalmat mutat, valamint jelentős mennyiségben kvercetin glikozidokat.

Következtetések: Vizsgálataink bizonyítják, hogy a kökénytermés antioxidáns hatású polifenolokban gazdag, ezek lehathatókonyabb kivonása metanol és metanol-víz elegyével érhető el.

Kulcsszavak: *Prunus spinosa* L., polifenolok, antioxidáns kapacitás.

Bevezető

A *Prunus spinosa* L. (kökény) napsütötte domboldalokon, köves sziklás helyeken, útszéleken, kaszálókon, legelőkön, erdőirtásokban és erdők szélén igen elterjedt a Rosaceae családba tartozó igénytelen faj [1]. 1-2 m magasságra is megnövő cserje, március és áprilisban nyíló hófehér virágokkal. Sötétkék termése 1-1,5 cm átmérőjű, hamvas felületű, késő őszig az ágakon marad [2].

A Kárpát-medence egész területén honos, igen elterjedt faj [1, 3]. Drogként a virágot – *Pruni spinosae flos* – és a termést – *Pruni spinosae fructus* – gyűjtik [4].

A virágok enyhe hashajtó hatásúak, vizelethajtó és vértisztító teák összetételében szerepelnek [4, 5]. Vérnyomáscsökkentőként is használják a népgyógyászatban [3]. A virágok flavonoidokat: kempferol- és kvercetin glikozidokat tartalmaznak [6, 7].

Terméséből készítik a fanyar ízű kökénypálinkát. A gyógyászatban fogínyecsetelésre, valamint szirupnak elkészítve hashajtóként alkalmazzák [4]. Kémiai összetételére jellemző vegyületek a polifenolos anyagok: cserzőanyag, szerves savak, flavonoidok, antociánok [4].

Guimaraes és munkatársai a Portugáliában gyűjtött kökénytermést HPLC-DAD-ESI/MS-sel vizsgálva 21 fenolsavat és flavonoidot azonosítottak: fő komponensként klorogénsavat írtak le, valamint több kvercetin flavonglikozidot. Ezen kívül 8 antocián vegyületet azonosítottak: cianidin és peonidin glikozidokat [8]. *Barros* és munkatársai vizsgálták a liofilizált kökénytermés fitokémiai összetételét és antioxidáns aktivitását. 20 zsírsavat azonosítottak, fő komponens az oleinsav; mérték a tokoferol (9,25 mg/100 g), aszkorbinsav (15,6 mg/100 g), polifenol (83 mg/g) és flavonoid (8,63 mg/g) tartalmat [9]. *Pinacho* és munkatársai a kökény termések, ágak és levelek fenolos vegyületeit vizsgálták diklórmetános, etil acetátos, etanolos és vizes kivonatokból. Mérték a kivonatok antioxidáns kapacitását, összpolicifenol, flavonoid és antocián tartalmát. A fenolos komponensek HPLC-MS/MS azonosítását csak az ágakból nyert etanolos kivonatból végezték [10]. *Marakoglu* és munkatársai a törökországi Konya vidék kökényállományát mérték fel, értékelték a termés ásványi anyag tartalmát. Fő ásványi elemként Al, B, Ca, K, Mg, Na, P és S-t írtak le [11].

Korábbi munkánk során a kökénytermések VRK analizésénél klorogénsav és rutin jelenlétét mutattuk ki, valamint meghatároztuk a C-vitamin tartalmát (30 mg/100 g drog) [12]. Romániai kuta-

tócsoportok közül *Ursache* és munkatársai a kökénytermés antocián összetételének hő hatására történő változását tanulmányozták [13].

Munkánk során a Romániában gyűjtött kökénytermések (*Pruni spinosae fructus*) antioxidáns hatású komponenseinek minőségi és mennyiségi vizsgálatát végeztük. A mélyhűtött termésekből metanollal, metanol-víz elegyével (1:1 arányban) és vízzel készített kivonatokot vizsgáltuk. Meghatároztuk ezek összpolicifenol, flavonoid és antocián tartalmát, valamint antioxidáns hatását DPPH és PCL módszerekkel. Az egyes komponensek azonosítására és kvantifikálására RP-HPLC-UV/VIS módszert dolgoztunk ki.

Anyag és módszer

Vizsgálati anyag

A *Pruni spinosae fructus* Marossárpatak községben (Glodeni: Maros megye, Románia) előforduló természetes állományból gyűjtöttük, 2015 októberében. A begyűjtött mintákat feldolgozásig mélyhűtőben tároltuk -20 °C-on. Meghatározásainkat három párhuzamos mérésből végeztük.

Anyagok

A következő referencia anyagokat használtuk méréseinkhez: cianidin-3-glukozid, delfinidin klorid, malvidin-3-glukozid klorid (oenin klorid), pelargonidin klorid, klorogénsav, kávésav, neoklorogénsav (3-kávékínsav), kvercetin-3-ramnozid (kvercitrin), kvercetin 3-O-glukóz-6''-acetát, kaempferol-3-glukozid, kvercetin-3-glukóz (izokvercitrin), kvercetin-3-galaktozid (hiperozid), kvercetin-3-rutozid (rutin), vitexin és vitexin-2-O-ramnozid a Roth-tól (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Németország). A DPPH reagens (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) és az aszkorbinsav a Sigma-Aldrich-től (Steinheim, Németország) származnak. A kivonásokhoz és VRK-hoz használt oldószereket a Merck-től (Darmstadt, Németország) vásároltuk. A kétszeresen desztillált és tisztított vizet Direct-Q system-mel nyertük (Millipore, Bedford, AEÁ). Az összpolicifenol tartalom meghatározáshoz Folin-Ciocalteu reagenst (Scharlau, Spanyolország), a nátrium karbonátot (Alfa Aesar, Karlsruhe, Németország), a galluszsavat (Sigma-Aldrich) használtuk. Az összflavonoid tartalom meghatározáshoz a következő anyagokat használtuk: alumínium hexahidrát klorid (Chimopar, Románia) és nátrium acetát (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Né-

metország). Az összantocián tartalomhoz sósavat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Németország) és a metanolt (Merck) használtunk.

A kemilumineszcenciás módszerhez a szükséges reagenseket a gyártótól rendelhető kitta tartalmazza (ACW kit, Analytic Jena, Németország).

A HPLC elválasztás Nucleodur C 18 (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) oszlopon történt.

Extrakció

A kivonatokat metanollal, metanol-víz (1:1) és vízzel készítettük. A gyümölcsöket (5 g) mozsárban eldörzsöltük és 50 ml oldószerrel kivonatoltuk 25 °C-on, 30 perces ultrahangos rázatással. Szűrés után 50 ml-es törzsoldatot készítettünk, melyet ampullákban elosztva mélyhűtőben tároltunk a további mérésekig. A HPLC vizsgálat előtt nylon membrán szűrőn (0,2 µm, VWR International) átszűrtük a mintát.

Összpolifenol tartalom meghatározása

Folin-Ciocalteu módszerrel dolgoztunk [14]. 40 µl előbb elkészített mintához 3,16 ml desztillált vizet és 200 µl Folin-Ciocalteu reagenst adtunk, jól összekevertük, 5 perc után 600 µl nátrium karbonátot (20% w/v) adtunk hozzá. Az így összekevert oldatok 2 órát szobahőmérsékleten (20 °C) álltak és vakkal (víz és reagens) szemben 765 nm-en leolvastuk az abszorbanciát. Az eredményeket mg galluszsav ekvivalensben 100 g fagyasztott gyümölcsre határoztuk meg [14].

Összflavonoid tartalom meghatározása

A kivonatok összflavonoid tartalmát kolorimetriás módszerrel határoztuk meg. 500 µl kivonathoz 1 ml nátrium acetátot (10% w/v), 600 µl AlCl₃-ot (2,5%, w/v), 1,4 ml metanolt és 1,5 ml vizet adtunk. Az oldatokat jól összekevertük és 15 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten (20 °C), majd 430 nm-en leolvastuk az abszorbanciát vakkal szemben (kivonat+metanol+víz). Az eredményeket mg kvercetin ekvivalensben fejeztük ki 100 g fagyasztott gyümölcsre vonatkoztatva [10, 15, 16].

Összantocián tartalom meghatározása

Az antocián tartalmat az Európai Gyógyszerkönyv 7. kiadásában hivatalos kolorimetriás módszerrel végeztük [15]. A kivonatokból tömény sósav metanollal készített 0,1% (V/V) töménységű ol-

datával ötszörös hígítást készítettünk. Az oldatok abszorbanciáját 528 nm-en határoztuk meg, kompenzáló folyadékként tömény sósav metanollal készített 0,1% (V/V) töménységű oldatát használtuk. Az eredményeket mg cianidin-3-glükozid-kloridban fejeztük ki 100 g fagyasztott gyümölcsre vonatkoztatva [15].

Antioxidáns kapacitás meghatározása DPPH módszerrel

A minták szabadgyökfogó képességét Brand-Williams és munkatársai módosított módszerrel mértük [17]. DPPH reagens 1 mM-os metanolos oldatát frissen hígítottuk 0,1 mM-ra. Az így kapott oldat abszorbanciáját 0,650 ± 0,020-re állítottuk be 517 nm-en. 200 µL mintát vagy standardot összekevertünk 2800 µL DPPH oldattal, erélyes összerázást követően 6 perc után mértük az abszorbanciát 517 nm-en. A vak oldat ugyanazt a DPPH mennyiséget tartalmazta és 200 µL metanolt. A DPPH %-os inhibícióját a következőképpen számoltuk ki:

$$\text{inhibíció \%} = (A_v - A_m / A_v) \times 100$$

Ahol az A_v a vak abszorbanciája, az A_m a minta abszorbanciája. Pozitív kontrollként aszkorbinsavat használtuk és minden mérést három párhuzamosból végeztünk. Kiszámoltuk az IC₅₀-et, ez azt az antioxidáns koncentrációt (kivonat) jelöli, amely a DPPH gyök mennyiségének 50%-os csökkenéséhez szükséges [17, 18].

Antioxidáns kapacitás meghatározása kemilumineszcenciás (PCL) módszerrel

A *Prunus spinosa* kivonatok szuperoxid anion szabadgyök felfogó képességének vizsgálatára fotokemilumineszcencián alapuló módszert (PCL) alkalmaztunk, Photochem® készüléket használva (Analytic Jena, Németország). Ez a módszer magába foglalja a szuperoxid anion keletkezését egy fényérzékeny anyagból UV fény hatására, valamint ezen szabadgyök meghatározását egy kemilumineszcenciás módszerrel. A próbák vízoldható antioxidáns kapacitásának (ACW, Water soluble Antioxidant Capacity) kiszámítását a PCL szoftver automatikusan végzi a vak illetve a kalibrációs oldatok (aszkorbinsav) esetén mért szabadgyök felfogó képesség összefüggéséből. A munkaoldatok elkészítése a gyártó által előírt munkamenet alapján történtek [20, 21]. A lumineszcencia változását 4 percen át követtük. Minden mérést háromszoros ismétlésben végeztünk. Az eredményeket µmol aszkorbinsav/ml kivonatra adtuk meg [19, 20, 21, 22].

RP-HPLC-UV/VIS módszer

Statisztikai elemzés

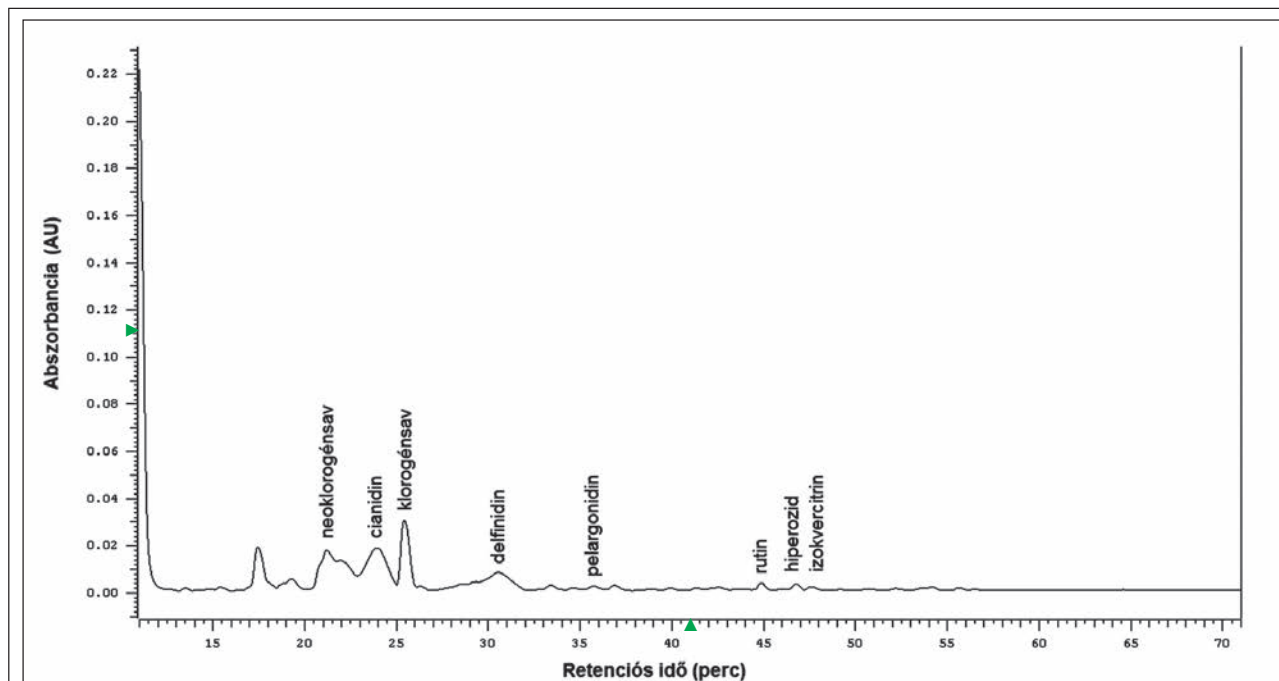
A termések metanolos kivonatait nagyhatékony-ságú folyadékkromatográfiás technikával vizsgáltuk meg. Az antociánok stabilitása érdekében tömény HCl-t adtunk a kivonathoz, 2%-os arányban [23]. A kromatográfiás rendszer Merck Hitachi L-7100 pumpából, Merck Hitachi L-7612 gázmentesítőből, Merck Hitachi L-7200 automata injektorból és Merck Hitachi L-7455 DAD detektorból állt. Az elválasztásokat fordított fázisú analitikai oszlopon (Nucleodur C 18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm) végeztük, gradiens elúcióval (foszfát puffer pH=2,5 95→76% és acetonitril 5→24%). Az eluens áramlási sebessége 0,55 ml/perc. A komponensek detektálását 280 nm (fenolkarbonsavak), 370 nm (flavonoid glikozidok) és 520 nm (antociánok) hullámhosszokon végeztük. A beinjektált minták térfogata 100 µl, mérés időtartama 90 perc. Méréseinket 3 párhuzamos injektálással végeztük [24, 25, 26, 27].

Az eredményeket három meghatározás átlagaként ± SD adtuk meg. IC₅₀ -et a DPPH módszerrel a GraphPad Prism5 software-rel számoltuk.

Eredmények

A mélyhűtött kökénytermésekből metanollal, metanol-víz 1:1 arányú elegyével és vízzel kivonatot készítettünk. Megmértük összpolicenol, flavonoid és antocián tartalmukat. Az eredmények azt bizonyítják, hogy a polifenolok és antociánok kivonása leghatékonyabban metanollal érhető el, ezt követi a metanol-víz (1:1) és legkevésbé hatékony a vizes kivonás (*I. táblázat*). Flavonoidok esetén nem találtunk jelentős különbséget az alkalmazott kivonószerek hatékonyságában (*I. táblázat*).

A kivonatok antioxidáns aktivitásának mérésére két módszert alkalmaztunk: DPPH szabadgyök megkötést és fotokemilumineszcencián alapuló



1. ábra: A *Pruni spinosae fructus* metanolos kivonatának HPLC kromatogramja 280 nm-en

I. táblázat

Pruni spinosae fructus tartalmi anyagai

Kivonat	Összpolicenol tartalom mg GSE /100 g fgy	Összantocián tartalom mg CGE /100g fgy	Összflavonoid tartalom mg KE /100 g fgy
Metanol	369 ± 66	37,11 ± 6,45	37,32 ± 9,32
Metanol-víz 1:1	244 ± 7,6	16,33 ± 3,91	35,82 ± 4,66
Víz	101 ± 6,7	7,76 ± 1,57	36,06 ± 3,81

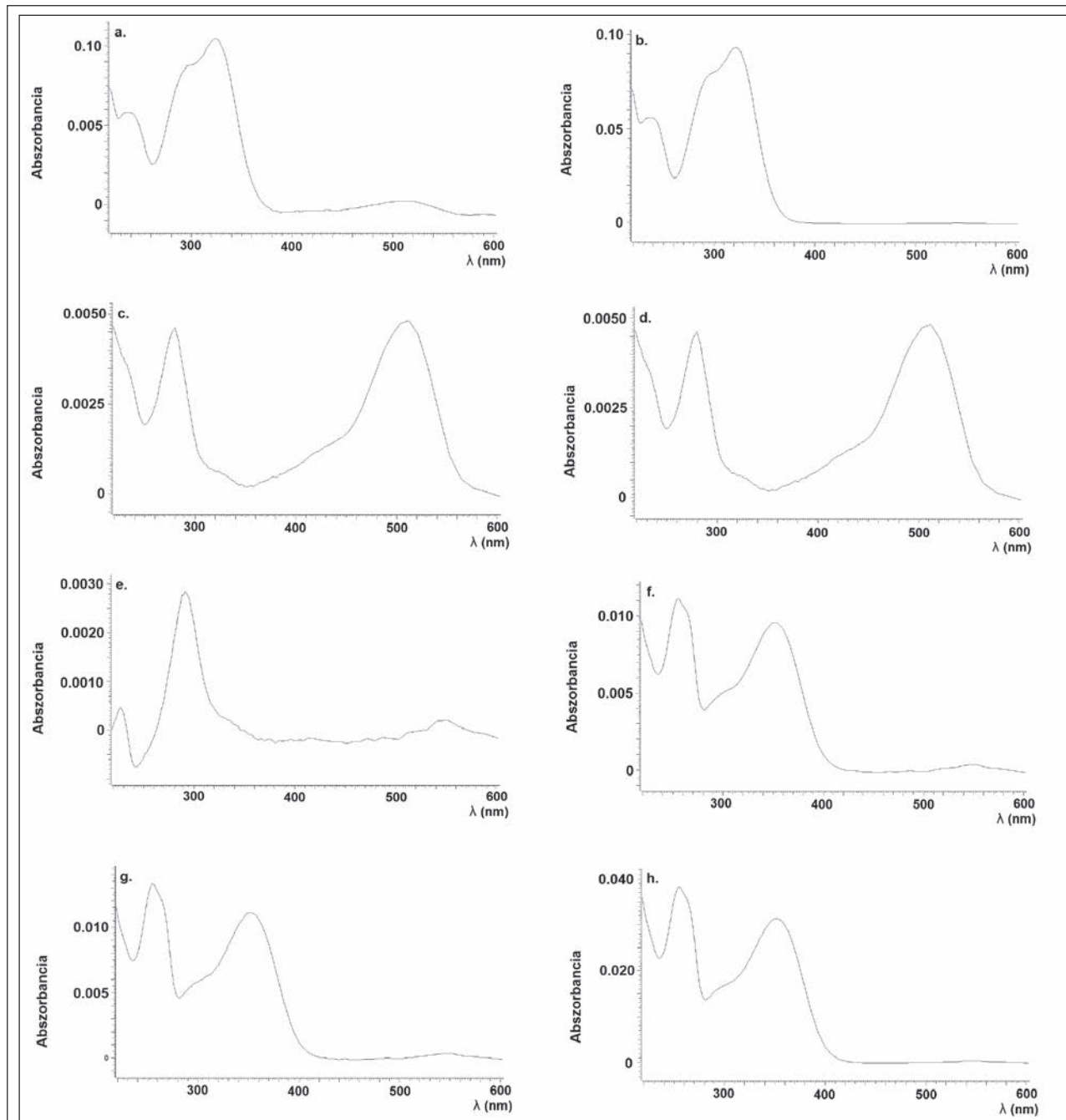
Megi.: Az eredmények 3 mérés átlaga ± SD. GSE – galluszsav ekvivalens, CGE – cianidin-3-glükozid ekvivalens, KE – kvercetin ekvivalens, Fgy – fagyasztott gyümölcs.

PCL módszert. A DPPH módszernél IC_{50} értékeket számoltunk, pozitív kontrollként pedig aszkorbinsavat használtunk ($IC_{50} = 0,0091$ mM). A DPPH gyökmegkötő kapacitás a magas polifenol és antocián tartalmú metanolos és metanol-vizes kivonatokban lényegesen jobbnak bizonyult, mint a vizes kivonatokban (*II. táblázat*).

A PCL módszernél az eredményeket μ mol aszkorbinsav ekvivalensben fejeztük ki. Ez esetben is a metanol és a metanol-víz elegyével készített ki-

vonat mutat erősebb antioxidáns aktivitást (*II. táblázat*). Az alacsony polifenol és antocián tartalmú vizes kivonatot gyenge antioxidáns aktivitás jellemzi.

A köménytermésben található polifenolos vegyületek azonosítására RP-HPLC-DAD módszert dolgoztunk ki. Metanolos kivonatot vizsgáltunk. Az egyes komponensek azonosítása referencia anyagokkal való összehasonlítás alapján történt (retenciós idő, UV-VIS spektrum) (*1. és 2. ábra*).



2. ábra: Referencia anyagok abszorpciós spektrumai: a = neoklorogénsav, b = klorogénsav, c = cianidin, d = delfinidin, e = pelargonidin, f = rutin, g = hiperozid, h = izokvercitrin

II. táblázat

Pruni spinosae fructus antioxidáns kapacitása

Kivonat	DPPH	PCL
	IC ₅₀ mg/ml	μmol AAE/ml
Metanol	1,339 ± 0,23	11,94 ± 0,84
Metanol-víz 1:1	1,873 ± 0,03	10,35 ± 1,09
Víz	15,295 ± 2,79	1,89 ± 0,35

Megj.: AAE – aszkorbinsav ekvivalens

III. táblázat

A Pruni spinosae fructus metanolos kivonatában azonosított komponensek

	Polifenolok	Retenciósi idő (perc)	Koncentráció (μg/g fgy)
1	Neoklorogénsav	21,21	142,68
2	Cianidin-3-O-glükóz	23,92	40,72
3	Klorogénsav	25,45	270,16
4	Delfinidin	30,55	33,14
5	Pelargonidin	35,72	14,61
6	Rutin (kvercetin-3-ramnosilglükózid)	44,86	37,64
7	Hiperozid (kvercetin-3-O-galaktozid)	46,77	39,05
8	Izokvercitrin (kvercetin-3-O-glükózid)	47,54	43,41

Megj.: fgy – fagyasztott gyümölcs

Mennyiségi meghatározáshoz a referencia anyagokkal 5 pontos kalibrációs egyenest készítettünk, az egyenes egyenletével számoltuk ki a koncentrációkat (III.táblázat).

A RP-HPLC vizsgálat során fő komponensként klorogénsavat azonosítottunk, ez összhangban van egyes irodalmi forrásokkal [8]. Ezen kívül jelentős mennyiségű neoklorogénsavat mutattunk ki; egy Szerbiában végzett mérés szerint ez a fő fenolos anyag [28]. Antocián vegyületek közül három komponenst sikerült azonosítani, mennyiségileg a cianidin-3-O-glükóz dominál. A flavonoidok tekintetében eredményeink részben összhangban vannak az irodalmi adatokkal, ugyanis a kvercetin glikozidjait találtuk. A portugál mérések szerint a flavonoid elegy felét rutin teszi ki [8]. Az általunk vizsgált termékekben közel egyforma arányban található rutin, hiperozid és izokvercitrin. Erre valószínűleg a földrajzi elhelyezkedésből adódó eltérő pedoklimatikus tényezők jelentik a magyarázatot.

Következtetések

Eredményeink egyértelműen igazolják a kökénytermés metanolos és metanol-vizes kivonatainak antioxidáns hatását DPPH és PCL módszerekkel, valamint ezeknek az összpolidenol és antocián tartalommal való összefüggését. A metanolos kivonat HPLC vizsgálata során nagy mennyiségű klorogénsavat (270,16 μg/g) és neoklorogénsavat (142,68 μg/g) mutattunk ki, valamint három kvercetin glikozidot (ezek együtt 120 μg/g).

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki a Magyar Tudományos Akadémia és a Studium Prospero Alapítványnak (0350/26.02.2016) az anyagi támogatásért.

IRODALOM

1. Ciocarlan V.: Flora ilustrată a României, Editura Ceres, București, 2000. 346.old.
2. ***Flora Republicii Populare Romîne, vol. IV. Editura Academiei Republicii Populare Romîne, București, 1956, 835-847 old.
3. Bernáth J.: Gyógy-és aromanövények, Mezőgazda, Budapest, 2000, 486 old.
4. Szabó L. Gy.: Gyógynövény-ismereti tájékoztató, Schmidt und Co, Baksa-pécs, 2005, 232.old.
5. Pârva C.: Enciclopedia plantelor, vol.IV, Editura Tehnică, București, 2005, 135-137 old.
6. Olszewska M., Wolbis M.: Acta Pol. Pharm. 58, 367-372 (2001).
7. Rácz G., Rácz-Kotilla E., Szabó L. Gy.: Gyógynövények ismerete, Galenus, Budapest, 2012, 345. old.
8. Guimaraes R., Barros L., Duenas M., Carvalho A. M., Queiroz M. J., Santos-Buelga C., Ferreira I. C. F. R.: Food Chemistry 141, 3721-3730 (2013).
9. Barros L., Carvalho A.M., Morias J. S., Ferreira I. C.F.R.: Food Chemistry 120, 247-254 (2010).
10. Pinacho R., Cervero R.Y., Astiasaran I., Ansorena D., Calvo M. I.: Journal of Functional Foods 19, 49-62 (2015).
11. Marakoglu T., Arslan D., Özcan M., Haciseferogullari H.: J. Food Eng., 68, 137-142 (2005).
12. Varga E., Horváth Gy., Bencsik T., Orbán Zs. K.: Gyógyszerészet 58(4), Suppl.I, S90 (2014).
13. Ursache F.M., Stănciuc N., Botez E., Nistor O.: J Biotechnology, 208, S 70, (2015).
14. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M.: Methods Enzymol. 299, 152-179 (1999).

15. ***Pharmacopoea Hungarica, VIII.kiadás, II.kötet, Medicina, Budapest, 2004.
16. *da Silva L. A. L., Pezzini B. R., Soares L.*: Pharmacog. Mag. 11(41), 96-101 (2015).
17. *Brand-Williams W., Cuvelier M., E., Berset C.*: LWT Food Sci. Technol. 28, 25-30 (1995).
18. *Floegel A., Kim D.O., Chung S.J., Koo S. I., Chun O. K.*: Journal of Food Composition and Analysis 24, 1043-1048 (2011).
19. *Balogh E.*: Antioxidáns kapacitás meghatározása és ennek kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata bogycs gyümölcsök esetében, Doktori értekezés, Budapest, Corvinus egyetem, 2010, 36. old.
20. <https://www.analytik-jena.de/en/analytical-instrumentation/products/antioxidants.html>
21. ***Protocol for the Determination of Antioxidative Capacity of water soluble compounds (ACW) with PHOTOCHEM®, code number: ACW-Kit, 2007.
22. *Govindarajan R., Vijayakumar M., Rao Ch.V., Shirwaikar A., Rawat A.J.S., Mehrotra Sh., Pushpangadan P.*: Biol. Pharm. Bull. 27(8), 1266-1269 (2004).
23. *Farahmandazad H.*: Recovery and purification of anthocyanins from purple-blue potato, Master's thesis, Lappeenranta University of Technology, 2015, 1-81
24. *Pyrzynska K., Sentkowska A.*: Critical Reviews in Analytical Chemistry, 45, 41-51 (2015).
25. *Ying X., Wang R., Xu J.*: Journal of Chromatographic Science, 47, March (2009)
26. *Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C.*: Analytica Chimica Acta 512, 271-280 (2004).
27. *Kumar N., Bhandari P., Singh B., Gupta A.P., Kaul V.K.*: J. Sep. Sci. 31, 262 - 267 (2008).
28. *Velickovic J. M., Kostic D. A., Stojanovic G. S., Mitic S. S., Mitic M., N., Randelovic S. S., Dordevic A. S.*: Hem. Ind. 68(3), 297-303 (2014).

Érkezett: 2017. március 8.

Önemulgeáló hatóanyag-felszabadító rendszerek, mikroemulziók és nanoemulziók formulálási lehetőségei

JAKAB GÉZA, FÜLÖP VIKTOR, SÁNTHA KONRÁD, SZERŐCZEI DEBÓRA, BALOGH EMESE, ANTAL ISTVÁN*

Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet, 1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 7.

*Email: antal.istvan@pharma.semmelweis-univ.hu

Summary

JAKAB G., FÜLÖP V., SÁNTHA K., SZERŐCZEI D., BALOGH E., ANTAL I.: **Formulation possibilities of self-emulsifying drug delivery systems, microemulsions and nanoemulsions**

Objective

The aim of this review is to introduce the self-emulsifying drug delivery systems which can be used to improved the bioavailability of poorly water soluble drug substances.

Methods

The review summarizes the most prominent results of the lipid based medicinal preparations, such as microemulsions and nanoemulsions developed in the last two decades.

Results

The analysis of the references details the lipid based formulation classification systems, the most common excipients, the quality attributes depending on the ingredients, as well as the differences in the characteristics of micro- and nanoemulsions.

Conclusions

The summary demonstrates the formulation possibilities of self-emulsifying drug delivery systems, which may increase the applicability and are promising to improve the therapeutic effectiveness.

Keywords:

poorly water soluble drugs, lipid based formulations, self-emulsification, colloidal drug carriers

Összefoglalás

Célkitűzés

Az áttekintés célja a vízben rosszul oldódó hatóanyagok per os biológiai hasznosíthatóságának növelése érdekében alkalmazható önemulgeáló gyógyszerhordozó rendszerek bemutatása.

Módszerek

A közlemény feldolgozza az elmúlt két évtizedben előtérbe került lipid alapú gyógyszerkészítmények kutatásának legfontosabb eredményeit, különös tekintettel a mikro- és nanoemulziókra.

Eredmények

A szakirodalmi források elemzése bemutatja a lipid alapú készítmények osztályozási rendszerét, a leggyakrabban alkalmazott segédanyagokat, az összetevőktől függő minőségi tulajdonságokat, a mikro- és nanoemulziók közötti jellemző eltéréseket.

Következtetések

Az áttekintés rávilágít a lipid alapú készítmények, illetve az önemulgeáló hatóanyag-felszabadító rendszerek alkalmazhatóságot megkönnyítő formulálási lehetőségeire, amelyek a terápiás hatékonyság növelése érdekében ígéretesek.

Kulcsszavak:

rossz vízoldhatóságú hatóanyagok, lipid alapú készítmények, önemulgeálódás, koloid hatóanyag-hordozó rendszer

Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerfejlesztés egyik legnagyobb kihívása az alacsony orális biohasznosíthatóságú hatóanyagokat tartalmazó készítmények formulálása [1, 2]. Az új hatóanyag-jelölt molekulák mintegy 30-40%-a a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) II. osztályába tartozik, azaz alacsony vízoldhatóságot és jó membrán permeabilitást mutat, miközben szignifikáns és ígéretes farmakológiai hatásokkal rendelkezik molekuláris támadáspontján.

Az alacsony orális biohasznosíthatóság javítása céljából számos gyógyszer technológiai megoldást

alkalmaznak [3-5], pl. komplexképzést ciklodextrinnekkel [6], szilárd diszperziókat [7], szilárd lipid nanorészecskéket [8], nanokristályokat [9]. A lipid alapú formulációk közül biofarmáciai és gyógyszer technológiai előnyei következtében nagy jelentőséggel bírnak az önemulgeálódó gyógyszerhordozó rendszerek [10].

Önemulgeálódó gyógyszerhordozó rendszerek

Az önemulgeálódó gyógyszerhordozó rendszerek izotróp keverékek (prekoncentrátumok), melyek a hatóanyag mellett természetes vagy szintetikus olajokból, hidrofil vagy lipofil emulgensekből, és



esetenként hidrofil koszolvensből (koemulgen-sekből) állnak. A gyomor enyhe keverő funkciójának következtében a gyomornedvben felhígult keverék nagy diszperzitásfokú o/v típusú emulziót képez (1. ábra). A keletkezett cseppek méretétől és termodinamikai stabilitásától, valamint a kiindulási prekoncentrárum összetételétől függően megkülönböztetünk önemulgeálódó (SEDDS), önmikroemulgeálódó (SMEDDS) és önnanoemulgeálódó (SNEDDS) gyógyszerhordozó rendszereket [11]. Felépítésükből adódóan a lipid alapú formulációkhoz soroljuk őket. A felhasználásra szánt adagolási formában kialakított fizikai állapot szerint megkülönböztetünk folyékony („Liquid”, L-SEDDS), pasztaszerű félszilárd („SemiSolid”, SS-SEDDS) és szilárd („Solid”, S-SEDDS) hordozórendszereket.

A lipid alapú készítmények egyik legfőbb biofarmáciai előnye, hogy a vízben rosszul oldódó, lipofil hatóanyag – olajfázisban – oldott állapotban található a gasztrointesztinális traktusban (GIT) történő áthaladása során. Az abszorpció javulása várható egy olyan kolloid diszperz rendszertől, amely a hatóanyagot oldott állapotban tartalmazza, mivel így a kioldódás – mint sebesség-meghatározó lépés – elkerülhető.

Lipid formulációk osztályozási rendszere

A 2000-ben bevezetett osztályozási rendszer lipid alapú formulációk számára *Pouton* nevéhez fűződik [12]. Az elgondolás alapvető szempontjaként szolgált, hogy a lipid készítményeket az összetétel az olaj, emulgens, segédemulgens arányok szerint

I. táblázat

Lipid alapú hordozórendszerek osztályozási rendszere

	I. típus	II. típus	III/A. típus	III/B típus	IV. típus
Rendszer jellege	olajfázis	önemulgeálódó olajfázis vízdoldható segédanyag nélkül	önemulgeálódó olajfázis vízdoldható segédanyaggal	önemulgeálódó olajfázis vízdoldható segédanyaggal, alacsony olajtartalommal	olajfázis nélkül, micellaképző felületaktív és koszolvens segédanyagokkal
Emésztési folyamat	követelmény	nem feltétel	nem feltétel	nem feltétel	nem feltétel
Diszperzió mérettartománya	durva	kolloid (<250 nm)	kolloid (<250 nm)	kolloid (<100 nm)	kolloid (<50 nm)
Oldószerhatás vízben híguláskor	korlátozott jelentőségű	nem változik	csökkenhet	valószínűen csökken	csökken, fázisátalakulás
Összetétel					
Olaj (m/m%)	100	40–80	40–80	<20	–
Hidrofób (HLB<12) felületaktív anyag (m/m%)	–	20–60	–	–	0–20
Hidrofil (HLB>12) felületaktív anyag (m/m%)	–	–	20–40	20–50	30–80
Hidrofil koszolvens (m/m%)	–	–	0–40	20–50	0–50

csoportosítsák (*I. táblázat*), és az egyes típusokhoz rendeljék hozzá a jellemző tulajdonságokat, így pl. a várható hatását a gasztrointesztinális traktusban történő hígulásnak. Az I-es típusú összetételek csak olajat tartalmaznak, nem diszpergálódnak a GIT-ben, és a kívánt hatás eléréséhez esszenciális az olaj enzimek által történő bontása. A II-es típus tagjai olajat és vízzel nem elegyedő, HLB<12 emulgenst tartalmaznak [13], ezek önmulgeálódás révén már o/v típusú emulziót képeznek a gyomor-bél rendszerben. Az osztályozási rendszer III. típusához soroljuk az önmikroemulgeálódó rendszereket, melyek vízdoldékony emulgenseket és/vagy koemulgenseket tartalmaznak, és képeznek finom diszperziókat a fiziológias kioldó közegben. A III/A típusba tartozó kevérekek kisebb, míg a III/B típushoz sorolt formulációk jelentős arányú hidrophil emulgenst és koemulgeátort tartalmaznak, azonban hígulás hatására a rendszer szolubilizáló képessége csökkenhet, és a hatóanyag csapadék formájában kiválhat. A lipid alapú formulációk döntő része a III. típus képviselője, közülük példa az immun-suppresszáns ciklosporint tartalmazó Neoral® és a HIV-terápiában alkalmazott ritonavir/lopinavir kombinációs készítmény, a Kaletra® [30]. A gyógyszerfejlesztés egyik új irányvonala olajmentes formulációk előállítására, *Pouton* ezeket az összetételeket a IV. típusba sorolja. Egy az Egyesült Államokban végzett kutatás szerint a hidrophil emulgens és segédemulgens együttes alkalmazása szignifikánsan nagyobb szolubilizáló képességgel bír a kizárólag koemulgeátort tartalmazó prekoncentrátumokhoz képest [11]. A lipidmentes összetételek hátránya közé tartozik a szolubilizáló ké-

esség jelentős mértékű csökkenése in vivo. A IV. típus szerinti formulációk abban az esetben nyernek alkalmazást, ha a hatóanyag hidrophób, de nem lipofil karakterű. Nem szabad azonban megfelekezünk krónikus alkalmazás során a magas emulgens és segédemulgens arány következtében fellépő toxicitásról. Erre nagyon jó példa a IV. típus szerint készült lágú zselatin kapszula gyógyszerforma a HIV-proteáz gátló amprenavirból, az adott klinikai indikációban az előnyök egyértelműen túlsúlyban vannak a kockázatokkal szemben [14].

Mikroemulziók és nanoemulziók

Biofarmáciai és gyógyszerterápiás előnyeik következtében a leggyakrabban előállított kolloidális diszperz rendszerek a mikroemulziók és nanoemulziók (*II. táblázat*). Számos hasonlóság van a két kolloid struktúra között, ám néhány fontos különbség egyértelmű határt szab köztük [15]. A szakirodalom szerint amennyiben a diszpergált cseppek átmérője 200-300 nm alatt van, akkor mikroemulzióról vagy nanoemulzióról beszélünk [16].

Önmagában a cseppméret alapján a két rendszer között nem tudunk különbséget tenni, azonban a fizikai-kémiai, kolloidikai tulajdonságaik alapján egyértelműen megállapítható, hogy mikro vagy nanoemulzió. Ezeknél a rendszereknél a terminológia, illetve méret szerinti megkülönböztetés önmagában félrevezető. A „nano” 10^{-9} , míg a „mikro” 10^{-6} dimenziót jelent, így azt a következtetést vonhatnánk le, hogy a nanoemulziók cseppmérete számottevően kisebb a mikroemulziók cseppméreté-

II. táblázat

Önmulgeáló rendszerek fontosabb jellemzői

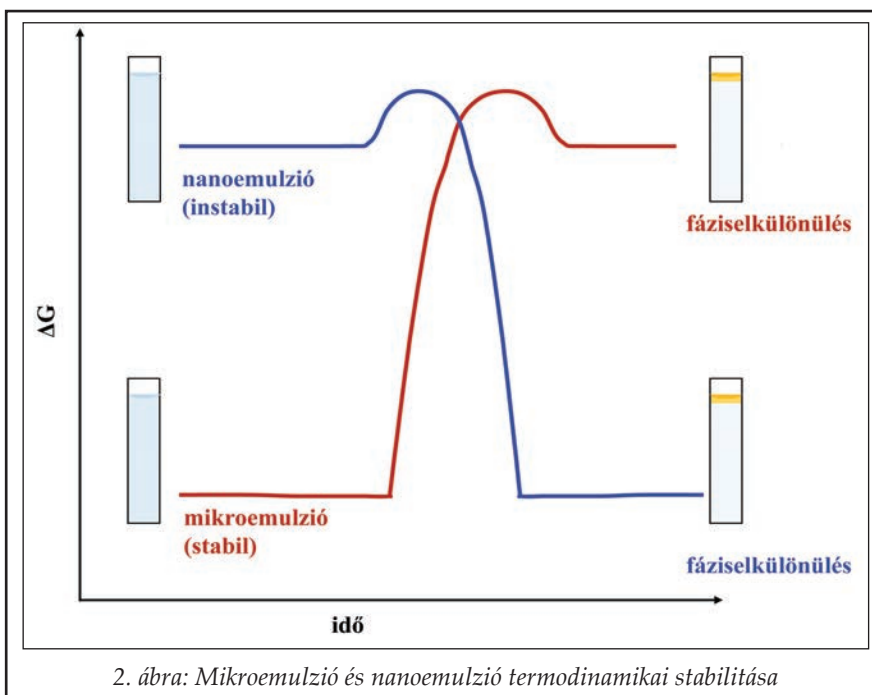
Tulajdonság	Mikroemulzió	Nanoemulzió
Termodinamikai stabilitás	stabil	instabil
Kinetikai stabilitás	instabil, de kompenzált	szterikus és elektrosztatikus gátból következő metastabil állapot
Morfológia	változatos (pl. szférikus, lamelláris, cylinder)	kizárólag szférikus
Összetétel, lehetséges stabilizátorok	nagyobb emulgens/olaj arány, kis molekulású emulgensek.	kisebb emulgens/olaj arány, fehérjék, polimerek, kis molekulású emulgensek
Optikai tulajdonságok	200 nm alatt a kolloid diszperzió elkezdi feltisztulni, 60 nm alatt transzparenssé válik.	
Részecskeméret-eloszlás	szűk tartomány, egy csúcs, alacsonyabb polidiszperzitás.	széles tartomány, több csúcs, magasabb polidiszperzitás.

hez képest. A gyakorlatban azonban általában fordítva, a mikroemulziók mutatnak kisebb cseppméretet [17].

A legmeghatározóbb különbség a mikroemulziók és a nanoemulziók között a termodinamikai stabilitás kérdésköre (2. ábra). A mikroemulziók termodinamikailag stabil kolloid diszperziók, míg a nanoemulziók termodinamikailag nem stabil rendszerek. Mikroemulziók esetén a kolloid diszperzió (cseppek vízben eloszlva) szabadentalpiája ($\Delta G_{\text{koll.diszp}}$) alacsonyabb, mint a különálló fázisok (olaj és víz) szabadentalpiája (G_{ov}), ezért a mikroemulziók képződése termodinamikailag kedvezményezett

folyamat ($\Delta G_{\text{koll.diszp}} < \Delta G_{\text{ov}}$). Nanoemulziók esetén a helyzet fordított: a kolloid diszperzió szabadentalpiája magasabb, mint a különálló fázisok szabadentalpiája, ezért a nanoemulziók termodinamikailag instabil rendszerek ($\Delta G_{\text{koll.diszp}} > \Delta G_{\text{ov}}$) [17].

A nanoemulziók termodinamikai instabilitásuk ellenére képesek akár hónapokon vagy akár éveken át megtartani cseppállandóságukat, ellenállnak az aggregatív erőknek [20]. A metastabil állapotban levő kolloidális diszperz rendszer termodinamikailag instabil, ám kinetikailag stabilizált állapotban lehet jelen [20]. Bár a termodinamikailag instabil rendszer az energiaminimum elvének megfelelően az alacsonyabb szabadentalpiát biztosító, szeparált fázisokba törekszik visszaalakulni, ám ezt a folyamatot különböző energiagátak (szterikus és elektrosztatikus) kialakításával lassíthatjuk, azaz kinetikailag stabilizáljuk a rendszert [16]. Minél nagyobb az energiagát, annál tovább marad metastabil állapotban a nanoemulzió, annál kevésbé képesek az egyes cseppek megközelíteni egymást és aggregálódni. Mind az amfipatikus, mind a részlegesen nedvesedő szilárd részecskék felhalmozódása a határfelületen kedvezményezett. Az emulzió időbeli stabilitását elősegíti egy erős és rugalmas határfelületi film kialakulása, valamint elektromos töltéssel rendelkező emulgeátorok alkalmazása esetén az elektromos kettősréteg taszítása [18]. A mikroemulziók kinetikailag instabilak, ám a méretükből kifolyólag az aggregációs hajlam energetikai gátaknak köszönhetően kompenzált [23].



2. ábra: Mikroemulzió és nanoemulzió termodinamikai stabilitása

Az összetételt vizsgálva mindkét típus a lipid osztályozási rendszer III. típusába tartozik, azaz olaj, emulgens és koemulgeátor is szükséges a mikro/nanoemulzió előállításához. A különbség az emulgens/olaj arányban és a felhasznált emulgens minőségében van. Mikroemulzió esetén nagyobb mennyiségű felületaktív anyag szükséges, és kizárólag kis molekulású emulgensek alkalmasak a termodinamikailag stabil rendszer létrehozásához [18]. Ezzel szemben nanoemulziók képzéséhez kisebb emulgens/olaj arány is megfelelő, valamint a kis molekulású emulgensen kívül különböző fehérjék és polimerek is alkalmasak [19]. Cseppméretben nincs különbség a mikroemulzió és nanoemulzió között, amennyiben a lipid alapú kolloidális diszperz rendszer cseppmérete 200 nm alatti, akkor definíció szerint mikro/nanoemulzióról beszélhetünk [16]. Optikai tulajdonságok a cseppméret tükrében értelmezhetők: a rendszer 200 nm-nél kezd kitisztulni, 60 nm alatt transzparenssé válik [21]. Nanoemulziók esetén a cseppek gömb alakúak. Ebben a mérettartományban a cseppek határfelületi feszültsége (γ : N/m) relatíve nagy, míg a sugara (r : m) kicsi, ezért több atmoszféra nagyságú Laplace-nyomás ($\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$) detektálható. A diszpergált csepp a legkisebb határfelületet igyekszik kialakítani: gömb alakot vesz fel [16]. Mikroemulziók morfológiai elemzése összetettebb képet tár elénk. A kolloid mérettartomány alsó felének termodinamikailag stabil képviselője gömb, pálca, cylinder vagy lamelláris struktúrákat is felvehet [22].

A fentiek alapján látható, hogy a mikro-, és nanoemulziók precíz elkülönítése komoly kihívást jelent a kutató számára. A két kolloid diszperzió termodinamikai stabilitásában eltérést mutat, ezért mikroemulziók esetén a hosszú távú eltarthatóság, a gyenge aggregációs hajlam döntő lehet, de nem szabad megfeledkeznünk a nanoemulziók esetleges metastabil állapotáról. Támpont lehet a részecskeméret-eloszlás, polidiszperzitás, Zeta-potenciál szignifikáns változása az idő függvényében, a cseppmorfológia módosulása [17]. Láthatuk, hogy a nanoemulziókra kizárólag a gömb alak jellemző, míg mikroemulziók esetén többféle struktúra lehetséges. Megfelelő képkalkoló eljárások (atomerő mikroszkópia, pásztázó elektronmikroszkópia, röntgen) segítségével jellemezni tudjuk az előállított emulziót [15]. Elengedhetetlen a cseppméreteloszlás vizsgálata is, a mikroemulziók szűk mérettartományt, a nanoemulziók szélesebb, esetenként több csúccsal jellemezhető cseppméreteloszlást mutatnak [22].

Önemulgeálódó rendszerek segédanyagai

Az önemulgeálódó gyógyszerhordozó rendszerek olajokból, emulgensekből és koemulgeátorokból épülnek fel. Az önemulgeálódás folyamatát döntő módon befolyásolják az alkalmazott segédanyagok (III. táblázat). Az olaj és emulgens kémiai szerkezete, koncentrációja, az olaj/emulgens arány,

az alkalmazott segédemulgens minősége és mennyisége, az emulgens/segédemulgens arány, illetve az egyes segédanyagok bemérési sorrendje mind hatással vannak a kolloid diszperzió minőségére [24]. A sikeres formuláláshoz számos paramétert kell figyelembe venni, önemulgeált cseppek képződésére csak meghatározott segédanyag-kombinációk esetén van lehetőség. A komponensek kiválasztásának főbb szempontjai a következők [25]:

- a hatóanyag oldhatósága a lehető legjobb legyen az adott segédanyagban,
- az önemulgeálás sebessége a legnagyobb, a keletkezett cseppek mérete a legkisebb legyen a sikeres abszorpció érdekében,
- a gyomor-bél traktusban tapasztalható pH és ionkoncentráció hatására ne változzon meg a cseppméret és a stabilitás,
- minimalizálja a hatóanyag bomlását és metabolizációját a fiziológiás környezetben,
- a segédanyagok toxicitása, tisztasága, stabilitása és kedvező ára is lényeges kritériumok.

Olajok

Az olajok a SEDDS legfontosabb alkotórészei. Oldott állapotban tartják a hatóanyagot, elősegítik az önemulgeálódás folyamatát, facilitálják a hatóanyag intesztinális abszorpcióját [26]. Az olajokat többféle szempont szerint csoportosíthatjuk. Eredetük szerint lehetnek természetesek, félszinteti-

III. táblázat

Önemulgeáló rendszerek fontosabb segédanyagai

Anyag	HLB-érték	Tulajdonságok
Olívaolaj	-	természetes olaj, 85%> telítetlen zsírsav aránnyal [41]
Szezámolaj	-	természetes olaj, 80%> telítetlen zsírsav arány, allergizálhat [42]
Glicerín-monooleát (Peccol®)	3	félszintetikus, hosszú szénláncú származék, lipofil hatóanyagok kiváló oldószere [43,44]
Kaprilsav trigliceridek (Labrafac® Lipophile WL 1349)	2	félszintetikus származék, közepes szénláncú triglicerid, parenterálisan is alkalmazható [45]
Polioxilezett ricinusolaj 35:1 (Cremophor® EL)	12	nemionos emulgens, vízdoldható, félszilárd [46]
Polioxilezett ricinusolaj 40:1 (Cremophor® RH 40)	15	nemionos emulgens, íz- és szagmentes, orális készítmények esetén előnyös [47]
Makrogol-glicerín-oleát (Labrafil® M 1944 CS)	10	nemionos emulgens, vízben jól diszpergálódik, egyik legjobban tolerált felületaktív anyag [48]
Polioxtilén(20)-szorbitán-monooleát (Tween 80)	15	nemionos emulgens, gasztroirritatív-potenciál [49]
Dietilén-glikol-monoetil-éter (Transcutol® HP)	-	hidrofil koemulgens, vízzel kiválóan elegyedik, szinergista effektus jellemző az emulgenssel [50]
polietilén-glikol 400	-	színtelen, viszkózus folyadék, alacsony toxicitás [51]

kusak, szintetikusak. Szerkezetüket tekintve trigliceridek vagy kevert gliceridek (mono-, di-, és trigliceridek keveréke) közepes és/vagy hosszú szénláncú zsírsavakkal, melyek telítettek és egyszerűen vagy többszörösen telítetlenek lehetnek [27].

A természetes olajok változatos szénlánc-hosszú és telítettségű trigliceridek keverékei, leggyakrabban használt a szezámolaj, napraforgóolaj, olívaolaj, mogyoróolaj, kókuszolaj és pálmaolaj. Olvadáspontjuk a szénlánc hosszának valamint telítettségének növekedésével növekszik, az oxidációra való hajlamuk pedig csökken [24]. Számos olaj áll rendelkezésre tisztított állapotban SEDDS formulálásához. Előnyös tulajdonságaik közé tartozik, hogy a GIT-ben található enzimek révén tökéletesen lebomlanak, epesavak közvetítésével felszívódnak. Alapvetően biztonságosnak tekintjük őket [28]. Hátrányaik közé tartozik, hogy általában kevesebb hatóanyagot képesek oldatban tartani félszintetikus társaikhoz képest, valamint az önemulgeálódás is nehezebben megy végbe [29].

Természetes olajok részleges hidrolízisével, kémiai módosításával félszintetikus olajokat, emulgenseket, segédemulgenseket állíthatunk elő. Ezek a segédanyagok lágy és kemény zselatinkapszulába probléma nélkül tölthetők, szobahőmérsékleten folyadék vagy félszilárd állapotban kerülnek felhasználásra [30].

Félszintetikus olajok a parciális gliceridek, melyeket trigliceridből állítanak elő transzészterezés útján alkáli katalízis és melegítés mellett glicerin segítségével. Parciális gliceridek nyerhetők a fenti reakción kívül a glicerin közvetlen észterezésével megfelelő zsírsavakkal [24]. A kémiai módosításon átesett parciális gliceridek a természetes olajokhoz viszonyítva hidrofílebb karakterrel jellemezhetők, eredményesebben képesek a vízben rosszul oldódó hatóanyagot szolubilizálni [31]. Nagyszámú képviselője van a félszintetikus olajoknak a piacon: glicerin-monokaprilokaprát (Capmul® MCM); glicerin-monosztearát (Geleol®, Imwitor® 191, Cutina® GMS®, Tegin™); glicerin-disztearát (Precirol® ATO 5); glicerin-monooleát (Peceol®); glicerin-monolinolát (Maisine® 35-1); glicerin-dibehenát (Compritrol® 888 ATO).

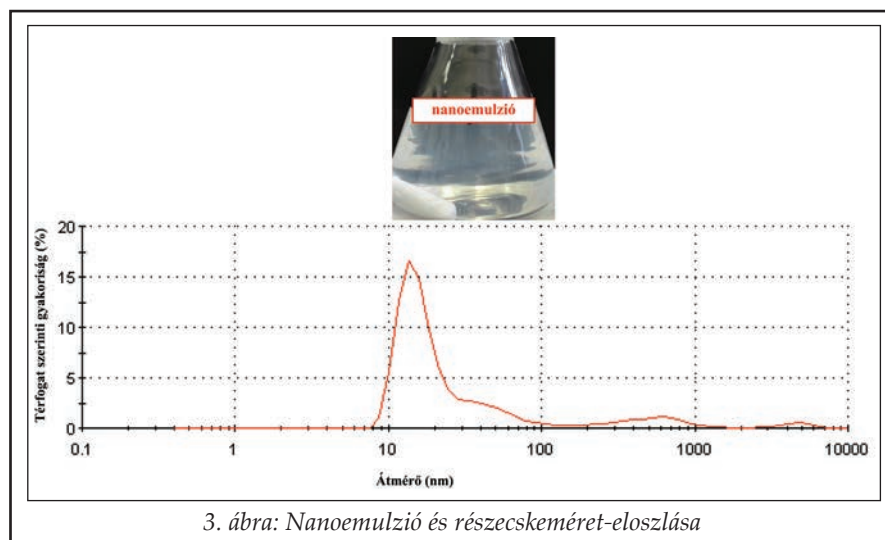
Több kutatócsoport is vizsgálta az egyes olajok szerkezete és a hatóanyag oldhatósága valamint biohasznosíthatósága közötti összefüggéseket. Grove és munkatársai egy D₃ vitamin analóg molekula, a seocalcitol viselkedését tanulmányozták közepes (MCT) vagy hosszú (LCT) szénláncú trigliceridet tartalmazó mikroemulziókban. Emulgensnek mindkét esetben Cremophor® RH40-et, koemulgeátornak

Transcutol® HP-t választottak azonos tömegarányok mellett. Az abszorpció és biohasznosíthatóság tekintetében szignifikáns különbséget nem tapasztaltak a MCT és LCT tartalmú mikroemulziók között. Megállapították, hogy MCT esetén az önemulgeálódáshoz szükséges idő rövidebb volt, valamint a terner fázisdiagramok összehasonlítása során nagyobb volt MCT esetén az önmikroemulgeálódó tartomány [32]. Porter és munkatársai az alábbi három danazol tartalmú lipid formulációt vizsgálták: LCT-oldat, LCT-SMEDDS és MCT-SMEDDS. Az oldatot illetve a prekonceptrátumokat mikronizált danazzal szemben hasonlították össze kiéhezettett beagle kutyákban. Az LCT-oldat és LCT-SMEDDS szignifikánsan növelte a biohasznosíthatóságot, míg az MCT-SMEDDS minimális növekedést produkált. Az in vivo eredményeket alátámasztja, hogy in vitro az MCT-SMEDDS formuláció szignifikáns hatóanyag-kiválást mutatott, míg az LCT formulációk esetében hatóanyag-kiválást egyáltalán nem tapasztaltak [33]. Egy nemzetközi kutatócsoport ugyancsak az LCT típusú formulációk előnyeit fedte fel az MCT tartalmú formulációkkal szemben. In vitro modellezték a különböző formulációk emészthetőségét a felszabaduló zsírsavak visszatitrálásával, valamint vizsgálták a kivált hatóanyag (danazol) mennyiségét. Azt találták, hogy a MCT tartalmú formulációk nagyon gyorsan elveszítették szolubilizációs kapacitásukat, míg az LCT tartalmúak esetén elhanyagolható mennyiségű hatóanyag-kiválást mértek. Megjegyzik, hogy kapcsolat van az egyes lipidek emészthetősége valamint a szolubilizáló-képesség között, de a pontos jellemzéshez további vizsgálatok szükségesek [34].

A bemutatott vizsgálatok tükrében látható, hogy nem egyértelmű az MCT és LCT alapú formulációk hatása a vízben rosszul oldódó hatóanyagok biohasznosíthatóságát és szolubilizációs kapacitását tekintve. Emellett meghatározó szerepet kap a hatóanyag, az alkalmazott segédanyag, illetve a hatóanyag-segédanyag kölcsönhatás is.

Emulgensek

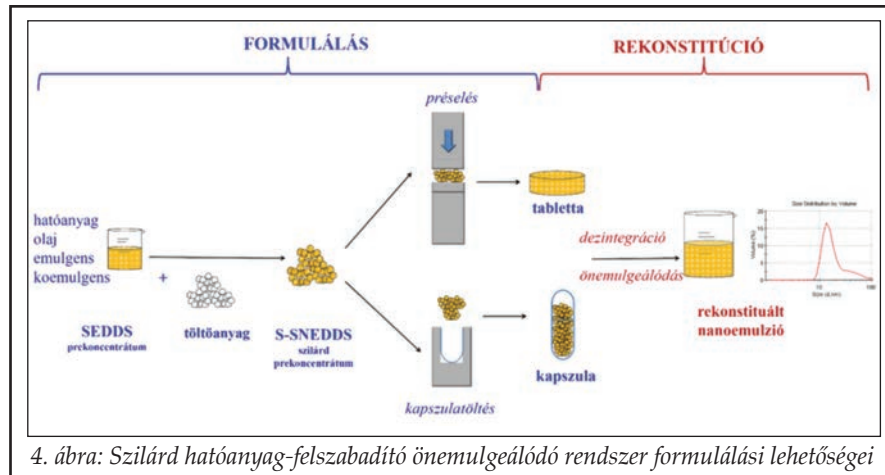
Az önemulgeálódó gyógyszerhordozó rendszereknek nélkülözhetetlen építőkövei az emulgensek. Növelik a lipidnek az intesztinális membránhoz való affinitását, valamint képesek fokozni a biológiai membránok permeabilitását [35]. Hidrofób láncok között a lipofil tulajdonságú hatóanyagok oldódhatnak. SMEDDS/SNEDDS formulála-



nemionos felületaktív anyag: makroglicerín-ricinoleát (Cremophor® EL), makroglicerín-oleát (Labrafil® M 1944 CS), kaprilokaproil makrogol-8-glicerid (Labrasol®), propilén-glikol-monokaprilát (Capryol® 90).

Koemulgeátorok, koszolvensek

A koemulgeátorok segítik az önemulgeálódás folyamatát, csökkentik a határfelületi-feszültséget és növelik a határfelület flexibilitását [52]. Nagy mennyiségű hatóanyagot képesek tartósan oldatban tartani. Általában 20-50 m/m%-ban alkalmazzuk őket SEDDS formulációkban [53]. A segédemulgens kiválasztása alapvetően két tényező függvénye: milyen mértékben képesek oldani a hatóanyagot és az adott olaj:emulgens:segédemulgens összetételben a koemulgeátor mennyiben járul hozzá az önemulgeálás fokozásához. Gyakrabban alkalmazott segédemulgens a dietilén-glikol-monoetil-



sához 30-70 m/m% emulgens szükséges, így hosszú távon stabil, 200 nm alatti, szűk cseppméret-eloszlással jellemezhető kolloid diszperz rendszer képezhető [36]. Önemulgeálódás szempontjából a HLB>12 értékű, nemionos emulgensek preferáltak. A nemionos emulgensek klinikai előnye az ionos felületaktív anyagokkal szemben, hogy a relatív toxicitásuk alacsonyabb, jobb tolerálhatósággal rendelkeznek [37]. A nemionos emulgensek jellemzői, hogy hidrophil csoportjai nem rendelkeznek töltéssel, vízoldhatóak, amit a nagy polaritással rendelkező hidrophil és polioxetilén csoportjainak köszönhetik [38]. Több kutatás is igazolta, hogy a SEDDS formulációkban alkalmazott emulgens tulajonságú komponensek képesek gátolni a P-glikoprotein mediálta hatóanyag effluxot [39]. Ugyancsak figyelemfelkeltő eredmény, hogy az intesztinális sejtekben található fázis I. metabolizációban szerepet játszó CYP450 enzimszisztéma aktivitása is szignifikánsan csökkenthető nemionos tenzidek segítségével [40]. SEDDS formulációk esetén néhány gyakran alkalmazott

éter (Transcutol® HP), polietilén-glikol (PEG 400), és etil-alkohol.

Formulációs lehetőségek

A 3. ábra napraforgóolajból készült önemulgeálódó nanoemulzió makroszkópos megjelenését és Malvern Zetasizer készülékkel meghatározott cseppméret-eloszlását szemlélteti. Az alkalmazhatóság szempontjából ígéretes, hogy az önemulgeálódó rendszer szilárd hordozóra felvihető, és tabletta vagy kapszula adagolási formában is előállítható (4. ábra). A gyógyszerformából a nanoemulzió a felhasználás során, rekonstitúció révén képződik újra.

Következtetések

Figyelembe véve a rossz vízoldhatósággal rendelkező hatóanyagok jelentős számát, a lipid alapú készítmények, illetve az önemulgeáló hatóanyag-fel szabadító rendszerek számos előnnyel rendel-

keznek és ígéretesnek mutatkoznak a hatóanyag szervezetbe juttatása, illetve a terápiás hatékonyság javítása céljából.

IRODALOM

- Chatterjee B., Hamed A., Ahmed A., Mandal UK, Sengupta P.: *Drug Deliv.* 23, 3639–3652 (2016)
- S. Gupta, R. Kesarla, A. Omri.: *ISRN Pharmaceutics.* 1-16 (2016)
- Hauss DJ.: *Informa Healthcare.* USA, Inc. (2007)
- Pouton CW.: *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 29(3-4) 278–287 (2006).
- Brown D.: *Curr Opin Drug Discov Devel.* 4, 414-8. (2006).
- Carrier RL., Miller LA., Ahmed I.: *J Control Release.* 123(2), 78-99 (2007).
- Sareen S., Mathew G., Joseph L.: *Int J Pharm Investig.* 2(1), 12–17 (2012).
- Ekambaram P., Sathali A., Priyanka A.: *Sci. Revs. Chem. Commun.* 2(1), 80-102 (2012).
- Chen H., Khemtong C., Yang X., Chang X., Gao J.: *Drug Discovery Today.* 16 (7-8), 354–360 (2015).
- Feeney OM., Crum MF., McEvoy CL., Trevaskis NL., Williams HD., Pouton CW., Charman WN., Bergström CAS., Porter CJH.: *Adv Drug Deliv Rev.* 101, 167-94 (2016).
- Porter CJH., Pouton CW., Cuine JF, Charman NC.: *Advanced Drug Delivery Reviews.* 6(17), 673–691 (2008).
- Pouton CW.: *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 11(2), 93–98 (2000).
- Niczinger N., Hajdú M., Budai L., Dredán J., Antal I.: *Acta Pharm. Hung.* 81, 151-164 (2011).
- Strickley RG.: *Pharm. Res.* 21, 201–230 (2004).
- Anton N., Vandamme T.: *Pharmaceutical Research.* 28 (5), 978–985 (2011).
- McClements DJ., Rao J.: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 51, 285–330 (2011).
- McClements DJ.: *Soft Matter.* 8, 1719-1729 (2012).
- Kralova, I., Sjoblom J.: *Journal of Dispersion Science and Technology.* 30 (9), 1363–1383 (2009).
- Anton N., Vandamme T.: *Int J Pharm.* 377, 142–7. (2009).
- Anton N, Benoit J, Saulnier P.: *J Control Release.* 128, 185–99 (2008).
- Wooster TJ., Golding M., Sanguansri P. *Langmuir.* 24(22), 12758-65. (2008).
- Jonsson B., Lindman B., Holmberg K., Kronberg B.: *Surfactants & Polymers in Aqueous Solutions,* John Wiley & Sons, Chichester, U.K., 1998. 139-154.
- Monzer F.: *CRC Press,* USA, 2008, 316-342.
- Rahman MA., Hussain A., Hussain MS., Mirza MA., Iqbal Z.: *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 1–19, (2012).
- Cerpnjak K., Zvonar A., Gašperlin M., Vrečer F.: *Acta Pharm.* 63, 427–445 (2013).
- Kalepu S., Manthina M., Padavala V.: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3 (6), 361–372 (2013).
- Stuchlík M., Zák S.: *Biomed. Pap.* 145, 17– 26 (2001).
- Mason TG., Wilking1 JN., Meleson1 K., Chang CB., Graves SM.: *J. Phys.: Condens. Matter* 18, 635–666 (2006).
- Wadhwa J., Nair A., Kumria R.: *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research,* 69(2), 179-191 (2012).
- Gershanik T., Benita S.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.,* 50, 179–188 (2000).
- Zhang L., Zhang I., Zhang M., Pang Y., Li Z., Zhao A., Feng J.: *Drug Deliv.* 22(4), 475–486 (2015).
- Grove M., Mullertz A., Nielsen JL., Pedersen G.P.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 233–234 (2006).
- Porter CJH., Kaukonen AM., Boyd BJ. Edwards GA., Charman WN.: *Pharm Res.* 21(8), 1405-12 (2004).
- Williams HD., Sassene P., Kleberg K., Bakala-N'Goma JC., Calderone M., Jannin V., Igonin A., Partheil A., Marchaud D., Jule E., Vertommen J., Maio M., Blundell R., Benameur H., Carrière F., Müllertz A., Porter CJ., Pouton CW.: *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 101 (9), 1-31 (2012).
- Singh B., Bandopadhyay S., Kapil R., Singh R., Katare O.: *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems.* 26(5), 427-521 (2009).
- Kim HJ., Yoon KA., Hahn M., Park ES., Chi SC.: *Drug Dev Ind Pharm.* 26, 523–9. (2000).
- Mahapatra AK., Murthy PN., Swadeep B., Swain RJ.: *International Journal of PharmTech Research* 6 (2), 546-568 (2014).
- URL: <http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>
- Dintaman JM., Silverman JA.: *Pharm Res.* 16, 1550–6. (1999).
- Cherovinsky DS., Brecher ML., Hoelcle MJ.: *Anticancer Res.* 13, 93–6 (1993).
- Balata GF.: *Drug Des Devel Ther.* 5(10), 117-28 (2016).
- Memvanga PB., Préat V.: *Eur J Pharm Biopharm.* 82(1), 112-9 (2012).
- Sachs-Barrable K., Thamboo A., Lee SD., Wasan KM.: *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10(3), 319-331 (2007).
- Wasan EK., Bartlett K., Gershkovich P., Sivak O., Banno B., Wong Z., Gagnon J., Gates B., Leon CG., Wasan KM.: *Int. J. Pharm.* 372(1-2), 76-84 (2009).
- Zhang P., Liu Y., Feng N., Xu J.: *Int. J. Pharm.* 355(1-2), 269-276 (2008).
- Zupančič O., Grießinger JA., Rohrer J., Pereira de Sousa I., Danninger L., Partenhauser A., Sündermann NE., Lafleur F., Bernkop-Schnürch A.: *Eur J Pharm Biopharm.* 109, 113-121 (2016).
- Vithlani S., Sarraf S., Chaw CS.: *Drug Dev Ind Pharm.* 38(10), 1188-94 (2012).
- Balakrishnan P., Lee BJ., Oh DH., Kim JO., Hong MJ., Jee JP., Kim JA., Yoo BK., Woo JS., Yong CS., Choi HG.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72(3), 539-545 (2009).
- Rashid R., Kim DW., Yousaf AM., Mustapha O., Fakhar Ud Din., Park JH., Yong CS., Oh YK., Youn YS., Kim JO., Choi HG.: *Int J Nanomedicine* 10, 6147–6159 (2015).
- Rao SV., Shao J.: *Int. J. Pharm.* 36(281-2), 2-9 (2008).
- Bhattacharyya A., Bajpai M.: *Curr Drug Deliv.* 10(5), 542-7 (2013).
- Lawrence MJ., Rees GD.: *Adv Drug Deliv Rev,* 45, 89–121 (2000).
- Agubata CO., Nzekwe IT., Obitte1 NC., Ugwul CE., At-tama AA., Onunkwo1 GC.: *J Drug Discov Develop and Deliv.* 1(1), 1-7 (2014).

Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közzétételére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratát közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közzétételére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közzététel bibliográfiai adatainak megjelölésével.

Közzétételre elfogadunk:

1. **Összefoglaló közleményeket**, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.
2. **Közleményeket**, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.
3. **Rövid közleményeket**, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.
4. **Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét**, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

A kézirat elkészítésének módja:

a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal el látva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

Teljes URL cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma, az alábbiak szerint:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: *J. Pharm. Sci.* 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rác I., Plachy J., Csontos A.: *A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei.* Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): *Chiral Separations by HPLC.* Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31-68.

Szabadalom:

4. *U.S. Pat.* 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&object_ID=6000268 [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában *Fábián P. és Magasi P.*: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig *Erdey-Grúz T. és Csányi P.*: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; *F. Csányi P., Fábián P. és Hónyi E.*: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint *F. Csányi P. és Simándi L.*: Szeretlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadók.

b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A **dolgozat címe** (esetleg alcíme).

A **szerző(k) teljes neve** (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztővel kapcsolatban tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) **munkahelye teljes postai címe**vel, valamint a **levezető szerző e-mail címe**.

A dolgozat magyar nyelvű összefoglalása.

Strukturált (Bevezetés, Célkitűzés és Módszerek, Eredmények, Következtetések) A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

Kulcsszavak: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A **dolgozat címe angol nyelven**, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

Angol nyelvű összefoglalás.

Strukturált (Introduction, Purpose and Methods, Results, Conclusions)

Bevezetés, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

Key-words: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

Kísérleti rész, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

Eredmények.

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

Az eredmények értékelése.

Ábracímek.

Következtetések. Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

Irodalomjegyzék.

