

ACTA

PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

4.

2018

APHGAO 88, (043) 213-252. (2018)



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:

Ambrus Rita egyetemi adjunktus (Szegedi Tudományegyetem)

Báthori Mária professor emeritus (Szegedi Tudományegyetem)

Borbás Anikó egyetemi tanár (Debreceni Egyetem)

Horoáth Györgyi egyetemi docens asszony (Pécsi Tudományegyetem)

Perjési Pál egyetemi tanár (Pécsi Tudományegyetem)

Tóthfalusi László egyetemi docens (Semmelweis Egyetem)

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>Németh Zsófia, Kiss Lóránd, Maléth József, Hegyi Péter, Szabóné Révész Piroska, Jójártné Laczkovich Orsolya: Liposzómális formulációk kutatása és fejlesztése akut pankreatitisz kezelése céljából.</i>	215
<i>Pápay Zsófia Edit, Farkas Dóra, Budai Livia, Balogh Emese, Antal István: A transzmukozális hatóanyagbevitel biofarmáciai és formulálási szempontjai</i>	227
<i>Bartos Csilla, Ambrus Rita, Bartos Csaba, Szabóné Révész Piroska: Metakrilát-kopolimer alapú mikrorészecskék előállítása és összehasonlító vizsgálata intranazális gyógyszerbevitel céljából</i>	237
<i>Varga Erzsébet, Orbán Krisztina, Finta Adél, Kursinszki László, Domokos Erzsébet: Chrysanthemum balsamita var. tanacetoides fitokémiai elemzése</i>	244
<i>Gajdács Márió, Paulik Edit, Szabó Andrea: Közforgalomban dolgozó gyógyszerészek antibiotikum felhasználással és rezisztenciával kapcsolatos véleménye</i>	249

CONTENTS

<i>Németh, Zs., Jójárt-Laczkovich, O., Kiss, L., Maléth, J., Hegyi, P., Szabó-Révész, P.</i> : Research and development of liposomal formulations for the treatment of acute pancreatitis.	215
<i>Pápay Zs.E., Farkas D., Budai L., Balogh E., Antal I.</i> : Biopharmaceutical and formulations aspects of transmucosal drug delivery	227
<i>Bartos Csilla, Ambrus R., Bartos Csaba, Szabó-Révész P.</i> : Preparation and comparison of methacrylate copolymer-based microparticles for intranasal application	237
<i>Varga E., Orbán K., Finta A., Kursinszky L., Domokos E.</i> : Phytochemical analysis of <i>Chrysanthemum balsamita</i> var. <i>tanacetoides</i>	244
<i>Gajdács M., Paulik E., Szabó A.</i> : The opinions of community pharmacists related to antibiotic use and resistance ..	249

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. Szökő 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.

Liposzómális formulációk kutatása és fejlesztése akut pankreatitisz kezelése céljából

NÉMETH ZSÓFIA¹, KISS LÓRÁND², MALÉTH JÓZSEF³, HEGYI PÉTER^{4,5}, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA^{1*}, JÓJÁRTNÉ LACZKOVICH ORSOLYA¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet, 6720 Szeged, Eötvös u. 6.

²Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kórélettani Intézet, 6725 Szeged, Semmelweis u. 1.

³Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I.-es számú Belgyógyászati Klinika, MTA-SZTE Lendület Eпитél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport, 6720 Szeged, Korányi fasor 8-10, SZTE ÁOK Népegészségtani Intézet, 6720 Szeged, Dóm tér 10.

⁴Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Transzlációs Medicina Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12.

⁵Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, MTA-SZTE Lendület Gasztroenterológiai Multidiszciplináris Kutatócsoport, 6720 Szeged, Korányi fasor 8-10.

*Kapcsolattartó e-mail címe: revesz@pharm.u-szeged.hu

Summary

Németh, Zs., Jójárt-Laczkovich, O., Kiss, L., Maléth, J., Hegyi, P., Szabó-Révész, P.: **Research and development of liposomal formulations for the treatment of acute pancreatitis**

Introduction: Liposomes, as a type of nano-delivery systems, are used for targeted drug delivery. Nowadays, the main intention of nanotechnological researches is to provide new therapeutic and diagnostic options.

Aim: The aim of our research project is to find a possible method for the administration of adenosine triphosphate (ATP) into the human body through liposomal formulations to support the energy homeostasis of the cells during the treatment of acute pancreatitis. The objectives of this work are to study the liposomal formulations made from different liposomal wall contents, incorporate propidium iodide (PrI), a cell dye as a marker, then ATP molecule as a biologically active substance into liposomes.

Method: PrI-containing liposomes were designed and the formulations were prepared by the thinfilm hydration method. Instrumental investigations were conducted. The particle size distribution was determined via the dynamic light scattering technique. The zeta potential was verified to check the charge of the vesicular surface. The drug incorporation capacity and the cell penetration ability were measured through PrI cell dye incorporation into liposomes and using fluorescence microscopy. The cell penetration was surveyed on the human embryonic kidney 293T cell line.

Results: The liposomal formulations were prepared with vesicles under 100 nm from different combinations of wall contents. The smallest value of the mean diameter was 66 nm. The zeta potential values were -3.92 mV and -2.49 mV, and in the case of using a positively charged phospholipid, it was measured as +7.92 mV. The drug incorporation capacity values of the products tested on the cell cultures were 24-38%. The highest cell penetration values were measured in case of the 'conventional' samples, which were only made from Phospholipon 90G[®] lipid complex and cholesterol.

Conclusion: Due to the utilization of the PrI marker, we were able to test the cell penetrating ability of the entrapped molecules. We would like to prepare further, pancreatic cell penetrating and ATP molecule containing liposomal formulations in the future.

Keywords: nano-delivery system, liposomal formulation, acute pancreatitis, propidium iodide, adenosine triphosphate

Összefoglalás

Bevezetés: A liposzómák a célzott hatóanyag-bevitelt elősegítő nanohordozó rendszerek. Napjainkban a nanotechnológiai kutatások az újabb terápiás és diagnosztikai területek felfedezésére irányulnak.

Célkitűzés: Célunk az akut pankreatitisz kezelésének kimenetele szempontjából fontos, a sejtek energetikai homeosztázisának fenntartását elősegítő adenosin-trifoszfát (ATP) molekula liposzómális formulációkon keresztül történő szervezetbe juttatásának kutatása. A most bemutatásra kerülő munkánk célja különböző falalkotókból felépülő liposzómális formulációk kutatása, továbbá jelölőanyagként propidium-jodid (PrI), majd később biológiailag aktív anyagként ATP molekula bezárása volt.

Módszerek: PrI-tartalmú liposzóma összetételeket terveztünk és állítottunk elő lipidfilm-hidratációs technológiával. A minták részecskeméretének meghatározása dinamikus fényszórásmérésen alapuló módszerrel történt. A felületi töltöttség vizsgálata céljából zeta-potenciál meghatározására, illetve a bezárási hatékonyság ellenőrzése érdekében PrI sejtfesték bezárására és UV spektrofotometriás mérésekre került sor. A formulált vezikulák sejtekbe való bejutásának teszteléséhez HEK-293T humán embrió vese sejtvonal lett felhasználva.

Eredmények: Különböző falösszetételű, 100 nm alatti mérettartományba eső liposzómális formulációk előállítása történt, amelyek közül a legkisebb átlagos átmérő értéke 66 nm volt. A zeta-potenciál értékek -3,92 mV-ot és -2,49 mV-ot, illetve kationos foszfolipid alkalmazásakor +7,92 mV-ot értek el. A sejtenyészeten tesztelt termékek esetében a hatóanyag-bezárási hatékonyság 24-38%-nak bizonyult. A legmagasabb sejtpenetrációs érték a „hagyományos”, csak Phospholipon 90G[®] lipidkeverékből és koleszterinből álló összetétel esetében volt tapasztalható.

Következtetések: A PrI-jelölőanyag használatával ellenőrizhetővé tehető a liposzómába zárt molekulák sejtekbe történő felvétele. A jövőben szeretnénk pancreas sejtekbe penetráló, biológiailag aktív anyagként ATP molekulákat bezáró liposzómális formulációkat előállítani.

Kulcsszavak: nanohordozó rendszer, liposzómális formuláció, akut pankreatitisz, propidium-jodid, adenosin-trifoszfát.

Bevezetés

A liposzómális formulációk alkalmazása a ható- és aktív anyagok szervezetbe történő bejuttatásának egyik modern és innovatív formája. A lipid kettősrétegből felépülő *liposzóma* a nanohordozó rendszerek egyik sokoldalú típusa. A hatóanyagok liposzómába zárása a rövid keringési és eltarthatósági idő, továbbá a költséges előállítás és vizsgálómódszerek ellenére számos előnyös tulajdonsággal bír [1]. A liposzómális hatóanyag-bevitel segítségével csökkenthető a kialakuló mellékhatások mértéke és mennyisége, előnyösebb farmakokinetika, és megfelelő szövet, szövetet célzó, irányított target terápia érhető el. A jobb farmakokinetikai hatásoknak köszönhetően így egyenletesebb hatóanyag-szintet, retard hatást, magasabb terápiás index és alacsonyabb toxicitási értékeket lehet biztosítani. A molekulák liposzómába zárásával elhatárolhatók, úgymond megvédhetők a hatóanyagok a szervezet bontó folyamataitól, ezáltal növelhető a hatáskifejtésre fordítható idő [2].

Folyékony közegben a liposzómák szférikus, gömbszerű formát vesznek fel. Az amfifil tulajdonságú foszfolipidekből spontán szerveződés útján nano- vagy mikrométeres mérettartományba eső, kettős membránréteggel határolt vezikulák alakulnak ki. A liposzómák falát alkotó, leggyakrabban negatív vagy semleges töltéssel rendelkező foszfolipid apoláris szénláncjai egymás felé néznek, amíg a poláris feji részek a külső és a belső vizes fázis mentén tömörülnek egy rétegbe. Ennek a szerkezeti felépítésnek köszönhetően a vezikulák mind hidrophil, mind lipofil hatóanyagokat is tartalmazhatnak. A hidrophil molekulák a liposzóma vizes, belső terében, míg a lipofil anyagok a membránba ágyazódva helyezkedhetnek el [3]. A foszfolipid kettősréteg stabilizálása általában koleszterin segítségével történik. A koleszterin a foszfolipid molekulák között fennálló hézagok kitöltésével csökkenti a membrán fluiditását. Az újabb típusú liposzómákat (stealth vagy lopakodó liposzóma) a keringési idő növelése céljából PEG-illalni is szokták, azaz polietilén-glikol láncokat kapcsolnak a felszíni foszfolipidekre, ezáltal gátolva az immunsejtes fagocitációt. A kutatások újabb irányvonalai kiterjednek a felszínükön antitesteket vagy antitest-fragmentumokat megkötő immunliposzómákra, a pozitív töltésű foszfolipidekből felépülő kationos liposzómákra és a lokális környezeti viszonyokra érzékeny bioreszponzív liposzómákra is [4]. A hatóanyagot tartalmazó

liposzómák megfelelő kialakításakor figyelembe kell venni a bezárandó anyag tulajdonságait, az alkalmazás módját és a kezelendő betegség kórfejlését is, ezért egy adott hordozórendszer kifejlesztése mindig egy összetett feladatsor végeredményeként történik meg. A parenterális felhasználású liposzómális készítmények megfelelőségének a sterilitás mellett a stabil hatóanyag-tartalom, a nyújtott keringési idő, a beteg szövetet célzó penetrációs képesség és a leadott molekula sejtekbe való eljutásának biztosítása is a feltételei közé tartozik [3].

Az akut pankreatitisz (heveny hasnyálmirigygyulladás) egy súlyos, gyulladással járó betegség, amelyet az elfogadhatatlanul magas mortalitás és a specifikus kezelés hiánya jellemez [5]. A helyzetet tovább nehezíti, hogy az elmúlt évek során jelentősen csökkent az akut pankreatitisz témakörben végzett kutatások száma, amely tény hozzájárulhat a specifikus terápia nélkülözéséhez [6, 7]. Egy felmérés szerint 2012-ben az akut pankreatitisz volt a leggyakoribb hospitalizációs ok a nem daganatos eredetű gasztrointesztinális megbetegedések között az Egyesült Államokban [8, 9]. A betegség országonként eltérő előfordulási gyakorisággal jelentkezik, általában 13 80 eset/100.000 lakos/év értékkel lehet számolni [10]. Az esetek többségében (80%) a betegség enyhe lefolyású, azonban a súlyos forma megjelenésekor (20%), amikor 48 órán belül többszervi elégtelenség alakul ki a pankreatitisz talaján, a halálozási ráta elérheti akár a 40%-ot [9, 11]. A módosított Atalanta klasszifikáció 3 súlyossági fokozatot [enyhe (67-72%), közepesúlyos (16-29%), és súlyos (4-12%) akut pankreatitisz] különböztet meg [12, 13, 14]. Egy Magyarországon 2013-ban indult két éves vizsgálat a betegség nemek közti megoszlási arányának 44-56% női-férfi arányt állapított meg 600 akut pankreatitisszel diagnosztizált beteget vizsgálva [15].

A pankreatitisz kialakulása általában a szekréciós útvonal gátlására és ennek következtében a parenchyma sejtek károsodására vezethető vissza. Az esetek 80%-ában az akut pankreatitisz excesszív alkoholfogyasztás, illetve epekövesség következtében alakul ki. A nők körében gyakoribb az epekövesség eredetű pankreatitisz, még a férfiaknál az alkoholos eredet dominál [16]. A zsírsavak is közrejátszanak az ATP-szint csökkenésében, így a magas szérumszint triglicerid koncentráció értékekkel élő betegek esetében súlyosabb lefolyásra és rosszabb kimenetelre kell számítani akut pankreatitisz esetében [17].

A pankreatitiszes esetek 10%-a idiopátiás, illetve további 10% köthető traumához, az epeutakt érintő beavatkozásokhoz, vagy másodlagosan aminoszalicilátok [18], antibiotikumok, diuretikumok, immunszuppresszánsok, esetleg antiretrovirális hatóanyagok alkalmazásához [19]. A hasnyálmirigy acinus és ductus sejtjei szekretoros működésükhöz nagymennyiségű energiát igényelnek, amelyet a sejtek adozin-trifoszfát (ATP) hidrolízisével állítanak elő. Az ATP előállítása a sejtekben glikolízis, illetve a mitokondriumban végbemenő oxidatív foszforiláció során történik [5]. A leggyakoribb pankreatitist kiváltó faktorok, mint az epesavak, az alkohol és a nemoxidatív alkohol metabolitok mitokondriumkárosító hatása több esetben összetett mechanizmuson alapszik [20, 21, 22].

Az akut pankreatitisz kezelése szupportív terápián keresztül valósítható meg a megfelelő folyadékbevitel és oxigénellátás biztosításával, illetve a szükséges fájdalomcsillapító kezelés alkalmazásával [19]. A kezdeti folyadékpótlásra Ringer-laktát infúzió használata javasolt [10]. Az International Association of Pancreatology (=IAP) és az American Pancreatic Association (=APA) irányelvek a táplálásra szoruló, súlyos akut hasnyálmirigygyulladásban szenvedő betegek számára elsődleges terápiaként a szondán keresztüli táplálást ajánlják [11, 23, 24]. A súlyos akut pankreatitisz esetén a halálozás elsődleges okaként a fertőzéses eredetű komplikációkkal kell számolni. Habár az antibiotikum kezelés csökkenti a fertőzések incidenciáját és súlyosságát, azon betegek meghatározása, akiknél szükség lehet a profilaktikus antibiotikum terápia alkalmazására nem könnyű feladat. Megerősítetten epeúti eredetű pankreatitisz esetén a vezetékelt elzáró kövek eltávolítása a kezelési megoldás. Elfertőződött, nekrotizáló hasnyálmirigy kialakulásakor a műtéti beavatkozás elkerülhetetlen [19].

A fentebb leírt mitokondriumkárosodás, és az abból következő ATP-szint csökkenés fontos szerepet játszik az akut pankreatitisz progressziójában. Az intracelluláris ATP-szint helyreállítása segítheti a betegség kezelését, mert így a sejtek fiziológiai működése fenntarthatóvá válik. Az „*in vitro*” módszerekkel, patch pipettán keresztül történő ATP-visszaadás csökkenti a sejtek károsodását [21]. Azonban az „*in vivo*” körülmények közötti ATP-bevitel során több nehézséggel is meg kell küzdeni. Az ATP molekula nagyon érzékeny az enzimatisz hidrolízisre és csak gyenge sejtpenetrációs képesség jellemzi. Szakirodalmi adatok alapján a

liposzómákba zárt ATP-vel történő kezelés hatásosnak bizonyul a sejtek ischemiás állapotában, azonban a sejtekbe történő bejuttatásához szükséges egy kolloidális gyógyszerhordozó-rendszer alkalmazása [5, 9, 25, 26].

Az ischemiát követő sejthalál kiterjedését és formáját nagymértékben befolyásolja az intracellulárisan megtalálható ATP mennyisége. Általánosságban elmondható, hogy az apoptózis, azaz az önvezérelt programozott sejthalál egy ATP-t igénylő folyamat. A csökkent vérellátású területeken a nem megfelelő oxigénellátás és a gyors glükózbontás miatt a sejtek ATP-szintje gyorsan csökken, ezért az apoptózis folyamata jellemzően gátlás alá kerül és sejtnekrózis indukálódik. A folyamat jelentősége abban rejlik, hogy míg a nekrózis során a sejtekből felszabaduló sejtartalom gyulladásos folyamatokat generál, addig az apoptózis esetében ez a folyamat elmarad. Ischemiás sejteknél az exogén ATP-bevitel megoldást jelenthet a megfelelő ATP-szint visszaállítására. Exogén ATP alkalmazásakor azonban olyan nehézségeket kell leküzdeni, mint az ATP negatív töltéséből adódó gyenge sejtpenetrációs képessége, valamint az ATP molekulák „*in vivo*” körülmények között jelentkező gyors bomlási folyamata [27, 28]. A célterületre való eljuttatás alatt bekövetkező bomlás elkerülése érdekében az ATP molekulát célszerű liposzómákba csomagolni. Az ATP liposzómába zárásának hatékonyságát a sejtek energiaszintjének javításában már több „*in vitro*” és „*in vivo*” körülmények között végzett kísérlet bizonyítja [29]. Az ATP-tartalmú liposzómák segítségével megemelhető a sejtek energiaszintje, ezáltal növelni lehet azok túlélési esélyeit, illetve a sejthalál bekövetkezése esetén biztosíthatóvá válik a nekrózis apoptózis irányba való eltolása. A nekrotizáló sejthalál arányának ily módon történő csökkentése mérsékli a végső károsodás mértékét [28]. Kísérletes körülmények között kimutatták, hogy a liposzómák, főként a pozitív töltéssel rendelkezők, spontán akkumulálódnak az ischemiás területeken. A nanohordozó részecskék felszaporodásának okát, legalábbis részben, a terület gyenge infiltrációjában látják, amely folyamat a részecskék csapódásához vezet, illetve fokozza a terület permeabilitás és retenciós értékeit [30]. ATP-tartalmú vezikulák sikeres alkalmazásáról számoltak be agyi [31], retina [28] és hasnyálmirigy β -sejtek [32] ischaemiája, illetve miokardiális infarktusz [26, 30] esetén, azonban pancreas acinus és ductus sejteken végzett vizsgálatokat még nem közöltek az irodalomban.

A formulációk sejtpenetrációs képessége fluoreszcens festéket tartalmazó mintákkal kezelt sejttényezeteken vizsgálható. Az immunfluoreszcens festési technikák és a fluoreszcens mikroszkópia, beleértve a konfokális lézermikroszkópos mérési technikát, a sejtbiológia gyakran alkalmazott eljárásai közé tartoznak. A konfokális lézermikroszkóp használatával háromdimenziós felvételek is készíthetők, ezért széles körben használják a sejtalkotók intracelluláris helyzetének meghatározására. A fluoroflórok számos típusát alkalmazzák az immunfluoreszcens mikroszkópiában. Amíg a fluoreszcint, a rodamint és ezek származékait immunfestéses technikákban szokták alkalmazni, addig a propidium-jodiddal, illetve az etídium-bromiddal a DNS-t lehet láthatóvá tenni [33].

A propidium-jodid (PrI) (3,8-diamino-5-[3-(diethylammonio)-propil]-6-fenil-fenantridin-dijodid) ($C_{27}H_{30}N_4^+I_2^-$) [34] egy vörös színű fluoreszcens sejtmag-, és kromoszóma festék, amelyet széleskörűen alkalmaznak a mikroszkópos vizsgálatok során a sejtmag és a további DNS-t tartalmazó sejtszervecskék láthatóvá tételére. A PrI nem képes penetrálni az élő, intakt sejtek membránját.

Jelen munkánk célja, különböző falösszetételű, epitél sejtekbe penetrálódni képes liposzómális formulációk kutatása és fejlesztése, valamint azok gyógyszer technológiai vizsgálata volt. Továbbá propidium-jodid sejtmagfesték liposzómába zárásával és fluoreszcens mikroszkópos ellenőrzéssel vizsgáltuk a minták sejtpenetrációs-képességét.

A kísérletes munka

Anyagok

A liposzómák előállításánál során falalkotó komponensként Phospholipon 90G[®] lipid keveréket (Phospholipid GmbH, Köln, Németország), koleszterin (Molar Chemicals Kft., Budapest, Magyarország) és 96%-os etanol (Molar Chemicals Kft., Budapest, Magyarország) felhasználásával készített 1,25 mg/ml koncentrációjú koleszterin oldatot, N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilammónium-klorid (DOTAP-Cl) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) és L- α -foszfatidiletanolamin-dioleoil (PE) foszfolipideket (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) alkalmaztunk. Oldószerként 10 ml 96%-os etanolt (Molar Chemicals Kft., Budapest, Magyarország), beoldóközegként 30 ml pH=7,4-es szűrt foszfát puffert (PBS) használtunk.

Jelölőanyagként 0,60 ml, 1 mg/ml koncentrációjú, propidium-jodidból (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) készített törzsoldatot alkalmaztunk.

Kísérleteink során az *I. táblázatban* látható 3 összetétellel dolgoztunk. A „hagyományos” összetétel csak Phospholipon 90G[®] lipidkeverékből és koleszterinből állt. A DOTAP-Cl-t tartalmazó összetétel a Phospholipon 90G[®] lipidkeveréken és a koleszterinen kívül DOTAP-Cl-ot, azaz egy kationos foszfolipidet is tartalmazott, amely foszfolipid irodalmi adatok alapján fuzogén liposzómákat képez, ezáltal elősegíti a liposzómák és az epitél sejtek sejtmembránjának az egyesülését [35, 36]. A PE-t tartalmazó összetétel a Phospholipon 90G[®] lipidkeverék és a koleszterin mellett foszfatidil-etanolamint is tartalmazott. Kísérleti eredmények alapján, a foszfatidil-kolinnal készített mintákkal összehasonlítva, a PE csökkenteti a liposzómák méretét [37], így alkalmazásával egyszerűbb lehet az intravénás készítményeknél ajánlott 100 nm alatti mérettartomány elérése.

Módszerek

Liposzómák előállítása

A liposzómák előállítása lipidfilm-hidratációs technikával történt. A DOTAP-Cl-, és a PE-tartalmú összetételek esetében előállítottunk PrI-ot a belső, és kontrollként a külső fázisban tartalmazó mintákat is.

Az előre meghatározott mennyiségű Phospholipon 90G[®] lipidkeverék, a koleszterin oldat és esetenként a választott további foszfolipid komponensek összemérésével elkészítettük a lipidszuszpenziókat (*I. táblázat*), majd 10 ml 96%-os etanollal oldatos formává alakítottuk azokat. A lipidfilmet 65°C-on, 25 rpm forgási sebesség mellett Rotavapor[®] R-210/215 vákuumbepárló készülék segítségével (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svájc) készítettük el. A PrI-ot belső fázisban tartalmazó minta esetében a lipidfilm hidratálása a 30 ml pH=7,4 szűrt foszfát puffer és a 0,60 ml PrI törzsoldat elegyével történt. A folyadék hatására a lipidfilmből vezikulák keletkeztek, így a liposzómák belső fázisába került a jelölőanyagot tartalmazó oldat, amelyet a külső fázisban maradt PrI-tartalomtól az előállítás egy későbbi lépésében ultracentrifugálással és mosással különítettünk el. A PrI-ot külső fázisban tartalmazó kontroll minta hidratálására 30 ml pH=7,4-es foszfát

I. táblázat

A vizsgált liposzómális formulációk összetétele

Liposzóma összetétel	„hagyományos”	DOTAP-Cl-ot tartalmazó	PE-t tartalmazó
Phospholipon 90G® (mg)	95	90	90
Koleszterin oldat (ml)	5	4	4
DOTAP-Cl (mg)	-	5	-
PE (mg)	-	-	5

puffert használtunk. Az így kapott lipid-szuszpenzióhoz a 0,60 ml PrI törzsoldatot csak az ultrahangozás után adtuk hozzá, így ezek a minták jelölőanyagot csak a külső fázisban tartalmaztak. A beoldóközeg elegyítését követően 15 pernyi, 48 kHz-en végzett ultrahangozással (Elma Transsonic Digital S D-78224 kád ultrahangozó készülék, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Németország) segítettük a lipidfilm hidratációját, amely folyamat során a spontán szerveződött multilamelláris vezikulákból nagyméretű unilamelláris liposzómák alakultak ki. A liposzómák méretformázására 0,45 µm-es (Millipore® SLHV033NS Millex® HV Syringe Filter with Durapore® PVDF Membrane), illetve 0,22 µm-es (FilterBio PES Fecskendőszűrő, FilterBio Membrane Co. Ltd., Lab-Ex Laborkereskedelmi Kft, Budapest, Magyarország) pórusátmérőjű membrán-szűrőket használtunk, amely folyamat eredményeként kisméretű unilamelláris vezikulákat kaptunk. A PrI-ot belső fázisban tartalmazó mintákat 4°C-on, 2-szer 30 percig 123 000 rcf-es forgási sebesség mellett ultracentrifugáltuk Thermo Scientific Sorvall wX+ Ultra Series Centrifuge készülékkel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA). A 2. ultracentrifugálási ciklus után a pelleteket 4 ml pH=7,4-es szűrt foszfát pufferrel hígítottuk fel, majd a sterilitás biztosítása érdekében lamináris boxban (Scanlaf Mars Class 2 Cabinet, LaboGene ApS., Allerød, Dánia) 0,22 µm pórusátmérőjű membrán-szűrő segítségével üvegfiolekba szűrtük. Az elkészített mintákat fénytől védve, gondosan lezárt tárolóedényekben, 2-8°C között tároltuk.

Vizsgálatok

A liposzómális formulációk gyógyszer technológiai paramétereinek vizsgálata

Bezárási hatékonyság vizsgálata

A PrI-ot belső fázisban tartalmazó minták esetében vizsgáltuk az adott falösszetételek alkalmazásával elérhető legnagyobb bezárási hatékonyságot. A vizsgálat indirekt módon ultracentrifuga

(Thermo Scientific Sorvall wX+ Ultra Series Centrifuge készülék, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) és spektrofotométer (Thermo Spectronic Unicam Helios Alpha UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) használatával történt.

Az 1 mg/ml koncentrációjú PrI törzsoldat hígításával kapott oldatok segítségével kalibráló egyenest vettünk fel, amely egyenes egyenlete a következő: $0x^2+88,89x-0,01239=0$, $r^2=0,9999$. Az ultracentrifugálás során gyűjtött felülúszó abszorbanciáját 289 nm-en határoztuk meg. Az oldatok sűrűségét Anton Paar Density Meter DMA™ 35 hordozható sűrűségmérővel (Anton Paar GmbH, Graz, Ausztria) mértük meg. Az abszorbancia, ezáltal a koncentráció, továbbá a térfogat értékek ismeretében meghatároztuk a felülúszóban maradt PrI mennyiséget ($m_{PrI(felülúszó)}$), majd ennek az értéket kivonva az előállításakor bemért PrI tömegéből ($m_{PrI(össz)}$) megkaptuk a liposzómákba bezárt sejt-magfesték tömegét, illetve annak ismeretében kiszámítottuk a bezárási hatékonyságot.

$$\text{bezárási hatékonyság} = \frac{m_{PrI(össz)} - m_{PrI(felülúszó)}}{m_{PrI(össz)}} \times 100\%$$

Részecskeméret-meghatározás, polidiszperzitási index és zeta-potenciál mérés

A vezikulák méretét, a minták polidiszperzitási index (PdI) és zeta-potenciál értékeit Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Anglia) dinamikus fényszórás-mérése (dynamic light scattering=DLS) alapuló részecskeméret analízátorral (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Anglia) határoztuk meg szobahőmérsékleten 1,330-as refrakciós index érték mellett.

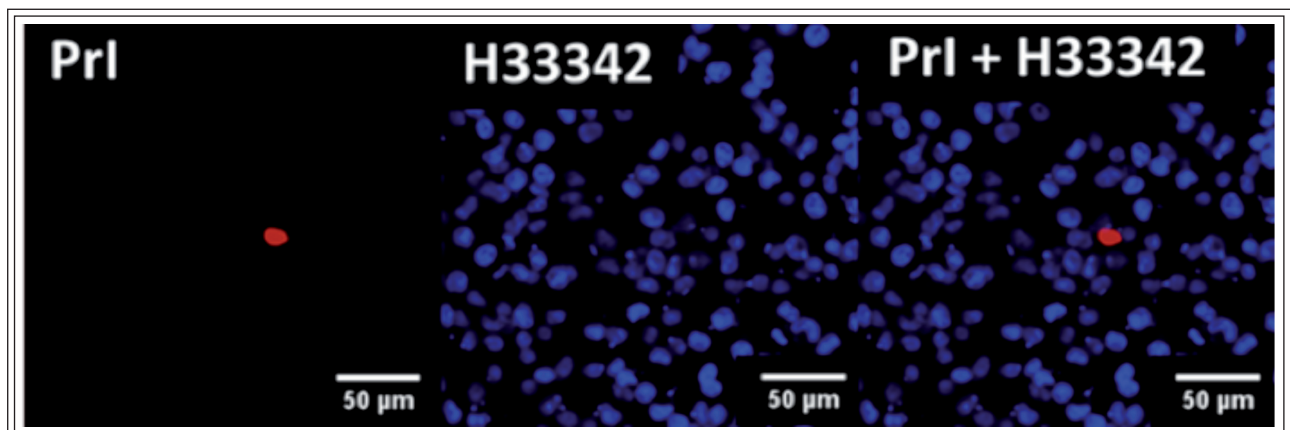
Liposzómális formulációk sejtpenetrációs képességének vizsgálata

A PrI-tartalmú liposzómák sejtpenetrációs képességét a könnyebb fenntarthatóság és a pancreas ductus sejtekhez való hasonlóság alapján HEK-293T (American Type Culture Collection) humán

vese epitél sejtvonalon vizsgáltuk. A sejtek tenyésztése 30 mm átmérőjű, üvegaljú petricsészékben történt. A sejtek HEPES pufferben (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glükóz, 10 mM Na-HEPES) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország), illetve 10% FBS-sel (fetal bovine serum = magzati borjú szérum) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok), 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillin G-vel és 100 µg/ml sztreptomocinnal kiegészített DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium = Dulbecco által módosított Eagle médium) (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok) tápoldatban növekedtek. A sejt kultúrákat 37°C-on 5% CO₂

jelenlétében tartottuk. A kísérletekhez 70-90% konfluenciát elérő tenyészeteket használtunk.

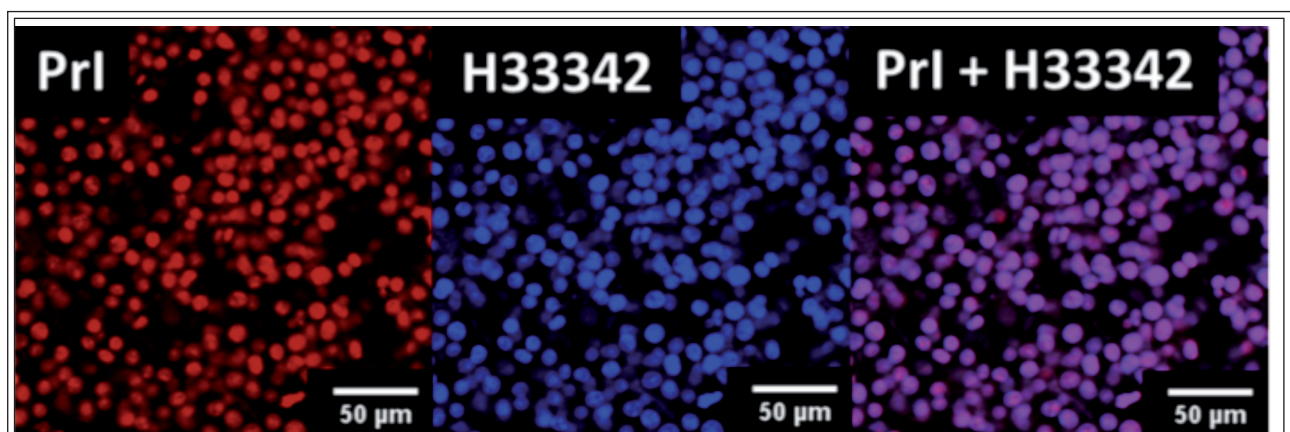
A sejtek kezeléséhez a liposzómákat tartalmazó mintákat 4-szeresre, illetve 10-szeresre hígítva alkalmaztuk a „hagyományos összetétel”, továbbá 0,7 µg/ml végső PrI koncentrációra hígítva használtuk a speciális falalkotókat (DOTAP-Cl vagy PE) tartalmazó formulációk esetében. Három-három párhuzamos kezelés történt csoportonként. A kezeléseket megkezdését követően 60, illetve 120 percnél Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország) képet készítettünk a sejtekről (n=3-4). A felvételeket az ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) program segítségével bináris



1. ábra: A negatív kontroll, azaz az alap PrI penetráció meghatározása

A bal oldali ábrán PrI-dal, a középsőn Hoescht 33342-vel kezelt sejtek láthatóak.

A jobb oldali ábrát a két kép egyesítésével kaptuk. (PrI: propidium-jodid, Hoechst 33342: 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazin)-2,5'-bi-1H-benzimidazoltrihidroklorid-trihidrát)



2. ábra: A pozitív kontroll meghatározása

A sejtek 1%-os Triton X-100-zal, PrI-dal, és Hoechst 33342-vel voltak kezelve. A bal oldali ábrán csak a PrI-dal, a középsőn pedig a Hoechst 33342-vel festett sejtek láthatóak. A jobb oldali ábrát a két kép egyesítésével kaptuk, és az összes festődött sejtet mutatja.

(1%-os Triton X-100 (polietilén-glikol-mono-p-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenil-éter, PrI: propidium-jodid, Hoechst 33342: 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazin)-2,5'-bi-1H-benzimidazoltrihidroklorid-trihidrát)

II. táblázat

A különböző falalkotó összetételek alapján készített liposzómális formulációk hatóanyag-tartalom meghatározásának és műszeres vizsgálatainak eredményei

(PdI = polidiszperzitási index, PrI = propidium-jodid)

Minta	PrI koncentráció (mg/ml)	Átlagos átmérő (d.nm)	PdI	Zeta potenciál (mV)
„hagyományos”	19,60	97	0,282	-3,92
DOTAP-Cl, PrI külső fázisban	19,60	102	0,264	6,37
DOTAP-Cl, PrI belső fázisban	4,69	66	0,268	7,92
PE, PrI külső fázisban	19,60	92	0,355	-1,25
PE, PrI belső fázisban	7,44	105	0,380	-2,49

képpé alakítottuk, majd meghatároztuk a PrI által megfestett, fluoreszcensen pozitív területek nagyságát. A PrI-tartalmú liposzómák sejtpenetrációs képességének meghatározásához összehasonlítási alapként kontroll vizsgálatokat is végeztünk. Az eredmények kiértékeléséhez imitáltuk a negatív, illetve a pozitív kontroll esetében kapható válszokat (1. és 2. ábra).

Eredmények

A liposzómális formulációk gyógyszer technológiai paramétere

A bezárási hatékonyság (hatóanyag-tartalom), az átlagos átmérő, a polidiszperzitási index, valamint a zeta-potenciál meghatározásának eredményeit a II. táblázat foglalja össze.

Hatóanyag-tartalom

A hatóanyag-bezárás mértéke függ a lipid kettős-réteg természetétől, az adott anyag részecskeméretétől, az olaj-víz megoszlási hányadostól és a lipid membránnal szemben mutatott viselkedésétől. A liposzómális hatóanyag-szállítás mechanizmusát és mértékét erősen befolyásolja a vezikulák felszínének zeta-potenciál értéke is. A bezárási hatékonyság függ a bezárni kívánt anyag polaritásától és lipofil/hidrofil természetétől, amely az anyag liposzómákban való elhelyezkedését is meghatározza. Amennyiben a hatóanyag hidrofób, a liposzómákat alkotó foszfolipidek acilezett szénhidrogén láncai között helyezkedik el, így az anyag bezárási hatékonyságára befolyásoló hatással van a szénláncok hossza és sűrűsége, illetve a hatóanyag-lipid arány változása is. A hidrofil hatóanyag a liposzómák közepén található vizes közeget magban, illetve a foszfolipidek poláris feji csoportjához közel található meg. A liposzómába

zárt hatóanyagok biohasznosulása csak a vezikulából való felszabadulás után következik be. A megfelelő terápiás hatás elérése céljából lényeges lépés a hatóanyag-leadás optimalizációja [38].

Méréseink során a II. táblázatban bemutatott hatóanyag-tartalom értékeket kaptuk. A PrI-ot külső fázisban tartalmazó formulációk esetében a minták hatóanyag-tartalmát 100%-osnak vettük. A PrI-ot belső fázisban tartalmazó DOTAP-Cl-os összetétel esetében ez az érték 24%, a PE-t tartalmazó formulációnál 38% lett, tehát ez utóbbi esetben tudtunk nagyobb bezárási hatékonysággal dolgozni.

Részecskeméret (átlagos átmérő)

A liposzóma alapú hatóanyag-hordozó rendszerek alapvető fizikai jellemzője a részecskék mérete, amely meghatározza a nanohordozó rendszerrel elérhető sikereket. Különböző méretű liposzómákkal végzett kísérletek eredményeire alapozva a kutatók arra a megállapításra jutottak, hogy a 100 nm-nél kisebb átmérőjű intravénásan alkalmazott vezikulák esetében csökken a plazma proteinek és a liposzómák között lejátszódó interakciók száma, így ezek a részecskék elkerülnek a retikuloendotheliális rendszer elimináló mechanizmusát, ezáltal megnövekszik a vérben mérhető féleletidejük, továbbá képesek passzívan akkumulálódni a tumorban [38, 39]. Megállapítást nyert az a tény is, hogy a nagyobb méretű liposzómák gyorsabban eliminálódnak a véráramból, viszont a méret csökkentésével csökken a vezikulák által bezárható hatóanyag mennyisége is [38].

Mіндеzen információk alapján kísérletünk során mi is törekedtünk a 100 nm-es mérethatár alatti vezikulákat tartalmazó formulációk előállítására. A mérésünk során kapott átlagos részecskéátmérő értékeket megvizsgálva az alábbi következtetéseket tudtuk levonni. A „hagyományos” ösz-

szetétel (97 nm), a PrI-ot belső fázisban tartalmazó DOTAP-Cl-tartalmú minta (66 nm), illetve a festéket külső fázisban tartalmazó PE-tartalmú formuláció (92 nm) esetében sikerült a 100 nm alatti vezikulaméretet elérnünk. A PrI-ot külső fázisban tartalmazó DOTAP-Cl-os összetétel (102 nm) és a festéket bezáró PE-os minta (106 nm) esetében a részecskék mérete kis mértékben meghaladta a 100 nm-es elméleti határértéket. A vizsgált minták közül a PrI-ot belső fázisban tartalmazó DOTAP-Cl-tartalmú összetétel esetében mértük a legkisebb átlagos átmérő értéket (66 nm-t), tehát ez az összetétel felelt meg leginkább az elvárásainknak, intravénás felhasználásra ezt a formulációt lehetne alkalmazni.

Polidiszperzitási index

A minták előállításánál során célunk volt, hogy monodiszperz rendszereket hozzunk létre, ezért az eredményeinket $PdI < 0,30$ alatt tekintettük megfelelőnek.

A „hagyományos” összetétel ($PdI=0,282$), illetve a DOTAP-Cl-tartalmú minták esetében (PI külső fázisban: $PdI=0,264$; belső fázisban: $PdI=0,268$) sikerült $0,30$ alatti PdI -szel rendelkező rendszereket előállítanunk. A PE-t tartalmazó formulációk monodiszperzitása adódott a legalacsonyabbnak, ezekben az esetekben a PdI meghaladta a $0,30$ -as értéket (PI külső fázisban: $PdI=0,355$; belső fázisban: $PdI=0,380$). A leginkább monodiszperz rendszernek a festékanyagot be nem záró DOTAP-Cl-os falösszetételű formuláció bizonyult ($PdI=0,264$). A sejtpenetrációs vizsgálatokra alkalmazható, tehát PrI-ot belső fázisban tartalmazó minták közül az igényeinknek megfelelő homogen méreteloszlást a „hagyományos” és a DOTAP-Cl-ot tartalmazó összetételek alkalmazásával tudtuk elérni.

Zeta-potenciál

Az általunk előállított minták zeta-potenciál értékeit megvizsgálva az alábbi megfigyeléseket tettük. A „hagyományos” minta zeta-potenciál értéke negatív, $-3,92$ mV volt. A PE-tartalmú összetétel vizsgálatakor kapott zeta-potenciál értékek szintén negatívnak bizonyultak, $-1,25$ mV-ot mértünk a PrI-ot külső, illetve $-2,49$ mV-ot a belső fázisban tartalmazó minták esetében. A DOTAP-Cl-ot, ismert kationos foszfolipidet tartalmazó összetétel esetében a zeta-potenciál értékek alátámasztották, hogy a várt módon kationos liposzómákat sikerült

előállítanunk. Ekkor a PrI-ot külső fázisban tartalmazó minta esetében $+6,37$ mV-os, míg a belső fázis esetén $+7,92$ mV-os értékeket mértünk.

Megállapíthatjuk, hogy a felületi töltés és a biológiai hasznosíthatóság közötti összefüggések alapján mintáink közül a DOTAP-Cl-ot tartalmazó, PrI-ot bezáró minta felel meg leginkább az elvárásainknak.

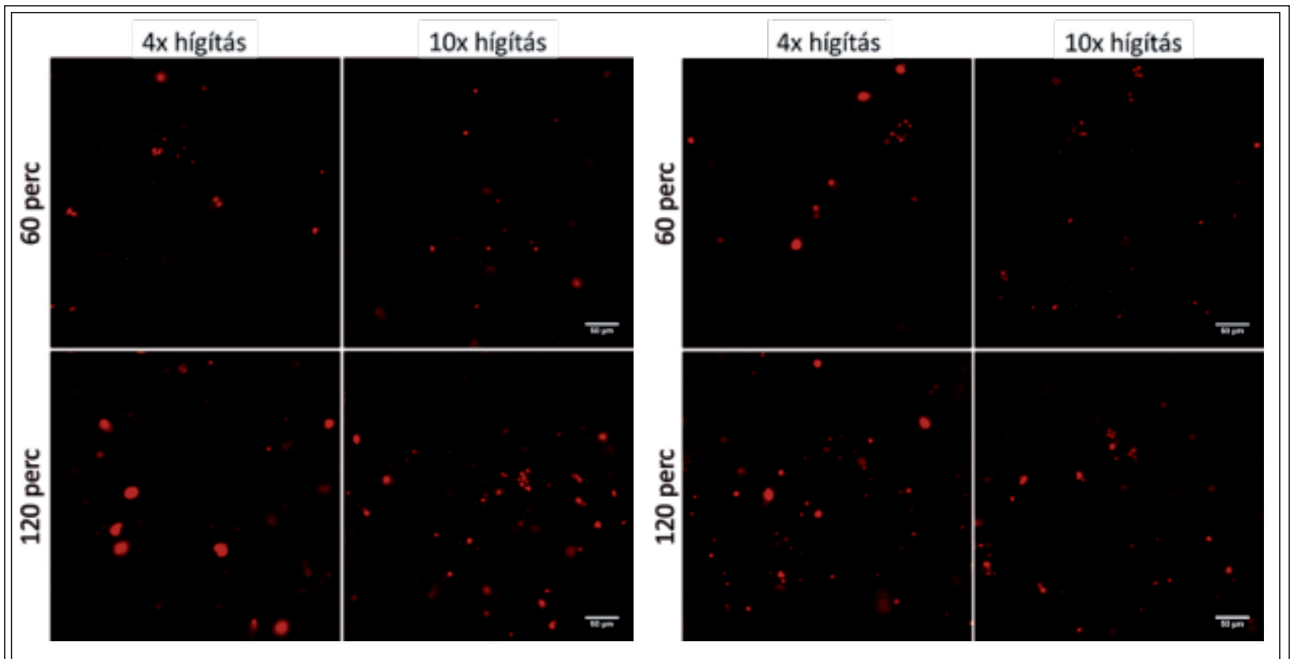
Liposzómális formulációk sejtpenetrációs képessége

A formulációk sejtpenetrációs képességének meghatározásához összehasonlítási alapként kontroll vizsgálatokat is végeztünk.

A negatív kontrollhoz élő, kezeletlen és intakt sejtmembránnal rendelkező sejteket használtunk, amelyekbe a PrI elhanyagolható mértékben tud bejutni. A sejteket Hoechst 33342 (2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazin)-2,5'-bi-1H-benzimidazoltrihidroklorid-trihidrát) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) sejtmagfestéssel, majd $0,7$ $\mu\text{g/ml}$ PrI-dal (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) festettük meg. A Hoechst 33342 festék képes az ép és a sérült sejtmembránon is átjutni, ezáltal minden sejtmagot megfest, míg a PrI csak a sérült membránon keresztül penetrál. A Hoechst 33342-vel kapott képen megállapítható az összes sejt száma, míg a PrI csak az elpusztult sejteket festette meg (**1. ábra**).

A pozitív kontroll esetében kapható válasz eléréséhez a sejteket 1%-os Triton X-100 (polietilén-glikol-mono-p-(1,1,3,3-tetrametil-butyl)-fenil-éter), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) tartalmú detergenssel kezeltük, amely az összes sejt membránját feloldotta. A sérült sejtmembránnal rendelkező sejteket először $1,25$ $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazin)-2,5'-bi-1H-benzimidazoltrihidroklorid-trihidrát) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) sejtmagfestéssel, majd $0,7$ $\mu\text{g/ml}$ PrI-dal (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) festettük meg. A két festéket együtt alkalmazva megállapíthatjuk az összes sejt számát, valamint a PrI összes sejtre vonatkozó százalékos penetráció értékét (**2. ábra**).

A „hagyományos” összetételű, továbbá a DOTAP-Cl-, illetve a PE-tartalmú liposzóma mintákkal végzett sejtkelések eredményét Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal ellenőrizve az alábbi felvételeket (**3. ábra**) készítettük, amelyekből a lentebb olvasható következtetéseket tudtuk levonni.



3. ábra: A „hagyományos” összetétel alapján készített mintával kezelt sejtekről konfokális mikroszkóppal készített felvételek. A bal oldali képeket HEPES pufferrel, a jobb oldaliakat FBS-DMEM közeggel előkészített sejtekről készítettük a 60. és a 120. percnél. A felvételek között változott a PrI-tartalmú liposzómális formulációk hígításának mértéke (4-szeres és 10-szeres).

(HEPES: (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glükóz, 10 mM Na-HEPES) puffer, FBS-DMEM: 10% FBS (fetal bovine serum = magzati borjú szérum)-tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium = Dulbecco által módosított Eagle médium), PrI: propidium-jodid)

III. táblázat

A különböző összetételek alapján készített minták vizsgálatokor festődött területek nagysága
A teljes képterület: 180 710 μm² (HEPES: HEPES (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glükóz, 10 mM Na-HEPES) puffer, FBS-DMEM: 10% FBS (fetal bovine serum = magzati borjú szérum)-tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium = Dulbecco által módosított Eagle médium), PrI=propidium-jodid)

Festődött terület nagysága (%)				
Kezelési idő; tápfolyadék	60 perc; FBS-DMEM		120 perc; FBS-DMEM	
Kontroll	0,043±0,012			
Triton X-100	22,912±13,929			
Kezelési idő	60 perc		120 perc	
Közeg	HEPES	FBS-DMEM	HEPES	FBS-DMEM
„hagyományos” 4X	0,701±0,142	0,648±0,311	1,663±0,676	1,991±0,033
„hagyományos” 10X	0,621±0,298	0,545±0,061	1,527±0,438	0,895±0,307
Kezelési idő; tápfolyadék	60 perc; FBS-DMEM		120 perc; FBS-DMEM	
DOTAP-Cl, PrI külső fázisban	0,175±0,114		0,228±0,105	
DOTAP-Cl, PrI belső fázisban	0,046±0,023		0,046±0,032	
PE, PrI külső fázisban	0,239±0,175		0,729±0,595	
PE, PrI belső fázisban	0,022±0,004		0,014±0,005	

A „hagyományos” összetétel alapján készített mintákkal kétféle hígításban (4-szeres és 10-szeres) kezeltük a HEK-293T sejteket. A minták sejtpenetrációs képességét a teljes képterülethez (180 710 μm²) viszonyított festett terület arányá-

ban vizsgáltuk (III. táblázat). A legjobb eredményeket a 4-szeres hígítás esetében értük el. (HEPES puffer esetén 1,663±0,676%, FBS-DMEM közeg alkalmazásakor 1,991±0,033% képterület jelzett festődést.) Kétféle médiumot használtunk a sejteknél:

HEPES puffert, illetve 10% FBS-tartalmú DMEM közeget.

A **III. táblázatban** közölt értékeket megvizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a különböző közegek alkalmazása nem befolyásolja számottevő módon a PrI sejtekbe való bejutását. Változtattuk a kezelési időket is. 60, illetve 120 percig vetettük alá festésnek a sejteket. Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a PrI-ot időfüggő módon veszik fel az epitél sejtek. Ugyanígy vizsgáltuk a DOTAP-Cl-ot, illetve PE-t tartalmazó mintákat is, ahol a formulációkat egységesen 0,70 µg/ml PrI tartalomra hígítva kezeltük a HEK-293T sejteket. Az elkészült felvételek és a mérési eredmények (**III. táblázat**) alapján megállapítottuk, hogy ezen összetételek esetén a sejtek csak nagyon csekély mértékben vették fel a sejtmagfestéket.

A sejtpenetrációs-képesség vizsgálatával kapott eredmények összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy előkísérleteket végeztünk, amelyek során azt vizsgáltuk, hogy be lehet-e juttatni egy modellt vegyületet vagy egy hatóanyagot liposzómák segítségével epitél sejtekbe. A kontroll kísérleteink működtek. Megállapítottuk, hogy a PrI-ot, mint modell vegyületet időfüggő módon veszik fel az epitél sejtek, mivel a 60 percnyi kezelést követően mért festődés mértéke jelentősen elmaradt a 120 perc után mért értékekhez képest. A sejtek előkezelésére használt tápfolyadék minősége (HEPES puffer vagy 10% FBS-tartalmú DMEM közeg) nem befolyásolja jelentős mértékben a PrI sejtekbe való bejutását, azonban a körülmények optimalizálása érdekében a magasabb értékeket adó FBS-DMEM közeget alkalmaztuk a továbbiakban. A legjobb sejtpenetrációs értékeket a „hagyományos” (Phospholipon 90G® lipidkeverékből és koleszterin oldatból álló) formuláció alkalmazásakor kaptuk.

Összefoglalás

Jelen cikkben epitél sejtekbe penetrálni képes liposzóma alapú hatóanyag-hordozó-rendszerek előállításai és vizsgálati módszereit mutattuk be.

A kísérletes munka során különböző falösszetételű, az epitél sejtekbe penetrálni képes liposzómális formulációkat állítottunk elő. A PrI sejtmagfestéket bezáró liposzóma-tartalmú minták sejtpenetrációs-képességének vizsgálatával ellenőriztük, hogy az epitél sejtek eléréséhez megfelelő gyógyszerhordozó rendszert és összetételt választottunk-e ki. Előkísérleteink során bebizonyítottuk, hogy liposzómák segítségével be lehet juttatni modell vegyületet epitél sejtekbe. Ezen folyamat ellen-

őrzésére működőképes kontroll kísérletet hoztunk létre. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a PrI időfüggő módon jut be a liposzómákból az epitél sejtekbe. Ezt a sejtpenetrációt szignifikáns mértékben nem befolyásolja a vizsgálandó sejtek kezeléséhez alkalmazott tápfolyadék (HEPES puffer vagy FBS-DMEM médium) minősége. Kísérleteink során sejtpenetrációs-képesség szempontjából a legjobb eredményt a „hagyományos” (csak Phospholipon 90G® lipidkeverékből és koleszterinből álló) liposzóma falösszetétellel értük el.

A most bemutatásra került vizsgálatok egy komplex kísérletsorozat részét képezik. A jövőben további, a pancreas sejtek penetrálására képes vezikula összetételeket szeretnénk meghatározni, azok alapján a liposzómákat előállítani és megvizsgálni, majd kiválasztani a célunknak leginkább megfelelő formulációt. Törekvésünk távolabbi célja az akut pankreatitisz során bekövetkező mitokondriumkárosodáshoz köthető, a betegség lefolyásában meghatározó szerepet betöltő ATP-szint csökkenés kompenzálására használható, ATP molekula szervezetbe juttatására alkalmas liposzómális formulációk előállítása, ezáltal ATP bejuttatása a hasnyálmirigy acinus és ductus sejtjeibe.



A CIKK Az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

A munka létrejöttét segítették az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 és az EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 számú pályázatok.

Hegyvi Péter munkásságát az LP2014-10/2014 Lendület pályázat támogatja.

Irodalomjegyzék

1. Jójártné Laczkovich, O., Bónis, E., Szabóné Révész, P.: *Gyógyszerészet* 59, 6-14 (2015)
2. Budai, M., Szógyi, M.: *Acta Pharmaceutica Hungarica* 71, 114-118 (2000)
3. Bozó, T., Pál, Sz., Dévay, A.: *Acta Pharmaceutica Hungarica* 78, 103-109 (2008)
4. Dér, K., Szabóné Révész, P., Sipos, P.: *Gyógyszerészet* 59, 1-8 (2015)
5. Maléth, J., Rakonczay, Z., Venglovecz, V., et al.: *Acta Physiologica* 207, 226-235 (2013)
6. Szentesi, A., Tóth, E., Bálint, E., et al.: *PLoS One* 11, 1-16 (2016)
7. Abu-El-Haija, M., Gukovskaya, A. S., Andersen, D. K., et al.: *Pancreas* 47, 1185-1192 (2018)
8. Peery, A. F., Dellon, E. S., Lund, J., et al.: *Gastroenterology* 143, 1179-1187 (2012)
9. Maléth, J., Hegyi, P., Rakonczay, Z., et al.: *Pancreatology* 15, 18-22 (2015)

10. Hritz, I., Czakó, L., Dubravcsik, Zs., et al.: *Orvosi Hetilap* 7, 244261 (2015)
11. Working Group IAP/APA Acute Pankreatitis Guidelines: *Pancreatology* 13, 1–15 (2013)
12. Banks, P. A., Bollen, T. L., Dervenis, C. et al: *Gut* 62, 102–111 (2013)
13. Acevedo-Piedra, N. G., Moya-Hoyo, N., Rey-Riveiro, M. et al: *Clin Gastroenterol Hepatol* 12, 311–316 (2014)
14. Pongprasobchai, S., Vibhatawata, P., Apisarnthanark, P.: *Gastroenterol Res Pract* 1–7 (2017)
15. Párniczky, A., Kui, B., Szentesi, A. et al: *PLoS One* 11, 1–19 (2016)
16. Young, S. P., Thompson, J. P.: *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 8, 125–128 (2008)
17. Kiss, L., Fűr, G., Mátrai P., et al.: *Sci Rep* 8, 1–14 (2018)
18. Meczker, Á., Mikó, A., Hegyi P.: *J Gastrointestin Liver Dis* 27, 189–194 (2017)
19. Hayden, P., Wyncoll, D.: *Curr Anaesth Crit Care* 19, 1–7 (2008)
20. Venglovecz, V., Rakonczay, Z., Ozsvári, B., et al.: *Gut* 57, 1102–1112 (2008)
21. Judák, L., Hegyi, P., Rakonczay, Z., et al.: *European Journal of Physiology* 466, 549–562 (2014)
22. Maléth, J., Balázs, A., Pallaqi, P., et al.: *Gastroenterology* 148, 427–39, (2015)
23. Mosztbacher, D., Farkas, N., Solymár, M., et al.: *World J Gastroenterol* 23, 957–963 (2017)
24. Márta, K., Farkas, N., Szabó, I.: *Int J Mol Sci* 17, 1–12 (2016)
25. Márta, K., Szabó, A. N., Pécsi, D., et al.: *BMJ Open* 7, 1–9 (2017)
26. Levchenko, T. S., Hartner, W. C., Verma, D. D., et al.: ATP-Loaded Liposomes for Targeted Treatment in Models of Myocardial Ischemia. In: Weissig, V. (ed) *Liposomes*. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. pp. 361–375.
27. Liang, W., Levchenko, T. S., Torchilin, V. P.: *J Microencapsul* 21, 251–261 (2004)
28. Dvorianchikova, G., Barakat, D. J., Hernandez, E., et al.: *Mol Vis* 16, 28822890 (2010)
29. Puisieux, F., Fattal, E., Lahiani, M., et al.: *J Drug Target* 2, 443–448 (1994)
30. Hartner, W. C., Verma, D. D., Levchenko, T. S., et al.: *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1, 530–539 (2009)
31. Laham, A., Claperon, N., Durussel, J. J., et al.: *Pharmacol Res Commun* 20, 699–705 (1988)
32. Atchison, N., Swindlehurst, G., Papas, K. K., et al.: *Biomater Sci* 2, 548 (2014)
33. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., et al.: *J Histochem Cytochem* 45, 49–53 (1997)
34. <https://www.caymanchem.com/msdss/14289m.pdf> [2018. 02. 25.] Cayman Chemical; online. Safety Data Sheet: Propidium Iodide
35. Csiszár, A., Hersch, N., Dieluweit, S., et al.: *Bioconjug Chem* 21, 537–543 (2010)
36. Vincourt, V., Nguyen, L., Chaumeil, J-C., et al.: *Cryobiology* 60, 262–270 (2010)
37. Akizuki, H., Kaneko, T.: *Biophys J* 110, 71 (2016)
38. Bozzuto, G., Molinari, A.: *Int J Nanomedicine* 975 (2015)
39. Fanciullino, R., Ciccolini, J.: *Curr Med Chem* 16, 4361–4371 (2009)

Érkezett: 2018. október 23.

A transzmukozális hatóanyagbevétel biofarmáciai és formulálási szempontjai

PÁPAY ZSÓFIA EDIT, FARKAS DÓRA, BUDAI LÍVIA, BALOGH EMESE, ANTAL ISTVÁN

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészeti Intézet, 1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 7.
Levelezési cím: antal.istvan@pharma.semmelweis-univ.hu

Summary

Pápay Zs.E., Farkas D., Budai L., Balogh E., Antal I.: **Biopharmaceutical and formulations aspects of transmucosal drug delivery**

Mucus is a complex viscoelastic fluid that lubricates, protects and moisturizes the mucosal surfaces such as the human lungs, gastrointestinal tract, and eyes. It serves as a physical barrier against pathogens and foreign particles from the environment. Rheological characterization of mucus contributes to understand the mucus physiology and pathology and it is also important in the development of drug delivery systems designed for use at mucosal surfaces. The present review provides a short overview of the most important findings of mucosa layers and recent strategies in the design of efficient drug delivery systems.

Keywords: mucosa, mucin, physicochemical and rheological attributes, viscoelasticity,

Összefoglalás

A nyálka (mukóza) egy komplex viszkoelasztikus folyadék, ami lubrikálja, védi és hidratálja a tüdő, a gasztrointesztinális traktus és a szem nyálkahártyáit. Fizikai barrierként véd a patogének és a környezetből származó idegen részecskék ellen. A nyálka reológiai tulajdonságainak megismerése hozzájárul a fiziológiás és patológias szerepének megértéséhez, valamint a transzmukozális gyógyszerformák fejlesztéséhez. Ezen cikk egy rövid áttekintést ad a mukozális rétegekkel kapcsolatos legfontosabb eredményekről és a hatékony transzmukozális hatóanyagbevétel tervezésének korszerű módszereiről.

Kulcsszavak: mukóza, mucin, fizikai-kémiai és reológiai jellemzők, viszkoelaszticitás

A mukozális barrier jelentősége és tulajdonságai

A nyálka (mukóza) szinte minden szervben megtalálható, mely a külvilággal érintkezik, például szem- és ornyálkahártya, szájüreg, reproduktív szervek és a tüdő. Ezen kívül az egész gasztrointesztinális traktust és a belső szerveket is borítja. Ez az epithelium sejteket borító, szelektív barrier funkciót betöltő biopolimer a szükséges gázokat és a tápanyagokat átengedi (szemipermeábilis), de a patogénnel szemben védelmet nyújt [1]. Összetételét tekintve 90-95% víz, 2-5% mucin (komplex glikoproteinek), 1-2% lipid és 1% elektrolitok. 0,02%-ban tartalmaz DNS-t és védő szerepet betöltő fehérjéket (pl.: immunglobulinokat) [2]. A nyálka pontos összetétele az adott szervtől, ezáltal funkciójától függ.

Az egyes szervekben található mukozális barrier fontosabb funkcióit és tulajdonságait az **I. táblázat** foglalja össze [3].

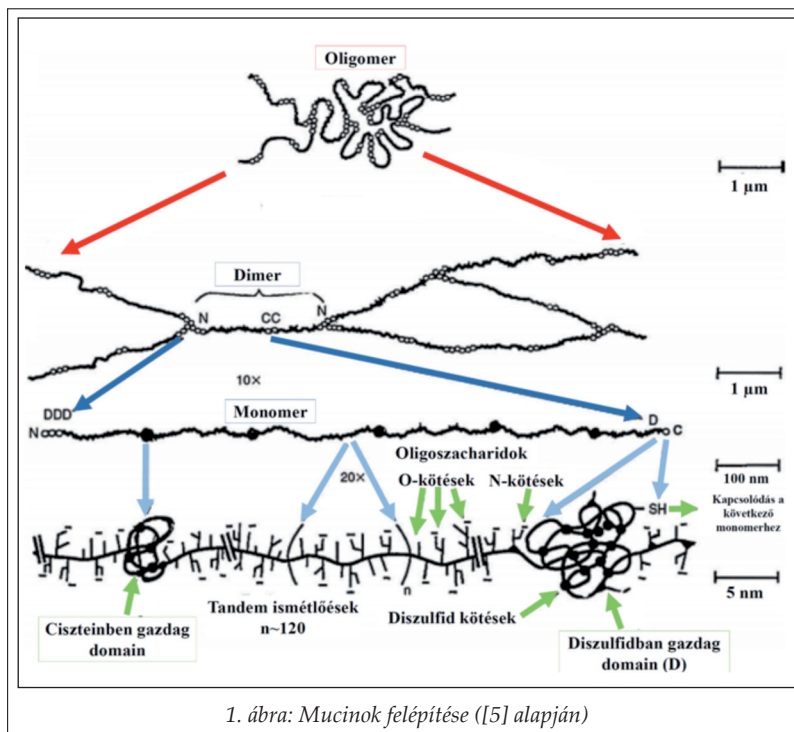
Feladatai közé tartozik a lubrikáció, a hidratálás és a védelem [3]. Továbbá legtöbb szervben tisztító szerepet is betölt, hiszen rendkívül adhezív. A nyálka eliminációjával (pl.: pislogás vagy köhögés)

a beletapadt részecskék és kórokozók távoznak a szervezetből. A mukóza folyamatosan termelődik, majd megemésztődik vagy távozik a szervezetből. Átlagosan 5 mm/perc sebességgel mozog és 20 percenként megújul az adott felületen. Mivel a clearance mechanizmus folyamatos, ezért a nyálkában kulcsfontosságú szerepet betöltő, nagy molekulatömegű mucinok termelődése állandó [4]. A mucinok szerkezetüket tekintve glikoproteinek, tehát az őket felépítő fehérje egyes aminosavaihoz (főleg szerin és treonin) kovalens kötéssel szénhidrát láncok kapcsolódnak. Ilyen szénhidrát komponensek lehetnek az N-acetil-galaktózin, N-acetilglükózamin, fruktóz, galaktóz, szialsav vagy mannóz. Az oligoszacharid láncok 5-15 monomert tartalmaznak és a magas (kb. 80%) glikoziláltságnak köszönhetően összekapcsolódva „fogkefe-szerű” struktúrát alkotnak (**1. ábra**) (3). A fehérje mag, mely körülbelül a glikoprotein 20%-a, 200-500 kDa molekulatömegű. Főként szerin, treonin és prolin aminosavakat és ezek ismétlődő egységeit (60%), valamint ciszteint tartalmaz (>10%) [2].

Emberben 21 féle mucin gént (MUC) azonosítottak, melyek alapján az epithelium goblet sejtjei vagy

Mukóza szerepei a szervezetben

Szerv	Élettani funkciók	Átlagos rétegvastagság (μm)	pH	Pórusméret	Viszkozitás	Clearance idő (perc)
Szem	Hidratálás, könny-film kialakítása	3-30	7,6-7,8	550 ± 50 nm	0,97–2,33 mPa·s 2–9 mPa·s	5-8
Orr	Részecskék/kórokozók eltávolítása	5-15	5,0-7,8	150 ± 50 nm ²	1,8 ± 1,7 Pa·s	20
Tüdő (egészséges)	Mucociliáris clearance	10-30 trachea 2-5 bronchus	6,5–7,9	100 nm – néhány μm	10 Pas / 0,04-0,49 Pa·s	10-20
CF	Kóros túltermelődés	-	6,5–6,9	140 ± 50 nm	322 ± 199 Pa·s / 0,04–0,38 Pa·s	-
COPD	Kóros túltermelődés	-	7,59	-	0,16–1,8 Pa·s	-
GI traktus Gyomor	Lubrikálás, hámsejtek védelme	170	1-2	500 nm	2,9–3,1 mPa·s	50-360
GI traktus Vékonybél	Lubrikálás	10-40	5,5–7,5	-	1,1–25,8 mPa·s	
GI traktus Vastagbél	Lubrikálás, immunválasz kivédése	100-125	7-9,5	<200 nm	-	



1. ábra: Mucinok felépítése ([5] alapján)

szubmukozális mirigyek termelhetnek *szekréciós* vagy *membránhoz kapcsolódó mucinokat*. Az utóbbiak rövid citoplazmatikus, nagy lipofil transzmembrán és nagy extracellulláris résszel rendelkeznek. A stimulálás hatására termelődő, vezikulákban raktározódó *szekréciós mucinok* vízdékony monomerek, melyek lehetnek *gélképzők* vagy *nem-gélképzők*. A gélképző mucinok a legnagyobb ismert fehérjérszettel rendelkező glikoproteinek. Molekulatömegük 10-40 MDa, átmérőjük 100-500 nm hosszú és felületi töltésük a szialinsav és a magas szulfát tartalomnak

köszönhetően főként negatív [5]. A glikoprotein fehérjérsze ciszteinben gazdag domainokat tartalmaz, melyek diszulfid kötések révén dimerizálódásra és multimerizálódásra hajlamosak, összekapcsolódva gélszerű mucinréteget alkotnak az adott felszínen [6]. A gélszerű struktúra kialakításához hidrofób kötések is hozzájárulnak [7]. A nyálka vastagsága egyes szerveken eltérő, megfelelő termelés hiányában betegségek alakulhatnak ki (pl.: száraz szem szindróma) [2].

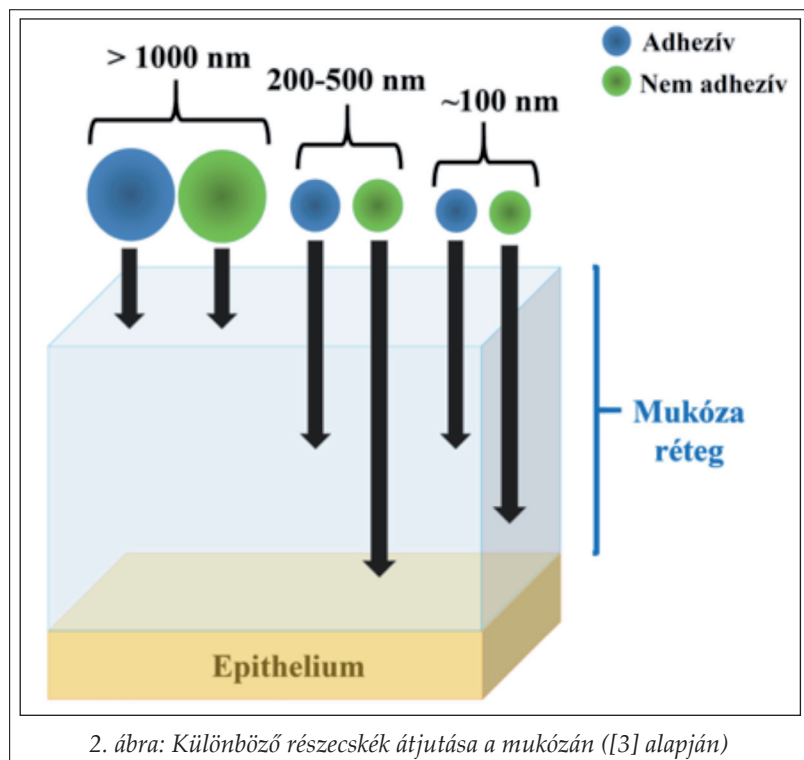
A mukóza fizikai kémiai tulajdonságai

A barrier funkció ellátásában meghatározó szerepet tölt be a nyálka pH-értéke, ún. pórusmérete, viszkozitása és az ionerősség is. Továbbá rendkí-

vüli adhezivitással rendelkezik, melyet hidrofób-, elektrosztatikus- és hidrogénhid kötések, valamint a sztérikus gátlás kialakításával ér el.

Pórusméret

A nyálkában a mucinok reverzibilisen összekapcsolódnak főleg laza másodrendű kötésekkel, diszulfid hidakkal, ezáltal fonalas szerkezetű mucin-rostszálakat létrehozva. Ebből következően, a mukóza barrier egy nanoszkópikus heterogén kö-



2. ábra: Különböző részecskék átjutása a mukózán ([3] alapján)

zeg, amelyen az átjutást a mucinok közötti rés vagy a „pórusméret” – mely átlagosan 20-1800 nm – jelentősen meghatározza. Például a kisebb méretű vírusok diffúzió segítségével könnyen átjutnak a védőhálón [5].

A részecskék méretén kívül a *felületi tulajdonságai* is jelentős szerepet játszanak (2. ábra). A nyálka rendkívüli adhezivitásához hozzájárul a negatív zeta potenciálú felületi töltése, valamint az elektrosztatikus és hidrofób kötőerők kialakítása. Ebből kifolyólag a nyálka alatt elhelyezkedő epithel réteghez azok a részecskék tudnak nagyobb eséllyel eljutni, melyek *semleges felületi töltéssel* és *optimális mérettel* rendelkeznek [8].

Kémhatás

A környezeti pH érték képes megváltoztatni a mucin konformációját, ezáltal a létrejövő kölcsönhatásukat is. Például a pH csökkenésével a hidrofób csoportok kerülnek előtérbe, ezáltal megváltoztatva a glikozilált régió felületi töltését, így a másodlagos kötések is. Csökken a mucin rostok közötti taszítás, nő a mukóza viszkozitása. Ez fiziológiás körülmények között előnyös a gyomorban, mert védi a nyálkahártyát a gyomorsavtól. Ezzel szemben a pH érték növekedésével csökken a viszkozitás, mely a légutakban elősegíti a kórokozók átjutását [7, 8].

Ionerősség

A mukóza megfelelő víztartalmát egy ion-nukleotid visszacsatolási folyamat biztosítja, Ozmolaritása optimális esetben a plazmáéval megegyezik (izotóniás). Az ionösszetételben vagy koncentrációban történő kis változás is képes jelentősen változtatni a viszkozitást és befolyásolni a nyálka viselkedését. Makroszkópikus szinten az ionkoncentráció növekedésével egyenes arányban csökken a mukóza viszkozitása. A magas környezeti ionkoncentráció is gyengíti a mucinok közötti interakciót, ezáltal elősegíti a részecskék átjutását [8].

Kimutatták, hogy a nikotin, a baktériumok és egyes gyógyszermolekulák is képesek jelentős mértékben megváltoztatni a mucus viszkozitását [4]. Betegség esetén a megválto-

zott reológiai tulajdonságok további funkcióvesztést és védelem csökkenést eredményezhetnek, melyek további felülfertőződésekhez is vezethetnek. Például a tüdőben nyák túlermelődés alakul ki a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), asztma vagy cisztás fibrózis (CF) betegségek esetén. Különböző daganatos elváltozások is képesek megváltoztatni nyák összetételét és a mucin termelődését [8].

A mukóza reológiai tulajdonságai

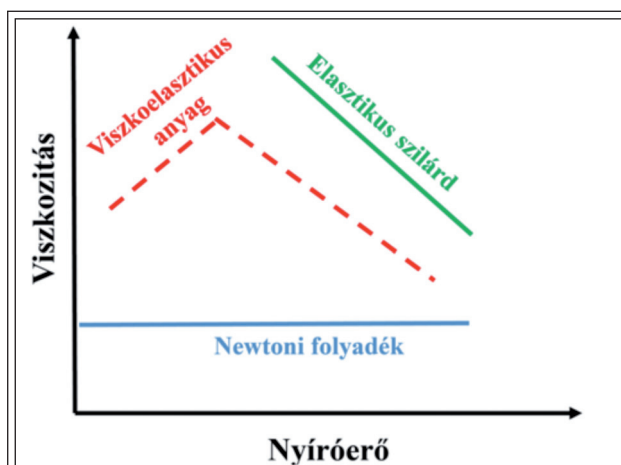
Reológiai háttér

A *reológia* a görög „rheos”, folyik szóból származik. Önálló tudományterület, mely a testek deformációját és folyási tulajdonságait, valamint a változásokat előidéző erők közötti törvényszerűségeket és ezeknek a külső tényezőktől való függését tanulmányozza. Ezen belül részletesebben a *viszkozimetria* foglalkozik a testek alakváltozásaival, amikor a tér egy pontjából erő (pl.: nyíróerő) hat a testre. Ilyen erő okozta ellenállás (belső surlódás) a test *viszkozitása*, mely egy hőmérséklettől és nyomástól függő anyagi állandó. A viszkozitás mérések egyik célja, hogy összefüggést találjanak az erő behatására történő deformáció vagy folyási tulajdonságok között *biológiai anyagokban* is. Néhány csak egyszerű folyadékként vagy szilárd testként viselkedik, azonban a legtöbb biológiai anyag

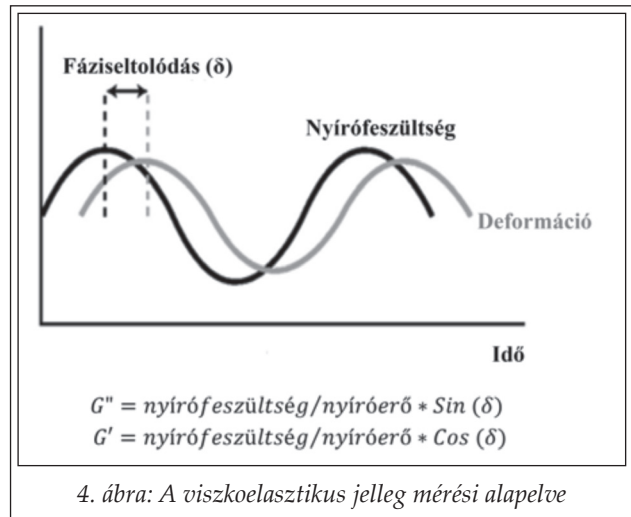
komplex viszkozitással rendelkeznek, így biztosítva egyes funkciók ellátását és a szervek működését.

A reológiai testeket viselkedésüktől függően feloszthatjuk *newtoni* vagy *nem-newtoni* anyagokra, az utóbbi esetében több alcsoportot is megkülönböztetünk. A *tixotrópiát* mutató rendszereknél a viszkozitás nem csak a deformáló erő mértékétől, hanem a hatás idejétől is függ (az idő előrehaladtával csökken). Ezzel szemben, ha a viszkozitás a deformáció idejének előrehaladtával nő, akkor *reopex* jelenségről beszélünk. A viszkozitás ezen kívül jelentősen függ a hőmérséklettől és a terhelés mértékétől, melyeknek kiemelt szerepük van a *viszkoelasztikus* anyagok esetében is. Ha a reológiai test viszkoelasztikus tulajdonságú, akkor szilárd és folyékony anyagokra egyaránt jellemző módon fog viselkedni. A *viszkoelasztikus* biológiai anyagokra jellemző, hogy időtől és korábbi behatásoktól is függ a reológiai viselkedésük [8]. A **3. ábra** szemlélteti a biológiai anyagokra jellemző viszkozitásokat. A folyadékok viszkozitása növekvő erőbehatásra konstans, míg az elasztikus szilárd anyagoké csökken. Ezzel szemben a viszkoelasztikus anyagok komplex viszkozitása azt jelenti, hogy a viszkozitás kis erőbehatásra növekszik (dilatáns), majd további nyíróerőt alkalmazva jelentősen lecsökken (plastikus) [5].

A heterogén biológiai folyadékok hiteles modellezése és mérése nem egyszerű feladat, ugyanis számos változó tényező áll fenn az élő szervezetben. A viszkoelasztikus jelleg mérési alapelveit a **4. ábra** szemlélteti. Oszillációs (periodikusan változó) terheléssel tudjuk legjobban vizsgálni, ekkor az alkalmazott nyírófeszültség értékének változása egy szinuszgörbét ír le. A nyírófeszültség hatására a mintában nyírás deformáció keletkezik. Abban az esetben, ha a vizsgált minta viszko-



3. ábra: Biológiai anyagokra jellemző viszkozitások



4. ábra: A viszkoelasztikus jelleg mérési alapelve

elasztikus tulajdonságú, a deformáció – fáziskülönbséggel – követni fogja a nyírófeszültséget. A fáziskülönbséget a fáziseltolódási (veszteségi) szög jellemzi (δ) [9]. A viszkoelasztikus jelleget a komplex modulus (G^*) jellemzi, mely az elasztikus (tárolási) modulus (G') és a viszkózus (veszteségi) modulus (G'') összege, mértékegységük Pascal. A modulusok számítása figyelembe veszi a nyírófeszültséget, deformációt és a fáziseltolódási szöget (**4. ábra**). Ha a viszkózus és elasztikus modulusok értéke megegyezik, akkor $\delta=45^\circ$. Viszkoelasztikus szilárd anyagokra jellemző $\delta < 45^\circ$ és viszkoelasztikus folyadékok esetén pedig $\delta > 45^\circ$ [5].

A mukóza viszkozitása

Makroreológiai szempontból a nagy víztartalom ellenére a nyálka nem-newtoni tulajdonságú biopolimer. Főként a mucin tartalomnak köszönhetően viszkoelasztikus jellegű, melyhez a lipid és protein tartalom is hozzájárul. Habár minden nyálka viszkoelasztikus jellegű, a viszkózus és elasztikus tulajdonságok az adott szervben kissé eltérőek lehetnek, melyet főként a glikoziláció befolyásol [8]. Reológiai szempontból az elasztikus modulus (G') a gél deformálódását követően az eredeti szerkezet visszanyerését mutatja, míg a viszkózus modulus (G'') jelöli a gél nyíróerő hatására kialakuló folyási tulajdonságának mértékét. Tehát alacsony nyíróerő hatására elasztikus szilárd ($G' < G''$), magasabb erőbehatásra viszkózus folyadékként viselkedik és reverzibilis alakváltozást mutat ($G' < G''$) [5].

Viszkozitása a víznél 100-10000szer nagyobb, a nyál és a könny kevésbé viszkózus. Nagyobb nyíróerő hatására (fiziológiás maximum esetén) pedig a víz viszkozitásához hasonló értéket mutat [8].

Habár a mukóza viszkoelasztikus jellegű, rézecskek vagy patogének átjutását a barrieren az adott mikrokörnyezetük (*mikroreológiai szinten*) fogja befolyásolni, ugyanis az összekapcsolódott mucin rostok közötti tér viszkozitása alacsony, vízhez hasonló [5].

A mukóza szerepe egyes szervekben

Szem

A szem szaru- és kötőhártyáját borító könnyfilm egy lipo-hidrofil réteg, melynek legfőbb szerepe a védelem [4]. Komplex összetételű, több rétegből áll és termelődésében több mirigy is szerepet játszik. Egészséges emberben viszkozitása sokkal kisebb (körülbelül 0,006 Pa·s), mint más mucus szekrétmé [5]. Minden réteg más specifikus molekulákat és proteineket tartalmaz. A legkülső réteget lipidek alkotják, így gátolva a könny elpárolgását. A középső réteg főként vizet, proteineket és elektrolitokat tartalmaz. A szaru- és kötőhártya sejtjei termelik a különböző mucinokat (szekréciós és membránhoz felszínhez kapcsolódó – gélképző), melyek a legbelső mucus réteget építik fel. A mucinok játszószák a legnagyobb szerepet a szem védelmében, ugyanis hidratáló, lubrikáló és anti-adhezív tulajdonságokkal rendelkeznek. Feltehetően a szekréciós mucinok gátolják a patogének megtapadását a szem felületén, míg a gélképző mucinoknak a patogének megkötésében és eliminálásában van szerepe [6]. Viszkoelasztikus jellegének köszönhetően pislogás folyamán (nagy erő behatásra) csökken a viszkozitás, lubrikáló hatás lép fel. A könnyfilm reológiai viselkedését és a szaruhártyán történő szétterülés sebességét befolyásolja a vizes fázis rétegvastagsága, ezért ennek non-invazív vizsgálata a szemszárazságot is felderítheti [10]. Továbbá nem csak a könnyfilm rendelkezik viszkoelasztikus jelleggel, hanem az ínhártya [11] illetve a kollagén és hialuronsav építőegységeknek köszönhetően az üvegtest is [12].

Szájüreg és gasztrointesztinális traktus

A szájüregben termelődő nyál is tartalmaz kis molekulatömegű mucint (körülbelül 180 kDa), mely a szekréciós mucinok csoportjába tartozik. A nyál sem newtoni folyadék, nyíróerőtől függően viszkoelasztikus tulajdonságokkal rendelkezik [13]. Viszkozitását befolyásolják a különböző stimulusok és a nyálmirigyek mucinban kissé eltérő koncentrációjú szekrétumai [14].

A gyomorban, vékony- és vastagbélben található szekrétaum reológiai tulajdonságai hasonlóak. A gyomorban a nyálka viszkoelasztikus jellege pH-függést mutat, mely a nyálkahártya védelmét szolgálja. Alacsony pH értéken az elasztikus jelleg dominánsabb, a viszkozus folyás minimálisra tehető ($G' > G''$), ezzel szemben pH=4 érték felett ez fordítva mutatható ki ($G' < G''$), alátámasztva az elektrolitok és egyéb komponensek befolyásoló szerepét a viszkozításra [4].

A legösszetettebb mucusréteg a beleket borítja, rétegvastagsága a colon felé haladva nő. Több funkcióval is rendelkezik, például lubrikánsként segíti a gyomor és béltartalom átjutását, a tápanyagok felszívódását és a salakanyagok ürülését. A nyálkaréteg a vékonybélben egy, míg a vastagbélben két részre osztható. Az epithel sejtek felszínével közvetlenül érintkező 50-100 μm vastagságú réteg viszkoelasztikusabb jellegű, mint a lumináris részhez közelebb eső nyák. Kimutatták, hogy a két réteghez eltérő affinitást mutatnak a baktériumok. A vékonybélben lévő réteg és a vastagbél külső rétege átjárható a számukra, míg a belső réteg védi az entrocitákat és megakadályozza, hogy a bélbaktériumok immunválaszt válthassanak ki [4, 6].

Reproduktív szervek

A méhnyaknyák változó viszkozitásának nagy jelentősége van a megtermékenyítésben. A női hormonális ciklus fogamzóképes fázisában termelődő viszkoelasztikus jellegű méhnyaknyák elősegíti a spermiumok megfelelő helyre történő eljutását, és így megtermékenyülést [3]. Felfedezték, hogy newtoni folyadékban a spermiumok individuálisan és random módon úsznak, de viszkoelasztikus közegbe kerülve csoportokba rendeződve célorientáltan kezdenek el együtt mozogni. Tehát a spermiumok kollektív mozgása a közeg viszkozitásától függ, az elasztikus jelleg segíti elő a rendeződést [15].

Orrüreg és légutak

Az ornyálkahártyát borító váladék szintén viszkoelasztikus. Viszkozitása nagyobb, mint a tracheobronchiális váladéké. Rendkívül adhezív jellegének köszönhetően főbb szerepe a levegő megtisztítása az orrüregben található szőrszalak és csillósörös hengerhámsejtek segítségével. A teljes nyákréteg körülbelül 20 percenként megújul [16]. A belelegzett levegőben szálló porrészecskék meg-

tapadnak a nyákban, majd a csillók mozgásának hatására az orrgaratba sodródnak, ahonnan főként a nyállal együtt a gyomorba kerülnek, vagy köpet formájában ürülnek [5].

A légutakat borító nyákréteg alatt is hámsejtek találhatóak, melyekből 5-10 μm hosszán kinyúló csillók láthatóak az 5. ábrán [8]. Viszkozitása a légzőrendszer különböző részein eltérő, átlagosan 1215 Pa·s, az elasztikus modulus értéke 1 Pa. A tracheobronchiális váladék viszkoelasztikus jellegének nagy szerepe van a *mucociliáris clearanceben* (MCC). A nyák viszkozitása köhögést (nyíróerő) követően gyorsan, néhány mp alatt, és reverzibilisen visszalakul, mely elengedhetetlen a mucociliáris transzportozhoz és megakadályozza, hogy a mucus a gravitáció hatására az alveolusokig eljusson. A MCC jelentős védelmet nyújt a patogénekkal szemben. A csillók szisztematikusan, gyorsan és egy irányba mozognak, ezáltal folyamatosan eliminálják a nyákréteget, ezért az egész tüdő clearance mechanizmusa 24 óra alatt lezajlik [5]. Struktúráját tekintve a tracheobronchialis nyák heterogén, egy kisebb viszkozitású alsó (*periciliáris*, PCL) és egy viszkózusabb, felső (*luminális*) rétegből áll. A PCL rész, mely körülbelül 7 μm vastagságú, elengedhetetlen a csillók megfelelő működéséhez. A luminális nyák rétegvastagsága a disztálisról a proximális légutak felé haladva nő [4, 8]. Ennek a két rétegnek a mucociliáris clearance mechanizmusban van szerepe, ugyanis a periciliáris folyadék rész elősegíti a csillószőrök mozgását, de a viszkózus nyák nem engedi át a baktériumokat és vírusokat, mintegy védőhálóként funkcionál [6]. A PCL régióban továbbá a csillószőrök között nagy mukopoliszacharidok és membránhoz kapcsolódó mucinok találhatóak, így mintegy 20-40 nm pórusnagyságú

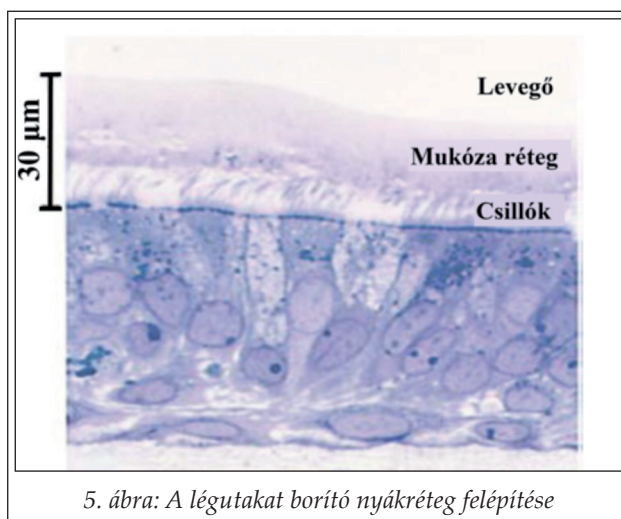
védőhálót képeznek a bronchiális epithelium felszínén. Továbbá egy intermolekuláris tasztítás is fellép, mely stabilizálja a PCL-t az ozmotikusan aktív viszkózusabb mucus réteggel szemben [17]. Irritáció (pl.: dohányzás) esetén hígabb nyák termelődik, így elősegítve a gyorsabb eliminációt, azonban krónikus irritáció esetén ez segíti a baktériumok megtelepedését. A cisztás fibrózisban (CF) szenvedő betegek estén a túl viszkózus nyák gátolja a csillószőrök mozgását, így szintén sérül a védelem és fertőzések léphetnek fel [5].

Stratégiák a mukozális barrieren történő átjutásra

A funkcionalitásából és a komplex struktúrából adódóan a mukozális barrier megakadályozhatja a részecskék és molekulák eljutását az epitheliumhoz, ezáltal csökkenti a terápiás hatékonyságot. A molekuláris kölcsönhatások következtében rendkívül adhezív tulajdonsággal rendelkeznek. A mucin proteoglikánok szénhidrát komponensei semleges és felületi töltéssel rendelkező részecskéket is képesek megkötni másodlagos kötőerőkkel, elektrosztatikus kölcsönhatásokkal. Továbbá a fehérje nem glikozilált része hidrofób kötések kialakítására is képes. Ennek következtében a mukoadhezivitásnak és a mucus barrieren történő átjutásnak jelentős szerepe van a gyógyszer-molekulák lokális transzportjában, melynek az egyik sebességmeghatározó lépése a mukozális barrieren történő átjutás. A nyálkaréteg pórusmérete, vastagsága, összetétele és viszkozitása az egyes szervekben, valamint a patológiás elváltozások esetén is eltérő.

Napjainkban számos kutatás folyik olyan *transzmukozális* gyógyszerhordozó rendszer létrehozásának érdekében, mely képes hatékonyan átjutni a mukozális barrieren és bejutni az epithelium sejtekbe. Az optimális tulajdonságokkal rendelkező részecske (pl.: méret, felületi töltés) képes átjutni ezen a viszkoelasztikus és adhezív barrieren, elősegítve az adott gyógyszer-molekula stabilitását, felszívódását és a terápiás hatás kialakulását.

A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek (nDDS) kiemelkedő jelentőségűek a hatóanyagok bio-disztribúciójában, farmakokinetikájának javításában és a hatás helyére történő eljuttatásában, ezáltal növelve a készítmény hatékonyságát és csökkentve a mellékhatásokat. A szervezetbe juttatásukra számos lehetőség nyílik, ezek közül is jelentősek a non-invazív és lokális adagolási módok, pl.: az orális vagy pulmonális adagolás. Előnyeik a szisztémás adagolással szemben, hogy



5. ábra: A légutakat borító nyákréteg felépítése

csökken a mellékhatások veszélye, továbbá nyújtott hatóanyagleadás és a célszövetben megnövekedett hatóanyag koncentráció érhető el [18]. A megfelelő terápiás hatás kialakításához azonban át kell jutniuk a mukozális barrieren, elkerülve a gyors eliminációt és elérni az epitheliumot. Általánosságban elmondható, hogy a

- nagy méretű (hidrofób vagy hidrofil) molekulák
- pozitív felületi töltésű molekulák
- lipofil molekulák
- hidrofób molekulák

átjutása a mukozán jelentősen akadályozott a sztérikus gátlás és másodlagos kötőerők következtében [3].

A különböző biofarmáciai megközelítéseken alapuló gyógyszer technológiai megoldásokat a **II.** és **III. táblázat** tekinti át. A két fő irányvonal a mukóza barrier módosításán vagy sértetlenségének megőrzésén alapszik. A megfelelő terápiás hatás eléréséhez, tehát a módosított hatóanyagleadáshoz, sejt szintű penetrációhoz, valamint a hatóanyag védelméhez a nanorészecskék extra- és

intracelluláris szinten is alkalmas jelöltek [16, 18].

Az intakt nyálkaréteg adhezív tulajdonságát használják ki az úgynevezett *mukoadhezív rendszerek (II. táblázat)*. A nano- és mikrorészecskék nem tudnak közvetlen kapcsolatba lépni a nyálkahártyával borított epithelium sejtekkel. Mukoadhezív rendszerek segítségével növelni lehet a részecskék retenciós idejét, így több idő jut a hatóanyag kioldására az adott felszínen, ezáltal nő a diffúzió, a lokális hatás kialakulásának esélye és a terápiás hatékonyság. Mukoadhezivitást könnyen el lehet érni elektrosztatikus kötőerők révén, hiszen a mucin glikoproteinek főként negatív töltéssel rendelkeznek. Ezen kívül a mucin fehérjék cisztein tartalmának, így aktív szulfhidril csoportjainak köszönhetően diszulfid kötések is képesek könnyen kialakítani a tiolált felületű részecskékkel. Továbbá a pozitív felületi töltéssel rendelkező nanorészecskék tovább növelik a celluláris felvétel, és így a magasabb biohasznosíthatóság esélyét, hiszen az epithelium sejt felszíne is negatív tulajdonságú [18]. Fontos azonban megjegyezni, hogy

II. táblázat

Mukadhezív gyógyszerhordozó rendszerek

Gyógyszerhordozó rendszer	Jellemzői	Előnyei	Hátrányai	Alkalmazható segédanyagok
Mukoadhezív részecskék	Pozitív felületi töltés	Erős muko- és citoadhezivitás, gyors endocitózis Megnövekedett retenciós idő és lokális hatóanyag koncentráció	Rossz mukozális permeabilitás, gyors clearance	Kitozán és származékai
	Negatív felületi töltés	Erős mukoadhezivitás Megnövekedett retenciós idő és lokális hatóanyag koncentráció	Rossz mukozális permeabilitás, gyors clearance	Carbopol®
	Tiolált felület	Megnövekedett retenciós idő és lokális hatóanyag koncentráció	Rossz mukozális permeabilitás, gyors clearance	Kitozán-thioglikolsav kopolimer Thiolált α -ciklodextrin
Muko-inert/ Mukozán áthatoló részecskék (MPP)	Hidrofil és semleges felület	Jó permeabilitás Gyors mukozális penetráció és egyenletes eloszlás	Alacsony citoadhezivitás	Alacsony molekulatömegű PEG és kopolimerei, Pluronic®
	Ikerionos polimerek (ismétlődő kationos és anionos csoportok)	Jó permeabilitás, nagy kémiai stabilitás csökkenti az elektrosztatikus interakciókat, „csúszós” felszín	Alkalmazásuk gyógyszer technológiában még nem elterjedt	Poliakrilsav/ poliallilamin polielektrolit komplex, Kitozán-kondroitin szulfát komplex
	Önemulgeáló rendszerek (SNEDDS)	Kis méret (<50 nm) és hidrofób felület következtében inertek és könnyen átjutnak a pórusokon	Még nem ismert	Cremophor®, Triacetin, Labrafil®
Nano-mikrorészecskék	Nanofonalak a felületen	Erős citoadhezivitás Megnövekedett retenciós idő és lokális hatóanyag koncentráció	Gyors clearance	Szilikon nanoszálak PLGA

Mukoadhezivitás növelésének mechanizmusai

Mukóza barrier módosítása	Jellemzői	Előnyei	Hátrányai	Alkalmazható segédanyagok
Hidratáltság növelése	Nagyobb víztartalom következtében nagyobb pórusméret és csökkent viszkozitás	Csökkent sztérikus barrier funkció, részecskék könnyebben átjutnak	Elválhat az epitheliumtól Csökkent védelem a patogének ellen	Ozmotikusan aktív anyagok (pl.: mannit)
Mukolítikus szerek alkalmazása	Depolimerizálja a mucinrostokat a S-S kötések felbontásával vagy szulfhidridiszulfid interakciók alakulnak	Csökkent viszkozitás és megnövelt részecske mobilitás	Csökkent védelem a patogének ellen	N-acetilcisztein L- cisztein, Glutathion Mucinex®
Proteolítikus enzimek alkalmazása	Keresztkötésben lévő glikoproteinek ezimatis bontása	Csökkent viszkozitás és megnövelt penetráció	Enzimek következtében csökkent stabilitás	Tripszin, Papanin, Bromelain
Mukóza előkezelése (interakciók gátlása)	Amfifil polimer vagy Töltéssel rendelkező oligomer blokkolja a mucin kötési helyeit	Megnövelt részecske mobilitás és uptake	Csak hidrofób vagy töltéssel rendelkező részecskék esetében működik Csökkent védelem	Triblock kopolimerek, Oligo-guluronát

a részecskék tranzit idejét az adott mukóza réteg fiziológiás clearance ideje fogja meghatározni, továbbá adhezivitásukból adódóan nem fognak átjutni az epitheliumhoz. Ennek következtében a mukoadhezív részecskék nem alkalmasak intracelluláris hatóanyagbevitel vagy génterápia esetén. Alkalmazásuknak a hosszú clearance idő következtében inkább a gasztrointesztinális rendszerben van nagyobb jelentősége [16].

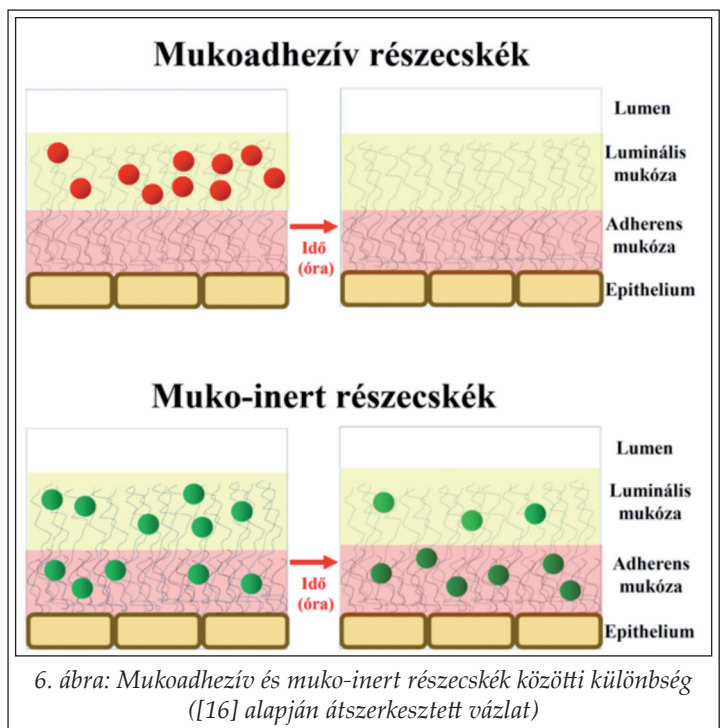
A mukózán áthatoló részecskék (MPP) mukoinertek, vagyis hidrofílek és nem rendelkeznek felületi töltéssel, vagy nagyon sűrűn helyezkednek el a pozitív és negatív csoportok (ikerionos polimerek). A mukoadhezív és mukoinert részecskék viselkedése közötti különbséget a 6. ábra mutatja. Egyik lehetőség a nanorészecske felszínének módosítása alacsony molekulatömegű polietilén-glikollal (PEG). Ez képes minimalizálni az interakció kialakulását a részecske és a mucin anionos, valamint hidrofób csoportjai között, így könnyen átjut a részecske a mucin rostok között és eléri az epithelium sejteket [19, 20, 21]. Ígéretesnek bizonyulnak még egyéb vízdoldékony polimerek (pl.: polivinil-alkohol) és biodegradábilis nanohordozó rendszerek, melyek gyors penetrációval és szabályozott hatóanyagleadással növelhetik a biohasznosíthatóságot [22, 23].

A nano-mikrorészecskék felszíne nano méretű fonalakkal borított. Méretüknél fogva magasabb hatóanyagtartalommal rendelkezhetnek, továbbá segítségükkel elkerülhető a toxikus akkumuláció a sejtekben. Lassabban

haladnak át a mukózán, mint a kis méretű részecskék, mégis jelentős citoadhéziót figyeltek meg [18].

A mukóza fiziológiás tulajdonságainak módosítására több lehetőség adódik (III. táblázat). Ezek ugyan elősegítik a részecskék átjuttatását, de a csökkent barrier funkció miatt a kórokozók bejutásának veszélye is minden esetben fenn áll.

A nyálkaréteg hidratáltságát növelni ozmotikusan aktív anyagokkal vagy hipotóniás oldattal lehet, mely nem toxikus hatású és kedvezően csökkenti a sztérikus gátlást, valamint a viszkozitást.



6. ábra: Mukoadhezív és mukoinert részecskék közötti különbség ([16] alapján átszerkesztett vázlat)

Azonban fő hátránya, hogy megnöveli azt a távolságot, amit a nanorészecskének el kell érnie az epithel sejtig.

A mukolitikus szerek alkalmazása már jól ismert a gyógyszeres terápiában. Nagy jelentőségük lehet olyan betegségek lokális kezelésében, ahol a nyálkaréteg abnormálisan vastag és viszkózus (pl.: cisztás fibrózis, COPD esetén). Ekkor az alkalmazott segédanyag (pl.: N-acetil-cisztein) S-S kötések felbontásával depolimerizálja a mucinrostokat és csökkenti a viszkozitást [20]. Segédanyagokkal együtt történő formuláció esetén a mukolitikum kontrollált felszabadulása a nanorészecskékből megvalósítható, ezáltal a barriernek csak kis részén, az adott részecske átjutásához szükséges mértékben történik a „beavatkozás”.

Hasonló elven működik a proteolitikus enzimekkel együtt történő adminisztráció vagy a részecske felületét borító polimerekhez kovalens kötással történő kapcsolásuk. Ekkor a mukózát felépítő kereszt-kötésben lévő glikoproteinek ezimatis bontása következtében növekedik meg a barrier penetrációja és csökken a viszkoelasztikus jellege is [22].

A mukóza interakciók gátlásának illetve „maszkírozásának” nagy előnye, hogy nem teszik szükségessé a nanorészecske felületének módosítását (pl.: PEGilálás). A clearance mechanizmus és a mucin folyamatos újratermelődése azonban limitálja a módszer hatékonyságát [24].

Összefoglalás

A biológiai anyagok lehetnek testfolyadékok (pl.: vér, nyálka) szövetek és szervek. Főbb közös tulajdonságaik, hogy összetettek (szervetlen és szerves anyagokból épülnek fel), multifunkcionálisak, ugyanakkor egy speciális célnak megfelelően képesek működni. Egyik kiemelkedő jelentőségű testfolyadék a nyálka, melyben mucin glikoproteinek járulnak hozzá a mukóza védő, hidratáló és lubrikáló tulajdonságaihoz. Azonban a gyógyszermolekulák lokális transzportjának egyik sebességmeghatározó lépése a mukozális barrieren történő átjutása, ezért a nyálka fiziológiás és patológiás tulajdonságainak megismerése elengedhetetlen a hatékony hordozórendszer kialakítása, így a mukózával borított felület terépiájának érdekében. A különféle segédanyagokból felépülő nano- és mikrorészecskék megfelelő méretükből és felületi töltésükből adódóan alkalmas transzmukozális hordozórendszerek lehetnek. Non-invazív (pl.: orális, pulmonáris, nazális) adagolásuk számos előnnyel bírhat, mely elő-

remutató olyan betegségek terápiájában is, ahol mukózában történt fiziológiás változások a jelentősen csökkentik a hagyományos gyógyszerhordozó rendszerek hatékonyságát.

IRODALOM

1. Authimoolam, S.P., Dziubla, T.D.: *Polymers*. 8, 1-28 (2016).
2. Bansil, R., Turner, B.S.: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164-170 (2006).
3. Leal, J., Smyth, H.D.C., Ghosh, D.: *Int. J. Pharm.* 532, 555-572 (2017).
4. Bansil, R., Celli, J., Hardcastle, J., Turner, B.: *Front. Immunol.* 4, 310 (2013).
5. Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., Hanes, J.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 86-100 (2009).
6. Hodges, R.R., Dartt, D.A.: *Exp. Eye Res.* 117, 62-78 (2013).
7. Wagner, C. E., Turner, B.S., Rubinstein, M., McKinley, G.H., Ribbeck, K.: *Biomacromolecules* 18, 3654-3664 (2017).
8. Vasquez, P.A., Forest, M.G.: *Complex Fluids and Soft Structures in the Human Body*. In: *Spagnolie, S.E. (ed): Complex Fluids Biol. Syst. Exp. Theory, Comput.*, NY: Springer New York. New York, 2015. 53-110. old.
9. Blackledge, T.A., Swindeman, J.E., Hayashi, C.Y.: *J. Exp. Biol.* 208, 1937-1949 (2005).
10. Yokoi, N., Yamada, H., Mizukusa, Y., Bron, A.J., Tiffany, J.M., Kato, T., Kinoshita, S.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5319 (2008).
11. Downs, J.C., Suh, J.-K.F., Thomas, K.A., Bellezza, A.J., Hart, R.T., Burgoyne, C.F.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 540-546 (2005).
12. Silva, A.F., Alves, M.A., Oliveira, M.S.N.: *Rheol. Acta.* 56, 377-386 (2017).
13. van der Reijden, W.A., Veerman, E.C., Amerongen, A.V.: *Biorheology*. 30, 141-152, (1993).
14. Stokes J.R., Davies, G.A.: *Biorheology*. 44, 141-160 (2007).
15. Tung, C., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A.G., Ardon, F., Wu, M., Suarez, S.S.: *Sci. Rep.* 7, 3152 (2017).
16. Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Hanes, J.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 158-171, (2009).
17. Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher R.C., Rubinstein, M.: *Science*. 337, 937-941 (2012).
18. Fang, L., Wang, L., Yao, Y., Zhang, J., Wu, X., Li, X., Wang, H., Zhang, X., Gong, X., Chang, J.: *Nanomedicine*. 13, 153-171 (2017).
19. Xu, Q., Ensign, L.M., Boylan, N.J., Schon, A., Gong, X., Yang, J.-C., Lamb, N.W., Cai, S., Yu, T., Freire, E., Hanes, J.: *ACS Nano*. 9, 9217-9227 (2015).
20. Nordgård C.T., Draget, K.I.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 175-183 (2018).
21. Huckaby, J.T., Lai, S.K.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 125-139 (2018).
22. Khutoryanskiy, V.V.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 140-149 (2018).
23. Tang, B.C., Dawson, M., Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Suk, J.S., Yang, M., Zeitlin, P., Boyle, M.P., Fu J., Hanes, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19268-19273 (2009).
24. Dünnhaupt, S., Kammona, O., Waldner, C., Kiparissides, C., Bernkop-Schmürch, A.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96, 447-453 (2015).

Metakrilát-kopolimer alapú mikrorészecskék előállítása és összehasonlító vizsgálata intranazális gyógyszerbevitel céljából

BARTOS CSILLA, AMBRUS RITA, BARTOS CSABA, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet, Szeged, Eötvös u. 6-6720

*Kapcsolattartó e-mail címe: revesz@pharm.u-szeged.hu

Summary

Bartos Csilla, Ambrus R., Bartos Csaba, Szabó-Révész P.: **Preparation and comparison of methacrylate copolymer-based microparticles for intranasal application**

Introduction: Polymeric microparticles have an increasing importance as drug delivery systems in the field of medicine because of their controlled release properties. Polymeric microparticles can be applied intranasally for the delivery of drugs to reach the systemic circulation or directly the brain tissues.

Aims: The aim of our work was to prepare and compare a synthetic polymer based microparticles by spray drying process, soluble at the pH of nasal mucosa.

Methods: Empty and meloxicam (MEL)-containing microparticles were produced, using the aqueous dispersion of an anionic copolymer based on methacrylic acid and ethyl acrylate with 30% dry substance. The initial liquid samples contained the MEL in dissolved and suspended form. After spray drying, the solid samples were investigated by structural and morphological analysis (DSC, XRPD, SEM), furthermore the *in vitro* dissolution test of products were carried out and compared with each other.

Results: It was found that microcomposites with monodisperse particle size distribution were prepared, which contained the drug in molecularly dispersed or amorphous form. *In vitro* investigation of delivery system containing MEL in a molecularly form exhibited 70% of dissolved amount of drug in first 15 min at pH 5.6.

Conclusion: Methacrylate copolymer based microcomposites may ensure the controlled release of non-steroidal anti-inflammatory drugs because the starting rapid dissolution (15 min) is followed by slow rate release for 60 min using intranasal administration for pain management.

Key words: methacrylate copolymer, microparticles, spray drying, meloxicam, *in vitro* dissolution

Összefoglalás

Bevezetés: A polimer alapú mikrorészecskék, mint gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése egyre nagyobb jelentőséggel bír a gyógyszerterületén a szabályozott hatóanyagleadó sajátosságainak köszönhetően. Az intranazálisan alkalmazott polimer alapú mikrorészecskék lehetővé teszik a hatóanyagok szisztémás keringésbe, valamint az agyszövetbe történő, orron keresztüli bevitelét.

Célkitűzés: Munkánk célja az orrüreg kémhatásán oldódó, szintetikus polimer alapú mikrorészecskék előállítása és összehasonlítása volt, porlasztva szárítás alkalmazásával.

Módszerek: Hatóanyag nélküli, üres és hatóanyagként meloxicamot (MEL) tartalmazó mikrorészecskéket állítottunk elő, metakrilát-kopolimer tartalmú diszperziót alkalmazva (30% szárazanyag tartalom). A MEL-tartalmú kiindulási minták a hatóanyagot oldott és szuszpendált formában tartalmazták. Vizsgáltuk és összehasonlítottuk az előállított termékek fizikai-kémiai és morfológiai sajátosságait (DSC, XRPD, SEM), továbbá az *in vitro* kioldódási sajátosságait.

Eredmények: Megállapítottuk, hogy monodiszperz szemcseméret-eloszlású mikrokompozitokat állítottunk elő, amelyek a hatóanyagot amorf vagy molekulárisan diszperz formában tartalmazták. A hatóanyagot molekulárisan elosztatva tartalmazó gyógyszerhordozó rendszerből a MEL 70%-a 15 percen belül szabadult fel az orrüregnek megfelelő kémhatású (pH = 5,6) közegben.

Következtetések: A metakrilát-kopolimer alapú mikrokompozitok alkalmasak lehetnek nem szteroid gyulladásgátlók orron keresztüli gyors felszívódását követően fenntartó dózis biztosítására, fájdalomcsillapítás céljából.

Kulcsszavak: metakrilát-kopolimer, mikrorészecskék, porlasztva szárítás, meloxicam, *in vitro* kioldódás

1. Bevezetés

A polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerek lehetőséget nyújtanak a hatóanyagok terápiás vér-szintjének biztosítására, szabályozott és célzott hatóanyagleadó rendszerek előállítására [1]. Alkalmazásuk megoldást jelenthet a rossz oldékonyságú, kis stabilitású, szűk terápiás indexű hatóanyagok biztonságos dozírozására, biztosítva azok

megfelelő mennyiségben, időben és helyen történő leadását, ezáltal csökkentve a mellékhatásokat és növelve a beteg compliance-t. A polimer mikrorészecskék 1-1000 µm-es mérettartományba eső, természetes (zselatin, alginát, agaróz, nátriumhialuronát), felszintetikus (cellulóz-éterek, kitozán) vagy szintetikus (politejsav, poli-ε-kaprolakton, poli(vinil-pirrolidon), polimetakrilát) polimerekből felépülő részecskék [2-4]. A szintetikus polime-

rek a gyógyszeriparban közkedvelt, szerkezetüket tekintve jól reprodukálható, stabil segédanyagok. Az Eudragit®-ok különböző funkciós csoportokkal ellátott szintetikus metakrilát kopolimerek, amelyek mukoadhezív sajátsággal és pH-függő kioldódást biztosító tulajdonsággal egyaránt rendelkeznek [5].

A polimer mikrorészecskék előállítása különböző módszerekkel történhet (koacerváció, emulgeálás/oldószer elpárolgatás, extrudálás, porlasztva szárítás) [6]. A porlasztva szárítási módszer alkalmazása során, a polimer-oldatot alkalmas közegben mikrocseppekké diszpergálják, amelyek a meleg szárító levegő hatására gyorsan elveszítik nedvességtartalmukat.

Az orr, mint alternatív beviteli kapu az utóbbi évtizedben egyre inkább a figyelem középpontjába került, mivel a már ismert hatóanyagoknak új indikációs területet nyithat meg és sok farmakonjelölt bejuttatási problémáit is megoldhatja. Az orrüreg a gyógyszerbevitel szempontjából a neheztítő tényezők mellett számos terápiás előnnyel rendelkezik, úgy, mint a máj „first pass” metabolizmusának, továbbá szájon át történő gyógyszerbevitel során a gasztrointesztinális traktusban esetlegesen bekövetkező hatóanyagbomlásnak az elkerülése. Jellemző a hatóanyagok gyors abszorpciója és a hatás gyors kezdete, amely az orrnyálkahártya nagy felületének, jó permeabilitásának és gazdag vérellátottságának köszönhető. További előnyök közé tartozik, hogy a nazális készítmények alkalmazása könnyű, nem követelmény a sterilitás, adagolásuk a megfelelő szerelékek segítségével pontos és egyszerű [7-9].

A hatóanyag molekulatömegén, molekulaméretén, lipofilitásán és pKa értékén túl, annak oldékonysága, oldódási sebessége és permeabilitása fontos a hatás elérése céljából [10]. Az oldékonyság növelése azért fontos, hogy a farmakon feloldódjon az orrnyálkahártya felületén, mert oldott állapotban képes felszívódni a szisztémás keringésbe és a központi idegrendszerbe egyaránt, valamint, hogy az orrüreg limitált térfogatának megfelelően kis térfogatú, de terápiás szempontból optimális koncentrációjú egyszeri dózist állíthassunk elő. „Prodrug”-ok, ko-szolvensek és a hatóanyag só formájának alkalmazásán túl [11] az oldékonyság növelése hagyományos és innovatív technológiákkal valósítható meg. Polimerek, ciklodextrinek, liposzómák alkalmazása a rossz vízoldékonyságú hatóanyagok formulálása során javítják az oldékonyságot és egyben a készítmény stabilitását is biztosítják. A hatóanyagok biohasznosíthatósága

azok mirko- és nanoméretű részecskébe ágyazásával is fokozható, növelve elsősorban a készítmény tartózkodási idejét. Az irodalomban metakrilát-kopolimer alapú mikroszférák előállításáról olvashatunk nazális úton történő vakcináció megvalósítása céljából [12]. L100-55-típusú, az orrnyálkahártya kémhatásán (pH 5,5 kémhatástól) oldódó Eudragit alapú hordozót juttattak be intranazálisan [4]. Továbbá Eudragit® alapú nanorészecskék esetében jó vízoldékonyságú hatóanyagok vér-agy-gáton való átjuttatásán túl, más polimerekkel kombinálva a hordozók hosszabb tartózkodási ideje valósítható meg [13, 14].

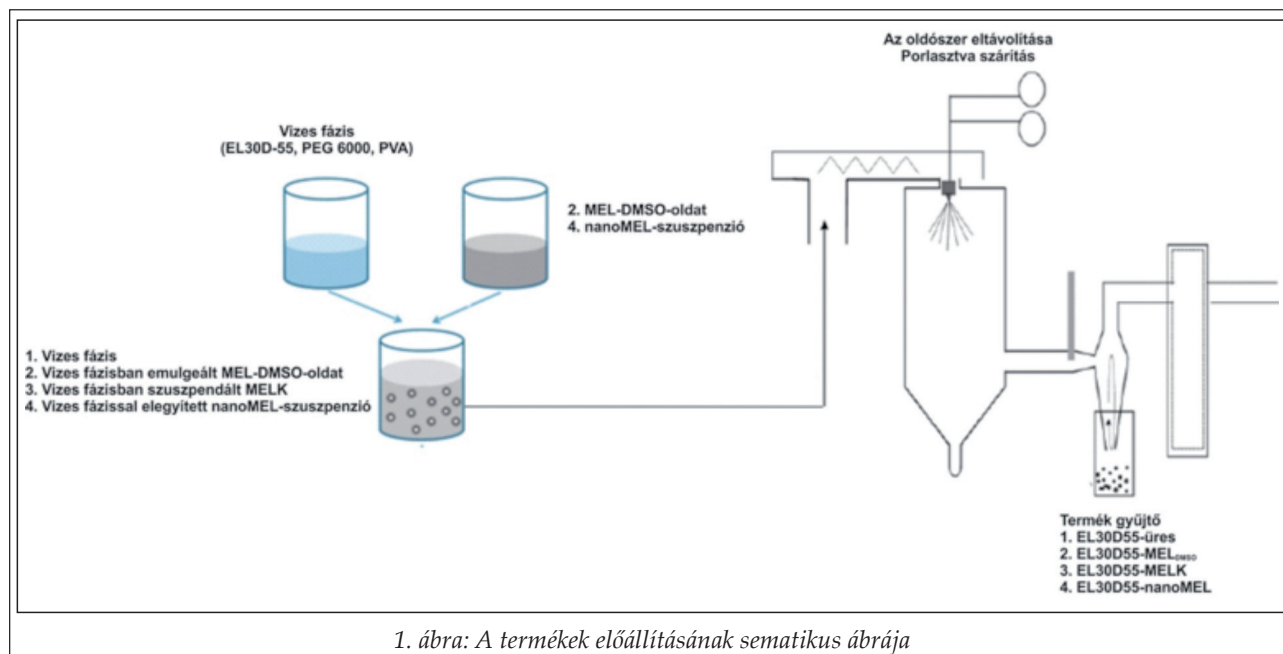
Munkánk során kontrollált hatóanyag felszabadulású (gyors kezdeti, majd lassuló kioldódású), szintetikus polimer alapú mikrorészecskék előállítása volt a cél, intranazális gyógyszerbevitel céljából, porlasztva szárítási eljárás alkalmazásával. Hatóanyag nélküli, üres hordozót (EL30D-55) állítottunk elő, valamint hatóanyagként a MEL-t, mint nem szteroid gyulladásgátlót különböző formában zártuk be a hordozóba. Összehasonlítottuk a termékek fizikai-kémiai, morfológiai sajátságait, továbbá a hatóanyag *in vitro* felszabadulását is tanulmányoztuk.

2. Anyagok

Felhasznált anyagok: meloxikám (MEL) és meloxikám-kálium-monohidrát (MELK) – EGIS Gyógyszergyár (Magyarország); Eudragit® L30D-55 (EL30D-55) (Evonik, Németország); polietilén-glikol 6000 (PEG 6000) – Sigma-Aldrich (Németország); poli(vinil-alkohol) 27000 (PVA) – Sigma-Aldrich (Németország); dimetil-szulfoxid (DMSO) – VWR International Kft. (Magyarország).

Polimer mikrorészecskék előállítása

A minták elkészítése során először üres, hatóanyag nélküli mikrokompozitokat állítottunk elő segédanyagok alkalmazásával (**I. táblázat**). Ebben a fázisban határoztuk meg a mikrorészecskét alkotó komponensek mennyiségét és arányát. Az előkísérletek eredményeit figyelembe véve az üres mikrokompozitokat EL30D-55, az orrüreg kémhatásán (pH = 5,6) 15 perc alatt teljesen feloldódó polimer, valamint lágyító (PEG 6000) és aggregációgátló aditívek (PVA) alkalmazásával készítettük el. A mikrorészecskék előállítása porlasztva szárítással valósult meg (Büchi Mini Dryer B-191, Svájc). A porlasztás 0,7 mm átmérőjű fúvóka segítségével történt. Az eljárási paraméterek beállításá-



val (bemenő levegő hőmérséklete: 92 °C, kimenő levegő hőmérséklete: 61 °C, áramlási sebesség: 5 ml/perc, levegő áramlási sebessége: 600 l/h) szilárd fázisú terméket nyertünk. A hatóanyag tartalmú mikrokompozitok előállításához a rossz vízoldékonyságú MEL (0,0040 mg/ml, 37 °C) szerves oldószeres oldatát, a MELK vizes oldatát (vízoldékonyság: 13,10 mg/ml, 37 °C), valamint nanonizált MEL-t tartalmazó (D10 = 0,07 µm, D50 = 0,14 µm, D90 = 0,37 µm) vizes szuszpenziót alkalmaztunk (vízoldékonyság: 0,0093 mg/ml, 37 °C). A MEL DMSO-s oldatát ultrahangozás (Hielscher UP 200S, 200W, Németország) mellett emulgeáltuk (EL30D55-MEL_{DMSO}), az üres mikrorészecskék előállítására alkalmazott diszperzióval (EL30D55-üres) (1. ábra). A MELK tartalmú minta esetében a hatóanyagot vízben feloldottuk, majd az oldatot elegyítettük a vizes diszperzióval (EL30D55-MELK), a nanonizált hatóanyagot [15] pedig szuszpendáltuk a diszperzióban (EL30D55-nanoMEL). Ezt követően került sor a minták porlasztva szárítására szilárd fázisú termékek előállítása céljából.

3. Vizsgálati módszerek

3.1 Szemcseméret megoszlás, morfológia

A mikrorészecskék szemcseméretét és méreteloszlását lézer diffrakciós eljárással határoztuk meg (Malvern Mastersizer Sirocco 2000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, egyesült Királyság). A diszperziós levegő áramlását 2,0 bar nyomás biztosította. A D10, D50, D90 értékeket térfogat szerinti méretanalízissel határoztuk meg.

A kiindulási hatóanyag és a szilárd termék morfológiai jellemzése pásztázó elektronmikroszkóppal történt (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Japan). A minta töltődésének megakadályozása céljából arany-palládium bevonó anyagot használtunk, 18 mA plazmaáram alkalmazásával. A felvételek 15 kV nagyfeszültség, 10 µA elektronáram és 0,1 Pa elővákuum beállításával készültek.

3.2 Szerkezeti sajátosságok

A hatóanyag kristályos jellegét porröntgen difrak-

I. táblázat

A porlasztandó vizes diszperziók összetétele, feltüntetve a MEL eloszlásának módját

	Termékek	MEL (mg)	MELK (mg)	EL30D-55 vizes diszperzió (ml)	PEG 6000 (mg)	PVA (mg)	Hatóanyag eloszlása
1.	EL30D55-üres	-	-	25	1500	500	-
2.	EL30D55-MEL _{DMSO}	90	-	25	1500	500	oldott (DMSO)
3.	EL30D55-MELK	-	90	25	1500	500	oldott (víz)
4.	EL30D55-nanoMEL	90	-	25	1500	500	szuszpendált

ciós vizsgálatokkal határoztuk meg (BRUKER D8 Advance porróntgen diffraktométer, Bruker AXS, Németország). Mérési paraméterek: Cu ($K\alpha=1.5406 \text{ \AA}$), 40 kV, 40 mA.

A termékek termoanalitikai sajátságait DSC (differenciál pásztázó kalorimetria) készülékkel (Mettler Toledo STAR®, Mettler Inc., Svájc) határoztuk meg. A méréseket argon gáz átáramoltatásával (10l/óra) végeztük (2-5 mg-os minta, 25-300 °C, 10 °C/perc fűtési sebesség).

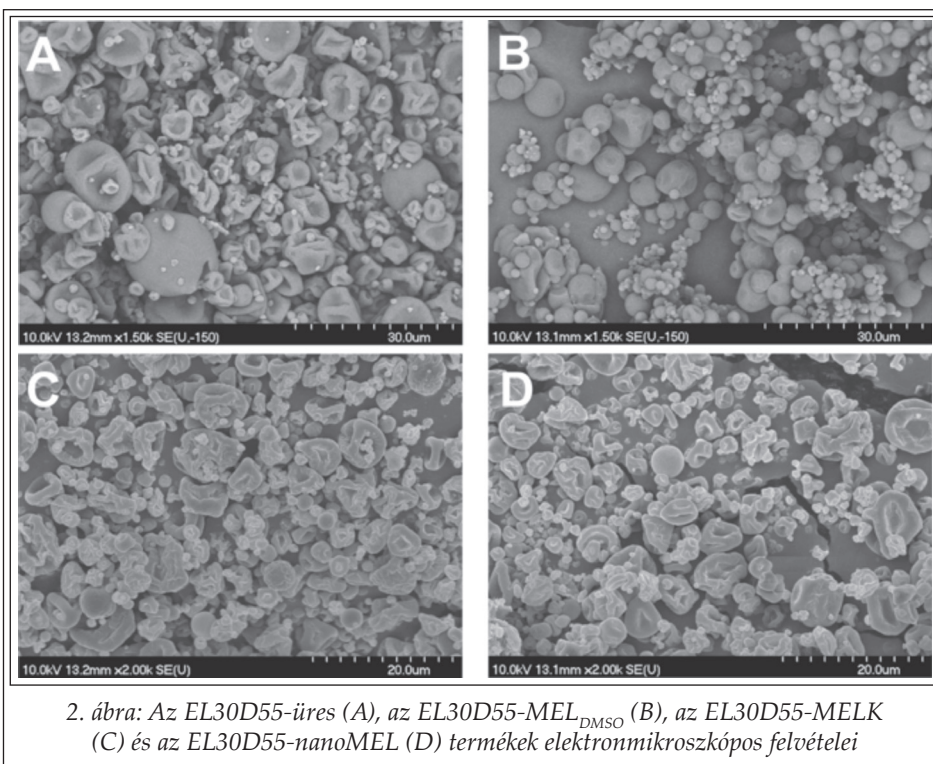
3.3 *In vitro* kioldódási vizsgálatok

A kioldódási vizsgálatokat a Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos forgólapátos kioldó készülék módosított változatával végeztük (USP kioldó készülék, II; Pharma Test, Németország), az orrűreg körülményeit szimulálva (pH = 5,6, 30 °C). 50,0 ml térfogatú közegben 100,0 mg terméket diszpergáltunk 100 fordulat/perc fordulatszámot alkalmazva. Mintavételre a kevertetés 5., 10., 15., 30. és 60. percében került sor. Minden minta esetében három párhuzamos mérést végeztünk. A kioldódott MEL koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg 364 nm hullámhosszon (UNICAM UV/Vis Spectrometer, Németország).

4. Eredmények értékelése

4.1 Szemcseméret megoszlás és morfológia

A minták szemcseméret megoszlás eredményei az II. táblázatban láthatók, amelyek alapján elmondható, hogy mind a négy termék monodiszperz eloszlást mutatott. A hatóanyagot tartal-



mazó mikrokompozitok D90 értéke kb. 11 és 19 μm között változott, ami megfelel a nazálisan alkalmazott porokkal szemben támasztott követelményeknek ($<40 \mu\text{m}$) [16]. Az eredmények azt mutatják, hogy a mikrorészecskék méretét alapvetően a hordozó anyagok mennyisége és aránya határozza meg, a MEL eloszlásának módja nem befolyásolja azt szignifikánsan ($p>0,05$).

Az elektronmikroszkópos képek alapján látható, hogy a hatóanyagot nem tartalmazó részecskék üreges szerkezetűek voltak. A MELK-t és nanonizált MEL-t tartalmazó minták porlasztva szárítása szabálytalan alakú, egyenetlen felületű, horpadt részecskéket eredményezett, míg a MEL_{DMSO}-tartalmú mikrokompozitok esetében közel szférikus habitus figyelhető meg (2. ábra). Mivel a kiindulási vizes közegű mintában a hatóanyag eloszlása (molekuláris, szuszpendált) különböző volt, így a porlasztva szárítás során a megszilárduló termékek is másképpen tartalmazzák a MEL-t. Ebből adódóan a mikrorészecskék eltérő morfológiája feltehetően a hatóanyag külön-

II. táblázat

A porlasztva szárított mikrorészecskék szemcseméret-eloszlása

	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)
EL30D55-üres	3,69	8,27	16,79
EL30D55-MEL _{DMSO}	2,62	6,53	19,27
EL30D55-MELK	3,07	6,04	11,45
EL30D55-nanoMEL	2,75	5,58	11,39

böző formában való eloszlatoottságával magyarázható.

4.2 Szerkezeti sajátosságok

XRPD eredmények

A porröntgen-diffrakciós eredmények alapján elmondható, hogy a kiindulási hatóanyag esetében látható karakterisztikus csúcsok annak kristályos szerkezetét bizonyítják (3. ábra). Az oldatos formákból (EL30D55-MEL_{DMSO}, EL30D55-MELK) előállított szilárd termékek jel nélküli ujjlenyomatot adnak, ami részben a MEL molekuláris eloszlatoottságával, részben pedig az amorf jelleggel magyarázható, de felmerül a MEL kis mennyisége is a termékben (4,3 %), ami éppen a detektálhatóság határán van. A nanonizált MEL-t tartalmazó termék (EL30D55-nanoMEL) röntgendiffraktogramja mutat ugyan kristályos frakcióra utaló jelet, de ez sem értékelhető. A minták előállításának körülményei is fontos szempontokat vetnek fel. Így a MELK esetében a savas kémhatású (pH = 2,34) polimer diszperzió elegyítésének hatására, már a porlasztva szárítást megelőzően, kicsapódik a MELK, mivel savas közegben az oldékonysága minimális (0,017 mg/ml, pH 5,6). A nanoMEL-t tartalmazó diszperzió esetében pedig azzal is számolni

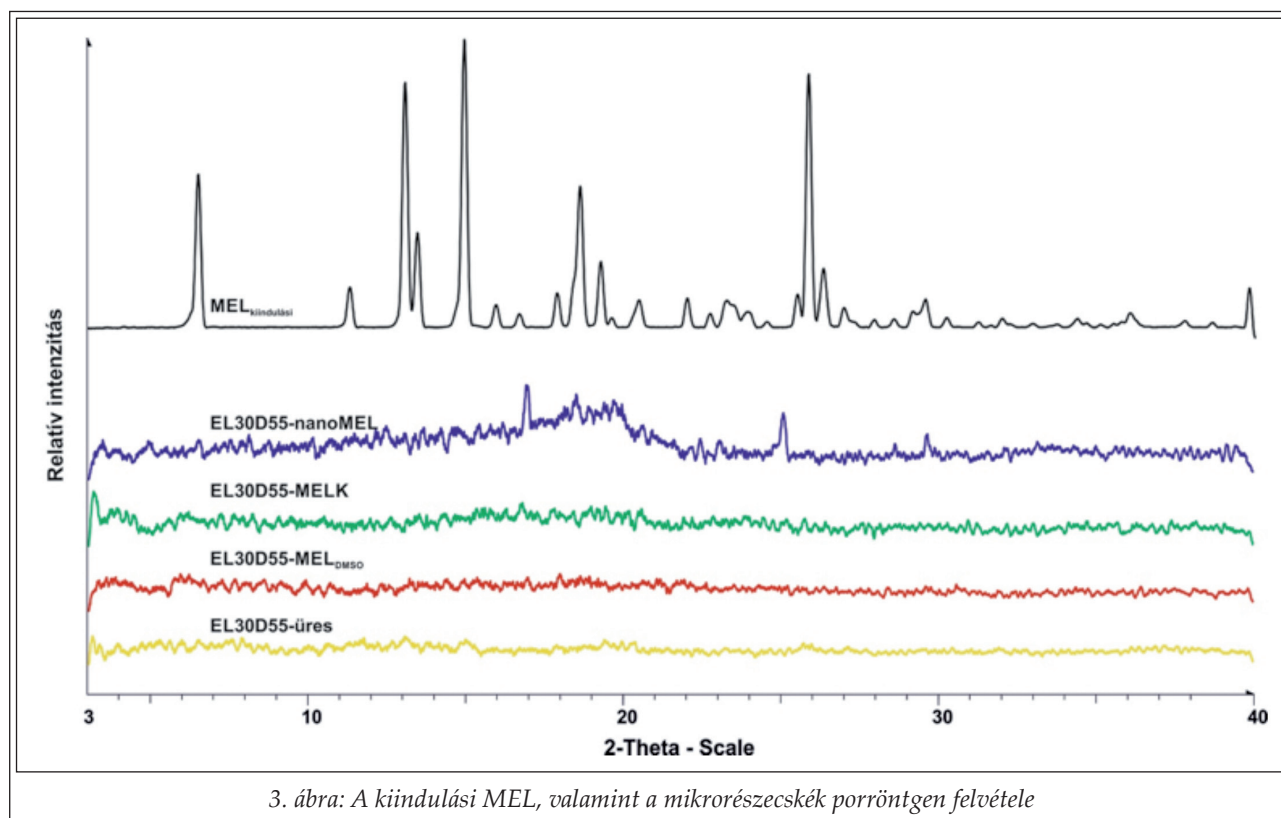
kell, hogy már a nanonizálás hatására bekövetkezik a MEL szerkezetletörése, ami a minta amorf hányadát növeli.

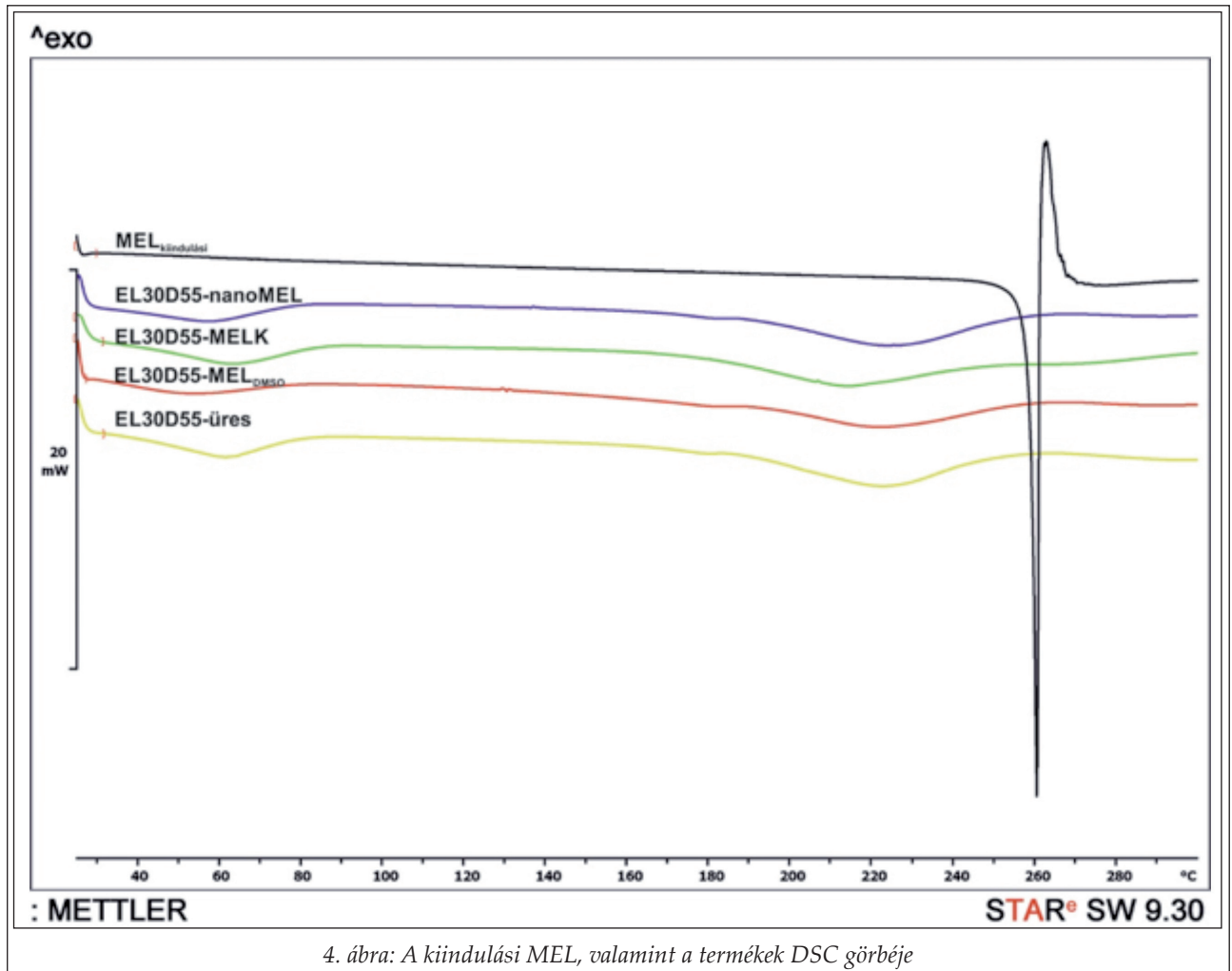
DSC felvételek

A kezeletlen MEL-nek 259,27 °C-on jól definiálható olvadáspontja van. Az EL30D-55 amorf sajátosságú segédanyag, olvadásponttal nem rendelkezik. A hatóanyagot tartalmazó polimer mikrorészecskék esetében a görbéken csak a segédanyag jele figyelhető meg, az amorf sajátosságú hatóanyagok (MELK, nanoMEL), valamint a molekulárisan diszperz állapotban lévő MEL esetében a kiindulási hatóanyagokra jellemző karakterisztikus endoterm csúcs eltűnt (4. ábra). A termékek görbéin 63 °C-nál jelentkező endoterm csúcs a mintákban lévő maradék oldószerrel magyarázható. Míg a 220-240 °C között megjelenő csúcsok az EL30D-55 polimer jelét mutatják. Ebben az esetben is felmerül a MEL kis mennyiségének befolyása a termékek detektálhatóságát tekintve.

In vitro kioldódási vizsgálatok

Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok során megállapítottuk, hogy nazális körülmények között a rossz vízoldékonyságú kezeletlen MEL esetében mini-



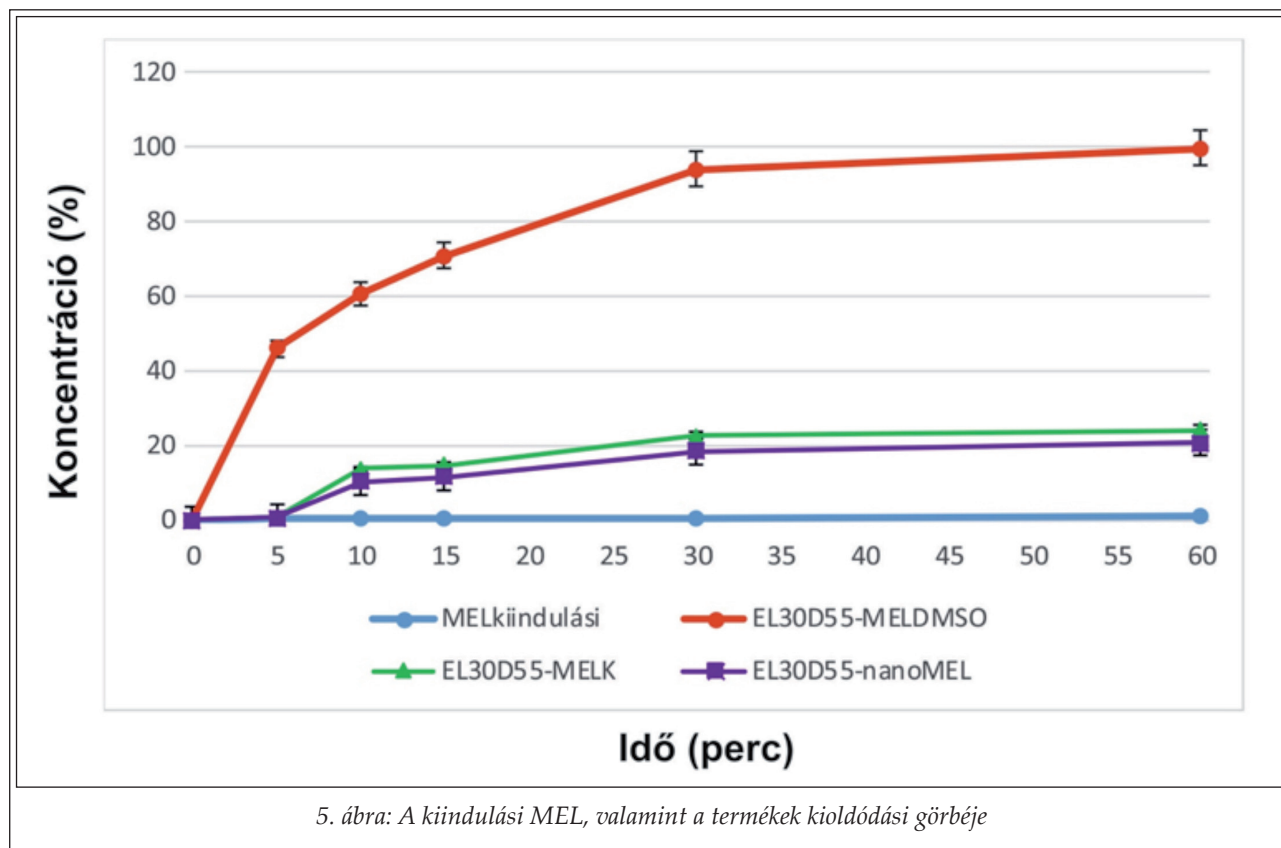


mális mértékű kioldódást tapasztaltunk (1,15% a vizsgálat 60. percében). A MELK-t és a nanoMEL-t tartalmazó termékből egy óra alatt csak a hatóanyag kb. 20%-a oldódott ki, a két kioldódási görbe lefutása között jelentős mértékű különbség nincs. A MEL-t molekuláris eloszlásban tartalmazó mikrorészecskék (EL30D55-MEL_{DMSO}) esetében viszont kontrollált hatóanyag felszabadulást figyeltünk meg; a gyors kezdeti kioldódást (70% a kísérlet első 15 percében) lassuló hatóanyag felszabadulás követte (5. ábra). 60 perc alatt a hatóanyag 100%-a kioldódott. Az *in vitro* kioldódási vizsgálati eredmények egyértelműen bizonyítják a hatóanyag molekuláris eloszlásának fontosságát a hordozó rendszerben.

5. Összegzés

Közleményünk összefoglalót adott a szintetikus polimer alapú gyógyszerhordozók alkalmazásának előnyeiről, továbbá az orron keresztüli gyógyszerbevitel lehetőségéről. Munkánk során az orr-

nyálkahártya kémhatásán oldódó polimer (EL30D-55) alapú mikrorészecskéket állítottunk elő porlasztva szárítással. Üres és hatóanyagot (MEL) tartalmazó mikrorészecskék kerültek előállításra. A kiindulási minták a hatóanyagot szerves oldószerben oldva, nanonizált állapotban szuszpendálva, valamint só formájában tartalmazták. A szemcseméret-megoszlás vizsgálata során megállapítottuk, hogy monodiszperz eloszlást mutató termékek keletkeztek. A mikrorészecskék szerkezetét porröntgen-diffrakciós és termoanalitikai módszerekkel vizsgáltuk. A hatóanyagot nem tartalmazó, valamint a MELK-t és MEL-t amorf formában tartalmazó mikrokompozitok üregek, míg a molekuláris állapotban lévő MEL-tartalmú mikrorészecskék közel szférikus morfológiájúak voltak. Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a MEL-t oldott állapotban tartalmazó minta kontrollált hatóanyag felszabadulást biztosított gyors kezdeti, ezt követően pedig csökkenő sebességű kioldódással, ami egy nem szteroid gyulladásgátló esetében fontos a gyors



fájdalomcsillapítást követő fenntartó dózis biztosítása szempontjából.

A munka a GINOP-2.2.1-15-2016-00007 projekt „Nanotechnológia: nanoterápiás rendszerek kutatása és fejlesztése” altéma keretein belül valósult meg.

IRODALOM

1. Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F.: *Nanomedicine* 2, 8-21 (2006).
2. Nidhi, Rashid, M., Kaur, V., Hallan, S.S., Sharma, S., Mishra, N.: *Saudi Pharm. J.* 24, 458-472 (2016).
3. Sebe, I., Szabó, B., Zelkó, R.: *Acta Pharm. Hung.* 82, 138-154 (2012).
4. Imperiale, J. C., Acosta, G. B., Sosnik, A.: *J. Control. Release* doi:10.1016/j.jconrel.2018.06.031
5. Ji, Y., Lemberg, M., Prudic, A., Paus, R., Sadowski, G.: *Chem. Eng. Res. Des.* 121, 22-31 (2017).
6. Tran, V-T., Benoît, J-P., Venier-Julienne, M-C.: *Int. J. Pharm.* 407, 1-11 (2011).
7. Costantino, H.R., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P.H., Quay, S.C.: *Int. J. Pharm.* 337, 1-24 (2007).
8. Gieszinger, P., Bartos, Cs., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: *Gyógyszerészet* 61, 204-211 (2017).
9. Saundane, N.S., Pagar, K.P., Vavia, P.R.: *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 14, 189-199 (2013).
10. Zelkó, R., Süvegh, K.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 351-354 (2005).
11. Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S., Onoue, S.: *Int. J. Pharm.* 420, 1-10 (2011).
12. Li, H-S., Singh, B., Park, T-E., Hong, Z-S., Kang, S-K., Cho, C-S., Choi, Y-J.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 80, 16-25 (2015).
13. Katia, P., Seremeta, Chiappetta, D.A., Sosnik, A.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102, 441-449 (2013).
14. Salatin, S., Barar, J., Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Kiafar, F., Mitra Jelvehgari, M.: *Res. Pharm. Sci.* 12, 1-14 (2017).
15. Bartos, Cs., Jójárt-Laczkovich, O., Katona, G., Budai-Szűcs, M., Ambrus, R., Bocsik, A., Gróf, I., Deli, M. A., Szabó-Révész, P.: *DDDT* 12, 1567-1580 (2018).
16. Európai Gyógyszerügynökség (EMA): https://www.google.hu/search?q=requirements+ema+nasal+powder&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&dcr=0&ei=JfOoWsSAFMuxX-naryg [2006. 06. 21.]

Érkezett: 2018. november 2.

Chrysanthemum balsamita var. *tanacetoides* fitokémiai elemzése

¹VARGA ERZSÉBET*, ¹ORBÁN KRISZTINA, ¹FINTA ADÉL, ²KURSINSZKI LÁSZLÓ,
³DOMOKOS ERZSÉBET

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

²Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet, Üllői út 26, 1085 Budapest

³Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Gyógyszerészeti botanika tanszék,
540139 Tîrgu Mureş, Gh.Marinescu 38

*Levelezési cím: erzsebet.varga@umftgm.ro

Summary

Varga E., Orbán K., Finta A., Kursinszky L., Domokos E.: **Phytochemical analysis of *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides***

Introduction: *Chrysanthemum balsamita* L. it is originated from South-West Asia. It has been introduced to Europe where it is known as a medicinal, aromatic and decorative plant. The herba of the plant contains the following compounds: essential oils, flavonoids, triterpene saponins, isoflavones, bitter material, polyphenolic components.

Aim: The aim of the study was to determine the antioxidant capacity of a variant of the *Ch. balsamita* species (var. *tanacetoides*) and its correlation with phenolic compounds.

Materials and methods: The herba of the *Ch. var. tanacetoides* was collected from the University Medicinal Garden. Extraction from the herba was made with methanol, methanol-water (1:1) and water. For each extract, total polyphenol and total flavonoid content was determined. The tannins were determined spectrophotometrically from aqueous extract. The flavonoid-O-glycoside content was determined based on flavonoid-aluminum chloride (AlCl₃) complexation and measured by spectrophotometry. The antioxidant capacity was determined by the ABTS method.

Results: The highest polyphenol (65.4 mg gallic acid / 100 g drug) and flavonoid (21.58 mg quercetin / 100 g drug) contents were obtained from the methanol:water (1:1) extract. The polyphenol concentration in the herba expressed in pirogallol was 1.710 g%, while the tannin concentration was 0.727 g%. The concentration of flavonoid-O-glycoside expressed in hyperoside was 0.39 g%. Methanol extract had the highest antioxidant activity (IC₅₀=0.0012 mg/ml), followed by the water extract (IC₅₀=0.0020 mg/ml) and the methanol:water (1:1) extract (IC₅₀=0.1060 mg/ml).

Conclusions: The methanol:water (1:1) solvent proved to be the best for the extraction of polyphenols and flavonoids in high quantities, but the antioxidant capacity showed the lowest value for the methanol:water (1:1) extract. Testing the antioxidant capacity with other methods and qualitative analysis of the extracts are necessary.

Keywords: *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides*, polyphenols, flavonoids, antioxidant capacity, ABTS

Összefoglalás

Bevezetés: A *Chrysanthemum balsamita* L. Dél-Nyugat Ázsiából származik. Európába behozott faj, kultúrnövényként, gyógy- és fűszernövényként ismert. A növény herbája a következő vegyületeket tartalmazza: illóolajat, flavonoidokat, triterpén szaponinokat, izoflavonoidokat, keserűanyagot, polifenolos komponenseket.

Célkitűzés: Célunk meghatározni a *Ch. balsamita* faj egyik változatának (var. *tanacetoides*) az antioxidáns kapacitását és annak összefüggését a fenolos vegyületekkel.

Módszerek: A herbát a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Gyógynövénykertjében termesztett *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* egyedekről gyűjtöttük. A herbából a kivonatokat metanol, metanol-víz (1:1) elegyével és vízzel készítettük. Minden kivonatra meghatároztuk az összpolidol és összflavonoid tartalmat. A cserzőanyag meghatározása spektrofotometriás módszerrel történt, vizes kivonattól. A flavonoid O-glikozidokat AlCl₃-al történő komplexképzéssel és spektrofotometriás módszerrel mértük. Az antioxidáns kapacitást ABTS módszerrel határoztuk meg.

Eredmények: A legmagasabb polifenol (65,4 mg galluszsav/100 g drog) és flavonoid (21,58 mg kvercetin/100 g drog) tartalmat a metanolos-vizes (1:1) kivonatokból mértük. A herba polifenol koncentrációja pirogallolban kifejezve 1,710 g%, a cserzőanyagé 0,727 g%. A herba flavonoid-O-glikozid koncentrációja hiperozidban kifejezve 0,39 g%. A legnagyobb antioxidáns aktivitással a metanolos kivonat rendelkezett (IC₅₀=0,0012 mg/ml), majd ezt követte a vizes kivonat (IC₅₀=0,0020 mg/ml) és a metanolos-vizes (1:1) kivonat (IC₅₀=0,1060 mg/ml).

Következtetések: A polifenolok és flavonoidok legnagyobb mennyiségben való kivonására a metanolos-vizes (1:1) módszer bizonyult a legjobbnak, viszont az antioxidáns kapacitás a legalacsonyabb értéket mutatta a metanolos-vizes kivonat esetében. Szükséges az antioxidáns kapacitás tesztelése más módszerekkel is, illetve a kivonatok minőségi analízise.

Kulcsszavak: *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides*, polifenolok, flavonoidok, antioxidáns kapacitás, ABTS

Bevezetés

A *Chrysanthemum balsamita* L., magyar nevén boldogasszony mentája, boldogasszony tenyere vagy balzsamos aranyvirág, Melius Péter Herbáriumában megtalálhatók már ezek a megnevezések [1]. A népi gyógyászatban, Székelyföldön és a csángó vidékeken nevezik még vénasszony bűzlentyűjének is [2].

Az Asteraceae családba és a *Chrysanthemum* genusba tartozik. Dél-Nyugat Ázsiából származik. Európába behozott faj, kultúrnövényként, gyógy- és fűszernövényként ismert. Gyakran termesztik nálunk az országban és dísnövényként fordul elő kertekben, temetőben [3, 4].

A *Ch. balsamita* (L.) Baillon syn. *Tanacetum balsamita* L. egy lágyszárú évelő faj. Szára 60-120 cm magas, zöld, szőrös, felső részén elágazó. Tölevelei hosszú levéllyel rendelkeznek, tojásdad-elliptikusak, enyhén csipkés szélűek. A szárlevelek közül az alsók nyelesek, a felsők ülők. A levéllemez az alsó felén néha 1-4 karéjos lehet. A leveleken T alakú védőszőrök és rövid mirigyszőrök vannak. Fészkés sátor vagy fészkés buga virágzata van. A fészekben 6-10 mm átmérőjű csöves virágok (*Ch. balsamita* var. *tanacetoides*) ülnek. A központi elhelyezkedésű csöves (kög) virágok mellett a fészek szélén megjelenhetnek, fehér színű, 10-16 mm átmérőjű nyelves (sugár) virágok (*Ch. balsamita* var. *balsamita*). Késő ősszel virágzik. Hengeres kaszattermései 5 bordájúak és rövid (0,2-0,4 mm) repítőszőrrel rendelkeznek. Illata mentára emlékeztet. Genetikailag jellemezve a *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* poliploid ($2n=54$, $x=9$), míg a *Ch. balsamita* var. *balsamita* diploid ($2n=18$) taxon [3,4,5,6].

A *Chrysanthemum balsamitae* herba-t a népgyógyászat kolagog-koleretikus és májvédő tulajdonságáért használja, de ismert diuretikus, adsztringens, sztomahikus, féregűző, görcsoldó, karmínatív és emenagóg hatása is [7, 8]. Használják külsőleg rovarcsípések kezelésére is [2].

A fitoterápiában sikeresen alkalmazzák kolagog-koleretikus és májvédő tulajdonságáért, de tudományos kutatások tárgyát képezik kivonataik, májvédő hatásukért. Állatkísérletekkel igazolták a májra kifejtett pozitív hatást, csökkentve a szteatózist, normalizálva az enzimműködést [9]. Antimikrobás hatását 14 mikroorganizmusra vizsgálták (9 baktérium, 2 gomba, 3 penész fajra) [10].

A növény herbája eddigi ismereteink szerint a következő vegyületeket tartalmazza: illóolajat, triterpén szaponinokat, flavonoidokat, izoflavo-

noidokat, keserűanyagot és polifenolos komponenseket [11, 12].

Illóolajában, az egyik fontosabb, nagymennyiségben található, farmakológia hatással bíró vegyület a karvon [13, 14, 15]. A közel 200 leírt illóolaj komponens közül megemlíthetjük a legismertebbeket: 1,8 cineol, α -tujon, 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, kámfén, kámfor, szabinén, p-cimen, limonen, β -tujon, pinokarvon, transzszabinol, ciszkrizantenol, cisz-pinokarveol, mirtenol, mirtenilacetát, stb. [11, 16].

Az Asteraceae családra jellemző szeszkviterpén laktonok újabb kilenc frakcióját sikerült azonosítani a Bulgáriában termesztett kemotípusokból [17].

Triterpén glikozidjai hidrolízissel gipszogenin aglikont eredményeznek [7]. Polifenolos komponensei (klorogénsav, dikaffeol-kínasav, trihidroxidimetiloxiflavon, tetrahidroxidimetoxiflavonol) magas antioxidáns aktivitással rendelkeznek, mely a hidroxil csoportoknak sajátos megoszlásával magyarázható, reaktív peroxid gyök megkötéssel. A polifenolok kelatáló struktúrák, képesek átmeneti fémeket megkötni, elsősorban nehézfémeket környezetünkben. Potenciális antioxidáns tulajdonságot tulajdonítanak a növényi kivonatoknak, elsősorban funkcionális élelmiszerekben lenne jelentőségük [18, 19, 20].

Egy előzetes mérésünk alapján a Szegedi Tudományegyetemen 2008-ban az illóolajokból mindkét tanulmányozott növényi részben a karvon volt a domináló komponens: a *Ch. balsamitae* foliumban 68,42%-ban; a *Ch. balsamitae* flosban 74,67%-ban volt jelen a karvon. Kísérő frakciók a limonen, az α -tujon és az 1,8 cineol [21, 11].

A *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* herba fitokémiai elemzésének érdekében a következő célokat tűztük ki: a herbából metanolos, vizes és metanolos:vizes (1:1) kivonatok készítése, amelyekből meghatároztuk a herba összpolicenol, összflavonoid, továbbá a herba cserzőanyag és flavonoid-O-glikozid tartalmát; valamint a kivonatok antioxidáns hatásának meghatározása ABTS módszerrel.

Anyag és módszer

Növényi részek gyűjtése

A növényi részeket (herba) a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógynövénykertjében termesztett *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* egyedekről gyűjtöttük (hiányoznak a fehér nyelves virágok) 2016 nyarán, a növény teljes virágzása idején (1. ábra). A gyűjtött növényi részeket (her-



1. ábra: *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides* a MOGYE Gyógynövénykertjében (Fotó: Varga Erzsébet, 2016)

ba), természetes körülmények között szárítottuk és a kivonatok elkészítéséig tároltuk a MOGYE, Farmakognózia és fitoterápia tanszékén.

Extrakció és mintakészítés a fenolos komponensek kivonására

A kivonatokat metanollal, metanol-víz (1:1) elegyvel és vízzel készítettük. A drogot (2,5 g) dörzsmozsárban szét-dörzöltük és 25 ml oldószerrel kezeltük. A kivonatokat ultrahangos vízfürdőben 30 percig 25°C-on tartottuk, azután szűrtük, majd 25 ml-es mérőlombikokban a megfelelő oldószerrel feltöltöttük a jelig. A kivonatokat szűrtük és hűtőszekrényben (3-4°C-on) ampullákba töltve tároltuk a mérésekig.

Összpolifenol tartalom meghatározása

Folin-Ciocalteu módszerrel dolgoztunk (*Singleton és munkatársai*, 1999) [22]. Az előre elkészített 40 µl kivonathoz, 3,16 ml desztillált vizet és 200 µl Folin-Ciocalteu reagenst adtunk, homogenizáltuk, majd 5 perc eltelte után 600 µl 20% w/v nátrium karbonátot adtunk hozzá. Az így készített kivonatokat 2 órán át szobahőmérsékleten (20°C) állni hagytuk majd kompenzáló oldattal (víz és reagens) szemben 765 nm-en mértük az abszorbanciát (spektrofotométer UV-VIS SPECORD 210). Az eredményeket mg galluszsav ekvivalensben 100 g drogra vonatkoztatva határoztuk meg.

Cserzőanyag meghatározása

A cserzőanyag tartalom meghatározása a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv bórporos spektrofotometriás

módszerével történt [23] vizes kivonatból (3 párhuzamos mérés), pirogallol összehasonlító oldat felhasználásával. A cserzőanyag tartalmat (% g/g) pirogallolban kifejezve számoltuk.

Összflavonoid tartalom meghatározása

A kivonatok összflavonoid tartalmát kolorimetriás módszerrel határoztuk meg (X. Román Gyógyszerkönyv *Cynarae folium* monográfiájánál leírt módszerrel, kisebb módosításokkal) [24]. Az 500 µl kivonathoz 1 ml 10% w/v nátrium acetátot, 600 µl 2,5% w/v AlCl₃-ot, 1,4 ml metanolt és 1,5 ml vizet adtunk. Az oldatokat homogenizáltuk és 15 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten (20°C), majd 430 nm-en leolvastuk az abszorbanciát nátrium acetát, alumínium klorid, metanol és vízzel szemben. Az eredményeket mg kvercetin ekvivalensben fejeztük ki 100 g drogra.

Flavonoid-O-glikozidok meghatározása

A hiperozidban kifejezett flavonoid tartalmat a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, O-glikozidok mérésére alkalmas, AlCl₃-al történő komplexképzésen alapuló, spektrofotometriás módszerrel mértük, a *Sambuci flos* monográfiájánál leírtak szerint [23]. Három párhuzamos mérést végeztünk és száraz drogra vonatkoztatva határoztuk meg a koncentrációt.

Antioxidáns vizsgálati módszer ABTS-sel

Az ABTS (2,2'-diazino-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav) és kálium perszulfát reakciója eredményezte gyök-kation képződésén alapszik a mérés. 10 mg ABTS tablettát oldunk 2,6 ml káliumperszulfát törzsoldatban. Az ABTS• + oldatot spektroszkópiai minőségű metanollal hígítottuk, hogy az oldat abszorbanciája 0,900 ± 0,05 legyen 734 nm-en. 2,5 ml ABTS•-t tartalmazó oldathoz a minták különböző mennyiségét adtuk (10-50 µl). A gátlási intervallum 20-80% között kell legyen. Az abszorbanciaértékeket 6 perc után mértük [25]. A minták antioxidáns kapacitását, grafikus módszerrel Excel-ben határoztuk meg.

Minden mérést három párhuzamosból végeztünk. Kiszámoltuk az IC₅₀-et, ez az antioxidáns koncentrációt (kivonat) jelöli, amely az ABTS gyök mennyiségének 50%-os csökkenéséhez szükséges.

I. táblázat

Chrysanthemum balsamitae herba kivonatok polifenol és flavonoid tartalma (n=3) (Folin-Ciocalteu és a Cynarae folium monográfiánál leírt módszer)

Kivonatok	Polifenolok mg GSE/100 g drog ^a	Flavonoidok mg KVE/100 g drog ^b
metanolos	11,19±1,21	8,04±0,54
metanolos vizes (1:1, v/v) elegy	65,40±4,51	21,58±3,11
vizes	29,03±3,21	16,38±1,75

^a GSE=galluszsav ekvivalens

^b KVE=kvercetin ekvivalens

II. táblázat

A Chrysanthemum balsamitae herba polifenol-, cserzőanyag- és flavonoid-O-glikozid tartalma (n=3) a Ph. Hung. VIII. szerint

Fenolos komponensek	Koncentráció g% (pirogallol)
polifenol	1,710±0,170
cserzőanyag	0,727±0,023
	Koncentráció g%(hiperozid)
flavonoid-O-glikozid	0,390±0,080

III. táblázat

A Chrysanthemum balsamitae folium antioxidáns kapacitása (n=3)

Kivonatok	ABTS IC ₅₀ mg/ml
metanolos	0,0012
metanolos vizes (1:1, v/v)	0,1060
vizes	0,0020

Gátlás képlete = $(A_o - A_t) / A_o \times 100$, ahol az A_o = ABTS oldat abszorbanciája 0 időpontban és az A_t = ABTS és minta keverék abszorbanciája 360 másodperc után.

Eredmények

A polifenol tartalom megadása a galluszsavban kifejezett g/g százalékos koncentrációval történt. A galluszsav kalibrációs egyenes egyenlete a következő volt: $y = 0,044x + 0,0057$ ($R^2 = 0,9906$). Az összflavonoid tartalmat kvercetinben fejeztük ki és a kalibrációs egyenes egyenlete a következő volt: $y = 0,156x - 0,1676$ ($R^2 = 0,9954$) (I. táblázat).

A hiperozidban kifejezett flavonoid tartalom és a pirogallóban kifejezett cserzőanyag- és polifenol tartalom eredményei a II. táblázatban találhatóak. Az ABTS antioxidáns mérés adatait a III. táblázatban összegeztük.

Eredményeink kiértékelésénél figyelembe vettük a nemzetközi szakirodalomban közölt adatokat. Benedec és munkatársai Kolozsavárról 2016-ban [26] a *Ch. balsamitae* var. *balsamita* és var. *tanacetoides* etanolos kivonatainak flavonoid és polifenol tartalmát vizsgálták, melynek során eredményeinkhez képest kisebb értékeket kaptak. Alexieva és munkatársai 2013-ban [12] Bulgáriában *Ch. balsamitae herba* dekortumokat vizsgáltak (0,48-0,60 mg galluszsav/g fagyasztott növény), így eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani. Szintén az említett országból, Popova 2014-ben [27] az etanolos kivonatok galluszsavban kifejezett polifenoltartalomra

0,89 mg/friss súly értéket kapott. Ez az érték alacsonyabb a metanolos, metanolos-vizes és vizes kivonattal elért eredményeinknél.

A Román Gyógyszerkönyvben [24] hivatalos *Ratanhiae radix* cserzőanyagtartalmához viszonyítva a *Ch. balsamitae herbae* 83%-kal alacsonyabb. A szintén hivatalos *Crataegi folium cum flore* droghoz képest a hiperozidban kifejezett flavonoid tartalom 35%-kal kevesebb az általunk vizsgált droghoz képest.

Az antioxidáns mérések ABTS módszerével a metanolos és a vizes kivonatok bírnak magas antioxidáns kapacitással, kevésbé a metanolos:vizes (1:1) kivonatok. Méréseinket kevésbé tudjuk összehasonlítani Popova és mtsai 2014-es eredményeivel [27], akik az etanolos kivonatokból végeztek meghatározásokat (11,61±0,25 µM TE/friss növény, troloxban kifejezve).

Következtetések

A legmagasabb polifenol- és flavonoid tartalmat a metanolos-vizes (1:1) kivonatból mértük, ami nem járt együtt egyben magas antioxidáns kapacitással, ellenkezőleg, utóbbi értéke ebben a kivonatban volt a legalacsonyabb. A metanolos kivonatból számoltuk a legkisebb összpolfenol- és flavonoid tartalmat, ugyanakkor ez a kivonatok bizonyult magas antioxidáns kapacitásúnak.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki az Erdélyi Múzeum Egyesület és Semmelweis Egyetemnek (52.2/P.2.EMEOGYSZ/ 01.02.2016).

IRODALOM

1. *Melius P.*: Herbárium, Az fáknak, füveknek nevekről, természetekről és hasznairól, Kriterion Könyvkiadó, Bukarest, 1978, 414 old.
2. *Rácz G., Rácz-Kotilla E., Szabó L. Gy.*: Gyógynövények ismerete, A fitoterápia és az alternatív medicina alapjai, GalenusKiadó, Budapest, 2012, 387-388 old.
3. *Ciocârlan V.*: Flora ilustrată a României, Ceres Kiadó, Bukarest, 2000, 802 old.
4. *Muntean, L. S., Tămaș, M., Muntean, S., Muntean, L., Duda, M.M., Vrăban, D.I., Florin, S.*: Tratat de plante medicinale cultivate și spontane, II.kiadás, Risoprint Kiadó, Kolozsvár, 2016, 853-855 old.
5. ***Flora Republicii Populare Romîne, IX.kötet, Academemia Republicii Populare Romîne Kiadó, Bukarest, 1964, 421 old.
6. ***Flora Europaea, Cambridge University Press, United Kingdom, 4.kötet, 1976, 914 old.
7. *List P.H., Hörhammer L.*: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972, 906-907 old.
8. *Coprean D, Giurgea R, Rusu M, Tămaș M.*: Rev Roum Physiol., 28, 1-2, 27-29 (1991).
9. *Rus, M.A, Tămas, M., Puica, C., Roman, I., Sabadas, M.*: Phytother.Res., 19, 9, 744-9. (2005).
10. *Kubo, A., Kubo, I.*: J.of Nat.Prod., 58, 10, 1565-1569 (1995).
11. *Hassanpouraghdam, M.B., Tabatabaie, S.J., Nazemiyeh, H., Vojodi, L., Aazami, M.A., Shoja, A.M.*: Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology, 15, 3, 119-124. (2008).
12. *Alexieva, I., Mihaylova, D., Popova, A.*: НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ, 52, 10, 2, (2013).
13. *Pérez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Burzaco, A.*: Acta Horticulturae, 306, 188-193. (1992).
14. *Başer, K.H.C., Demirci, B., Tabanca, N., Özek, T., Gören, N.*: Flavour and Fragrance Journal, 16, 3, 195-200 (2001).
15. *Monfared, A., Davarani, S.S.H., Rustaiyan, A., Masoudi, S.*: Journal of Essential Oil Research, 14, 1, 1-2. (2002).
16. *Hassanpouraghdam, M.B.*: Nat.Prod.Res, 23, 7, 672-7. (2009).
17. *Todorova M.N., Ognzanov I.V.*: Phytochemistry, 28, 4, 1115-1117 (1989).
18. *Pukalskas A., Venskutonis P.R., Dijkgraaf I., A. van Beek T.*: Food Chemistry, 122, 3, 1 804–811. (2010).
19. *Bylaite E., Venskutonis R., Roozen J.P., Posthumus M.A.*: J.Agric.Food Chem., 48, 6, 2409-14. (2000).
20. *Mărculescu, A., Hanganu, D., Olah, N.K.*: Roum. Biotechnol. Lett., 6, 477-484. (2001).
21. *Finta A., Varga E.*: Gyógyszerészet Suppl., 15. (2008).
22. *Singleton, V. L., Rossi, J. A.*: Amer. J. Enol. Viticult. 16, 144–158. (1965).
23. ***Pharmacopoea Hungarica Ed.VIII, I.kötet, Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2003, 232 old.
24. ***Farmacopeea Română, X.kiadás, Medicală Kiadó, Bukarest, 1993, 334-335 old.
25. *Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.*: Free Radical Biol. Med. 26, 1231–1237 (1999).
26. *Benedec, D., Filip, L., Vlase, L., Bele, C., Sevastre, B., Raita, O., Olah N.K., Hanganu, D.*: PJPS, 29, 4, 1359-1364 (2016).
27. *Popova, A.T., Mihaylova, D.S., Alexieva I.N.*: Int.J.Curr. Microbiol.App.Sci, 3, 11, 436-444 (2014).

Érkezett: 2018. augusztus 13.

Közforgalomban dolgozó gyógyszerészek antibiotikum felhasználással és rezisztenciával kapcsolatos véleménye (rövid közlemény)

GAJDÁCS MÁRIÓ*, PAULIK EDIT, SZABÓ ANDREA

SZTE ÁOK Népegészségtani Intézet, Szeged, Dóm tér 10. – 6720

*Levelező szerző: mariopharma92@gmail.com

Summary

Összefoglalás

Gajdács M., Paulik E., Szabó A.: *The opinions of community pharmacists related to antibiotic use and resistance*

Introduction: The development of antibacterial resistance is accelerated by improper use of antibiotics. Pharmacists working in community settings are considered as an important part of the healthcare system. Several international recommendations highlight their role in the management of antibiotic resistance, but it is imperative for them to have the proper level of knowledge related to this area.

Aims: The aim of our study was to evaluate the beliefs and attitudes of pharmacists working in the Southern Great Plain of Hungary in relation to the use of antibiotics and the development of antibiotic resistance.

Methods: Our questionnaire-based survey was conducted from January 2016, in the community pharmacies of the Southern Great Plain and at postgraduate courses of the University of Szeged. Altogether 105 participants completed the questionnaires.

Results: 99.3% of the respondents consider antibiotics a priority drug group, almost 30% of the pharmacists have already given out antibiotics without a medical prescription. 45.7% admitted that the temperament of patients determines their dispensing practice. 97.1% believes it is important to explain the proper use of antibiotics during dispensing, and 90.5% said that it is very important to recommend probiotics.

Conclusion: Community pharmacists working in the south eastern part of the country have a positive view on the importance of pharmaceutical care and patient education in promoting adequate antibiotic use. The pharmacists should avoid giving out antibiotics without a medical prescription. Courses and advanced level training could be of particular importance in achieving change in this area.

Keywords: antibiotics, resistance, dispensing practice, community pharmacy, professional liability

Bevezetés: Az antibakteriális rezisztencia kialakulását gyorsítja az antibiotikumok helytelen alkalmazása. A közforgalmú gyógyszerárakban dolgozó gyógyszerészeket az egészségügyi ellátás fontos ágának tekintjük. Több nemzetközi ajánlás is kiemeli a közforgalomban dolgozó gyógyszerészek szerepét az antibiotikum rezisztencia menedzsmentjében, azonban ehhez elengedhetetlenül szükséges a szakemberek ismereteinek megfelelő szintje.

Célkitűzés: Kutatásunk célja az ország délkeleti részén közforgalomban tevékenykedő gyógyszerészek véleményének és attitűdjének felmérése az antibiotikumok felhasználásával, rezisztenciával kapcsolatban, valamint felelősségérzetük vizsgálatára a helytelen antibiotikum-felhasználás vonatkozásában.

Módszerek: Vizsgálatunkat 2016 januárjától folytattuk, papír alapú kérdőív segítségével, a Dél-alföldi Régió közforgalmú gyógyszerárakban, illetve a Szegedi Tudományegyetem szinten tartó továbbképzéseink; a lekérdezés során 105 gyógyszerész töltötte ki kérdőívünket.

Eredmények: A válaszadók 93,3%-a az antibiotikumokat kiemelt gyógyszercsoportnak tartja. Közel 30% nyilatkozta azt, hogy adott már ki recept nélkül antibiotikumot. 45,7% szerint a betegek temperamentuma alapvetően meghatározza gyógyszerkiadási szokásait. 97,1% fontosnak tartja, hogy expedálás során kitérjen az antibiotikumok helyes felhasználására, 90,5% pedig nagy jelentőséget tulajdonít a probiotikumok ajánlásának.

Következtetések: Az ország délkeleti részén dolgozó gyógyszerészek pozitívan vélekednek a gondozás és a betegoktatás jelentőségéről a megfelelő gyógyszerhasználat elősegítésében. Váloztatni – elsősorban – azon kollégák gyakorlatán kellene, akiken keresztül az antibiotikumokhoz vény nélkül is hozzá tudnak jutni a páciensek. A változás érdekében a szakmai tanfolyamokon és a szinten tartó továbbképzéseken kiemelt jelentőséget kell kapjon a téma oktatása.

Kulcsszavak: antibiotikumok, rezisztencia, expedálás, közforgalom, szakmai felelősség

1. Bevezetés

A baktériumok antibiotikumokkal szemben kialakuló, egyre kiterjedtebb rezisztenciáját és az új hatásmechanizmusú szerek hiányát a 21. század egyik legjelentősebb egészségügyi problémájának tekinthetjük [1]. Az antibakteriális szerek ellen kialakuló védekező mechanizmusok (pl. antibiotikumokat bontó enzimek termelése, célmolekulák túl-

termelődése, efflux pumpák expressziója) és így a rezisztens baktériumok kiválasztódása a törzsféjlődés természetes velejárója, azonban a környezetből szerzett, sokszor a hatékony terápiás dózis alatti gyógyszerhatás elősegíti, sőt gyorsítja ezt a folyamatot [2, 3]. A lakosság nem megfelelő ismeretei és elvárásai szintén fontos tényezőnek bizonyultak. Egy nemrégiben a Dél-alföldi régió területén végzett felmérés kimutatta, hogy a megkérdezettek

46,3%-a szerint az influenza és a megfázás hatékonyan kezelhető antibiotikummal [4], a páciensek egy része abban méri az orvos munkáját, hogy felírt-e neki az orvos antibiotikumot. Az egészségügyi szakemberek (házi orvosok, expedáló gyógyszerészek) nem megfelelő tájékozottsága és attitűdje – a naprakész ismeretek hiánya az antibiotikum rezisztencia témakörében, megfelelési kényszer a betegek felé, a vény nélküli gyógyszerkiadás helytelen gyakorlata – szintén fontos tényezői a rezisztencia elsődleges terjedésének [5, 6]. Az antibiotikum-rezisztencia problémája jellegénél fogva a teljes társadalmat érinti, ezért megoldása a betegek szintjétől egészen a döntéshozók szintjéig következetes fellépést igényel, olyannyira, hogy a Világgazdasági Fórum (WEF) jegyezte, mint a világot kiemelten fenyegető problémát [7, 8]. További baljós jövőképet fest az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése, mely szerint 2050-re a rezisztens kórokozók által okozott halálesetek száma eléri majd a daganatos betegségek által okozott halálozást [1].

A közforgalmú gyógyszertárakban dolgozó gyógyszerészeket a primér egészségügyi ellátás különleges és fontos ágának tekinthetjük. Azon túl, hogy a páciensek rajtuk keresztül juthatnak hozzá a gyógyuláshoz, életminőségük fenntartásához szükséges gyógyszerekhez, közvetlen szerepük van különböző betegségek elsődleges prevenciójában és a betegek oktatásában is a helyes gyógyszer-tári gyakorlat (GPP, *good pharmacy practice*) és a gyógyszerészeti gondozás tevékenységén belül. Több nemzetközi ajánlás is kiemeli a közforgalomban dolgozó gyógyszerészek szerepét az antibiotikum-rezisztencia menedzsmentjében és visszaszorításában, illetve a megfelelő gyógyszerhasználat elősegítésében, ehhez azonban elengedhetetlenül szükséges a szakemberek ismereteinek megfelelő szintje, odaadása és olyan munkahelyi színtér, ahol végezni tudják ezen tevékenységüket [9-12].

Kutatásunk célja az ország délkeleti részén (Csongrád, Bács-Kiskun és Békés megye), közforgalomban tevékenykedő gyógyszerészek antibiotikumokkal, ezen belül felhasználásukkal, jelentőségükkel és az ellenük kialakuló rezisztenciával kapcsolatos véleményének és attitűdjének felmérése volt, kitérve a gyógyszerészek személyes felelősségérzetének vizsgálatára a helytelen antibiotikum-felhasználás vonatkozásában.

2. Adatgyűjtés és adatelemzés

Kvantitatív vizsgálatunkat 2016 januárjától kezdve végeztük, saját fejlesztésű, anonim, önkitöltős, pa-

pír alapú kérdőív segítségével (SZTE etikai engedély száma: 3688). A Dél-alföldi Régió közforgalmú gyógyszertáraiban, illetve a Szegedi Tudományegyetem keretein belül szervezett, kötelező szinten tartó továbbképzések során 160 gyógyszerészt kerestünk meg kérdőívünkkel, amelyet 105 gyógyszerész töltött ki értékelhetően (válaszadási arány: 65,6%).

A gyógyszerészeti minta deskriptív elemzése során átlagokat (folytonos változók) és gyakoriságokat (kategorikus adatok) vizsgáltunk. Az elemzések minden esetben az aktuális kérdésre érvényes választ adók száma alapján történtek. Az adatok statisztikai elemzése SPSS 24.0 programmal történt, a különbségek megállapítására χ^2 -próbát alkalmaztunk, eredményeinket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Kutatásunk során az alábbiakat vizsgáltuk:

1. *Demográfiai és szakmai jellemzők (nem, életkor, szakképzettség).*
2. *Az antibiotikumok (mint gyógyszercsoport) és az antibiotikum-rezisztencia jelentőségével, illetve a gyógyszerészek felelősségével kapcsolatos vélemény.*
3. *Az antibiotikumokkal kapcsolatos ismeretek szubjektív megítélése.*
4. *A prevenció jelentőségével kapcsolatos attitűd.*

3. Eredmények

3.1. A minta jellemzői

A válaszadók átlagéletkora 34,8 év volt (minimum: 23 év; maximum: 74; $SD \pm 12,3$), a 35 év feletti korosztály tagjai a lekérdezettek 41%-át tették ki. Nem szerint a női dominancia volt jellemző (válaszadók 71,4%-a, 75 fő volt nő). A megkérdezettek 63,8%-a nem rendelkezett szakvizsgával (vagy első szakvizsgája megszerzése folyamatban volt). A szakgyógyszerészek esetén az átlagos szakvizsgaszám medián értéke egy, többségében *Farmakológia, farmakoterápia* (40%).

3.2. Az antibiotikumokkal, antibiotikum rezisztencia jelenségével és a közforgalmú gyógyszerészek felelősségével kapcsolatos vélemények

A felmérésünkben részt vevő, közforgalomban dolgozó gyógyszerészek kivétel nélkül egyetértettek abban, hogy az antibiotikumok helytelen használata súlyos egészségügyi problémát jelent, 93,3%-uk pedig kiemelt jelentőségű gyógyszercsoportnak tartja azokat. Arra a kérdésre, hogy „kiad-e vény nélkül antibiotikumot és ha igen, ezt

milyen gyakran teszi” a válaszadók 71,4%-a nyilatkozta azt, hogy soha, vagy csak a jogszabály által előírt esetekben, a megfelelő igazolvány ellenében, míg 23,8%-uk az esetek *kevesebb, mint 1%-ában*, 4,8%-k az esetek *1-5%-ában* kiad recept nélkül antibiotikumot az azt kérő páciensnek. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a vény nélküli gyógyszerkiadás és a gyógyszerészek életkora, szakképzettsége, illetve a saját ismeretei között. 86,7% tartotta problémának, hogy van olyan gyógyszerész kolléga, aki vény nélkül is kiad antibiotikumot, 81% szerint ezek a szakemberek járványügyi kockázatot okoznak és felelősség terheli őket. Válaszadóink 45,7%-a nyilatkozott úgy, hogy a betegek temperamentuma alapvetően meghatározza gyógyszerkiadási szokásait, többnyire a 35 év alatti kollégák ($p < 0,05$) körében. A megkérdezettek 82,9%-a úgy gondolta, hogy az antibiotikumok használata az állattenyésztésben legalább annyira jelentős tényezője a bakteriális rezisztencia kialakulásának, mint a nem megfelelő indikációban történő felhasználásuk az egészségügyben. 81,9% szerint a nem megfelelően választott antibiotikum-terápia éves szinten jelentősen növeli az egészségügyi ellátás költségeit országos szinten, míg 50,5% értett egyet az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (jogutódja a NEAK) antibiotikumokra vonatkozó támogatási szintjével.

I. táblázat

Közfoglalmú gyógyszerészek becslése az antibiotikumokra vonatkozó vényforgalomról az összes vényre vonatkoztatva (%)

Antibiotikumra vonatkozó vények %-os aránya (kategóriák)	Válaszadók %-os aránya
0-5%	7,6
5,1-10,0%	26,7
10,1-15,0%	22,9
15,1-20,0%	17,1
20,1-25,0%	10,5
több mint 25,0%	15,2

3.3. Az antibiotikumokkal kapcsolatos ismeretekre, illetve a gyógyszerészi gondozásra vonatkozó vélemények

Vizsgáltuk, hogy válaszadóink vélekedése szerint a patikai vényforgalom átlagosan hány százalékát teszik ki antibiotikum kiváltására szolgáló receptek (*I. táblázat*). A megkérdezettek 22,9%-a szerint legalább minden tizedik (!) vény antibiotikum kiadására vonatkozik, ezért a gyógyszerészek felkészültsége és elkötelezettsége a lehetséges intervenció iránt kiemelt jelentőségű. A megkérdezettek saját ismereteikre vonatkozó eredményeit a *II. táblázat* összegzi. Megfigyelhető, hogy a 35 év alatti kollégák ($p < 0,01$), illetve a szakvizsgával rendelkezők elégedettebbek ($p < 0,001$) voltak az antibiotikum-rezisztenciával kapcsolatos ismereteikkel, a döntő többség (96,2%) fontosnak tartotta, hogy naprakész információkkal rendelkezzen az elérhető termékek vonatkozásában.

A megkérdezettek 81%-a egyet értett abban, hogy az antibiotikumok megfelelő felhasználása nagyobb arányú lenne, ha a gyógyszerészeknek lenne ideje ellátni gondozási feladataikat, a 35 év feletti kollégák szignifikánsan nagyobb arányban nyilatkoztak így ($p < 0,05$). Bár a válaszadók egy része úgy gondolta, hogy erre nincs kereslet, 78,1% szerint a tanácsokra a betegek többnyire fogékonyak, örömmel fogadják azokat. 97,1% fontosnak tartotta, hogy expedálás során kitérjen az antibiotikumok helyes felhasználásának részleteire, 90,5% pedig nagy jelentőséget tulajdonított a probiotikumok, étrend-kiegészítők ajánlásának az antibiotikumot kiváltó betegnek, hogy a gyógyszerhasználatból adódó esetleges mellékhatásokat (pl. dysbiosis, antibiotikum-asszociált hasmenés) a beteg elkerülhesse.

4. Összegzés, következtetések

Kutatásunk célja közfoglalmú gyógyszerertárban dolgozó gyógyszerészek antibiotikum-felhasználásáról

II. táblázat

A gyógyszerészek szubjektív véleménye az antibiotikumokkal kapcsolatos ismereteikről

Állítások	Egyetért	Nem ért egyet	Nem tudja
A szakmai ismereteim az antibakteriális terápiára vonatkozóan megfelelőek.	91,4%	1,9%	6,7%
A bakteriális rezisztenciával kapcsolatos ismereteim megfelelőek.	69,5%	3,8%	26,7%
Az egyetemi képzés alatt lehetne hangsúlyosabb az antibiotikumok felhasználásához kapcsolódó oktatás.	90,5%	8,6%	0,9%
Fontosnak tartom, hogy megismerjem a gyógyszerkincsben található antibiotikumokat, illetve a piacon megjelenő termékeket.	90,5%	8,6%	0,9%

lással, prevencióval és személyes felelősségükkel kapcsolatos ismereteinek és attitűdjének feltárása volt. Eredményeink tükrében elmondható, hogy az ország délkeleti részén dolgozó gyógyszerészek többsége a tőle elvárható szinten részt vesz az antibiotikum rezisztencia visszaszorításában, valamint pozitívan vélekedik a gondozás és a betegoktatás jelentőségéről a megfelelő gyógyszerhasználat elősegítésében. Ez nem elhanyagolható szempont, ha figyelembe vesszük a patikákban antibiotikumot vásárló betegek számát, hiszen minden alkalommal lehetőség nyílik a betegek szemléletmódjának megváltoztatására. Arra azonban figyelni kell, hogy ne a vényt kiváltani óhajtó viselkedése határozza meg az expediálás menetét. A válaszadók többsége elégedettnek bizonyult a saját ismereteiket illetően, elismerve az önálló utánjárás jelentőségét. Fontos lenne azon kollégák gyakorlatán is változtatni, akik ugyan kisebbségben vannak, de fenntartják a betegekben azt a vélekedést, hogy az antibiotikumokhoz vény nélkül (sokszor teljesen indokolatlan esetben) is hozzá tudnak jutni. Az előbb említett kisebbség, illetve akik nem érezték biztosnak tudásukat (többnyire az idősebb korosztály és a szakvizsgával nem rendelkezők), a szakmai tudásfejlesztés szempontjából jó célcsoportnak tekinthetők. A különböző szakmai tanfolyamok és szinten tartó továbbképzések fenti szempontok szerinti kiegészítése hosszú távon kiemelt jelentőségű lehet a változás elérésében.

5. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a kérdőívet kitöltő gyógyszerész kollégák, a kérdőív kitöltését segítő gyógyszerértékelők és a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar dolgozói felé, akik ezzel lehetővé tették kutatásunk létrejöttét. *Gajdács Máriót* a Balassi Intézet Kutatói Program támogatta.

IRODALOM

1. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf [2016.12.28.] World Health Organisation. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO, 2014.
2. Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (1), 42-51 (2015).
3. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liijquist, B., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L.: *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268-281 (2012).
4. *Gajdács M.*: Az antibiotikum felhasználással kapcsolatos lakossági ismeretek és attitűdök. 23. Marosvásárhelyi Tudományos Diákköri Konferencia. Orvostudományi Értesítő 89 (Suppl.1). 128, (2016).
5. Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.S., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J.: *Bad Bugs, No Drugs*: *Clin. Inf. Dis.* 48, 1-16 (2009).
6. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-consumption-europe-esac-net-2012.pdf> [2016.12.28.] European Centre for Disease Prevention and Control: Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012.
7. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Antimicrobial-Resistance-in-G7-Countries-and-Beyond.pdf> [2016.12.28.] Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: Economic issues, policies and options for action, 2015.
8. http://www3.weforum.org/docs/WEF_GlobalRisks_Report_2013.pdf [2016.12.28.] World Economic Forum: Global Risks Eight Edition. World Economic Forum, USA, 2013.
9. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/262815/The-role-of-pharmacist-in-encouraging-prudent-use-of-antibiotics-and-averting-antimicrobial-resistance-a-review-of-policy-and-experience-Eng.pdf?ua=1 [2016.12.28.] The role of pharmacist in encouraging prudent use of antibiotic medicines and averting antimicrobial resistance – a review of current policies and experiences in Europe. WHO, 2014.
10. Simpson, S.A., Wood, F., Butler, C.C.: *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 292-296 (2007).
11. Weller, T.M., Jamieson, C.E.: *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 295-298 (2004).
12. Munoz E.B., Dorado, J.E., Martínez, F.M.: *Aten. Primaria* 46 (7), 367-375 (2014).

Érkezett: 2018. június 15.

