



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**CIKLODEXTRINEK ÉS MUKOADHEZÍV TARTÓSÍTÓ RENDSZER
ALKALMAZÁSA SZEMÉSZETI KÉSZÍTMÉNYEK
FEJLESZTÉSÉBEN**

Bíró Tivadar

Gyógyszerész

Témavezető:

Dr. habil. Aigner Zoltán Ph.D.

SZEGED

2021

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Program
Programvezető: *Prof. Dr. Csóka Ildikó*, intézetvezető egyetemi tanár

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Témavezető: *Dr. habil. Aigner Zoltán*, egyetemi docens

Bíró Tivadar

CIKLODEXTRINEK ÉS MUKOADHEZÍV TARTÓSÍTÓ RENDSZER ALKALMAZÁSA SZEMÉSZETI KÉSZÍTMÉNYEK FEJLESZTÉSÉBEN

Komplexvizsga-bizottság:

Elnök: *Prof. Dr. Révész Piroska D.Sc.*, Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Tagok: *Prof. Dr. Bácskay Ildikó Ph.D.*, Debreceni Egyetem,
Gyógyszertechnológiai Tanszék

Ifj. Dr. habil. Regdon Géza Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bíráló bizottság:

Elnök: *Prof. Dr. Kiss Loránd D.Sc.*, Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerkémiai Intézet

Opponensek: *Prof. Dr. Bácskay Ildikó Ph.D.*, Debreceni Egyetem,
Gyógyszertechnológiai Tanszék

Dr. Szenté Lajos D.Sc., Cyclolab Ltd., Budapest

Tagok: *Dr. habil. Vasas Andrea Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem,
Farmakognóziái Intézet

Dr. habil. Szakonyi Gerda Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszeranalitikai Intézet

SZEGED

2021

1. BEVEZETÉS

A hatékony, beteg-együttműködés szempontjából optimális szemészeti készítmények fejlesztése nagy kihívást jelent a gyógyszertechnológusok számára, ugyanis a szem összetett anatómiai szerkezete, védekező mechanizmusai és a készítmény alkalmazhatósága jelentősen korlátozza a formulafejlesztés lehetőségeit. Fő célunk, hogy megfeleljünk a betegközpontú terápia és a gyógyszerformulálás technológiai követelményeinek.

A szem az egyik legfontosabb szerve az emberi testnek. Bármilyen eredetű látászavar esetén komoly hátrány alakul ki a mindennapi életvitelben. A beteg-compliance kulcsfontosságú, amihez hozzájárul az optimális, egyszerűen és önállóan kivitelezhető alkalmazás, megfelelő hatékonyság, minimális irritáció figyelembevétele a fejlesztés során. A szem sajátos fiziológiás igényei teszik nehezzé az optimalizálást. Számos új módszert fejlesztettek a megnövelt biohasznosulású szemészeti készítmények formulálására. Ezek közül leginkább a szemcseppek vannak a kutatólaborok fókuszpontjában. A szemcseppek számos előnye mellett (könnyű alkalmazhatóság, nem invazív, kényelmes és gazdaságos), sok hátrányuk ismert, amelyek megoldásra várnak: rövid tartózkodási idő, kis felszívódás, alacsony biohasznosulás és problémás mikrobiológiai stabilitás a többadagos készítményekben.

A szemészeti készítmény hatékonyságának optimalizálásához növelni kell a vízben rosszul oldódó hatóanyag oldhatóságát és tartózkodási idejét a szem felszínén. Oldékonyságnövelő ciklodextrin (CD) származékok és mukoadhezív polimerek alkalmazásával a hatóanyag permeabilitása és a gyógyszerkészítmény szemfelszínen való tartózkodási ideje nő, így az elvárt hatékonyság és biohasznosulás elérhető. A szemcseppek antimikróbás stabilitása kifejezetten fontos. Korábbi vizsgálatok alapján a leggyakrabban alkalmazott tartósítószer, a benzalkónium klorid (BK) irritáló és toxikus hatású a kornea epitélsejtjein, azaz egy jobban tolerálható, antimikróbás, alternatív anyag alkalmazása szükséges az új készítmények fejlesztésében.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkák során célul tűztük ki egy olyan innovatív szemészeti készítmény fejlesztését, amelyben hatóanyagként prednizolont (PR) alkalmaztunk. További célunk volt a készítmény megfelelő fiziológiai, reológiai, mukoadhezív és mikrobiológiai paramétereinek kialakítása az optimális toxicitás és hatóanyag-permeabilitás mellett, vízdékony CD zárványkomplex és prezervatív, mukoadhezív cink-hialuronát (ZnHA)–cink-glükonát (ZnGlu) rendszer alkalmazásával.

A munka fő lépései a következők voltak:

- I. PR-CD zárványkomplex képzése és az alkalmazott CD mennyiségének optimalizálása fázis oldékonyság vizsgálattal és dialízismembrán-diffúziós módszerrel;
- II. Fiziológiás paraméterek beállítása pH, felületi feszültség és ozmolalitás mérésével;
- III. Viskozitás és mukoadhezív tulajdonságok vizsgálata;
- IV. Mikrobiológiai stabilitás vizsgálata az Európai Gyógyszerkönyvben (EP) hivatalos módszerrel;
- V. *In vitro* citotoxicitás vizsgálata humán kornea epitél sejtvonalon (HCE-T);
- VI. Hatóanyag permeabilitásának vizsgálata *in vitro* HCE-T és *ex vivo* sertés kornea modellek alkalmazásával.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

A PR-t a Henan Lihua Gyógyszerészeti Vállalattól (Henan, Kína) biztosította. A hidroxipropil- β -CD-t (HPBCD) a Wacker-Chemie GmbH-től (München, Németország) szereztük be, a hidroxipropil- γ -CD-t (HPGCD) a Cyclolab Kft (Budapest, Magyarország), a ZnHA-ot és a ZnGlu-ot a Richter Gedeon Nyrt. (Budapest, Magyarország) felajánlásával alkalmaztuk. A BK-t, a NaCl-ot, a bórsavat és a bóraxot (borát-puffer komponensei) valamint a dimetil-szulfoxidot (DMSO) a Molar Chemical Kft-től (Halászttelek, Magyarország) vásároltuk. A mucint (porcine gastric mucin type II) a Sigma Aldrich-től szereztük be (Saint Louis, Missouri, USA). Ringer-oldatot alkalmaztunk a vizsgálatok médiumaként, aminek pH értéke 7,4-re volt beállítva.

3.2. Módszerek

3.2.1. PR-CD zárványkomplex vizsgálata

3.2.1.1. Fázis oldékonyság vizsgálat

A fázis oldékonyság vizsgálat során a PR-t feleslegben adtuk HPBCD-t illetve HPGCD-t tartalmazó, különböző koncentrációjú (0-150 mM) oldatokhoz (tisztított vízzel készítve), majd 48 órán keresztül kevertettük. Ezt követően a mintákat 0,45 μ m-es membránszűrőn (Millex-HV Syringe Driven Filter Unit, 0.45 μ m, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) szűrtük, és a hatóanyag-tartalmat UV spektrofotométerrel (hullámhossz: 248 nm, Unicam UV/Vis Spectrometer, ATI Unicam, Cambridge, UK) mértük. Az eredményeket fázis-oldékonysági görbén ábrázoltuk, meghatároztuk a diagram típusát és számoltuk a látszólagos stabilitási állandókat (K_s).

3.2.2. A szemészeti készítmények előállítása

A készítményekben hatóanyagként 0,1%-ban PR-t alkalmaztunk. Adott mennyiségű HPBCD-t vagy HPGCD-t borát pufferben (tisztított vízzel készített, 0,22 μ m-es membránszűrőn átszűrte) feloldottunk. A PR hozzáadása után 10 percig ultrahangos kádban ráztuk a hatóanyag teljes feloldódásáig. Ezt követően ZnHA-ot és ZnGlu-ot adtunk az oldathoz 0,5%-os mennyiségben. Az ozmolalitást NaCl-al állítottuk be 300 mOsm/kg értékre, a pH 6,20 volt minden összetétel esetében. Minden szemcseppet aseptikus körülmények között készítettünk. A mintákat 24 órán keresztül hűtőben tároltuk a polimer teljes duzzadása céljából.

3.2.3. Dialízismembrán-diffúzió vizsgálata

Az optimális hatóanyag penetrációhoz szükséges CD koncentrációt dialízismembrán-diffúziós vizsgálattal határoztuk meg. Zellutrans/Roth cellulóz dialízismembránt (10 mm széles, 6,4 mm átmérő, MWCO: 12000-14000 D) alkalmaztunk a kísérletekhez. A membránzsákokat Spectra/Por záróelemekkel zártuk. A zsákokba 2,00 ml mintát injektáltunk, majd azokat 25 ml borát puffert tartalmazó akceptor fázisba (pH=7,4) helyeztük 35 °C-on temperálva. Adott időintervallumokban (15, 30, 60, 120, 180 and 240 perc) 1,00 ml mintát vettünk az akceptor fázisból, amit friss borát pufferrel póoltunk. 4 párhuzamos mérést végeztünk el. A hatóanyag-tartalmat UV spektrofotometriás eljárással határoztuk meg.

3.2.4. Viskozitás

Physica MCR 101 reométert használtunk a viszkozitás mérésekhez kúp-lemez mérőeszközzel (Anton Paar, Graz, Ausztria, CP25-1, cone angle 0,997°, 25 mm átmérő). A mintákat 25 °C-on vizsgáltuk; a nyírási sebességet 0,1-től 100 1/s-ig növeltük, a kiértékelésnél a 100 1/s nyírási sebességen mért átlagértékeket használtuk. A viszkozitás-értékeket CD koncentráció függvényében ábrázoltuk.

3.2.5. Felületi feszültség

A minták felületi feszültségét OCA 20 nedvesedési peremszög meghatározó készülékkel (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Németország) mértük, függő csepp módszerrel. A felületi feszültség értékeket SCA 20/22 szoftvermodul segítségével számoltuk ki Young-Laplace egyenlet segítségével.

3.2.6. Tartósítószer-hatékonyság vizsgálata

A ZnHA–ZnGlu rendszer összetételünkben való mikrobiológiai hatékonyságát a EP-ben hivatalos módszerrel vizsgáltuk, BK-dal tartósított mintákkal összehasonlítva. A tartósítószer hatékonyságát kontroll törzseken teszteltük: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) és *Candida albicans* (ATCC 10231). A különböző mikroorganizmusokat tartalmazó inokulum szuszpenziókat 9 g/l NaCl-ot tartalmazó steril oldattal készítettük. A telepképző egységek számát (CFU) lemezöntéses módszerrel, majd telepszámlálással határoztuk meg. A tartósított mintákat beoltottuk 10^6 CFU/ml baktériumot illetve gombát tartalmazó szuszpenziókkal. A standard módszert követve három párhuzamos mintát vettünk adott időközönként (0; 6; 24 óra; 7; 14; 28 nap) és Sabouraud-dextróz folyékony agar (gomba) vagy emésztett szója-kazein folyékony agar (baktériumok) táptalajban oszlattuk el. A baktériumot tartalmazó mintákat 30-35°C-on 24 óráig, a gomba-tartalmú mintákat 20-25°C-on 48 óráig inkubáltuk. A CFU csökkenésének

\log_{10} értékeit összehasonlítottuk az EP A és B szintű követelményeivel (EP-A, EP-B). Célunk volt, hogy igazoljuk a ZnHA–ZnGlu gyógyszerkönyvi követelményeknek való megfelelését a CD származék jelenléte mellett.

3.2.7. Mukoadhézió vizsgálata

A formulált összetételeink mukoadhézióját tensile teszttel vizsgáltuk. A mintákat ZnHA–ZnGlu rendszerrel és anélkül készítettük elő. Célunk volt, hogy igazoljuk a biopolimer tartalmú mintáink mukoadhezivitását, illetve a CD származékok esetleges befolyását a mukoadhézióra. A méréseket TA.XT Plus Texture analyzer-rel (ENCO, Spinea, Olaszország) végeztük, 1 kg-os cellával és 1 cm átmérőjű henger szondával felszerelve. 20 μ l mintát helyeztünk a szondára, amit egy 50 μ l 8%-os mucin diszperzióval (szimulált könnyfolyadékkal készült) vagy szimulált könnyfolyadékkal (vak, pH=7,4) átitatott szűrőpapír korongra helyeztünk. 2500 mN előnyomást alkalmaztunk 3 percig. A szonda függőleges emelésével elválasztottuk a mintát. A szonda emelkedésének sebessége a vizsgálat során 2,5 mm/perc volt.

3.2.8. Humán kornea epitelsejtvonal előkészítése

A humán kornea epitelsejtek ((HCE-T; RCB 2280; RIKEN BRC, Tsukuba, Japán) immortalizálása rekombináns SV-40 adenovírus vektorral történt. A sejteket F-12 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ban (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 10%-os magzati szarvasmarha szérummal (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 0.5% DMSO-val, 5 μ g/ml rekombináns humán inzulinnal és 10 ng/ml rekombináns humán epidermális növekedési faktorral kiegészítve inkubátorban növesztettük (5% CO₂, 37 °C). Minden műanyag felületet 0,05% patkány farkok kollagénnel (tisztított vízzel készített) vontunk be a sejtek tenyésztése előtt. A közeget kétnaponta cseréltük. A sejteket először folyadék-folyadék körülmények között tenyésztettük 5-8 napon keresztül. A levegő-folyadék határfelület kialakításához eltávolítottuk a médiumot a felső kompartmentből, és 1ml médiumot adtunk az alsó kompartmenthez, hogy a folyadékszintet megfelelő magasságban tartsuk a következő 5-8 napban. A transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréséhez 500 μ l médiumot adtunk a felső kompartmenthez minden másnap.

3.2.9. A sejtek életképességének vizsgálata impedancia méréssel

A PR végső koncentrációja 100 μ g/ml volt a kísérletekben használt mintákban. A mintákat Ringer-oldattal (pH=7,4) hígítottuk. A következő összetételek vizsgáltuk (1. táblázat.):

1. táblázat. A vizsgált szemészeti készítmények összetétele

Sejtéletképesség vizsgálata		Permeabilitás vizsgálata	
I.	PR/HPBCD/ZnHA/ZnGlu	F1	PR
II.	PR/HPGCD/ZnHA/ZnGlu	F2	PR/HPBCD
III.	PR/HPBCD/BK	F3	PR/HPGCD
IV.	PR/HPGCD/BK	F4	PR/HPBCD/ZnHA/ZnGlu
V.	ZnHA/ZnGlu	F5	PR/HPGCD/ZnHA/ZnGlu
VI.	BK		

Az impedanciát 10 kHz-en mértük RTCA SP készülékkel (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). A háttér-méréseket 50 µl sejtkultúra-médiummal végeztük, majd kollagénnel bevont arany elektródás 96-lyukú plate-ben (E-plate 96, ACEA Biosciences) 5 x 10³ sejt/lyuk sűrűségig tenyésztettük. A sejteket 4-5 napig inkubátorban tároltuk (CO₂, 37 °C), majd 10 percenként monitoroztuk a kísérlet végéig. A sejteket a növekedési plató kezdetéig kezeltük. A tápoldatok Ringer-oldattal készültek, Triton X-100 (TX-100) detergenst (1 mg/ml) alkalmaztunk sejttoxikus referenciaként. A sejtek életképességét meghatároztuk (Rn-Rb értékek) adott időközönként, ahol az Rn a sejtes elektróda impedancia értéke, illetve Rb az önmagában médiumot tartalmazó háttér impedancia értéke.

3.2.10. Immunhisztokémia

A formulációk HCE-T sejtmorfológiára való hatását sejtkapcsolati fehérjék [zonula occludens protein 1 (ZO-1), occludin, β -catenin and E-cadherin] immunfestésével vizsgáltuk. A sejteket üveg fedőlemezek (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) növesztettük 4 x 10⁴ sejt/fedőlemez sűrűségűre, majd 30 percen át kezeltük a formulációkat tartalmazó mintákkal. A kezelést követően a fedőlemezeket foszfát-pufferrel (PBS) mostuk és a sejteket 3%-os paraformaldehid oldattal 15 percen át fixáltuk szobahőmérsékleten. A sejtek permabilizálását 0,2%-os TX-100 oldattal végeztük 10 percig és a nem-specifikus kötőhelyek blokkolását követően (3%-os PBS-ben oldott szarvasmarha szérum albuminnal) primer antitesteket alkalmaztunk [nyúl anti-ZO-1 (AB_138452, 1:400; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), nyúl anti- β -catenin (AB_476831, 1:400), nyúl anti-occludin (AB_2533977, 1:100; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és egér anti-E-cadherin (AB_397580, 1:400; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) egy éjszakán át tartó kezeléssel. A szekunder antitestekkel való inkubálást 1 órán keresztül végeztük [Alexa Fluor-488-labeled anti-mouse (AB_2534088, 1:400; Life Technologies, Invitrogen, USA) és anti-rabbit IgG Cy3 conjugated (AB_258792, 1:400)]. Hoechst dye 33342 festéket alkalmaztunk a sejtmagok megjelenítéséhez. A festékek vizualizációjához Visitron konfokális rendszert (Visitron Systems GmbH, Germany) alkalmaztunk.

3.2.11. Permeabilitás vizsgálata HCE-T sejtvonalon

A TEER értéket STX-2 elektróddal felszerelt EVOM volt-ohmméterrel (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) mértük a kísérlet során a barrier-integritás ellenőrzése céljából. Az eredményeket a monolayer felületéhez viszonyítva $\Omega \times \text{cm}^2$ -ben fejeztük ki. A sejtmentes inzertek TEER értékét minden esetben kivontuk a mért adatból. A HCE-T sejteket 10^5 denzitásúra növesztettük a Transwell inzertekben (polikarbonát membrán, $0,4 \mu\text{m}$ pórusátmérő, $1,12 \text{ cm}^2$ felület; 3401, Corning Life Sciences, Tewksbury, Massachusetts, USA), majd 5-8 napig folyadék-folyadék körülmények között, illetve 5-8 napig levegő-folyadék határfelületen tenyésztettük. A TEER érték ellenőrizve, illetve a médium cserélve lett minden második napon. A permeabilitás mérésekhez az inzerteket akceptor fázisként $1,5 \text{ ml}$ Ringer-oldatot tartalmazó 12-lyukú plate-re helyeztük. A felső donor oldalra $0,5 \text{ ml}$ formulációkat tartalmazó puffer-oldat mintákat pipettáztunk (F1-F5). A plate-eket 30 percing horizontális keverőn (120 rpm) kevertettük. Mindkét kompartmentből mintát vettünk és meghatároztuk a hatóanyagtartalmat HPLC segítségével.

3.2.12. Ex vivo permeabilitás vizsgálata

A kísérlethez használt szemek nagyfehér sertésekből (súly: $90\text{--}115 \text{ kg}$, hím és nőstény, 6-7 hónapos) származnak egy helyi vágóhíd felajánlásán keresztül. Az eltávolított szemgolyókat izotóniás sóoldattal (NaCl , $0,9\%$; B. Braun, Melsungen, Germany) mostuk és Ringer-oldatban jégen tároltuk a felhasználásig. A szállítás és a preparálás az állatok előlését követő 2 órán belül megtörtént. A kimetszett korneákat vertikális diffúziós cellákba (Standard Vertical Ussing/Diffusion Chambers, akrilból készült, $0,64 \text{ cm}^2$ diffúziós felület, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) helyeztük. A kornea epiteliális oldala a donor fázis felé mutatott. A donor és akceptor fázisok térfogata egyaránt $3,5\text{--}3,5 \text{ ml}$ volt. 30 perces inkubációt követően a donor fázist eltávolítottuk és $3,5 \text{ ml}$ mintát injektáltunk a helyére. Adott időközönként $500 \mu\text{L}$ mintát vettünk az akceptor fázisból, amit $500 \mu\text{L}$ Ringer-oldattal pótolunk. Folyamatos O_2 cirkulációt biztosítottunk a rendszerben fiziológiás körülményeket szimulálva a szöveteknek. Hat párhuzamos mérést végeztünk minden minta (F1-F5) esetén. A minták PR tartalmát HPLC módszerrel határoztuk meg, majd mintánként kiszámoltuk az apparens permeabilitási koefficiens.

3.2.13. TEER mérése az ex vivo vizsgálat során

Az *ex vivo* kísérletek során monitoroztuk a TEER értéket a sertés kornea épségének ellenőrzése céljából. Ag/AgCl elektródákat használtunk Millicell® ERS-2 Epithelial Volt-Ohm Méterhez (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) kapcsolva. Az ellenálást

adott időközönként (0; 15; 150; 300 perc) mértük minden vertikális diffúziós cellában, mindegyik párhuzamos vizsgálat esetén.

3.2.14. HPLC mérés módszere

A PR mennyiségi meghatározására HPLC-t alkalmaztunk (Agilent Infinity 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Phenomenex Gemini NX C18 kolonnát (150 x 4.6 mm, 5 μ m) használtunk az EP-ben hivatalos módszer alapján. HPLC minőségű vizet alkalmaztunk az A csatornán, HPLC minőségű acetonitril/metanol elegyet (50/50 V/V%) a B csatornán, 1 ml/perc áramlási sebességgel, 25 °C-on. Az elválasztás során grádiens elúciót alkalmaztunk. 20 μ l vizsgálati mintát injektáltunk, a hatóanyag meghatározását 254,4 nm hullámhosszon végeztük.

3.2.15. Statisztikai analízis

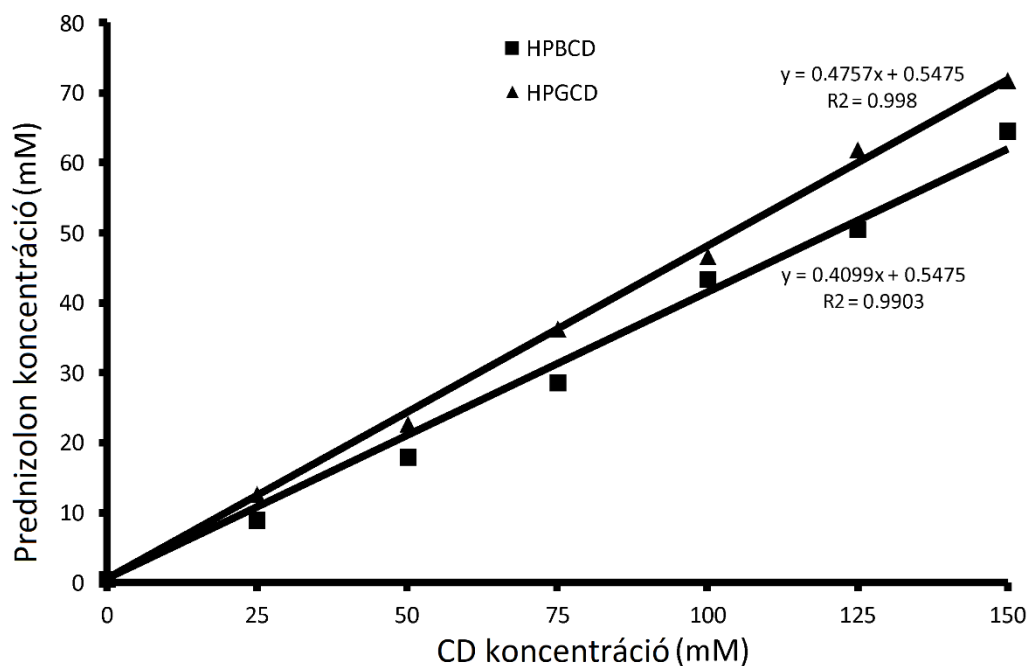
Az eredmények átlagait használtuk a vizsgálatok kiértékelése során azok standard deviációjának figyelembevételével. A statisztikai számítások során egyutas ANOVA módszert használtunk Dunett's tesztet megelőzően statisztikai szoftver segítségével (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Az eredmények szignifikanciáját $P < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. PR-CD zárványkomplex vizsgálata

4.1.1. Fázis oldékonyság vizsgálata

A fázis-oldékonyság vizsgálat eredménye az 1. ábrán látható:

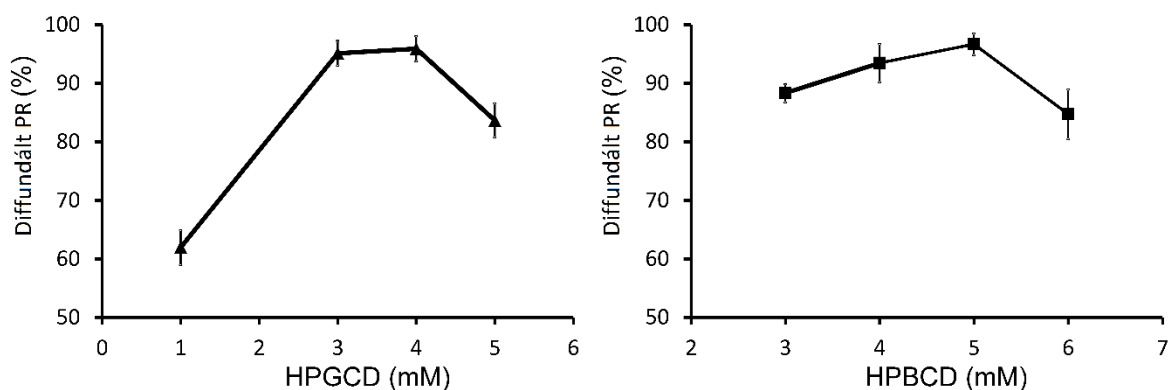


1. ábra. A PR fázis oldékonyság görbéje HPBCD (■) és HPGCD (▲) tartalmú vizes oldatokban 25 °C-on

A PR oldékonysága lineárisan nőtt a HPBCD illetve HPGCD koncentráció növelésével. A görbék Higuchi A_L típusúak mindkét CD származék esetén, tehát 1:1 molekulaarányú komplex létrejöttét feltételezhetjük. A HPBCD esetén az apparens stabilitási állandó $1286,4 \text{ M}^{-1}$, PR-HPGCD esetén ez az érték $1778,5 \text{ M}^{-1}$. Megállapítható hogy a PR nagyobb affinitással komplexálódik a HPGCD üregébe.

4.2. Dialízismembrán-diffúzió vizsgálata

A dialízismembrán-diffúziós vizsgálattal optimalizáltuk a készítmények CD koncentrációját a megfelelő hatóanyagdiffúzió szempontjából. A diffundált hatóanyag-mennyiséget az 2. ábra mutatja be a CD koncentráció függvényében.



2. ábra. PR diffúziója félig áteresztő membránon keresztül a HPGCD és HPBCD koncentráció függvényében 240 perces mérést követően

Az eredmények azt mutatják, hogy 4 mM HPGCD és 5 mM HPBCD okozta a legnagyobb hatóanyag diffúziót a dialízismembránon keresztül. Optimális CD koncentráció alatt nem komplexált, szuszpendált hatóanyag marad a zsákokban. A szükségesnél magasabb CD koncentráció esetén kevesebb szabad PR molekula detektálható az akceptor fázisból származó mintákból. Ezt követően ZnHA–ZnGlu rendszert adtunk a szemcseppekhez, hogy biztosítsuk a mukoadhéziót és a mikrobiológiai stabilitást. A biopolimer hozzáadása nem volt befolyással a dialízismembránon diffundáló PR mennyiségére.

4.3. Viszkozitás

Vizsgáltuk a ZnHA és PR-CD komplex tartalmú készítményeink viszkozitását. Korábbi tanulmányok alapján a szemcseppek viszkozitása 30 mPa s érték alatt optimális. Ennél magasabb értéknél látászavar és diszkomfort érzés jelentkezhet, ami fokozott könnytermelődéshez és gyors eliminációhoz vezethet a szem védekező reflex mechanizmusainak köszönhetően. Az eredmények azt mutatják, hogy az összetételeink viszkozitása megfelelő, 9,2-24,2 mPa s tartományba esik.

4.4. Felületi feszültség

A mintáink felületi feszültségek átlaga 60 mN/m, ami magasabb a könnyfolyadék felületi feszültségénél. Korábban vizsgált forgalomban lévő szemcseppek értékei 34,3 és 70,9 mN/m közé estek. Figyelembe véve ezeket az eredményeket az általunk formulált szemcseppek felületi feszültsége megfelel a szemészeti készítményekkel támasztott követelményeknek.

4.5. Tartósítószer-hatékonyság vizsgálata

A tartósítószer-hatékonyság vizsgálat során az I-es (HPBCD-vel) és II-es (HPGCD-vel) mintákban ZnHA–ZnGlu rendszert alkalmaztunk tartósító komponensként.

A *Staphylococcus aureus* mennyiségének logaritmikus csökkenése 1,5 volt 6 órát követően, 2 volt 24 óra után és nem volt kimutatható mennyiségű baktérium 7 napot követően. A *Pseudomonas aeruginosa* esetén nagyobb mértékű csökkenés volt megfigyelhető a vizsgálat időtartamának elején, de a baktérium minden mintában kimutatható volt. A *Candida albicans* telepek logaritmikus csökkenése 1 volt 6 óra után és nem volt detektálható gombatelep a későbbi mintaszámlálásokkor. Összefoglalva a ZnHA–ZnGlu rendszer tartósító hatékonysága az EP B szintű követelményeknek felel meg.

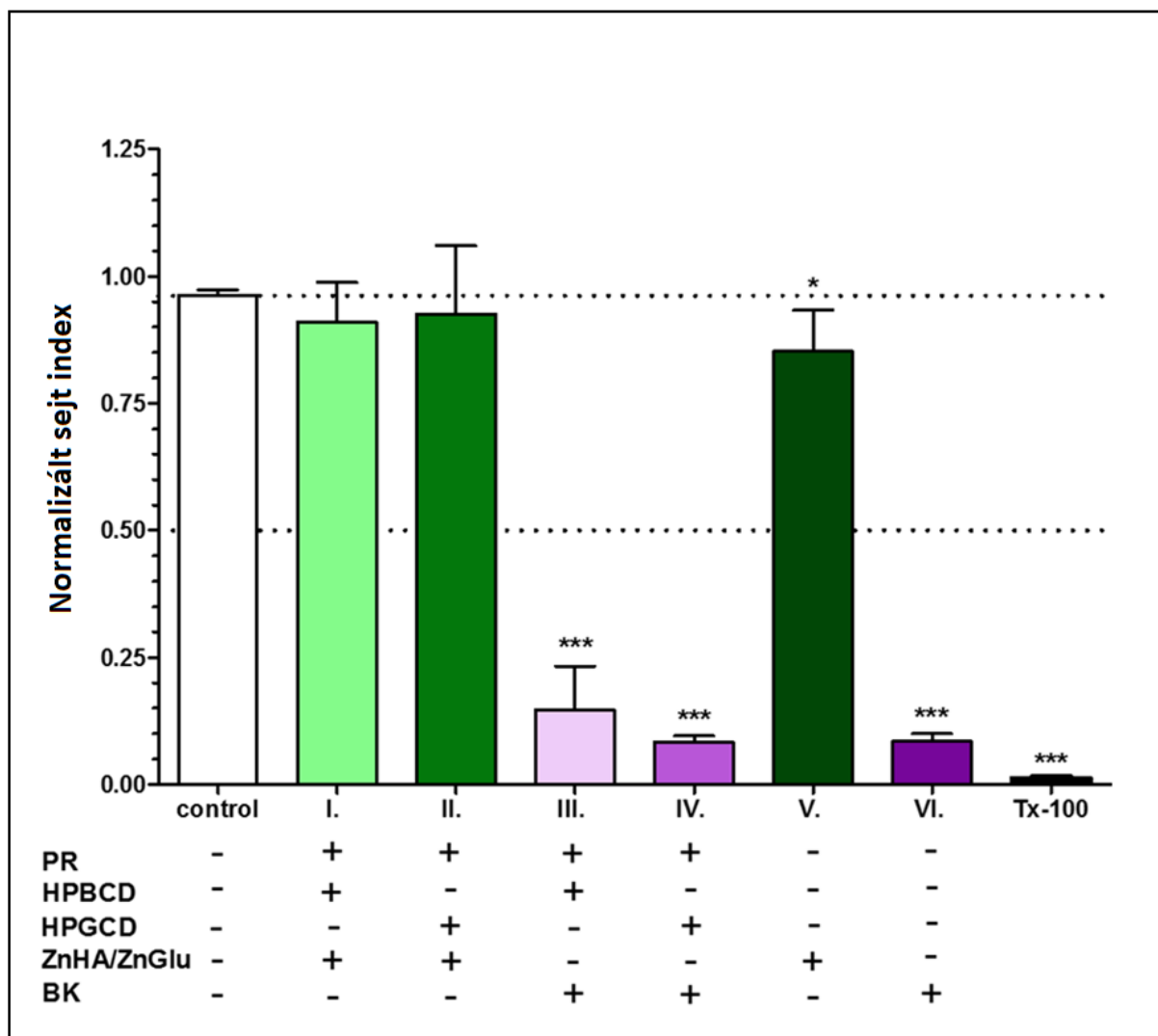
A III-as (HPBCD) és IV-es (HPGCD) mintákat benzalkónium-kloriddal tartósítottuk. A III-as mintában megfigyelt logaritmikus csökkenés *Staphylococcus aureus* esetén 1 volt 6 óra után, 2 volt 24 óra után, és nem volt megfigyelhető baktérium a későbbiekben. A *Pseudomonas aeruginosa* logaritmikus csökkenése 2 volt 6 óra után és nem volt megfigyelhető telep a későbbi méréseknél. A *Candida albicans* esetén nem volt megfigyelhető gomba 7 napos vizsgálatot követően. A IV-es mintában nem volt megfigyelhető *S. aureus* és *C. albicans* 6 órát követően. A *P. aeruginosa* esetén az antimikrobás hatás kisebb mértékű volt, melynek hátterében az ismert rezisztencia áll a BK-val szemben. A III-as és IV-es minta mikrobiológiai stabilitása ugyancsak megfelel az EP követelményeinek.

4.6. Mukoadhézió vizsgálata

A Tensile teszt eredménye alapján szignifikáns különbség figyelhető meg a vakoldaton, illetve a mucin diszperzió mért mérések értékei között. Minden minta mukoadhezív, a ZnHA-tal készült szemcseppek nagyobb adhezív értékkel rendelkeznek, összehasonlítva az anélkül készült összetételekkel. Ez igazolja a ZnHA jelentőségét a mukoadhézió kialakításában, aminek hátterében minden bizonnyal a polimerláncok interpenetrációja áll. A CD típusa nem befolyásolta jelentősen a mukoadhéziót, nincs szignifikáns különbség a HPGCD és HPBCD-vel készült minták értékei között.

4.7. Sejtéletképesség vizsgálata impedancia méréssel

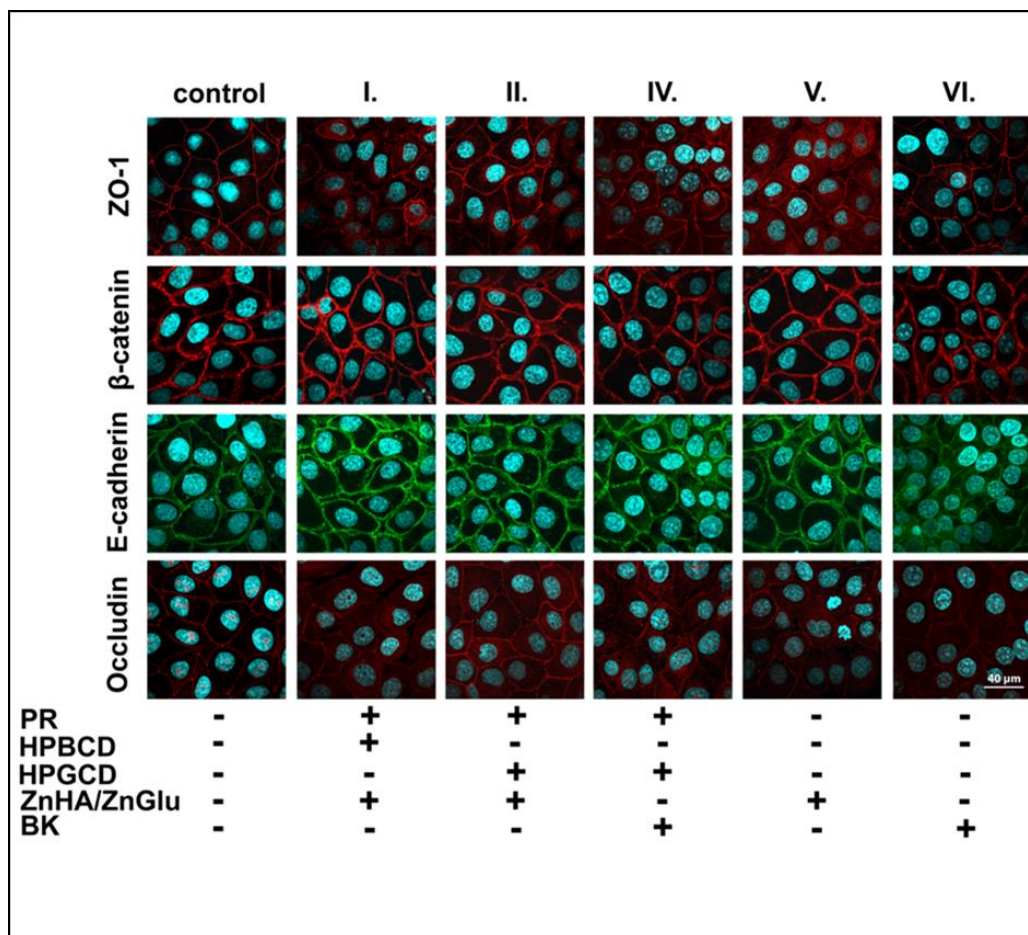
Az impedancia mérések során szignifikáns sejtkárosodást figyeltünk meg a BK tartalmú minták mérésekor (III, IV, VI). A PR-CD komplexet és ZnHA–ZnGlu rendszert tartalmazó minták nem mutattak citotoxikus hatást. Az önmagában ZnHA–ZnGlu rendszert tartalmazó mintában (V) mért normalizált sejt index érték szignifikánsan magasabb volt a BK-t tartalmazó mintában (VI) mért értékkel szemben. Összehasonlításként, a maximális toxicitást a referencia károsító Triton X-100 detergenssel kezelt sejtekben detektáltuk (3. ábra).



3. ábra. Sejtéletképesség vizsgálata HCE-T sejtvonalon 1 órás kezelést. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ kontrollal összehasonlítva), Triton X-100 (Tx-100).

4.8. Immunhisztokémia

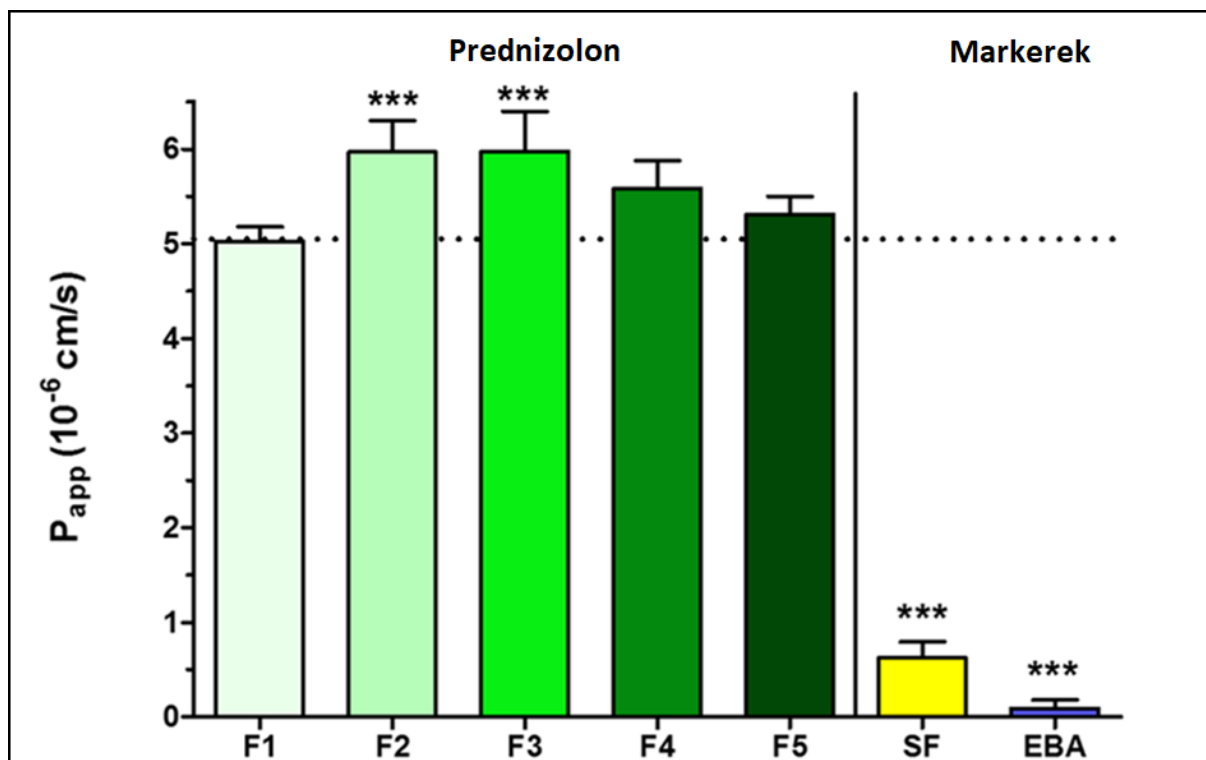
A kornea epitélisejtek szoros paracelluláris barriert képeztek, amelyet a vizualizált sejtkapcsolati fehérjék (ZO-1, β -catenin, E-cadherin és occludin) is igazoltak (4. ábra). Morfológiai változás volt megfigyelhető a BK tartalmú minta esetén (VI) kiváltképp az E-cadherin fehérje lokalizációja esetében. A ZnHA–ZnGlu-tal formulált összetételek esetén nem volt megfigyelhető morfológiai változás, illetve citotoxikus hatás a HCE-T sejtvonalon. Megállapítható, hogy a ZnHA–ZnGlu kombináció egy nem toxikus alternatíva lehet, HCE-T sejtvonalon jól tolerálható az alkalmazott koncentrációban. A BK-t tartalmazó minták eredményei alátámasztották a toxikus és a várható irritáló hatást a szem felületén.



4. ábra. PR tartalmú minták hatása a junkciós fehérjék morfológiájára HCE-T sejtvonalon 1 órás kezelést követően.

4.9. Permeabilitás vizsgálata HCE-T sejtvonalon

Az *in vitro* permeabilitás vizsgálat során PR-CD komplex tartalmú minták, illetve PR-CD-ZnHA–ZnGlu tartalmú célformuláció permeabilitását vizsgáltuk PR szuszpenzióval szemben. Az eredmények alapján az F2 és F3 összetételek P_{app} értékei szignifikánsan nagyobbak voltak (F2: $5,97 \times 10^{-6}$ cm/s, F3: $5,97 \times 10^{-6}$ cm/s) összehasonlítva a PR szuszpenzióval (F1: $5,02 \times 10^{-6}$ cm/s). A permeabilitás minimálisan alacsonyabb volt a ZnHA–ZnGlu tartalmú készítmények esetén (F4: $5,59 \times 10^{-6}$ cm/s, F5: $5,31 \times 10^{-6}$ cm/s). A hidrofil markermolekulák alacsony P_{app} értéket mutattak a modellben, ami a megfelelő barrier-integritást jelzi.



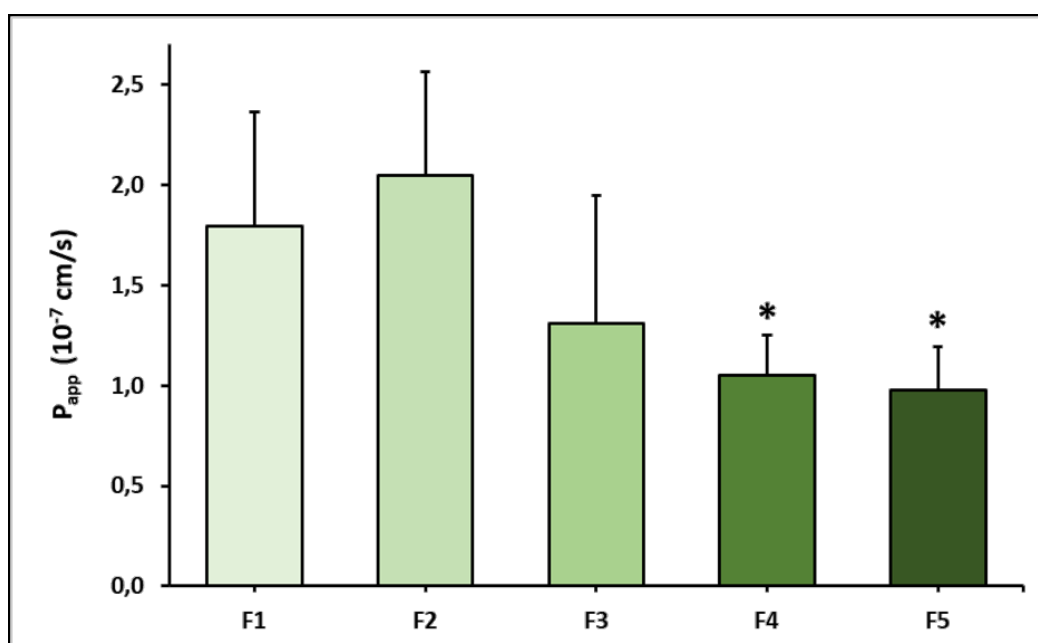
5. ábra. PR in vitro permeabilitás-vizsgálata HCE-T sejtvonalon keresztül. (fluorescein:SF; Evans blue labeled albumin: EBA) $p < 0,001$ F1-hez hasonlítva

Tekintve a PR-CD minták nagyobb oldott hatóanyag koncentrációját, fokozott hatóanyag-permeáció várható az epitelsejteken keresztül. A biopolimerrel készített célformulációk permeabilitása minimálisan csökkent, aminek hátterében a polimer struktúra diffúzió gátló hatása állhat (5. ábra).

4.10. *Ex vivo* permeabilitás vizsgálata

A PR *ex vivo* permeabilitását sertés kornea modellen vizsgáltuk a korábban említett formulációkkal (F1-F5) (6. ábra). A PR-HPBCD (F2) minta permeabilitása ($2,05 \times 10^{-7}$ cm/s) nagyobb mértékű volt összehasonlítva a PR szuszpenzióval (F1, $1,79 \times 10^{-7}$ cm/s). Az F3 minta (PR-HPGCD) permeabilitása alacsonyabb volt ($1,31 \times 10^{-7}$ cm/s). Figyelembe véve az egyedi mérések viszonylag magas szórását nincs szignifikáns különbség az F1-F3 formulációk P_{app} értékei között. A ZnHA–ZnGlu jelenlétében (F4-F5) szignifikánsan alacsonyabb P_{app} értékek voltak mérhetőek (F4: $1,05 \times 10^{-7}$ cm/s, F5: $0,98 \times 10^{-7}$ cm/s). A mért TEER értékek $1058-2818 \Omega \times \text{cm}^2$ értéktartományba estek. Tekintve a folyamatos keverést, a vertikális elrendezést és a kornea összetett szerkezetét az oldatos formulák előnyei nem mutatkoznak jelentősen. A célformulációból megfigyelt hatóanyag-permeáció

alacsonyabb a polimer struktúrának köszönhetően, habár a nagyobb viszkozitás és mukoadhézió miatt hosszabb tartózkodási idő és jobb hasznosulás várható. Az *ex vivo* és *in vitro* modellek között különbség figyelhető meg a modellek strukturális eltérései miatt. A vizsgált szemcseppek optimálisak lehetnek *in vivo* körülmények között, ugyanis kisebb mértékű irritáció és csökkent könnyfolyadék termelés várható. A szemcsepp hosszabb ideig tartózkodik a szem felszínén, illetve a védekező mechanizmusok csökkentése esetén hosszabb idejű hatóanyag abszorpció várható az alkalmazást követően, így ritkább használatot igényel. Megállapítható, hogy a készítmények permeabilitása optimális, ami megnövelt terápiás hatást eredményezhet.



6. ábra. PR Ex vivo permeabilitás-vizsgálata (F1-F5) sertés kornea modellen keresztül * $p < 0,05$ F1-hez hasonlítva. $n=6$

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ph.D. munkám során PR-tartalmú oldatos szemcseppet formuláltunk CD zárványkomplex képzésével és mukoadhezív, antimikrobás ZnHA-tal és ZnGlu-tal. Az elért eredmények a következők:

- Oldatos rendszer kialakítása ciklodextrines zárványkomplex képzéssel HPGCD és HPBCD alkalmazásával;
- A dialízismembrán-diffúziós vizsgálat során megállapítottuk, hogy a diffúzió szempontjából optimális CD koncentráció 5 mM a HPBCD és 4 mM a HPGCD esetén, *in vitro* körülmények között. A ZnHA és ZnGlu hozzáadása nem befolyásolta a penetrációs tulajdonságokat;
- A viszkozitás-mérések alapján a fent említett CD koncentrációjú formulációk értékei a legalacsonyabbak, melyek a gyógyszerkönyvi követelményeknek megfelelnek;
- A CD koncentráció nem befolyásolta a szemészeti készítmények felületi feszültségét, amelyek optimálisak voltak a forgalomban lévő készítményekéhez viszonyítva;
- A ZnHA–ZnGlu rendszer tartalmú mintáink mukoadhezív tulajdonságát Tensile teszttel támasztottuk alá, ami várhatóan hosszabb tartózkodási időt okoz a szem felszínén. A CD típusa nem befolyásolja a mukoadhezivitást;
- A tartósítószer-hatékonyság vizsgálat során igazoltuk a ZnHA–ZnGlu alkalmazhatóságát tartósító komponensként. A ZnHA tartalmú szemcseppek mikrobiológiai stabilizáló hatása megfelel a gyógyszerkönyv követelményeinek *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* esetében;
- A fejlesztett összetételek nem toxikusak *in vitro* körülmények között, HCE-T sejten elvégzett impedancia-mérés és immunhisztokémia vizsgálatok alapján;
- A szemcseppek permeabilitása optimális *in vitro* HCE-T és *ex vivo* sertéskornea modelleken.

Innovatív összetételeink alkalmasak lehetnek új típusú szemészeti készítmények fejlesztésére optimális permeabilitással, megfelelő mikrobiológiai stabilitással, minimális irritációval, és várhatóan nagyobb terápiás hatékonysággal.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Bíró, T.**, Horvát, G., Budai-Szűcs, M., Csányi, E., Urbán, E., Facskó, A., Szabó-Révész, P., Csóka, I., Aigner, Z., Development of prednisolone-containing eye drop formulations by cyclodextrin complexation and antimicrobial, mucoadhesive biopolymer. *Drug Design, Development and Therapy* (2018) 12, 2529–2537.

[DOI: 10.2147/DDDT.S165693](https://doi.org/10.2147/DDDT.S165693)

Q1

IF (2018): 3,208

- II. **Bíró T.**, Aigner Z., Current Approaches to Use Cyclodextrins and Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery – A Mini-Review. *Scientia Pharmaceutica* (2019) 87, 15.

[DOI: 10.3390/scipharm87030015](https://doi.org/10.3390/scipharm87030015)

Q2

IF (2019): 0

- III. **Bíró T.**, Bocsik A., Jurišić Dukovski B., Gróf I., Lovrić J., Csóka I., Deli M.A., Aigner Z. New approach in ocular drug delivery: *in vitro* and *ex vivo* investigation of cyclodextrin containing, mucoadhesive eye drop formulations. *Drug Design, Development and Therapy* (2021) 15, 351-360.

[DOI: 10.2147/DDDT.S264745](https://doi.org/10.2147/DDDT.S264745)

Q1

IF (2020): 3,216

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. Bíró Tivadar, Aigner Zoltán: Megnövelt biohasznosulású szemészeti készítmény formulálása és vizsgálata.
Tudományos Diákköri Konferencia, p. 170, Szeged, Hungary, 2016.
2. Bíró Tivadar, Aigner Zoltán: Megnövelt biohasznosulású szemészeti készítmény formulálása és vizsgálata.
XII. Clauder Ottó Emlékverseny, p. 13, Budapest, Hungary, 2016.
3. Bíró Tivadar, Aigner Zoltán: Megnövelt biohasznosulású szemészeti készítmény formulálása és vizsgálata.
Országos Tudományos Diákköri Konferencia, p. 443, Pécs, Hungary, 2017.
4. Bíró Tivadar, Aigner Zoltán: Megnövelt biohasznosulású gyulladáscsökkentő szemcsepp formulálása.
Magyar Kémikusok Egyesülete, Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 10th Kerekasztal Konferenciája, p. 29, Balatonszemes, Hungary, 2017.
5. Tivadar Bíró, Gabriella Horvát, Mária Budai-Szücs, Erzsébet Csányi, Edit Urbán, Andrea Facskó, Piroska Révész- Szabó, Ildikó Csóka, Zoltán Aigner:
Characterization of prednisolone containing eye drop formulations by mucoadhesive–preservative system and cyclodextrin inclusion complex formation.
7th BBBB International Conference on Pharmaceutical, Sciences, Acta Pharmaceutica Hungarica 87 (3-4) p. 178, Balatonfüred, Hungary, 2017.

6. Tivadar Bíró, Gabriella Horvát, Alexandra Bocsik, Ilona Gróf, Edit Urbán, Mária A. Deli, Erzsébet Csányi, Piroska Szabó-Révész Ildikó Csóka, Zoltán Aigner: Formulation of steroid containing eye drops with cyclodextrin derivatives and mucoadhesive preservative system.
12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Acta Pharmaceutica Hungarica 88 (3) p. 139-140, Szeged, Hungary, 2018.
7. Bíró Tivadar, Aigner Zoltán: Ciklodextrinek és mukoadhezív, antimikrobás biopolimer alkalmazása megnövelt hatékonyságú szemészeti készítmények formulálása céljából.
XIII. Clauder Ottó Emlékverseny, p. 18, Budapest, Hungary, 2018.
8. Tivadar Bíró, Zoltán Aigner: Novel ophthalmic formulations to increase the efficacy and stability.
I. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, p. 18, Szeged, Hungary, 2019.
9. Tivadar Bíró, Zoltán Aigner: *In vitro* and *ex vivo* investigation of steroid containing ocular drug delivery systems.
II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, p. 6, Szeged, Hungary, 2020.
10. Bíró Tivadar, Bocsik Alexandra, Gróf Ilona, Bisera Jurišić Dukovski, Jasmina Lovrić, Deli A. Mária, Aigner Zoltán: Innovatív szemcseppek toxicitásának és hatóanyag-permeabilitásának vizsgálata *in vitro* és *ex vivo* modellek alkalmazásával.
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI; Acta Pharmaceutica Hungarica 90. p. 86, Debrecen, Hungary, 2020.