

Debreceni Egyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Tanszék



**Ivermectin tartalmú innovatív
készítmények fomulálása és vizsgálata**

Koterlán Dávid

V. évfolyamos gyógyszerészhallgató

Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó
témavezető

Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó
tanszékvezető

Dr. Nemes Dániel
konzulens

Debrecen

2022.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
Ivermectin.....	4
Emulziók.....	6
Mikroemulziók.....	7
Önemulgeáló rendszerek (SEDDS, SMEDDS).....	7
TR-146-os sejtvonal	9
Galleria mellonella.....	9
3. Célkitűzés	12
4. Anyagok és módszerek.....	13
Formuláció.....	13
Formulációhoz felhasznált anyagok.....	13
DLS mérés	14
Sejtek tenyésztése	14
MTT-teszt	15
TEER-mérés	16
Az ivermectin transzportjának vizsgálata	16
Galleria mellonellán végzett in vivo vizsgálatok	17
Statisztika	17
5. Eredmények	18
Részecskeméret meghatározása.....	18
MTT teszt eredményei.....	19
Sejtes transzport eredményei.....	20
A formulált emulzió hatékonyságának vizsgálata	21
6. Összefoglalás	23
Köszönetnyilvánítás.....	24
Irodalomjegyzék	25
Ábrajegyzék	27

1. Bevezetést

Bevezetés: Az ivermectin egy endectocid hatású parazitaellenes gyógyszer, amely a glutamát és γ -aminovajsav (GABA) kapuzott Cl^- csatornák modulálásával a paraziták bénulását idézi elő. Hatékony többek között rühesség, tetvesség, folyami vakság, onchocerciasis, strongyloidiasis és malária kezelésére. Az antiparazitikus hatás mellett rendelkezik még csekély antibiotikus, gyulladáscsökkentő, valamint kísérletesen megfigyelt vírus és tumor ellenes hatásokkal is. A lipofil hatóanyagok biohasznosíthatósága javítható önmulgeáló rendszerek segítségével, melyek vizes közeggel történő érintkezésük során diszpergálódnak és termodinamikailag stabil o/v típusú emulziókat képeznek.

Célkitűzés: Munkánk során a BCS II. osztályába tartozó ivermectin oldékonyságát és biológiai hatékonyságát akartuk növelni egy mikro vagy nanoemulziós rendszer előállításával, a modern gyógyszer technológiai segédanyagok segítségével.

Anyag- és módszertan: Először az ivermectin oldékonyságát határoztuk meg különböző összetételű modern felületaktív anyagokat tartalmazó önmulgeáló rendszerekben és ezekből emulziókat vizsgáltunk, melyeket Zetasizer készülékkel vizsgáltunk. Az ivermectin felszívódását humán bukkális karcinóma eredetű TR-146 sejteken vizsgáltuk, a citotoxicitást pedig MTT sejtéletképességi vizsgálatokkal. A biológiai hatást *Galleria mellonella* lárvákon befecskendezéssel határoztuk meg.

Eredmények: A formulált emulzió részecskeméretét sikerült meghatározni és az stabilnak is mutatkozott. A citotoxicitás magas mértékű volt, míg a sejtes transzport az oldathoz képest nem volt alacsonyabb. A lárvákon az oldathoz képest nagyobb hatása volt a formulált emulziónak.

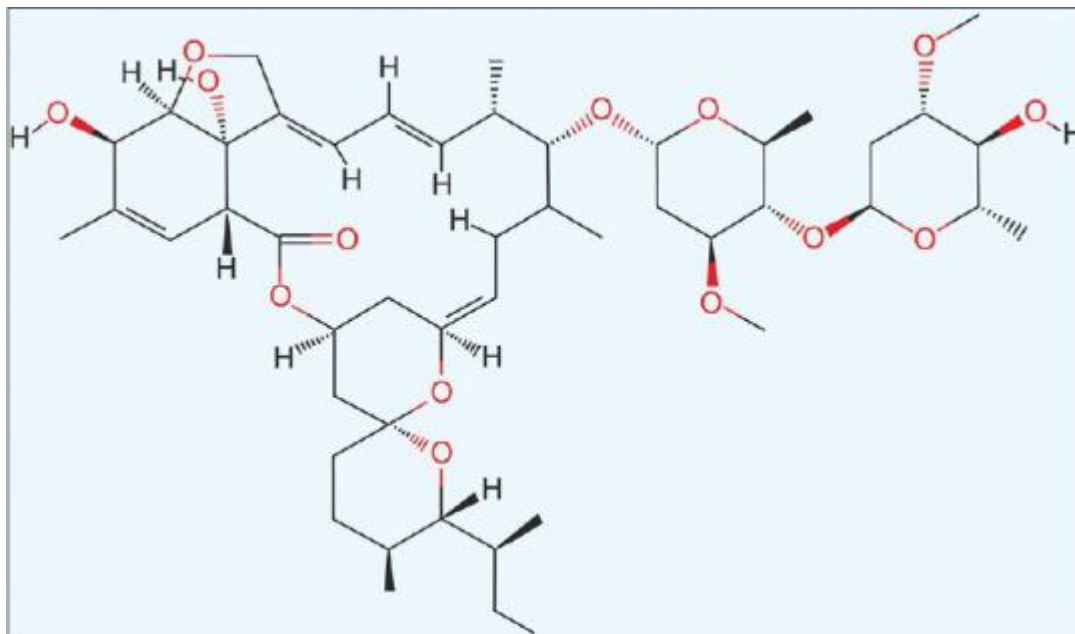
Diskusszió: Összességében sikerült az ivermectin oldékonyságát növelni, azonban az emulzió a vizsgált módszerek alapján csak mérsékelten növelte a biológiai hatást.

2. Irodalmi áttekintés

Ivermectin

Az ivermectin felfedezése az 1960-as évek végéhez köthető. Satoshi Ōmura és William Campbell egy japán golfpályáról vett mintából tenyésztett ki baktériumokat, ami a *Streptomyces avermectinius* felfedezéséhez vezetett. A gombáról kimutatták, hogy egy avermectin nevű anyagot termel. Az ivermectin az avermectin szintetikus származéka, amely a makrociklusos laktonok széles spektrumú parazitaellenes osztályába tartozik, szerkezete hasonló a makrolidokéhoz, bár az antibakteriális hatása azonban elhanyagolható. Az ivermectint 1982-ben próbálták ki először emberen az *Onchocerca volvulus* kórokozó ellen. A farmakon mára már számos terápiás alkalmazással rendelkezik. [1]

Az ivermectin (MK-0933, az avermectin B1 22,23-dihidroszármazéka) 2 kémiai vegyületből áll: 22,23-dihidroavermectin B1a-ból (80%–90%) és 22,23-dihidroavermectin B1b-ből (10–20%), molekulaképlete $C_{48}H_{74}O_{14}$. Színe fehértől sárgásfehérig terjed, nem higroszkópos, kristályos por, mely vízben nem, de metanolban és 95%-os etanolban oldódik. [1]



1. ábra: Az ivermectin szerkezeti képlete

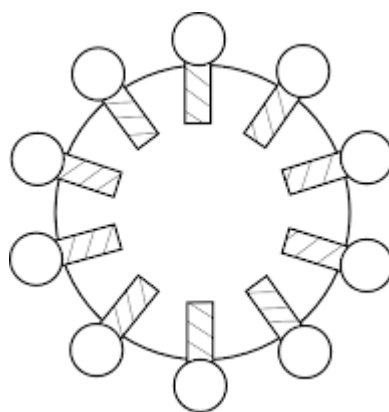
Az ivermectin BCS II. osztályba tartozik, ami azt jelenti, hogy alacsony oldékonysága és magas membránpermeabilitása van. Gyorsan, kb. 0,5-2,5 óra alatt felszívódik, felezési ideje 18 óra, bár hatása napokkal később is megfigyelhető. Általában szájon át, éhgyomorra javasolt a bevétele. Felszívódása szignifikánsan nő, ha magas zsírtartalmú ételekkel együtt kerül bevitelre, plazmakoncentrációja csökken, ha narancslével és nő, ha sörrel együtt fogyasztjuk. A gyógyszer a májban metabolizálódik főleg a CYP3A4 enzimen keresztül, de részt vesznek a metabolizmusában a CYP2D6 és a CYP2E1 enzimek is. Nagy része epével és széklettel ürül, kevesebb mint 1%-a ürül változatlan formában a vizelettel. Részt vesz az enterohepatikus körforgásban, az epével történő kiválasztódása után újra felszívódik a vékonybélben. Erősen kötődik a plazmafehérjékhez (93,2%), ezért magasabb szabad gyógyszerfrakció várható a hypoalbuminémiában szenvedő betegeknél. Parenterális készítményeket kizárólag állatgyógyászati célokra használjuk. Vizsgálatok kimutatták, hogy az oldat formájában alkalmazott ivermectin szisztémás hozzáférhetősége körülbelül kétszerese a szilárd formáknak (tabletta, kapszula). [1] [2]

Az ivermectin számos hatással rendelkezik. Elsősorban endectocid hatása van, azaz endoparaziták és exoparaziták ellen is használható. Szelektíven és nagy affinitással kötődik a paraziták perifériás motoros szinapszisaiban található glutamát és γ -aminovajsav (GABA) kapuzott klorid-csatornához és fokozza a kloridion-beáramlást, amely a parazita idegsejtjeinek és izmainak hiperpolarizációját okozza, amely a parazita bénulásához és halálához vezet. A gyógyszer gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik, melyet az IL-10 gyulladásgátló citokin termelésének fokozása által fejt ki, valamint a nukleáris faktor-kappa β (NF- $\kappa\beta$) útvonal gátlása révén. Ezek mellett van még malária ellenes hatása (a terjesztő vektor és *Plasmodium* fajok ellen egyaránt hatásos), mérsékelt antibakteriális hatása *Mycobacterium tuberculosis* és *Chlamydia trachomatis* ellen, valamint antivirális hatással is rendelkezik az IMP α/β 1 virális citoplazmafehérjék nukleáris importjának gátlásán keresztül. RNS vírusok fertőzése során az RNS vírusfehérje transzportja az IMP α/β 1 virális transzportfehérjékre támaszkodik. Magasabb koncentrációkban az ivermectin DNS-vírusok, mint például a pszeudorabies vírus ellen is hatást fejt ki *in vitro* és *in vivo*. A gyógyszer daganatellenes hatással is rendelkezhet a WNT-T sejtfaktor (WNT-TCF) jelátviteli útvonalának deregulációja által vastagbél-, bőr-, tüdő-, emlő-, petefészek- és prosztaták esetén. [1]

A készítményt alkalmazzák rühesség, tetvesség, folyami vakság, elefantiázis, onchocerciasis, strongyloidiazis, malária, *Mansonella spp.*, horogférgesség, cérnagilisztáság, gnathostomiazis, loa loa, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* valamint ostor- és orsóférgesség kezelésére. Az ivermectint ezek mellett alkalmazzák még Rosacea kezelésére 1%-os krém formájában. (Soolantra®; Rosiver™; Izeffa®) Magyarországon az egyetlen emberi felhasználásra szánt törzskönyveett ivermectin tartalmú készítmény a Soolantra® 10mg/g krém. [1] [3]

Emulziók

Az emulziók olyan kolloid diszperz rendszerek, amelyekben a diszpergáló közeg és a diszpergált rész egyaránt folyadék halmazállapotú. Az egyik folyadék fizikai tulajdonságait tekintve apoláris, lipofil, olajszerű, míg a másik poláris hidrofil tulajdonságú. Attól függően, hogy a két folyadék közül melyik alkotja a diszpergáló, folytonos külső fázist megkülönböztetünk O/V (olaj a vízben) és V/O (víz az olajban) típusú emulziókat. Termodinamikai szempontból az emulziók instabil rendszerek, jelentős mennyiségű energia szükséges az emulziók kialakításához és egy idő után az emulgeált cseppek kompakt fázissá olvadnak össze és ez az emulzió megszűnését okozza. Az emulziócseppek gömb alakot vesznek fel, hogy a felület-térfogat arányt minimálisra csökkentsék. Méretük a μm -es tartományban van. Vizuálisan az emulziók átlátszatlan tejszerű viszkózus rendszerek. [4]



2. ábra: Micellák szerkezete

Mikroemulziók

A mikroemulziók hasonlóan az emulziókhoz szintén két egymással nem elegyedő folyadékból állnak melyek felületaktív anyagokat is tartalmaznak, viszont ezek a rendszerek termodinamikailag stabilak, jelentősebb energiabefektetés nélkül keletkeznek, optikailag átlátszók, izotróp tulajdonságúak. A „mikro” előtagot ebben az esetben a „nagyon kicsi” értelemben használják és nem a mikrométeres mérettartomány jelölésére. A mikroemulziókat valójában nanométeres skálán kell értelmezni. (nanoemulzióknak azt a termodinamikailag instabil emulziót nevezzük, amelyekben a cseppek mérete mindenképpen 200 nm alatti) Az ilyen kis méretek hatalmas határfelületi területtel járnak együtt, amely csak azért érhető el mindenféle energiabevitel nélkül, mert a határfelületi feszültség nagyon alacsony. Az ultraalacsony határfelületi feszültség esetén a gömbalak, mint a legalacsonyabb felület/térfogat arányt biztosító kényszer jelentéktelenné válik, és sok mikroemulzió esetében az olajos vagy vizes domének a gömböktől nagyon eltérő alakban helyezkednek el. Az emulziókat és mikroemulziókat szabad szemmel is könnyedén meg tudjuk különböztetni egymástól, mivel az utóbbi teljesen átlátszó és alacsony viszkozitással rendelkeznek. (Ha az oldott víz és olaj mennyisége nagyon magas, kékes megjelenésűek lehetnek.) [5]

Önemulgeáló rendszerek (SEDDS, SMEDDS)

A vízben kevésbé jól, vagy egyáltalán nem oldódó gyógyszeranyagok gasztrointesztinális rendszerbe történő bejuttatásának számos előnnyel járó megoldása a különböző önemulgeáló illetve ön-mikroemulgeáló rendszerek (SEDDS, SMEDDS) alkalmazása. Ezen formuláció segítségével akár a magas terápiás dózisban adagolt hatóanyagok mennyisége is csökkenthető. [6]

Az önemulgeáló gyógyszer-leadó rendszerek a lipidalapú készítmények egy olyan csoportja, melyekben lipidek, nemionos felületaktív anyagok és társoldószeres vagy társfelületaktív anyagok keverékei, egy „emulzió előtti” koncentrátumot alkotnak. Ha ez az előkoncentrátum a bélnedvben diszpergálódik, spontán emulziót képződik. Az emulziócseppek a gyógyszer magas oldékonysággal rendelkező hordozójaként működnek, megakadályozzák a kicsapódást, a hatóanyagot pedig a felszívódás helyére szállítják. A kolloid lipid fázis és a folytonos vizes fázis között gyorsan kialakul az

egyensúly és a disszolúciós lépés megkerülésével a hatóanyagokat „elő-oldott” (pre-dissolved) állapotba vihetik és csökkenthetik a hatóanyag újbóli kiválását. [6] [7]

Az önemulgeáló rendszereket orálisan alkalmazhatjuk lágy vagy kemény zselatin kapszulákban. A gyógyszervegyület SEDDS-ből történő orális abszorpciójának hatékonysága függ a felületaktív anyag koncentrációjától, az olajos fázis és a felületaktív anyag arányától, az emulzió polaritásától, a cseppek méretétől és töltésétől is. A rendszer ezen tulajdonságai határozzák meg az önemulgeáló képességet. Így csak nagyon specifikus gyógyszerészeti segédanyag-kombinációk vezetnek hatékony önemulgeáló rendszerekhez. [8]

A SEDDS segítségével olyan BCS IV. osztályba tartozó hatóanyagokat is adhatunk per os melyeket korábban csak parenterálisan lehetett nagy hatékonysággal az emberi szervezetbe juttatni. Ezek a gyógyszerleadó rendszerek gyakran jobb orális biohasznosulást mutatnak a kristályos, lipidmentes készítményekhez képest a rosszul oldódó vegyületek esetében. [6]

A SEDDS jellemző sajátossága, a nagyon magas benne a tenzid és kotenzid koncentráció. Ezek az önemulgeáló összetételek csak olajból és tenzidekből álló izotróp keverékek, melyek vizet nem tartalmaznak. Tenzidként gyakran használunk propilén glikol származékokat, polietilén glikol származékokat például Cremophor[®]-t vagy Labrasol[®]-t ami mono-, di- és trigliceridek polietilén glikol mono és diésztereinek meghatározott keveréke. Ha a rendszer vizes közegbe kerül (például bélnedv), akkor nagy diszperzitásfokú o/v típusú mikroemulzió képződik belőle. A vizes közegbe kerülés során a diszpergált cseppek méretét az alkalmazott tenzid természete és koncentrációja határozza meg. A nagyon kicsi részecskeméretű diszperz rendszer kialakításához elegendő energiát szolgáltat per os bevétel esetén csupán a gasztrointesztinális traktus motilitása is. [6]

Bár az önemulgeló rendszerek számos előnnyel rendelkeznek, meg kell említeni bizonyos korlátaikat is, mint például az *in vivo* gyógyszerkicsapódás, a készítmény kezelésével kapcsolatos problémák, a korlátozott nyirokfelvétel, a prediktív *in vitro* tesztek hiánya és a telítetlen zsírsavak oxidációja. [9]

TR-146-os sejtvonala

A sejt kultúrákat a tudomány széles köreiben alkalmazzák. Sokrétű különböző tulajdonságaik miatt különböző modellek kialakítására szolgálnak. [10]

A TR-146 sejt vonala a szájnyálkahártya potenciálisan egyedülálló *in vitro* modellje, amely egy 67 éves nő bukkális karcinómájának nyaki csomóponti metasztázisából származik. A sejtek differenciálatlan, nem keratinizált réteghámot alkotnak, amely a normál szájnyálkahártyára jellemző számos jellemzővel rendelkezik, tartalmaz epithelialis-mesenchymalis átmenet markereket, tight junction fehérjéket és aquaporinokat. [10]

A sejt vonal ideális permeabilitási, abszorpciós vizsgálatokhoz, különböző markerek és gyógyszerek transzportjának tanulmányozására. A TR-146-os sejt vonal permeabilitását számos különböző molekulatömegű és hidrofilizású anyag segítségével jellemezték különböző pH és ozmolalitás tartományokban. Tanulmányozták az aminopeptidáz, karboxipeptidáz és észteráz aktivitását és kimutatták, hogy a sejt vonal nagyfokú hasonlóságot mutat a normál humán bukkális epitélium enzimjeinek aktivitásával. A sejt vonal ezért nemcsak a felszívódási, hanem az enzimatikusan labilis gyógyszerekkel végzett metabolizmus-vizsgálatokhoz is alkalmazható. [10]

Galleria mellonella

A *Galleria mellonella* faj (nagy viasz moly) a méhkolóniák kártevőjeként a világon szinte mindenütt elterjedt. Előfordulása alapvetően egybeesik az egyes országok méhészeti gazdaságával, mivel ez a kártevő méhkaptárban vagy tárolt viaszban található, a *galleriosis* nevű jelenséget okozza. Teljes metamorfózissal fejlődik pete, lárva, báb és a teljesen kifejlett stádiumokon keresztül. [11]



3. ábra: A nagy viasmoly kifejlett példánya

A tudományos szempontból jelentős fajt számos kísérletben alkalmazzák modellorganizmusként, mivel a rovar megfelel a modellszervezetekkel szemben támasztott követelmények többségének. A lárvák méretük és életciklusuk miatt könnyen kezelhetők, eltartásukhoz nincs szükség speciális szakértelemmel rendelkező személyzetre. A rovarok hasonlóságot mutatnak az emlősök különböző biokémiai folyamataival. Alapvetően egy félig komplex, sejtes és humorális veleszületett immunrendszerrel rendelkeznek, amely figyelemre méltó hasonlóságot mutat az emlősökével. További előnyeik még, hogy a lárvák életképességét könnyű meghatározni, minden laboratórium számára megfizethetők, a gyógyszerek és a kórokozók dózissai pontosan és könnyen beadhatók, nagyon széles hőmérséklet-tartományban inkubálhatók (beleértve a 37 °C-ot is, ami az emberi test hőmérséklete) annak ellenére, hogy a növekedés optimális hőmérséklete 25 °C. Megemlítendő még, hogy a gerinces állatokból álló modellekkel ellentétben nem igényelnek etikai engedélyt. [12] [13]



4. ábra: *Galleria mellonella* befecskendezése

A Galleria mellonellát általában antimikrobiális gyógyszerek *in vivo* aktivitásának értékelésére, mikrobiális kórokozók virulenciájának vizsgálatára, valamint élelmiszer-tartósítószeres és antimikrobiális gyógyszerek *in vivo* toxicitásának tanulmányozására használják. [11]

3. Célkitűzés

Kutatási munkám célja az irodalmi áttekintésben tárgyalt ismeretanyag alapján egy relatíve stabil, ivermectint tartalmazó önemulgeáló rendszer létrehozása volt, amely az ivermectin oldatos formájához képest nagyobb biológiai hatékonysággal (ölési képességgel) rendelkezik. A formulációt felületaktív anyagok segítségével igyekeztünk megvalósítani. Az általunk elkészített önemulgeáló rendszert különböző *in vitro* és *in vivo* vizsgálatoknak szeretnénk volna alávetni. Vizsgálni akartuk a formuláció citotoxicitását és a sejtes transzportot TR-146-os sejtvonalon valamint a biológiai hatékonyságot *Galleria mellonella* lárvákon.

4. Anyagok és módszerek

Formuláció

A formulációhoz felületaktív anyagokat használtunk fel. Igyekeztünk egy stabil SMEDDS, vagy SNEDDS rendszert létrehozni, amely képes az ivermectint feloldani. A szakirodalomban csupán 3 olyan önemulgeáló rendszerre találtunk példát, melyet ivermectinnel alkalmaztak. Az első formuláció optimalizált nanoemulziós formula volt, amely Maisine CC-ből, Labrasol ALF-ből és Transcutol HP-ből állt 20:60:20 arányban. A második formuláció Lauroglycolt olajos fázisként, Labrasolt surfactanként és Transcutolt cosurfactanként és vizet tartalmazott 4:23:23:50 arányban. A harmadik formuláció pedig Capryol PGMC-t, Transcutol HP-t és Labrasolt tartalmazott 10:15:75 arányban. Mindhárom formulációban fokozatos növekvő mennyiségben ivermectint oldottunk fel, majd centrifugálással vizsgáltuk az emulziós rendszer stabilitását. A legtöbb ivermectint a 3. formuláció (CTL 10:15:75) tudta feloldani, illetve ez bizonyult a legstabilabb SMEDDS rendszernek a centrifugálási vizsgálatok alapján. [14], [15], [16]

Formulációhoz felhasznált anyagok

Capryol PGMC

A Capryol PGMC egy olajos folyadék, amely kaprilsav propilénlikol észtereiből áll mono- és diészterekből alkotva. Viskozitása 20 mPa·s 20°C fokon, HLB értéke 6. Oldószerként szolgál a rosszul oldódó hatóanyagokhoz és fokozza a biohasznosulást. Kotenzidként szolgál LFCS II-es típusú SEDDS és III-as típusú SMEDDS formulációkban.[17]

Transcutol® HP

A Transcutol® HP nagy tisztaságú dietilénlikol-monoetil-éterből áll. Oldószerként, szolubilizáló szerként, valamint a biohasznosulás javítására használják orális és egyéb alternatív beviteli módok esetén. Viskozitása 4.8 mPa·s 20°C fokon. Koszolvensként alkalmazzák LFCS III-as (SMEDDS) és IV-es (micellás oldatok) orális készítményekben. Hordozóként használják nazális és szemészeti készítményekben. [18]

Labrasol®

A Labrasol® egy folyékony halmazállapotú nemionos, o/v típusú felületaktív anyag, amelyet szolubilizálószerként alkalmaznak. Mono-, di-, trigliceridek és PEG-8 (MW 400) illetve kaprinsav (C10), kaprilsav (C8) mono- és diésztereit tartalmazza. Viskozitása 20 °C-on 80 - 110 mPa·s, CMC értéke 42 ± 24 (mg / L, 25 °C), HLB értéke 12. [19]

DLS mérés

A dinamikus fényszórás (DLS) módszerét szuszpenziók és emulziók szemcséinek jellemzésére használják. A mérés a szemcsék Brown-féle mozgásán alapul, ami azt fejezi ki, hogy a kisebb szemcsék gyorsabban, a nagyobbak pedig lassabban diffundálnak a folyadékban. A mintát a vizsgálat során megvilágítják, a szemcséken szóródó fény pedig információt szolgáltat a diffúzió sebességéről és így a szemcsék méreteloszlásáról. A módszerrel 0,8 - 6500 nm mérettartományba eső szemcsék analizálhatók. [20]

A megfelelő formuláció kiválasztása után meghatároztuk a rendszer részecskeméret eloszlását dinamikus fényszórással egy Malvern Zetasizer Nano ZS készülékkel. A vizsgálatot három különböző koncentráción végeztük el: 25, 50 és 75 mg/ml-en, annak érdekében, hogy meghatározzuk az optimális hatóanyag mennyiséget.

Sejtek tenyésztése

A sejteket inkubátorban tenyésztettük, ferde nyakú sejttenyésztő flaskákban melyek alkalmasak letapadó sejt kultúrák tárolására. A táptalajt Dulbecco's Módosított Eagle's Médiumból (DMEM) készítettük el, amely tartalmaz 10% hővel inaktivált főtális szarvasmarha szérumot, 1% nem-esszenciális aminosav oldatot, valamint gentamicint, nátrium-bikarbonátot.

A sejteket a folyamatos, exponenciális növekedésük fenntartása érdekében hetente passzáltuk. A passzálas során a sejttenyésztő flaskát először 5 ml PBS puffer oldattal mostuk. Ez a lépés eltávolítja a szérum, kalcium és magnézium maradványokat, melyek gátolnák a sejtek disszociációját előidéző reagens hatását. Ezután 10 percen

keresztül inkubáltuk a tenyészetet 3 ml TrypLE™ Express Enzyme oldattal, hogy feloldjuk az adherens sejteket. 7 ml sejtmedium hozzáadása után 10 percig 1100 RPM fordulatszámon centrifugáltuk a sejtszuszpenziót. A szuszpenzióból ezalatt mintát vettünk, majd Bürker-kamra segítségével számoltuk meg a sejteket. A centrifugálás során leülepedett sejtekről eltávolítottuk a használt médiumot, majd 10 ml friss sejtmediumot adtunk hozzájuk és homogén sejtszuszpenziót képeztünk. Az új tenyésztő flaskába akkora térfogatot helyeztünk a szuszpenzióból, hogy az 1 millió sejtet tartalmazzon, majd friss médiummal 10 ml-re egészítettük ki.

MTT-teszt

Az ivermectin citotoxicitásának a vizsgálatát MMT teszt segítségével végeztük TR-146 sejtvonalon. Az élő, metabolikusan aktív sejtek endocitózis segítségével felveszik a sárga színű MTT molekulát, és azt hasítással lila színű formazánná alakítják át. A sejtek metabolikus aktivitásának csökkenése, az életképes sejtek számának a csökkenésére utal a tesztkulturában. Minél kevesebb a képződött lila formazán mennyisége annál halványabb lila árnyalatú lesz a vizsgált minta, melyet abszorpcióval jól detektálhatunk. A sejtek életképességét a vizsgálandó anyaggal végzett kezelés után kolorimetriásan tudjuk meghatározni. [21]

A tesztet lamináris boxban végeztem az aseptikus körülmények biztosításának érdekében. A TR-146-os sejteket 96 lyukú plate-re szélesztettem szét úgy, hogy egy-egy lyuk megközelítőleg 10.000 sejtet és 100 µl médiumot tartalmazzon. A sejtek monolayer képzését egy hetes inkubációval értem el a kísérlet során. Ezután eltávolítottam az elhasznált médiumot a sejtekről és a sejtek felszínét 50 µl PBS-sel mostam. Lyukanként 100 µl-t vittem fel a plate-re az általunk formulált ivermectin tartalmú emulzióból, majd 37 °C-on 30 percig inkubáltam a sejteket. Ezután az emulziókat eltávolítottam a sejtekről és felszínüket 50 µl PBS-sel mostam. A művelet után 100 µl/lyuk 5 mg/ml-es MTT-PBS oldatot adtam a sejtekhez, majd 2 óra inkubáció után 37 °C-on eltávolítottam a festéket a sejtekről és 100 µl/lyuk sósavas izopropanollal szuszpendáltam a sejteket. Az abszorbancia mérését Thermo-Fisher Multiskan Go spektrofotométer segítségével végeztem el 565 nanométeren.

TEER-mérés

A TEER (Transzepitheális elektromos ellenállás) mérése során a sejttenyésztő inzertekre szélesztett sejtek „érettségét” vizsgáltuk. A 24 lyukú plate-ben lévő inzertek alja $0,33 \text{ cm}^2$ területű, $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ pórus átmérőjű polikarbonát membránból állt. A kísérlet elvégzése során gondosan ügyeltünk arra, hogy az inzertekbe és a lyukakba annyi médiumot tegyünk, hogy a két folyadékszint egyforma legyen, biztosítva ezzel a hidrosztatikai nyomás egyenlőségét a kamrákban, megakadályozva, hogy az inzertek alján letapadt sejtek rétege sérüljön. A TEER mérő készülékkel a membránon kialakuló sejtréteg egybefüggőségét mérjük. Minél folytonosabb egy sejtréteg, az elektromos ellenállás mértéke annál nagyobb a két folyadék réteg között. A mérésekre a megfelelő sejtes transzport elvégzéséhez volt szükség, mivel ennek feltétele a folytonos sejtréteg az inzerteken.

Az ivermectin transzportjának vizsgálata

Az ivermectin tartalmú formulációkra vizsgált sejtes transzport vizsgálatot az MTT-teszt alapján megfelelőnek talált ezerszeres hígításon végeztük. Az emulziót Hank's pufferrel hígítottuk, a kontroll pedig $0,05 \text{ mg/ml}$ koncentrációjú ivermectint tartalmazó oldat volt szintén Hank's pufferben oldva. Előzetesen TEER méréssel ellenőriztük a sejtréteg folytonosságát, csak a $130 \text{ }\Omega \cdot \text{cm}^2$ érték feletti inzerteket használtuk a kísérletekhez. Az ivermectin mennyiségét egy Thermo-Fisher Multiskan Go készülékkel mértük, Greiner UV-star 96 lyukú mikroplate-ek segítségével. A Hank's pufferben korábban felvettünk egy kalibrációs görbét az analitikai mérésekhez. A sejtek 10^5 /inzert koncentrációban kerültek szélesztésre és 2 hét után váltak alkalmassá a vizsgálatra. A 24 lyukú platebe helyezett sejttenyésztő inzertek esetén az apikális kamrába $400 \text{ }\mu\text{l}$, míg a bazolaterális kamrába $1000 \text{ }\mu\text{l}$ folyadék került. Előbbi a megfelelő emulzió vagy oldat volt, míg utóbbi Hank's puffer. 1, 2 illetve 3 óra elteltével inzertenként $2 \times 100 \text{ }\mu\text{l}$ folyadékot vettünk ki a bazolaterális kamrából és helyeztünk Greiner UV-Star 90 lyukú mikroplatebe. A kivett térfogatok folyamatosan pótlásra kerültek.

Galleria mellonellán végzett in vivo vizsgálatok

A *Galleria mellonella* egy alapvetően az immunológiában alkalmazott kísérleti állat amit az elmúlt években kezdtek el biokompatibilitási vizsgálatokra alkalmazni. Mi viszont nem a lárvák ivermectin toleranciájára voltunk kíváncsiak, hanem arra, hogy a formulációnk milyen mértékben képes ezeket a modellszervezeteket elpusztítani, mivel a lárvák nagy hasonlóságot mutatnak az ivermectin által célzott parazitákhoz, szintén gerinctelenek. A lárvák perifériás motoros szinapszisaiban számos parazita fajhoz hasonlóan glutamát és γ -aminovajsav (GABA) kapuzott klorid csatornák találhatóak. Az ivermectin szelektíven és nagy affinitással kötődve ezen csatornához fokozza a kloridion-beáramlást, amely a parazita idegsejtjeinek és izmainak hiperpolarizációját idézi elő, melynek hatására a lárvák megbénulnak, majd elpusztulnak. A vizsgálat során az emulziós és oldatos formulációból 20x, 40x, 200x és 1000x-es hígításokat tartalmztunk. Ez hatóanyagra levetítve 2.5, 1.25, 0.25 és 0.025 mg/ml ivermectint tartalmazott mindkét forma esetében. Minden mintából 20 μ l került beinjektálásra a lárvákba egy 28G-s inzulinos fecskendő segítségével.

A vizsgálat során arra voltunk kíváncsiak, hogy a két formuláció közül melyik képes több lárva elpusztítására az egyes csoportokban. A teljes vizsgálat 72 órát vett igénybe és ezalatt az időtartam alatt 4-szer tekintettük meg a mintákat, hogy a lárvák közül hányan pusztultak el és hányan maradtak életben. Az élet maradáást egy pipettaheggyel történő fizikai ingerléssel ellenőriztük. Az ivermectinnel történő kezelést vettük a 0. órának, „mintavételezés” pedig a 22., 27., 49. és 72. órában történt.

A vizsgálatokhoz 64 darab lárvaat használtunk fel és ezeket nyolc darab nyolcas csoportokra bontottuk és különböző koncentrációjú ivermectin oldattal, illetve emulzióval kezeltük.

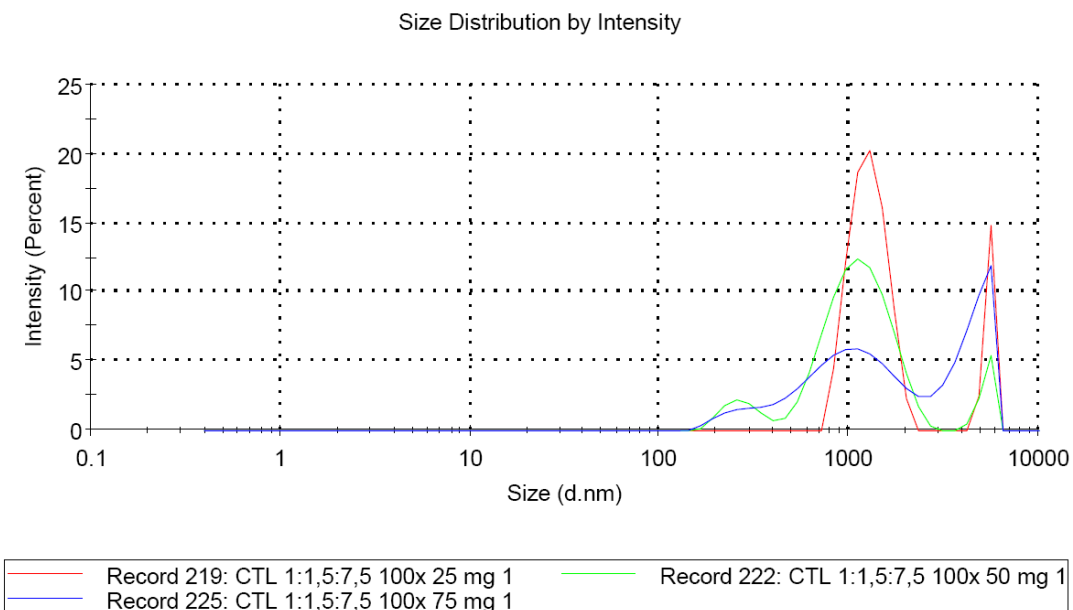
Statisztika

A *Galleria mellonella* lárva halálozási arányát Kaplan-Meier módszerrel ábrázoltuk és Gehan-Breslow-Wilcoxon, illetve Mantel-Cox analíziseknek vetettük alá a halálozási görbéket.

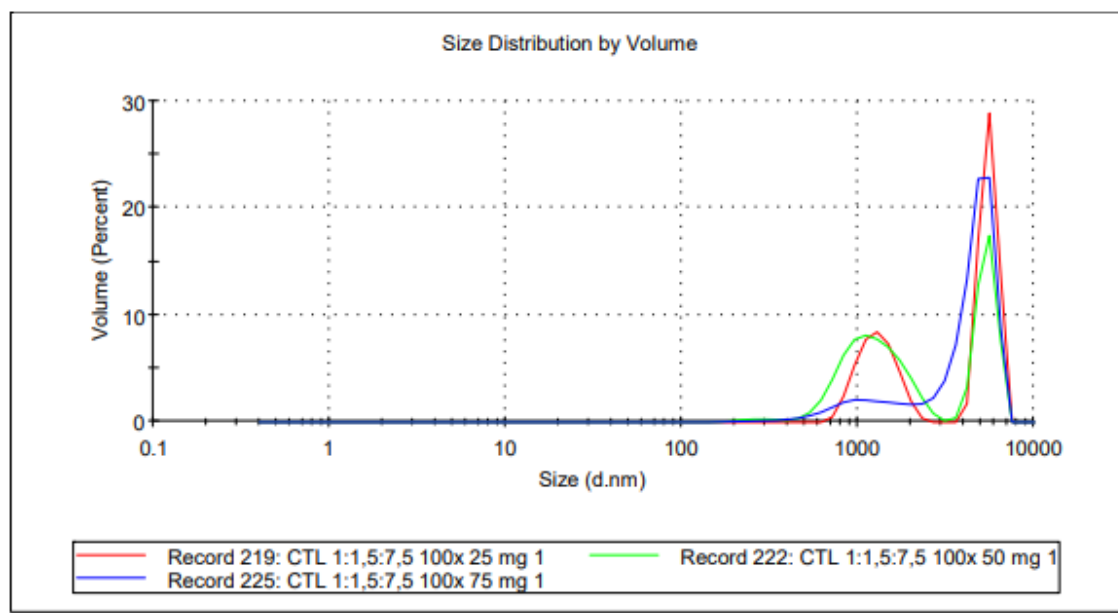
5. Eredmények

Részecskeméret meghatározása

A Malvern Zetasizerrel végzett vizsgálat során a részecskék méret szerinti eloszlását mértük az intenzitás (5. ábra) és a térfogat függvényében. (6. ábra). A két eredményt, a készülék a mért adatokból két külön matematikai eljárással alkotja meg.



5. ábra

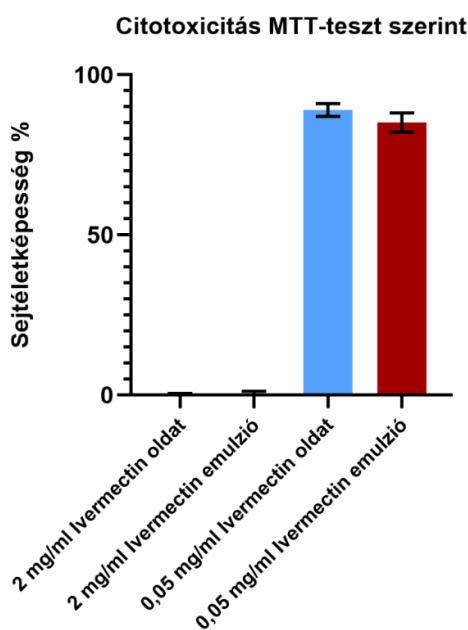


6. ábra

A vörös görbe a 25 mg/ml-es a zöld görbe az 50 mg/ml-es, a kék görbe pedig a 75 mg/ml-es koncentrációjú ivermectin tartalmú emulziókat mutatja. A kapott eredményeink alapján azt találtuk, hogy egy mikrométeres nagyságrendű készítményt sikerült formulálnunk. Az ábrán jól látható, hogy a 25 és 50 mg/ml koncentrációjú emulzióink két 1000 nm feletti frakciót adnak, míg a 75 mg/ml-es összetétel 3 különböző mérettartományú, nem homogén frakciót is tartalmaz, ezért a ezt az összetételt nem alkalmaztuk további vizsgálatainkhoz. Bár a 25 és 50 mg/ml-es formulációk közül, a 25mg/ml-es mutatott jobb részecskeméret eloszlást, mégis a nagyobb hatóanyagtartalmú 50mg/ml-es összetétellel dolgoztunk tovább, hogy megfelelő legyen a hatóanyag mennyiség a további vizsgálatokhoz.

MTT teszt eredményei

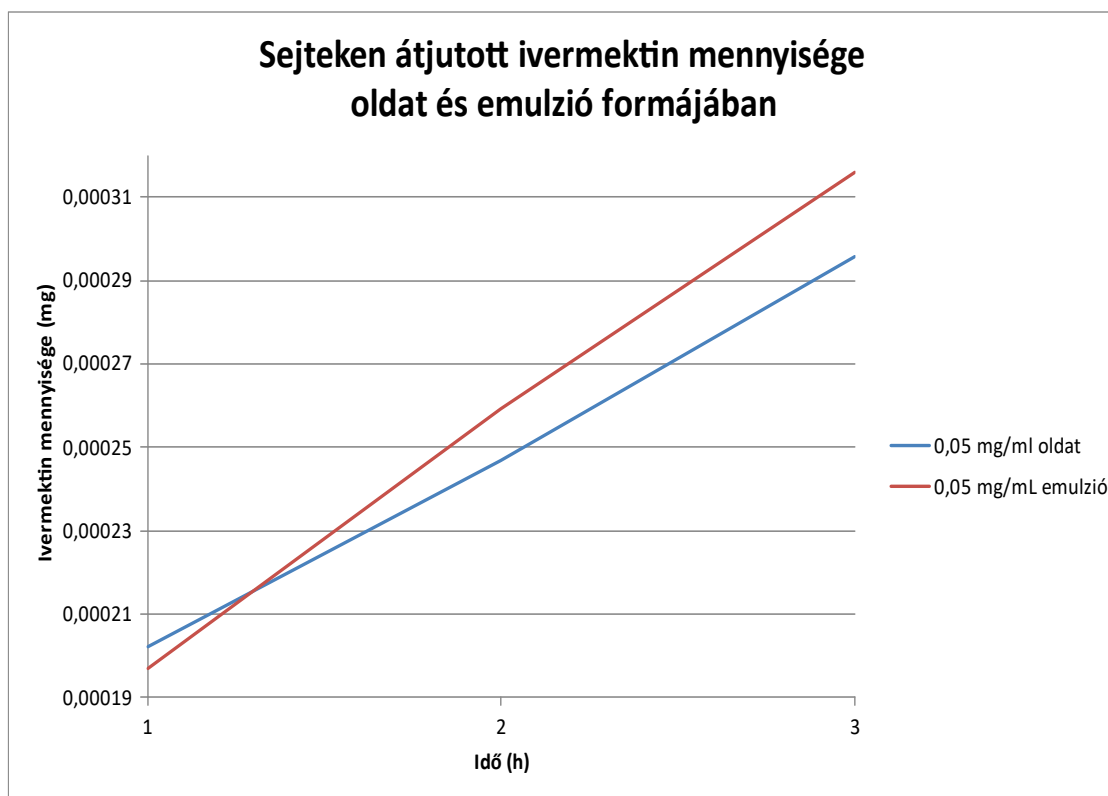
A kiválasztott formulációk toxicitását ezután TR-146 sejtvonalon vizsgáltuk MTT tesztel. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy 500x hígítás esetén teljes sejtpusztulás volt detektálható, 1000x hígítás esetén azonban a kapott értékek arra utalnak, hogy ez a hígítás még tolerálható és viszonylag magas sejtleletképeségi értékeket kaptunk, ezért a sejtes transzportot ezerszeres hígításon végeztük el, ami gyakorlatilag 0,05 mg/ml ivermectin koncentrációt jelent.



7. ábra

Sejtes transzport eredményei

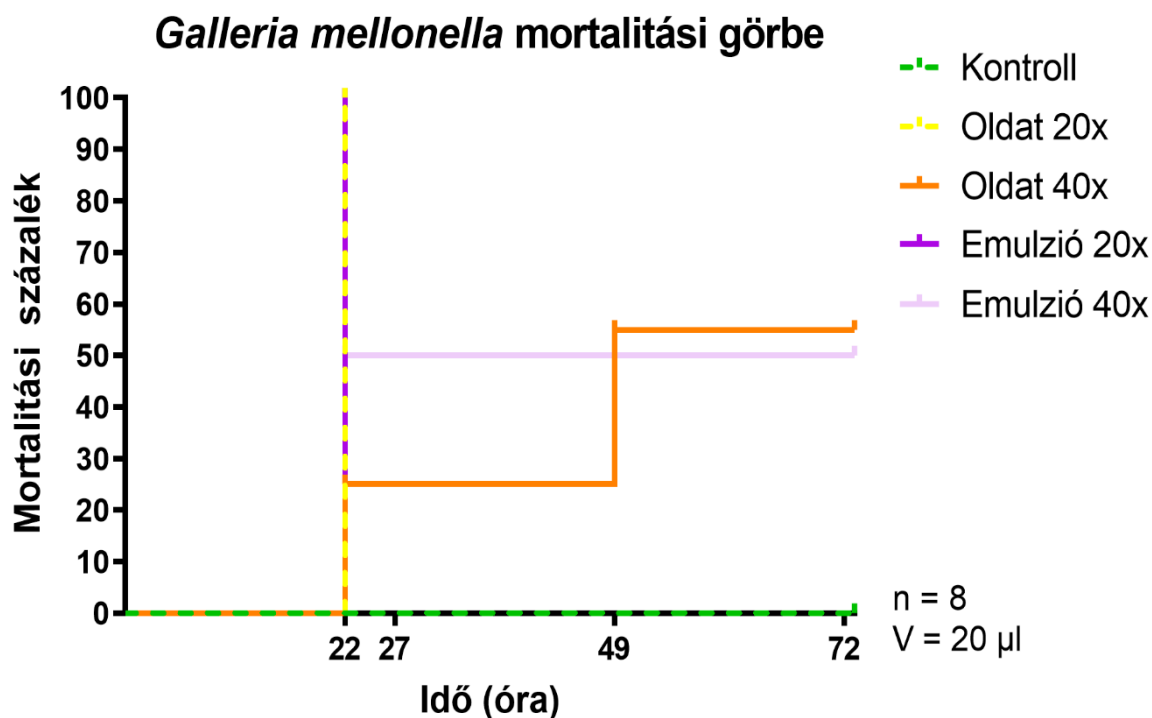
A sejtes transzportot Hank's pufferben végeztük el szintén TR-146 sejtvonalon. Az alsó fázisokból vettünk mintát amit spektrofotométerben mértünk vissza 248 nanométeren, és egy korábban felvett kalibrációs görbe alapján számoltuk a minták abszorbanciáját. A kísérlet során az általunk formulált emulzióval egy azonos hatóanyag-tartalmú ivermectin oldatot hasonlítottuk össze. 3 óra alatt azt tapasztaltuk, hogy csupán minimálisan hatékonyabb az általunk formulált rendszer az oldathoz képest ebben a vizsgálati környezetben.



8. ábra

A formulált emulzió hatékonyságának vizsgálata

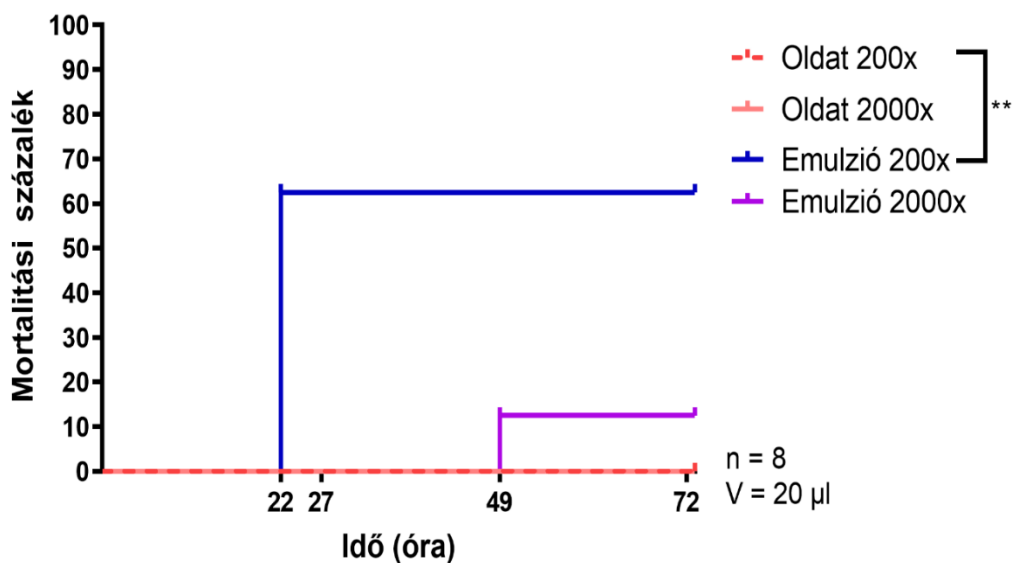
A vizsgálathoz a formulált emulziókat különböző mértékben hígítottuk, illetve készítettünk hozzá azonos koncentrációjú ivermectin oldatokat is kontrollként. A Tanszéken korábban folytatott kísérletek alapján ilyen hígításon az emulgensek a lárváknak nem okoznak jelentős egészségkárosodást, így a hordozó rendszer tesztelését kihagytuk. A diagramon (9. ábra) látható, hogy az oldat és az emulzió húszszoros hígításon, már az első vizsgálati időpontban minden egyed megölt. negyvenszeres hígításon az oldat és az emulzió között a kísérlet végéig, a 72. óráig nem volt számottevő különbség.



9. ábra

A 10. ábrán jól megfigyelhető, hogy kétszázszoros hígításon szignifikáns volt a különbség az oldat és az emulzió között. Jól látható, hogy sem a kétszázszoros sem a kétezerszeres hígítású oldat nem ölt meg egyetlen lárvát sem, a kétszázszoros hígítású emulzió viszont a kezelt állatok 60%-át elpusztította már az első 22 óra után. A kétezerszeres hígítású emulzió esetén 1 egyed pusztult el.

Galleria mellonella mortalitási görbe



10. ábra

A 72 óra alatt elpusztult lárvákat a 9. ábrán egy táblázatban számszerűleg is feltüntettem, ahol szintén látható, hogy az emulzióknak 0,25 és 0,025 mg/ml koncentrációkon több lárvaival végzett, mint az azonos koncentrációjú ivermectin oldat.

Hatékonyság vizsgálata *Galleria mellonella* lárvaikon

Formuláció	ivermectin koncentráció	elpusztult lárvák
oldat	2,5 mg/ml	8
oldat	1,25 mg/ml	4
oldat	0,25 mg/ml	0
oldat	0,025 mg/ml	0
SEDDS	2,5 mg/ml	8
SEDDS	1,25 mg/ml	4
SEDDS	0,25 mg/ml	6
SEDDS	0,025 mg/ml	1

11. ábra

6. Összefoglalás

Munkánk során sikerült a vizsgált emulziók közül a legjobb részecskeméret eloszlásút kiválasztani, aminek azonban a bukkális, TR-146 sejtvonalon mért sejtes transzport eredményei nem voltak jelentősen jobbak az ivermectin oldathoz képest és a kiválasztott formuláció magas citotoxicitást mutatott. Ugyanakkor a kialakított SEDDS a *Galleria mellonella* lárvákon jelentősen nagyobb ölü hatással bírt, mint az azonos koncentrációjú oldat. Hatékonyabbnak bizonyult az oldatos formához képest.

Az általunk készített ivermectin tartalmú önemulgeáló rendszeren a többféle szempontból is lehetne módosítani. Csökkentenünk kell a citotoxicitást és a továbbiakban a formuláció optimalizálásához hosszú távú kinetikai stabilitási vizsgálatokat kell végeznünk, akár alacsonyabb hatóanyag-tartalommal. Valószínű, hogy a stabilabb 25 mg/ml-es koncentrációjú oldattal is hasonlóan jó eredményeket kapnánk a *Galleria mellonella* lárva végzett hatékonysági vizsgálatokon, mivel a kísérlet során még kétszázszoros hígításban is nagy hatékonyságot értünk el. Mindezek mellett az ivermectin emulziós formulációinak a hatóanyagra gyakorolt stabilitása nem ismert, ezért egy kinetikailag és termodinamikailag stabilizált, kedvező citotoxicitású, fejlesztett készítményt még ilyen szempontból is beható vizsgálatoknak kell alávetni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni a diplomamunkám létrehozatalának lehetővé tételéért és a rengeteg segítségért, tudásért amit az évek során kaptam témavezetőmnek, Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin tanszékvezetőnek és konzulensemnek Dr. Nemes Dániel egyetemi tanársegédnek, illetve a gyógyszertechnológiai tanszék minden tagjának.

Irodalomjegyzék

- [1] Mathachan SR, Sardana K, Khurana A. Current Use of Ivermectin in Dermatology, Tropical Medicine, and COVID-19: An Update on Pharmacology, Uses, Proven and Varied Proposed Mechanistic Action. *Indian Dermatol Online J.* 2021 Jul 14;12(4):500-514. doi: 10.4103/idoj.idoj_298_21. PMID: 34430453; PMCID: PMC8354388.
- [2] González Canga A, Sahagún Prieto AM, Díez Liébana MJ, Fernández Martínez N, Sierra Vega M, García Vieitez JJ. The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans--a mini-review. *AAPS J.* 2008;10(1):42-6. doi: 10.1208/s12248-007-9000-9. Epub 2008 Jan 25. PMID: 18446504; PMCID: PMC2751445.
- [3] Deeks ED. Ivermectin: A Review in Rosacea. *Am J Clin Dermatol.* 2015 Oct;16(5):447-52. doi: 10.1007/s40257-015-0150-8. PMID: 26254001.
- [4] https://kolloid.unideb.hu/wp-content/uploads/vm_bsc_lev/4%20eloadas.pdf letöltve: 2022 02.10
- [5] Tartaro G, Mateos H, Schirone D, Angelico R, Palazzo G. Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review. *Nanomaterials (Basel).* 2020 Aug 24;10(9):1657. doi: 10.3390/nano10091657. PMID: 32846957; PMCID: PMC7558136.
- [6] Önemulgeáló rendszerek formulálása tenzid komponenseinek élő sejtekre gyakorolt hatásának ismeretében Ujhelyi Zoltán, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó
- [7] Investigation of Self-Emulsifying Drug-Delivery System Interaction with a Biomimetic Membrane under Conditions Relevant to the Small Intestine Oliver J. Hedge, Fredrik Höök, Paul Joyce, and Christel A. S. Bergström *Langmuir* 2021 37 (33), 10200-10213. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c01689
- [8] Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother.* 2004 Apr;58(3):173-82. doi: 10.1016/j.biopha.2004.02.001. PMID: 15082340.
- [9] Dokania S, Joshi AK. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)--challenges and road ahead. *Drug Deliv.* 2015;22(6):675-90. doi: 10.3109/10717544.2014.896058. Epub 2014 Mar 27. PMID: 24670091.
- [10] <https://ximbio.com/reagent/151425/tr146-cell-line> letöltve: 2022 02.16

- [11] Wojda I, Staniec B, Sulek M, Kordaczuk J. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog Dis.* 2020 Nov 23;78(9):ftaa057. doi: 10.1093/femspd/ftaa057. PMID: 32970818; PMCID: PMC7683414.
- [12] Trevijano-Contador, N.; Zaragoza, O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *J. Fungi* **2019**, *5*, 3.
<https://doi.org/10.3390/jof5010003>
- [13] Sammy Kay, Joseph Edwards, Joseph Brown and Ronald Dixon *Galleria mellonella* Infection Model Identifies Both High and Low Lethality of *Clostridium perfringens* Toxigenic Strains and Their Response to Antimicrobials
- [14] Yin HF, Yin CM, Ouyang T, Sun SD, Chen WG, Yang XL, He X, Zhang CF. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Genkwanin: A Novel Approach for Anti-Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2021 Feb 12;15:557-576. doi: 10.2147/DDDT.S292417. PMID: 33603345; PMCID: PMC7886095.
- [15] Gupta A, Nayak K, Misra M. Cow ghee fortified ocular topical microemulsion; *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* evaluation. *J Microencapsul.* 2019 Nov;36(7):603-621. doi: 10.1080/02652048.2019.1662121. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31500482.
- [16] Seo YG, Kim DW, Yousaf AM, Park JH, Chang PS, Baek HH, Lim SJ, Kim JO, Yong CS, Choi HG. Solid self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for enhanced oral bioavailability of poorly water-soluble tacrolimus: physicochemical characterisation and pharmacokinetics. *J Microencapsul.* 2015;32(5):503-10. doi: 10.3109/02652048.2015.1057252. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26079598.
- [17] <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/capryol-pgmc> letöltve: 2022 02.20
- [18] <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/transcutol-hp> letöltve: 2022 02.20
- [19] <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/labrasol> letöltve: 2022 02.20
- [20] <https://www.microtrac.hu/hu/termekek/particle-size-shape-analysis/dinamikus-fenyszoras/> letöltve: 2022. 02.23
- [21] <https://www.laboratuar.com/hu/testler/biologjik/mtt-testi/> letöltve: 2022 02.23

Ábrajegyzék

1. ábra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8354388/figure/F1/> letöltve: 2022. 02. 09.

2. ábra: https://68bd5162-a-62cb3a1a-s-sites.googlegroups.com/site/4ckisla89/home/feladat-ismertetese/huto-keno-folyadekok/emulgeator.png?attachauth=ANoY7crtKVf8L3_UxHuSMMVgZPn7-fnagoy6PafH8iFMQyHaga_Wm1HUE6k8yVCDI-PrBqz-L6sTMUN-AZ11oV2drLvW6NcdU0lgZiETv0v9Gu6YHD_z8W_SNsoCQ-xH91YHMDaNodXxAOThRKF9Ms95-mdiPrmP3oJePx8fS2nr4rGERkmlcftdc0mABdOp1DYavKT_y02n_i6Xlz0yV6IzCCNcWWI9HtpZkYX06GpNZFOqEll15IK7SAVwcizMjPdfZe13lDoFY22hen0yv_OGBxXPnJFy6w%3D%3D&attredirects=0 letöltve: 2022. 02. 10

3. ábra: https://www.butterfliesandmoths.org/sites/default/files/bamona_images/292150_galleria_mellonella_september_20-2011_hardin_co_ky_wingspan_29_mm.jpg letöltve: 2022.02.12

4. ábra: <https://www.researchgate.net/profile/Eugen-Domann/publication/210094705/figure/fig1/AS:394119940722688@1470976924453/Demonstrating-the-injection-technique-in-Galleria-mellonella.png> letöltve: 2022.02.12

5. ábra: saját ábra

6. ábra: saját ábra

7. ábra: saját ábra

8. ábra: saját ábra

9. ábra: saját ábra

10. ábra: saját ábra

11. ábra: saját táblázat

FÜGGELÉK

Saját munka:

- Oldatok, emulziók készítése
- Sejtvonal fenntartása
- Transzport és MTT vizsgálat elvégzése
- *In vivo* vizsgálat elvégzése

Segítséggel végzett munka:

- *In vitro* vizsgálat kiértékelése
- *In vivo* vizsgálat kiértékelése