

# **Membrán modell fejlesztése gyógyszertranszport jellemzéséhez**

Diplomamunka  
Anyagtudomány mesterszak

**Papp Szabolcs Dániel**

Témavezető:  
Dr. Kiss Éva  
egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest  
Természettudományi Kar  
Kémiai Intézet  
Fizikai Kémiai Tanszék

2018

## **Köszönetnyilvánítás**

Rendkívüli köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Kiss Évának, az értékes szakmai tanácsokért és a munkám elkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségért, valamint azért, hogy a rendelkezéseimre bocsájtotta a szükséges eszközöket a Határfelületi- és Nanoszerkezetek laboratóriumában.

Külön köszönöm Pári Edit és Dr. Gyulai Gergő önzetlen segítségét, akik mindig készségesen segítettek bármilyen elméleti vagy gyakorlati kérdéssel fordultam hozzájuk.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Ábrahám Ágnesnek, Hórvölgyi Zoltánné Pető Idának, valamint a Határfelületi- és Nanoszerkezetek laboratórium összes munkatársának a segítségükért és türelmükért.

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b> .....	5
<b>2. Irodalmi áttekintés</b> .....	6
2.1. A sejt felépítése .....	6
2.2. A sejtmembrán felépítése .....	7
2.3. Mesterséges sejtmembránok .....	8
2.4. Membrán modellek .....	9
2.4.1. CACO-2 .....	10
2.4.2. PAMPA .....	11
2.5. Hatóanyag felszabadulás .....	13
2.6. Hatóanyagok .....	14
2.7. Permeációs vizsgálatok .....	17
<b>3. Célkitűzés</b> .....	20
<b>4. Anyagok és módszerek</b> .....	21
4.1. Felhasznált anyagok és eszközök .....	21
4.1.1. A folyadéktranszport vizsgálatához felhasznált anyagok .....	21
4.1.2. A kísérleti munka során alkalmazott egyéb anyagok .....	22
4.1.3. Folyadék transzport vizsgálatára szolgáló, szétszedhető mérőcella .....	22
4.2. Kísérleti módszerek .....	24
4.2.1. Koncentráció meghatározása .....	24
4.2.2. Permeabilitás meghatározása .....	24
4.2.3. Spektrofotometria .....	26
4.2.4. Felületi morfológia vizsgálata .....	27
<b>5. Eredmények és értékelésük</b> .....	30
5.1. Előkísérletek .....	30
5.1.1. A cella anyagának duzzadás- és oldódás vizsgálata .....	30
5.2. Kísérletek modellanyaggal .....	33
5.2.1. Transzportvizsgálat fluoreszcein vegyületekkel .....	33
5.2.2. Membrán felületi morfológiájának vizsgálata .....	40
5.3. Kísérletek hatóanyaggal .....	45
5.3.1. Transzportvizsgálat hidrokortizonnal .....	45
5.3.2. Transzportvizsgálat izoniaziddal .....	51
5.3.3. Permeabilitás meghatározása .....	56
<b>5. Összefoglalás</b> .....	57
<b>6. Summary</b> .....	58
<b>7. Irodalomjegyzék</b> .....	59

## Rövidítések

CACO-2	humán colon adenocarcinoma eredetű sejtvonal
PAMPA	párhuzamos mesterséges-membrán permeabilitás vizsgálat ( <b>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</b> )
SER	sima felszínű endoplazmatikus retikulum
DER	durva felszínű endoplazmatikus retikulum
AFM	atomi erő mikroszkóp ( <b>A</b> tomic <b>F</b> orce <b>M</b> icroscope)
ATP	adenozin-trifoszfát
DNS	deoxiribonukleinsav
IBD	gyulladásos bélbetegség ( <b>I</b> nflammatory <b>B</b> owel <b>D</b> isease)
ECM	elektrokémiai megmunkálás ( <b>E</b> lectro <b>C</b> hemical <b>M</b> achining )
EPDM	etilén-propilén-dién terpolimer
INH	izonikotinil-hidrazin, izoniazid
SLA	sztereolitográfia (stereolitography)
EtOH	etanol
MeOH	metanol
PCTE	"nyomon maratott" polikarbonát ( <b>P</b> olycarbonate <b>T</b> rack <b>E</b> tched)
HPMC	hidroxipropil-metilcellulóz

## 1. Bevezetés

A 20. század második felében a nanotechnológia fejlődése jelentősen felgyorsult, és az új vizsgálati módszerek megjelenésével egy addig elérhetetlennek tűnő „világ” megfigyelése vált lehetővé. Az 1980-as évektől kezdődően folyamatosan készülnek az újabb és fejlettebb műszerek (pl: pásztázó elektronmikroszkóp, atomi erő mikroszkóp) melyek a nanométeres mérettartomány mélyreható és egyre pontosabb vizsgálatát biztosítják a tudósok számára.

Az emberi szervezetben zajló alapvető folyamatok megértéséhez elengedhetetlen az azt alkotó sejtek és azok összetételének pontos ismerete, majd feltárása. Napjainkban az erre irányuló kutatások többnyire a vegyiparban, azon belül a gyógyszeriparban fedezhetők fel szerte a világon.

Ahhoz, hogy a gyógyszer hatóanyagok elérjék a kívánt hatást, több feltételnek kell teljesülni. Ezek között meghatározó a sejtbe való bejutás képessége, amelynek jellemzésére több *in vitro* és modell módszert kidolgoztak. A membrán permeációs vizsgálatok akkor is fontosak, ha a hatóanyag egy gyógyszerhordozóban van jelen, mely lehetővé teszi a hatékonyabb, gyorsabb és koncentráltabb hatóanyag leadást az emberi szervezeten belül. Belátható, hogy ez nagymértékben elősegítheti az egyre agresszívabb és alkalmazkodóbb kórokozók elleni harcot napjaink orvoslásában.

A sejtmembránon lejátszódó transzportfolyamatoknak a sejt alapvető működésében jelentős szerepük van. Sok kutatás folyik jelenleg is a sejtmembránt alkotó kettős lipid réteg, illetve a benne lévő membránfehérjék és egyéb transzportot segítő sejtalkotók modellezésére, viszont az összetettség miatt ez nehéz feladatnak bizonyul. Az imént felsorolt okok miatt elsődlegesen egy csupasz, fehérjéktől mentes kettős lipid réteg modellezésével és vizsgálatával próbálkoztak már sokan, és erre tettem kísérletet diplomamunkám során én is egy a gyógyszertranszport jellemzésére szolgáló membrán modell fejlesztésével.

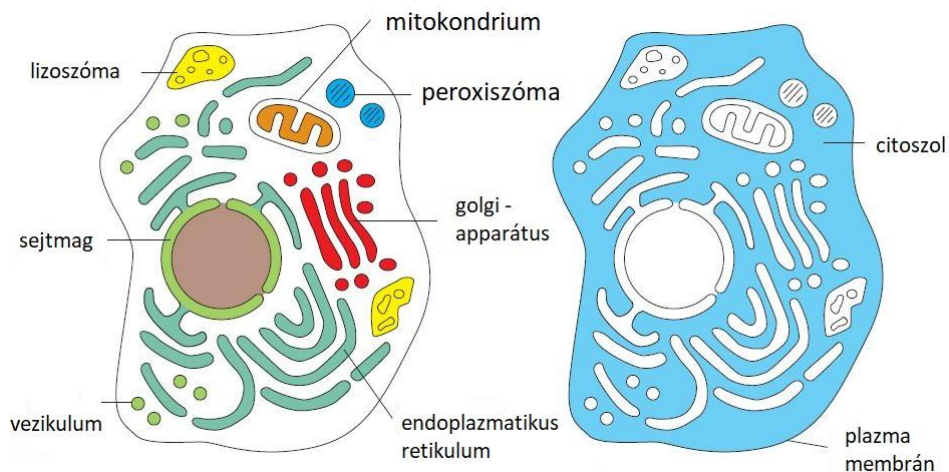
## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A sejt felépítése

Az élő szervezetek legalapvetőbb alkotó eleme a sejt. Felépítése és működése igen összetett, ezért is vált lehetővé számtalan specializálódási formájának következtében az élőlények széles körének kialakulása.

A sejtalkotókat egy vékony membrán választja el a sejten belüli tértől. A sejt központjában, a sejtmagban található a hosszú polimerekből álló DNS molekulák, melyek az adott élőlény genetikai információját tárolják. Az endoplazmatikus retikulum (ER) egy olyan membránrendszer, melyben riboszómák szintetizálnak fehérjéket. Létezik durva felszínű endoplazmatikus retikulum (DER) és sima felszínű endoplazmatikus retikulum (SER). Az itt szintetizálódott fehérjék és membrán lipidek, válogatáson és módosításon esnek át a Golgi-készülékben, majd exocitózissal távoznak a sejtől [1].

A lizoszómák feladata a jelenlevő makromolekulák lebontása, melyek egy meghatározott anyagáramlással, a vezikuláris transzporttal mozognak a sejten belül, mivel az egyes kompartmentek összeolvadása kivételes esetben valósul csak meg. A mitokondriumok feladata az ATP szintetizálása, a peroxiszómák pedig az oxidatív folyamatok lebonyolításában játszanak szerepet. A sejtalkotókat egy vékony membrán választja el a sejten belüli tértől, a citoplazmától, melynek alapállománya a citoszol. Az 1. ábrán látható egy eukarióta sejt felépítésének sematikus ábrázolása, ahol kék színnel van jelölve a citoszol [1,2].



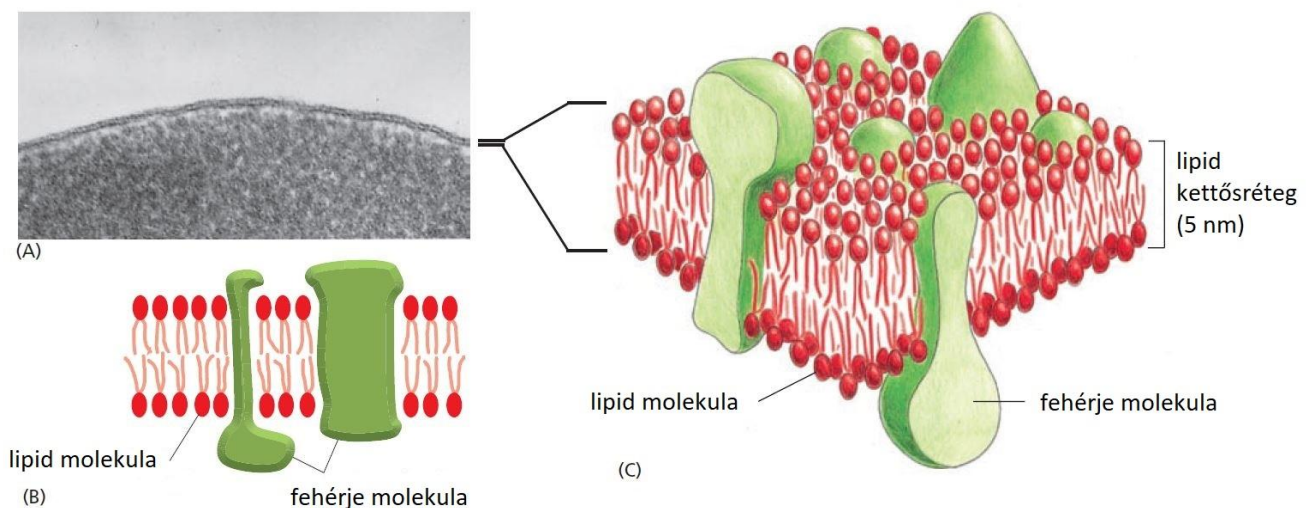
1.ábra: A sejt szerkezetének sematikus ábrázolása [2]

Függetlenül attól, hogy hol és milyen szerepük van ezeknek a sejteknek, akár egy állatban akár egy emberben, általánosságban a sejtburkolatuk (ún. sejtmembránjuk vagy plazmamembránjuk) szerkezete megegyezik [2].

## 2.2. A sejtmembrán felépítése

A plazmamembrán szerkezetének alapja egy lipid kettős réteg, mely - 5 nm vagy 50 atomnyi – vastagságú, egy hidofil és egy hidrofób részt tartalmazó fosfolipid molekulákból áll. Ezekben a molekulákban a hidofil fejrészhez egy foszfát csoporton keresztül kapcsolódik a lipid apoláris része, amit telített vagy telítetlen láncú szénláncok alkotnak. A membrán fehérjék is szerves részét képezik a membránnak, ugyanis sok transzportfolyamat megvalósulásában játszanak szerepet [2].

Ez a plazmamembrán (vagy sejtmembrán) egy határoló réteg, amely a sejtműködés alapfunkcióiért felel, a tápanyagok bejutását, a végtermékek vagy a hulladéktermékek kijutását segíti, illetve kellő rugalmassága hozzájárul ahhoz, hogy a sejt növekedni tudjon. A nem kívánt anyagok bejutását úgy igyekszik elkerülni, hogy különböző szelektív csatornákkal próbálja megválogatni pl: az átjuttatni kívánt vegyületeket. A 2. ábrán a sejt membrán sematikus ábrázolt szerkezetét, illetve egy elektronmikroszkópos felvételt láthatunk [1,2].



2.ábra: Egy emberi vörösvérsejt elektronmikroszkópos keresztmetszeti képe (A); A sejt membrán szerkezetének sematikus ábrázolása (B és C) [2].

A membránfehérjéknek számos fajtája van, melyek a sejtmembránban különböző módon helyezkednek el, és eltérő feladatokat látnak el. A transzmembrán fehérjék a kettős rétegen átnyúlnak, és ahhoz hasonlóan rendelkeznek hidrofil és hidrofób résszel is. Az előbbi részek a membrán két oldalán helyezkednek el, míg az utóbbi részek a membránon belüli térben. Ezeket hívjuk integrált membránfehérjéknek. Egyes membránfehérjék teljesen a sejten belüli térben (citoszolban) helyezkednek el, és csak a membrán belső monorétegéhez csatlakoznak. A perifériás membránfehérjék teljesen kívül esnek a kettősrétegen, és lipid- vagy fehérje molekulákon keresztül kapcsolódnak a membránhoz [2].

### **2.3. Mesterséges sejtmembránok**

A kettősréteg és a környező vizes közeg lehetővé teszi, hogy a membránok úgy viselkedjenek, mint egy kétdimenziós folyadék, melyben a molekulák bizonyos keretek közötti korlátozott mozgása biztosítja a rugalmasságot. Ennek alapján dolgoztak ki módszereket szintetikus lipid kettősrétegek kialakítására, melyek olyan membrán modellek, amelyeken a valódi biológiai membránokon lejátszódó folyamatok részben szimulálhatóak.

Általánosan kétféle membránszerveződést különböztetünk meg: a zárt, kör alakú, sejtalkotókat elszigetelő membránokat és vezikulumokat; valamint a sík kettős rétegeket. Az elsőhöz hasonló szerkezetek előállíthatók amfipatikus lipidmolekulák spontán aggregációjával vízben. Liposzómák esetén ez 25 nm – 1 mm átmérőjű gömböcskéket jelent. A másik módszer alternatívájaként egy sík kettősréteg alakítható ki szilárd hordozón, vagy két vizes közeg közötti válaszfalon elhelyezkedő lyukon [2].

A kutatások eredményeiből a lipid molekulák gyakrabban és ritkábban bekövetkező mozgásaira következtethetünk a rétegben (egyes esetekben a rétegek közötti „flip-flop” kicserélődésre), biológiai membránok esetén pedig a fehérje molekulák mozgására is. Kimutatták, hogy a hőmérsékletváltozás jelentős hatással van a molekulák membránon belüli elhelyezkedésére, ugyanis a magasabb hőmérséklet elősegíti azok gyors vándorlását, így növelve a transzportfolyamatok sebességét. Ez a hosszú szénhidrogén láncok saját hossz tengelyük körüli rendkívül gyors (akár 30 000 fordulat/perc-es) mozgásának tudható be [2].



## 2.4. Membrán modellek

A kombinatorikus kémia és a nagy áteresztőképességű szűrési módszerek megjelenése lehetővé tette a gyógyszeripar egy új irányba történő fejlődését. Ezek segítségével nagyszámú hatóanyag-jelölt molekula állítható elő, és ezek közül bizonyos kritériumok szerint kiválaszthatóak az ígéretes molekulák. Ez a molekulák szervezetben történő viselkedésének jellemzésére újabb fizikai-kémiai paraméterek alkalmazását jelentette. Az addig használt ionizáció és lipofilitás mellett megjelent az oldhatóság és a permeabilitás (áteresztőképesség) is. A permeabilitás fontossága abban rejlik, hogy nem a diffúzió kinetikáját írja le, hanem azt, hogy egy molekula mennyire képes áthaladni egy biológiai membránon, egy fluxus értéket ad meg [3]. Ilyen vizsgálatokra alkalmazhatóak a CACO-2 sejtvonalakon végrehajtott kísérletek.

A CACO-2 humán epiteliális vagy szöveti sejtvonalat széles körben alkalmazzák a bél hámszöveti gátjának mintájaként. Ez a sejtvonat eredetileg a vastagbélrák kutatás eredményeként alakult ki, ezáltal leginkább a bélrendszerben található abszorptív enterocitákra (felszívó sejtekre) jellemző. A legelőnyösebb tulajdonsága az a képesség, hogy spontán differenciálódik akár egy vékony sejtréteggé, melynek vastagsága egy sejt átmérőjének a nagyságrendjébe esik, lehetővé téve ezzel a sejten keresztüli, illetve sejtmembránon keresztüli permeabilitás vizsgálatát [4].

Heterogén és enyhén eltérő tulajdonságú sejteket tartalmaz ez a modell, mivel a tenyésztési körülmények várhatóan kiválasztják a sejtek azon szubpopulációinak növekedését, amelyek az eredeti sejtvonaltól eltérő sejtmodell-rendszert eredményeznek. Ennek megfelelően a különböző laboratóriumok hasonló kísérleti körülmények között kapott eredményei nem lehetnek közvetlenül összehasonlíthatók. Ennek köszönhetően számos klónozott CACO-2 sejtvonalat hoztak létre, és írtak le a szakirodalomban [4].

A PAMPA (párhuzamos mesterséges membrán-permeabilitás vizsgálat) módszer, vagy más néven nagy áteresztőképességű módszer a molekulák passzív, transzcelluláris permeabilitásának mérésére alkalmazható. Ez a rendszer lipidekből kialakított mesterséges membránt tartalmaz. A membrán kialakítása során lehetőség van arra, hogy optimalizáljuk a mesterséges membránt alkotó foszfolipidek mennyiségét és minőségét. Ennek következtében egy humán szövethez hasonló biomimetikus membránt hozhatunk

létre. Mint ilyen, a gasztrointesztinális (GIT-PAMPA), a vér-agy gáti (BBB-PAMPA) és a bőrön keresztül történő felszívódást leíró módszer „bőr-PAMPA” (Skin PAMPA) került kifejlesztésre [3].

#### **2.4.1. CACO-2**

Az 1970-es években több sejt modell kifejlesztésére került sor a gasztrointesztinális daganatok kutatásaival kapcsolatban. A cél a rák kialakulásának és a citoterápia hatásainak vizsgálata volt. Részben primer bélhámsejtek morfológiai és funkció szerinti heterogenitása, azaz a bél enterociták, enteroendokrin sejtek, Paneth-sejtek és M-sejtek miatt szükség volt a tumorsejtek speciálisabb sejtípusokká történő differenciálódására [4].

A sejtvonalak többségét részben szintetikus vagy biológiai tényezők hozzáadásával lehet differenciálni. A sejt kultúra-vizsgálatok számos tudományágban izgalmas új lehetőségeket kínáltak. Ha megfelelően használják, a CACO-2 humán colon adenocarcinoma eredetű sejtvonal tájékoztatást nyújt a bélnyálkahártya gátló tulajdonságainak biológiai és biokémiai alapjairól, de értékelheti a gyógyszerek és az élelmiszeripar szempontjából fontos gyógyszerek és táplálkozási összetevők felszívódását is. Így a CACO-2 sejtvonalat számos alkalmazásban használták [4].

Ilyen alkalmazás volt a gyógyszerhatóanyagok vagy élelmiszer-összetevők (például paracelluláris vagy transzcelluláris mechanizmusú) szállítására szolgáló útvonalak felderítése a bélhámon keresztül, vagy ezek által potenciálisan kiváltott toxikus hatás tanulmányozása a bélnyálkahártyában. De ilyen volt még a bioaktív molekula optimális fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése paracelluláris vagy transzcelluláris úton a bélhámon keresztül történő passzív diffúzióhoz vagy a bioaktív molekulák közötti interakciók tanulmányozása a bélhámon át történő szállítás során [4].

Hsih-Yin Tan és munkatársai gyógyszertranszport vizsgálatához egy többkamrás mikrofluidos modellt használt, CACO-2 sejtek alkalmazásával. Egy tiolén-bázisú többkamrás és többrétegű chipet terveztek meg úgy, hogy hosszú távú folyadékáramlásnak tették ki a CACO-2 sejttényeztetet. A mikrofluid-chip jellemzése megmutatta, hogy a porózus teflon membrán funkcionalitása (a felső és az alsó folyadékrétegek között) tiol-énes keverékkel történő kezeléssel majd ECM bevonattal

megváltoztatható [5]. Az ECM bevonatot [6] elektrokémiai megmunkálással készítették el.

A teflon membrán két keményített tiol-én réteggel való összekapcsolása egy folyadék rendszerben egy mikrochip kialakulását eredményezi, amely hosszú időn át tartó sejt kultúrát tud biztosítani. Az ebben tenyésztett CACO-2 sejtek növekedése és differenciálódása folyamatos áramlási körülmények között felgyorsult. A CACO-2 sejtrétegei szoros réteget képeztek, a P-gp transzporterekhez és a nyálkahártyához hasonló, hatékonyan utánozva ezzel az emberi bélrendszert, és jó hatóanyag-átjutás modellként szolgáltak [5].

Bátran állítható, hogy ez a sejtvonal olyan tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek megfelelő *in vitro* modellrendszeré teszik. Egy másik kutatásban egy mikroporózus membránon termesztett CACO-2 sejtréteg morfológiai jellemzését és a rétegek permeabilitásának jellemzését végezték el. A membrán egy 0.3  $\mu\text{m}$  pórusméretű polikarbonát membrán volt. A sejtenyészet növekedését időben követték és bizonyos időközönként, a 3. és a 10. nap után permeabilitás vizsgálatot csináltak, majd az eredményt összehasonlították az eredeti sejt nélküli membránnal. A legnagyobb értéket a sejt nélküli membránon mérték, majd pedig a 3. és 10. napon vizsgált membrán következett ebben a csökkenő sorrendben, a monoréteg integritásának változásával [7].

Különböző morfológiai vizsgálatokon kívül ezzel is bizonyították, hogy az idő elteltével ezek a sejtek, bizonyos megfelelő körülmények között, egyre nagyobb multiréteget hoznak létre. Az egyre vastagabb réteg pedig rontja a membránon keresztüli sikeres penetráció valószínűségét [7].

#### **2.4.2. PAMPA**

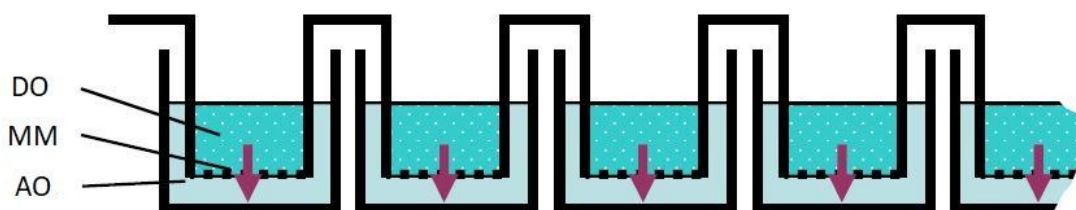
A gyógyszerkutatás részeként, a belső szervi permeabilitás meghatározása kulcsfontosságú paraméter. Számos *in vitro* sejt- vagy szövetalapú rendszer áll rendelkezésre ahhoz, hogy megismerjük egy vegyület permeabilitását, de ezeket nem nagy áteresztőképességre tervezték [8]. Az új ígéretes vegyületek nagy száma jelentősen megnehezíti a vizsgálatokat a gyógyszerkutatásban. A párhuzamos mesterséges membrán permeabilitás vizsgálat (PAMPA) nagy áteresztőképességű, gyors és olcsó módja a vegyületek passzív transzport tulajdonságainak előrejelzésére [8].

Az eljárás alapja két 96 lyukú mikrotiterlemez szendvics, amelyek egymáshoz illeszkednek, és a felső rész alsó részén kb. 0.45  $\mu\text{m}$  pórusméretű PVDF szűrőt tartalmaznak. Mesterséges membránt alakítunk ki a szűrőn. A megfelelő inkubációs idő után a PAMPA szendvics lemezét leválasztjuk, és a vegyület koncentrációját az akceptor és donor fázisban megfelelő analitikai módszerrel határozzuk meg. A vegyületek áteresztőképességét kiszámíthatjuk ezekből a koncentrációértékekből. A permeabilitási mérések eredményeit több kísérleti paraméterrel végzik, mint a lipidmembrán összetétele, a felszabadult vízréteg (UWL) jelenléte, a donor és az akceptor fázisok közötti pH-különbségek, valamint az oldat összetétele a membrán mindkét oldalán [3,8].

A PAMPA előnyei:

- sejtmentes vizsgálati módszer
- A passzív transzporttal szállított vegyületek esetében jó előrejelzést ad
- A PAMPA vizsgálathoz csak néhány milligramm vegyület szükséges
- A nem sejt alapú vizsgálat kevésbé idő és munkaigényes a CACO-2 vizsgálatokhoz képest, ezért nagyobb számú vegyület esetében ajánlott
- Egy kifinomultabb PAMPA modell alkalmazható a pH adott vegyület permeabilitására gyakorolt hatásának tanulmányozására [8].

A 3. ábrán látható a PAMPA mérési elrendezés elvi vázlata, egy 96-lyukas lemez ("plate"), mely két hasonló lemez egymásra helyezésével lehetővé teszi az apró „cellákban” való párhuzamos mérést. A donor oldat (DO) tartalmazza a vizsgálandó hatóanyag tömény koncentrációjú oldatát, melyen a membránszűrőre (MM) felvitt lipid rétegen keresztüli penetráció mértékét az akceptor oldat (AO) folyamatos vizsgálatával, a koncentráció folyamatos időközbeni meghatározásával adhatjuk meg [8].



3.ábra: A PAMPA mérési elrendezés elvi vázlata [8]

Egy hatékony gyógyszer kifejlesztésében a biológiai aktivitás meghatározó tényező. A felszívódás sebessége, az oldhatóság vagy a biológiai lebomlás is hasonlóan fontos paraméterek. Ezeknek a tulajdonságoknak az optimalizálása gyakran csak a fejlesztés utolsó szakaszában történik meg [9].

A passzív transzport folyamatok leírására, Kansy és két munkatársa a PAMPA módszert választotta, és a gasztrointesztinális felszívódás előrejelzésére dolgozták ki ezt az eljárást [9]. Egy 96-lyukú tálcát töltöttek fel 6,5 és 7,4 pH-jú foszfát pufferekkel. Ez volt az akceptor oldat, melyre ráhelyeztek egy másik tálcát, hasonlóan a 3. ábrán látható elrendezéshez. A szűrőre szerves oldószerben (pl: n-hexadekán vagy n-dodekán) feloldott lecitint vittek fel, mellyel a biológiai membránt próbálták modellezni [8,9,10].

Ugyanazzal a pufferrel töltötték fel a donor oldalt is, mely a vizsgálandó hatóanyagot is tartalmazta. Ezek után a mindkét oldatban kialakult koncentrációt spektrofotométeres módszerrel határozták meg. A koncentráció értékekből, a membrán jellemzőkből és a mérési időből számolt permeabilitást összevetették a humán intesztinális felszívódási (HIA%) adatokkal. Azt figyelték meg, hogy a rendelkezésre álló mérési elrendezéssel és az alkalmazott paraméterek felhasználásával jól közelíthetőek-e az *in vitro* értékek [8,9,10].

A transzdermális terápiás rendszerek kifejlesztése során hamarosan és egyértelműen nyilvánvalóvá váltak azok az előnyök, melyek közül az egyik legfontosabb a hosszú és szabályozott hatóanyag-leadás. A lehetséges előnyök mellett a bőr elsődleges (védő) funkciójából származó nehézségek szintén ismertek. A kutatás hatékonysága erősen függ attól a módszertől, amely a molekulák bőrön keresztül történő felszívódását modellezi a lehető legkorábbi fejlesztési szakaszban. Ezáltal a kedvezőtlen jellemzőkkel rendelkező molekulák kizárhatóak. A bőr PAMPA fejlesztése óriási lépést jelentett ezen a területen, mivel lehetőséget biztosított arra, hogy gyorsan, hatékonyan és költséghatékonyan kivizsgálja a bőr és a transzdermális termékek különböző formáit [3, 11, 12].

## **2.5. Hatóanyag felszabadulás**

A gyógyszerek hatóanyagának feladata, hogy eljussanak a sejtcsoportokba, sejtekbe ahol kifejthetik a hatásukat. A célhelyre történő bejutáshoz sok membránon kell átjutniuk. Ezeknek a membránoknak a szerkezete és felépítése nagyon hasonló egymáshoz, azonban

az alkotó anyagok aránya eltérhet. Mivel az emlősökben található membránok szerkezete nagyon hasonló, lehetőség nyílik állatkísérletek elvégzésével vizsgálni, hogy az adott hatóanyag mennyire fejt ki hatását. Ugyan ezzel megjósolható az emberi szervezetre való alkalmazhatósága is, a minőségre és mennyiségre való eltérő érzékenység ezt jelentősen korlátozza [13].

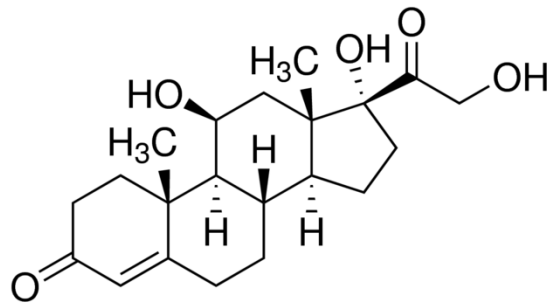
A napjainkban alkalmazott terápiás gyógyszereket a modern biotechnológia eredményeinek köszönhetjük és négy fő típusát különböztetjük meg [13]:

- kis molekulatömegű gyógyszerhatóanyagok,
- biologikumok (többnyire polipeptidek, fehérjék),
- vakcinák,
- diagnosztikumok.

Az egyre fokozottabb biztonságra törekvés újabb és újabb fejlesztési lépcsők, farmakológiai és toxikológiai vizsgálatok beiktatását igényli a kis molekulatömegű hatóanyagok kutatásában. Ilyen intézkedések akkor szükségesek, ha a hatóanyag biokompatibilitására irányuló kísérletek nem voltak elég alaposak, és egy esetleges súlyosan káros mellékhatás csak a már forgalomba került gyógyszerkészítménynél jelentkezik a fogyasztók körében [13].

## 2.6. Hatóanyagok

Az egyik általam használt hatóanyag a hidrokortizon volt. Gyulladásos bélbetegség (IBD) kezelésében gyakran alkalmazzák ezt a kortikoszteroidot és a meszazint [14]. A farmakológiai kezelés az IBD súlyosságától, típusától és a kezelés általános céljától függ. A kortikoszteroidokat, köztük a hidrokortizont is gyulladáscsökkentő hatása miatt használják, a Crohn-betegség és egyéb bélbetegégek kezelésére. Ezek a kortikoszteroidok beadhatók intravénásán, orálisan szabályozott felszabadulású tablettákkal azonban csak kisebb dózisok alkalmazhatók rövidebb ideig [14]. A hidrokortizon fotometriás vizsgálata során az anyagra jellemző hullámhossz  $\lambda = 254 \text{ nm}$  volt [14]. Ez eltér az általunk mért értéktől ( $\lambda = 248 \text{ nm}$ ), valószínűleg azért, mert a cikkben 70 % (v/v) etanol volt az oldószer, a mi esetünkben pedig kétszer desztillált víz. A hidrokortizon szerkezeti képlete a 4. ábrán látható.



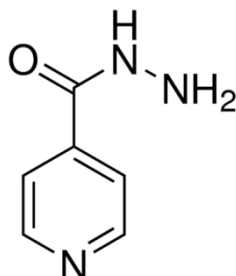
4. ábra: A hidrokortizon szerkezeti képlete [15]

Esther T. L. Lau és munkatársai hidrokortizon és meszsalazin hatóanyagok kapszulázási hatékonyságát vizsgálták zein mirkorészecskébe ún. koacerválással [14]. A koacerváció egy olyan fázisszeparációs jelenség, mely egy hidrokolloid oldhatóságának csökkenésekor lép fel. Az eljárás alkalmas héjképzésre, pl: vizes fázisból olajcseppek felületére. A létrejött héjszerkezet porózus volta miatt inkább lassú hatóanyag-leadást biztosító rendszereknél alkalmazott [16]. A kapszulázási hatékonyság meghatározása során arra jutottak, hogy ugyan mindkét hatóanyag viszonylag jól alkalmazható erre a célra, az emésztési folyamatok befolyásolnák vagy meg is akadályoznák a hatóanyag célzott helyen való leadását [14].

A másik általam választott hatóanyag az izoniazid volt. A TBC, más néven tüdőtuberkulózis hatalmas egészségügyi kockázatot jelent szerte a világon még napjainkban is. A betegség kezelésére legelterjedtebben használt gyógyszer az izoniazid (INH, izonikotinil-hidrazin), gyorsan felszívódik a gasztrointesztinális traktusból. Soha nem használatos önmagában az aktív tuberkulózis kezelésére, mert a szervezet gyorsan rezisztensé válik a hatóanyaggal szemben [17]. Továbbá mérgező hatása is lehet a különböző enzimek hatására bekövetkező metabolizmus során. A biotranszformáció hidrolízist és glicinnel való konjugációt eredményez, amely a méregtelenítés reakciója. Az oxidációs reakciók felelősek az INH toxicitásért [18, 19].

Az izoniazid a mycobacterium kataláz (peroxidáz) enzim KatG hatásával aktiválódik. Olyan kovalens komplexet hoz létre, amely megakadályozza a micelláris sav szintézisét és megöli a sejtet. Az INH elleni rezisztencia olyan mutációk következménye, amelyek a NADH-függő akut transzporter reduktázt kódoló inhA túlzott expresszióját eredményezik [19].

A toxikus mellékhatások leküzdése érdekében a kezelés során a betegek piridoxint kapnak az INH mellé. A piridoxin a B6-vitamin egyik alkotó vegyülete, mely segít a nátrium és a kálium egyensúlyozásában, valamint a vörösvérsejt-termelés elősegítésében [17]. Az izoniazid szerkezeti képlete az 5. ábrán látható.



5. ábra: Az izoniazid szerkezeti képlete [15].

Indiai kutatók [17] az izoniazid és a piridoxin tablettázási dózis adagjának UV-spektrofotometriás becsléséhez alkottak meg egy módszert. A spektrumon 263 nm (izoniazid) és 292 nm (piridoxin) hullámhosszon, jól elváló csúcsokon detektálták a hatóanyagokat desztillált vízben, 1-11 µg /ml és 5-30 µg /ml koncentráció tartományban. Ezzel az eljárással analizálták az 300 mg Isoniazidot és a 10 mg piridoxint tartalmazó, forgalomba hozott tabletták formuláját. Ennek a módszernek a legszembetűnőbb tulajdonsága az egyszerűség, a gazdaságosság és a gyorsaság, és nem igényel olyan előkészítést, mint például az oldószerek kivonása, a fűtés, a gáztalanítás, amelyek szükségesek a HPLC eljáráshoz. Ezek olyan új módszerek melyek a minőségellenőrzésben rutinelemzésre alkalmazhatók [17, 18].

Az 1. táblázatban láthatók a hatóanyagok log P és vízdoldhatósági értéke. Látható, hogy az izoniazid sokkal jobban oldódik vízben, kevésbé hidrofób, mint a hidrokortizon. A mérési eredményeim kiértékelése során ezt is figyelembe vettem.

	<b>Hidrokortizon [14]</b>	<b>Isoniazid [20]</b>
<b>Log P</b>	1.61	-0.7
<b>Vízdoldhatóság (mg/ml)</b>	0.311	34.9

1. táblázat: A hidrokortizon és az izoniazid log P és vízdoldhatóság értékei



Munkámban a szűrőmembrán és a sejtmodell kombinálásával akartunk egy olyan rendszert előállítani, amely ötvözi ezek előnyeit és a hatóanyag transzport tanulmányozását teszi lehetővé. Az általunk elképzelt mérőcella formájában a gyógyszer felszabadulás mérésére használt eszközt követi, a transzportot lehetővé tevő rész pedig a PAMPA rendszerben használt membránra hasonlít. Ugyanakkor ettől el is tér annyiban, hogy olyan rendszert szeretünk volna, amely a vizuális észlelésre is lehetőséget nyújt.

## 2.7. Permeációs vizsgálatok

A következőkben olyan metódusokat fogok ismertetni, melyek újabb fizikai-kémiai paraméterek beiktatásával próbálnak meg pontosabb leírást adni a membrántranszport kinetikájáról. Olyan, minden változót figyelembe vevő egyenletre volt szükség, melyben a donor és akceptor oldali koncentrációk, térfogatok, a membrán jellemzők, és többek között az idő is megjelenik. Ezek az egyenletek szolgáltak a méréseim során használt membrán-kinetikai összefüggések alapjául.

Programozható, szabályozott hatóanyag-leadó rendszert próbáltak már sokan fejleszteni. Farouk M. Sakr (1999) [21] egy olyan prototípus modellt készített, melynek henger alakú formája egy speciális, korrózióálló, nagy sűrűségű polimerből készült. A modelltől származó *in vitro*, hosszú távú hatóanyag-leadást hidroxipropil-metilcellulóz (HPMC) tablettában lévő levonorgesztrell hatóanyaggal vizsgálták HPLC készülék segítségével [21].

Napjainkban a szabályozott hatóanyag-leadású orális dózisformák (ozmotikus tabletták, bevonatos tabletták, biodegradábilis polimer mátrixok stb.) leadásnak és felszívódásának modellezésére számos alternatíva létezik. A passzív orális dózisformák vizsgálata esetén sok paramétert kell figyelembe venni, de különösen nehéz utánozni a bélben történő felszívódási időt [21].

Avdeef és munkatársai 23 különböző gyógyszer és termékmolekula transzport tulajdonságait vizsgálták eltávolítható mesterséges membránon keresztül egy *in vitro* modell alapján [22]. A membránt dodekánban oldott foszfatidilkolinnal készítették, pufferoldatokban (pH=7,4). A szerzők sok vegyületre nagyon alaposan megvizsgálták, hogy milyen hatása van a paraméterek (idő, keverés, analitika) nem túl nagymértékű

megváltoztatásának. Érdekes módon, a nagy logP érték ellenére a vízdékonyság hatását a permeabilitásra kizáró oknak tartják [22].

A vegyületek közül volt olyan, amelynek mennyiségét 60 %-ban visszatartotta a foszfolipideket tartalmazó membrán. A keverés a mozgékony molekulákra pozitív, míg a nem mozgékony molekulákra negatív hatással volt a membránpermeabilitás szempontjából. A hidrogénkötés hatását a foszfolipidektől mentes dodekánnal bevont szűrők alkalmazásával vizsgálták, a koncentrációkat pedig UV-spektrofotometriával és LC-MS-sel határozták meg [22].

A következő egyenleteket használják a permeabilitás számolására. A Fick I-II. egyenletekből vezethetőek le, melynek homogén membránokra alkalmazott alakja a következő:

$$J = D_m \frac{dC_m}{dx} = D_m \frac{[C_m(0) - C_m(h)]}{h} \quad (1)$$

ahol  $J$  az áramsűrűség,  $C_m(0)$  és  $C_m(h)$  a koncentrációk a membrán két oldalán,  $h$  a membrán vastagsága és  $D_m$  az oldott anyag diffúziós együtthatója a membránban. Ennek átrendezésével, a kísérleti kialakítás és a konkrét feltételezések függvényében levezethető egy effektív permeabilitás ( $P_e$ ):

$$P_e = \frac{V_D}{(AM_D(0))\left(\frac{\Delta M_A}{\Delta t}\right)} \quad (2)$$

ahol  $V_D$  a donor oldat térfogata,  $A$  a szűrő felülete,  $M_D(0)$  a donor oldat kiindulási koncentrációja,  $\Delta M_A$  az akceptor oldat koncentráció adott időben és  $\Delta t$  pedig az eltelt idő. Az effektív permeabilitás ismeretében pedig az akceptor oldat pontos koncentrációja kiszámolható a következő egyenlet alapján:

$$C_A(t) = \frac{M}{(V_D + V_A)} + \left( C_A(0) - \frac{M}{(V_D + V_A)} \right) \exp\left\{ -P_e \times A \left( \frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A} \right) t \right\} \quad (3)$$

ahol  $M$  a hatóanyag teljes koncentrációja a rendszerben,  $C_A(t)$  a hatóanyag koncentráció az akceptor oldatban,  $V_A$  pedig az akceptor oldat térfogata [22]. Több, PAMPA mérésekhez kifejlesztett elő-kezelt "plate" rendszerhez található [23, 24] egy ezekből az

egyenletekből kikövetkeztetett összefüggés, mely pontosan megadja a permeabilitás ( $P$ ) értéket több paraméter figyelembevételével. Az egyenlet a következő:

$$P = \frac{-\ln\left(\frac{1-c_A(t)}{c_{eq}}\right)}{A \times \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) \times t} \quad (4)$$

ahol  $c_A(t)$  az akceptor oldat koncentrációja adott időben,  $c_{eq}$  az egyensúlyi koncentráció,  $A$  a szűrő felülete,  $V_D$  a donor oldat térfogata,  $V_A$  akceptor oldat térfogata, és  $t$  pedig az eltelt idő. Az egyensúlyi koncentráció ( $c_{eq}$ ) pedig a következő egyenlettel számolható:

$$c_{eq} = \frac{[c_D(t) \times V_D + c_A(t) \times V_A]}{(V_D + V_A)} \quad (5)$$

ahol  $c_D(t)$  a donor oldat koncentráció adott időben és  $V_D$  a donor oldat térfogata [23, 24]. A számításaim során a 4-es és 5-ös egyenletet használtam a permeabilitás meghatározásához.

### **3. Célkitűzés**

Munkám során egy olyan membránmodell kifejlesztésére tettem kísérletet, melyben egy mesterségesen kialakított lipid kettősrétegben lejátszódó, jól definiálható gyógyszertranszport jellemzése volt a cél. A transzportfolyamatok leírását és meghatározását célzó méréseket egy külön erre a célra tervezett, folyadék transzport vizsgálatára szolgáló, szétszedhető mérőcellával végeztem.

Indikátorok és gyógyszerhatóanyagok koncentrációváltozását vizsgáltam 8 és 24 órás mérések keretében, ahol a mérőcellában két folyadék fázis között, egy pórusos szerkezetű membránszűrőre felvitt lipid réteg szolgáltatta a membránmodellt. A lipid réteg kémiai összetétele szabadon választható, alkalmazkodva bizonyos sejttípusokra jellemző lipid összetételhez. A membránhordozó megfelelő stabilitást biztosít a lipid filmnek, ugyanakkor lehetővé teszi a transzportfolyamatokat. A lipid rétegen át történő transzportvizsgálaton kívül arra is kíváncsi voltam, milyen morfológiai változás következik be a lipidfilmben. A kísérleti eszközzel az első transzportvizsgálatokat próbaként fluoreszkáló vegyületek, majd ismert hatóanyagok és DPPC lipid felhasználásával végeztem.

Az irodalomban talált modellek szinte mindegyike kis koncentrációkra vonatkoztatva ad tájékoztatást a rendszerben történő transzportfolyamatokra. A méréseim során nagyobb koncentrációk esetén történő transzportfolyamatok leírására tettem kísérletet egy erre célra kifejlesztett mérési elrendezéssel.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált anyagok és eszközök

#### 4.1.1. A folyadéktranszport vizsgálatához felhasznált anyagok

- 1,2-dipalmitoil - foszfatidilkolin (DPPC), félszintetikus,  $\geq 99\%$ ,  
M= 734.04 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Fluorescein, M = 332,31 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Fluorescein (szabad sav), M = 332,31 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Fluorescein Na-sója, M = 376,27 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Hidrokortizon, M = 362,46 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Isoniazid (INH), M = 137,14 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Aminoszalicilsav (PAS), M = 153,14 g/mol, Sigma -Aldrich, Németország
- Etanol, 96 %, Merck Kft., Magyarország
- Aceton,  $\geq 99.8$  %, Merck Kft., Magyarország
- Tetrahydrofuran (THF), analitikai tisztaságú, Merck Kft., Magyarország
- Metanol, analitikai tisztaságú, Merck Kft., Magyarország
- Dimetil-szulfoxid (DMSO), analitikai tisztaságú, Merck Kft., Magyarország
- Diklórmétán,  $>99.8$  % tisztaságú, Sigma -Aldrich, Németország
- Dinátrium-foszfát, 99,95 % tisztaságú, Sigma -Aldrich, Németország
- Kálium-foszfát, Sigma -Aldrich, Németország
- Kétszer desztillált víz

#### Felhasznált membránszűrők

- fecskendőszűrő membrán, polipropilén (GHP), hidrofób, d = 25mm, pórusméret:  
0.2  $\mu\text{m}$ , Acrodisc (Sigma-Aldrich), Németország
- diszk membránszűrő, polikarbonát (PCTE), hidrofil, d = 25 mm, pórusméret: 0,4  
 $\mu\text{m}$ , VWR, Egyesült Államok

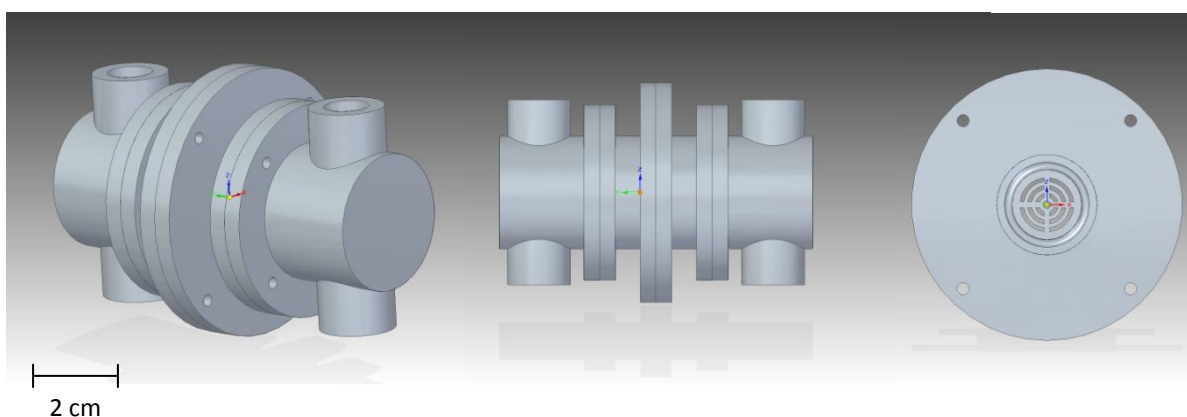
#### 4.1.2. A kísérleti munka során alkalmazott egyéb anyagok

A használt üvegeszközök tisztítását hidrogén-peroxid és tömény kénsav frissen elkészített elegyével (1:2) végeztem.

- Hidrogén-peroxid (30%), analitikai tisztaságú, Molar Chemicals Kft., Magyarország
- Kénsav (96%), analitikai tisztaságú, Merck Kft., Magyarország

#### 4.1.3. Folyadék transzport vizsgálatára szolgáló, szétszedhető mérőcella

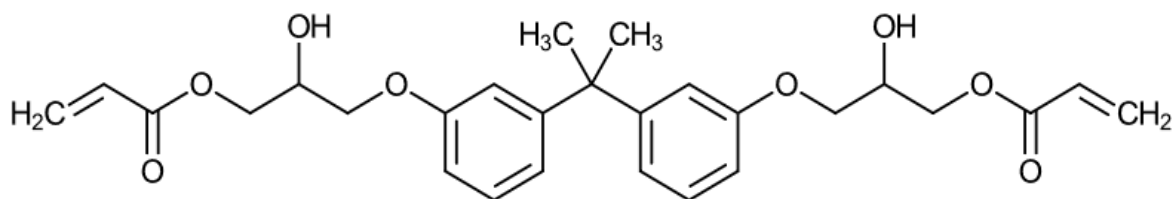
A transzportvizsgálatokhoz használt eszközt egy 3D nyomtatással foglalkozó cég készítette el saját tervünk alapján a Határfelületi- és Nanoszerkezetek laboratórium részére (6. ábra). A tervezés folyamatában fontos szempont volt a korrózióállóság mellett a teljes vagy részleges fényáteresztés, valamint a szétszerelhetőség egyszerűsége (a későbbiekben részletezett membránszűrő cserélhetősége miatt).



6.ábra: Folyadék transzport vizsgálatára szolgáló szétszedhető mérőcella modellje

Az eszköz hőre keményedő, UV reagens fotopolimer gyantából készült, 3D nyomtatásos SLA (Stereolitography) technológiával [25, 26]. A modellt egy szoftver a nyomtató készülék számára értelmezhető rétegekre bontja, amely 0,025 és 0,1 mm között megválasztható. A folyamat során a viszkózus gyantából UV bevilágítás hatására megszilárdul a réteg, majd elmozdul a tálca a kiválasztott távolsággal, és egy újabb réteg szilárdul meg. Így épül fel a kívánt szerkezet, melynek alátámasztásához egy ún. „support” anyagot használnak. Ez a támaszték anyag egy eltérő fotopolimerből készül, így később szerves oldószerrel, amely általában izopropil alkohol, maradéktalanul eltávolítható.

Végül UV kemencében utókezelésnek vetik alá a kész darabot, mely során elérhető a kívánt szilárdság, illetve a maradványok eltávolítása és a felületek, élek simítása is megtörténik. Az eljárás előnye, hogy gyors, az egész réteg egyszerre kerül levilágításra, széles az alapanyag választék, és jó felületi minőség érhető el. Azonban hátránya, hogy a legtöbb műgyanta is széttöredezik tartós direkt napfény hatására [25, 26]. A nyomtatáshoz felhasznált műgyanta kémiai szerkezete a 7. ábrán látható.



7. ábra: A nyomtatáshoz használt műgyanta kémiai szerkezete [25, 26]

A cella anyagából való kioldódás vizsgálata során meggyőződünk arról, hogy ugyan oldódik ki anyag a cellából, de a kioldódás mértéke folyamatosan csökken. A cella minden mérés után egy teljes éjszakán át - ami 15-16 órát jelent - ázott vízben, így ezalatt az idő alatt az adszorbeálódott anyagok távozni tudtak az anyagból, így az regenerálódni tudott.

## 4.2. Kísérleti módszerek

### 4.2.1. Koncentráció meghatározása

Minden mérés során egy donor oldatot készítettem, melyet egy adott koncentrációra állítottam be. Rendszerint ez az érték minden esetben jóval a modell- vagy hatóanyag oldhatósága fölötti érték volt. A donor cellarészben kétszer desztillált vizet (20 ml) vagy annak 20 %-os etanol tartalmú oldatát (16 ml víz + 4 ml EtOH) használtam oldószerként. Egyes esetekben az etanolos oldat 4x-es hígítású oldatát is alkalmaztam. Ezek után az akceptor cellarészt tiszta, kétszer desztillált vízzel (20 ml) töltöttem fel. A későbbiekben az akceptor oldatból 8, illetve 24 órán keresztül vettem mintákat a következő időközönként:

- Az első órában 15 percenként: a 15., a 30., a 45., és a 60. percben
- Az első és negyedik óra között: a 90., a 120., a 150., a 180., a 210., és a 240. percben
- A negyedik és a nyolcadik óra között; a 300., a 360., a 420. és a 480. percben
- Esetenként a 24. órában is vettem mintát

Az akceptor oldatból rendszeresen kivett 1 ml minta abszorbanciáját egy spektrofotométerrel mértem meg. A kivett minta helyett 1 ml kétszeresen desztillált vizet töltöttem vissza. Az aktuális hatóanyag különböző koncentrációjú vizes oldataiból készítettem hígítási sort, majd pedig kalibrációs görbét.

A kalibrációs görbe segítségével az egyenes egyenlete alapján, a minták mért abszorbancia értékeit számoltam át koncentrációvá. Az egész rendszer, mind a donor, mind pedig az akceptor oldat a teljes mérés alatt folyamatos kevertetés alatt volt keverőbábák és mágneses keverő által, így biztosítva a homogén koncentráció eloszlást.

### 4.2.2. Permeabilitás meghatározása

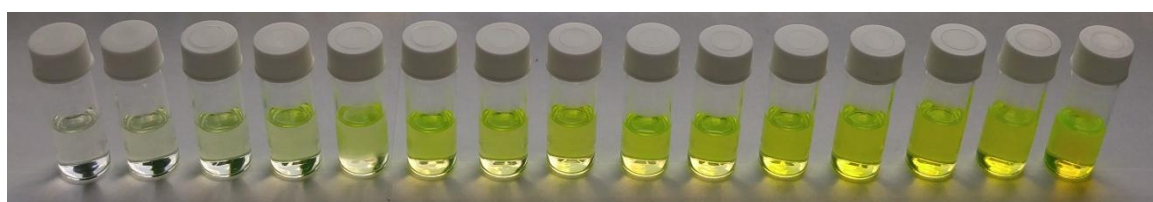
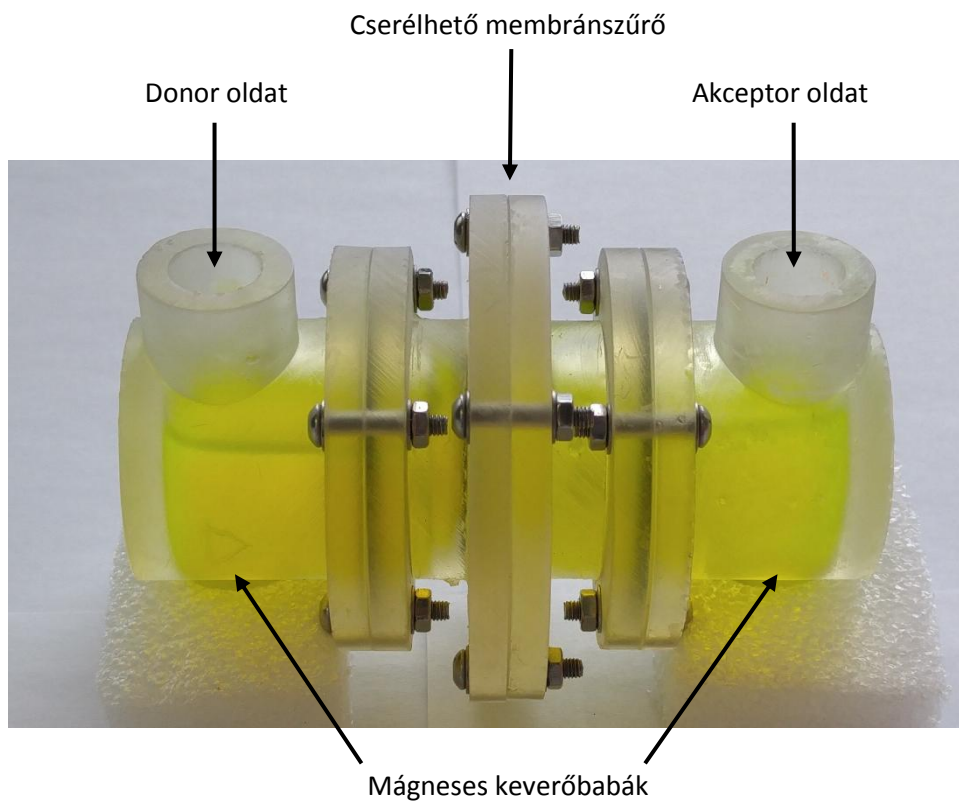
A transzportfolyamatok és a membrán permeabilitás vizsgálatára különböző koncentrációjú (3 g/l és 5 g/l) metanolos 1,2-dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC) lipid oldatokat készítettem, majd vittem fel egy hordozó membránszűrőre.



A lipid oldatnak a felületre injektálása után forgótárcsás azaz "spin-coating" [27] technika alkalmazásával törekedtem a réteg minél egyenletesebb eloszlására. Ezt úgy végeztem, hogy egy megfelelően acetonnal, etanollal és vízzel letisztított üveglapot ragasztottam a tárcsára. Az üveglapra egy 40 µl-es vízcseppet tettem, majd óvatosan ráhelyeztem a membránszűrőt. Bekapcsoltam a készüléket, majd megvártam ameddig egy pár másodpercen keresztül a víz szétterül a membrán és az üveglap között, így biztosítva, hogy az ne mozduljon el. Ezután egy kloroformmal és metanollal elmosott fecskendővel 50 µl lipid tartalmú oldatot injektáltam a felületre, majd bekapcsoltam a készüléket 3 másodpercre. Miután szétterült a lipid a felületen, levettem a membránt a tárcsáról és betettem a készülékben kialakított helyére, majd feltöltve a donor és az akceptor oldalt a megfelelő folyadékokkal, elkezdtem a mérést. A lipid oldat koncentrációja kezdetben 3 g/l volt, de a későbbiekben egy töményebb 5 g/l-es oldatot használtam, mely egyenletesebb eloszlást eredményezett. Ennek fontosságát a dolgozatom eredmények részében szeretném bővebben kifejteni.

Az első tesztméréseknél melyeket fluoreszcein vegyületekkel végeztem, egy hidrofób, 25mm átmérőjű, 0.2 µm pórusméretű polipropilén (GHP) fecskendő szűrőmembránja volt a hordozó. Ezeket a méréseket a mérőcella kipróbálására és a paraméterek, valamint a mérési elrendezés optimalizálására való tekintettel, lipid réteg felvitele nélkül csináltam meg. A valódi transzportvizsgálat méréseket egy hidrofil, 25mm átmérőjű, 0.4 µm pórusméretű polikarbonát (PCTE) diszk membránszűrővel végeztem. Azért esett erre a membránra a választás, mert ennek a membránnak egy számomra fontos tulajdonsága volt. Ez pedig az, hogy egy különleges lézeres maratásos "track-etched" [28] eljárással készült. Ennek az előállítási módszernek köszönhetően a felülete sima, így a morfológiai változások jól nyomon követhetők az ilyen membránokon.

A "track-etched" [28] membrán azért fontos számunkra, mert a cella tervezése lehetővé teszi, hogy a membrán kivehető, cserélhető majd vizsgálható legyen. Ennek következtében annak felületi morfológiáját mikroszkópi méréseknek vethetjük alá, így fontos információval szolgálhat a hordozón lévő lipid réteg szerkezetéről és elhelyezkedéséről. A 8. ábrán a folyadék transzport vizsgálatára szolgáló szétszedhető mérőcella képe, a mérési elrendezés illetve egy 24 órás mérés során vett minták sorozata látható.



8.ábra: A szétszedhető mérőcella, illetve egy 24 órás mérés mintáiból összeállított sorozat képe

A 8. ábrán egy vizes mérés látható a fluoreszcein nátrium só oldatával, 24 óra elteltével. Jól látható, hogy a donor oldat és a 0. órán még színtelen akceptor oldat alig megkülönböztethető szinte ugyanolyan lett 24 óra elteltével. Az időnként vett minták színe a fluoreszcein nátrium-só koncentráció függvényében folyamatosan növekszik (balról jobbra haladva).

#### 4.2.3. Spektrofotometria

A hatóanyag koncentrációt spektrofotometriás módszerrel határoztam meg. A méréseket egy Analytic Jena Specord 40 nevű UV-látható spektrofotométerrel végeztem.

Az alkalmazott hullámhossztartomány  $\lambda = 190\text{-}800\text{ nm}$  volt, amelyen belül mindkét vizsgált hatóanyagnak jól definiált abszorpciós csúcsa volt. Az izoniazid mennyiségi méréséhez a  $\lambda = 263\text{ nm}$ -t a hidrokortizonhoz a  $\lambda = 254\text{ nm}$  választottam.

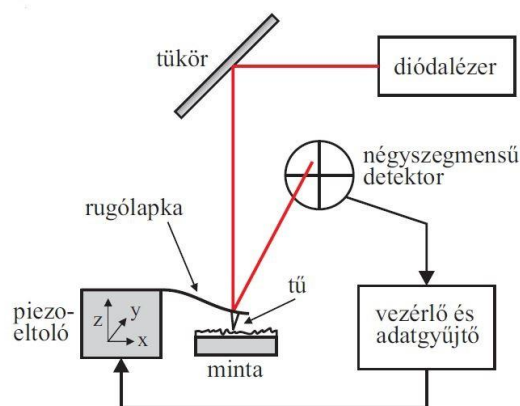
A kapott abszorbancia értékekből a Lambert-Beer törvény alapján számolható a koncentráció, a következő egyenlet alapján:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (6)$$

ahol,  $A$  az abszorbancia,  $I_0$  a monokromatikus fénynyaláb intenzitása,  $I$  a közegen áthaladt fény csökkent intenzitása,  $\varepsilon$  a moláris abszorbancia (vagy extinkciós koefficiens),  $c$  a koncentráció és  $l$  pedig a réteg vastagsága, amelyen a fény áthaladt [29].

#### 4.2.4. Felületi morfológia vizsgálata

A mérés során használt membránszűrők felületi morfológiájának vizsgálatára egy atomi erő mikroszkóp (AFM) tűnt a legmegfelelőbb választásnak. A mérések során a topográfiai adatok analízisével fontos információt kaphatunk a mintafelület érdességéről. Jelen esetben a forgó tárcsás eljárással felvitt lipid réteg ezzel ellenőrizhetővé vált. Az AFM mikroszkóp sematikus felépítése a 9. ábrán látható [30, 31, 32].

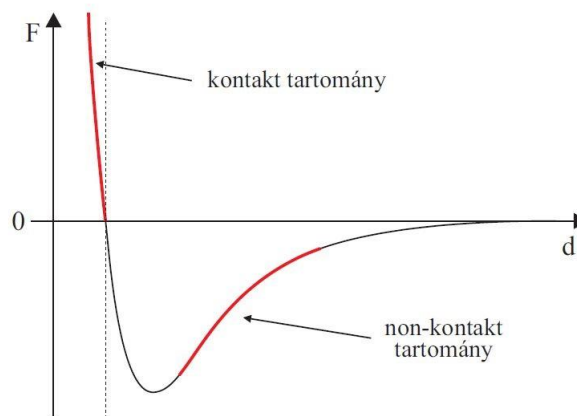


9. ábra: Az AFM sematikus ábrázolása

A kisméretű laprugóról (cantilever) egy lézerdíóddal előállított fénynyaláb verődik vissza. A reflexió növelése érdekében egy fémes bevonat van a lapka azon oldalán,

ahonnan visszaverődve a fény egy négyszegmensű detektorba jut. Az érzékelés jó jel-zaj viszonytal állítható. A lapka végén egy kis görbületi sugarú ( $\sim 10$  nm) tű van, mely egy kemény anyagból (jellemzően  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , SiC vagy WC) készül. A lapka háromirányú x-y-z finom mozgatása egy piezoelektromos kristállyal van megoldva. Az x-y irányban mozgó tű végigpásztázza a minta felületét, miközben a négyszegmensű detektor jelét és a piezo z-irányú vezérlőfeszültségét felhasználva egy olyan negatív visszacsatolást alakít ki, ami a tű hegyére ható erőt - vagyis a rugólapka elhajlását - állandó értéken tartja. Az adatsor egy x,y,z hossz-kalibráció után átszámolható a mintafelszín topográfiáját megfelelően közelítő értékekké [30, 31, 32].

A felszíni atomok potenciálterében a tűre ható erő a felszíntől mért távolság függvényében a 10. ábrán látható. A mintafelszín megközelítő tűre először egy vonzóerő kezd el hatni. Ha a tűnek ebben az állapotában kezdjük el a mérést, akkor a non-kontakt vagyis érintésmentes módban vizsgálunk. Ha a tűt közelebb visszük a felszínhez akkor az erő előjelet vált. Ezt nevezzük kontakt módnak [30, 31, 32].



10. ábra: A tűre ható erő

A kívánt üzemmód használatát a minta tulajdonságai szabják meg. Egy kemény és sima felszín vizsgálatához a kontakt mód a legmegfelelőbb. Ugyan a tű a mintához ilyenkor nagyon közel van, a sima felületen kicsi a valószínűsége, hogy a tű beleütközzön egy kiemelkedő akadályba, tönkretéve a mérést, vagy rosszabb esetben roncsolva a tűt és a laprugót. Puhább és lazább szerkezetű minták vizsgálatához a nem kontakt mód az ajánlott. A két alapvető kontakt és non-kontakt üzemmódokon kívül több üzemmód is létezik a mikroszkópon. Ilyen a tapping („kopogtató”) üzemmód, mely non-kontakt tartományban érhető el [30, 31, 32].

Nem kontakt módnál egy MicroMash NSC15-ös típusú  $\text{Si}_3\text{N}_4$  alumínium reflektáló felülettel rendelkező nem-kontakt tűt használtam (erőállandó: 40 N/m, sajátfrekvencia: 325 kHz). A minta felületét PSIA XE-100 (Park Systems, Dél-Korea) atomi erő mikroszkóp készülékkel tanulmányoztam, a felvételeket XEI 1.8.0. (Park Systems, Dél-Korea) kiértékelő programmal vizsgáltam, a mérések során a pásztázási sebesség minden esetben 1 Hz volt.

## 5. Eredmények és értékelésük

A folyadéktranszport vizsgálatát különböző típusú polimer membránok átteresztőképességének a vizsgálatával kezdtem, ahol a fluoreszcein, a fluoreszcein (szabad sav) és a fluoreszcein nátrium-sója volt a modellanyag. Későbbi mérések során a hidrokortizont és az izoniazidot használtam, mint gyógyszerhatóanyagot.

### 5.1. Előkísérletek

#### 5.1.1. A cella anyagának duzzadás- és oldódás vizsgálata

A nyomtatást végző cég biztosított számunkra néhány mintadarabot a leendő cella műgyanta anyagából. A minták duzzadását és oldódását különböző oldószerekben vizsgáltam meg. A második óra után a mintákat 38-40 °C-ra melegítettem. Többnyire szerves oldószereket használtam fel, tisztán és különböző hígítási arányban, illetve egy savas (HCl, pH=2), egy lúgos (NaOH, pH=11) és egy semleges vizes puffer oldatot (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Adott idejű áztatást követően a felesleges oldószert letöröltem, illetve hagytam elpárologni. Az 1, 17 és 21 óra elteltével kapott tömegváltozások a 2. és a 3. táblázatokban találhatóak.

	Aceton	DMSO	DMSO (10% + víz)	EtOH	MeOH
Minta tömege	0,8121 g	0,6521 g	0,5723 g	0,8643 g	0,5421 g
A tömeg 1 óra után	0,8235	0,6955 g	0,5785 g	0,8850g	0,5650 g
A tömeg 17 óra után	(erősen oldódik)	0,7400 g	0,5921 g	0,9193 g	0,6143 g
A tömeg 21 óra után	feloldódott	0,6979 g	0,5793 g	0,9055 g	0,5719 g

2. táblázat: A cella anyagának tömegváltozása különböző folyadékokban

	THF	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	Víz + HCl (pH 2)	Víz seml. puffer (pH 7)	Víz + NaOH (pH 11)
Minta tömege	0,5911 g	0,5123 g	0,4519 g	0,5320 g	0,4510 g
A tömeg 1 óra után	0,6190 g	0,1605 g	0,4492 g	0,5326 g	0,4470 g
A tömeg 17 óra után	0,4180 g (erősen oldódik)	feloldódott	0,4576 g	0,5593 g	0,4597 g
A tömeg 21 óra után	feloldódott	feloldódott	0,4530 g	0,5360 g	0,4509 g

3. táblázat: A cella anyagának tömegváltozása különböző folyadékokban

Az aceton, tetrahidrofuran és diklór-metán oldószerekben oldott minták teljesen feloldódtak. A DMSO és az alkoholok bizonyos mértékű duzzadást okoztak, míg vizes oldatokban csekély volt a változás.

Az előbbi okok miatt a további duzzadásvizsgálatot csak a maradék 7 folyadékkal folytattam (DMSO, DMSO 10%, EtOH, MeOH illetve savas, seml. és lúgos puffer). A 21 óra elteltével végzett párhuzamos mérések átlagai a 4. táblázatban láthatók.

Minta tömege	DMSO (tisztá)	DMSO (10% + víz)	EtOH	MeOH	Víz + HCl (pH 2)	Víz seml. puffer (pH 7)	Víz + NaOH (pH 11)
Kiindulási tömeg	0,6521 g	0,5723 g	0,8643 g	0,5421 g	0,4519 g	0,5320 g	0,4510 g
1.mérés	0,6979 g	0,5793 g	0,9055 g	0,5719 g	0,4530 g	0,5360 g	0,4509 g
2.mérés	0,6982 g	0,5831 g	0,9112 g	0,5765 g	0,4542 g	0,5375 g	0,4520 g
3.mérés	0,6875 g	0,5840 g	0,9085 g	0,5691 g	0,4536 g	0,5379 g	0,4516 g
Tömeg átlag	<b>0,6945 g</b>	<b>0,5821 g</b>	<b>0,9084 g</b>	<b>0,5725 g</b>	<b>0,4536 g</b>	<b>0,5371 g</b>	<b>0,4515 g</b>
Szórás	0,00609 g	0,00249 g	0,00285 g	0,00373 g	0,0006 g	0,001 g	0,0005 g
Duzzadás	<b>7,21 %</b>	<b>1,59 %</b>	<b>5,17 %</b>	<b>5,65 %</b>	<b>0,22 %</b>	<b>0,96 %</b>	<b>0,11 %</b>
Szórás	0,063 %	0,0067 %	0,016 %	0,037 %	0,0002 %	0,002 %	0,0001 %

4. táblázat: A cella anyagának tömegszázalékra átszámolt tömegváltozása a különböző folyadékokban való 21 órás áztatás után

A szerves oldószerekben áztatott minták, 21 óra elteltével, az alkohol esetében 5 %-os, a DMSO esetében pedig 7 %-os tömegváltozást adnak feltehetően a műgyanta duzzadása miatt. Látható, hogy a duzzadás mértéke a vizes oldatoknál a legkisebb, így ez okoz legkevésbé változást a minták állapotában. Ezért a minták fotometriás vizsgálatát vizes, illetve 10 %-os EtOH oldatokban végeztem. A mérő cella anyaga 1 napos vizes áztatás után 0.32 %-os duzzadást mutatott, amelyet szintén tömeg alapján mértem.

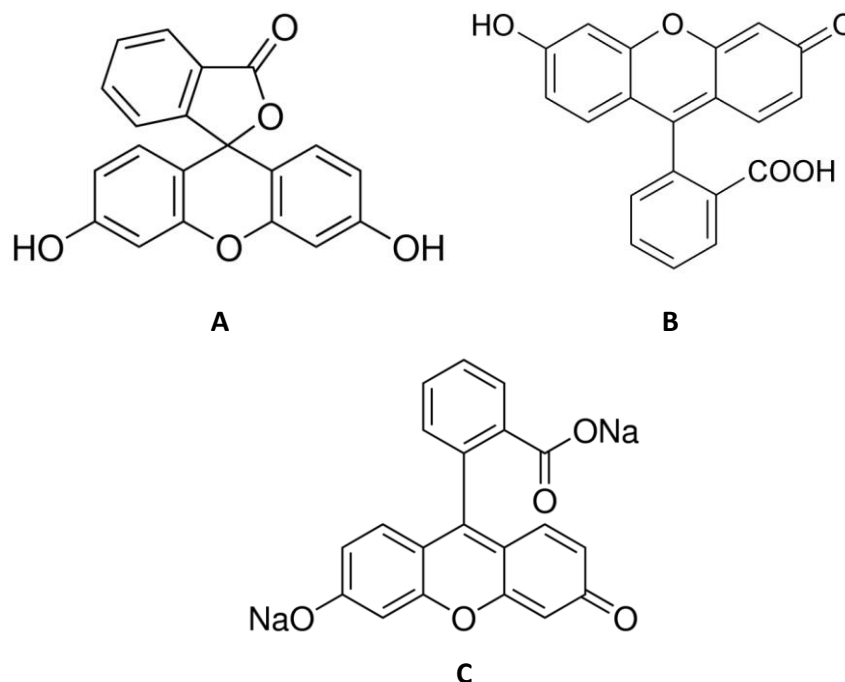
A cella illesztései közötti szigetelésben szükség volt egy rugalmas anyagú szigetelőgyűrűre, mely végül egy O-gyűrű lett. Ez a gyűrű egy EPDM gumiból készült, így megfelelt az elvárásainknak. Az O-gyűrűket is hasonlóan a cella anyagához, vizes, illetve 10 %-os etanol oldatokban áztattam. A vizsgálatok során kiderült, hogy kémiai stabilitása valóban megfelelő számunkra, hiszen nem oldódtak ki belőle jelentős mértékben anyagok, melyek befolyásolnák a transzportvizsgálatok a hatóanyag koncentráció meghatározását.



## 5.2. Kísérletek modellanyaggal

### 5.2.1. Transzportvizsgálat fluoreszcein vegyületekkel

A fluoreszceinek vizes oldatbeli koncentrációjának meghatározásához kalibrációt végeztem. A fluoreszceinből, fluoreszcein - szabad savból - és a fluoreszcein nátrium sójából különböző koncentrációjú vizes és etanosos oldatokat készítettem, és az abszorbanciáját megmértem. Az etanosos oldatokra azért volt szükség, mert a fluoreszcein és a fluoreszcein (szabad sav) anyagok oldhatósága kevésbé jó vízben, mint etanolban. A fluoreszcein nátrium-sója azonban egyaránt jól oldódik vízben és etanolban is. Az említett molekulák szerkezeti képletei a 11. ábrán láthatók.

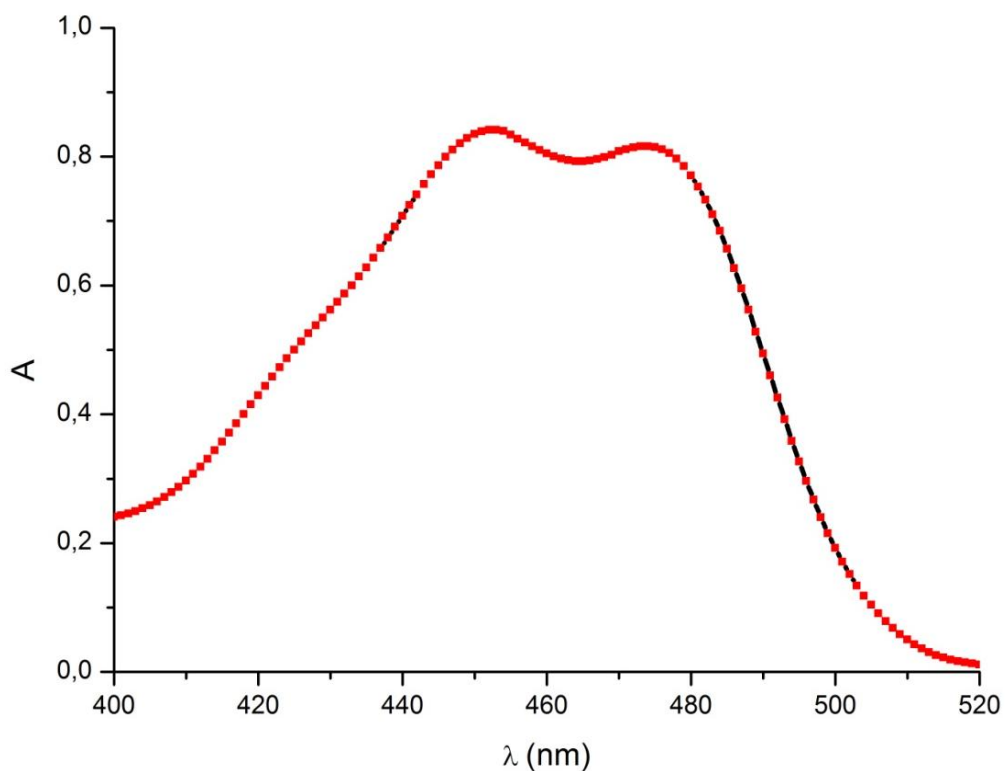


11. ábra: A fluoreszcein (A), a fluoreszcein -szabad sav- (B) és a fluoreszcein nátrium-só (C) szerkezeti képlete [16]

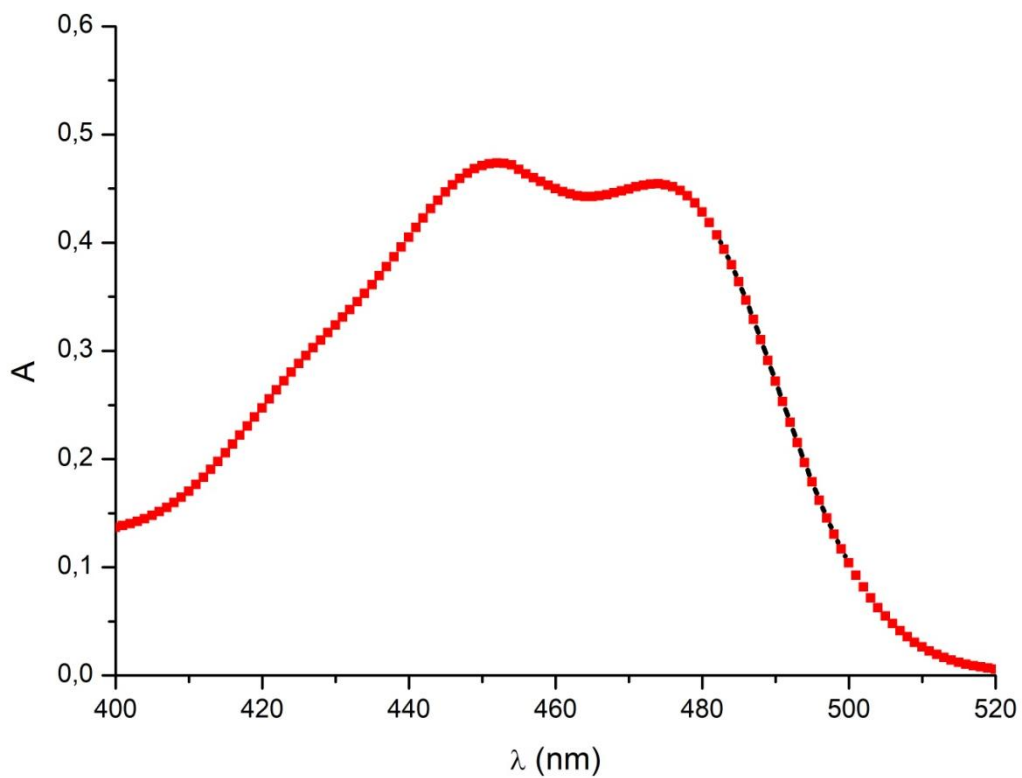
A spektrum alapján kiválasztottam a megfelelő hullámhosszakot, majd az ezeknél az értékeknél mért abszorbancia értékeket tüntettem fel az ismert koncentráció függvényében. Az anyagokra mért hullámhossz értékek a következők:

- Fluoreszcein  $\lambda = 452 \text{ nm}$
- Fluoreszcein (szabad sav)  $\lambda = 452 \text{ nm}$
- Fluoreszcein nátrium-sója  $\lambda = 483 \text{ nm}$

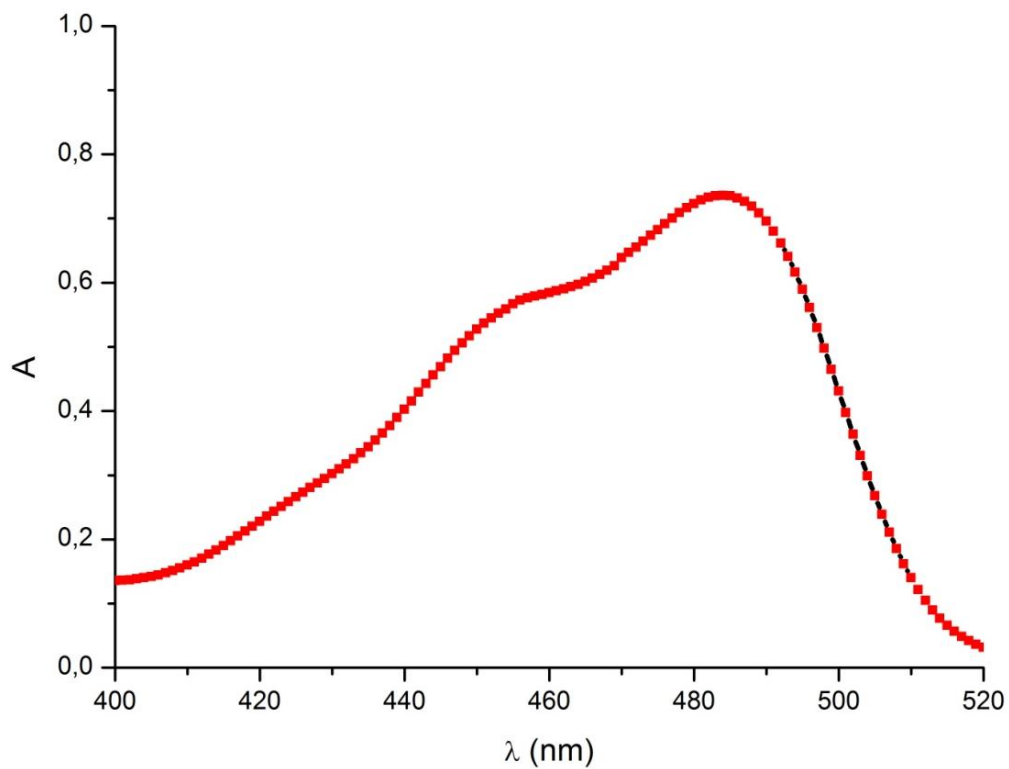
A transzportvizsgálatoknál minden esetben a donor és az akceptor oldat is 20 ml volt. A donor oldat általában kétszeresen desztillált vizes oldat volt, de egyes esetekben 16 ml kétszeresen desztillált vizet és 4 ml abszolút etanolt tartalmazott (20% etanol tartalom) az anyag vízben való korlátozott oldhatósága miatt. A donor oldatok kiindulási koncentrációja az előkísérletek végzése során minden anyag esetében 0,125 g/l volt. A 12.-15. ábrákon látható spektrumok minden esetben az anyagok 0,0125 g/l koncentrációjú oldatának abszorbanciáját mutatják a hullámhossz függvényében. A különböző anyagokra felvett kalibrációs görbék a 16.-19. ábrákon láthatók.



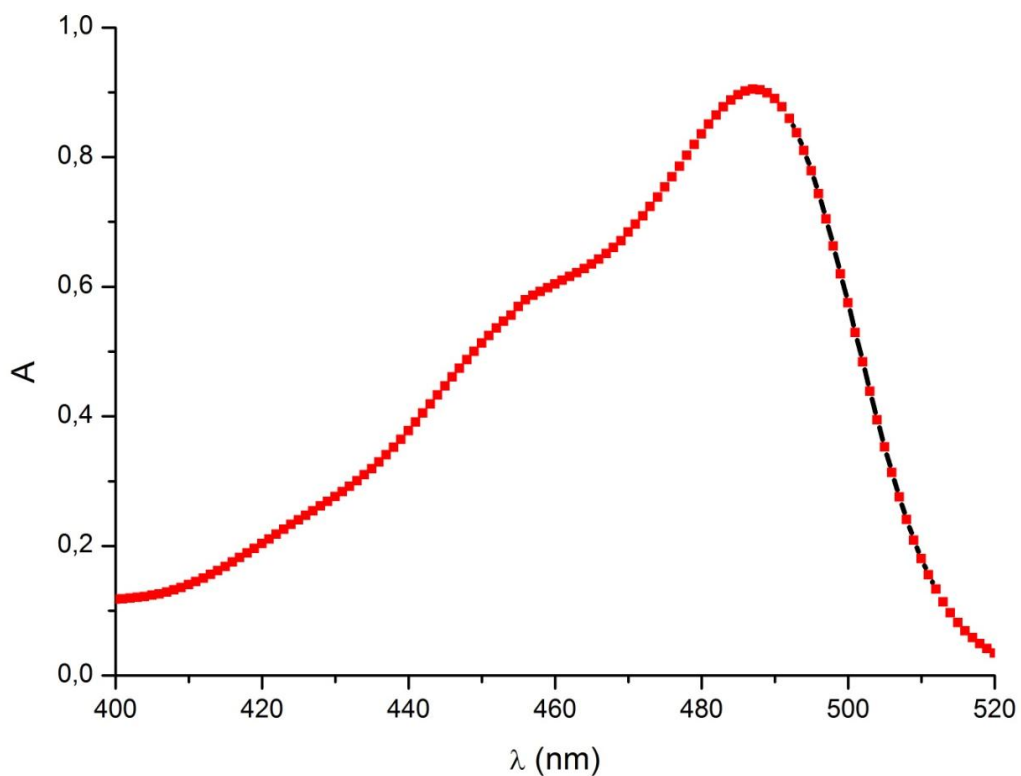
12. ábra: A fluoreszcein (szabad sav) 0,0125 g/l koncentrációjú, 20 %-os EtOH oldatának spektruma



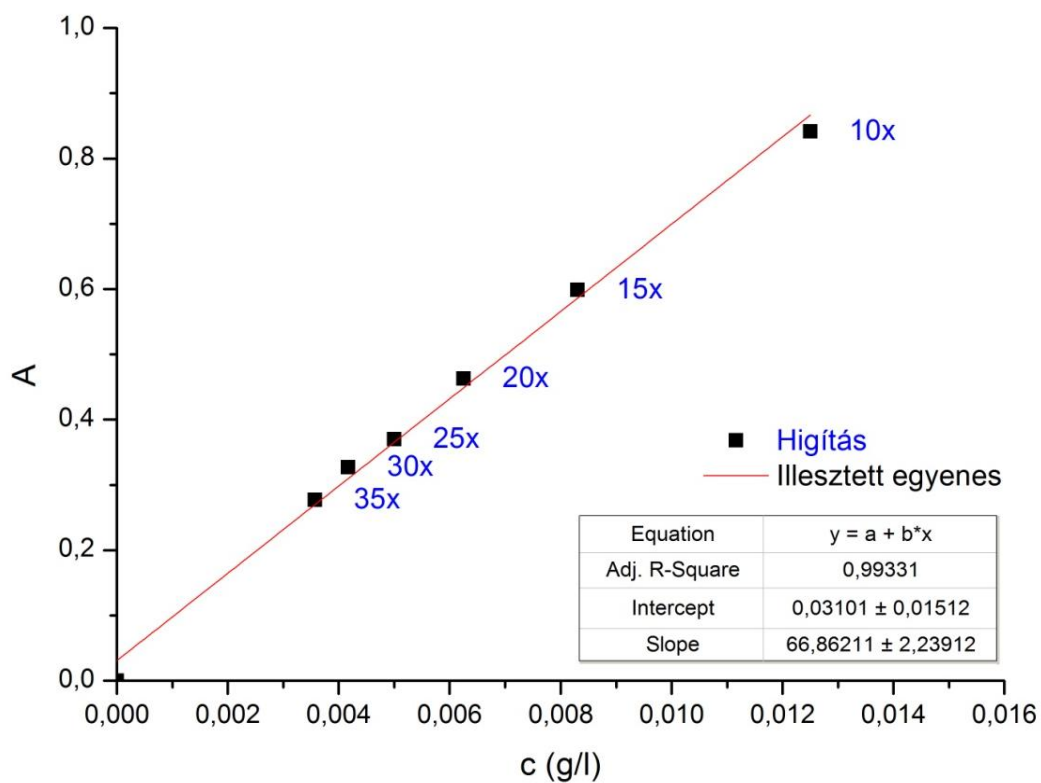
13. ábra: A fluoreszcein 0,0125 g/l koncentrációjú, 20 %-os EtOH oldatának spektruma



14. ábra: A fluoreszcein nátrium sójának 0,0125 g/l koncentrációjú, 20 %-os EtOH oldatának spektruma

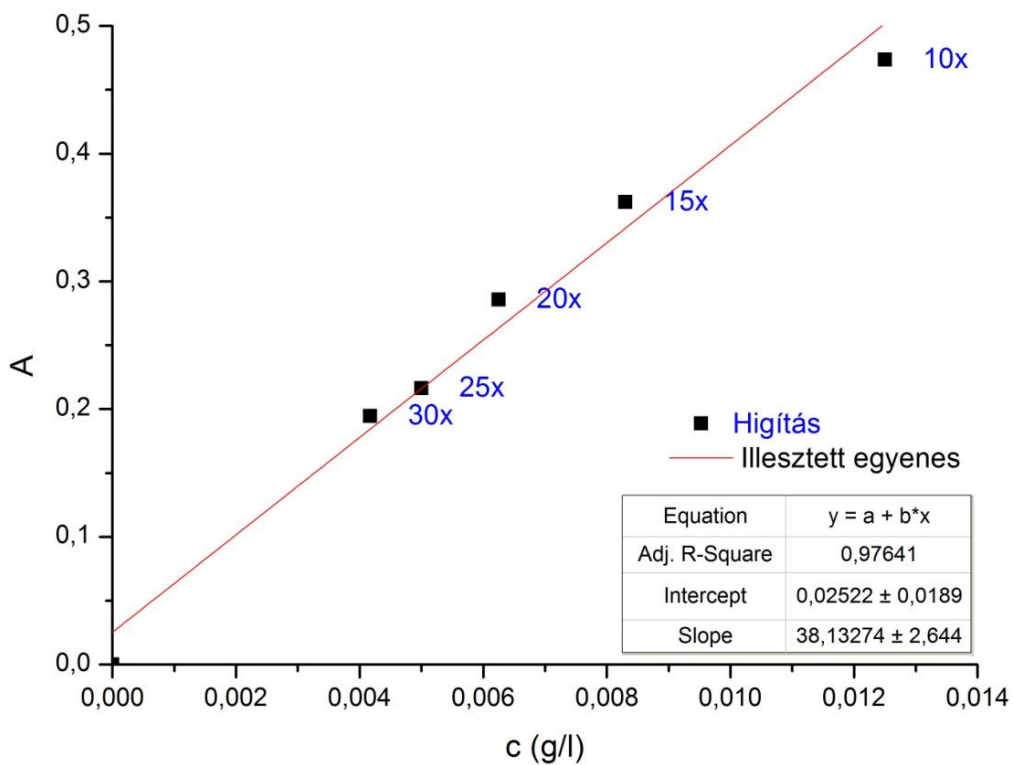


15. ábra: A fluoreszcein nátrium sójának 0,0125 g/l koncentrációjú, vizes oldatának spektruma

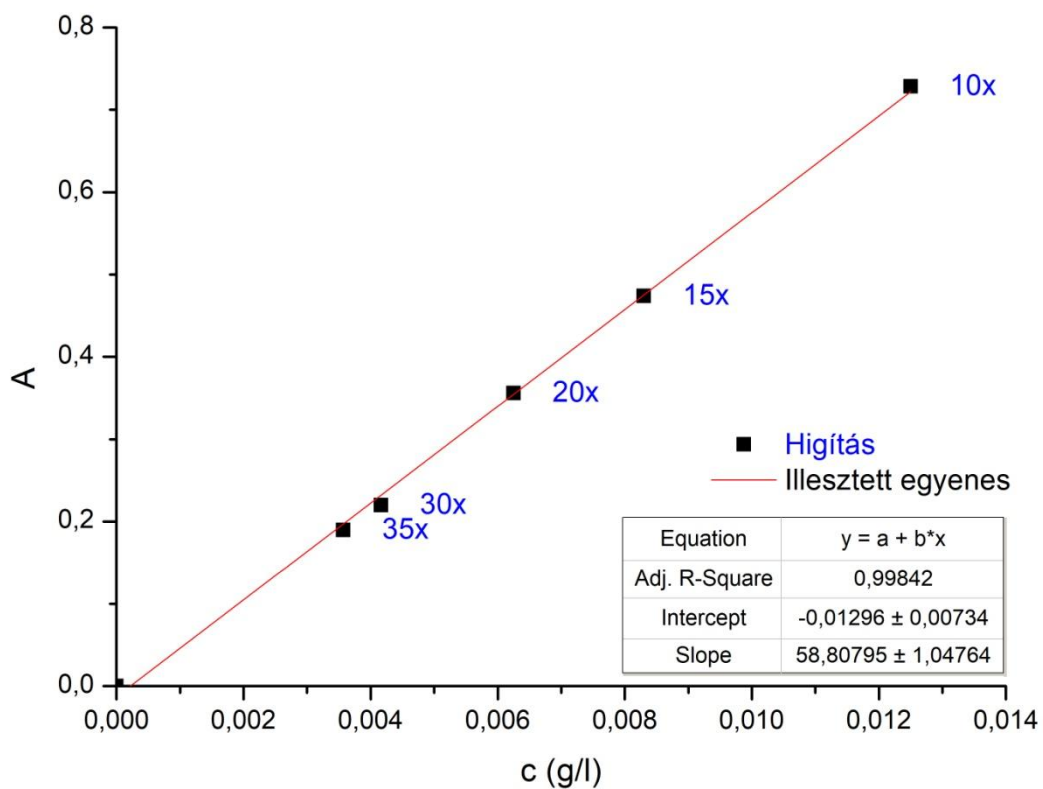


17. ábra: A fluoreszcein (szabad sav) kalibrációs egyenese 20 %-os EtOH oldatban

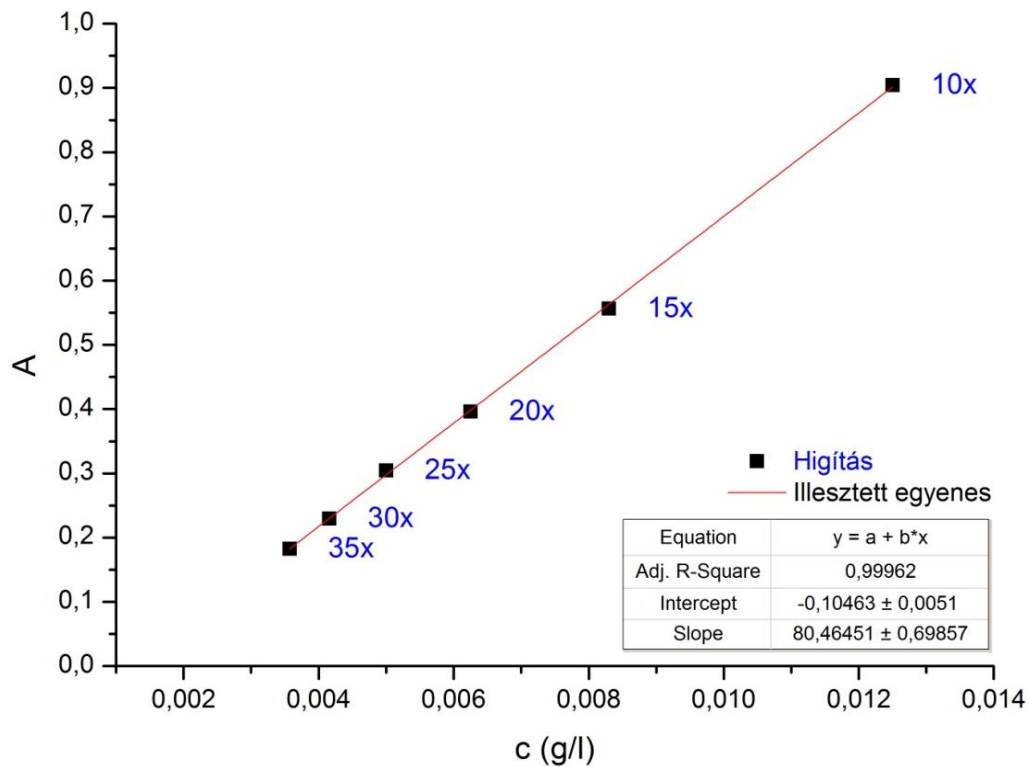
$\lambda = 452 \text{ nm-en}$



16. ábra: A fluoreszcein kalibrációs egyenese 20 %-os EtOH oldatban  $\lambda = 452$  nm-en



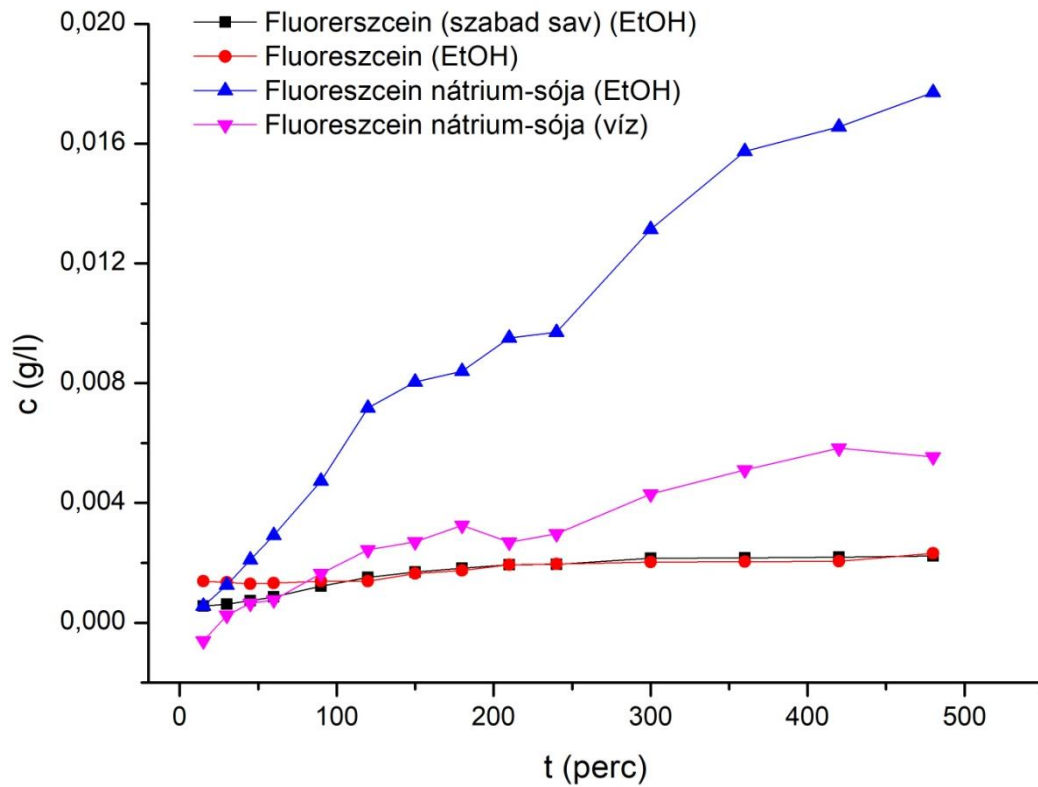
18. ábra: A fluoreszcein nátrium-sójának kalibrációs egyenese 20 %-os EtOH oldatban  
 $\lambda = 452$  nm-en



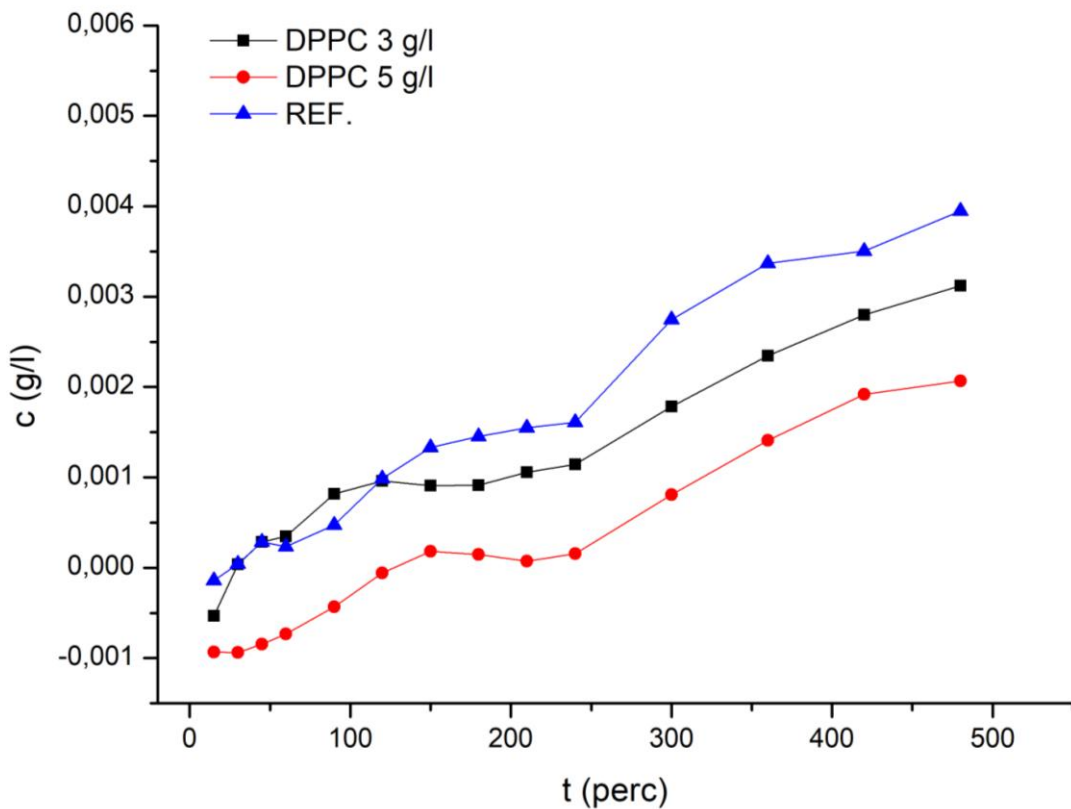
19. ábra: A fluoreszcein nátrium-sójának kalibrációs egyenese vizes oldatban  $\lambda = 452 \text{ nm}$ -en

A transzport vizsgálatokat a modellanyagok esetén 24 órán keresztül végeztem. A két cellát a polimer membrán választotta el. Ezzel egy referenciamérést akartam végezni, melyet később összehasonlíthatok azokkal a mérésekkel, ahol már a polimer membrán hordozón lipid réteg is van. A mért abszorbancia értékeket a kalibrációs egyenesek egyenletéből átszámoltam a megfelelő koncentráció értékekre majd pedig ábrázoltam az eltelt idő függvényében (20. ábra). Az ábrán megfigyelhető, hogy a különböző fluoreszcein származékok más sebességgel jutnak át a membránon. Ezt okozhatja a molekulák térfogatigényének, oldhatóságának, vagy abszorpciós képességének különbsége is.

A 21. ábrán már két lipidés és egy referencia (lipid nélküli membránnal végzett) mérés eredményei láthatók. A fluoreszcein nátrium-sójának vizes, 0,125 g/l-es koncentrációjú oldata volt a donor oldat. A polimer membrán hordozóra különböző koncentrációjú lipid oldatokat vittem fel, és az akceptor oldat koncentrációját 8 órán keresztül követtem. Az akceptor oldatban kialakuló fluoreszcein koncentráció változása összehasonlítható a 21. ábrán. A lipid nélküli membrán esetében a legnagyobb az akceptor oldali koncentráció, míg a lipid oldattal való bevonás kisebb akceptor oldali koncentrációt eredményezett.



20. ábra: A fluoreszcein vegyületeinek koncentráció értékei az idő függvényében, az akceptor cellában (polimer membrán esetében)



21. ábra: A fluoreszcein nátrium-sójának koncentrációja az akceptor cellában az idő függvényében egy lipid nélküli és lipiddel bevont polimer membrán hordozó esetében

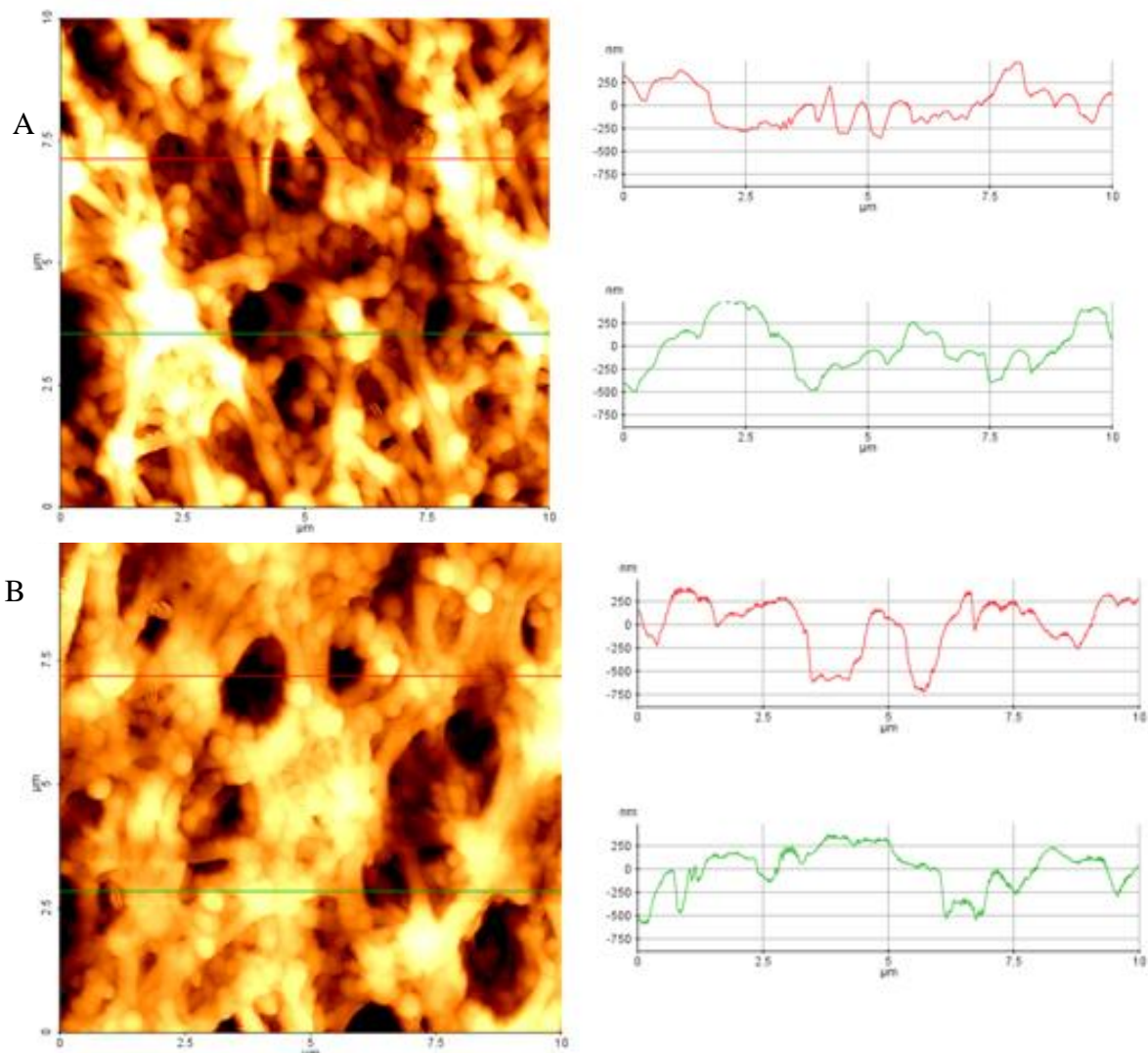
A lipid ezek szerint olyan réteget képez a hordozón, ami csökkenti a fluoreszcein átjutását a membránon. A membrán nagyobb koncentrációjú lipid oldattal való bevonása a membránnak nagyobb mértékben gátolja a fluoreszcein átjutását.

### **5.2.2. Membrán felületi morfológiájának vizsgálata**

A membrán felületének morfológiai vizsgálatát AFM készülékkel végeztük. Azt szeretnénk volna megtudni, hogy a felvitt lipid réteg hogyan terül szét a hordozón, és milyen szerkezetet alakít ki. Először csak az üres, lipid nélküli polimer membránt vizsgáltuk meg, ami referenciaként szolgált. Aztán a különböző koncentrációjú lipid oldatokkal felvitt réteggel is megnéztük a membránt, majd pedig a transzportvizsgálat után is, hogy lássuk, történt-e változás a felületen lévő lipid réteg szerkezetében.

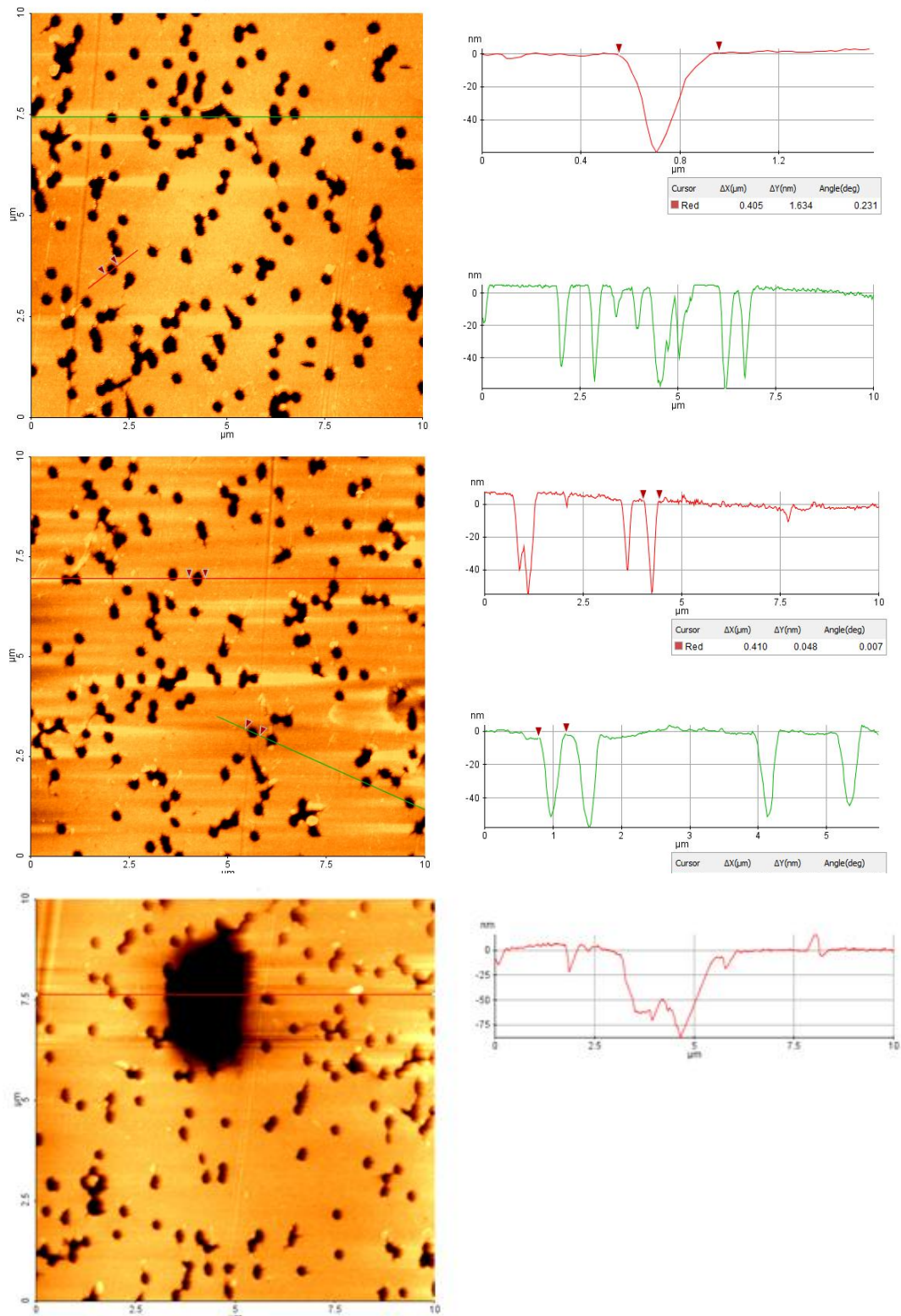
Legelőször a 22. ábrán látható GHP membránt vizsgáltuk meg. A képekből kiderül, hogy ez olyan membrán, melynek felülete nem elég sima, nem jól definiáltak a pórusok. A felület morfológiai képén körülbelül  $\pm 300$  nm-es kiemelkedések és mélyedések figyelhetők meg szabálytalan elrendezésben. Ezt a membránt csak a tesztmérésekhez használtuk, hiszen az ezen a felületen esetlegesen kialakuló lipid réteg nem lenne nyomon követhető a felületi egyenetlenségek miatt.



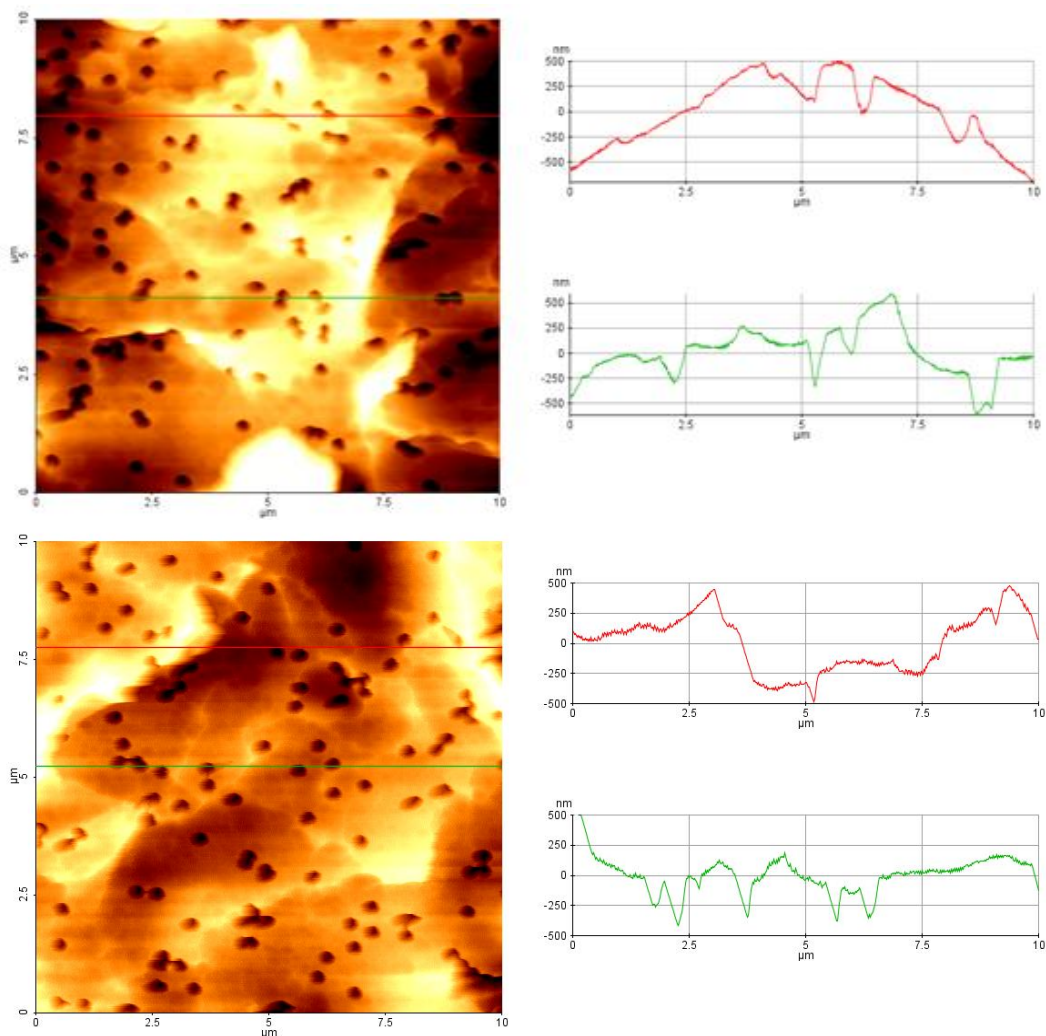


22. ábra: Lipid nélküli GHP membrán felső (A) és alsó, fonák (B) oldalának AFM képe keresztmetszeti profilokkal, a vizsgált terület 10 x 10  $\mu\text{m}$

A további mérésekhez használt polikarbonát track-etched membrán fényes oldalának képe a 23. ábrán, a matt oldali képe a 24. ábrán látható. A fényes és matt oldal szabad szemmel is megkülönböztethető. A méréseknél a donor oldal felőli rész, mindig a fényes oldal volt. A 10 x 10  $\mu\text{m}$ -es felvételeken jól láthatóak a közel azonos méretű lyukak egy sima felületen szabálytalanul de egyenletes elhelyezkedésben. Ahogy a vonalmenti profilból kiolvasható, a membrán felülete körülbelül 1 nm-en belül sima. A pórusok átmérője megfelel a megadott 0.4  $\mu\text{m}$ -nek. Helyenként nagyobb lyukak, nyilvánvaló hibahelyek is előfordulhatnak a polimer membránon. A hátoldalon is jól látszanak a lyukak, de alakjuk kevésbé szabályos, mivel egy több 100 nm-es léptékben egyenetlen felületen láthatóak.



23. ábra: Lipid nélküli polikarbonát track-etched membrán fényes oldalának AFM képe keresztmetszeti profilokkal

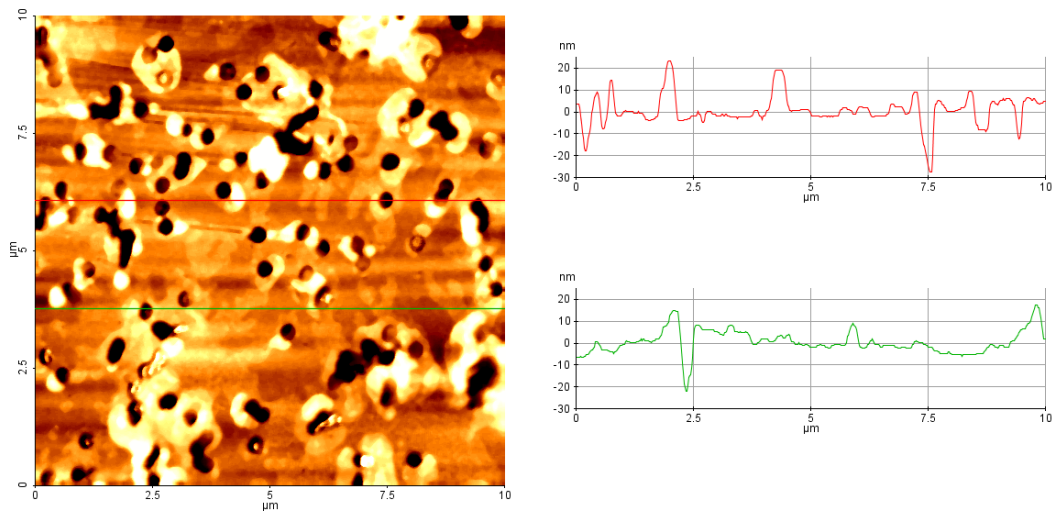


24. ábra: Lipid nélküli polikarbonát track-etched membrán matt oldalának AFM képe keresztmetszeti profilokkal

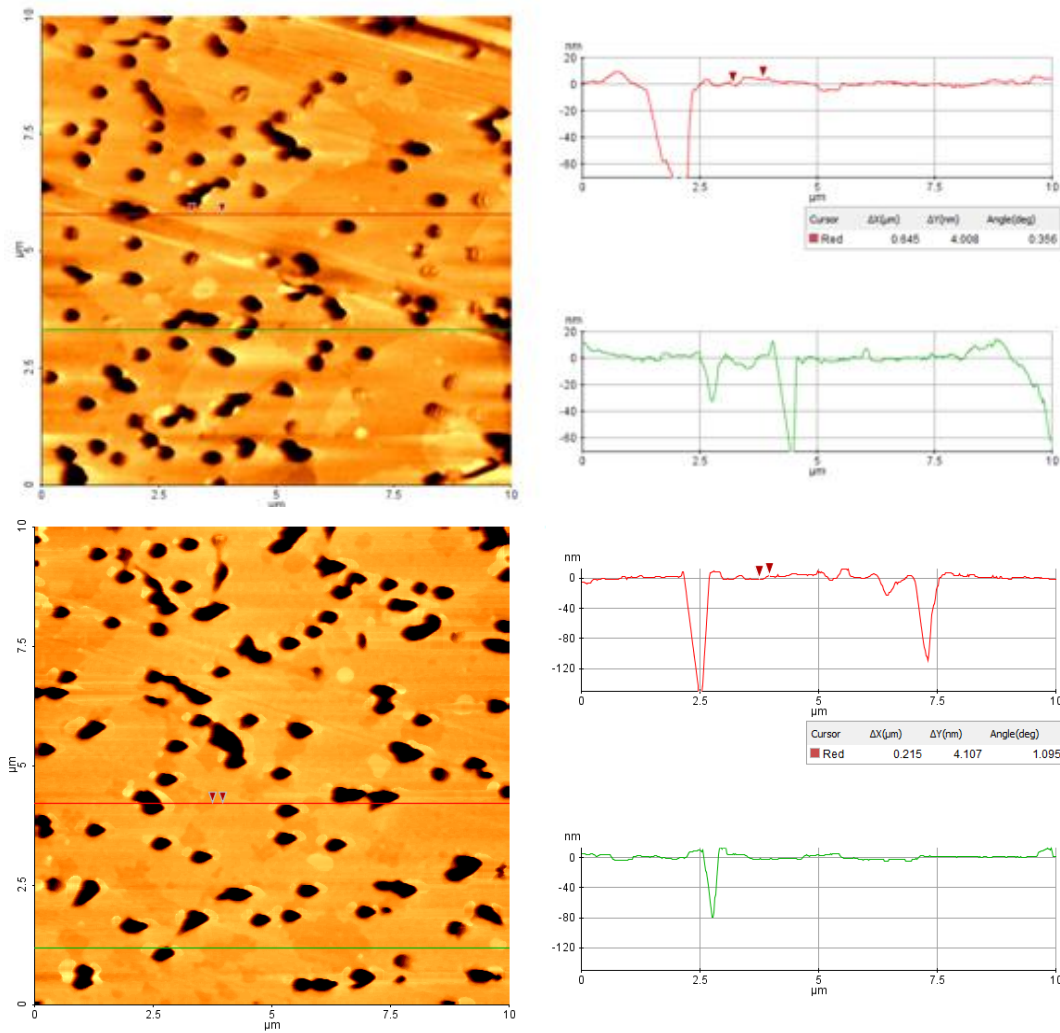
A következő feladat a lipid felvitele volt. Először a 3 g/l koncentrációjú lipidet vittem fel a hordozóra. Az AFM képen látszik (25.ábra), hogy a lipid réteg ugyan megjelent a felületen, de nem egyenletes. Ezért megpróbálkoztunk egy töményebb, 5 g/l-es koncentrációjú lipid oldattal. Ennek az eredménye a 26. ábrán látható. Itt már észrevehető az egyenletesebb lipid réteg, ezért ezzel a módszerrel készített membránokkal folytattam a vizsgálatokat.

A mérési sorozat elején a felvitt lipid réteg egyenletességét egy áztatásos technikával próbáltam meg javítani. Ennek során a lipides membránszűrőt egy rázógépből termosztálva (45 °C) áztattam egy éjszakán keresztül. Ez biztosította a legtöbb esetben, hogy a felesleges lipid leázzon, és egy kettős lipid réteg maradjon a felületen [32].





25. ábra: Polikarbonát track-etched membrán AFM képe 3 g/l koncentrációjú lipid oldattal készített réteggel



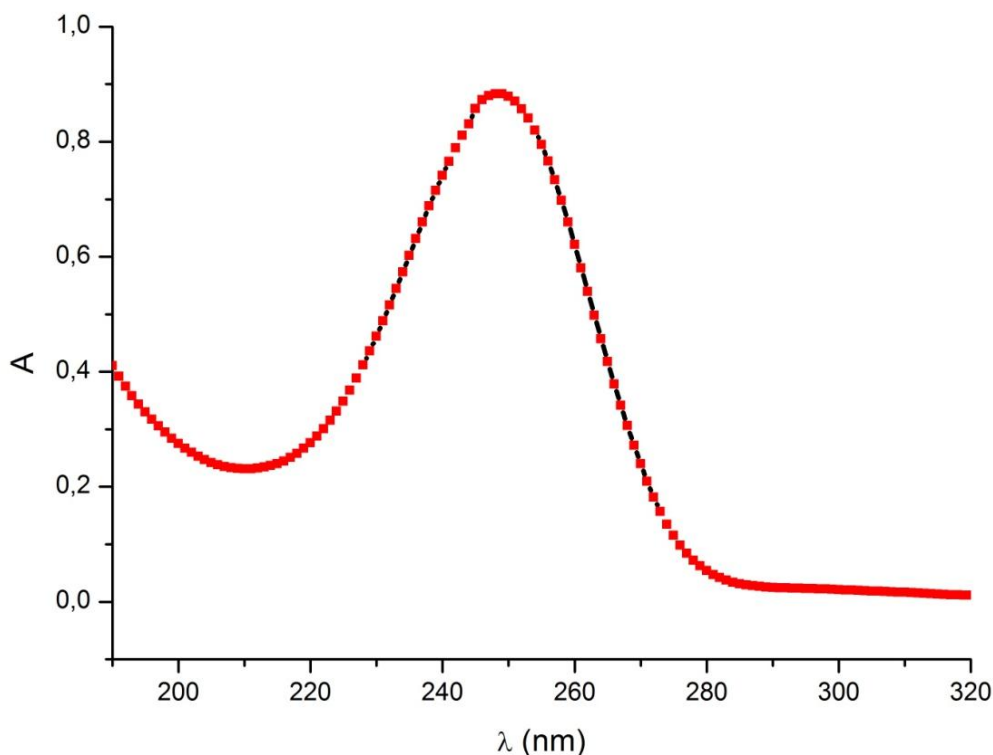
26. ábra: Polikarbonát track-etched membrán AFM képe 5 g/l koncentrációjú lipid oldattal készített réteggel

## 5.3. Kísérletek hatóanyaggal

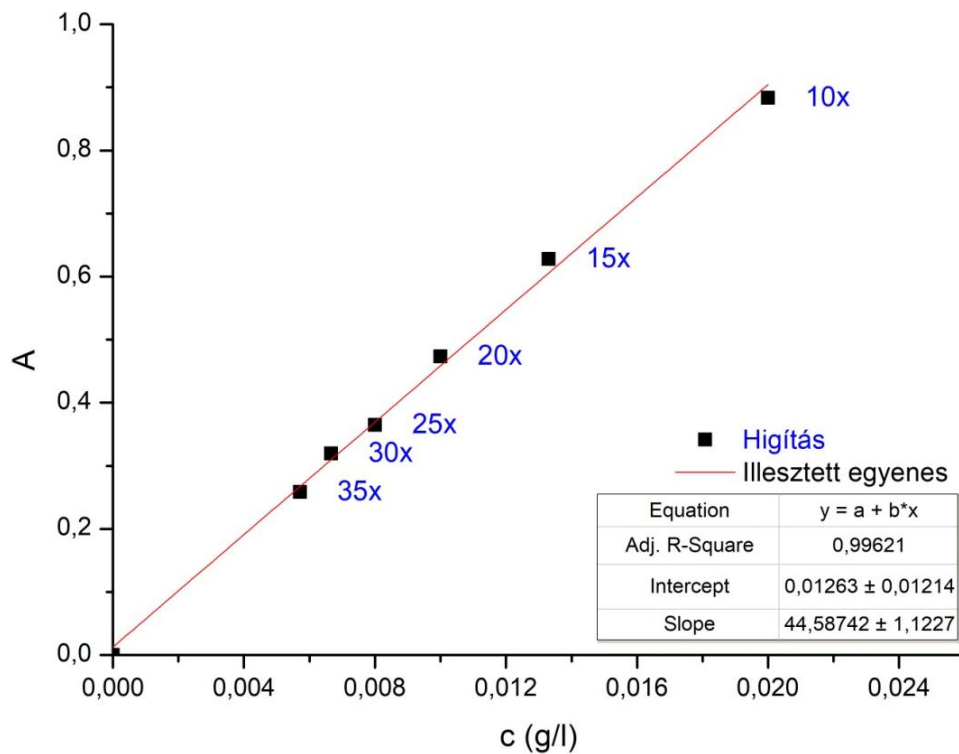
### 5.3.1. Transzportvizsgálat hidrokortizonnal

A tesztmérések tapasztalatai alapján változtattam a lipid membrán kialakításán. Feltételezhető volt, hogy a lipid réteg stabil elhelyezkedése a hordozón a transzportvizsgálatok során nem biztosított. Ezt a feltételezést eleinte az is alátámasztotta, hogy nem tapasztaltam jelentős eltérést a modellanyaggal való méréseknél a lipid nélküli és a lipiddel borított membrán esetén. A továbbiakban nem egy, hanem két membránszűrőre vittem fel lipidet, majd egymásra fordítottam őket, és így tettem be a cellába. Ezzel biztosítottam azt, hogy a lipid ott legyen a felületen és azon keresztül történjen a transzport. Ezzel a "dupla membrán" módszerrel elvégeztem a referencia méréseket is. A felvitt lipid oldat koncentrációja minden esetben 5 g/l volt.

Az egyik általam választott hatóanyag a hidrokortizon volt. A mérésekhez először egy 0,2 g/l-es törzsoldatot készítettem, melyet 3 napon keresztül kevertettem, mivel a hidrokortizon vízben nehezen oldható, hidrofób anyag. Ebből hígítottam az összes kisebb koncentrációjú oldatot, melyre még szükségem volt. A 10x hígítású, 0,02 g/l koncentrációjú oldat spektruma 27. ábrán, a kalibrációs görbe pedig a 28. ábrán látható.

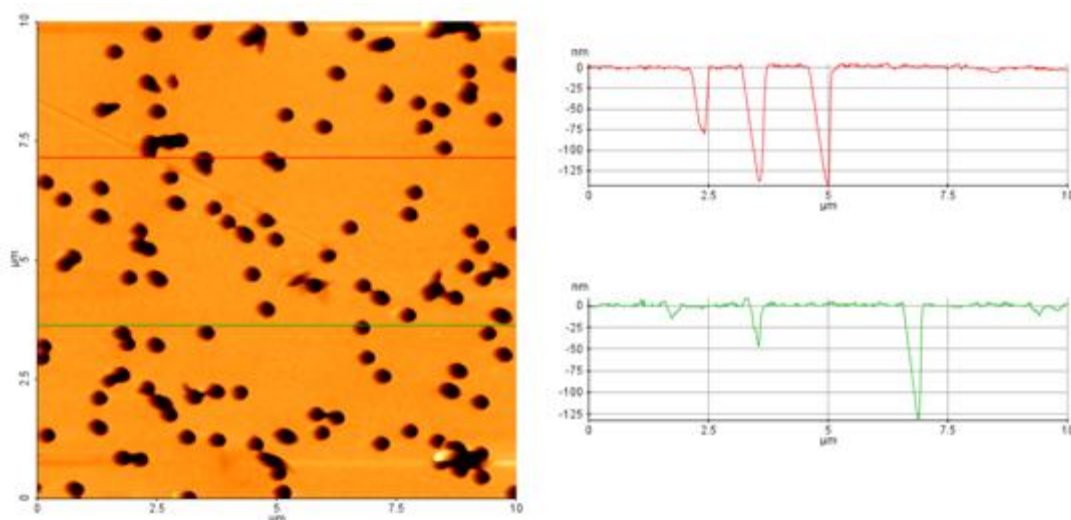


27. ábra: A hidrokortizon 0,02 g/l koncentrációjú vizes oldatának spektruma

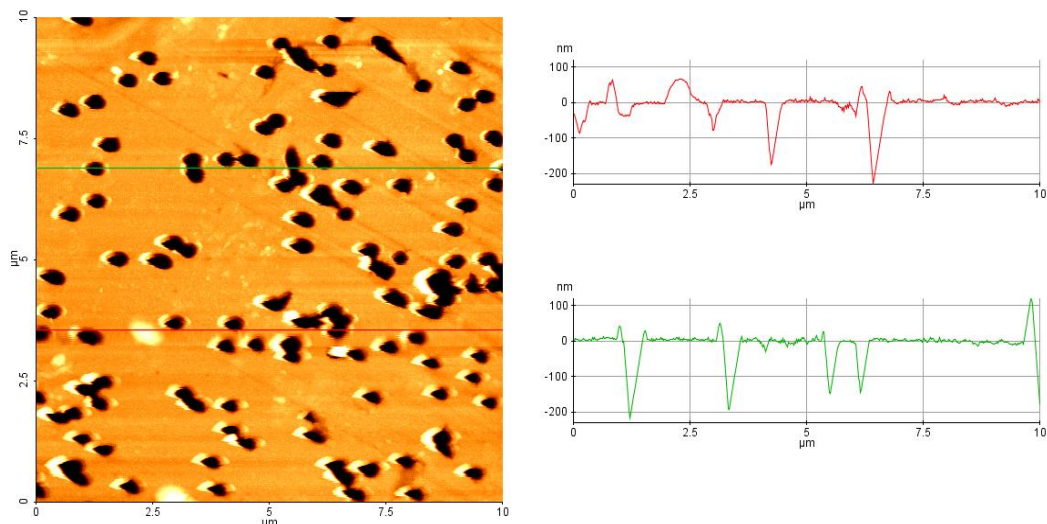


27. ábra: A hidrokortizon kalibrációs egyenese vizes oldatban  $\lambda = 254$  nm-en

A referencia, lipid nélküli mérést először egy 0,1 g/l-es majd pedig 0,2 g/l-es koncentrációjú oldattal végeztem el, melynek képe a 29. és 30. ábrán látható. A 8 órás transzportvizsgálat után azt próbáltuk megvizsgálni, hogy a szűrőmembrán felületén történik-e változás a különböző hidrokortizon oldat penetrációjának hatására. Látható azonban, hogy nem volt észlelhető változás, esetleges hidrokortizon felhalmozódás sem a hígabb sem a töményebb oldat transzportja során.

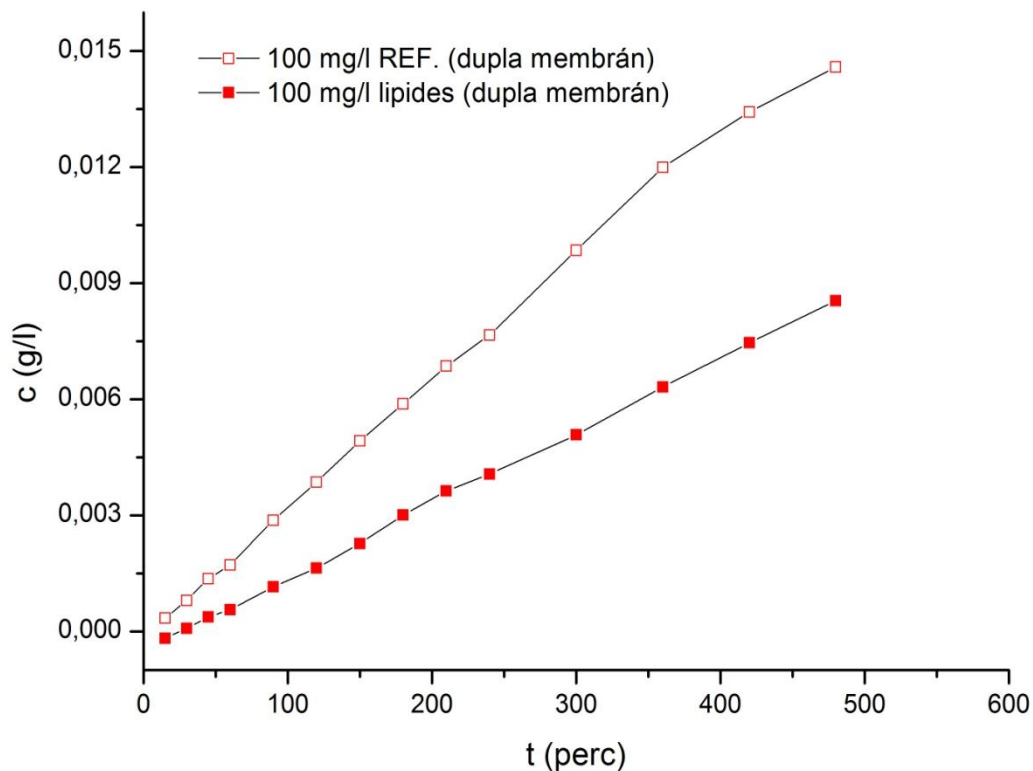


29. ábra: Lipid nélküli polikarbonát track-etched membrán AFM képe, 0,1 g/l hidrokortizon vizes oldatával történt transzportvizsgálat után

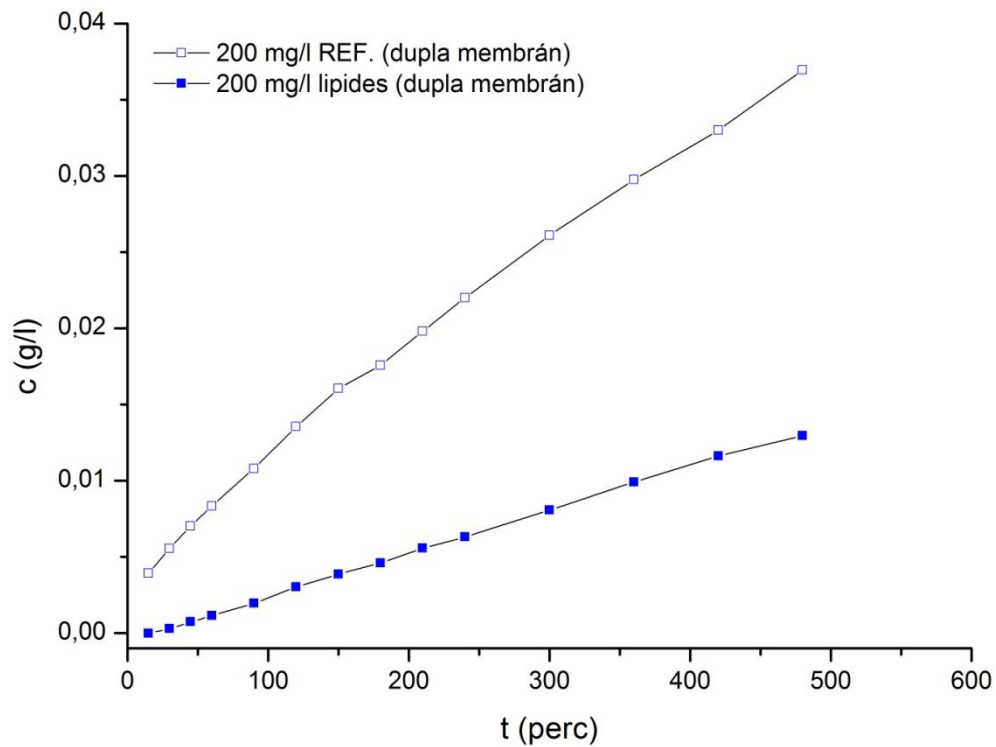


30. ábra: Lipid nélküli polikarbonát track-etched membrán AFM képe, 0,2 g/l hidrokortizon vizes oldatával történt transzportvizsgálat után

A donor és az akceptor oldali membránokon egyaránt látható a lipid. A feltevést, hogy valóban ott van a hordozón és lassabb a penetráció, a 31. és 32. ábra mutatja. A referencia (lipid nélküli) mérésekhez képest minden esetben igaz, hogy a lipides membrán alkalmazásakor kisebb koncentrációértéket tapasztaltam az akceptor oldalon. A lipid membrán fékezi a hatóanyag penetrációját, vagyis sikerült egy olyan összeállítást készíteni, amelyben a lipid réteg transzportra gyakorolt hatása tanulmányozható.



31. ábra: A hidrokortizon penetrációja, 0,1 g/l koncentrációban, vizes oldattal; referencia és lipides mérés

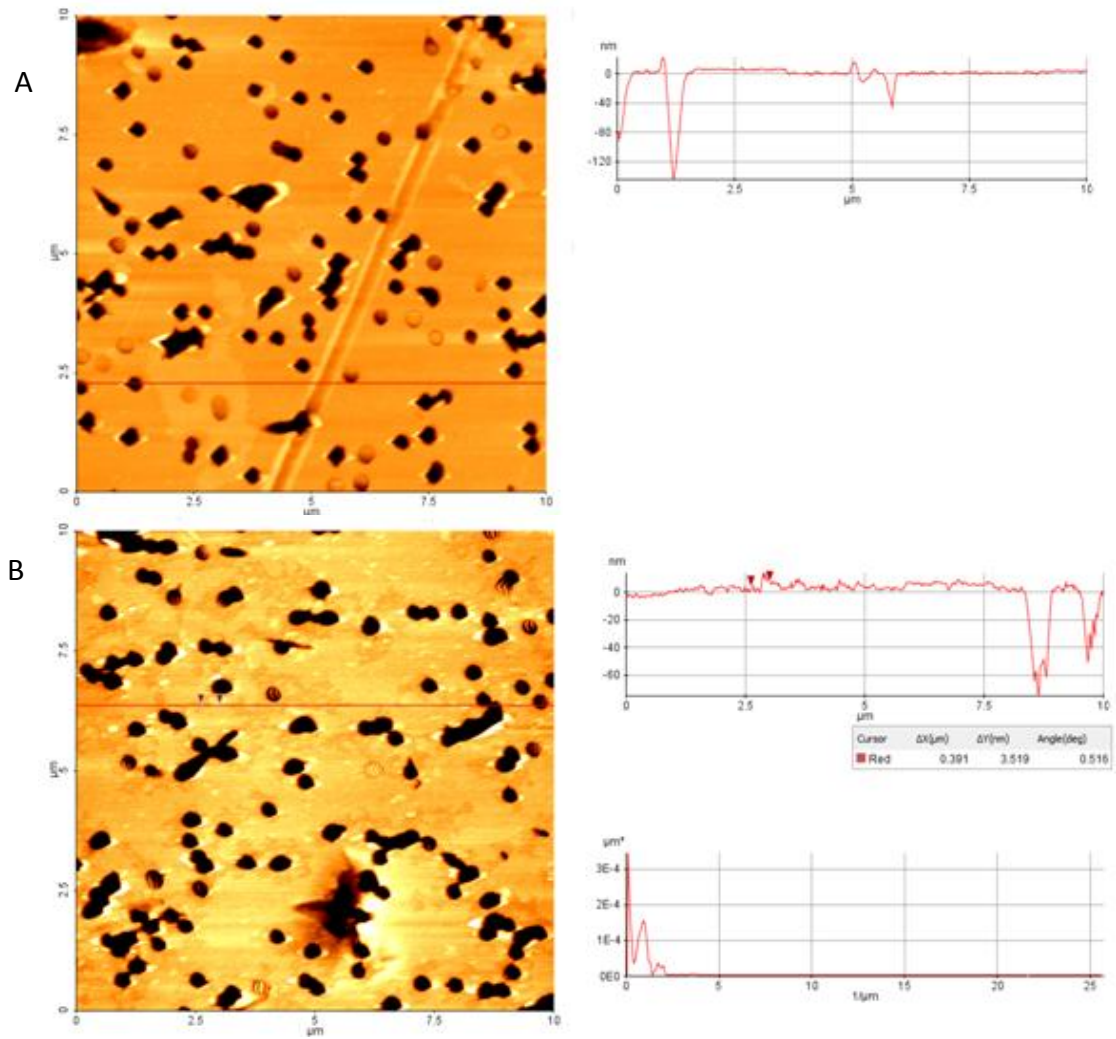


32.ábra: A hidrokortizon penetrációja, 0,2 g/l koncentrációban, vizes oldattal; referencia és lipides mérés

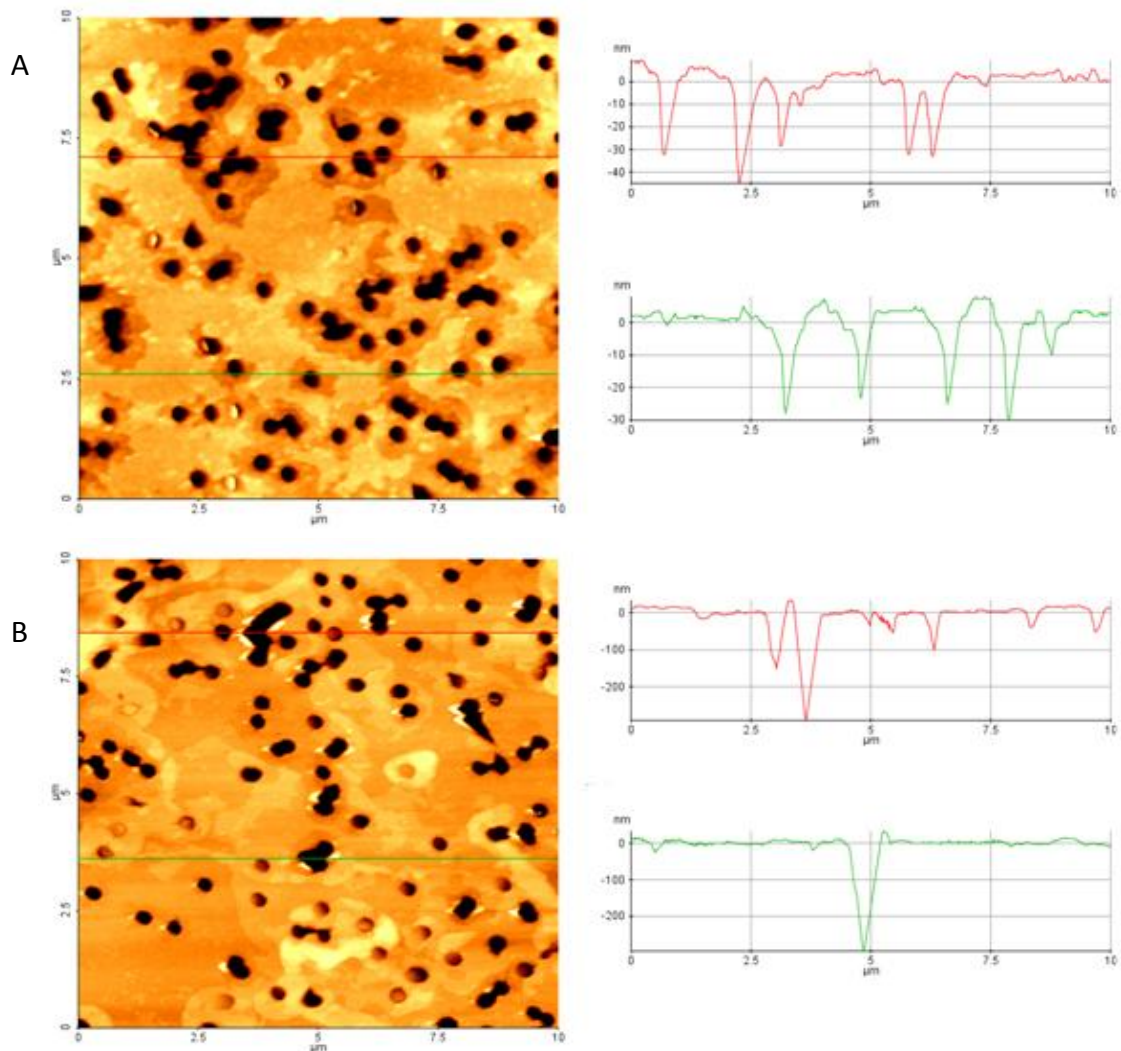
A 33. ábrán a dupla membrános, lipides transzportvizsgálat után készített AFM felvételek képe látható. A membrán felületén lipid réteg van. Ami feltűnő, egyes pórusok eltömődtek a transzport során vagyis a lipid réteg biztosan ott marad a membránon és azon keresztül történt a penetráció.

A töményebb hatóanyag koncentrációjú oldattal végzett mérések után készített AFM képek a 34. ábrán láthatók. Itt a lipid szigetesebb formában helyezkedik el, ugyanakkor szerkezetbeli változása is megfigyelhető mind a donor mind az akceptor oldali membránok esetében. Egyes pórusok eltömődtek, és a lipid réteg szerkezete is megbomlott, kevésbé egyenletes. Ez a hatóanyag zsírolldhatósága miatt lehetséges.





33. ábra: Lipides polikarbonát track-etched membránok AFM képe, 0,1 g/l hidrokortizon vizes oldatával történt transzportvizsgálat után; donor oldali membrán (A) és akceptor oldali membrán (B)

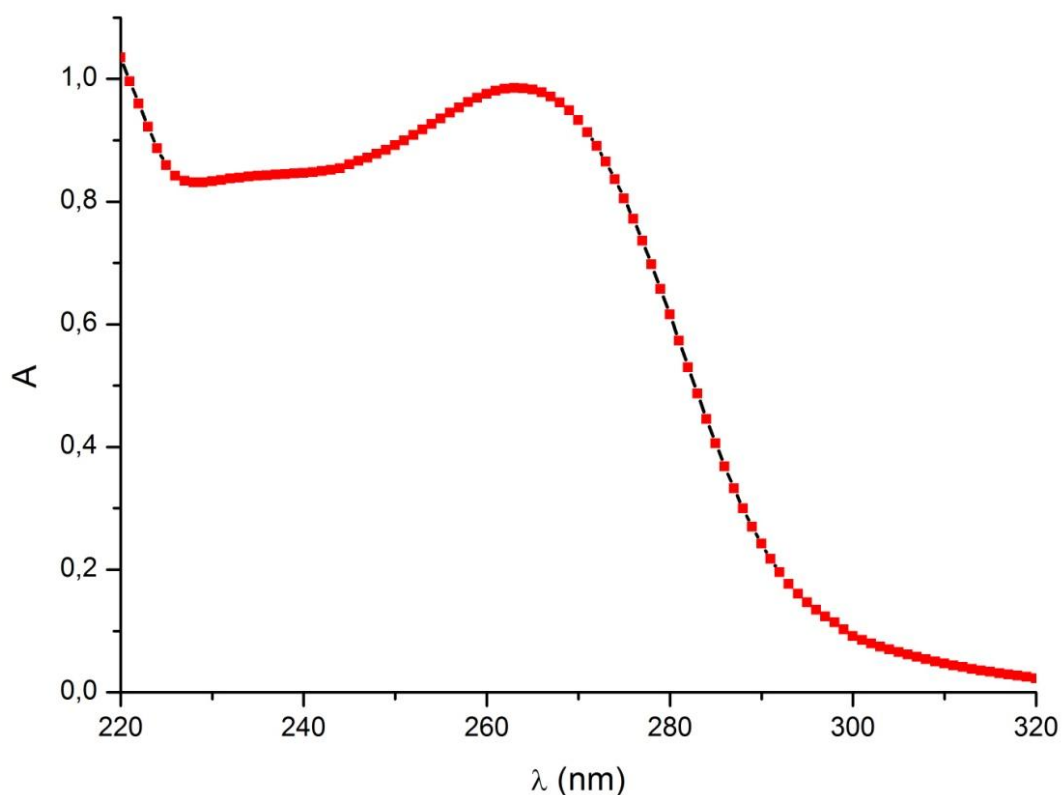


34. ábra: Lipides polikarbonát track-etched membrán AFM képe, 0,2 g/l hidrokortizon vizes oldatával történt transzportvizsgálat után; donor oldali membrán (A) és akceptor oldali membrán (B)

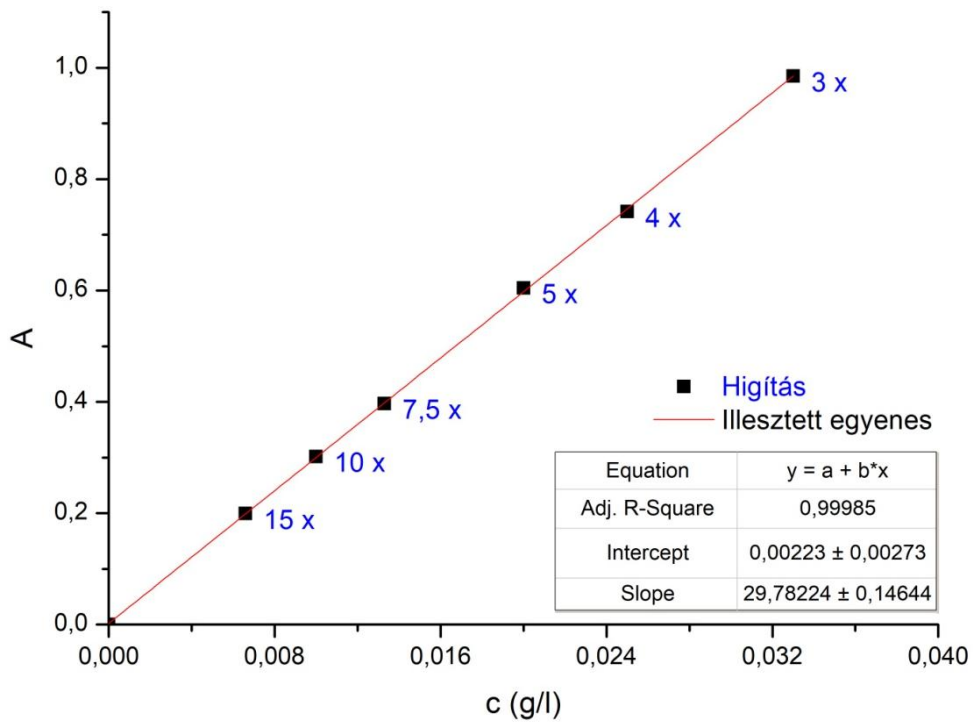
A töményebb hatóanyag koncentrációjú oldattal végzett mérések után készített AFM képek a 34. ábrán láthatók. Itt a lipid szigetesebb formában helyezkedik el, ugyanakkor szerkezetbeli változása is megfigyelhető mind a donor mind az akceptor oldali membránok esetében. Egyes pórusok eltömődtek, és a lipid réteg szerkezete is megbomlott, kevésbé egyenletes. Ez a hatóanyag zsírolthatósága miatt lehetséges.

### 5.3.2. Transzportvizsgálat izoniaziddal

Az másik általam választott hatóanyag az izoniazid volt. A mérésekhez ebben az esetben egy 0,1 g/l-es és egy 0,2 g/l-es törzsoldatot készítettem, de ebben itt nem volt szükség hosszú idejű kevertetésre, mivel vízoldhatósága jobb, mint a hidrokortizoné. Ebből hígítottam az összes kisebb koncentrációjú oldatot, melyre még szükségem volt. Az izoniazid a 0,033 g/l-es koncentrációjú oldatának spektruma a 35. ábrán látható, a kalibrációs görbéje pedig a 36. ábrán látható. Ebben az esetben is a "dupla membrán" módszerrel végeztem a referencia és a lipides méréseket is. A felvitt lipid oldat koncentrációja itt is minden esetben 5 g/l volt.

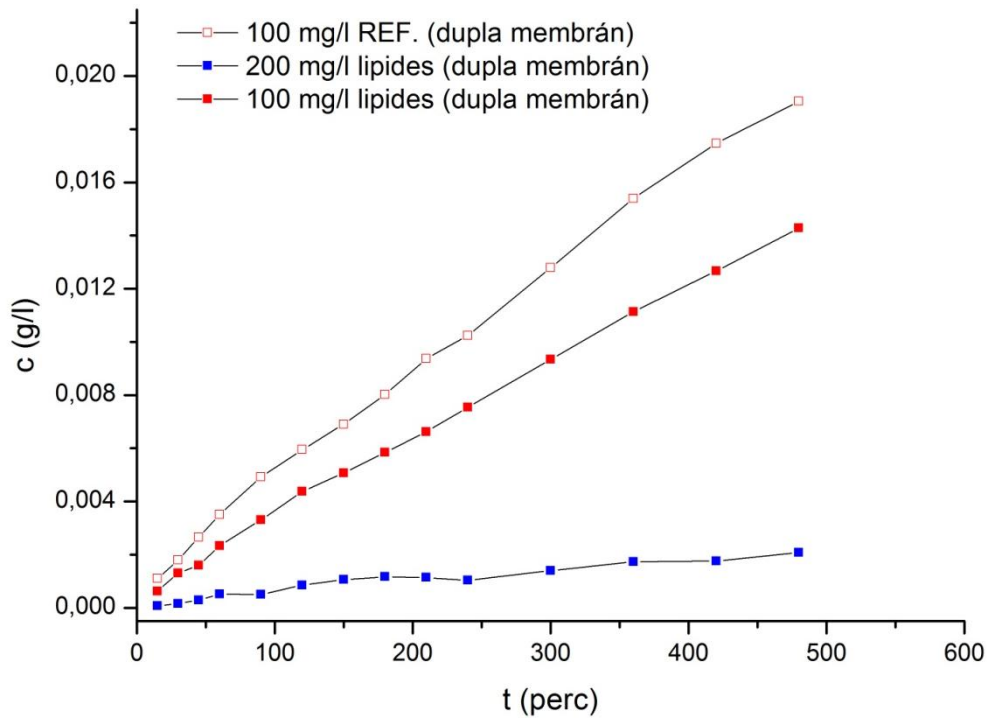


35. ábra: Az izoniazid 0,033 g/l koncentrációjú vizes oldatának spektruma

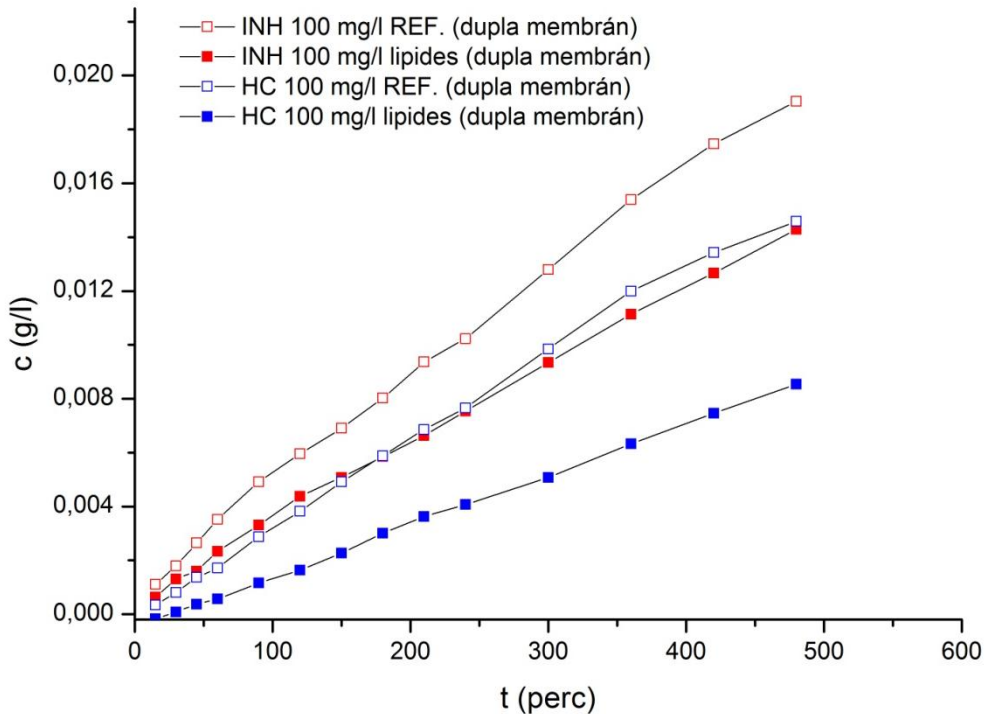


36.ábra: Az izoniazid kalibrációs egyenese vizes oldatban  $\lambda = 263$  nm-en

A transzportvizsgálatok eredményét a 37. és 38. ábrán foglaltam össze. A hidrokortizon (HC) akceptor oldali koncentrációja csekély mértékben növekszik a 0,1 g/l koncentráció esetén. Ennél nagyobb mértékű a változás a nagyobb koncentrációjú oldatot használva. A transzport vizsgálatok során kiderült, hogy a kisebb izoniazid molekula penetrációja nagyobb mértékű volt, mint a hidrokortizon molekuláé. Ezt a 38. ábrán összefoglalt eredmények jól mutatják.

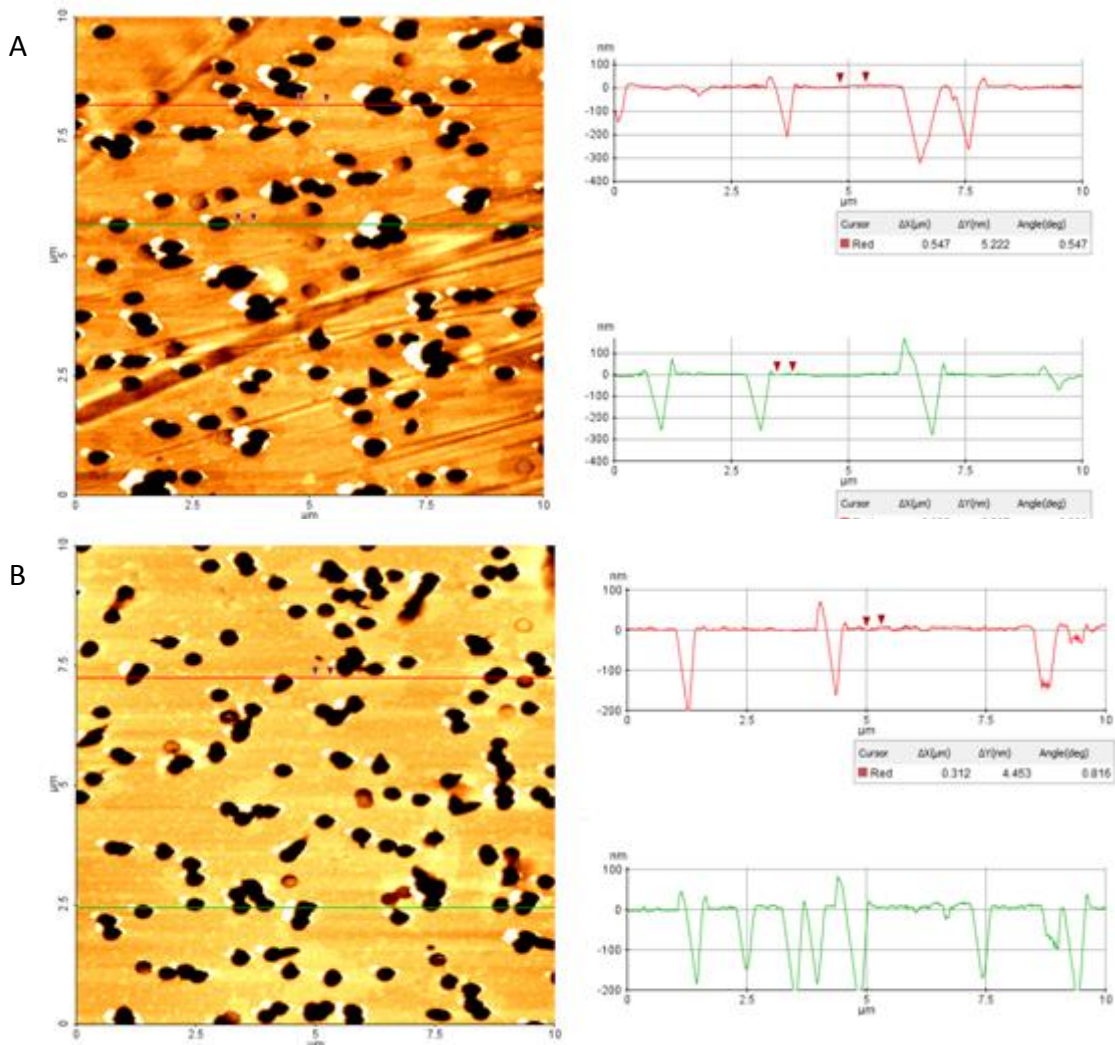


37.ábra: Az izoniazid penetrációja, 0,1 g/l koncentrációban, vizes oldattal; referencia és lipides mérés



38.ábra: A hidrokortizon és az izoniazid penetrációjának összehasonlítása, 0,1 g/l és 0,2 g/l koncentrációban, vizes oldattal; referencia és lipides mérések összehasonlítása

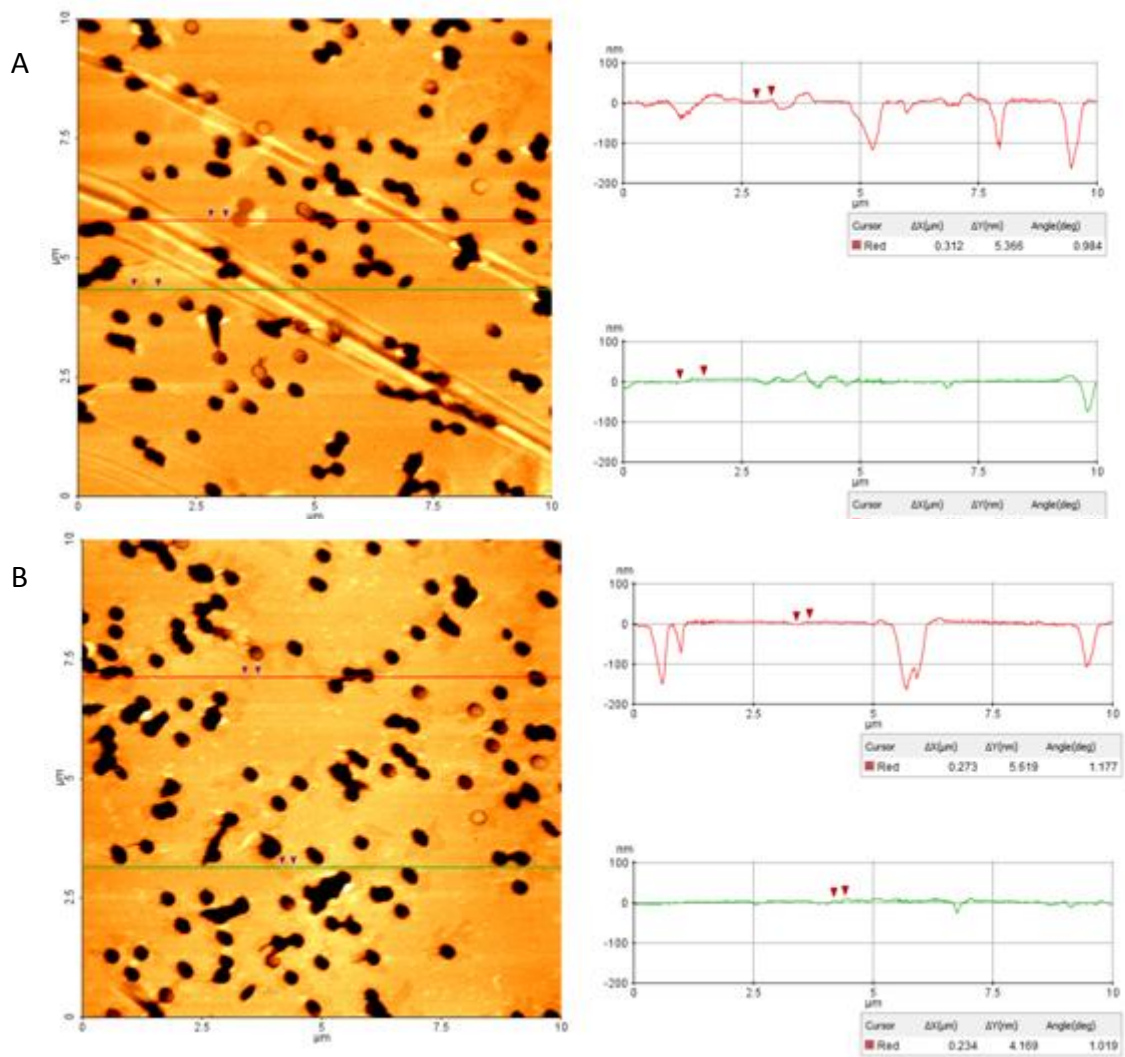
A 39. ábrán a lipides membránok AFM képe látható, 0,1 g/l hatóanyag koncentrációjú vizes oldatával történt transzportvizsgálat után. A donor oldali membrán és akceptor oldali membrán között nem látható nagy különbség.



39.ábra: Lipides polikarbonát track-etched membrán AFM képe, 0,1 g/l izonazid vizes oldatával történt transzportvizsgálat után; donor oldali membrán (A) és akceptor oldali membrán (B)

A 40. ábrán pedig azoknak a membránoknak az AFM képe látható, ahol 0,2 g/l hatóanyag koncentrációjú vizes oldattal történt a transzportvizsgálat. A donor és az akceptor oldali membrán között itt sem látható nagy különbség. Mivel az izoniazid kevésbé zsírolható és kisebb térigényű molekula mint a hidrokortizon, nem tapasztalható szigetesedés a lipid rétegben, hanem egyenletes és egybefüggő réteg van, ahol csak néhány eltömődött pórus figyelhető meg.



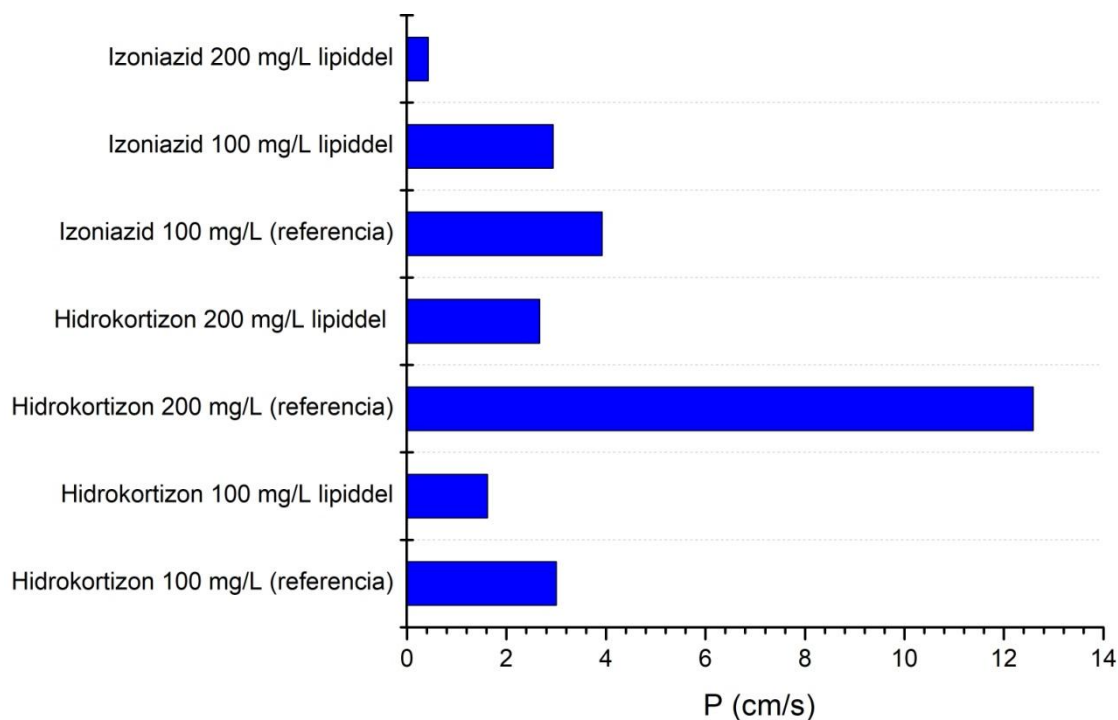


40.ábra: Lipides PCTE membránok AFM képe, 0,2 g/l izonazid vizes oldatával történt transzportvizsgálat után; donor oldali membrán (A) és akceptor oldali membrán (B)

### 5.3.3. Permeabilitás meghatározása

A transzport folyamatokból meghatározható a permeabilitás, ami az adott hatóanyag membránon való átjutásának és a lipid réteggel való kölcsönhatásának a jellemzője. A porozitás a membrán effektív áteresztőképességével áll kapcsolatban, ugyanis ez a membrán felületén található lyukak átlagos összterületét jelenti. Ezzel is lehetséges jellemezni a membrán keresztüli penetráció mértékét.

A 4-es egyenlet alapján számolt permeabilitás értékek a 41. ábrán láthatók. A referencia méréseknél kaptam a legnagyobb értékeket, ami annak tudható be, hogy a lipid nélküli membránszűrőn gyorsabb volt a molekulák átjutása. A lipiddel fedett membránszűrőn már lassabb volt a transzport, így kisebb a permeabilitás. Itt már a lipid réteg szerkezete és a molekulák mérete erősen befolyásolta a koncentráció értékek változását az akceptor oldatban és ez által a permeabilitást is.



41.ábra: A transzportvizsgálatok során kapott értékek alapján számolt permeabilitás



## 5. Összefoglalás

### **Membrán modell fejlesztése gyógyszertranszport jellemzéséhez**

**Papp Szabolcs Dániel**, anyagtudomány mesterszakos hallgató

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Kémiai Intézet, Fizikai  
Kémiai Tanszék

Témavezető: **Dr. Kiss Éva**, egyetemi tanár  
Fizikai Kémiai Tanszék

Munkám során két, a gyógyszerhatóanyagok mesterséges sejtmembránon keresztüli transzportjának mennyiségi és minőségi jellemzésére használt, széles körben elfogadott módszer kombinálásával szerettem volna egy egyedi elrendezésű membrán modellt létrehozni.

Az irodalomban talált modellek szinte mindegyike kis koncentrációkra vonatkoztatva ad tájékoztatást a rendszerben történő transzportfolyamatokról. A méréseim során nagyobb koncentrációk esetén történő transzportfolyamatok leírására tettem kísérletet egy erre a célra kifejlesztett mérési elrendezéssel.

Sikerült egy olyan rendszert előállítani, mely a szűrőmembrán modell (PAMPA) és a hatóanyag felszabadulására szolgáló eszköz kombinálásával ötvözi ezek előnyeit, és a hatóanyag sejtmembrán modellen keresztüli transzport tanulmányozását teszi lehetővé. Az elképzelt mérőcella formájában a gyógyszer felszabadulás mérésére használt eszközt követi, a transzportot lehetővé tévő rész pedig a PAMPA rendszerben használt membránra hasonlít. Ugyanakkor ettől el is tér annyiban, hogy jelen esetben a vizuális észlelésre is lehetőség nyílik.

Az eszköz 3D nyomtatással készült el saját tervünk alapján. A tervezés folyamatában fontos szempont volt a kémiai stabilitás mellett a teljes vagy részleges fényáteresztés valamint a szétszerelhetőség egyszerűsége. A mérések során a modellanyagok és gyógyszerhatóanyagok egy hordozóra felvitt lipid rétegen keresztüli penetrációját vizsgáltam különböző hatóanyag koncentrációk esetén. További mérések során AFM segítségével próbáltam a felvitt lipid réteg felületi morfológiájának jellemzését elvégezni a transzportvizsgálatok előtt és után.

A gyógyszerhatóanyagok mesterséges sejtmembránon keresztüli transzportjának jellemzése lehetőséget nyújt arra, hogy bizonyos mértékben reprezentálni tudjuk a valódi biológiai sejtmembránokban lejátszódó transzportfolyamatokat és szelektálni tudjunk a hatóanyagjelöltek között. Ez nagy jelentőséggel bír a gyógyszerkutatás terén, hiszen a hatóanyagok többnyire a sejtmembránon keresztüli átjutás után képesek elérni a kívánt hatást a sejt belsejében. Az ilyen célú kutatások eredményei elérhetőbbé teszik például a rákos megbetegedések sikeres gyógyítását vagy az újabb, mutációk következtében megjelenő kórokozók által okozott betegségek gyógyítását.

## 6. Summary

### **Development of a membrane model for the characterization of drug transport**

**Szabolcs Dániel Papp**, MSc student in Material Science

Department of Physical Chemistry, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University,  
Budapest

Supervisor: **Éva Kiss**, professor  
Department of Physical Chemistry

During my work, I wanted to create a unique membrane model by combining widely accepted methods for quantitative and qualitative analysis of the transport of drug substances through artificial cell membrane. Almost all of the models found in the literature provide information on the low flow of concentrations to characterize the transport processes in the system.

During my measurements, I tried to describe the transport processes at higher concentrations with a new measurement arrangement developed for this purpose. The system has been designed combining the advantages of the filter membrane model (PAMPA) and the drug release measurement and the study of the active substance transport. The structure of the measuring cell follows the device used to measure drug release and the transporting part resembles the membrane used in the PAMPA system. At the same time, it also differs from the fact that, in the present case, visual perception is also possible.

The device was made with 3D printing based on our own design. In the process of design, the inertness of the material, the full or partial light transmission and the simplicity of dismantling were important aspects. During the measurements, I examined the penetration of model materials and drug substances on a substrate through a layer of lipid at various active substance concentrations. During further measurements, I tried to analyze the surface morphology of the lipid layer before and after the transport tests using the AFM technique.

The artificial membrane permeability and drug release research enable to represent a certain degree of transport processes in the real biological cell membranes and make efficient selection among possible drug candidates. This has great importance in the field of pharmaceutical research, since the active substances are usually able to achieve the desired effect inside the cell after passing through the cell membrane. The results of such researches make us to successfully cure cancerous diseases or to cure illnesses caused by newer mutation pathogens.

## 7. Irodalomjegyzék

- [1] Pálfia Zs., Kristóf Z., A sejtbiológia alapjai, Eötvös Loránd Tudományegyetem, 25-31, 42-56, 70-77 (2013)
- [2] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Essential Cell Biology, Third Edition, Garland Science - Taylor & Francis Group, 1-31, 363-383, 463-480 (2010)
- [3] Vizserálek G., Keserű Gy., Budai M., Examination of permeability of drugs by PAMPA method in theoretical and practical aspects, Ph.D. thesis, Semmelweis University, Doctoral School of Pharmaceutical Sciences (2016)
- [4] K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers, The Impact of Food Bioactives on Health - In Vitro and Ex Vivo Models, Springer International Publishing AG - Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 103-111 (2015)
- [5] H. Y. Tan, S. Trier, U. L. Rahbek, M. Dufva, J. P. Kutter, T. L. Andresen, A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies, PLoS ONE 13(5): e0197101 (2018)
- [6] Markos S., Gépgyártástechnológia, Különleges megmunkálások (előadás), Budapesti Műszaki- és Gazdaságtudományi Egyetem
- [7] I. J. Hidalgo, T. J. Raub, R. T. Borchardt, Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability, Gastroenterology, 96:736-49 (1989)
- [8] U. Mueller-Vieira, Parallel Artificial Membrane Permeation Assay, Pharmacelsus, Contract Research Organization, ADME & in vitro Pharmacology (2009)
- [9] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 41, No. 7 (1998)

- [10] Müller J., Gyógyszerhatóanyagok felszívódásának és szöveti megoszlásának modellezése in vitro nem sejtes módszerekkel, Tézisfüzet, Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató laboratórium, 2-5 (2017)
- [11] H. Yu, Q. Wang, Y. Sun, M. Shen, H. Li, Y. Duan, A New PAMPA Model Proposed on the Basis of a Synthetic Phospholipid Membrane, PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0116502 (2018)
- [12] C. Masungi, J. Mensch, A. Van Dijck, C. Borremans, B. Willems, C. Mackie, M. Noppe, M. E. Brewster, Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates, Pharmazie 63: 194–199 (2008)
- [13] F. Faigl, L. Szeghy, E. Kovács, B. Mátravölgyi, Gyógyszerek, Egyetemi tananyag, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, 71-101, 102-112 (2011)
- [14] Esther T. L. Lau, Steven J. Giddings, Salmaan G. Mohammed, Paul Dubois, Stuart K. Johnson, Roger A. Stanley, Peter J. Halley and Kathryn J. Steadman, Encapsulation of Hydrocortisone and Mesalazine in Zein Microparticles, Pharmaceutics 5, 277-293 (2013)
- [15] [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) - biotechnológiai vállalat honlapja
- [16] Szabó T., Mag-héj és tömör mátrix szerkezetű mikrokapszulák előállítása, valamint alkalmazása öngyógyító és biolerakódás-gátló bevonatokban, MTA TTK, Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Funkcionális Határfelületek Kutatócsoport (2014)
- [17] Pratap Y. Pawar, Anjali V. Lagad, Sandhya N. Bahir, Sumedha and R. Rathi, Simultaneous UV Spectrophotometric Method for Estimation of Isoniazid and Pyridoxine in Tablet Dosage Form, Der Pharma Chemica, 4 (2):749-754 (2012)
- [18] R. Dantes, J. Metcalfe, E. Kim, M. Kato-Maeda, P. C. Hopewell, M. Kawamura, P. Nahid, A. Cattamanchi, Impact of Isoniazid Resistance-Confering Mutations on the Clinical Presentation of Isoniazid Monoresistant

Tuberculosis, INH-R Mutations and Clinical Presentations, PLoS ONE |  
www.plosone.org, Volume 7, Issue 5 (2012)

- [19] D. Međeši, Isoniazid – metabolism, toxicity and interactions, University of Split, Faculty of Chemistry and Technology (2016)
- [20] [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isoniazid](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isoniazid) - kémiai adatbázis
- [21] F. M. Sakr, A programmable drug delivery system for oral administration, International Journal of Pharmaceutics 184, 131–139 (1999)
- [22] A. Avdeef, M. Strafford, E. Block, M. P. Balogh, W. Chambliss, I. Khan, Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes - Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst, European Journal of Pharmaceutical Sciences 14, 271–280 (2001)
- [23] M. S. Shanler, A. K. Mason, R. M. Crocker, R. Vardaro, C. L. Crespi, D. M. Stresser, E. S. Perloff, Automation of Pre-coated PAMPA Plates Improves Predictability, Reproducibility, and Efficiency, Application Note 475, Corning Incorporated - Life Sciences (2013)
- [24] X. (Kevin) Chen, A. Murawski, L. Hladik, C. L. Crespi, A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model, Application Note 479, Corning Incorporated - Life Sciences (2013)
- [25] R. Pandey, Photopolymers in 3D printing applications, Arcada, Degree Thesis, Plastics Technology (2014)
- [26] [ww.basiliskus.hu/sla-ipari-mugyantas/](http://ww.basiliskus.hu/sla-ipari-mugyantas/) - 3D nyomtatással foglalkozó cég
- [27] G. Pompeo, M. Girasole, A. Cricenti, F. Cattaruzza, A. Flamini, T. Prospero, J. Generosi, A. Congiu Castellano, AFM characterization of solid-supported lipid multilayers prepared by spin-coating, Biochimica et Biophysica Acta 1712 29 – 36 (2005)
- [28] P. Apel, Track etching technique in membrane technology, Radiation Measurements, 34, 559–566 (2001)
- [29] Fábrián I., Spektrofotometria (Fábrián István által összeállított szilabusz átdolgozott kiadása), Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék (2009)

- [30]** Bereznai M., Vékonyrétegek építése nitrogén és argon háttérgázban molibdén, volfrám, szén és bór-karbid céltárgyak impulzuslézeres ablációjával, PhD értekezés, Szegedi Tudományegyetem Egyetem, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (2011)
- [31]** Péntes C. B.; Membránalkotók, Gyógyszerhatóanyagok, Biopolimerek összetett struktúráinak vizsgálata felületjellemzési módszerekkel, Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem (2016)
- [32]** Pári E., Gyógyszerhordozó nanorészecskék kölcsönhatása lipid monoréteggel, Szakdolgozat, Eötvös Loránd Tudományegyetem (2014)