



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék

Természetes lipidkivonat alapú membránok permeabilitási viszonyainak vizsgálata

Tudományos diákköri dolgozat

Készítette: Dékány Gergely

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor

BME, Környezeti és Kémiai Folyamatmérnöki Tanszék

Egyetemi tanár

Konzulens: Vincze Anna

Ph.D. hallgató

2022.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Balogh György Tibornak, aki a témaválasztással segített, hogy beleláthassak a gyógyszerkutatásba, és szakmai munkájával hozzájárult a dolgozat elkészültéhez. Szeretném megköszönni a sok munkát, rengeteg türelmet és befektetett időt konzulensemnek, Vincze Annának, aki mérési munkámat és a dolgozat megírását koordinálta. Köszönetet mondanék továbbá Takács Gergőnek, Dr. Arany Ádámnak, és Formanek Andrásnak, akik segítséget nyújtottak a mérési adatok alapján készülő keminformatikai elemzések kapcsán, Dr. Balogh-Weiser Diánának, aki a Zeta-potenciálok mérésével segítette munkánkat, illetve Dr. Katona Gábornak, aki a liposzómák elkészítésével járult hozzá a dolgozat létrejöttéhez.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	6
2.	Irodalmi rész.....	7
2.1.	Permeabilitás	7
2.2.	Felszívódás vizsgálata a gyógyszerkutatásban	9
2.3.	In vitro modellek	9
2.4.	PAMPA	10
2.4.1.	Eltérő belépési kapukhoz köthető PAMPA modellek	14
2.4.2.	Totál és poláris lipidek összehasonlítása	19
2.5.	Zeta potenciál	20
2.6.	A gyógyszervegyületek kölcsönhatásai lipidmembránokkal	21
3.	Célkitűzés	23
4.	Kísérleti rész.....	24
4.1.	Felhasznált vegyületek, anyagok.....	24
4.2.	Alkalmazott eszközök, módszerek	25
4.2.1	Felhasznált eszközök	25
4.2.2	A vizsgálandó vegyületek kiválasztása	25
4.2.3	A PAMPA vizsgálatok kivitelezése	27
4.2.4	A Zeta-potenciál mérések kivitelezése	28
4.2.5	HPLC vizsgálat.....	29
4.2.6	Kimutatási határ (LOD) és a mennyiségi mérés alsó határának (LOQ) meghatározása	29
4.2.7	Statisztikai értékelés	30
4.3.	Eredmények.....	31
4.3.1	A felhasznált vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése	31
4.3.2	A kimutatási határ (LOD) és a mennyiségi mérés alsó határának (LOQ) eredményei	33
4.3.3	Összefüggés keresése a vegyületek ionizációs állapotai és a permeabilitás értékek között a vizsgált pH-n.....	33
4.3.4	A lipidmembránok összetétele és a zeta potenciál közötti összefüggések	35
4.3.5	A vegyületek szöveti lipidkivonat-páronként mért permeabilitásának összehasonlítása.....	39
4.3.6	A vegyületek szövetenként mért permeabilitásának összehasonlítása	42
4.4.	Összefoglalás.....	47
5.	Referenciák.....	50

Rövidítésjegyzék

Å	Ångström
ANOVA	Analysis of variance - Varianciaanalízis
ATP	Adenozin-trifoszfát
BBB	Blood-Brain Barrier - Vér-agy gát
CA	Kardiolipin
Caco-2	Human colon carcinoma cell line - Humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonala
CEC	Cerebral endothelial cell - Agyi hámsejt
CHO	Koleszterin
Da	Dalton
DAD	Diode-Array Detection - Diódasoros detektor
DMSO	Dimetil-szulfoxid
HBA	Hidrogén-kötés akceptor
HBD	Hidrogén-kötés donor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography - Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
LC	Liquid chromatography - Folyadékkromatográfia
LOD	Limit of Detection - Kimutatási határ
$\log D_{7,4}$	pH 7,4-hez tartozó látszólagos megoszlási hányados tízes alapú logaritmus
$\log P$	Semleges molekuláris formához tartozó megoszlási hányados tízes alapú logaritmus
LOQ	Limit of Quantification - A mennyiségi mérés alsó határa
Lyso PI	Lipáz eredetű foszfatidilinozitol
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells - Madin-Darby kutya-vese epitélium sejtvonala
MR	Membránretenció
MS	Mass spectrometry - Tömegspektrometria
PA	Foszfatidinsav
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay - Párhuzamosított mesterséges membrán permeabilitás mérési módszer
PBS	Phosphate buffered saline – Foszfát puffer
PC	Foszfatidilkolin

Pe	Effektív permeabilitás [cm/s]
PE	Foszfatidiletanolamin
PI	Foszfatidilinozitol
pK _a	A savi disszociációs állandó negatív tízes alapú logaritmus
PS	Foszfatidilszerin
PSA, TPSA	Polar Surface Area - Poláros molekulafelszín
PTFE	Politetrafluoretilén
PVDF	Polivinilidén-fluorid
t-SNE	t-elosztott sztochasztikus szomszéd beágyazási algoritmus
UV	Ultraibolya

1. Bevezetés

A gyógyszerkutatás korai fázisának egyik fontos feladata a hatékony szűrési lépések kidolgozása, mellyel a potenciális gyógyszerjelöltek köre leszűkíthető. Ennek egyik kiemelt iránya a hatóanyagok farmakokinetikai tulajdonságainak, így pl. a célzott szöveten történő hatóanyag felszívódásnak a vizsgálata, mely elsődlegesen in vitro rendszereken történik. Ilyen in vitro, 96-lyukú mérőtálca(plate)-alapú technika a PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) rendszer, amely nagyszámú vegyület gyors és robusztus permeabilitás vizsgálatát teszi lehetővé biomimetikus, mesterséges lipidmembránokon. A PAMPA rendszer segítségével kísérleti állatok feláldozása nélkül, relatíve olcsón kaphatunk nagyszámú vegyületre a szöveti permeabilitási viszonyokat jól közelítő adatokat, melyek segítségével a potenciális gyógyszerjelölt vegyületek köre szűkíthető. A kutatásunk célja három kereskedelmi forgalomban is elérhető szövetspecifikus lipidkeverék (vér-agy gát-, máj- és szív-specifikus lipid extraktumok) összehasonlítása. A méréseink során szerkezetileg diverz hatóanyagok penetrációs sajátságának változását vizsgáltuk különböző mesterséges lipidmembrán alapú PAMPA rendszerek segítségével. A hatóanyagok eltérő fizikai-kémiai tulajdonságai alapján (molekulatömeg, sav-bázis karakter, lipofilitás, oldhatóság, poláros molekulafelszín) várhatóan eltérő mértékben képesek felszívódni az egyes szövetspecifikus biológiai membránokon keresztül. A szövetspecifikus lipidextraktumok egymással történő összehasonlítása kiterjedt arra, hogy a különböző szövetekből izolált ún. totál és poláris lipidkeverékek eltérő összetételének van-e meghatározó hatása a kiválasztott hatóanyagok permeabilitására. Szakirodalmi adatok alapján a totál és poláris szövetspecifikus természetes lipid kivonatok permeabilitási viszonyait korábban még nem vizsgálták, ezek felhasználásáról csupán a vér-agy gáton (BBB) keresztüli hatóanyagfelszívódás modellezésében használt sertés poláris agyi lipidkivonat kapcsán találhatók kidolgozott ún. PAMPPA-BBB rendszerek [1], [2]. A méréseinket a kutatócsoport által korábban kidolgozott PAMPA módszerrel végeztük, eredményeinket az általános, hatóanyagok fizikai-kémiai sajátságát leíró paraméterek segítségével korreláltattuk.

2. Irodalmi rész

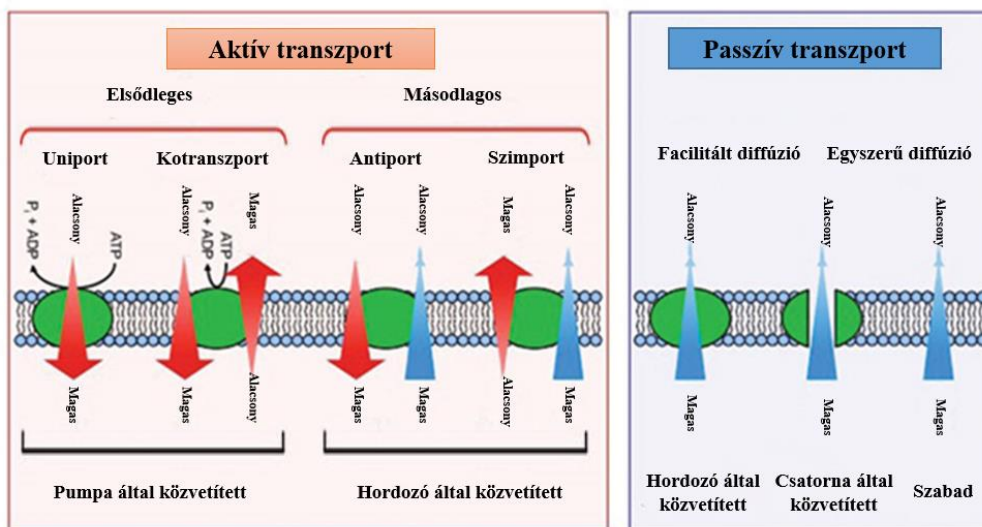
2.1. Permeabilitás

A szájon át vagy orális úton történő (*per os*) gyógyszerbevitel az egyik leggyakoribb gyógyszeradagolási forma, azonban a megfelelő dózis beállítása nem egyszerű feladat. *Per os* adagolás során a szervezetbe szilárd vagy folyadék halmazállapotú gyógyszerhatóanyag kerülhet. Így pl. szilárd halmazállapotú tabletta esetén először a gyógyszerforma szétesésére, majd a hatóanyag kioldódására van szükség. A megfelelő biohasznosuláshoz a hatóanyag oldódását követően keresztül kell jutnia a bélhám-sejtréteg membránrendszerén, hogy ezt követően először a májba (ún. first pass metabolizmus), majd a szisztémás keringésbe kerüljön. A nem megfelelő biohasznosulásnak több oka is lehet, ilyen pl. a csökkent felszívódási képesség a bélrendszeren keresztül/elégtelen permeabilitás, a rossz oldhatóság, csökkent kémiai stabilitás és fokozott metabolizmus [3].

A permeabilitás egy vegyület lipidmembrán kettősrétegen történő átjutásának sebességét adja meg. Egy gyógyszervegyület a szervezetünk különböző belépési kapuin keresztül szívódik fel, illetve oszlik meg különböző vizes terekben és szövetekben. Ilyen belépési kapu pl. egy kenőcs, vagy tapasz esetén a bőr hámszövet, szemcsepp esetén a szaruhártya, illetve a *per os* gyógyszeradagolás esetén a tápcsatorna (gasztrointesztinális traktus), de a vérkeringésbe jutva a hatóanyagok a szervezet más szöveteit is elérhetik, mint a májat, szívet, tüdőt vagy az agyat a vér-agy gáton keresztül. A felszívódáshoz a vegyületeknek át kell jutniuk a biológiai membránokon, mely történhet aktív és passzív transzport segítségével.

Passzív transzport során a folyamat hajtóereje a koncentráció gradiens a membrán apikális és bazolaterális oldala között, a folyamat energiabefektetés (ATP felhasználás) nélkül történik. Transzcelluláris diffúzió esetén a vegyületek a sejtmembránon, paracelluláris felszívódás esetén pedig a sejtek közötti vizes pórusokon haladnak át. A gyógyszerhatóanyagok jelentős része transzcelluláris úton szívódik fel. Ezek a vegyületek jellemzően *per os* adagolással kerülnek a szervezetbe, leggyakrabban lipofil jellegűek, és a felszívódás során a vékonybélben elhelyezkedő bélbolyhok jelentősen nagyobb felülete eredményezi azt, hogy ez a kedvezményezett felszívódási forma, és nem a paracelluláris útvonal [4]. A transzcelluláris felszívódás függ az ionizálható hatóanyagok töltöttségi állapotától, amit pK_a érték ismerete mellett a közeg pH-ja határoz meg. Függ továbbá az oktanol-víz megoszlási hányadostól, és a hidrogénkötések erősségétől is [5]. Paracelluláris transzport jellemzően 200 Da-nál kisebb molekulatömegű, hidrofil vegyületek esetén lehet jelentős felszívódási útvonal [6]. Endocitózissal nagyobb, lipofilebb karakterű molekulák juthatnak át a membránokon a vezikulák belsejében. Aktív transzport során ATP befektetésével, a koncentráció gradienssel

szemben is történhet felszívódás, melyekhez aktív transzportfehérjékre van szükség. Amennyiben az apikális irányból a bazolaterális irányba történik a transzport akkor influxról, ellentétes esetben efflux folyamatról beszélhetünk. A membránon történő áthaladás során történhet metabolizmus is, melyért főleg a citokróm P450 izoenzimek a felelősek. Az aktív és passzív transzportfolyamatok összehasonlítását az **1.ábra** mutatja be



1. ábra Az aktív és passzív transzportfolyamatok bemutatása [7]

A gyógyszermolekulák felszívódása elsődlegesen passzív transzporttal történik. A passzív transzport a sejtmembránokon történő átjutás elsődleges formája a legtöbb szerv esetén, azonban a diffúzió fontos azon molekulák esetén, melyek csekély mértékben tudnak passzív diffúzióval felszívódni. Facilitált diffúciónak nevezzük azt a hordozók (carrier) által végzett transzportfolyamatot, ahol a folyamat a koncentráció gradiens irányában történik, és nem szükséges hozzá további befektetett energia. A facilitált diffúzió főleg a máj, szív, és a vesén történő penetráció esetén jellemző [5]. A membránon való átjutást Fick I. törvényével írhatjuk le, ez passzív transzportot feltételez.

$$I = J \cdot A = -D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

- I Diffúziós anyagáram [mol/s]
- D Diffúziós állandó [m²/s]
- J Diffúziós anyagáram-sűrűség [mol/m²s]
- A Diffúziós felület nagysága [m²]
- c Koncentráció [mol/dm³]
- x Térbeli koordináta [-]

2.2. Felszívódás vizsgálata a gyógyszerkutatásban

A gyógyszerkutatás folyamatában a biológiai célponton megfelelő választ adó hatóanyag kiválasztása nehéz és költséges folyamat. Annak érdekében, hogy a gyógyszergyártó vállalatok ne pazarolják erőforrásaikat, a szintetizált vegyületeket több szempont szerint vizsgálják. A gyógyszervegyületek korai optimalizálása során több száz-ezer vegyület párhuzamos vizsgálata szükséges, hogy el tudják dönteni, melyekből válhat később vezérmolekula. Mivel nagy mennyiségű mintáról beszélünk, így szükség van nagy áteresztőképességű vizsgálati módszerekre. Az in silico modellek számítógépes szimulációk segítségével becsülnek adatokat gyorsan, ezáltal egy elsődleges képet kaphatunk a vegyületek tulajdonságairól. Kisebb áteresztőképességgel, de a valóságot jobban közelítő adatokat szolgáltatnak a 96/384 lyukú plate (mikrotiter tálca) alapú in vitro modellek, melyek modellezhetnek csak passzív transzportfolyamatokat (mesterséges lipidmembránok), illetve rendelkezésre állnak olyan in vitro sejtes modellek is, melyek képesek aktív és passzív transzport együttes vizsgálatára.

2.3. In vitro felszívódás, permeabilitási modellek

Az in vitro permeabilitási modelleket csoportosíthatjuk az alapján, hogy sejtes, vagy nem sejtes rendszerekről beszélünk. Az ipari gyógyszerkutatásban általánosan alkalmazott sejtes vizsgálati rendszerek a Caco-2 és az MDCK modellek, ahol humán vastagbél, illetve kutyavese eredetű sejtvonalakat használnak általában 12/24, ritkábban 96 lyukú mérőtálcákon. Mivel ezekben a sejtes rendszerekben transzportfehérjék is megtalálhatók, ezért aktív és passzív transzport, továbbá metabolikus folyamatok modellezésére is alkalmasak. Ezzel szemben a nem sejtes, mesterséges lipidmembrán alapú módszerekkel (pl. PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) csak passzív transzport modellezhető. A gyógyszerfejlesztés különböző szakaszaiban eltérő in vitro módszereket alkalmaznak, hiszen a vizsgálandó vegyületek számosságának jelentős eltérése miatt lényeges kérdés az ár, az áteresztőképesség, és a transzportfolyamat, amit modellezni kívánunk (**2. ábra**). A korai fázisban a nagyszámú vegyület előszűrése során az in vitro PAMPA rendszer használata előnyös, mivel olcsóbb, nagy áteresztőképességű (96 lyukú mérőtálca) [8], és emellett megfelelő közelítő eredményeket szolgáltat, hiszen a kismolekulás gyógyszervegyületek mintegy 80%-a elsődlegesen passzív transzport útján szívódik fel a tápcsatornán keresztül. Az elsődleges szűrési feltételeket teljesítő vezérmolekulák (lead-ek) optimalizálásához, és az elő-fejlesztéséhez mind a sejtes (Caco-2, MDCK), mind a PAMPA rendszer megfelelő információt szolgáltat, míg a fejlesztési folyamatban, és az in vivo preklinikai vizsgálatok értelmezéséhez inkább a sejtes rendszerek alkalmazása kerül előtérbe. Ki kell emelni azonban, hogy a PAMPA rendszerrel szemben a sejtes rendszerek hátránya, hogy a sejtek növesztésének időtartama jellemzően 7-15 nap, ezáltal

hosszú előkészítést igényel, és a biológiai rendszer komplexitásának eredményeképpen a reprodukálhatósága és robusztussága is rosszabb, mint a mesterséges lipid alapú permeabilitási rendszereknek [8].

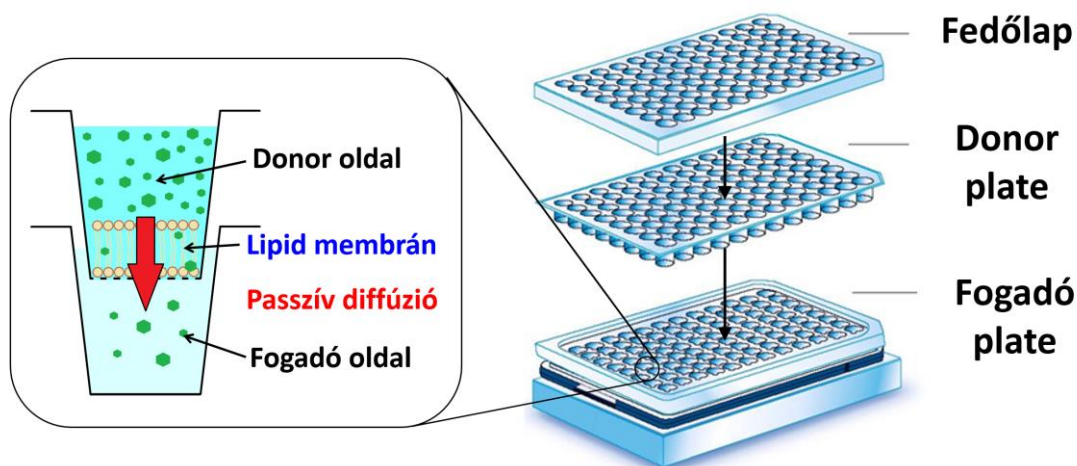


2. ábra Gyógyszerfelszívódási modellek ábrázolása a költség, az előrejelzés jósága és az áteresztőképesség szempontjából

2.4. PAMPA modell

A PAMPA egy 96-lyukú mérőtálca alapú in vitro módszer, amely passzív transzport modellezésre alkalmas. A PAMPA lehetőséget ad különböző farmakokinetikai vizsgálatok elvégzésére, többek között különböző lipidösszetételű, illetve eltérő szövetspecifikus lipidizolátum alapú membránokon történő felszívódás (abszorpció) vizsgálatára, vagy szöveti gyógyszerfelhalmozódás pl.: foszfolipidózis előrejelzésére. A rendszer leírására gyakran használják a „szendvics” kifejezést, mivel az egy donor, és egy fogadó tálcából áll. A donor oldal jellemzően a membrán apikális, míg a fogadó a bazolaterális oldalt hivatott modellezni. A felső mikrotiter tálca (plate) alján egy pórusos polimer szűrőréteg található melynek anyaga szerves oldószer hatására nedvesedő polivinilidén-fluorid (PVDF). A szűrőmembrán funkciója, hogy támasztékot nyújtson a mesterséges lipid oldatnak, ami a rendszerben a membránt, azaz a modellezni kívánt biológiai belépési kaput biztosítja. A donor oldalra a gyógyszermolekulák fiziológiás térnek megfelelő pH-n pufferált, jellemzően 100-500 μM -os oldata kerül. A fogadó oldalra rendszerint a vérnek, vagy intersticiális folyadéknak megfelelő pH 7,4-es vizes puffer kerül. Ezt követően a tálcákat egymásba illesztik, desztillált vízzel megnedvesített papírvattával letakarják a párolgási veszteségek csökkentésére, majd erre egy műanyag fedlap kerül. Ezt követően megfelelő ideig adott hőmérsékleten (leggyakrabban az emberi testre jellemző fiziológiás hőmérsékleten, azaz 37°C-on) inkubálják a rendszert. Az inkubációs idő letelte után

a donor és fogadó plate-et szétszedik, és nagy áteresztőképességű analitikai módszerekkel pl. UV plate-olvasóval, LC-DAD-MS segítségével meghatározzák a donor és fogadó mérőtálca lyukaiban (well) a hatóanyagkoncentrációkat. A vizsgált vegyületek penetrációs sebességét az ún. effektív permeabilitással jellemzik.



3. ábra A PAMPA rendszer elrendezése [9]

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \left(\frac{V_F \cdot V_D}{V_F + V_D} \right) \cdot \log \left[1 - \left(\frac{V_F \cdot V_D}{(1 - MR) \cdot V_D} \right) \cdot \frac{c_D(t)}{c_D(0)} \right] \quad (2)$$

A Szűrőfelület [cm²]

t Inkubációs idő [s]

τ_{ss} Az állandósult állapot beálltának ideje [s]

V_F A fogadó oldal térfogata [cm³]

V_D A donor oldal térfogata [cm³]

c_D A vizsgált vegyület donor oldali koncentrációja [mol/cm³]

MR Membránretenció [-]

P_e Effektív permeabilitás [cm/s]

Az egyenletben szereplő MR rövidítés a becsült membránretenció, mely a membránban ragadt hatóanyag mennyiségét jelenti.

$$MR = \left(1 - \frac{c_D(t)}{c_D(0)} - \frac{V_F}{V_D} \frac{c_F(t)}{c_D(t)} \right) \quad (3)$$

$c_F(t)$ A vizsgált vegyület fogadó oldalon mért koncentrációja a „t” időpillanatban [mol/cm³]

A PAMPA rendszerrel az elsősorban passzív transzport segítségével felszívódó vegyületek vizsgálhatók megfelelő jósággal, azonban a megfelelő paraméterek megváltoztatásával a rendszer jól közelítheti az in vivo adatokat. A membránrendszert tekintve alkalmazhatunk lipid nélküli oldószermembránokat, mint a dodekán, hexán, vagy használhatunk ún. monolipid membránt, ahol egyfajta foszfolipid szerves oldószeres oldatát hozzuk létre (pl. foszfatidilkolin, foszfatidiletanolamin, stb.) A foszfolipidek mellett egy a membránintegritást nagymértékben befolyásoló membránalkotót, a koleszterint is szokták alkalmazni. Ezek mellett használhatunk a mestésleges membrán kialakításánál jóval összetettebb ún. szövetspecifikus lipidkeverékeket, melyek jellemzően állati (sertés, szarvasmarha) eredetűek.

A PAMPA modell egy másik változtatható paramétere a vizes közegek pH-ja. Használhatunk izo-pH-jú rendszert, ahol a donor és fogadó oldalon is azonos, jellemzően az intersticiális térnek, vagy a vérnek megfelelő pH 7,4-es közeget alkalmaznak. Gradiens-pH esetén a donor és fogadó oldal pH-ja eltérő. A fogadó oldal jellemzően itt is 7,4-es pH-jú, míg a donor oldalon kialakított pH 2-8-as közeg a gasztrointesztinális traktus egyes szakaszainak (2,0 – gyomor, 5,5 – patkóbél, 6,5 – vékonybél, stb.) felel meg. Az ionizálható molekulák effektív permeabilitása jelentősen változhat a közeg pH-jával, a töltéssel nem rendelkező molekulák esetén izo-, és gradiens pH esetén is hasonló a penetráció értéke. Gyenge savak permeabilitása jelentősebb, gradiens pH alkalmazásakor, (ha $pH_{donor} < pH_{akceptor}$) mint izo-pH rendszerben, míg gyenge bázisok esetén éppen ellenkező hatás figyelhető meg [10].

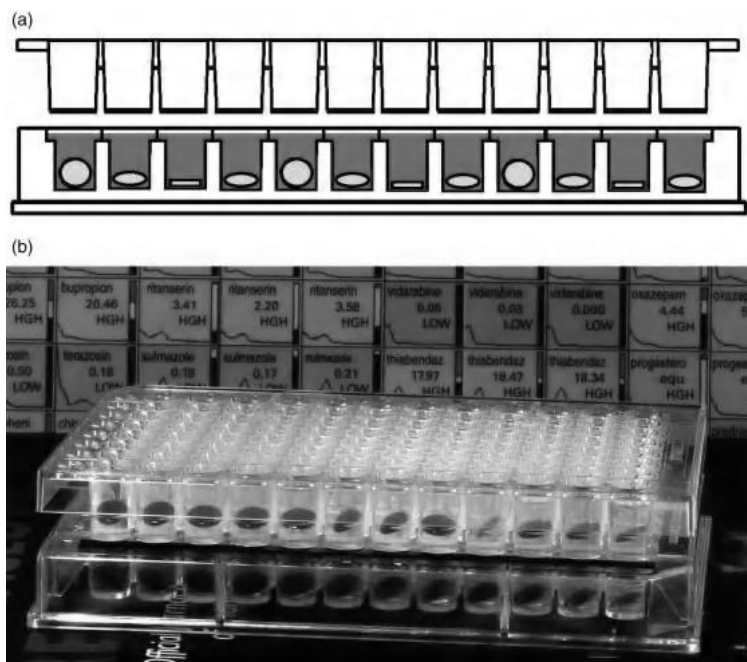
Rosszul oldódó vegyületek esetén mind a donor, mind a fogadó oldalon célravezető lehet koszolvenssek (pl. DMSO vagy acetonitril) alkalmazása is. Általánosságban a vízzel elegyedő koszolvenssek adagolása várhatóan csökkenti a membrán-víz megoszlási hányadost. Növekvő mennyiségű koszolvens adagolása esetén megfigyelhető volt, hogy a permeabilitási koefficiens értéke csökkent [11].

A fogadó cellában használható még akár humán szérum albumin (a vérplazma pontosabb modellezésére), mely a fogadó oldalon lévő szabad hatóanyag koncentrációját csökkenti ezáltal növelve/állandó értéken tartva a koncentráció gradienst. Sawada és munkatársai kimutatták, hogy a plazmafehérje kötődés jelentősen befolyásolja a molekulák permeabilitását sejtmembránok esetén. Penetráció során a fogadó oldalon megjelenő anyagok mennyisége jelentősen befolyásolható a jelenlévő szérum fehérjék segítségével, melyek a membránról történő deszorpció sebességét befolyásolják [10].

Az inkubálási körülmények változtatásával érhetünk el minél inkább az in vivo rendszerhez hasonló körülményeket. Az inkubálás jellemző időtartama 1-24 óra a vegyületek

lipofilitásától függően [12]. Az inkubálás történhet szobahőmérsékleten, azonban jelentősen csökkenthető a mérési idő, ha a vizsgálatot az emberi testre jellemző fiziológiás 37°C-on végezzük.

Végül a fogadó cella kevertetése a felszívódás útját meghatározó, a vér hígítási és elszállítási hatását hivatott modellezni melynek köszönhetően a membrán nem kevert határrétege, a koncentráció gradiens jelentősen befolyásolható. Az anyagátadási műveletek során, ha turbulens áramlás van a folyadék főtömegében, megkülönböztetünk egy turbulens, egy átmeneti és egy lamináris réteget. A lamináris határréteg vastagsága függ a keverés hatékonyságától, itt az anyag csak diffúzió segítségével halad át [13]. A kevertetés hatására lecsökken a nem kevert határréteg vastagsága, mely azt eredményezi, hogy csökken a rétegen diffúzióval történő áthaladás ideje. A keverés történhet pl. egy ún. orbital plate shaker segítségével, mely egy rezgő lap alkalmazásával homogenizálja a well-ek tartalmát. A módszer hátránya, hogy a 96 lyukű cellák esetén nem egyenletesen történik a homogén eloszlás. Mérések alapján kimutatható, hogy a nem kevert határréteg vastagsága a plate szélén jóval alacsonyabb, mint a középben elhelyezkedő well-ekben. Egy másik megoldás lehet, ha minden fogadó (alsó) cellát önállóan kevertetünk (**4. ábra**), melyeket egy külső mágnes segítségével közel vízszintes irányú forgásra kényszerítünk, így homogenizálva az alsó (fogadó) well-ek oldatát [14], [15].



4. ábra A mágneses keverővel ellátott PAMPA plate [14]

2.4.1. Eltérő belépési kapukhoz köthető PAMPA modellek

Tápcsatorna (gasztrointesztinális traktus) modell

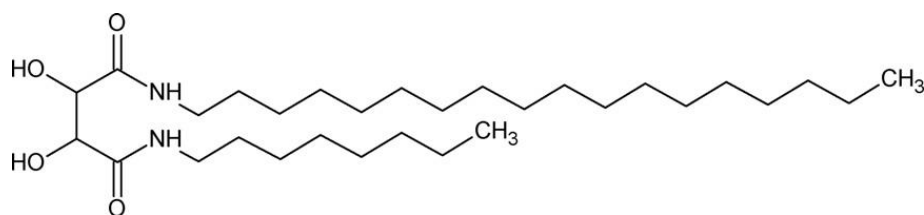
A gyógyszerek jellemző adagolási formája a szájon keresztül történő, orális adagolás. Ennek előnye, hogy gazdaságosan, nagy tömegben gyártható, jól tárolható hatóanyagok kerülnek kereskedelmi forgalomba. *Per os* adagolás során a hatóanyag a nyelőcsőn keresztül a gyomorba jut, mely csekély vérellátása, viszonylag kis felülete, és rövid tartózkodási ideje révén nem járul hozzá jelentősen a hatóanyag felszívódásához. A felszívódás legjelentősebb része a vékonybélben történik, melynek pH-ja folyamatosan változik. A vékonybélből történő kilépés után a vastagbélben hatóanyag felszívódás jelentősen visszaszorul. A béltraktus belső felét egy ún. felszívóhám borítja, melyen keresztül a hatóanyag a vérkapillárisokba, majd a kapuvénába, ezáltal a májba, végül a szisztémás vérkeringésbe kerül (first pass). A lényegesen változó pH, a nagy felület és jó vérellátás mellett még a gyomor és béltraktus mozgása is jelentősen befolyásolja a felszívódást a tranzitidő révén. A tranzitidő az egyes szakaszokon történő áthaladás időtartama, mely eltér üres és táplált gyomor esetén is. Befolyásolhatja a felszívódást az ételinterakció, mely az élelmiszerekkel történő kölcsönhatás. A felszívódás transzcelluláris, paracelluláris módon passzív transzport segítségével, emellett facilitált diffúzióval, aktív transzporttal is történhet. Megfelelő felszívódás eléréséhez a gyógyszernek némileg vízoldhatónak, azonban a membránon keresztüli átjutásához megfelelően lipofilnek is kell lennie. Végül fontos, hogy ellenálló legyen a gyomor savas közegével, a hidrolitikus enzimekkel szemben, és előnyös, ha a molekula mérete nem túl nagy ($\leq 500 \text{ Da}$) [16].

A kutatócsoportunk által is használt módszer szerint a gasztrointesztinális traktust modellező GI-PAMPA modellben a hatóanyagok 6,5-ös pH-jú foszfátpufferben (PBS) kerülnek feloldásra. A membránok előállításához 16 mg foszfatidilkolin (PC) és 8 mg koleszterin (CHO) oldunk 600 μl dodekánban. Az így előállított membránból 5 μl -t mérünk ki minden well-be. A donor oldalra 150 μl hatóanyagoldatot, a fogadó platebe 300 μl 7,4-es pH-jú PBS oldat kerül kimérésre. A rendszer összeillesztését követően az inkubáció 37°C-on 4 órán keresztül történik [17]. A gasztrointesztinális traktus során eltérő szakaszok esetén eltérő pH értékek jellemzőek. A gyomor esetében erősen savas pH 2-es, a vékonybél esetén átlagosan pH 6,5-ös az apikális közeg. A modellezni kívánt szakasztól függően tehát a donor oldal pH-jának beállításával modellezhető megfelelően a fennálló koncentráció gradiens.

Transzdermális modell

A szervezetet a külvilágtól elválasztó legnagyobb szervünk a bőr, így a bőrön keresztüli felszívódás fontos kérdés a gyógyszerkutatásban, illetve a kozmetikai iparban is. A bőrön keresztüli felszívódást használják ki pl. hormonpótlásnál, nikotin tapaszok esetén, illetve akár

fájdalomcsillapítók lokális bejuttatásához is. Az itt felszívódó gyógyszereknek végig kell haladnia a stratum corneumon, mely körülbelül 50% ceramidot, 35% szabad zsírsavat, és 15% koleszterint tartalmaz. A penetráció méréséhez legpontosabban in vivo adatokat használhatunk, azonban nagyszámú vegyület vizsgálata esetén ez drága, munkaerőigényes és lassú, így szükség van nagy áteresztőképességű vizsgálatokra. A gyakorlatban a bőr-PAMPA modellezéséhez a drága ceramidok helyett certramidokat alkalmaznak, mivel ezek olcsón szintetizálhatók, szénláncuk hossza, lipofilitásuk, hidrogén donor képességük közel azonos, mint a ceramidoké. Kutatócsoportunk 2012-es közleményében az in vivo adatokkal legjobban korreláló mérési módszer 50% C8-C18 típusú certramidot tartalmazott, 25-25% szabad zsírsavval és koleszterinnel kiegészítve [18]. Ez alkotta a mesterséges membrán összetételét. A megfelelő lipidösszetételű rendszer kloroformban került feloldásra, majd ebből 10-10 µl került minden mérési helyre. A donor oldalra kevert rendszer esetén 180 µl, nem kevert rendszer esetén 200 µl Britton-Robinson puffer segítségével elkészített pufferoldatot töltöttek, eltérő pH értékeken, mely még 1% DMSO-t is tartalmazott. A fogadó oldalra 200 µl 7,4-es pH-jú Britton-Robinson puffer került bemérésre. Kevert rendszer esetén 4, nem kevert rendszer esetén 24-40 óra inkubálási időt alkalmaztak.



5. ábra A gyakorlatban alkalmazott C8-C18 típusú certramid szerkezete [18]

Vér-agy gát modell

A gyógyszerkutatás és fejlesztés során az új hatóanyagok vér-agy gáton történő felszívódása jelentős nehézségeket okoz, mivel a makromolekulák közel 100%-a, a kismolekulás vegyületek körülbelül 98%-a nem képes áthaladni azon, illetve ha fel is szívódnak, ki vannak téve szöveti lipidek általi megkötődésnek, a fokozott mértékű effluxnak, illetve metabolikus reakcióknak is. A vér-agy gáton történő átjutás fontos a központi idegrendszert stimuláló készítmények fejlesztése során, mivel a vér-agy gát agyi kapilláris erek endotél sejtjeiből áll (cerebral endothelial cells, CECs), melyek limitálják az áthaladást a mikroekekbe, mivel ezekben a sejtekben jóval jelentősebb a metabolikus aktivitás [12]. Az in vitro modellek kidolgozása során fontos, hogy minél több, a vér-agy gátra jellemző tulajdonság megjelenjen a modellben, azonban az maradjon praktikus, hozzáférhető és nagy áteresztőképességű. A központi idegrendszerbe történő felszívódás vizsgálatára nincs egyértelmű módszer, azonban például sertés agyból készült kivonatok segítségével próbálták

modellezni a felszívódást dodekánban oldva. Az eljárást Li Di és munkatársai dolgozták ki. A vegyületeket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldották fel, és ezt követően membránként dodekánban oldott sertés agy extraktum segítségével végeztek méréseket [1], [19].

A kutatócsoportunk által 2015-ben kidolgozott eljárás szerint a gyógyszervegyületeket DMSO-ban feloldva, PBS segítségével hígították 100 μM koncentrációra (297 μl puffer+3 μl a dimetil-szulfoxidban 10 mM-os koncentrációban oldott vegyületekből). Ezt követően az elkészített oldatokat szobahőmérsékleten 1 órán keresztül rázatták, majd leszűrték a szilárd maradványok eltávolításának érdekében. A plate szűrőrétegére 5 μl poláris sertés agy extraktum hexán-dodekán 3:1 arányú oldatát helyezték, ezt követően a rendszert 4 órán keresztül inkubálták a fiziológias 37°C-os hőmérsékleten [20].

Bukkális nyálkahártya modell

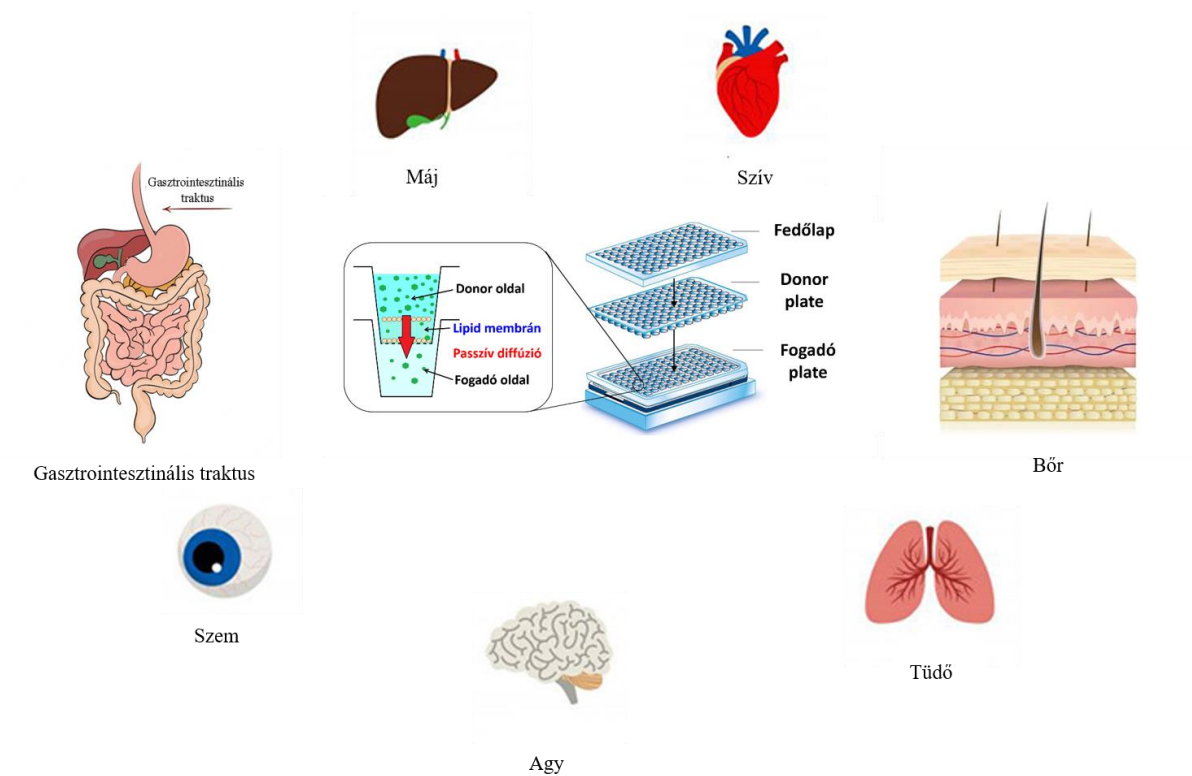
A bukkális nyálkahártyán történő gyógyszerfelszívódás farmakokinetikai jelentősége, hogy ezzel a teljes gasztrointesztinális traktus megkerülhető, ezáltal a hatóanyag gyorsabban jut a szisztémás keringésbe, megkerülve a first pass metabolizmust. A lehetőségek azonban kissé behatároltak a viszonylag kis felület (kb. 50 cm^2), az akaratlan nyelés, illetve a nyál által elvezetett hatóanyag miatt [21]. Az emberi bukkális nyálkahártya többrétegű, és mind a paracelluláris, mind a transzcelluláris úton történhet penetráció. A felszívódás kb. 4-4000-szer jobb, mint bőrön keresztül [22]. A bukkális gyógyszeradagolás gyors helyi és általános hatást biztosít, mivel a száj vérellátása gazdag, emellett azon molekulák alkalmazása is lehetséges melyek savérzékenyek. Bukkális gyógyszeradagolást főleg helyi hatást kifejtő hatóanyagok esetén alkalmaznak [16].

A kutatócsoportunk által 2015-ben kidolgozott PAMPA rendszerrel végzett mérésekhez 100 μM -os oldatokat állítottak elő úgy, hogy a vegyületeket DMSO-ban oldva 10 mM-os oldatokat képeztek, melyeket 6,8-as pH-jú foszfát pufferrel hígítottak a szükséges koncentrációkra. Ezt követően az oldatokat egy órán keresztül szobahőmérsékleten rázták. A donor plate-en minden lyukba 5 μl dodekán, vagy dodekánban oldott lipidek kerültek (pl. foszfatidilkolin és koleszterin). Az alkalmazott membránkompozíciókkal megmért permeabilitás értékeket ex vivo adatokkal (sertés bukkális nyálkahártya) összevetve a legmagasabb korrelációt a lipidmentes dodekán segítségével érték el. Ezt követően a donor oldalra 150 μl gyógyszeroldat, a fogadó oldalra 300 μl 0,01M-os 7,4-es pH-jú foszfát-puffer került kimérésre. A rendszert ezt követően 4 órán keresztül 37°C-os hőmérsékleten inkubálták [23].

Szaruhártya modell

Az emberi szem esetén többnyire helyi alkalmazású (topikális) formulákat használnak, mivel a szem egy viszonylag elszigetelt szerv. A topikális alkalmazás előnye, hogy fájdalommentes és többnyire egyszerű (pl. a szemcseppek, szemkenőcsök használata), azonban a szemén keresztüli penetráció összetett folyamat, a könnyképződés, és az akaratlan pislogás miatt. További gyógyszereszeséget okozhat még a megkötődés a könnyfilmben lévő fehérjéken és a metabolizmus is. A felszívódás során előnyt jelent, ha a vegyület lipofil tulajdonságú, és kisebb méretű, mivel a makromolekulák számára szinte teljes mértékben áthatolhatatlan a szaruhártya hámszövet. A kutatások megmutatták, hogy a helyi alkalmazású vegyületek mindössze kb. 10%-a képes elérni az intraokuláris teret a szem öntisztító mechanizmusainak és a gyér felszívódásnak köszönhetően [24]. A felszívódást a sejtek szoros illeszkedése (tight junction) jelentősen megnehezíti, ezért a preferált út a paracelluláris, azonban a lipofil vegyületek inkább a transzcelluláris utat választják. Mindazonáltal a túlzottan lipofil tulajdonságú vegyületek felszívódását a hidrofil jellegű támasztószövet (stroma) limitálhatja [25].

A vegyületek penetrációjának vizsgálatára több ex vivo és in vitro sejtes és nem-sejtes módszer is rendelkezésre áll. Az ex vivo és a sejtes módszerek laboratóriumi állatok feláldozásával járhatnak, míg a nem-sejtes PAMPA módszer egy foszfolipid membrán segítségével kínál lehetőséget a permeabilitás vizsgálatok elvégzésére, melyet szintén kutatócsoportunk dolgozott ki és 2019-ben publikált. A modellmembrán ebben az esetben foszfatidilkolin (PC) hexán:dodekán:kloroform (70:25:5 V/V%) oldószerkeletben készült oldata, a rendszer izo-pH 7,4 alapú. A vegyületek feloldása foszfát-pufferben (PBS, pH 7,4) történik, az inkubálási idő 4 óra, hőmérséklet a szemre jellemző 35°C [26].



6. ábra PAMPA és a segítségével vizsgálható néhány szerv

1. táblázat A PAMPA modellek összehasonlítása

	Membrán összetétel	Membrán oldószere	Inkubálási körülmények
Gasztrointesztinális (GI-PAMPA)	foszfatidilkolin+koleszterin	dodekán	4 óra 37°C-os hőmérsékleten
Transzdermális (Skin-PAMPA)	50% C8-C18 ceramid 25% szabad zsírsav 25% koleszterin	Kloroform	Kevert rendszer esetén 4 óra Nem kevert rendszer esetén 24-40 óra
Vér-agy gát (PAMPA-BBB)	Poláris sertés agy extraktum	hexán:dodekán (3:1)	4 óra 37°C-os hőmérsékleten
Bukkális nyálkahártya	Foszfatidilkolin és koleszterin	dodekán	4 óra 37°C-os hőmérsékleten
Szaruhártya (Corneal-PAMPA)	Foszfatidilkolin	hexán-dodekán-kloroform (70:25:5 V/V%)	4 óra 35°C-os hőmérsékleten

2.4.2. Totál és poláris lipidek összehasonlítása

A PAMPA rendszerrel végzett munka során modellparaméterként változtathatók az oldószerek, a benne oldott foszfolipidek vagy szövetspecifikus lipidkeverékek is. Munkám során három kereskedelmi forgalomban kapható szövetspecifikus lipidkivonat-párral dolgoztunk (máj, szív és agy eredetű lipidkivonatok), páronként az egyik egy ún. totál, a másik egy poláris lipidfrakció volt. A totál lipid egy kloroform-metanol oldószerkeverégből nyert extraktum az adott szövetből. Az extraktum megoszlik az ionmentesített vízzel szemben, a kloroformos fázist betöményítik. A poláris lipidkivonatot a totál lipidből nyerik. A poláris lipid készítése során a totál lipidből aceton segítségével készítenek egy csapadékot, és az acetonban oldhatatlan részt dietil-éter segítségével extrahálják [27]. A mérési munkám során alkalmazott három lipidmembrán-pár a szív-, máj-, és agy totál illetve poláris lipidek voltak. A lipidkeverékek tömegszázalékos összetételét az alábbi táblázatban foglaltuk össze a gyártó honlapján megadott adatok alapján.

2. táblázat A szövetspecifikus totál és poláris lipidkeverékek tömegszázalékos összetétele [27]

	Szív poláris	Szív totál	Máj poláris	Máj totál	Agy poláris	Agy totál
PC [%]	8,6	5,4	42	42	12,6	9,6
PE [%]	13,6	6,8	26	22	33,1	16,7
PI [%]	1	2,5	9	8	4,1	1,6
PA [%]	0,6	1,1	-	-	0,8	2,8
CA [%]	1,7	2,3	-	-	-	-
Neutrális lipidek [%]	57,7	49,8	-	-	-	-
Ismeretlen [%]	16,8	32,1	-	-	30,9	58,7
Lyso PI [%]	-	-	1	1	-	-
Koleszterin [%]	-	-	5	7	-	-
Egyéb neutrális lipidek [%]	-	-	17	20	-	-
PS [%]	-	-	-	-	18,5	10,6

PC: Foszfátidilkolin

PE: Foszfátidiletanolamin

PI: Foszfátidilinozitol

PA: Foszfátidinsav

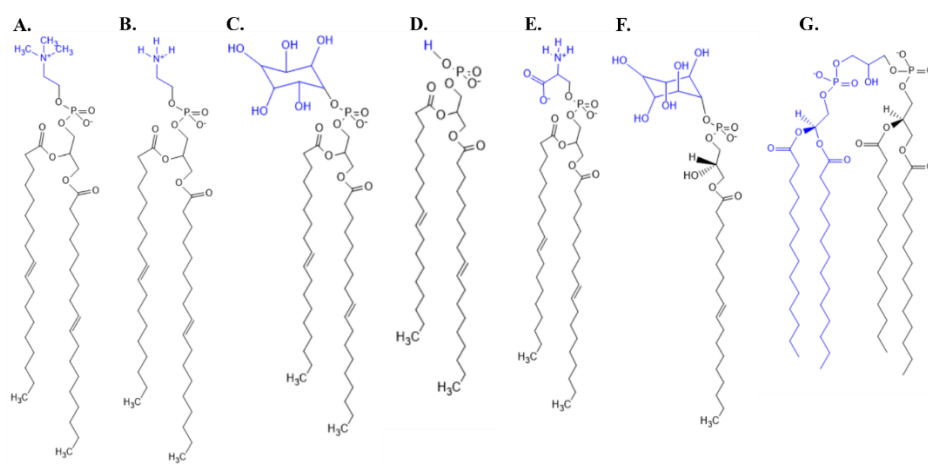
CA: Kardiolipin

PS: Foszfátidilszerin

Lyso PI: Lipáz eredetű foszfátidilinozitol

3. táblázat A foszfolipidek nettó töltései

Anyag megnevezése	Nettó töltés
Foszfátidilkolin	0
Foszfátidiletanolamin	0
Foszfátidilinozitol	-1
Foszfátidinsav	-1
Kardiolipin	-2
Foszfátidilszerin	-1
Lipáz eredetű foszfátidilinozitol	-1



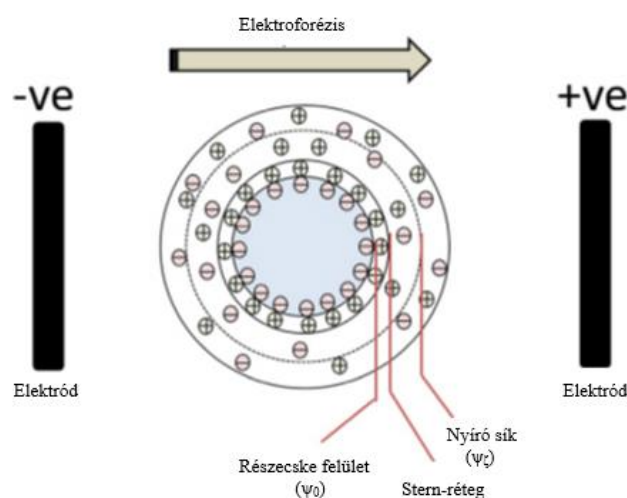
7. ábra A foszfolipidek szerkezeti képletei **A:** foszfátidilkolin, **B:** foszfátidiletanolamin, **C:** foszfátidilinozitol, **D:** foszfátidinsav, **E:** kardiolipin, **F:** foszfátidilszerin, **G:** lipáz eredetű foszfátidilinozitol [28]

A gyártó által közölt adatok alapján jól látható, hogy az azonos szervekből származó extraktumok esetében is jelentős különbségek vannak a lipidfrakciókat tekintve. Emellett az agy- és a szív-extraktumok esetében a gyártó által nem ismertett komponensek is lényeges arányban megtalálhatók.

2.5. Zeta-potenciál

A Zeta-potenciál vagy más néven elektrokinetikus potenciál, egy a kolloid részecske nyíró felületén (shear plane/slipping plane) ébredő potenciál, miközben az egy elektromos térben (elektrolitban) mozog. Mikor részecskéket folyadék fázisban diszpergálnak, akkor azok felületén egy ún. elektromos kettősréteg (electric double layer, ún. Stern-réteg és diffúziós réteg) alakul ki. A belső réteg főleg olyan ionokból vagy molekulákból alakul ki, melyek ellentétes töltésűek a részecskéhez képest, ezt hívjuk Stern-rétegnek (**8. ábra**). A további részekben a felületi töltéseknek köszönhetően az elektrosztatikus hatások exponenciálisan

csökkennek (nullába tart), azonban ezek a gyakorlatban a felülettől csupán néhány nm távolságig észlelhetők. A Stern-rétegen kívül egy diffúziós réteg alakul ki, mely ezzel együtt alkotja az elektromos kettősréteget. A diffúziós réteg dinamikusan változik és jelentősen befolyásolhatja pl. a pH, az ionerősség és a koncentráció is. Elektromos tér hatására a töltött részecskék a velük ellentétes töltéssel rendelkező elektród irányába mozdulnak el, ez az elektroforézis jelensége. A diffúziós rétegen kívül van egy hipotetikus felület a mozgó részecskefázis és a folyadékfázis réteg között, ez az ún. nyíró felület. A Zeta-potenciál tehát a folyadék-részecske határfelületén kialakuló potenciál, melyet mérni elektroforetikus fényszóródáson vagy elektroakusztikus jelenségen alapulva lehet [29].



8. ábra Az elektroforézis bemutatása [29]

Elektroforetikus fényszóródás

Az elektromos tér hatására mozgó részecskék felületén megtörik a beeső lézersugár, aminek hatására annak frekvenciája megváltozik az eredeti lézersugár frekvenciájához képest. A frekvencia változása arányos a részecske sebességével (Doppler eltolódás). A részecske sebességének meghatározása után a Zeta-potenciál számítható.

Elektroakusztikus jelenség

Egy nagy frekvenciás elektromos mezőt alkalmaznak, mely a részecskéket oszcilláló mozgásra kényszeríti. Az oszcilláció mértékét befolyásolja a Zeta-potenciál és a részecske mérete [29].

2.6. A gyógyszervegyületek kölcsönhatásai lipidmembránokkal

A hatóanyag-lipid kölcsönhatásokat három csoportba sorolhatjuk. Az első a gyógyszervegyületek megoszlása a membrán felé. A második a gyógyszervegyület és a

lipidmembrán tulajdonságainak hatása a permeabilitásra. A harmadik a gyógyszerek hatása a lipidmembránok tulajdonságaira pl. a lipid kettősréteg domainjében történő laterális szerveződésükre. A gyógyszer-lipid kölcsönhatások lényeges szerepet játszanak pl. a gasztrointesztinális permeációban, és a testben történő eloszlásban.

A gyógyszervegyület-lipid kölcsönhatások előrejelzésének az egyik legegyszerűbb módja a számított lipofilitás értékének meghatározására ($\log P$). Mivel az oktanol a lipid kettősréteghez hasonlóan lipofil, és részlegesen amfifil sajátosságú, ezért az adatok némileg korrelálnak, azonban az oktanol-víz rendszerben mért $\log P$ értékek nem tökéletesek a lipid-víz megoszlás leírására. Neutrális molekulák megoszlásának becslésére alkalmazható a számított megoszlási hányados ($\log D$), azonban savas/bázikus karakterű vegyületek esetén a korreláció mértéke csekély. Ez jelentős probléma, mivel a gyógyszervegyületek mindössze 37%-a semleges karakterű, így ez mindössze ezek becslésére megfelelő. Becsült adatok esetén a korrelációt jelentősen javíthatja az anizotróp membrán modell használata a számítások során. Az oktanol-víz megoszlás alapján számított adatok előrejelző képessége nem tökéletes, mivel a lipid kettősréteg egy heterogén és anizotropikus közeg. A poláris csoportokkal rendelkező vegyületek a lipid-víz felületen, az inkább lipofil tulajdonságokkal rendelkező vegyületek pedig a lipidek lipofil oldalláncában gazdag területen ágyazódnak be. A lipidek kettősrétegbe rendeződése során a lipofil zsírsav oldalláncok a kettősréteg belsejében, a hidrofil részek pedig kettősréteg külső felén helyezkednek el. A töltéssel rendelkező gyógyszervegyületek közül térállását tekintve preferált, ha a vegyület negatív fele halad a lipid kettősréteg felé, ebben az esetben jobb kötődés érhető el a vegyület és a lipid között. Hidrofób aromás gyűrűk esetében jobb kapcsolat kialakítása érhető el amennyiben azokat halogénezik. Ez annak köszönhető, hogy a halogénatom eltolja a gyűrűs vegyület töltés eloszlását, ezzel kialakítva egy kedvezőbb negatív töltést a gyűrű közepében. Egy másik tulajdonság, amely nem jellemezhető tökéletesen, az oktanol-víz megoszlási hányados segítségével a laterális nyomásprofil. Ezzel kapcsolatos tulajdonságok pl. a laterális nyomás, a hajlítási feszültség (curvature stress) és az effektív geometrikus alak. A lipid kettősrétegnek, amennyiben nem feszíti erő, vagy nincs összenyomva, nincs, vagy közel nulla a laterális nyomása. Amennyiben bármilyen más hatást érzékel, akkor ez a nyomásprofil megváltozik. Ha egy minden pontban közel azonos térszerkezetű molekula próbál a kettősrétegbe bejutni akkor nincs ezzel ellentétesen kialakuló nyomásprofil, azonban amennyiben a lipid eltérő mélységében eltérő méretű/szerkezetű a belépő molekula, megfigyelhető a laterális nyomásprofil kialakulása [30].

3. Célkitűzés

A munkám célja különböző, kereskedelmi forgalomban elérhető szövetspecifikus lipidkeverékek (vér-agy gát-, máj-, és szívspecifikus lipid extraktumok) alkalmazásával kémiai diverz gyógyszervegyületek permeabilitási viszonyainak összehasonlítása a PAMPA rendszer segítségével. A gyógyszervegyületek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságainak köszönhetően (molekulatömeg, sav-bázis karakter, lipofilitás, oldhatóság, poláros molekulafelszín) várhatóan különböző mértékben képesek felszívódni az egyes szövetekben. A munkám további célja olyan fizikai kémiai paraméterek azonosítása statisztikai és egyéb keminformatikai módszerekkel, melyek várhatóan fontos szerepet játszanak az adott szövetekre vonatkozó felszívódási folyamatok leírásában. Munkámat a kutatócsoport KU Leuven-nel (Belgium) közös CELSA pályázatának (CELSA/21/019: Active learning and interpretation of computational model on tissue specific permeability for stock and virtual drug discovery library) keretein belül végeztem.

4. Kísérleti rész

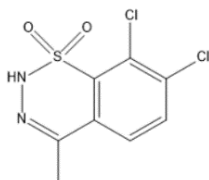
4.1. Felhasznált vegyületek, anyagok

A mérésekhez szükséges totál és poláris lipidkivonatokat az Avanti Polar Lipids Inc.-től szereztük be. Az oldószerek közül a hexán, dodekán és a kloroform és a gradiens HPLC minőségű acetonitril a Merck Kft. -től származott. A foszfát-puffert (PBS) a Merck Kft. által forgalmazott sókeverék segítségével készítettük el. A foszfát-puffer készítéséhez szükséges desztillált vizet a Milli-Q víztisztító berendezés segítségével állítottuk elő. A felhasznált gyógyszeripari standard vegyületeket az alábbi táblázatban összegeztem, mind a Merck Kft.-től származik. A „PGY0072” kóddal ellátott vegyület az Egis Gyógyszergyár Zrt.-től származó, kutatási célra adományozott gyógyszereszerű vegyület.

4. táblázat A permeabilitás vizsgálatra kiválasztott vegyületek

Sorszám	Vegyület neve	Sorszám	Vegyület neve
1.	Ambroxol hidroklorid	17.	Enoxacin
2.	Buspiron hidroklorid	18.	Rozuvasztatin
3.	Cetirizin dihidroklorid	19.	Koffein
4.	Dexametazon	20.	Furoszemid
5.	Dibukain	21.	Cefuroxim
6.	Famotidin	22.	Labetalol hidroklorid
7.	Flutamid	23.	Ibuprofén
8.	Indapamid	24.	Szulindak
9.	Lamotrigin	25.	PGY0072*
10.	Lanzoprazol	26.	Piroxikám
11.	Levomepromazin	27.	Propamidin
12.	Metoprolol tartarát	28.	Ramipril (anhidrát)
13.	Nepafenak	29.	Szulfametoxazol
14.	Nitrazepám	30.	Fenitoin
15.	Norfloxacin	31.	Verapamil hidroklorid
16.	Ondanzetron	32.	Warfarin

*A PGY0072 szerkezeti képlete:



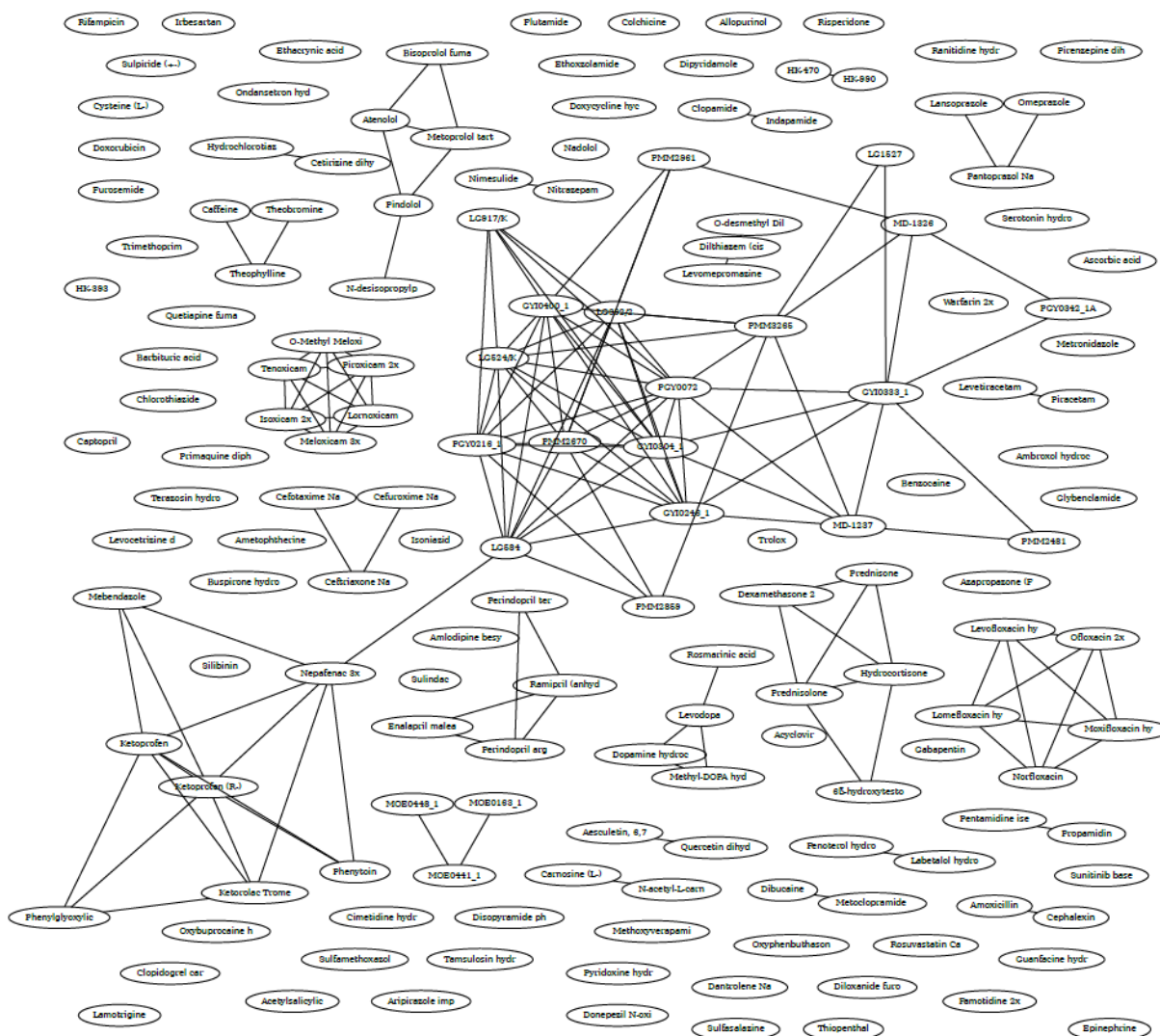
4.2. Alkalmazott eszközök, módszerek

4.2.1 Felhasznált eszközök

A vizsgálatok során 96-lyukú polipropilén plate-eket használtunk (Agilent Technologies, Denmark, 0,5 ml/lyuk). A PAMPA permeabilitás méréséhez erre a célra kialakított 96-lyukú plate-eket használtuk (donor szűrő plate: Millipore Multiscreen® IP Filter Plate, MAIPNTR10, pórus méret: 0,45 µm; fogadó plate: teflon (PTFE) plate, Millipore Multiscreen® Acceptor Plate, MSSACCEPTOR). A folyadékok kimérésére Eppendorf® Research®, Research® plus automata, illetve manuális pipettákat használtunk. A plate-ek inkubálásához a Heidolph Titramax 1000 és Incubator 1000 készülékeket használtuk. A hatóanyagok feloldásának érdekében egy Bandelin Sonorex Digiplus ultrahangos fürdőt és egy IKA® vortex 3 kémcsórázó készüléket alkalmaztunk. A minták vizsgálatához egy Agilent 1100, diódasoros detektorral, kvaternerpumpával és autosamplerrel ellátott HPLC (High Performance Liquid Chromatography) készüléket használtunk.

4.2.2 A vizsgálandó vegyületek kiválasztása

A hatóanyagok kiválasztása során szem előtt tartottuk, hogy a választott vegyületek egy széles fizikai-kémiai és szerkezeti teret fedjenek le. Az egymással szerkezeti tulajdonságaikban hasonlító vegyületek a gráfon (9. ábra) vonallal összekötve láthatók. Törekedtünk arra, hogy az egymással szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületek közül csupán egyet válasszunk ki, ezeket reprezentatív mintaként felhasználva, vegyületkörünket további különálló molekulákkal egészítettük ki, teljesen véletlenszerűen. A vegyületek kiválasztása során a kutatócsoport rendelkezésére álló molekulabankból 172 db tulajdonságaiban megfelelő hatóanyag közül választottuk ki véletlenszerűen a későbbiekben használt vegyületkört.

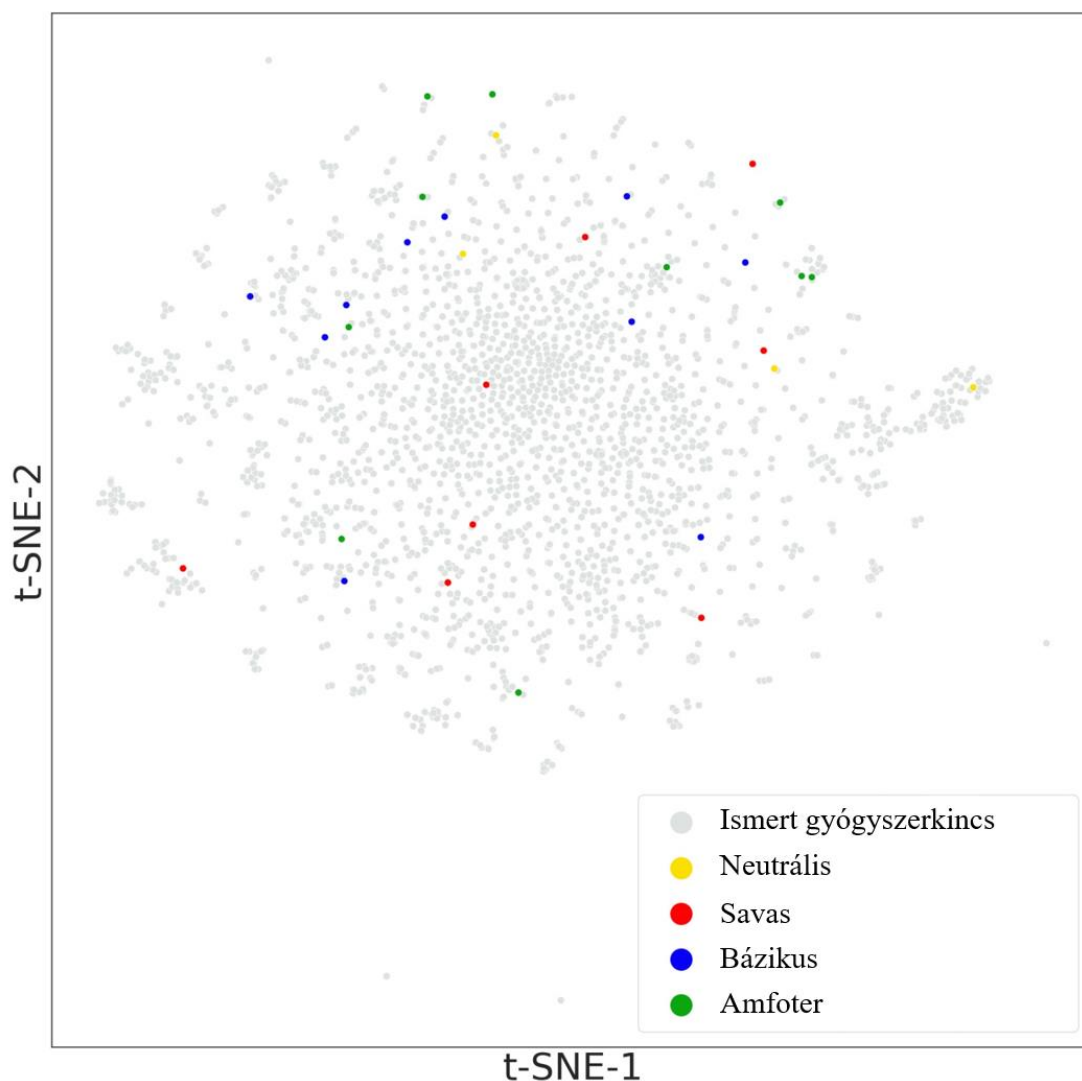


9. ábra A rendelkezésre álló molekulákat (172 db hatóanyag) ábrázoló, a különböző kémiai szerkezetű vegyületek kiválasztását segítő gráf

A vizsgálatokra jellemző szerkezeti diverzitást a **10. ábra** segítségével próbáljuk meg szemléltetni, ahol az általunk vizsgált vegyületek sav-bázis karakterüknek megfelelő színkóddal lettek ellátva és kiemelve a gyógyszerszerű vegyületek halmazában. Látható, hogy a pontok kellően elkülönülnek a térben, tehát a szerkezeti diverzitás biztosított.

Az ábra az ún. t-elosztott sztochasztikus szomszéd beágyazási (t-SNE) algoritmussal készült, mely egy dimenziócsökkentési algoritmus adatok vizualizálására. Ez egy nemlineáris algoritmus, mely minden adatpontnak képes egy helyet adni egy két, vagy háromdimenziós térképen. A módszer szerint két, az eredeti térben közeli pontnak alacsony dimenzióban egymáshoz közel kell lennie. A t-SNE algoritmus a két valószínűségi sűrűség összehangolásából áll, minimalizálva a két eloszlás közötti Kullback-Leibler-divergenciát a térképen lévő pontok helyéhez viszonyítva. Az algoritmust használják rákkutatáshoz, bioinformatikához, zenei elemzések készítéséhez [31]. A **10. ábrán** jól látható, hogy a vizsgált

vegyületeink nem csak szerkezetükben mutatnak megfelelő divergenciát (a pontok a térben szétszórtan helyezkednek el), hanem sav-bázis karakterüket tekintve is különbözőek.



10. ábra A vizsgálatra kiválasztott vegyületek eloszlása a gyógyszerkémiai térben, a kémiai szerkezetnek megfelelő t-SNE koordináták szerint, sav-bázis karakter alapján színezve

4.2.3 A PAMPA vizsgálatok kivitelezése

A kiválasztott hatóanyagokból névlegesen 100 μM koncentrációjú oldatokat készítettünk 7,4-es pH-jú foszfátpuffer (PBS) segítségével. Az anyagok feloldását vortex és ultrahangos fürdő alkalmazásával segítettük elő. A vizsgálatok napján az oldatokat 10 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük a megfelelő homogenizálás érdekében. Ezt követően a fogadó plate minden cellájába 300 μl 7,4-es pH-jú foszfátpuffert töltöttünk. A donor plate-be először 5 μl került minden cella alján látható, szerves oldószer hatására nedvesedő szűrőrétegre az aktuálisan alkalmazott lipid extraktumból készített oldatból. Ezután egy polipropilén plate-be 300 μl hatóanyag oldat került kimérésre, melyből 150 μl a donor plate-be, a másik felét egy

kromatográfiás üvegcsébe pipettáztuk a kiindulási koncentráció meghatározásának érdekében. Minden mérés során 3 párhuzamos mintaelőkészítés történt. A lipidoldatokat az Avanti Polar Lipids Inc. által forgalmazott totál vagy poláris lipid extraktum 16 mg-jából készítettük, 600 µl oldószer hozzáadásával, mely 5%-a kloroform, 25%-a dodekán és 70%-a hexán volt, a kutatócsoport korábbi módszerének megfelelően [26]. A megfelelő oldódás érdekében a lipideket 0 °C közelében tartottuk, ezen kívül vortexet, és ha szükséges volt, jeges ultrahangos fürdőt is használtunk. Az így készült oldatból a donor oldal szűrőfelületére 5 µl-t vittünk fel, majd a két illékony oldószerkomponens (hexán, kloroform) elpárolgását követően, a megmaradó „töményített” dodekános lipidrétegre a hatóanyagoldatokat is bemértük. Ezután a donor és fogadó plate-eket összeillesztettük, majd a szendvicsszerű elrendezés tetejére egy desztillált vízzel megnedvesített szűrőpapír, valamint egy műanyag fedőlap került az inkubálás során megnövekedett párolgás csökkentése érdekében. A donor és fogadó oldal összeillesztése után egy Heidolph Titramax 1000 készülékben 4 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk a rendszert. Az inkubációs idő letelte után a donor plate-et kiemeltük a fogadó mérőtálcából, majd mind a donor, mind a fogadó oldal összes cellájából 150-150 µl mintát vettünk, és ezeket egy kromatográfiás üvegcsébe pipettáztuk. A koncentrációk meghatározása HPLC segítségével történt. A kromatogramok felvétele egy diódasoros detektor (DAD) segítségével történt, a csúcsterületeket 220 ± 2 nm-en határoztuk meg. Az effektív permeabilitás és a membránretenció számolásához a (2) és (3) egyenleteket használtuk, a kiindulási, donor-, illetve fogadó oldali csúcsterületek ismeretében.

4.2.4 A Zeta-potenciál mérések kivitelezése

A Zeta-potenciál méréséhez először liposzómákat készítettünk a megfelelő lipidextraktumokból. Ehhez először 5 mg lipidkivonat került feloldásra 2 ml kloroformban egy gömblombikban. A szerves fázist egy rotációs vákuumbepárló segítségével 25°C-on, 50 rpm fordulatszámon és 100 mbar nyomás alatt elpárologtattuk, (Büchi R-210, Büchi, Flawil, Svájc) ezáltal vékony filmréteget kialakítva. Ezt követően a filmréteget 5 ml PBS (pH 7,4) segítségével hidratáltuk, 1 mg/ml-es végleges lipidkivonat koncentrációt kialakítva. A mintákat vortex (Biobase MX-S, Jinan, Shandong, Kína) segítségével homogenizáltuk 500 rpm fordulatszámon 5 percen keresztül, és időről-időre a diszperzió homogenizálását ultrahangos fürdővel (Elmasonic S30, Elma Ultrasonic Technology, Singen, Németország) segítettük elő. A liposzómákat felhasználásukig 4°C-on tároltuk.

A liposzóma minták méreteloszlását és Zeta-potenciál értékét Malvern Zeta sizer ProBlue részecskeanalizátorral határoztuk meg. A liposzóma elegyeket (1,0 ml) hígítás nélkül 1x1 cm-es küvettákba (DTS0012) pipettáztuk, majd DIP cell (Zen1002) mérőfej segítségével

fényszóródás mérést és Zeta-potenciál mérést hajtottunk végre 37,0°C-on termosztálva. Az adatok kiértékelésére ZS Explorer szoftvert alkalmaztunk, minden mintát három párhuzamos méréssel vizsgáltunk.

4.2.5 HPLC vizsgálat

Készülék	Agilent 1100 HPLC (autosampler, kvaterner pumpa, DAD detektor)
Kolonna	Kinetex C18 3x30 mm részecskeátmérő 2,6 µm
Eluensek	A: MilliQ víz+0,1% hangyasav B: Acetonitril: MilliQ víz 95:5 0,1% hangyasav
Termosztálás	45°C
Mérés hullámhossza	220 és 254 nm
Kiértékelő szoftver	ChemStation

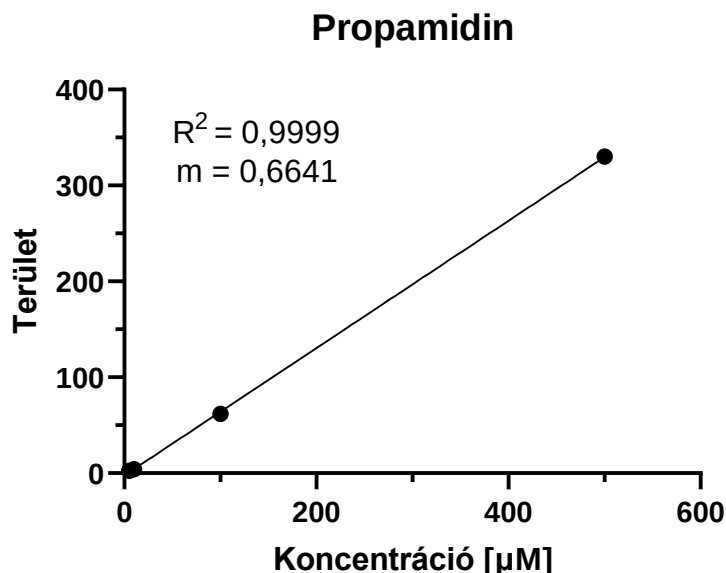
Gradiens program:

Idő (perc)	B eluens
0-0,5	2%
0,5-2,30	2-100%
2,30-3,30	100%
3,30-4,31	100-2%

4.2.6 Kimutatási határ (LOD) és a mennyiségi mérés alsó határának (LOQ) meghatározása

A kimutatási határ (LOD: Limit of Detection) a mért komponenseknek az a legkisebb koncentrációja vagy mennyisége, amely a vak mintától megbízhatóan megkülönböztethető. A mennyiségi mérés alsó határa (LOQ: Limit of Quantification) az a legkisebb koncentráció vagy mennyiség, amely még elfogadható megbízhatósággal határozható meg.

Az LOD és LOQ értékek kiszámítása azért vált fontossá, mert a méréseink során nyolc vegyület esetén a vegyületek fogadóoldali csúcsterületét nem tudtuk meghatározni, így az effektív permeabilitásuk (P_e) nullának adódott. A P_e értékek határát ezekben az esetekben érdemes az adott vegyület LOD értékével közelíteni a HPLC módszerünkre vonatkozóan. Ennek meghatározásához a hatóanyagokból névlegesen 10 mM-os DMSO törzsoldatokat készítettünk, és egy hárompontos hígítást végeztünk, ami 100-, 10,- és 5 µM volt minden vegyület esetén. A kalibrációs egyenes meredekségének meghatározásához a mért terület és a hozzájuk tartozó koncentráció értékekre egyenest illesztettünk.



11. ábra A propamidin mint példavegyület hígítási sorához tartozó egyenes meredekségének meghatározása

A meredekség kiszámítása után az LOD és LOQ értékeket a következő képletek segítségével számítottuk ki.

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{m} \quad (4)$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{m} \quad (5)$$

ahol σ : A HPLC ismételt injektálására jellemző szórás

m: A kalibrációs egyenes meredeksége

4.2.7 Statisztikai értékelés

A mérési eredmények értékelése során a statisztikai próbák, és a grafikonok a GraphPad Prism 8 programmal készültek, a szerves vegyületek ábrázolása a ChemDraw program segítségével készült.

ANOVA (Analysis of variance) teszt

Az ANOVA teszt egy statisztikai próba annak eldöntésére, hogy van-e szignifikáns különbség két, vagy több hasonló csoport között az átlag és a variancia vizsgálatával.

A vizsgálat feltételei közé tartozik, hogy a csoportok elemei között nem lehet kapcsolat, azonos mintaelemszámra van szükség, a független változó normális eloszlású, és a csoportok varianciája hasonló. Az ANOVA tesztet csoportosíthatjuk egy-, vagy többváltozós próbákra.

Az eltérés a két próba között a független változók számában van. Az egyváltozós ANOVA próbának egy független, és egy normális eloszlású függő változója van. A független változó két vagy több hasonló csoportot alakít ki. Az ANOVA teszt képes három, vagy több csoport átlagának összehasonlítására, hozzá hasonló a t-próba, mely csak két csoport összehasonlítására képes [35]. A teszt eredménye megmutatja, hogy az eltérés szignifikáns, vagy nem a csoportok között, melyhez egy „p” értéket rendel. A „p” érték annak a valószínűsége, hogy a nullhipotézis igazsága esetén a próbastatisztika a talált, vagy annál szélsőségesebb értéket vesz fel.

4.3. Eredmények

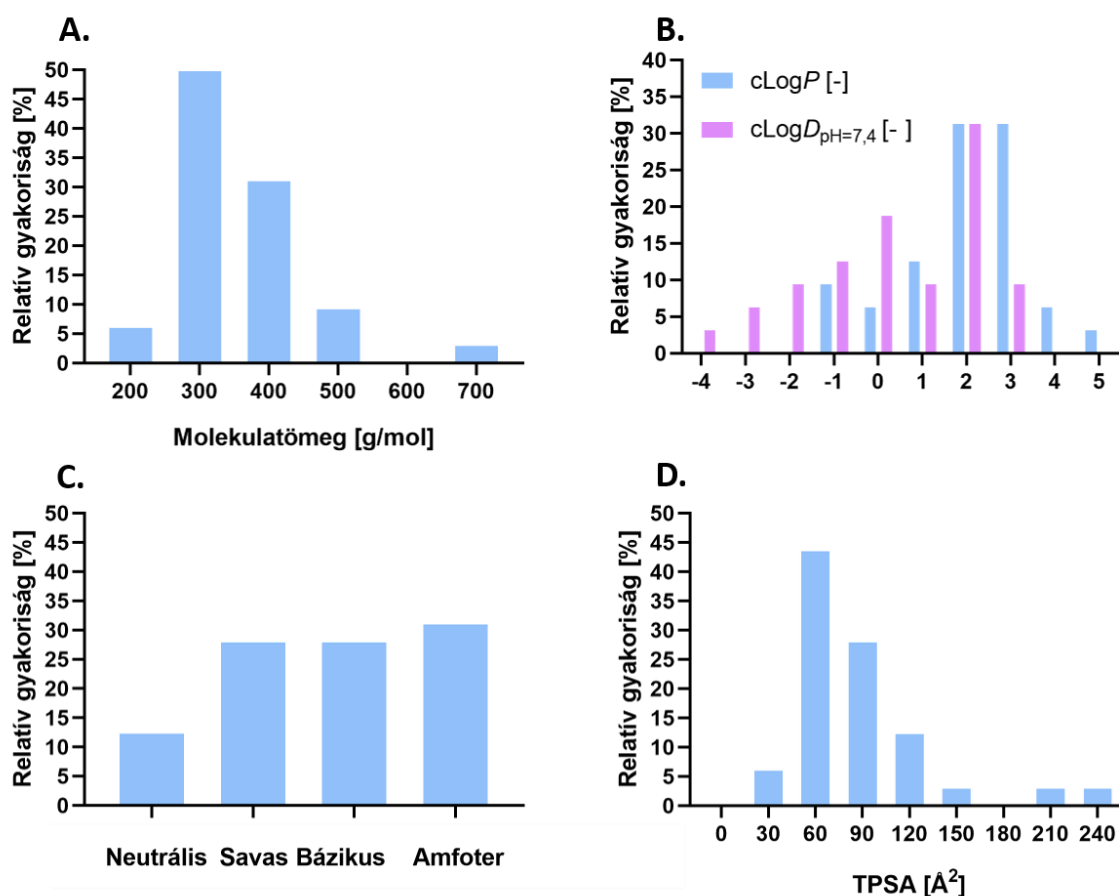
4.3.1 A kiválasztott vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése

A vizsgált 32 vegyület kiválasztása során szem előtt tartottuk, hogy azok szerkezeti diverzitásuk mellett egy megfelelően széles fizikai-kémiai teret fedjenek le. A vegyületek molekulatömegének eloszlása a **12/A. ábrán** látható. A móltömeg kb. 200 – 700 g/mol között változott, közel normális eloszlást követve. A *Lipinski szabály* szerint a gyógyszer-szerű vegyületek jellemzően 500 Da alatti molekulatömeggel rendelkeznek, ami méréseink során alkalmazott vegyületek 94%-ára teljesül. Az *Oprea szabály* teljesüléséhez a molekulatömegnek 460 Da-nál kisebbnek kell lenni, hogy egy hatóanyag vezérmolekula-szerű legyen [32]. Ennek a követelménynek 32 vegyületből 28 felel meg. A *Clark & Lobell szabály* szerint a vér-agy gát penetrációjának szükséges feltétele, hogy a hatóanyagok móltömege legyen kisebb mint 450 Da, a feltétel ebben az esetben is 28 molekulára teljesül [33], [34].

A **12/B. ábrán** a méréseink során alkalmazott hatóanyagok számított lipofilitás, és megoszlási hányados értékei láthatók. A hatóanyagok kiválasztása során alkalmazhatunk gyors, a vegyületek szerkezetéből adódó kiválasztási szabályokat. A *Lipinski szabály (rule of five)* szerint a passzív transzporttal felszívódó gyógyszer-szerű vegyületek lipofilitása nem haladhatja meg a $\log P = 5$ értéket [35]. Az *Oprea szabály* szerint a vezérmolekula-szerű vegyületek $-4 \leq \log P \leq 4,2$ lipofilitási tartományban helyezkednek el. A vér-agy gáton történő átjutás szükséges feltételét írja le a *Clark & Lobell szabály*, mely szintén a megoszlási hányadosra vonatkozik, annak megfelelősségi tartománya $1 \leq \log D_{7,4} \leq 3$. Az ábra alapján jól látható tehát, hogy a méréseink során használt gyógyszer-vegyületek egy része lipofilitása alapján képes lehet a vér-agy gát penetrációra, és szinte minden általunk használt vegyület megfelel a *Lipinski* és az *Oprea szabálynak* is. A *Clark & Lobell szabály* által támasztott követelménynek mindössze 13 vegyület felel meg, ami kb 41% [32]–[35].

A 12/C. ábrán a vegyületek sav-bázis tulajdonságai láthatók, ez alapján megállapítható, hogy a neutrális, savas, bázikus és amfoter karaktert hordozó vegyületek nagyjából azonos számban szerepeltek a kísérletben.

A 12/D. ábrán a vegyületek TPSA (Total Polar Surface Area) hisztogramja látható. A PSA (Polar Surface Area) a nitrogén és oxigén atomok, illetve a hozzájuk kapcsolódó poláris hidrogénatomok által elfoglalt felület ($\text{\AA}^2$), mely felelős a hidrogén kötések kialakításáért, és a polaritásért. A penetráció során előnyt jelenthet a vegyületek számára, ha a TPSA érték alacsonyabb, pl. a vér-agy gáton történő felszívódáshoz jellemzően $90 \text{ \AA}^2$ -nél kisebb felület szükséges. Bebizonyították továbbá, hogy a $60 \text{ \AA}^2$ -nél kisebb felület esetén teljes mértékben, $140 \text{ \AA}^2$ felett azonban egyáltalán nem figyelhető meg intesztinális sejteken keresztüli felszívódás [36], [37]. A hisztogram alapján jól látható, hogy a vegyületek jelentős többsége várhatóan képes lesz az intesztinális felszívódásra, kisebb hányaduk pedig a vér-agy gáton keresztüli átjutásra is. Az ábra alapján látható, hogy a vegyületeink TPSA eloszlása szűk, nagyjából $60\text{-}150 \text{ \AA}^2$ közé tehető (néhány kivétellel), vagyis ez alapján a vegyületeink feltételezhetően passzív transzporttal képesek közlekedni a biológiai membránokon.



12. ábra A vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak gyakoriság-hisztogramjai. A: molekulatömeg; B: clogP, clogD_{7,4} (lipofilitás); C: Sav-bázis tulajdonság, D: TPSA – poláros molekulafelület

4.3.2 A kimutatási határ (LOD) és a mennyiségi mérés alsó határának (LOQ) eredményei

Az LOD és LOQ értékeket azokra a vegyületekre határoztuk meg, melyeknek a csekély permeabilitásuk miatt a fogadóoldali csúcsterületét nem tudtuk integrálni (**5. táblázatban**). Ezt követően a fogadó oldali koncentrációt az LOD értékkel közelítve meghatároztuk azt a maximális permeabilitást, aminél a valós értékek biztosan kisebbek.

5. táblázat A kiszámított LOD és LOQ értékek a nyolc gyengén penetrációs képességű hatóanyag esetén

Hatóanyag	LOD [μM]	LOQ [μM]	Számított P_e [10 ⁻⁶ cm/s]
Famotidin	1,78	5,39	<0,33
Norfloxacin	0,92	2,77	<0,51
Rosuvastatin	0,57	1,73	<0,47
Furoszemid	0,40	1,21	<0,36
Cefuroxim	1,17	3,54	<1,22
Szulindak	0,46	1,40	<0,49
Propamidin	3,16	9,58	<0,75
Ramipril	1,18	3,58	<0,90

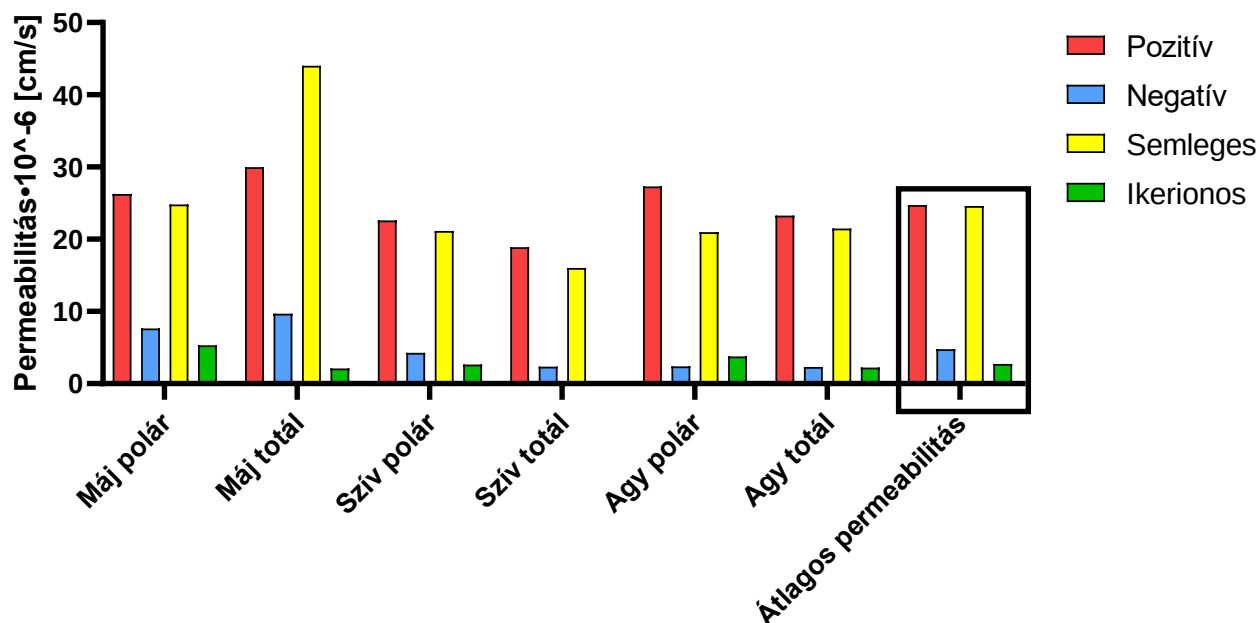
4.3.3 Összefüggés keresése a vegyületek ionizációs állapota és a permeabilitás értékei között a vizsgált pH-n

Mivel vizsgálatainkat izo-pH körülmények között, 7,4-es pH-jú foszfátpufferben végeztük, az alkalmazott hatóanyagokra meghatároztuk az ACD/Percepta szoftver segítségével (a pK_a értékek ismeretében) az erre a pH-ra jellemző domináns ionizációs állapotukat, és megadtuk töltéseiket. Ezek alapján a vegyületeket négy csoportba soroltuk: pozitív, negatív, semleges és ikerionos (**6. táblázat**). A csoportokban lévő vegyületekre mért effektív permeabilitás értékeket átlagoltuk, ez látható a **13. ábrán**. Várakozásaink szerint a semleges (sárga) és a 7,4-es pH-n főként pozitív (piros) töltéssel rendelkező vegyületek penetrációja magasabbnak, míg a negatív (kék) és ikerionos (zöld) tulajdonságú vegyületeké

alacsonyabbnak bizonyult. A semleges vegyületek esetén a magyarázat viszonylag egyszerű, mivel a hatóanyag nem rendelkezik pozitív vagy negatív töltésű csoportokkal, ezért a lipidek poláris fejcsoportjában jelenlévő töltéssel rendelkező csoportja nem tud kialakítani semmilyen elektrosztatikus kölcsönhatást, így az nem befolyásolja a vegyület penetrációját. Pozitív töltésű vegyületek esetén a membránon való áthaladást segíti a lipidmolekulák negatív töltésű fejcsoportjaival kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás, míg a negatív és ikerionos tulajdonságú vegyületek esetén az áthaladást nehezíti az elektrosztatikus taszítás. A **13. ábrán** látható, hogy a pozitív (piros) töltésű és semleges (sárga) hatóanyagok effektív permeabilitása (P_e) jóval magasabb, mint a negatív (kék) és ikerionos (zöld) vegyületek esetén. A lipidkeverékek közül a legmagasabb P_e értékek a máj totál lipid-, a legalacsonyabb a szív totál lipidnél láthatók.

6. táblázat A vegyületek 7,4-es pH-n jelenlévő domináns molekuláris formáinak töltés szerinti csoportosítása

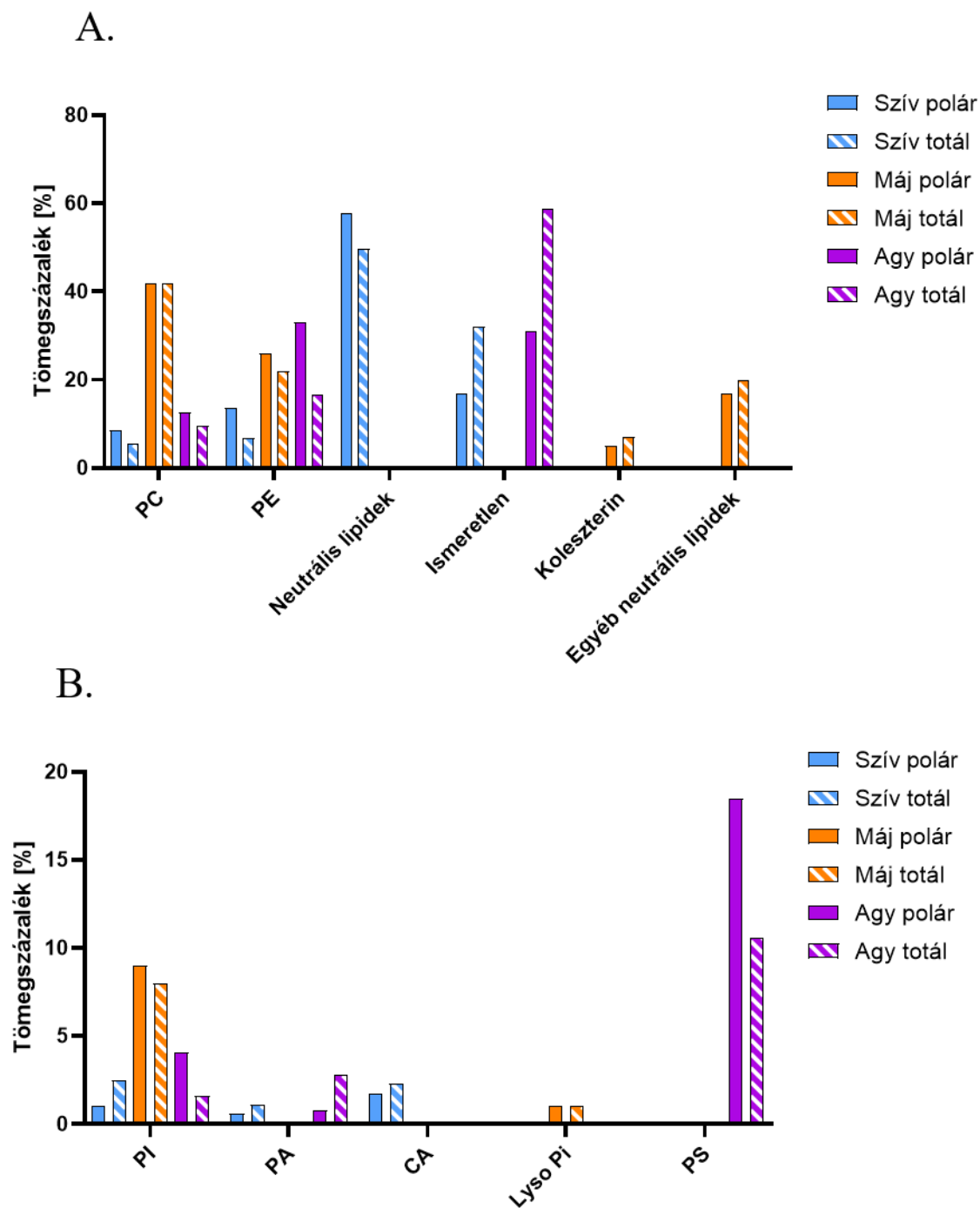
Pozitív (+)	Negatív (-)	Semleges (0)	Ikerionos (+/-)
<i>Ambroxol hidroklorid</i>	<i>Cetirizin dihidroklorid</i>	<i>Dexametazon</i>	<i>Norfloxacin</i>
<i>Buspiron hidroklorid</i>	<i>Rosuvastatin</i>	<i>Flutamid</i>	<i>Enoxacin</i>
<i>Dibukain</i>	<i>Furoszemid</i>	<i>Indapamid</i>	
<i>Famotidin</i>	<i>Cefuroxim</i>	<i>Lamotrigin</i>	
<i>Levomepromazin</i>	<i>Ibuprofén</i>	<i>Lanzoparazol</i>	
<i>Metoprolol tartarát</i>	<i>Szulindak</i>	<i>Nepafenak</i>	
<i>Ondanzetron</i>	<i>PGY0072</i>	<i>Nitrazepám</i>	
<i>Labetalol hidroklorid</i>	<i>Piroxikám</i>	<i>Koffein</i>	
<i>Propamidin</i>	<i>Ramipril (anhidrát)</i>	<i>Fenitoin</i>	
<i>Verapamil hidroklorid</i>	<i>Szulfametoxazol</i>		
	<i>Warfarin</i>		



13. ábra A vegyületek átlagos permeabilitása membránok, és molekuláris formák szerinti lebontásban

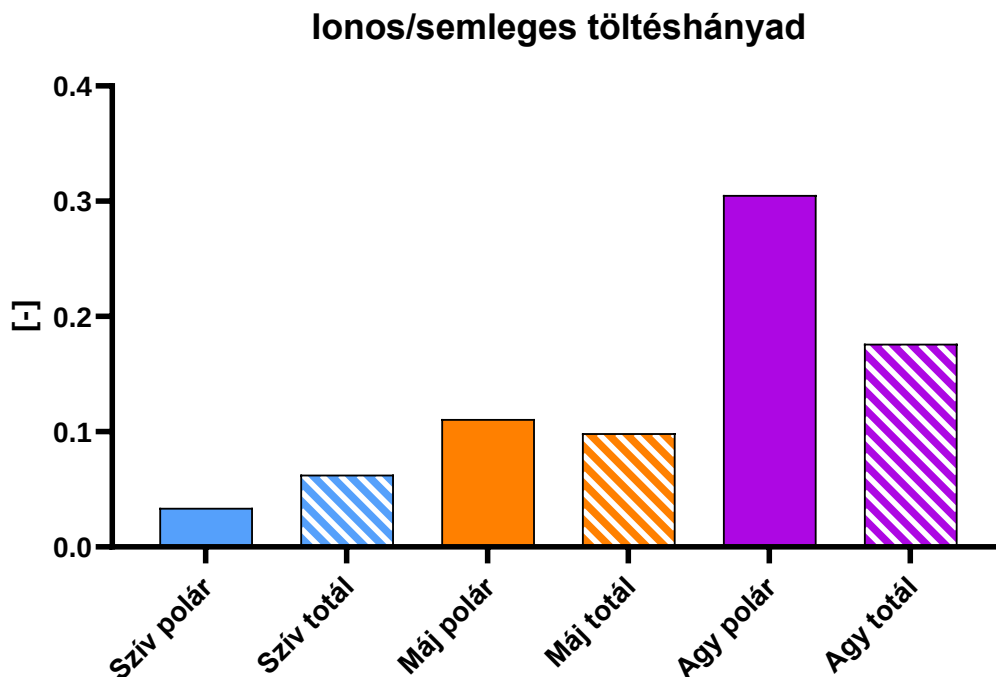
4.3.4 A lipidmembránok összetétele és a Zeta-potenciál közötti összefüggések

A 14. ábrán az egyes lipidkivonatokban a lipidalkotók mennyisége látható tömegszázalékban kifejezve, nettó semleges (+/-) és negatív töltésük szerint csoportosítva. A nettó negatív töltésű lipidalkotók legnagyobb mennyiségben az agyból származó lipidkivonatban találhatók, melyek közül a legmeghatározóbb a foszfatidilszerin. A szív és agy eredetű lipidkivonatoknál láthatóan még a gyártó által nem ismertett lipidalkotók is jelentős részét alkotják az összetételnek.



14. ábra A semleges és ionos lipidfrakciók mennyisége. **A:** nettó semleges komponensek, **B:** nettó negatív töltésű komponensek

A vegyületek nettó semleges, illetve negatív töltésű (ionos) lipidkomponenseinek arányát a **15. ábra** mutatja be. Látható, hogy a legnagyobb ionos (-) / semleges ($\pm$) töltéshányad az agyi lipidekre jellemző (a korábban említett magas foszfatidilszerin tartalom miatt).

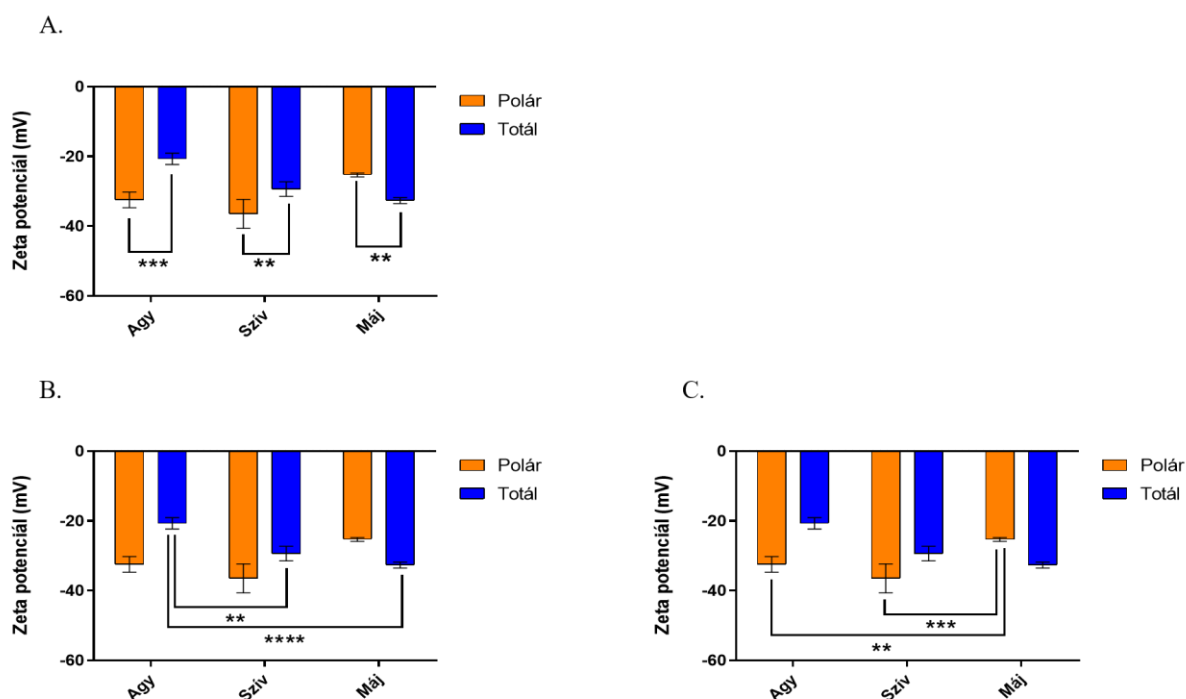


15. ábra A különböző totál és poláris lipidek ionos és semleges lipidalkotóinak hányadosa

A **16. ábrán** a totál és poláris lipid kivonatok Zeta-potenciál értékei láthatók. A mérési eredmények alapján összehasonlításra kerültek páronként a máj-, szív-, és agy lipid kivonatok, illetve szövetek között a totál-totál és poláris-poláris lipidfrakciók ANOVA próba segítségével. A szignifikáns zeta-potenciál különbséget mutató lipid kivonatok eredményeit vonallal kötöttük össze, és minél nagyobb eltérést mutattak az adott adatcsoportok, annál több csillaggal érzékeltettük az eltérést.

Habár első áttekintésre a különböző szöveti eredetű totál és poláris lipid kivonatok izolálási technikája hasonló, a Zeta-potenciálokat jellemző, három megközelítésben végzett összehasonlító ANOVA teszt segítségével sikerült rámutatnunk a szignifikáns különbségekre (**16. ábra**). A **16/A. ábra** az egyes szöveti izolátumok totál és poláris lipidekből származó liposzóma oldatai közötti különbséget mutatja, ami alapján mindhárom membrán esetén szignifikáns különbség volt azonosítható. A lipidösszetétellel összevetve, a legfőbb különbséget itt a gyártó által nem ismertett komponensek okozhatják, mivel ezek esetén nagy az eltérés, és ezek relatíve nagyobb hányadát képezik az extraktumoknak. A három lipid kivonat-pár (totál-poláris) közül az agy esetén figyelhető meg a legnagyobb különbség a zeta-potenciálok között. Ezt alátámaszthatja az összetételben való eltérés, ugyanis itt a legnagyobb különbség a foszfatidilszerin és a gyártó által ismeretlennek jelölt komponensek mennyiségében. Ezen kívül a **15. ábrán** azt is láthattuk, hogy az ionos/semleges

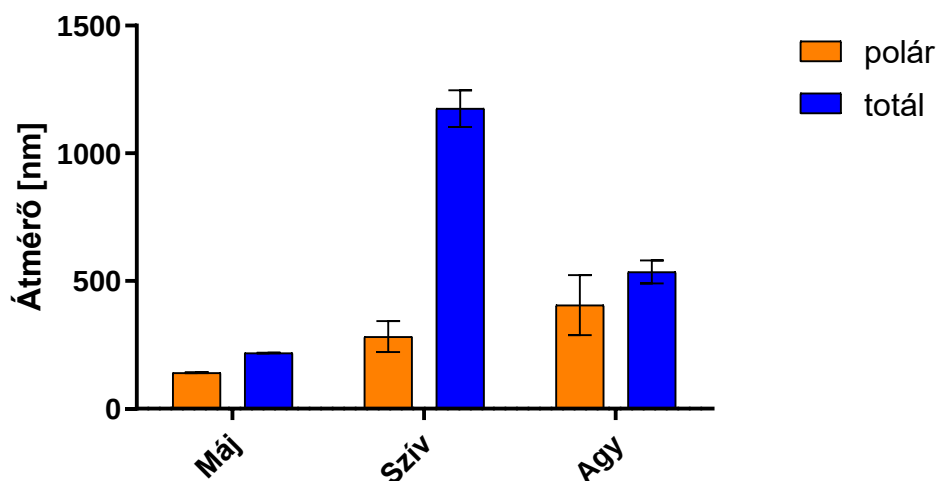
lipidkomponensek arányában szintén az agy esetén látható kiugró különbség, hasonló okokból kifolyólag.



16. ábra A totál és poláris lipidkivonatok Zeta-potenciáljai. **A:** az adott szerv totál és poláris lipidkivonatainak összehasonlítása, **B:** a totál lipidextraktumok szervspecifikus összehasonlítása, **C:** a poláris lipidextraktumok szervspecifikus összehasonlítása; a szignifikáns különbségek kimutatására ANOVA Sidak-féle multiple comparisons tesztet használtunk: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Kizárólag a totál lipidkivonatokra fókuszálva, a legnagyobb különbség az agy és a máj eredetű lipidek esetén mérhető zeta-potenciálok között figyelhető meg, de szignifikáns különbség látható a szív-agy totális lipidkivonatpár esetén is. (16/B. ábra). Így tehát újra az agy, mint szövet emelkedik ki a sorból, ahogy az a lipidösszetételnél is tapasztalható volt.

Amennyiben a poláris lipidkivonatokat hasonlítjuk össze a Zeta-potenciálok tekintetében, a máj a kiemelkedő, tehát a máj-agy, illetve a máj-szív eredetű lipidek között figyelhető meg szignifikáns különbség. A szív és máj lipideket összehasonlítva az látható, hogy a máj több PC-t, PE-t és PI-t tartalmaz, míg a szív kivonat esetén igen nagy arányúak az ismeretlen összetevők. A máj és agy lipidkivonatok közötti eltérés hasonló okokra vezethető vissza, mint ahogy azt a totál lipidfrakciónál leírtuk.



17. ábra A különböző szöveti lipidekből készített liposzómák átmérőviszonyai

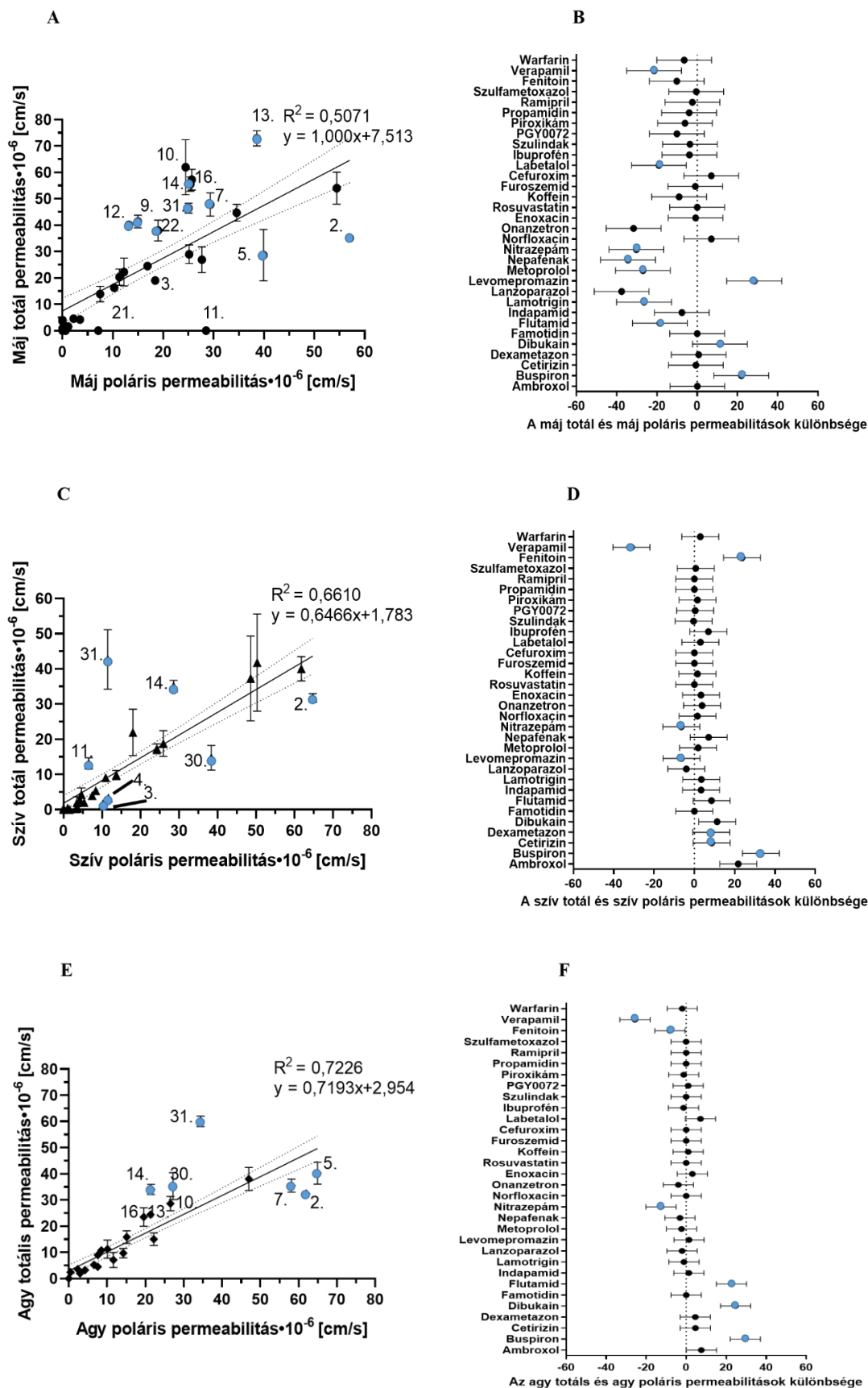
A **17. ábrán** a lipidkivonatokból készített liposzómák méretei láthatók, melyek szintén hozzájárulhatnak a zeta-potenciálokban mérhető különbségekhez. A máj és agy kivonatok esetén a totál és poláris lipidextraktumok mérete közel hasonló, a szív lipidek esetén jelentős, közel ötszörös méretkülönbség van a totál lipidkivonat javára. ANOVA teszt segítségével összehasonlítottuk páronként a különbségeket, és a máj-agy extraktumok esetén nem mutatható ki szignifikáns eltérés, míg a szív frakciók esetén – a várakozásoknak megfelelően – a különbség egyértelműen szignifikáns („p”<0,0001). A **16. és 17. ábra** tendenciáit összevetve azt láthatjuk, hogy bár méretben a szív totál extraktumból képzett liposzómák kiemelkedők, a rájuk jellemző zeta-potenciál csak a szívhez képest szignifikánsan különböző, így valószínűleg a méret ebben az esetben kevésbé lényeges paraméter a Zeta-potenciál alakulásában, mint a tényleges lipidösszetétel.

4.3.5 A vegyületek szöveti lipidkivonat-páronként mért permeabilitásának összehasonlítása

A mért effektív permeabilitás (P_e) és membránretenció (MR) értékeket szövetenként párosítva ANOVA próba segítségével vizsgáltuk. A próba során Tukey multiple comparisons tesztjét végeztük el, mely sem a permeabilitás sem a membránretenció esetén nem mutatott szignifikáns különbséget a totál és a poláris lipideken végzett mérési eredmények között, kivéve abban az egy esetben, amikor a máj-szív totál lipidek kerültek összehasonlításra. Ez azzal magyarázható, hogy a próba során minden lipid esetén csak az átlagos membránretenció és permeabilitás értékek kerülnek összehasonlításra, ami a különböző membránok esetén összességében kiegyenlítődik.

A totál és poláris lipidek összehasonlításához a csoportonként átlagolt permeabilitás értékek mellett vegyületenként is vizsgáltunk eltéréseket, hogy megtaláljuk az átlagtól eltérően viselkedő hatóanyagokat. A vizsgálat két módon történt: kétváltozós ANOVA és az ahhoz tartozó Sidak-féle multiple comparisons teszt segítségével tanulmányoztuk vegyületenként a totál-polár lipidkivonat-párok közötti, permeabilitás értékekben tapasztalható eltéréseket, illetve ezeket az adatokat egymás függvényében is ábrázoltuk, ahol lineáris regresszióval meghatároztuk az illesztés jóságát is (**18. ábra**). A lineáris regresszió során az egyenes mellett a 95%-os konfidencia intervallumot is ábrázoltuk. A jobb oszlopban lévő ábrákon az ANOVA próba során felhasznált permeabilitás értékek közötti különbséget ábrázoltuk ($P_{e_{total}} - P_{e_{polár}}$), az adott módszerrel számolt konfidenciaintervallumokat is feltüntetve. Tehát abban az esetben, ha egy vegyület P_e értéke a totál és a poláris lipidextraktumon teljesen azonos lenne, a **18. ábra** bal oldali oszlopában az egyenesen, a jobb oldali oszlopban pedig a 0-hoz húzott szaggatott vonalon helyezkedne el. Azokat a vegyületeket, amelyek az ANOVA próba esetén szignifikáns eltérést mutattak a totál és poláris permeabilitásban, és az egyenes konfidencia intervallumában sem helyezkedtek el, az ábrán kék színnel jelöltük. Az lineáris illesztés jóságát is vizsgáltuk. Látható, hogy az illesztés jósága a máj ($R^2 = 0,5071$), szív ($R^2 = 0,6610$) és az agy ($R^2 = 0,7226$) lipidkivonatoknál rendre nő, ezáltal egyre kevesebb vegyület esik a konfidencia intervallumon kívülre.

Megfigyelhető továbbá, hogy bár a különböző lipidkivonatok esetén mérhető P_e értékeket vetettünk össze, mégis a lipidkivonat eredetétől függetlenül többnyire azonos vegyületek esetén azonosítottunk szignifikáns eltérést. A leggyakrabban szignifikáns eltérést mutató vegyületek a buspiron, dibukain, flutamid, nitrazepám, fenitoin és a verapamil hatóanyagok voltak. Ezek között vannak olyan vegyületek, melyek mindhárom membrán esetén a konfidencia intervallumon kívül helyezkednek el. Ezek a buspiron ($\log P = 3,04$; $\log D_{7,4} = 2,68$), a dibukain ($\log P = 3,67$; $\log D_{7,4} = 1,77$), a nitrazepám ($\log P = 2,03$; $\log D_{7,4} = 2,03$), és a verapamil ($\log P = 4,01$; $\log D_{7,4} = 2,44$). A jobb oldali ábrákon megfigyelhető még, hogy a kékkel jelölt vegyületek tendenciózusan ugyanabba az irányba mozdultak el, vagyis szöveti eredettől függetlenül mindig vagy a totál, vagy a poláris lipidfrakción mérhető nagyobb permeabilitásuk. A buspironnak (2) és a dibukainnak (5) a poláris, míg a nitrazepámnak (14) és verapamilnak (31) rendre a totál lipidkivonat esetén mérhető nagyobb permeabilitás érték. A konfidencia intervallumon kívül eső vegyületek a **4. táblázatban** szereplő sorszámuk alapján kerültek számozásra.



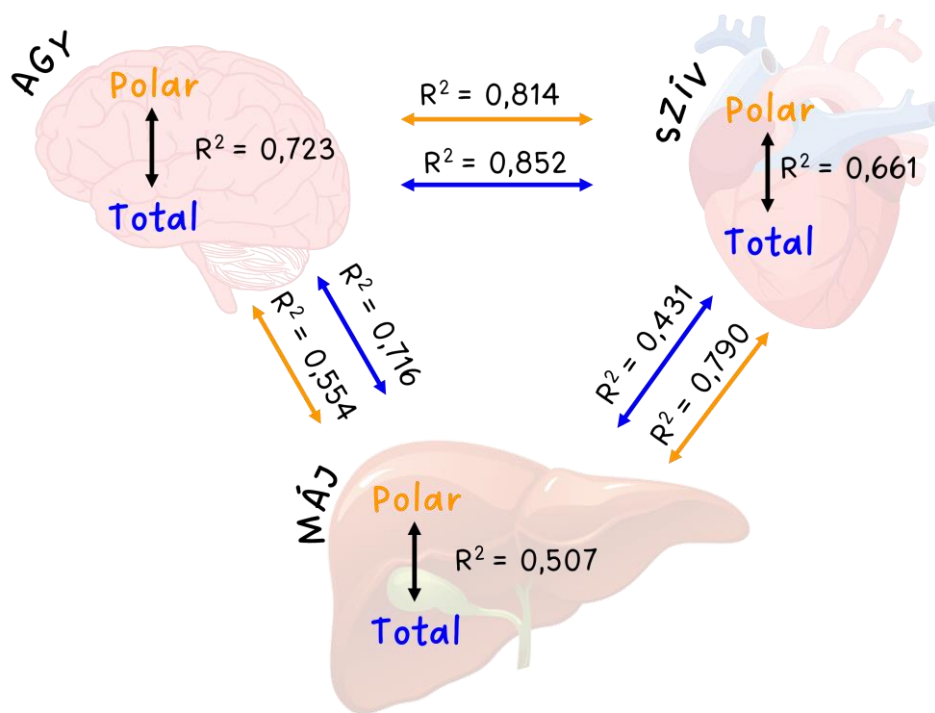
18. ábra A total és poláris lipidkivonatok összehasonlítása a lineáris regresszióval és a kétváltozós ANOVA teszt Sidak-féle multiple comparison tesztjével . **A:** A máj total és poláris permeabilitásokra illesztett regresszió; **B:** Az ANOVA-hoz számolt nominális P_e különbségek a máj lipidkivonatokra; **C:** A szív total és poláris permeabilitásokra illesztett regresszió; **D:** Az ANOVA-hoz számolt nominális P_e különbségek a szív lipidkivonatokra; **E:** Az agy total és poláris permeabilitásokra illesztett regresszió; **F:** Az ANOVA-hoz számolt nominális P_e különbségek az agy lipidkivonatokra

4.3.6 A vegyületek szövetenként mért permeabilitásának összehasonlítása

A **19. ábrán** a vegyületek különböző szövetenként mért permeabilitásának (P_e) összehasonlítása látható, a páronkénti lineáris regresszióra jellemző R^2 értékekkel. A **18. ábrán** látható szövetenként végzett totál-poláris összehasonlítások mellett hasonló módon lineáris regressziót végeztünk a totál-totál és poláris-poláris lipidkivonat-párokon mérhető permeabilitásra is. A **19. ábrán** az egyenesek illesztésének jóságát jellemző determinációs együtthatók láthatók. A fekete nyíl felett az adott szöveti totál-poláris frakció összehasonlítása látható, narancssárga színnel a szövetek közötti poláris, kékkel a szövetek közötti totál lipidkivonatokat összehasonlító egyenesek determinációs együtthatói vannak. A legnagyobb hasonlóság a különböző extraktumok esetén a szív és agy totál frakciók között ($R^2 = 0,852$), a legkisebb illeszkedési jóság, azaz várhatóan a legnagyobb eltérés a szív és máj totál frakciók között van ($R^2 = 0,431$).

Az illesztett egyenesek determinációs együtthatói összehasonlításra kerültek a mért Zeta-potenciálok alapján készült ANOVA teszttel. A totál lipidkivonatok esetén az ANOVA teszt szignifikáns különbséget mutatott a máj és agy, illetve a szív és agy lipidkivonatok között, a teszt eredményei a **16/B. ábrán** láthatók. A Zeta-potenciálok alapján a máj és agy eredetű liposzómák között jelentősebb az eltérés, mint a szív és agy esetén, a lineáris regressziónál is hasonló eredményre jutottunk, hiszen a máj és agy között $R^2 = 0,716$, míg a szív és agy között R^2 értéke magasabb (0,852), azaz az egyenes illesztésének jósága utóbbi esetben nagyobb.

A poláris lipideket vizsgálva a **16/C. ábra** alapján kimutatható különbség van a máj és agy, illetve a szív és máj lipidkivonatok között, és utóbbiak között jelentősebb az eltérés. Ebben az esetben az illeszkedés jósága az egyenesre nagyobb volt a szív és máj között ($R^2 = 0,790$), mint a másik esetben ($R^2 = 0,716$), ez tehát az előző, zeta-potenciálból származó eredményekkel nem egyeztethető össze. A **17. ábrán** a lipidkivonatokból készült liposzómák mérete látható. Ezek összehasonlítására szintén egy ANOVA teszt segítségével végeztünk vizsgálatokat, mely eredménye a függelékben elhelyezett **F4. táblázatban** olvasható. A totál-totál kivonatok összehasonlítása során szignifikáns eltérést mutatott a máj-szív, illetve a máj-agy kivonatpár is. Összehasonlítva az egyenesek illeszkedésével az első esetben 0,43, a második esetben 0,71 körüli determinációs együtthatót kaptunk. A poláris-poláris összehasonlítás esetén a máj-agy lipidek mutattak jelentős eltérést, az együttható értéke ebben az esetben 0,55 körüli.



19. ábra A vegyületek totál és poláris lipideken mért permeabilitását összehasonlító lineáris regresszióra jellemző determinációs együtthatók (narancssárga – azonos szövet eredet, lila – szövetek közötti (totál), zöld – szövetek közötti (polár)

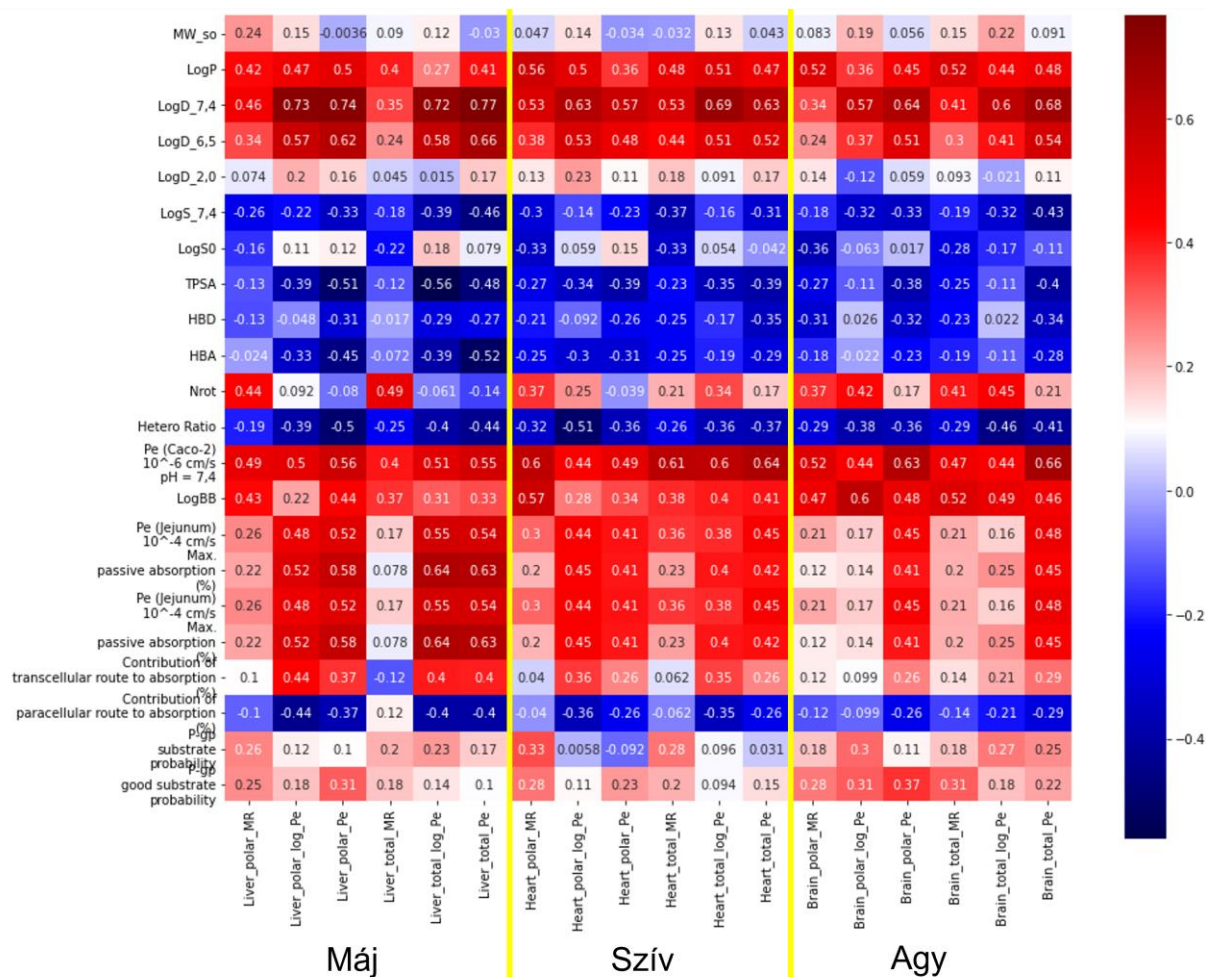
4.3.7 A mérési eredmények és a fizikai-kémiai paraméterek korrelációja

A **20. ábrán** a különböző lipidkivonatokon mért effektív permeabilitás (P_e), annak logaritmus ($\log P_e$), és membránretenció (MR) értékek, illetve a gyógyszerkutatásban általánosan használt fizikai-kémiai leíró paraméterek, deskriptorok láthatók a tengelyeken. A fizikai-kémiai paraméterek a hatóanyagokra az ACD/Percepta predikciós szoftver által becsült értékek. Az ábrán a paraméterenkénti lineáris regresszióval kapott *Pearson-koefficiensek* avagy korrelációs együtthatók (r) értéke látható. A *Pearson*-féle korrelációs együttható -1 és 1 közötti értékeket vehet fel, az együttható közel lineáris kapcsolatok esetén alkalmazható megfelelően. Ha a korrelációs együttható értéke 0, akkor a két változó között nincs kapcsolat. Ha értéke 0 és 1 között helyezkedik el, akkor magasabb x értékhez magasabb y érték tartozik, ha előjele negatív, akkor magasabb x értékhez általában kisebb y érték tartozik, ezáltal a kapcsolat fordított arányú. Ha a korrelációs együttható értéke ± 1 akkor a két változó között determinisztikus lineáris kapcsolat van. A jobb szemléltetés érdekében az egyre nagyobb egyenes arányosságot mutató korrelációs együtthatók értékét sötétedő vörös színnel, a növekvő fordított irányú kapcsolatot bemutató korrelációs együtthatókat sötétedő kék színnel emeltük ki, ha a változók között nem volt korreláció azokat fehérrel jelöltük [38].

A **20. ábrát** áttekintve megállapítható, hogy minden szöveti lipidkivonat esetében a permabilitás (P_e) és membránretenció (MR) értékekkel pozitív korrelációt mutat a lipofilitás, a mérési körülményekhez hasonló pH értékeken becsült megoszlási hányados ($\log D_{7,4}$ és $\log D_{6,5}$), a 7,4-es pH-n becsült Caco-2 és jejunális (intesztinális szakaszra jellemző) permeabilitási értékek, illetve az agy szöveti lipidekből származó mérések esetén a $\log BB$ (mely a vegyület agyban, illetve vérben mérhető koncentrációjának hányadosa logaritmizálva) értékek. A fenti pozitív korrelációk ésszerűek, hiszen minél lipofilebb egy hatóanyag (minél nagyobb az affinitása a membrán lipofil közegéhez), annál könnyebben jut be a membránba. A permeabilitás értékeink számolt Caco-2 és jejunális permeabilitással kapott pozitív korrelációja azt bizonyítja, hogy a szoftver előrejelzése valid, permeabilitást tényleges befolyásoló paramétereken alapszik.

Fordított, tehát negatív korrelációs kapcsolat látható a P_e értékek esetén a poláros molekulafelszínnel (TPSA), az oldhatósággal ($\log S_{7,4}$), a hidrogén kötés-donorok (HBD) és akceptorok (HBA) számával, illetve a heteroatomok számával is. Ez azzal magyarázható, hogy minél polárosabb a molekula annál jobb a vízoldhatósága, ellenben a membrán lipofil közege felé annál kisebb hajlandósággal oszlik meg. A hidrogén-kötések kialakításának lehetősége valamint a heteroatomok száma szintén a molekula poláros jellegével függ össze, így a fentiekkel magyarázható.

A mérési adatokkal gyenge korrelációt mutat pl. a molekulatömeg, és a mérési körülményektől jelentősen eltérő pH-n számított megoszlási hányados értéke ($\log D_{2,0}$). Az ábrát tekintve megfigyelhető, hogy a permeabilitás illetve annak logaritmusa trendszerűen jobban korrelál a legtöbb fizikai-kémiai változóval, mint a membránretenció, a szöveti lipidkivonattól függetlenül. Érdekes, hogy a rotálható kötések száma nem köthető egyértelműen a permeabilitáshoz, hiszen a permeabilitással rendre pozitív, a membránretencióval viszont rendre negatív korrelációs kapcsolatot mutatott.

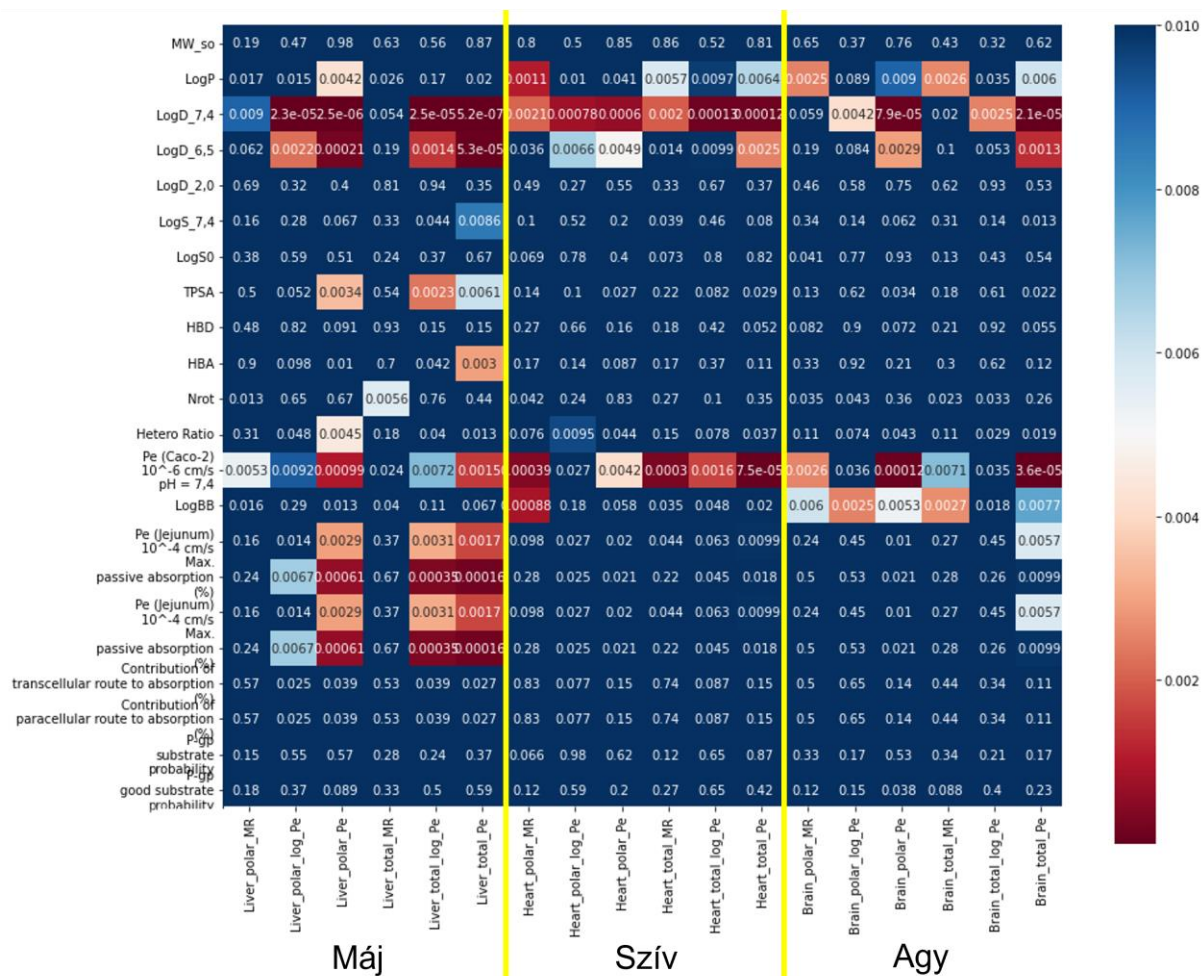


20. ábra A mérési eredmények (permeabilitás, membránretenció) és a fizikai-kémiai paraméterek lineáris korrelációja

A **21. ábrán** a **20. ábrához** hasonlóan a különböző természetes lipidkivonatokon mért effektív permeabilitás és membránretenció értékek, illetve a gyógyszerkutatás során használt különböző fizikai-kémiai paraméterek láthatók a tengelyeken. Az ábrán az adatok összehasonlításakor a szignifikancia mértékét bemutató „p” értékek láthatók. Egy eredmény annál szignifikánsabb minél kisebb a „p” értéke. Általában ha $p < 0,01$ akkor az adatot statisztikailag szignifikánsnak tekintjük, amennyiben $p < 0,00012$ akkor az adat erősen szignifikánsnak minősül. A nullhipotézis feltételezi, hogy a Pearson-féle korrelációs együttható értéke 0, melyet az adott szignifikancia szinttel elvetünk. A szignifikancia mértékének növekedését, azaz a „p” érték csökkenését mutatja, ha a kék szín felől a vörös felé haladunk. Azaz a molekulatömeg esetén pl. nincs szignifikáns eltérés, a 7,4-es pH-n becsült deszkriptor értékek esetén szignifikáns differencia van a legtöbb esetben. Ebben az esetben is jellemző, hogy a mérési körülményekhez hasonló deszkriptorok pl. 7,4-es pH esetén a Caco-2 permeabilitás (P_e), és a $\log D_{7,4}$ esetén kaptunk a kiemelten szignifikáns eredményeket. Az agy szövetből származó lipidkivonatok esetében itt is megfigyelhető a $\log BB$ értékekkel a szignifikancia, ami az in vitro és in silico modell jóságát is jelöli hiszen a $\log BB$ érték épp az in

vivo agyi megoszlást hivatott jellemezni. A **20. ábrán** látható korrelációs együtthatók a **21.ábrán** látható „p” értékek segítségével értelmezendők, azaz egy korreláció abban az esetben szignifikáns, ha a **20.ábrán** látható korrelációs együttható értéke ± 1 -hez közelít, és „p” értéke alacsony.

A **20-21. ábrák** a Python 3.9.7, Matplotlib 3.4.3 és a Seaborn 0.11.2. programok segítségével készültek. A statisztikai számítások a Numpy 1.21.2, Pandas 1.3.4. és a Scipy 1.7.1. segítségével végeztük.



21.ábra A mérési eredmények és a hozzájuk tartozó korrelációs nullhipotézis „p” értékei

4.4. Összefoglalás

A CELSA/21/019 (Active learning and interpretation of computational model on tissue specific permeability for stock and virtual drug discovery library) projektben résztvevőként kutatásunk során 32 vegyület effektív permeabilitásának (P_e) és membránretenciójának (MR) mérését végeztük el a PAMPA in vitro, mesterséges membrán alapú technika segítségével. A kutatás során kereskedelembe kapható, szövetspecifikus totál és poláris lipidfrakciókból képzett mesterséges membránokat használtunk. Fontos kiemelni, hogy bár a poláris agy eredetű lipidkivonat alapú PAMPA modell egy általános gyógyszerkutatási eszköz a központi idegrendszeri hatóanyag-jelöltek jellemzésében / osztályozásában, viszont a vizsgálatunkba bevont többi lipidkivonat, de különösen a totál lipidek alkalmazására a PAMPA szakirodalomban eddig nem volt példa. Így a vizsgálatunk nem csupán a modellalkotásban, de ezen lipidek jellemzésében, illetve a hatóanyagokon keresztül a permeabilitási tulajdonságaikra vonatkozóan is új információt hordoz. A vizsgált lipidkivonatoknak a gyártó ugyan megadja a főbb összetevők mennyiségét, azonban a listában számos ismeretlen komponenst is megjelölnek, esetenként jelölve nagy arányukat is a kivonatban. A lipidkivonatok további jellemzésére meghatároztuk a három lipidkivonat-párból készített liposzómák méretviszonyait, és Zeta-potenciál értéküket. Megvizsgáltuk a kiválasztott vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak eloszlását, továbbá külön vizsgáltuk a látszólag gátolt permeabilitású hatóanyagokat, mely esetekben a fogadóoldalon nem volt detektálható az adott vegyület detektálási határa az alkalmazott analitikai módszer alkalmazása mellett. A mérések kiértékelése során először összehasonlítottuk a vegyületek permeabilitás értékeit és azok ionizációs állapotait a kísérletekben alkalmazott 7,4-es pH-es közegre vonatkozóan. A Zeta-potenciálok mérési adatai alapján ANOVA teszt segítségével vizsgáltuk az egyes lipidkivonatok közötti különbséget, amit aztán összevetettünk a kivonatok alkotó lipidkomponensek összetételével. Kapcsolatot kerestünk az azonos szövetekből származó totál és poláris lipidkivonatok között a mért effektív permeabilitás értékeik alapján, szövetek szerint átlagos értékeket tekintve, és vegyületenként külön-külön vizsgálva is. Megvizsgáltuk továbbá, hogy van-e kapcsolat a különböző szövetekből származó totál-totál és poláris-poláris lipidkivonatok között is. Emellett Pearson-féle korrelációs mátrix segítségével elemeztük, hogy van-e kapcsolat a különböző szövetekből származó lipidkivonatok, és különböző, in silico számított fizikai-kémiai paraméterek között.

A mérési eredményeinket áttekintve általánosságban elmondható, hogy a 7,4-es pH-n pozitív töltéssel, vagy a töltéssel nem rendelkező (semleges) vegyületek permeabilitása

fokozottabb az alkalmazott lipidmembrántól függetlenül. A liposzómák Zeta-potenciál értékeinek összehasonlítása során mindhárom lipidkivonat-pár esetén szignifikáns különbséget tapasztaltunk. A Zeta-potenciál mérések alapján készült ANOVA tesztek eredménye megmutatta, hogy a totál lipidek szövetenkénti összehasonlításában a nagyobb eltérések az agy kivonatokhoz köthetők. Ez kapcsolatban lehet a lipidkivonat összetételével, hiszen főleg az agy totál-poláris kivonatokban jelentős mennyiségben előfordul a foszfatidilszerin, illetve nagy arányban vannak még a gyártó által nem ismertett komponensek is. Fontos megállapítás még, hogy a totál-poláris párokra jellemző zeta-potenciál értékek tendenciája a máj esetén megfordul, tehát nagyobb negatív potenciált mutat a totál kivonat a poláriséhoz képest. A liposzómák méretét vizsgálva a totál és poláris frakciókat egymással összehasonlítva csak a szív lipidkivonatok esetén látható szignifikáns különbség.

A totál és poláris lipidkivonatok szövetenként egymással összevetve, ha az effektív permeabilitások átlagát vizsgáltuk, nem volt szignifikáns eltérés a kivonatok között, azonban ha egyedileg vegyületek szerint kerestünk eltéréseket, akkor kiemelkedtek olyan vegyületek, melyek tendenciaszerű devianciát mutattak minden lipidkivonat esetén. Ezek jellemzően kiemelkedően magas permeabilitású, semleges vagy bázikus karakterű vegyületek voltak. Végül a különböző szöveteken mérhető permeabilitások összehasonlítása során azt találtuk, hogy a totál lipidfrakciók összevetésénél jelentős különbség a szív-máj, illetve az agy-máj szövetpárok között volt, míg a poláris esetben jelentősebb különbséget jobbra az agy-máj szövetpár mutatott. Ezen eredmények a zeta-potenciál értékekkel csak részleges átfedést mutatnak, így valószínűsíthető, hogy a liposzómákra meghatározott zeta-potenciál önmagában nem elég a PAMPA lipidmembránjára jellemző permeabilitási viszonyok leírására.

Az összefüggések pontosításához egy Pearson-féle korrelációs mátrix segítségével vizsgáltuk a permeabilitás/membránretenció és egy predikciós szoftverrel számolt fizikai-kémiai paraméterek között fennálló korrelációkat. Elsősorban a PAMPA mérés során alkalmazott közegnek megfelelő pH-n becsült paraméterek ($\log D_{7,4}$, $\log D_{6,5}$, Caco-2 P_e) mutattak szignifikáns korrelációt a mérési eredményeinkkel, továbbá hasonlóságot figyeltünk meg az agyból származó lipidkivonatok és a becsült $\log BB$ értékek, illetve a máj lipidkivonatok és a becsült jejunum permeabilitási értékek között. A mátrix alapján a máj lipidmembránokon mért permeabilitások és membránretenciók leírására több paraméterrel is szorosabb korreláció mutatkozott, így kijelenthető, hogy a három rendszer közül mind a mért adatok, a fizikai-kémiai paraméterek és a zeta-potenciálra vonatkozóan is a máj lipidkivonat-rendszer mutat egyedi tendenciákat, míg az agy és a szív lipidkivonatokból képzett membránok egymáshoz hasonlóan viselkednek.

A jövőbeli célunk a dolgozat tárgyát képező, eddig szakirodalomban nem vizsgált szövetspecifikus lipidmembránok permeabilitási viszonyainak jellemzésére KU Leuven keminformatikusainak segítségével további magasabb rendű, összetettebb modellek kidolgozása és publikálása.

5. Referenciák

- [1] L. Di, E. H. Kerns, K. Fan, O. J. McConnell, and G. T. Carter, "High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier," *Eur J Med Chem*, vol. 38, no. 3, pp. 223–232, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0223-5234(03)00012-6.
- [2] J. Müller, K. Ezzo, G. Dargó, Á. Könczöl, and G. T. Balogh, "Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 79, pp. 53–60, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.019.
- [3] E. Neirinckx *et al.*, "Species comparison of oral bioavailability, first-pass metabolism and pharmacokinetics of acetaminophen," *Res Vet Sci*, vol. 89, no. 1, pp. 113–119, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.rvsc.2010.02.002.
- [4] P. Artursson, K. Palm, and K. Luthman, "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport," 2001. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- [5] "Apical (A) side Basolateral (B) side Intestinal membrane." [Online]. Available: www.nature.com/reviews/drugdisc
- [6] M. Kansy, F. Senner, and K. Gubernator, "Communications to the Editor Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes," 1998. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [7] „<https://thebiologynotes.com/difference-between-active-transport-and-passive-transport/>”
- [8] Balogh György Tibor, "Permeabilitás - PAMPA és Caco2 modellek," in *A gyógyszerkutatás kémiaja*, First., G. M. Keserű, Ed. Budapest: Akadémiai kiadó, 2011, pp. 352–357.
- [9] J. Ponmochi *et al.*, "Development of skin-on-a-chip platforms for different utilizations: Factors to be considered," *Micromachines*, vol. 12, no. 3. MDPI AG, pp. 1–25, Mar. 01, 2021. doi: 10.3390/mi12030294.
- [10] Alex Avdeef, "Membrane Retention (Iso-pH without Chemical Sink) ," in *Absorption and drug development*, Second., A. Alex, Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012, pp. 357–359.
- [11] Alex Avdeef, "Effects of Cosolvents, Bile Acids, and Other Surfactants," in *Absorption and drug development*, Second., A. Alex, Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012, pp. 360–361.
- [12] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, and A. Falcão, "Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 87, no. 3. Elsevier B.V., pp. 409–432, Aug. 01, 2014. doi: 10.1016/j.ejpb.2014.03.012.
- [13] Simándi Béla, "Anyagátadás szállítással (konvektív anyagtranszport)," in *VEGYIPARI MŰVELETEK II. Anyagátadó műveletek és kémiai reaktorok*, Second., B. Simándi, Ed. Typotex Kiadó, 2012, pp. 27–28.
- [14] Alex Avdeef, "Individual-Well Stirring," in *Absorption and drug development*, Second., A. Alex, Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012, p. 368.
- [15] Alex Avdeef, "Stirring with Orbital Shakers," in *Absorption and drug development*, Second., A. Alex, Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012, pp. 365–368.

- [16] Szeleczy Gábor, "Felszívódás," in *A gyógyszerkutatás kémiája*, First., G. M. Keserű, Ed. 2011, pp. 447–452.
- [17] B. Sipos *et al.*, "Spray-dried indomethacin-loaded polymeric micelles for the improvement of intestinal drug release and permeability," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 174, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.ejps.2022.106200.
- [18] B. Sinkó *et al.*, "Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, no. 5, pp. 698–707, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2012.01.011.
- [19] L. Di, E. H. Kerns, I. F. Bezar, S. L. Petusky, and Y. Huang, "Comparison of blood-brain barrier permeability assays: In Situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB," *J Pharm Sci*, vol. 98, no. 6, pp. 1980–1991, 2009, doi: 10.1002/jps.21580.
- [20] J. Müller, K. Ezzo, G. Dargó, Á. Könczöl, and G. T. Balogh, "Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 79, pp. 53–60, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.019.
- [21] V. F. Patel, F. Liu, and M. B. Brown, "Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 3, pp. 746–756, Aug. 10, 2012. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.026.
- [22] A. Kokate, X. Li, P. J. Williams, P. Singh, and B. R. Jasti, "In silico prediction of drug permeability across buccal mucosa," *Pharm Res*, vol. 26, no. 5, pp. 1130–1139, May 2009, doi: 10.1007/s11095-009-9831-4.
- [23] E. Borbás *et al.*, "In vitro dissolution-permeation evaluation of an electrospun cyclodextrin-based formulation of aripiprazole using μ FluxTM," *Int J Pharm*, vol. 491, no. 1–2, pp. 180–189, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.06.019.
- [24] P. Agarwal and I. D. Rupenthal, "In vitro and ex vivo corneal penetration and absorption models," *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 6, no. 6, Springer Verlag, pp. 634–647, Dec. 01, 2016. doi: 10.1007/s13346-015-0275-6.
- [25] H. Kidron, K. S. Vellonen, E. M. del Amo, A. Tissari, and A. Urtti, "Prediction of the corneal permeability of drug-like compounds," *Pharm Res*, vol. 27, no. 7, pp. 1398–1407, Jul. 2010, doi: 10.1007/s11095-010-0132-8.
- [26] G. Dargó, A. Vincze, J. Müller, H. J. Kiss, Z. Z. Nagy, and G. T. Balogh, "Corneal-PAMPA: A novel, non-cell-based assay for prediction of corneal drug permeability," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 128, pp. 232–239, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.ejps.2018.12.012.
- [27] "<https://avantilipids.com/product-category/natural-lipids>."
- [28] Alex Avdeef, "Octanol-Impregnated Filters with Controlled Water Pores," in *Absorption and drug development*, Second., A. Alex, Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012, p. 328.
- [29] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *Journal of Controlled Release*, vol. 235, Elsevier B.V., pp. 337–351, Aug. 10, 2016. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [30] J. M. Alakoskela, P. Vitovič, and P. K. J. Kinnunen, "Screening for the drug-phospholipid interaction: Correlation to phospholipidosis," *ChemMedChem*, vol. 4, no. 8, pp. 1224–1251, Aug. 03, 2009. doi: 10.1002/cmdc.200900052.

- [31] ["https://hu.frwiki.wiki/wiki/Algorithme_t-SNE?fbclid=IwAR1_w5P5pYWS7t60XDXm-PLXU4S0jOyIPWu5McktxQrqr8AZ2OJBHMQ2oY."](https://hu.frwiki.wiki/wiki/Algorithme_t-SNE?fbclid=IwAR1_w5P5pYWS7t60XDXm-PLXU4S0jOyIPWu5McktxQrqr8AZ2OJBHMQ2oY)
- [32] O. Ursu and T. I. Oprea, "Model-free drug-likeness from fragments," *J Chem Inf Model*, vol. 50, no. 8, pp. 1387–1394, Aug. 2010, doi: 10.1021/ci100202p.
- [33] D. E. Clark, "Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration," *J Pharm Sci*, vol. 88, no. 8, pp. 815–821, 1999, doi: 10.1021/js980402t.
- [34] M. Lobell, L. Molnár, and G. M. Keserü, "Recent advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure," *J Pharm Sci*, vol. 92, no. 2, pp. 360–370, Feb. 2003, doi: 10.1002/jps.10282.
- [35] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. SUPPL. pp. 4–17, Dec. 2012. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.019.
- [36] H. Pajouhesh and G. R. Lenz, "Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs."
- [37] S. A. Hitchcock and L. D. Pennington, "Structure-brain exposure relationships," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 49, no. 26. pp. 7559–7583, Dec. 28, 2006. doi: 10.1021/jm060642i.
- [38] https://spssabc.hu/ketvaltozos-elemzes/korrelacio/?fbclid=IwAR0espkjzYcJs4wnC_WBRC0Pud-plWoMbigHiddYITL1CmwrrBSaMn6PDPo.%E2%80%9D%20https://spssabc.hu/ketvaltozos-elemzes/korrelacio/?fbclid=IwAR0espkjzYcJs4wnC_WBRC0Pud-plWoMbigHiddYITL1CmwrrBSaMn6PDPo%20

Függelék

F1. táblázat A máj poláris, máj totál és szív poláris lipidkivonatok esetén az effektív permeabilitások átlaga, szórása és a mérések száma

Sorszám	Vegyület	Átlag	Máj poláris Szórás	N	Átlag	Máj totál Szórás	N	Átlag	Szív poláris Szórás	N
1	Ambroxol hidroklorid	54,45	4,50	3	54,48	6,12	3	61,77	6,64	3
2	Buspiron hidroklorid	57,04	1,91	3	35,10	1,48	3	64,73	4,97	3
3	Cetirizin dihidroklorid	18,43	0,47	3	19,04	0,39	3	10,27	2,51	3
4	Dexametazon	27,70	2,50	3	26,91	4,87	3	11,68	0,50	3
5	Dibukain	39,92	7,88	3	28,64	9,73	3	48,61	1,71	3
6	Famotidin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
7	Flutamid	29,35	6,86	3	47,85	4,44	3	50,28	9,11	3
8	Indapamid	16,89	1,31	3	24,47	1,50	3	5,37	1,46	3
9	Lamotrigin	14,97	2,77	3	41,34	2,40	3	7,46	2,44	3
10	Lanzoprazol	24,43	5,94	3	61,94	10,41	3	18,47	4,46	3
11	Levomepromazin	28,52	22,67	3	0,00	0,00	3	6,35	0,96	3
12	Metoprolol tartarát	13,17	11,56	3	40,10	1,04	3	10,96	0,50	3
13	Nepafenak	38,58	17,44	3	72,92	2,90	3	25,93	3,95	3
14	Nitrazepám	25,40	2,68	3	55,56	2,71	3	28,59	2,14	3
15	Norfloxacin	7,17	6,36	3	0,00	0,00	3	1,59	0,32	3
16	Ondanzetron	25,69	4,49	3	57,25	3,98	3	13,69	1,37	3
17	Enoxacin	3,49	0,15	3	4,25	0,53	3	3,70	0,70	3
18	Rozuvasztatin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
19	Koffein	11,30	0,87	3	20,28	3,07	3	4,19	0,96	3
20	Furoszemid	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
21	Cefuroxim	7,10	2,82	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
22	Labetalol hidroklorid	18,97	1,84	3	37,95	3,94	3	8,38	0,73	3
23	Ibuprofén	25,14	6,26	3	28,98	3,57	3	24,23	4,14	3
24	Szulindak	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
25	PGY0072	12,21	0,72	3	22,25	5,29	3	4,67	1,77	3
26	Piroxikám	10,28	0,77	3	16,33	1,13	3	3,50	0,79	3
27	Propamidin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
28	Ramipril (anhidrát)	2,23	0,67	3	4,59	1,21	3	0,00	0,00	3
29	Szulfametoxazol	1,14	0,13	3	1,59	0,54	3	1,10	0,25	3
30	Fenitoin	34,58	2,45	3	44,70	3,18	3	38,36	5,90	3
31	Verapamil hidroklorid	25,06	3,27	3	46,41	1,88	3	11,51	2,70	3
32	Warfarin	7,48	2,25	3	13,92	2,97	3	3,25	0,74	3

F2. táblázat A szív totál, agy poláris és agy totál lipidkivonatok esetén az effektív permeabilitások átlaga, szórása és a mérések száma

Sorszám	Vegyület	Átlag	Szív totál Szórás	N	Átlag	Agy polár Szórás	N	Átlag	Agy totál Szórás	N
1	Ambroxol hidroklorid	40,13	3,49	3	46,71	4,93	3	37,54	4,42	3
2	Buspiron hidroklorid	31,73	1,20	3	61,96	4,38	3	32,41	1,53	3
3	Cetirizin dihidroklorid	1,64	0,07	3	11,67	1,45	3	7,07	2,88	3
4	Dexametazon	3,28	0,17	3	14,23	3,38	3	9,67	1,80	3
5	Dibukain	37,28	12,04	3	64,95	6,13	3	40,24	4,23	3
6	Famotidin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
7	Flutamid	41,76	13,81	3	58,14	13,18	3	35,51	2,45	3
8	Indapamid	2,04	0,15	3	6,60	1,22	3	5,22	0,92	3
9	Lamotrigin	3,98	0,46	3	10,11	1,83	3	11,22	3,48	3
10	Lanzoprazol	21,92	6,61	3	26,57	1,39	3	28,60	2,74	3
11	Levomepromazin	12,78	1,31	3	14,81	2,49	3	13,37	4,54	3
12	Metoprolol tartarát	9,07	0,49	3	8,49	1,88	3	10,80	0,92	3
13	Nepafenak	18,80	3,67	3	21,34	2,20	3	24,44	1,25	3
14	Nitrazepám	35,07	1,66	3	21,51	3,17	3	34,07	1,94	3
15	Norfloxacin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
16	Ondanzetron	9,85	1,30	3	19,60	4,04	3	23,49	3,56	3
17	Enoxacin	0,40	0,35	3	7,58	1,30	3	4,48	1,23	3
18	Rozuvasztatin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
19	Koffein	2,62	0,76	3	2,97	0,22	3	1,96	0,20	3
20	Furoszemid	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
21	Cefuroxim	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
22	Labetalol hidroklorid	5,37	0,68	3	22,21	2,11	3	15,05	2,41	3
23	Ibuprofén	17,28	1,39	3	7,64	0,70	3	8,97	0,53	3
24	Szulindak	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
25	PGY0072	4,26	1,89	3	4,23	0,60	3	3,23	0,66	3
26	Piroxikám	1,92	1,69	3	2,35	0,57	3	3,57	0,16	3
27	Propamidin	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
28	Ramipril (anhidrát)	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
29	Szulfametoxazol	0,42	0,37	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
30	Fenitoin	14,71	3,49	3	27,21	3,23	3	35,31	5,15	3
31	Verapamil hidroklorid	42,68	8,46	3	34,41	6,71	3	60,01	2,04	3
32	Warfarin	0,29	0,51	3	0,47	0,82	3	2,43	0,20	3

F3 táblázat Az ACD/Percepta szoftver által becsült fizikai-kémiai paraméterek

Sorszám	Vegyület	Molekulatömeg [Da]	TPSA [$\text{\AA}^2$]	logP [-]	logD _{7,4} [-]
1	Ambroxol hidroklorid	414,56	58,28	2,7	1,31
2	Buspiron hidroklorid	421,96	69,64	3,04	2,68
3	Cetirizin dihidroklorid	461,81	53,01	2,51	-0,56
4	Dexametazon	392,46	94,83	1,92	1,92
5	Dibukain	343,46	54,46	3,67	1,77
6	Famotidin	337,45	237,75	-0,8	-1,67
7	Flutamid	276,2	74,92	3,14	3,14
8	Indapamid	365,83	100,88	2,15	2,14
9	Lamotrigin	256,09	90,71	1,68	1,68
10	Lanzoprazol	369,36	87,08	2,41	2,4
11	Levomepromazin	328,47	41,01	4,92	3,02
12	Metoprolol tartarát	684,81	50,72	1,81	-0,29
13	Nepafenak	254,28	86,18	1,38	1,38
14	Nitrazepám	281,27	87,28	2,03	2,03
15	Norfloxacin	319,33	72,88	-0,56	-3,04
16	Ondanzetron	365,85	59,11	2,61	1,62
17	Enoxacin	320,32	85,77	-0,62	-2,83
18	Rozuvasztatin	500,57	149,3	1,36	-1,77
19	Koffein	194,19	58,44	0,28	0,28
20	Furoszemid	330,74	131,01	2,35	-0,78
21	Cefuroxim	446,37	199,06	0,1	-3,64
22	Labetalol hidroklorid	364,87	95,58	2,74	0,85
23	Ibuprofén	206,28	37,3	3,37	0,45
24	Szulindak	356,41	73,58	3,34	0,3
25	PGY0072	265,12	66,91	2,3	1,9
26	Piroxikám	331,35	107,98	2,22	-1,16
27	Propamidin	312,37	118,2	1,33	-1,67
28	Ramipril (anhidrát)	416,51	95,94	3,44	-0,13
29	Szulfametoxazol	253,28	106,6	0,65	-0,55
30	Fenitoin	252,27	58,2	2,42	2,38
31	Verapamil hidroklorid	491,06	63,95	4,01	2,44
32	Warfarin	308,33	63,6	3,11	0,31

F4. táblázat A lipidkivonatokból készített liposzómák méretét összehasonlító ANOVA teszt eredménye. A szignifikancia mértékének növekedését a csillagok számának növekedésével érzékeltettük.

Összehasonlított lipidkivonatok	Szignifikancia	„p” érték
Máj poláris – Máj totál	Nem szignifikáns	0,9360
Máj poláris – Szív poláris	Nem szignifikáns	0,2551
Máj poláris – Szív totál	****	<0,0001
Máj poláris – Szív poláris	**	0,0042
Máj poláris – Agy totál	***	0,0001
Máj totál – Szív poláris	Nem szignifikáns	0,9848
Máj totál – Szív totál	****	<0,0001
Máj totál – Agy poláris	Nem szignifikáns	0,0546
Máj totál – Agy totál	***	0,0008
Szív poláris – Szív totál	****	<0,0001
Szív poláris – Agy polár	Nem szignifikáns	0,4235
Szív poláris – Agy totál	**	0,0060
Szív totál – Agy poláris	****	<0,0001
Szív totál – Agy totál	****	<0,0001
Agy poláris – Agy totál	Nem szignifikáns	0,3543