

CK2 INHIBITOR TARTALMÚ ALGINÁT MIKROGYÖNGYÖK FORMULÁLÁSA ÉS VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ SEGÉDANYAGOKKAL

Papp Boglárka^{2,3}, Józsa Liza^{1,3}, Pető Ágota^{1,3}, Kósa Dóra^{1,3}, Ujhelyi Zoltán^{1,2,3}, Pallér Ádám³, Bácskay Ildikó^{1,2,3} és Fehér Pálma^{1,2,3}

¹ Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék, 4032 Debrecen, Nagyerdei körút 98 papp.boglarka@pharm.unideb.hu (P.B.); jozsa.liza@euipar.unideb.hu (J.L.); peto.agota@pharm.unideb.hu (P.Á); kosa.dora@pharm.unideb.hu (K.D.); ujhelyi.zoltan@pharm.unideb.hu (U.Z.); bacskay.ildiko@pharm.unideb.hu (B.I); feher.palma@pharm.unideb.hu (F.P.)

² Debreceni Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola, 4032 Debrecen, Nagyerdei körút 98.

³ Debreceni Egyetem, Egészségipari Intézet 4032 Debrecen, Nagyerdei körút 98.



Absztrakt

A kutatási munka során CK2 inhibitor tartalmú alginát mikrogyöngyöket formuláltunk polimerizációs módszerrel. Egyes készítményekben segédanyagokat használtunk a formulálás során a hatóanyag penetrációjának javítása és a készítményeink stabilitásának növelése érdekében. A hatóanyagot tartalmazó nátrium-alginát keverékhez Transcutol® HP-t adtunk és a kapott eredményeket a segédanyag nélküli mikrogyöngyökkel összehasonlítottuk. A készítményekkel különböző gyógyszerforma vizsgálatokat végeztünk, meghatároztuk a kapszulázási hatékonyságot, a duzzadási viselkedést, enzimátikus stabilitási vizsgálatot és in vitro kioldódási vizsgálatot végeztünk. A formulációk sejttéletképességi vizsgálatához MTT tesztet végeztünk Caco-2 sejtvonalon. Végül a készítmények antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásait értékeltük. A Transcutol® HP alkalmazásával a formulációban javult a CK2-inhibitor készítményben történő stabilitása és permeabilitása.

Kulcsszavak: alginát mikrogyöngy, polimerizációs módszer, formulálás, kapszulázási hatékonyság, duzzadási viselkedés, enzimátikus stabilitási vizsgálat, in vitro kioldódási vizsgálat

Bevezetés

A CK2 protein kináz, más néven kazein kináz-2, egy szerin/treonin kináz, amely két katalitikus (α) és/vagy (α') alegységgel és két szabályozó alegységgel rendelkezik [1]. A CK2 számos jelátviteli útvonalat szabályoz, melyek részt vesznek a tumorsejtek túlélésében, proliferációjában, migrációjában és inváziójában [2,3]. A CK2 expressziója és kináz aktivitása emelkedett különböző daganattípusokban és számos citoszolikus szubsztrát foszforilációján keresztül növeli a tumorsejtek agresszivitását [2,4,5].

Emelkedett CK2 kináz aktivitás figyelhető meg egyes humán tumortípusban [6]. A CK2 kémiai inhibitorokkal történő downregulációja elősegíti a tumorsejtek apoptózisát, gátolja a sejtek migrációját, valamint a tumor növekedését [6].

A CK2 protein kináz egyes gyulladással járó betegségek patogenezisében fontos és összetett szerepet játszik [7,8]. A CK2 aktivitása elősegíti az NF- κ B, PI3K-Akt-mTOR és JAK-STAT útvonalak aktiválódását [8]. A CK2 protein kináz ezen tulajdonságai miatt új rákellenes és gyulladáscsökkentő terápiák kifejlesztésének célpontja lehet [7].

A szakirodalom alapján a CK2 fokozza a reaktív oxigén gyökök termelődését [9]. A CK2 fontos szerepet játszik az oxidatív stressz jelátviteli útvonalában. Az antioxidánsok által aktivált transzkripciós faktor, a nukleáris erythroid faktor 2 (Nrf2) szabályozza az oxidatív sérülésekkel szembeni citoprotektív gének indukcióját [10,11]. Pagano és munkatársai igazolták munkájuk során, hogy a szubsztituált benzimidazol-származékok a CK2 hatékony inhibitorai [12]. A szubsztituált heterociklusos gyűrű szerkezet lehetővé teszi a molekula számára a CK2 ATP-kötő zsebébe történő beépülését. Számos CK2-gátló benzimidazol-származékot írtak már le [13,14]. A molekula rossz oldékonysága miatt a hatékony gyógyszerhordozó rendszer kifejlesztése kihívást jelentő feladat volt. A kísérleteinkhez kiválasztott hatóanyag a 2-dimetilamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (DMAT) volt.

A különböző természetes poliszacharidok közül az alginátokat az elmúlt három évtizedben széles körben alkalmazták gyógyszerhordozó rendszerek formulálásában [15]. Az alginát (1,4)-kötött β -D-mannuronát és α -L-guluronát kopolimerje. Az alginát alapú mikrorészecskék, mint gyógyszerhordozó rendszerek biokompatibilisek, biológiailag lebomlóak, védik a hatóanyagot a gasztrointesztinális rendszer környezeti feltételeitől [16]. Emellett célzott hatékonysággal és szabályozott hatóanyag felszabadulással rendelkeznek [17–19]. Az alginát alapú mikrogöngyök formulálása során a hatóanyag az alginát gélben csapdázódik, mely kétértékű kationokkal, mint például Ca^{2+} , Ba^{2+} és Sr^{2+} , az alginátban lévő uronsavmaradványokkal térhálósodik [20–23].

A Transcutol® HP (TC) egy dietilén-glikol-monometil-éter, melyet széles körben alkalmaznak oldószerként/szolubilizátorként, mivel képes javítani a különböző, rossz vízoldékonysággal rendelkező gyógyszerek oldékonyságát. Penetrációfokozóként is alkalmazható különböző gyógyszerformákban, valamint több szerző is igazolta munkája során, hogy javíthatja az in vivo gyógyszerfelszívódást, az in vitro kioldódási sebességet és a hatóanyag felszabadulását, ami a gyógyszer jobb orális biológiai hozzáférhetőségéhez vezet [24–26].

Jelen vizsgálatunk célja a CK2 inhibitort tartalmazó alginát mikrogöngyök előállításának volt a hatóanyag biológiai hozzáférhetőségének fokozása érdekében. Hatóanyagként egy szelektív CK2-inhibitort, a DMAT-ot választottuk, segédanyagként pedig TC-t alkalmaztunk egyes formulációkban. A TC-t a DMAT oldhatóságának, in vitro hatóanyag-felszabadulásának és penetrációjának javítása érdekében alkalmaztuk. A készítmények karakterizálásához különböző gyógyszerforma vizsgálatokat végeztünk el, mértük a kapszulázási hatékonyságot, a duzzadási viselkedést, in vitro kioldódási és enzimikus stabilitási vizsgálatokat végeztünk. A mikrogöngyök sejtelétképességi vizsgálatát Caco-2 adenokarcinóma sejtvonalon végeztük. A formulációk antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatását is vizsgáltuk, a segédanyag nélküli és TC tartalmú göngyök vizsgálati eredményeit összehasonlítottuk.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A DMAT (CAS# 749234-11-5) a Sigma-Aldrich Buchs-tól (St. Gallen, Svájc), az alacsony viszkozitású nátrium-alginát a BÜCHI Labortechnik AG-től (Flawil, Svájc) került beszerzésre. A kalcium-klorid-dihidrátot a VWR International-tól (Debrecen, Magyarország) vásároltuk. A Transcutol® HP-t (dietilén-glikol-monoetil-éter) a Gattefossé-tól (Saint-Priest, Franciaország) vásároltuk. Minden más termék a Sigma-Aldrichtól (St. Louis, MI, USA) került beszerzése.

CK2 inhibitor tartalmú mikrogöngyök formulálása

A mikrogöngyök gyártását BÜCHI Encapsulator Pro B-395 készülékkel végeztük el. Előzetesen 3,30 g nátrium-alginát port oldottunk 200 ml desztillált vízben az 1,5%-os alginát oldat elkészítéséhez. A 100 mM-os CaCl_2 oldat elkészítéséhez 14,701 g kalcium-klorid-dihidrátot oldottunk desztillált víz egy részében, majd 1000 ml-re egészítettük desztillált vízzel. Két, DMAT hatóanyagot (0,5 mg/ml) tartalmazó mikrogöngy gyártását

végeztük el. (1. Táblázat) Az 1. összetétel a hatóanyagot önmagában tartalmazza segédanyagok nélkül, a 2. összetétel esetében a DMAT-ot előzetesen oldottuk Transcutol HP-ban.

	Összetétel	Segédanyag
1	DMAT mikrogyöngyök	-
2	DMAT mikrogyöngyök + TC	Transcutol® HP (0,01% v/v)

1. Táblázat DMAT tartalmú mikrogyöngyök különböző formulációi

A gyártó ajánlása alapján orális gyógyszerformák esetén a nagy tisztaságú TC alkalmazása ajánlott. A gyártás során 200 µm átmérőjű fúvókát használtunk és ennek megfelelően állítottuk be a kapszulázó paramétereit (áramlási sebesség, rezgési frekvencia és elektrosztatikus feszültség) (2. táblázat). Az alginátoldat kalcium-klorid-oldattal töltött 80 rpm sebességű mágneses keverővel ellátott főzőpohárba érkezett és kereszt kötött. Az alginátgyöngyöket 15 percig hagytuk keményedni a kalcium-klorid-oldatban. A gyöngyöket ezt követően desztillált vízzel mostuk, majd vákuumszivattyúval 0,4 µm porosméretű membránon szűrtük és Scanvac CoolSafe Touch 110-4 készülékkel liofilizáltuk 24 órán keresztül - 110 °C-on.

Fúvókaátmérő (µm)	Rezgési frekvencia (Hz)	Elektrosztatikus feszültség (V)	Áramlási sebesség (ml/perc)
200 µm	1800	1000-1200	5,06

2. Táblázat A kapszulázó készülék gyártási paramétereit

Kapszulázási hatékonyság

A gyöngyök kapszulázott hatóanyag-tartalmának meghatározásához közvetlenül a formulálás után 1 ml mintát vettünk a CaCl₂ oldatból. A hatóanyag-koncentrációt UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Tokió, Japán) határoztuk meg 420 nm-en. [27] A kapszulázott DMAT mennyiségét a következő képlettel számoltuk ki:

$$\text{Kapszulázási hatékonyság (KH\%)} = \frac{\text{teljes mennyiség (mg)} - \text{vizes közegben található mennyiség (mg)}}{\text{teljes mennyiség (mg)}} * 100$$

Duzzadási viselkedés

A DMAT tartalmú gyöngyök duzzadókéességét desztillált vízben vizsgáltuk. A gyöngyökből egy grammot adtunk 50 ml desztillált vízhez és 37 °C-on Radelkis OP-912 mágneses keverővel (Radelkis, Budapest, Magyarország) kevertettük. A duzzadás

vizsgálatához a gyöngyöket 24 óra elteltével óvatosan kivettük a vízből és a felesleges víz eltávolítása után a tömegüket megmértük [28]. A tömegváltozást a következő egyenlet segítségével számoltuk ki:

$$\text{Duzzadási viselkedés (\%)} = \frac{\text{duzzadt gyöngy tömeg} - \text{kiindulási gyöngy tömeg}}{\text{duzzadt gyöngy tömeg}} * 100$$

Enzimatisz stabilitási vizsgálat

A tanulmány során a gyöngyök enzimatisz stabilitását vizsgáltuk proteolitikus enzimek jelenlétében, pepszin és pankreatin enzimekkel. 20 mg DMAT tartalmú mikrogyöngyöt 100 ml pepszint tartalmazó szimulált gyomornedvbe (SGF) vagy pankreatint tartalmazó szimulált bélmedvbe (SIF) helyeztünk. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk 100 fordulat/perc állandó keverés mellett. Az SGF és a SIF előállítás az Európai Gyógyszerkönyv előírása alapján történt. 120 percen keresztül, előre meghatározott időközönként 1000 µl mintát vettünk és az enzimatisz reakció leállítás érdekében ekvivalens mennyiségű jéghideg reagenshez (0,10 M NaOH az SGF esetében és 0,10 M HCl az SIF esetében) adtuk. Ezt követően 420 nm-es hullámhosszon UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Tokió, Japán) mértük az abszorbancia értékeket [29].

In vitro kioldódási vizsgálat

A DMAT-tartalmú mikrogyöngyök kioldódási vizsgálatához USP kioldódásvizsgáló készüléket (Erweka, DT 800, Langen, Németország) használtunk 100 rpm lapátfordulatszám, 900 ml oldóközeggel 37 °C-on. Kioldóközeggként frissen készített, pankreatint nem tartalmazó szimulált bélfolyadékot (SIF) (pH 6,8) használtunk. A vizsgálat során az oldóközgeből meghatározott időközönként (0,0,5,1,4,8 és 24 óra) egy fecskendő segítségével folyamatosan mintát vettünk. A mintákat 0,45 µm-es membránszűrővel szűrtük, és a DMAT mennyiségét standard kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A minták abszorbanciáját 420 nm-en mértük UV/VIS spektrofotométer segítségével. [30].

MTT citotoxicitási teszt

A sejtek életképességének méréséhez MTT-tesztet végeztünk Caco-2 sejtvonalon. A sejteket előzetesen 104 sejt/lyuk sűrűségben növesztettük Dulbecco DMEM sejtmediumban 96 lyukú lemezen, amíg teljes konfluenciát értük el. A sejtekről eltávolítottuk a fáradt médiumot és PBS-sel mostuk. A hatóanyagot nem tartalmazó gyöngyöket és a DMAT-ot tartalmazó gyöngyöket 1 órán át inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂ mellett. A mintákból 100 mg-ot 10 ml PBS-ben oldottunk fel. 1 óra elteltével a mintákat eltávolítottuk a sejtekről és MTT festékoldatot (5 mg/ml) adtunk hozzá. A sejteket az oldattal 3 órán keresztül 37°C-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk. A festéket eltávolítottuk a mintákból, és a keletkezett formazán kristályokat 2-propanol:sósav 25:1 arányú keverékében oldottuk fel. A sárga tetrazónium só a sejtek anyagcsere-aktivitása miatt a mitokondriális enzimek lila színű, oldhatatlan formazánkristályokká alakítják át. Az oldatok abszorbanciáját 570 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (Thermo-Fisher Multiskan Go (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA)) mértük, amelyből kiszámítható az életképes sejtek százalékos aránya. Pozitív kontrollként PBS-t, negatív kontrollként pedig Triton-X 100 (10% w/v) oldatot használtunk.

Transzepithelialis elektromos ellenállás (TEER)

Az adenokarcinóma sejtek membránintegritás változásának vizsgálatához transzepithelialis elektromos ellenállást (TEER) mértük. A sejteket 404 sejt/lyuk sűrűségben növesztettük 24 lyukú lemezen, hogy konfluens réteget képezzenek. Negatív kontrollként PBS-t, pozitív kontrollként pedig Triton X-100-at (10% w/v) használtunk. A mérést akkor végeztük el, amikor a sejtintegritás 1000 és 1200 Ω cm² közötti TEER-értékeket mutatott. A sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákkal, a vizsgálat során adott időközönként folyamatos mérést végeztünk. A TEER mérése egy elektródapár segítségével történt Millipore Millicell-ERS 00001 berendezéssel (Merck, Waltham, MA, USA). A minták eltávolítása után a

következő 12 órában folytattuk a méréseket a regenerálódás vizsgálatára [31].

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) teszt

A 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) egy kolometriás meghatározási módszer, mely során a sötétlila oldat antioxidáns jelenlétében sárgára változik a gyökfogó tulajdonság függvényében. A vizsgálat során CK2-inhibitorot tartalmazó két összetétel antioxidáns tulajdonságait vizsgáltuk. A tesztoldat elkészítéséhez 96%-os etanollal hígítottuk a DPPH port (M = 394,33 g/mol). Minden egyes mintából 100 μ l-t PBS-ben hígítva adtunk 2 mL DPPH tesztoldathoz (0,06 mM). A mintákat tartalmazó oldatokat 30 percig inkubáltuk és fénytől védve tartottuk. Pozitív kontrollként PBS-t, negatív kontrollként pedig Troloxot (10,0 μ M) alkalmaztunk. A visszamaradt DPPH mennyiségi mérését UV spektrofotométerrel végeztük 517 nm hullámhosszon. Az antioxidáns aktivitás százalékos arányát (AA%) a következő egyenlet segítségével határoztuk meg [32].

$$AA\% = 100 - \frac{(Minta\ abszorban\text{cia} - Vak\ abszorban\text{cia})}{Kontroll\ abszorban\text{cia}} \times 100$$

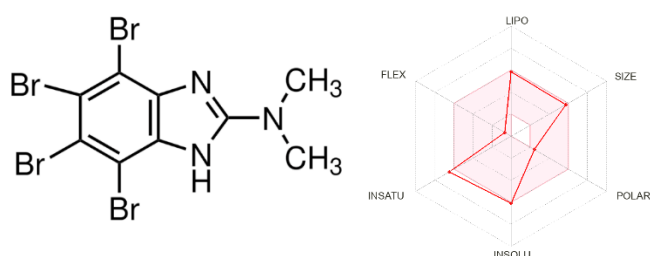
In vitro gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata

A mikrogöngyök gyulladáscsökkentő hatását Caco-2 sejtvonalon vizsgáltuk. A sejteket 104 sejt/lyuk sűrűségben növesztettük 96 lyukú lemezen a teljes konfluencia eléréséig, majd a fáradt médiumot eltávolítottuk. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 1 órán keresztül inkubáltuk a minta oldatokkal. Minden összetételű mikrogöngyökből 100 mg-ot PBS-sel hígítottunk a vizsgálat elvégzéséhez. A gyulladás indukálásához 50 μ L IL-4-et (30 ng/mL) adtunk a sejtekhez, és egy éjszakán át inkubáltuk. Az inkubációt követően a sejtekből eltávolítottuk a felülúszót, és a gyártó utasításainak megfelelően humán TNF- α ELISA készletet (Sigma-RAB0476) használtunk. Az oldatok abszorbanciáját Thermo Scientific Multiskan GO mikrolemez spektrofotométerrel (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) mértük, és az érték egyenesen arányos volt a minták gyulladáscsökkentő hatásával. [33]

Eredmények

A DMAT in silico fizikai-kémiai jellemzése

A DMAT (476,79 g/mol) fizikai-kémiai jellemzését a SwissADME program [34] segítségével határoztuk meg. A DMAT alacsony vízdékonysággal és magas penetrációval rendelkezik a GI traktuson keresztül, de gyenge penetráció prediktálható a véragyagáton keresztül. A DMAT log Po/w értékét kiszámítottuk, és a konszenzusérték 4,12 volt (öt érték átlaga). A DMAT szerkezetét és fizikai-kémiai tulajdonságainak összefoglalását az 1. ábra mutatja.



1. ábra A DMAT kémiai szerkezete és fizikai- kémiai tulajdonságai

Kapszulázási hatékonyság

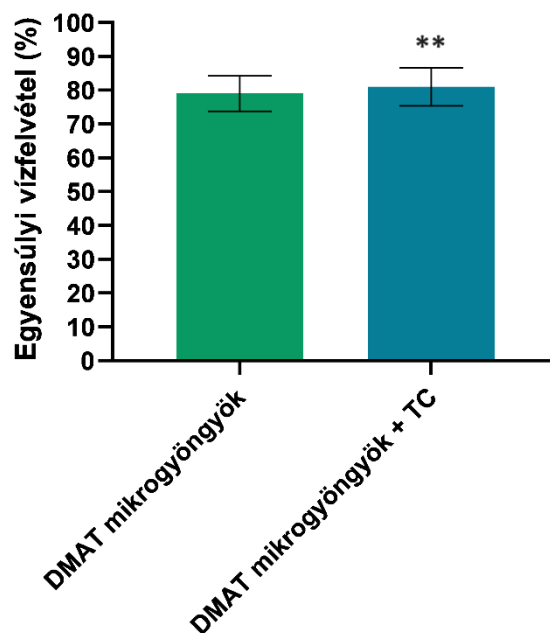
Az alginátgyöngyök DMAT- tartalmát a kapszulázási hatékonyság meghatározásával állapítottuk meg. A kapszulázási hatékonyság (KH%) a segédanyag nélküli DMAT-ot tartalmazó mikrogyöngy esetében 64% volt, míg a TC tartalmú mikrogyöngy esetében 70%-nak adódott (3. Táblázat). Az eredmények alapján elmondható, hogy a segédanyag alkalmazása elősegítette a hatóanyag inkorporálását a segédanyag nélküli gyöngyökkel szemben. A kapszulázási hatékonyságot a 3.3 egyenlet alapján számoltuk ki.

	Összetétel	KH (%)
1	CK2 inhibitor mikrogyöngy	64,32 ± 0,72
2	CK2 inhibitor mikrogyöngy + TC	70,12 ± 0,81

3. táblázat DMAT- tartalmú mikrogyöngyök kapszulázási hatékonysága

Duzzadási viselkedés

A különböző összetételű mikrogyöngyök vízfelvételét a 3.4. szakaszban leírt egyenlet alapján határoztuk meg. A 2. ábra mutatja a gyöngyök tömegének változását a vízfelvétel függvényében 24 óra elteltével. A hatóanyagot önmagában és a TC segédanyagot tartalmazó gyöngyök nagyon hasonló duzzadási mértéket mutattak 24 óra alatt (79 és 81%). A vízfelvételért elsősorban az alginát volt felelős, mivel 7-es pH körülmények között a polimer kiváló duzzadási tulajdonsággal rendelkezik, mely a tömeg növekedését eredményezi.

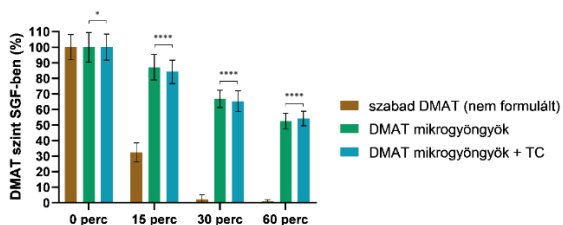


2. ábra A DMAT tartalmú mikrogyöngyök duzzadóképessége desztillált vízben

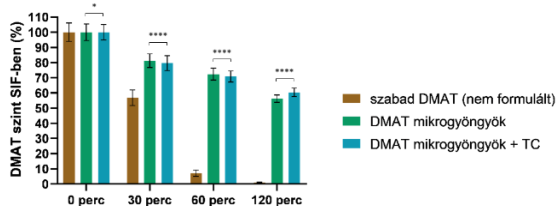
A gyöngyökből egy grammot 50 ml desztillált vízhez adtunk. Az összes összetételt az egyensúlyi vízfelvétel százalékos arányában ábrázoltuk. Minden adatpont 5 minta értékének átlagát jelöli. Az eredmények értékeléséhez egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk Dunett többszörös összehasonlító teszttel. A ** statisztikailag szignifikáns különbséget jelez $p < 0,05$ értéken.

Enzimatisz stabilitási vizsgálat

A mikrogyöngyök enzimatisz stabilitását a szabad (nem formulált) DMAT-mintával hasonlítottuk össze a kísérlet során. A DMAT mindössze 2%-ban volt mérhető SGF-ben, míg SIF-ben 7% szabad hatóanyag volt detektálható 60 perc inkubáció után. Az aktív vegyület az SGF-ben 60 perc után, SIF-ben pedig 120 perc után szinte teljesen elbomlott. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mikrogyöngy formuláció képes megvédeni a hatóanyagot a degradációval szemben. Mindkét formuláció esetében a DMAT legalább 50%-a védett az SGF és a SIF által történő lebomlással szemben. A 3. ábra a kísérlet eredményeit mutatja be.



(a)

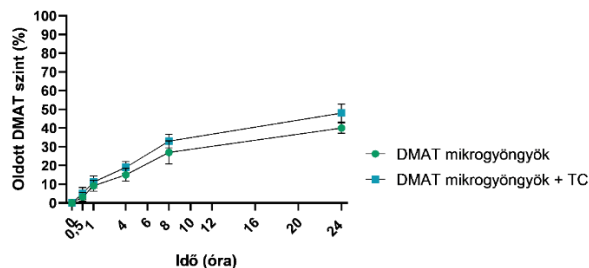


(b)

4. ábra DMAT tartalmú alginát mikrogyöngyök enzimatisz stabilitása SGF (a) és SIF közegben (b). Kontrollként szabad DMAT-ot (nem formulázott) használtunk. Minden adatpont 5 minta értékének átlagát ± szórás jelöli. A segédanyagot tartalmazó készítmények és a csak DMAT-ot tartalmazó készítmények összehasonlítására egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk Dunett többszörös összehasonlító teszttel. * és **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jelez $p < 0,01$ és $p < 0,0001$ értéken.

In vitro kioldódási vizsgálat

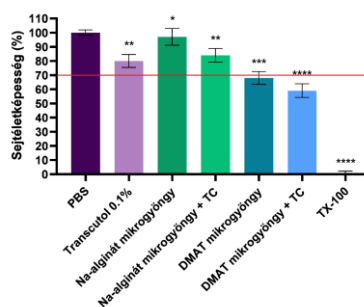
A DMAT felszabadulását a különböző mikrogyöngyökből 6,8 pH mellett figyeltük 24 órán keresztül, az eredményeket a 4. ábra mutatja be. A vizsgálat azt mutatja, hogy a TC hozzáadása a készítményhez jobb hatóanyag-felszabadulást eredményezett, mint a csak a hatóanyagot tartalmazó, segédanyagok nélküli készítmény esetében.



5. ábra DMAT tartalmú mikrogyöngyök kioldódási vizsgálata 6,8 pH-jú pankreatin nélküli szimulált intesztinális folyadékban

MTT sejtéletképességi teszt

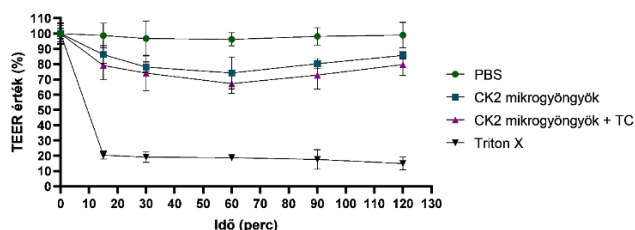
Az MTT-vizsgálat eredményeit a 5. ábra mutatja be. A kísérlet során negatív kontrollként PBS-t, pozitív kontrollként pedig Triton X-100-at használtunk. A sejtéletképességi értékeket a PBS-hez képest hasonlítottuk össze és a negatív kontroll százalékában fejeztük ki. Az üres nátrium-alginát gyöngyök esetében a készítmények biztonságosnak és a sejtek által jól tolerálhatónak bizonyultak, a sejtek életképessége minden esetben következetesen meghaladta a 70%-ot, ami összhangban van az ISO 10993-5:2009 ajánlással. A DMAT-ot tartalmazó gyöngyök esetében azonban a sejtek életképessége csökkent, mind a segédanyag nélküli, mind pedig a TC tartalmú gyöngyök esetében. A sejtek életképességének csökkenése a hatóanyag jelenlétének tulajdonítható, mivel az üres gyöngyök nem mutattak citotoxikus hatást.



5. ábra A sejtek életképességének vizsgálata Caco-2 sejteken az MTT-teszttel, miután a készítményeket 1 órán át inkubálták. A sejtek életképességét a negatív kontroll (PBS) százalékában fejeztük ki. Minden adatpont az átlag ± szórás és $n = 6$. A különböző készítmények és a PBS összehasonlítására egytényezős varianciaanalízist végeztünk Dunett többszörös összehasonlító tesztjével. *, **, *** és **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzi $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ értékeken.

Transzepithelialis elektromos ellenállás (TEER) mérés

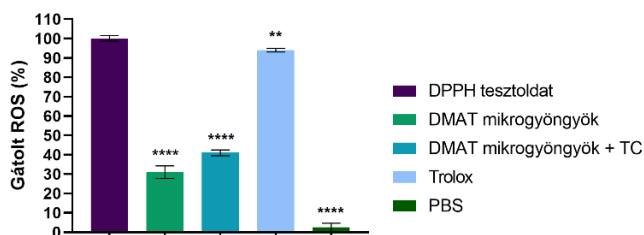
Az adenokarcinóma sejtek membránintegritását TEER-méréssel határoztuk meg. A minták integritása a vizsgálat megkezdése után már 15 perccel alacsonyabb értéket mutatott, majd 60 percre folyamatosan csökkent. Az 1 órás kezelés után a tesztoldatokat eltávolítottuk és friss médiumot adtunk a sejtekhez. A 12 órás inkubáció után a sejtek integritása a kísérlet végén a kiindulási érték 90%-a fölé emelkedett. Negatív kontrollként PBS-t, pozitív kontrollként pedig Triton X-100-at (10% w/v) használtunk. A TC-t tartalmazó gyöngyök nagyobb mértékben voltak képesek megbontani a Caco-2 sejtek integritását a segédanyag nélküli gyöngyökkel szemben. Az eredményeket a 6. ábra mutatja.



6. ábra A Caco-2 sejtek transzepithelialis elektromos ellenállásának értékelése a kezdeti 120 percben

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) teszt

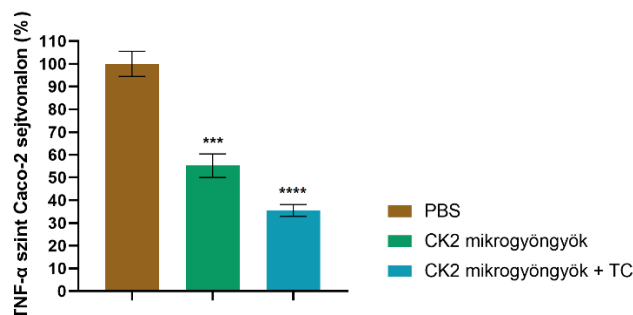
A két készítmény antioxidáns aktivitásának százalékos arányát (AA%) DPPH-tesztoldat segítségével határoztuk meg. A két készítményt összehasonlítva a TC nélküli mikrogyöngyök kisebb gyökfogó aktivitást mutattak. Az eredmények azt mutatták, hogy a DMAT hatékonyabb antioxidáns aktivitással rendelkezik abban az esetben, ha TC-t is tartalmaz a formuláció. Az 7. ábra a kísérlet eredményeit mutatja be.



7. ábra A DMAT tartalmú mikrogyöngyök antioxidáns tulajdonságainak vizsgálata DPPH kolorimetriás módszerrel. A gátolt reaktív oxigéngyökök százalékos arányát a DPPH tesztoldat függvényében ábrázoltuk. Egytényezős varianciaanalízist végeztünk; a ** és a **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzi $p < 0,05$ $p < 0,0001$ értékeken. Minden adat 5 mérés átlagát \pm szórás jelöli.

In vitro gyulladáscsökkentő hatás

A DMAT-tal töltött mikrogyöngyök gyulladáscsökkentő hatását ELISA-teszttel vizsgáltuk Caco-2 sejtvonalon. A negatív kontrollként PBS-t használtunk, mely abszorbancia értékeinek átlagát tekintettük 100%-nak, amelyhez a vizsgált anyagokat hasonlítottuk, és százalékban fejeztük ki. A 8. ábra a Caco-2 sejtvonalon végzett gyulladáscsökkentő teszt eredményét mutatja be a TNF- α szint százalékában kifejezve. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a DMAT jelentős gyulladáscsökkentő hatással bír és a TC segédanyaggal formulázott mikrogyöngyök mutatták a legerősebb gyulladáscsökkentő hatást.



8. ábra A mikrogyöngyök gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon. A különböző készítmények és a PBS összehasonlítására Dunnett-féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk egytényezős varianciaanalízist mellett. *** és **** a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzi $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ értékeken.

Diszkusszió

A CK2 túlzott expressziójáról és fontos szerepéről már számos rákos megbetegedésben említést tettek, beleértve a vesét, a tüdőt, a prosztatát, sőt a glioblastómát (GBM) is [2,35]. A CK2-gátlók képesek apoptózist indukálni, gátolták a tumorsejtek migrációját és csökkentették a tumor

növekedését humán glioblasztómás egér xenograft modellekben [36,37]. Zheng és munkatársai megállapították, hogy a CK2 α gén a GBM nagy százalékában amplifikálódik, és a CK2 gátlása CX-4945-tel (per os CK2 inhibitor) gátolja a GBM növekedését egerekben.

Vizsgálatunkban a DMAT-ot, tetrahalogénezett CK2-inhibítort választottuk és különböző gyógyszerforma, in vitro sejtleletképeségi, gyulladáscsökkentő és antioxidáns kísérleteket végeztünk el. A formulálás növelheti az indeno[1,2-b]indol váz alapú CK2-inhibitorok hatékonyságát [38]. DMAT tartalmú alginát mikrogyöngyöket formuláltunk a Büchi Encapsulator B-395 Pro készülékkel kontrollált polimerizációs módszerrel. A polimer oldathoz TC-t adtunk a hatóanyag-felszabadulás javítása és a DMAT penetrációjának fokozása érdekében [38].

A TC segédanyagot tartalmazó mikrogyöngy formuláció mutatta a legmagasabb egyensúlyi vízfelvételt (83%) a segédanyagot nem tartalmazó gyöngyökhöz képest. A formulálás során a duzzadási tulajdonság fontos tényező, mivel a duzzadási viselkedés befolyásolja az alkalmazhatóságot [39].

A kapszulázási hatékonyság 64% volt abban a készítményben, ahol a CK2 inhibítort segédanyagok nélkül formuláltuk, míg TC tartalmú gyöngyök esetében 70%-os bezáródás volt megfigyelhető. A TC elősegítette a hatóanyag bezáródását a térhálósodott alginát gyöngybe és fokozta a mikrogyöngy stabilitását.

Az in vitro kioldódási teszt alapján a TC alkalmazása a formulációban javította a DMAT kioldódási profilját a segédanyag nélküli mikrogyöngy formulációhoz képest. A készítményből kioldott CK2-inhibitor nagyobb mértékű felszabadulása fokozottabb biohasznosulást és abszorpciót eredményezhet. [40].

A polimer és biológiailag lebomló mátrix kialakításával megakadályozható a hatóanyag nagyfokú lebomlása a gasztrointesztinális traktuson való áthaladása során [41]. Az enzimatiszta stabilitási vizsgálat szerint a szabad hatóanyaggal összehasonlított eredmények alapján a formulációk sikeresen meg tudták védeni

a CK2-inhibítort a gasztrointesztinális traktus környezeti feltételeitől.

A Caco-2 sejtvonal vastagbél adenokarcinómából származik, és széles körben alkalmazott a bél epithelialis barrier modelljeként, mivel ezek a sejtek hasonló gyógyszer-transzportereket expresszálnak, mint a humán bél sejtek [42,43]. Kósa és munkatársai arról számoltak be, hogy alginát hordozók kombinációja TC és Labrasol amfil felületaktív anyagokkal javította a hatóanyag felszívódását a barrierfunkciók reverzibilis megváltoztatásán keresztül [39].

A penetrációfokozóval ellátott, peptiddel töltött alginát gyöngyök kulcsszerepet játszanak a hatóanyag biológiai hozzáférhetőségének javításában [39]. Mangla és munkatársai nanoszerkezetű lipidhordozókat formuláltak a tamoxifen és a szulforafén orális bevitelének fokozására [52]. Azok a formulációk, amelyek TC-t tartalmaztak, jobb in vitro és ex vivo hatóanyag-leadási profilt, valamint jobb bélpermeabilitást eredményeztek [44]. A felhasznált segédanyagok megfelelő koncentrációjának kiválasztásához előzetes életképeségi vizsgálatot végeztünk el. Az alkalmazott legmagasabb koncentrációk bizonyultak a Caco-2 sejtek által még tolerálhatónak.

A TC javíthatja a hatóanyagok biológiai hozzáférhetőségét a készítményekben. Hashemzadeh és munkatársai kimutatták, hogy a dietilén-glikol-monoetil-éternek, mint szolubilizátor/penetrációfokozónak a hatékonysága függ az alkalmazott koncentrációtól önmagában vagy más segédanyagokkal kombinálva [24].

A segédanyagok citotoxikus hatásának megfigyelése kulcsfontosságú mutató a készítmények formulálása során. A formulációk biokompatibilitásának megismerése érdekében MTT-tesztet végeztünk Caco-2 sejtvonalon. Az eredmények azt mutatták, hogy a hatóanyagot nem tartalmazó nátrium-alginát gyöngyök a TC-vel és anélkül is biztonságosak és jól tolerálhatók voltak a sejtek számára, mivel a sejtek életképesége minden esetben 70% feletti volt. A DMAT-ot tartalmazó gyöngyök esetében a citotoxicitási értékek 70% alatt maradtak, ami a

vegyület tumor proliferáció gátló hatását figyelembe véve várható volt.

A két készítmény DPPH-megkötő aktivitását határoztuk meg az antioxidáns tulajdonságok megfigyelése érdekében. A DMAT-tal töltött mikrogyöngy formuláció segédanyagok nélkül 31%-os DPPH-megkötő aktivitást mutatott; míg a TC-t tartalmazó gyöngyök esetében magasabb antioxidáns hatás volt megfigyelhető (41%). Ezek az eredmények összhangban vannak az in vitro kioldódási vizsgálatokkal, mivel a segédanyag alkalmazása javíthatta a DMAT kioldódását és a hatóanyag nagyobb mennyisége jelentősebb antioxidáns hatást eredményezett. A készítmény antioxidáns hatása a feloldott hatóanyag mennyiségétől függött. Számos szerző bizonyította, hogy a TC javíthatja az in vivo gyógyszerfelszívódást, az in vitro oldódási sebességet és a hatóanyag felszabadulását, ami a hatóanyag jobb orális biológiai hozzáférhetőségéhez vezet [24–26]. Spaglova és munkatársai arról számoltak be munkájuk során, hogy a TC javította az indometacin oldhatóságát és hatóanyag-leadását [45].

Számos olyan betegségről - amelyekben a gyulladásos válasz fontos szerepet játszik - számoltak be, melyekben abnormális CK2 jelátvitelt figyeltek meg (pl. emlőrák, glomerulonefritisz és T-sejtes limfóma) [7,46]; ezért a CK2-t a gyulladásos betegségek célpontjaként is alkalmazzák [7].

Wang és munkatársai kimutatták, hogy a CK2 inhibitor (PD144795) gátolta a TNF- α által indukált p65 foszforilációt HeLa sejteken [47]. A DMAT-tal töltött mikrogyöngyök gyulladáscsökkentő hatását Caco-2 sejtvonalon ELISA-teszttel vizsgáltuk. A TNF- α , egy klasszikus pleiotróp pro-inflammatorikus citokin, mely szintjének meghatározásával a gyulladáscsökkentő tulajdonság kifejezhető [48]. A segédanyagok nélküli CK2 mikrogyöngy formuláció enyhén csökkentette a TNF- α szintjét (55%). A TC hozzáadása után a formuláció nagyobb gyulladáscsökkentő hatást mutatott (36%). Korábbi vizsgálatunk szerint a TC segédanyag használata a kurkumint tartalmazó SNEDDS készítményekben javíthatta a készítmények gyulladáscsökkentő hatását [33]. Ezek az

eredmények azt is bizonyították, hogy a segédanyagok képesek befolyásolni az in vitro hatóanyag-felszabadulást a készítményekből és modulálni a gyulladáscsökkentő hatást.

Eredményeink alapján elmondható, hogy kifejlesztettük és optimalizáltuk a DMAT-tal töltött alginát mikrogyöngyök hatékony formulációját a TC segédanyag segítségével. A nátrium-alginát mikrogyöngy, mint hordozórendszer bizonyítottan megakadályozta a hatóanyag enzimatis le bomlását és a TC segédanyag javítani tudta a DMAT permeabilitását a Caco-2 sejtvonalon keresztül, valamint jobb biológiai hozzáférhetőséget biztosított a készítmény számára. A formulációk jó antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatást is mutattak, amelyet a segédanyag alkalmazása a készítményben is befolyásolt.

Konklúzió

Jelen tanulmányban DMAT-tal töltött alginát mikrogyöngyöket formuláltunk TC segédanyaggal és nélküle. A TC alkalmazása a készítményekben javította az enzimatis stabilitást és a hatóanyag in vitro kioldódását, valamint növelte a CK2-inhibitor permeabilitását a Caco-2 sejtvonalon. A formulációk in vitro antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatása is bizonyított volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az alginát gyöngyök ígéretes hordozórendszerek lehetnek a CK2-gátlók számára, ugyanakkor rámutatnak arra is, hogy a megfelelő segédanyagok kiválasztása döntő fontosságú a formulálás során.

A CK2 szerepe és túlzott expressziója már bizonyított a szolid tumorok különböző típusaiban. Ezenkívül ma már számos CK2-inhibitor áll rendelkezésre, amelyek in vitro, in vivo és preklinikai vizsgálatokban is hatásosnak bizonyultak a rákos megbetegedésekkel szemben. A jövőben in vivo állatkísérleteket tervezünk a készítményeinkkel, amelyek bizonyíthatják ezeknek a formulációknak a fontosságát a rákterápiában.

Szerzői hozzájárulások

F.P. és B.I. tervezték a kísérleteket. P.B. és F.P. végezték a DMAT fizikai-kémiai értékelését. P.B. végezte a CK2 mikrogyöngyök formulálását és jellemzését. K.D. végezte az enzimatis stabilitási vizsgálatot. P.Á. és U.Z. CaCo-2 sejtvonalon végzett MTT vizsgálatokat. J.L. és B.P. gyulladáscsökkentő és antioxidáns kísérleteket végeztek. F.P. és B.I. írták és szerkesztették a kéziratot. A kéziratot minden szerző elolvasta és elfogadta.

Finanszírozás

A munkát a 2019-2.1.11-TÉT-2020-00098 számú, "Kináz-inhibitor nanopartikulumok formulálása glioblasztóma agydaganat terápiájában" című pályázat támogatta.

A TKP2021-EGA-18 azonosítószámú számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA-pályázati program finanszírozásában valósult meg.

IRODALOM

1. Silva-Pavez, E.; Tapia, J.C. Protein Kinase CK2 in Cancer Energetics. *Front Oncol* 2020, 10, 893, doi:10.3389/fonc.2020.00893.
2. Rowse, A.L.; Gibson, S.A.; Meares, G.P.; Rajbhandari, R.; Nozell, S.E.; Dees, K.J.; Hjelmeland, A.B.; McFarland, B.C.; Benveniste, E.N. Protein Kinase CK2 Is Important for the Function of Glioblastoma Brain Tumor Initiating Cells. *J Neurooncol* 2017, 132, 219–229, doi:10.1007/s11060-017-2378-z.
3. Fakhoury, M. Drug Delivery Approaches for the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016, 44, 1365–1373, doi:10.3109/21691401.2015.1052467.
4. Michael, J.S.; Lee, B.-S.; Zhang, M.; Yu, J.S. Nanotechnology for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *J Transl Int Med* 2018, 6, 128–133, doi:10.2478/jtim-2018-0025.
5. Borgo, C.; D'Amore, C.; Sarno, S.; Salvi, M.; Ruzzene, M. Protein Kinase CK2: A Potential Therapeutic Target for Diverse Human Diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021, 6, 183, doi:10.1038/s41392-021-00567-7.
6. Ji, H.; Lu, Z. The Role of Protein Kinase CK2 in Glioblastoma Development. *Clinical Cancer Research* 2013, 19, 6335–6337, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2478.
7. Singh, N.N.; Ramji, D.P. Protein Kinase CK2, an Important Regulator of the Inflammatory Response? *J Mol Med* 2008, 86, 887–897, doi:10.1007/s00109-008-0352-0.
8. Gibson, S.A.; Benveniste, E.N. Protein Kinase CK2: An Emerging Regulator of Immunity. *Trends Immunol* 2018, 39, 82–85, doi:10.1016/j.it.2017.12.002.
9. Ka, S.-O.; Hwang, H.P.; Jang, J.-H.; Hyuk Bang, I.; Bae, U.-J.; Yu, H.C.; Cho, B.H.; Park, B.-H. The Protein Kinase 2 Inhibitor Tetrabromobenzotriazole Protects against Renal Ischemia Reperfusion Injury. *Sci Rep* 2015, 5, 14816, doi:10.1038/srep14816.
10. Apopa, P.L.; He, X.; Ma, Q. Phosphorylation of Nrf2 in the Transcription Activation Domain by Casein Kinase 2 (CK2) Is Critical for the Nuclear Translocation and Transcription Activation Function of Nrf2 in IMR-32 Neuroblastoma Cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2008, 22, 63–76, doi:10.1002/jbt.20212.
11. Pi, J.; Bai, Y.; Reece, J.M.; Williams, J.; Liu, D.; Freeman, M.L.; Fahl, W.E.; Shugar, D.; Liu, J.; Qu, W. Molecular Mechanism of Human Nrf2 Activation and Degradation: Role of Sequential Phosphorylation by Protein Kinase CK2. *Free Radic Biol Med* 2007, 42, 1797–1806, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.001.
12. Pagano, M.A.; Meggio, F.; Ruzzene, M.; Andrzejewska, M.; Kazimierczuk, Z.; Pinna, L.A. 2-Dimethylamino-4,5,6,7-Tetrabromo-1H-Benzimidazole: A Novel Powerful and Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 321, 1040–1044, doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.067.
13. Battistutta, R.; Mazzorana, M.; Sarno, S.; Kazimierczuk, Z.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. Inspecting the Structure-Activity Relationship of Protein Kinase CK2 Inhibitors Derived from Tetrabromo-Benzimidazole. *Chem Biol* 2005, 12, 1211–1219, doi:10.1016/j.chembiol.2005.08.015.
14. Łukowska-Chojnacka, E.; Wińska, P.; Wielechowska, M.; Poprzeczko, M.; Bretner, M. Synthesis of Novel Polybrominated Benzimidazole Derivatives—Potential CK2 Inhibitors with Anticancer and Proapoptotic Activity. *Bioorg Med Chem* 2016, 24, 735–741, doi:10.1016/j.bmc.2015.12.041.
15. Doderio, A.; Alberti, S.; Gaggero, G.; Ferretti, M.; Botter, R.; Vicini, S.; Castellano, M. An Up-to-Date Review on Alginate Nanoparticles and Nanofibers for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Adv Mater Interfaces* 2021, 8, 2100809, doi:10.1002/admi.202100809.
16. Nayak, A.K.; Das, B.; Maji, R. Calcium Alginate/Gum Arabic Beads Containing Glibenclamide: Development and in Vitro Characterization. *Int J Biol Macromol* 2012, 51, 1070–1078, doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.021.
17. Bhujbal, S. V.; Paredes-Juarez, G.A.; Niclou, S.P.; de Vos, P. Factors Influencing the Mechanical Stability of Alginate Beads Applicable for Immunoisolation of Mammalian Cells. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014, 37, 196–208, doi:10.1016/j.jmbbm.2014.05.020.
18. Moradhaseli, S.; Sarzaeem, A.; Mirakabadi, A.Z.; Mohammadpour Dounighi, N.; Soheily, S.; Borumand, M.R. Preparation and Characterization of Sodium Alginate Nanoparticles Containing ICD-85 (Venom Derived Peptides) Component Analysis of Venom View Project Design, Preparation and Characterization of Agkistrodon Halys Venom Entrapped Chitosan Nanoparticles View Project Preparation and Characterization of Sodium Alginate Nanoparticles Containing ICD-85 (Venom Derived Peptides); 2013; Vol. 4;
19. Dounighi, N.M.; Zolfagharian, H.; Khaki, P.; Bidhendi, S.M.; Sarei, F. Alginate Nanoparticles as a

- Promising Adjuvant and Vaccine Delivery System. *Indian J Pharm Sci* 2013, 75, 442, doi:10.4103/0250-474X.119829.
20. Venkatesan, J.; Anil, S.; Singh, S.K.; Kim, S.-K. Preparations and Applications of Alginate Nanoparticles. In *Seaweed Polysaccharides*; Elsevier, 2017; pp. 251–268.
21. Thai, H.; Thuy Nguyen, C.; Thi Thach, L.; Thi Tran, M.; Duc Mai, H.; Thi Thu Nguyen, T.; Duc Le, G.; Van Can, M.; Dai Tran, L.; Long Bach, G.; et al. Characterization of Chitosan/Alginate/Lovastatin Nanoparticles and Investigation of Their Toxic Effects in Vitro and in Vivo. *Sci Rep* 2020, 10, 909, doi:10.1038/s41598-020-57666-8.
22. Daemi, H.; Barikani, M. Synthesis and Characterization of Calcium Alginate Nanoparticles, Sodium Homopolymannuronate Salt and Its Calcium Nanoparticles. *Scientia Iranica* 2012, 19, 2023–2028, doi:10.1016/j.scient.2012.10.005.
23. Adrian, E.; Treľová, D.; Filová, E.; Kumorek, M.; Lobaz, V.; Poreba, R.; Janoušková, O.; Pop-Georgievski, O.; Lacík, I.; Kubies, D. Complexation of CXCL12, FGF-2 and VEGF with Heparin Modulates the Protein Release from Alginate Microbeads. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 11666, doi:10.3390/ijms222111666.
24. Hashemzadeh, N.; Jouyban, A. Review of Pharmaceutical Applications of Diethylene Glycol Monoethyl Ether; 2022; Vol. 25;.
25. Singh, D.; Tiwary, A.K.; Bedi, N. Canagliflozin Loaded SMEDDS: Formulation Optimization for Improved Solubility, Permeability and Pharmacokinetic Performance. *J Pharm Investig* 2019, 49, 67–85, doi:10.1007/s40005-018-0385-5.
26. Alvi, M.M.; Chatterjee, P. A Prospective Analysis of Co-Processed Non-Ionic Surfactants in Enhancing Permeability of a Model Hydrophilic Drug. *AAPS PharmSciTech* 2014, 15, 339–353, doi:10.1208/s12249-013-0065-8.
27. Amini, Y.; Amel Jamehdar, S.; Sadri, K.; Zare, S.; Musavi, D.; Tafaghodi, M. Different Methods to Determine the Encapsulation Efficiency of Protein in PLGA Nanoparticles. *Biomed Mater Eng* 2017, 28, 613–620, doi:10.3233/BME-171705.
28. Manjanna, K.M.; Pramod Kumar, T.M.; Shivakumar, B. Calcium Alginate Cross-Linked Polymeric Microbeads for Oral Sustained Drug Delivery in Arthritis. *Drug Discov Ther* 2010, 4, 109–122.
29. Mallikarjuna Setty, C.; Sahoo, S.S.; Sa, B. Alginate-Coated Alginate-Polyethyleneimine Beads for Prolonged Release of Furosemide in Simulated Intestinal Fluid. *Drug Dev Ind Pharm* 2005, 31, 435–446, doi:10.1080/03639040500214647.
30. Medina, J.R.; Aguilar, E.; Hurtado, M. DISSOLUTION BEHAVIOR OF CARBAMAZEPINE SUSPENSIONS USING THE USP DISSOLUTION APPARATUS 2 AND THE FLOW-THROUGH CELL METHOD WITH SIMULATED GI FLUIDS. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017, 9, 111, doi:10.22159/ijpps.2017v9i11.21201.
31. Srinivasan, B.; Kolli, A.R.; Esch, M.B.; Abaci, H.E.; Shuler, M.L.; Hickman, J.J. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *SLAS Technol* 2015, 20, 107–126, doi:10.1177/2211068214561025.
32. Baliyan, S.; Mukherjee, R.; Priyadarshini, A.; Vibhuti, A.; Gupta, A.; Pandey, R.P.; Chang, C.-M. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus Religiosa*. *Molecules* 2022, 27, 1326, doi:10.3390/molecules27041326.
33. Józsa, L.; Vasvári, G.; Sinka, D.; Nemes, D.; Ujhelyi, Z.; Vecsernyés, M.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Lekli, I.; Gyöngyösi, A.; et al. Enhanced Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Self-Nano and Microemulsifying Drug Delivery Systems Containing Curcumin. *Molecules* 2022, 27, 6652, doi:10.3390/molecules27196652.
34. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci Rep* 2017, 7, 42717, doi:10.1038/srep42717.
35. Pagano, M.A.; Bain, J.; Kazimierczuk, Z.; Sarno, S.; Ruzzene, M.; Di Maira, G.; Elliott, M.; Orzeszko, A.; Cozza, G.; Meggio, F.; et al. The Selectivity of Inhibitors of Protein Kinase CK2: An Update. *Biochemical Journal* 2008, 415, 353–365, doi:10.1042/BJ20080309.
36. Prudent, R.; Moucadel, V.; Nguyen, C.-H.; Barette, C.; Schmidt, F.; Florent, J.-C.; Lafanechère, L.; Sautel, C.F.; Duchemin-Pelletier, E.; Spreux, E.; et al. Antitumor Activity of Pyridocarbazole and Benzopyridoindole Derivatives That Inhibit Protein Kinase CK2. *Cancer Res* 2010, 70, 9865–9874, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0917.
37. Zheng, Y.; McFarland, B.C.; Drygin, D.; Yu, H.; Bellis, S.L.; Kim, H.; Bredel, M.; Benveniste, E.N. Targeting Protein Kinase CK2 Suppresses Prosurvival Signaling Pathways and Growth of Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 2013, 19, 6484–6494, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0265.

38. Zhao, Y.; Liu, D.; Yan, Z.; Zhang, Z.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Xue, C. Preparation and Characterization of the Ag₂Se Flexible Films Tuned by PVP for Wearable Thermoelectric Generator. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 2021, 32, 20295–20305, doi:10.1007/s10854-021-06535-9.
39. Kósa, D.; Pető, Á.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Budai, I.; Németh, J.; Fehér, P.; Bácskay, I.; Ujhelyi, Z. Oral Bioavailability Enhancement of Melanin Concentrating Hormone, Development and In Vitro Pharmaceutical Assessment of Novel Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2021, 14, 9, doi:10.3390/pharmaceutics14010009.
40. Nasr, A.; Gardouh, A.; Ghorab, M. Novel Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (S-SNEDDS) for Oral Delivery of Olmesartan Medoxomil: Design, Formulation, Pharmacokinetic and Bioavailability Evaluation. *Pharmaceutics* 2016, 8, 20, doi:10.3390/pharmaceutics8030020.
41. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog Polym Sci* 2012, 37, 106–126, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
42. Hidalgo, I.J.; Raub, T.J.; Borchardt, R.T. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology* 1989, 96, 736–749.
43. Seithel, A.; Karlsson, J.; Hilgendorf, C.; Björquist, A.; Ungell, A.-L. Variability in mRNA Expression of ABC- and SLC-Transporters in Human Intestinal Cells: Comparison between Human Segments and Caco-2 Cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 28, 291–299, doi:10.1016/j.ejps.2006.03.003.
44. Mangla, B.; Neupane, Y.R.; Singh, A.; Kumar, P.; Shafi, S.; Kohli, K. Lipid-Nanopotential Combinatorial Delivery of Tamoxifen and Sulforaphane: Ex Vivo, in Vivo and Toxicity Studies. *Nanomedicine* 2020, 15, 2563–2583, doi:10.2217/nnm-2020-0277.
45. Špaglová, M.; Čuchorová, M.; Šimunková, V.; Matúšová, D.; Čierna, M.; Starýchová, L.; Bauerová, K. Possibilities of the Microemulsion Use as Indomethacin Solubilizer and Its Effect on in Vitro and Ex Vivo Drug Permeation from Dermal Gels in Comparison with Transcutol®. *Drug Dev Ind Pharm* 2020, 46, 1468–1476, doi:10.1080/03639045.2020.1802483.
46. Yamada, M.; Katsuma, S.; Adachi, T.; Hirasawa, A.; Shiojima, S.; Kadowaki, T.; Okuno, Y.; Koshimizu, T.-A.; Fujii, S.; Sekiya, Y.; et al. Inhibition of Protein Kinase CK2 Prevents the Progression of Glomerulonephritis; 2005;
47. Wang, D.; Westerheide, S.D.; Hanson, J.L.; Baldwin, A.S. Tumor Necrosis Factor α -Induced Phosphorylation of RelA/P65 on Ser529 Is Controlled by Casein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 32592–32597, doi:10.1074/jbc.M001358200.
48. Sethi, J.K.; Hotamisligil, G.S. Metabolic Messengers: Tumour Necrosis Factor. *Nat Metab* 2021, 3, 1302–1312, doi:10.1038/s42255-021-00470-z.