

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Növényi hatóanyagokat tartalmazó külsőleges
gyógyszerformák formulálása és vizsgálata**

Dr. Józsa Liza

Témavezető: Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

*„A tudományos munkát nem a közvetlen haszna alapján kell megítélni.
Önmagáért, a tudomány szépségéért kell végezni.”*

Marie Curie

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. Természetes eredetű hatóanyagot tartalmazó külsőleges készítmények a gyógyászatban	11
2.2. A <i>Spirulina platensis</i>	12
2.2.1. A <i>Spirulina platensis</i> bioaktív vegyületei.....	13
2.2.2. A <i>Spirulina platensis</i> szerepe a bőrgyógyászatban és az acne vulgaris terápiájában	15
2.3. <i>Calendula officinalis</i>	16
2.3.1. A <i>Calendula officinalis</i> bioaktív vegyületei	17
2.3.2. A <i>Calendula officinalis</i> szerepe a reumatoid arthritisz terápiájában	17
2.4. Bőrfelületre szánt félszilárd készítmények	19
2.4.1. Kenőcsök és krémek	20
2.4.2. Gélek	21
2.4.3. A hatóanyag diffúziós képességét fokozó anyagok	22
2.5. HaCaT sejtvonala	26
3. Célkitűzés	27
4. Anyagok és módszerek.....	29
4.1. Felhasznált anyagok	29
4.2. Kivonatok készítése.....	30
4.2.1. Liofilizált <i>Spirulina platensis</i> kivonat készítése és karakterizálása.....	30
4.2.2. Liofilizált <i>Calendula officinalis</i> virágkivonat készítése és karakterizálása.....	30
4.3. Külsőleges gyógyszerformák formulálása.....	31
4.3.1. <i>Spirulina platensis</i> tartalmú krémek formulálása	31
4.3.2. <i>Calendula officinalis</i> tartalmú topikális készítmények formulálása.....	32
4.3.3. <i>Calendula officinalis</i> tartalmú gélek formulálása	34
4.4. Gyógyszerforma vizsgálatok	35
4.4.1. A pH meghatározása	35
4.4.2. Textúra analízis.....	35
4.4.3. Reológiai analízis.....	36
4.4.4. <i>In vitro</i> hatóanyag-felszabadulás és diffúziós vizsgálatok.....	36
4.4.4.1. Matematikai és kinetikai elemzés	37
4.5. Sejttenyésztés módszertana	38
4.6. Cytotoxicitás vizsgálata.....	39

4.7. Antioxidáns hatás vizsgálata	40
4.7.1. Szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitásának meghatározása UV-sugárzásnak kitett HaCaT sejteken	40
4.7.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás meghatározása	41
4.8. A <i>Spirulina platensis</i> tartalmú készítmények antibakteriális hatásának vizsgálata	42
4.9. A <i>Calendula officinalis</i> tartalmú készítmények klinikai vizsgálata	42
4.10. Statisztikai elemzés.....	44
5. Eredmények.....	45
5.1. A <i>Spirulina platensis</i> alga tartalmú krémek vizsgálatának eredményei.....	45
5.1.1. Makroszkópikus tulajdonságok és kémhatása	45
5.1.2. Textúra elemzés	46
5.1.3. <i>In vitro</i> hatóanyag felszabadulás és diffúzió vizsgálata.....	47
5.1.3.1. Matematikai és kinetikai elemzés eredménye	49
5.1.4. <i>In vitro</i> citotoxicitási vizsgálata HaCaT sejtvonalon	51
5.1.4.1. A <i>Spirulina platensis</i> és az alkalmazott segédanyagok citotoxicitása	51
5.1.4.2. A <i>Spirulina platensis</i> tartalmú készítmények citotoxicitása	52
5.1.5. A <i>Spirulina platensis</i> tartalmú készítmények <i>in vitro</i> antioxidáns vizsgálatai	54
5.1.5.1. Szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitásának mérése HaCaT sejteken.....	54
5.1.5.2. A <i>Spirulina platensis</i> porral formulált összetételekkel végzett DPPH vizsgálat	56
5.1.6. Antibakteriális hatás vizsgálata.....	57
5.2. A <i>Calendula officinalis</i> tartalmú készítmények vizsgálatának eredményei.....	59
5.2.1. A <i>Calendula officinalis</i> tartalmú készítmények makroszkópikus tulajdonságai és kémhatásuk	59
5.2.2. Textúra elemzés	60
5.2.3. Reológiai jellemzés	62
5.2.4. <i>In vitro</i> hatóanyag felszabadulás és diffúzió vizsgálata.....	65
5.2.4.1. A diklofenák-nátrium <i>in vitro</i> felszabadulása és diffúziós profilja.....	66
5.2.4.2. A metil-szalicilát <i>in vitro</i> felszabadulása és diffúziós profilja.....	68
5.2.4.3. A kvercetin <i>in vitro</i> felszabadulása és diffúziós profilja.....	69
5.2.5. A <i>Calendula officinalis</i> tartalmú készítmények sejtéletképeségre gyakorolt hatása	71
5.2.6. A <i>Calendula officinalis</i> tartalmú gyógyszerkészítmények antioxidáns hatása.....	72
5.2.7. A terápiás hatás vizsgálata – humán klinikai vizsgálat.....	74
5.2.7.1. A fájdalom mértékének meghatározása	74

5.2.7.2. A szinoviális membrán vastagságának mérése	75
6. Megbeszélés	77
6.1. A <i>Spirulina platensis</i> tartalmú készítmények vizsgálati eredményeink megbeszélése.	77
6.2. A <i>Calendula officinalis</i> tartalmú készítmények vizsgálati eredményeink megbeszélése	80
7. Összefoglalás.....	84
8. Summary	85
9. Irodalomjegyzék.....	86
9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	86
9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke	99
10. Ábrajegyzék	101
11. Táblázatok jegyzéke.....	103
12. Tárgyszavak	104
13. Keywords	104
14. Köszönetnyilvánítás	105
Függelék.....	107

Rövidítések jegyzéke

CE	kémiai penetrációfokozó (Chemical Enhancer)
CLS	sejtvonal szolgáltatás (Cell Lines Service)
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRM	Cremophor
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
EC ₅₀	maximális effektív koncentráció fele (half effective concentration)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethilen-diamine-tetraaceticacid)
EGTA	egtazinsav (egtazic acid)
FBS	magzati szarvasmarha szérum (Foetal Bovine Serum)
FDA	Amerikai gyógyszerügyi hatóság (Food and Drug Administration)
GLA	Gamma-linolénsav (Gamma linolenic acid)
HaCaT	Emberi felnőtt bőr keratinocitái, alacsony extracelluláris Ca ²⁺ koncentráción és emelkedett hőmérsékleten tartva (Human adult skin keratinocytes, low Ca ²⁺ elevated Temperature)
HEPES	ikerionos szulfonsav puffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HLB	hidrofil-lipofil egyensúly (Hydrophilic-lipophilic Balance)
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
IPM	izopropil-mirisztát (Isopropyl myristate)
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
MHB	Mueller-Hinton táptalaj (Mueller-Hinton Broth)
MTT	3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetazolium-bromid (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid (Nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NF-κB	Nukleáris faktor-kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
O/V	olaj a vízben emulzió

P60	poliszorbát 60 (Polysorbate 60)
PBS	foszfát pufferelt sóoldat (Phosphate Buffered Saline)
PC	fikocianin (Phycocyanine)
PGE1	prostaglandin E1
pH	hidrogén-kitevő (potentia hydrogenii)
PVA	polivinil-alkohol
RA	reumatoid artritisz / reumás ízületi gyulladás (rheumatoid arthritis)
ROS	reaktív oxigén gyök (Reactive Oxygen Species)
SD	szórás / standard deviáció (Standard Deviation)
SC	Stratum corneum
SLS	nátrium-lauril-szulfát (Sodium-lauryl-sulfate)
SOD	szuperoxid-dizmutáz (Superoxide dismutase)
SP70	szacharóz-sztearát 70% monoészter (Sucrose stearate 70% monoesters)
SPP	<i>Spirulina platensis</i> por
STAT1	szignál transzducer és transzkripció aktivátor 1 (Signal transducer and activator of transcription 1)
TC	Transcutol HP
TEWL	transzepidermális vízvesztés (Trans-epidermal Water Loss)
TFS	Tefose 63
TROLOX	(±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-kromán-2-karbonsav
TXA2	tromboxán A2 (Thromboxane A2)
UV	ultraviola sugárzás (Ultraviolet radiation)
VAS	vizuális analóg skála (Visual analogue scale)

1. Bevezetés

A természetes eredetű alapanyagok gyógyászati célra történő felhasználása több száz éves múltra tekint vissza. A híres polihisztor, Paracelsus gondolatából - mely szerint „*a természetből jön a betegség és onnan jön a gyógyulása is*”- következtethetünk arra, hogy milyen fontosnak tartották már a 16. században is a természetes gyógymódok alkalmazását. [1]

A természetes eredetű hatóanyagokat tartalmazó külsőleges készítmények számos előnnyel rendelkeznek. Akár preventív vagy terápiás céllal történő használatukkal elkerülhetővé válnak a szintetikus összetevők által okozott esetleges nem kívánt hatások, úgy, mint a hiperszenzitivitási reakció tünetei (kiütés, viszketés, bőrpír, égő érzés). Emellett jobb beteg compliance társul hozzájuk, ugyanis a betegek döntő többsége magasabb fokú együttműködést mutat a természetes eredetű gyógymódokkal szemben. Érdemes azonban szem előtt tartani és kihangsúlyozni, hogy a természetes eredet nem feltétlenül jelent biztonságosabbat vagy jobbat szervezetünk számára, ezért minden esetben körültekintően kell eljárunk ezen terápiás gyógymódok alkalmazása során, hiszen néhányuknak komoly biztonsági aggályai is lehetnek.

A gyógynövények és egyéb természetes eredetű hatóanyagok felhasználását preformulációs vizsgálatoknak kell megelőzniük, emellett a belőlük készült kivonatokat (extraktum) különböző analitikai vizsgálatoknak kell alávetni, amely során a bennük található vegyületek kvalitatív és kvantitatív meghatározása történik. Amennyiben toxikus tulajdonsággal rendelkező vegyület nem kerül azonosításra a vizsgálatok során, valamint a terápiás hatást kiváltó aktív hatóanyag ténylegesen megtalálható a kivonatban, kezdetét veheti a gyógyszerkészítmény formulálása. A formulálás során azonban sokszor abba a problémába ütközünk, hogy az extraktumok hatóanyagai rendkívül lipofilek, rossz vízoldékonysággal rendelkeznek, valamint a biológiai membránokon keresztül történő penetrációs képességük is csekély a nagy molekulásúlyú aktív vegyületek miatt. Mindez csökkentheti a komponens biohasznosulását, így a terápiás hatás mértékét.

A hatóanyagok diffúziós és penetrációs képességét befolyásolhatja azok fizikiai-kémiai tulajdonságai, kémiai szerkezetük, a hidrofil-lipofil csoportok aránya, valamint felszabadulási sebességük az adott gyógyszerformából. Az adott készítmény alkalmazásának módja és időtartama, illetve a bőr fiziológiás állapota is meghatározó tényezők lehetnek a biohasznosulás mértékében, továbbá a vivőanyag típusától és tulajdonságaitól függően

korlátozhatja a hatóanyag felszabadulását és membránon keresztül történő diffúziós képességét. A topikális gyógyszerkészítmények formulálásban kulcsfontosságú a különböző segédanyagok, ezen belül is a felületaktív anyagok alkalmazása, mivel ezek nagymértékben megkönnyíthetik a megfelelő gyógyszerforma kialakítását, továbbá elősegíthetik a hatóanyag bőrön keresztül történő diffúzióját, így fokozhatják a hatás mértékét. [2] Kutatómunkám fő tárgyát a külsőleges gyógyszerkészítmények (kenőcsök, krémek és gélek) formulálásához szükséges megfelelő segédanyagok kiválasztása képezte, különös tekintettel az oldékonyságot és a penetrációs készséget növelő felületaktív anyagok (tenzidek) alkalmazására.

Doktori értekezésem témájaként két különböző terápiás hatással rendelkező természetes eredetű hatóanyagot, a *Spirulina platensis* (*S. platensis*) algát, valamint a *Calendula officinalis* (*C. officinalis*) növény virágát választottam a külsőleges gyógyszerkészítmények formulálásához.

Számos tudományos cikk igazolta már a *S. platensis* kiemelkedő terápiás hatását. Ezek közé tartozik például a testsúly szabályozása az emésztésre gyakorolt hatása révén, emellett immunerősítő, hozzájárul a szív és érrendszer egészségének megőrzéséhez. Mindez a benne található, terápiás szempontból aktív vegyületeknek köszönhető. Az *S. platensis* hatóanyagai révén (pl.: béta-karotin, E-vitamin, fikocianin, szuperoxid-dizmutáz) jelentős antioxidáns, illetve antibakteriális hatással is rendelkezik. [3] Ennek ellenére külsőleges alkalmazása még nem annyira terjedt el, pedig rendkívül értékes hatóanyag. A feltételezett antibakteriális hatását kihasználva kutatómunkám során olyan készítményt szerettem volna formulálni, amely az acne vulgaris terápiájában, mint alternatív kezelési mód megfelelő hatékonysággal alkalmazható például antibiotikum-rezisztencia fennállása esetén.

A másik kutatási vonalat a reumatoid arthritis kezelésére szánt *C. officinalis*, diklofenák-nátrium és metil-szalicilát tartalmú külsőleges készítmények formulálása és vizsgálata képezte. A reumatoid arthritis kezelésében a helyi gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító terápia kiemelkedő jelentőségű. A PhD munkám célja szintetikus és természetes gyulladáscsökkentő hatóanyagokat is tartalmazó helyi hatású készítmények előállítása volt különböző típusú segédanyagok (felületaktív anyagok, gélképzők) alkalmazásával reumás ízületi gyulladás kezelésére. A nem szteroid gyulladásgátlók (NSAID-ok) külsőleges, lokális alkalmazása az ízületi fájdalom egyik fő kezelési alternatívája. Az orális NSAID (pl.: diklofenák-nátrium, ibuprofen, naproxen) terápiával összehasonlítva legalább egyenértékű fájdalomcsillapítást, valamint a fizikai funkciók javulását eredményezik, viszont kevesebb szisztémás mellékhatásuk ismert. [4] A metil-szalicilát illékony szerves vegyület, melyet számos növényfaj szintetizál. [5] Javítja a vérkeringést és

helyi fájdalomcsillapító hatást vált ki. [6] A szakirodalom szerint a diklofenák-nátriumot és metil-szalicilátot tartalmazó külsőleges gyógyszerkészítmények csökkentik a fájdalmat, a duzzanatot és az ízületek merevségét, valamint javítják az ízületi mobilitást reumás megbetegedések esetén. [7] A különböző szintetikus gyulladáscsökkentő hatóanyagok és növényi komponensek egy készítményben történő alkalmazásáról szóló szakirodalmak száma csekély, ezért kutatómunkám során szerettem volna feltérképezni a fent leírt körömvirág tartalmú készítményben lévő hatóanyagok együttes gyulladáscsökkentő hatását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Természetes eredetű hatóanyagot tartalmazó külsőleges készítmények a gyógyászatban

Napjainkban növekvő igény tapasztalható a természetes eredetű gyógyszerek, ezen belül is a gyógynövények iránt. Ezt a tényt az is bizonyítja, hogy egyre több természetes eredetű étrend-kiegészítő és gyógyszer jelenik meg a gyógyszerpiacon, nem beszélve arról, hogy a fejlődő országok lakosságának 80 százaléka ma is tradicionális medicinát, elsősorban gyógynövényeket alkalmaz. A gyógynövények felhasználási területe széleskörű. A gyógyászati felhasználás (fitofarmakonok, fitoterapeutikumok) mellett aromaterápia részeként, főzet vagy forrázat formájában, valamint az élelmiszer- és kozmetikai iparban is megjelennek, illetve gyógyszeriparban modellvegyületként is felhasználják a belőlük izolált biológiailag aktív anyagokat. Az adott növényi részekből készült kivonatok több tíz vagy akár száz komponensből álló anyagkeverékek, ezért alkalmazásuk során komplex hatásra kell gondolnunk. A növényi drogok a hatóanyagok mellett nagymennyiségben tartalmaznak úgynevezett ballasztanyagokat is, melyek szinergista hatást fejthetnek ki vagy módosíthatják az aktív vegyületek hatását. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben számos gyógynövény hivatalos, köztük az antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással rendelkező *C. officinalis* is. [5] Tradicionális külsőleges készítményként tarthatók számon a fekete nadálytő (*Symphytum officinale*) felhasználásával formulált, zúzódások, rándulások kezelésére bizonyítottan alkalmas krémek, kenőcsök. [8] Az árnika (*Arnica montana*) a rándulás vagy ficam következtében kialakuló izom- és ínhúzódások, valamint rovarcsípések kezelésére alkalmazható, míg a vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum*) magjában található hatóanyagok (pl. eszcin) serkentik a vérkeringést és megerősíti az érfalakat, ezáltal az első számú alapanyaga a visszér elleni topikális készítményeknek. [9–11] A flavonoidokban és szaponinokban gazdag orvosi zsályát (*Salvia officinalis*) és a fűszerként is ismert rozmaringot (*Salvia rosmarinus*) a népi gyógyászatban ízületi bántalmak kezelésére, valamint izomlazító kenőcsökben használják. [12]

2.2. A *Spirulina platensis*

A ma élő algafajok változatos morfológiával és fiziológiai sajátosságokkal rendelkeznek, melyek jellemzőek az adott fajra, így közös jellemvonásaik és származásuk alapján könnyen osztályozhatók. [13] A mikroalgák megjelenése a Földön több milliárd évvel ezelőttire tehető a szakirodalom alapján. Gyógyászati szempontból a *Spirulina platensis*, vagy más néven *Arthrospira platensis* a legjelentősebb képviselőjük, amely egy kékeszöld színű, mikroszkopikus, filamentózus (fonalas) cianobaktérium (1. ábra). [14]



1. ábra: A *Spirulina platensis* mikroszkopikus képe

A cianobaktériumok rendszertanilag a prokarióták közé sorolhatók, felépítésük megegyezik a baktériumokéval, azonban fotoszintézisük az oxigén felszabadítás miatt jobban hasonlít a növényekéhez. [15]

Az algák évezredek óta fontos szerepet töltenek be a táplálkozás szempontjából, például több keleti népcsoport rendszeresen fogyasztja a nagyobb méretű, ezáltal könnyen betakarítható fajokat. A ma étrend-kiegészítőként elterjedt mikroalgák, Spirulina-fajok fogyasztása valószínűleg szintén több évszázados múltra tekint vissza. [16] Ez nem véletlen, hiszen ezen algafajok az emberi szervezet számára fontos táp- és ásványi anyagokkal bővelkednek, melyet az is igazol, hogy az Egészségügyi Világszervezet „szuperélelmiszerként” tartja számon őket. [17]

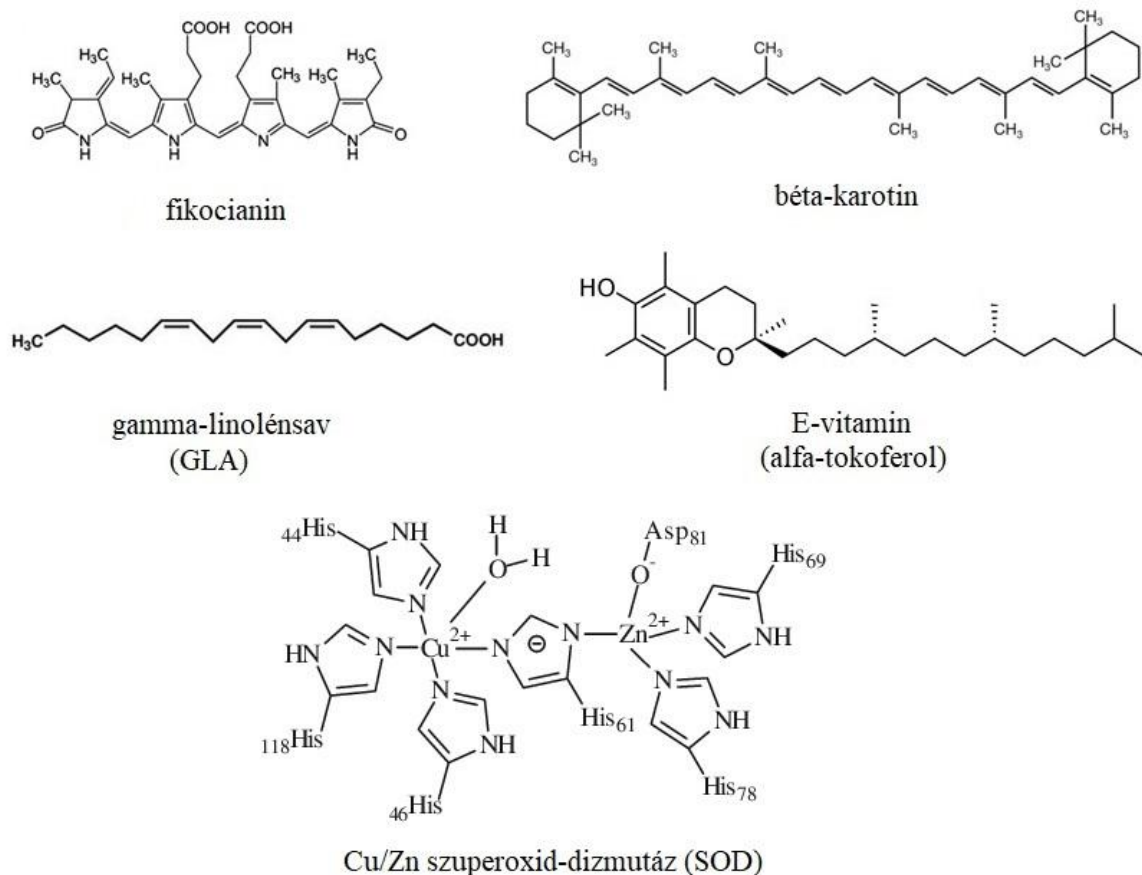
Mindemellett nagyon értékes bőrgyógyászati hatóanyag. Krémek, gélek és emulziók tartalmazzák általában por formájában maximum 2-5%-ban. Javítja a bőr rugalmasságát, antioxidáns hatásának köszönhetően lassítja a bőr öregedését. Pórusösszehúzó hatása mellett nyugtatja a bőrt, valamint visszaállítja a meggyengült sejt-kötéseket és hozzájárulhat a szövetek újraképződéséhez vágások esetén. [18]

2.2.1. A *Spirulina platensis* bioaktív vegyületei

A *S. platensis* a fikocianin (PC) nevű színanyagnak köszönheti zöldeskék színét. A fikocianin egy biológiailag aktív vegyület, mely tengeri élőlényekből, legnagyobb mennyiségben az általam is vizsgált algából izolálható. A fikocianin a fikobiliproteinek (PBP) családjába tartozik. A molekulák színe szerint a fikobiliproteineket három kategóriába lehet sorolni: fikoeritrinre (PE, vörös), fikocianinra (PC, kék) és allofikocianinra (AP, kékeszöld). A fikocianin szerepet játszik a fotoszintézisben, hatékonyan képes összegyűjteni a fény energiáját. Molekulaszerkezetét tekintve α és β alegységekből áll, mindegyik alegység kromoforral van összekapcsolva, így specifikus abszorpciós spektrummal rendelkezik. A fikocianin fikocianobilin (PCB) kromoforokat tartalmaz, melyek abszorpciós tartománya 590-670 nm között található (2. ábra). [19]

A fikocianin antioxidáns hatással bír, képes a reaktív oxigén gyököket semlegesíteni, ezáltal a májban zajló lipid-peroxidáció gátlásában, így a máj védelmében is részt vesz. Képes a szabad hidroxil-gyökök megkötésére, így elkerülhetővé válnak az oxidatív károsodások, és megakadályozható a sejtek idő előtti apoptózisa. Mindemellett több kutatás is zajlik a fikocianin rákellenes szerepéről (például emlőrák, májrák, tüdőrák, vastagbélrák, leukémia és csontvelőrák esetében) *in vitro* és *in vivo*. A fikocianin specifikus affinitást mutat a tumoros sejteken lévő makrofágok (TAM-ok) scavenger-A (SR-A) receptorához, amely a TAM-on nagymértékben expresszálódik. Ez lehetővé teszi a fikocianin szelektív felhalmozódását a tumorsejtekben és célzott hatás kifejtését. [20] Kim és munkatársai leírták, hogy a fikocianin az UV sugárzásnak kitett bőrsejtekben is kedvezően modulálja az apoptotikus útvonalakat, míg Gunes és kutatócsoportja a sebgyógyulást segítő hatását igazolták. [21,22] Ezen túlmenően antibakteriális, gyulladásgátló és immunerősítő (fokozza a limfocita aktivitást és a nyirokrendszer működését) hatással egyaránt rendelkezik. A szakirodalom szerint szelektíven képes gátolni a ciklooxygenáz-2 (COX-2) indukálható izoformát. [23,24]

A *S. platensis* nagymennyiségben tartalmaz béta-karotint is, mely a szervezetbe bekerülve A-vitaminná (retinol) alakul. Jelentős antioxidáns aktivitással rendelkezik, amely segít megóvni a sejteket az oxidatív károsodástól, valamint hozzájárul a fotoprotektív hatás kialakításához. [25]



2. ábra: A *Spirulina platensis* legfontosabb bioaktív vegyületeinek szerkezeti képletei

A *S. platensis* a halakban fellelhető mennyiség sokszorosát tartalmazza a jótékony hatású telítetlen zsírsavakból. Ezek közül kiemelkedő jelentőséggel bír a többszörösen telítetlen gamma-linolénsav (GLA), amelyet a szervezet nem képes szintetizálni, ezért exogén forrásból szükséges pótolnunk. [26] A GLA szerepet játszik a stratum corneum barrier funkcióinak fokozásában, képes csökkenteni a transzepidermális vízvesztés mértékét, valamint hatékony az epidermális hiperproliferáció kezelésében. Hiányában felbomolhat a vízháztartás egyensúlya, ami kiszáradáshoz, ráncosodáshoz vezethet. Humán klinikai vizsgálatok által bizonyított, hogy atópiás dermatitiszben szenvedő betegek ekcémás tünetei enyhültek magas GLA tartalmú készítmények fogyasztása során, csökkent a bőrszárazság, a gyulladás, a viszketés és a hámlás mértéke. [27,28] Mindemellert a GLA fontos prekursora bizonyos biokémiai anyagoknak, mint a prosztaglandinok (pl.: PGE1), tromboxánok (TXA2) és leukotriének, melyek jelentős szerepet játszanak a gyulladásos folyamatokban és az immunválasz kialakításában. [29]

A *S. platensis* kiemelkedő mennyiségben tartalmazza az egyik alapvető antioxidáns enzimet, a szuperoxid-dizmutázt (SOD). A SOD egy fémtartalmú enzim, attól függően, hogy hol fordul elő és milyen fém atomot tartalmaz, három típusát különböztetjük meg. Az elsőként felfedezett szuperoxid-dizmutáz enzim a réz-cink szuperoxid-dizmutáz (Cu/Zn-SOD vagy SOD1). Ez az enzim a citoszolban található meg eukariótákban, míg a mangán szuperoxid-dizmutáz (Mn-SOD vagy SOD2) a mitokondriumokban lokalizálódik, azonban ez az enzim a prokariótákra is jellemző. A harmadik típus vas tartalmú enzim, ez szinte csak prokariótákra jellemző. A SOD a szuperoxid anion gyököket semlegesíti, hidrogén-peroxiddá és oxigénné alakítja át azokat, ezáltal antioxidáns hatással rendelkezik. [30–32]

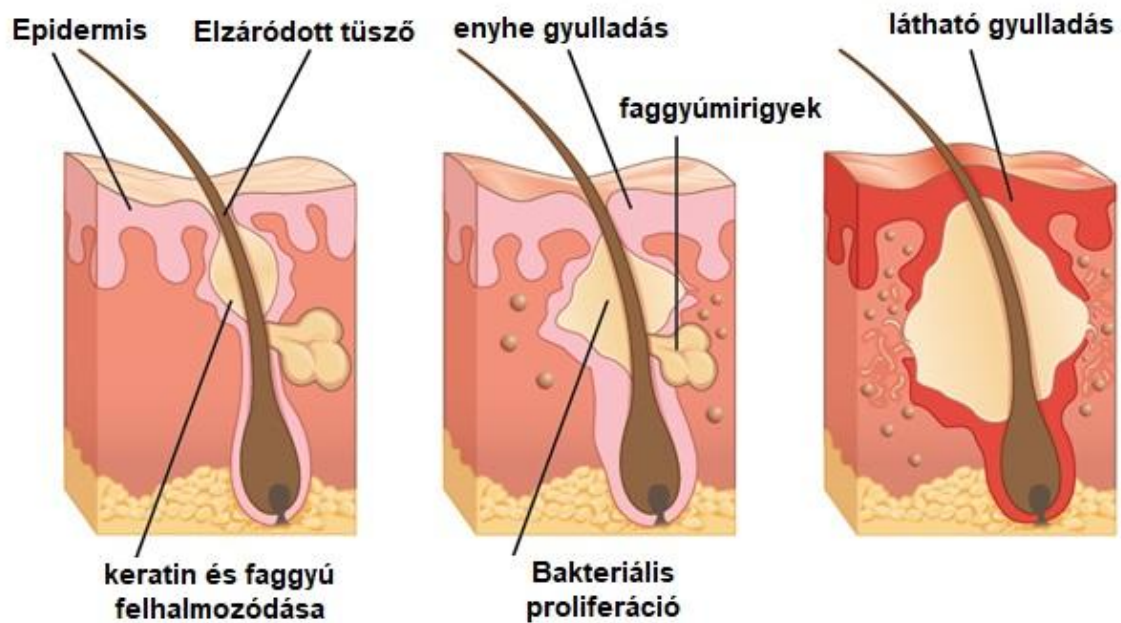
Az E-vitamin (alfa-tokoferol) szintén jelentős antioxidáns hatással bír és az alga kiemelkedően magas mennyiségben tartalmazza. Elsősorban a sejtek sejtthártyáját védi, hozzájárul az öregedési folyamatok lassításához, gátlásához. [33] Antioxidáns aktivitása mellett enzimgátló hatása is bizonyított. A CTGF-géne (connective tissue growth factor) keresztül segíti a sejtregenerációt, sebgyógyulást. [34]

2.2.2. A *Spirulina platensis* szerepe a bőrgyógyászatban és az acne vulgaris terápiájában

A természetes hatóanyagokat tartalmazó külsőleges készítmények terén végzett legújabb kutatások szerint az algák ígéretesek lehetnek különböző bőrproblémák kezelésére a bennük található sokszínű bioaktív vegyületnek köszönhetően. A *S. platensis*-ből kinyerhető telítetlen zsírsavak, esszenciális aminosavak, vitaminok, ásványi anyagok és antioxidánsok elősegítik a sebgyógyulást és gátolják a gyulladásos folyamatok kialakulását, szekunder metabolitjai pedig antibakteriális és antivirális hatással rendelkeznek. [35] Spolaore és munkatársai 0,5 és 1,125%-os *S. platensis* kivonatokat tartalmazó krémek *in vitro* sebgyógyító hatását epiteliális és fibroblaszt sejteket használva vizsgálták. Megállapították, hogy az 1,125%-os *S. platensis* kivonat jelentősen javította a sejtproliferációt és migrációt a seb területén a kontroll krémhez képest. [36] Egyes kutatások szerint a sebgyógyulást segítő aktivitás az algában található fikocianin és karotinoidok jelenlétével kapcsolatos. [22]

Az *S. platensis*-t antibakteriális hatása révén alkalmasnak találták az acne vulgaris kezelésére is. Az acne vulgaris egy multifaktoriális, krónikus gyulladásos bőrbetegség, amely elsősorban a serdülőkorúakat érinti. (3. ábra) Négy fő patogenetikai mechanizmusa van: fokozott faggyútermelés, folliculáris hiperkeratinizáció, bakteriális hiperkolonizáció és gyulladás. [37] A bőrgyulladás és az acne vulgaris kialakulásának és súlyosbodásának

leggyakoribb oka a *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*, korábban *Propionibacterium acnes*) és a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) baktériumok jelenléte. [38] A *C. acnes* képes megtelepedni és szaporodni a bőr faggyútüszőinek csatornáiban, az ottani lipofil környezetben biofilmet képez és különböző virulencia faktorokat termel, melyek kiváltják a gazdaszervezet immunválaszát. A proinflammatorikus citokinek megjelenése mediálja a gyulladást, mely a baktériumok számának növekedésével fokozódik. [39,40]



3. ábra: Az acne vulgaris patogenezise

Nihal és munkatársai kimutatták, hogy a fikocianinban gazdag kenőcs sikeresen alkalmazható az acne lokális kezelésében, ugyanis *C. acnes* és *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ellen is baktericid hatást mutatott. [41]

2.3. *Calendula officinalis*

A *C. officinalis* növény, közismert néven körömvirág az *Asteraceae* család egyik képviselője. Tradicionálisan a nagy sárga vagy narancssárga virágokat (*flos*) és a növény leveleit (*folium*) alkalmazzák alternatív gyógymódként vagy kiegészítő terápiaként főzet, forrázat, tinktúra vagy egyéb folyékony extraktum formájában, legtöbbször krémekben, kenőcsökben. Számos felhasználási területe ismert beleértve a bőr- és hajápolási termékeket.

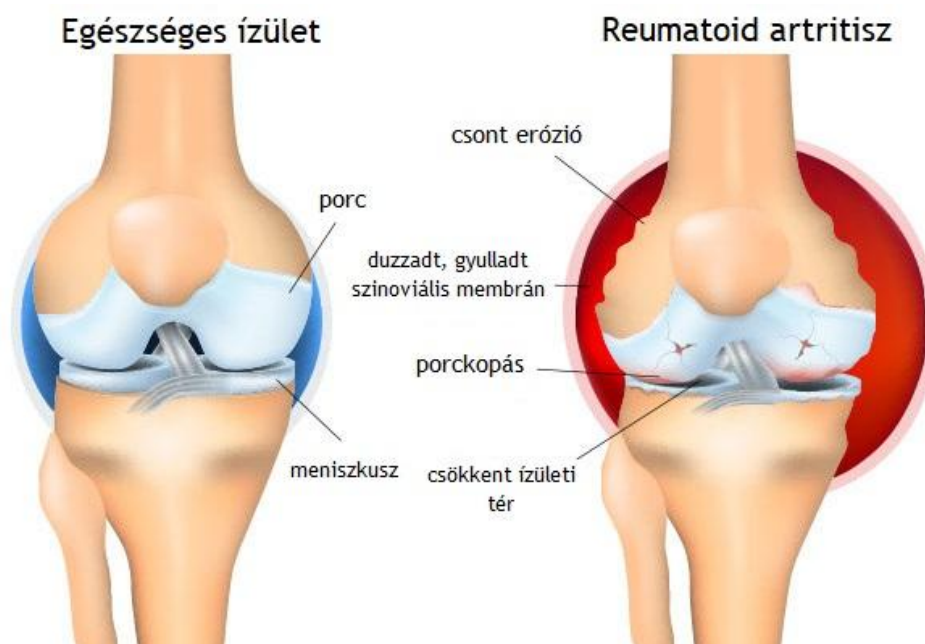
Indiában a virágok felhasználásával formulált kenőcsöket sebek, hegek, valamint herpesz kezelésére, míg a leveleket forrázat formájában használják visszér lokális terápiájában. [42]

2.3.1. A *Calendula officinalis* bioaktív vegyületei

A *Calendula officinalis flos* kivonat számos biológiailag aktív anyagban gazdag, például flavonoidokban, karotinoidokban, glikozidokban és szteroidokban, melyek lehetővé teszik ezt a széleskörű alkalmazást. Polikarbonátokat is tartalmaz, amelyek szerepet játszanak a sebgyógyulásban és a sejtek permeabilitásának szabályozásában. [43] A benne található karotinoidok gyulladáscsökkentő tulajdonsággal rendelkeznek, míg a flavonoidok antioxidáns és antimikrobiális aktivitással bírnak. [44] A *C. officinalis* fő flavonoid komponense a kvercetin, amely jelentős antioxidáns aktivitását a reaktív oxigén- és nitrogényökök semlegesítése révén fejeti ki, de olyan gyulladásos jelátviteli utakat is megcéloz, mint a STAT1, NFκB és MAPK. [45] A körömvirágból készült extraktumnak a proinflammatorikus citokinek, a COX-2 enzim és a prosztaglandin szintézis gátlása révén jelentős gyulladáscsökkentő hatása van. [46,47]

2.3.2. A *Calendula officinalis* szerepe a reumatoid artritisz terápiájában

A reumatoid artritisz (RA) egy szisztémás autoimmun betegség, mely az ízületeket és azok perifériás részeit (ínakat, szalagokat, izmokat) érinti. A gyulladás helyétől, súlyosságától vagy a beteg életkorától függően különböző formákat ölthet. [48] A betegség következtében károsodik az ízületi porc és deformálódás jöhet létre, ami visszafordíthatatlan kórképet eredményez. (4. ábra) Ez a betegség gyakran érinti a vállat és a térdet. [49,50] Terápiája magában foglalja a nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID-ok), szisztémás és lokális kortikoszteroidok és/vagy fizioterápia alkalmazását. [51] Több tanulmány is beszámolt róla, hogy az ízületi gyulladásban szenvedők gyakran alkalmaznak kiegészítő és alternatív terápiás gyógymódot betegségük kezelésére a hagyományos terápiák, például a vénköteles gyógyszerek mellett. [52]



4. ábra: A reumatoid artritisz patogenezeise

A szakirodalom szerint összefüggés van az oxidatív stressz és a krónikus gyulladás között, ugyanis a reaktív oxigén gyökök (ROS) jelenléte szerepet játszik a szövetkárosodás létrehozásában a reumában szenvedő betegeknél. [53] Az oxidáns / antioxidáns egyensúly változása szövetkárosodáshoz vezethet, ezért az antioxidánsok együttes adagolása a reumás betegségekben is fontos. [54]

Az imént említett felismerés igazolja a körömvirág potenciális terápiás hatását a reumatoid artritisz kezelésében. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a *C. officinalis*-ban nagymennyiségben megtalálható kvercetin bioflavonoid gyulladásgátló és antinociceptív hatással rendelkezik. Javadi és munkatársai egy kettős-vak, placebo-kontrollos randomizált klinikai vizsgálat során tanulmányozták a kvercetin pótlás hatását ötven RA-ban szenvedő nő klinikai tüneteinek súlyosságára. Az aktív csoport napi egy 500 mg-os kvercetin kapszulát kapott 8 héten keresztül, a fájdalom intenzitását vizuális analóg skálán (VAS) rögzítették. Az eredmények azt mutatták, hogy a kvercetin kiegészítő kezelésként jótékony hatással volt a reumás ízületi gyulladásra, szignifikáns mértékben csökkentette a fájdalom mértékét, ezáltal javította a betegek életminőségét. [55] A kvercetin külsőleges alkalmazásának ízületi gyulladásra gyakorolt hatásáról nem találtam adatokat a szakirodalomban. Azonban Bodhankar és munkatársai leírták, hogy a körömvirágolaj javítja a diklofenak-nátrium *in vitro* perkután felszívódását Carbopol gélben való alkalmazás során. [56] Készítményeink a körömvirág kivonat mellett diklofenak-nátriumot és metil-szalicilátot is tartalmaztak, melyek

ízületi gyulladásra gyakorolt jótékony hatásairól számos tudományos publikáció áll rendelkezésünkre. A metil-szalicilát (szalicilsav-metil-észter) egy illékony szerves vegyület, számos növényfaj szintetizálja. Irodalmi adatok alapján antireumatikus hatással bír, javítja a vérkeringést és helyi fájdalomcsillapító hatást fejt ki. [5,6] Számos topikális készítmény létezik, amelyek diklofenak-nátriumot és metil-szalicilátot tartalmaz kombinációban a reumatoid arthritisz kezelésére. Ezek a gyógyszerek csökkentik a fájdalmat, a duzzanatot és az ízületi merevséget. A metil-szalicilát gyulladásgátló hatását a citokinek termelődésének, valamint az NF- κ B jelátviteli útvonal aktiválódásának gátlásával képes kifejteni, míg a diklofenak-nátrium esetében ez a hatás a ciklooxygenáz enzim gátlása révén, a prosztaglandin-szintézis gátlásán keresztül érvényesül. [57]

2.4. Bőrfelületre szánt félszilárd készítmények

A megfelelő hatékonyságú bőrfelületre szánt, topikális gyógyszerkészítmény formulálásához kulcsfontosságú a bőr anatómiájának ismerete. Röviden összefoglalva a bőr 3 nagy részre tagolható: epidermisz (a bőr külső rétege), dermisz és szubkutisz (hipodermisz). Amikor bőrápolásról beszélünk, akkor leginkább az epidermisz rétegre kell gondolnunk, azon belül is a legkülsőbb rétegre, a stratum corneumra (SC). Ez az a felület, ami a külvilággal közvetlenül érintkezik, segít megakadályozni, hogy a mikrobák a bőrbe jussanak, támogatja a bőr UV sugarak elleni védelmét, és szabályozza a transepidermális vízvesztés mértékét, ezzel biztosítva, hogy hidratált maradjon a bőr külső rétege és így egészségesen működhessen. Ezen rétegre az úgynevezett „tégla fal-szerkezet” jellemző, ahol a tégláknak az elszarusodott, sejtmag nélküli korneociták felelnek meg, közöttük pedig lipidrteg és víz található. A SC-nak kitűnő diffúziós ellenállása van, számos hatóanyag számára megnehezíti vagy lehetetlenné teszi a mélyebb rétegekbe vagy esetleg a véráramba történő bejutást, ami pedig a transzdermális gyógyszerkészítmények formulálását rendkívül megnehezíti. [58,59]

A topikális gyógyszerkészítmények a bőrfelületen vagy a nyálkahártyán alkalmazott gyógyszerkészítmények, melyek lehetnek lokális és szisztémás hatásúak. A bőrfelületre szánt készítmények közé sorolhatunk olyan dermatológiában használatos kenőcsöket, krémeket és géleket, amelyeket lokális hatás kifejtésére terveztek. A dermatológiai formulációknál cél a hatóanyag koncentrációjának maximalizálása az érintett bőrterületen, ideális esetben minimális szisztémás hatás mellett, míg a transzdermális gyógyszerkészítményeknél (pl.

tapaszok) a bőrre, mint hatóanyag beviteli kapura kell tekinteni és a szisztémás hatása elérése a cél. [60,61]

2.4.1. Kenőcsök és krémek

A kenőcsök az úgynevezett félszilárd gyógyszerformák egyik legjelentősebb csoportját alkotják. Az adott készítmény összetételével, bizonyos segédanyagok használatával szabályozni lehet a lokális vagy a szisztémás hatás kialakulását, illetve a felszívódás mértékét. [62] Szerkezetüknek megfelelően általánosságban elmondható, hogy viszkózus anyagként viselkednek és a nem Newtoni folyadékokra jellemző tulajdonságokkal bírnak, melyek például a nagy nyírófeszültség hatására fellépő plasztikus, pszeudoplasztikus viselkedés vagy a tixotrópia.

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv a kenőcsöket egyfázisú készítményalaként meghatározza meg, míg a krémeket (cremor) többfázisú készítményként tartja számon. [5] Összességében mindkettőre elmondható, hogy általában oldott, emulgeált vagy szuszpendált hatóanyagból és vivőanyagból állnak. A krémekre jellemző a nagyobb víztartalom, ezáltal lágyabb konzisztencia a kenőcsökkel szemben. A vivőanyag legtöbbször több komponensből álló, összetett rendszer, készítményalapnak is nevezik. Ez teszi lehetővé a hatóanyagok plasztikus készítményekké való feldolgozását. Nagyon fontos megemlíteni, hogy míg más gyógyszerformák esetén a vivőanyagok általában nem rendelkeznek terápiás hatással, sőt legtöbbször követelmény is, hogy indifferens legyen, addig a kenőcsök és krémek használatakor mindig számolnunk kell annak bőrre kifejtett hatásával. Az alap-és segédanyagok típusainak kiválasztásakor ezért körültekintően kell eljárni. [63] A bőrfelületre szánt félszilárd gyógyszerkészítményeket több csoportba sorolhatjuk az őket felépítő vázképző anyag tulajdonságait tekintve. A növényi hatóanyagokat tartalmazó kenőcsök és krémek formulálása során többféle vázképző anyagot kipróbáltunk az optimális hatóanyag penetráció meghatározása érdekében. Alkalmazásra került többek között egy szénhidrogéngél vázképző, a fehér vazelin (Vaselinum album), melyet egy természetes eredetű lipogél típusú, abszorpciós alapanyaggal, a lanolinnal (Adeps lanae, gyapjúzsír) kombináltunk. Az említett készítményalapok okklúzív és emolliens hatása kifejezett, vízzel viszonylag nehezen lemoshatók. A vazelin csekély, míg a lanolin jelentős vízfelvevő képességgel rendelkezik. [63] Emellett két másik lipogél típusú vázképző, a Cera flava (sárga méhviasz) és a zsíralkoholok csoportjába tartozó cetil-sztearil alkohol is alkalmazásra került az összetételek fejlesztése során. A megfelelő emulgensek használatával és víz hozzáadásával, valamint a fent

leírt vázképző anyagok alkalmazásával lehetőségünk nyílik emulziós rendszerű kenőcsök és krémek formulálására.

A kívánt hatóanyagleadó rendszer kialakításához elengedhetetlen a kenőcs és krém formulálás általános szempontjainak ismerete. Az összetétel tervezésekor megkerülhetetlen tényező tehát, hogy a megfelelő terápiát a ható - és vivőanyag együttesen alakítja ki, valamint a hatás mértékéhez nagyban hozzájárul a bőr fiziológiás állapota is. A kívánt hatóanyagleadású gyógyszerkészítmény kialakításához fontos ismerni a hatóanyagok oldékonyságát és permeabilitását a biológiai membránokon keresztül. A biohasznosulás mértékét nagymértékben befolyásolhatja továbbá, hogy a hatóanyag oldott vagy szuszpendált állapotban van jelen a készítményben. Az előbbi esetében fontos a kezdeti koncentráció és a diffúziós állandó ismerete is a hatóanyag felszabadulásának és felszívódásának értékeléséhez. [64] Amennyiben a farmakont szuszpendált formában tartalmazza a készítmény, tovább befolyásolja a biohasznosulás mértékét a hatóanyag vivőanyagban való oldhatósága. [63]

2.4.2. Gélek

A gélek kolloid méretű szerves részecskékből és szerves makromolekulákból létrehozott félszilárd gyógyszerformák kolloid koherens rendszerei. Küllemüket tekintve legtöbbször transzparensnek, nagy mennyiségű vizet tartalmaznak (kb. 85-90%), emiatt fizikai-kémia tulajdonságaik hasonlítanak az oldatokéhoz, ugyanakkor könnyen deformálhatóak és alaktartóak. [63] A gélek háromdimenziós térhálós vázszerkezettel rendelkeznek, melynek típusa alapján két nagy csoportba oszthatók. Amennyiben a részecskék között stabil kovalens kötések alakulnak ki, kémiai gélről beszélünk. Ebbe a csoportba tartoznak például az irreverzibilis kohezív térhálós gélek (pl.: polivinil-alkohol (PVA) gél), a szilárd-gáz vagy a szilárd-folyékony xerogélek. A viszonylag gyenge másodrendű kötőerők (van der-Waals kölcsönhatás, hidrogén-kötés) által összetartott vázakkal bíró gélek a fizikai gélek, melyek kevésbé alaktartók, már kis erőbehatásra is folynak, valamint szerkezetük és kialakulásuk erősen függ a közeg pH-jától. [65]

Az általam formulált gélek a makromolekulás hidrogélek csoportjába sorolhatók, melyekben a térhálós szerkezet adott monomerek összekapcsolódásával jön létre. A legismertebb gélképző polimerek közé tartozik a metil-cellulóz, mely a *Formulae Normales VIII*-ban is hivatalos *Hydrogelum methylcellulosi* fő alkotó eleme, félszintetikus polimer. [66] A gyógyszeriparban többek között viszkozitásnövelőként, valamint kötőanyagok granulálás során gyakran alkalmazott hidroxietil-cellulóz is rendelkezik gélképző tulajdonsággal.

Vízben kolloidálisan oldódik, gyorsan és teljes mértékben szolvatálódik, a gélszerkezet viszonylag gyorsan kialakul szobahőmérsékleten is. A szintén gélképző tulajdonsággal rendelkező akrilsav és a metil-akrilát származékok vízben csak részben oldódnak, de lúggal végzett semlegesítés során vízben kolloidálisan oldódó származékká alakulnak. A semlegesítésre alkalmazható például nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid és trietanolamin (trolamin).

Az általam formulált körömvirág tartalmú gélek készítése során felhasznált gélképző anyagok (Carbopol 974P, Pemulen TR-1 és Synthalen K) a karbomer típusú gélképzők (poliakrilátok, polimetakrilátok) közé tartoznak. A karbomerek szintetikus, nagy molekulásúlyú akrilsav polimerek által térhálósított cukrok vagy polialkoholok, melyek segítenek irritáló hatástól mentes lokális használatra szánt gyógyszerformák kialakításában, mindamelllett hogy biztosítják az optimális hatóanyagfelszabadulást és permeációt. A Carbopol 974P ennek megfelelően nagy molekulatömegű vegyület, melynek előállítása az akrilsav térhálós polimerjének allil-pentaeritrittel kopolimerizálva történik. Orális és nyálkahártyán történő használatra szánt készítmények formulálásához is alkalmas. [67] A Pemulen TR-1 akrilsav és 10-30 szénatomos alkil-akrilát nagy molekulásúlyú kopolimerjével, valamint allil-pentaeritrittel térhálósított emulgeálószer. A Pemulen polimer segédanyagok hidrofil és hidrofób részeket egyaránt tartalmaznak, kiváló gélképző polimerként szolgálnak, emellett o/v típusú emulziók létrehozását is lehetővé teszik. A szakirodalomban beszámoltak róla, hogy egyes nem ionos felületaktív anyagok alacsony koncentrációban jelentősen növelhetik a Pemulen és hasonló polimer emulgeálószer emulgeáló képességét. [68] A polimer emulgeálószer és felületaktív anyag kombinációja azonban az emulzió hosszú távú fizikai stabilitásának csökkenéséhez is vezethet. [68,69] A Synthalen K szintén karbomer típusú, szintetikus, 2-propénsav homopolimer segédanyag, amelyet biokompatibilitása és sokoldalúsága miatt széles körben alkalmaznak. A külsőleges gyógyszerformák formulálásakor kiváló stabilitást biztosít nagy viszkozitás mellett. [70,71]

2.4.3. A hatóanyag diffúziós képességét fokozó anyagok

A topikális készítmények formulálása során a legnagyobb kihívást a hatóanyagok bőrbe juttatása, a penetráció elérése, elősegítése jelenti. Mint azt fentebb említettem, a SC-on keresztül igen nehéz a hatóanyagok átjutása, ezért számos módszer létezik a bőr barrier tulajdonságainak leküzdésére, beleértve fizikai és kémiai technikákat is. A legáltalánosabb és legmegfelelőbb eljárás a speciális segédanyagok, úgynevezett Chemical Enhancer-ek (CE)

alkalmazása, amelyek képesek az adott molekulákat magukkal együtt szállítani a SC-ba vagy módosítják a SC struktúráját, ezáltal lehetővé teszik a hatóanyag molekulájának bejutását. Először is, az oldott anyagnak az SC legkülső lipidrétegén kell átjutnia. Ezt a folyamatot a CE-bőr és az oldott anyag-bőr kölcsönhatások befolyásolhatják. [72] Az oldott anyag a bőrbe, illetve a bőrön keresztül három fő úton diffundálhat: a bőrfüggelékeken (faggyúmirigy, szőrtüsző, verejtékmirigy) keresztül, paracelluláris és transzcelluláris úton. Utóbbi esetében a lipid természetű sejtmembrán miatt főként a hidrofób anyagok képesek diffundálni. A paracelluláris útnál a hatóanyag a sejt közötti járatokon keresztül jut a dermiszbe, majd a vérkeringésbe, viszont ebben az esetben is leginkább a lipofil anyagok transzportja zajlik. A szőrtüszők, verejték- és faggyúmirigyek csatornáin keresztül az ionok és a nagy poláris molekulák szabadon átjuthatnak a SC-on, viszont ezek a függelékek a teljes bőrfelület nagyon kicsi hányadát képezik (csak 0,1%-a). [73] A diffúziót az is megnehezíti, hogy a hatóanyagnak a mirigyekben lévő váladékkal ellentétes irányba kell mozognia. Ezen kívül a faggyúmirigyekben csak lipofil molekulák áthatolása lehetséges a lipidekben gazdag faggyú miatt, viszont a szőrtüszők és verejtékmirigyek csatornáin hidrofil természetű vegyületek is képesek lehetnek a diffúzióra. [74,75]

A hatóanyagok diffúzióját segíthetik a gyógyszertechnológiában széles körben használt és jelentős szerepet betöltő felületaktív anyagok. Segédanyagként történő alkalmazásuk célja lehet a nedvesítés, oldás, diszpergálás elősegítése, az abszorpció és a biológiai hasznosíthatóság növelése, illetve új gyógyszerhordozó rendszerek kialakítása. Kémiai szerkezetüket tekintve három csoportra oszthatók: anionos, kationos és nemionos felületaktív anyagok. Az anionos felületaktív anyagok a bőr szerkezetének megváltoztatása által fejtik ki a hatásukat. Használatuk során a transepidermális vízvesztés (transepidermal water loss, TEWL) mértéke jelentősen fokozódhat, ami bőrszárazságot és ez által irritációt, bőrpírt és bőrkárosodást eredményezhet. Ebbe a csoportba tartoznak többek között az alkálifémek zsírsavakkal alkotott sói (szappanok), mint például az általunk is használt Empicol LZ/N, ami a jól ismert nátrium-lauril-szulfát (Natrii laurilsulfas, sodium-lauryl-sulfate, SLS) finomra porított formája. A kationos felületaktív anyagok (pl.: aminok, alkil-imidazolinok és a kvaterner ammóniumsók) nagyobb mértékű, drasztikusabb változást idéznek elő a stratum corneum szerkezetében, mint az anionos és nemionos társaik, ezért e csoport molekulái hatékonyabbak lehetnének a penetrációt fokozó hatást tekintve, azonban bőrirritációt okozó mellékhatásuk is sokkal jelentősebb mértékű, ebből kifolyólag dermális készítményekben való alkalmazásuk kerülendő. A nemionos felületaktív anyagok közé tartoznak az alkoholok (cetil- vagy sztearil-alkohol), észterek és amin-oxidok. Előnyük, hogy csak kismértékben

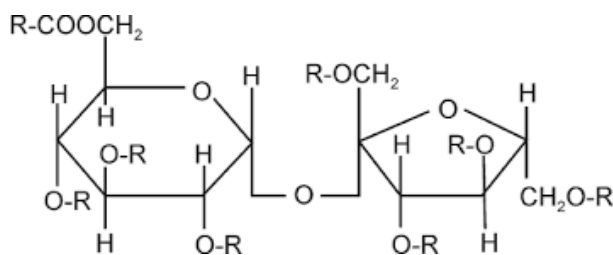
változtatják meg az SC fiziológiás struktúráját az ionos felületaktív anyagokkal összehasonlítva. Bár penetrációt fokozó hatásuk viszonylag kisebb mértékű, mint az ionos tenzideké, biztonságosnak tekinthetők, és a megfelelő koncentrációban alkalmazva nem okoznak bőrirritációt. [72] Ebbe a csoportba sorolható az általunk használt és a *VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben* is hivatalos Poliszorbát 60 (polioxietilén-szorbitán-monosztearát), melyet szorbitból és zsírsavakból állítanak elő egy többlépcsős kémiai reakcióban. A Cremophor (Kolliphor) A6 és A25 szintén nemionos felületaktív anyagok, o/v emulgeálószerkezeteket tekintve polietoxilált glikol észterek, melyeket krémek és gélek formulálásához előszeretettel használnak akár egymással kombinálva a megfelelő arányban. [76] A *S. platensis* tartalmú krémek formulálásánál alkalmazott Tefose 63 (TFS) ugyancsak nemionos o/v emulgens, szerkezetét tekintve polioxil-6-sztearát, etilén-glikol-sztearátok és polioxil-32-sztearát keveréke. A TFS sokoldalú felületaktív anyag, melyet a gyártó (*Gattefossé*) leírása szerint sokszor más emulgensekkel (pl.: Labrafil) együtt alkalmaznak kotenzidként külsőleges használatra szánt készítmények stabilitásának és konzisztenciájának javítása érdekében.

A felületaktív anyag szerkezete, a szénhidrogén lánc hosszúsága, illetve telítettsége szabja meg a diffúziós készséget elősegítő hatás mértékét. [77] Mindazonáltal érdemes szem előtt tartani, hogy a vivőanyag típusa és a készítményben lévő hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai is nagymértékben befolyásolják az adott felületaktív anyag penetrációt fokozó hatását. [78]

Az egyik legszélesebb körben vizsgált penetrációt fokozó zsírsav-észter az izopropil-mirisztát (IPM), melynek többféle hatásmechanizmusát is leírták. Egyes feltételezése szerint az IPM gátolja a SC-ban lévő lipidlamellák egymáshoz rendeződését ezzel könnyebb átjutást biztosítva a hatóanyagoknak. Egyes szakirodalmak arról számolnak be, hogy az IPM beépül a lipofil régióba, rögzítve az izopropilcsoportját a poláris régióban, így kölcsönhatásba lép a SC lipidjeivel, ami segíti a diffúziót. [79,80]

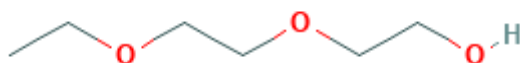
A cukorészterek szintén észter típusú nemionos, felületaktív tulajdonsággal rendelkező segédanyagok, melyeket főleg az élelmiszeriparban és a kozmetikai iparban alkalmaznak. Előnyük, hogy természetes és biodegradábilis anyagok, jól ismert emulgeáló és szolubilizáló tulajdonságokkal. A gyógyszertechnológiában történő használatuk még nem annyira elterjedt, pedig a hatóanyag szolvatálásának és abszorpciójának fokozásához, valamint a szabályozott hatóanyag-leadású rendszerek formulálásához kiváló segédanyagok lehetnek. A cukorészterek szacharóz α -D-glükózának hatos szénatomján lévő hidroxil-csoportját zsírsavakkal észteresítve állíthatók elő. (5. ábra) A leggyakrabban használt észteresítő zsírsavak közé tartozik a laurinsav, sztearinsav, mirisztinsav, palmitinsav és az olajsav. [81] A

kutatómunkám során használt SP70 cukorészter sztearinsavat tartalmazó, 15-ös HLB (hydrophilic-lipophilic balance) értékkel rendelkező, o/v emulgens.



5. ábra: A cukorészterek általános kémiai szerkezete

Szintén penetrációt fokozó hatással rendelkező felületaktív anyag az általam is használt Transcutol HP (TC), mely kémiai szerkezetét tekintve dietilén-glikol-monoetil-éter (6. ábra). Szerkezetéből adódóan poláris és apoláris oldószerekkel is kiválóan elegyedik, ezáltal jó szolubilizálószernek minősül. Emellett növeli különböző hatóanyagok percután penetrációját nedvesítő tulajdonságai miatt. Alkalmazása következtében a SC-ot alkotó lipidek megduzzadnak, mely jelenség hozzájárul a diffúziós ellenállás csökkenéséhez. [82,83]



6. ábra: A Transcutol (dietilén-glikol-monoetil-éter) kémiai szerkezete

A TC önmagában is elősegíti különböző hatóanyagok percután penetrációját, azonban ez a hatás tovább fokozódhat, ha a megfelelő tenzidekkel együtt kerül alkalmazásra. [83–85]

A krémek formulálása során választásom azért esett az o/v típusú készítményalapra, mert a stratum corneum hidratálásával a legtöbb hatóanyag, illetve kozmetikum bőrön keresztül történő diffúziójának mértéke jelentősen megemelkedhet. A szarurétegünk víztartalma általában 5-10 százalék között mozog, viszont a hidratálásnak köszönhetően ez az érték akár a duplájára is emelkedhet. A bőr megfelelő mértékű hidratáltsága a hidrofíl és a lipofíl természetű hatóanyagok átjutását egyaránt fokozhatja, ugyanis a poláris természetű penetrációfokozó anyag interakcióba tud lépni az amfifil tulajdonságú lipidek feji (poláris) végével, ami a lipid kettős réteg átrendeződését eredményezheti. [86]

2.5. HaCaT sejtvonal

A külsőleges gyógyszerkészítmények vizsgálatára elfogadott *in vitro* modellrendszer a HaCaT sejtvonal, melyet Boukamp és munkatársai hoztak létre 1988-ban. A differenciációra és proliferációra képes emberi keratinocitákat egy melanómában szenvedő 62 éves férfi betegből izolálták sebészeti kimetszéssel. A sejteket csökkentett kalciumion koncentrációjú (0,2 mM) médiumban növesztették 38,5 °C-on. [87]

A HaCaT sejtek differenciációjával konfluens sejtréteg (monolayer) alakul ki, mely alkalmas a humán bőr *in vitro* modellezésére. Ennek megfelelően a HaCaT sejtvonalat a külsőleges használatra szánt gyógyszerkészítmények alkalmazása által okozott bőrkárosodás, citotoxicitás jellemzésére, illetve a sebgyógyulást elősegítő, antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatás tanulmányozására széles körben használják. [88,89] A keratinocitákkal végzett vizsgálatok eredményei előrevetíthetik az *in vivo* eredményeket, így sok esetben az állatkísérletek alternatívájaként szolgálnak a gyógyszerek vagy kozmetikumok és az emberi bőr biokompatibilitásának jellemzésére. Mindezek ellenére érdemes szem előtt tartanunk, hogy a tenyésztett sejtek reakciója a különböző anyagokkal történő kezelésekre nem mindig van összhangban az élő szervezet részét képező sejtek viselkedésével. Az immortalizált sejtek genotípusa és/vagy fenotípusa olykor megváltozhat, ami módosult reakciókat eredményezhet a külső hatásokra. [88]

3. Célkitűzés

A természetes eredetű hatóanyagok felhasználásával formulált készítmények esetében számos kérdés merülhet fel az adott készítmény hatóanyagtartalmát, terápiás hatását, biohasznosulását, valamint biokompatibilitását illetően. A legtöbb forgalomban lévő gyógynövény alapú készítményről sajnos nem állnak rendelkezésünkre kísérletek által alátámasztott bizonyítékok az imént felsorolt kérdéseket illetően.

Az említett szempontokat, valamint a szakirodalmi előzményeket figyelembe véve doktori értekezésem céljaul megfelelő hatóanyagleadással rendelkező természetes eredetű hatóanyagot tartalmazó külsőleges gyógyszerkészítmények formulálását tűztük ki. Két különböző hatóanyagra, a *S. platensis* algára és a *C. officinalis* gyógynövény virágára esett a választásunk az eltérő terápiás indikációjú készítmények fejlesztésére.

A *S. platensis*-t felhasználva gyógyszerformaként krémeket terveztünk formulálni az acne vulgaris terápiájára, míg a körömvirág kivonat esetében célunk a reumatoid arthritisz kiegészítő kezelésére alkalmas kenőcs, krém vagy gél formulálása volt diklofenák-nátrium és metil-szalicilát hozzáadásával, szinergista hatást remélve.

A kívánt mértékű biohasznosulás eléréséhez a megfelelő kenőcs, krém és gél-alapanyagok, valamint penetrációt fokozó segédanyagok kiválasztása volt az elsődleges cél. Különböző típusú emulgensek segítségével kedvező hatóanyagleadású lokális használatra szánt készítményeket szerettünk volna formulálni. Célkitűzéseink között szerepelt a formulációk egymással való összehasonlítása a kioldódott hatóanyag-mennyiség szempontjából Franz féle vertikális diffúziós cella és spektrofotométer segítségével.

Az esetleges negatív, nem kívánt hatások vizsgálatát is fontosnak tartottuk, ezért MTT citotoxicitási méréseket végeztünk HaCaT sejtvonalon.

Az irodalmi összefoglalóban leírt felvetések alapján lényeges volt számunkra, hogy készítményeink antioxidáns hatással is rendelkezzenek, ezért erre irányuló mérések elvégzését szintén célul tűztük ki.

A *S. platensis* tartalmú krémek antibakteriális hatását az acne vulgaris-t okozó *C. acnes* és *S. aureus* baktériumtörzseken terveztük vizsgálni, míg a körömvirág tartalmú készítmények esetében humán klinikai vizsgálat elvégzése volt a végső cél reumás ízületi gyulladásban szenvedő betegeket bevonva. Kutatómunkám két fő irányvonalát az alábbi táblázatban összefoglalva szeretném ismertetni (1. táblázat):

Hatóanyag	Kísérlet	A kísérletben közreműködő társszerzők	
<i>Spirulina platensis</i>	Az alga tenyésztése, kivonatkészítés, liofilizálás	Prof. Dr. Vasas Gábor, DE Növénytani Tanszék	
	Különböző típusú felületaktív anyagot tartalmazó krémek formulálása		
	Gyógyszerforma vizsgálatok	pH mérés	
		textúra analízis	
		diffúziós vizsgálat	
	Citotoxicitási vizsgálat HaCaT sejteken		
	Antioxidáns hatás vizsgálata	SOD	
DPPH			
Antibakteriális hatás vizsgálata		Dr. Szabó Judit, DE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai Intézet	
<i>Calendula officinalis</i>	A <i>C. officinalis</i> virágának gyűjtése, kivonatkészítés, analízis, liofilizálás	Prof. Dr. Jurca Tünde és Prof. Dr. Pallagi Annamária Nagyvárad Egyetem Orvos- és Gyógyszerésztudományi Kar	
	Kenőcsök, krémek és gélek formulálása diklofenák-nátrium és metil-szalicilát hozzáadásával		
	Gyógyszerforma vizsgálatok	pH mérés	
		textúra analízis	
		diffúziós vizsgálat	
	Citotoxicitási vizsgálat HaCaT sejteken		
	Antioxidáns hatás vizsgálata (DPPH)		
Randomizált, placebo kontroll humán klinikai vizsgálat reumatoid artritiszben szenvedő betegeken		Nagyvárad Egyetem és a Băile Felix Recovery Hospital (Rehabilitációs Klinikai Kórház Félixfürdő, Románia) munkatársai	

1. táblázat: A kutatómunka során alkalmazott kísérletek sematikus ábrázolása a társszerzők közreműködésének megjelölésével.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

A krémek formulálásához használt Transcutol HP [2-(2-etoxi-etoxi)-etanol (CAS-szám: 111-90-0)] és Tefose 63 (CAS-szám: 9004-99-3) a Gattefossé (Lyon, Franciaország), míg a cukorészter SP70 [szacharóz-sztearát (CAS-szám: 84066-95-5)] a Sisterna (Roosendaal, Hollandia) ajándéka volt. A Cremophor A6 [polietilén-glikol 260 mono (hexadecil/oktadecil) -éter (CAS-szám: 85941-44-2)] és A25 [makrogol (25) -cetosztearil-éter, (CAS-szám: 68439-49-6)] a BASF cégtől (Ludwigshafen, Németország) származik. A cetil-sztearil alkohol [hexadekán-1-ol; oktadekán-1-ol (CAS-szám: 67762-27-0)], a sztearinsav [oktadekánsav (CAS-szám: 57-11-4)], a propilén-glikol [propán-1,2-diol (CAS-szám: 57-55-6)], az izopropil-mirisztát [propan-2-ol-tetradekanoát (CAS-szám: 110-27-0)] és a standard-ként használt Aknemycin™ kenőcs (20 mg/g eritromicin, Almirall Hermal, OGYI) -T-2373/01) a Hungaropharma Ltd.-től (Budapest, Magyarország) kerültek beszerzésre.

A körömvirág tartalmú krémek formulálásához használt Empicol LZ/N anionos felületaktív anyagot az Innospec Performance Chemicals Italy SRL, CLW0025334 sorozatból vásároltuk. A Synthalen K gélképző polimert (1518F65A) az Elton Corporation SA (Románia), míg a Carbopol 974P és a Pemulen TR-1 polimereket a Lubrizol Corporation (Ohio, USA) biztosította. A diklofenák-nátriumot (CAS-szám: 15307-79-6), metil-szalicilátot (CAS-szám: 119-36-8) és trietanol-amint (CAS-szám: 102-71-6) a Merck KGaA-tól (Németország) szereztük be. Fehér vazelin és lanolin (Adeps lanae anhydricus) (Pharm Grade USP37) a Zhongbao Chemicals Co., Ltd. termékei voltak.

A sejtenyésztéshez szükséges nem esszenciális aminosav oldatot, a penicillin-sztreptomicin keveréket, a GlutaMax™ kiegészítőt, a 96 lyukú plate-eket és a sejtenyésztő flakákat a Thermo-Fisher (Darmstadt, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre. A HaCaT sejtvonalat (humán keratinocita sejtek) a Cell Lines Service-től (CLS, Heidelberg, Németország) rendeltük.

A vizsgálatokban használt cianobaktérium törzs (*Spirulina platensis*) a Botanikai Intézet Autotróf Szervezetek (CCALA) kultúra gyűjteményéből került beszerzésre Prof. Dr. Vasas Gábor, a DE Növénytani Tanszék vezetője által. (026 *Limnospira maxima* (Setchell & NLGardner) Nowicka-Krawczyk, Mühlsteinová & Hauer kódolással, a Sammlung von Algenkulturen Universität Göttingen (SAG) *Arthrospira platensis* -nek (SAG 85,79 törzs) megfelelője.) [90]

A *C. officinalis* virágok begyűjtése 2019 júniusától augusztusig tartott Romániában a Nagyváradi Egyetem munkatársai által.

Minden egyéb segédanyag és reagens a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) terméke.

4.2. Kivonatok készítése

4.2.1. Liofilizált *Spirulina platensis* kivonat készítése és karakterizálása

A cianobaktérium törzs tenyésztése Zarrouk tápközegben (ipari termelésben standardként használt tápközeg) batch-kultúrában történt 8,2-es pH értéken, termosztáttal (20 ± 1 °C) ellátott box-ban, 12 órás világos/sötét fényperiódussal [28,69]. Az alga fonalakat 12 napos tenyésztés után centrifugálással (Beckman Avanti J-25 rotor; $4500 \times g$) összegyűjtöttük, majd liofilizáltuk (Christ Alpha 1-2 LD plus) a Növénytan Tanszéken Prof. Dr. Vasas Gábor segítségével. A liofilizált alga port használtam fel a krémek formulálásához és a további vizsgálatokhoz.

4.2.2. Liofilizált *Calendula officinalis* virágkivonat készítése és karakterizálása

A bioaktív vegyületek növényből történő extrahálásához etil-alkohol és desztillált víz keverékét használtuk extrakciós oldószerként. Száz gramm aprított *C. officinalis* virágmintát helyeztünk egy lombikba, és 1000 ml 96%-os etanos oldatot adtunk hozzá. Az elegyet kétszer extraháltuk ultrahangos fürdőben 90 percig 45 °C-on [91], majd cellulózmembránon (0,45 µm pórusátmérő) szűrtük. A maradék szilárd fázist tovább extraháltuk 500 ml 70% etanol és desztillált víz (1:1) elegyével azonos körülmények között, majd ismét szűrtük. Az alkoholos és a vizes-alkoholos kivonatok elegyítésével nyert hidroalkoholos extraktumot centrifugáltuk, és a felülúszót rotációs bepárlóban szárazra pároltuk. [92] A száraz *C. officinalis* virágkivonatot -25 °C-on fagyasztottuk, majd liofilizáltuk (Christ Alpha 1-2 LD plus) és a liofilizált port használtuk a további vizsgálatokhoz.

A *C. officinalis* fitokémiai elemzését a romániai kutatócsoport korábbi vizsgálataiban HPLC módszerrel végezte, diódasor detektorral ellátott eszközzel, amely polifenolok (p-kumarinsav, koffeinsav, galluszsav) és flavonoidok (kvercetin, epikatechin, rutin, miricetin) jelenlétét jelezte. [93] Méréseik szerint 1 g liofilizált *C. officinalis* kivonat $26,75 \pm 0,56$ mg kvercint tartalmaz. Mivel a növény betakarításának, extrakciójának és liofilizálásának

körülményei azonosak voltak ezekben a kísérletekben, a kvercetin koncentrációját korábbi vizsgálataik alapján határoztuk meg. [92,93]

4.3. Külsőleges gyógyszerformák formulálása

4.3.1. *Spirulina platensis* tartalmú krémek formulálása

Az alga tartalmú krémek formulálása különféle nemionos felületaktív anyagok, Poliszorbát 60 (P60), Cremophor A6:A25 (1:1) (CR), Tefose 63 (TFS) és cukorészter SP70 (SP70) felhasználásával történt. Az egyes felületaktív anyagok mennyisége az összetételekben 3 - 3% volt az összmennyiséghez viszonyítva. Magasabb koncentrációban az ilyen típusú segédanyagok alkalmazása kerülendő, mivel fenn áll a toxicitás veszélye, károsíthatják, roncsolhatják a membránt. [94] A 2. táblázat az általam formulált krémek összetételét hivatott szemléltetni.

Összetevők	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>Spirulina platensis</i> por	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Transcutol HP	-	-	-	-	14,2%	14,2%	14,2%	14,2%
Poliszorbát 60	3%	-	-	-	3%	-	-	-
Cremophor A6:A25 (1:1)	-	3%	-	-	-	3%	-	-
Tefose 63	-	-	3%	-	-	-	3%	-
Cukorészter SP70	-	-	-	3%	-	-	-	3%
Cetil-sztearil alkohol	4,6%							
Sztearinsav	10%							
Glicerin	5%							
Propilénglikol	5%							
Izopropil-mirisztát	5%							
Tisztított víz	62,4%				48,2%			

2. táblázat: *S. platensis* liofilizátumot tartalmazó o/v emulziós krémek összetétele

A formulálás során a *S. platensis* alga liofilizált formában, az egyes összetételekben 5-5 %-ban került felhasználásra. Kísérleti munkám során formuláltam olyan krémeket, melyekben a *S. platensis* liofilizátum szuszpendált formában volt jelen, valamint olyan összetételeket is létrehoztam, melyekben az algát Transcutol segítségével oldott formában oszlattam el a készítményalapban jobb penetrációs képességet remélve.

Ahogy a 2. táblázatban látható, a formuláláshoz felhasznált készítményalap minden esetben megegyezett, illetve nagy mennyiségű vizet tartalmazott, jellemzően az olaj a vízben (o/v) típusú emulziós krémekre. A készítményalap tartalmazott még cetil-sztearil alkoholt és sztearinsavat készítményalapként, glicerint, mely megfelelő koncentrációban alkalmazva hidratálja a bőrt, propilénglikolt penetrációt fokozó szerként, valamint izopropil-mirisztátot (IPM) konzisztencialágyítóként (emollients).

A cetil-sztearil alkohol, a sztearinsav, a glicerin és az IPM keverékét 60 °C-ra melegítettem vízfürdőn és homogenizáltam. Ez képezte az összetételek olajos fázisát. A vizes fázist alkotó propilénglikol, emulgeálószer és tisztított víz elegyét szintén 60 °C-ra melegítettem. A vizes és az olajos fázist homogenizáltam, majd folyamatos kevergetés mellett 25 °C-ra hűtöttem. Az utolsó lépés a hatóanyag, a *S. platensis* liofilizátum hozzáadása volt szuszpendált (I – IV összetétel) vagy oldott formában. Az V-VIII-as jelölésű formulációk esetén 5,0 g liofilizátumot 14,2 g TC-ben oldottam fel Radelkis OP-912 mágneses keverőt használva szobahőmérsékleten 3 órán keresztül. A liofilizált *S. platensis* teljesen feloldódott a TC-ban.

4.3.2. *Calendula officinalis* tartalmú kenőcs és krém formulálása

Ahhoz, hogy a kívánt hatóanyag-leadó rendszert kialakítsam három különböző félszilárd gyógyszerkészítményt készítettem, melyek hatóanyagai minden esetben diklofenák-nátrium, *C. officinalis* virágkivonat és metil-szalicilát voltak azonos mennyiségben, a készítményalapban viszont jelentősen eltértek egymástól. A formulált kenőcs (A) és a két krém (B, C) összetételét a 3. táblázat mutatja be.

Összetétel	A	B	C
<i>C. officinalis</i> kivonat	5%	5%	5%
Diklofenák-nátrium	1%	1%	1%
Metil-szalicilát	12,5%	12,5%	12,5%
Lanolin	40,75%	-	-
Fehér vazelin	40,75%	-	-
Cetil-sztearil alkohol	-	10%	10%
Cera flava	-	2,5%	2,5%
Empicol LZ/N	-	1,5%	-
Cukorészter SP70	-	-	1,5%
Glicerin	-	10%	10%
Tisztított víz	-	57,5%	57,5%

3. táblázat: *C. officinalis* kivonatot tartalmazó kenőcs (A) és krémek (B, C) összetétele

Az A-val jelölt kenőcs alapját a két komponens, a vazelin és a lanolin 60 °C-ra történő melegítésével és homogenizálásával hoztam létre, ebben szuszpendáltam az elporított körömvirág liofilizátumot és a diklofenák-nátriumot, majd hozzáadtam a metil-szalicilátot és homogenizáltam.

A B összetétel alapja egy o/v típusú emulziós készítményalap, melyet két lépésben formuláltam. A lipofil fázist a cetil -sztearil alkohol és a cera flava (sárga méhviasz) vízfürdőn történő megolvasztásával kaptam. Az Empicol LZ/N és glicerin vizes oldatából formulált vizes fázist 60 ° C ± 2 ° C hőmérsékleten, folyamatos keverés mellett hozzáadtam az olajos fázishoz. Az Empicol LZ/N anionos felületaktív anyag, rendkívül sokoldalú, kiváló bioadhezív készítmények formulálásához.

A C készítmény alapja szintén o/v típusú emulziós krém volt. A lipofil fázist a cetil -sztearil alkohol, a glicerin és a cera flava vízfürdőn történő megolvasztásával nyertem. A vizes fázist cukorészter SP70 nemionos emulgeálószer és propilénglikol vizes oldatából állítottam elő, amelyet szintén 60 °C-ra melegítettem. A vizes és lipofil fázisokat homogenizáltam és 25 °C-ra hűtöttem folyamatos kevergetés mellett.

A B és a C összetétel esetében 5 gramm liofilizált körömvirágot és 1 gramm diklofenák-nátriumot a tisztított víz adott mennyiségében (10 ml) feloldva adtam a készítményalaphoz, majd ezután oszlattam el benne a 12,5 grammnyi metil-szalicilátot.

4.3.3. *Calendula officinalis* tartalmú gélek formulálása

A gélképződés folyamata során a makromolekula duzzadás révén felszívja a vizet. Az általam formulált gélösszetételeket a 4. táblázat hivatott szemléltetni.

Összetétel	D	E	F
<i>C. officinalis</i> kivonat	5%	5%	5%
Diklofenák-nátrium	1%	1%	1%
Metil-szalicilát	12,5%	12,5%	12,5%
Synthalen K	0,5%	-	-
Carbopol 974P	-	0,5%	-
Pemulen TR-1	-	-	0,5%
Trietanolamin	0,6%	0,6%	0,6%
Glicerin	10%	10%	10%
Tisztított víz	70,4 %	70,4%	70,4%

4. táblázat: *C. officinalis* tartalmú gélek minőségi és mennyiségi összetétele

A D-vel jelölt formuláció előállításánál a Synthalen K gélképző anyagot glicerin és víz elegyében diszpergáltam. A keverést mágneses keverő segítségével végeztem, majd az elegyet 2 órán keresztül állni hagytam. Amikor a Synthalen K teljesen feloldódott, a bázikus komponens, amelyet a trietanolamin 10 ml desztillált vízben való diszperziója képzett kis részletekben adtam hozzá, és addig kevertettem az elegyet, amíg a gél fel nem tisztult. Az E és F összetételek esetében a megfelelő mennyiségű polimert hozzáadtam a megadott mennyiségű vízhez és glicerinhez, majd a gélképződés folyamatát trietanolamin hozzáadásával indítottam el, hasonlóan a D készítményhez. Az E formuláció Carbopol 974P polimert, míg az F Pemulen TR-1 polimert tartalmazott gélképző segédanyagként. A liofilizált körömvirágot és a diklofenák-nátriumot 10 ml vízben feloldva oszlattam el az elkészített gélek adott mennyiségében, végezetül hozzáadtam a 12,5 gramm metil-szalicilátot mind a három összetételhez.

4.4. Gyógyszerforma vizsgálatok

4.4.1. A pH meghatározása

A pH-t potenciometriásan határoztam meg hordozható digitális pH-mérővel (Sension™ 1, Hach Company, USA). Öt gramm kenőcsöt / krémet / gélt adtam 20 ml desztillált vízhez, amelyet előzőleg 37 ± 2 °C-ra melegítettem és 1 percig erőteljesen kevertettem mágneses keverőn. Lehűlés után a diszperziót leszűrtem, és a szűrletben meghatároztam a pH-t. Mindegyik meghatározást triplikátumban végeztem. A készítmények kémhatását közvetlenül a formulálás után, valamint 30 és 60 nap elteltével is meghatároztam (mindvégig 21 °C-on tárolva) az esetleges stabilitási problémák detektálása érdekében.

4.4.2. Textúra analízis

A textúra analízist a formulációk mechanikai jellemzőinek becslésére végeztem a formulálást követő napon. A konzisztencia megfelelő értéke fontos a felhasználás és a hatóanyagleadás szempontjából, meghatározza a félszilárd gyógyszerforma felkenhetőségét, az alkalmazott felületen való szétterülés mértékét, a felülethez való tapadást és abszorpcióját is.

Kompressziós tesztet hajtottam végre, amely során a készítmények ellenállása CT3 Texture Analyzer (Brookfield, Middleboro, MA, USA) segítségével került számszerűsítésre. A szondára kifejtett erőt Texture Pro CT szoftver (Brookfield Engineering Laboratories, MA, USA) rögzítette. A készülék TA5 Cylinder típusú próbatest (12,7 mm átmérő és 35,0 mm hosszúság) volt felszerelve a vizsgálat során. Az eszköz trigger erejét (4,0 g), célpontját (10,0 mm) és sebességét (0,50 mm/s) rögzítettem. A vizsgálatokhoz az adott összetételű készítménnyel töltött tégelyt 5,50 centiméterre helyeztem a próbatest alá. A mérés előtt a feltétet 1 mm/s sebességgel leengedtem a minta felületére. A felszín elérése után a próbatest 10,0 mm mélységig hatolt be a mintába 0,50 mm/s sebességgel, végezetül az arra kifejtett erőt detektáltam Newton-ban (N) kifejezve. A textúranalízis szobahőmérsékleten ($24,5 \pm 0,5$ °C), triplikátumban került elvégzésre. A vizsgálat segítségével megkaptuk azon értékeket, amelyek megadják, hogy mekkora erő szükséges a mérőtest kenőcsbe, krémbe vagy gélbe való hatolásához.

4.4.3. Reológiai analízis

A formulált körömvirág tartalmú kenőcs, krémek és gélek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzésére reológiai mérések kerültek elvégzésre. A folyási és viszkozitási tulajdonságokat RheolabQC rotációs reométerrel (Anton Paar Magyarország Kft.) határoztam meg. Az adatokat RheoPlus Rheometer szoftverrel (32 V3.10 21003407-33024) segítségével elemeztem, megállapítottam az átlagértékeket, és kiszámítottam a szórást (SD). A készítmények folyási és viszkozitási görbéit szabályozott nyírási sebességgel végzett rotációs tesztekkel határoztam meg a nyírási feszültség és a viszkozitás mértékének felhasználásával.

A vizsgálatokhoz használt koncentrikus henger alakú mérőrendszert (DIN EN ISO 3219 és DIN 53019 szerint) alkalmasnak találtam a félszilárd gyógyszerformák vizsgálatára. A készítményből 0,50 – 0,50 grammot a reométer koncentrikus hengerekkel rendelkező termosztált mérőrendszerének (CC27-SN11271, $d = 26,7$ mm) tartályába vittem fel. A cellák hőmérsékletének beállítására Viscoterm VT2 vízfürdőt (Anton Paar Magyarország Kft.) használtam. A méréseket változó nyírási sebességgel (sebesség gradiens) végeztem, 2-ről 50 s^{-1} -re növelve (120-300 fordulat/perc), majd 50-ről 2 s^{-1} -re csökkentve $24,5 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. [95]

4.4.4. *In vitro* hatóanyag-felszabadulás és diffúziós vizsgálatok

A permeabilitási vizsgálatokat Franz féle diffúziós cella segítségével végeztem. A Franz cella a hatóanyagok vivőanyagból való felszabadulásának (release), valamint membránon keresztül történő diffúziójának és bőrbe jutásának a modellezésre alkalmas berendezés krémek, kenőcsök, gélek, valamint transzdermális hatóanyagleadó rendszerek vizsgálata során.

Az általam használt diffúziós berendezés (Hanson Microette TM Topical and Transdermal Diffusion Cell System) $1,767 \text{ cm}^2$ diffúziós felülettel és 7,0 ml térfogatú receptor kamrával rendelkezett. Az *in vitro* teszthez 25,0 mm átmérőjű és $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ pórusú szintetikus cellulóz-acetát membránokat alkalmaztam.

Az egyes diffúziós cellák receptor kamráit 30%-os etanollal töltöttem fel. A szintetikus cellulóz-acetát membránokat használat előtt 30 percig izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnáltam. Egy gramm mintát juttattam minden membránra, majd a receptor fázis tetejére helyeztem őket. A diffúziós cellák szorosan zárva voltak, megakadályozva a vivőanyag párolgását és biztosítva a készítmény integritását a vizsgálat során. A vizsgálat $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten zajlott a receptor közeget folyamatosan (350 fordulat / perc) rázatva mágneses

keverővel. Mintavétel (1-1 ml minta) a receptor közegből 15, 30, 60, 90, 105 és 120 perc múlva történt.

A *S. platensis* tartalmú minták fikocianin tartalmát 620 nm-en mértem UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Tokió, Japán). [96,97] Vak mintaként 30%-os etanolt használtam. A fikocianin spektroszkópiás mérése előtt kalibrációs görbe került felvételre, mely által lineáris kapcsolatot találtam a fikocianin koncentrációja és a mért abszorbancia között.

A *C. officinalis*-t tartalmazó készítmények esetében a receptor közeg diklofenák-nátrium-tartalmát 275 nm-en mértem UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Tokió, Japán). [98] A metil-szalicilát mérése során annak nagy koncentrációja miatt a mintákat 100-szorosára hígítottam a receptor közeggel (30%-os alkohollal), majd 237 nm-en detektáltam a diffundált mennyiséget. [99] A *C. officinalis* kivonat fő összetevőjét, a kvercetin 370 nm-en detektáltam. [44] Vak mintaként 30%-os etanolt használtam. A spektroszkópiai mérések előtt meghatároztam a diklofenák-nátrium, a metil-szalicilát és a *C. officinalis* kivonat (kvercetin) kalibrációs görbéit.

4.4.4.1. Matematikai és kinetikai elemzés

A különböző összetételek diffúziós profiljainak összehasonlítását matematikai analízis segítségével végeztem. A *S. platensis* tartalmú krémek esetében a hatóanyagot oldott, illetve szuszpendált állapotban tartalmazó összetételek, míg a körömvirág esetében a különböző típusú készítményalappal rendelkező formulációk diffúziós profiljának hasonlóságát vizsgáltam a hasonlósági tényező (f_2) meghatározásával. Az f_2 hasonlósági tényezőt Microsoft Excel segítségével számítottam ki. [100,101]

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{j=1}^n w_j |R_j - T_j|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

ahol n a mintavételi szám, R_j és T_j az adott referencia és vizsgálati összetételből a j -edik időpontban átlagosan kioldódott hatóanyag százalékban kifejezve, és w_j a súlyfaktor. A készítmények akkor tekinthetők hasonlóknak, ha a hasonlósági tényező (f_2) 50 és 100 között van. [100,101]

A kinetikai jellemzők meghatározásához az egységnyi területen átdiffundált hatóanyag-mennyiséget (Q , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ábrázoltam az eltelt idő (t) négyzetgyöke ($t^{1/2}$, $\text{min}^{1/2}$) függvényében. A kapott egyenes meredeksége megadta a hatóanyag vívőanyagból történő felszabadulásának sebességi állandóját (k_0). A hatóanyag diffúziós együtthatója (D) az adott t időpontban a

hatóanyag koncentrációjából (Q , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a kezdeti koncentrációból (C_0') és a diffúziós időből (t) határozható meg az alábbi egyenlet szerint [63]:

$$D = \frac{Q^2 \times \pi}{(2[C_0'])^2 \times t}$$

4.5. Sejttenyésztés módszertana

A kísérletekhez használt HaCaT sejtvonal (humán keratinocita sejtek) a Cell Lines Service-től (CLS, Heidelberg, Németország) származtak.

Sejttenyésztő tápoldatként steril DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő folyadékot használtam, mely 4,5 g/l D-glükózt, fenolvörös indikátort, 1% (v/v) L-glutamint tartalmazott, kiegészítve nátrium-hidrogén-karbonáttal (3,7 g/l), 10% (v/v) foetális szarvasmarha szérummal, 1% (v/v) nem esszenciális aminosav oldattal és 1% (v/v) penicillin (100 NE/ml) – streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oldattal. Elkészítés után két héttel a médiumhoz GlutaMAX™ stabilizált L-alanin-L-glutamin dipeptid tartalmú oldat került hozzáadásra 1:100 arányban. [102]

A HaCaT sejteket műanyag sejttenyésztő flaskában növesztettem párásított CO_2 atmoszférában (5%v/v), 37 °C-on. A sejttenyésztő médiumot hetente kétszer cseréltem lamináris áramlású steril fülke alatt. A konfluens sejtréteg kialakulásakor a sejteket a sejtlaborban, aszeptikus körülmények között, lamináris áramlású fülke alatt passzáltam. A passzálás megkezdése előtt minimum 20 percig UV lámpa segítségével csíramentesítettem a laminár bokszt, majd 70%-os alkohollal fertőtlenítettem a felületeket. A sejttenyésztő médium eltávolítása után a maradék tápoldatot PBS oldattal mostam. A letapadó sejtek emésztéséhez 4 ml tripszin-EDTA oldatot (0,05% (m/v) tripszin és 0,02% (m/v) EDTA) használtam. A sejteket 5 percig 37°C-on inkubáltam a tripszinezés alatt, ezután ötszörös mennyiségű friss médium hozzáadásával leállítottam a reakciót. A sejtszuspenziót 1100 rpm fordulatszámom, 6 percig, 25 °C-on centrifugáltam, a felülúszót eltávolítottam, majd a sejteket 10 ml friss médiummal szuszpendáltam és mikroszkóp alatt, Bürker kamra segítségével megsámoltam. Végezetül 1 millió sejtet tartalmazó mennyiséget steril flaskába szélesztettem és kiegészítettem tápoldattal 10 ml-re. A citotoxicitási és az antioxidáns kísérleteket minimum 20, maximum 40 passzázsszámú HaCaT sejteken végeztem.

4.6. Citotoxicitás vizsgálata

A különböző összetételek sejtleletképessegre gyakorolt hatását 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetazolium-bromid (MTT) festék segítségével vizsgáltam Mosmann és munkatársai által elsőként leírt metodikát alkalmazva. [103] Az MTT festékekkel végzett teszt egy kolorimetriás vizsgálat, amely a sejtek metabolizációs képességén alapszik. A metodika segítségével a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NAD(P)H)-függő mitokondriális oxidoreduktáz enzim aktivitása detektálható, amely a tetrazólium gyűrű felnyitásával transzformálja a vízoldható sárga MTT festéket vízoldhatatlan lila formazán kristállyá [(E,Z)-5-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-1,3-difenil-formazán]. [104,105]

A vizsgálathoz szükséges előkészületeket (mintakészítés) a diffúziós méréshez hasonlóan végeztem el (4.4.4. fejezet). Alkohol helyett PBS-t használtam a cellák feltöltéséhez, így kiküszöbölve a receptor közeg toxicitása miatti esetleges fals eredményeket. Az izopropil-mirisztáttal impregnált cellulóz-acetát membránra felvittem a készítmények meghatározott mennyiségét és elindítottam a diffúziót. A mintavétel a 120. percben történt a receptor közegből.

Az *in vitro* citotoxicitási vizsgálatot humán keratinocita sejtvonalon (HaCaT sejtvonal) végeztem. A sejteket 96 lyukú sejttenyésző plate-be szélesztettem (10^4 sejt/lyuk) és CO₂ inkubátorban, 37°C-on hagytam nőni 7 napon keresztül, amíg létrejött a konfluens sejtréteg. A vizsgálat során a sejttenyésző médiumot eltávolítottam a sejtekről, majd a mintákat és a negatív kontrollként használt PBS, valamint a pozitív kontrollként alkalmazott Triton-X 100 (10 v/v%) oldatokat rápipettázva a sejtekre (200 µl/lyuk) további 30 percig inkubáltam 37°C-on. Ezután leszívtam az oldatokat és a sejteket kétszer 1 ml PBS oldattal mostam. Egy tiszta kádban elvégeztem az MTT festék hígítását (1:9 arányú MTT festék - PBS), rápipettáztam a sejtekre (100 µl/lyuk), majd további 3 órán keresztül inkubáltam 37°C-on. Ezután eltávolítottam az oldatot a sejtekről és a keletkező lila színű formazán kristályokat sósavas izopropanolban (100 µl/lyuk) oldottam fel (izopropanol - 1,0 N sósav = 25:1). Végül 570 nm-en, 690 nm háttér mellett mértem az abszorbanciát FLUOstar OPTIMA Microplate Reader segítségével. Az így kapott abszorbancia értékek a még élő sejtek számával korreláltak. A sejtek életképességét a kezeletlen negatív kontrollhoz (csak PBS-sel kezelt) viszonyítva százalékban fejeztem ki. Mindegyik mintát 6 lyukban vizsgáltam, az abszorbancia értékeket átlagoltam.

4.7. Antioxidáns hatás vizsgálata

4.7.1. Szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitásának meghatározása UV-sugárzásnak kitett HaCaT sejteken

A kísérlet során UVB sugárzásnak tettem ki HaCaT sejteket az adott összetételekkel történő kezelés előtt vagy után 10 percen keresztül, ezzel oxidatív stresszt, szabadgyök-képződést, sejtkárosodást indukáltunk. Egyszeri, 350 μ W mértékű UV-B sugárzást hoztam létre a Gyógyszertechnológiai Tanszéken lévő napszimulátor berendezéssel (Oriol® Sol-UV-4 UV Solar Simulator, USA). A HaCaT sejteket 12-lyukú plate-ben szélesztve (10^5 sejt/lyuk) az UV-sugárzást kibocsátó berendezés alá helyeztem, attól 20 cm távolságra. A vizsgálandó mintákat a Franz-diffúziós készülék segítségével gyűjtöttem, hasonlóan a citotoxicitási vizsgálathoz (1,0 ml minta minden készítményből). Pozitív kontrollként a HaCaT sejteket (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karbonsavval (Trolox), az E-vitamin vízben oldódó származékával kezeltem, melyet közvetlenül felhasználás előtt oldottam fel PBS-ben (10 μ M). A kísérlethez PBS-t használtam negatív kontrollként.

Az előkezelés során a tápoldatot eltávolítottam a sejtekről, 200 μ l vizsgálati oldatot, illetve kontroll mintát adtam hozzá, és a sejteket további 20 percig inkubáltam a mintákkal CO₂ inkubátorban 37 °C –on. 20 perces UV-B besugárzás és a minták eltávolítása után a sejteket kétszer mostam PBS-sel. Az utókezelt csoport esetében a sejteket a kezelés előtt 20 percig besugároztam, 20 percig inkubáltam a vizsgálati oldatokkal, majd mostam PBS-sel.

A sejteket felszedtem és centrifugáltam 2500 rpm-en, 10 percen keresztül 4 °C-on, majd homogenizáltam a sejt pelletet 20 mM HEPES pufferrel (1 mM EGTA, 210 mM mannitol, és 70 mM szacharóz, pH 7,2), és újra centrifugáltam 3500 rpm-en 5 percen keresztül 4 °C-on. A felülúszó SOD aktivitását *Cayman kit* segítségével határoztam meg (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). [106]

A SOD enzim aktivitásának meghatározására szolgáló assay-t 96 lyukú plate-en végeztem a gyártói protokoll szerint. A kolorimetriás mérés kiértékeléséhez szükséges kalibrációs egyenes szerkesztéséhez standard oldatokat készítettem különböző SOD koncentrációkkal, melyek enzimaktivitása ismert volt. 10-10 μ l standard, illetve vizsgálati oldatot adtam az egyes lyukakhoz melyeket kiegészítettem 200 μ l hígított gyökdetektor oldattal. Ezután a reakciót inicializáltam 20 μ l xantin oxidáz enzim hozzáadásával. A plate-et 30 percig inkubáltam szobahőmérsékleten (24,5 °C), majd 450 nm hullámhosszon vizsgáltam a minták abszorbanciáját Multiskan Go spektrofotométert használva (Thermo-Fisher,

Waltham, Amerikai Egyesült Államok). Minden mintát hat lyukon vizsgáltam, az eredményeket átlagoltam. A SOD enzim aktivitását az egyes mintákban lineáris regresszió módszerével számszerűsítettem.

4.7.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás meghatározása

A készítmények DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,33$ g/mol) gyökfogó aktivitását Brand – Williams módszerét alkalmazva, azt kis mértékben módosítva határoztam meg. [107] A hatóanyagot tartalmazó és a hatóanyag nélküli készítményekből származó mintákat Franz-diffúziós cella felhasználásával gyűjtöttem, receptor fázisként abszolút etanolt használva. A cellákból 2,0 ml mintát vettünk a 120. percben, amikor a hatóanyagok diffúziója elérte a maximumot. Az előzőleg elkészített *C. officinalis* kivonat (15,0 mg/ml abszolút etanos oldat), valamint a *S. platensis* kivonat (10 mg/mL abszolút etanos oldat) antioxidáns aktivitását is tanulmányoztuk.

Az antioxidáns hatás vizsgálatához 2,0 ml mintához 1,0 ml 0,06 mM koncentrációjú DPPH gyökoldatot pipettáztam, majd a reakcióelegyet 30 percig sötétben inkubáltam. Amennyiben a DPPH antioxidáns vegyületekkel reagál, ezen vegyületek hidrogént adnak át a DPPH-nak. Amikor a DPPH donálta a hidrogéngyököt, a reakció színváltást eredményezett sötét ibolyaszínűről világossárgára. Az abszorbancia mérését UV-spektrofotométerrel (Shimadzu Spektrofotométer, Tokió, Japán) végeztem 517 nm-en, abszolút etanolt használva háttérként. [108] A kapott abszorbancia értékek segítségével az antioxidáns aktivitás mértéke (gátolt reaktív oxigén gyök (ROS) %) meghatározható az alábbi képlettel:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{minta} - Abs_{h\ddot{a}tt\acute{e}r}) \times 100] / Abs_{kontroll}\}$$

ahol az Abs_{minta} az adott minta és a DPPH oldat keverékének abszorbanciája, az $Abs_{h\ddot{a}tt\acute{e}r}$ az abszolút etanol abszorbanciája, az $Abs_{kontroll}$ pedig a negatív kontroll és a DPPH oldat keverékének abszorbanciája. [109] Standardként aszkorbinsav alkoholos oldatát (0,25 mg/ml) használtam. [110] Negatív kontrollként 1,0 ml DPPH-oldatot (0,06 mM) hígítottam 2,0 ml abszolút etanollal.

4.8. A *Spirulina platensis* tartalmú készítmények antibakteriális hatásának vizsgálata

A *S. platensis* tartalmú készítmény antibakteriális hatását *Staphylococcus aureus* (ATCC® 43300™) és *Cutibacterium acnes* (ATCC® 33169™) baktériumtörzseken vizsgáltam, előbbi esetében 1×10^5 sejt/ml, míg utóbbinál 1×10^6 – 10^7 sejt/ml kezdő inokulum alkalmazásával. Az antibakteriális érzékenységi vizsgálatokat mikrodilúciós módszerrel végeztem a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársaival közreműködve, a legújabb EUCAST protokolloknak (E.Dis 5.1) megfelelően.

A *S. aureus*-t Mueller-Hinton táptalajon (Mueller-Hinton Broth (MHB)) tenyésztettük aerob körülmények között. Ötven mikroliter *S. aureus* szuszpenziót adtunk 5 ml tömény MHB-hez. A *C. acnes*-t tioglikolát tápközegben tenyésztettük, ezzel biztosítva az anaerob mikroorganizmusok növekedését. A tioglikolát tápközeg nátrium-tioglikolátot, dextrózt, nátrium-kloridot és tápanyagokat tartalmazott, beleértve a kazeint, az élesztőt, a marhakivonatot és a vitaminokat. [111]

A vizsgálati oldatokat Franz-diffúziós berendezés segítségével nyertem az adott összetételekből, kioldó közegként PBS-t használva. Pozitív kontrollként egy gyári eritromicin tartalmú kenőcsöt (Aknemycin™, 20 mg/g eritromicin) használtam, melyet szintén diffúziónak vettem alá és a cella receptor fázisából vettem mintát a 120. perc után. Mindegyik készítményt három különálló diffúziós cella segítségével vizsgáltam. A negatív kontrollcsoportokat mindkét esetben csak PBS-sel kezeltem. Vizsgáltam továbbá az alga antibakteriális hatását diffúzió nélkül, melyhez 10,0 mg liofilizált *S. platensis*-t oldottam 4,0 ml PBS-ben.

A kísérlet során 100 µl bakteriális inokulumot pipettáztam 96-lyukú plate-re, majd 100 µl tesztoldatot adtam hozzá. A *S. aureus* baktériumtörzset tartalmazó plate-eket aerob környezetben, míg a *C. acnes* baktériumot Concept 400 anaerob kamrában inkubáltuk 6 órán keresztül 37 °C-on. Az inkubálás során mintákat vettünk 2 és 6 óra elteltével, és abszorbanciájukat 600 nm-en mértük Multiskan Go (Thermo Fisher) spektrofotométerrel.

4.9. A *Calendula officinalis* tartalmú készítmények klinikai vizsgálata

Randomizált prospektív vizsgálatot végeztünk 115 abartikuláris reumás betegen, akiket a romániai Bihile Băile Felix rehabilitációs klinikai kórházban 2019 januárja és júniusa között kezeltek. A felvételi kritériumok a következők voltak: 18 évesnél idősebb betegek, akik vállat

vagy térdet érintő ízületi gyulladásban szenvednek, olyan betegek, akik elfogadták az ultrahangvizsgálatot, és akiknél íngyulladást diagnosztizáltak. A kizárási kritériumok a degeneratív vagy gyulladós reuma, demencia, daganatos megbetegedés, fertőző és dermatológiai kórképek voltak. Ötven beteg került kiválasztásra, akik teljesítették a felvétel kritériumait és beleegyeztek a klinikai vizsgálatba. Közülük 36 páciensnél diagnosztizálták a térd RA-t, 14-nél pedig a váll RA-t.

A betegek randomizálása számítógépes kód segítségével történt a két kezelési csoport egyikébe: Az aktív csoportot a hatóanyagot tartalmazó készítménnyel, a placebócsoportot aktív összetevőket nem tartalmazó formulával kezeltük naponta kétszer (reggel és este), 14 napon keresztül. Öt gramm készítményt használtunk fel minden kezelésnél. A kezeléseket a fent említett gyógyszerforma és preklinikai vizsgálatok során legkedvezőbb eredményeket mutató készítménnyel, a Synthalen K gélképző anyaggal formulált D jelölésű összetétellel (hatóanyagokkal / hatóanyagok nélkül) végeztük.

A vizsgálatban résztvevő valamennyi beteg kitöltötte a fájdalom értékelésére szolgáló kérdőívet, a vizuális analóg skálát (VAS) a kezelés megkezdése előtt és a 14 napos kezelés után. A VAS skálán a betegek válaszaikat (fájdalomintenzitásuk) bárhová elhelyezhették egy 10 cm hosszú vonalon, „nincs fájdalom” (0. szint) és „elviselhetetlen fájdalom” (10. szint) verbális leírókkal a végpontokon.

A klinikai vizsgálat során a térd vagy a váll képalkotó vizsgálatát hosszanti és keresztirányban egyaránt elvégeztük nagyfrekvenciás ultrahanggal (Philips HDI 5000), melynek segítségével mértük a teljes szinoviális membrán vastagságát a vizsgálatba való belépés napján és 14 nappal később. [112] A gyulladást a szinoviális membrán duzzanata jellemezte, amely a szinoviális folyadék növekedésével és a membrán fokozott perfúziójával társult. [113,114] A szinoviális vastagság mérését az Európai Liga a Reuma Ellen (European League Against Rheumatism, EULAR) által ajánlott protokoll, valamint Jan és munkatársai szerint végeztük. [115] Mindkét esetben az UH képének legnagyobb anteroposterior átmérőjét értékeltük a klinika orvosának segítségével. A szinoviális membrán átmérőjének csökkenés jelentette az ízületi gyulladás mérséklődését.

Etikai megállapítás: Minden alany megalapozott beleegyezését adta a felvételhez, mielőtt részt vett volna a vizsgálatban. A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végezték, és a protokollt a Rehabilitációs Klinikai Kórház Bäile Felix (Románia, Bihor, Etikai Bizottság) etikai bizottsága jóváhagyta (12820 / 28.12.2018).

4.10. Statisztikai elemzés

Az adatokat Microsoft Excel 2013 és GraphPad Prism (6. verzió; GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA) segítségével kezeltem és elemeztem, és átlagként \pm S.D. ábrázoltam. Két csoport összehasonlítását t-próbával, míg több csoport összehasonlítását egyirányú ANOVA-val végeztem, amelyet Dunnett többszörös összehasonlító tesztje vagy Tukey többszörös összehasonlító tesztje követett, attól függően, hogy a csoportokat egy adott kontrollcsoporthoz vagy egymáshoz hasonlítottam-e. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettem, amennyiben a p-értéke kisebbnek adódott, mint 0,05.

5. Eredmények

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a *S. platensis*, illetve a *C. officinalis* felhasználásával formulált összetételek vizsgálati eredményeit a két témakör szerint csoportosítva szeretném bemutatni.

5.1. A *Spirulina platensis* alga tartalmú krémek vizsgálatának eredményei

5.1.1. Makroszkopikus tulajdonságok és kémhatása

A külsőleges gyógyszerkészítményeket illetően rendkívül fontos a megfelelő kémhatás beállítása, ugyanis ezen formulációk esetében a 3,5 - 7 pH-tartományba esők az elfogadottak. Az emberi bőrfelület pH-ja normál esetben 4,7 körül mozog, viszont az öregedéssel ez az érték növekszik. Bár a savasabb pH-jú készítmények kedvezőbbek a bőrnek, a túl alacsony pH befolyásolhatja az általunk végzett antioxidáns és antibakteriális tesztek eredményeit, ezért esett a választás a semleges pH-ra. [116,117]

A formulált összetételek makroszkopikus jellemzőinek értékelését közvetlenül az elkészítést követően, illetve 30 és 60 nap elteltével végeztük el. Az V-VIII formulációk homogén, halvány kékeszöld megjelenésűek, az I-IV összetételek pedig heterogének voltak, mivel ezek szuszpendált formában tartalmazták a liofilizált *S. platensis*-t. Az egyes készítmények pH-értéke 6,5 és 7,0 közöttinek adódott és 60 nap elteltével sem változott szignifikáns mértékben (5. táblázat).

Összetétel	pH érték ± SD		
	Közvetlenül formulálás után	30 nap után	60 nap után
I	6,77 ± 0.04	6,76 ± 0.04	6,76 ± 0.05
II	6,83 ± 0.04	6,84 ± 0.04	6,82 ± 0.03
III	6,95 ± 0.05	6,94 ± 0.03	6,94 ± 0.04
IV	6,92 ± 0.02	6,93 ± 0.03	6,91 ± 0.04
V	6,77 ± 0.04	6,74 ± 0.05	6,73 ± 0.05
VI	6,82 ± 0.02	6,81 ± 0.04	6,92 ± 0.04
VII	6,90 ± 0.03	6,89 ± 0.04	6,90 ± 0.05
VIII	6,91 ± 0.03	6,91 ± 0.05	6,92 ± 0.05

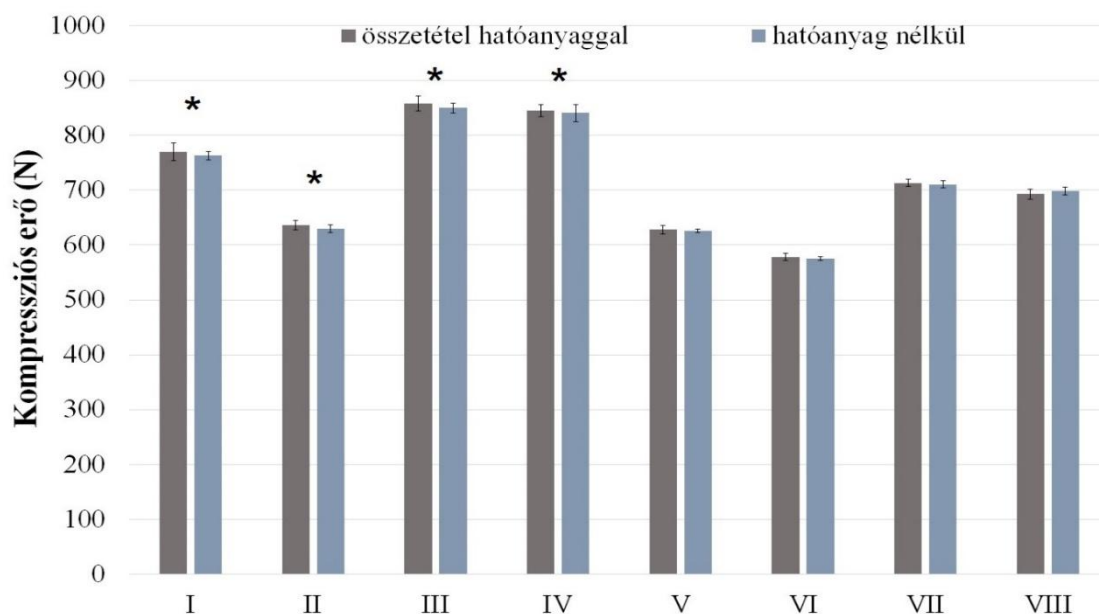
5. táblázat: A *Spirulina platensis* tartalmú készítmények pH-értékei közvetlenül formulálás után, valamint 30 és 60 nap elteltével 21 °C-on történő tárolással. Az egyes mérési adatok az átlagot ± S.D. jelzik, n = 5.

5.1.2. Textúra elemzés

A krémek és kenőcsök mechanikai tulajdonságainak elemzésére az egyik legáltalánosabb kvantitatív módszer az állományvizsgálat. [118,119] A különböző összetételekkel kompressziós vizsgálatokat végeztem, majd értékeltem az eredményeket.

A próbatestnek az I–VIII. készítménybe adott távolságra történő bejutásához szükséges nyomóerőket (N) a 7. ábra mutatja. A nyomóerő maximális értékéből következtetni lehet a készítmény konzisztenciájára. [119] A vizsgálatom szerint a különböző összetételekhez eltérő erőkifejtésre volt szükség, tehát eltérő konzisztenciával rendelkeznek. A hatóanyagot szuszpendált és oldott formában tartalmazó készítményeket hasonlítottam össze egymással. A SPP-t Transcutolban oldva tartalmazó formulációk esetében kisebb erőkifejtés volt detektálható a deformációval szemben, mint a szuszpenziós változatokat illetően. Szignifikáns ($p < 0,05$) különbségek voltak kimutathatók az I. és IV, II és VI, III és VII, valamint IV és VIII formulációk között. [120]

A textúra vizsgálatát a hatóanyagot tartalmazó, illetve a hatóanyag nélküli (kontroll) készítmények esetében is elvégeztem, majd értékeltem. A meghatározásokat öt párhuzamos méréssel, $24,5 \pm 0,5$ °C-on hajtottam végre. A 7. ábra Newton-ban (N) megadott nyomóerőt prezentálja összehasonlítva a kontroll mintákkal. A kontrollminták azonos összetételűek voltak *S. platensis* kivonat nélkül.



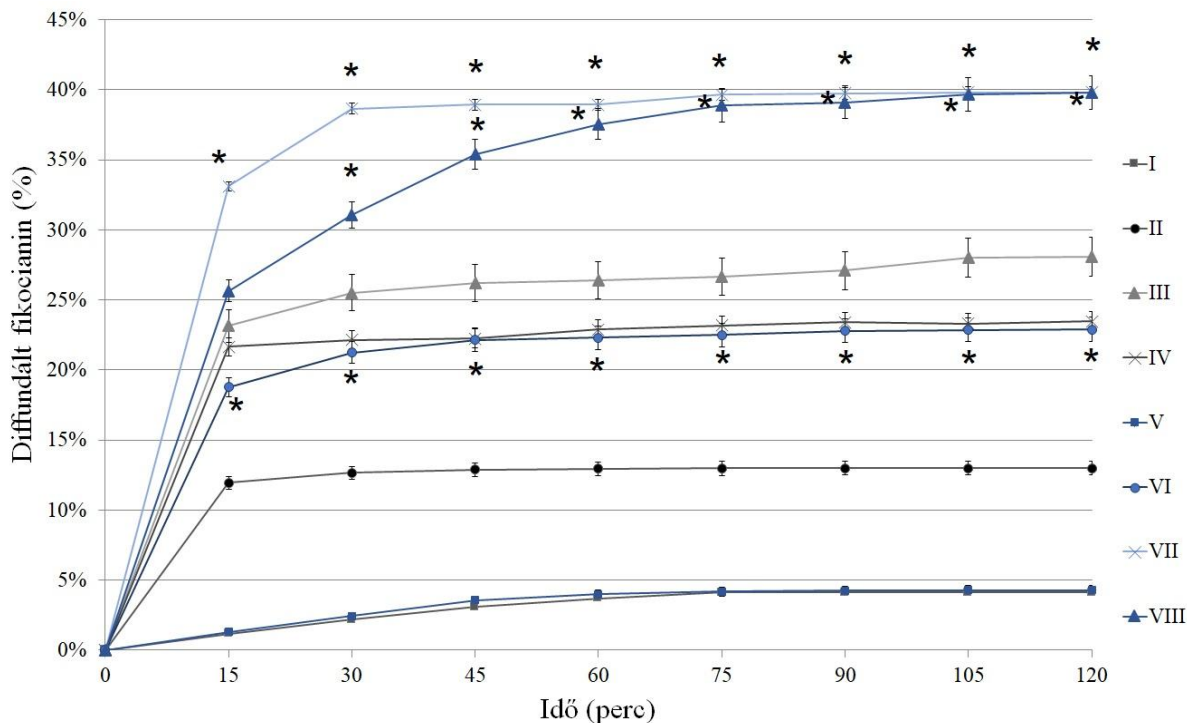
7. ábra: A *S. platensis* tartalmú készítmények textúra-analízisének eredménye $24,5 \pm 0,5$ °C-on, nyomóerő (N)-ként meghatározva. A hatóanyagot tartalmazó formulációkhoz tartozó eredményeket szürke oszlopok, a hatóanyag nélkülieket pedig kék oszlopok szemléltetik. Minden adatpont az átlag \pm S.D., n = 5 értéket jelenti.

A hatóanyaggal és hatóanyag nélkül formulált készítmények, valamint a hatóanyagot szuszpendált és oldott formában tartalmazó krémek összehasonlító elemzésére egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA-t) és Tukey többszörös összehasonlító teszt került elvégzésre. A szignifikáns eltéréseket az ábrán * jelöli ($p < 0,05$). A *S. platensis* por alkalmazása statisztikailag egyik esetben sem változtatta meg a kompressziós erő értékét. A szuszpendált (I-IV) és az oldott formák (V-VIII) között minden összetételpárban szignifikáns különbségek voltak kimutathatók.

5.1.3. *In vitro* hatóanyag felszabadulás és diffúzió vizsgálata

A 8. ábra a különböző összetételekből felszabadult és diffundált fikocianin kumulatív mennyiségét mutatja (%) az idő függvényében (perc). A különböző összetételű készítmények 100 grammja 5 gramm liofilizált *S. platensis* algát tartalmazott, ami az analitikai vizsgálatok

alapján $23,07 \pm 0,8$ mg fikocianinnak felel meg. [90] A diffúziós cellákra felvitt mennyiség a krémekből 1-1 gramm volt, ami a fentiek szerint $0,23 \pm 0,008$ mg fikocianinnak feleltethető meg.



8. ábra: A fikocianin *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát szintetikus membránon keresztül az I-VIII összetételek esetében. Az egyes mérési pontok hat külön cellából vett minta abszorbanciájának átlagát és \pm SD-t jelzik. Egyutas ANOVA-t és Tukey többszörös összehasonlító teszt került elvégzésre a Spirulinát szuszpendált és oldott formában tartalmazó készítmények összehasonlítására. A statisztikailag szignifikáns különbségeket $p < 0,05$ értéknél csillag jelöli.

A kísérletei eredmények szerint azok a készítmények, amelyek esetében a hatóanyagot TC-ben oldott formában tartalmazták, magasabb diffúziós értékeket mutattak, mint az azonos emulgenst tartalmazó szuszpenziós párjaik. A fikocianin vivőanyagból történő felszabadulásának, valamint membránon keresztüli diffúziójának mértéke a különböző összetételekből 120 perc elteltével a következő csökkenő sorrend szerint rendezhető: VII > VIII > III > IV > VI > II > V > I.

Szignifikáns különbségeket tapasztaltam a II. és VI., III. és VII., valamint IV. és VIII. összetétel diffúziója között ($p < 0,05$), azonos időpontokban (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 és 120 perc után) vett minták esetében. Ahogy az várható volt, a hatóanyag TC-ban történő feloldásával nagyobb mértékű fikocianin felszabadulás és diffúzió volt megfigyelhető. Az eredmények továbbá azt mutatják, hogy emulgeálószerként a TFS-t vagy az SP70-et

tartalmazó készítményekből még TC használata nélkül is kedvezőbb volt a hatóanyag diffúziós profilja, mint a CR és P60 emulgeálószeret tartalmazó krémek esetében.

A legnagyobb diffundált hatóanyag-mennyiséget tehát a VII és VIII készítmények esetében sikerült detektálni, amelyekben a *S. platensis*-t TC-ban oldottam, emulgeálószerként pedig SP70-et vagy TFS-t tartalmazott. A fikocianin maximális diffundált mennyisége elérte a $39,81 \pm 0,83\%$ -ot ($9,18 \pm 0,38$ mg) a VII készítmény esetében és a $39,80 \pm 1,15\%$ -ot ($9,18 \pm 0,41$ mg) a VIII jelölésű krémet vizsgálva. Megállapítható, hogy ezen két készítményből származó diffundált fikocianin mennyisége közötti különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($p < 0,05$) a kísérlet végén (120. perc). A P60-at emulgeálószerként tartalmazó krémek mutatták a legcsekélyebb mennyiségű diffundált hatóanyagot, és a TC készítményhez való hozzáadása sem eredményezett jelentős növekedést.

5.1.3.1. Matematikai és kinetikai elemzés eredménye

Az azonos emulgeálószerrel formulált oldott és szuszpendált *S. platensis* liofilizátumot tartalmazó készítmények diffúziós profilját hasonlítottam össze modell-független analízis segítségével. A kiszámított hasonlósági tényezőket a 6. táblázat tartalmazza. Két készítményt akkor tekintettem hasonlóknak, ha hasonlósági tényezőjük (f_2 érték) 50 és 100 között van.

Páronkénti összehasonlítás	f_2
VII vs III	45,42
VIII vs IV	43,59
VI vs II	53,91
V vs I	97,74

6. táblázat: Az azonos emulgeálószerrel formulált oldott és szuszpendált *Spirulina platensis* port tartalmazó összetételek kioldódási profiljának összehasonlítása a hasonlósági tényező (f_2) számításával.

A számított f_2 hasonlósági faktor értékek alapján nagyfokú hasonlóságot véltem felfedezni az V és az I összetétel kioldódási profilját illetően. Érdekes módon a számolás alapján a VI és a II összetétel is hasonlóknak bizonyult, mivel az f_2 érték (53,91) 50 és 100 közöttinek adódott. [100] A legnagyobb különbséget a VIII és a IV jelölésű összetételnél

tapasztaltam, ez esetben tehát a TC szignifikáns mértékben növelni tudta az átdiffundált fikocianin hatóanyag koncentrációját.

A fikocianin felszabadulásának sebességi állandóját (k) és a diffúziós együttható értékét (D) az egységnyi területen átdiffundált hatóanyag mennyiségéből, a kezdeti koncentrációból és a diffúziós időből határoztam meg. Az egyes összetételekhez tartozó sebességi állandókat és a diffúziós együttható értékeket a 7. táblázat tartalmazza. [121,122] A számolás alapján jelentős különbségek ($p < 0,05$) voltak megfigyelhetők a III és VII, IV és VIII, valamint a II és VI összetétel diffúziós együttható értékei között. Ezekben az esetekben statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb eredményeket kaptunk a szuszpendált formák vizsgálata során, mint az oldott SPP-t tartalmazó készítményeknél. Az I és V összetételek között nem tapasztaltam szignifikáns különbséget. A Poliszorbát 60 emulgenssel formulált készítményekből a fikocianin felszabadulási sebessége és diffúziós állandója elmaradt a többi összetételtől, függetlenül attól, hogy a hatóanyag oldott vagy szuszpendált formában volt jelen.

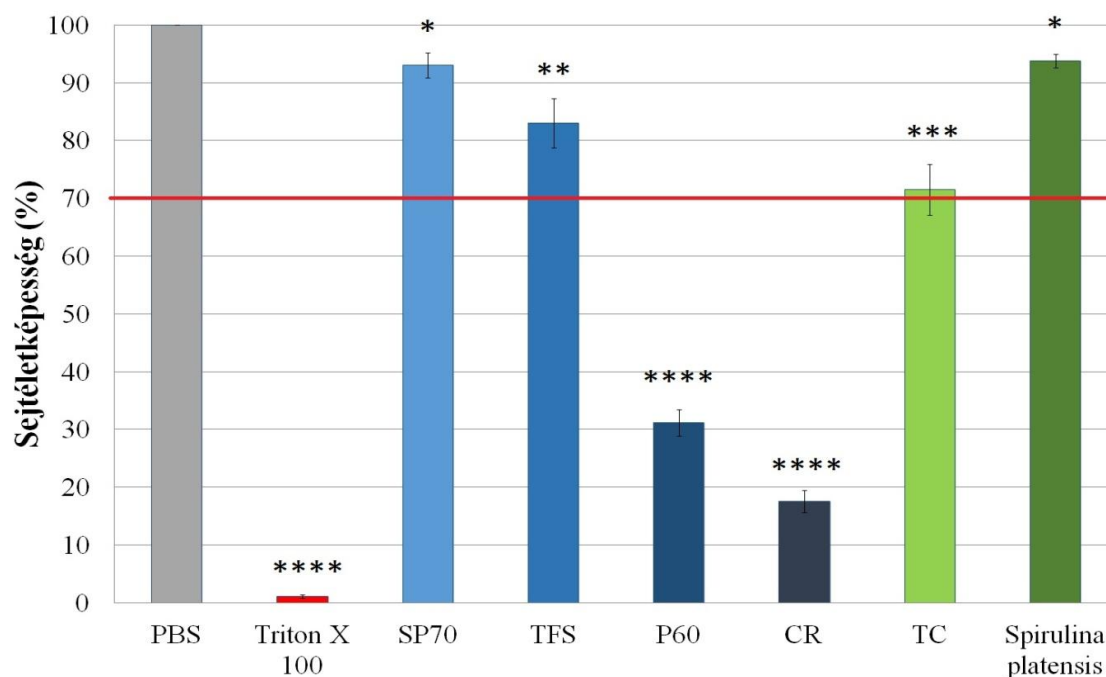
Összetétel	A fikocianin felszabadulás sebességi állandója	Diffúziós koefficiens
	$k \cdot 10^2 (\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{1/2}) \pm \text{S.D.}$	$D \cdot 10^5 (\text{cm}^2/\text{min}) \pm \text{S.D.}$
I	64,07 ± 0,28	0,143 ± 0,02
II	156,48 ± 2,60	1,756 ± 0,35
III	339,19 ± 7,53	7,316 ± 1,29
IV	279,68 ± 5,96	5,484 ± 0,83
V	65,80 ± 0,15	0,167 ± 0,02
VI	285,37 ± 3,63	5,345 ± 0,42 *
VII	493,51 ± 6,62	15,90 ± 0,95 *
VIII	531,44 ± 5,87	14,54 ± 0,93 *

7. táblázat: A fikocianin felszabadulási sebessége és a diffúziós koefficiens értékek az egyes összetételekre vonatkoztatva (I-VIII). Minden adatpont az átlagot ± S.D. jelenti, $n = 5$, $p < 0,05$. Egyutas ANOVA és Pearson korrelációs tesztek kerültek elvégzésre statisztikai elemzésként. A SPP-t szuszpendált vagy oldott formában tartalmazó készítmények közötti szignifikáns eltéréseket a táblázatban csillag (*) jelöli.

5.1.4. *In vitro* citotoxicitási vizsgálata HaCaT sejtvonalon

5.1.4.1. A *Spirulina platensis* és az alkalmazott segédanyagok citotoxicitása

A nemionos felületaktív anyagok, a TC és az alga 0,50 (m/m) %-os oldatának citotoxicitását HaCaT sejt monorétegen vizsgáltam. A segédanyagokat és a SPP-t PBS-ben oldottam fel. Amint az a 9. ábrán látható, az emulgeálószer típusa nagymértékben befolyásolta a sejtek életképességét. A legjelentősebb toxicitás a P60 és a CR emulgensek esetében volt detektálható, ezek esetében a sejtek életképessége kevesebb, mint 50% volt a negatív kontrollcsoporthoz (foszfáttal pufferolt sóoldat (PBS)) képest. Az SP70 cukorészterrel kezelt sejteknek volt a legmagasabb az életképessége ($93,05 \pm 2,20$ %), ezt követte a TFS kezelés $82,79 \pm 2,95$ százalékkal. A kísérlet eredményei szerint tehát az SP70 és a TFS emulgens is minimális toxikus hatást gyakoroltak a keratinocita sejtekre 0,50 (m/m) % koncentrációkat alkalmazva. Szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a TC-lal, valamint a PBS-sel kezelt (negatív kontroll) csoportok között. A TC $70,46 \pm 4,37$ %-ra csökkentette a sejtek életképességét, ami még éppen elfogadhatónak mondható az ISO 10993:5 standard alapján, mely szerint 70% feletti érték esetén nevezhető a készítmény biokompatibilisnek. [123] A PBS-ben oldott SPP csak 5,5%-kal csökkentette a sejtek életképességét, a készítmény fő komponense tehát jól tolerálhatónak bizonyult.



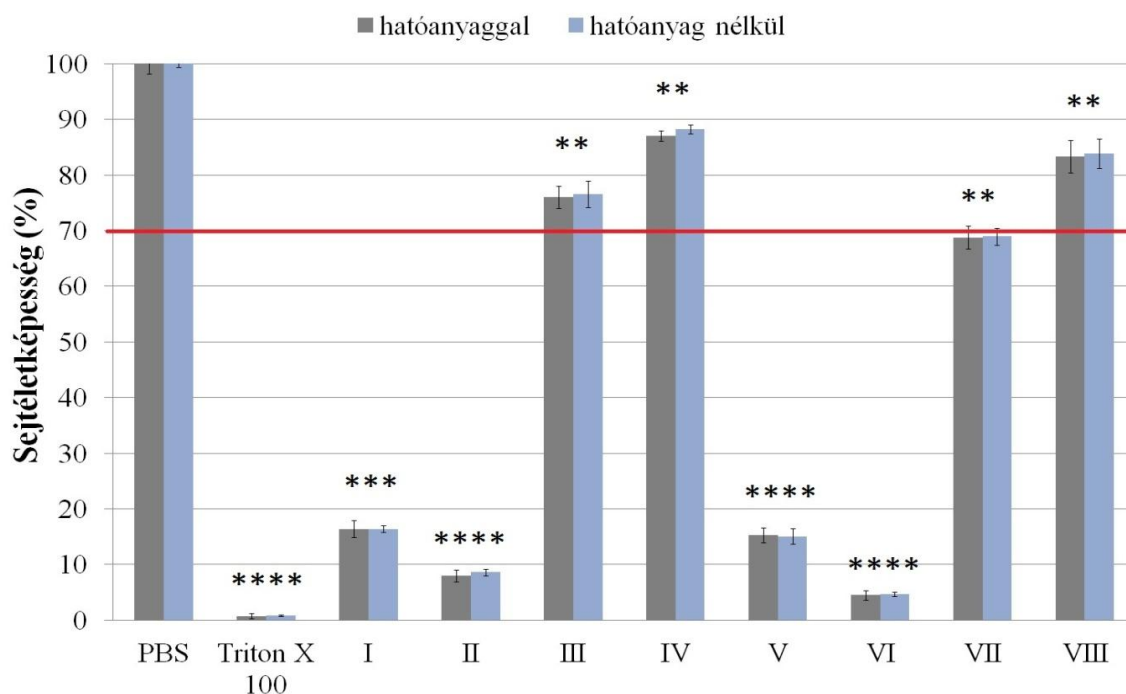
9. ábra: Az SP70 cukorészter (SP70), Tefose 63 (TFS), poliszorbát 60 (P60), Cremophor A6 és A25 (CR), Transcutol HP (TC) és *Spirulina platensis* 0,50 (m/m) %-os oldataival kezelt HaCaT sejtek életképességének vizsgálata MTT festék segítségével. Negatív kontrollként PBS-t, pozitív kontrollként Triton X 100-at alkalmaztunk. Minden adatpont az átlagot \pm S.D jelöli (n = 10). A sejtek életképessége a negatív kontroll csoport százalékában került kifejezésre. A különböző minták PBS-sel történő összehasonlítására egyutas ANOVA, valamint Dunnett többszörös összehasonlító tesztje került elvégzésre. A *, **, *** és **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jeleznek $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ értékeknél. A piros vonal az ISO 10993-5: 2009 (E) szabvány alapján meghatározott 70%-os határértéket jelöli.

5.1.4.2. A *Spirulina platensis* tartalmú készítmények citotoxicitása

Az MTT citotoxicitási vizsgálatokat HaCaT sejt monorétegen végeztem, minden mintát Franz diffúziós berendezés segítségével készítettem, receptorfázisként PBS-t használva. Az 1 ml-es mintaoldatokat a 120. percben vettem, amikor a fikocianin diffúziója elérte a maximumát. Az azonos összetételű, de SPP nélküli krémeket is vizsgáltam kontrollként. A kísérletek eredményeit a 10. ábra mutatja.

A sejtek életképességét a csak PBS-sel kezelt sejtek életképességének százalékában fejeztük ki. A pozitív kontroll a Triton X 100 (10 tömeg/térfogat%) volt, amely szignifikánsan alacsonyabb sejtéletképességi eredményeket mutatott a negatív kontrollhoz képest. A TC-t nem tartalmazó krémek magasabb sejtéletképességi értékeket mutattak, mint az azonos emulgeálószer, valamint TC-t is tartalmazó összetételek. A különböző emulgeálószeret tartalmazó készítmények eltérő mértékű sejtéletképességet eredményeztek. A kapott abszorbancia értékek alapján a cukorészter SP70 felületaktív anyagot tartalmazó formulációk

voltak a legkevésbé toxikusak a keratinocitákra nézve, ugyanis a sejtek életképessége a IV-es összetétel esetében $87,24\% \pm 1,0\%$, míg a VIII-as összetétel esetében $83,15\% \pm 0,82\%$ volt. Az I, V és II, VI összetétel párokkal történő kezeléshez társultak a legalacsonyabb sejtleletképességi adatok, tehát a Poliszorbát 60-at és Cremophort tartalmazó krémek fejtették ki a legtoxikusabb hatást a HaCaT sejtekre. Az SPP-t nem tartalmazó formulációk esetében a citotoxicitásban nem volt szignifikáns különbség az SPP tartalmú krémekhez képest, tehát a SPP alkalmazása statisztikailag egyik esetben sem változtatta meg a sejtek életképességi értékeit. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy az SP70-nel és TC-lal formulált, hatóanyagként *S. platensis*-t tartalmazó összetétel jól tolerálható, mindössze 13%-kal csökkentette a sejtek életképességét.



10. ábra: Sejtéletképességi vizsgálat MTT-teszt segítségével HaCaT-sejteken az I–VIII formulációkkal történő 1 órás inkubálás után. A sejtleletképesség százalékos értéke a csak PBS-sel kezelt negatív kontroll sejtek abszorbanciája alapján került kiszámításra. Minden adatpont az átlagot \pm S.D. ábrázolja, $n = 12$. A különböző készítményekkel történt kezelések eredményeinek a negatív kontrollal való összehasonlítására szokásos egyutas ANOVA Dunnett többszörös összehasonlító tesztjével került elvégzésre. **, *** és **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jelez $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ értéknél. A piros vonal az ISO 10993-5: 2009 (E) szabvány alapján meghatározott 70%-os határértéket jelöli.

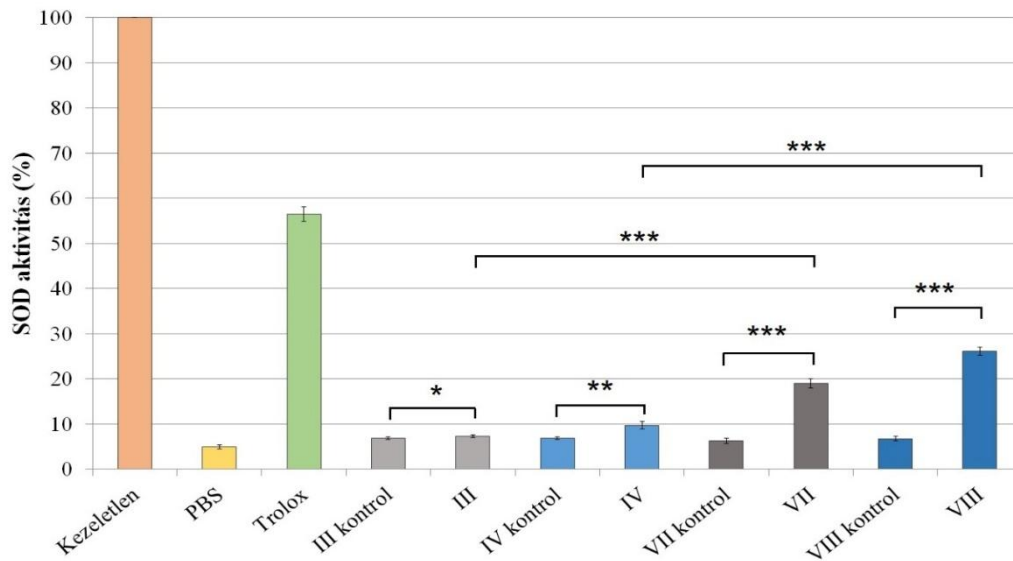
5.1.5. A *Spirulina platensis* tartalmú készítmények *in vitro* antioxidáns vizsgálatai

5.1.5.1. Szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitásának mérése HaCaT sejteken

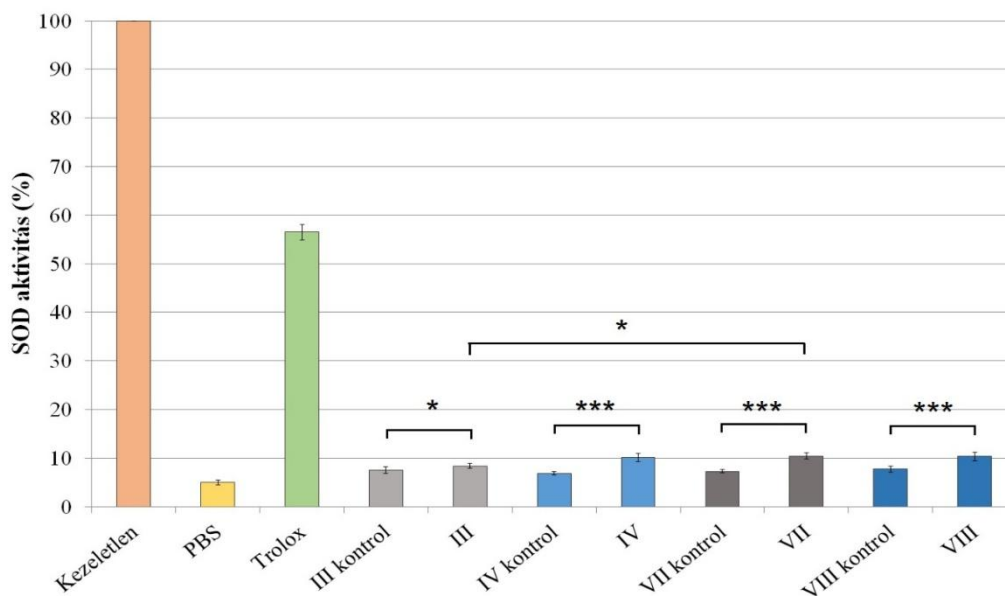
Az *in vitro* antioxidáns kísérlethez az emulgeálószerként TFS-t és SP70-et, valamint az SPP-t szuszpendált (III, IV) és oldott formában (VII, VIII) tartalmazó készítményeket választottam ki a diffúziós vizsgálatok és az MTT citotoxicitási tesztek eredményei alapján.

A vizsgálat során az UVB sugárzásban nem részesült sejtcsoport SOD enzimaktivitását tekintetem 100%-nak. A hatóanyaggal formulált összetételekkel történő elő- és az utókezelés hatására bekövetkezett enzimaktivitás változásokat összehasonlítottam a kontroll sejtek enzimaktivitásával, amelyeket az SPP-t nem tartalmazó III és IV, valamint VII és VIII készítményekkel elő- vagy utókezelttem. Pozitív kontrollként (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karbonsavat (Trolox) használtam az elő- és utókezelés során.

A 11. ábra szemlélteti, hogy az ultraibolya sugárzásnak kitett csoportban, ahol nem alkalmaztam elő- vagy utókezelést a vizsgálati oldatokkal, a SOD enzim szintje szignifikánsan lecsökkent az UV-val nem kezelt csoporthoz képest. A HaCaT sejtekben az antioxidáns enzimaktivitás drasztikus mértékű csökkenését az UVB sugárzás okozta nagyfokú oxidatív stressz eredményezhette, ami súlyos sejtkárosodáshoz vezethetett. Az előkezelés során kisebb mértékű csökkenést, azaz magasabb enzimaktivitást tapasztaltam az SOD értékét tekintve. A legkedvezőbb eredmény a VIII-as készítménnyel történő premedikálás hatására volt megfigyelhető, ahol az SPP-t TC-ban oldottam fel (11/a ábra). Ebben az esetben a SOD aktivitás átlagos értéke UVB besugárzás után $26,45 \pm 0,85\%$ -nak adódott. Az eredményeim alapján elmondható, hogy az utókezelés nem tudta megakadályozni az UVB sugárzás okozta jelentős enzimszint-csökkenést (11/b ábra).



(a)

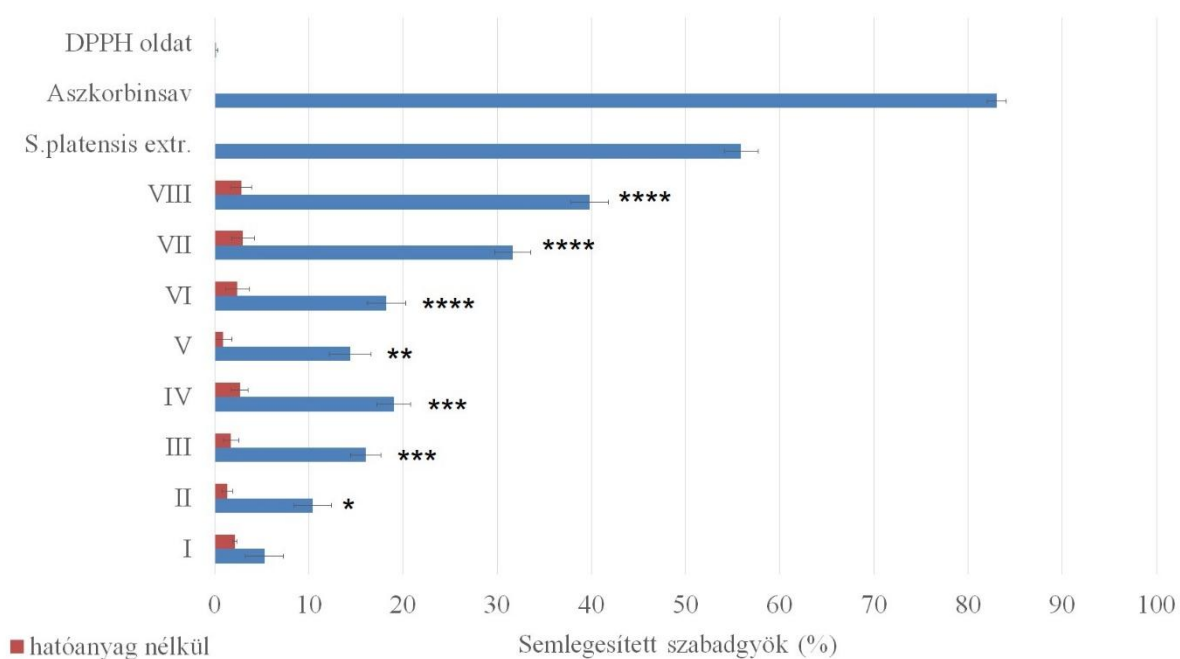


(b)

11. ábra: Tefose 63-at (III, VII) és cukorészter SP70 felületaktív anyagot (IV, VIII) tartalmazó készítményekkel végzett elő (a) - és utókezelés (b) hatása az UVB sugárzásnak kitett HaCaT-sejtek SOD enzimaktivitására. Az enzimaktivitás százalékos értéke a sugárzás nélkül hagyott keratinociták SOD aktivitása alapján került kiszámításra. A negatív kontroll PBS-sel elő- vagy utókezelt UVB-besugárzott sejtek, pozitív kontroll PBS-ben oldott Trolox-szal (10,0 μM) kezelt sejtek voltak. Az adatpontok az átlagot \pm S.D. jelentik, $n = 10$. A készítmények egymással való összehasonlítására egyutas ANOVA és Tukey-féle többszörös összehasonlító tesztek kerültek elvégzésre. A *, ** és *** statisztikailag szignifikáns különbségeket jelez $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ értékeknél.

5.1.5.2. A *Spirulina platensis* porral formulált összetételekkel végzett DPPH vizsgálat

A vizsgálat során a *S. platensis* kivonat, valamint a III, IV, VII, VIII készítmények gyökfogó aktivitásának százalékos arányát (AA%) határoztam meg. A DPPH-teszt eredményei alapján megállapítható, hogy a *S. platensis* kivonat (10 mg/ml) antioxidáns aktivitása az aszkorbinsav antioxidáns aktivitásának 68%-a (12. ábra). Összehasonlításképpen elvégeztük a vizsgálatot a hatóanyag nélküli formulációkkal is. A kapott értékek alapján az SPP-t tartalmazó készítmények antioxidáns aktivitása szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az azonos összetételű, de SPP-t nem tartalmazó formulációké. Az SPP nélküli krémek tehát - ahogy azt várni lehetett - nem mutattak jelentős gyökfogó aktivitást.



12. ábra: A *S. platensis*-t tartalmazó készítmények szabadgyökfogó aktivitása a hatóanyag nélküli készítményekkel összehasonlítva. A pozitív kontroll 96%-os etanolban oldott aszkorbinsav (0,25 mg/ml) volt. Negatív kontrollként 2,0 ml DPPH-oldatot (0,06 mM) alkalmaztunk 1,0 ml abszolút etanollal hígítva. Az adatok átlag \pm SD (n=4) formában vannak megadva. Kétmintás t-próba került elvégzésre az SPP-vel vagy anélkül készült készítmények összehasonlítására. A szignifikáns eltéréseket az ábrán *, **, *** és **** jelöli (p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001 és p < 0,0001), amely az SPP-t tartalmazó és az azonos összetételű, SPP nélküli összetételek szignifikancia szintjeit mutatja.

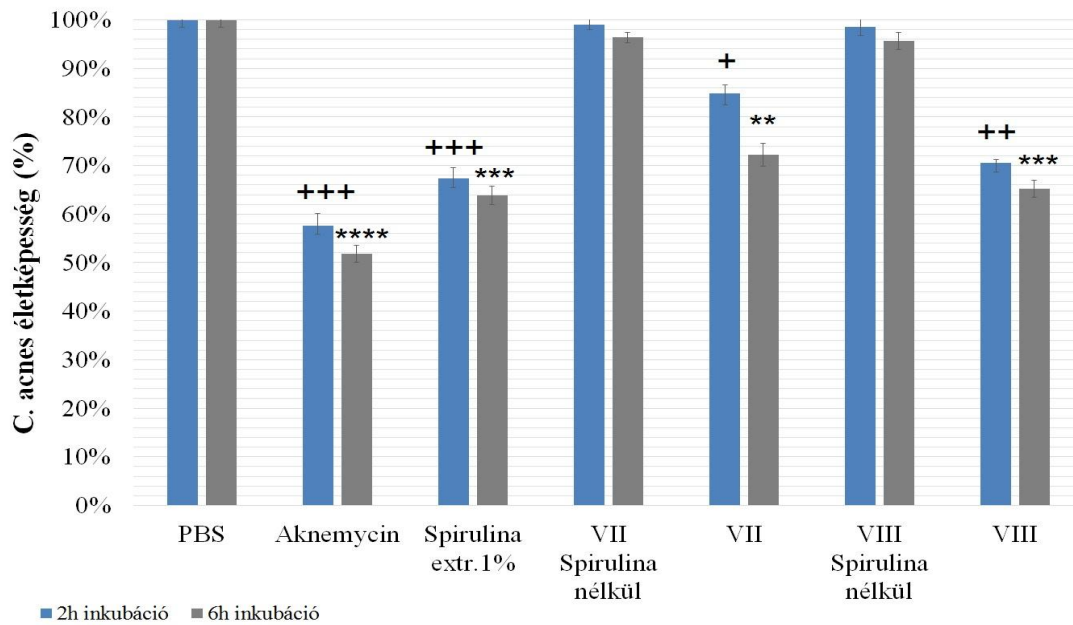
Eredményeink szerint a VII és VIII készítmény szignifikáns mértékben képes volt gátolni a DPPH oxidációját, azaz jelentős gyökfogó aktivitással rendelkeztek. A VIII készítmény, amely SP70 cukorésztert és TC-t tartalmazott, mutatta a leghatékonyabb antioxidáns aktivitást a DPPH vizsgálat eredményei szerint is. Az SPP-t szuszpendált

formában tartalmazó készítmények (III és IV) ebben az esetben is kisebb aktivitást mutattak, mint azok, amelyek a hatóanyagot oldott formában tartalmazták.

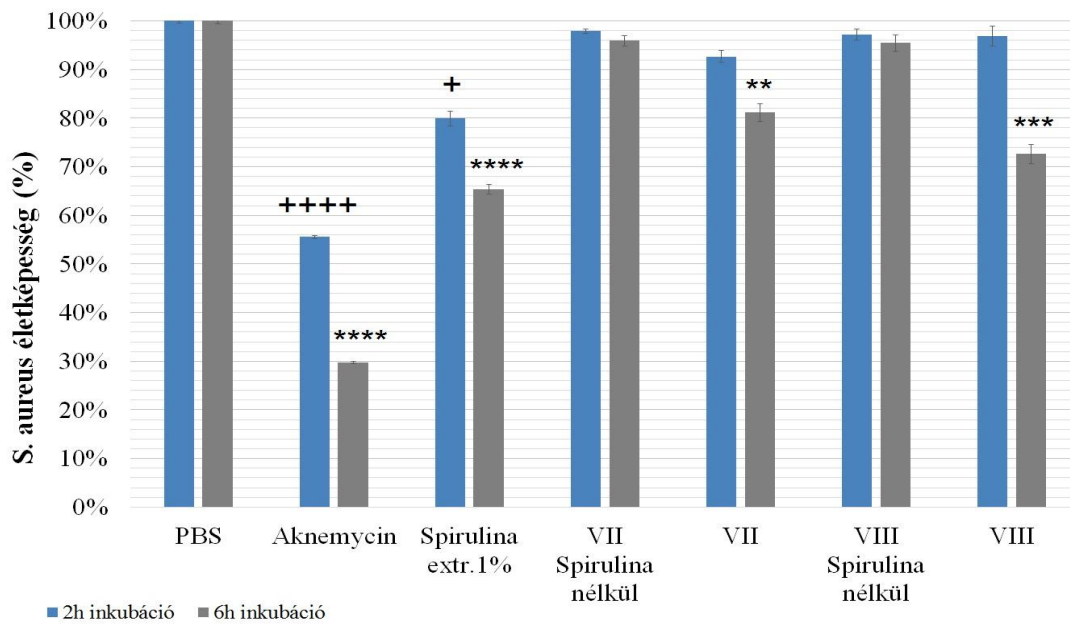
5.1.6. Antibakteriális hatás vizsgálata

A *S. platensis* tartalmú krémek acne vulgaris elleni hatásának tesztelésére a fent leírt vizsgálatok alapján legkedvezőbbnek bizonyult, TFS és SP70 emulgenssel formulált, a hatóanyagot TC-ban oldva tartalmazó összetételeket választottuk ki. A VII- és a VIII jelölésű krémek antibakteriális hatásának becslésére standard mikrodilúciós módszert alkalmaztunk, melyet Dr. Szabó Judit, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársának segítségével végeztünk el. A vizsgálatot *C. acnes* (13/a ábra) *S. aureus* (13/b ábra) baktériumtörzseken hajtottuk végre 6 órás inkubációs idővel. Pozitív kontrollként Aknemycin™ kenőcsöt (20 mg/g eritromicin) használtunk. A negatív kontrollcsoportot mindkét esetben csak PBS-sel kezeltük. A *S. platensis* hatását önmagában is teszteltük PBS-sel készített 0,25 (m/m) %-os oldat formájában.

Az eredményeink alapján megállapítható, hogy mindkét összetétel kisebb aktivitást mutatott a *S. aureus* baktériummal szemben két órás inkubáció után (2 óra), összehasonlítva a *C. acnes* ellen mért aktivitással. Hat óra elteltével azonban nőtt a készítmények hatékonysága *S. aureus* ellen. Eredményeink szerint összességében a *C. acnes* érzékenyebbnek bizonyult a kezelésekre. Ahogy az a 13/a ábrán látható, az SP70 cukorésztert (VIII) tartalmazó készítmény meg tudta közelíteni az Aknemycin™ hatását, ugyanis az ezzel a készítménnyel végzett kezelés jelentősen, $65,34 \pm 1,76\%$ -ra csökkentette a *C. acnes* életképességét. Szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a kezelt és a negatív kontroll csoport között 2 és 6 órás inkubációs idő után is a *C. acnes* baktériumtörzset tekintve. Az SP70 emulgenst tartalmazó készítménnyel végzett kezelés mindkét esetben hatékonyabbnak bizonyult.



(a)



(b)

13. ábra: A *C. acnes* (a) és a *S. aureus* (b) baktériumtörzsek sejtleletképesége a VII, VIII összetétellel (hatóanyaggal és kontrollként hatóanyag nélkül), a pozitív kontrollal (Aknemycin™) és az SPP-oldattal (0,25%) történő kezelés után. A sejtek életképesége a csak PBS-sel kezelt negatív kontrollcsoport abszorbanciájának százalékában került kifejezésre. Az adatpontok átlag ± SD-t ábrázolják, n = 12. A statisztikai szignifikanciát +, ++, +++, +++++ és *, **, *, **** jelzik ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$) a 2 (pluszjel) és 6 (csillag) órás minták esetében. A kezelt csoportokat PBS-sel hasonlítottuk össze egyutas ANOVA-val, amelyet Dunnett többszörös összehasonlító tesztje követett.**

A *S. aureus* kísérletünk szerint kevésbé volt érzékeny a kezelésekre. Ugyanakkor statisztikailag szignifikáns különbségek ebben az esetben is megfigyelhetők voltak a negatív kontroll (PBS) és a kezelt csoportok életképessége között 6 órás inkubáció után, amint az a 13/b ábrán látható. A VIII-as készítmény a *S. aureus*-t vizsgálva is hatékonyabbnak bizonyult, mivel átlagosan $72,59 \pm 1,98\%$ -ra csökkentette a baktériumsejtek életképességét.

A *S. platensis* oldatával végzett kezelés mindkét baktériumtípus ellen hatékonynak bizonyult. A *S. aureus* sejtek életképessége $65,49 \pm 0,97\%$ -ra, míg a *C. acnes* esetében $63,67 \pm 1,88\%$ -ra csökkent. Vizsgálataink szerint a SPP-t nem tartalmazó készítmények nem befolyásolták szignifikánsan a baktériumok életképességét. Ebből arra következtethetünk, hogy a segédanyagok önmagukban nem rendelkeznek jelentős antibakteriális hatással.

5.2. A *Calendula officinalis* tartalmú készítmények vizsgálatának eredményei

5.2.1. A *Calendula officinalis* tartalmú készítmények makroszkópikus tulajdonságai és kémhatásuk

A körömvirág tartalmú formulációk esetében is első lépés az elkészített készítmények makroszkópikus jellemzőinek leírása volt. Közvetlenül az elkészítést követően, valamint 30 és 60 nap elteltével is vizsgáltam a formulált kenőcs, illetve a krémek és gélek küllemét. A kenőcs (A), valamint a krémek (B-C) homogén, narancssárga megjelenésű volt, míg a gélek (D-F) áttetszőek voltak és ezek a tulajdonságok 60 nap elteltével sem változtak. A készítményeink megfeleltek a vizuális, szaglási és tapintási jellemzőkre vonatkozó hivatalos követelményeknek. [5,124,125]

A pH-t potenciometriásan, digitális pH-mérővel határoztam meg. A 8. táblázat a készítmények pH-értékét mutatja közvetlenül a formulálás után, 30, illetve 60 nap elteltével. A külsőleges gyógyszerkészítmények elkészítése során olyan készítmények formulálása volt a cél, amelyek pH-ja a természetes bőrfelület pH-értékéhez hasonló. [116] A megfelelő pH beállítása nagyon fontos a gélképződés megindításához, ennek legkedvezőbb pH-tartománya 6,5-7,0 körül van. [63] Az alkalmazott polimerek (Synthalen K, Carbopol, Pemulen) vizes oldatának pH-ja a polimer koncentrációjától függően 2,5-3,5 között van, ezért a pH növeléséhez trietanolamin (trolamin) hozzáadására volt szükség. [126] Gélek esetében az optimális viszkozitás 5,5-7,0 pH-tartományban érhető el. [95]

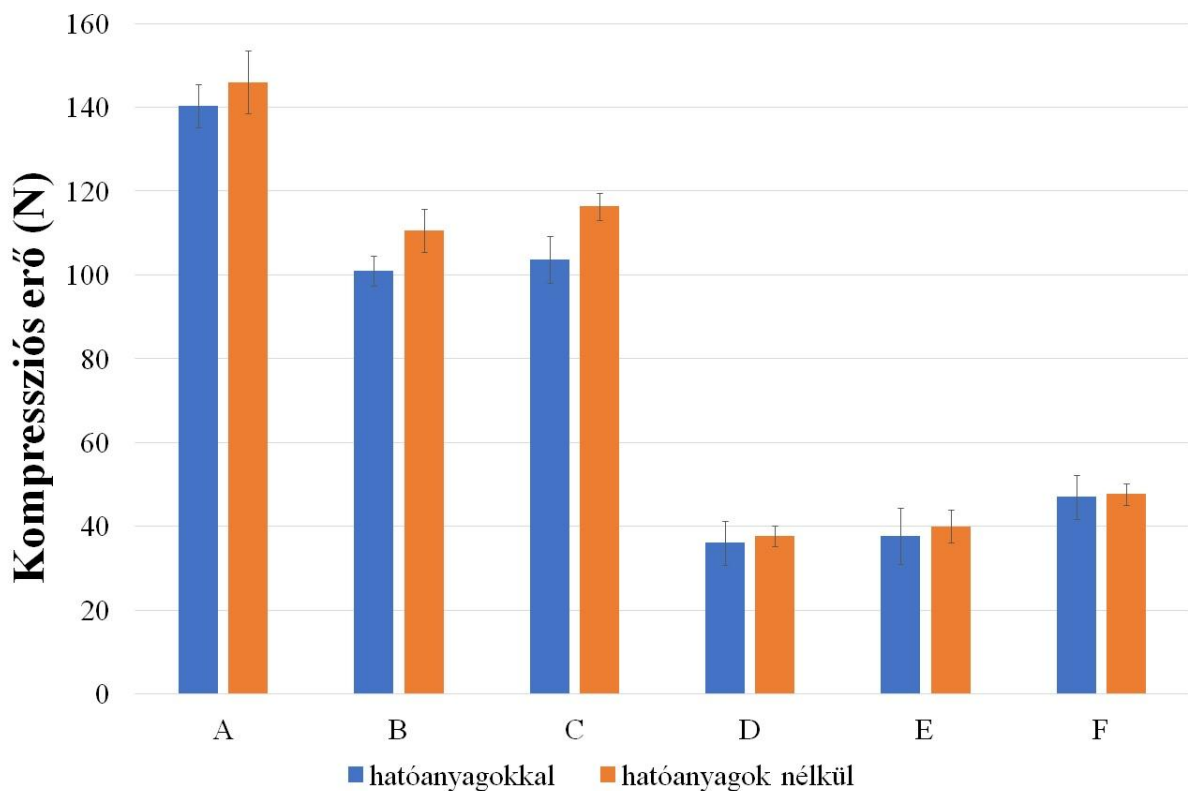
Összetétel	pH érték \pm SD		
	közvetlenül formulálás után	30 nap után	60 nap után
A	5,77 \pm 0.05	5,76 \pm 0.04	5,76 \pm 0.05
B	4,93 \pm 0.03	4,94 \pm 0.05	4,93 \pm 0.05
C	4,85 \pm 0.04	4,84 \pm 0.03	4,84 \pm 0.04
D	5,72 \pm 0.02	5,72 \pm 0.04	5,71 \pm 0.04
E	5,84 \pm 0.04	5,84 \pm 0.03	5,83 \pm 0.05
F	5,91 \pm 0.02	5,91 \pm 0.04	5,92 \pm 0.04

8. táblázat: A körömvirág tartalmú formulációk pH értékei közvetlenül formulálás után, valamint 30 és 60 nap elteltével, 21 °C-on történő tárolás esetén. Az értékek az átlagot \pm szórást (S.D.) prezentálják, n = 3.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy sikerült a formulálás és a terápiás hatás szempontjából megfelelő kémhatást elérni. A készítmények stabilitására utal, hogy a pH értékek 60 nap elteltével sem csökkentek vagy nőttek szignifikáns mértékben.

5.2.2. Textúra elemzés

A textúra vizsgálatát a hatóanyagot tartalmazó, illetve a hatóanyag nélküli (kontroll) készítmények esetében is elvégeztem, majd értékeltem az eredményeket. A meghatározásokat három párhuzamos méréssel, 24,5 \pm 0,5 ° C-on hajtottam végre. A 14. ábra Newton-ban (N) megadott nyomóerőt prezentálja összehasonlítva a kontroll mintákkal. A kontrollminták azonos összetételűek voltak diklofenák-nátrium, *C. officinalis* kivonat és metil-szalicilát nélkül.



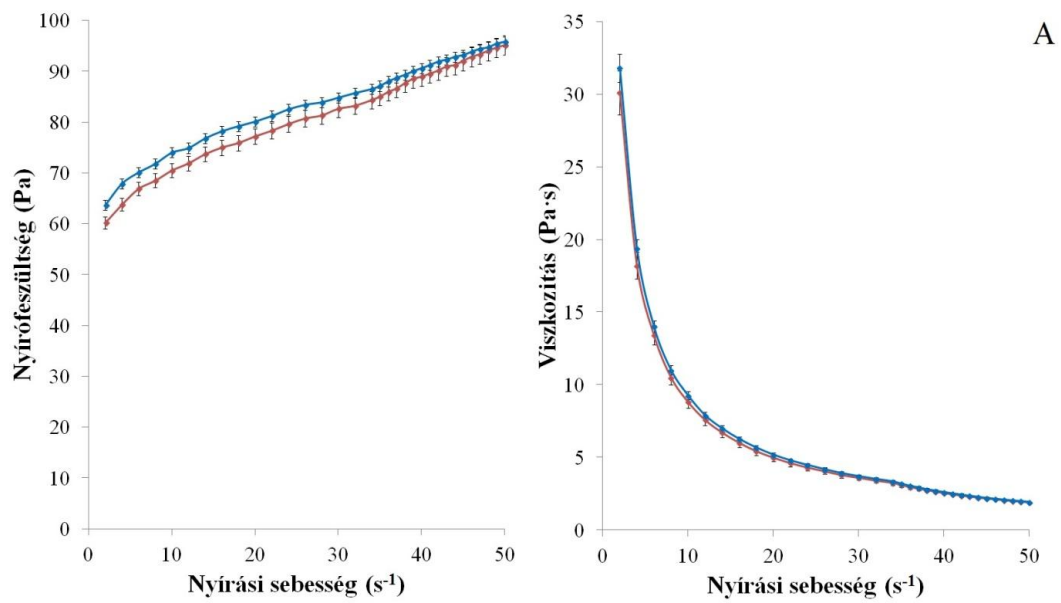
14. ábra: A *C. officinalis* tartalmú készítmények textúra-analízisének eredménye $24,5 \pm 0,5$ °C-on. A hatóanyagokat tartalmazó készítményeket kék oszlopokkal, a hatóanyag nélkülieket pedig narancssárga oszlopokkal ábrázoltuk. Minden adatpont az átlag \pm S.D., n = 3 értéket jelenti.

Méréseim szerint, és ahogy azt várni lehetett a különböző összetételekhez különböző nagyságú nyomóerőre volt szükség. A gélek (D-F) rezisztenciája szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a kenőcsöz és krémekhez (A-C) képest. A kompressziós teszt eredményei szerint a gélek lágyabb konzisztenciával rendelkeznek. A legnagyobb nyomóerő értéket a vazelint és lanolit tartalmazó (A) összetétel esetében mértük ($140,33 \pm 5,13$ N a hatóanyagot tartalmazó összetétel esetén és $146,00 \pm 7,54$ N a hatóanyag nélkülinél). Ez a nagyobb konzisztenciájú formuláció akadályozhatja a hatóanyagok felszabadulását, valamint a nehezebb felkenhetőség miatt ronthatja a beteg compliance-t is. Szignifikáns ($p < 0,05$) különbség nem volt kimutatható az o/v emulziós rendszerű krémek között (B és C formuláció), illetve a különböző gélképző anyaggal formulált készítmények (D és E, D és F, E és F) között sem. A hatóanyagok hozzáadása egyik esetben sem változtatta meg szignifikánsan a kompressziós erő értékét.

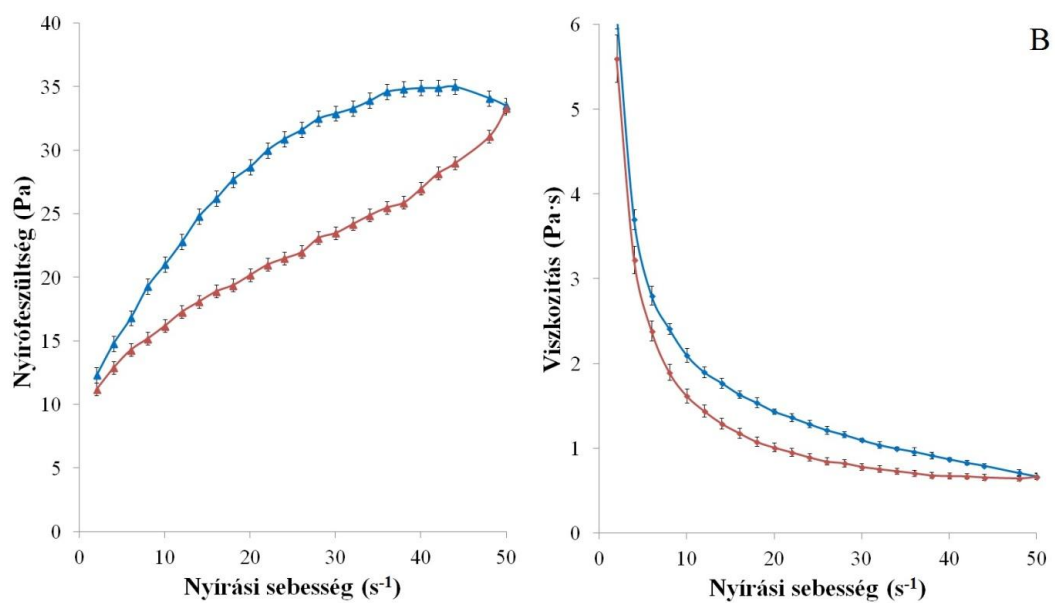
5.2.3. Reológiai jellemzés

A reológiai jellemzők meghatározását a félszilárd gyógyszerkészítmények alapvető fizikai tulajdonságainak értékelésére végeztem el. A vizsgálat során a külső fizikai körülmények hatására bekövetkező folyási és viszkozitásbeli változásokat detektáltam.

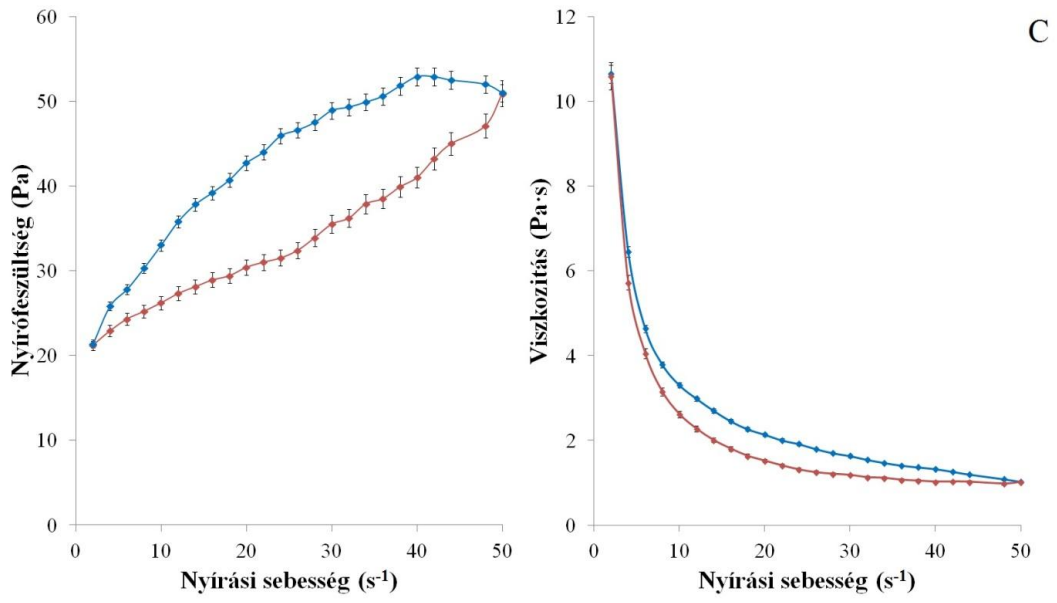
A 15. ábra a hatóanyagokat tartalmazó készítmény reológiai jellemzésének eredményeit mutatja be.



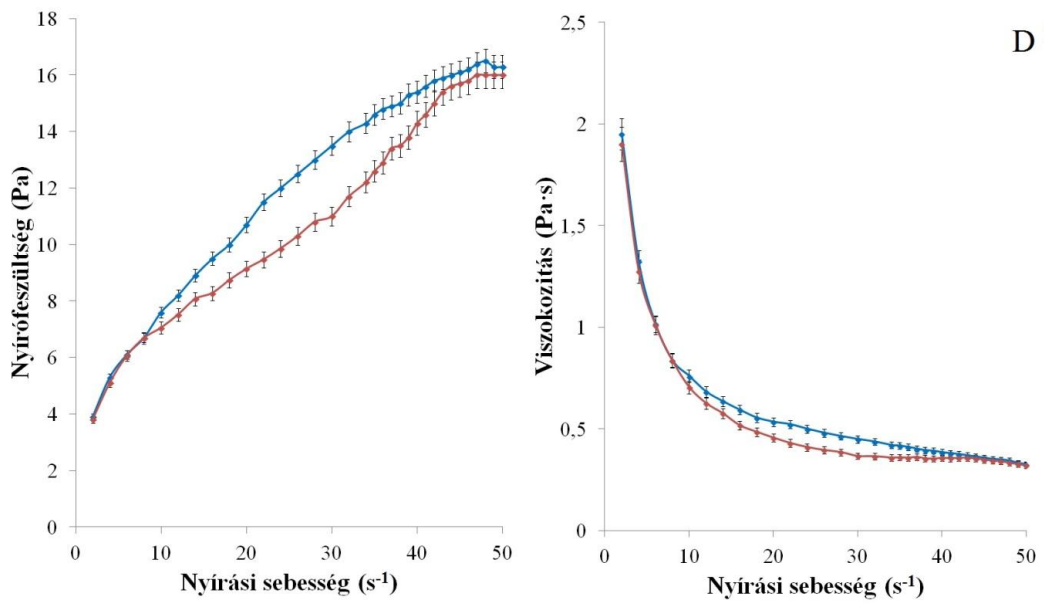
(a)



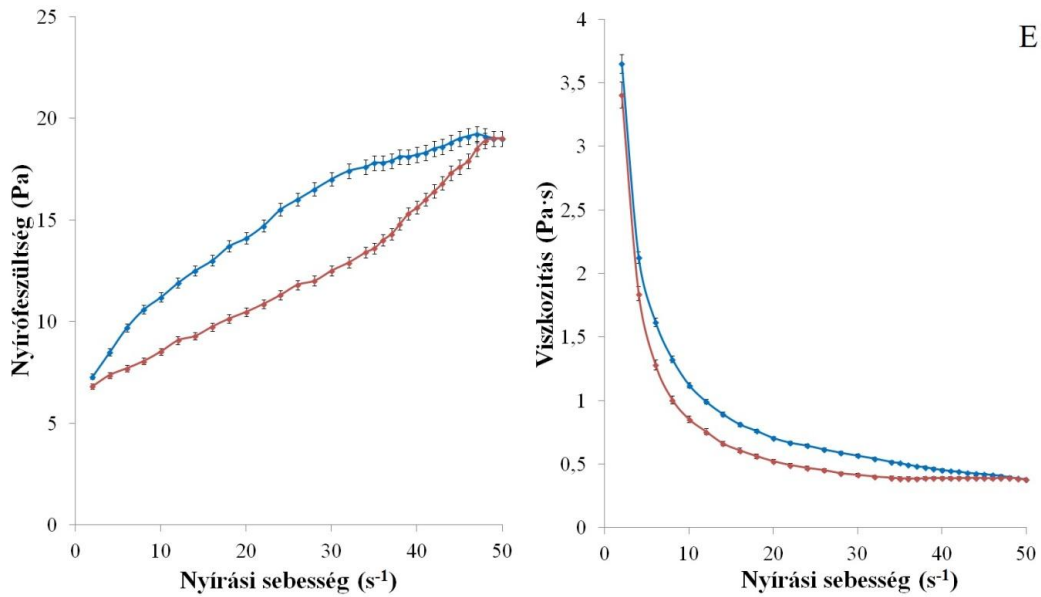
(b)



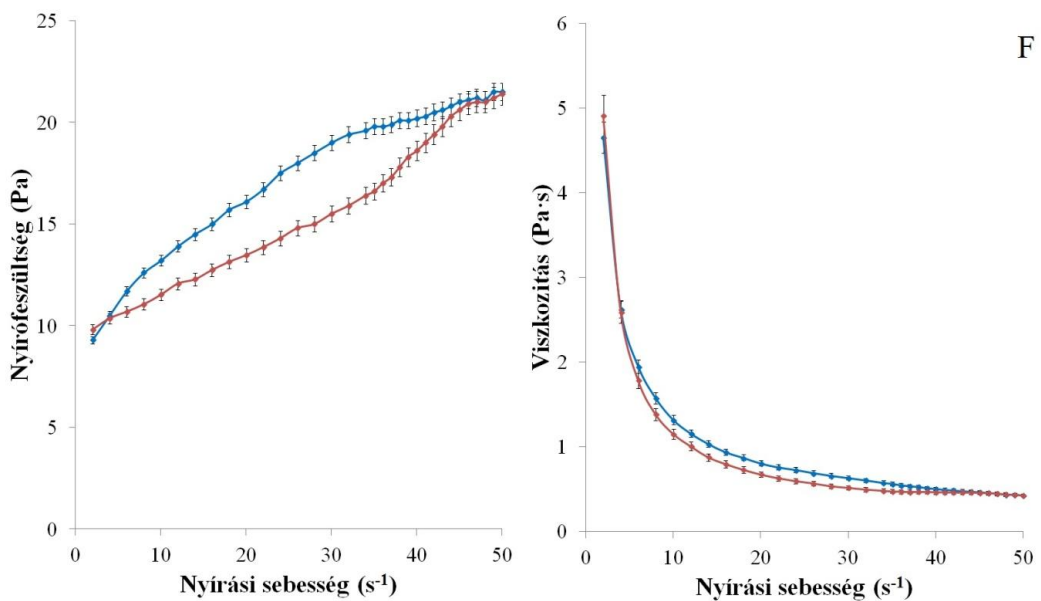
(c)



(d)



(e)



(f)

15. ábra. A kenőcs -, krém - és gélminták folyás-és viszkozitásgörbéi, a nyírófeszültség (Pa) (bal) és a viszkozitás (Pa·s) (jobb) a sebesség gradiens (nyírási sebesség) függvényében ábrázolva. Minden adatpont az átlag ± SD-t jelöli, n = 3, 24,5 °C-on vizsgálva, a nyírási sebességet először 2-ről 50 s⁻¹-re növelve (felfelé görbe, kékkel jelölve), majd 50-ről 2 s⁻¹-re csökkentve (lefelé görbe, pirossal jelölve) a lehetséges tixotrópia jelenségének detektálására.

A reológiai elemzés információkat nyújtott az általam formulált félszilárd gyógyszerkészítmények folyási tulajdonságairól, valamint a tixotrópia mértékéről a reogramok és a viszkozitás meghatározásával. Ahogy azt a vizsgálat eredményei is tükrözik,

az alkalmazott készítményalapok (szénhidrogéngél, o/v emulziós készítményalap vagy hidrogél) jellemző tulajdonságai hatással lehetnek a formulációk reológiai viselkedésére.

A kísérletek szerint a készítmények viszkozitása a mechanikai hatás (nyírási sebesség) nagyságától és idejétől függően változott. A folyásgörbét tekintve megállapítható, hogy a sebesség gradiens növelése minden esetben növekvő nyírófeszültséget eredményezett.

Az A összetétel (15/a ábra) kivételével minden készítmény esetében jelentős tixotróp és pszeudoplasztikus viselkedést észleltem. Ez azt jelentette, hogy a félszilárd szerkezet mechanikai hatás (nyírás) hatására megváltozott, és folyadékszerű rendszerré vált. Látható, hogy mindegyik készítmény szerkezeti viszkózus, azaz nyírásra vékonyodó anyag volt, mivel a viszkozitás a nyírási sebesség növekedésével minden esetben csökkent, a készítmények folyósabbá váltak.

Amint az 15/a ábrán látható, a vazelin és lanolin alapú összetétel rendelkezett a legmagasabb viszkozitással, ami a szénhidrogéngél típusú kenőcsalappal volt magyarázható. A felfelé (sebesség gradiens növelés) és lefelé (sebesség gradiens csökkentés) görbék ebben az esetben gyakorlatilag egybeestek, szignifikáns hiszterézis jelenség és tixotrópia nem volt kimutatható az adott kísérleti körülmények között, 24,5 °C-on vizsgálva. Ennek köszönhetően a nyíróerő eltávolítása után a vazelin és lanolin alapú összetétel gyorsabban vissza tudta nyerni eredeti szerkezetét. [127]

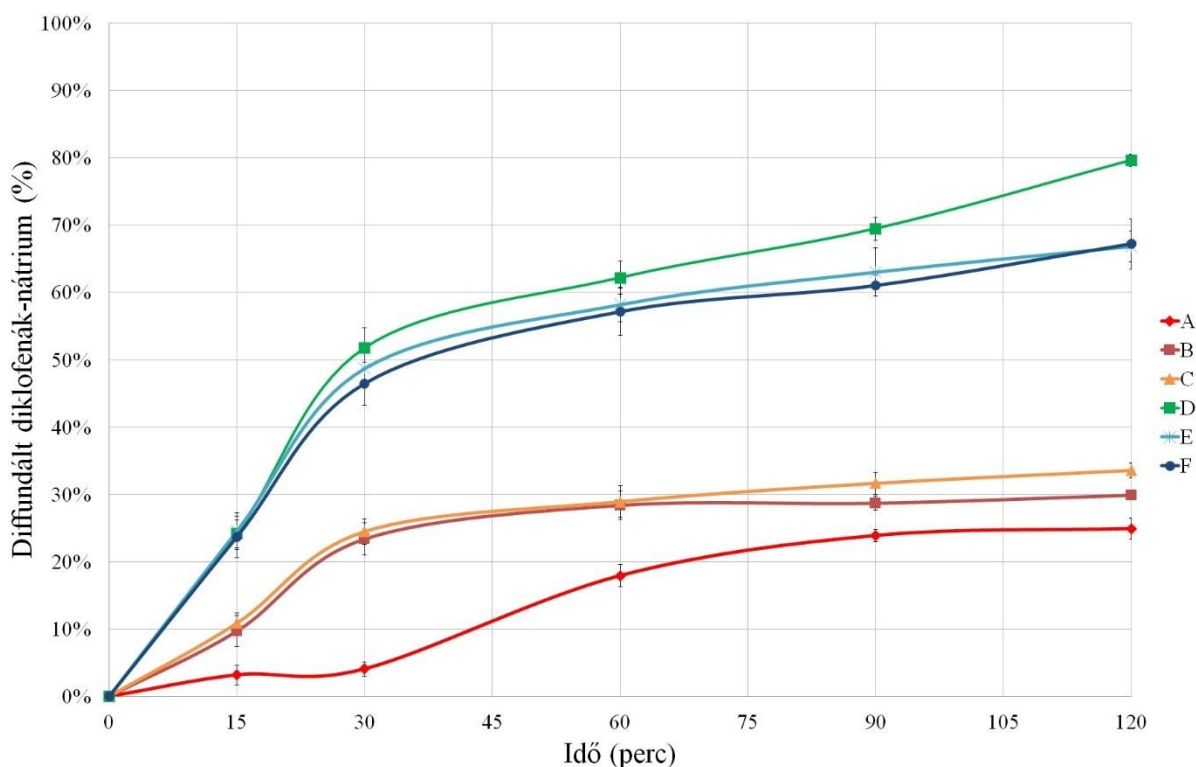
Amint az várható volt, a géleknél alacsonyabb viszkozitási értékeket figyeltem meg, mint a kenőcsöknél. A legalacsonyabb értéket a D-vel jelölt, Synthalen K gélképző anyaggal formulált gél esetében detektáltam (15/d ábra).

5.2.4. *In vitro* hatóanyag felszabadulás és diffúzió vizsgálata

A körömvirág tartalmú összetételek *in vitro* diffúziós profiljait Franz diffúziós módszerrel vizsgáltam. Meghatározásra került a diklofenák-nátrium, a metil-szalicilát és a kvercetin *in vitro* felszabadulási és diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. A kísérletek során hat, 30%-os etil-alkohollal töltött Franz cellát használtam melyekből 15, 30, 60, 90 és 120 perc múlva vettem mintát. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a hatóanyagok diffúziós profiljai az alkalmazott készítményalaptól és segédanyagaik típusaitól nagymértékben függenek.

5.2.4.1. A diklofenák-nátrium *in vitro* felszabadulása és diffúziós profilja

A 16. ábra a diklofenák-nátrium membránon áthatolt átlagos kumulatív százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében (perc).



16. ábra: A diklofenák-nátrium *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. Az adatpontok az átlagot \pm S.D.-t prezentálják (n = 6).

A kenőcsből (A), krémekből (B-C) és gélekből (D-F) származó hatóanyag-diffúziós profilokat összehasonlítva arra lehet következtetni, hogy a diklofenák-nátrium nagyobb mennyiségben volt jelen a receptor fázisban gélek esetén. A vizsgálat szerint a D-vel jelölt, Synthalen K gélképző polimert tartalmazó formuláció bizonyult a legmegfelelőbbnek. Ebben az esetben a diklofenák-nátrium kumulatív mennyisége 2 óra múlva $79,62 \pm 0,91\%$ -nak ($7,96 \pm 0,09$ mg) adódott. Az E és F összetételt tekintve a diklofenák-nátrium diffúziós profiljai nagyon hasonlóak voltak. A vizsgálat végén (120. perc) az összes diffundált diklofenák-nátrium mennyisége $66,86 \pm 2,31\%$ ($6,69 \pm 0,23$ mg) volt a Carbopol 974P-vel formulált készítmény (E) esetében, és $67,19 \pm 3,76\%$ ($6,72 \pm 0,38$ mg) a Pemulen TR-1 gélképző anyagot tartalmazó összetétel (F) esetében.

Kísérleteim szerint a kenőcs és a krémek is alacsonyabb diffúziós értékeket mutattak a gélekhez képest. Az Empicol LZ/N emulgeáló szert tartalmazó készítményből (B) a membránon átjutott diklofenák-nátrium kumulatív mennyisége $29,90 \pm 0,56\%$ ($2,99 \pm 0,05$ mg) volt, míg a cukorészter SP70 emulgenssel formulált összetételből (C) a hatóanyag $33,57 \pm 1,08\%$ -a ($3,36 \pm 0,11$ mg) jutott a receptor fázisba. A vazelin és lanolin alapú összetétel (A) esetében volt a legkisebb az átdiffundált diklofenák-nátrium mennyisége ($24,93 \pm 1,56\%$, $2,49 \pm 0,16$ mg) 2 óra elteltével.

A készítményekből történő diklofenák-nátrium felszabadulás kinetikájának értékelésére az *in vitro* diffúziós vizsgálatok során kapott eredményeket nulladrendű matematikai modellekkel elemeztem. A diklofenák-nátrium felszabadulásának sebességi állandóját (k) és a diffúziós együttható értékét (D) az egységnyi területen átdiffundált hatóanyag mennyiségéből, a kezdeti koncentrációból és a diffúziós időből határoztam meg. [121,122] A kiszámolt D és k értékeket a 9. táblázat tartalmazza.

Összetétel	A diklofenák-nátrium felszabadulási sebessége	Diffúziós koeficiens
	$k \cdot 10^2$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{óra}^{1/2}$) \pm S.D.	$D \cdot 10^5$ (cm^2/perc) \pm S.D.
A	$114,98 \pm 3,12$	$0,1302 \pm 0,032$
B	$128,07 \pm 4,41$	$0,1873 \pm 0,027$
C	$141,13 \pm 8,23$	$0,2361 \pm 0,031$
D	$324,44 \pm 6,34$	$1,3282 \pm 0,076$
E	$277,78 \pm 9,11$	$0,9365 \pm 0,056$
F	$276,27 \pm 10,35$	$0,9459 \pm 0,078$

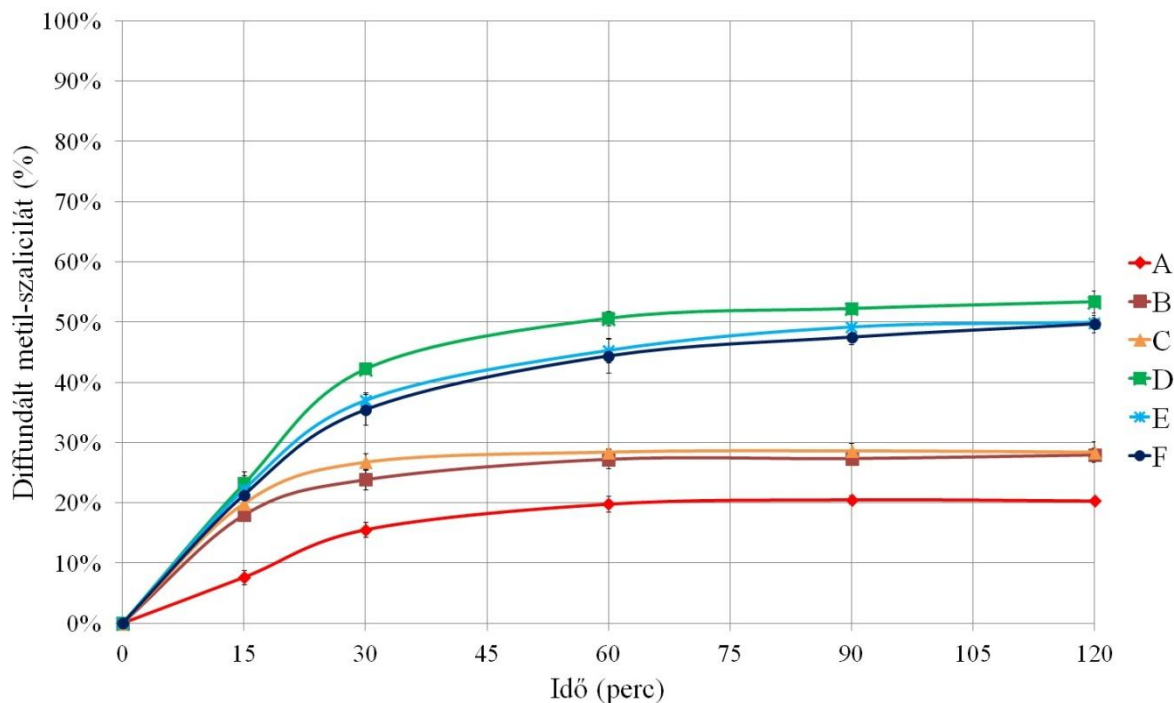
9. táblázat: A diklofenák-nátrium felszabadulási sebessége (k) és diffúziós együttható értékei (D) az A-F készítményekre vonatkoztatva. Minden érték az átlagot \pm S.D. jelenti, n=6.

Egyutas ANOVA és Tukey többszörös összehasonlító tesztjeit végeztem a készítmények diffúziós együttható értékeinek összehasonlítására, mely szerint az A és B, B és C, E és F formulációk diffúziós együttható értékei között nem volt szignifikáns különbség ($p < 0,05$). A többi esetben a különbség szignifikánsnak bizonyult.

A diklofenák-nátrium felszabadulási sebességét, valamint a diffúziós koefficiens értékét tekintve is megállapítható, hogy a D összetétel esetében kimagaslóan kedvezőbb a hatóanyag diffúziós profilja.

5.2.4.2. A metil-szalicilát *in vitro* felszabadulása és diffúziós profilja

Meghatározásra került a diffundált metil-szalicilát mennyisége is, melynek százalékos arányát az idő függvényében ábrázoltam (perc) a 17. ábrán.



17. ábra: A metil-szalicilát *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. Az adatpontok az átlagot \pm S.D-t jelölik (n = 6).

Az eredmények szerint a metil-szalicilát diffúziója szignifikánsan nagyobb volt a gélek esetében. A legmagasabb diffúziós érték a D összetételnél volt megfigyelhető, hasonlóan a diklofenák-nátrium diffúziójához. A metil-szalicilát teljes diffundált mennyisége $53,37 \pm 1,86\%$ volt a Synthalen K polimert tartalmazó gélkészítmény esetében, amelyet 2 óra diffúziós idő után mértünk. A Carbopol 974P (E összetétel) és a Pemulen TR-1 (F összetétel) polimerrel formulált gélek azonban képesek voltak megközelíteni ezt az értéket, mivel a diffundált hatóanyag maximális mennyisége ezek esetében $49,91 \pm 0,78\%$ -nak, illetve $49,72 \pm 1,48\%$ -nak adódott.

Ami a krémeket illeti, a B és C o/v emulziós összetételek esetében 30 perc elteltével nem nőtt szignifikánsan az átdiffundált gyógyszer mennyisége. A legkedvezőtlenebb membránon keresztül történő diffúziót a vazelint és lanolint tartalmazó készítménynél (A) detektáltam ($20,30 \pm 0,49\%$).

A metil-szalicilát felszabadulásának sebességi állandóját (k) és a diffúziós együttható értékét (D) a 10. táblázat tartalmazza.

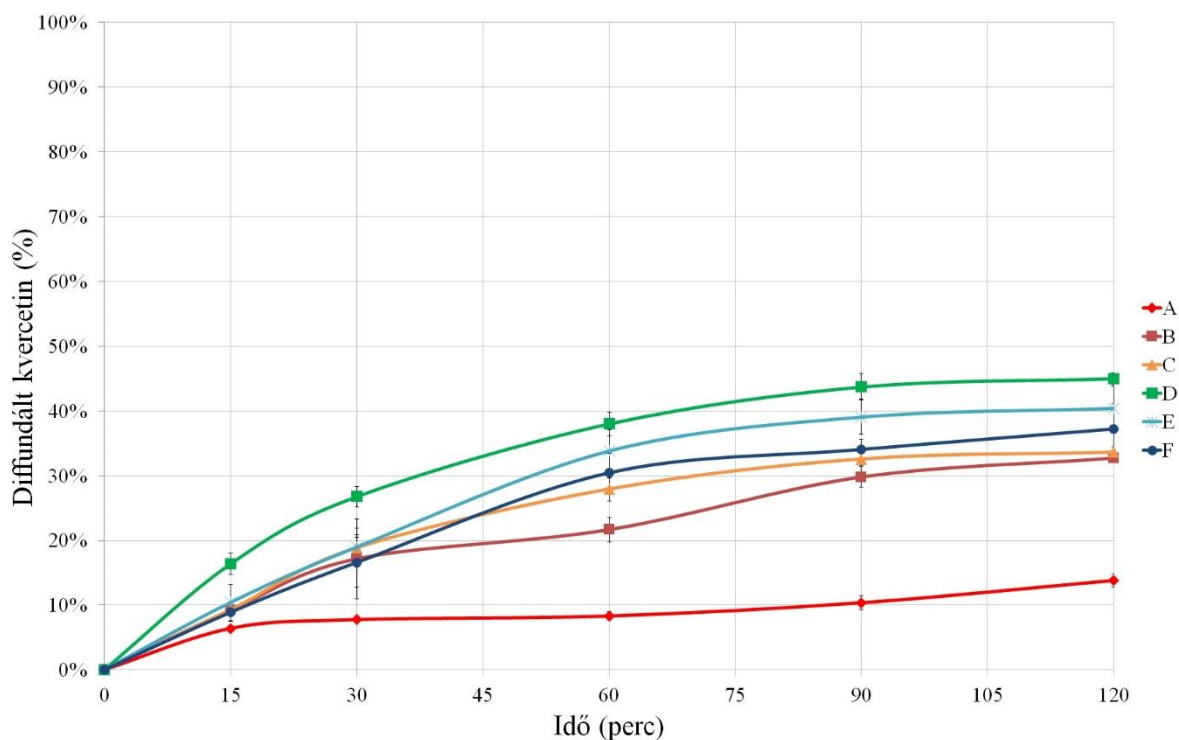
Összetétel	A metil-szalicilát felszabadulási sebessége	Diffúziós koefficiens
	k ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{óra}^{1/2}$) \pm S.D.	D $\cdot 10^5$ (cm^2/perc) \pm S.D.
A	1099,1 \pm 32,96	13,491 \pm 0,472
B	1360,8 \pm 40,82	25,626 \pm 0,897
C	1369,0 \pm 41,07	26,491 \pm 0,927
D	2781,7 \pm 82,45	93,255 \pm 3,062
E	2590,6 \pm 77,72	81,557 \pm 2,543
F	2562,1 \pm 76,86	80,919 \pm 2,832

10. táblázat: A metil-szalicilát felszabadulási sebessége (k) és diffúziós együttható értékei (D) az A-F készítményekre vonatkoztatva. Minden érték az átlagot \pm S.D. jelenti, n = 6.

A legmagasabb felszabadulási sebességet és diffúziós együtthatót a D összetétel esetében tapasztaltam. A készítmények diffúziós együttható értékeinek összehasonlítására egyutas ANOVA és Tukey többszörös összehasonlító tesztek kerültek elvégzésre, mely alapján a B és C, E és F formuláció diffúziós együtthatói között nem figyeltem meg szignifikáns különbséget. A többi esetben a felszabadulási sebességek és a diffúziós együtthatók között szignifikáns eltérések ($p < 0,05$) voltak detektálhatók.

5.2.4.3. A kvercetin *in vitro* felszabadulása és diffúziós profilja

A 18. ábra a membránon keresztül áthatolt kvercetin kumulatív mennyiségét (%) mutatja a különböző készítményekből az idő (perc) függvényében. A különböző összetételű készítmények 100 grammja 5 gramm liofilizált *C. officinalis*-t tartalmazott, ami az analitikai vizsgálatok alapján $133,75 \pm 2,8$ mg kvercetinnek felel meg. [91,93] A diffúziós cellákra felvitt mennyiség az összetételekből 1-1 gramm volt, ami a fentiek szerint $1,33 \pm 0,03$ mg kvercetinnek ekvivalens.



18. ábra: A kvercetin *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. Az adatpontok az átlagot \pm S.D-t jelölik (n = 6).

Eredményeink azt mutatták, hogy a kvercetin diffúziója jobb volt a gélkészítményeknél, azonban a gélek és krémek közötti különbség nem volt akkora, mint a diklofenák-nátrium diffúziós vizsgálatban. A B ($32,72 \pm 0,69\%$) és a C összetétel ($33,60 \pm 0,90\%$) megközelítette a gélek diffúziós profilját. Az eredmények szerint az emulziós típusú krémekből származó kvercetin felszabadulás szignifikánsan magasabb volt, mint a vazelin és a lanolin alapú formuláció esetében ($13,82 \pm 1,06\%$).

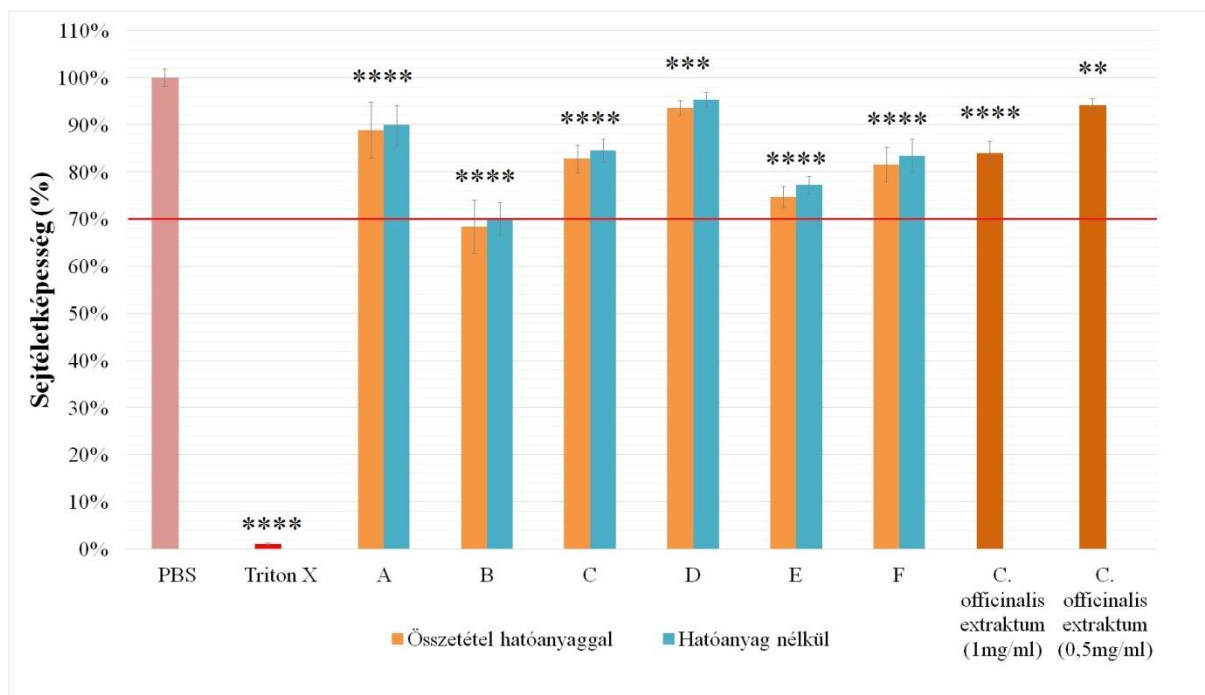
A diffúziós vizsgálatok eredményei szempontjából a legmegfelelőbb összetétellel a D készítmény rendelkezett, amely a hatóanyagokat Synthalen K segítségével elkészített gélmátrixban tartalmazta. Ebben az esetben a diffundált kvercetin kumulatív mennyisége $45,01 \pm 0,91\%$ volt ($12,04 \pm 2,24$ mg), az E összetételnél $40,42 \pm 3,40\%$, az F esetben pedig $37,25 \pm 3,83\%$ volt 2 órás diffúziós idő után.

A kvercetin felszabadulása a különböző készítményekből 2 óra elteltével a következő csökkenő sorrend alapján rendezhető: $D > E > F > C > B > A$

5.2.5. A *Calendula officinalis* tartalmú készítmények sejtelképességre gyakorolt hatása

A 2- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -3,5-difenil-2H-tetrazolium-bromid (MTT) citotoxicitási vizsgálatok humán keratinocita sejtvonalon (HaCaT sejtvonal) kerültek elvégzésre. A vizsgálathoz szükséges mintákat Franz-diffúziós berendezés használatával nyertem, PBS-t használva receptor fázisként. Az azonos összetételű, de hatóanyagok nélküli készítményeket szintén teszteltem. A PBS-ben oldott *C. officinalis* kivonat citotoxicitását 1,0 mg/ml és 0,5 mg/ml koncentrációban vizsgáltam.

A citotoxicitás vizsgálatának eredményeit a 19. ábra hivatott prezentálni. Az eredmények szerint a hatóanyagokat tartalmazó és a hatóanyagok nélkül formulált kontroll összetételek sejtelképességre gyakorolt hatása között szignifikáns különbség nem volt tapasztalható.



19. ábra: Sejtelképességi vizsgálat (MTT teszt) az A-F összetételekkel és PBS-ben oldott 1 mg/ml, illetve 0,5 mg/ml koncentrációjú *C. officinalis* kivonattal kezelt HaCaT sejteken. A sejtek életképessége a PBS-sel kezelt negatív kontroll (PBS) százalékában került kiszámításra. A pozitív kontroll Triton X 100 (10% w / v) volt. ANOVA statisztikai elemzést, valamint Dunnett többszörös összehasonlító teszt került elvégzésre a különböző készítmények és kivonatok PBS-sel való statisztikai összehasonlítására. **, *** és **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jeleznek $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ értékeken.

Az A összetétel mutatta a legmagasabb sejtelképességi értéket ($88,92 \pm 5,97\%$), míg a B formulációval történő kezelés a sejtek életképességének legnagyobb mértékű csökkenését

eredményezte. Ebben az esetben az életképesség csak $68,43 \pm 5,62\%$ -nak adódott, amit valószínűleg az Empicol LZ/N anionos emulgens jelenléte eredményezett. A cukorészter SP70 nemionos emulgenssel formulált összetétellel történő kezelés $82,79 \pm 2,95\%$ -os sejtelétképességet eredményezett, tehát a C formuláció sem tekinthető citotoxikusnak.

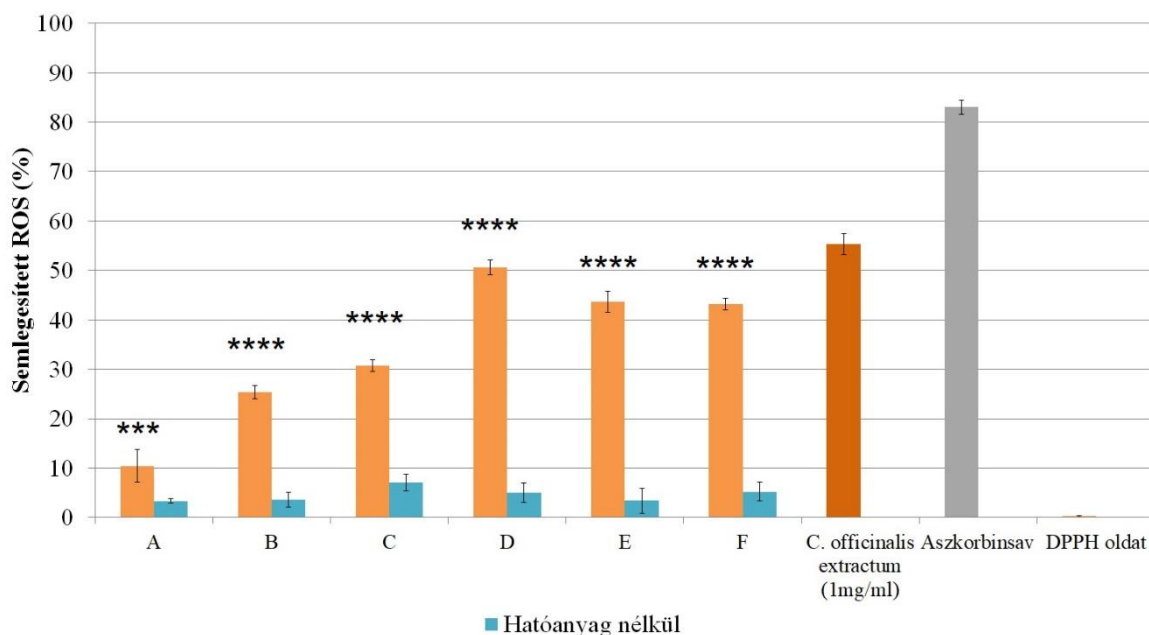
A készítmények közül a Synthalen K-val formulált gél (D) bizonyult a legkevésbé toxikusnak, ezzel az összetétellel kezelt sejtek életképessége $93,61 \pm 1,49\%$ -ot eredményezett, tehát jól tolerálható gélnek bizonyult. A géleket tekintve a Carbopol 974P polimer tartalmú (E) készítménnyel történő kezelés mutatta a legkisebb sejtelétképességet ($74,73 \pm 2,23\%$).

A meghatározott koncentrációjú *C. officinalis* kivonatokkal történő kezelések nem fejtettek ki toxikus hatást a keratinocita sejtekre.

5.2.6. A *Calendula officinalis* tartalmú gyógyszerkészítmények antioxidáns hatása

A 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) módszert alkalmaztam az egyes összetételek szabadgyökfogó kapacitásának tesztelésére és az antioxidáns aktivitás értékelésére. [107] Az antioxidáns kapacitással korreláló színváltozás (sötét ibolyától világossárgáig) mérését 517 nm-en, Shimadzu UV-VIS spektrofotométerrel végeztem.

A DPPH vizsgálat szerint a *C. officinalis* kivonat szabadgyökfogó aktivitása $65,34 \pm 2,10\%$ -nak bizonyult (20. ábra). A gyökfogó aktivitás (a gátolt reaktív oxigén gyök (ROS)% -a) meghatározását valamennyi készítmény esetében elvégeztem hatóanyagokkal, illetve hatóanyagok nélkül. Szignifikáns különbségeket észleltünk minden esetben a hatóanyagokat tartalmazó és a hatóanyagok nélküli formulációk között. Összességében megállapítható, hogy a *C. officinalis* kivonatot tartalmazó készítmények antioxidáns aktivitása lényegesen magasabb volt, mint ugyanazon készítmények aktivitása, de a kivonat nélkül. A hatóanyag nélküli készítmények nem mutattak jelentős gyökfogó aktivitást ($3,35-7,06\%$ közötti értékeket detektáltam), tehát nem befolyásolták szignifikáns mértékben az antioxidáns vizsgálat eredményeit.



20. ábra: *In vitro* szabadgyök semlegesítő aktivitás hatóanyagokkal vagy anélkül, valamint a *C. officinalis* kivonat antioxidáns aktivitása (15 mg/ml). Pozitív kontrollként abszolút etanolban oldott aszkorbinsavat (0,25 mg / ml), negatív kontrollként abszolút etanollal hígított DPPH-oldatot (0,06 mmol) használva. Egyirányú ANOVA és Tukey többszörös összehasonlító tesztek kerültek elvégzésre a hatóanyagokat tartalmazó vagy anélküli formulációk összehasonlítására. A szignifikáns különbségek jelölése csillagokkal történt (***) $p < 0,001$ és **** $p < 0,0001$).

Eredményeim szerint a B és C összetétel gyökfogó aktivitása között nem volt szignifikáns különbség, 25,35%-os, illetve 30,73%-os gyökfogó aktivitást detektáltam. Ez valószínűleg annak tudható be, hogy a készítményalap ebben a két esetben nagyon hasonló, o/v típusú emulziós rendszerű készítmények, melyekből a hatóanyagok felszabadulása nagyobb mértékű, összehasonlítva a szénhidrogén-gél alapú készítménnyel (A). A DPPH vizsgálat szerint az E és F gélek antioxidáns aktivitása szintén nagyon hasonló volt, azonban a kenőccsel és a krémekkel összehasonlítva magasabbnak bizonyultak. A készítmények közül csak a D összetétel érte el az 50%-os szabadgyök semlegesítő aktivitást, így ez tekinthető a leghatékonyabb készítménynek. A legkisebb aktivitást az A jelölésű formuláció esetében mértük, ami a hatóanyag felszabadulása szempontjából kedvezőtlen kenőcsalapnak (vazelin és lanolin) bizonyult.

5.2.7. A terápiás hatás vizsgálata – humán klinikai vizsgálat

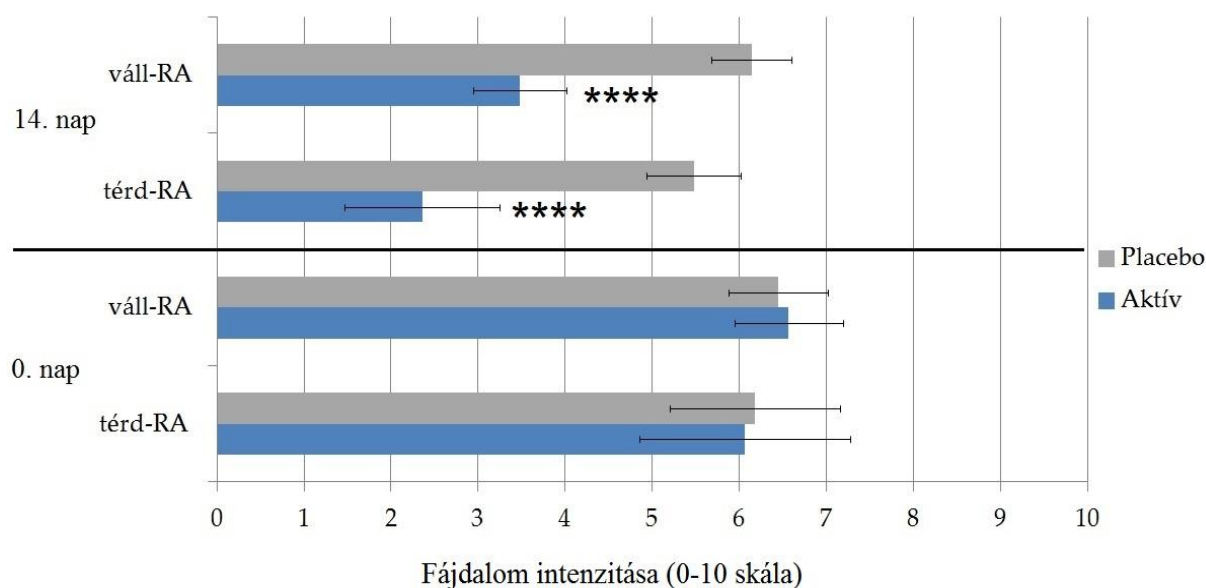
5.2.7.1. A fájdalom mértékének meghatározása

A kiválasztott összetétel gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásának vizsgálata randomizált, placebo-kontroll tanulmányon alapult. Összesen 50 beteget választottunk ki, akik teljesítették a kritériumokat és beleegyeztek a klinikai vizsgálatba. Ezen betegek közül 34 nő (68%) és 16 (32%) férfi volt. A nők átlagos életkora 56,11 (\pm 7,81) év volt, a férfiaké 52,7 (\pm 8,66) év. A vizsgálatba bevont egyének között 36 betegnél diagnosztizálták a térd reumatoid artritizét (térd-RA), és 14 betegnél a váll reumás ízületi gyulladását (váll-RA).

A terápiás aktivitás értékeléséhez a preformulációs és a gyógyszerforma vizsgálatok eredményei alapján a Synthalen K gélképző polimerrel formulált összetételt választottuk. Minden kezeléshez öt gramm készítményt (D összetétel, hatóanyagokkal vagy hatóanyagok nélkül) használtunk fel.

A vizsgálat célja a hatóanyagokat tartalmazó helyi kezelés hatásának összehasonlítása volt a kontrollcsoport placebo kezelésével. Eredményeink szerint, a vizuális analóg skála (VAS) alapján szignifikánsan csökkent a fájdalom a kezelés első és 14. napja között (21. ábra). Azoknál a betegeknél, akiknek a térdét érintette a reumás megbetegedés, az átlagos érték a kiinduláskor $6,06 \pm 1,21$ volt az aktív csoportban és $6,18$ a placebo csoportban. A kezelés 14. napján a vizsgálati csoport esetében $2,36 \pm 0,89$ -re csökkent, míg a placebo csoportnál $5,48 \pm 0,54$ -re változott a VAS skálán megjelölt érték. E két adat közötti különbség a statisztikai analízis alapján szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,0001$), a kiindulási értéktől a 14. napig tartó százalékos változás 61,1%-nak adódott a vizsgálati (aktív) csoportot tekintve.

A vállat érintő reumatoid arthritis esetén a fájdalom csökkenése a kiindulási értékhez viszonyítva 47% volt az aktív csoportban. A kísérleti és a placebo csoport közötti különbség a 14. napon szintén statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,0001$).



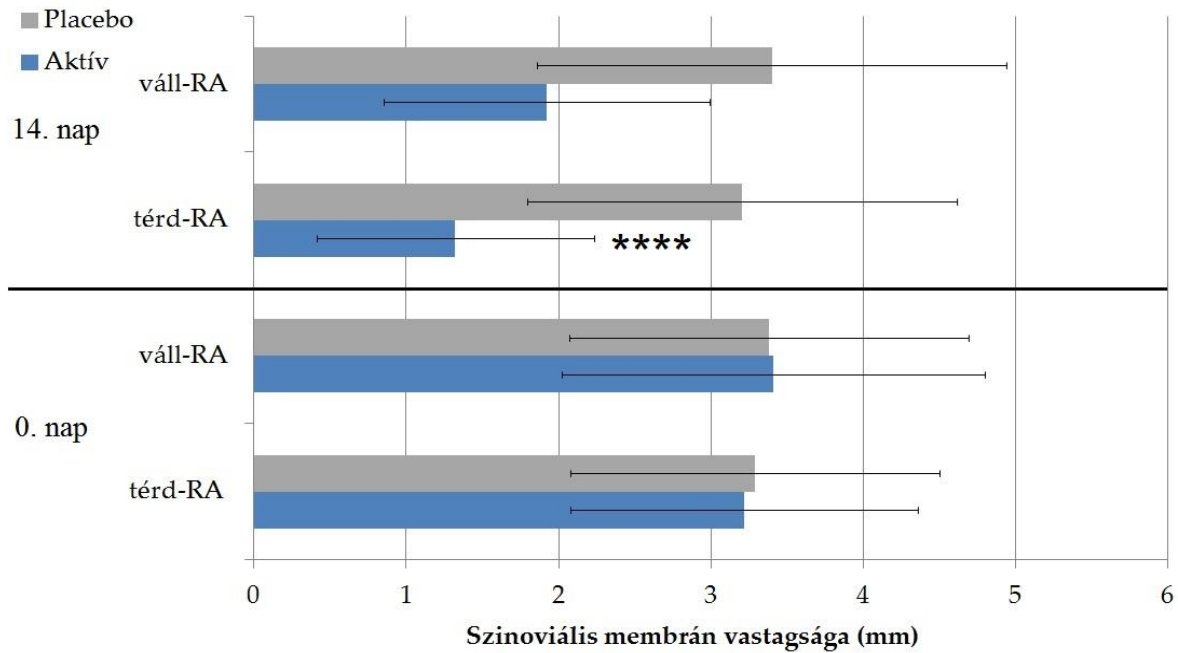
21. ábra: A fájdalom mértékének alakulása (VAS skála pontszámok alapján értékelve). A VAS skálán a betegek a fájdalom intenzitását bárhová el tudták helyezni egy 10 cm hosszú szakaszon, végpontokon a „nincs fájdalom” (a 0. szinten) és az „elviselhetetlen fájdalom” (a 10. szinten) leírókkal. T-próba került elvégzésre az aktív és a placebo csoportok összehasonlítására. A szignifikanciát csillagok jelölik ($p < 0,0001$). Az aktív csoport kezelése a hatóanyagokat is tartalmazó D összetétellel történt, míg a placebo csoporté ugyanazzal a formulációval hatóanyagok nélkül.

5.2.7.2. A szinoviális membrán vastagságának mérése

Ízületi gyulladásban szenvedő betegeknél a gyulladás miatt a szinoviális membrán megvastagodása fordulhat elő. [128] A fiziológiás szinoviális membrán legfeljebb 1,8 mm vastag, ennél nagyobb érték szinoviális hipertrófiát jelez. [129]

A vizsgálat során ultrahang segítségével értékeltük a terápia hatékonyságát; a szinoviális membrán vastagságát ultrahanggal mértük az aktív és a placebo csoportban. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a membrán vastagsága szignifikáns mértékben csökkent a térdet érintő ízületi gyulladással kezelt betegeknél az aktív csoportban ($3,22 \pm 1,14$ -ről $1,32 \pm 0,91$ -re), míg a vállat érintő reumatoid artritiszben szenvedő betegeknél a kezdeti szinoviális vastagság $3,41 \pm 1,39$ -ről $1,92 \pm 1,07$ -re csökkent a 14. nap végére (22. ábra). Az aktív és a placebo csoport közötti különbség a 14. napon szintén szignifikáns volt a térd-RA esetében ($p < 0,0001$). A placebo csoportok szinoviális membránvastagsága a vizsgálat során nem változott jelentősen. A mérés szerint az alkalmazott lokális terápia

hatékonyabbnak bizonyult a térd-RA esetén, mivel a szinoviális vastagság csökkenése az aktív csoportban 59%-os volt, szemben a vállat érintő megbetegedéssel kezelték esetében, ahol a csökkenés 44% volt a hatóanyagokkal formulált D jelölésű készítménnyel történő kezelést tekintve.



22. ábra: A szinoviális membrán vastagságának ultrahangos vizsgálata (mm). T-próba került elvégzésre az aktív és a placebo csoportok összehasonlítására. A szignifikáns különbséget csillagokkal jelöltük ($p < 0,0001$). Az aktív csoport kezelése a hatóanyagokat is tartalmazó D összetétellel történt, míg a placebo csoporté ugyanazzal a hatóanyagok nélküli formulációval.

6. Megbeszélés

6.1. A *Spirulina platensis* tartalmú készítmények vizsgálati eredményeink megbeszélése

A természetes eredetű hatóanyagokat tartalmazó készítmények formulálása esetén kiemelkedő figyelmet kell fordítanunk a megfelelő gyógyszerforma kialakítására, különös tekintettel a segédanyagok kiválasztására, melyek használata segítheti az aktív komponensek biohasznosulását.

Első kísérletsorozatunkban a különböző felületaktív anyagokat tartalmazó, liofilizált *S. platensis* alga felhasználásával formulált készítmények konzisztenciáját, diffúziós profilját és biokompatibilitását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze, majd feltérképeztük a kiválasztott összetételek antibakteriális hatását. A formulálás során az általunk liofilizált *S. platensis* algát szuszpenziós állapotban tartalmazó összetételek mellett a Transcutol HP segítségével a port oldott formában tartalmazó krémek formulálása is megvalósult. Ez kiemelkedően fontos volt számunkra, ugyanis a szakirodalom szerint a hatóanyag oldott állapotban történő alkalmazása nagymértékben elősegítheti annak biohasznosulását. [63] Az egyes összetételek alapanyagai azonosak voltak, egyedül az emulgens típusa különbözött. A krémek formulálásához nemionos felületaktív anyagokat, Poliszorbát 60-at, Cremophor A6 és A25 egy-egy arányú keverékét, SP70 cukorésztert és Tefose 63-mat választottunk azok bőrre gyakorolt kíméletesebb hatása végett.

A textúra analízis és az *in vitro* diffúziós vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy azok a készítmények, amelyek penetráció fokozóként TC-t tartalmaztak kombinálva SP70 cukor-észterrel vagy Tefose 63 emulgeálószerrel, lágyabb konzisztenciát és ebből kifolyólag kedvezőbb hatóanyagleadást és membránon keresztüli diffúziót mutattak. A TC kiváló szolubilizálószernek bizonyult, segítségével sikerült az SPP-t oldott állapotban inkorporálni a krémekbe, amely befolyásolhatja a hatóanyagok bőrbe jutását és biohasznosulását. Előnye továbbá, hogy nem toxikus és biokompatibilis a bőrrel a szakirodalom szerint. [121,122,130]

A felületaktív anyagok szintén módosíthatják a hatóanyagok oldékonyságát és permeabilitását egyaránt. [131–133] Az *in vitro* diffúziós vizsgálataink rávilágítottak, hogy az egyes felületaktív anyagok különböző mértékben befolyásolták a fikocianin felszabadulását és diffúzióját a gyógyszerhordozó rendszerből. Vizsgálatunkban a TFS és a SP70 típusú nemionos felületaktív anyagot TC-vel együtt tartalmazó készítmények optimális

konzisztenciával rendelkeztek, illetve szignifikáns mértékben fokozták a hatóanyag oldékonyságát és kedvező diffúziós profilt eredményeztek. Az SP70 cukorészterre a szakirodalomban leírtak alapján esett a választásunk a formulálás során. A cukorésztereket természetes és biológiailag lebomló nemionos segédanyagok, jól ismert emulgeáló, szolubilizáló és penetrációt fokozó tulajdonságokkal. Emellett javíthatják a hatóanyag felszabadulását, eloszlását és biohasznosulását. [81,82,134,135] A Tefose 63 szintén nemionos felületaktív anyag, három komponens fizikai keveréke: PEG-6-palmitosztearát, etilén-glikol-palmitosztearát és PEG-32-palmitosztearát. Kellemes állagot ad a krémeknek, emellett kiváló szolubilizáló tulajdonságokkal is rendelkezik. [84,136]

Az *in vitro* citotoxicitási vizsgálatok elengedhetetlenek a gyógyszerkészítmények biztonsági profiljának meghatározásához. Kutatómunkám során HaCaT sejtvonalon MTT tesztet végezve térképeztem fel a különböző összetételek sejtéletképességre gyakorolt hatását. A HaCaT sejtek a humán keratinociták széles körben alkalmazott *in vitro* modelljei, melyet a keratinociták működésének tanulmányozására és a bőrfelületen alkalmazható készítmények, valamint segédanyagok biokompatibilitásának vizsgálatára széleskörűen alkalmaznak. A keratinocitákkal végzett vizsgálatok eredményei előrevetíthetik az *in vivo* eredményeket. [87,137,138]

A citotoxicitási vizsgálat eredményei alapján az SP70 és TFS felületaktív anyagokat tartalmazó összetételek sejtéletképességre gyakorolt hatása kedvezőbb volt, mint a P60 és CR tenzideket tartalmazó készítményeké. A HaCaT sejteken végzett *in vitro* citotoxicitási tesztek szerint az SP70 tartalmú készítmények kevésbé voltak toxikusak, a sejtek életképessége a IV-es készítmény esetében $87,24\% \pm 1,0\%$ -nak, míg a TC-t is tartalmazó VIII-as összetétel esetében $83,15\% \pm 0,82\%$ -nak bizonyult.

A helyi antibiotikum-kezelés általában az első választás az acne vulgaris kezelésében. A növekvő bakteriális rezisztencia azonban a helyi antibiotikumok monoterápiaként történő alkalmazása elleni ajánlásokhoz vezet, és más helyi szerekekkel kombinált terápiát kíván meg. [139–141] Az acne vulgarisban főként a *C. acnes* és a *S. aureus* baktériumok felelősek a bőrgyulladásért. [38] Fanelli és munkatársai arról számoltak be, hogy az acnéban szenvedő betegek 43%-ánál történt *C. acnes* kolonizáció [39], továbbá a bőrelváltozásokban a *S. aureus* száma is növekszik, ami extracelluláris toxinok és enzimek felszabadításával gyulladós bőrbetegséget okozhat pustulákkal. [38]

A *C. acnes* lokális gyulladást válthat ki azáltal, hogy kemotaktikus faktorokat termel, és az odavonzott neutrofilek gyulladós mediátorokat, például ROS-t szabadítanak fel a dermiszben. A ROS semlegesítése jelentősen csökkentheti az acne során fellépő gyulladással

járó sejtkárosodást [142], ezért az antimikrobiális hatás mellett antioxidáns hatással is rendelkező készítmények hatékonyabbak lehetnek az acne vulgaris terápiájában. [38]

A SOD enzim aktivitásának meghatározására irányuló antioxidáns vizsgálataink során a SPP tartalmú krémekkel történő kezelés előtt vagy után UV sugárzásnak tettünk ki HaCaT sejteket. Az UV-sugárzás oxidatív stresszhez vezethet a bőr felsőbb rétegeiben, és számos jelátviteli útvonalat aktiválhat, hatására a keratinocitákban fokozódik a ROS képződés. [143,144] A *S. platensis*-ben nagymennyiségben megtalálható SOD, az egyik fő antioxidáns enzim, semlegesíti az oxidatív stressz során keletkező szabad gyököket, így megelőzve a sejtkárosodást. [145,146]

A HaCaT sejtvonalon végzett *in vitro* antioxidáns teszt szerint a TC-ben oldott *S. platensis* TFS és SP70 felületaktív anyaggal (VII, VIII) kombinálva fokozottabb mértékű SOD aktivitást eredményezett a szuszpenziós összetételekkel összehasonlítva (III és IV). Eredményeink azt mutatták, hogy az előkezelés hatékonysága szignifikánsan nagyobb mértékű volt az oldott SPP-t tartalmazó formulációk esetében, míg a szuszpenziós gyógyszerformáknál nem tapasztaltunk eltérést az elő- és utókezelések hatékonysága között. A kísérlet segítségével sikerült igazolnunk, hogy a hatóanyag oldott formában történő inkorporálása az adott készítménybe növelheti annak penetrációs készségét és ez által a hatékonyságát. Mindezek mellett a felületaktív anyag típusa is befolyásolta a készítmények antioxidáns hatását. Az SP70 cukorészter emulgenst tartalmazó VIII-as összetételű premedikáció mutatta a legnagyobb SOD aktivitásnövekedést.

Gunes és munkatársai leírták, hogy az 1,125% *S. platensis* kivonatot tartalmazó krém sebgyógyító és antioxidáns hatással bír a keratinocitákra. [147] A *S. platensis* antioxidáns hatása elsősorban fikocianin- és SOD enzimtartalmának köszönhető, amelyek egyaránt képesek megkötni a szabadgyököket. [148,149] Éppen ezért a legújabb trendek azt sugallják, hogy a mikroalgák értékes hatóanyagaik (például antioxidánsok és pigmentek) révén jelentős szerepet tölthetnek be a kozmetikai iparban. [35,147]

Az acne terápiája során elengedhetetlen a *C. acnes* túlszaporodásának megakadályozása. [150] Az antibiotikumok széleskörű és hosszú távú alkalmazása az acne kezelésében azonban - mint azt fent említettem - rezisztens *C. acnes* törzsek elterjedését eredményezi, ezért a bőrgyógyászat területén egyre nagyobb figyelmet kapnak az antimikrobiális hatású természetes vegyületek. [151] El-sheekh és munkatársai megállapították, hogy a *S. platensis* antibakteriális hatással bír a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szemben [60]. Moon és kutatócsoportja szerint a *S. platensis* vizes kivonata $1,5 \pm 0,1$ mg/ml MIC-értéket mutat *C. acnes* ellen [152], míg Mala és munkatársai

leírták, hogy a *S. platensis* acetonos kivonata mérsékelt antimikrobiális hatást mutat a *S. aureus* ellen. [153]

Az antibakteriális hatás vizsgálata során készítményeinket *S. aureus* és *C. acnes* baktériumokon is teszteltük. A *S. platensis* pontos hatásmechanizmusa nem ismert, de egyes feltételezések szerint a *S. platensis* antimikrobiális aktivitása zsírsav-komponenseinek és poliszacharid-tartalmának szinergikus hatásával hozható összefüggésbe. [18] Továbbá azt is leírták, hogy az algában található zsírsavak képesek elpusztítani a mikroorganizmusokat azok sejtmembránjának bontása révén. [41,152,154]

C. acnes ellen a klindamicin és az eritromicin a leggyakrabban választott antibiotikum [155,156], ezért kutatómunkám során az eritromicint tartalmazó Aknemycin krémet alkalmaztuk standardként az antibakteriális tesztekben. Az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársaival együttműködve végzett vizsgálataink szerint a formulált krémek csökkentették a *C. acnes* és a *S. aureus* életképességét a kontrollcsoportokhoz képest. A SP70 cukorészter felületaktív anyagot tartalmazó összetételek nagyobb mértékben csökkentették a baktériumok életképességét, mint a TFS tenziddel készültek 6 órás inkubáció után. Ezek az eredmények azt is mutatták, hogy a felületaktív anyag típusa befolyásolta a *S. platensis* biohasznosulását és az antimikrobiális aktivitást.

Munkánk rávilágított a különböző nemionos felületaktív anyagokat tartalmazó *S. platensis* készítmények közötti különbségekre mind a biokompatibilitást illetően mind pedig a biohasznosulás terén. Kísérleteink szerint a felületaktív anyagok nagymértékben befolyásolták a krémek textúráját és a hatóanyag felszabadulását, ebből adódóan készítményeink antioxidáns és antibakteriális aktivitásának mértékére is bizonyítottan hatással voltak.

6.2. A *Calendula officinalis* tartalmú készítmények vizsgálati eredményeink megbeszélése

A gyógyszeriparban egyre nagyobb az igény a szisztémás mellékhatások nélküli, helyi gyulladáscsökkentő hatású reumatoid arthritis kiegészítő kezelésére szolgáló külsőleges készítményekre. Bár a reumatoid arthritis nem gyógyítható, a korai kezelés és szupportív terápia (beleértve a fizioterápiát, az életmódbeli változtatásokat és a műtetet) csökkentheti az ízületi károsodás kockázatát és megakadályozhatja az állapot romlását. [157]

Kutatómunkám során hat különböző, diklofenak-nátrium, metil-szalicilát és *C. officinalis* virágát tartalmazó kivonat kombinációját tartalmazó gyulladáscsökkentő hatású topikális készítményt formuláltam. Az első kísérletsorozattól eltérően ezúttal különböző típusú készítményalapokat hoztunk létre, úgy, mint a vazelint és lanolint tartalmazó szénhidrogéngélt, valamint o/v emulziós rendszerű, nagyobb víztartalmú krémeket, melyek anionos (Empicol LZ/N) vagy nemionos (cukorészter SP70) emulgenst tartalmaztak. Három különböző segédanyaggal (Carbopol 974P, Pemulen TR-1 és Synthalen K) makromolekulás hidrogéleket is formuláltunk, melyektől kedvezőbb hatóanyagfelszabadulást és diffúziót vártunk.

Elsőként a készítmények fizikai-kémiai tulajdonságait, a texturális és reológiai paramétereiket térképeztük fel. A viszkozitás az egyik legfontosabb tényező a helyileg alkalmazandó készítményeknél, mivel befolyásolhatja a hatóanyag felszabadulását, valamint módosíthatja a vivőanyagok diffúziós sebességét. Számos tanulmány leírta már a félszilárd gyógyszerformák viszkozitása és az azokban lévő hatóanyagok diffúziós képessége közötti fordított arányosságot, valamint azt, hogy az alkalmazott vivőanyag típusa szignifikáns mértékben befolyásolhatja a hatóanyagok felszabadulásának és diffúziójának sebességét. [158,159] Kísérleteink szerint az általunk formulált Synthalen K gélkészítmény mutatta a legjobb diffúziós eredményeket és a legalacsonyabb viszkozitást, a leglágyabb konzisztenciát. A gélek *in vitro* diffúziós vizsgálatunkban tapasztalt nagyobb diffúziós sebessége tehát az alacsony viszkozitásuknak tudható be, ami fokozott gyógyszerfelszabadulást eredményezett ezekből a készítményekből. [159] Emellett a gélkészítmények - szemben a kenőccsel és krémekkel - könnyebben kenhetők, így nagy felületek kezelésére alkalmasabbak lehetnek.

Hasonlóan az első kísérletsorozathoz a körömvirág tartalmú készítmények esetében is végeztünk citotoxicitási vizsgálatokat HaCaT sejtvonalon a készítmények toxicitásának kizárására. [87,138] Az MTT vizsgálat alapján a különböző összetételű készítmények közül a D formuláció volt a legkevésbé toxikus, ez esetben a sejtek életképessége $93,61 \pm 1,49\%$ -nak bizonyult. A vivőanyagként vazelint és lanolint tartalmazó összetétel mutatta a legmagasabb sejt-életképességi értéket ($88,92 \pm 5,97\%$), míg az o/v emulziós típusú krémekkel történő kezelés a sejtek életképességének nagyobb mértékű csökkenését eredményezték. Az anionos felületaktív anyagot tartalmazó összetétel esetben az életképesség csak $68,43 \pm 5,62\%$ -nak adódott, míg az SP70 cukorészter nemionos emulgenssel formulált összetétellel történő kezelés $82,79 \pm 2,95\%$ -os sejtéletképességet eredményezett. Az eredmények alapján tehát az anionos felületaktív anyag az alkalmazott koncentrációban már citotoxicitást eredményez HaCaT sejteken, míg a nemionos emulgens jól tolerálható.

Preformulációs vizsgálataink és az antioxidáns teszt alapján a Synthalen K gélképző segédanyagot tartalmazó összetételt találtuk alkalmasnak az *in vivo* vizsgálatra.

A készítményünket prospektív, placebo kontrollált klinikai vizsgálatnak vetettük alá a gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásának értékelése céljából. A fájdalom egy tünet, és mint ilyen, az egyetlen személy, aki pontosan érzi annak intenzitását, az az érintett beteg, tehát önmaga képes pontosan értékelni. Az orvosi gyakorlatban szükséges volt a fájdalom intenzitásának tárgyiasítására, így különböző értékelési módszerek kerültek kidolgozásra az évek során. A vizuális analóg skála (VAS) a klinikai gyakorlatban leggyakrabban használt fájdalomértékelési eszköz. A módszer egyszerű, nem invazív és könnyen használható, lehetővé teszi a fájdalom osztályozását a páciens számára. [160–162] Diklofenák-nátriumot, metil-szalicilátot és körömvirág extraktumot együttesen tartalmazó gyógyszerkészítmény klinikai vizsgálatáról jelenleg még nem állnak rendelkezésre információink, viszont diklofenák-gélek reumatoid artritiszben szenvedő betegeken történő humán klinikai vizsgálatairól számos tanulmány számolt már be. Egy szakirodalomban leírt randomizált klinikai vizsgálatban a diklofenak gél a vártak megfelelően jobbnak bizonyult a fájdalom csillapításában 3 napos kezelési periódust vizsgálva, mint a placebo gél. [112] Az általunk formulált gél a klinikai vizsgálat szerint a VAS skálán értékelt fájdalmat szignifikánsan csökkentette 14 napos kezelési idő elteltével.

Több tanulmányban beszámoltak arról, hogy a gyulladáscsökkentővel végzett külsőleges kezelésre adott rövid távú szinoviális válasz, azaz a szinovium vastagságbeli csökkenése ultrahanggal kimutatható [163], ezért vizsgálatunk során elvégeztük az ultrahangos képalkotó vizsgálatot a kezelésekk előtt és után. Az eredmények szerint a Synthalen K segédanyaggal formulált gélkészítménnyel végzett kezelés után a szinovium vastagságának szignifikáns mértékű csökkenése volt megfigyelhető a placebo csoporthoz képest, tehát a kezelés jótékony hatással volt a lokális gyulladásra.

A *C. officinalis*, a diklofenak-nátrium és a metil-szalicilát kombinációja a prezentált gél formájában kitűnő eredménnyel alkalmazható reumatoid artritisz kiegészítő kezelésekként. Megannyi tanulmány igazolta már azt a feltételezést, hogy a körömvirágolaj javítja a diklofenak-nátrium *in vitro* percután felszívódását. [56] Továbbá leírták, hogy a diklofenak-nátrium és metil-szalicilát kombinációja helyi nanoemulzióban alkalmazva térdízületi osteoarthritis fennállása esetén fokozta a klinikai hatékonyságot azokhoz a készítményekhez képest, amelyek csak diklofenak-nátriumot tartalmaztak. A közölt eredmények tehát a körömvirág, illetve a metil-szalicilát szinergista hatását jelezhetik. [7]

A *C. officinalis* kivonat gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatása több tanulmány által bizonyított. Leírták például, hogy a virágából készült 70%-os etanolos kivonat külsőleges alkalmazása egereken 20%-kal csökkentette a mesterségesen indukált fülödémát [46,164], továbbá a *C. officinalis* etanolos kivonata gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki, és pozitív formában hatott Wistar nőstény patkányok bőrsebeinek gyógyulási folyamatának gyulladós és proliferatív fázisában. [165]

A *C. officinalis* extraktumban található számos polifenol révén megelőzheti az oxidatív stressz által létrehozott károsodást, sőt akár már 0,2 µg/ml koncentrációban alkalmazva semlegesíti a reumatoid artritisz patogenezisében is bizonyítottan részt vevő reaktív oxigén- és nitrogényköket. [166,167] Van Vugt és munkatársai leírták az antioxidáns terápia klinikai jelentőségét és az antioxidánsok jótékony hatását a reumatoid artritisz lefolyására. [54] A különböző összetételekkel végzett antioxidáns vizsgálatunk szerint a Synthalen K gélképzőt tartalmazó formuláció mutatta a legnagyobb gyökfogó aktivitást a hat készítmény közül, így ebből az aspektusból is ezt az összetételt tartottuk megfelelőnek az *in vivo* vizsgálatra.

Munkánk rámutatott a különböző segédanyagokkal, felületaktív anyagokkal és gélképző polimerekkel rendelkező kenőcs-, krém- és gélkészítmények közötti különbségekre. A segédanyagok befolyásolták a reológiai viselkedést, a készítmények citotoxicitását és a hatóanyagok felszabadulását, valamint az antioxidáns hatás mértékét. A Synthalen K-t tartalmazó gél kedvező diffúziós profilja és ez által a terápiás hatékonysága révén megfelelő alternatívát jelenthet adjuváns terápiaként való alkalmazásra reumatológiai kórképek, például váll- és térdízületi gyulladás kezelésére.

7. Összefoglalás

Doktori tanulmányaim során növényi hatóanyagok felhasználásával különböző terápiás indikációkban külsőleges gyógyszerformákat formuláltam. Kutatómunkám elsődleges célját a segédanyagok - különös hangsúllyal a felületaktív anyagokra - közti különbségekre való rámutatás képezte.

Első kísérletsorozatunkban hatóanyagként *S. platensis* liofilizátumot tartalmazó emulziós krémeket formuláltunk különböző nemionos emulgensek, illetve Transcutol HP szolubilizálószerként való alkalmazásával. Vizsgálataink rávilágítottak, hogy az SP70 cukorésztert és Transcutol HP-t tartalmazó készítmény megfelelő konzisztenciával és diffúziós profillal rendelkezik, továbbá ez esetében detektálható a legmagasabb antioxidáns aktivitás UVB sugárzás indukálta oxidatív stressz esetében HaCaT sejteken. Kutatómunkánkkal sikerült igazolni, hogy az említett készítmény antimikrobiális hatással is bír az acne vulgaris két fő kórokozója, a *C. acnes* és a *S. aureus* ellen, illetve minimális a HaCaT sejtek életképességére gyakorolt negatív hatása. A *S. platensis* algával végzett kísérleteink egyik kiemelkedő eredményét egy természetes eredetű hatóanyagot tartalmazó topikális készítmény fejlesztése jelenti, amely alternatív lehetőséget nyújt az egyik leggyakoribb bőrbetegség, az acne vulgaris kezelésére, kevesebb mellékhatással és antibiotikum-rezisztencia nélkül.

Második kísérletsorozatunkban olyan kenőcsöt, krémeket és géleket formuláltunk, melyek a *C. officinalis* extraktumot, diklofenák-nátriummal és metil-szaliciláttal kombinálva tartalmazzák az optimális terápiás hatás elérése érdekében. A reológiai és a diffúziós vizsgálatok alapján elmondható, hogy a hatóanyagok gélkészítménybe történő inkorporálása - a kenőccsel és krémmel összehasonlítva - kedvezőbb tulajdonságokat eredményez, amelyek következtetni engednek a magas szöveti koncentráció biztosítására, ami nagyobb mértékű és hosszabb idejű fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatást von maga után. Legjobb tudomásunk szerint a jelen értekezésben tárgyalt humán klinikai vizsgálat volt az első *C. officinalis*-t, diklofenák-nátriumot és metil-szalicilátot együttesen tartalmazó készítményre irányuló tanulmány reumatoid artritisz terápiájában. Kísérletünkben sikerült igazolni, hogy a Synthalen K gélképző polimerrel formulált készítmény szignifikáns mértékben képes csökkenteni a betegek fájdalmát, valamint az érintett ízület gyulladásának mértékét. Az általunk formulált *C. officinalis* tartalmú gél tehát kitűnő, szisztémás mellékhatásoktól mentes, alternatív terápiás lehetőséget nyújthat az ízületi gyulladásban szenvedő betegek részére.

8. Summary

During my PhD studies, I formulated external dosage forms in various therapeutic indications using herbal active ingredients. The primary goal of my research was to point out the differences between excipients, with special emphasis on surfactants.

In our first experiments, ointments containing *S. platensis* lyophilisate were formulated using various nonionic emulsifiers and Transcutol HP as a solubilizer. The investigations have pointed out that the formulation containing SP70 sucrose ester emulsifier and Transcutol HP has a good consistency and diffusion profile and this composition presents the highest antioxidant activity in UV radiation-induced oxidative stress on HaCaT cells. In addition, it has antimicrobial activity against the two main pathogens of acne vulgaris, *C. acnes* and *S. aureus*, and has a minimal negative effect on the viability of HaCaT cells. One of the outstanding results of our experiments with *S. platensis* algae is the development of a topical preparation containing a natural active ingredient, which offers an alternative treatment for one of the most common skin diseases, acne vulgaris, with fewer side effects and no antibiotic resistance.

In the second experiments, we formulated anti-inflammatory an ointment, two creams and three gels containing *C. officinalis* extract in combination with diclofenac sodium and methyl salicylate to achieve the optimal therapeutic effect. Based on rheological and diffusion studies, the incorporation of the active ingredients into a gel formulation results in more favorable properties compared to the ointment and creams, suggesting a high tissue concentration. This can provide a greater and longer-lasting analgesic and anti-inflammatory effect. To the best of our knowledge, the human clinical trial discussed in this dissertation was the first study to investigate the combination of *C. officinalis*, diclofenac sodium, and methyl salicylate in the treatment of rheumatoid arthritis. In our experiment, we were able to demonstrate that the formulation with Synthalen K gel-forming polymer can significantly reduce pain in patients as well as the degree of inflammation in the affected joint. The *C. officinalis* gel we had formulated may provide an excellent alternative treatment option for patients with rheumatoid arthritis without systemic side effects.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Walker, D.P. Walter Pagel. Paracelsus. An Introduction to Philosophical Medicine in the Era of the Renaissance. Basle and New York: S. Karger. xii+pp. 368.70 Swiss francs. *Renaiss. News* **1959**, 12, 107–109, doi:10.2307/2857408.
2. Rácz, I. *Gyógyszerformulálás*; Medicina Könyvkiadó, 1984;
3. Nege, A.S.; Dewi Masithah, E.; Khotib, J. Trends in the Uses of *Spirulina* Microalga: A mini-review. *J. Ilm. Perikan. dan Kelaut.* **2020**, 12, 149–166, doi:10.20473/jipk.v12i1.17506.
4. Bariguan Revel, F.; Fayet, M.; Hagen, M. Topical Diclofenac, an Efficacious Treatment for Osteoarthritis: A Narrative Review. *Rheumatol. Ther.* **2020**, 7, 217–236, doi:10.1007/s40744-020-00196-6.
5. *Pharmacopoeia Hungarica VIII. - VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.)*; Országos Gyógyszerészeti Intézet, 2006;
6. Derry, S.; Moore, R.A.; Gaskell, H.; McIntyre, M.; Wiffen, P.J. Topical NSAIDs for acute musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, 2015, CD007402, doi:10.1002/14651858.CD007402.pub3.
7. Dave, M.B.; Dave, U.M.; Savajiyani, D.N. Clinical efficacy of topical nanoemulsion diclofenac gel versus combination of nanoemulsion diclofenac with methyl salicylate in osteoarthritis of knee. *J. Orthop. Trauma Surg. Relat. Res.* **2017**, 12.
8. Staiger, C. Comfrey root: from tradition to modern clinical trials. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **2013**, 163, 58–64, doi:10.1007/s10354-012-0162-4.
9. Smith, A.G.; Miles, V.N.; Holmes, D.T.; Chen, X.; Lei, W. Clinical Trials, Potential Mechanisms, and Adverse Effects of Arnica as an Adjunct Medication for Pain Management. *Medicines* **2021**, 8, 58–64, doi:10.3390/medicines8100058.
10. Gallelli, L. Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, Volume 13, 3425–3437, doi:10.2147/DDDT.S207720.
11. Pittler, M.H.; Ernst, E. Horse-Chestnut Seed Extract for Chronic Venous Insufficiency. *Arch. Dermatol.* **1998**, 134, 1356–1360, doi:10.1001/archderm.134.11.1356.
12. Ghorbani, A.; Esmaeilizadeh, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**, 7, 433–440, doi:10.1016/j.jtcme.2016.12.014.
13. Péterfi, I. *Az algák biológiája és gyakorlati jelentősége*; Ceres Könyvkiadó, 1977;
14. Karkos, P.D.; Leong, S.C.; Karkos, C.D.; Sivaji, N.; Assimakopoulos, D.A. *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2011**, 2011, 1–4, doi:10.1093/ecam/nen058.

15. Kecskés, M.; Hortobágyi, T.; Padisák, J.; Tóth, S.; Babos, L.; Versegly, K.; Orbán, S. *Baktérium-, alga-, gomba-, zúzmó- és mohahatározó*; Nemzeti Tankönyvkiadó, 2003;
16. Tihanyi, A.; Tóth, J.; Weber-Suta, Á. *Zöld utat az egészségnek! Mikroalgák szerepe a modern táplálkozásban és a gyógyításban*; Weber-Suta Ágnes, 2008; ISBN 978-963-06-5961-1.
17. Furmaniak, M.A.; Misztak, A.E.; Franczuk, M.D.; Wilmotte, A.; Waleron, M.; Waleron, K.F. Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.02541.
18. Delsin, S.D.; Mercurio, D.G.; Fossa, M.M.; Campos PMBG, M. Clinical Efficacy of Dermocosmetic Formulations Containing Spirulina Extract on Young and Mature Skin: Effects on the Skin Hydrolipidic Barrier and Structural Properties. *Clin. Pharmacol. Biopharm.* **2015**, *04*, 144–149, doi:10.4172/2167-065X.1000144.
19. Storf, M.; Parbel, A.; Meyer, M.; Strohmam, B.; Scheer, H.; Deng, M.-G.; Zheng, M.; Zhou, M.; Zhao, K.-H. Chromophore Attachment to Biliproteins: Specificity of PecE/PecF, a Lyase-Isomerase for the Photoactive 3¹-Cys- α 84-phycoviolobilin Chromophore of Phycoerythrocyanin. *Biochemistry* **2001**, *40*, 12444–12456, doi:10.1021/bi010776s.
20. Jiang, L.; Wang, Y.; Yin, Q.; Liu, G.; Liu, H.; Huang, Y.; Li, B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *J. Cancer* **2017**, *8*, 3416–3429, doi:10.7150/jca.21058.
21. Kim, K.M.; Lee, J.Y.; Im, A.-R.; Chae, S. Phycocyanin Protects Against UVB-induced Apoptosis Through the PKC α / β II-Nrf-2/HO-1 Dependent Pathway in Human Primary Skin Cells. *Molecules* **2018**, *23*, 478–490, doi:10.3390/molecules23020478.
22. Gunes, S.; Tamburaci, S.; Dalay, M.C.; Deliloglu Gurhan, I. In vitro evaluation of *Spirulina platensis* extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1824–1832, doi:10.1080/13880209.2017.1331249.
23. Romay, C.; Armesto, J.; Ramirez, D.; González, R.; Ledon, N.; García, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflamm. Res.* **1998**, *47*, 36–41, doi:10.1007/s000110050256.
24. Reddy, M.C.; Subhashini, J.; Mahipal, S.V.; Bhat, V.B.; Srinivas Reddy, P.; Kiranmai, G.; Madyastha, K.; Reddanna, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 385–392, doi:10.1016/S0006-291X(03)00586-2.
25. Stahl, W.; Sies, H. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 1179S-1184S, doi:10.3945/ajcn.112.034819.
26. Janson, S. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. Avigad Vonshak. *Q. Rev. Biol.* **1998**, *73*, 353–354, doi:10.1086/420339.
27. Kerscher, M.J.; Korting, H.C. Treatment of atopic eczema with evening primrose oil:

- rationale and clinical results. *Clin. Investig.* **1992**, *70*, 167–171, doi:10.1007/BF00227362.
28. Kawamura, A.; Ooyama, K.; Kojima, K.; Kachi, H.; Abe, T.; Amano, K.; Aoyama, T. Dietary Supplementation of Gamma-Linolenic Acid Improves Skin Parameters in Subjects with Dry Skin and Mild Atopic Dermatitis. *J. Oleo Sci.* **2011**, *60*, 597–607, doi:10.5650/jos.60.597.
 29. Sergeant, S.; Rahbar, E.; Chilton, F.H. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *785*, 77–86, doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.020.
 30. Marklund, S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, *79*, 7634–7638, doi:10.1073/pnas.79.24.7634.
 31. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–55.
 32. Byun, S.J.; Ji, M.-R.; Jang, Y.-J.; Hwang, A.-I.; Chung, H.K.; Kim, J.S.; Kim, K.-W.; Chung, H.-J.; Yang, B.-C.; Jeon, I.; et al. Human extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) expression in transgenic chicken. *BMB Rep.* **2013**, *46*, 404–409, doi:10.5483/BMBRep.2013.46.8.251.
 33. Wang, X. Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.* **1999**, *38*, 309–336, doi:10.1016/S0163-7827(99)00008-9.
 34. Azzi, A.; Gysin, R.; Kempná, P.; Munteanu, A.; Negis, Y.; Villacorta, L.; Visarius, T.; Zingg, J.-M. Vitamin E Mediates Cell Signaling and Regulation of Gene Expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1031*, 86–95, doi:10.1196/annals.1331.009.
 35. Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P.; et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 60–78, doi:10.1016/j.cbpc.2006.05.007.
 36. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 87–96, doi:10.1263/jbb.101.87.
 37. Vora, J.; Srivastava, A.; Modi, H. Antibacterial and antioxidant strategies for acne treatment through plant extracts. *Informatics Med. Unlocked* **2018**, *13*, 128–132, doi:10.1016/j.imu.2017.10.005.
 38. Weber, N.; Biehler, K.; Schwabe, K.; Haarhaus, B.; Quirin, K.-W.; Frank, U.; Schempp, C.M.; Wölfle, U. Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Molecules* **2019**, *24*, 223–236, doi:10.3390/molecules24020223.
 39. Fanelli, M. Antibiotics, Acne, and *Staphylococcus aureus* Colonization. *Arch. Dermatol.* **2011**, *147*, 917–921, doi:10.1001/archdermatol.2011.67.
 40. Mayslich, C.; Grange, P.A.; Dupin, N. *Cutibacterium acnes* as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. *Microorganisms* **2021**, *9*, 303–324, doi:10.3390/microorganisms9020303.

41. Nihal, B.; Gupta, N.V.; Gowda, D. V.; M., M. Formulation and development of topical anti acne formulation of Spirulina extract. *Int. J. Appl. Pharm.* **2018**, *10*, 229–233, doi:10.22159/ijap.2018v10i6.26334.
42. Givol, O.; Kornhaber, R.; Visentin, D.; Cleary, M.; Haik, J.; Harats, M. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. [and] Eur. Tissue Repair Soc.* **2019**, *27*, 548–561, doi:10.1111/wrr.12737.
43. Vlahovic, T. The Use of Marigold Therapy for Podiatric Skin Conditions. *Foot Ankle J.* **2008**, *1*, doi:10.3827/faoj.2008.0107.0001.
44. Butnariu, M.; Coradini, C.Z. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chem. Cent. J.* **2012**, *6*, 35–42, doi:10.1186/1752-153X-6-35.
45. Fürst, R.; Zündorf, I. Plant-Derived Anti-Inflammatory Compounds: Hopes and Disappointments regarding the Translation of Preclinical Knowledge into Clinical Progress. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–9, doi:10.1155/2014/146832.
46. Preethi, K.C.; Kuttan, G.; Kuttan, R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J. Exp. Biol.* **2009**, *47*, 113–120.
47. Yadegari, M. Phyto-Chemical and Morphological Characters of *Calendula officinalis* as Affected by Micronutrients. *J. Ornament. PLANTS* **2016**, *6*, 271–278.
48. Wasserman, A.M. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am. Fam. Physician* **2011**, *84*, 1245–1252.
49. Hussain Manik, Z.; George, J.; Sockalingam, S. Ultrasound Assessment of Synovial Thickness of Some of the Metacarpophalangeal Joints of Hand in Rheumatoid Arthritis Patients and the Normal Population. *Scientifica (Cairo)*. **2016**, *2016*, 1–7, doi:10.1155/2016/5609132.
50. Birch, J.T.; Bhattacharya, S. Emerging Trends in Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **2010**, *37*, 779–792, doi:10.1016/j.pop.2010.07.001.
51. Köhler, B.M.; Günther, J.; Kaudewitz, D.; Lorenz, H.-M. Current Therapeutic Options in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 938–953, doi:10.3390/jcm8070938.
52. Callahan, L.F.; Wiley-Exley, E.K.; Mielenz, T.J.; Brady, T.J.; Xiao, C.; Currey, S.S.; Sleath, B.L.; Sloane, P.D.; DeVellis, R.F.; Sniezek, J. Use of complementary and alternative medicine among patients with arthritis. *Prev. Chronic Dis.* **2009**, *6*, A44.
53. Fonseca, L.J.S. da; Nunes-Souza, V.; Goulart, M.O.F.; Rabelo, L.A. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–16, doi:10.1155/2019/7536805.
54. van Vugt, R.M.; Rijken, P.J.; Rietveld, A.G.; van Vugt, A.C.; Dijkmans, B.A.C. Antioxidant intervention in rheumatoid arthritis: results of an open pilot study. *Clin.*

- Rheumatol.* **2008**, *27*, 771–775, doi:10.1007/s10067-008-0848-6.
55. Javadi, F.; Ahmadzadeh, A.; Egtesadi, S.; Aryaeian, N.; Zabihyeganeh, M.; Rahimi Foroushani, A.; Jazayeri, S. The Effect of Quercetin on Inflammatory Factors and Clinical Symptoms in Women with Rheumatoid Arthritis: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *J. Am. Coll. Nutr.* **2017**, *36*, 9–15, doi:10.1080/07315724.2016.1140093.
 56. Bodhankar, M.; Kavade, V.; Patil, A. Consequence of *Calendula* oil on the in- vitro percutaneous absorption of diclofenac sodium. *J. Drug Deliv. Ther.* **2012**, *2*, 118–120, doi:10.22270/jddt.v2i3.139.
 57. Zhang, T.; Sun, L.; Liu, R.; Zhang, D.; Lan, X.; Huang, C.; Xin, W.; Wang, C.; Zhang, D.; Du, G. A Novel Naturally Occurring Salicylic Acid Analogue Acts as an Anti-Inflammatory Agent by Inhibiting Nuclear Factor-kappaB Activity in RAW264.7 Macrophages. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 671–677, doi:10.1021/mp2003779.
 58. Chambers, E.S.; Vukmanovic-Stejic, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* **2020**, *160*, 116–125, doi:10.1111/imm.13152.
 59. Barbero, A.M.; Frasc, H.F. Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration. *J. Control. Release* **2017**, *260*, 234–246, doi:10.1016/j.jconrel.2017.05.034.
 60. Herkenne, C.; Alberti, I.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Mathy, F.-X.; Pr at, V.; Guy, R.H. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 87–103, doi:10.1007/s11095-007-9429-7.
 61. Ng, S.-F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for *In Vitro* Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441, doi:10.1208/s12249-010-9522-9.
 62. D vai, A. F lszil rd gy gyszerform k technol gi ja. In *A gy gyszertechol gia alapjai*; P csi Tudom nyegyetem Gy gyszertechol giai  s Biofarm ciai Int zet, 2013.
 63. R cz, I.; Selmeczi, B. *Gy gyszertechol gi I-III.*; Medicina K nyvkiad , 2001;
 64. Hadgraft, J. Percutaneous absorption: possibilities and problems. *Int. J. Pharm.* **1983**, *16*, 255–270, doi:10.1016/0378-5173(83)90145-X.
 65. Echeverria, C.; Fernandes, S.; Godinho, M.; Borges, J.; Soares, P. Functional Stimuli-Responsive Gels: Hydrogels and Microgels. *Gels* **2018**, *4*, 54–91, doi:10.3390/gels4020054.
 66. *Formulae Normales VII. - Szabv nyos V nymint k Gy jtem nye VIII.*; Orsz gos Gy gyszer szeti  s  lmez s-eg szs g gyi Int zet, 2020;
 67. Mezreb, N.; Charrueau, C.; Boy, P.; Allain, P.; Chaumeil, J.C. Production of Carbopol 974P and Carbopol 971P pellets by extrusion-spheronization: optimization of the processing parameters and water content. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 481–490, doi:10.1081/ddc-120037476.
 68. Simovic, S.; Milic-Askrabic, J.; Vuleta, G.; Ibric, S.; Stupar, M. The Influence of

- Processing Variables on Performance of O/W Emulsion Gels Based on Polymeric Emulsifier (Pemulen (R)TR-2NF). *Int. J. Cosmet. Sci.* **1999**, *21*, 119–125, doi:10.1046/j.1467-2494.1999.183572.x.
69. Goddard, E. Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256*, 228–235, doi:10.1006/jcis.2001.8066.
 70. A-sasutjarit, R.; Sirivat, A.; Vayumhasuwan, P. Viscoelastic Properties of Carbopol 940 Gels and Their Relationships to Piroxicam Diffusion Coefficients in Gel Bases. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 2134–2140, doi:10.1007/s11095-005-8244-2.
 71. Lee, S.G.; Kang, J.B.; Kim, S.R.; Kim, C.J.; Yeom, D.W.; Yoon, H.Y.; Kwak, S.S.; Choi, Y.W. Enhanced topical delivery of tacrolimus by a carbomer hydrogel formulation with transcutol P. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2016**, *42*, 1636–1642, doi:10.3109/03639045.2016.1160107.
 72. Haque, T.; Talukder, M.M.U. Chemical Enhancer: A Simplistic Way to Modulate Barrier Function of the Stratum Corneum. *Adv. Pharm. Bull.* **2018**, *8*, 169–179, doi:10.15171/apb.2018.021.
 73. Scheuplein, R.J.; Blank, I.H. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.* **1971**, *51*, 702–747, doi:10.1152/physrev.1971.51.4.702.
 74. Alkilani, A.Z.; McCrudden, M.T.C.; Donnelly, R.F. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics* **2015**, *7*, 438–470, doi:10.3390/pharmaceutics7040438.
 75. Morrow, D.I.J.; McCarron, P.A.; Woolfson, A.D.; Donnelly, R.F. Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery. *Open Drug Deliv. J.* **2007**, *1*, 36–59.
 76. Abdel-Mottaleb, M.M.A.; Neumann, D.; Lamprecht, A. *In vitro* drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *Int. J. Pharm.* **2010**, *390*, 208–213, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.02.001.
 77. Schwartz, A.M. Surfactants in cosmetics. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *109*, 299, doi:10.1016/0021-9797(86)90306-1.
 78. Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Róka, E.; Juhász, B.; Varga, B.; Bombicz, M.; Priksz, D.; Bácskay, I.; et al. Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes. *Molecules* **2016**, *21*, 1269–1290, doi:10.3390/molecules21101269.
 79. Brinkmann, I.; Müller-Goymann, C.C. An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. *Pharmazie* **2005**, *60*, 215–220.
 80. Liu, P.; Cettina, M.; Wong, J. Effects of isopropanol-isopropyl myristate binary enhancers on *in vitro* transport of estradiol in human epidermis: a mechanistic evaluation. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 565–572, doi:10.1002/jps.21459.
 81. Szűts, A.; Szabó-Révész, P. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery

- systems—A mini-review. *Int. J. Pharm.* **2012**, *433*, 1–9, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.076.
82. Csizmazia, E.; Erős, G.; Berkesi, O.; Berkó, S.; Révész, P.; Csányi, E. Penetration enhancer effect of sucrose laurate and Transcutol on ibuprofen. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2011**, *21*, 411–415, doi:10.1016/S1773-2247(11)50066-8.
 83. Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma, . A Silybum marianumot tartalmazó belsőleges és külsőleges gyógyszerformák fejlesztése, *in vitro* és *in vivo* vizsgálata, Debreceni Egyetem, 2017.
 84. Cázares-Delgadillo, J.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A. Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH-dependent phenomenon. *Int. J. Pharm.* **2005**, *297*, 204–212, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.020.
 85. Shokri, J.; Azarmi, S.; Fasihi, Z.; Hallaj-Nezhadi, S.; Nokhodchi, A.; Javadzadeh, Y. Effects of various penetration enhancers on percutaneous absorption of piroxicam from emulgels. *Res. Pharm. Sci.* **2012**, *7*, 225–34.
 86. Trommer, H.; Neubert, R.H.H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2006**, *19*, 106–121, doi:10.1159/000091978.
 87. Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 761–771, doi:10.1083/jcb.106.3.761.
 88. Ölschläger, V.; Schrader, A.; Hockertz, S. Comparison of Primary Human Fibroblasts and Keratinocytes with Immortalized Cell Lines Regarding their Sensitivity to Sodium Dodecyl Sulfate in a Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay. *Arzneimittelforschung* **2011**, *59*, 146–152, doi:10.1055/s-0031-1296378.
 89. Schoop, V.M.; Fusenig, N.E.; Mirancea, N. Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *112*, 343–353, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x.
 90. Tarko, T.; Duda-Chodak, A.; Kobus, M. Influence of growth medium composition on synthesis of bioactive compounds and antioxidant properties of selected strains of *Arthrospira* cyanobacteria. *Czech J. Food Sci.* **2012**, *30*, 258–267, doi:10.17221/46/2011-CJFS.
 91. Olennikov, D.N.; Kashchenko, N.I.; Chirikova, N.K.; Akobirshoeva, A.; Zilfikarov, I.N.; Vennos, C. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers and Preparations. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1685–1702, doi:10.3390/ijms18081685.
 92. Marian, E.; Vicaș, L.G.L.; Jurca, T.; Mureșan M, Stan RL, Sevastre B, Diaconeasa Z, Ionescu C, H.; Tunde, J.; Mureșan, M.; Stan, R.L.; Sevastre, B.; Diaconeasa, Z.; Ionescu, C.; Hangan, A.C. A comparative study on the biologic activity of *Centaurea Cyanus* versus *Calendula officinalis*. *Farmacia* **2017**, *65*, 940–946.
 93. Tünde, J.; Marian, E.; Tita, B.; Vicaș, S.; Pallag, A.; Tóth, I.; Krusper, L.; Braun, M.; Vicas, L. Determination of oligoelements content of plant material and assessment of

- bioactive compounds from *Calendula officinalis* lyophilized extract. *Rev. Chinie - Bucharest- Orig. Ed.* **2017**, *68*, 1786–1789.
94. Ujhelyi, Z.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Fehér, P.; Kiss, T.; Veszelka, S.; Deli, M.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 564–573, doi:10.1016/j.ejps.2012.07.005.
 95. Shahin, M.; Hady, S.A.; Hammad, M.; Mortada, N. Optimized formulation for topical administration of clotrimazole using Pemulen polymeric emulsifier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2011**, *37*, 559–568, doi:10.3109/03639045.2010.528768.
 96. Glazer, A.N.; Fang, S.; Brown, D.M. Spectroscopic properties of C-phycoerythrin and of its alpha and beta subunits. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 5679–5685.
 97. Chen, H.-W.; Yang, T.-S.; Chen, M.-J.; Chang, Y.-C.; Wang, E.I.C.; Ho, C.-L.; Lai, Y.-J.; Yu, C.-C.; Chou, J.-C.; Chao, L.K.-P.; et al. Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 1337–1344, doi:10.1016/j.procbio.2014.05.006.
 98. Aiello, P.B.; Borges, F.A.; Romeira, K.M.; Miranda, M.C.R.; Arruda, L.B. de; L. Filho, P.N.; Drago, B. de C.; Herculano, R.D. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. *Mater. Res.* **2014**, *17*, 146–152, doi:10.1590/S1516-14392014005000010.
 99. Dorwal, D. Development of UV Spectrophotometric Method For Determination of Methyl Salicylate In Bulk And Semisolid Formulation. *Int. J. Res.* **2012**, *3*.
 100. Liebenberg, W.; Engelbrecht, E.; Wessels, A.; Devarakonda, B.; Yang, W.; De, V.M.M. A comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with Franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus. *J. Food Drug Anal.* **2020**, *12*, 19–28, doi:10.38212/2224-6614.2669.
 101. Vasvári, G.; Haimhoffer, Á.; Horváth, L.; Budai, I.; Trencsényi, G.; Béresová, M.; Dobó-Nagy, C.; Váradi, J.; Bácskay, I.; Ujhelyi, Z.; et al. Development and Characterisation of Gastroretentive Solid Dosage Form Based on Melt Foaming. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 290–301, doi:10.1208/s12249-019-1500-2.
 102. Nemes, D.; Kovács, R.; Nagy, F.; Mező, M.; Poczok, N.; Ujhelyi, Z.; Pető, Á.; Fehér, P.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; et al. Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms—Assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity. *Molecules* **2018**, *23*, 1827–1846, doi:10.3390/molecules23071827.
 103. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 104. Bahuguna, A.; Khan, I.; Bajpai, V.K.; Kang, S.C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2017**, *12*, 115–118, doi:10.3329/bjp.v12i2.30892.
 105. Liu, Y.; Peterson, D.A.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* **2002**, *69*, 581–593, doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x.

106. superoxide-dismutase-assay-kit @ www.caymanchem.com.
107. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30, doi:https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
108. Romanet, R.; Coelho, C.; Liu, Y.; Bahut, F.; Ballester, J.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R.D. The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay. *Molecules* **2019**, *24*, 1353–1364, doi:10.3390/molecules24071353.
109. Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Leitão, G.G.; Reis, A.S.; dos Santos, T.C.; Coube, C.S.; Leitão, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 127–130, doi:10.1002/ptr.687.
110. Lu, Y.; Yeap Foo, L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **2000**, *68*, 81–85, doi:10.1016/S0308-8146(99)00167-3.
111. Tille, P. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*; 2013; ISBN 0323030653.
112. Efe, T.; Sagnak, E.; Roessler, P.P.; Getgood, A.; Patzer, T.; Fuchs-Winkelmann, S.; Peterlein, C.D.; Schofer, M.D. Penetration of topical diclofenac sodium 4 % spray gel into the synovial tissue and synovial fluid of the knee: a randomised clinical trial. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2014**, *22*, 345–350, doi:10.1007/s00167-013-2408-0.
113. El Miedany, Y.; Youssef, S.; Mehanna, A.N.; El Gaafary, M. Development of a scoring system for assessment of outcome of early undifferentiated inflammatory synovitis. *Jt. bone spine* **2008**, *75*, 155–162, doi:10.1016/j.jbspin.2007.04.021.
114. Filippucci, E.; Cipolletta, E.; Mashadi Mirza, R.; Carotti, M.; Giovagnoni, A.; Salaffi, F.; Tardella, M.; Di Matteo, A.; Di Carlo, M. Ultrasound imaging in rheumatoid arthritis. *Radiol. Med.* **2019**, *124*, 1087–1100, doi:10.1007/s11547-019-01002-2.
115. Jan, M.-H.; Chai, H.-M.; Wang, C.-L.; Lin, Y.-F.; Tsai, L.-Y. Effects of repetitive shortwave diathermy for reducing synovitis in patients with knee osteoarthritis: an ultrasonographic study. *Phys. Ther.* **2006**, *86*, 236–44.
116. Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28*, 359–370, doi:10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x.
117. Ismaiel, M.M.S.; El-Ayouty, Y.M.; Piercey-Normore, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) platensis. *Brazilian J. Microbiol.* **2016**, *47*, 298–304, doi:10.1016/j.bjm.2016.01.003.
118. Tai, A.; Bianchini, R.; Jachowicz, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2014**, *36*, 291–304, doi:10.1111/ics.12125.
119. Filipovic, M.; Lukic, M.; Djordjevic, S.; Krstonosic, V.; Pantelic, I.; Vuleta, G.; Savic, S. Towards satisfying performance of an O/W cosmetic emulsion: screening of reformulation factors on textural and rheological properties using general experimental design. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2017**, *39*, 486–499, doi:10.1111/ics.12402.

120. Moldovan, M.; Lahmar, A.; Bogdan, C.; Părăuan, S.; Tomuță, I.; Crișan, M. Formulation and evaluation of a water-in-oil cream containing herbal active ingredients and ferulic acid. *Med. Pharm. Reports* **2017**, *90*, 212–219, doi:10.15386/cjmed-668.
121. Higuchi, T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 874–875, doi:10.1002/jps.2600501018.
122. Higuchi, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1960**, *11*, 85–97.
123. International Organization for Standardization Geneva Switzerland *ISO/EN 10993-5 Biol. Eval. Med. devices - Part 5 Tests Cytotox. Vit. methods*; 3rd ed.; 2009;
124. Ueda, C.T.; Shah, V.P.; Derdzinski, K.; Ewing, G.; Flynn, G.; Maibach, H.; Marques, M.; Rytting, H.; Shaw, S.; Thakker, K.; et al. Topical and Transdermal Drug Products. *Dissolution Technol.* **2010**, *17*, 12–25, doi:10.14227/DT170410P12.
125. The United States Pharmacopeial Convention, I. *Semisolid Drug Products - Performance Tests*; Usp 37.; 2014;
126. Tegeli, V.; Thorat, Y.S.; Shivsharan, U.; Gajeli, G.; Kumbhar, S.T.; Chougule, G.K. Pemulen as a versatile emulsifier. *Int. J. Drug Form Res.* **2011**, *2*, 52–63.
127. Chen, M.X.; Alexander, K.S.; Baki, G. Formulation and Evaluation of Antibacterial Creams and Gels Containing Metal Ions for Topical Application. *J. Pharm.* **2016**, *2016*, 1–10, doi:10.1155/2016/5754349.
128. Wenham, C.Y.J.; Conaghan, P.G. The role of synovitis in osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2010**, *2*, 349–359, doi:10.1177/1759720X10378373.
129. Hemke, R.; van den Berg, J.M.; Nusman, C.M.; van Gulik, E.C.; Barendregt, A.M.; Schonenberg-Meinema, D.; Dolman, K.M.; Kuijpers, T.W.; Maas, M. Contrast-enhanced MRI findings of the knee in healthy children; establishing normal values. *Eur. Radiol.* **2018**, *28*, 1167–1174, doi:10.1007/s00330-017-5067-6.
130. Mura, P.; Faucci, M.T.; Bramanti, G.; Corti, P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *9*, 365–372, doi:https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00075-5.
131. Mohd. Yasir; Som, I.; Bhatia, K. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2012**, *4*, 2–9, doi:10.4103/0975-7406.92724.
132. Srivastava, S.; Mishra, S.; Dewangan, J.; Divakar, A.; Gupta, N.; Kalleti, N.; Mugale, M.N.; Kumar, S.; Sharma, S.; Rath, S.K. Safety assessment of the pharmacological excipient, diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE), using *in vitro* and *in vivo* systems. *DARU J. Pharm. Sci.* **2019**, *27*, 219–231, doi:10.1007/s40199-019-00264-5.
133. Sullivan, D.W.; Gad, S.C.; Julien, M. A review of the nonclinical safety of Transcutol®, a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE) used as a pharmaceutical excipient. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 40–50, doi:10.1016/j.fct.2014.06.028.
134. Benson, H. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Curr.*

Drug Deliv. **2005**, *2*, 23–33, doi:10.2174/1567201052772915.

135. El-Leithy, E.S.; Makky, A.M.; Khattab, A.M.; Hussein, D.G. Optimization of nutraceutical coenzyme Q10 nanoemulsion with improved skin permeability and anti-wrinkle efficiency. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 316–328, doi:10.1080/03639045.2017.1391836.
136. Youan, B.-B.C.; Hussain, A.; Nguyen, N.T. Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS PharmSci* **2003**, *5*, 123–131, doi:10.1208/ps050222.
137. Islam, M.T.; Rodríguez-Hornedo, N.; Ciotti, S.; Ackermann, C. The Potential of Raman Spectroscopy as a Process Analytical Technique During Formulations of Topical Gels and Emulsions. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1844–1851, doi:10.1023/B:PHAM.0000045238.39700.6c.
138. Colombo, I.; Sangiovanni, E.; Maggio, R.; Mattozzi, C.; Zava, S.; Corbett, Y.; Fumagalli, M.; Carlino, C.; Corsetto, P.A.; Scaccabarozzi, D.; et al. HaCaT Cells as a Reliable *In Vitro* Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 1–12, doi:10.1155/2017/7435621.
139. Dreno, B. Topical Antibacterial Therapy for Acne Vulgaris. *Drugs* **2004**, *64*, 2389–2397, doi:10.2165/00003495-200464210-00002.
140. Al-Hammadi, A.; Al-Ismaily, A.; Al-Ali, S.; Ramadurai, R.; Jain, R.; McKinley-Grant, L.; Mughal, T.I. Topical, Biological and Clinical Challenges in the Management of Patients with Acne Vulgaris. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **2016**, *16*, e152-160, doi:10.18295/squmj.2016.16.02.004.
141. Hassanzadeh, P.; Bahmani, M.; Mehrabani, D. Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: An *in vitro* study. *Indian J. Dermatol.* **2008**, *53*, 122–124, doi:10.4103/0019-5154.43213.
142. Sibi, G. Inhibition of lipase and inflammatory mediators by Chlorella lipid extracts for antiacne treatment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2015**, *6*, 7–12, doi:10.4103/2231-4040.150364.
143. Yang, B.; Xu, Q.-Y.; Guo, C.-Y.; Huang, J.-W.; Wang, S.-M.; Li, Y.-M.; Tu, Y.; He, L.; Bi, Z.-G.; Ji, C.; et al. MHY1485 ameliorates UV-induced skin cell damages via activating mTOR-Nrf2 signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 12775–12783, doi:10.18632/oncotarget.14299.
144. Jadoon, S.; Karim, S.; Asad, M.H.H. Bin; Akram, M.R.; Kalsoom Khan, A.; Malik, A.; Chen, C.; Murtaza, G. Anti-Aging Potential of Phytoextract Loaded-Pharmaceutical Creams for Human Skin Cell Longevity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 1–17, doi:10.1155/2015/709628.
145. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* **2018**, *54*, 287–293, doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
146. Desai, K.; Sivakami, S. Purification and biochemical characterization of a superoxide

- dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 1661–1666, doi:10.1007/s11274-007-9413-8.
147. Gunes, S.; Tamburaci, S.; Dalay, M.C.; Deliloglu Gurhan, I. *In vitro* evaluation of *Spirulina platensis* extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1824–1832, doi:10.1080/13880209.2017.1331249.
 148. Ashgari, A.; Fazilati, M.; Latifi, A.M.; Salavati, H.; Choopani, A. A Review on Antioxidant Properties of Spirulina. *J. Appl. Biotechnol. Reports* **2016**, *3*, 345–351.
 149. Gabr, G.A.; El-Sayed, S.M.; Hikal, M.S. Antioxidant Activities of Phycocyanin: A Bioactive Compound from *Spirulina platensis*. *J. Pharm. Res. Int.* **2020**, *73–85*, doi:10.9734/jpri/2020/v32i230407.
 150. Bhatia, A.; Maisonneuve, J.-F.; Persing, D.H. *The Infectious Etiology of Chronic Diseases*; National Academies Press: Washington, D.C., 2004; ISBN 978-0-309-08994-4.
 151. Moon, S.H.; Roh, H.S.; Kim, Y.H.; Kim, J.E.; Ko, J.Y.; Ro, Y.S. Antibiotic resistance of microbial strains isolated from Korean acne patients. *J. Dermatol.* **2012**, *39*, 833–837, doi:10.1111/j.1346-8138.2012.01626.x.
 152. El-Sheekh, M.M.; Daboor, S.M.; Swelim, M.A.; Mohamed, S. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. *Iran. J. Microbiol.* **2014**, *6*, 112–119.
 153. Mala, R.; Sarojini, M.; Saravanababu, S.; Umadevi, G. Screening for Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Spirulina Platensis. *J. Cell Tissue Res.* **2009**, *1*, 1951–1955.
 154. Parsons, J.B.; Yao, J.; Frank, M.W.; Jackson, P.; Rock, C.O. Membrane Disruption by Antimicrobial Fatty Acids Releases Low-Molecular-Weight Proteins from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 5294–5304, doi:10.1128/JB.00743-12.
 155. Mendoza, N.; Hernandez, P.O.; Tying, S.K.; Haitz, K.A.; Motta, A. Antimicrobial susceptibility of Propionibacterium acnes isolates from acne patients in Colombia. *Int. J. Dermatol.* **2013**, *52*, 688–692, doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05403.x.
 156. Toyoda, M.; Morohashi, M. Pathogenesis of acne. *Med. Electron Microsc.* **2001**, *34*, 29–40, doi:10.1007/s007950100002.
 157. Smolen, J.S.; Aletaha, D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 276–289, doi:10.1038/nrrheum.2015.8.
 158. Chi, S.C.; Jun, H.W. Release Rates of Ketoprofen from Poloxamer Gels in a Membraneless Diffusion Cell. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 280–283, doi:10.1002/jps.2600800318.
 159. Bolla, P.K.; Clark, B.A.; Juluri, A.; Cheruvu, H.S.; Renukuntla, J. Evaluation of Formulation Parameters on Permeation of Ibuprofen from Topical Formulations Using Strat-M® Membrane. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 151–170, doi:10.3390/pharmaceutics12020151.

160. Younger, J.; McCue, R.; Mackey, S. Pain outcomes: A brief review of instruments and techniques. *Curr. Pain Headache Rep.* **2009**, *13*, 39–43, doi:10.1007/s11916-009-0009-x.
161. Boonstra, A.M.; Schiphorst Preuper, H.R.; Reneman, M.F.; Posthumus, J.B.; Stewart, R.E. Reliability and validity of the visual analogue scale for disability in patients with chronic musculoskeletal pain. *Int. J. Rehabil. Res. Int. Zeitschrift fur Rehabil. Rev. Int. Rech. Readapt.* **2008**, *31*, 165–169, doi:10.1097/MRR.0b013e3282fc0f93.
162. Downie, W.W.; Leatham, P.A.; Rhind, V.M.; Wright, V.; Branco, J.A.; Anderson, J.A. Studies with pain rating scales. *Ann. Rheum. Dis.* **1978**, *37*, 378–381.
163. Keen, H.I.; Hensor, E.M.A.; Wakefield, R.J.; Mease, P.J.; Bingham, C.O. 3rd; Conaghan, P.G. Ultrasound assessment of response to intra-articular therapy in osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)*. **2015**, *54*, 1385–1391, doi:10.1093/rheumatology/keu529.
164. Ashwlayan, V.D.; Kumar, A.; Verma, M.; Garg, V.K.; Gupta, S. Therapeutic Potential of *Calendula officinalis*. *Pharm. Pharmacol. Int. J.* **2018**, *6*, 149–155, doi:10.15406/ppij.2018.06.00171.
165. Parente, L.M.L.; Lino Júnior, R. de S.; Tresvenzol, L.M.F.; Vinaud, M.C.; de Paula, J.R.; Paulo, N.M. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012*, 1–7, doi:10.1155/2012/375671.
166. Dean T. Cobb The role of polyphenols in the prevention of ultraviolet light induced inflammation and immunosuppression: A key process in photocarcinogenesis. In *Polyphenols: Food Sources, Bioactive Properties and Antioxidant Effects*; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, 2014 ISBN 978-1631178573.
167. Stolarek, R.; Kula, P.; Kurmanowska, Z.; Nowak, D. Effect of various agonists on nitric oxide generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **1998**, *28*, 104–109, doi:10.1007/s005990050028.

9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/75/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Józsa Liza
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10069255

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Józsa, L.**, Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Sinka, D. Z., Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szabó, J., Kalló, G., Vasas, G., Bácskay, I., Fehér, P.: Formulation of Creams Containing Spirulina Platensis Powder with Different Nonionic Surfactants for the Treatment of Acne Vulgaris.
Molecules. 25 (20), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204856>
IF: 4.411
2. Jurca, T., **Józsa, L.**, Suci, R. N., Pallag, A., Marian, E., Bácskay, I., Muresan, M., Stan, R. L., Cevei, M., Cioară, F., Vicas, L., Fehér, P.: Formulation of Topical Dosage Forms Containing Synthetic and Natural Anti-Inflammatory Agents for the Treatment of Rheumatoid Arthritis.
Molecules. 26 (1), 1-26, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26010024>
IF: 4.411





További közlemények

3. Bácskay, I., Sinka, D. Z., **Józsa, L.**, Vasas, G., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Juhász, B., Szilvássy, Z.:
Formulation and investigation of turmeric extract and sodium benzoate loaded capsules.
Acta Pharm Hung. 91 (1), 11-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.33892/aph.2021.91.11-20>
4. **Józsa, L.**, Fehér, P.: Amit a Spirulina algáról tudni érdemes.
Gyógyszerészet. 2020 (3), 160-164, 2020.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,822

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,822**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.02.07.



10. Ábrajegyzék

- 1. ábra:** A *Spirulina platensis* mikroszkopikus képe. (forrás: <https://algae-lab.com/shop/living-algae/culture-sample/spirulina-platensis-live-algae-spiral-cells/> Letöltve: 2021. 12. 09.)
- 2. ábra:** A *Spirulina platensis* legfontosabb bioaktív vegyületeinek szerkezeti képletei. (saját ábra)
- 3. ábra:** Az acne vulgaris patogenezise (forrás: <https://healthhelmet.com/acne-pathogenesis> Letöltve: 2022. 02. 15.)
- 4. ábra:** A reumatoid artritisz patogenezise (forrás: <https://www.advancedrheumatology.net/service/rheumatoid-arthritis-treatment/services-callout-rheumatoid-arthritis/> Letöltve: 2022. 02. 15.)
- 5. ábra:** A cukorészterek általános kémiai szerkezete. (forrás: Szűts Angéla (2009) Cukorészterek olvadéktechnológiai alkalmazhatóságának vizsgálata című PhD értekezése, Szeged)
- 6. ábra:** A Transcutol (dietilén-glikol-monoetil-éter) kémiai szerkezete. (forrás: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethylene_glycol_monoethyl_ether Letöltve: 2021.10.21)
- 7. ábra:** A *S. platensis* tartalmú készítmények textúra-analízisének eredménye $24,5 \pm 0,5$ °C-on, nyomóerő (N)-ként meghatározva. (saját ábra)
- 8. ábra:** A fikocianin *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát szintetikus membránon keresztül az I-VIII összetételek esetében. (saját ábra)
- 9. ábra:** Az SP70 cukorészter (SP70), Tefose 63 (TFS), Poliszorbát 60 (P60), Cremophor A6 és A25 (CR), Transcutol HP (TC) és *Spirulina platensis* 0,50 (m/m) %-os oldataival kezelt HaCaT sejtek életképességének vizsgálata MTT festék segítségével. (saját ábra)
- 10. ábra:** Sejtéletképességi vizsgálat MTT-teszt segítségével HaCaT-sejteken az I–VIII formulációkkal történő 1 órás inkubálás után. (saját ábra)

- 11. (a-b) ábra:** Tefose 63-at (III, VII) és cukorészter SP70 felületaktív anyagot (IV, VIII) tartalmazó készítményekkel végzett elő (a) - és utókezelés (b) hatása az UVB sugárzásnak kitett HaCaT-sejtek SOD enzimaktivitására. (saját ábra)
- 12. ábra:** A *S. platensis*-t tartalmazó készítmények szabadgyökfogó aktivitása a hatóanyag nélküli készítményekkel összehasonlítva. (saját ábra)
- 13. (a-b) ábra:** A *C. acnes* (a) és a *S. aureus* (b) baktériumtörzsek sejttéteképessége a VII, VIII összetétellel (hatóanyaggal és kontrollként hatóanyag nélkül), a pozitív kontrollal (Aknemycin™) és az SPP-oldattal (0,25%) történő kezelés után. (saját ábra)
- 14. ábra:** A *C. officinalis* tartalmú készítmények textúra-analízisének eredménye $24,5 \pm 0,5$ °C-on. (saját ábra)
- 15. (a-f) ábra:** A kenőcs-, krém- és gélminták folyás-és viszkozitásgörbéi, a nyírófeszültség (Pa) (bal) és a viszkozitás (Pa·s) (jobb) a sebesség gradiens (nyírási sebesség) függvényében ábrázolva. (saját ábra)
- 16. ábra:** A diklofenák-nátrium *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. (saját ábra)
- 17. ábra:** A metil-szalicilát *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. (saját ábra)
- 18. ábra:** A kvercetin *in vitro* diffúziós profilja izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. (saját ábra)
- 19. ábra:** Sejtéteképességi vizsgálat (MTT teszt) az A-F összetételekkel és PBS-ben oldott 1 mg/ml, illetve 0,5 mg/ml koncentrációjú *C. officinalis* kivonattal kezelt HaCaT sejteken. (saját ábra)
- 20. ábra:** *In vitro* szabadgyök semlegesítő aktivitás hatóanyagokkal vagy anélkül, valamint a *C. officinalis* kivonat antioxidáns aktivitása (15 mg/ml). (saját ábra)
- 21. ábra:** A fájdalom mértékének alakulása (VAS skála pontszámok alapján értékelve). (saját ábra)
- 22. ábra:** A szinoviális membrán vastagságának ultrahangos vizsgálata (mm). (saját ábra)

11. Táblázatok jegyzéke

- 1. táblázat:** A kutatómunka során alkalmazott kísérletek sematikus ábrázolása a társszerzők közreműködésének megjelölésével. (saját táblázat)
- 2. táblázat:** *S. platensis* liofilizátumot tartalmazó o/v emulziós krémek összetétele. (saját táblázat)
- 3. táblázat:** *C. officinalis* kivonatot tartalmazó kenőcs (A) és krémek (B-C) összetétele. (saját táblázat)
- 4. táblázat:** *C. officinalis* tartalmú gélek minőségi és mennyiségi összetétele. (saját táblázat)
- 5. táblázat:** A *Spirulina platensis* tartalmú készítmények pH-értékei közvetlenül formulálás után, valamint 30 és 60 nap elteltével 21 °C-on történő tárolással. (saját táblázat)
- 6. táblázat:** Az azonos emulgeálószerrel formulált oldott és szuszpendált *Spirulina platensis* port tartalmazó összetételek kioldódási profiljának összehasonlítása a hasonlósági tényező (f_2) számításával. (saját táblázat)
- 7. táblázat:** A fikocianin felszabadulási sebessége és a diffúziós koefficiens értékek az egyes összetételekre vonatkoztatva (I-VIII.). (saját táblázat)
- 8. táblázat:** A körömvirág tartalmú formulációk pH értékei közvetlenül formulálás után, valamint 30 és 60 nap elteltével, 21 °C-on történő tárolás esetén. (saját táblázat)
- 9. táblázat:** A diklofenák-nátrium felszabadulási sebessége (k) és diffúziós együttható értékei (D) az A-F készítményekre vonatkoztatva. (saját táblázat)
- 10. táblázat:** A metil-szalicilát felszabadulási sebessége (k) és diffúziós együttható értékei (D) az A-F készítményekre vonatkoztatva. (saját táblázat)

12. Tárgyszavak

Spirulina platensis, *Calendula officinalis*, felületaktív anyagok, antioxidáns, külsőleges gyógyszerkészítmények, acne vulgaris, antibakteriális, gyulladásgátló, HaCaT sejtvonala

13. Keywords

Spirulina platensis, *Calendula officinalis*, surfactants, antioxidants, topical preparations, acne vulgaris, antibacterial, anti-inflammatory, HaCaT cell line

14. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Fehér Pálmának, akitől már TDK hallgatóként rengeteg segítséget és támogatást kaptam, melyek hatására diplomám megszerzése után a tudományos élet felé vettem az irányt. Őszintén hálás vagyok áldozatos munkájáért, folyamatos szakmai iránymutatásáért, illetve az élet minden területére kiterjedő baráti tanácsaiért, biztatásáért.

Hálás köszönettel tartozok Prof. Dr. Bácskay Ildikó dékánhelyettes és tanszékvezető asszonynak, hogy segítségével bekapcsolódhattam a Gyógyszertechnológiai Tanszéken zajló kutatásokba, emellett szakmai felkészültségével és a Gyógyszerésztudományi Karért végzett áldozatos munkájával mindannyiunk számára példát állít.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Vecsernyés Miklós Dékán Úrnak, hogy lehetőséget biztosított a tudományos munka végzésére a Gyógyszertechnológiai Tanszéken és bármikor számíthattam szakmai segítségére.

Köszönettel tartozom Dr. Lekli Istvánnak az elmúlt három évben nyújtott szakmai segítségéért, példamutatásáért és folyamatos támogatásáért.

Köszönetet mondok a Gyógyszertechnológiai Tanszék valamennyi munkatársának, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Fenyvesi Ferencnek, Dr. Váradi Juditnak, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Réti-Nagy Katalinnak, Dr. Nemes Dánielnek, Dr. Arany Petrának, Dr. Sinka Dávidnak, Dr. Pető Ágotának, Dr. Kósa Dórának, Dr. Rusznyák Ágnesnek, Dr. Haimhoffer Ádámnak, Dr. Klusóczki Ágnesnek, Pardi Sándornénak, Horányiné Körei Máriának, Szilágyi Erikának, Nagy Tündének és Bátoriné Pataki Brigittának, amiért munkájukkal és szakmai támogatásukkal hozzájárultak eredményeimhez. Köszönöm továbbá Vaszily Máriának, Lakatos Szilviának és Antalné Sipos Szilviának, hogy támogatták munkámat és bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért.

Ezúton is szeretném megköszönni az értekezésem alapjául szolgáló közlemények társszerzőinek a közös munka során nyújtott önzetlen segítségüket és támogatásukat. Köszönetet mondok Dr. Szabó Judit tanárnőnek és Dr. Kalló Gergőnek, akik lehetővé tették az antibakteriális vizsgálatok elvégzését, illetve segítették a munkámat szakmai tanácsaikkal. Köszönetet mondok az Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi munkatársának, akik a kutatómunka során felvetődött gyakorlati problémák megoldásában segítségemre voltak. Köszönettel tartozok Prof. Dr. Vasas Gábor tanszékvezető Úrnak és a Növényteni Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy szakmai tanácsaikkal segítették tudományos munkámat.

Köszönöm Prof. Dr. Jurca Tündének, továbbá a Nagyváradai Egyetem oktatóinak a gyógynövényekkel végzett analitikai vizsgálatokat és a közös publikációnk megjelenéséhez nyújtott támogatásukat. Köszönettel tartozok a Bäile Felix Recovery Hospital munkatársainak a humán klinikai vizsgálatban nyújtott segítségükért.

Dr. Csoma Eszternek, Prof. Dr. Tósaki Árpádnak és Prof. Dr. Gergely Lajosnak köszönöm a fáradthatatlan munkát, melyet a Doktori Iskolánkért végeznek.

Óriási hálával tartozok páromnak, Dr. Árvai Péternek önzetlen támogatásáért és szeretetéért, mely segített átvészelni a nehezebb pillanatokot.

Hálásan köszönöm testvéremnek és egyben legjobb barátnőmnek, Józsa Kamillának, hogy mindvégig mellettem állt és odaadóan támogatott.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Szüleimnek, hogy nyugodt és kiegyensúlyozott háttérrel biztosították a kutatómunkám elvégzéséhez és disszertációm megírásához, valamint kitartóan támogatnak és segítenek egész életemben.

Függelék

A kutatás az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 „Debrecen Venture Catapult Program” és EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázat keretében valósult meg.

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Az értekezés alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04 Big Data, Biotechnológia, Energetika, Terápiás célú fejlesztés, Vízrel kapcsolatos kutatások és a négy Lendület kutatócsoport továbbfinanszírozása és TKP2021-EGA-18) támogatta. A TKP2020-IKA-04 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A TKP2021-EGA-18 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 Komplex Egészségipari Multidiszciplináris Kompetencia Központ kialakítása a Debreceni Egyetemen új innovatív termékek és technológiák fejlesztése érdekében és a GINOP-2.3.3-15-2016-00021 „Gyógyszertechnológiai K+F fejlesztése a Debreceni Egyetemen” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A kutatás egy része a „Domus Hungarica Scientiarum et Artium” kutatási pályázattal és a Nagyváradai Egyetem Kutatási szerződésének (nr. 6/2016) támogatásával valósult meg.