

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Tapinarof-tartalmú nanoformulációk fejlesztése és vizsgálata a pikkelysömör terápiájában

Dr. Balogh Barbara Nóra

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2026

Tapinarof-tartalmú nanoformulációk fejlesztése és vizsgálata a pikkelysömör terápiájában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Balogh Barbara Nóra okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Zelkó Romána, MTA doktora
Dr. Berkó Szilvia, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Halmos Gábor Miklós, PhD
tagok: Prof. Dr. Zelkó Romána, MTA doktora
Dr. Berkó Szilvia, PhD
Prof. Dr. Szökő Éva, MTA doktora
Dr. Budai-Szűcs Mária, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar,
A032-es előadóterem

2026. november 13. 11:00

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	4
2.	Célkitűzés.....	7
3.	Anyagok és módszerek.....	8
4.	Eredmények.....	15
5.	Megbeszélés	20
6.	Összefoglalás.....	27
7.	Köszönetnyilvánítás	28
8.	Támogatás	30

1. Bevezetés

A pikkelysömör napjaink egyik legismertebb népbetegsége. A mai napig bár számos kutatás foglalkozott a pikkelysömör patofiziológiájával és kezelésével, ezek többsége elsősorban a szisztémás biológiai vagy a hagyományos helyi kezelésekre összpontosít. A betegek nagy része azonban igyekszik elkerülni a biológiai terápiák és a kortikoszteroidok használatát, így továbbra is nagy szükség van a jól tolerálható, hosszú távon is biztonságosan alkalmazható helyi kezelésekre. Ennek ellenére kevés kutatás foglalkozik az újabb helyi készítmények fejlesztésének kihívásaival és lehetőségeivel.

A pikkelysömör egy krónikus, immunmediált gyulladásos bőrbetegség, amely a világ népességének 1–3%-át érinti, vagyis több mint 100 millió embert világszerte. Bár elsősorban dermatológiai kórképnek tekinthető, ma már egyértelműen bizonyított, hogy számos társbetegséggel áll kapcsolatban. A pszoriázis növeli a szív- és érrendszeri betegségek, a metabolikus szindróma, az elhízás, a gyulladásos bélbetegségek és a pszoriázisos artritisz kialakulásának kockázatát. Emellett a látható bőrtünetek jelentős pszichológiai terhet jelentenek a betegek számára, amely gyakran szorongáshoz, depresszióhoz és az életminőség jelentős romlásához vezet. A betegség kialakulásában genetikai, környezeti és immunológiai tényezők egyaránt szerepet játszanak, míg fennmaradását komplex gyulladásos folyamatok biztosítják.

A páciensek többsége enyhe, lokalizált elváltozásokkal rendelkezik, amely nem igényel szisztémás kezelést. A helyi terápia döntő fontosságú ezeknek a betegeknek a kezelésében. Sajnos jelenleg nincs végleges gyógymód, azonban a tünetek enyhítésével javíthatjuk a betegek életminőségét. A jelenleg alkalmazott lokális terápiák közé tartoznak a kortikoszteroidok, a D-vitamin-analógok, a retinoidok és a kalcineurin-inhibitorok. Ezek a készítmények számos esetben hatékonyan csökkentik a gyulladást és a klinikai tüneteket, ugyanakkor hosszú távú alkalmazásuk különböző mellékhatásokkal járhat. A kortikoszteroidok bőratrofiát, striákat és tachyphylaxiát okozhatnak, míg a D-vitamin-analógok és retinoidok gyakran irritációval, erythemával vagy égő érzéssel járnak. A közepesen súlyos és súlyos esetek kezelésére alkalmazott szisztémás gyógyszerek és biológiai terápiák ugyan jelentős terápiás előrelépést jelentenek, azonban magas költségük és potenciális mellékhatásaik miatt nem minden beteg számára elérhetők vagy megfelelőek. Mindezek alapján továbbra is jelentős igény mutatkozik olyan innovatív, szteroidmentes lokális készítmények fejlesztésére, amelyek kedvező mellékhatásprofil mellett képesek hosszú távon is hatékony terápiát biztosítani.

A fokozott bőrpenetrációval rendelkező dermális gyógyszeradagolás fő akadálya a stratum corneum barrier tulajdonságai, amely az emberi test egyik leginkább áthatolhatatlan hámrétegének számít az exogén anyagok esetében. A bőr az emberi szervezet legnagyobb szerve, amely az

epidermiszből, a dermiszből és a hipodermiszből épül fel. Az epidermisz legkülső rétege, a stratum corneum elsődleges védelmi vonalként szolgál a külső környezeti hatásokkal szemben, ugyanakkor jelentős akadályt képez a gyógyszerhatóanyagok bőrön keresztüli bejutásával szemben is.

Pszoriázis esetén a bőrbarrier károsodik, ezért a hatóanyagok penetrációja csökkent. Ezek a problémák kémiai penetrációfokozók alkalmazásával minimalizálhatók. Használatuk azonban káros lehet, különösen krónikus állapotokban, mivel sokuk irritáló hatású. Ráadásul az újabb hatóanyagok körülbelül 40%-a hidrofób jellegű, mint például a tapinarof. Ezeknek a rosszul oldódó anyagoknak a bejuttatása szintén kihívást jelent a gyógyszerbejuttatás szempontjából. Ezért szükséges egy olyan innovatív dermális bejuttatási rendszer kifejlesztése, amely kémiai permeációfokozók alkalmazása nélkül is javítja a hatóanyag bőrön belüli penetrációját.

Az elmúlt évtizedben a nanotechnológia fejlődése új távlatokat nyitott meg a helyi gyógyszeradagolásban. A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek képesek javítani a hatóanyagok oldhatóságát, stabilitását és biohasznosulását, miközben elősegíthetik azok bőrön keresztüli penetrációját. Különösen nagy jelentőséggel bírnak a rosszul oldódó, lipofil hatóanyagok esetében, amelyek hagyományos formulációkban gyakran korlátozott terápiás hatékonyságot mutatnak.

A nanoemulziók széles körű lehetőségeket kínálnak a helyi gyógyszeradagolás terén, azonban alacsony viszkozitásuk korlátozza a bőrön való alkalmazásukat. A viszkozitás növelése céljából alkalmazott különböző gélesítőszerkezetek lehetővé teszik a nanoemulziók gélmátrixba történő integrálását, amelynek eredményeként nanogélek jönnek létre, elősegítve a készítmények helyi alkalmazhatóságát. Egyedülálló fizikai-kémiai tulajdonságaiknak köszönhetően javítják a hatóanyagok oldhatóságát és dermális penetrációját, valamint a bőrt is hidratálják. Továbbá szabályozott hatóanyag-felszabadulást is biztosítanak és csökkentik a szisztémás mellékhatásokat, melyek kedvezőek a pikkelysömörhöz hasonló krónikus gyulladásos bőrbetegségek esetén. Míg a nanotechnológián alapuló hatóanyag-beviteli rendszerek egyre inkább teret nyernek a dermatológiában, a tapinarof nanogél készítményekbe való beépítése még új és feltáratlan terület.

Kísérleti munkám hatóanyagaként a tapinarofot választottam, mivel ez az új, ígéretes lokális szer a pikkelysömör patofiziológiájában kulcsfontosságú útvonalakat céloz meg. A tapinarof egy aril-hidrokarbon receptor (AhR) agonista, amely új hatásmechanizmust képvisel a pikkelysömör kezelésében. Az AhR receptor aktiválása hozzájárul a bőr immunológiai egyensúlyának helyreállításához, a gyulladásos citokinek termelésének csökkentéséhez, valamint a bőr barrierfunkciójának javításához. A receptor aktivációja révén mérséklődhet az IL-17 és IL-23 által közvetített gyulladásos válasz, amely a pikkelysömör kialakulásának egyik legfontosabb

molekuláris mechanizmusa. Emellett a tapinarof antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkezik, amelyek szintén szerepet játszhatnak a gyulladásos folyamatok mérséklésében.

A terápiás hatékonyság eléréséhez azonban nemcsak a hatóanyag gyulladáscsökkentő potenciálja szükséges, hanem annak a bőr mélyebb rétegeibe történő hatékony bejuttatása, valamint a megfelelő biológiai hozzáférhetőség biztosítása is. A hidrogélek és nanohordozók előnyös tulajdonságait ötvöző nanogélek lehetőséget kínálnak a stabil hatóanyag-hordozásra és a javított bőrpenetrációra. Továbbá, a mellékhatások minimalizálásával és a szükséges adagolási gyakoriság csökkentésével javíthatják a betegadherenciát. Mindezek alapján a tapinarof-tartalmú nanogélek ígéretes új megközelítést jelenthetnek a pikkelysömör helyi kezelésében, és hozzájárulhatnak olyan korszerű terápiás rendszerek fejlesztéséhez, amelyek egyszerre biztosítanak megfelelő hatékonyságot, biztonságosságot és betegbarát alkalmazhatóságot.

2. Célkitűzés

Kutatásom célja innovatív nanogél formulációk kifejlesztése volt, amelyek javítják a tapinarof biohasznosulását, fokozzák a bőrön keresztüli penetrációját, ezáltal hatékonyabb terápiás választ biztosítva pikkelysömör kezelésében. Munkám során a készítmények részletes gyógyszer technológiai és biológiai jellemzésére fókuszáltam, különös tekintettel a fizikai-kémiai tulajdonságokra, a biokompatibilitásra és a pszoriázis modellrendszerben való terápiás potenciáljuk vizsgálatára.

A **kísérletek első szakaszában** a tapinarof-tartalmú nanogél formulációk fejlesztésére és gyógyszerforma vizsgálataira került sor. Az optimális összetételek kialakítása után textúra- és reológiai méréseket végeztem, mivel ezek fontos paraméterek a kenhetőség és a hatóanyag biológiai hozzáférhetősége szempontjából. A készítmények méreteloszlását dinamikus fényszórásos módszerrel (DLS) vizsgáltam. Továbbá a biokompatibilitást és a sejtekre gyakorolt hatást HaCaT sejtvonalon MTT assay és sebzáródási (wound healing) teszt segítségével értékeltem fibroblaszt sejteken. Ezzel párhuzamosan a tapinarof in vitro felszabadulását Franz-diffúziós módszerrel értékeltem.

A **kísérletek második szakaszában** a kifejlesztett nanogélek gyulladáscsökkentő hatását és molekuláris hatásmechanizmusát vizsgáltam egy IMQ-indukált HaCaT–THP-1 ko-kultúras pszoriázis modellen, amely megbízhatóan utánozza a betegség gyulladásos mikrokörnyezetét in vitro. A kísérletek során ELISA vizsgálatokat végeztem a citokinprofil meghatározására, valamint qPCR-rel a gyulladásban szerepet játszó gének expresszióját mértem. Ezen kívül a nanoformulációk gyulladásos sejtválaszokra gyakorolt hatását valós idejű sejtanálízissel (RTCA) és sebzáródási teszt segítségével vizsgáltam. Végül a THP-1 monociták NF- κ B útvonalának aktivációját a p65 transzlokáció mértékének meghatározásával végeztem.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

A tapinarof, a Triacetin, a Tween 80, a DMEM táptalaj, a PBS, az RPMI 1640 táptalaj, a DMSO, a Trypan Blue festék és a tripszin-EDTA a Sigma-Aldrich-től (St. Gallen, Svájc) származik. A 96%-os etanolt, a 85%-os glicerint és az olajsavat a Molar Chemicals Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A Kollisolv PEG 400-at és a Kolliphor EL-t a BASF cégtől (Ludwigshafen, Németország) vásároltuk. A Carbopol 940 és Carbopol 934 a B.F. Goodrich Chemical Company-től (Charlotte, NC, USA) származik, a Trietanolamin pedig a VWR Chemicals-től. A Labrafil M és Transcutol HP-t a Gattefossé (Lyon, Franciaország) biztosította. Az imikimodot a MedChemExpress-től szereztük be a Bio-Kasztel Kft. (Budapest, Magyarország) közvetítésével.

3.2. Módszerek

3.2.1. Tapinarof-tartalmú nanogélek előállítása

Első sorban a tapinarof mennyiségét Transcutol HP-ban és etanolban oldottuk fel. Az olajos felületaktív anyagokat (Labrafil M, Triacetin, Tween 80, Kolliphor EL és olajsav) a vizes felületaktív anyagokkal (Transcutol HP, etanol és PEG 400) kombinálva alkalmaztuk a stabilitás és a textúra javítása, valamint a hatóanyag bőrön keresztüli behatolásának elősegítése érdekében. A segédanyagokat mágneses keverővel kevertettük az olajos fázis előállításához. A mágneses keverő fordulatszáma 400 fordulat/perc volt 15 percig. Ezt követően hozzáadtuk a vizes fázist a SNEDDS előállításához, majd 5 percig vortexeltük. Gélképző anyagként karbopol került hozzáadásra. A karbopol gélek előállításához a szükséges mennyiségű karbopol port kis mennyiségű tisztított vízben diszpergáltuk, és 24 órán át állni hagytuk, hogy egyenletesen megduzzadjon. A nanogél I.-hez nedvesítőként glicerint került hozzáadásra. Ezután a SNEDDS-eket cseppenként adagoltuk a gélmatrixhoz, miközben a mágneses keverőt 500 fordulat/perc sebességgel működtettük. A nanoméretű tartomány eléréséhez a gélesedés előtt UP200Ht (200 W, 26 kHz) kézi homogenizátort alkalmaztunk. A gélek pH-értékét a bőr pH-jához igazítottuk néhány csepp trietanolamin hozzáadásával, így homogén szerkezetű nanogélt hozva létre

3.2.2. Fizikai-kémiai vizsgálatok

3.2.2.1. Részecskeméret meghatározás

A részecskeméret elemzéshez Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical; Malvern, Egyesült Királyság) készüléket használtunk, hogy kimutassuk, hogy a tapinarof-tartalmú nanogélek gélképződés után sem veszítik el stabil részecskeméretüket. Az elemzés előtt a készítményeket

1000-szeresére hígítottuk tisztított vízzel a többszörös fényszórás elkerülése és a DLS mérés pontosságának biztosítása érdekében. A mintákat 5 percig 25 °C-on egyensúlyba hoztuk, majd 3 mérést végeztünk, amelyek mindegyike 13 futtatásból állt.

3.2.2.2. Reológiai jellemzés

Reológiai méréseket is elvégeztünk a reológiai tulajdonságok meghatározása érdekében RheolabQC rotációs reométer (Anton Paar, Graz, Ausztria) segítségével. A készítmények viszkozitás- és folyásgörbéit RheoPlus Rheometer szoftver (32 V3.10 21003407-33024) segítségével értékeltük ki. A készítmények viszkozitási görbéit kontrollált nyírási sebességgel végzett rotációs vizsgálatokkal értékeltük. 30 g készítményt töltöttünk a reométer koncentrikus hengeres mérőrendszerének csészéjébe. Mind a viszkozitást, mind az folyást minden gél esetben szobahőmérsékleten (24 °C) és testhőmérsékleten (35 °C) is megmértük. A nyírási sebességet először 0,01 s⁻¹-ről 50 s⁻¹-re emeltük, majd visszacsökkentettük 0,01 s⁻¹-re a hiszterézis jelenségének vizsgálata céljából.

3.2.2.3. Textúra analízis

A kompressziós vizsgálat során a nanogélek ellenállását CT3 Textúra Analizáló készülék (Brookfield, Middleboro, MA, USA) segítségével határoztuk meg. Az elemzéshez a vizsgált készítménnyel töltött tégelyt kb. 5,50 cm-rel a textúra analizátor szondája alá helyeztük. A mérés előtt a szondát 1 mm/s sebességgel engedték le a minta felületére. A textúraelemző készülék a vizsgálat során TA5 hengeres típusú szondával (12,7 mm átmérőjű és 35 mm hosszú) volt felszerelve. A nyomásvizsgálatot a következő beállítási paraméterekkel végeztük el: sebesség (0,50 mm/s), trigger erő (4,0 g) és csúcspont (10,0 mm). A nyomásvizsgálatokat szobahőmérsékleten (25 °C) végeztük. Az érzékelőre ható erőt a Texture Pro CT szoftver 1.3 verziójával (Brookfield Engineering Laboratories, MA, USA) rögzítettük. Minden mérést háromszor ismételtünk meg. Végül meghatároztuk az átlagokat és a szórásokat.

3.2.2.4. In vitro kioldódási vizsgálat

A tapinarof in vitro felszabadulását a különböző összetételű gélekből Franz diffúziós cella (Teledyne Hanson Research, Chatsworth, CA, USA) segítségével határoztuk meg. A cellulóz-acetát membránt az akceptor és a donor fázisok közé helyeztük. A vizsgált anyag

koncentrácioprofilját előre meghatározott időpontokban vett minták alapján határoztuk meg. 500 mg tömegű mintákat helyeztünk mesterséges cellulóz-acetát membránra (0,5 µm pórusméret) donor fázisként, és pH = 5 puffert választottam akceptor fázisként a bőr pH-jának imitálására. A receptor fázist 32 °C-on tartottuk. A membránt a vizsgálat előtt 15 percig izopropil-mirisztáttal előkezeltük a bőr lipofil tulajdonságának jellemzése érdekében. A mágneses keverő forgási sebessége 450 fordulat/perc volt. A mintákat 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 és 300 perc elteltével vettem a receptor fázisból. Az analitikai elemzés spektrofotométerrel történt. A diffundált hatóanyag mennyiségét százalékban fejeztük ki és az idő függvényében ábrázoltuk.

3.2.3. In vitro sejtes vizsgálatok

3.2.3.1. Monokultúrák vizsgálatok

3.2.3.1.1 Sejtéletképességi vizsgálat HaCaT sejteken

A SNEDDS-ekhez használt segédanyagok és hatóanyagok biztonságosságát MTT-tesztel vizsgáltuk meg. A citotoxicitás igazolására HaCaT sejt vonalakon végeztünk a sejt életképesség vizsgálatot. A sejteket 96-lyukú plate-re szélesztettünk 10.000 sejt/lyuk sűrűséggel a kísérlet elvégzéséhez. 7 napig növekedni hagytuk őket, hogy teljesen benépesítsék a lyuk membránját. Eltávolítottuk a médiumot a sejtek felszínéről, majd PBS-sel történő mosás után 200 µl/lyuk mintaoldatot vittünk fel a sejtekre. Ezt a rövid távú vizsgálatoknál 30 perces, míg hosszútávú vizsgálatok esetében 24 órás inkubáció követte. Ezt követően a mintákat eltávolítottuk, és 5 mg/ml koncentrációjú MTT festékoldatot (tetrazolium-bromid) adtunk a sejtekhez. Majd a sejteket 3 órán át inkubáltuk 37°C-on. Az életképes sejtek a sárga, vízdékony tetrazolium-bromidot lila formazán kristályokká alakítják. Az inkubálás végén a formazán csapadékot sósavas izopropanolban (25:1) oldottam fel. Ezután a minták abszorbanciáját spektrofotométerrel (Fluostar Optima) határoztuk meg. Az eredmény egyenesen arányos az életképes sejtek számával.

3.2.3.1.2 Sebgyógyulási vizsgálat fibroblaszt sejteken

A fibroblaszt sejteket 10.000 sejt/lyuk sűrűséggel szélesztettük 12 lyukú kamrába (Thermo SC NUNC, Roskilde, Dánia). A konfluens monorétegeket 0,5% FBS-t tartalmazó DMEM-ben 2 órán át szinkronizáltuk. Egy standard 200 µL-es pipettahegy segítségével 500–800 µm széles csíkot távolítottunk el a sejtekből a lyukban. A sebkultúrát PBS-sel mostuk, hogy eltávolítsuk a nem letapadó, felesleges sejteket. Majd a monorétegeket a szabad tapinaroffal, vagy az üres gélekkel, vagy a tapinarofot tartalmazó gélekkel (5, 10, 20, 40 µg/ml) kezeltük. A

sebterületet 0 és 24 óra elteltével optikai mikroszkóppal (Axiovert, ZEISS, Jena, Németország) megfigyeltük és lefényképeztük.

3.2.3.2. Ko-kultúrák vizsgálatok

3.2.3.2.1 Valós idejű sejtanalízis (RTCA)

A kísérlet során az imikimod leghatékonyabb koncentrációját alkalmaztuk, amelyet korábban Váradi és munkatársai határoztak meg. A kísérlet célja az volt, hogy meghatározzuk a tapinarofot tartalmazó nanogélek optimális koncentrációját, amelyet további kísérletekhez használhatunk. A tesztminták sejtproliferációra gyakorolt hatását, imikimod jelenlétében és hiányában egyaránt, az xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) segítségével követtük nyomon, amely lehetővé teszi a sejtek proliferációjának és életképességének valós idejű monitorozását. A teszt során az E-plate 16-lyukú lemezt alkalmaztunk, mely arany mikroelektrodákkal van bevonva az elektromos impedancia méréséhez. Az E-plate lemezbe 10.000 HaCaT sejtet vetettünk lyukanként. Hat óra elteltével, a sejtek megtapadását követően, 1000 THP-1 sejtet adtunk minden lyukhoz a ko-kultúra kialakítása érdekében. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban tenyésztettük. 24 óra elteltével a sejteket tapinarof, tapinarof-tartalmú nanogélek, illetve az üres nanogélek sorozatos hígításaival kezeltük (0,1 µM, 1 µM és 10 µM). Negatív kontrollként tenyésztőközeget alkalmaztunk, míg pozitív kontrollként imikimodot tartalmazó tenyésztőközeget használtunk. A sejtszaporodást 96 órán keresztül követtük nyomon, az adatok rögzítése 30 percenként történt. Az eredményeket a RTCA szoftver által számított normalizált sejtindex értékeként fejeztük ki.

3.2.3.2.2 Sebgyógyulási vizsgálat ko-kultúra modellen

In vitro sebgyógyulási vizsgálatot végeztünk a sejtek proliferációjának és migrációjának értékelésére a ko-kultúra modellben. A karcolás létrehozásához egy 24-lyukú lemezt alkalmaztunk, amely sebképző betétekkel (0,5 mm szélesség) volt ellátva. HaCaT sejteket vetettünk be az egyes betétek két rekeszébe 280.000 sejt/üreg sűrűséggel, így 140.000 sejt/rekesz sűrűséggel. A THP-1 sejteket 6 óra elteltével 28.000 sejt/üreg sűrűséggel adtuk hozzá. A kezelés teljes időtartama alatt DMEM táptalajt alkalmaztunk. A ko-kultúrát 37 °C-on inkubáltuk, 24 óra elteltével a betéteket óvatosan eltávolítottuk a karcolási terület kialakítása érdekében. A nem tapadó THP-1 sejtek megőrzése érdekében a kezelés előtt nem végeztünk mosási lépést (pl. PBS-sel). Ezt követően a sejteket 10 µM tapinaroffal imikimod jelenlétében vagy anélkül, 10 µM tapinarofot tartalmazó nanogéllal imikimod jelenlétében vagy anélkül, valamint 10 µM hatóanyagot nem tartalmazó nanogéllal kezeltük. A karcolási területet 0, 6, 12

és 24 óránál fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk és dokumentáltuk.

A kísérletet 24 óra elteltével lezártuk. A lyukakat PBS-sel mostuk, majd a sejteket fixáló oldattal 15 percig rögzítettük szobahőmérsékleten. Egy második PBS-es mosást követően a sejteket Trypan Blue festékkel festettük 15 percig szobahőmérsékleten. A képeket Zeiss Axioscope A1 mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Németország) készítettük.

A sejtek migrációs sebességét a felvett képek alapján, az idő függvényében mért részarádás mennyiségi meghatározásával állapítottuk meg. A végső ponton (24 óra) mért karcolási területet összehasonlítottuk a kezdeti karcolás területével (0 óra), és a migrációs sebességet a részarádás százalékos arányaként számítottuk ki.

3.2.3.2.3 ELISA vizsgálatok

ELISA vizsgálatokat szintén végeztünk a HaCaT–THP-1 ko-kultúra modellen. A kísérlethez egy 12-lyukú Transwell rendszert használtunk, amely 0,4 µm pórusméretű, permeábilis polikarbonát membránnal rendelkezett. A bazális kamrába 1500 µL DMEM került, míg a HaCaT sejteket az apikális kamrába vetettük 300.000 sejt/lyuk sűrűségben.

6 óra elteltével THP-1 sejteket is hozzáadtunk az apikális kamrához 30.000 sejt/lyuk sűrűséggel, hogy létrehozzuk a ko-kultúrát. A sejteket 37 °C-on 3 napig inkubáltuk, hogy megközelítsék a 100%-os konfluenciát. Majd a következő formulációkkal kezeltük: 10 µM tapinarof imikimod jelenlétében vagy anélkül, valamint 10 µM tapinarofot tartalmazó nanogél imikimod jelenlétében vagy anélkül. Negatív kontrollként kezeletlen tenyésztőközeget alkalmaztunk, míg pozitív kontrollként 1 µM imikimodot használtunk. 24 órás kezelés után mintákat gyűjtöttünk az apikális kamrából. A TNF-α, IFN-γ, IL-17A és IL-23 koncentrációját a felülúszókból, ELISA kitek segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

3.2.3.2.4 Génexpresszió mérése qPCR-rel

A qPCR vizsgálathoz lyukanként 500.000 HaCaT sejtet vetettünk 12-lyukú lemezekbe. Miután a sejtek 6 órán keresztül 37 °C-on megtapadtak, minden lyukhoz 50.000 THP-1 sejtet adtunk 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban történő inkubálás mellett. A ko-kultúrákat azonos körülmények között 72 órán keresztül tartottuk fenn. Három nap elteltével a sejteket 1 µM imikimoddal, 10 µM tapinarofot tartalmazó nanogéllal, 10 µM tapinaroffal, illetve ezek kombinációjával kezeltük.

A 24 órás kezelés után összegyűjtöttük a nem adhezív THP-1 sejteket tartalmazó tenyésztőközeget. A sejtszuszpenziót centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk, a sejtpelletet pedig PBS oldattal mostuk. Ezzel egy időben a lemezen maradt letapadt HaCaT

sejteket is PBS-sel mostuk. Ezt követően 1 ml TRIzol reagenst (Invitrogen, Cat. No. 15596026) adtunk közvetlenül minden lyukhoz a letapadt sejtek líziséhez. A THP-1 sejt pelletet a TRIzol lízátumban reszuszpendáltuk, majd az egyesített mintákat 1,5 ml-es RNáz-mentes mikrocentrifuga csövekbe (Eppendorf, Invitrogen, Cat. No. F23488) helyeztük a teljes RNS izolálásához. A sejt lízist követően kloroformot adtunk a mintákhoz a fázisszétválasztás érdekében, majd intenzív vortexelés után a mintákat maximális fordulatszámon 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. A felső fázist óvatosan eltávolítottuk és izopropil-alkohollal kevertük össze. Ezt követően ismét centrifugáltuk a mintákat maximális fordulatszámon 4 °C-on 10 percig. Majd eltávolítottuk a felülúszót, és az RNS-pelletet 70%-os etanollal mostuk. Az ismételt centrifugálást követően (maximális fordulatszámon, 4 °C-on, 5 percig) a felülúszót eltávolítottuk, a pelletet megszáritottuk, végül RNáz-mentes vízben oldottuk fel. Az RNS-koncentrációkat NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg, valamint az RNS minőségét az ND-1000 Software V3.3.0 szoftver segítségével elemeztük.

A komplementer DNS (cDNS) szintéziséhez TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit készletet (Applied Biosystems, USA) alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően.

A Tnf- α , Ifn- γ , Il-17a és Il-23 génexpressziós szintjeit PrimePCR SYBR Green Assays alkalmazásával vizsgáltuk a gyártó utasításai szerint. Endogén kontrollként a humán GAPDH-t használtuk. A relatív génexpressziós szinteket kvantitatív valós idejű PCR-rel határoztuk meg a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System készülék (Bio-Rad) segítségével. A PCR program a következő lépésekből állt: 95 °C-on 2 perc, majd 40 ciklus 95 °C-on 5 másodpercig és 60 °C-on 30 másodpercig. Minden mérést háromszor végeztünk el. A normalizált génexpressziót a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számítottuk ki.

3.2.3.2.5 NF- κ B transzlokáció

Az NF- κ B jelátviteli út aktivációjának vizsgálatához a p65 alegység nukleáris transzlokációját immunfluoreszcens festéssel elemeztük a THP-1 sejtekben. A sejtek lemezre történő felvitele előtt steril üveg fedőlemezeket helyeztünk a 16-lyukú lemez üregeibe. A THP-1 sejteket RPMI 1640 tápközegben szuszpendáltuk, és 20 ml sejtsuszpenzióhoz 2 μ l 100 ng/ml PMA oldatot adtunk a differenciálódás indukálása érdekében, mivel a PMA-kezelés elősegíti a THP-1 monociták makrofágszerű, adhezív sejtekké történő differenciálódását, ami megkönnyíti a sejtek rögzítését és a megbízható immunfluoreszcens analízist. Végül 50.000 sejt/lyuk sűrűségben vetettük a sejteket. Ezt követően 30 órán át 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú légkörben inkubáltuk őket. Az inkubálás után a PMA-tartalmú táptalajt eltávolítottuk, és PMA-mentes

RPMI 1640 tenyésztőközegre cseréltük. A sejteket további 24 órán át azonos körülmények között inkubáltuk. Ezután a táptalajt eltávolítottuk és friss RPMI 1640 közeggel helyettesítettük, majd a sejteket 10 μ M tapinarof-tartalmú nanogéllal, 10 μ M tapinaroffal és 10 μ M tapinaroffal kezeltük meg. 24 órás kezelés után 1 μ M imikimodot adtunk a táptalajhoz a gyulladás indukálása érdekében, majd a sejteket további 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezután a sejteket kétszer mostuk 500 μ l PBS-sel. A sejtek rögzítését 4% PFA oldattal végeztük 15 percig szobahőmérsékleten. A permeabilizációt 0,1% Triton X-100 oldattal végeztük, hogy megkönnyítsük az antitestek hozzáférését a sejtmaghoz. A nem specifikus kötődések blokkolására 5%-os FBS oldatot alkalmaztunk. A sejteket ezután 1 órán át Alexa-Fluor 488 konjugált NF- κ Bp65 (F-6) antitesttel (Cat. No. sc-8008 AF488) (2 μ g/ml) inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-sel. A sejtmag festését 1:10.000 hígítású magfestéssel végeztük 10 percig, majd eltávolítottuk a festéket, végül még kétszer mostuk PBS-sel. Végezetül, az üveg fedőlemezeket tárgylemezekre rögzítettük.

A fluoreszcens képalkotást Zeiss Axioscope A1 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) és Zeiss Immersol™ 518F immersziós olajjal (Cat. No. 201006) végeztük. A képelemzést ZEN 2012 szoftverrel (v3.8.99.07000, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Németország) végeztük.

4. Eredmények

4.1. Fizikai-kémiai vizsgálatok

4.1.1. Részecskeméret meghatározás

Meghatároztuk mindkét összetétel részecskeméretének és polidiszperzitási indexének eloszlását. A dinamikus fényszórásos (DLS) mérések alapján mindkét kompozíció a nanométerű tartományban van. Ennek elérése érdekében a géleket gélesedés előtt manuális ultrahangos kezelésnek vetettük alá. A nanogél II. esetében 50%-os amplitúdó 2 percre történő alkalmazása volt elegendő a kívánt nanométer eléréséhez, amely a gélesedés után is megmaradt. A nanogél I. esetében ez az idő nem volt elegendő. Emiatt az időt 3 percre növeltük, ami már nanométerű géleket eredményezett. Ezenfelül minden formuláció polidiszperzitási indexe alacsony értékeket mutatott.

4.1.2. Reológiai vizsgálatok

A reológiai tulajdonságokat annak meghatározása céljából vizsgáltuk, hogy melyik készítmény a legalkalmasabb helyi alkalmazásra, mivel a viszkozitás jelentősen befolyásolja a félszilárd formulák kenhetőségét, valamint a beépített hatóanyagok biológiai hozzáférhetőségét is. A készítmények reológiai viselkedésének jellemzésére a viszkozitás és a folyás változását használtuk, amelyet a nyírási sebesség függvényében vizsgáltuk. Az eredmények szerint a gélek viszkozitása a mechanikai hatás (nyírási sebesség) nagyságától és idejétől függ. Kezdetben a viszkozitás magas, majd a nyírási sebesség növekedésével fokozatosan csökken, ami pszeudoplasztikus viselkedésre utal. A nyírófeszültség növekedése minden esetben növekvő nyírási sebességet eredményezett, ami azt jelzi, hogy a nanogélek deformációjához nagyobb erő szükséges. Továbbá a görbék egyértelműen mutatják, hogy a nanogél I. nagyobb viszkozitással és meredekebb folyásgörbével rendelkezik, mint a nanogél II. A 24 °C-on végzett mérések valamivel magasabb viszkozitási értékeket mutattak, mint a 35 °C-on mért eredmények. Tehát készítmények viszkozitása a hőmérséklet növekedésével csökken. A kísérlet során a nyírási sebességet először növeltük, majd csökkentettük a hiszterézis jelenségének vizsgálata céljából. A felfelé és lefelé mutató görbék gyakorlatilag egybeesnek, tehát a kísérleti körülmények között nem volt jellemző hiszterézis. A vizsgált minták belső szerkezete nyírófeszültség hatására nem mutatott maradandó változást. Hiszterézis hiányában a gélek kevésbé tixotróp viselkedése azt tükrözte, hogy a nyíróerő eltávolítása után képesek voltak visszanyerni eredeti szerkezetüket.

4.1.3. Textúra analízis

A vizsgált formulációkat textúraanalízisnek is alávetettük. Az eredmények alapján a minták nem mutattak ellenállást. Mindkét gél konzisztenciája megfelelőnek bizonyult gyógyszerformulálási szempontból, mivel az alacsony konzisztencia elősegíti a hatóanyag felszabadulását. Az alacsony mechanikai ellenállás kedvező tulajdonság a bőrön történő alkalmazás szempontjából.

4.1.4. In vitro kioldódási vizsgálat

A formulációk diffúziós profilját egy izopropil-mirisztáttal impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül vizsgáltuk. A membránon átjutott tapinarof átlagos kumulatív százalékos arányát az idő függvényében határoztuk meg. A permeációs vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a hatóanyag azonnal elkezdett felszabadulni, és az oldódási görbe folyamatos emelkedést mutatott. Az eredmények alapján a nanogél II. jobb teljesítményt mutatott a másik formulációhoz képest: 5 óra elteltével a tapinarof 81%-a jutott át a membránon, ami jelentősen magasabb, mint a nanogél I. esetében megfigyelt 52%. Ezen kívül a nanogél II. fluxusa $0,1935 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ volt, míg a nanogél I. fluxusa alacsonyabb, $0,1255 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ értéket mutatott. A kinetikai modellek szerinti illeszkedéshez tartozó korrelációs együtthatók a nulladrendű és elsőrendű modellek esetében kerültek meghatározásra. Az 1-hez közelebb eső korrelációs együtthatók (R^2 értékek) jobb illeszkedést jeleznek az adott modellhez. Az eredmények alapján mindkét gél jól jellemezhető a null- és elsőrendű kinetikai modellekkel.

4.2. In vitro sejtes vizsgálatok

4.2.1. Monokultúrás vizsgálatok

4.2.1.1. Sejtéletképességi vizsgálat HaCaT sejteken

A citotoxicitási vizsgálatokat minden esetben HaCaT sejteken végeztük. A kísérletet a készítmény különböző segédanyagaival végeztük, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy azok nem toxikusak a sejtekre. A kísérletben a Labrafil M-et, a Transcutol HP-t és a Tween 80-at vizsgáltuk, amelyeket különböző koncentrációkban oldottunk PBS-ben. Ezen kívül a hatóanyagot és a nanogél formulációkat tapinaroffal és anélkül 9%-os NaCl oldatban oldottuk fel különböző koncentrációban. A vizsgálat során pozitív kontrollként a Triton-X 100-at, negatív kontrollként pedig a PBS-t választottuk. A sejtek életképességét a negatív kontrollhoz viszonyítva, százalékos formában fejeztük ki.

A vizsgálatok eredményei alapján csak a Tween 80 nem bizonyult biztonságosnak az alkalmazott koncentrációkban. Mivel azonban elősegítik a hatóanyag felszabadulását és jobb penetrációját, használatuk megfontolandó. A további vizsgálati minták biztonságosnak és nem toxikusnak bizonyult, mivel a sejtek életképességének értékei minden esetben 70% felett voltak. A tapinarof és a különböző nanogélek HaCaT sejtek életképességére gyakorolt hatását rövid távú (30 perces inkubációs idő) és hosszú távú (24 órás inkubációs idő) vizsgálatokkal is elemeztük. A rövid távú vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy az összes készítmény, beleértve a tapinarofot önmagában, nem volt toxikus a HaCaT sejtekre. A hosszú távú értékelések során hasonló értékeket kaptunk. Egyes kombinációk esetén azonban 24 órás inkubációt követően az életképesség enyhe csökkenése volt megfigyelhető. Összességében mindkét vizsgálat azt mutatja, hogy a tapinarof és a nanogél formulációk biztonságosan alkalmazhatók HaCaT sejteken.

4.2.1.2. Sebgyógyulási vizsgálat fibroblaszt sejteken

A tapinarof-tartalmú nanogélek fibroblaszt sejt kultúrában történő migrációra gyakorolt hatását karcolásos sebgyógyulási teszttel vizsgáltuk. 40 µg/ml koncentráció alkalmazása mellett, 24 órás kezelés után értékeltük a karcolás záródásának mértékét. A vizsgált hatóanyagot tartalmazó és nem tartalmazó formulációk hatását a szabad tapinaroffal kapott záródási arányhoz viszonyítva értékeltük. A nanogél II.-vel kezelt sejteknél kevesebb fibroblaszt volt a karcolás területén belül, mint az üres nanogéllal kezelt sejteknél. Az üres készítmények esetében a karcolás területének teljes záródása volt megfigyelhető. A hatóanyaggal töltött nanogél I. hatására a fibroblaszt sejt kultúrában szintén megfigyelhető volt a sejtek záródása 24 órán belül. Röviden, az eredmények arra utalnak, hogy a tapinarof beépítése a nanogélbe II.-be növeli annak antiproliferatív és antimigrációs aktivitását.

4.2.2. Ko-kultúrás vizsgálatok

4.2.2.1. Valós idejű sejtanalízis (RTCA)

A tapinarof és a nanogél-alapú adagolórendszerek potenciális pikkelysömör elleni hatását valós idejű sejtelelemzéssel értékeltem a ko-kultúra modellen. Az IMQ által indukált gyulladásos környezet fokozott sejtszaporodást eredményezett, összhangban a szakirodalomban korábban leírtakkal. Maga a szabad tapinarof mérsékelten csökkentette az IMQ által kiváltott proliferációt, ami gyulladáscsökkentő hatására utal. Mindkét tapinarof-tartalmú nanogél-készítmény hatékonyabban csökkentette a sejtproliferációs indexet, mint a szabad hatóanyag, különösen IMQ jelenlétében. A tapinarof a nanogél formulációkkal kombinálva dóziszfüggő módon mérsékelte az

IMQ által kiváltott sejtproliferációt. A kísérlet eredményei szerint nanogél I. is jelentősen csökkentette az IMQ által kiváltott proliferációt, de a II. számú nanogél készítmény erőteljesebb hatást mutatott. Az RTCA-eredmények alapján a 10 μ M-es tapinarof és a tapinarofot tartalmazó nanogélek mutatták a legjelentősebb biológiai hatást, ezért ezt a koncentrációt alkalmaztam a későbbi vizsgálatokban.

4.2.2.2. Sebgyógyulási vizsgálat ko-kultúra modellen

A sejmigrációt in vitro sebgyógyulási vizsgálattal értékeltem a ko-kultúra modellben. A kezeletlen (kontroll) mintákban a sejt vándorlás a vártan megfelelően zajlott. Teljes sebzáródás volt megfigyelhető az IMQ-val kezelt mintákban is, mivel az IMQ fokozza a keratinociták szaporodását. Az üres nanogélek kezelése nem befolyásolta a sebzáródást, ami tovább erősíti azok biokompatibilitását. A szabad tapinarof mérsékelten lassította a sejtek szaporodását, míg a hatóanyagot tartalmazó nanogél I. IMQ hiányában szintén csökkentette a sebzáródás sebességét. Ugyanakkor a legerőteljesebb antimigrációs hatást a tapinarofot tartalmazó nanogél II. formuláció esetében figyeltem meg. Érdekes módon a tapinarof mind szabad formájában, mind a nanogélekbe beépítve erőteljesebben gátolta a sejt vándorlást gyulladásos mikrokörnyezetben (IMQ jelenlétében), mint fiziológias körülmények között. Összességében a hatóanyaggal töltött II. számú nanogél bizonyult a leghatékonyabbnak a rendellenes keratinocita-migráció csökkentésében, ezáltal ígéretesnek bizonyul a gyulladásos sejt válasz modulálásában.

4.2.2.3. ELISA vizsgálatok

A proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IFN- γ , IL-17A és IL-23) szintjét ELISA módszerrel határoztam meg a HaCaT-THP-1 ko-kultúras modellben. Az IMQ-kezelés a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan növelte az összes vizsgált citokin szekrécióját, ami megerősítette a gyulladásos válasz sikeres kiváltását. A tapinarof önmagában és nanogél készítményekben is gyulladáscsökkentő hatást mutatott. A hatóanyagot tartalmazó nanogél készítmények viszont hatékonyabbnak bizonyultak, mint a szabad hatóanyag. A gyulladásos mikrokörnyezetben a szabad tapinarof mérsékelten csökkentette az IL-23 szekrécióját, és nem mutatott gátló hatást más citokinekre, sőt, egyes esetekben magasabb citokinszinteket eredményezett, mint az IMQ-kezelés önmagában. IMQ jelenlétében a tapinarof-tartalmú nanogél I. csökkentette a TNF- α és az IL-23 szintjét, enyhén csökkentette az IL-17A szekrécióját, míg az IFN- γ szintjében nem volt megfigyelhető lényeges változás. A legerősebb gyulladáscsökkentő hatást az hatóanyag-tartalmú nanogél II. kezelés mutatta, amely valamennyi vizsgált citokin szintjét csökkentette, beleértve az IL-23-at is. Bár az IL-17A és IL-23 génexpressziójában nem volt

kimutatható változás qPCR-rel, az ELISA jelentős modulációt mutatott ki fehérjeszinten. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tapinarof-tartalmú nanogélek hatékonyan csökkentik az IMQ által kiváltott gyulladásos citokintermelést ebben az in vitro ko-kultúra modellben.

4.2.2.4. Génexpresszió mérése qPCR-rel

A *Tnf- α* , *Ifn- γ* , *Il-17a* és *Il-23* gének expresszióját qPCR módszerrel határoztam meg. A *Tnf- α* gén expressziója az IMQ-val kezelt mintákban a kontrollcsoporthoz képest megnövekedett, ami megerősítette a gyulladásos válasz sikeres kiváltását. A tapinarofot tartalmazó nanogél I. fejtette ki a leghatékonyabb gyulladáscsökkentő hatást IMQ jelenlétében, mivel jelentősen csökkentette az IMQ által kiváltott *Tnf- α* expressziót. A szabad tapinarof és tapinarofot tartalmazó nanogél II. szintén csökkentette a *Tnf- α* szintjét, bár a nanogél I. hatása bizonyult a leghatékonyabbnak. Az *Ifn- γ* génexpresszió enyhe növekedést mutatott IMQ hatására. A szabad tapinarof és a tapinarofot tartalmazó nanogélekkel végzett kezelés az IMQ jelenlétében az *Ifn- γ* expresszió enyhe csökkenését eredményezte. Összességében az *Ifn- γ* gén expressziója a kísérleti körülmények között stabil maradt. Az *Il-17a* és az *Il-23* mRNS-expressziója 24 órás kezelés után minden kísérleti csoportban a kimutatási határ alatt maradt. Sem az IMQ-stimuláció, sem a tapinarof, sem a tapinarofot tartalmazó nanogélek nem váltottak ki mérhető transzkripciós változásokat az *Il-17a* vagy az *Il-23* esetében a HaCaT–THP-1 ko-kultúra modellben. Ezek az eredmények eltérnek az ELISA-val mért citokinszint-változásoktól, ami arra utal, hogy a citokinszekréció és a génexpresszió nem állt közvetlen összefüggésben az alkalmazott kísérleti körülmények között.

4.2.2.5. NF- κ B transzlokáció

Az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivációját immunfluoreszcens festéssel vizsgáltam THP-1 monocita sejtvonalon, a p65 alegység sejtmagba történő transzlokációjának nyomon követésével. Az IMQ-kezelés a p65 alegység nukleáris lokalizációját eredményezte, ami az NF- κ B útvonal aktivációját jelzi. A szabad tapinarof kezelés a p65 sejtmagba való transzlokációjának enyhe csökkenését eredményezte, míg a tapinarofot tartalmazó nanogél I. mérsékelt gátló hatást mutatott. A leghatékonyabb IMQ-indukált p65 sejtmagba való lokalizációt a hatóanyag-tartalmú nanogél II.-nél figyelték meg, ami a szabad tapinarofhoz és a tapinarofot tartalmazó nanogél I.-hez képest az NF- κ B aktiváció erőteljesebb gátlását jelzi.

5. Megbeszélés

5.1. A készítményfejlesztés és a gyógyszerforma vizsgálatok értékelése

Kísérletes munkám első szakaszában a géleket többféle szempontból vizsgáltuk, beleértve az sejtleletkéességi vizsgálatot és a részecskeméret meghatározást. A formulációk nanoméretét dinamikus fényszórásos módszerrel igazoltuk. A mérések alapján mindkét összetétel a gélképződést követően is a nanoméret-tartományban maradt.

A készítményeket reológia és textúra analízisnek is alávetettük, mivel ezek a paraméterek közvetlenül összefüggenek a készítmények összetételével, ezáltal a konzisztenciával és a stabilitással is. Különösen a viszkozitás és a nyírófeszültség hőmérséklet- és nyírási sebességfüggő változása befolyásolja a hatóanyag-leadást, ezáltal a bőrön keresztüli penetrációt is.

A reológiai mérések azt mutatták, hogy mindkét gél viszkozitása csökkent a hőmérséklet emelkedésével: 35 °C-on a viszkozitás kissé alacsonyabb volt, mint szobahőmérsékleten. Hasonló eredményekről számolt be Zeynep Ay Şenyigit és munkatársai, akik karbopol 934 alapú gélekben figyeltek meg pszeudoplasztikus viselkedést a mupirocin dermális alkalmazásához. Rajinikanth és társai másik vizsgálatukban szintén nyírásra híguló viselkedést mutattak ki karbopol 934 alapú gélek esetén. Giuseppe és társai munkája tovább erősíti ezeket az eredményeket, miszerint a karbopolt tartalmazó gélek viszkozitása a hőmérséklet emelkedésével csökken.

A viszkozitás csökkenésének következményeként testhőmérsékleten a gél könnyebben folyik, ami gyorsabb hatóanyag-leadáshoz vezethet. A nanogél II. viszkozitása kissé alacsonyabb volt, ami arra utal, hogy ez a formuláció gyorsabb hatóanyag-felszabadulásra képes. Az alacsonyabb viszkozitás azt is jelenti, hogy testhőmérsékleten a nanogél könnyebben kenhető, ami megkönnyíti a bőrre való felvitelt.

A textúraanalízis alapján a két formuláció között nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a kompressziós erő tekintetében. A nanogél I. körülbelül 65 Nm átlagos kompressziós erőt mutatott, míg a nanogél II. kissé alacsonyabbat, körülbelül 60 Nm-t. A vizsgált minták nem mutattak ellenállást, így állaguk megfelelőnek bizonyult gélalapú gyógyszerformákhoz, ami hozzájárulhat a betegek jobb együttműködéséhez.

Az in vitro hatóanyag-leadási vizsgálatok során megfigyeltük, hogy a nanogél II. gyorsabb és magasabb mértékű tapinarof felszabadulást mutatott az idő előrehaladtával. 11 perc elteltével a felszabadult tapinarof mennyisége megközelítette a 14%-ot, míg a nanogél I. mérsékeltebb felszabadulást mutatott, körülbelül 8%-ot. Mindkét formuláció stabil maradt a

kísérlet során, azonban a két nanogél közötti különbség egyértelműen megmutatkozott a hatóanyag-leadás sebességében. Ez a különbség valószínűleg az alkalmazott összetevők eltéréseiből, illetve a reológiai tulajdonságokból ered, amelyek befolyásolják a bőrön való áthatolást. A két gél közül a nanogél II. jelentősen jobb felszabadulási profilt mutatott, ami összhangban áll a reológiai vizsgálatok eredményeivel. Az ilyen gyors felszabadulás különösen előnyös lehet, ha a célzott, gyors hatás elérése a cél, mint pikkelysömör esetén.

Munkánk során igyekeztünk olyan segédanyagokat választani, amelyek elősegítik a hatóanyag oldódását és felszabadulását. A szakirodalmi adatok alapján a nem-ionos felületaktív anyagok rendelkeznek a legkisebb irritációs potenciállal, ezért ezek használata mellett döntöttünk. A Labrafil M, a Tween 80 és a Transcutol HP egyaránt ismert oldószerek vagy ko-oldószerek, amelyeket gyakran alkalmaznak helyi gyógyszerformák penetrációjának fokozására.

Yue Zhang és munkatársai szerint a tapinarof nagy mértékben oldódik Tween 80-ban és etanolban. Jasmine Musakhanian leírása alapján a Transcutol HP jelentős mennyiségű hidrofíl és lipofíl anyagot képes oldani, így jól alkalmazható hidrogélekben is. Ennek megfelelően a gélformulációban a tapinarofot ezekben az oldószerekben oldottuk fel.

A hatóanyagot tartalmazó készítmények és a kiválasztott segédanyagok biokompatibilitását HaCaT sejtvonalon teszteltük. A tapinarof és a különböző nanogélek sejtleletképessegre gyakorolt hatását rövid és hosszú távú vizsgálatokkal egyaránt jellemeztük annak érdekében, hogy átfogóbb képet kapjunk a formulációk biokompatibilitási profiljáról. Az MTT teszt eredményei alapján a szabad tapinarof, a nanogél formulációk, valamint a Labrafil M és a Transcutol HP a vizsgált koncentrációtartományban megfelelő biokompatibilitást mutattak. Ezzel szemben a Tween 80 citotoxikus hatást mutatott, így ez bizonyult az egyetlen vizsgált komponensnek, amely a sejtek életképességének csökkenését eredményezte.

Ugyanakkor ezek az eredmények nem egyeznek Farzaneh Forouz és munkatársainak megfigyeléseivel, akik szintén MTT teszt segítségével vizsgálták a Labrafil M és Transcutol HP toxicitását. Eredményeik szerint ezek az anyagok ugyan kevésbé voltak toxikusak, mint a Triton X-100, de nem tekinthetők nem toxikus segédanyagoknak farmakológiai vagy toxikológiai értékelések alapján.

Kísérletünk során egyedül a Tween 80 bizonyult toxikusnak. Ezzel szemben a szakirodalomban számos tanulmány cáfolja ezt az eredményt. Caroline Maupas és munkatársai például lipid nanopartikulumokba épített Tween 80 és más felületaktív anyagok toxicitását vizsgálták, és erős felületaktív anyag-típusfüggő toxicitást figyeltek meg HaCaT sejtekben. Azonban nem a Tween 80 bizonyult a legtoxikusabbnak. A felületaktív anyagok toxicitása

főként amfipatikus szerkezetüknek tulajdonítható. Ezzel szemben Maiulle T. Pacheco és munkatársai a sucupira olajat tartalmazó nanoemulziókat vizsgálták, ahol a toxicitást nem a felületaktív anyagoknak, hanem magának az olajnak tulajdonították. Továbbá Katja Steine és társai a Tween 80-at az egyik legbőrbarátabb felületaktív anyagként értékelték.

A szakirodalmi adatok szerint a tapinarof rendelkezik antiproliferatív tulajdonságokkal. Ezt in vitro sebgyógyulási vizsgálataink is alátámasztották, ahol a sebzáródás mértéke elsősorban a sejtmigrációt tükrözi. Míg a klasszikus sebgyógyulási modellekben a gyorsabb sebzáródás kedvezőnek tekinthető, a pikkelysömör kontextusában a fokozott sejtmigráció és proliferáció mérséklődése potenciálisan előnyös hatásnak tekinthető. A tapinarof önmagában is jobban akadályozta sebzáródást 24 óra elteltével, mint az üres gélek. Ezen felül a tapinarofot tartalmazó nanogél I. mérsékelten gátolta a sejtmigrációt, míg a hatóanyagot tartalmazó nanogél II. hatására lassabb sebzáródás következett be, vagyis a fibroblasztok migrációja a karcolás területén belül 24 órán belül gátlásra került. Ez azért lehet kedvező a pikkelysömör kezelésében, mivel a betegségre a keratinociták fokozott proliferációja jellemző.

5.2. In vitro sejtes vizsgálatok eredményeinek értékelése

Kísérletes munkám második szakaszában a HaCaT–THP-1 ko-kultúra modell alkalmazásával különböző paraméterek alapján értékeltük a tapinarofot tartalmazó nanogéleket. A nanoformulációk sejtproliferáció-gátló hatását RTCA és in vitro sebgyógyulási tesztekkel vizsgáltuk. Mivel a tapinarof vizsgálatára RTCA módszer alkalmazásáról nincs rendelkezésre álló tudományos adat, kísérletünk egyedülállónak tekinthető. A méréseket a hatóanyaggal és anélkül, gyulladásos (IMQ-indukált) és nem gyulladásos környezetben végeztük. Az eredmények alapján mindkét nanogél jelentősen csökkentette az IMQ által kiváltott sejtproliferációt, míg a szabad tapinarof hatása mérsékeltebb volt. A hatóanyagot nem tartalmazó nanogélek nem fokozták a sejtszaporodást. Minden minta esetében a 10 µM-es tapinarof-koncentráció bizonyult a leghatékonyabbnak, így a továbbiakban a kísérleteket ezzel a dózissal folytattuk.

Az in vitro sebgyógyulási vizsgálat során a 10 µM-es tapinarof-koncentráció eltérő migrációs profilt eredményezett, mint a humán dermális fibroblasztokon végzett korábbi kísérletünkben, ahol a hatóanyagot 40 µM-es dózisban, gyulladásos stimulus nélkül teszteltük. A gyulladásos keratinocita-makrofág modellben az IMQ fokozta a sejtek közötti rés bezáródását, de a tapinarofot tartalmazó kezelések jelentősen lassították ezt a folyamatot. A kétféle nanogél közül a II. típusú nanogél kedvezőbb tendenciát mutatott, mint az I. típusú. Az IMQ jelenlétében azonban minden kezelés jelentősen lelassította a sejtek közötti rés

bezáródását a szabad hatóanyaghoz képest. Ez a tulajdonság különösen előnyös lehet olyan kórképekben, mint a pikkelysömör, amelyek hiperproliferációval és gyulladással járnak, és ahol a terápia célja a rendellenes keratinocita-proliferáció csökkentése.

Az ELISA vizsgálatokat végeztük annak értékelésére, hogy a tapinarofot tartalmazó nanogél készítmények milyen hatást gyakorolnak a szabad tapinarofhoz képest a kulcsfontosságú proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IFN- γ , IL-17A és IL-23) szekréciójára a HaCaT–THP-1 ko-kultúra modellben. Eredményeink azt mutatták, hogy a tapinarofot tartalmazó nanogélek kifejezettebb citokinszint-csökkenést eredményeztek, mint a szabad hatóanyag. A nanogél I. gyulladást okozó körülmények között csökkentette a TNF- α és az IL-23 citokinek szintjét, és enyhén mérsékelte az IL-17A szekrécióját, míg a nanogél II. mutatta a leghatékonyabb gyulladáscsökkentő profilt, mivel számottevő mértékben csökkentette mind a négy vizsgált citokin szintjét. Ezzel szemben a szabad tapinarof csak mérsékelt IL-23 csökkenést eredményezett, és nem volt kimutatható gátló hatása a többi citokinre. Sőt, egyes esetekben az IMQ jelenlétében a citokinszintek emelkedése volt megfigyelhető.

Ezek az eredmények összhangban állnak a tapinarof gyulladáscsökkentő hatásait igazoló korábbi tanulmányokkal. Smith és munkatársai megfigyelték, hogy a hatóanyag csökkentette a gyulladást okozó citokinek expresszióját és javította a bőr barrierjét. Mind az ELISA, mind a qPCR vizsgálatok az IL-17A, IL-17F, IL-22 és IL-23 szintek csökkenését mutatták, mely alátámasztja a tapinarof gyulladáscsökkentő hatását. Hasonló eredményekről számolt be Zhao és munkatársai, akik ELISA-val mérték az IL-17 termelésének csökkenését a tapinaroffal kezelt dendritikus sejtekben, és megfigyelték az mRNS-expressziót is. Bissonnette és munkatársai tanulmányukban egyértelműen kimutatta, hogy a tapinarof-kezelés csökkentette a gyulladást okozó citokinek (IL-17A, IL-22, IL-23 és IL-1) szintjét egy pikkelysömörös egérmodellben. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezeknek a tanulmányoknak a többségét különböző biológiai modelleken végezték, ami korlátozza a közvetlen összehasonlíthatóságot a jelen in vitro ko-kultúra modellel.

A qPCR analízis részleges eltérést mutatott az ELISA eredményekhez képest. A tapinarofot tartalmazó készítmények csökkentették a *Tnf- α* mRNS szintjét a szabad hatóanyaghoz képest, míg az *Ifn- γ* transzkripciója a kísérleti csoportokban nagyrészt változatlan maradt, így ebben a modellben nem volt kimutatható egyértelmű tapinarofhoz köthető hatás. Az *Il-17a* és az *Il-23* mRNS szintek minden mintában a kimutatási határ alatt voltak. Ezáltal a kísérleti körülmények között nem lehet közvetlen következtetést levonni az ELISA-val mért citokin-szekréció és a qPCR-rel kimutatott mRNS-expresszió között. Ez az eltérés a transzkripciós és poszttranszkripciós szabályozás különbségeivel, valamint az mRNS és a

fehérjeszekréció közötti időbeli eltéréssel magyarázható.

Számos tanulmány már rámutatott erre a jelenségre, hogy az mRNS- és a fehérjeszintek közötti eltérés nem ritka. A fehérjeszekréciót nem csupán a transzkripció, hanem az mRNS stabilitása, a transláció, a transláció utáni módosulások és a fehérje lebomlás is befolyásolja. Egy másik tanulmány immunsejtekben hasonlította össze a mért mRNS-szinteket a fehérjeszintekkel (proteomika/FACS), és kimutatta, hogy a két mérés között nem mindig áll fenn szoros összefüggés, sőt bizonyos esetekben jelentős eltérések is megfigyelhetők. Eichelbaum és munkatársai aktivált makrofágokon végzett időbeli kinetikai vizsgálatokkal igazolták, hogy a transzkripciós válaszok gyakran korábban érik el csúcspontjukat, mint a megfelelő fehérjeszint-változások. Vagyis az mRNS-szint gyorsan (gyakran 2–6 órán belül) tetőzik, majd lecsökken, míg a szekretált fehérje késleltetve, fokozatosan halmozódik fel. További tanulmányok szintén megerősítik, hogy az mRNS-csúcsok gyakran jóval a mérhető extracelluláris fehérjefelhalmazódás előtt jelentkeznek.

Összességében véve az ELISA és a qPCR eredményei között megfigyelt eltérés a leegyszerűsített *in vitro* ko-kultúra rendszerek ismert korlátját tükrözi. Bár a tapinarofot tartalmazó nanogélek egyértelműen modulálták a citokin szekréciót ebben a ko-kultúra modellben, kizárólag ezekre az adatokra alapozva nem vonhatók le végleges következtetések a transzkripciós szabályozásról vagy specifikus jelátviteli útvonalak részvételéről. Mindazonáltal az ELISA-val megfigyelt, következetes citokin-felszabadulás gátlása alátámasztja a tapinarof-nanogél készítmények funkcionális gyulladáscsökkentő potenciálját ebben a pikkelysömör-szerű *in vitro* modellben.

Az immunfluoreszcens festéssel értékelt NF- κ B p65 alegység intracelluláris lokalizációja szintén megerősítette a gyulladáscsökkentő hatást. Az imikimod kezelés nukleáris p65 transzlokációt indukált a THP-1 monocitákban. A szabad tapinarof enyhén csökkentette ezt az aktivációt. Ezzel szemben a tapinarof-tartalmú nanogél I. mérsékelt gátló hatást mutatott, míg a leghatékonyabb blokkoló hatást a hatóanyag-tartalmú nanogél II. érte el. Bár a pontos mechanizmusok nem tisztázottak, az eredmények arra utalnak, hogy a nanogél alapú adagolás javíthatja a tapinarof sejten belüli hozzáférhetőségét.

A szakirodalomban kevés tanulmány vizsgálta közvetlenül a tapinarof NF- κ B p65 nukleáris transzlokációjára kifejtett gátló hatását gyulladásos állapotban lévő keratinocitákban. A korábbi tanulmányok főként a tapinarof által kiváltott citokin-modulációra és az AhR aktivációra összpontosítottak, de nem állnak rendelkezésre adatok az NF- κ B jelátvitelre gyakorolt közvetlen hatásáról. Egy közelmúltbeli tanulmány kimutatta, hogy a tapinarof gátolta az NF- κ B p65 nukleáris transzlokációját a részecskeszennyezés által kiváltott oxidatív

stressznek kitett HaCaT keratinocitákban, potenciálisan az AhR/Nrf2 aktivációján keresztül. Ezenkívül Brito és munkatársai egérmodellben is kimutatták, hogy a tapinarof-kezelés csökkent a több jelátviteli út, köztük az NF- κ B, a JAK/STAT, az ERK/MAPK és az mTOR aktivitását, valamint modulálja az IFN- γ , az IL-17/23 és a TNF- α által közvetített jelátvitelt a bőrben. Érdekes módon más AhR-ligandokról (pl. indigó) és szerkezetileg rokon polifenol-vegyületekről (pl. rezveratrol) is beszámoltak, hogy gátolják az NF- κ B transzkripció aktivitását. Ezek az eredmények alátámasztják az AhR-aktiváció és a gyulladásos jelátviteli útvonalak közötti kölcsönhatást.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a nanogél-alapú gyógyszerhordozás javíthatja a tapinarof in vitro biológiai hatékonyságát imikimoddal stimulált HaCaT–THP-1 modellben. A vizsgált paraméterek alapján a tapinarofot tartalmazó nanogélek hatékonyabban csökkentették a gyulladásos válaszokat, mint a szabad hatóanyag. A formulációk közötti különbségek a kísérletek során jól megfigyelhetők voltak: a nanogél II. (magasabb SNEDDS-tartalommal) erősebb hatást mutatott a gyulladásos jelátviteli utak gátlásában, míg a nanogél I. kifejezettebb hatást mutatott a génexpressziós vizsgálatokban. Ezek a különbségek arra utalnak, hogy a nanogél-rendszerek összetétele és szerkezeti jellemzői jelentősen befolyásolhatják a tapinarofra adott sejtválaszokat.

Bár a megfigyelt hatások mögött meghúzódó pontos molekuláris mechanizmusok a jelenlegi eredmények alapján nem határozhatók meg egyértelműen, a nanogélek fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságai alapján több lehetséges magyarázat is felvethető. Elsősorban a nanogélek tartós hatóanyag-felszabadulási viselkedése lehet az, ami biztosítja a sejtek hosszabb ideig tartó kitétséget a hatóanyag-koncentrációknak. Számos beszámoló jelent meg a nanogél-rendszerekhez kapcsolódó hosszabb felszabadulási profilokról, és ismert, hogy ezek fokozzák a farmakológiai hatásokat a szabad hatóanyagokhoz képest. Ezen felül a nanogél mátrixba való beépítés megvédheti a hatóanyagot a fizikai-kémiai lebomlástól és javíthatja oldhatóságát, különösen olyan lipofil molekulák esetében, mint a tapinarof. A megnövekedett sejtfelvétel szintén hozzájárulhat a megfigyelt hatásokhoz. Nanoméretüknek és nagy fajlagos felületüknek köszönhetően a nanogélek elősegíthetik a sejtmembránokkal való szorosabb kölcsönhatást és megkönnyíthetik a terápiás szerek intracelluláris transzportját. Ezenkívül a felületaktív anyagok és maguk a SNEDDS-ek is fokozhatják a bőrbe való behatolást, sőt modulálhatják a helyi gyulladásos válaszokat is, ami hozzájárulhat a nanoformulációk között megfigyelt különbségekhez.

5.3. Új tudományos eredmények összefoglalása

A kísérletes munkám során elért, új tudományos eredmények:

- Tapinarofot sikeresen beépítettem nanogél-alapú formulációkba, amelyek alkalmasak topikális alkalmazásra és megfelelő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek.
- Dinamikus fényszórás segítségével igazoltam, hogy a nanoformulációk a gélesítést követően sem veszítik el nanoméret-tartományba eső részecskeméretüket.
- A különböző nanogél formulációk reológiai és textúraanalitikai vizsgálatával igazoltam azok megfelelő viszkozitását, szerkezetét és konzisztenciáját dermális készítményként.
- In vitro felszabadulási vizsgálatokkal kimutattam, hogy a nanogél formulációk biztosítják a tapinarof kontrollált hatóanyag-leadását.
- A formulációk során alkalmazott segédanyagok és készítmények citotoxicitását HaCaT sejtvonalon vizsgálva igazoltam azok biokompatibilitását és biztonságát.
- Valós idejű sejtanalízissel kimutattam, hogy a tapinarof és a tapinarofot tartalmazó nanogélek koncentrációfüggő módon befolyásolják a keratinociták proliferációját imikimoddal indukált gyulladásos környezetben.
- In vitro sebgyógyulási vizsgálatok során kimutattam, hogy a tapinarofot tartalmazó formulációk modulálják a sejtmigrációt, mivel nem gyulladásos környezetben a fibroblasztok migrációját lassították, míg a HaCaT–THP-1 ko-kultúrák modellben a gyulladásos környezetben zajló sebzáródási folyamatokat is befolyásolták.
- HaCaT–THP-1 ko-kultúrák modellen ELISA módszerrel kimutattam, hogy a tapinarof és nanogél formulációi erőteljesebben csökkentik a proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-23) szintjét, összehasonlítva a szabad hatóanyaggal.
- Génexpressziós vizsgálatokkal igazoltam, hogy a tapinarofot tartalmazó formulációk befolyásolják a gyulladásos citokinek (*Tnf- α* , *Ifn- γ*) mRNS-szintjét.
- Immunfluoreszcens vizsgálattal kimutattam, hogy szabad hatóanyaghoz képest, a tapinarof-tartalmú nanogélek eredményesebben gátolják az NF- κ B p65 alegység sejtmagba történő transzlokációját, ezáltal hozzájárulnak a gyulladásos jelátviteli utak modulálásához.

6. Összefoglalás

A pikkelysömör egy krónikus, immunmediált gyulladásos bőrbetegség, amely jelentős életminőség-romlással jár, azonban kezelése még mindig kihívást jelent. Bár számos terápiás lehetőség áll jelenleg rendelkezésre, a hatékony, jól tolerálható és hosszú távon is alkalmazható topikális készítményekre továbbra is erős igény mutatkozik. A közelmúltban engedélyezett tapinarof, mint AhR-agonista, egy új terápiás megközelítést kínál, mivel gyulladáscsökkentő, antioxidáns és bőrbarrier-helyreállító hatásokkal rendelkezik. Ugyanakkor a hagyományos formulációk korlátozzák a hatóanyag megfelelő bőrpenetrációját és biohasznosulását.

Doktori munkám célja olyan innovatív, topikális gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése volt, amelyek képesek fokozni a tapinarof terápiás hatékonyságát. Ennek érdekében különböző összetételű tapinarof-tartalmú nanoformulációkat állítottam elő. Vizsgálataim során igazoltam, hogy a létrehozott rendszerek megőrzik stabil, 200 nm alatti részecskeméretüket gélesedés után is, megfelelő reológiai és texturális tulajdonságokkal rendelkeznek, így alkalmasak dermális alkalmazásra. Valamint a citotoxicitási vizsgálatok alapján biztonságosnak bizonyultak HaCaT sejteken. In vitro kioldódási vizsgálat során a formulációk közül a nanogél II. előnyösebb hatóanyag-leadási profilt mutatott, amely összefüggésbe hozható kedvező viszkozitási és szerkezeti tulajdonságaival.

A biológiai hatások vizsgálata során sikeresen kimutattam, hogy a tapinarof nanogélbe történő beépítése fokozza annak antiproliferatív és antimigrációs hatását, amit in vitro karcolási tesztekkel igazoltam.

A kutatás következő fázisában egy imikimod-indukált HaCaT–THP-1 ko-kultúrák pszoriázis modell alkalmazásával vizsgáltam a formulációk hatását a sejtek működésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a nanogél-alapú hatóanyagbevitel csökkentette a gyulladásos folyamatokban kulcsfontosságú szerepet játszó citokinek (TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-23) szintjét, valamint hatékonyabban gátolta a sejtek proliferációját és migrációját, mint a szabad hatóanyag. Továbbá a NF- κ B jelátviteli útvonal gátlása is megfigyelhető volt, ami tovább erősíti a rendszer gyulladáscsökkentő potenciálját.

Összességében a fejlesztett tapinarof-tartalmú nanogél rendszerek képesek javítani a hatóanyag biohasznosulását és biológiai hatékonyságát, miközben kedvező biztonságossági profilt mutatnak. Eredményeim alátámasztják, hogy a nanogél formulációk ígéretes, nem-szteroid alternatívát jelenthetnek a pikkelysömör topikális kezelésében, és hozzájárulhatnak a jelenlegi terápiás lehetőségek továbbfejlesztéséhez.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni legnagyobb hálámat és tiszteletemet témavezetőmnek, Prof. Dr. Bácskay Ildikónak, a Gyógyszerésztudományi Kar dékánasszonyának, aki szakmai útmutatásával, támogatásával és biztatásával végig kísérte a doktori munkámat.

Külön köszönettel tartozom konzulensemnek és mentoromnak, Dr. Pető Ágotának, aki folyamatos szakmai iránymutatásával és önzetlen segítségével nagyban hozzájárult kutatásaim sikeréhez.

Hálás vagyok a Gyógyszertechnológiai Tanszék valamennyi munkatársának: Dr. Fehér Pálmának, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Arany Petrának, Dr. Sinka Dávidnak, Dr. Józsa Lizának, Horányiné Körei Máriának, Gulyás Évának, Szilágyi Erikának és Bátoriné Pataki Brigittának, akik munkájukkal, szakmai támogatásukkal és bátorításukkal hozzájárultak eredményeimhez.

Köszönettel tartozom a Gyógyszerfelügyeleti és Gyógyszergazdálkodási Tanszék munkatársainak, különösen Prof. Dr. Vecsernyés Miklósnak és Dr. Horváth Lászlónak, illetve a Gyógyszeripari Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársainak, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Nemes Dánielnek és Dr. Haimhoffer Ádámnak, valamint a Molekuláris és Nanogyógyszerészeti Tanszék kollégáinak, Dr. Fenyvesi Ferencnek, Dr. Váradi Juditnak és Dr. Rusznyák Ágnesnek, akik hozzájárultak kutatásaim előrehaladásához és szakmai tanácsaikkal segítették munkámat.

Külön hálával tartozom Dr. Klusóczki Ágnesnek, aki az elmúlt évben nyújtott szakmai támogatásával és együttműködésével nagyban hozzájárult kutatásom előrehaladásához.

Hálásan köszönöm PhD-hallgató társaimnak, Bodnár Krisztinának, Dr. Papp Boglárkának és Alsheikh Raghadnak a közös munkát, a folyamatos támogatást és azt, hogy a nehezebb időszakokban is mindig igyekeztünk egymásban tartani a lelket.

Köszönöm továbbá Lakatos Szilviának, Antalné Sipos Szilviának és Vaszily Máriának, hogy mindig készségesen segítettek, és bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm a tutoraimnak, Prof. Dr. Juhász Bélának és Dr. Lekli Istvánnak a PhD képzésem alatt nyújtott támogatásukat.

Hálával tartozom Dr. Csoma Eszternek, Prof. Dr. Tósa Árpádnak és Prof. Dr. Gergely Lajosnak a Doktori Iskolánkért végzett fáradhatatlan munkájukért és elkötelezettségükért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak az évek során nyújtott szeretetet, türelmet és kitartó támogatást. Rendkívül hálás vagyok a szüleimnek, a nagyszüleimnek, a nővéremnek és családjának, hogy mindig támogattak, és a

nehezebb napokat megkönnyítették azzal, hogy megteremtették azt a biztonságos és szeretetteljes környezetet, amely lehetővé tette számomra, hogy eljussak idáig.

8. Támogatás

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

A projektet a 2022-1.2.2-TÉTIPARI-UZ-2022-00006 „Természetes gyógynövénykivonatot tartalmazó különböző prototípusok közös kutatása és fejlesztése ipari felhasználásra” projekt támogatta.

A kutatás a Richter Gedeon Nyrt. által létrehozott Richter Gedeon Talentum Alapítvány (székhely: 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.) támogatásával, a Richter Gedeon Kiválósági PhD Ösztöndíj keretében készült.

A Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-25-3-II kódszámú Egyetemi Kutatói Ösztöndíjprogramjának, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



Nyilvántartási szám: DEENK/260/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balogh Barbara Nóra
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10087184

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balogh, B. N.**, Klusóczy, Á., Pető, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Váradi, J., Bácskay, I.: In Vitro Investigation of Tapinarof-Loaded Nanogels in an Imiquimod-induced HaCaT-THP-1 Co-Culture Model.
Eur. J. Pharm. Sci. 221, 1-15, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2026.107510>
IF: 4.7 (2024)
2. **Balogh, B. N.**, Pető, Á., Haimhoffer, Á., Sinka, D. Z., Kósa, D., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Argenziano, M., Cavalli, R., Bácskay, I.: Formulation and Evaluation of Different Nanogels of Tapinarof for Treatment of Psoriasis.
Gels. 10 (11), 1-18, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/gels10110675>
IF: 5.3

További közlemények

3. **Balogh, B. N.**, Pető, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Bácskay, I.: Tapinarof Nanogels as a Promising Therapeutic Approach.
Pharmaceutics. 17 (6), 1-28, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics17060731>
IF: 5.5 (2024)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,5

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10

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

Debrecen, 2026.05.07.

