

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A SILYBUM MARIANUMOT TARTALMAZÓ BELSŐLEGES ÉS KÜLSŐLEGES
GYÓGYSZERFORMÁK FEJLESZTÉSE, IN VITRO ÉS IN VIVO VIZSGÁLATA**

Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma

Témavezető: Dr. Vecsernyés Miklós



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017.

A SILYBUM MARIANUMOT TARTALMAZÓ BELSŐLEGES ÉS KÜLSŐLEGES GYÓGYSZERFORMÁK FEJLESZTÉSE, IN VITRO ÉS IN VIVO VIZSGÁLATA

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

Írta: Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében
Témavezető: Dr. Vecsernyés Miklós, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Dr. Antal István, PhD

Ifj. Dr. Regdon Géza, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék
könyvtára (Elméleti Tömb 5.emelet)
2017. október 13. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA doktora

Dr. Gáspár Róbert, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA doktora

Dr. Antal István, PhD

Dr. Gáspár Róbert, PhD

Ifj. Dr. Regdon Géza, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2017. október 13. 13 óra

Tartalom

1. Bevezetés	5
2. Célkitűzés	6
3. Anyagok és módszerek	8
3.1 Felhasznált anyagok	8
3.2. Silybum marianum mag származási helye	8
3.3. Szilimarin olaj és szilimarin por kivonása	8
3.4. Szilimarin olajjal végzett SMEDDS formulálás és a készítmény hatásának vizsgálata	9
3.4.1. SMEDDS-szilimarin olaj formulálása	9
3.4.2. SMEDDS cseppméretének meghatározása	9
3.4.3. Kísérleti állatok	10
3.4.4. Kezelési protokoll szilimarin olaj- SMEDDS-el egerekben.	10
3.4.5. Májenzim értékek meghatározása egéren	10
3.4.6. Máj fehérje extraktum készítése	10
3.4.7. Hisztopatológiai vizsgálatok	11
3.4.8. Máj antioxidáns státuszának feltérképezése	11
3.5. Szilimarin port tartalmazó krém formulálása és vizsgálata	13
3.5.1. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása	13
3.5.2. Krémek gyógyszerforma vizsgálata	13
3.5.3. Sejtenyésztes	14
3.5.4. MTT teszt	14
3.5.5. In vivo kísérletekhez használt kísérleti állatok	15
3.5.6. In vivo bőr irritációs teszt	15
3.5.7. UV-B sugárzás HaCaT sejteken, a sejtek elő- és utókezelése	16
3.5.8. UV-B sugárzás tengerimalac bőrén in vivo, a bőr elő- és utókezelése szilimarin tartalmú krémmel	16
3.5.9. Szuperoxid dizmutáz aktivitás meghatározása	17
3.5.10. Kataláz aktivitás meghatározása	17
3.5.11. Glutathion peroxidáz aktivitás	17
3.5.12. Lipid peroxidációs (MDA) teszt	18
3.5.13. HO-1 aktivitás mérés	18
3.6. Statisztikai analízis	19
3.7. Az értekezésben szereplő, együttműködésben kivitelezett metodikák	19
4. Az értekezés új tudományos eredményei	20
4.1. Szilimarinolaj-SMEDDS készítmények formulálása és terápiás hatásának vizsgálata során kapott eredmények	20
4.2. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása és terápiás hatásának vizsgálata során kapott eredmények	21

5. Összefoglalás	24
6. Köszönetnyilvánítás	25
7. Publikációk jegyzéke.....	26

1. Bevezetés

A *Silybum marianum* gyógynövényt, már évszázadok óta használják máj- és epebetegségek kezelésére. A szilimarin hatóanyag akut és krónikus májkárosodások megelőzésére, de a már kialakult májgyulladás, májcirrózis esetén is kifejezetten hatásos. Alkalmazzák alkoholizmus miatt kialakult májzsírosodásban, alkohol vagy vírus eredetű hepatitiszben. Hatásos szer gombamérgezésben, illetve más hepatotoxikus anyaggal szemben. Kompetitív gátolja a mérgeanyagok bejutását a májsejtbe, segíti és gyorsítja a májsejtek regenerálódását, csökkenti a toxinok okozta szabadgyökök mennyiségét. A belsőleges terápiás hatás mellett számos tudományos cikk igazolta a máriatövis kivonatának külsőleges hatását is, legfőképp az UV sugárzás okozta bőrkárosodások ellen nyújtott védelmét.

A növény hatását a termésében található flavonolignán-komplex adja, melynek összefoglaló neve a szilimarin. A máriatövis hatóanyagának rossz a biohasznosulása, mivel relatív oldhatatlan vízben, amely mind belsőleges mind külsőleges alkalmazásának korlátot szab.

Kivonás során a máriatövis magból, amely a növény érett termése két fázis különíthető el, egy szilárd por és egy folyékony olajos rész.

A szilimarin por kedvezőbb biohasznosulása érdekében számos megoldást találhatunk az irodalomban. Jelentős mennyiségű adat bizonyítja, hogy a szilimarin sokkal kedvezőbb farmakokinetikai paramétereket mutat jól felszívódó származékok (pl. sók, glikozidok) esetében, illetve megfelelő gyógyszerformában, mint liposzómába ágyazva, szilárd diszperzióban, nanorendszerben és ön(mikro) emulgeáló rendszerekben is. Ugyanakkor kevés olyan tudományos cikk található, amely a szilimarin olajjal foglalkozik.

Vízben nehezen vagy nem oldódó hatóanyagok orális bevitelére alkalmas lehet az ön(mikro)emulgeáló rendszerek alkalmazása, melyek növelik a biohasznosulást a gasztrointesztinális szolubilizáció révén. Az önemulgeáló rendszerek izotróp keverékek, melyek olajból, tenzidből és/vagy kotenzidből állnak, vizet nem tartalmaznak. Vizes közegben o/v emulzió képződik minimális energiabefektetés hatására. A gasztrointesztinális traktus motilitása is elegendő energiát adhat a rendszer kialakításához.

A külsőleges gyógyszerformákból a hatóanyag penetrációját több tényező befolyásolja. A hatóanyag szerkezete, fizikiai-kémiai tulajdonsága és felszabadulása az adott gyógyszerformából, a bőr barrier funkciója, a bőr szarurétegének nedvességtartalma stb. Ugyanakkor a külsőleges gyógyszerformulálás egyik legfontosabb kritériuma a megfelelő

segédanyag(ok) (pl. penetrációt növelő) alkalmazása is, hiszen azok segíthetik a hatóanyag bőrön keresztül történő átjutását és a terápiás hatást.

Kísérleteink során a *Silybum marianum* gyógynövény magjából kivont szilimarin olajjal és porral dolgoztunk. A szilimarin olajból egy belsőleges SMEDDS (önmikroemulgeáló rendszer) gyógyszerformát alakítottunk ki és vizsgáltuk a hepatoprotektív hatását. A szilimarin porból o/v típusú emulziós krémet formuláltunk, a port oldott formában tartalmazta készítményünk, illetve emulgensként penetrációt növelő segédanyagot választottunk. Az így kialakított külsőleges gyógyszerforma segítette a szilimarin por bőrbe való penetrációját és kimutattuk az UV sugárzás ellenében a készítmény antioxidáns hatását.

2. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki a *Silybum marianum* magjából nyert olaj és por belsőleges és külsőleges gyógyszerformába történő formulálását annak érdekében, hogy magas biohasznosítású gyógyszerformát állítsunk elő.

I. Kísérleteink **első részében** belsőleges per os gyógyszerformát alakítottunk ki szilimarin olajból. A formulálás során célul tűztük ki, hogy a szilimarin olajból egy stabil önmikroemulgeáló rendszert (SMEDDS) formuláljunk, melyben a szilimarin olaj alkotja a gyógyszerforma olajos fázisát és egyben a hatóanyagát is, azért, hogy az így kialakított készítmény megfelelő hepatoprotektív hatással rendelkezzen.

Ezeket a szempontokat figyelembe véve a következő célokat tűztük ki a kísérleti terv kialakításánál:

1. Szilimarin olajat tartalmazó stabil, megfelelő részecskemérettel rendelkező önmikroemulgeáló rendszer (SMEDDS) formulálása, a megfelelő tenzidek és kotenzidek kiválasztása, gyógyszerforma vizsgálat.
2. A szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS hatása szén-tetraklorid által kiváltott májkárosodásban. A készítmény in vivo hatásának vizsgálata egéren, a plazma májenzim (ALT, AST) értékeinek meghatározása, az antioxidáns enzim értékek detektálása máj-homogenizátumból és a máj szövettani vizsgálata.

II. Kísérleteink **második részében** szilimarin porból formuláltunk krémet. A külsőleges készítmény kialakításánál az elsődleges célunk az volt, hogy a krém oldatos formában

tartalmazza a szilimarin port, valamint a megfelelő segédanyagok kiválasztásával növeljük a hatóanyag penetrációját. A terápiás cél az volt, hogy UVB sugárzás okozta bőrkárosodás kezelésére és megelőzésére megfelelő antioxidáns hatással rendelkező krémet állítsunk elő.

A következő kísérleti tervet követtük a kísérleteink második felében:

1. Szilimarin por oldódásának optimalizálása.
2. o/v emulziós rendszerű, szilimarin port tartalmazó krém formulálása penetrációfokozó segédanyagok alkalmazásával.
3. A krémek konzisztencia vizsgálata Textura Analizáló készülékkel és a hatóanyag in vitro felszabadulásának vizsgálata Franz-diffúziós cella segítségével.
4. A krémek in vitro citotoxicitási vizsgálata HeLa és HaCaT sejtvonalon.
5. In vivo irritációs tesz során a TEWL értékek meghatározása tengerimalac modellen.
6. A krém antioxidáns hatásának vizsgálata in vitro HaCaT sejtvonalon és in vivo tengerimalacon UVB sugárzás előtt és után.
7. A HO-1 enzim aktivitás meghatározása tengerimalac bőrszövetéből a krémmel való elő és utókezelésben UVB sugárzás ellenében.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

A munkánk során használt Transcutol HP, Capryol 90 és Labrasol a Gattefossé cég (Lyon, Franciaország), a Cremophor RH40, Cremophor A6, A25 a BASF (Ludwigshafen, Németország) ajándéka volt. A kísérleteinkben felhasznált cukorésztereket (SP 50, SP70, PS750) a Sisterna cég (Roosendaal, Hollandia magyarországi képviselte) bocsátotta rendelkezésre.

HeLa, humán adenokarcinoma sejtvonal a Sejtkultúrák Európai Gyűjteményéből (ECACC, European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) a HaCaT sejtek (humán keratinocita sejtek) a Cell Lines Service-től származott (CLS, Heidelberg, Németország). Minden egyéb reagens a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) terméke.

3.2. Silybum marianum mag származási helye

A máriatövis magok Aradról (Románia) származnak. Az aradi Vasile Goldis Nyugati Egyetem Természettudományi Kara és egy aradi, minőségi tanúsítvánnyal rendelkező gazdaság régóta együttműködésben van, ahonnan a növények erednek.

3.3. Szilimarin olaj és szilimarin por kivonása

A Silybum marianum magból Kahol és mtsai. által leírt módszer szerint készült a szilimarin por és olaj kivonat a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén. A kivonás után egy szilárd és egy folyékony fázist kaptak, a szilárd fázisból szárítás után nyerték a szilárd szilimarin port. A folyékony hexános kivonatból, vákuum alatt, rotációs párologtató készülékkel elpárologtatták a maradék hexánt és az így előállított sárga, szilimarin olajat használtuk a kísérleteinkben. A szilimarin por nem tartalmazott semmi oldószermaradványt. HPLC-MS módszerrel ugyanazok a bioaktív flavonoidok kerültek meghatározásra, mint a standardokban. A szilimarin olaj komponenseit Shimadzu QP-2010 GC-MS készülék segítségével jellemezték.

3.4. Szilimarin olajjal végzett SMEDDS formulálás és a készítmény hatásának vizsgálata

3.4.1. SMEDDS-szilimarin olaj formulálása

A SMEDDS gyógyszerforma kialakítását a következő felületaktív anyag segítségével végeztük: Cremophor RH40, Labrasol, Capryol 90 és Transcutol HP. A SMEDDS olajos fázisát a szilimarin olaj alkotta, amely egyben a gyógyszerhordozó rendszer hatóanyagaként is szerepelt. Különböző SMEDDS összetételeket víz hígítási módszerrel készítettük. A tenzid komponenseket 37°C-on összekevertük -Schott Tritronic diszpenzer és Radelkis OP-912 mágneses keverő - segítségével. A szilimarin olajat szobahőmérsékleten inkorporáltuk a rendszerhez. A keverékeket 24 órán keresztül állni hagytuk, hogy megfigyeljük az esetleges fázis-szeparációt. Erweka DT 800 forgólapátos kioldódás vizsgáló készülék segítségével (Erweka GmbH, Heusenstamm, Germany) néztük a különböző keverékek ön-emulgeáló képességét. 1 gramm keveréket adtunk 200 ml tisztított vízhez és enyhe keverés mellett (70 fordulatszám, 37 °C) szemmel követtük az ön-emulgeálás folyamatát, majd a megfigyeléseink alapján Turner háromszög diagramokat szerkesztettünk. Számításainkhoz Cartesian koordináta számolást használtunk.

3.4.2. SMEDDS cseppméretének meghatározása

A diszperz fázis átmérőjét DLS (dinamikus fénymikroszkóp) készülék (Brookhaven Fotometer) segítségével határoztuk meg. A diffúziós koefficiens kiértékeléséhez az intenzitás korrelációs funkciót használtuk. A vizsgálat során a 3.1 részecskeméret meghatározó programot használtuk a következő paramétereket állítottuk be: hőmérsékletet 25°C, lézer detektálási szög: 90 fok, lambda: 533 nm, index: 1,334. A számítógépes program automatikusan meghatározta a diszperz fázis cseppjeinek átmérőjét.

3.4.3. Kísérleti állatok

A szén-tetraklorid toxicitás során vizsgált hepatoprotektív hatást Swiss hím egéren vizsgáltuk. Az állatokat 12-12 h világos-sötét ciklusban, állandó hőmérsékleten tartottuk. Az állatoknak a standard rágszálótáphoz és a vízhez szabad hozzáférésük volt, az egerek testsúlya 25 ± 3 g volt. Az állatkísérleteket a Vasile Goldis Nyugati Egyetem etikai bizottsága engedélyezte. A kísérletek alatt követtük a laborállatok gondozására vonatkozó nemzetközi etikai irányelveket.

3.4.4. Kezelési protokoll szilimarin olaj- SMEDDS-el egerekben.

A 48 db állatot hat csoportra osztottunk. A kontrol (1. csoport) és a CCl₄ kontrol csoport (2. csoport) csak izotóniás sóoldatot kapott. A többi csoport 7 napon keresztül per os szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS-et kapott előkezelésben, kétféle dózisban (500 mg/kg és 1000 mg/kg). A 8. napon intraperitoneális CCl₄-ot (1.0 ml/kg) kapott a CCl₄ kontrol, valamint a 3. (SMEDDS p.o. 500 mg/kg) és 4. (SMEDDS p.o. 1000 mg/kg.) csoport. Az egerektől a 9. napon narkózisban (narkotikum: ketamin/xylazin 80/6 mg/ttkg elegy) a venae cavae-ból vérmintát gyűjtöttünk, majd cervikális diszlokációval termináltuk az állatokat.

3.4.5. Májenzim értékek meghatározása egéren

A cervikális diszlokáció előtt gyűjtött vért heparines csőbe raktuk, majd lecentrifugáltuk (15 perc, 2000 g), hogy a plazmát megkapjuk. A plazma mintákból azonnal meghatároztuk az alanin-aminotranszferáz (ALT) és aszparát-aminotranszferáz (AST) aktivitást, spektrofotometrikus méréssel kit segítségével (Roche, Franciaország) a gyártó által leírt módon.

3.4.6. Máj fehérje extraktum készítése

A totál fehérje extraktum készítése során 0,1g májszövetet szuszpendáltunk hideg 0,1M Tris-HCl pufferben (pH 7,4), mely 5mM EDTA-t és frissen hozzáadott proteáz gátló koktélt is tartalmazott. Ezután golyósmalomban (MM 301 típusú, Retsch GmbH and Co, Haa, Németország) homogenizáltuk 2 percen keresztül 16 Hz-en és a homogenizátumot centrifugáltuk (8,000 rpm, 30 perc, 4 °C). A felülúszóból határoztuk meg az enzimértékeket (SOD, CAT, GPX, GR) valamint a GSH és MDA koncentrációt.

3.4.7. Hisztopatológiai vizsgálatok

A májmintát 4%-os formalin-foszfát pufferoldatban fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk. A hemoxicillin-eozin festéshez 5µm vastag mintákat metszettünk, a meghatározást standard módszer alapján végeztük. Az Oil-Red O festéshez a lefagyasztott mintákat 8 µm vastagra szeltük SLEE MNT criotóm segítségével, majd 10%-os formaldehid pufferben fixáltuk és festéshez Oil-Red-O kit-et (Bio-Optica) használtunk, követve a gyártó által leírt módszert. A mintákat fénymikroszkóp (Olympus BX43 mikroszkóp) alatt megvizsgáltuk és digitális kamerával (Olympus XC30) lefényképeztük.

3.4.8. Máj antioxidáns státuszának feltérképezése

3.4.8.1. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás meghatározása májszövetből

SOD aktivitást spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg 340 nm-en. A módszer alapja a szuperoxid anion képződés okozta NADH oxidáció következtében létrejött optikai törés csökkenése. Egy egység enzim-aktivitás az az enzimmennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy a NADH oxidáció 50%-ban gátolva legyen.

3.4.8.2. Kataláz (CAT) aktivitás meghatározása májszövetből

CAT aktivitást spektrofotometriai módszerrel mértük 240 nm-en, a H₂O₂ bomlást monitorozva. A CAT aktivitást U/mg protein-ben határoztuk meg. Egy egység enzim egy µmole H₂O₂ bomlását okozza egy perc alatt, 25°C-on pH=7 –en.

3.4.8.3. Glutation peroxidáz (GPx) meghatározása májszövetből

GPx aktivitást Beutler által leírt módszer segítségével spektrofotometriás mérést (340 nm) végeztünk. A detektálás alapja a NADPH-NADP⁺ oxidációs átalakulás, tert-butil-hidroperoxide által. A NADPH koncentrációt moláris extinkciós koefficient (6,22 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹) segítségével számoltuk, az aktivitást U/mg-ban fejeztük ki. Egy egység (U) aktivitás annak az enzimnek a mennyisége, amely ahhoz szükséges, hogy 1 µmol NADPH egy perc alatt oxidálódjon.

3.4.8.4. Glutation reduktáz (GR) aktivitás meghatározása májszövetből

GR aktivitást spektrofotometriás méréssel (340 nm) határoztuk meg a NADPH oxidáció miatt létrejövő optikai sűrűség csökkenése alapján. Ez a folyamat a GSSG (oxidált glutation) enzimatisz redukciója miatt történik. Az enzim aktivitását U/mg-ban fejeztük ki. Egy egység enzim 1 μmol NADPH-t oxidál egy perc alatt meghatározott körülmények között.

3.4.8.5. GSH koncentráció meghatározása májszövetből

A májszövet homogenizátumát deproteinizáltuk 5% szulfoszalicilsavval, majd Detect X® Glutation kit segítségével kolorimetriás mérést végeztünk, követve a gyártó utasításait. A módszer kinetikai analízist foglal magába, így a GSH mennyiség folyamatos redukcióját okozza a DTNB reagensnek 5,5-ditiobis (2-nitro-benzoészav), amely sárga színű komplexet képez a reaktív nem fehérje-SH csoportokkal. A képződött sárga komplexet 412 nm-en lehet detektálni, 10 mM GSH kalibrációs görbe segítségével. A GSH szintet nmol/mg fehérjében adtuk meg.

3.4.8.6. Lipid peroxidáció meghatározása

Del Rio által leírt fluorimetriás módszer segítségével mértük a máj lipid peroxidációt, melynek alapja a képződött MDA termék mennyisége. A máj homogenizátumot (200 μl) 700 μl 0,1 M HCL-ban, 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Majd a homogenizátumhoz 900 μl 0,025 M tiobarbitursavot adtunk, és keveréket tovább inkubáltuk 37°C-on, 65 percen keresztül. A mintákat fluoreszensz analízisnek vetettük alá ($\lambda_{\text{ex}} = 520$, $\lambda_{\text{em}} = 549$) (Spektrofluorométer FP-6300 JASCO). A malondialdehid koncentrációját 1,1,3,3-tetrametoxipropán standard segítségével határoztuk meg. Az eredményeket nmol MDA/mg fehérjében fejeztük ki.

3.5. Szilimarin port tartalmazó krém formulálása és vizsgálata

3.5.1. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása

A krémek formulálásához különböző emulgenseket használtunk úgy, mint, Poliszorbát 60 (P60), Cremophor A6 és A25 (C) 1:1 arányban, valamint különböző típusú cukorésztert (SP50, SP70, PS750). Az o/v típusú krémek előállítása során a cetil-sztearil alkohol, sztearinsav és izopropil-mirisztát (IPM) melegítése (60 °C) és keverése alakította ki az olajos fázist. A vizes fázis propilénglikolt, emulgenst és tisztított vizet tartalmazott, melyet azonos hőmérsékletre (60 °C) felmelegítettünk és az olajos fázishoz kevertünk. A készítmény homogenizálása és lehűtése (25 °C) után adtuk a Nipagin M-t és az aktív hatóanyagot, a szilimarin port a krémekhez. A krémekbe 5% por került vagy szuszpendált (I-V összetétel) vagy oldott formában (VI-X összetétel). Az oldott összetételeknél a szilimarin port, előzőleg Transcutol HP (TC)-ben oldottuk.

3.5.2. Krémek gyógyszerforma vizsgálata

3.5.2.1. Krémek konzisztencia vizsgálata

A krémek ellenállását CT3 Textúra Analizáló (Brookfield, Middleboro, U.S.A.) készülékkel mértük. A kompressziós teszt, normál tesztmódban volt kivitelezve. A következő paraméterek értéke állandó volt: trigger erő (4g), csúcspont (10 mm), sebesség (0,5 mm/s). TA5 cilinder típusú testet (12,7 mm átmérő, 35 mm hosszúság) használtunk a vizsgálat során. Az ellenállás értékét N-ban fejeztük ki.

3.5.2.2. In vitro vizsgálat Franz diffúziós cellával

Membrán diffúziós és permeabilitási vizsgálatokat vertikális Franz-diffúziós cellában végeztük (Hanson Microette TM Topical and Transdermal Diffusion Cell System). A donor fázisba 0,3 g mintát raktunk, a cellulóz-acetát membránra helyezve (0,45 µm pórusméret). A membránt izopropil-mirisztátban (IPM) áztatva készítettük elő. Az effektív diffúziós terület 1,767 m² volt. 30%-os alkoholt használtunk akceptor fázisnak, azért hogy segítsük a szilimarin oldódását. A mágneses keverő rotációja 450 rpm-re volt állítva. A receptor oldat 32,5 °C-ra volt termosztálva

az egész kísérlet alatt, hogy a Franz cella membránja hasonló legyen a fiziológias bőr hőmérsékletéhez. A kísérleteket 6 órán keresztül végeztük. Az akceptor fázisból 0,8 ml mintát vettünk, melyet friss receptor közeggel helyettesítettünk. A szilimarinnak a mennyiségének mérését UV spektrofotométer segítségével végeztük (Shimadzu Spectrophotometer, Japan, Tokyo), 287 nm hullámhosszon.

3.5.3. Sejtenyésztés

A HeLa sejteket műanyag sejtenyésztő edényben növesztettük, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő médium folyadékban, amely 3.7 g/L NaHCO₃, 10% (v/v) hőinaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS), 1% (v/v) nem esszenciális aminosav oldatot, 1% (v/v) l-glutamint, 100 IU/mL penicillint és 100 IU/mL sztreptomocint tartalmazott, 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában.

HaCaT keratinocitákat DMEM tenyésztő médium folyadékban növesztettük, amely 7% (v/v) FBS-t, sztreptomocint (100 U/ml), penicillint (0,1 mg/ml) és glutamint (4 mmol/l) tartalmazott párásított CO₂ atmoszférában (5%v/v), 37 °C-on.

A sejtenyésztő médiumot hetente kétszer cseréltük mindkét sejttypusnál lamináris áramlású steril fülke alatt. A sejteket 1x10⁵ sejt/cm² sűrűsége szétosztottuk és a kísérletekhez közel konfluensre növesztettük. A konfluens sejtréteg kialakulásakor történt a sejtek passzálása lamináris box alatt. 20-40 passzázsszám közötti sejteket használtunk a citotoxicitási és antioxidáns kísérleteknél.

3.5.4. MTT teszt

A I-X összetétel citotoxicitását kolorimetriás citotoxicitási vizsgálattal, az MTT tesztel végeztük el. HaCaT keratinocitákon és Hela sejtvonalon végeztük az in vitro citotoxicitási vizsgálatokat. A vizsgálatot a következőképp végeztük: HaCaT és HeLa sejteket sima felületű 96 lyukú tenyésztő plate-ben szétosztottuk 10³ sejt/lyuk sűrűsége és CO₂ inkubátorban, 37°C-on hagytuk nőni 7 napig, amíg a konfluens sejtréteg kialakult. A növesztés során a 3. napon a tenyésztő médiumot lecseréltük lamináris box alatt. A kísérletek során a sejtenyésztő médiumot eltávolítottuk, vizsgálati mintákat ráraktuk a sejtre és a sejteket további 30 percig inkubáltuk 37°C-on. A minták eltávolítása után a sejteket kétszer 1 ml PBS oldattal mostuk, és további 3 órán keresztül inkubáltuk (37°C-on) az MTT -t tartalmazó médiummal, 5 mg/ml. A lila formázán kristályokat sósavas izopropanolban oldottuk (izopropanol : 1,0 N sósav= 25:1). Az

abszorbanciát 570 nm –en mértük, 690 nm háttér mellett FLUOstar OPTIMA Microplate Reader segítségével. (BMG LABTECH, Offenburg, Németország). A sejt életképességet kezeletlen kontrol- hoz viszonyítva százalékban fejeztük ki. Mindegyik kísérletet ötször megismételtünk, mindegyik komponenst 5 lyukban vizsgáltuk.

3.5.5. In vivo kísérletekhez használt kísérleti állatok

Hím, Hartley tengerimalacot (250-350 g) használtunk a bőrszövet antioxidáns és HO-1 enzim értékének meghatározására. Az állatok standard rágcslótápot kaptak ad libitum és vizet ihattak korlátlanul. Az állatokat 1 hétig hagytuk akklimatizálódni a kísérletek előtt és 25 ± 2 °C hőmérsékleten, 55 ± 5 % relatív páratartalomban tartottuk őket 12 órás világos-sötét ciklusban. Az állatkísérletekben a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt a vonatkozó Európai Unió-s és a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (No 10/2014/DEMÁB, 2019).

3.5.6. In vivo bőr irritációs teszt

Az in vivo antioxidáns vizsgálatok előtt az összetételekkel (III., IV., VIII., IX.) bőr irritációs tesztet végeztünk. A kiválasztott összetételeket a tengerimalac hátbőrére kentük és a TEWL értéket 24 órával a ráhelyezés előtt és után mértük. A vizsgált krémet (0,1 g) egyenletesen eloszlattunk egy nem egybefűzött polietilén vászonra (2 cm X 2 cm), amelyet utána a tengerimalac hátára rögzítettünk. A vizsgálat előtt az állatok hátsó bőrfelületét teljesen leborotváltuk. A polietilén vászont Tegaderm® 3M (3Med Kft, Budakeszi, Magyarország) és Fixomull ® ragtapasszal (MEDIGOR Bt., Veszprém, Magyarország) rögzítettük. 24 óra elteltével a kötést eltávolítottuk és a kezelt bőrfelületet vattával megtisztítottuk. A készítmény eltávolítása után 30 perccel a transepidermális vízvesztés (TEWL, Transepidermal water loss) értékeket megmértük és összehasonlítottuk a kezelés előtt 24 órával mért értékekkel. Tewameter (TM300, Courage& Khazaka, Köln, Németország) segítségével. A kísérlet alatt a laboratórium hőmérséklete, 25° C-on relatív páratartalma 55% értéken maradt. Mindegyik kísérlet ötször lett megismételve (n=5).

3.5.7. UV-B sugárzás HaCaT sejteken, a sejtek elő- és utókezelése.

A HaCaT sejteket 12-lyukú sima felületű plate-ben szélesztettük 1×10^5 sejt/lyuk sűrűséggel és 7 napig növesztettük CO₂ inkubátorban 37°C -on, a konfluens sejtréteg kialakulásáig. A növesztés során a 3. napon a tenyésztő médiumot lecseréltük lamináris box alatt. Az UVB sugárzás 350μW egyszeri sugárzást jelentett 20 cm távolságból.

Az előkezelt csoportban, a sejtenyésztő médiumot eltávolítottuk, majd a vizsgálati mintát ráraktuk a sejtekre és a sejteket további 20 percig inkubáltuk (37°C), majd 10 perc UV-B sugárzás után a vizsgálati mintákat eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk és további 24 órán át inkubáltuk (37°C). Az utókezelés során a sejteket először 10 percig UV-B sugárzásnak tettük ki, és utána kezeltük a vizsgálati mintákkal 20 percen keresztül. Ezután a vizsgálati mintát eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk és 24 órán át inkubáltuk (37°C). A kísérlet végén meghatároztuk következő paramétereket: superoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), glutation peroxidáz (GPx) és malondialdehid (MDA) aktivitások. Mindegyik kísérletet ötször ismételtünk meg.

3.5.8. UV-B sugárzás tengerimalac bőrén in vivo, a bőr elő- és utókezelése szilimarin tartalmú krémmel

A szilimarin krémek (III., IV., VIII., IX.) elő és utókezelésének antioxidáns hatását vizsgáltuk UVB sugárzás előtt és után. Az állatokat UV-B sugárzásnak tettük ki (akut sugárzás, 350μW) 20 cm távolságban. A kísérlet előtt a tengerimalacok hátát leborotváltuk és olyan alumínium fóliával fedtük le, amelyen 10 téglalap alakú (0,8 X 13 cm) vágás volt, majd 0,1 g krémet vittünk fel mindegyik vágásra.

Az antioxidáns és HO-1 enzim vizsgálatoknál az állatokat két csoportra osztottuk, mindegyik csoporthoz 10 állat tartozott. Az I. csoportban a tengerimalacok bőrét előkezeltük a krémmel 20 percig, majd az állatokat az UV-B készülék alá helyeztük és 10 percig sugároztuk a fedetlen bőrfelületet. A krémeket lemostuk majd 24 órával a sugárzást követően a bőrmintákat összegyűjtöttük. A II. csoportban az állatokat először 10 percig besugároztuk, majd bőrüket utókezeltük a krémmel, melyet 20 perc múlva lemostuk és 24 óra elteltével a bőrmintákat összegyűjtöttük. A vizsgálatok végén az állatokat altatásban tartottuk ketamin/xylazine (30-44 mg/kg, 1-5 mg/kg) segítségével és a szövetmintákat kivágtuk. Az állatokat cervikális diszlokációval termináltuk. A mintákat PBS-ben (foszfát puffer pH 7.4) áztattuk és lemostuk,

majd eltávolítottunk a maradék vörösvérsejtet és alvadékot. A bőrmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80°C-on tartottuk a további vizsgálatig.

3.5.9. Szuperoxid dizmutáz aktivitás meghatározása

A bőrszövetet homogenizáltuk 20 mM HEPES pufferben (1mM EGTA, 210 mM mannitol, és 70 mM sucrose /g szövet), pH 7.2. A homogenizátumot centrifugáltuk 1500 X g-n, 5 percen keresztül 4°C-on. És a felülúszóban vizsgáltuk a SOD aktivitást Cayman kit segítségével, a gyártó utasítása szerint. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf).

A sejteket (1×10^6) gumibot segítségével felszedtük, 1000 X g-n, 10 percen keresztül 4 °C-on centrifugáltuk. A sejtpelletet homogenizáltuk 20 mM HEPES pufferben (1mM EGTA, 210 mM mannitol, és 70 mM sucrose /g szövet), pH 7.2. 10.000 X g-n 15 percen keresztül 4 °C-on, a felülúszó SOD aktivitását Cayman kit segítségével meghatároztuk, a gyártó utasítása szerint. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf)

3.5.10. Kataláz aktivitás meghatározása

A szövetmintákat homogenizáltuk hideg pufferben (50 mM kálium foszfát, pH 7.0, ebben 1 mM EDTA) per gramm szövet, 10000 x g-n 15 percen keresztül 4 °C-on centrifugáltuk és a felülúszóban néztük a CAT aktivitást Cayman kit segítségével. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf)

A sejteket (1×10^6) gumibot segítségével felszedtük, 1000 x g-n, 10 percen keresztül 4 °C-on centrifugáltuk. A sejtpelletet homogenizáltuk jégen, 2 ml hideg kálium foszfát pufferben, pH 7.0, 1mM EDTA per gramm szövet, 10000 X g –n 15 percen keresztül centrifugáltuk 4°C-on, a felülúszó CAT aktivitását mértük Cayman kit segítségével. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf)

3.5.11. Glutation peroxidáz aktivitás

A szövetmintákat homogenizáltuk 10 ml hideg pufferben amely tartalmazott 50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 5 mM EDTA és 1mM dithiothreitol, per gramm szövet, 10000 x g-n 15 percen keresztül 4°C –on centrifugáltuk és a felülúszóban néztük a GPX aktivitást Cayman kit segítségével. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/703102.pdf)

A sejteket (1×10^6) gumibot segítségével felszedtük, $1000 \times g$ -n, 10 percen keresztül $4^\circ C$ -on centrifugáltuk. A sejt pelletet homogenizáltuk jégen, 2 ml hideg kálium foszfát pufferben, pH 7.0, 1mM EDTA per gramm szövet, $10000 \times g$ -n 15 percen keresztül centrifugáltuk $4^\circ C$ -on, a felülúszó GPX aktivitását mértük Cayman kit segítségével (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/703102.pdf)

3.5.12. Lipid peroxidációs (MDA) teszt

Szövetmintát (10 mg) és sejteket (1×10^6) jégen homogenizáltuk 300 μ l MDA lízis pufferben, amely 3 μ l BHT (100 $\times$) tartalmazott, $13000 \times g$ -n, 10 percen keresztül centrifugáltuk, hogy az oldhatatlan maradványokat eltávolítsuk. A felülúszót vizsgáltuk Lipid peroxidációs kit segítségével. (Sigma-Aldrich, Magyarország) A lipid peroxidációt az MDA (malondialdehid) és tiobarbitursav (TBA) reakciójakor keletkező kolorimetriás termékből (532 nm) határoztuk meg, amely arányos az MDA mennyiségével. Mindegyik antioxidáns tesztet ötször ismételtünk meg.

3.5.13. HO-1 aktivitás mérés

A tengerimalac bőrszövetet homogenizáltuk 200 mM foszfát pufferben (pH=7,4), majd 20.000g-vel, $4^\circ C$ -on 30 percen keresztül centrifugáltunk. A felülúszóból a HO-1 enzim aktivitást Tenhunen és mtsai által leírt módszer segítségével határoztuk meg. A módszer alapja a hem átalakulása bilirubinná, mely spektrofotometriásan meghatározható. A felülúszóhoz a következő reakcióelegyet adtuk: 2mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 15 μ M hem, 105 μ M NADPH, 120 μ g/mL biliverdin reduktáz (patkány máj citoszolból), 2mM $MgCl_2$ és 100 mM KH_2PO_4 . Az így kapott mintát (2ml) $37^\circ C$ -on inkubáltuk 1 órát sötétben, majd a reakciót a minták jégre helyezésével és kloroform hozzáadásával állítottuk le. A HO-1 aktivitást a bilirubin reakcióelegyben való képződésének spektrofotometriás mérése alapján számoltuk ki 460 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbségét alapul véve. Az aktivitás mértékegységét nmol bililrubin / mg / óra-ban fejeztük ki.

3.6. Statisztikai analízis

A szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS gyógyszerforma vizsgálatakor az eredményeket GraphPad Prism 5 szoftver segítségével végeztük. A csoportok közötti szignifikanciák összehasonlítását kétutas ANOVA módszerrel és a csoportok közötti eltérést Bonferroni tesztel végeztük. Az adatokat átlag $\pm$ S.D. formában közöltük. Csillaggal és üres kereszttel jelöltük a szignifikáns különbségeket az ábráinkon. A különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Mindegyik kísérlet során öt párhuzamos mérést végeztünk és legalább ötször megismételtük ($n=5$).

A szilimarin port tartalmazó krém vizsgálatának eredményeit a SigmaStat (version 3.1; SPSS, Inc.) segítségével elemeztük és ez alapján számított átlagokat $\pm$ S.D. tüntettük fel. Az MTT életképesség vizsgálata során a csoportok összehasonlítását egyutas ANOVA módszerrel végeztük, és Tukey's tesztel végeztük a csoportok közötti eredmények összehasonlítását. A SOD, CAT, MDA, GPX és HO-1 értékelésnél többutas Anova módszert használtunk és a csoportok közötti összehasonlítást Persian korrelációval végeztük. Csillaggal és kereszttel jelöltük a szignifikáns különbségeket az ábráinkon. A különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A HeLa és HaCaT sejtvonalon végzet vizsgálatoknál tíz ($n=10$), a több kísérlet során öt ($n=5$) párhuzamos mérést végeztünk és legalább ötször megismételtük.

3.7. Az értekezésben szereplő, együttműködésben kivitelezett metodikák

A szilimarin-olaj tartalmú SMEDDS gyógyszerformák in vivo állatkísérleteiben az aradi Vasile Goldis Nyugati Egyetem munkatársai segítettek. (Georgiana Damache, Ardelean Aurel, Costache Marieta, Dinischiotu Anca, Hermenean Anca)

A szilimarin por tartalmú krémek in vivo állatkísérleteiben részt vettek a Debreceni Egyetem, Farmakológiai Intézet munkatársai. (Dr. Juhász Béla, Dr. Bombicz Mariann, Dr. Priksz Dániel, Dr. Varga Balázs)

A HO-1 enzim mérésében közreműködött a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék munkatársa. (Dr. Varga Csaba)

A statisztikai eredmények kiértékelését dr. Ujhelyi Zoltán kollégám segítségével végeztem.

Az értekezésben szereplő egyéb módszert és annak kiértékelését a jelölt saját maga végezte.

4. Az értekezés új tudományos eredményei

4.1. Szilimarinolaj-SMEDDS készítmények formulálása és terápiás hatásának vizsgálata során kapott eredmények

Munkánk során modern emulziós formát, önmikroemulgeáló rendszert alakítottunk ki szilimarin olajból, melyet nemcsak vivőrendszerként alkalmaztuk, hanem egyúttal a hatóanyagként is. A SMEDDS-ben lévő olaj komponens tulajdonsága és koncentrációja meghatározó elemei a gyógyszerformának. Az önemulgeáló rendszerben az olaj saját terápiás hatása azáltal növekszik, hogy perorális felszívódása jelentősen fokozódik.

Az olajos fázis mellett a megfelelő felületaktív anyag kiválasztása is növeli a hatóanyag terápiás hatását az önemulgeáló rendszerben. Az összetételünkben Cremophor RH 40, Transcutol HP felületaktív anyagot, kotenzidként pedig Labrasol és Capryol 90-et használtunk. A formuláláshoz alkalmazott felületaktív anyagok citotoxicitását és membrán permeabilitásra gyakorolt hatását a munkacsoportunk előzőleg már megvizsgálta, így az eredmények alapján kerültek kiválasztásra a jelenlegi munkában. Előző kísérleteink során azt is megállapítottuk, hogy a felületaktív anyagok megváltoztathatják a sejtmembrán permeabilitását és a paracellelluláris transzportot. Feltételezésünk szerint, a szilimarin olajból és a megfelelő felületaktív anyagokból formulált önmikroemulgeáló rendszer valószínűleg a paracelluláris transzportot is befolyásolta, így növelve az olaj szájon át történő biohasznosulását.

A megfelelő gyógyszerforma kialakítása a hatóanyagok terápiás hatását növelheti, ugyanakkor a dózist csökkentheti, erre a célra megfelelő lehet az ön (mikro) emulgeáló rendszerek kialakítása. Ezt igazolja az, hogy állatkísérletekben, csak extrém magas dózisban, 2000 mg/kg (patkány) illetve 10 g/kg (egér) mutatott védő hatást májszövetben szén-tetraklorid toxikáció után.

Munkánk során a szilimarin olaj-SMEDDS gyógyszerforma már kisebb mennyiségű olajtartalom esetén is terápiás hatást mutatott. (500 mg/kg, 1000 mg/kg).

A kísérleteinkben szén-tetraklorid expozíciót követően vizsgáltuk a szilimarin olaj hepatoprotektív hatását SMEDDS gyógyszerformában. A szén-tetraklorid toxikáció megemelte az ALT és AST értékeket az egéren végzett in vivo kísérletekben. A szilimarin olaj-SMEDDS összetétel a magasabb dózisban (1000 mg/kg) mérsékelte a szén-tetraklorid okozta szérum aminoszén-aminotranszferáz értékeket. Feltételezhetően, a hatást az válthatja ki, hogy a szilimarin olaj megtartja a májsejtek membránjának strukturális integritását. A hisztológiai vizsgálataink ezt a

megállapítást szintén alátámasztották, mivel a nagyobb dózisban adott szilimarinolaj-SMEDDS (1000 mg/kg) készítmény mérsékelte a szén-tetraklorid okozta májkárosodást.

A szilimarin olaj-SMEDDS előkezelés ugyanakkor antioxidáns védelmet mutatott az egér májszövetből mért antioxidáns enzimértékek alapján. A szén-tetraklorid okozta expozíció az antioxidáns enzimek csökkenését okozta, de a májhomogenizátumban mért enzim aktivitások (SOD, CAT, GPX, GR) nőttek a szilimarin-olaj-SMEDDS kezelést követően. Az antioxidáns enzimszintek növekedésének egyik lehetséges oka a szilimarinolaj linolénsav tartalma, amely az olaj egyik fő komponense. A linolénsav az endogén GSH oxidációját idézi elő, ami a szuperoxid anionok képződést generál. A szuperoxid-anion egy kaszkádot elindítva, növeli a SOD termelődést, mely emeli a máj hidrogén-peroxid koncentrációját, és ez a GPX és CAT reakciót katalizálja.

A szilimarin-olaj SMEDDS készítmény az egér májszövetében növelte a GR szintet a szén-tetraklorid okozta enzimszinthez képest, mely változás szintén a linolénsavhoz kapcsolható. Az eredményeink összhangban vannak Choi és mtsai. megfigyeléseivel, melyben a linolénsav izomerek GR növelő hatását írta le.

A lipidperoxidáció végtermékének, az MDA szintjének növekedése jelzi a szabadgyökök keletkezését. A szén-tetraklorid expozíciót követően az antioxidáns enzimek csökkenése az antioxidáns védelmi rendszer gyengüléséhez vezetett, amely automatikusan az MDA koncentráció növekedését vonta maga után. A szilimarin-olaj SMEDDS előkezelés csökkentette az MDA szintet, amely a formuláció antioxidáns hatását feltételezi, melynek oka valószínű az olajban lévő magas linolénsav, tokoferol és aszkorbinsav 2,6 dihexadekonát.

4.2. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása és terápiás hatásának vizsgálata során kapott eredmények

Munkánk során megfelelő konzisztenciával rendelkező szilimarin port tartalmazó o/v emulziós rendszerű krémeket formuláltunk.

A formulálás során a szilimarin port szuszpenziós formában tartalmazó összetételek mellett sikerült olyan krémeket előállítani, melyekben a hatóanyag oldott állapotban volt. A szilimarin port Transcutolban oldottuk, amely jó szolubilizáló és penetrációt fokozó anyag, ugyanakkor nem toxikus és a bőrrel biokompatibilis.

A krémek előállítása során különböző nemionos, amfifil tenzidet használtunk úgy, mint Poliszorbát 60, Cremophor A6, A25, cukorészter SP50, SP70 és PS750. Az emulziós rendszerű

külsőleges készítményeknél a megfelelő, penetrációt fokozó emulgens kiválasztásával növelhetjük a készítmények penetrációját. A felületaktív anyagoknak fontos szerepe van a szolubilizációban is, ugyanakkor megváltoztathatják a gyógyszerek biohasznosíthatóságát, hiszen befolyásolják a hatóanyag abszorpcióját és penetrációját. A Franz diffúziós vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a szilimarín port oldott állapotban tartalmazó krémekből a hatóanyag felszabadulása és membránon való átjutása lényegesen jobb volt, mint a szuszpenziós összetételeknek. Az in vitro membrán diffúziós vizsgálatok során azt is megállapítottuk, hogy a membránon átjutott szilimarín mennyisége az emulgensként cukor-észtert tartalmazó összetételek esetében volt a legnagyobb.

A felületaktív anyagok toxikus koncentrációjának a meghatározása is szükséges ahhoz, hogy a gyógyszeradagolás biztonságos legyen. Ennek érdekében, elsőként in vitro biokompatibilitási vizsgálatokat végeztünk (MTT teszt) HeLa és HaCaT sejteken. A HeLa sejtek a humán méhnyakrák megbízható modellje, de külsőleges készítmények vizsgálatára is használják. A HaCaT sejtek alkalmasak arra, hogy megállapítsuk a segédanyagok bőr irritációs potenciálját. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az összetételekben lévő emulgensek hogyan befolyásolja a krémek tolerálhatóságát. Az MTT sejtéletképesség vizsgálatok során emulgensként cukor-észtert tartalmazó készítmények biztonságosabbnak bizonyultak, mint az emulgensként Cremofort és poliszorbátot tartalmazó krémek.

Az in vivo biokompatibilitási vizsgálatok során bőrirritációs tesztet (TEWL teszt) végeztünk az in vitro vizsgálatok során megfelelőnek bizonyult krémösszetételekkel (III., IV., VIII., IX.). A mért TEWL értékek szerint a szilimarín krémek nem okoztak bőrirritációt a tengerimalac bőrén. A formulációs és biokompatibilitási vizsgálatok után tovább folytattuk az in vitro kísérleteket. A sejteket UVB sugárzásnak tettük ki és vizsgáltuk a szilimarín krém hatását elő és utókezelésben úgy, hogy HaCaT keratinociták antioxidáns enzim aktivitás értékeit meghatároztuk.

Az UVB sugárzás önmagában csökkentette a GPx, SOD és CAT enzimaktivitást, ugyanakkor az MDA értéke nőtt a kezletlen csoporthoz képest. A szilimarín port Transcutolban oldva és emulgensként SP50 és SP70 cukorésztert tartalmazó készítmények (VIII., IX.) elő és utókezelésben is az antioxidáns enzimek növekedését okozták az UVB sugárzást követően. E mellett a lipid peroxidáció végtermékének a csökkenése volt tapasztalható ezen készítmények alkalmazásakor.

Eredményeink összhangban vannak azzal, hogy a szilimarín dózistól függően védő hatást mutatott UV indukált károsodás ellen humán keratinocitákon az NF-kappa-B aktiváció gátlásával.

Az in vitro antioxidáns tesztek eredményei szoros kapcsolatot mutattak az in vivo vizsgálatokkal, melyet tengerimalac bőrén végeztük el.

A szilimarín krémek elő és utókezelése a tengerimalac bőrszövetében mért antioxidáns enzimszintek növekedését okozta UVB sugárzást követően. Az MDA szint ugyanakkor ezekben az esetekben csökkenést mutatott. Az in vitro és in vivo eredmények igazolták, hogy a szilimarín tartalmú o/v emulziós krémek kivédik az UVB okozta oxidatív stresszt, mely a hatóanyag antioxidáns hatásával összefüggést mutat. Megfigyelésünk megegyezik Katiyar vizsgálataiban tapasztaltakkal, ahol a szilimarín külsőleges használata gátolta az UV okozta oxidatív stresszt egér bőrszövetben, UVB besugárzásban. A kísérletekben a szilimarint alkoholban oldották, de nem alakítottak ki gyógyszerformát.

Svobodavá és mtsai megfigyelései szerint, a szilimarín flavonoid komponensei, az UVA okozta oxidatív stressz bőrkárosodást okozó hatását mérsékeltek. A kísérletek során a szilimarín port DMSO-ban oldották és ennek hatását vizsgálták.

A HO-1 enzim szintjének nagymértékű növekedése szintén a stresszválasz egyik jele a különböző környezeti hatásokra. Az UV-A és UV-B sugárzás is magas HO-1 szintet hoz létre a sejtekben. Kísérleteink során az UVB sugárzás után a tengerimalac bőrszövetében magas HO-1 értékeket mértünk. Ugyanakkor a szilimarín krém kezelése nem befolyásolta a HO-1 enzim értékeket összehasonlítva a kezeletlen csoporttal. Feltételezésünk szerint, abban az esetben, mikor a szilimarín krémmel történő kezelés során az antioxidáns enzimek nagymértékben aktiválódnak (oldott hatóanyag bejutás esetén), az aktivált antioxidáns enzim rendszer gyorsan eliminálja a szabad gyököket, ezért a HO-1 enzim ekkor nem képes aktiválódni.

5. Összefoglalás

Kísérletsorozatunk **első részében** szilimarinolajat tartalmazó SMEDDS készítményt formuláltunk, melyben az olaj komponens egyben a hatóanyag is.

Megállapítottuk, hogy a szilimarinolaj-SMEDDS gyógyszerforma csökkentette a szén-tetraklorid intoxikáció okozta májenzim értékeket és az antioxidáns enzimszintek emelkedését egér májszöveten.

A szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS készítmények hepatoprotektív hatását hisztopatológiai vizsgálatokkal is igazoltuk egér májszöveten szén-tetraklorid toxikációt követően.

Eredményeink rámutattak arra, hogy a szilimarin-olaj SMEDDS összetételek nagy valószínűséggel a lipid-peroxidációt megakadályozzák és stabilizálják a májsejtek membránját, ezzel védi ki a szén-tetraklorid okozta májkárosodást.

Vizsgálatainkat összegezve megállapíthatjuk, hogy a szilimarin-olaj SMEDDS készítmény szájon át történő adagolásának májvédő hatása van.

Munkánk **második felében** olyan szilimarin port tartalmazó, megfelelő konzisztenciájú o/v krémeket formuláltunk, amely penetrációt fokozó anyagokat tartalmaz. Az in vitro membrán diffúziós vizsgálatok eredményei igazolták, hogy az összetételben lévő Transcutol- mely segítette a szilimarin por oldódását is- együttesen a cukor-észter típusú emulgenssel növeli a hatóanyag átjutását a diffúziós membránon.

A szilimarin port oldott állapotban tartalmazó krémek elő és utókezelésben is megfelelő antioxidáns aktivitást mutattak, az UVB indukálta oxidatív stressz ellen, tengerimalac modellen és HaCaT sejteken. Az utókezelés szignifikáns hatása azért is kiemelkedő, mert a szilimarin krémek hatékony kezelési lehetőséget jelenthetnek bőrártalmak kezelésére

Az in vitro és in vivo eredmények nem mutattak teljes korrelációt a kísérleteink során. Megállapítható, hogy az in vitro eredmények értékei nem elegendőek önállóan, viszont az in vivo állatkísérletekkel együtt a humán klinikai vizsgálatok megjósolhatóak.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Vecsernyés Miklósnak** a szakmai segítséget és támogatást.

Hálás vagyok **Dr. Bácskay Ildikónak** a hosszú éveken át tartó szakmai és baráti támogatásáért.

Köszönetet szeretnék mondani közvetlen kollégáimnak, akik alkalomadtán szintén sokat segítettek a kutatómunkám kivitelezésében:

Dr. Ujhelyi Zoltán

Dr. Fenyvesi Ferenc

Dr. Réti-Nagy Katalin

Dr. Róka Eszter

Dr. Sinka Dávid

Dr. Váradi Judit

Dr. Vasvári Gábor

Vaszily Mária

Köszönetet szeretnék mondani az in vivo állatkísérletekben nyújtott segítségért az alábbi kollégáknak:

Dr. Juhász Béla, Dr. Bombicz Mariann, Dr. Priksz Dániel, Dr. Varga Balázs

Szeretnék köszönetet mondani **családomnak**, akik minden körülmények között támogattak.

Jelen kutatást a Magyarország-Románia határon átnyúló együttműködési program 2007-2013 támogatta (HURO/0901/058/2.2.2.), valamint a TÉT-14-FR-1-2015-0031-Balaton-projekt.

Munkánkat továbbá a GINOP-2.3.2-15 számú, valamint a Kutatási infrastruktúra megerősítése – nemzetköziesedés, hálózatosodás című, GINOP-2.3.3-15-2016-00021 számú pályázatok is támogatták.

7. Publikációk jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/163/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fehér Pálma
Neptun kód: A8GZI9
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036708

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

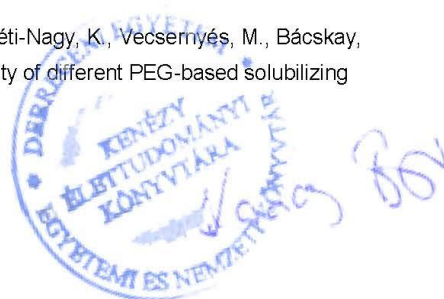
1. **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Várad, J., Fenyvesi, F., Róka, E., Juhász, B., Varga, B., Bombicz, M., Priksz, D., Bácskay, I., Vecsernyés, M.: Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes.
Molecules. 21 (10), 1269, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21101269>
IF: 2.465 (2015)
2. **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Damache, G., Ardelean, A., Costache, M., Dinischiotu, A., Hermenean, A., Bácskay, I.: Hepatoprotective effects of a self-micro emulsifying drug delivery system containing Silybum marianum native seed oil against experimentally induced liver injury.
Pharmazie. 70, 231-238, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2015.4146>
IF: 1.264





További közlemények

3. Váradi, J., Harazin, A., Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Gogolák, P., Vámosi, G., Bácskay, I., **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Róka, E., Haines, D. D., Deli, M. A., Vecsernyés, M.: Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Protects Against Cytokine-Induced Barrier Damage in Caco-2 Intestinal Epithelial Monolayers.
PLoS One. 12 (1), e0170537, 2017.
IF: 3.057 (2015)
4. Réti-Nagy, K., Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Vámosi, G., Váradi, J., Bácskay, I., **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Róka, E., Vecsernyés, M., Balogh, G., Vasvári, G., Fenyvesi, F.: Endocytosis of fluorescent cyclodextrins by intestinal Caco-2 cells and its role in paclitaxel drug delivery.
Int. J. Pharm. 496, 509-517, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.049>
IF: 3.994
5. Róka, E., Ujhelyi, Z., Deli, M. A., Boosik, A., Fenyvesi, É., Sente, L., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Váradi, J., **Fehér, P.**, Gesztelyi, R., Félix, C., Perret, F., Bácskay, I.: Evaluation of the Cytotoxicity of [alfa]-Cyclodextrin Derivatives on the Caco-2 Cell Line and Human Erythrocytes.
Molecules. 20, 20269-20285, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201119694>
IF: 2.465
6. Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Bacsó, Z., Gutay-Tóth, Z., Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., Ujhelyi, Z., **Fehér, P.**, Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fluorescently Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase Endocytosis.
PLoS One. 9 (1), e84856, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084856>
IF: 3.234
7. Ujhelyi, Z., Róka, E., Fenyvesi, F., **Fehér, P.**, Váradi, J., Réti-Nagy, K., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Assessment of the hemolytic activity and cytotoxicity of different PEG-based solubilizing agents.
Pharmazie. 68, 383-384, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2013.2207>
IF: 1.003





8. Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., **Fehér, P.**, Kiss, T., Veszelka, S., Deli, M. A., 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.* 47 (3), 564-573, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.005>
IF: 2.987
9. Vecsernyés, M., Bácskay, I., Fenyvesi, F., Váradi, J., **Fehér, P.**: Practicals in Pharmaceutical Technology - Prescription Pharmacy. Debreceni Egyetem, Debrecen, 260 p., 2011.
10. Fenyvesi, F., Kiss, T., Fenyvesi, É., Szente, L., Veszelka, S., Deli, M. A., Váradi, J., **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Tótsaki, Á., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Randomly Methylated beta-Cyclodextrin Derivatives Enhance Taxol Permeability Through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayer. *J. Pharm. Sci.* 100 (11), 4734-4744, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22666>
IF: 3.055
11. Fenyvesi, F., Pétervári, M., Nagy, L., Kéki, S., Zsuga, M., Bácskay, I., Kiss, T., Váradi, J., **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Réti-Nagy, K., Vecsernyés, M.: Solubility increasing experiments of sylimarin with cyclodextrins. *J. Med. Aradean.* 14 (2), 13-17, 2011.
12. **Fehér, P.**, Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Váradi, J., Kiss, T., Ujhelyi, Z., Réti-Nagy, K., Bácskay, I.: Topical application of Sylibum Marianum extract. *J. Med. Aradean.* 14, 5-8, 2011.
13. Aigner, Z., Bácskay, I., Blazsó, G., Botz, L., Dévay, A., Doró, P., Dredán, J., **Fehér, P.**, Fenyvesi, F., Gáspár, R., Gunda, T., Hajdú, Z., Halmos, G., Herczegh, P., Hohmann, J., Lázár, L., Liktör-Busa, E., Nagymajtényi, L., Pál, S., Pálfi, M., Perjési, P., Soós, G., Szökő, É., Takács-Novák, K., Tábi, T., Tótsaki, Á., Tóthfalusi, L., Zelkó, R., Zupkó, I., Váradi, J., Veres, K.: Általános gyógyszerészeti ismeretek. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 496 p., 2011.
14. **Fehér, P.**, Oláh, M., Bodnár, I., Hecht, D., Bácskay, I., Juhász, B., Nagy, G. M., Vecsernyés, M.: Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses. *Brain Res. Bull.* 82 (1-2), 141-145, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.02.006>
IF: 2.498





15. Oláh, M., **Fehér, P.**, Ihm, Z., Bácskay, I., Kiss, T., Freeman, M. E., Nagy, G. M., Vecsernyés, M.: Dopamine-Regulated Adrenocorticotrophic Hormone Secretion in Lactating Rats: functional Plasticity of Melanotropes.
Neuroendocrinology. 90 (4), 391-401, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000232313>
IF: 3.074
16. Kiss, T., Fenyvesi, F., Bácskay, I., **Fehér, P.**, Kocsán, R., Váradi, J., Szenté, L., Fenyvesi, É., Iványi, R., Vecsernyés, M.: Ciklodextrin-származékok citotoxicitási vizsgálata Caco-2 sejtvonalon.
Acta Pharm. Hung. 77 (2), 150-154, 2007.
17. Kiss, T., Fenyvesi, F., Pásztor, N., **Fehér, P.**, Váradi, J., Kocsán, R., Szenté, L., Fenyvesi, É., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Cytotoxicity of different types of methylated beta-cyclodextrins and ionic derivatives.
Pharmazie. 62 (7), 557-558, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2007.7.7051>
IF: 0.775
18. Szilágyi, Á., Fenyvesi, F., Majercsik, O., Pelyvás, F. I., Bácskay, I., **Fehér, P.**, Váradi, J., Vecsernyés, M., Herczegh, P.: Synthesis and Cytotoxicity of Leinamycin Antibiotic Analogues.
J. Med. Chem. 49 (18), 5626-5630, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm060471h>
IF: 5.115
19. Vecsernyés, M., Juhász, B., Dér, P., Kocsán, R., **Fehér, P.**, Bácskay, I., Kovács, P., Tótsaki, Á.: The administration of α -melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium.
Eur. J. Pharmacol. 470 (3), 177-183, 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01780-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01780-1)
IF: 2.352

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,338

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 3,729

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, 2017.05.30.