

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Gyógyszerészeti segédanyagok és külsőleges gyógyszerformák biokompatibilitási, *in vitro* és *in vivo* vizsgálata

Dr. Pető Ágota

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



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel modern megközelítése	6
2.2. Penetrációfokozó segédanyagok.....	8
2.3. BGP-15	11
2.4. <i>Philadelphus coronarius</i>	14
2.5. A vizsgálati módszerek elméleti hátterének áttekintése	15
2.5.1. Biokompatibilitási vizsgálat.....	15
2.5.1.1. A citotoxicitás vizsgálata	15
2.5.1.2. A citotoxicitási vizsgálatokhoz használatos sejtvonalak áttekintése.....	17
2.5.2. Textúra analízis	18
2.5.3. Franz diffúziós vizsgálat	19
2.5.4. Luciferáz vizsgálat	20
2.5.5. In vivo gyulladásos modellek áttekintése.....	20
2.5.6. Antioxidáns vizsgálatok.....	21
2.5.7. Mikrobiológiai vizsgálatok	22
2.5.8. IL-4 szint monitorozása	23
3. Célkitűzés	24
4. Anyagok és módszerek.....	26
4.1. Anyagok.....	26
4.2. Módszerek	27
4.2.1. Biokompatibilitás vizsgálatához kapcsolódó módszerek.....	27
4.2.1.1. HaCaT sejtvonal fenntartása	27
4.2.1.2. MTT teszt	27
4.2.2. Kenőcsök formulálásához és vizsgálatához kapcsolódó módszerek	28
4.2.2.1. Kenőcsök formulálása	28
4.2.2.2. Textúra analízis	30
4.2.2.3. In vitro hatóanyag felszabadulás vizsgálata Franz diffúziós cella segítségével	30
4.2.3. Hatékonyság vizsgálata.....	31
4.2.3.1. Luciferáz vizsgálat	31
4.2.3.2. BGP-15 tartalmú kenőcsök gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata in vivo fülödéma teszttel	31
4.2.3.3. SOD aktivitás meghatározása, antioxidáns vizsgálat	32

4.2.3.4. Totál antioxidáns kapacitás (TAC) vizsgálat	32
4.2.4. Gyógynövényből történő kivonatkészítés és karakterizálás	33
4.2.4.1. Kivonat készítése és liofilizált termék előállítása a <i>P. coronarius</i> leveléből és virágából.....	33
4.2.4.2. Fizikai-kémiai karakterizálás HPLC módszerrel	33
4.2.4.3. A liofilizált kivonat fitokémiai vizsgálata	33
4.2.4.4. DPPH antioxidáns vizsgálat	34
4.2.4.5. Antioxidáns kapacitás meghatározása FRAP módszerrel	34
4.2.4.6. Antioxidáns kapacitás meghatározása CUPRAC módszerrel	35
4.2.4.7. Antioxidáns kapacitás meghatározása ABTS módszerrel.....	35
4.2.5. A gyógynövény hatásainak vizsgálata	35
4.2.5.1. Liofilizátum antimikrobiális hatásának vizsgálata mikrodilúcióval	35
4.2.5.2. Liofilizátum antimikrobiális hatásának vizsgálata in vitro idő-ölés (time-kill) teszttel.....	36
4.2.5.3. Liofilizátum gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata ELISA segítségével...	36
5. Eredmények.....	36
5.1. Segédanyagok biokompatibilitási vizsgálata.....	36
5.2. Kenőcs formulálás	42
5.3. BGP-15 tartalmú kenőcsök textúra analízise.....	42
5.4. In vitro hatóanyag felszabadulás	43
5.5. Készítmény citotoxicitásának vizsgálata MTT teszttel	45
5.6. Luciferáz vizsgálat.....	45
5.7. BGP-15 tartalmú kenőcsök gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata <i>in vivo</i>	46
5.8. BGP-15 antioxidáns hatásának vizsgálata	48
5.9. A <i>P. coronarius</i> bioaktív komponensek meghatározásának eredménye	49
5.10. A <i>P. coronarius</i> antioxidáns vizsgálata	50
5.11. Liofilizátum antimikrobiális hatásának vizsgálata mikrodilúcióval és time-kill módszerrel	51
5.12. Liofilizátum gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata	52
5.13. In vitro hatóanyag felszabadulás vizsgálata	53
5.14. <i>P. coronarius</i> tartalmú összetételek textúra analízise.....	55
5.15. A <i>P. coronarius</i> tartalmú kenőcsösszetételek citotoxicitása	56
6. Megbeszélés	57
6.1. A BGP-15-tel kapcsolatos kísérletek eredményeinek megbeszélése	57
6.2. A közönséges jezsámmel kapcsolatos kísérletek eredményeinek megbeszélése.....	59
6.3. Új tudományos eredmények összefoglalása	62

7. Összefoglalás.....	63
8. Summary	65
9. Irodalomjegyzék.....	67
9.1. Az értekezéshez felhasznált irodalmi hivatkozások	67
9. 2.Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	86
10. Rövidítésjegyzék	89
11. Ábrajegyzék	91
12. Táblázatok jegyzéke	93
13. Tárgyszavak	94
14. Keywords	94
15. Köszönetnyilvánítás	95
16. Függelék	97

1. Bevezetés

Manapság a természetes eredetű, növényi hatóanyagok reneszánszukat élik, a betegek részéről egyre növekszik az igény a természetes összetevőket tartalmazó készítményekre, [1,2]. A gyógyszertárakban egyre növekvő kínálat található a gyógynövény tartalmú étrendkiegészítőkből és egyéb készítményekből. A növényi eredetű hatóanyagok azonban nem feltétlenül jobbak a szintetikusan előállított hatóanyagoknál [3]. Alkalmazásuk esetében a biztonsággal kapcsolatban aggályok merülhetnek fel, ezért a növényi hatóanyagok felhasználását megelőzően preformulációs vizsgálatokat kell elvégezni. A gyógynövények termesztése kellő odafigyelést igényel, feldolgozásuk kihívásokkal teli feladat, ráadásul sok gyógynövény esetében csupán a népgyógyászat tapasztalati úton szerzett információi állnak rendelkezésünkre. A gyógynövényből történő hatóanyagkivonás mellett az aktív komponenseket azonosítani kell, továbbá a hatóanyag standardizálása is elengedhetetlen [4,5].

A természetes eredetű hatóanyagok mellett az új farmakonok, gyógyszerjelöltek kutatása, tudományos ismerete is fontos és rohamosan fejlődő terület, hiszen számos olyan kórkép és indikáció létezik, melynek kezeléséhez nem áll rendelkezésünkre megfelelő gyógymód, vagy a jelenleg használatos terápia nem teljes mértékben kielégítő és hatékonyabb, kevesebb mellékhatást okozó, jól tolerálható gyógyszerre van szükség [6,7].

A bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel lehetőségét és annak módszereit már a XX. században is nagy figyelem övezte. A dermális gyógyszerbevitel a betegek körében nagy népszerűségnek örvend, hiszen fájdalommentes, nem invazív kezelési mód, mely az emésztőrendszert elkerüli, így sokkal kevesebb mellékhatással kell számolnunk [8,9]. Azonban előnyei mellett gyógyszer formulálási szempontból nagy kihívást is jelent, melynek során több problémával is szembe kell néznünk, hiszen a bőr felépítéséből adódóan a stratum corneum gátat szab számos hatóanyag bejutásának a bőr mélyebb rétegeibe, az aktív komponenseknek számos kritériumnak kell megfelelniük. Többek között a méret, a lipofilitás, a hatékony dózis, és a felezési idő is meghatározó tényező. A megfelelő készítményalap, a megfelelő segédanyagok és penetrációfokozók használata hozzájárul a jobb terápiás hatás és biohasznosulás eléréséhez [10].

Doktori értekezésem témájaként egy gyógyszerjelölt farmakont, a BGP-15-öt és egy gyógynövényt, a *Philadelphus coronariust* választottam. Ezek felhasználásával külsőleges gyógyszerformát, O/V típusú kenőcsöket fejlesztettem, a gyógyszer formulálás lépései során a különbségekre -melyek a hatóanyag eltérő természetéből fakadnak- rámutatva. A

formulálás során fő szempontjaim a biohasznosulás és a biokompatibilitás növelése voltak. A hatóanyagok kiválasztásában szerepet játszott egy új, kismolekulájú hatóanyag dermális bevitelének elősegítése, valamint egy gyógynövény feldolgozása és külsőleges gyógyszerformában történő alkalmazása. A választott hatóanyagok hatékonyságának vizsgálata is fontos részét képezte kutatásomnak. A részletes kísérleti tervet a célkitűzés fejezetben mutatom be.

2. Irodalmi áttekintés

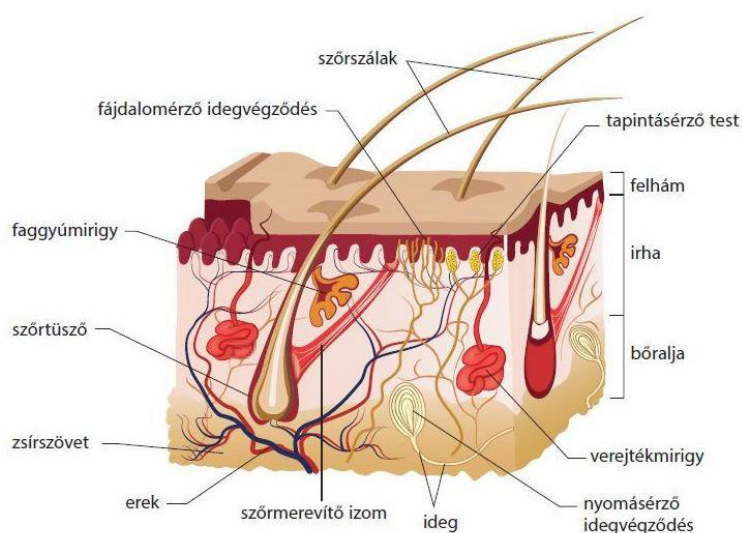
2.1. Bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel modern megközelítése

A gyógyszerek bőrön keresztül történő bejuttatása a gyógyszerészet egy vonzó és kihívásokkal teli területe. A modern technológiák gyors fejlődésének köszönhetően a gyógyszerek egyre nagyobb hányadát igyekeznek transzdermális úton bejuttatni, beleértve a konvencionális terápiás módszerekkel jól alkalmazható hatóanyagokat is. Ennek oka, hogy a transzdermális gyógyszerbevitel számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, kikerüli a gasztrointesztinális traktust, ezáltal a máj first-pass effektjét is, lokális és szisztémás hatást egyaránt elérhetünk vele. Lehetővé teszi egyes kórképek helyi kezelését, ezáltal kevesebb mellékhatással kell számolnunk, valamint nem invazív, fájdalommentes kezelési mód, a páciensek saját maguk is képesek a gyógyszer adminisztrációjára, így a bőrön keresztüli gyógyszerbevitel a betegek által az egyik leginkább kedvelt beviteli kapu. Mindez a fokozott beteg compliance-ben nyilvánul meg, különösen hosszútávú kezelés esetén [11].

A bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel során leggyakrabban alkalmazott gyógyszerformák a kenőcsök és a transzdermális terápiás rendszerek. A kenőcsökkel elsősorban helyi hatás elérése a célunk, a bőrfelület vagy mélyebb bőrrétegek kezelése, míg a transzdermális terápiás rendszerek esetében a cél a hatóanyag bejuttatása a szisztémás keringésbe [12]. A hatásuk alapján megkülönböztetünk fedő vagy védőkenőcsöket, sebkenőcsöket, penetrációs valamint reszorpciós kenőcsöket. Fedőkenőcsök esetén az elsődleges cél a bőr védelme. Sebkenőcsöket a károsodott bőr kezelésére alkalmaznak. Ezen két csoport esetében, továbbá a penetrációs kenőcsök esetében a cél, hogy a kenőcs a bőr felső szöveti rétegeibe behatoljon, penetrálódjon és ott fejtse ki hatását. A reszorpciós kenőcsök egy különleges csoportot képeznek, hiszen ezeknél a készítményeknél az a cél, hogy a hatóanyag felszívódjon a szisztémás keringésbe (pl. reumás kórképek, bronchitis kezelése esetében). Transzdermális gyógyszerbevitel során olyan terápiás rendszereket alkalmazunk, melyek lehetővé teszik, hogy különböző hatóanyagok a bőrön keresztül, előre meghatározott program szerint, folyamatosan felszabadulva a szisztémás

keringésbe jussanak [13]. A leggyakoribb transzdermális indikációs területek közé tartozik pl. a fájdalomcsillapítás, magas vérnyomás kezelése, hormonpótlás, hormonális fogamzásgátlás, dohányzásról való leszokás segítése. Ezen terápiás rendszerek legfőbb korlátozó tényezője, hogy a bejuttatható hatóanyagok a bőr barrier funkciója miatt limitáltak [14]. A transzdermálisan bejuttatható hatóanyagnak a következő kritériumoknak kell megfelelnie: alacsony molekulatömeg (<400 Da), megfelelő lipofilitás ($\log P_{o/w} \sim 1-4$), felezési idő max. 10 óra, alacsony dózisban hatékony (kb. 20 mg/nap), alacsony olvadáspont, nem irritálja a bőrt [15]. A korlátozó tényezők miatt a transzdermális gyógyszerbevitel egy intenzíven kutatott terület, számos technika és módszer van kifejlesztés alatt annak érdekében, hogy pl. peptidek, de akár védőoltások is bejuttathatók legyenek a bőrön keresztül, hiszen ezek a hatóanyagok a limitáló tényezők miatt egyelőre csak invazív módon vihetők be a szervezetbe. Lalani és munkatársai liposzómák és nanopartikulumok formulációjával növelte a bevitelre szánt peptidek stabilitását és biohasznosulását [16], Leone és munkatársai pedig a mikrotűk segítségével történő vakcináció módszerének továbbfejlesztésével érték el figyelemre méltó eredményeket [17].

Bőrünk elsődlegesen védelmi feladatot lát el, szervezetünket elhatárolja a külvilágtól, valamint a homeosztázis fenntartásában is fontos szerepe van. A mechanikai védelem és a barrier funkció mellett védelmet nyújt a mikroorganizmusokkal és a fénnel szemben, fontos szerepe van a hőszabályozásban, metabolizmusban, kiválasztásban, a külvilág ingereinek érzékelésében [18].



1. ábra. A bőr felépítése.

A bőr anatómiai felépítésének ismerete elengedhetetlen fontosságú, hiszen nagyban meghatározza a bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel lehetőségeit. A bőr 3 rétegre osztható:

epidermis (felhám), dermis (írha) és subcutis (bőralja). Az epidermis többrétegű elszarusodó laphámból épül fel, legkülső rétege a stratum corneum (SC), melynek sejtei szorosan illeszkednek egymáshoz. A SC keratinnal töltött, sűrűn tömött, elhalt sejtekből épül fel. A sejtek közötti teret lipid kettősréteg alkotja [19]. Ezek a lipid domének zsírsavakból, koleszterinből és telített zsírokból, úgynevezett ceramidokból állnak [20]. A szorosan elhelyezkedő keratinocytá rétegek és a sejtek közötti lipidek együttesen alkotják a barrier rendszert és megakadályozzák, hogy különböző ágensek hatoljanak be a bőr mélyebb rétegeibe [11,21]. A sejtek magas keratintartalma miatt az apoláris karakterű anyagok tudnak áthatolni a SC-on, viszont onnan továbbjutni csak azok a hatóanyagok képesek, melyek bizonyos hidrofíl tulajdonsággal is rendelkeznek, hiszen így képesek az epidermis mélyebb, víztartalmú rétegeibe továbbjutni [22]. Ez a gyógyszerbevitel szempontjából kulcsfontosságú, hisz, a SC fent említett tulajdonságai miatt a dermális gyógyszerbevitel kihívásokkal teli feladat [23,24].

Egy molekula különböző módokon juthat át a szarurétegen: transzcellulárisan, intercellulárisan, illetve bőrfüggelékeken keresztül. A transzcelluláris úton a molekulának direkt módon, a sejteken keresztül kell átjutnia a SC lipidstruktúráin, így ez leginkább a lipofil anyagokra jellemző. Az intercelluláris, azaz sejtek közötti útvonalon a hatóanyagoknak a keratinocyták között kell áthaladniuk, ez a hidrofíl anyagokra jellemző. A bőrfüggelékeken keresztül történő útvonal jelentősége teoretikus, hiszen a bőrünknek csak elhanyagolhatóan kis hányadát teszik ki (kb. 0,1%) [25].

Az aktív komponensek bőrön keresztül történő felszívódását penetrációfokozó segédanyagok hozzáadásával segíthetjük elő. A hatóanyagok penetrációjának elősegítése szempontjából a másik fontos kulcs a megfelelő hordozórendszer kiválasztása [26].

2.2. Penetrációfokozó segédanyagok

A penetrációfokozók olyan segédanyagok, melyek képesek a bőrbe behatolni, az alkotóelemeivel kölcsönhatásba lépni és reverzibilisen átjárhatóvá tenni a lipid kettősréteget a nem lipofil molekulák számára azáltal, hogy destabilizálják a lipid kettősréteget, vagy a membrán proteinjeinek konformációját megváltoztatják, ezáltal csökkentve a barrier funkciót átmenetileg [27].

A penetrációfokozást két nagy csoportra szokás osztani, fizikai és kémiai módszerekre. A fizikai módszerek számos technikát foglalnak magukba, ilyen az elektroporáció, iontoforézis, ultrahang, lézeres kezelések, mikrotű alapú eszközök, magnetoforézis, thermoporézis, rádiófrekvenciás kezelés használata. A kémiai penetrációfokozókat további csoportokra

oszthatjuk a segédanyagok kémiai tulajdonsága alapján: szulfoxidok, azonok, pyrrolidonok, zsírsavak, karbamid, illóolajok, alkoholok, zsíralkoholok, glikolok, felületaktív anyagok [25,28,29].

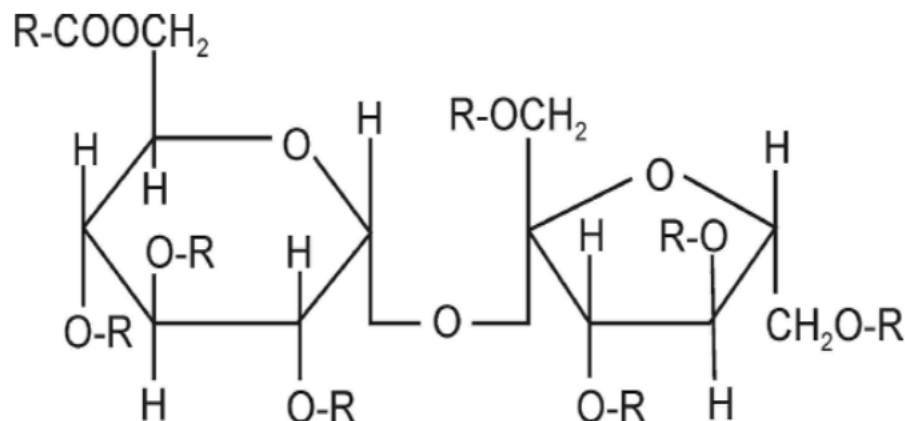
A felületaktív anyagokat emulgensként, nedvesítőszerként, stabilitás növelőként használják számos topikális gyógyszerkészítményben, kozmetikai és élelmiszeripari termékben. Ezen túlmenően köztudott, hogy a felületaktív anyagok amfifil természetüknek köszönhetően hatással vannak a biológiai membránok áteresztőképességére is, fokozhatják a különböző formulációk penetrációját. A felületaktív anyagok ilyen jellegű alkalmazása az elmúlt években előtérbe került a fentebb említett funkcióik mellett [30].

A külsőleges gyógyszerkészítmények hatása fokozható a megfelelő vivőanyag és segédanyagok kiválasztásával. Egyes penetrációfokozókat, illetve ezek kombinációit, előszeretettel alkalmazzák kenőcsökben, mert a jó hatóanyag-leadás biztosításával fokozhatják a készítmény hatását [31].

A **propilén-glikol** két alkoholcsoportot tartalmazó diol, mely kiváló penetrációfokozó hatása mellett oldószerként is gyakran használatos segédanyag [32]. Az **izopropil-mirisztát** poláris tulajdonságokkal rendelkező oldószer és penetrációfokozó segédanyag, az izopropil-alkohol mirisztinsav észtere [33]. Penetrációfokozó hatását számos tanulmány bizonyította, a propilén-glikollal kombinációban történő alkalmazásuk kimondottan előnyösnek számít dermális készítményekben, ugyanis a propilénglikol (PG) és az izopropil-mirisztát (IPM) szinergikusan fokozhatja a hatóanyag (pl. diklofenák-nátrium) penetrációját a gélekből, így erősítve a gyulladáscsökkentő hatást [34].

A **cukorészterek** (SP50, SP70, PS750) a szacharóz zsírsavakkal történő észteresítésével előállított, nemionos tenzidek, az élelmiszer és kozmetikai iparban elterjedt felületaktív anyagok. Napjainkban a gyógyszer technológiában is szívesen tanulmányozzák előnyös alkalmazhatóságuk, többek között kiváló emulgeáló hatásuk, penetrációfokozó tulajdonságaik miatt. További előnyük, hogy biodegradábilis anyagok és a bőrt nem irritálják [35].

A **Transcutol**, a dietilén-glikol-monoetil-éter, a gyógyszeriparban és a kozmetikai iparban előszeretettel alkalmazott oldószer és penetrációfokozó [36]. A cukorészterek és a Transcutol kombinációja szintén pozitívan befolyásolja a hatóanyagok, pl. az ibuprofen permeációját a mélyebb bőrrétegekbe, így fokozva annak hatását [37]. A piroxikám penetrációja d'Arpino és munkatársai szerint a propilén-glikol és a Transcutol kombinációjával jelentősen javítható az általuk vizsgált egyéb hordozókhoz képest [38].



2. ábra. A cukorészterek általános képlete.

A **Cremophor A6** és **A25** nemionos tenzidek, O/V emulgensek, az etilén-oxid és ricinusolaj reakciójával állítják őket elő. A Cremophor A6 és A25 megjelölések az etilén-oxid lánc hosszára utalnak [39]. Megfelelő arányban egymással kombinálva előszeretettel alkalmazzák különböző kenőcs összetételekben. Suthasinee és munkatársai különböző, Curcuma mangga kivonatot tartalmazó krémek gyulladáscsökkentő hatását vizsgálták, az általuk választott emulgeálószer a Cremophor A6; A25; glicerín-monosztearát voltak minden egyes készítményben a megfelelő biohasznosulás elérése érdekében [40].

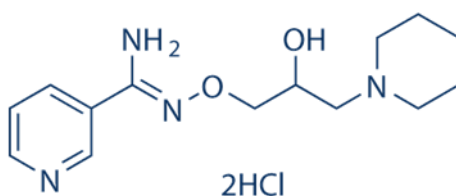
A **Labrasol** nemionos felületaktív anyag, polioxil-glicerid, O/V típusú emulgens, a gyógyszeriparban nagy népszerűségnek örvendő kiváló szolubilizáló tulajdonságai miatt [41]. Kataras és munkatársai a piroxikámot vizsgálták, hogy hogyan lehet javítani a hatóanyag felszabadulási sebességét és oldhatóságát. Arra a következtetésre jutottak, hogy a Labrasol és a Gelucire 44/14 kombinációja pozitív hatással van a hatóanyag felszabadulására [42].

A **Tefose 63** szintén nemionos tenzid, O/V emulgens, a poli-oxietilén sztearátok csoportjába tartozik [43]. Abd-Elsalam és munkatársai vizsgálatában a Tefose 63 javította a vorikonazol biológiai hozzáférhetőségét és hatását [44].

A **Sedefos 75** anionos O/V emulgens, etilén-glikol-palmitosztearát [45]. Jurca és munkatársai kutatásában a fehér akác kenőcsből történő felszabadulását és biohasznosulását jelentősen növelte a Sedefos 75 alkalmazása [46].

2.3. BGP-15

A BGP-15 egy nikotinos amidoxim-származék (O-(3piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim), magyar fejlesztésű, kis molekulájú gyógyszerjelölt. Az 1970-es években szintetizálták, eredetileg citosztatikus készítmények neuro-, nefro- és myelotoxikus hatásának enyhítésére szántak [47,48].



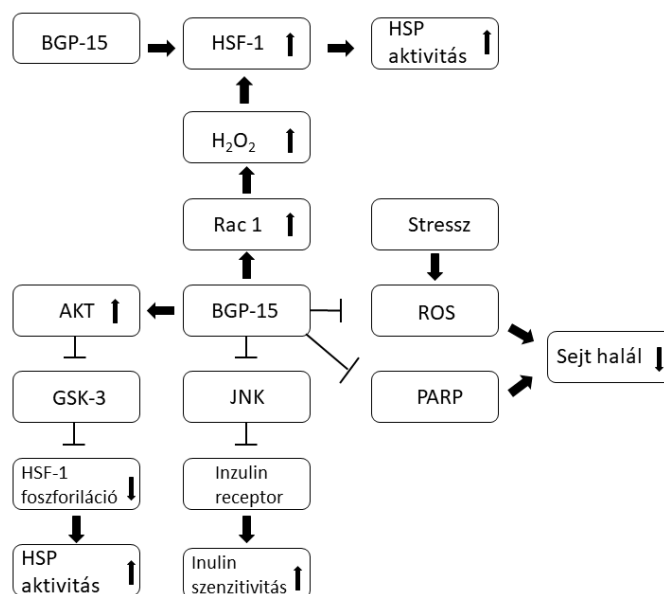
3. ábra. A BGP-15 szerkezeti képlete

2010 után a molekulával kapcsolatos kutatások újra előtérbe kerültek és az elmúlt években a hatóanyag számos egyéb jótékony hatását is feltárták, többek között hatékonynak bizonyult inzulin-rezisztencia megelőzésében és kezelésében [47,49,50], továbbá egyes tudományos publikációkban lehetséges gyulladáscsökkentő hatása is említésre került [51,52]. Emellett kardioprotektív tulajdonságai is intenzív kutatás alatt állnak, szívelégtelenség kezelésében, pitvarfibrillációban és pitvari szívmegnagyobbodásban is ígéretes eredményeket produkált [53–56]. A vázizom regenerációját elősegítő, valamint izomkárosodást megelőző hatását több területen vizsgálták, jelentős figyelmet kapott a diafragma funkciójának megtartottsága. A Duchenne-féle izomdisztrófia terápiájának hasznos és ígéretes kiegészítője lehet, hatásosságát állatkísérletben igazolták, melynek során izomdisztrófiában szenvedő egereken tesztelték a hatóanyagot [57,58]. Emellett a BGP-15 kezelés jótékonyak bizonyult policisztás ovárium szindróma kezelésében is (PCOS), ahol csökkentette az interstitiális fibrózist, valamint a kollagén depozíciót az ováriumban, mellyel összefügg a széleskörűen kutatott mitokondriális hatása is [59]. A BGP-15 adása potenciálisan alkalmazható traumás agysérülésben, és hatékony lehet a hosszú ideig lélegeztetett betegeknél kialakuló rekeszizom-gyulladás kezelésében [60]. A hatóanyag jótékony hatásaival foglalkozó tanulmányokat és kísérleteket egy korábbi, irodalmi áttekintő cikkünkben foglaltuk össze [61].

1. táblázat. A BGP-15 fő hatásainak összefoglalása terápiás dózissal.

BGP-15 hatásai	Hatékony dózis
Inzulin érzékenyítő hatás	200-400 mg/kg per os
Duchenne-féle izomdisztrófiában vázizomfunkció javítása	15 mg/kg per os
Kemoterápiás szerek toxikus mellékhatásainak enyhítése (pl. ciszplatin, taxol)	50-200 mg/kg per os
Paracetamol okozta májkárosító hatás enyhítése	10-450 mg/kg per os
Diafragma izomfunkciójának javítása	40 mg/kg
Fotoprotektív hatás	5-20% BGP-15 krém
PCOS (interstitiális fibrózis és kollagén depozíció csökkentése)	3 mg/100g per os
Diasztolés diszfunkció helyreállítása, arrithmiás epizódok csökkentése	10-15 mg/kg per os
Traumás agysérülés patológiás következményinek csökkentése	15 mg/kg per os

A BGP-15 a II. klinikai fázisig jutott diabétesz indikációban, de a megfelelő indikáció meghatározása még folyamatban van, mivel még jelenleg is kevés ismeret áll rendelkezésünkre a molekulával kapcsolatban [47,62]. A számos tanulmány ellenére a BGP-15 sokrétű hatásmechanizmusa sem teljesen tisztázott. A legtöbbet kutatott, leginkább elfogadott elmélet, a kis molekulású hősokkfehérjék (Hsp70 család) expressziójának indukálása, mellyel több protektív tulajdonsága magyarázható (pl. inzulinérzékenyítő) [63]. Mivel a szívizomban nem mutatható ki fokozott Hsp expresszió, kardioprotektív hatását egyes kutatások a poli-ADP-ribóz-polimeráz (PARP) enzim gátló hatásának tulajdonítják [64]. A membrán lipidraftokat módosító hatását szintén kísérletekkel támasztották alá [65–68].



4. ábra. A BGP-15 hatásmechanizmusával kapcsolatos jelenlegi ismereteink. A BGP-15 gátolja a JNK inzulinreceptorra gyakorolt gátló hatását, így az inzulinérzékenységet fokozza. A BGP-15 blokkolja a PARP enzimet, ami csökkenti a sejthalált, emellett a BGP-15 képes gátolni a mitokondriális ROS termelést, ami a sejtek jobb túlélését eredményezheti. Ezenkívül, a BGP-15 fokozza az AKT foszforilációt, ami a GSK-3 deaktiválódásához vezet, így a gátló foszforiláció csökken. A HSF-1 csökkenni fog, és a HSP-indukció növekedni fog. Ezenkívül gátolja a HSF-1 acetilációját, ami fokozott HSP aktivitást eredményez. A BGP-15 aktiválja a Rac 1-et, így a H₂O₂ szint emelkedik, amely aktiválja a HSF-1-et és indukálja a HSP aktivitását.

A hatóanyag helyi alkalmazása kevésbé vizsgált kutatási terület, csakúgy, mint a BGP-15 gyulladáscsökkentő hatása. Farkas és munkatársai BGP-15 krémeket formuláltak, bár az indikáció kissé eltérő volt. A kenőcsök fényvédő hatását úgy vizsgálták, hogy egereket előkezelték BGP-15 tartalmú készítményekkel, majd az állatokat közvetlen UV-sugárzásnak tették ki. Megállapították, hogy a krémek jelentősen csökkentették az égett sejtek számát, és megfigyelték az IL-10 és TNF- α epidermális citokinek expressziójának csökkenését [69]. A fent említett tulajdonságokat figyelembe véve a BGP-15 lehetséges gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata külsőleges gyógyszerformában kiegészítheti jelenlegi ismereteinket, és további hasznos információkkal szolgálhat a hatóanyagról.

2.4. *Philadelphus coronarius*

A *Philadelphus coronarius* (*P. coronarius*), magyar nevén a közönséges jezsámen a hortenziafélék (Hydrangeaceae) családjába, a somvirágúak (Cornales) rendjébe tartozik. Eredeti előfordulását tekintve Dél-Európában őshonos, manapság azonban már világszerte termesztik dísznövényként [70].

A Hydrangeaceae család számos fajára jellemző az antimikrobiális és gyulladáscsökkentő hatás, de emellett májvédő és antidiabetikus tulajdonságait is azonosították [71–73]. A közönséges jezsáment a népgyógyászatban előszeretettel alkalmazzák különböző kórképek kezelésére, ám ennek ellenére a vonatkozó szakirodalomban mégis kevés tudományosan megalapozott információ lelhető fel a gyógynövényről, az eddigi tudásunk sokkal inkább tapasztalati úton szerzett információként él a köztudatban. Korábbi kémiai kutatások már feltárták a gyógynövény virágának flavonoid-, triterpén-, kumarin- és fenolsavtartalmát, ám a levél efféle vizsgálatáról nincs információ [74].

A népgyógyászatban a jezsámen vizes kivonatát leggyakrabban különböző nőgyógyászati kórképek kezelésére alkalmazzák előszeretettel, emellett a növénynek antibakteriális és gyökfogó hatást is tulajdonítanak [74,75]. A közönséges jezsámen külsőleges gyógyszerformában történő alkalmazásával kapcsolatban jelenleg nem áll rendelkezésünkre tanulmány, ám a fent említett tények és tapasztalatok alapján gyógyászati hasznosítása számos előnyt hordozhat magában és a jelenlegi terápiás megoldásoknak hasznos kiegészítése lehet.



5. ábra. A közönséges jezsámen.

2.5. A vizsgálati módszerek elméleti háttérének áttekintése

2.5.1. Biokompatibilitási vizsgálat

A gyógyszerbiztonság alapvető tényező minden gyógyszerfejlesztési folyamat során. A készítményfejlesztés korai szakaszában széles körű toxicitási vizsgálatot kell végezni nem csupán a hatóanyagra vonatkozóan, hanem az összes felhasznált segédanyagot illetően is [76]. A biokompatibilitás, mint fogalom a szervezetbe bekerülő bioanyagok által kiváltott reakciót foglalja magába. Legegyszerűbb meghatározása szerint egy adott anyag azon tulajdonsága, miszerint nem gyakorol mérgező vagy káros hatást a biológiai rendszerekre [77]. Ezt a megfogalmazást gyakran kiegészítik a maximális hatás, minimális kockázat elvével, miszerint garantálnunk kell, hogy az adott, szervezetbe kerülő bioanyag maximálisan képes kifejteni jótékony hatásait és minimalizálnunk kell az alkalmazás során fellépő kockázati tényezőket. A biokompatibilitást különböző vizsgálati elemekre lehet felosztani: a citotoxicitásra, hisztotoxicitásra, hemotoxicitásra és genotoxicitásra [78].

Ezek tesztelésére számos irányelvet fogalmaztak meg az elmúlt évtizedekben, melyek egységesítésére és harmonizálására született meg az ISO (International Organization for Standardization), azaz a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet egységes irányelv rendszere [78,79]. Kísérletes munkám során a citotoxicitást, mint a biokompatibilitás elengedhetetlen tényezőjét vizsgáltam a formulált készítményekre és a kiválasztott segédanyagokra vonatkozóan.

2.5.1.1. A citotoxicitás vizsgálata

Az állatkísérletekkel járó növekvő költségek és a növekvő adminisztrációs terhek okán az *in vitro* kísérletek népszerűsége az elmúlt évtizedben növekedett. A sejttéletképességi vizsgálatok olcsók, könnyen és gyorsan kivitelezhetők, jól reprodukálhatók és nem igénylik veszélyes, vagy különleges reagensek felhasználását [80].

A sejttéletképességi vizsgálatok az életben maradt és az elpusztult sejtek arányát határozzák meg, melyből következtetni lehet a tesztelt anyag sejtkárosító hatására [81]. A sejttéletképességi vizsgálatok többnyire a sejtek életben maradásához szükséges biokémiai folyamatokhoz és biomarkerek méréséhez kapcsolódnak. A citotoxicitási vizsgálatok esetében a vizsgálat a sejtpusztulással járó membránintegritás elvesztésének kimutatására összpontosít [82]. A citotoxicitás vizsgálatára számos *in vitro* módszer került kidolgozásra.

Az **MTT teszt** olcsó és népszerű módszer a citotoxicitás nyomon követésére [83]. A vizsgálat lényege, hogy a tesztoldatokkal történő kezelést követően az életben maradó sejtek

mitokondriális enzimjei a sárga MTT festéket (tetrazolium-bromid) lila formazán precipitátumokká alakítják [84]. Az MTT festék pozitív töltéssel rendelkezik, ezért a sejtek és az intracelluláris oxidoreduktázok felveszik és katalizálják az említett reakciót. A sejt oxidatív állapota és a mitokondriális légzési lánc alapvető fontosságúak az átalakulásban. A NADH koncentrációja korlátozza a folyamatot, és minden olyan kémiai vegyület, amely módosítja a sejt oxidatív potenciálját, képes esetleg csökkentheti vagy növelheti a vizsgálat jelét [85]. Néhány tanulmányban fellelhető, hogy bizonyos vizsgált vegyületek radikálisan eltérő eredményeket mutatnak MTT teszttel, mint más módszerekkel, a lehetséges antioxidáns tulajdonságaik miatt [86]. Így az MTT teszt, bár a legnépszerűbb módszerek közé tartozik, bizonyos esetekben érdemes lehet más tesztekben gondolkodni.

Az **LDH teszt** egy citoplazmatikus enzim, a laktát-dehidrogenáz aktivitásán alapul, amely a NAD-ot NADH-vá redukálja. A NADH ezután egy tetrazolium festéket (vagy akár más, egyéb reagenst) redukál, amelynek koncentrációja spektrofotometriásan mérhető [87]. A vizsgálatot elsősorban a membránszivárgás kimutatására használják, amely korrelál a sejtkárosodással. A leggyakoribb reagens a 2-p-jódfenil-3-p-nitrofenil-tetrazolium-klorid (INT), amely vörös színű formazán terméket képez. Az LDH meglehetősen stabil a vizsgálat időtartama alatt az extracellulárisban térben, mennyisége függ a sejt mérettől és az oxidatív aktivitástól. Más tetrazolium alapú módszerekkel összehasonlítva kiválóan használható mert a sérült sejteket is képes mérni, nem csak az elhaltakat. A módszer korlátja azonban, hogy a szérum önmagában is magas LDH-aktivitással rendelkezik, ezért a szérummal kiegészített közegek nem ideálisak az LDH-teszthez, vagy több mosási lépésre van szükség, mielőtt a teszt reagens a sejtekre kerülne. További probléma, hogy ha a sejtek elhaltak (vagy a növekedés gátolt), de tesztelt anyag nem károsítja a sejtmembránt, akkor az elhalt sejtek tényleges számát a módszer alábecsüli. Erre megoldást jelenthet a kontrollvegyületek használata [88].

A **neutrálvörös teszt** nem enzimátikus biokémiai reakción alapul. A vizsgálat során a sejtek a festéket felveszik és megfesti a lizoszómákat [89]. A festék egy gyenge kationos vegyület, mely mikropinocitózissal vagy nem ionos diffúzióval kerül felvételre és felhalmozódik a lizoszómákban [90]. Mivel a sérült sejtek a festéket csak csökkent mértékben tudják felvenni és tárolni, az elhalt sejtek pedig egyáltalán nem festődnek meg, ezért a vizsgálat szenzitivitása magas, de a kísérlet során a sejteket többször mosni kell, melyet ha nem végeznek kellő elővigyázatossággal, csökkentheti a sejtek számát, tönkretelheti a sejtek monolayerét vagy másfajta járulékos károkat okozhat a sejtekben.

2.5.1.2. A citotoxicitási vizsgálatokhoz használatos sejtvonalak áttekintése

Napjainkban különböző immortalizált vagy primer sejtek és szövetek széles skálája áll rendelkezésre az *in vitro* toxicitás értékeléséhez. A jól kiválasztott sejttípus értékes információt nyújthat a tesztelt anyagról vagy formulációról, ám a kutatóknak gyakran nehézségekkel is szembesülnek, mivel figyelembe kell venni és mérlegelni a különböző modellek erősségeit és gyengeségeit. A sejteknek genetikailag stabilnak kell lenniük, és minden egyes vizsgálat során reprodukálható eredményeket kell biztosítaniuk. A citotoxicitás tesztelésére különböző humán sejtvonalak használatosak. Például a Caco-2, HaCaT és a HeLa, de ezeken kívül még számos más sejtvonal áll rendelkezésre.

A sejtvonalak lehetnek elsődlegesek, amikor közvetlenül egy szövetből vagy szervből izolálják őket. Szerkezetük, fehérje expressziós mintázatuk, anyagcseréjük és genetikai kódjuk azonos a az *in vivo* sejtekével. Emellett viszont nagyon érzékenyek a tenyésztés során fellépő bármilyen külső hatásra és meghatározott élettartamuk van, ami azt jelenti, hogy csak korlátozott számú passzálást képesek elviselni. A másodlagos sejtvonalakat valamilyen módszerrel immortalizálják, ami azt jelenti, hogy hipotetikusán végtelen az élettartamuk [80].

A **HaCaT sejtvonal** humán, felnőtt bőrből származó immortalizált keratinocytaiból épül fel, melyek megőrizték differenciációs és proliferációs képességüket, mely többszöri passzálást követően is megfigyelhető [91]. A sejtvonal normális morfogenezist mutat, és az izolált keratinocyta összes fő felszíni markerét és funkcionális aktivitását expresszálják [92]; stimuláció hatására a HaCaT sejtek differenciálódnak és specifikus differenciálódási markereket fejeznek ki. Képesek rétegzett epidermális struktúrát is kialakítani [93], de a közeg Ca^{2+} koncentrációjának változására oda-vissza tudnak térni a differenciált és a bazális állapot között. A sejtvonal limitáló tényezői közé tartozik, hogy citogenetikai elváltozásokat, valamint kromoszómális instabilitást mutat [94].

A **HeLa** sejtvonal humán epithelialis méhnyak adenokarcinóma sejtekből származik, az első, kultúrában fenntartott sejtvonal volt. Immortalizált, mivel laboratóriumi körülmények között korlátlan számú osztódásra képes. A HeLa sejteknek számos különböző törzse létezik, mivel sejt kultúrákban folyamatosan mutálódnak. Fenntartása könnyű, viszont a kontamináció és a befertőződés igen gyakori HeLa sejtekkel történő kísérletezés során [95].

A **Caco-2** humán epitél sejtvonalat széles körben használják a bélhám modelljeként. A Caco-2 sejtvonal eredetileg vastagbélrákból származik. Az egyik legelőnyösebb tulajdonsága, hogy spontán differenciálódni képes és monolayer képez. Bár vastagbél karcinómából származnak,

ha speciális körülmények között tenyésztik őket, a sejtek differenciálódnak és polarizálódnak, így fenotípusuk morfológiailag és funkcionálisan hasonlít a vékonybélben található enterocitákhoz [96].

A kísérletes munkám során a felhasznált segédanyagok és a készítmények citotoxicitását MTT teszt segítségével határoztam meg, annak egyszerű kivitelezhetősége és fent említett további előnyei figyelembevételével. Mivel külsőleges gyógyszerformát fejlesztettem, így a citotoxicitási vizsgálatokhoz a HaCaT sejtvonalat választottam a bőr modellezésére.

2.5.2. Textúra analízis

A kenőcsök gyógyszerforma vizsgálatai közé tartozik a konzisztencia vizsgálata, melynek ismerete fontos szempont a felhasználást tekintve. A konzisztencia a rendszernek azon az a tulajdonsága, hogy a különböző mechanikai hatásoknak ellenáll, ez kvantitatív módon jellemezhető. A konzisztencia meghatározza egy kenőcs kenhetőségét, a szétterülés mértékét, a felülethez történő tapadást. A konzisztencia vizsgálatok közé tartozik a rotációs viszkozimetria, penetrometria, konzisztometria, szétterülés, tapadás, tubusból való kinyomhatóság.

A **rotációs viszkozimetria** folyásgörbék felvételére, a viszkozitás és a tixotropia meghatározására alkalmas módszer. A vizsgálat során a mintában állandó sebességgel forog egy adott méretű és formájú test. A fellépő nyírófeszültséget a műszer elektromos jellé alakítja és regisztrálja [97].

A **konzisztometria** során az elkészült kenőcsösszetételekbe előre meghatározott paraméterek szerint egy próbatest hatol be. A műszer a kenőcs próbatestre kifejtett ellenállását regisztrálja. Minél lágyabb egy készítmény konzisztenciája, annál kisebb ellenállást fog kifejteni [98].

A **penetrométerek** az egyik legszélesebb körben használatos reológiai berendezések. A penetrometria mérésekor a vizsgálandó mintába egy szabvány méretű test (kettőskúp, kúp) hatol be. A behatolás a penetrométer fok (P^0) mértékegységgel jellemezhető [13].

Az **extenzométerek** a minták szétterülőképességének jellemzésére szolgálnak. A vizsgálat során a mintára növekvő mértékű vertikális terhelés hat, melynek függvényében a minta szétterülését, a kenőcsfolt növekedését mérjük. A területnövekedés mértéke korrelál a szétterülőképességgel [99].

A **tapadóképesség** vizsgálatára kenőcsingákat használunk. A mintákat egy üvegfelületre megadott rétegvastagságban felkenjük és ezen a felületen mozog az ún. csúszó szán. A kenőcs

tapadása a felületen fékezi a szán mozgását, így a lengésbehozatal és a nyugalmi helyzet között eltelt idő a tapadóképeséget jellemzi [100].

A **tubusból való kinyomhatóság** a konzisztencia gyakorlati szempontból történő vizsgálata. A kísérletben a tubust meghatározott tömeggel terheljük, majd megfigyeljük, hogy az alkalmazott tömegű terhelés hatására mekkora tömegű minta, mennyi idő alatt nyomódik ki a tubusból [13].

2.5.3. Franz diffúziós vizsgálat

A hatóanyag készítményalapból történő felszabadulásának vizsgálatához a gyakorlatban két fő módszer terjedt el, a membrán nélkül működő, valamint a membránnal szabályozott rendszerek. A membrán nélküli modellek esetében a minta közvetlenül érintkezik a választott kioldó közeggel. Sokkal előnyösebb lehet a membránnal szabályozott rendszerek használata, hiszen ebben az esetben a minta nem érintkezik közvetlenül a kioldó közeggel, a hatóanyagnak egy membránon keresztül kell átdiffundálnia a donor fázisból az akceptor fázisba. A berendezésben a membrán a bőrt modellezi. A diffúziós cellával tehát jól megfigyelhető a hatóanyag vivőanyagból történő felszabadulása (a hatóanyag feldúsulása a membrán és a készítmény határretegeiben), a penetráció (a membránba történő belépés) és a permeáció (az akceptor fázisba való bejutás a membránon keresztül) folyamata is [11,13,101,102]. A vizsgálatok kivitelezésében a membrán kiválasztása sarkalatos pont, hiszen nagyban meghatározza a kísérletet. Legszélesebb körben a szintetikus membránok használata terjedt el, hiszen költséghatékony, egyszerűen beszerezhető és könnyen használható, ám egyes tanulmányok szerint a szintetikus membránok (pl. cellulóz-acetát membrán) permeábilisabbak a biológiai membránokkal összehasonlítva. Ennek kiküszöbölésére a membránt impregnálni szokták valamilyen lipofil oldószerrel (pl. izopropil-mirisztát) annak érdekében, hogy a bőrt hűen modellezze számunkra. A törekvések ellenére azonban egyre inkább kezd elterjedni az *ex vivo* bőr használata, amikor az állatból kimetszenek egy bőrdarabot és ez kerül felhasználásra. A bőr származhat egérből, patkányból, tengerimalacból, de akár nagyobb testű állatokból is, pl. sertésből vagy marhából. A probléma az állati bőr *ex vivo* felhasználásával, hogy a SC vastagsága minden faj esetében eltérő. A majmok és a sertések bőrének felépítését tartják a leginkább hasonlónak a humán bőrhöz, azonban ezek beszerzése és felhasználása ritka, hiszen költséges és nehezen megoldható, így leggyakrabban kisebb rágcsálók bőrét szokás alkalmazni. A humán bőr felhasználása sem példa nélküli ezekben a vizsgálatokban, ennek alkalmazása a legrelevánsabb és az ezekkel kapott eredmények korrelálnak legjobban az *in vivo* vizsgálatok eredményeivel. Azonban a humán bőr alkalmazására a lehetőségek limitáltak, nehezen elérhető

és kivitelezhető, sok esetben drága és adminisztrációval terhelt folyamat. Így a leggyakrabban a szintetikus membrán és az állati bőr *ex vivo* alkalmazásával találkozhatunk [103,104].

2.5.4. Luciferáz vizsgálat

A luciferáz vizsgálat során lumineszcencia alapú detektálás segítségével mérhető az NF- κ B jelátviteli út aktiválódása. A Raw 264.7 sejtek NF- κ B-luciferáz riporter rendszerrel stabilan transzfektált sejtek, melyeket LPS segítségével aktiváltunk, ezáltal az NF- κ B expresszióját is aktiválva. A vizsgálat során a BGP-15 hatását vizsgáltuk, hogy képes-e az NF- κ B aktivációját gátolni vagy mérsékelni. A luciferáz expressziója az NF- κ B aktiválódásától függ, amely a sejtstimulációt követően következik be. A luciferáz szubsztrát hozzáadását követően luminométer segítségével mértük az enzimreakció hatására keletkező fényfelvillanásokat. Az enzimreakció során keletkező fotonok száma (a mért luciferáz egység) arányos az NF- κ B jelátviteli út aktivitásával [105].

2.5.5. *In vivo* gyulladásos modellek áttekintése

A fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő gyógyszerek kutatása egy intenzív terület, mivel a jelenleg rendelkezésre álló gyógyszerek nem minden esetben kielégítően hatékonyak, vagy komoly mellékhatásokkal bírnak, mely az alkalmazásukat korlátozza. Ebből a megfontolásból a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás vizsgálatára az elmúlt évtizedekben több *in vivo* modellt is sikeresen beállítottak, melyeket mechanikai vagy hőtraumával, legtöbbször kémiai anyagok felhasználásával valósítanak meg [106].

A **hot plate test** az akut nociceptív tesztek közé sorolható. A vizsgálat során az állatot (általában patkány vagy egér) egy speciális térbe helyezik, ahol a lábával érintkező talaj szobahőmérsékletre indulva egyre melegszik, majd az állat a talpa nyalogatásával és lábrázással jelzi a hőmérsékleti fájdalomküszöböt [107,108].

A **formalin teszt** során a kísérleti állat egyik végtagjába formalint injektálnak, ez néhány perc elteltével gyulladást indukál az állatban, melyet talpnyalással és lábemelgetéssel jelez számunkra. A vizsgálat akut gyulladást modellez, a tesztelni kívánt készítményt vagy hatóanyagot általában előkezelésben alkalmazzák és összehasonlítják a kezelt és kezeletlen csoportok eredményeivel [109].

Ecetsavval ún. visceralis nocicepciót lehet kiváltani, a kísérletet vonaglási tesztként is szokás aposztrofálni. Az ecetsavat intraperitoneálisan adják be az állatnak, a hashártya izgatásának révén alhasi izomösszehúzódások jelennek meg, melynek következtében az állat vonaglik [110].

A **karragénnel** történő kezelés kevert típusú, neurogén és nem neurogén gyulladásos reakciót vált ki. A karragént rendszerint az állat lábába injektálják, mely a maximális talpduzzanatot 3 órával a beadást követően éri el. Az állatok itt is lábemeléssel, lábrázással és talpnyalással adják jelét a gyulladás kialakulásának. A módszer használatánál mindenképp figyelembe kell venni, hogy a gyulladás a maximumot 3 óra elteltével éri el [111].

A **mustárolajjal** (allil-izotiocianát) akut, neurogén gyulladás váltható ki, ugyanis a kapszaicinre érzékeny nociceptorokat izgatja. A mustárolajat széles körben alkalmazzák fülödéma kiváltására. Az ödémát tolómérő segítségével kvantitatívan lehet mérni, így az állatokat a vizsgálni kívánt hatóanyaggal kezelve azt is meg tudjuk állapítani, hogy az adott szer mennyire hatásos a gyulladásra nézve, hiszen ha a fülödéma mértéke, a fül vastagsága csökken, akkor az adott hatóanyag nagy valószínűséggel hatásos gyulladáscsökkentő [112].

2.5.6. Antioxidáns vizsgálatok

Szervezetünkben számos enzim hozzájárulásával valósul meg az anyagcsere során keletkező szabadgyökök semlegesítése. Éppen ezért jelenleg már számos kidolgozott analitikai módszer és mérési metodika áll rendelkezésünkre melynek segítségével megállapíthatjuk egy anyag antioxidáns kapacitását. Ezek a módszerek működési elvükben bár sokszor hasonlóak, de eltérő reakciókon alapulnak, esetleg eltérő enzimek aktivitásának mérését veszik alapul.

Elektronátmeneten alapuló metodikák:

A **FRAP** módszer a vas redukálóképességén alapul, a reakció során a Fe^{3+} ion Fe^{2+} ionná alakul. A reakció pH=3,6 közegben történik és színváltozással jár, mely spektrofotometriásan követhető és mérhető [113].

A **CUPRAC** a rézion redukálóképességén alapuló módszer. A reakció a fiziológiához közeli értéken történik, a Cu^{2+} ion Cu^{1+} ionná alakul, mely kolorimetriásan követhető és spektrofotométerrel mérhető [114].

A **DPPH** módszer az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök megkötésén alapuló metodika. A reakció során a lila színű gyök antioxidáns anyagokkal reagálva elveszíti színét. A módszer széles körben alkalmazott, a DPPH gyök stabilitása és a reakció egyszerűsége miatt [115].

Az **ABTS** vizsgálat során a sötétzöld színű ABTS kation gyököt antioxidánsokkal reagáltatva a színintenzitás csökken, végül elveszíti színét [116].

In vitro és *in vivo* antioxidáns vizsgálatok:

A **SOD** (szuperoxid-dizmutáz) egy antioxidáns enzim, melynek hatása fontos az immunrendszer működése szempontjából, a szervezetben a szuperoxid anion dizmutációját katalizálja molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá, mely a kataláz enzim segítségével vízzé és oxigénné alakul [117].

A **TAC** (teljes antioxidáns kapacitás) egy integrált paraméter, ami egy többféle különböző antioxidáns vegyület komplex összességét tartalmazó mintát jellemez [118].

2.5.7. Mikrobiológiai vizsgálatok

Az elmúlt években egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott új antimikrobiális szerek kutatása és fejlesztése iránt a rezisztens törzsek leküzdése érdekében. Éppen ezért az antimikrobiális aktivitás meghatározására alkalmas módszerek kidolgozására és fejlesztésére is nagyobb figyelem irányult.

Az **agarlyuk-diffúziós módszert** széles körben alkalmazzák növények vagy mikrobiális kivonatok antimikrobiális hatásának értékelésére. Az agarlemez felületét a mikrobiális inokulummal beoltjuk, majd ezután egy 6-8 mm átmérőjű lyukat fúrunk rá és hozzáadjuk a vizsgálandó kivonatot a tesztelni kívánt koncentrációban. Ezután az agarlemezeket megfelelő körülmények között inkubáljuk. Az tesztelt minta, ha antimikrobiális hatással rendelkezik bediffundál a közegbe és gátolja a mikróbatörzsek növekedését [119].

A **mikrodilúciós** módszer a legegyszerűbben kivitelezhető hígítási módszerek közé tartozik. egy egyszerűen kivitelezhető kísérlet, használata során 96 lyukú plate-re pipetázzuk a tesztorganizmusok inokulumát, majd hozzáadjuk a vizsgálati anyagot és 24 órás inkubációt követően spektrofotométerrel megmérjük az egyes lyukak abszorbanciáját [120].

A baktériumölő vagy gombaölő hatás meghatározására a legmegfelelőbb módszer a **time-kill teszt**, hiszen információt nyújt az antimikrobiális szer és a mikróbatörzs közötti dinamikus kölcsönhatásról. A vizsgálat során a kiválasztott baktérium és gombatörzseken teszteljük a vizsgálati anyagunkat és a mikroorganizmusok szaporodására kifejtett hatásukat figyeljük az időben. A kísérlet tenyésztőcsövekben történik, a tesztorganizmusokhoz hozzáadjuk a vizsgálni kívánt anyagot. Előre meghatározott időközönként mintát veszünk a felülúszóból, majd ezeket a mintákat megfelelő táptalajra szélesztjük és 24 órás inkubációt követően a spektrofotometriásan mérjük az egyes lyukak abszorbanciáját [121].

A *Philadelphus coronarius* antimikrobiális aktivitásának meghatározásához a mikrodilúciós és a time-kill tesztet választottam, az egyszerű és gyors kivitelezhetőség, valamint a gyógynövénnyel kapcsolatos korábbi szakirodalmi adatokat figyelembe véve [122].

2.5.8. IL-4 szint monitorozása

Mivel a gyulladás egy összetett folyamat, így a gyulladáscsökkentő hatás *in vitro* vizsgálatára számos biokémiai útvonalra és biomarkerre épülő, kidolgozott módszer és kereskedelmi forgalomban elérhető készlet áll rendelkezésre.

A gyulladásban a makrofágok fontos szerepet játszanak a reaktív oxigén gyökök (ROS), reaktív nitrogén gyökök (RNS), citokinek, tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), valamint a gyulladást elősegítő nitrogén-oxid (NO) és prosztaglandin (PGE) termelésével.

Az LPS egy bakteriális endotoxin, amely a gyulladásos mediátorok pl. a TNF- α , az IL-6 és a NO szabályozásával serkenti a veleszületett immunitást. A LPS általi expozícióról bebizonyosodott, hogy növeli a fent említett gyulladásos citokinek és mediátorok mRNS-expresszióját. A gyulladásos mediátorok szintézisének gátlása közismerten hasznos terápiás stratégia a gyulladásos betegségek kezelésében. A közelmúltban egyre nagyobb érdeklődés övezi a gyógynövényekből izolált vegyületek felhasználását a gyulladásos betegségek kezelésében [123]. A gyógynövények gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata során a leggyakrabban alkalmazott ezek közül az NF- κ B útvonal tanulmányozása, illetve gyulladásos citokinek expressziójának tanulmányozása [124,125]

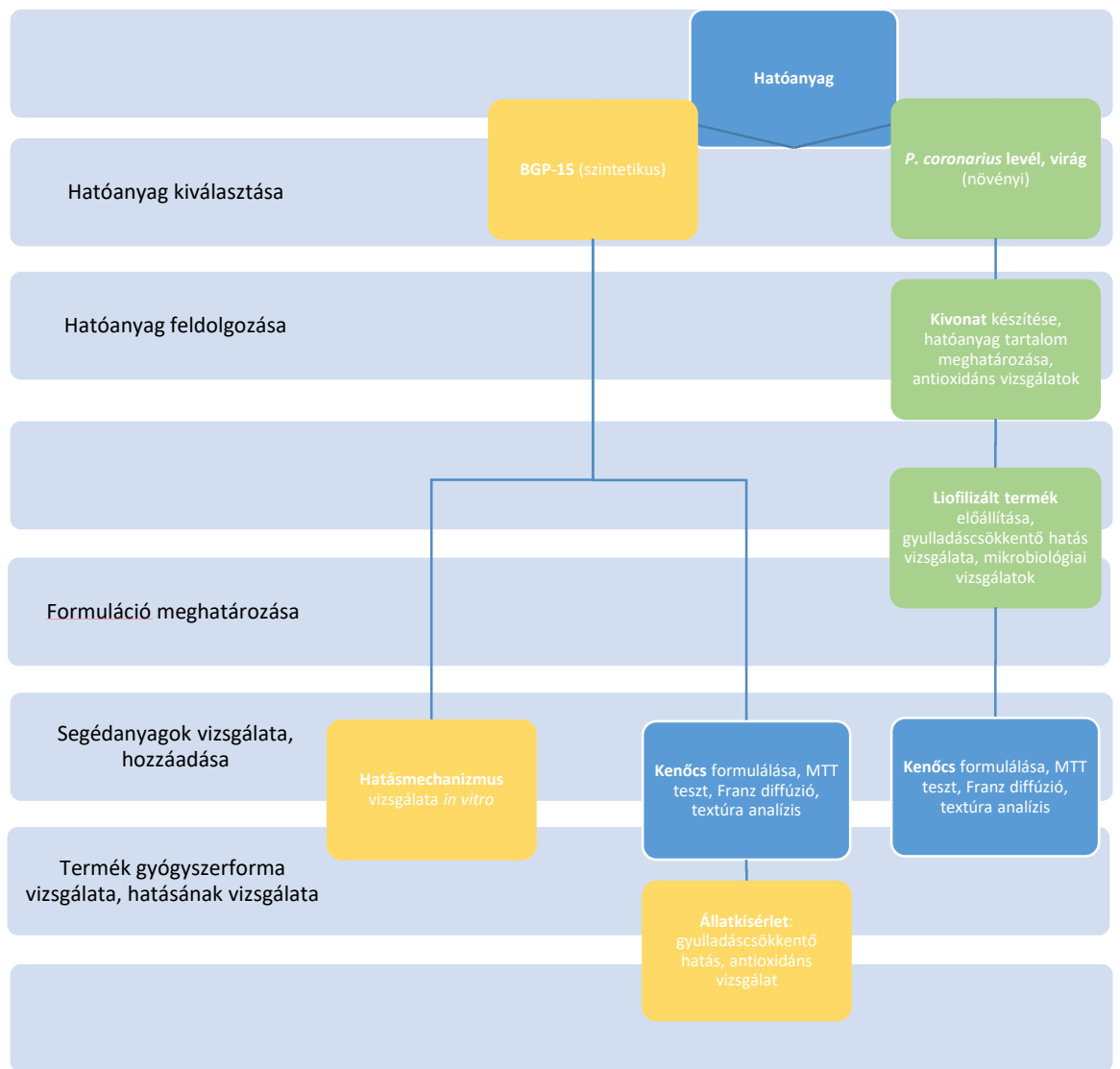
Az IL-4 a limfociták aktivációját és differenciálódását szabályozza, emellett a makrofág aktivációjában is fontos szerepe van, így a gyulladás létrejöttében. A legújabb megfigyelések arra utalnak, hogy az IL-4 jelentős szerepet játszhat a rheumatoid arthritis és a psoriasis kórképének alapjául szolgáló gyulladásos folyamatok szabályozásában [126,127]. Ezeket a megfigyeléseket alapul véve választottam az IL-4-et vizsgálatom alapjául. A kísérletet HaCaT sejteken végeztem el, ELISA segítségével azt vizsgáltam, hogy a jezsámmennel történő előkezelés képes-e csökkenteni vagy gátolni a sejtek IL-4 expresszióját. [128].

3. Célkitűzés

Kísérleti munkám során célul tűztem ki egy szintetikus és gyógynövényből izolált hatóanyagok felhasználásával külsőleges gyógyszerforma kialakítását, valamint a formulálás lépésein keresztül a hatóanyagok eltérő természetéből fakadó hasonlóságok és különbségek bemutatását. További célom volt a hatóanyagok biohasznosulásának növelése és a készítmény megfelelő biokompatibilitásának elérése. A kísérleti terv a **6. ábrán** látható összefoglalva.

A **kísérletek első szakaszában** a BGP-15 gyógyszerjelölt felhasználásával külsőleges gyógyszerforma létrehozása és vizsgálata, valamint a hatóanyag hatásának vizsgálata volt a célom. Ehhez különböző kenőcsösszetételek meghatározása és a megfelelő segédanyagok kiválasztása, majd biokompatibilitási vizsgálata volt a kísérletek célja. Az elkészült kenőcsöket több szempontból elemeztem, Franz diffúziós vizsgálatot és textúra analízist végeztem. A hatóanyag gyulladáscsökkentő hatását *in vitro* és *in vivo* teszteltem, valamint az antioxidáns tulajdonságait is vizsgáltam.

A **kísérletek második szakaszában** a *P. coronarius* gyógynövény leveléből és virágából kivonatot készítettem majd jellemeztem a bioaktív komponensek azonosításával, hatóanyagtartalom és az antioxidáns kapacitás meghatározásával. A kivonatból liofilizált extraktumot készítettem, melynek hatását több szempontból vizsgáltam, majd külsőleges gyógyszerformát fejlesztettem. A formulált kenőcsök textúra analízisét elvégeztem, valamint a hatóanyag *in vitro* felszabadulását vizsgáltam.



6. ábra. Kísérleti terv.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok

Hatóanyagok: A BGP-15 ((O-(3piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim) hatóanyagot a SONEAS Chemicals Ltd.-től szereztük be. A *P. coronarius* friss leveleit és virágát (~500 g) a Nagyvárad Eötvös Loránd Tudományegyetem Orvos-és Gyógyszerésztudományi Karának kertjéből gyűjtöttük 2020 nyarán. A *Philadelphus coronarius* L. faj egy példányának szárát, leveleit és virágát a Nagyvárad Eötvös Loránd Tudományegyetem Orvos-és Gyógyszerésztudományi Karának Herbariumában őrzik, mely a NYBG Steere Herbarium-ban van regisztrálva UOP 05313 kóddal.

Felületaktív anyagok: Kísérleteimhez a cukorészterek (SP50, SP70, PS750) a Sisterna-tól (Roosendaal, Hollandia) kerültek beszerzésre. A munkám során használt Sedefos 75, Labrasol, Tefose 63 és Transcutol a Gattefossé (Lyon, Franciaország), míg a Cremophor A6 és A25 a BASF (Ludwigshafen, Németország) ajándéka volt.

2. táblázat. A felhasznált tenzidek kémiai neve és HLB értékük.

Brand név	Kémiai név	HLB érték
SP50	szacharóz-sztearát (50% monoészter)	11
SP70	szacharóz-sztearát (70% monoészter)	15
PS750	szacharóz-palmitát	16
Sedefos 75	glikol-sztearát	10
Labrasol	Kaprilokaproil makrogol-8 glicerid	12
Tefose 63	etilén-glikol palmitosztearát	9,5
Transcutol	Dietilén-glikol-monoetil-éter	4,2
Cremophor A6	polietilén-oxid-alkiléter	10-12
Cremophor A25	polietilén-oxid-alkiléter	15-17

A kenőcsök készítéséhez használt egyéb anyagok: A sztearinsav, cetil-sztearil-alkohol, izopropil-mirisztát, propilén-glikol a Hungaropharma Zrt-től (Budapest, Magyarország) került beszerzésre. Az anyagok Ph. Hg. VIII. minőségűek voltak.

Sejtes kísérletekhez használt anyagok: A HaCaT sejteket a Cell Line Service-től (Heidelberg, Németország) szereztük be. A sejtvonal fenntartásához szükséges anyagokat és eszközöket, úgy mint GlutaMax, sejtenyésző flaska, 96 lyukú plate a Thermo-Fisher (Darmstadt, Németország) biztosította. A szentjánosbogár luciferáz szubsztrát a Promega-tól származott (Madison, WI, USA). Az IL-4 ELISA kitet, valamint az allil-izotiocianátot (AITC) a Sigma Aldrich-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk, míg a SOD kitet a Cayman Chemical-től (Ann Arbor, MI, USA) szereztük be. A *S. aureus*, *C. albicans* és *E. coli* törzseket, az RPMI és Mueller-Hinton tápfolyadékokat az ATCC-től (Manassas, Virginia, USA) szereztük be.

4.2. Módszerek

4.2.1. Biokompatibilitás vizsgálatához kapcsolódó módszerek

4.2.1.1. HaCaT sejtvonal fenntartása

Sejtes kísérleteimet humán keratinocita (HaCaT) sejtvonalon végeztem el. A sejtvonal passzálása, azaz új flaskába történő áthelyezése heti rendszerességgel történt, a passzálások között szükségszerűen médiumot (DMEM), azaz tápoldatot cseréltem a megfelelő növekedés elérése érdekében. A passzálást mindig steril körülmények között, lamináris boxban végeztem. A folyamat lényege, hogy a sejtekről a használt médiumot eltávolítottam, majd PBS-sel történő átmosás után a letapadt sejteket tripszin-EDTA segítségével, enzimatikus úton elválasztottam az edény felszínétől. Az enzim működését médiummal megállítottam, majd centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottam és a centrifugacső alján maradt sejteket friss médiummal szuszpendáltam. A szükséges mennyiségű sejtsuszpenziót, előzetes Bürker kamrában történő számlálás alapján meghatároztam és áthelyeztem új flaskába, majd médiummal kiegészítettem. A sejtek 37°C-on, 90%-os páratartalom alkalmazásával, 5%-os CO₂ atmoszférában voltak eltartva. A vizsgálatok 20-40 passzázsszám között kivitelezhetők [129].

4.2.1.2. MTT teszt

Az MTT-teszt a sejtek életképességének vizsgálatára alkalmas, *in vitro* citotoxicitási teszt. A munkát lamináris boxban végeztem. Előzetesen HaCaT sejteket szélesztettem 96 lyukú plate-re, 10.000 sejt/lyuk denzitással, majd 7 napig növekedni hagytam őket, hogy a konfluens sejtréteg kialakuljon. A vizsgálat során a használt médiumot eltávolítottam a sejtek felszínéről, majd PBS-sel történő mosást követően 200 µl/lyuk tesztoldatot felvittem a sejtekre és inkubálni hagytam 30 percen át. Ezt követően a tesztoldatokat eltávolítottam, a sejteket PBS-sel mostam, majd 5 mg/ml-es MTT-PBS (1:9) oldatot mértem a sejtekre és 3 órán át, 37°C-on inkubáltam őket. A kialakult formazán precipitátumokat sósavas izopropanollal (1:25)

szuszpendáltam, majd a minták abszorbanciáját spektrofotométer segítségével (Fluostar Optima) 570 és 690 nm-en mértem [130].

4.2.2. Kenőcsök formulálásához és vizsgálatához kapcsolódó módszerek

4.2.2.1. Kenőcsök formulálása

A kenőcsök készítése laboratóriumi körülmények között történt, az alábbi **3. táblázat** alapján. A formulálásához különböző emulgenseket választottam, úgy, mint Labrasol, Cremophor A6: A25=1:1, cukorészterek (SP50, SP70, PS750) a BGP-15 esetében, Tefose 63, Sedefos 75 és SP70 a *P. coronarius* esetében. Az előállítás során a cetil-sztearil-alkohol, izopropil-mirisztát és sztearinsav olvasztása (60 °C) alakította ki az olajos fázist. A cetil-sztearil-alkohol emulgens, amely attól függően, hogy magas vagy alacsony HLB értékű tenziddel párosítják, O/V vagy V/O emulziós kenőcsöt képes kialakítani. Mindemellett a sztearinsavval együtt a kenőcs alapját fogják képezni, az izopropil-mirisztát pedig jó penetrációfokozó segédanyag. A vizes fázis emulgenst, propilénglikolt és tisztított vizet tartalmazott, melyet az olajos fázissal megegyező hőmérsékletűre (60 °C) melegítettem, majd az olajos fázishoz kevertem. A készítményt szobahőmérsékletűre hűtöttem és a fázisokat emulgeáltam, pótoltam a melegítés során elpárolgott vizet, majd 1% Solutio conservans-sal, a FoNo VIII. kiadásában hivatalos tartósító oldattal tartósítottam és hozzáadtam a liofilizált növényi kivonatokat vagy a BGP-15-öt. A hatóanyagokat előzőleg Transcutolban és tisztított víz 1:1 arányú keverékében oldottam [131]. A Transcutol jó oldószer és penetrációfokozó segédanyag.

3. táblázat. A kenőcsök összetétele.

Összetétel	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.
BGP-15	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	-	-	-	-	-	-
<i>P. coronarius</i> levél	-	-	-	-	-	5 g	5 g	5 g	-	-	-
<i>P. coronarius</i> virág	-	-	-	-	-	-	-	-	5 g	5 g	5 g
Transcutol	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g	1,42 g
Cetil- sztearil alkohol	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g	4,6 g
Sztearinsav	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g
Propilén- glikol	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Izopropil- mirisztát	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Glicerín	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Solutio conservans (Ph. Hg. VII.)	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
Labrasol	3 g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cremophor A6:A25	-	3 g	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP50	-	-	3 g	-	-	-	-	-	-	-	-
SP70	-	-	-	3 g	-	3 g	-	-	3 g	-	-
PS750	-	-	-	-	3 g	-	-	-	-	-	-
Tefose 63	-	-	-	-	-	-	3 g	-	-	3 g	-
Sedefos 75	-	-	-	-	-	-	-	3g	-	-	3 g
Tisztított víz	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g

4.2.2.2. Textúra analízis

A krémek ellenállását a CT3 Textúra Analizáló (Brookfield, Middleboro, U.S.A.) készülékkel mértem. A vizsgálat során a kenőcsbe egy próbatest hatol be és a műszer a kenőcs által kifejtett ellenállást méri. A mérés alatt a következő beállítási paramétereket alkalmaztam: trigger erő (4g), csúcspont (5 mm), sebesség (0,5 mm/s). Próbatestként a TA₁₀ cylinder típusú testet (12,7 mm átmérő, 35 mm hosszúság) választottam. A kenőcsök cylinderre kifejtett ellenállásának értékét mN-ban fejeztem ki [132].

4.2.2.3. In vitro hatóanyag felszabadulás vizsgálata Franz diffúziós cella segítségével

A mérések során a kioldóközeg pH=5,5 puffer volt (Ph.Hg. VIII. előirata szerint), mely a bőr pH-jával megegyező. A kioldóközeget 32°C-ra fűtöttem a berendezéshez tartozó termosztát segítségével, a bőr hőmérsékletének megfelelően. A félig áteresztő, szintetikus cellulóz-acetát membránt a vizsgálat előtt 15 percig izopropil-mirisztátban áztattam, hogy az a bőr lipofil karakterét modellezze. A BGP-15 tartalmú kenőcsök esetében az analitikai elemzés tömegspektrométer segítségével, míg a *P. coronarius* tartalmú készítmények esetében spektrofotométerrel történt. A diffundált hatóanyag mennyiségét százalékban fejeztem ki és az idő függvényében ábrázoltam. Az ábrázolt egyenes meredeksége jellemző a mért hatóanyag felszabadulási sebességére [133–135].

A hatóanyag felszabadulási profiljának matematikai modelljét az alábbi egyenletek alapján határoztam meg:

$$\text{Nullad rendű: } Q_t = Q_0 + k_0 t$$

ahol Q a kioldódott hatóanyag mennyisége t időben, Q_0 a hatóanyag kezdeti mennyisége, k_0 a sebességi állandó.

$$\text{Első rendű: } Q_t = Q_0 \times e^{-k_1 t}$$

ahol Q_t a visszamaradt hatóanyag mennyisége t időben, Q_0 a hatóanyag kezdeti mennyisége, e az Euler féle szám és k_1 a sebességi állandó.

A különbözőségi faktorokat az alábbi egyenlet alapján határoztam meg:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100$$

R_j: a referens készítményből *j* időpontban felszabadult hatóanyag mennyisége százalékban; *T_j* a vizsgálati készítményből kioldódott hatóanyag mennyiségének százaléka a *j* időpontban; *n* a mintavételi időpontok számát jelöli.

4.2.3. Hatékonyság vizsgálata

4.2.3.1. Luciferáz vizsgálat

A kísérletben használt Raw264.7 sejtek NF- κ B-Luciferáz riporter rendszerrel stabilan transzfektált makrofágok. A sejteket 60 000/lyuk denzitással szélesztettük lumineszcens plate-re. 1 nap elteltével a makrofágok 1, 10, 100 μ M BGP-15-tel voltak kezelve. A minták elkészítéséhez a BGP-15-öt PBS-ben oldottuk, majd penetrációfokozóként hozzáadtunk SP50, SP70 vagy PS750 cukorésztert. A sejtek egy részét LPS-sel indukáltuk (100 ng/l), míg másokat nem. 6 óra inkubációt követően a médiumot eltávolítottuk és mostuk 200 μ l/lyuk PBS-sel. Ezt követően a sejteket sejtkultúra lízis reagenssel lizáltuk (20 μ l/lyuk) 10 percig. A szentjánosbogár-luciferáz szubsztrát (20 μ l/lyuk; Promega) hozzáadása után Luminoscan Ascent Scanning Luminometer (Thermo Electron Corporation) segítségével mértük a luciferáz aktivitást. A vizsgálatok elvégzése a Szegedi Biológiai Központ munkatársainak segítségével, együttműködésben valósult meg [136].

4.2.3.2. BGP-15 tartalmú kenőcsök gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata in vivo fülödéma teszttel

A BGP-15 gyulladáscsökkentő hatását az előzőleg formulált kenőcsök, valamint 10 mg/mL %-os vizes oldat formájában, fülödéma teszt segítségével vizsgáltam. Etikai engedélyszám: HB/15-ÉLB/1921-6/2020. Fülödéma teszt során a kísérleti állatok fülét gyulladáskeltő anyaggal gyulladásba hoztam, majd a gyulladást kísérő ödéma mértékét kvantitatívan tudtam mérni a fül vastagság változásának követésével. A kísérlet során paraffinban oldott, 1%-os allil-izotiocianát oldattal (AITC) lokális gyulladást idéztem elő fiatal, felnőtt C57BL/6 egerek fülén. Az oldatot vattapálcika segítségével vittem fel a fül belső és külső felszínére egyaránt és azt vizsgáltam, hogy a BGP-15 tartalmú kenőcsök, valamint BGP-15 oldat ezt a gyulladást képesek-e csökkenteni. A kenőcsöket és az oldatot premedikációként, korábbi szakirodalomban [87] közölt tapasztalatok alapján vittem fel, majd a beszívódást követően (30 perc) idéztem elő a gyulladást. A minták felvitelét megelőzően, valamint a gyulladás kiváltását követően 10 percenként egy mérnöki pontosságú, digitális tolómérővel mértem az egerek fülének vastagságát. A kísérlet során külön megvizsgáltam a fülvastagság változását csak AITC oldattal kezelt egereken, valamint hatóanyagot nem tartalmazó kenőcsökkel is. A kísérlet elvégzésében az Élettani Intézet munkatársai voltak a segítségemre [137–139].

4.2.3.3. SOD aktivitás meghatározása, antioxidáns vizsgálat

A SOD (szuperoxid-dizmutáz) egy antioxidáns enzim, melynek hatása fontos az immunrendszer működése szempontjából, a szervezetben a szuperoxid anion dizmutációját katalizálja molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá, mely a kataláz enzim segítségével vízzé és oxigénné alakul. A BGP-15 antioxidáns aktivitását HaCaT sejtvonalon vizsgáltam különböző koncentrációban: 1; 5; 10; 50; 100 mg/ml. A minták a PBS-sel készült oldatok voltak. A sejteket előzetesen 24 lyukú plate-re szélesztettem 50 000 sejt/lyuk denzitással, majd 7 napig növekedni hagytam őket CO₂ inkubátorban, 37°C-on. A kísérlet során a sejtek felszínéről eltávolítottam a használt médiumot, majd a BGP-15 tartalmú mintákkal előkezelésként inkubáltam 1 órán át. Ezt követően a mintákat eltávolítottam és mesterségesen generált UV-B sugárzásnak tettem ki a sejteket 10 percen át, abból a célból, hogy az oxidatív stressz hatására a szabadgyökök képződése fokozódjon. Ezt követően az egyes koncentrációkhoz tartozó sejteket külön-külön összegyűjtöttem a plate-ről és 10 percen át, 1000 rpm fordulatszámon, 4°C-on centrifugáltam. A sejtperleket ezután HEPES pufferben homogenizáltam és 15 percig újra centrifugáltam 1000 rpm fordulatszámon, 4°C-on. A felülúszók SOD aktivitását ezt követően a gyártó által biztosított leírás alapján vizsgáltam 96 lyukú plate-re helyezve a mintákat, majd az abszorbanciájukat spektrofotométer segítségével (Fluostar Optima) 235 nm hullámhosszon [140].

4.2.3.4. Totál antioxidáns kapacitás (TAC) vizsgálat

A kísérletet 20 hetes patkányokon végeztük BGP-15 tartalmú kenőcsökkel (Etikai engedélyszám: 6/2019/DEMÁB). Az állatok hátát szőrtelenítettük, majd két nappal később a kenőcsöket felvittük (24 órára). A harmadik napon egy másik bőrrészre vittük fel a mintákat, ezúttal 1 órára. Minden állattól bőrmintát vettünk, 3 régióból, a 24 órán át kezelt, az 1 órán át kezelt és kezeletlen részekről. A minták feldolgozása a kit-et biztosító gyártó utasításai szerint történtek. 100 mg mintát reagens pufferben homogenizáltunk, majd centrifugáltuk 12 000 rpm fordulatszámon, 15 percen át, 4°C-on. Ezt követően a felülúszót vizsgáltuk az utasításnak megfelelően, az oldatok abszorbanciáját 405 nm hullámhosszon (MultiscanGo microplate spectrophotometer). Az eredményeket a kezeletlen régió eredményeihez viszonyítva, százalékban fejeztük ki. A kísérlet kivitelezésében a Gyógyszerhatástani Tanszék munkatársai voltak a segítségemre [141].

4.2.4. Gyógynövényből történő kivonatkészítés és karakterizálás

4.2.4.1. Kivonat készítése és liofilizált termék előállítása a *P. coronarius* leveléből és virágából

Az összegyűjtött friss növényi részeket szobahőmérsékleten, napfénytől védett helyen eltartva szárítottuk, majd az egyes részeket feldaraboltuk és III-as számú szitán átszitáltuk. Az extrakcióhoz oldószerként 30 %_v-os etanol és desztillált víz elegyét választottuk 1:10 arányban. Az így készült extraktumból az etanolt rotációs bepárló készülék (Hei VAP Precision-Platinum 3) segítségével távolítottuk el 40°C hőmérsékleten, 8 rpm fordulatszámon, 200 mBar nyomáson. A visszamaradt vizes fázist -80°C-ra fagyasztottuk és liofileztük (ALPHA 2-4 LSC plus liofilező), így szilárd, vízdoldható terméket kaptunk. A kísérletek elvégzésében a Nagyváradi Egyetem munkatársai voltak segítségemre [142].

4.2.4.2. Fizikai-kémiai karakterizálás HPLC módszerrel

A *P. coronarius* kivonatából származó bioaktív vegyületek azonosítását és mennyiségi meghatározását kromatográfias elválasztással (Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D plus) végeztük. Phenomenex C18 (2) 100 A, 150 mm × 4,6 mm × 5 µm méretű oszlopot használtunk, amelyet 30 °C hőmérsékleten tartottunk. Az eluáláshoz használt mozgófázisok metanolt (A) és 0,1%-os hangyasavat (B) tartalmaztak. Az alkalmazott gradiens program a következő volt: 5% A és 95% B 0-3. perc, 25% A és 75% B 3-6. perc, 37% A és 63% B 9-13. perc, 54% A és 46 % B 18-22. perc, 95% A és 5% B 26-29. perc és 5% A és 95% B 30-36. perc. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc, az injektált térfogat pedig 10 µl. A detektálást több hullámhosszon végeztük: 254, 270, 275, 326, 337 és 360 nm. A kivonathoz tartozó polifenolokat a kivonat kromatogramján szereplő retenciós idők összehasonlításával azonosítottuk a standardoldat kromatogramokon [142].

A bioaktív vegyület-tartalmat a következő egyenlettel határoztuk meg:

$$\text{Bioaktív vegyület tartalom (mg/100mg)} = \frac{m_{\text{bioaktív vegyület}}}{m_{\text{gyógynövény}}}$$

A kísérletek elvégzésében a Nagyváradi Egyetem munkatársai voltak segítségemre.

4.2.4.3. A liofilizált kivonat fitokémiai vizsgálata

Vizsgálataink során a *P. coronarius* kivonatok bioaktív vegyület tartalmát (az összes polifenol és összes flavonoid tartalmát) meghatároztuk. A teljes polifenol tartalom kiszámításához a Folin–Ciocâlteu módszert választottuk. Ez elektrontranszfer reakción alapul, amely egy antioxidáns redukzív képességét méri. A teljes polifenol tartalmat a szárított növény galluszsav-

ekvivalensként (GAE/100 g) számítottuk ki a galluszsav kalibrációs egyenese alapján (5-500 mg/l, $Y = 0,0027 \times -0,0055$, $R^2 = 0,9999$). Minden meghatározást három párhuzamosban végeztünk. Az összes flavonoid tartalom meghatározására az alumínium-klorid kolorimetriás módszert választottuk. A standard kalibrációs görbéhez kvercetint használtunk. A kvercetin törzsoldatot úgy állítottuk elő, hogy 5 mg kvercetint 1 ml metanolban oldottunk fel, majd ezt követően egy standard kvercetin hígítási sort készítettünk metanollal (5-200 µg/ml). Az abszorbanciát 420 nm-es hullámhosszon mértük UV-Vis Varia spektrofotométerrel. A teljes flavonoid koncentrációt a kalibrációs egyenes szerint számítottuk ki ($Y = 0,0162 \times + 0,0044$, $R^2 = 0,999$), és kvercetin ekvivalensben (QE) mg/100 g szárított gyógynövényben fejeztük ki. Minden meghatározást három párhuzamos méréssel végeztünk. A kísérletek elvégzésében a Nagyváradi Egyetem munkatársai voltak segítségemre.

4.2.4.4. DPPH antioxidáns vizsgálat

A *P. coronarius* levelének és virágának antioxidáns képességét DPPH teszt segítségével vizsgáltuk, melynek alapja, hogy a lila színű DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) szabadgyök antioxidánsok jelenlétében színét elveszíti. Az extraktumokat a 96%-os etanolban oldott DPPH szabad gyökkel reagáltattuk. A reakcióelegy 100 µl extraktumot, 900 µl etanolt és 2 ml DPPH oldatot (0,06 mM) tartalmazott. A reakcióelegyeket fél órán át inkubáltuk. A reakcióban a fennmaradó DPPH mennyiség mérését UV spektrofotométerrel (Shimadzu Spectrophotometer, Tokió, Japán) végeztük 517 nm hullámhosszon. Az antioxidáns vizsgálatok elvégzésében a Nagyváradi Egyetem munkatársai voltak segítségemre [143].

4.2.4.5. Antioxidáns kapacitás meghatározása FRAP módszerrel

A FRAP módszer (Ferric-Reducing Antioxidant Power) egy egyszerű, spektrofotometriás technika, mely a tesztelt minta antioxidáns aktivitását határozza meg, melynek alapja, hogy a Fe^{3+} ionokat az antioxidánsok Fe^{2+} ionokká redukálják. A reakcióban Fe^{2+} ionok keletkeznek a TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-S-triazin) segítségével, melyet kék színváltozás kísér. A színváltozást spektrofotometriásan követhetjük. A törzsoldatok a következőket tartalmazták: 300 mM acetát puffer; 270 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 50 ml desztillált vízben oldva; 150 mg TPTZ és 150 µl HCl, 50 ml desztillált vízben oldva. A FRAP oldatot 50 ml acetát puffer, 5 ml $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ oldat és 5 ml TPTZ oldat összekeverésével állítottuk elő. A Troloxot mint standard oldatot és a minták abszorbanciáját 595 nm-es hullámhosszon detektáltuk. Az antioxidáns vizsgálatok elvégzésében a Nagyváradi Egyetem munkatársai voltak segítségemre [144,145].

4.2.4.6. Antioxidáns kapacitás meghatározása CUPRAC módszerrel

A kísérlet a Cu^{2+} ion Cu^{1+} ionná történő redukálásán alapul, mely kolorimetriásan nyomon követhető. A reakcióelegy 0,25 ml CuCl_2 oldatot (0,01 M), 0,25 ml etanolos neokuprint ($7,5 \cdot 10^{-3}$ M) és 0,25 ml $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pufferoldatot (1 M) tartalmazott, melyet összekevertünk a mintákkal. Ezután a teljes térfogatot 2 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel, és alaposan összekevertük, a csöveket lezártuk és szobahőmérsékleten állni hagytuk 30 percig. Ezt követően a minták abszorbanciáját 450 nm-en mértük spektrofotométer segítségével (Shimadzu Spectrophotometer, Tokió, Japán). A reakcióelegy megnövekedett abszorbanciája jelezte fokozott redukációs képességet. Az antioxidáns vizsgálatok elvégzésében a Nagyvárad Egyetem munkatársai voltak segítségemre [146].

4.2.4.7. Antioxidáns kapacitás meghatározása ABTS módszerrel

A minták antioxidáns aktivitását ABTS módszerrel is meghatároztuk. A kísérlet az antioxidánsok relatív képességét méri a vizes fázisban keletkező ABTS (2,20-azinobisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) megkötésére, összehasonlítva Trolox standard-del. Az ABTS-t desztillált vízben feloldottuk (7 mM). Az ABTS gyök kation (ABTS^+) előállításához a törzsoldatot kálium-perszulfáttal reagáltattuk, majd egy éjszakán át állni hagytuk egy sötét szobában. ABTS^+ -t és a mintákat etanollal hígítottuk. A reakcióelegy 10 μl hígított mintát (vagy Trolox standard-et) és 1 ml ABTS^+ -t tartalmazott, a minták abszorbanciáját spektrofotométer (Fluostar Optima) segítségével mértük 734 nm hullámhosszon. Az antioxidáns vizsgálatok elvégzésében a Nagyvárad Egyetem munkatársai voltak segítségemre [116].

4.2.5. A gyógynövény hatásainak vizsgálata

4.2.5.1. Liofilizátum antimikrobiális hatásának vizsgálata mikrodilúcióval

A *P. coronarius* levelének és virágának antifungális és antibakteriális aktivitását mikrodilúcióval teszteltük *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* fajokon. 96 lyukú plate-re pipettáztam fungális vagy bakteriális inokulumot (100 μl), ehhez 100 μl tesztoldatot adtunk. A minták a liofilizált *P. coronarius* levélből vagy virágból készültek RPMI-1640 illetve Mueller-Hinton tápoldatban oldva, majd 0,2 μm -es szűrőn átszűrtük. A tesztoldatokkal 24 órán át, 37°C-on inkubáltuk a sejteket, majd az oldatok abszorbanciáját spektrofotométerrel (Multiskan Go) 492 nm-en mértük fungális, 600 nm-en bakteriális sejtek esetén. A mikrobiológiai vizsgálatok kivitelezésében az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársai voltak segítségemre [147].

4.2.5.2. Liofilizátum antimikrobiális hatásának vizsgálata *in vitro* idő-ölés (time-kill) teszttel

A kísérlet során 5 ml-es tenyésztő csövekben gomba (10^5 sejt/ml) és bakteriális sejtek (10^6 - 10^7 sejt/ml) lettek szélesztve pH=7-es tápfolyadékban (RPMI-1640 ill. Mueller Hinton). *C. albicans* esetében eltávolítottunk 100 μ l felülszót előre meghatározott időközönként, majd ezeket 10-szeresen meghígítottuk és 4×30 μ l-t Sabouraud dextróz agar táptalajra pipettáztuk. Ezt követően 48 órán át inkubáltuk 35°C-on. *S. aureus* és *E. coli* baktériumok esetében ugyanezzel a módszerrel kerültek a minták szélesztésre Mueller-Hinton táptalajra, majd azonos körülmények között, azonos ideig inkubáltuk őket. Az inkubációt követően az oldatok abszorbanciáját Multiskan Go spektrofotométerrel mértük. A mikrobiológiai vizsgálatok kivitelezésében az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársai voltak segítségemre [148].

4.2.5.3. Liofilizátum gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata ELISA segítségével

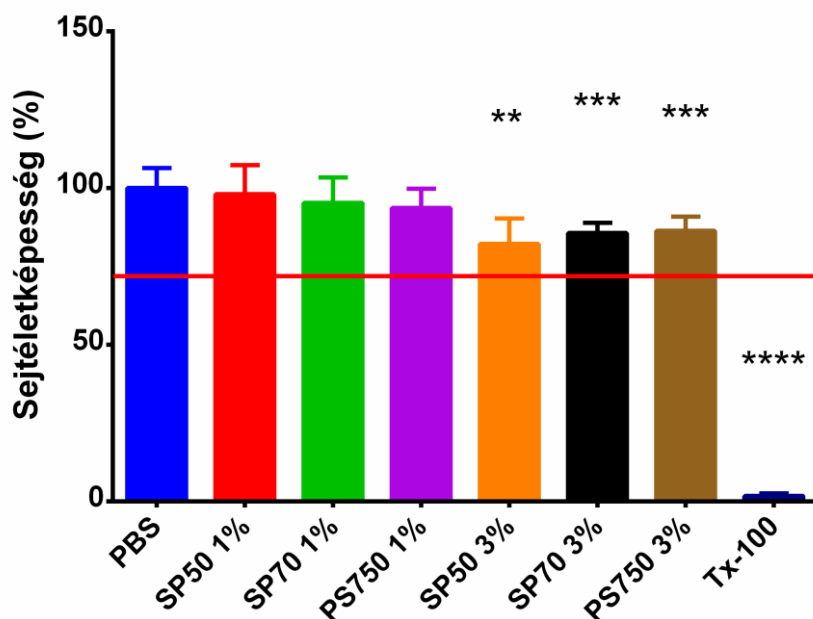
A kísérlethez előzetesen HaCaT sejteket szélesztettem 96 lyukú plate-re és egy hétig növekedni hagytam őket. A fáradt médiumot eltávolítottam a sejtek felszínéről, majd a tesztoldatokkal 1 órán át inkubáltam őket. A minták a liofilizált *P. coronarius* levélből vagy virágból készültek PBS-ben oldva, majd 0,2 μ m-es szűrőn átszűrtük. A tesztoldatokat 1 óra elteltével eltávolítottam, majd lyukanként 50-50 μ l IL-1 β -át és TNF α -át adtam a sejtekhez, melyekkel 24 órán át inkubáltam. Másnap a felülszót eltávolítottam és a gyártó utasításainak megfelelően elvégeztem a vizsgálatot. Az oldatok abszorbanciáját (Fluostar Optima) spektrofotométerrel mértem 235 nm hullámhosszon [149,150].

5. Eredmények

5.1. Segédanyagok biokompatibilitási vizsgálata

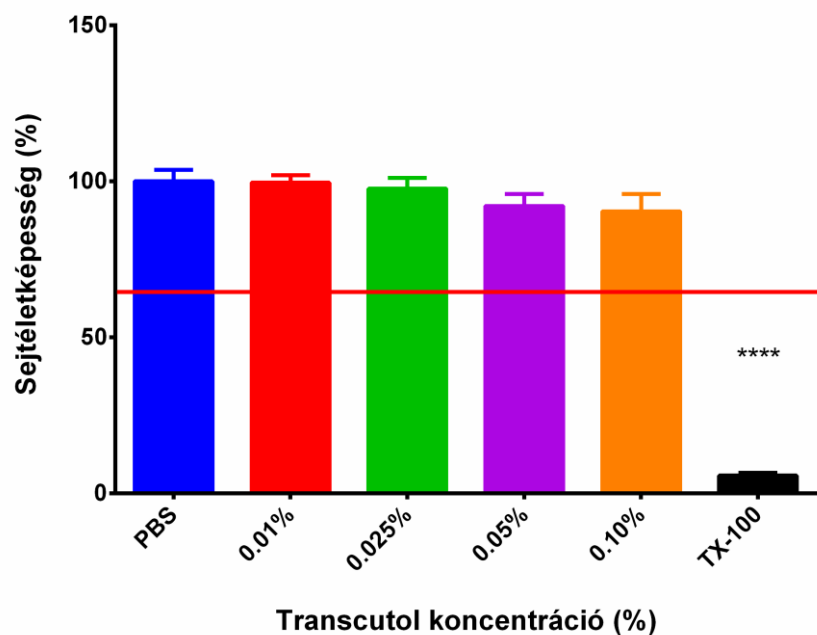
A segédanyagok citotoxicitását HaCaT sejt vonalon teszteltem. A sejtéletképességet a negatív kontrollhoz (PBS) hasonlítottam. A vizsgálat során pozitív kontrollt, Triton-X 100-at is használtam, annak érdekében, hogy meggyőződjek arról, a teszt megfelelően működik-e.

A **cukorészterekből** 1% és 3% koncentrációjú oldatot készítettem PBS-sel. A vizsgált koncentráció tartományban a cukorészterek biztonságosan alkalmazhatónak bizonyultak, a legjobb sejtéletképességi értéket az 1% SP50 cukorésztert tartalmazó minta produkálta, de az életképesség minden minta esetében 70% fölött van, mely az ISO (10993-5) szabvány előírásának megfelel. Az eredményeket a **7. ábra** foglalja össze.



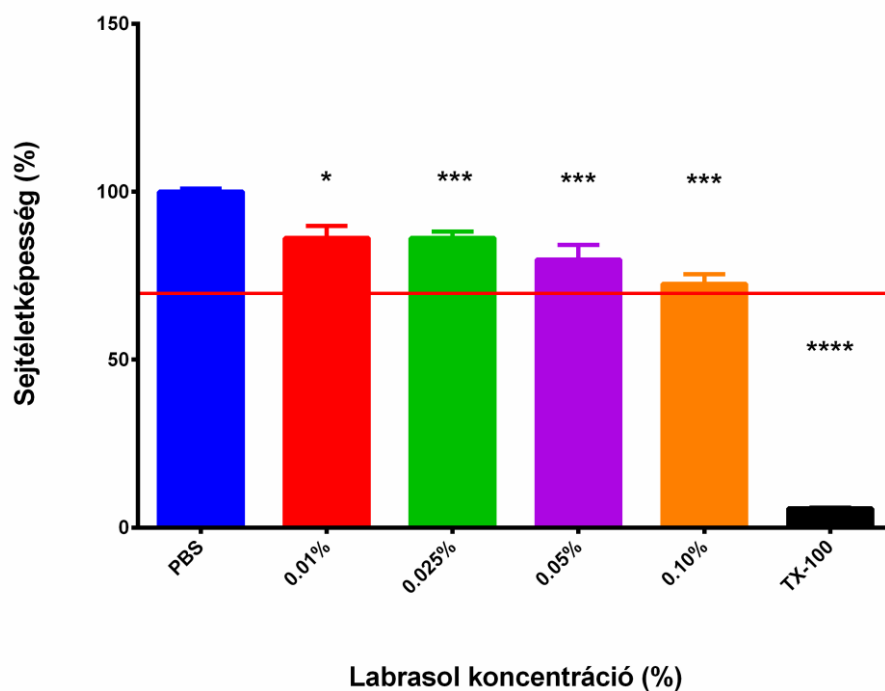
7. ábra. A cukorészterek MTT tesztje. A kísérlet során 6 párhuzamos mérést végeztem, ezek átlagai láthatóak a PBS-hez hasonlítva, százalékban kifejezve. A szignifikáns különbségek az ábrán csillaggal jelölve láthatóak. Az eredményeket egy utas ANOVA és T-próba segítségével hasonlítottam össze. **, *** és ****szignifikáns különbséget jelez $p < 0,01$; $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ -nél.

A **Transcutol** citotoxicitásának vizsgálatához különböző koncentrációjú oldatokat készítettem PBS-sel. Az alkalmazott koncentrációban a vizsgált minták nem bizonyultak toxikusnak, az életképesség 70% fölötti minden minta esetében. A koncentráció növekedésével a sejtéletképességi értékek csökkenése figyelhető meg. Az eredményeket a **8. ábrán** foglaltam össze.



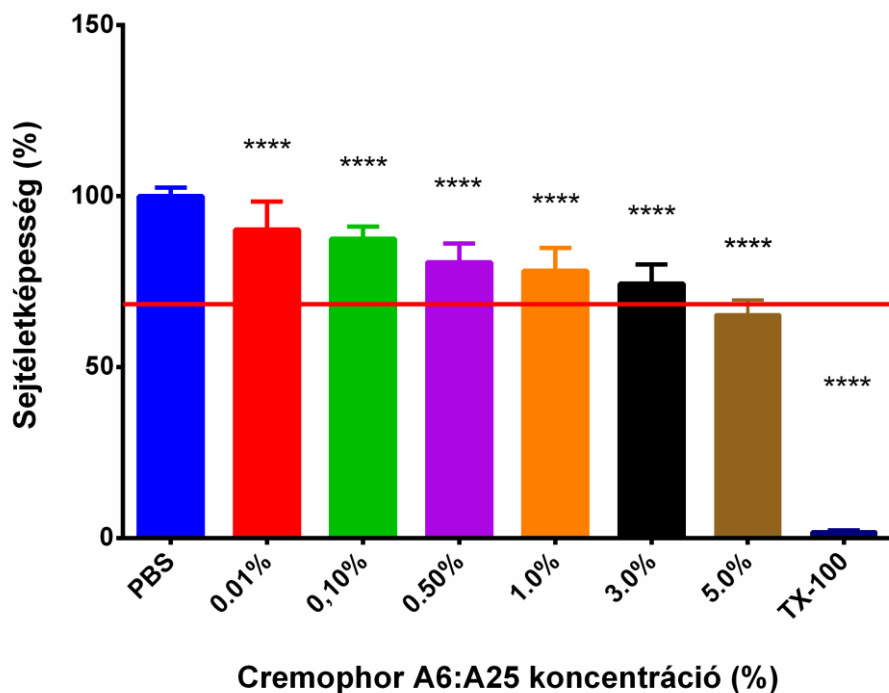
8. ábra. A Transcutol MTT tesztje. A vizsgálat során 6 párhuzamos mérést végeztem, melyek átlagai láthatóak a PBS-hez hasonlítva, százalékban kifejezve. A szignifikáns különbséget csillaggal jelöltem. Az eredmények statisztikai elemzése egy utas ANOVA és T-próba segítségével történt. **** szignifikáns különbséget jelez $p < 0,0001$ -nél.

A **Labrasol** sejtkárosító hatásának vizsgálatát követően kapott eredményeket a **9. ábrán** mutatom be. A kísérlethez hígítási sort készítettem a tenzidből PBS segítségével. A koncentráció növelésével az anyag citotoxicitása növekvő tendenciát mutat. A sejtéletképességi értékek 70% fölött vannak, 0,10%-os koncentrációban 72%.



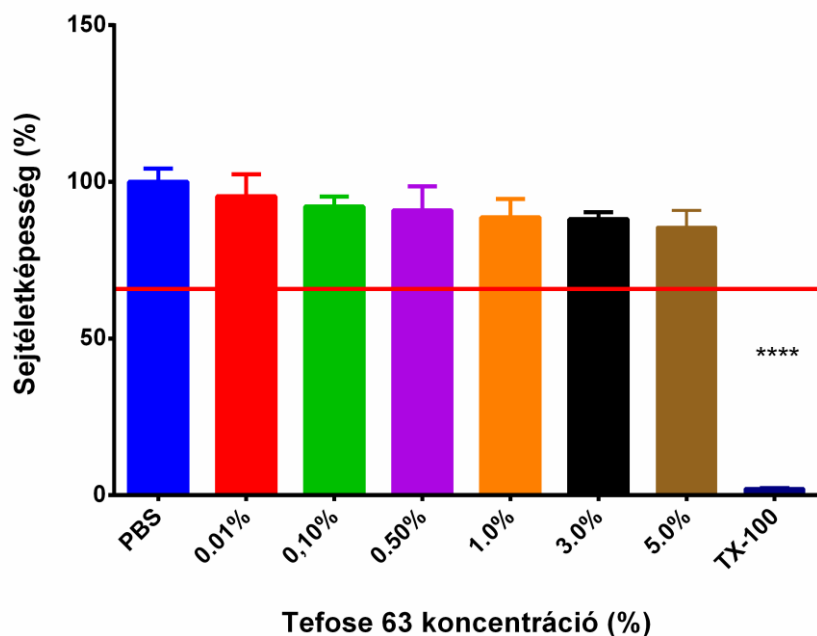
9. ábra. A Labrasol citotoxicitási vizsgálata. A kísérlet során koncentrációnként 6 párhuzamos mérést végeztem, melyek átlagai láthatóak a PBS-hez viszonyítva, százalékban kifejezve. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA és T-teszt segítségével történt. *, ***, **** szignifikáns különbséget jelez $p < 0,05$; $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ -nél.

A **Cremophor A6:A25** sejtéletképességi vizsgálatának eredményei a **10. ábrán** találhatóak. A segédanyagot különböző koncentrációkban vizsgáltam, jól látható, hogy a koncentráció növelésével a citotoxicitás növekszik. A kenőcs formulálásához alkalmazott 3% még a 70% feletti sejtéletképességet eredményez, 5%-ban alkalmazva azonban már a 70% sejtéletképességi határt nem éri el.



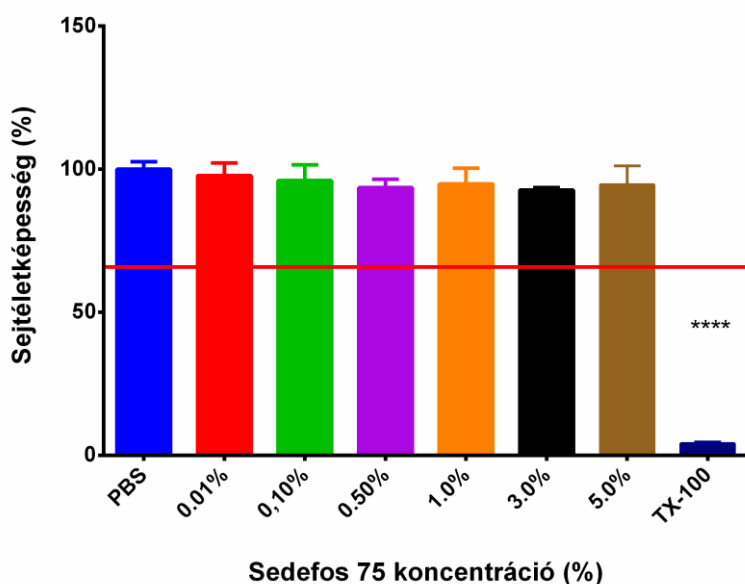
10. ábra. A Cremophor A6:25 sejtéletképességi vizsgálatának eredményei. A vizsgálat során csoportonként 6 párhuzamos mérést végeztem, ezek átlagai láthatóak a PBS-hez viszonyítva, százalékban kifejezve. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA és T-teszt segítségével történt. **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0001$ -nél.

A **Tefose 63** felületaktív anyag esetében a sejtkárosító hatás kisebb mértékű, mint az előző esetben. A vizsgált koncentrációtartományban a segédanyag biztonságosan alkalmazható, hiszen a sejtéletképesség minden esetben 70% fölött van, még 5%-os koncentrációban is a sejteknek 85%-os volt a túlélési aránya. A vonatkozó eredmények a **11. ábrán** kerülnek bemutatásra.



11. ábra. A Tefose 63 citotoxicitási vizsgálata. A kísérlet során koncentrációnként 6 párhuzamos mérést végeztem, ezek átlagai láthatóak a PBS-hez viszonyítva, százalékban kifejezve. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA és T-teszt segítségével történt. **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0001$ -nél.

A **Sedefos 75**-tel történő MTT teszt során a segédanyag biztonságosnak bizonyult az összes vizsgált koncentrációban, hiszen a sejtek túlélési aránya 70% fölött van minden esetben. A kísérlet eredményei a **12. ábrán** találhatók összegezve.



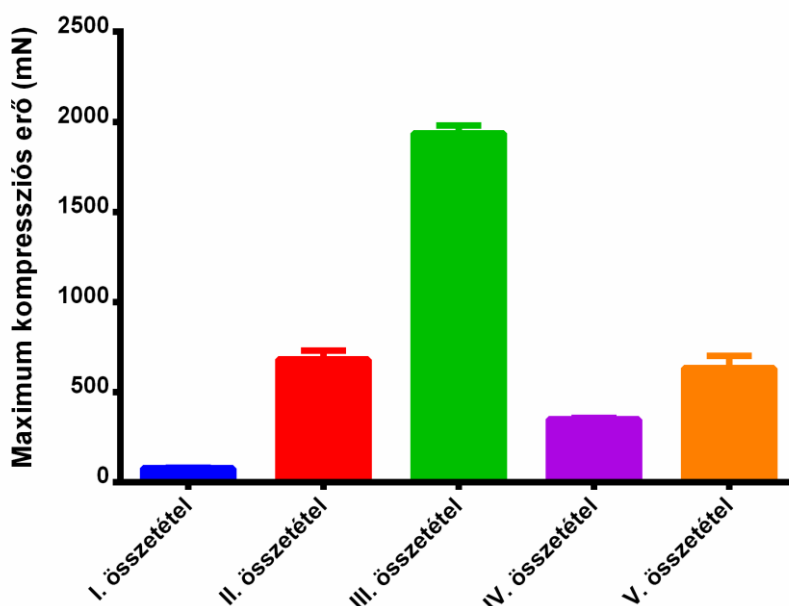
12. ábra. A Sedefos 75 citotoxicitási vizsgálata. A kísérlet során koncentrációnként 6 párhuzamos mérést végeztem, az ábrán mérések átlagai láthatóak a PBS-hez viszonyítva, százalékban kifejezve. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA és T-teszt segítségével történt. **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0001$ -nél.

5.2. Kenőcs formulálás

A kenőcsök formulálása során összesen 11 összetételt készítettem, melyből 5 BGP-15-öt, 3 liofilezett *P. coronarius* levél extraktumot, további 3 pedig liofilezett *P. coronarius* virág extraktumot tartalmazott. Az emulgensek változtatásával további összetételeket hoztam létre. A pontos összetételekről a **3. táblázat** ad információt.

5.3. BGP-15 tartalmú kenőcsök textúra analízise

A formulált készítmények textúráját a Brookfield CT3 Textúra Analizáló készülék segítségével vizsgáltam meg. A maximális kompressziós erő, mely ahhoz volt szükséges, hogy a cylinder behatoljon a kenőcsbe a **13. ábrán** látható. A BGP-15 tartalmú kenőcsök esetében a Labrasolt tartalmazó összetétel (I. összetétel) mutatta a leglágyabb konzisztenciát, míg az SP50-et tartalmazó formuláció (III. összetétel) a volt legellenállóbb.



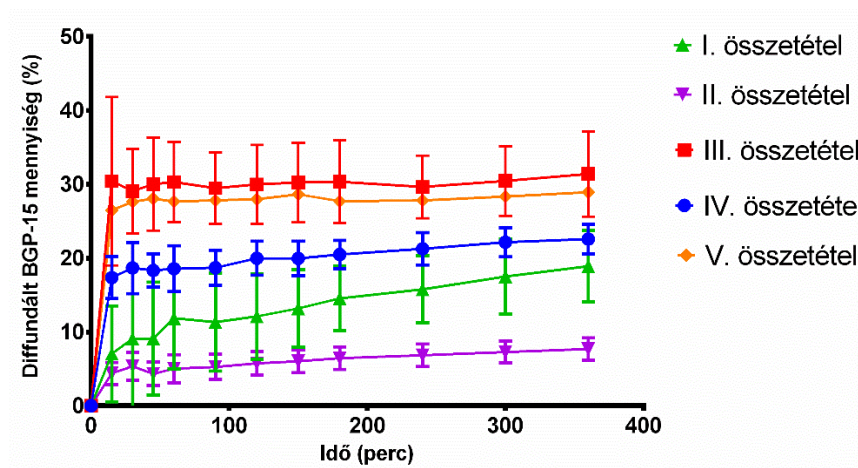
13. ábra. A BGP-15 tartalmú kenőcsök textúra analízise. Az ábrán a maximális kompressziós erő látható ábrázolva mN-ban kifejezve az egyes formulációk vonatkozásában. Az eredmények 3 mérés átlagát mutatják be $\pm$ SD. Az összehasonlítást egyutas ANOVA-val és T próbával végeztem el.

4. táblázat. BGP-15 tartalmú kenőcsök textúra analízisének statisztikai eredményei, p értékek és szignifikancia.

Összetételek	p érték	
I. és II. összetétel	<0,0001	*****
I. és III. összetétel	<0.0001	*****
I. és IV. összetétel	<0.0001	*****
I. és V. összetétel	0.0001	***
II. és III. összetétel	<0.0001	*****
II. és IV. összetétel	0.0003	***
II. és V. összetétel	0.3716	nem szignifikáns
III. és IV. összetétel	<0.0001	*****
III. és V. összetétel	<0.0001	*****
IV. és V. összetétel	0.0019	**

5.4. In vitro hatóanyag felszabadulás

A kenőcsökből történő hatóanyag felszabadulást Franz diffúziós cella segítségével vizsgáltuk. A kísérletek eredményeit a **14. ábrán** foglaltuk össze, mely bemutatja az egységnyi felületre kiszámított hatóanyag diffúziójának értékét százalékban kifejezve, az idő függvényében. A hatóanyag felszabadulási rátát (k), valamint a diffúziós koefficiens (D) értékeket a **5. táblázatban** mutatom be. A BGP-15-öt tartalmazó formulációk esetében a cukorészterekkel formulált összetételek (III; IV; V.) érték el a legjobb hatóanyag felszabadulást, ezek közül is az SP50 tartalmú formuláció (III. összetétel). A *P. coronarius* tartalmú kenőcsök közül a legjobb hatóanyag felszabadulás a Tefose 63 és az SP70 tartalmú készítmények (VII; IX; X.) esetében volt megfigyelhető. A készítményekből történő hatóanyag felszabadulást különbözőség szempontjából is elemeztük. Ennek eredményei a **6. táblázatban** találhatóak összefoglalva. Két formuláció különböző, ha különbözőségi faktoruk (f1) 0-15 között van. Ez alapján a III. és V. összetételek különbözőek.



14. ábra. BGP-15 tartalmú kenőcsök Franz diffúziós vizsgálata. A diagramon 3 párhuzamos mérés átlagai vannak ábrázolva $\pm$ SD.

5. táblázat. Az egyes összetételekhez kiszámított felszabadulási ráta (k) és diffúziós koefficiens (D) értékek.

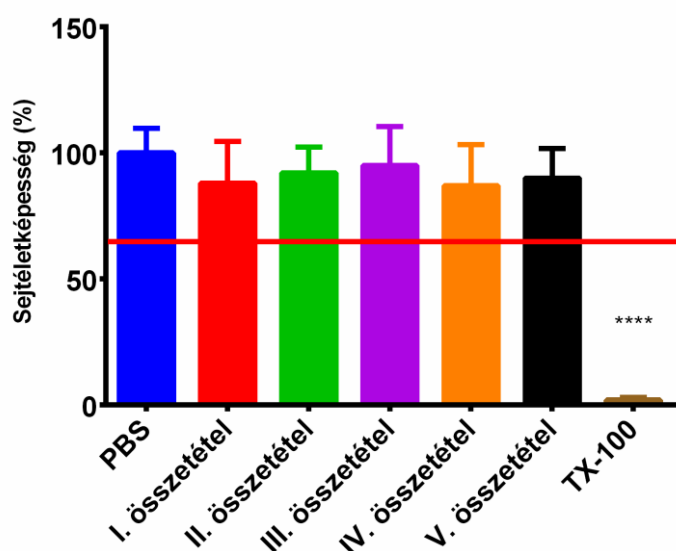
Készítmények	Felszabadulási ráta (k) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \sqrt{\text{min}}$)	Diffúziós koefficiens (D) ($\text{D} \times 10^{-7}$; cm^2/min)
I. összetétel	279,49	3810
II. összetétel	123,39	972
III. összetétel	593,64	17000
IV. összetétel	402,12	6480
V. összetétel	551,53	14100

6. táblázat. A BGP-15 tartalmú készítmények különbségi faktorai.

Készítmények	Különbségi faktor (f1)
I. vs. II.	54,18
I. vs. III.	57,61
I. vs. IV.	35,59
I. vs. V.	54,26
II. vs. III.	80,58
II. vs. IV.	70,49
II. vs. V.	79,04
III. vs. IV.	34,19
III. vs. V.	7,33
IV. vs. V.	28,98

5.5. Készítmény citotoxicitásának vizsgálata MTT tesztel

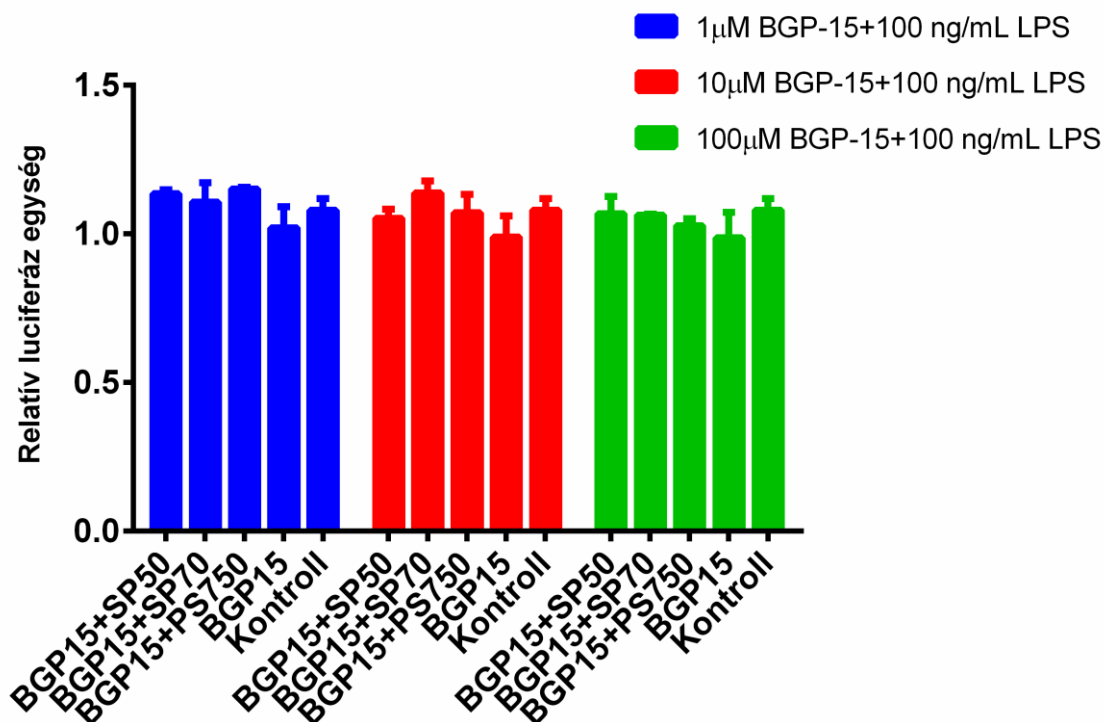
A kenőcsök citotoxicitásának vizsgálatához Franz diffúziós cellából, 6 órán át tartó inkubációt követően vettünk mintát, ahol a kioldóközeg pH=5,5 kémhatású puffer volt. Az eredmények alapján ebben az esetben is elmondható, hogy a kenőcsök biztonságosan alkalmazhatóak, a sejtleletkéesség 70% fölött van az összes testoldat esetében. A legjobb túlélési arányt az SP50 cukorésztert tartalmazó, III. összetétel produkálta. Az eredmények a **15. ábrán** találhatóak összefoglalva.



15. ábra. BGP-15 tartalmú kenőcsök citotoxicitása. A vizsgálat során 6 párhuzamos mérést végeztem, ezek átlagai láthatóak a PBS-hez hasonlítva, százalékban kifejezve. A szignifikáns különbségek az ábrán csillaggal jelölve láthatóak. A statisztikai elemzést utas ANOVA és T-próba segítségével végeztem el. **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0001$ -nél.

5.6. Luciferáz vizsgálat

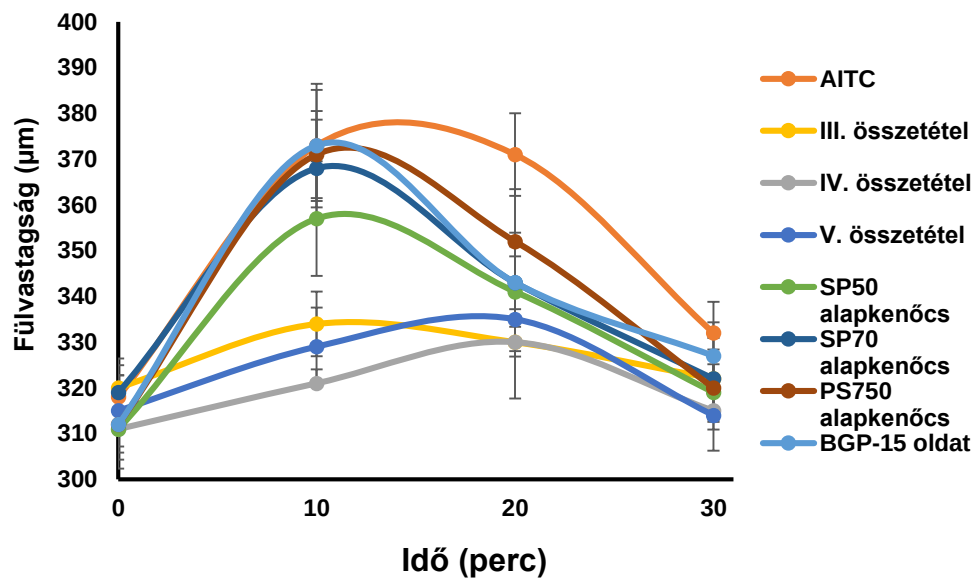
A BGP-15 gyulladáscsökkentő hatása, valamint annak útvonalát egér makrofágokból származó Raw264.7 sejteken került vizsgálatra, melynek eredményei a **16. ábrán** találhatóak. A kísérlet során azt teszteltem, hogy a BGP-15 az LPS-sel indukált sejtekben képes-e mérsékelni az NF- κ B útvonal aktiválódását és a gyulladás kialakulását. A hatóanyagot különböző koncentrációkban adtuk a sejtekhez, (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) önmagában, valamint a kenőcsösszetételekben alkalmazott emulgensekkel kombinálva. A mért lumineszcencia arányos volt az NF- κ B transzkripció faktorának aktivitásával. Az eredmények azt mutatják, hogy a BGP-15 bármelyik koncentrációjával történő kezelés nem volt képes a makrofágok LPS indukálta NF- κ B válaszát szignifikánsan mérsékelni vagy gátolni.



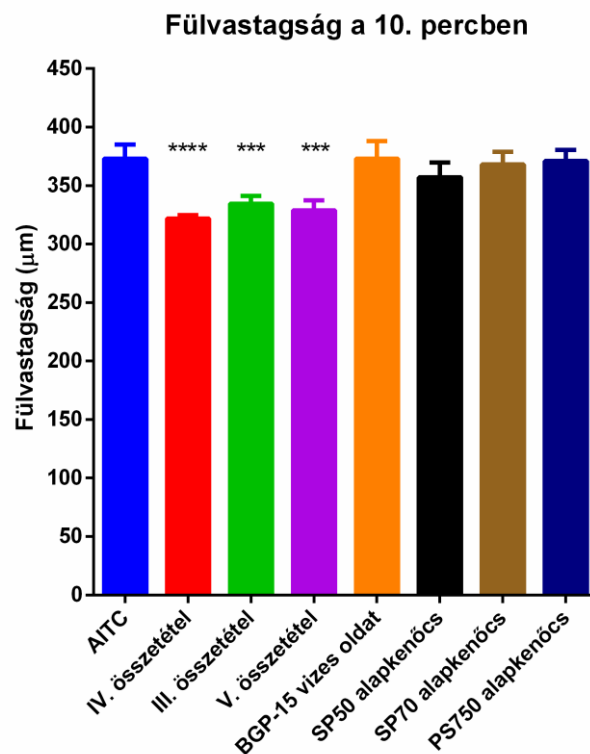
16. ábra. A BGP-15 hatása önmagában és cukorészterekkel együtt, különböző koncentrációkban LPS indukálta Raw264.7 sejteken.

5.7. BGP-15 tartalmú kenőcsök gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata *in vivo*

A kísérlet során azokat a BGP-15 tartalmú összetételeket teszteltem állatokon, melyekben az emulgens cukorészter volt, mivel a diffúziós vizsgálat során ezek produkálták a legjobb eredményeket. A kísérletben emellett hatóanyag nélküli kenőcsöket, a gyulladáskeltő anyagot (AITC) önmagában, valamint a BGP-15 vizes oldatát (10 ^m/m%) is vizsgáltam. Az eredmények a **17. ábrán** láthatóak összefoglalva, valamint a **18. ábrán** a kísérlet 10. percében mért fülvastagságokat prezentáltam. Jól látható mindkét diagramon, hogy a hatóanyagot tartalmazó készítmények esetében (III; IV; V. összetétel) a fülvastagság szignifikánsan kisebb összehasonlítva az alapkenőccsel, a BGP-15 oldattal, vagy magával a gyulladáskeltő anyaggal. A legjobb eredményt a IV. összetétellel, az SP70-et tartalmazó formulációval sikerült elérni.



17. ábra. A BGP-15 tartalmú kenőcsök in vivo tesztelése.

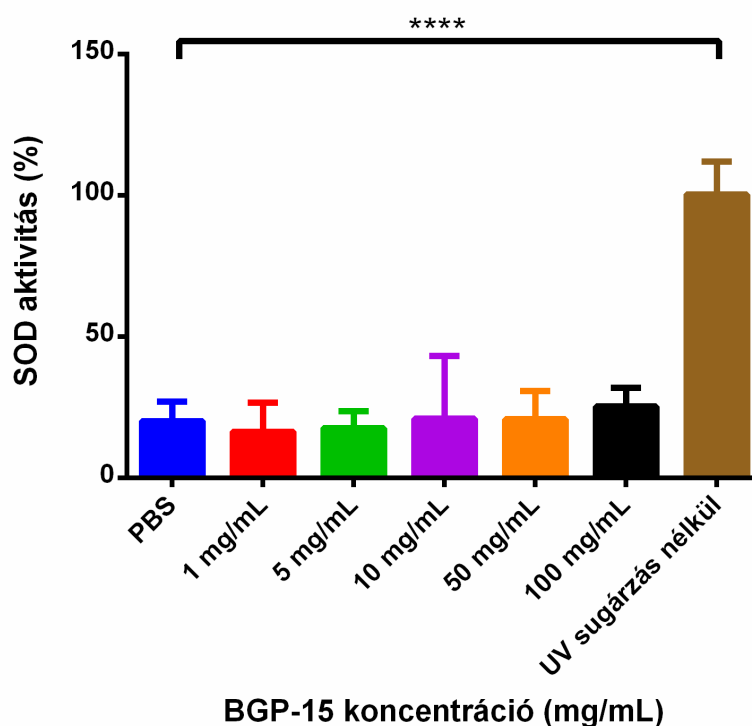


18. ábra. Fülvastagság a kísérlet 10. percében. Az eredmények 3 párhuzamos mérés átlagaiból adódtak össze. A csoportok összehasonlítását egy utas ANOVA-val és T-teszt segítségével elemeztem. A szignifikáns különbségek csillaggal jelölve találhatók. *** és **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,001$ és $p < 0,0001$ -nél.

5.8. BGP-15 antioxidáns hatásának vizsgálata

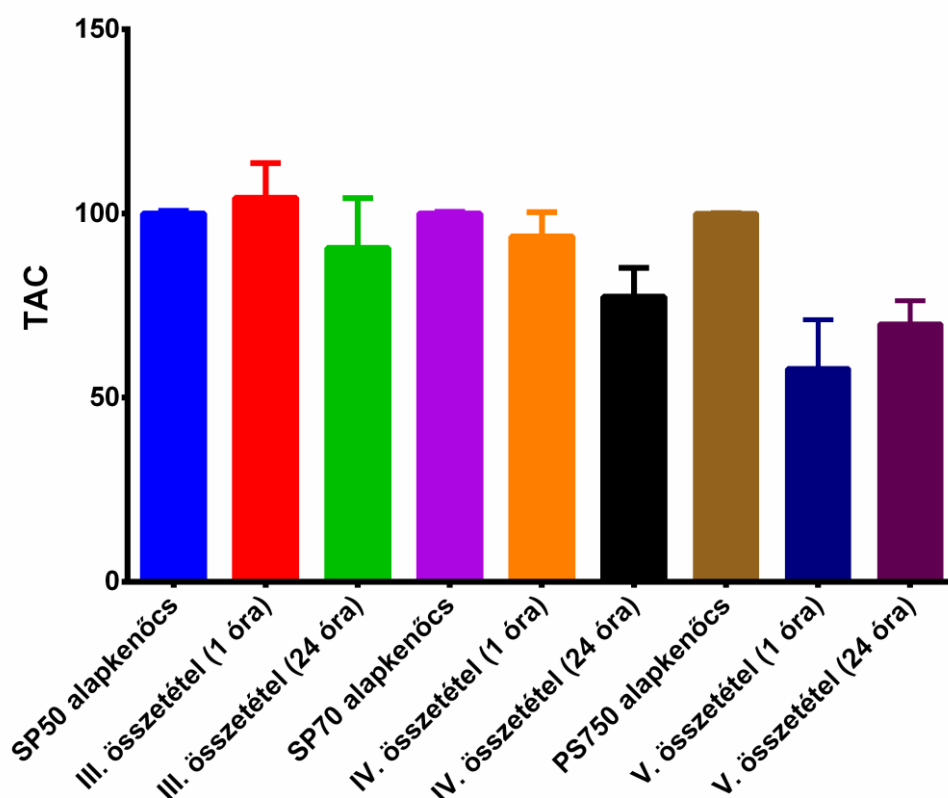
A BGP-15 esetleges antioxidáns hatását két módszerrel teszteltem, *in vitro* SOD aktivitást, valamint *in vivo* össz-antioxidáns kapacitást (TAC) elemeztem.

A SOD teszt eredményei a **19. diagramon** láthatóak. A kísérletet HaCaT sejtvonalon végeztük, a sejteket különböző koncentrációjú BGP-15 oldatokkal előkezelve. Az UV sugárzás hatására a sejtek SOD aktivitása szignifikánsan lecsökkent a PBS-sel kezelt csoportban, csakúgy, mint a BGP-15 bármelyik koncentrációjával előkezelt csoportoknál. A SOD enzim csökkent szintje az UV-B sugárzás okozta intenzív oxidatív stressz. A sejtek BGP-15-tel történő előkezelése nem tudta megelőzni vagy mérsékelni a SOD enzim csökkenését.



19. ábra. BGP-15-tel előkezelt HaCaT sejtek SOD aktivitása UV-B sugárzást követően. A statisztikai elemzéshez T-tesztet és ANOVA-t végeztem. **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0001$ -nél.

Az össz-antioxidáns kapacitás vizsgálatokor 20 hetes, előzőleg szőrtelenített patkányokat kezeltem BGP-15 tartalmú kenőcsökkel, valamint mindhárom készítmény hatóanyagmentes változatával. A kísérlet során egyik kenőcsösszetétel sem mutatott szignifikáns változást az hatóanyagmentes kenőcsökhöz hasonlítva, bár az V. összetételnél (PS750 tartalmú) kezdetben megfigyelhető volt a csökkenő tendencia, az eredmények ebben az esetben sem voltak szignifikánsan különbözőek. Az eredmények a **20. grafikonon** foglaltam össze.



20. ábra. BGP-15 tartalmú kenőcsök össz-antioxidáns kapacitása (TAC).

5.9. A *P. coronarius* bioaktív komponensek meghatározásának eredménye

Az extraktumok bioaktív vegyülettartalmának meghatározása HPLC segítségével történt. Az azonosított komponenseket és azok mennyiségét a 7. és 8. táblázat mutatja be. A *P. coronarius* levél nagy mennyiségben tartalmaz delphinidin 3-rutinozid kloridot (0,3354 mg/100 mg), luteolin 7-glükozidot (0,2528 mg/100 mg) és 7-metoxikumarint (0,2061 mg/100 mg) a többi komponenshez viszonyítva. A *P. coronarius* virág nagy mennyiségben tartalmaz bergaptent (2,8370 mg/100 mg), valamint kávésavat (1,8407 mg/100 mg), delphinidin-3-rutinozid-kloridot (1,7928 mg/100 mg), 7-metoxikumarint (1,6725 mg/100 mg). A virág sokkal nagyobb mennyiségben tartalmazza a delphinidin-3-rutinozid-kloridot és 7-metoxi-kumarint, mint a levél.

7. táblázat. *P. coronarius* levél extraktum bioaktív vegyülettartalma.

<i>P. coronarius</i> levél	Bioaktív vegyülettartalom (mg vegyület/100 mg extraktum) $\pm$ SD
7-metoxikumarin	0.2061 $\pm$ 0.032
Klorogénsav	0.0128 $\pm$ 0.0097
Kávésav	0.0740 $\pm$ 0.0033
Delfinidin 3-rutinozid klorid	0.3354 $\pm$ 0.047
Hyperozid	0.0514 $\pm$ 0.0071
Luteolin 7-glükozid	0.2528 $\pm$ 0.056
Rutin	0.0941 $\pm$ 0.0045
T- rezveratrol	0.0602 $\pm$ 0.0026

8. táblázat. *P. coronarius* virág extraktum bioaktív vegyülettartalma.

<i>P. coronarius</i> virág	Bioaktív vegyülettartalom (mg vegyület/100 mg extraktum) $\pm$ SD
7-metoxikumarin	1.6725 $\pm$ 0.372
Klorogénsav	0.2485 $\pm$ 0.098
Ferulsav	0.1094 $\pm$ 0.020
Galluszsav	0.1375 $\pm$ 0.034
Rozmarinsav	0.7674 $\pm$ 0.112
Trans p-kumársav	0.4387 $\pm$ 0.079
Bergapten	2.8370 $\pm$ 0.432
Kávésav	1.8407 $\pm$ 0.087
Delfinidin 3-rutinozid klorid	1.7928 $\pm$ 0.201
Diozmin	1.1125 $\pm$ 0.386
Hiperozid	0.2428 $\pm$ 0.042
Izopimpinellin	0.4678 $\pm$ 0.016
Luteolin 7-glükozid	0.0585 $\pm$ 0.0093
Myricetin	0.0645 $\pm$ 0.0021
Quercetin	0.1449 $\pm$ 0.034
Rutin	0.4077 $\pm$ 0.015
T- rezveratrol	0.5262 $\pm$ 0.027

5.10. A *P. coronarius* antioxidáns vizsgálata

A **9. táblázat** a *P. coronarius* levelének és virágának antioxidáns aktivitását mutatja be különböző módszerekkel. A vizsgálatok során a virág szignifikánsan jobb antioxidáns kapacitást mutatott ABTS ($p \leq 0,0241$) és Cuprac módszerrel ($p \leq 0,0093$), azonban a DPPH és FRAP módszerekkel nem tapasztalható szignifikáns különbség. A kísérlet során három párhuzamos mérés lett elvégezve.

A **10. táblázat** a növény levelének és virágának teljes polifenol és flavonoid tartalmát -mint két fő antioxidáns komponens- foglalja össze. A levél és a virág polifenol és flavonoid tartalmát T-próbával hasonlítottuk össze, azonban az eredmények nem különböztek szignifikánsan.

9. táblázat. A *P. coronarius* antioxidáns aktivitása. A statisztikai elemzést T-tesztel végeztem. * és ** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0241$ és $p \leq 0,0093$ -nál.

	<i>P. coronarius</i> levél	<i>P. coronarius</i> virág
DPPH (%)	86.63 ± 6.49	92.24 ± 10.09
ABTS (mmol TE/g DW)	18.37 ± 4.73	40.54 ± 9.77 *
FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	77.97 ± 46.01	164.62 ± 52.75
Cuprac ($\mu\text{mol TE/mL}$)	222.42 ± 21.04	423.35 ± 71.07 **

10. táblázat. A *P. coronarius* teljes polifenol és flavonoid tartalma.

	<i>P. coronarius</i> levél	<i>P. coronarius</i> virág
Polifenolok (mg GAE/100 g)	59.31 ± 4.36	54.83 ± 9.74
Flavonoidok (mg QE/100 g)	1.97 ± 1.49	1.91 ± 0.82

5.11. Liofilizátum antimikrobiális hatásának vizsgálata mikrodilúcióval és time-kill módszerrel

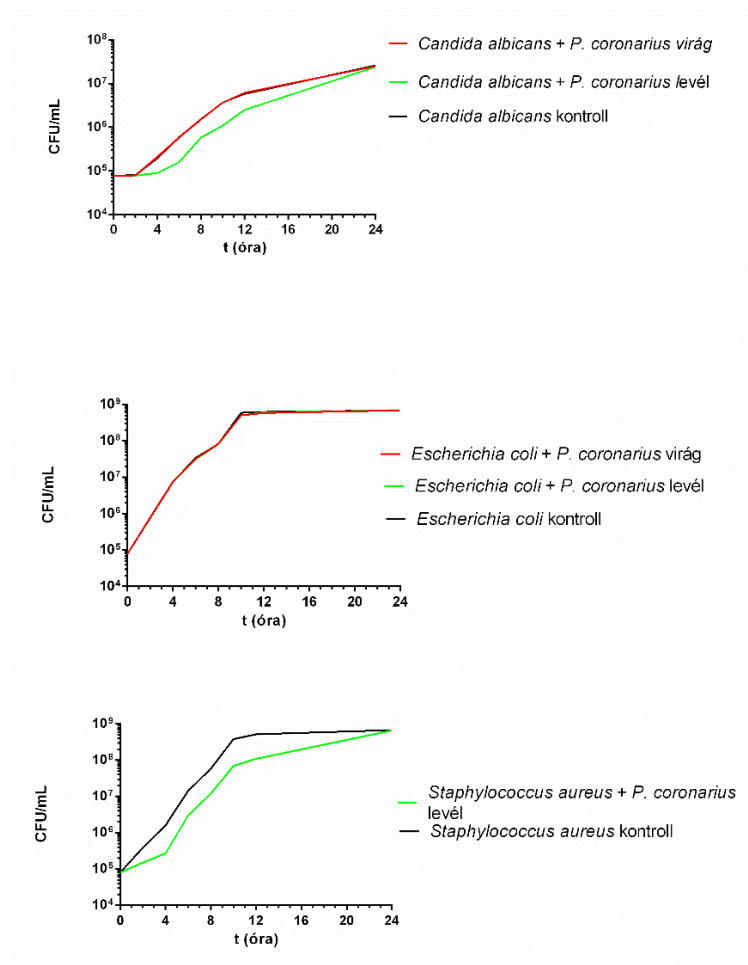
A *P. coronarius* levél és virág antimikrobiális potenciáljának vizsgálatára mikrodilúciós és time-kill módszerrel antimikrobiális vizsgálatokat végeztem.

A mikrodilúciós módszerrel kapott eredményeket a **11. táblázatban** mutatjuk be. A virág képes volt csökkenteni az *E. coli* életképességét 46,4%-ra. A levél esetében a *S. aureus* sejteléképességét 68,6%-ra, az *E. coli* 41,5%-ra csökkentette. Ezekben a kísérletekben sem a *P. coronarius* virága, sem a levele nem gátolta a *C. albicans* vagy a *P. aeruginosa* életképességét.

11. táblázat. A *P. coronarius* antimikrobiális aktivitása mikrodilúciós módszerrel

	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>P. coronarius</i> virág	nem történt gátlás	nem történt gátlás	$46.4\% \pm 3.4\%$	nem történt gátlás
<i>P. coronarius</i> levél	nem történt gátlás	$68.6\% \pm 5.6\%$	$41.5\% \pm 2.7\%$	nem történt gátlás

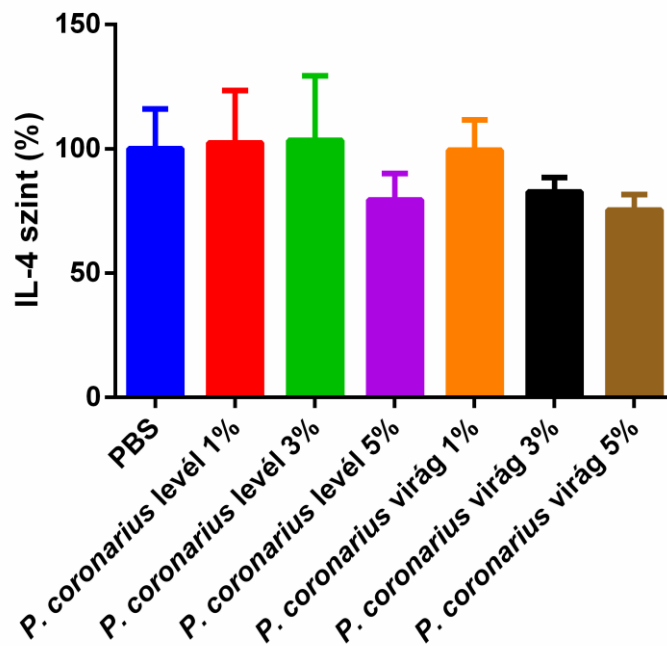
A time-kill módszerrel végzett vizsgálat eredményeit a **21. ábra** foglalja össze. A *C. albicans* és *S. aureus* esetében a *P. coronarius* levél lassította a mikroorganizmusok szaporodását, *E. coli* esetében azonban mind a virág, mind a levél hatástalannak bizonyult. A mintáink ölü aktivitást nem mutattak, csupán korlátozott mértékben tudták lassítani a mikroorganizmusok szaporodását.



21. ábra. A time-kill vizsgálat eredményei. *C. albicans* és *S. aureus* esetében a levél képes volt lassítani a mikróbák szaporodását.

5.12. Liofilizátum gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata

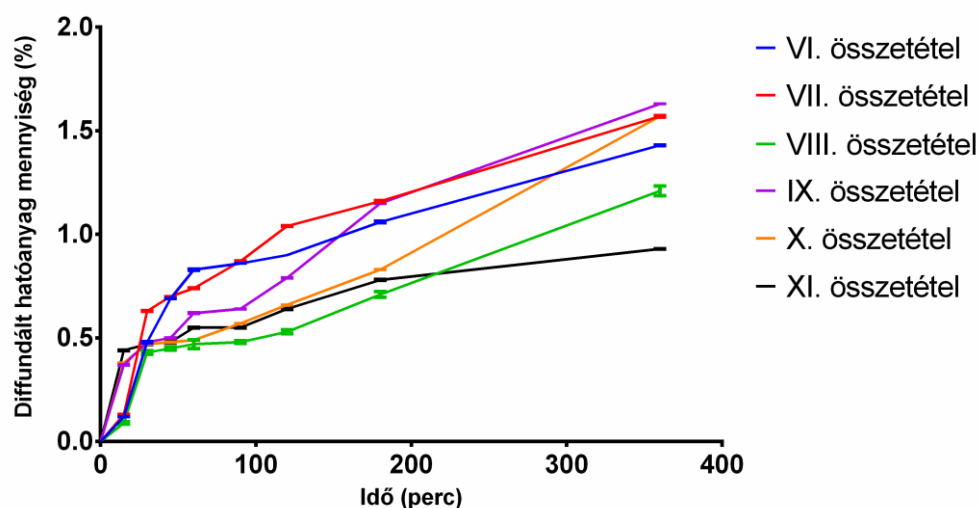
A *P. coronarius* levelének és virágának IL-4-re kifejtett hatását ELISA segítségével vizsgáltam HaCaT sejtvonalon. A vizsgálat során negatív kontrollként PBS-t alkalmaztam, a kiértékelés során a PBS által produkált eredményeket vettem 100%-nak és ehhez hasonlítottam a többi értéket, százalékban kifejezve. A levéllel és virággal történő előkezelés nem csökkentette szignifikánsan a sejtek IL-4 termelését sem 1, sem 3, sem pedig 5% koncentrációban. A vizsgálat eredményei a **22. ábrán** láthatóak.



22. ábra. A *P. coronarius* levél és virág hatása a sejtek IL-4 termelésére. A kísérletet 6 párhuzamos méréssel végeztem el, a statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t és T-próbát alkalmaztam, a csoportok között szignifikáns különbség nem volt kimutatható.

5.13. *In vitro* hatóanyag felszabadulás vizsgálata

A kenőcsökből történő hatóanyag felszabadulást Franz diffúziós cella segítségével vizsgáltam. A kísérletek eredményeit a **23. ábrán** foglaltam össze, mely bemutatja az egységnyi felületre kiszámított hatóanyag diffúziójának értékét százalékban kifejezve, az idő függvényében. A hatóanyag felszabadulási rátát (k), valamint a diffúziós koefficiens (D) értékeket a **12. táblázatban** mutatom be. A *P. coronarius* tartalmú kenőcsök közül a legjobb hatóanyag felszabadulás a Tefose 63 és az SP70 tartalmú készítmények (VII; IX; X.) esetében volt megfigyelhető. A készítményekből történő hatóanyag felszabadulást különbözőség szempontjából is elemeztük. Ennek eredményei a **13. táblázatban** találhatóak összefoglalva. Két formuláció különböző, ha különbözőségi faktoruk (f_1) 0-15 között van. Ez alapján a VI. és VII.; VI. és IX.; VI. és X.; VII. és IX.; VIII. és XI.; IX. és X.; X. és XI. összetételek különbözőek.



23. ábra. A *P. coronarius* tartalmú kenőcsök Franz diffúziós vizsgálata. Az ábrán prezentált eredmények 3 párhuzamos mérés átlagai $\pm$ SD.

12. táblázat. Az egyes összetételekhez kiszámított felszabadulási ráta (k) és diffúziós koefficiens (D) értékek.

Készítmények	Felszabadulási ráta (k) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \sqrt{\text{min}}$)	Diffúziós koefficiens (D) ($D \times 10^{-7}$; cm^2/min)
VI. összetétel	7,47	3,30
VII. összetétel	8,05	3,97
VIII. összetétel	5,31	2,36
IX. összetétel	7,45	4,32
X. összetétel	6,57	3,97
XI. összetétel	5,29	1,40

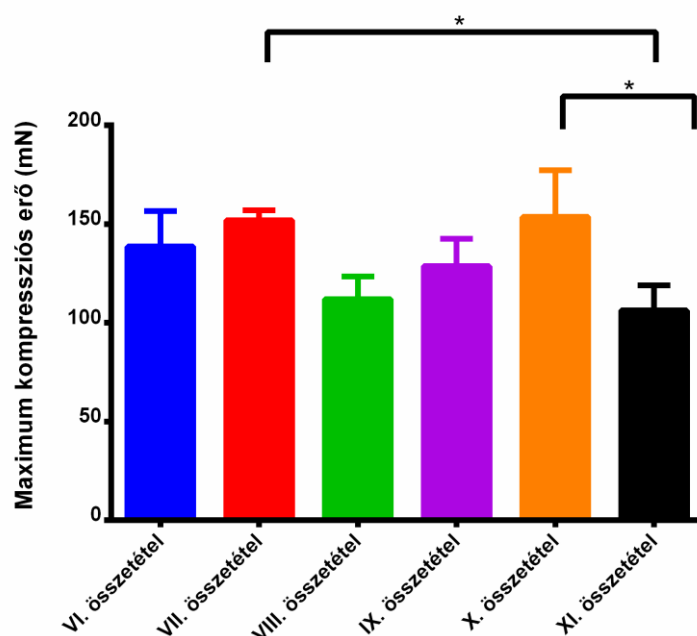
13. táblázat. A *P. coronarius* tartalmú összetételek különbözőségi faktorai.

Készítmények	Különbözőségi faktor (f_1)
VI. vs. VII.	6,87
VI. vs. VIII.	31,40
VI. vs. IX.	2,98
VI. vs. X.	14,44
VI. vs. XI.	24,02
VII. vs. VIII.	36,11
VII. vs. IX.	9,65
VII. vs. X.	20,32

VII. vs. XI.	29,24
VIII. vs. IX.	29,29
VIII. vs. X.	24,71
VIII. vs. XI.	9,71
IX. vs. X.	11,81
IX. vs. XI.	21,68
X. vs. XI.	11,19

5.14. *P. coronarius* tartalmú összetételek textúra analízise

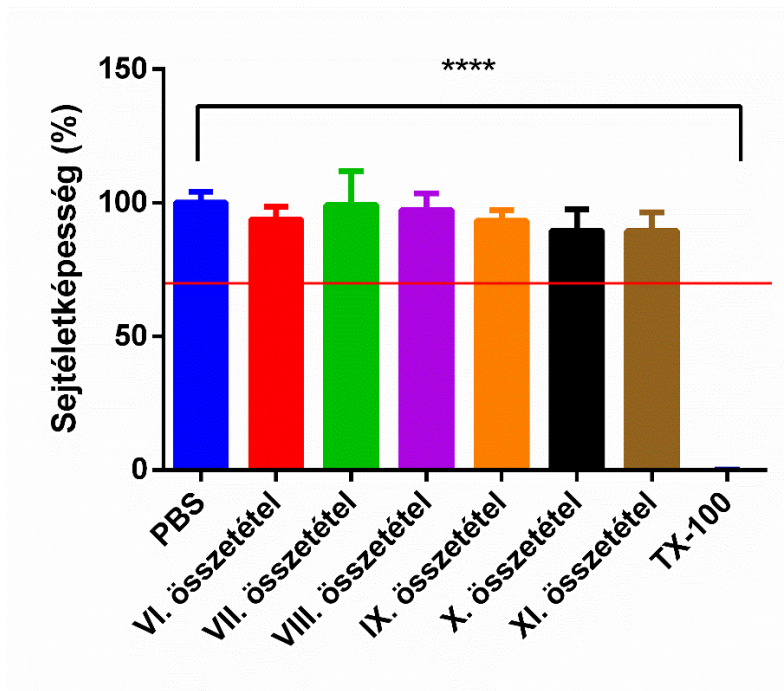
A formulált készítmények textúráját a Brookfield CT3 Textúra Analizáló készülék segítségével vizsgáltam meg. A maximális kompressziós erő, mely ahhoz volt szükséges, hogy a cylinder behatoljon a kenőcsbe a **24. ábrán** látható. A *P. coronarius*-t tartalmazó kenőcsök vizsgálata során a Tefose 63-at tartalmazókhöz (VII; X. összetétel) volt szükség a legnagyobb kompressziós erőre, míg a leglágyabb textúrája a Sedefos 75 tartalmú formulációknak volt (VIII; XI. összetétel).



24. ábra. A *P. coronarius*-t tartalmazó készítmények textúra analízise. Az ábrán prezentált eredmények 3 mérés átlagai $\pm$ SD. A statisztikai elemzés ANOVA és T-próba segítségével történt. * szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,05$ -nél.

5.15. A *P. coronarius* tartalmú kenőcsösszetételek citotoxicitása

A kenőcsök citotoxicitásának vizsgálatához Franz diffúziós cellából, 6 órán át tartó inkubációt követően vettem mintát, ahol a kioldóközeg pH=5,5 kémhatású puffer volt. Az eredmények alapján ebben az esetben is elmondható, hogy a kenőcsök biztonságosan alkalmazhatóak, a sejtleletkéesség 70% fölött van az összes tesztoldat esetében. A legjobb túlélési arányt az SP50 cukorésztert tartalmazó, III. összetétel produkálta. Az eredmények a **25. ábrán** találhatóak összefoglalva.



25. ábra. *P. coronarius* tartalmú kenőcsök MTT tesztje. Az eredmények 6 párhuzamos mérés átlagai $\pm$ SD. Az eredmények összehasonlítását egyutas ANOVA és T-próba segítségével végeztük el. **** szignifikáns különbséget jelöl $p < 0,0001$ -nél.

6. Megbeszélés

6.1. A BGP-15-tel kapcsolatos kísérletek eredményeinek megbeszélése

A BGP-15 gyógyszerjelölt farmakon kivételes tulajdonságai miatt intenzív kutatás tárgyát képezi, azonban a hatóanyaggal kapcsolatos jelenlegi ismereteink hiányosak. A BGP-15 lehetséges gyulladáscsökkentő hatása gyakran tárgyalt felvetés különböző tanulmányokban [67,151], ám mégis alulkutatott terület, csakúgy, mint a hatóanyag lokális alkalmazása. A BGP-15-ből jelenleg nem áll rendelkezésünkre külsőleges gyógyszerforma, holott a hatóanyag különböző indikációkban (pl. fényvédelem, gyulladás) történő helyi alkalmazásában számos lehetőség rejlik [67,69,151].

Kísérletes munkám első szakaszában különböző O/V típusú emulziós kenőcsöket formuláltam BGP-15 felhasználásával, különböző emulgensek és penetrációfokozó segédanyagok inkorporálásával, majd ezeket a készítményeket gyógyszerforma vizsgálatoknak vetettem alá, mint például a textúra analízis és az *in vitro* hatóanyag felszabadulás. A textúra analízis során bebizonyosodott, hogy a készítmények megfelelő konzisztenciával rendelkeznek, a cukorésztereket tartalmazó készítmények keményebb állagúak. Az *in vitro* hatóanyag felszabadulást Franz diffúziós cella segítségével vizsgálatam, majd ennek eredménye alapján került kiválasztásra az a három összetétel (III;IV;V. összetétel) amelyek a legjobb hatóanyag felszabadulási profilt mutatták további kutatások elvégzése céljából.

A fent említett kísérletekkel párhuzamosan a kenőcsök és a kiválasztott segédanyagok biokompatibilitási vizsgálata zajlott. A citotoxicitási vizsgálatokat HaCaT sejtvonalon végeztem el. Az MTT teszt során az összetételekhez kiválasztott segédanyagok az alkalmazott koncentráció tartományban és a formulációk is biztonságosan alkalmazhatóak, jól tolerálhatók voltak.

A BGP-15 kenőcsök gyulladáscsökkentő hatását C57BL/6J egereken vizsgáltam fülödéma teszttel. A kísérlet során az egerek fülén lokális gyulladást indukáltam AITC-oldattal, és a fül vastagságát a kísérlet teljes időtartama alatt monitoroztam. Az egerek fülét a BGP-15 tartalmú kenőcsökkel, hatóanyagmentes kenőcsökkel, illetve BGP-15 vizes oldattal premedikáltam. A kísérlet során a hatóanyagot tartalmazó kenőcsök jelentősen csökkentették vagy megakadályozták a gyulladás kialakulását, míg azokban az esetekben, amikor az állatokat olyan készítményekkel kezeltem, amelyek nem tartalmaztak BGP-15-öt, a gyulladás szinte ugyanolyan mértékben indukálódott, mint amikor a fület csak a pozitív kontrollal (gyulladáskeltő szerrel (AITC)) kezeltem. A legjobb eredményt a IV. összetétel, az SP70-et

tartalmazó formuláció érte el. Ebből arra következtethetünk, hogy a BGP-15 kenőcs formájában az előkezelés során penetrálni tudott az állat bőrébe, megakadályozva a lokális gyulladás kialakulását. Ezzel szemben vizes oldat formájában nem tudott a bőrbe penetrálni, így ott a gyulladás kialakult.

A BGP-15 antioxidáns tulajdonságait - mint a gyulladáscsökkentő hatás lehetséges magyarázatát - HaCaT sejtvonalon végzett SOD-teszttel vizsgáltam. Az eredmények azt mutatják, hogy a hatóanyag nem volt képes megvédeni a sejteket az UV-sugárzás okozta oxidatív stressztől, a SOD enzim szintje ugyanúgy csökkent, mint abban az esetben, amikor a sejtek csupán PBS-sel voltak kezelve. Az antioxidáns tulajdonság vizsgálatát a teljes antioxidáns kapacitás meghatározásával (TAC) is kiegészítettük, de szignifikáns változás nem volt kimutatható egyik összetétel esetében sem. Eredményeink hasonlóak Sümegi és munkatársainak eredményeihez, akik más módszerekkel próbálták vizsgálni a hatóanyag esetleges antioxidáns hatását, de ők is arra a következtetésre jutottak, hogy a hatóanyag, bár gátolja a mitokondriális ROS-termelődést, antioxidáns hatással nem rendelkezik [151].

A BGP-15 gyulladáscsökkentő hatásának másik lehetséges magyarázataként luciferáz vizsgálatot végeztünk. A kísérletben a BGP-15 gyulladáscsökkentő hatását Raw 264.7 sejteken vizsgáltuk. A BGP-15 bármelyik koncentrációjával történő kezelés nem volt képes a makrofágok LPS indukálta NF- κ B választ szignifikánsan mérsékelni vagy gátolni, így feltehetően a hatóanyag a gyulladáscsökkentő hatását más útvonalon fejti ki.

Eredményeink megerősítik azokat a feltételezéseket, melyek szerint a BGP-15 lokálisan alkalmazva gyulladáscsökkentő hatással bír, azonban a hatás pontos mechanizmusa továbbra is tisztázatlan, viszont néhány lehetséges magyarázatot ki tudunk zárni. A szakirodalomban a BGP-15 potenciális gyulladáscsökkentő tulajdonságát a farmakon PARP-gátló hatásának tulajdonítják. A PARP-gátlók képesek megvédeni a sejteket a ROS által kiváltott sérülésektől. A sejtek ROS-termelése gyulladásos folyamatokat képes indukálni [152,153]. Ezen túlmenően a BGP-15 képes megvédeni a mitokondriumokat a ROS által kiváltott károsodásoktól azáltal, hogy csökkenti a mitokondriális ROS-termelést [151]. A BGP-15 képes csökkenteni a mátrix metalloproteináz 9 (MMP9) expresszióját is, ami szintén lehetséges magyarázat lehet. Az MMP9 magas szintje mitokondriális károsodáshoz vezet. A BGP-15 blokkolja a JNK-t is, amely egy gyulladásos citokin [154–156].

A kenőcsök összetétele és a megfelelő penetrációfokozók kiválasztása nemcsak a formulálás, de a penetráció és a biohasznosulás szempontjából is fontos tényező. A kenőcsök összetételének

meghatározásakor igyekeztünk olyan készítményeket létrehozni, amelyek a legmegfelelőbb segédanyagokat tartalmazzák a BGP-15 lehető legjobb biohasznosulásának elérése érdekében. A szakirodalom alapján a cukorészterek (SP50, SP70, PS750) és a Transcutol jó penetrációfokozó tulajdonságuk révén képesek számos hatóanyag hatásának fokozására [37,38]. A Cremophor és származékai azonban nem bizonyultak a legjobb választásnak, Malingré és munkatársai a paclitaxelt vizsgálták, és arra a következtetésre jutottak kísérleteik alapján, hogy a Cremophor használata korlátozta a hatóanyag felszívódását [157]. A mi tapasztalataink hasonlóak voltak, a Franz diffúziós vizsgálatban a II. összetétel (amely Cremophort tartalmaz) produkálta a legrosszabb eredményeket. A Labrasol és az IPM előnyös kombináció lehet, mivel Okur és munkatársai azt találták, hogy növelheti a naproxen permeációs sebességét a bőrön keresztüli gyógyszerbevitelben [158]. Azonban a Labrasol sem bizonyul mindig a megfelelő felületaktív anyagnak. Shafiq és munkatársai tanulmányukban a ramiprilt vizsgálták, és arra a következtetésre jutottak, hogy a Labrasol nem megfelelő felületaktív anyag a gyógyszerfelszívódás fokozására [159]. Esetünkben a cukorészterek és a Transcutol kombinációja bizonyult a legjobb választásnak a Franz-diffúziós eredmények alapján, és ezek a készítmények az állatkísérletben is figyelemre méltó eredményeket értek el.

6.2. A közönséges jezsámmel kapcsolatos kísérletek eredményeinek megbeszélése

Kísérleti munkám második szakaszában a *Philadelphus coronarius* L., magyar nevén közönséges jezsáment, a tudományosan kevésbé tanulmányozott gyógynövényt vizsgáltam. Népgyógyászatban történő alkalmazása során számos jótékony [160] hatását felfedezték, többek között gyulladáscsökkentő [161] és antimikrobiális tulajdonságaira figyeltek fel, gyakran alkalmazták nőgyógyászati kórképek kezelésére [122]. Újdonságként a növény levelét és virágát is felhasználtam kutatásomban, melyekből kivonat készült, majd liofilizált extraktum, melynek lehetséges hatásait vizsgáltam. Mindemellett az antioxidáns kapacitás különböző módszerekkel került tanulmányozásra, és a gyógynövényből különböző kenőcsösszetételeket fejlesztettem.

A természetes eredetű készítmények esetében a meghatározott hatóanyagtartalom, a stabilitás és a könnyű feldolgozhatóság fontos szempont. E célból liofilizált terméket állítottunk elő a kivonatokból, hiszen ebben a formában a hatóanyagok stabilabbak és könnyen feldolgozhatók. A liofilizált extraktumok előállítása a szakirodalom szerint egyedülálló a jezsámen esetében, mivel a legtöbb tanulmány csak a kivonatát vizsgálta [74,122,161], amely tartalmaz szerves oldószert, pl. etanolt, metanolt, ez befolyásolhatja a biztonságosságot és téves következtetésekre vezethet.

Vizsgálatunk részeként a *P. coronarius* levelének és virágának antioxidáns aktivitását, valamint a teljes polifenol- és flavonoid tartalmát is meghatároztuk. A polifenolok fontos metabolitok, erős antioxidánsok, amelyek képesek megvédeni az UV-sugárzástól, és gyulladáscsökkentő hatásuk is van [162,163]. A flavonoidok antimikrobiális hatóanyagként, antioxidánsként ismertek és gyulladáscsökkentő hatással is bírnak [164,165]. A vizsgálatainkban a *P. coronarius* virága szignifikánsan jobb antioxidáns kapacitást mutatott ABTS és CUPRAC vizsgálatokkal, azonban a DPPH és FRAP módszerekkel nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Csak az ABTS és CUPRAC vizsgálat eredményei különböztek szignifikánsan a levél és a virág esetében, ennek fő oka feltehetően az, hogy a virágból több bioaktív komponens volt azonosítható, mint a levélből. A galluszsav és a kvercetin két jól ismert, kiváló és erős antioxidáns vegyület, védelmet nyújtanak az oxidatív stresszel szemben [166–169]. Ez a két vegyület csak a virágban volt kimutatható, ami megmagyarázza a jobb antioxidáns kapacitást. A különböző antioxidáns aktivitást meghatározó módszerek különböző mechanizmusokon alapulnak és eltérő érzékenységgel rendelkeznek [170,171], ami megmagyarázza, hogy miért nem kaptunk szignifikánsan különböző eredményeket a levél és a virág antioxidáns kapacitása között minden módszerrel. Ezért ajánlott az antioxidáns kapacitást különböző módszerekkel vizsgálni.

A szakirodalomban fellelhető információk alapján a *P. coronarius* antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkezik. Egy korábbi tanulmányban mikrodilúciós módszerrel vizsgálták Gram-pozitív és negatív baktériumokra kifejtett hatását. A kivonat erős antibakteriális hatással rendelkezett a vizsgálatban szereplő többi gyógynövény kivonatával összehasonlítva [122]. Kísérletsorozatunkban a liofilizált virág és levél kivonat antibakteriális tulajdonságait vizsgáltuk, kiegészítve antifungális hatásának vizsgálatával. A mikrodilúciós kísérletünkben a virág csökkentette az *E. coli* életképességét, a levél pedig a *S. aureus* és az *E. coli* sejtek életképességét. További, pontosabb információkért az antimikrobiális vizsgálatokat *in vitro* time kill teszttel egészítettük ki, ahol a levél és a virág hatását monitoroztuk a mikrobák növekedésére az időben. A *S. aureus* és a *C. albicans* növekedését a levél késleltette, míg a virág nem eredményezett semmilyen változást. Ezek az eredmények azonban nincsenek összhangban a mikrodilúció során tapasztaltakkal. A két módszer közül a time kill tesztet pontosabbnak tartják, mivel az időt, mint fontos tényezőt is figyelembe veszi a kísérlet során.

A liofilizált kivonatok gyulladáscsökkentő hatását HaCaT sejteken vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy sem a virággal, sem a levéllel történő előkezelés nem csökkentette szignifikánsan az IL-4 szintjét, annak ellenére, hogy a Hydrangeaceae fajok

gyulladáscsökkentő hatását már korábban is tesztelték. Dilshara és munkatársai azt vizsgálták, hogy a *H. macrophylla* levél kivonatának van-e gyulladáscsökkentő hatása [161]. Megfigyelték, hogy a kivonat elnyomta néhány pro-inflammatorikus citokin pl. NO expresszióját. PGE₂, TNF α . Továbbá Nakamura és munkatársai megállapították, hogy a *H. macrophylla* csökkentette az IL-6 mRNS expresszióját [73].

A jól megválasztott segédanyagok a topikális formulációk számos tulajdonságát befolyásolhatják, a biológiai hasznosulás növelésével a készítmény hatását fokozhatják [172,173]. A kenőcs összetételek meghatározásakor a segédanyagokat úgy választottuk ki, hogy a hatóanyagok legjobb potenciális biológiai hasznosulását érjük el. Csizmazia és munkatársai publikációja szerint a cukorészterek, mint például az SP70, képesek fokozni a hatóanyagok pl. az ibuprofén penetrációját és hatását [174].

Hasonló információk lelhetők fel a Tefose 63-mal kapcsolatban is, Abd-Elsalam és munkatársai vizsgálatában a Tefose 63 javította a vorikonazol biológiai hozzáférhetőségét és hatását [44]. Ezt a mi *in vitro* hatóanyag felszabadulási vizsgálataink is megerősítették. A IX. összetétel (SP70) produkálta a legjobb eredményeket, amelyet szorosan követett a VII; X (Tefose 63) és VI. összetétel (SP70). A legalacsonyabb felszabadulási ráta a VIII. és XI. összetételhez (Sedefos 75) tartozik. Azok a készítmények, amelyek emulgensként Tefose 63-at vagy SP70-et tartalmaztak, végül jobb hatóanyag felszabadulási profillal rendelkeztek, ami a hatóanyagok jobb biohasznosulásához vezethet.

A felületaktív anyagok és penetrációfokozók alkalmazása befolyásolhatja a különböző topikális készítmények biokompatibilitását, ezért a készítmény biztonságosságát minden esetben ellenőrizni kell. A citotoxicitási vizsgálatokat MTT teszttel végeztem el. Az eredmények alapján a *P. coronarius* levele és virága, valamint a kenőcs összetételek biztonságosak voltak. A sejtek életképességének értéke minden esetben 70% feletti volt, ami megfelel az ISO 10993-5 ajánlásoknak.

Mind a gyógyszeripari, mind a kozmetikai termékek esetében fontos tényező a beteg compliance. A készítménynek a lehető leginkább beteg barátinak kell lennie, és a készítmény alkalmazásával kapcsolatos kellemetlenségeket minimálisra kell csökkenteni [175,176]. A kenőcsök esetében a textúra fontos tényező a beteg együttműködés, compliance szempontjából. Ezt figyelembe véve O/V emulziós típusú kenőcsöt választottunk gyógyszerformának, mivel ez népszerű és kedvelt a betegek körében a lágyabb konzisztenciája miatt, valamint azért mert felkenés után nem hagy zsíros foltot. A textúra analízis során a VII. és X. összetétel bizonyult

a legkeményebb állagúnak (mindkettő Tefose 63-at tartalmazott), míg a VIII. és XI. összetétel volt a leglágyabb (mindkettő Sedefos 75-öt tartalmazott), de minden összetétel könnyen kenhető és alkalmazható volt.

6.3. Új tudományos eredmények összefoglalása

A kísérletes munkám során elért, új tudományos eredmények:

- A BGP-15-ből O/V típusú emulziós kenőcsöket formuláltam, az összetételek közül a cukorészter tartalmúak bizonyultak hatóanyag leadás szempontjából a legjobbnak, melyet a Franz diffúziós vizsgálat és az állatkísérlet is alátámaszt
- A formuláció során felhasznált segédanyagok citotoxicitásának vizsgálatával igazoltam azok biztonságosságát, mely az ISO 10993-5 ajánlásainak megfelel
- A BGP-15 kenőcsök gyulladáscsökkentő hatását *in vivo* állatkísérletben igazoltam
- A *Philadelphus coronarius* gyógynövény leveléből és virágából liofilezett extraktumot készítettünk, a jobb feldolgozhatóság és stabilitás érdekében, ez egyedülálló a növényvel kapcsolatos szakirodalomban
- A növény levelének és virágának komponenseit azonosítottuk, hatóanyagtartalmát meghatároztuk
- A gyógynövény antioxidáns kapacitását megvizsgáltuk, melynek során kiderült, hogy a virág jobb antioxidáns tulajdonságokkal bír, mint a levél, ezt a CUPRAC és az ABTS antioxidáns teszt is alátámasztja
- A liofilizált extraktumok antimikrobiális hatásának vizsgálata során a levél lassította a *C. albicans* és *S. aureus* szaporodását
- A liofilizált extraktumok felhasználásával O/V típusú emulziós kenőcsök formuláltam, melyek közül a legjobbnak a cukorészter SP70 és a Tefose 63 tartalmú bizonyult, ezt a Franz diffúziós vizsgálat alátámasztja
- A formuláláshoz felhasznált segédanyagok és a készítmények citotoxicitásának vizsgálatával igazoltam azok biztonságosságát, mely megfelel az ISO 10993-5 ajánlásának

7. Összefoglalás

Kísérletes munkám során két, eltérő természetű hatóanyagot választottam kutatásom témájához, egy jelenleg klinikai vizsgálat alatt álló gyógyszerjelölt farmakont, a BGP-15-öt és a gyógynövényt, a tudományos körökben kevésbé vizsgált, ám a népgyógyászatban előszeretettel alkalmazott *Philadelphus coronariust*, a közönséges jezsáment. A kutatásom során mindkét hatóanyagból O/V típusú emulziós kenőcsöket formuláltam és a megfelelő biohasznosulás elérése érdekében különböző emulgenseket és penetrációfokozó segédanyagokat adtam az összetételekhez. A biokompatibilitást, a segédanyagok és a készítmények biztonságos alkalmazhatóságát -mely a megfelelő beteg compliance egyik fontos szempontja- vizsgálva kerültek az kenőcsösszetételek meghatározásra.

A hatóanyagok hatásainak vizsgálatára is nagy hangsúlyt fektettem, hiszen nagy újdonságértékkel bírnak. A BGP-15 hatásai jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezik. A jezsámmal kapcsolatban ugyan a népgyógyászat révén rendelkezésre állnak tapasztalati úton szerzett információk, ám ezek tudományos megalapozottsága sok esetben hiányos.

A BGP-15-tel kapcsolatos kutatásom során a farmakonból kenőcsöket formuláltam, majd ezeket a kenőcsöket különböző vizsgálatoknak vettem alá: textúra analízis, Franz diffúziós vizsgálat. A kenőcsökből több változatot formuláltam az emulgensek változtatásával. A textúra analízis során a legkeményebb konzisztenciát az SP70 tartalmú formuláció mutatta, míg a leglágyabbat a Labrasol tartalmú. A Franz diffúziós vizsgálat során a legjobb hatóanyag felszabadulási profilja a cukorészter tartalmú (SP50, SP70, PS750) készítményeknek volt, így a kutatást ezekkel az összetételekkel folytattam. A biokompatibilitási vizsgálatok a felhasznált segédanyagok és a kenőcsösszetételek biztonságosan alkalmazhatónak bizonyultak. A BGP-15 gyulladáscsökkentő hatását in vivo állatkísérletben igazoltam, melynek során egereken végeztem fülödéma tesztet. A vizsgálat során a BGP-15-öt tartalmazó kenőcsök szignifikánsan csökkentették a fülvastagságot, azaz gátolták lokális gyulladás kialakulását. A farmakon hatásmechanizmusára vonatkozóan luciferáz vizsgálatot végeztünk, melynek eredménye arra engedett következtetni, hogy a BGP-15 nem gátolja az NF- κ B útvonalat, más módon fejti ki hatását. Az antioxidáns vizsgálatok során a BGP-15 nem mutatott antioxidáns tulajdonságokat.

A *Philadelphus coronariussal* kapcsolatos kísérleteim során a növény leveléből és virágából kivonat, majd liofilezett termék került előállításra. A kivonatok komponenseit azonosítottuk, a hatóanyagtartalmat meghatároztuk. Az antioxidáns kapacitást több teszttel is vizsgáltuk, melynek során igazoltuk, hogy a gyógynövény virága jobb antioxidáns aktivitással bír, mint a

levele. Az antimikrobiális vizsgálatban bizonyítottuk, hogy a liofilizált levél extraktum a *C. albicans* és a *S. aureus* szaporodását lassította. Az ELISA teszt során sem a levél, sem a virág nem csökkentette a gyulladt sejtek IL-4 expresszióját, így a gyulladáscsökkentő hatást kizártuk. A liofilizált extraktumok felhasználásával különböző O/V típusú emulziós kenőcsöket formuláltam és gyógyszerforma vizsgálatokat végeztem. A textúra analízis során a legkeményebb konzisztenciája a Tefose 63-at, míg a leglágyabb textúrája a Sedefos 75 tartalmú formulációknak volt. A Franz diffúziós vizsgálat során a legjobb hatóanyag felszabadulási profilja az SP70 és Tefose 63 tartalmú készítményeknek volt. A biokompatibilitási vizsgálatok során a felhasznált segédanyagok és a kenőcsösszetételek biztonságosan alkalmazhatónak bizonyultak.

8. Summary

In my experimental work two active substances were selected, a drug candidate pharmacon, BGP-15, currently under clinical trial and *Philadelphus coronarius* L., a popular and widespread, but scientifically less-investigated herb.

In my research, O/W emulsion ointments were formulated from both active ingredients and different emulsifiers and penetration enhancer excipients were added to the formulations to achieve proper bioavailability. The ointment compositions were formulated to assess biocompatibility, excipients and safe administration of the formulations, which is an important aspect of adequate patient compliance.

The effects of the active ingredients were in the focus as well as they have a high novelty value. The effects of BGP-15 are currently the subject of intensive researches. Although empirical information about *P. coronarius* is available based on folk medicine, the scientific base is often incomplete.

In my research with BGP-15, ointments were formulated from the pharmacon and subjected these ointments to various tests: texture analysis, Franz diffusion study. Several versions of the ointments were prepared by changing the emulsifiers. In the texture analysis, the formulation containing SP70 had the hardest consistency, while the one containing Labrasol had the softest consistency. In Franz diffusion study, the formulations containing sucrose esters (SP50, SP70, PS750) had the best drug release profile, so the research was continued with these formulations. The biocompatibility studies showed that the excipients and the ointment compositions were safe and well-tolerated. Anti-inflammatory effect of BGP-15 was tested *in vivo* in animal studies using mice in ear oedema test. In this study, those ointments, which contained BGP-15 significantly reduced ear thickness, thus inhibited the development of local inflammation. Luciferase assay was performed to investigate the mechanism of action of the pharmacon, the results suggested that BGP-15 does not inhibit the NF- κ B pathway. In antioxidant assays, BGP-15 did not show antioxidant properties.

In my experiments with *Philadelphus coronarius*, an extract of the leaves and flowers of the plant was prepared, followed by a lyophilization to gain a solid, stable, water soluble product. The constituents of the extracts were identified and the bioactive compound content was determined. The antioxidant capacity was tested by several assays, demonstrating that the flower of the herb has better antioxidant activity than the leaf. In the antimicrobial assay, it was demonstrated that the lyophilized leaf extract inhibited the growth of *C. albicans* and *S. aureus*.

In the ELISA test, neither the leaf nor the flower reduced IL-4 expression in inflamed cells, so an anti-inflammatory effect of the herb was excluded.

Using the lyophilized extracts, different O/V type emulsion ointments were formulated and dosage form studies were performed. In the texture analysis, those formulations, which contained Tefose 63 had the hardest consistency and those ones, which contained Sedefos 75 had the softest texture. In the Franz diffusion study, the formulations containing SP70 and Tefose 63 had the best drug release profile. In biocompatibility studies, the excipients and the ointment compositions were safe and well-tolerated by the cells.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az értekezéshez felhasznált irodalmi hivatkozások

1. Saewan, N.; Jimtaisong, A. Natural Products as Photoprotection. *J. Cosmet. Dermatol.* **2015**, *14*, 47–63, doi:10.1111/jocd.12123.
2. Winkelman, W.J. Aromatherapy, Botanicals, and Essential Oils in Acne. *Clin. Dermatol.* **2018**, *36*, 299–305, doi:10.1016/j.clindermatol.2018.03.004.
3. Meier, B.P.; Dillard, A.J.; Osorio, E.; Lappas, C.M. A Behavioral Confirmation and Reduction of the Natural versus Synthetic Drug Bias. *Med. Decis. Mak.* **2019**, *39*, 360–370, doi:10.1177/0272989X19838527.
4. Li, L.; Wang, L.; Fan, W.; Jiang, Y.; Zhang, C.; Li, J.; Peng, W.; Wu, C. The Application of Fermentation Technology in Traditional Chinese Medicine: A Review. *Am. J. Chin. Med.* **2020**, *48*, 899–921, doi:10.1142/S0192415X20500433.
5. Chen, L.; Wang, D.; Lv, D.; Wang, X.; Liu, Y.; Chen, X.; Zhang, H.; Zhu, Z.; Hong, Z.; Cao, Y.; et al. Identification of Eupatilin and Ginkgolide B as P38 Ligands from Medicinal Herbs by Surface Plasmon Resonance Biosensor-Based Active Ingredients Recognition System. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *171*, 35–42, doi:10.1016/j.jpba.2019.03.029.
6. Mansinho, A.; Boni, V.; Miguel, M.; Calvo, E. New Designs in Early Clinical Drug Development. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1460–1465, doi:10.1093/annonc/mdz191.
7. Berdigaliyev, N.; Aljofan, M. An Overview of Drug Discovery and Development. *Future Med. Chem.* **2020**, *12*, 939–947, doi:10.4155/fmc-2019-0307.
8. Dave, K.; Krishna Venuganti, V.V. Dendritic Polymers for Dermal Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **2017**, *8*, 1077–1096, doi:10.4155/tde-2017-0091.
9. Seah, B.C.-Q.; Teo, B.M. Recent Advances in Ultrasound-Based Transdermal Drug Delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *Volume 13*, 7749–7763, doi:10.2147/IJN.S174759.
10. Kakadia, P.; Conway, B. Lipid Nanoparticles for Dermal Drug Delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 2823–2829, doi:10.2174/1381612821666150428143730.
11. Szabó-Révész, P. *Gyógyszertechnológia*; 2009; 237-249. oldal és 409-414. oldal

12. Benson, H.A.E.; Grice, J.E.; Mohammed, Y.; Namjoshi, S.; Roberts, M.S. Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies. *Curr. Drug Deliv.* **2019**, *16*, 444–460, doi:10.2174/1567201816666190201143457.
13. Rácz, I; Selmeczi.B. *Gyógyszertechnológia 3.*; Medicina, 2000; ISBN 9632415456. 279-341. oldal
14. Li, B.S.; Cary, J.H.; Maibach, H.I. Stratum Corneum Substantivity: Drug Development Implications. *Arch. Dermatol. Res.* 2018, *310*, 537–549.
15. Chandrashekar, N.; Shobha Rani, R. Physicochemical and Pharmacokinetic Parameters in Drug Selection and Loading for Transdermal Drug Delivery. *Indian J. Pharm. Sci.* **2008**, *70*, 94, doi:10.4103/0250-474X.40340.
16. Lalani, R.; Misra, A.; Amrutiya, J.; Patel, H.; Bhatt, P.; Patel, V. Challenges in Dermal Delivery of Therapeutic Antimicrobial Protein and Peptides. *Curr. Drug Metab.* **2017**, *18*, 426–436, doi:10.2174/1389200218666170222151217.
17. Leone, M.; Mönkäre, J.; Bouwstra, J.A.; Kersten, G. Dissolving Microneedle Patches for Dermal Vaccination. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 2223–2240, doi:10.1007/s11095-017-2223-2.
18. Farley, A.; McLafferty, E.; Hendry, C. The Anatomy and Physiology of the Locomotor System. *Nurs. Stand.* **2012**, *27*, 35–43, doi:10.7748/ns2012.10.27.7.35.c9358.
19. Elias, P.M.; Choi, E.H. Interactions among Stratum Corneum Defensive Functions. *Exp. Dermatol.* **2005**, *14*, 719–726, doi:10.1111/j.1600-0625.2005.00363.x.
20. Madison, K.C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121*, 231–241, doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x.
21. Baroni, A.; Buommino, E.; De Gregorio, V.; Ruocco, E.; Ruocco, V.; Wolf, R. Structure and Function of the Epidermis Related to Barrier Properties. *Clin. Dermatol.* 2012, *30*, 257–262.
22. Coderch, L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J.L. Ceramides and Skin Function. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2003**, *4*, 107–129, doi:10.2165/00128071-200304020-00004.
23. Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.-M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 1063–1072, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.

24. Bouwstra, J. Structure of the Skin Barrier and Its Modulation by Vesicular Formulations. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 1–36, doi:10.1016/S0163-7827(02)00028-0.
25. Lane, M.E. Skin Penetration Enhancers. *Int. J. Pharm.* 2013, *447*, 12–21.
26. Williams, A.C.; Barry, B.W. Penetration Enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 603–618, doi:10.1016/j.addr.2003.10.025.
27. Kováčik, A.; Kopečná, M.; Vávrová, K. Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery: Benefits and Limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 145–155, doi:10.1080/17425247.2020.1713087.
28. Nokhodchi, A.; Shokri, J.; Dashbolaghi, A.; Hassan-Zadeh, D.; Ghafourian, T.; Barzegar-Jalali, M. *The Enhancement Effect of Surfactants on the Penetration of Lorazepam through Rat Skin*; 2003; Vol. 250;.
29. Mathur, V.; Satrawala, Y.; Rajput, M.S. Physical and Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery System. *Asian J. Pharm.* **2010**, *4*, 173–183, doi:10.4103/0973-8398.72115.
30. Ranneh, A.H.; Iwao, Y.; Noguchi, S.; Oka, T.; Itai, S. The Use of Surfactants to Enhance the Solubility and Stability of the Water-Insoluble Anticancer Drug SN38 into Liquid Crystalline Phase Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 501–505, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.10.058.
31. Som, I.; Bhatia, K.; Yasir, M. Status of Surfactants as Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2012**, *4*, 2–9, doi:10.4103/0975-7406.92724.
32. Propilén-Glikol:
<https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/propyleneglycol760957556>. Letöltés: 2022. 07. 30. 15:43
33. Izopropil-Mirisztát: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopropyl-myristate>. Letöltés: 2022. 07. 30. 15:51
34. Arellano, A.; Santoyo, S.; Martín, C.; Ygartuá-departamento, P. *Influence of Propylene Glycol and Isopropyl Myristate on the in Vitro Percutaneous Penetration of Diclofenac Sodium from Carbopol Gels*; 1998; Vol. 7;.

35. Sucrose Esters: <https://www.sisterna.com/personal-care/>. Letöltés: 2022. 08. 03. 14:58.
36. Transcutol. <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/transcutol-hp>.
Letöltés: 2022. 08. 03. 15:02.
37. Csizmazia, E.; Erős, G.; Berkesi, O.; Berk, S.; Szab-Révész, P.; Csnyi, E. Ibuprofen Penetration Enhance by Sucrose Ester Examined by ATR-FTIR in Vivo. *Pharm. Dev. Technol.* **2012**, *17*, 125–128, doi:10.3109/10837450.2010.508076.
38. D'Arpino, S.; Corbrion-Archer, V.; Marty, J.P.; Lantieri, L.; Vincent, C.M.; Astier, A.; Paul, M. Influence of Vehicles on the in Vitro Percutaneous Absorption of Piroxicam to Optimise the Formulation of Patch Tests in Dermatology. *Drug Dev. Res.* **2003**, *58*, 283–290, doi:10.1002/ddr.10164.
39. Fernandez, P.; Willenbacher, N.; Frechen, T.; Kühnle, A. Vesicles as Rheology Modifier. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, *262*, 204–210, doi:10.1016/j.colsurfa.2005.04.033.
40. Srirod, S.; Tewtrakul, S. Anti-Inflammatory and Wound Healing Effects of Cream Containing Curcuma Mangga Extract. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *238*, doi:10.1016/j.jep.2019.111828.
41. Labrasol: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/labrasol>. Letöltés: 2022. 07. 31. 16:34.
42. Karataş, A.; Yüksel, N.; Baykara, T. Improved Solubility and Dissolution Rate of Piroxicam Using Gelucire 44/14 and Labrasol. *Farmaco* **2005**, *60*, 777–782, doi:10.1016/j.farmac.2005.04.014.
43. Tefose 63: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/tefose-63>. Letöltés: 2022. 08. 01. 10:53.
44. Abd-Elsalam, W.H.; Nagy, Y.I.; Abouelatta, S.M. Tailoring Thixotropic Mixed-Lipid Nanoconstructs of Voriconazole for the Management of Vulvovaginal Candidiasis: Formulation, Statistical Optimization, in Vitro Characterization and in Vivo Assessment. *Drug Deliv.* **2021**, *28*, 1877–1889, doi:10.1080/10717544.2021.1974608.
45. Sedefos 75: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/sedefos-75>.
Letöltés: 2022. 08.03. 16:23.

46. Jurca, T.; Pallag, A.; Vicaş, L.; Marian, E.; Mureşan, M.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Bácskay, I. Formulation and Antioxidant Investigation of Creams Containing Robiniae Pseudacaciae Flos l. Ethanolic Extract. *Farmacia* **2021**, *69*, 697–704, doi:10.31925/farmacia.2021.4.9.
47. Literáti-Nagy, B.; Kulcsár, E.; Literáti-Nagy, Z.; Buday, B.; Péterfai, E.; Horváth, T.; Tory, K.; Kolonics, A.; Fleming, A.; Mandl, J.; et al. Improvement of Insulin Sensitivity by a Novel Drug, BGP-15, in Insulin-Resistant Patients: A Proof of Concept Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Horm. Metab. Res.* **2009**, *41*, 374–380, doi:10.1055/s-0028-1128142.
48. Bárdos, G.; Móricz, K.; Jaszlits, L.; Rabloczky, G.; Tory, K.; Rácz, I.; Bernáth, S.; Sümegi, B.; Farkas, B.; Literáti-Nagy, B.; et al. BGP-15, a Hydroximic Acid Derivative, Protects against Cisplatin- or Taxol-Induced Peripheral Neuropathy in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *190*, 9–16, doi:10.1016/S0041-008X(03)00155-8.
49. Chung, J.; Nguyen, A.K.; Henstridge, D.C.; Holmes, A.G.; Chan, M.H.S.; Mesa, J.L.; Lancaster, G.I.; Southgate, R.J.; Bruce, C.R.; Duffy, S.J.; et al. HSP72 Protects against Obesity-Induced Insulin Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 1739–1744, doi:10.1073/pnas.0705799105.
50. Literati-Nagy, Z.; Tory, K.; Literáti-Nagy, B.; Bajza, Á.; Vígh, L.; Vígh, L.; Mandl, J.; Szilvássy, Z. Synergetic Insulin Sensitizing Effect of Rimonabant and BGP-15 in Zucker-Obes Rats. *Pathol. Oncol. Res.* **2013**, *19*, 571–575, doi:10.1007/s12253-013-9620-6.
51. Sarszegi, Z.; Bogнар, E.; Gaszner, B.; Kónyi, A.; Gallyas, F.; Sumegi, B.; Berente, Z. BGP-15, a PARP-Inhibitor, Prevents Imatinib-Induced Cardiotoxicity by Activating Akt and Suppressing JNK and P38 MAP Kinases. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *365*, 129–137, doi:10.1007/s11010-012-1252-8.
52. Brykczynska, U.; Geigges, M.; Wiedemann, S.J.; Dror, E.; Böni-Schnetzler, M.; Hess, C.; Donath, M.Y.; Paro, R. Distinct Transcriptional Responses across Tissue-Resident Macrophages to Short-Term and Long-Term Metabolic Challenge. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 1627-1643.e7, doi:10.1016/j.celrep.2020.01.005.
53. Horvath, O.; Ordog, K.; Bruszt, K.; Deres, L.; Gallyas, F.; Sumegi, B.; Toth, K.; Halmosi, R. BGP-15 Protects against Heart Failure by Enhanced Mitochondrial

- Biogenesis and Decreased Fibrotic Remodelling in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 2021, 1–13, doi:10.1155/2021/1250858.
54. Bombicz, M.; Priksz, D.; Gesztelyi, R.; Kiss, R.; Hollos, N.; Varga, B.; Nemeth, J.; Toth, A.; Papp, Z.; Szilvassy, Z.; et al. The Drug Candidate BGP-15 Delays the Onset of Diastolic Dysfunction in the Goto-Kakizaki Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. *Molecules* **2019**, 24, 586, doi:10.3390/molecules24030586.
 55. Sapra, G.; Tham, Y.K.; Cemerlang, N.; Matsumoto, A.; Kiriazis, H.; Bernardo, B.C.; Henstridge, D.C.; Ooi, J.Y.Y.; Pretorius, L.; Boey, E.J.H.; et al. The Small-Molecule BGP-15 Protects against Heart Failure and Atrial Fibrillation in Mice. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 5705, doi:10.1038/ncomms6705.
 56. Lampé, N.; Priksz, D.; Erdei, T.; Bombicz, M.; Kiss, R.; Varga, B.; Zsuga, J.; Szerafin, T.; Csanádi, Z.; Balla, G.; et al. Negative Inotropic Effect of BGP-15 on the Human Right Atrial Myocardium. *J. Clin. Med.* **2020**, 9, 1434, doi:10.3390/jcm9051434.
 57. Gehrig, S.M.; van der Poel, C.; Sayer, T.A.; Schertzer, J.D.; Henstridge, D.C.; Church, J.E.; Lamon, S.; Russell, A.P.; Davies, K.E.; Febbraio, M.A.; et al. Hsp72 Preserves Muscle Function and Slows Progression of Severe Muscular Dystrophy. *Nature* **2012**, 484, 394–398, doi:10.1038/nature10980.
 58. Kennedy, T.L.; Swiderski, K.; Murphy, K.T.; Gehrig, S.M.; Curl, C.L.; Chandramouli, C.; Febbraio, M.A.; Delbridge, L.M.D.; Koopman, R.; Lynch, G.S. BGP-15 Improves Aspects of the Dystrophic Pathology in Mdx and Dko Mice with Differing Efficacies in Heart and Skeletal Muscle. *Am. J. Pathol.* **2016**, 186, 3246–3260, doi:10.1016/j.ajpath.2016.08.008.
 59. Takahashi, N.; Harada, M.; Hirota, Y.; Nose, E.; Azhary, J.M.; Koike, H.; Kunitomi, C.; Yoshino, O.; Izumi, G.; Hirata, T.; et al. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 10824, doi:10.1038/s41598-017-11252-7.
 60. Eroglu, B.; Kimbler, D.E.; Pang, J.; Choi, J.; Moskophidis, D.; Yanasak, N.; Dhandapani, K.M.; Mivechi, N.F. Therapeutic Inducers of the HSP70/HSP110 Protect Mice against Traumatic Brain Injury. *J. Neurochem.* **2014**, 130, 626–641, doi:10.1111/jnc.12781.
 61. Pető, Á.; Kósa, D.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Sinka, D.; Vecsernyés, M.; Szilvássy, Z.;

- Juhász, B.; Csanádi, Z.; Vigh, L.; et al. Pharmacological Overview of the BGP-15 Chemical Agent as a New Drug Candidate for the Treatment of Symptoms of Metabolic Syndrome. *Molecules* **2020**, *25*, 429, doi:10.3390/molecules25020429.
62. Literáti-Nagy, B.; Péterfai, É.; Kulcsár, E.; Literáti-Nagy, Z.; Buday, B.; Tory, K.; Mandl, J.; Sümegi, B.; Fleming, A.; Roth, J.; et al. Beneficial Effect of the Insulin Sensitizer (HSP Inducer) BGP-15 on Olanzapine-Induced Metabolic Disorders. *Brain Res. Bull.* **2010**, *83*, 340–344, doi:10.1016/j.brainresbull.2010.09.005.
 63. Literáti-Nagy, B.; Kulcsár, E.; Literáti-Nagy, Z.; Buday, B.; Péterfai, É.; Horváth, T.; Tory, K.; Kolonics, A.; Fleming, A.; Mandl, J.; et al. Improvement of Insulin Sensitivity by a Novel Drug, BGP-15, in Insulin-Resistant Patients: A Proof of Concept Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Horm. Metab. Res.* **2009**, *41*, 374–380, doi:10.1055/s-0028-1128142.
 64. Szabados, E.; Literati-Nagy, P.; Farkas, B.; Sumegi, B. BGP-15, a Nicotinic Amidoxime Derivate Protecting Heart from Ischemia Reperfusion Injury through Modulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 937–945, doi:10.1016/S0006-2952(99)00418-9.
 65. Escribá, P. V.; Busquets, X.; Inokuchi, J.; Balogh, G.; Török, Z.; Horváth, I.; Harwood, J.L.; Vigh, L. Membrane Lipid Therapy: Modulation of the Cell Membrane Composition and Structure as a Molecular Base for Drug Discovery and New Disease Treatment. *Prog. Lipid Res.* **2015**, *59*, 38–53, doi:10.1016/j.plipres.2015.04.003.
 66. Gungor, B.; Vanharanta, L.; Hölttä-Vuori, M.; Pirhonen, J.; Petersen, N.H.T.; Gramolelli, S.; Ojala, P.M.; Kirkegaard, T.; Ikonen, E. HSP70 Induces Liver X Receptor Pathway Activation and Cholesterol Reduction in Vitro and in Vivo. *Mol. Metab.* **2019**, *28*, 135–143, doi:10.1016/j.molmet.2019.07.005.
 67. Crul, T.; Toth, N.; Piotto, S.; Literati-Nagy, P.; Tory, K.; Haldimann, P.; Kalmar, B.; Greensmith, L.; Torok, Z.; Balogh, G.; et al. *Hydroxamic Acid Derivatives: Pleiotropic Hsp Co-Inducers Restoring Homeostasis and Robustness*; 2013; Vol. 19;.
 68. Hooper, P.L.; Balogh, G.; Rivas, E.; Kavanagh, K.; Vigh, L. The Importance of the Cellular Stress Response in the Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell Stress Chaperones* **2014**, *19*, 447–464, doi:10.1007/s12192-014-0493-8.
 69. Farkas, B.; Magyarlaki, M.; Csete, B.; Nemeth, J.; Rabloczky, G.; Bernath, S.; Literáti

- Nagy, P.; Sümegi, B. Reduction of Acute Photodamage in Skin by Topical Application of a Novel PARP Inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 921–932, doi:10.1016/S0006-2952(01)00929-7.
70. Hufford, L. Hydrangeaceae. **2004**, *38*, 202–215, doi:10.1007/978-3-662-07257-8_22.
 71. Myung, D.-B.; Lee, J.-H.; Han, H.-S.; Lee, K.-Y.; Ahn, H.S.; Shin, Y.-K.; Song, E.; Kim, B.-H.; Lee, K.H.; Lee, S.H.; et al. Oral Intake of Hydrangea Serrata (Thunb.) Ser. Leaves Extract Improves Wrinkles, Hydration, Elasticity, Texture, and Roughness in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients* **2020**, *12*, 1588, doi:10.3390/nu12061588.
 72. Shi, J.; Li, C.J.; Yang, J.Z.; Ma, J.; Li, Y.; Chen, H.; Zhang, D.M. Monoterpenes from the Leaves of Hydrangea Paniculata and Their Hepatoprotective Activities. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2015**, *17*, 512–518, doi:10.1080/10286020.2015.1042871.
 73. Nakamura, S.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Search for Antidiabetic Constituents of Medicinal Food. *Yakugaku Zasshi* **2011**, *131*, 909–915, doi:10.1248/yakushi.131.909.
 74. Klečáková, J.; Chobot, V.; Jahodár, L.; Laakso, I.; Víchová, P. Antiradical Activity of Petals of Philadelphus Coronarius L. *Cent. Eur. J. Public Health* **2004**, *12 Suppl*, S39–40.
 75. Egészségtér.hu: <https://egeszsegter.hu/cikk/1453/a-jezsamen-nem-jazmin#gsc.tab=0>. Letöltés: 2022. 07.13. 20:42.
 76. Horváth, S. Cytotoxicity of Drugs and Diverse Chemical Agents to Cell Cultures. *Toxicology* **1980**, *16*, 59–66, doi:10.1016/0300-483X(80)90110-9.
 77. Williams, D.F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941–2953, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
 78. Pizzoferrato, A.; Ciapetti, G.; Stea, S.; Cenni, E.; Arciola, C.R.; Granchi, D.; Lucia Cell Culture Methods for Testing Biocompatibility. *Clin. Mater.* **1994**, *15*, 173–190, doi:10.1016/0267-6605(94)90081-7.
 79. Iso.org: <https://www.iso.org/conformity-assessment.html>. Letöltés: 2022. 07.27. 12:52.
 80. Bácskay, I.; Nemes, D.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Vasvári, G.; Fehér, P.; Vecsernyés, M.; Ujhelyi, Z. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. In

Cytotoxicity; InTech, 2018.

81. KASUGAI, S.; HASEGAWA, N.; OGURA, H. A Simple in Vito Cytotoxicity Test Using the MTT (3-(4,5)-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) Colorimetric Assay: Analysis of Eugenol Toxicity on Dental Pulp Cells (RPC-C2A). *Jpn. J. Pharmacol.* **1990**, 52, 95–100, doi:10.1254/jjp.52.95.
82. Gonzalez, R.; Tarloff, J.. Evaluation of Hepatic Subcellular Fractions for Alamar Blue and MTT Reductase Activity. *Toxicol. Vitro.* **2001**, 15, 257–259, doi:10.1016/S0887-2333(01)00014-5.
83. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
84. Buranaamnuay, K. The MTT Assay Application to Measure the Viability of Spermatozoa: A Variety of the Assay Protocols. *Open Vet. J.* **2021**, 11, 251, doi:10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9.
85. Berridge, M. V.; Herst, P.M.; Tan, A.S. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. In; 2005; pp. 127–152.
86. Wang, P.; Henning, S.M.; Heber, D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS One* **2010**, 5, e10202, doi:10.1371/journal.pone.0010202.
87. Allen, M.; Millett, P.; Dawes, E.; Rushton, N. Lactate Dehydrogenase Activity as a Rapid and Sensitive Test for the Quantification of Cell Numbers in Vitro. *Clin. Mater.* **1994**, 16, 189–194, doi:10.1016/0267-6605(94)90116-3.
88. Smith, S.M.; Wunder, M.B.; Norris, D.A.; Shellman, Y.G. A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time. *PLoS One* **2011**, 6, e26908, doi:10.1371/journal.pone.0026908.
89. Cavanaugh, P.F.; Moskwa, P.S.; Donish, W.H.; Pera, P.J.; Richardson, D.; Andrese, A.P. A Semi-Automated Neutral Red Based Chemosensitivity Assay for Drug Screening. *Invest. New Drugs* **1990**, 8, 347–354, doi:10.1007/BF00198590.
90. Zhang, S.-Z.; Lipsky, M.; Trump, B.; Hsu, I.-C. Neutral Red (NR) Assay for Cell

- Viability and Xenobiotic-Induced Cytotoxicity in Primary Cultures of Human and Rat Hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* **1990**, 6, doi:10.1007/BF00249595.
91. Wilson, V.G. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. In; 2013; pp. 33–41.
 92. Micallef, L.; Belaubre, F.; Pinon, A.; Jayat-Vignoles, C.; Delage, C.; Charveron, M.; Simon, A. Effects of Extracellular Calcium on the Growth-Differentiation Switch in Immortalized Keratinocyte HaCaT Cells Compared with Normal Human Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2009**, 18, 143–151, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x.
 93. Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N.E. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J. Cell Biol.* **1988**, 106, 761–771, doi:10.1083/jcb.106.3.761.
 94. Colombo, I.; Sangiovanni, E.; Maggio, R.; Mattozzi, C.; Zava, S.; Corbett, Y.; Fumagalli, M.; Carlino, C.; Corsetto, P.A.; Scaccabarozzi, D.; et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* **2017**, 2017, 1–12, doi:10.1155/2017/7435621.
 95. Verma, R.; Hansch, C. Chemical Toxicity on HeLa Cells. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 423–448, doi:10.2174/092986706775527910.
 96. Lea, T. Caco-2 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 103–111.
 97. Mustafa, A.; Eser, A.; Aksu, A.C.; Kiraz, A.; Tanyeri, M.; Erten, A.; Yalcin, O. A Micropillar-Based Microfluidic Viscometer for Newtonian and Non-Newtonian Fluids. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1135, 107–115, doi:10.1016/j.aca.2020.07.039.
 98. Bogdan, C.; Moldovan, M.L.; Man, I.M.; Crişan, M. Preliminary Study on the Development of an Antistretch Marks Water-in-Oil Cream: Ultrasound Assessment, Texture Analysis, and Sensory Analysis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2016**, 9, 249–255, doi:10.2147/CCID.S107298.
 99. Goanta, V. Extensometer for Determining Strains on a Tensile and Torsion Simultaneous Load. *Sensors* **2020**, 20, 385, doi:10.3390/s20020385.

100. Marty, J.; Lafforgue, C.; Grossiord, J.; Soto, P. Rheological Properties of Three Different Vitamin D Ointments and Their Clinical Perception by Patients with Mild to Moderate Psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2005**, *19*, 7–10, doi:10.1111/j.1468-3083.2005.01330.x.
101. Abd, E.; Gomes, J.; Sales, C.C.; Yousef, S.; Forouz, F.; Telaprolu, K.C.; Roberts, M.S.; Grice, J.E.; Lopes, P.S.; Leite-Silva, V.R.; et al. Deformable Liposomes as Enhancer of Caffeine Penetration through Human Skin in a Franz Diffusion Cell Test. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2021**, *43*, 1–10, doi:10.1111/ics.12659.
102. Sil, B.C.; Alvarez, M.P.; Zhang, Y.; Kung, C.-P.; Hossain, M.; Iliopoulos, F.; Luo, L.; Crowther, J.M.; Moore, D.J.; Hadgraft, J.; et al. 3D-Printed Franz Type Diffusion Cells. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2018**, *40*, 604–609, doi:10.1111/ics.12504.
103. Csizmazia, Eszter, Berkó, Szilvia, Maroda, Mónika, Szabóné Révész, Piroska, Csányi, E. A Bőrön Keresztüli Hatóanyag Permeáció Modellezése És Penetrációfokozók Hatásának Vizsgálata. *Acta Pharm. Hung.* **2012**, *1*, 15–23.
104. Netzlaff, F.; Kaca, M.; Bock, U.; Haltner-Ukomadu, E.; Meiers, P.; Lehr, C.-M.; Schaefer, U.F. Permeability of the Reconstructed Human Epidermis Model Episkin® in Comparison to Various Human Skin Preparations☆. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 127–134, doi:10.1016/j.ejpb.2006.08.012.
105. Mendez, J.M.; Marijke Keestra-Gounder, A. NF-KB-Dependent Luciferase Activation and Quantification of Gene Expression in Salmonella Infected Tissue Culture Cells. *J. Vis. Exp.* **2019**, *2020*, 1–10, doi:10.3791/60567.
106. Barrot, M. Tests and Models of Nociception and Pain in Rodents. *Neuroscience* **2012**, *211*, 39–50, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.
107. Tjølsen, A.; Rosland, J.H.; Berge, O.-G.; Hole, K. The Increasing-Temperature Hot-Plate Test: An Improved Test of Nociception in Mice and Rats. *J. Pharmacol. Methods* **1991**, *25*, 241–250, doi:10.1016/0160-5402(91)90014-V.
108. Hunskaar, S.; Berge, O.-G.; Hole, K. A Modified Hot-Plate Test Sensitivie to Mild Analgesics. *Behav. Brain Res.* **1986**, *21*, 101–108, doi:10.1016/0166-4328(86)90088-4.
109. Lopes, D.M.; Cater, H.L.; Thakur, M.; Wells, S.; McMahon, S.B. A Refinement to the Formalin Test in Mice. *F1000Research* **2019**, *8*, 891,

doi:10.12688/f1000research.18338.2.

110. Sándor, K.; Elekes, K.; Szabó, Á.; Pintér, E.; Engström, M.; Wurster, S.; Szolcsányi, J.; Helyes, Z. Analgesic Effects of the Somatostatin Sst4 Receptor Selective Agonist J-2156 in Acute and Chronic Pain Models. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 539, 71–75, doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.082.
111. Sándor, K.; Helyes, Z.; Gyires, K.; Szolcsányi, J.; László, J. Static Magnetic Field-Induced Anti-Nociceptive Effect and the Involvement of Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves in This Mechanism. *Life Sci.* **2007**, 81, 97–102, doi:10.1016/j.lfs.2007.04.029.
112. Gad, S.C. *The Mouse Ear Swelling Test (MEST) in the 1990s**; ELSEVIER, 1994; Vol. 93;.
113. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.
114. Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch. Toxicol.* **2020**, 94, 651–715, doi:10.1007/s00204-020-02689-3.
115. SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-Based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Anal. Sci.* **2018**, 34, 795–800, doi:10.2116/analsci.18P014.
116. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231–1237, doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
117. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 1768–1774, doi:10.1021/jf803011r.
118. Rubio, C.P.; Hernández-Ruiz, J.; Martínez-Subiela, S.; Tvarijonaviciute, A.; Ceron, J.J. Spectrophotometric Assays for Total Antioxidant Capacity (TAC) in Dog Serum: An Update. *BMC Vet. Res.* **2016**, 12, 166, doi:10.1186/s12917-016-0792-7.
119. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S.K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial

- Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71–79, doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
120. Vanegas, D.; Abril-Novillo, A.; Khachatryan, A.; Jerves-Andrade, L.; Peñaherrera, E.; Cuzco, N.; Wilches, I.; Calle, J.; León-Tamariz, F. Validation of a Method of Broth Microdilution for the Determination of Antibacterial Activity of Essential Oils. *BMC Res. Notes* **2021**, *14*, 439, doi:10.1186/s13104-021-05838-8.
 121. Thomas, S.R.; Elkinton, J.S. Pathogenicity and Virulence. *J. Invertebr. Pathol.* **2004**, *85*, 146–151, doi:10.1016/j.jip.2004.01.006.
 122. Nagy, M.; Grancai, D.; Jantova, S.; Ruzekova, L. Antibacterial Activity of Plant Extracts from the Families Fabaceae , Oleaceae , Philadelphaceae , Rosaceae and Staphyleaceae. *Phyther. Res.* **2000**, *14*, 601–603.
 123. Aziz, N.; Kim, M.-Y.; Cho, J.Y. Anti-Inflammatory Effects of Luteolin: A Review of in Vitro, in Vivo, and in Silico Studies. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *225*, 342–358, doi:10.1016/j.jep.2018.05.019.
 124. Azab, A.; Nassar, A.; Azab, A. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules* **2016**, *21*, 1321, doi:10.3390/molecules21101321.
 125. Im, D.-S. Pro-Resolving Effect of Ginsenosides as an Anti-Inflammatory Mechanism of Panax Ginseng. *Biomolecules* **2020**, *10*, 444, doi:10.3390/biom10030444.
 126. Iwaszko, M.; Biały, S.; Bogunia-Kubik, K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells* **2021**, *10*, 3000, doi:10.3390/cells10113000.
 127. Hahn, M.; Ghoreschi, K. The Role of IL-4 in Psoriasis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2017**, *13*, 171–173, doi:10.1080/1744666X.2017.1279054.
 128. Aggarwal, R.; Jain, A.K.; Mittal, P.; Kohli, M.; Jawanjal, P.; Rath, G. Association of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Preeclampsia. *J. Clin. Lab. Anal.* **2019**, *33*, e22834, doi:10.1002/jcla.22834.
 129. Kósa, D.; Peto, Á.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Gonda, S.; Vasas, G.; Fehér, P.; Bácskay, I.; Ujhelyi, Z. Formulation of Novel Liquid Crystal (Lc) Formulations with Skin-Permeation-Enhancing Abilities of Plantago Lanceolata (Pl) Extract and Their Assessment on Hacat Cells. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26041023.

130. Ujhelyi, Z.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Fehér, P.; Kiss, T.; Veszélka, S.; Deli, M.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Evaluation of Cytotoxicity of Surfactants Used in Self-Micro Emulsifying Drug Delivery Systems and Their Effects on Paracellular Transport in Caco-2 Cell Monolayer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 564–573, doi:10.1016/j.ejps.2012.07.005.
131. Józsa, L.; Ujhelyi, Z.; Vasvári, G.; Sinka, D.; Nemes, D.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Szabó, J.; Kalló, G.; et al. Formulation of Creams Containing *Spirulina Platensis* Powder with Different Nonionic Surfactants for the Treatment of Acne Vulgaris. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25204856.
132. Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Róka, E.; Juhász, B.; Varga, B.; Bombicz, M.; Priksz, D.; Bácskay, I.; et al. Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended *Silybum Marianum* against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/molecules21101269.
133. Suarato, G.; Spanò, R.; Bertorelli, R.; Diaspro, A.; Athanassiou, A.; Surdo, S. 3D-Printed, Pocket-Size Diffusion Cells for Skin Permeation Investigation. *Proceedings* **2018**, *2*, 945, doi:10.3390/proceedings2130945.
134. Samaha, D.; Shehayeb, R.; Kyriacos, S. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles of Diltiazem Modified-Release Formulations. *Dissolution Technol.* **2009**, *16*, 41–46, doi:10.14227/DT160209P41.
135. Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2010**, *67*, 217–223.
136. Eder, K.; Vizler, C.; Kusz, E.; Karcagi, I.; Glavinas, H.; Balogh, G.E.; Vigh, L.; Duda, E.; Gyorfy, Z. The Role of Lipopolysaccharide Moieties in Macrophage Response to *Escherichia Coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *389*, 46–51, doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.082.
137. Újhelyi, J.; Újhelyi, Z.; Szalai, A.; László, J.F.; Cayasso, M.; Vecsernyés, M.; Pórszász, R. Analgesic and Anti-Inflammatory Effectiveness of Sitagliptin and Vildagliptin in Mice. *Regul. Pept.* **2014**, *194–195*, 23–29, doi:10.1016/j.regpep.2014.09.006.

138. Bánvölgyi, Á.; Pozsgai, G.; Brain, S.D.; Helyes, Z.S.; Szolcsányi, J.; Ghosh, M.; Meleg, B.; Pintér, E. Mustard Oil Induces a Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor-Independent Neurogenic Inflammation and a Non-Neurogenic Cellular Inflammatory Component in Mice. *Neuroscience* **2004**, *125*, 449–459, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.009.
139. Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A.J. *Modulation of Mouse Ear Edema by Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitors and Other Pharmacologic Agents*; 1985; Vol. 17;.
140. Sun, Y.; Oberley, L.W.; Li, Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 497–500, doi:10.1093/clinchem/34.3.497.
141. Szabados-Furjesi, P.; Pajtas, D.; Barta, A.; Csepanyi, E.; Kiss-Szikszai, A.; Tosaki, A.; Bak, I. Synthesis, in Vitro Biological Evaluation, and Oxidative Transformation of New Flavonol Derivatives: The Possible Role of the Phenyl-N,N-Dimethylamino Group. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23123161.
142. Jurca, T.; Marian, E.; Tita, B.; Vicas, S.; Pallag, A.; Toth, I.; Krusper, L.; Braun, M.; Vicas, L. Determination of Oligoelements Content of Plant Material and Assessment of Bioactive Compounds from Calendula Officinalis Lyophilized Extract. *Rev. Chim.* **2017**, *68*, 1786–1789, doi:10.37358/rc.17.8.5765.
143. Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Leitão, G.G.; Reis, A.S.; Santos, T.C. dos; Coube, C.S.; Leitão, S.G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phyther. Res.* **2001**, *15*, 127–130, doi:10.1002/ptr.687.
144. Mureșan, M.; Olteanu, D.; Filip, G.A.; Clichici, S.; Baldea, I.; Jurca, T.; Pallag, A.; Marian, E.; Frum, A.; Gligor, F.G.; et al. Comparative Study of the Pharmacological Properties and Biological Effects of Polygonum Aviculare L. Herba Extract-Entrapped Liposomes versus Quercetin-Entrapped Liposomes on Doxorubicin-Induced Toxicity on HUVECs. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1418, doi:10.3390/pharmaceutics13091418.
145. Džugan, M.; Tomczyk, M.; Sowa, P.; Grabek-Lejko, D. Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules* **2018**, *23*, 2069, doi:10.3390/molecules23082069.
146. Campos, C.; Guzmán, R.; López-Fernández, E.; Casado, Á. Evaluation of the Copper(II) Reduction Assay Using Bathocuproinedisulfonic Acid Disodium Salt for

- the Total Antioxidant Capacity Assessment: The CUPRAC–BCS Assay. *Anal. Biochem.* **2009**, 392, 37–44, doi:10.1016/j.ab.2009.05.024.
147. Nemes, D.; Kovács, R.; Nagy, F.; Mező, M.; Poczok, N.; Ujhelyi, Z.; Peto, A.; Fehér, P.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; et al. Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms—Assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity. *Molecules* **2018**, 23, doi:10.3390/molecules23071827.
 148. Nemes, D.; Kovács, R.; Nagy, F.; Tóth, Z.; Herczegh, P.; Borbás, A.; Kelemen, V.; Pfliegler, W.P.; Rebenku, I.; Hajdu, P.B.; et al. Comparative Biocompatibility and Antimicrobial Studies of Sorbic Acid Derivates. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, 143, 105162, doi:10.1016/j.ejps.2019.105162.
 149. Tavakolpour, S.; Tavakolpour, V. Interleukin 4 Inhibition as a Potential Therapeutic in Pemphigus. *Cytokine* **2016**, 77, 189–195, doi:10.1016/j.cyto.2015.09.017.
 150. Qiu, Y.Y.; Zhu, J.X.; Bian, T.; Gao, F.; Qian, X.F.; Du, Q.; Yuan, M.Y.; Sun, H.; Shi, L.Z.; Yu, M.H. Protective Effects of Astragaloside IV against Ovalbumin-Induced Lung Inflammation Are Regulated/Mediated by T-Bet/GATA-3. *Pharmacology* **2014**, 94, 51–59, doi:10.1159/000362843.
 151. Sumegi, K.; Fekete, K.; Antus, C.; Debreceni, B.; Hocsak, E.; Gallyas, F.; Sumegi, B.; Szabo, A. BGP-15 Protects against Oxidative Stress- or Lipopolysaccharide-Induced Mitochondrial Destabilization and Reduces Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species. *PLoS One* **2017**, 12, 1–19, doi:10.1371/journal.pone.0169372.
 152. Giansanti, V.; Donà, F.; Tillhon, M.; Scovassi, A.I. PARP Inhibitors: New Tools to Protect from Inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 80, 1869–1877, doi:10.1016/j.bcp.2010.04.022.
 153. Peralta-Leal, A.; Rodríguez-Vargas, J.M.; Aguilar-Quesada, R.; Rodríguez, M.I.; Linares, J.L.; de Almodóvar, M.R.; Oliver, F.J. PARP Inhibitors: New Partners in the Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 47, 13–26, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.008.
 154. Wachal, Z.; Szilágyi, A.; Takács, B.; Szabó, A.M.; Priksz, D.; Bombicz, M.; Szilvássy, J.; Juhász, B.; Szilvássy, Z.; Varga, B. Improved Survival and Retinal Function of Aging ZDF Rats in Long-Term, Uncontrolled Diabetes by BGP-15 Treatment. *Front. Pharmacol.* **2021**, 12, 1–11, doi:10.3389/fphar.2021.650207.

155. Nagy, G.; Szarka, A.; Lotz, G.; Dóczy, J.; Wunderlich, L.; Kiss, A.; Jemnitz, K.; Veres, Z.; Bánhegyi, G.; Schaff, Z.; et al. BGP-15 Inhibits Caspase-Independent Programmed Cell Death in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *243*, 96–103, doi:10.1016/j.taap.2009.11.017.
156. Wachal, Z.; Bombicz, M.; Priks, D.; Hegedűs, C.; Kovács, D.; Szabó, A.M.; Kiss, R.; Németh, J.; Juhász, B.; Szilvássy, Z.; et al. Retinoprotection by BGP-15, a Hydroximic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21062124.
157. Malingré, M.M.; Schellens, J.H.M.; Telling, O. Van; Ouwehand, M.; Bardelmeijer, H.A.; Rosing, H.; Koopman, F.J.; Schot, M.E.; Huinink, W.W.T.B.; Beijnen, J.H. The Co-Solvent Cremophor EL Limits Absorption of Orally Administered Paclitaxel in Cancer Patients. *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 1472–1477, doi:10.1054/bjoc.2001.2118.
158. Okur, N.Ü.; Yavasoglu, A.; Karasulu, H.Y. Preparation and Evaluation of Microemulsion Formulations of Naproxen for Dermal Delivery. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 135–143, doi:10.1248/cpb.c13-00051.
159. Shafiq, S.; Shakeel, F. Effect of Labrasol on Self-Nanoemulsification Efficiency of Ramipril Nanoemulsion. *Pharmazie* **2009**, *64*, 812–817, doi:10.1691/ph.2009.9186.
160. Valko, V.; Fickova, M.; Pravdova, E.; Nagy, M.; Grancai, D.; Czigle, S. Cytotoxicity of Water Extracts from Leaves and Branches of *Philadelphus Coronarius* L. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **2006**, *150*, 71–73, doi:10.5507/bp.2006.007.
161. Dilshara, M.G.; Jayasooriya, R.G.P.T.; Lee, S.; Jeong, J.B.; Seo, Y.T.; Choi, Y.H.; Jeong, J.W.; Jang, Y.P.; Jeong, Y.K.; Kim, G.Y. Water Extract of Processed *Hydrangea Macrophylla* (Thunb.) Ser. Leaf Attenuates the Expression of pro-Inflammatory Mediators by Suppressing Akt-Mediated NF- κ B Activation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *35*, 311–319, doi:10.1016/j.etap.2012.12.012.
162. Hano, C.; Tungmunthum, D. Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. *Medicines* **2020**, *7*, 26, doi:10.3390/medicines7050026.
163. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 270–278, doi:10.4161/oxim.2.5.9498.

164. Pietta, P.G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035–1042, doi:10.1021/np9904509.
165. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, 47, doi:10.1017/jns.2016.41.
166. Choubey, S.; Goyal, S.; Varughese, L.R.; Kumar, V.; Sharma, A.K.; Beniwal, V. Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2018**, *18*, 1283–1293, doi:10.2174/1389557518666180330114010.
167. de Cristo Soares Alves, A.; Mainardes, R.M.; Khalil, N.M. Nanoencapsulation of Gallic Acid and Evaluation of Its Cytotoxicity and Antioxidant Activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *60*, 126–134, doi:10.1016/j.msec.2015.11.014.
168. Xu, D.; Hu, M.-J.; Wang, Y.-Q.; Cui, Y.-L. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules* **2019**, *24*, 1123, doi:10.3390/molecules24061123.
169. Song, X.; Wang, Y.; Gao, L. Mechanism of Antioxidant Properties of Quercetin and Quercetin-DNA Complex. *J. Mol. Model.* **2020**, *26*, 133, doi:10.1007/s00894-020-04356-x.
170. Cazón, P.; Antoniewska, A.; Rutkowska, J.; Vázquez, M. Evaluation of Easy-Removing Antioxidant Films of Chitosan with Melaleuca Alternifolia Essential Oil. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *186*, 365–376, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.035.
171. Bener, M.; Şen, F.B.; Apak, R. Heparin-Stabilized Gold Nanoparticles-Based CUPRAC Colorimetric Sensor for Antioxidant Capacity Measurement. *Talanta* **2018**, *187*, 148–155, doi:10.1016/j.talanta.2018.05.021.
172. López-Lluch, G.; del Pozo-Cruz, J.; Sánchez-Cuesta, A.; Cortés-Rodríguez, A.B.; Navas, P. Bioavailability of Coenzyme Q10 Supplements Depends on Carrier Lipids and Solubilization. *Nutrition* **2019**, *57*, 133–140, doi:10.1016/j.nut.2018.05.020.
173. Kalasz, H.; Antal, I. Drug Excipients. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2535–2563, doi:10.2174/092986706778201648.
174. Csizmazia, E.; Eros, G.; Berkesi, O.; Berkó, S.; Szabó-Révész, P.; Csányi, E. Penetration Enhancer Effect of Sucrose Laurate and Transcutol on Ibuprofen. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2011**, *21*, 411–415, doi:10.1016/S1773-2247(11)50066-8.

175. Morris, L.S.; Schulz, R.M. Patient Compliance—an Overview. *J. Clin. Pharm. Ther.* **1992**, *17*, 283–295, doi:10.1111/j.1365-2710.1992.tb01306.x.
176. Thatai, P.; Khan, A.B. Management of Nail Psoriasis by Topical Drug Delivery: A Pharmaceutical Perspective. *Int. J. Dermatol.* **2020**, *59*, 915–925, doi:10.1111/ijd.14840.

9. 2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/360/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pető Ágota
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068515

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pető, Á.**, Kósa, D., Haimhoffer, Á., Nemes, D., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Frum, A., Gligor, F. G., Vicaș, L. G., Marian, E., Jurca, T., Pallag, A., Muresan, M., Tóth, Z., Bácskay, I.: Topical Dosage Formulation of Lyophilized *Philadelphus coronarius* L. Leaf and Flower: antimicrobial, Antioxidant and Anti-Inflammatory Assessment of the Plant. *Molecules*. 27 (9), 1-18, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092652>
IF: 4.927 (2021)
2. **Pető, Á.**, Kósa, D., Haimhoffer, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Sinka, D. Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Gyöngyösi, A., Lekli, I., Szentesi, P., Marton, A., Gombos, I., Dukic, B., Vígh, L., Bácskay, I.: Nicotinic Amidoxime Derivate BGP-15, Topical Dosage Formulation and Anti-Inflammatory Effect. *Pharmaceutics*. 13 (12), 2037, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13122037>
IF: 6.525





További közlemények

3. Sinka, D. Z., Doma, E., Szendi, N., Páll, J., Kósa, D., **Pető, Á.**, Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Szűcs, Z., Gonda, S., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Bácskay, I.: Formulation, Characterization and Permeability Studies of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Containing Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS).
Molecules. 27 (9), 2846-, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092846>
IF: 4.927 (2021)
4. Kósa, D., **Pető, Á.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Budai, I., Németh, J., Fehér, P., Bácskay, I., Ujhelyi, Z.: Oral Bioavailability Enhancement of Melanin Concentrating Hormone, Development and In Vitro Pharmaceutical Assessment of Novel Delivery Systems.
Pharmaceutics. 14 (1), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14010009>
IF: 6.525 (2021)
5. Kósa, D., **Pető, Á.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Gonda, S., Vasas, G., Fehér, P., Bácskay, I., Ujhelyi, Z.: Formulation of Novel Liquid Crystal (LC) Formulations with Skin-Permeation-Enhancing Abilities of *Plantago lanceolata* (PL) Extract and Their Assessment on HaCaT Cells.
Molecules. 26 (4), 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26041023>
IF: 4.927
6. **Pető, Á.**, Kósa, D., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Sinka, D. Z., Vecsernyés, M., Szilvássy, Z., Juhász, B., Csanádi, Z., Vigh, L., Bácskay, I.: Pharmacological Overview of the BGP-15 Chemical Agent as a New Drug Candidate for the Treatment of Symptoms of Metabolic Syndrome.
Molecules. 25 (2), 429-441, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25020429>
IF: 4.411
7. Nemes, D., Ujhelyi, Z., Arany, P., **Pető, Á.**, Fehér, P., Váradi, J., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Biocompatibility investigation of different pharmaceutical excipients used in liquid dosage forms.
Pharmazie. 73 (1), 16-18, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2018.7098>
IF: 0.82





8. Nemes, D., Kovács, R. L., Nagy, F., Mező, M., Poczkó, N., Ujhelyi, Z., **Pető, Á.**, Fehér, P.,
Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Interaction between Different
Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms: assessment of Cytotoxicity and
Antimicrobial Activity.
Molecules. 23 (7), 1-19, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071827>
IF: 3.06

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,122

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,452**

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

Debrecen, 2022.07.07.



10. Rövidítésjegyzék

ABTS	2,20-azinobisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)
AITC	allil-izotiocianát, gyulladáskeltő anyag
AKT	Protein-kináz B, szerin/treonin specifikus protein kinázok gyűjtőneve
ANOVA	Variancia analízis (Analysis of Variance)
BGP-15	(N'-(2-hidroxi-3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-piridin-karboximidamid)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i> , sarjadzógomba
C57BL/6 egerek	Csíramentes, beltenyésztett egér
Caco-2	Colon carcinoma sejtvonala
CO ₂	szén-dioxid
CUPRAC	Rézion redukálásán alapuló antioxidáns kapacitás (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, sejtenyésztéshez használt tápfolyadék
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök megkötésén alapuló antioxidáns mérés
DW	Szárazanyag (Dry Weight)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Gram negatív baktérium
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	Enzimhez kapcsolt immunoszorbens próba (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FoNo VIII.	Formulae Normales VIII; Szabályos Vényminták VIII.
FRAP	Vas redukáló képességen alapuló antioxidáns mérés (Ferric-Reducing Antioxidant Power)
GAE	Galluszsav ekvivalens
GSK-3	Glikogén szintáz kináz 3
HaCaT	Humán keratinocita sejtvonala (Human adult skin keratinocytes, low Ca ²⁺ elevated Temperature)
HeLa	Humán epithelialis méhnyak adenokarcinóma sejtvonala (Az elnevezés Henrietta Lacks nevéből származik)
HEPES	Ikerionos szulfonsav-pufferanyag (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav)
HLB	Hidrofil-lipofil egyensúly
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
HPLC	Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
HSF-1	Hőshock faktor-1
HSP	Heat shock protein, hőshock fehérje
IL-10	Interleukin 10
IL-1β	Interleukin-1β
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin 6
INT	2-p-jódifenil-3-p-nitrofenil-tetrazolium-klorid
IPM	Izopropil-mirisztát
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization)
JNK	Jun N-terminál kináz

LDH	Laktát-dehidrogenáz
LPS	Lipopoliszacharid
mRNS	messenger RNS, hírvivő RNS
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NF- κ B	Nukleáris faktor-kappa B
NO	Nitrogén-oxid
O/V	Olaj a vízben
<i>P. coronarius</i>	<i>Philadelphus coronarius</i> , közönséges jezsámen
PARP	poli-ADP-ribóz-polimeráz
PBS	Phosphate buffered saline (foszfát pufferelt sóoldat)
PCOS	Policisztás ovárium szindróma
PG	Propilén-glikol
PGE	Prostaglandin
Ph. Hg. VIII.	Pharmacopoeia Hungarica VIII; VIII. Magyar Gyógyszerkönyv
PS750	cukorészter PS750, nem ionos emulgens
QE	Kvercetin ekvivalens
Rac 1	Rho GTP-áz fehérje
Raw 264.7	Egér makrofág eredetű sejtvonal
RNS	Reaktív nitrogén gyökök
ROS	Reaktív oxigén gyökök
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 tápfolyadék
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , Gram pozitív baktérium
SC	Stratum corneum, szaruréteg
SD	Szórás (Standard Deviation)
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SP50	cukorészter SP50, nem ionos emulgens
SP70	cukorészter SP70, nem ionos emulgens
TAC	Teljes antioxidáns kapacitás, össz-antioxidáns kapacitás
TE	Trolox ekvivalens
TNF- α	Tumor nekrosis faktor- α
TX-100	Triton-X-100, pozitív kontroll
UV-B sugárzás	Ultraibolya-B sugárzás

11. Ábrajegyzék

- 1. ábra:** A bőr felépítése. (Forrás: <https://doktoroxygen.hu/a-bor-egeszsege/> Letöltés: 2022. 07.12. 18:59)
- 2. ábra:** A cukorészterek általános képlete. (Forrás: Szűts Angéla (2009) Cukorészterek olvadéktechnológiai alkalmazhatóságának vizsgálata című PhD értekezése, Szeged) Letöltés: 2022.07.16. 23:09
- 3. ábra:** A BGP-15 szerkezeti képlete. (Forrás: Pető et al. Pharmacological overview of the BGP-15 chemical agent as a new drug candidate for the treatment of symptoms of metabolic syndrome)
- 4. ábra:** A BGP-15 hatásmechanizmusával kapcsolatos jelenlegi ismereteink. (Saját ábra)
- 5. ábra:** A közönséges jezsámen. (Forrás: https://www.megyeriszabolcskertesze.hu/a_kozonseges_jezsamen_metszese Letöltés: 2022. 07.12. 19:03.)
- 6. ábra:** Kísérleti terv. (Saját ábra)
- 7. ábra:** A cukorészterek MTT tesztje. (Saját ábra)
- 8. ábra:** A Transcutol MTT tesztje. (Saját ábra)
- 9. ábra:** A Labrasol citotoxicitási vizsgálata. (Saját ábra)
- 10. ábra:** A Cremophor A6:25 sejtleletkéességi vizsgálatának eredményei. (Saját ábra)
- 11. ábra:** A Tefose 63 citotoxicitási vizsgálata. (Saját ábra)
- 12. ábra:** A Sedefos 75 citotoxicitási vizsgálata. (Saját ábra)
- 13. ábra:** A BGP-15 tartalmú kenőcsök textúra analízise. (Saját ábra)
- 14. ábra:** BGP-15 tartalmú kenőcsök Franz diffúziós vizsgálata. (Saját ábra)
- 15. ábra:** BGP-15 tartalmú kenőcsök citotoxicitása. (Saját ábra)
- 16. ábra:** A BGP-15 hatása önmagában és cukorészterekkel együtt, különböző koncentrációkban LPS indukálta Raw264.7 sejteken. (Saját ábra)
- 17. ábra:** A BGP-15 tartalmú kenőcsök in vivo tesztelése. (Saját ábra)
- 18. ábra:** Fülvestagság a kísérlet 10. percében. (Saját ábra)

19. ábra: BGP-15-tel előkezelt HaCaT sejtek SOD aktivitása UV-B sugárzást követően. (Saját ábra)

20. ábra: BGP-15 tartalmú kenőcsök össz-antioxidáns kapacitása (TAC). (Saját ábra)

21. ábra: A time-kill vizsgálat eredményei. (Saját ábra)

22. ábra: A *P. coronarius* levél és virág hatása a sejtek IL-4 termelésére. (Saját ábra)

23. ábra: A *P. coronarius* tartalmú kenőcsök Franz diffúziós vizsgálata. (Saját ábra)

24. ábra: A *P. coronarius*-t tartalmazó készítmények textúra analízise. (Saját ábra)

25. ábra: *P. coronarius* tartalmú kenőcsök MTT tesztje. (Saját ábra)

12. Táblázatok jegyzéke

- 1. táblázat:** A BGP-15 fő hatásainak összefoglalása terápiás dózissal. (Saját táblázat)
- 2. táblázat:** A felhasznált tenzidek kémiai neve és HLB értékük. (Saját táblázat)
- 3. táblázat:** A kenőcsök összetétele. (Saját táblázat)
- 4. táblázat:** BGP-15 tartalmú kenőcsök textúra analízisének statisztikai eredményei, p értékek és szignifikancia. (Saját táblázat)
- 5. táblázat:** Az egyes összetételekhez kiszámított felszabadulási ráta (k) és diffúziós koefficiens (D) értékek. (Saját táblázat)
- 6. táblázat:** A BGP-15 tartalmú készítmények különbözőségi faktorai. (Saját táblázat)
- 7. táblázat:** *P. coronarius* levél extraktum bioaktív vegyülettartalma. (Saját táblázat)
- 8. táblázat:** *P. coronarius* virág extraktum bioaktív vegyülettartalma. (Saját táblázat)
- 9. táblázat:** A *P. coronarius* antioxidáns aktivitása. (Saját táblázat)
- 10. táblázat:** A *P. coronarius* teljes polifenol és flavonoid tartalma. (Saját táblázat)
- 11. táblázat:** A *P. coronarius* antimikrobiális aktivitása mikrodilúciós módszerrel (Saját táblázat)
- 12. táblázat:** Az egyes összetételekhez kiszámított felszabadulási ráta (k) és diffúziós koefficiens (D) értékek. (Saját táblázat)
- 13. táblázat:** A *P. coronarius* tartalmú összetételek különbözőségi faktorai. (Saját táblázat)

13. Tárgyszavak

BGP-15, *Philadelphus coronarius*, penetráció fokozó, biokompatibilitás, biohasznosulás, kenőcs, gyulladáscsökkentő, HaCaT sejtvonal, antioxidáns, antimikrobiális

14. Keywords

BGP-15, *Philadelphus coronarius*, penetration enhancer, biocompatibility, bioavailability, ointment, anti-inflammatory, HaCaT cell line, antioxidant, antimicrobial

15. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Bácskay Ildikónak, önzetlen segítségéért, támogatásáért, áldozatos munkájáért, a szakmai iránymutatásáért és példamutatásáért az élet minden területén.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vecsernyés Miklós Dékán Úrnak, hogy lehetőséget biztosított kutatásaim elvégzésére a Gyógyszertechnológiai Tanszéken.

Hálával tartozom Dr. Kósa Dórának a hosszú évek óta tartó hű barátságáért, szeretetéért és rendületlen támogatásáért. Köszönöm továbbá Dr. Haimhoffer Ádámnak baráti támogatását.

Hálásan köszönöm kollégáimnak, a Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársainak Dr. Fehér Pálmának, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Fenyvesi Ferencnek, Dr. Váradi Juditnak, Szászné Dr. Réti-Nagy Katalinnak, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Józsa Lizának, Dr. Nemes Dánielnek, Dr. Sinka Dávidnak, Dr. Rusznyák Ágnesnek, Dr. Arany Petrának, Pardi Sándornénak, Horányiné Körei Máriaának, Szilágyi Erikának, Gulyás Évának, hogy segítették munkámat. Köszönöm továbbá Vaszily Máriaának, Lakatos Szilviának, Antalné Sipos Szilviának és Bátoriné Pataki Brigittának a támogatást. Köszönöm Dr. Lekli Istvánnak és Dr. Gyöngyösi Alexandrának a kutatásban nyújtott segítségüket és támogatásukat.

Szeretném megköszönni kutatópartnereimnek és társszerzőimnek a közös munkát, mellyel hozzájárultak kutatásaim sikeréhez és a dolgozatom megírásához. Köszönöm Prof. Dr. Vigh Lászlónak, Dr. Gombos Imrének, Dr. Marton Annamáriaának és Dukic Barbarának a Szegedi Biológiai Központ munkatársainak, Dr. Jurca Tündének és Dr. Pallag Annamáriaának a Nagyvárad Eötvös Loránd Tudományegyetem munkatársainak, továbbá Dr. Szentesi Péternek az Élettani Intézet munkatársának és Dr. Tóth Zoltánnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet kutatójának a segítséget.

Köszönöm a tutoraimnak, Prof. Dr. Vasas Gábornak és Prof. Dr. Kéki Sándornak a PhD képzésem alatt nyújtott támogatásukat.

Köszönöm Dr. Csoma Eszternek, Prof. Dr. Tósaki Árpádnak és Prof. Dr. Gergely Lajosnak a Doktori Iskoláért végzett fáradhatatlan munkájukat.

Hálával tartozom szerető családomnak a szüntelen támogatásukért. Köszönöm testvéremnek és sógoromnak, Lászlóné Pető Tímeának és László Tamásnak a szeretetet és a támogatást, keresztfiamnak és unokahúgomnak, László Boldizsárnak és László Emmának a feltétel nélküli,

önzetlen szeretetüket és vidámságukat, mellyel a nehéz pillanatokban is felvidítottak. Köszönöm nagymamámnak, Szűcs Józsefnének a szeretetét és féltő gondoskodását. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm drága szüleimnek, hogy egész életem során támogatnak, biztos és nyugodt, szeretetteljes háttérrel biztosítanak nekem és mindig számíthatok rájuk.

16. Függelék

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

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

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

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

A kísérletes munkát a Richter Gedeon Talentum alapítvány támogatta.