

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A Silybum marianumot tartalmazó belsőleges és
külsőleges gyógyszerformák fejlesztése, in vitro és in
vivo vizsgálata**

Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma

Témavezető: Dr. Vecsernyés Miklós



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	6
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	12
2.1. Silybum marianum	12
2.2. Silybum marianum mag kémiai összetétele	12
2.3. A szilimarin olaj és por belsőleges hatása, biohasznosulása és a SMEDDS gyógyszerforma felépítése.....	15
2.3.1. Szilimarin olaj belsőleges hatása	15
2.3.2. Szilimarin por belsőleges hatása	16
2.3.3. A szilimarin biohasznosulása	16
2.3.4. Szilimarin biohasznosulásnak növelése	18
2.3.4.1. Komplexált szilimarin képzése.....	18
2.3.4.2. Vízoldékony szilimarin származék képzése.....	19
2.3.4.3. Szilimarin hatóanyagtartalmú úszótabletta formulálása	20
2.3.4.4. Szilimarin hatóanyagtartalmú lágy zselatin kapszula formulálása.....	20
2.3.4.5. Szilimarin liposzómába történő ágyazása	20
2.3.4.6. Szilimarin szilárd diszperzióba történő inkorporálása.....	21
2.3.4.7. Szilimarin- szilárd lipid nanorészecskék előállítás (SLN).....	21
2.3.4.8. Szilimarinnal töltött mikroszférák kialakítása.....	21
2.3.4.9. Szilimarinnal töltött polimer micellák kialakítása.....	22
2.3.4.10. Szilimarin nanoemulzió és nanoszuszpenzió formulálása	22
2.3.4.11. Szilimarin por-SMEDDS formulálás.....	22
2.3.5. Olajok formulálása SMEDDS-ben	23
2.3.6. Ön(mikro)emulgeáló rendszerek.....	24
2.3.7. S(M)EDDS formulálásnál alkalmazott segédanyagok.....	26
2.4. A szilimarin hatóanyagainak külsőleges hatása és a külsőleges gyógyszerforma kialakításának szempontjai	28
2.4.1. A szilimarin por külsőleges hatása	28
2.4.2. Szilimarin porból formulált külsőleges készítmények.....	30
2.4.2.1. Leviaderm®.....	30
2.4.2.2. Organogél formulálása szilimarin porból	30
2.4.2.3. v/o emulziós krém formulálása máriatövis mag etanolos kivonatából	31
2.4.3. A kenőcsformulálás szempontjai.....	31
2.5. A gyógyszerformák fejlesztéséhez alkalmazott in vitro és vivo módszerek áttekintése	36
2.5.1. Franz diffúziós cella.....	36

2.5.2. Külsőleges gyógyszerformák sejtéletképességi vizsgálatai.....	37
2.5.3. Transzepidermális vízvesztés.....	38
2.5.4. Antioxidáns rendszer.....	39
2.5.5. HO-1 fehérje	40
2.5.6. A kísérletes májkárosodás és mértékének jellemzése	42
2.6. Célkitűzés	43
3. Metodika.....	45
3.1 Felhasznált anyagok.....	45
3.2. Silybum marianum mag származási helye.....	45
3.3. Szilimarin olaj és szilimarin por kivonása	45
3.4. Szilimarin olajjal végzett SMEDDS formulálás és a készítmény hatásának vizsgálata.....	46
3.4.1. SMEDDS-szilimarin olaj formulálása.....	46
3.4.2. SMEDDS cseppméretének meghatározása.....	46
3.4.3. Kísérleti állatok.....	47
3.4.4. Kezelési protokoll szilimarin olaj- SMEDDS-el egerekben.....	47
3.4.5. Májenzim értékek meghatározása egeren	48
3.4.6. Máj fehérje extraktum készítése.....	48
3.4.7. Hisztopatológiai vizsgálatok.....	49
3.4.8. Máj antioxidáns státuszának feltérképezése.....	49
3.4.8.1. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás meghatározása májszövetből.....	49
3.4.8.2. Kataláz (CAT) aktivitás meghatározása májszövetből	49
3.4.8.3. Glutation peroxidáz (GPx) meghatározása májszövetből	50
3.4.8.4. Glutation reduktáz (GR) aktivitás meghatározása májszövetből	50
3.4.8.5. GSH koncentráció meghatározása májszövetből.....	50
3.4.8.6. Lipid peroxidáció meghatározása.....	50
3.5. Szilimarin port tartalmazó krém formulálása és vizsgálata	51
3.5.1. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása.....	51
3.5.2. Krémek gyógyszerforma vizsgálata	53
3.5.2.1. Krémek konzisztencia vizsgálata.....	53
3.5.3. In vitro vizsgálat Franz diffúziós cellával.....	53
3.5.4. Sejttenyésztés.....	53
3.5.5. MTT teszt	54
3.5.6. In vivo kísérletekhez használt kísérleti állatok.....	55
3.5.7. In vivo bőr irritációs teszt.....	55
3.5.8. UV-B sugárzás HaCaT sejteken, a sejtek elő- és utókezelése	56

3.5.9. UV-B sugárzás tengerimalac bőréen in vivo, a bőr elő- és utókezelése	56
3.5.10. Szuperoxid dizmutáz aktivitás meghatározása.....	57
3.5.11. Kataláz aktivitás meghatározása	57
3.5.12. Glutathion peroxidáz aktivitás.....	58
3.5.13. Lipid peroxidációs (MDA) teszt.....	59
3.5.14. HO-1 aktivitás mérés.....	59
3.6. Statisztikai analízis	59
3.7. Az értekezésben szereplő, együttműködésben kivitelezett metodikák	60
4. Eredmények.....	61
4.1. Szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS formulálása és a gyógyszerforma hatásvizsgálata	61
4.1.1. SMEDDS cseppméretének meghatározása	61
4.1.2. A szilimarin olaj-SMEDDS hatása a májenzim értékekre.....	63
4.1.3. A szilimarin olaj-SMEDDS hatása az antioxidáns enzimek értékeire	63
4.1.4. GSH mérés eredménye.....	64
4.1.5. MDA koncentrációk mérésének eredménye	65
4.1.6. A máj hisztopatológiai vizsgálata	66
4.2. Szilimarin port tartalmazó krém formulációs vizsgálatának és a krém UVB sugárzás okozta károsodás kivédésének és kezelésének eredménye	68
4.2.1. Textúra analizáló készülékkel történő kompressziós vizsgálatok eredménye	68
4.2.2. in vitro membrán diffúziós vizsgálatok eredménye.....	70
4.2.3. MTT teszt eredménye.....	72
4.2.4. in vivo TEWL mérések eredménye.....	74
4.2.5. UV-B sugárzás hatásának vizsgálata HaCaT sejteken. A szilimarin krémek antioxidáns hatása elő- és utókezelésben	75
4.2.6. UV-B sugárzás hatásának vizsgálata tengerimalac modellen. A szilimarin krémek antioxidáns hatásának vizsgálata elő és utókezelésben.....	80
4.2.7. HO-1 enzim aktivitás.....	85
5. Megbeszélés.....	87
5.1. Szilimarinolaj-SMEDDS készítmények formulálása és terápiás hatásának vizsgálata.....	87
5.2. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása és terápiás hatásának vizsgálata.....	89
6/A Összefoglalás	92
6/B Summary.....	93

7. Irodalomjegyzék.....	94
7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom	94
7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények ellenőrzött jegyzéke.....	113
7.3. Ábrajegyzék	117
7.4. Táblázatok jegyzéke	120
8/A Tárgyszavak.....	121
8/B Keywords.....	121
9. Köszönetnyilvánítás	122
10. Függelék	123
10.1. Támogatás.....	123
10.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	124

Rövidítések

AAPS	American Association of Pharmaceutical Scientists
ALT	alanine aminotrasferase
AST	aspartate aminotransferase
BCS	Biopharmaceutical Classification System
BHT	Butylated hydroxytoluene
CAT	catalase
CCl ₄	Carbon tetrachloride
CLS	Cell Lines Service
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethilen-Diamine-Tetraaceticacid
FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
GC/MS	Gas Chromatography -Mass Spectroscopy
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
HaCaT	Human adult skin keratinocytes, low Ca ²⁺ elevated Temperature
HeLa	Henrietta Lacks
HLB	Hydrophilic-lipophilic Balance
HO	Heme oxygenase
HPLC-MS/MS	High-performance liquid chromatography-tandem Mass Spectroscopy
IL	Interleukin
IPM	Isopropyl myristate
MDA	Malondialdehyde
MTT	3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetazolium-bromid
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide

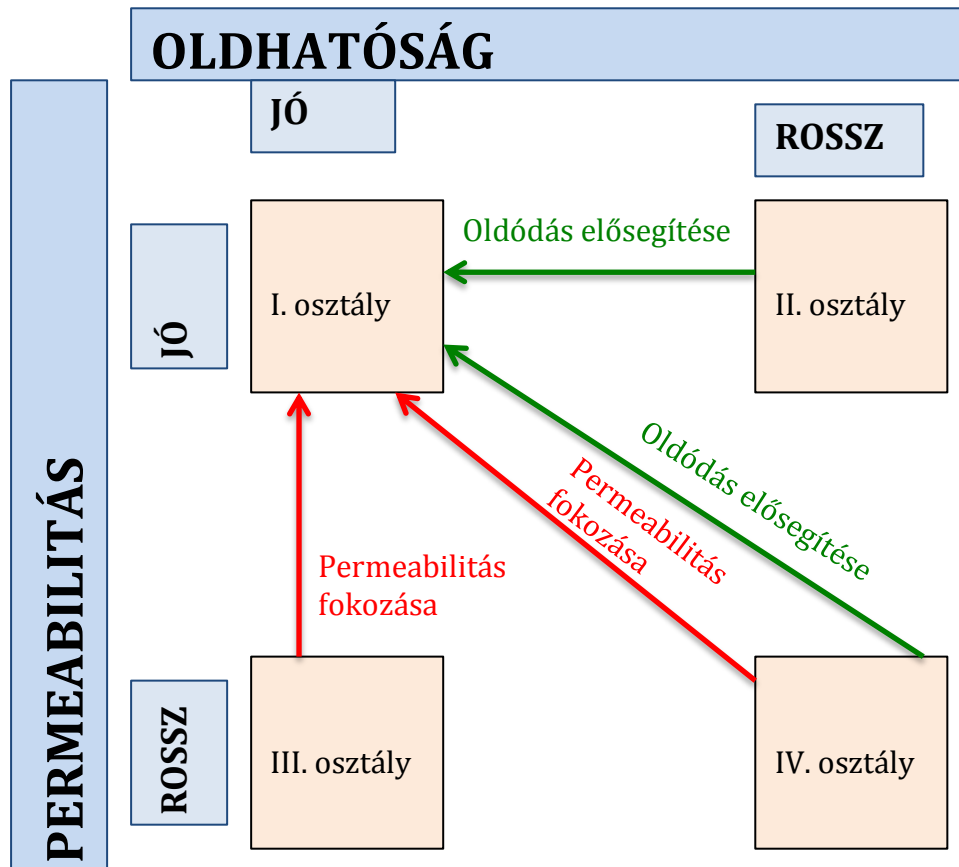
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMF	Natural Moisturizing Factor
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PS 750	Sucrose palmitate
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standard Deviation
SEDDS	Self Emulsifying Drug Delivery System
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SMEDDS	Self Micro-Emulsifying Drug Delivery System
SOD	Superoxide dismutase
SP 50	Sucrose stearate 50% monoesters
SP 70	Sucrose stearate 70% monoesters
TBA	Thiobarbituric-acid
TC	Transcutol
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TEWL	Transepidermal Water Loss
USP	United States Pharmacopoeia
WHO	World Health Organization

1. Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) felmérése szerint a betegek legalább 80 százalékát nagyrészt vagy kizárólag természetes szerekkel kezelik a világon. A fejlett ipari országokban alkalmazott gyógyszereknek is mintegy 40 százaléka származik természetes forrásból (Szőke É. és mtsai. 2012). Fitofarmakonnak tekintjük azokat a gyógyászati céllal alkalmazott készítményeket, amelyek hatóanyagai növényi részek (gyógynövény-drog), illetve azok kivonatai (nyers vagy tisztított kivonat), így az általuk kiváltott farmakológiai hatás természetes anyagkeverékeknek köszönhető (Nyiredi Sz. 2002).

A növényi kivonatok biológiailag aktív komponensei rossz vízdékonyságuk mellett gyakran biológiai membránokon is rosszul penetrálnak, ezért kicsi az abszorpciójuk, amely alacsony biohasznosulást és hatást eredményez. Sokszor ez az oka annak, hogy hiába az *in vitro* kísérletek eredményessége, az *in vivo* vizsgálatok már nem mutatják ugyanazt a hatást és ezáltal a növényi extraktumok klinikai felhasználása háttérbe szorul vagy nem lehetséges. A növényi eredetű készítmények fejlesztésekor az egyik lehetséges útvonal az, hogy már ismert fitofarmakon biofarmáciai tulajdonságát megváltoztatják, ezáltal növelik annak biohasznosulását.

A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) a hatóanyagoknak az emésztőtraktusból való felszívódását határozza meg, melyet Gordon L. Amidon és mtsai. 1995-ben vezettek be (Amidon és mtsa. 1995). A hatóanyagokat oldhatóság és permeabilitás alapján 4 csoportra osztották. A preformulálás során az egyik fontos szempont, hogy a hatóanyag melyik BCS csoportba tartozik. Amennyiben ismert, hogy a hatóanyag rossz oldhatósággal és/vagy rossz permeabilitással rendelkezik, a megfelelő gyógyszer technológiai módszer illetve segédanyag alkalmazásával javíthatjuk ezen tulajdonságokat és ezáltal segíthetjük a hatóanyag felszívódását és ezzel együtt biohasznosíthatóságát is (Kasim 2004). (1. ábra)



1. ábra: A hatóanyag felszívódásának elősegítése a BCS besorolás alapján (forrás: Antal I. előadás 2008)

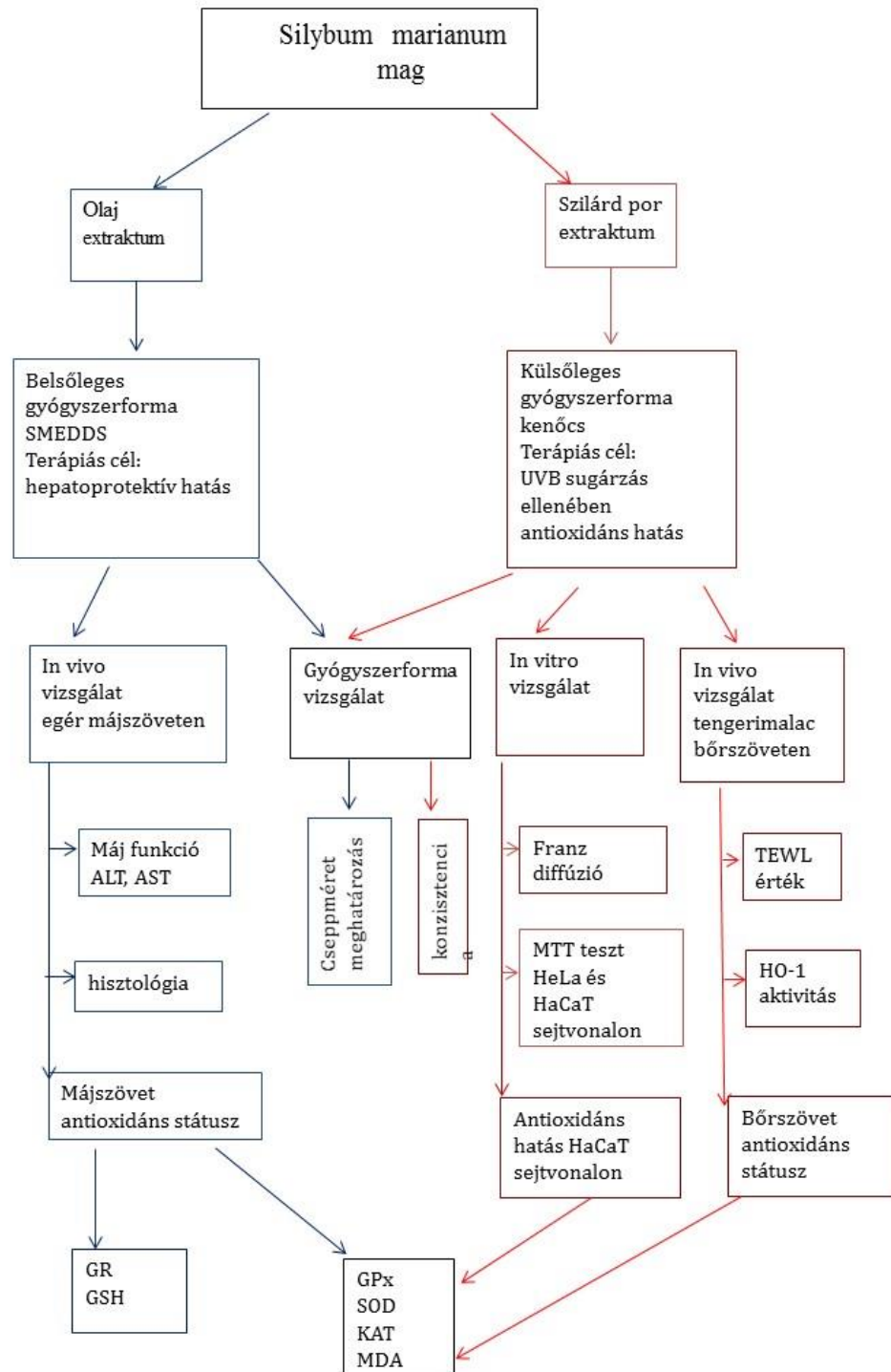
Rossz vízdékonysággal rendelkező növényi komponensek valamint kivonatok hatóanyagának részecskeméretének csökkentése, mikro- és nanorészecskék létrehozása is segítheti a hatóanyag abszorpcióját és ezáltal a hatásosságát. Ilyen megoldás lehet az ön(mikro) emulgeáló rendszerek formulálása.

A megfelelő gyógyszerforma kialakítása szintén növelheti a növényi eredetű hatóanyag felszívódását ezáltal biohasznosulását és terápiás hatását, úgy hogy ezzel együtt akár a terápiás dózist csökkenti. Egy új gyógyszerforma kialakítása a már meglévő hatóanyag biohasznosulását nagymértékben növelheti és célzott terápiát érhet el.

A külsőleges gyógyszerformákból a hatóanyag penetrációját több tényező befolyásolja. A hatóanyag szerkezete, fizikiai-kémiai tulajdonsága és felszabadulása az adott gyógyszerformából, a bőr barrier funkciója, a bőr szarurétegének nedvességtartalma stb. Ugyanakkor a külsőleges gyógyszerformulálásban kulcsfontosságú a megfelelő segédanyag(ok) alkalmazása, hiszen azok döntő módon segíthetik a hatóanyag bőrön keresztül történő átjutását és a terápiás hatás kifejlődését.

Munkánk kezdetekor olyan növényi kivonatot kerestünk mely régóta ismert, hatását már igazolták, ugyanakkor rossz vízdékonysággal rendelkezik, amely az egyik legfőbb oka a rossz biohasznosulásának. Így esett a választás a *Silybum marianum* gyógynövényre, melyet már évszázadok óta használnak máj- és epebetegségek kezelésére. A belsőleges terápiás hatás mellett számos tudományos cikk igazolta a máriatövis kivonatának külsőleges hatását is, legfőképp az UV sugárzás okozta bőrkárosodások ellen nyújtott védelmét. A növény hatását a termésében található flavonolignán-komplex adja, melynek összefoglaló neve a szilimarin. A máriatövis hatóanyagának rossz a biohasznosulása, mivel relatív oldhatatlan vízben, mely mind belsőleges mind külsőleges alkalmazásának korlátot szab (Hung és mtsai 2010).

Kísérleteink során a *Silybum marianum* gyógynövény magjából kivont szilimarin olajjal és porral dolgoztunk. A szilimarin olajból egy belsőleges SMEDDS (önmikroemulgeáló rendszer) gyógyszerformát alakítottunk ki és vizsgáltuk a hepatoprotektív hatását. A szilimarin porból o/v típusú emulziós krémet formuláltunk, a port oldott formában tartalmazta készítményünk, illetve emulgensként penetrációt növelő segédanyagot választottunk. Az így kialakított külsőleges gyógyszerforma segítette a szilimarin por bőrbe való penetrációját és kimutattuk UV sugárzás ellenében a készítmény antioxidáns hatását. A kísérletes munkánk vázlatát a 2. ábra foglalja össze (2. ábra).



2. ábra. A kísérletes munka vázlata

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Silybum marianum*

A *Silybum marianum* a leggyakrabban alkalmazott gyógynövény a májbetegségek megelőzésére és kezelésére (3. ábra) (Pepping 1999, Shaker és mtsai. 2010). A máriatövis a népi gyógyászatban már századok óta sikerrel alkalmazzák. A növény a zárwatermők törzsébe és fészkes virágzatúak (Asteraceae) családjába tartozik, Dél-Nyugat Ázsiából származik, hazánkban termesztett növény (Vargas-Mendoza és mtsai. 2014).



3. ábra. *Silybum marianum* /forrás: http://evgyogynovenye.hu/2013_mariatovis/

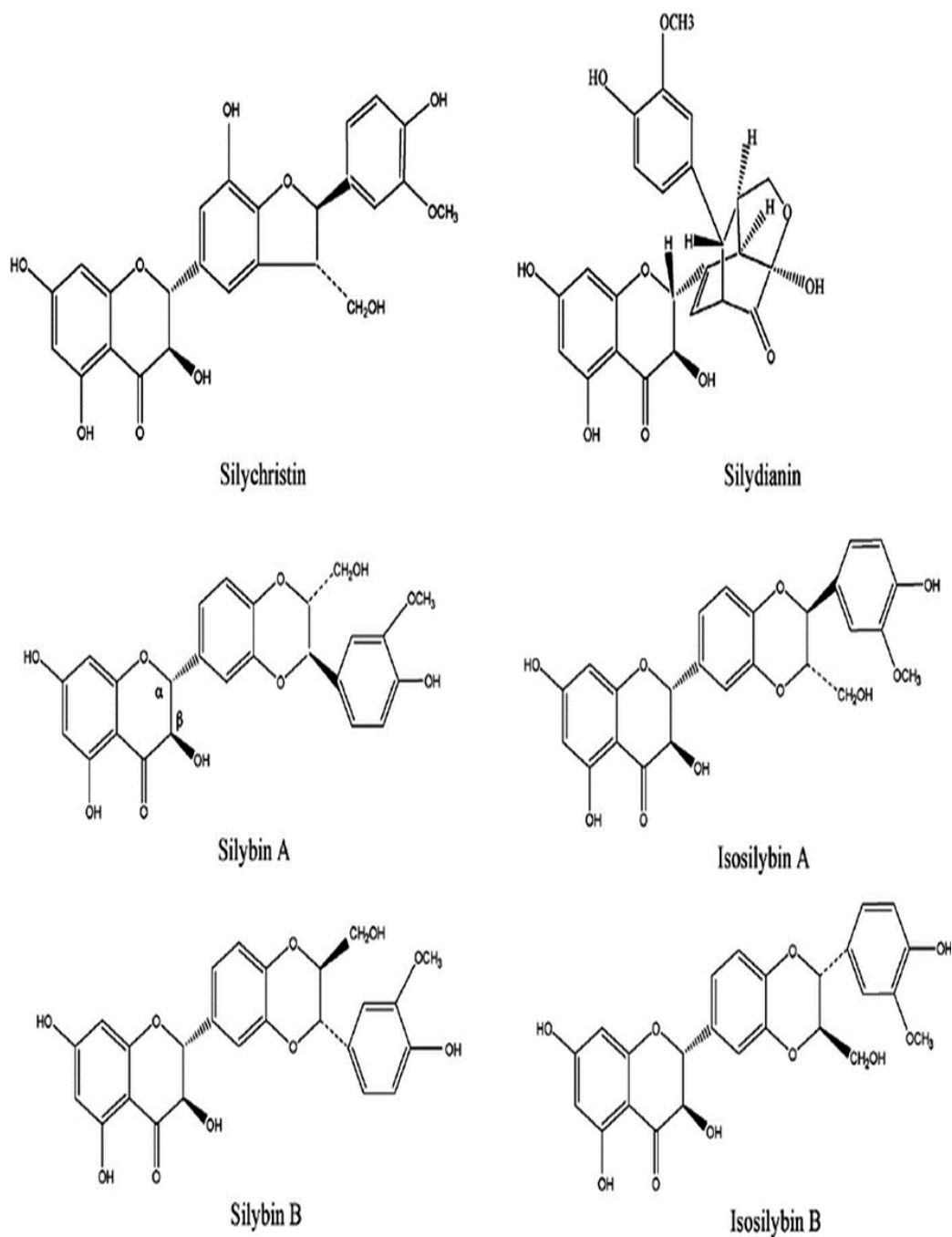
2.2. *Silybum marianum* mag kémiai összetétele

A gyógyászatban a máriatövis barnás termését (*Silybi mariani fructus*) alkalmazzák, amely a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos *Silybi mariani extractum siccum rafinatum et normatum* néven. A készítmény a termés tisztított, standardizált kivonata, szilimarintartalma 30-65%, hazánkban számos gyógyszer, gyógytermék és étrend-kiegészítő alapanyaga (Ph. Hg.VIII.).

A termés kb. 6 mm hosszú, legnagyobb mennyiségben zsírsolajat (15-30%) és fehérjét (20-30%) tartalmaz. Gyógyászati szempontból ugyanakkor a termésben található vegyületkeveréknek van nagy jelentősége, amely összefoglaló néven szilimarinnak nevezett, kémiaiilag flavonolignán-komplex. Fő hatóanyaga a maghéjban

koncentrálódó szilimarin legnagyobb mennyiségben (kb.50%) szilibint (más név: szilibinin) tartalmaz, de ezen kívül jelentősebb mennyiségű szilikrisztint, szilidianint és izoszilibinint (4. ábra). Kivonás során a máraitövis magból, amely a növény érett termése két fázis különíthető el, egy szilárd por és egy folyékony olajos rész.

A kísérleteink során alkalmazott szilimarin por komponensit Kuki és mtsai. (Kuki és mtsai. 2012) nagynyomású folyadékkromatográfiával összekapcsolt tömegspektrometriás módszerrel (HPLC-MS/MS) jellemezték. A legfőbb bioaktív flavonoid komponensek, mint szilikrisztin A és B, szilidianin, szilibin A és B, izoszilibin A és B mellett három további komponenst szintén detektáltak és részben szeparáltak; feltételezhetően két szilibin sztereoizomert és egy izoszilibin sztereoizomert (Kuki és mtsai. 2012).



4. ábra. Szilimarin főbb komponenseinek kémiai struktúrája (Kuki és mtsai 2012)

A szilimarin olaj a máriatövis mag kivonásakor keletkező melléktermék. Az olaj esszenciális zsírsavakat, foszfolipideket, szterolokat és viszonylag nagy mennyiségű E vitamint tartalmaz (Hadolin és mtsai. 2001). Gázkromatográfiás vizsgálat során a szilimarin olajból a következő zsírsavkomponenseket határoztak meg: linolsav (39%), olajsav (36,7%), palmitinsav (10,1%), sztearinsav (6,8%), linolénsav (3,6%), arachidinsav (2,9%) és behénsav (0,57%) (Fathi-Achachlouei és mtsai. 2016).

Hermenean és mtsai. (Hermenean és mtsai. 2015) gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria (GC-MS) eljárással vizsgálták a munkánk során felhasznált szilimarin olajat. Főként telített és telítetlen zsírsavakat, tokoferolt és elsőként aszkorbinsav 2,6 dihexadekanoát-ot azonosítottak, de e mellett lignocerinsav metil-észtert, squalen-t és koleszterolt is detektáltak. A zsírsavak közül a legnagyobb koncentrációban linolsavat és sztearinsavat mutattak ki.

2.3. A szilimarin olaj és por belsőleges hatása, biohasznosulása és a SMEDDS gyógyszerforma felépítése

2.3.1. Szilimarin olaj belsőleges hatása

A szilimarin olaj terápiás hatásáról kevés tudományos cikk található, valamint eddigi ismereteink szerint az olajat belsőleges gyógyszerformában még nem formulálták.

Zhu és mtsai (Zhu és mtsai. 2014) vizsgálták a szilimarin olaj antioxidáns és öregedés gátló hatását D-galaktóz-(D-gal)-lal kezelt egéren. A szilimarin olajat 7 héten keresztül, szájon át adagolták az állatoknak, amely csökkentette a triglicerid és koleszterin szintet, ugyanakkor a szuperoxid dizmutáz, glutation peroxidáz szintet valamint a teljes antioxidáns kapacitást növelte.

A máriatövis növény magjából kinyert olaj antioxidáns hatását is kimutatták patkány májszövetében szén-tetraklorid toxicitás után. Az olaj nagy koncentrációban (2000 mg/kg) csökkentette a lipid-peroxidációt és növelte a kataláz enzimaktivitást (Batakov és mtsai. 2001).

Hermenean és mtsai (Hermenean és mtsai. 2015) egéren vizsgálták a szilimarin olaj hatását szén-tetraklorid indukció okozta májkárosodásban. Az eredmények szerint a szilimarin olaj előkezelés kivédte a szén-tetraklorid okozta oxidatív stresszt és a májkárosodást. A szilimarin olaj előkezelés javította a májenzim, antioxidáns enzim értékeket a szén-tetraklorid expozíció után.

2.3.2. Szilimarin por belsőleges hatása

A *Silybum marianum* magjának szilárd kivonatát (szilimarin por) már évszázadok óta használják különböző máj és epebántalmakra. Napjainkban legelterjedtebben, mint májvédő alkalmazzák, az orvostudományi adatbázisban több mint ezer közlemény bizonyítja májvédő hatását (Gazák és mtsai. 2007, Luper 1998). Ezen irodalmi adatok alapján a szilimarin hatóanyag akut és krónikus májkárosodások megelőzésére, de a már kialakult májgyulladás, májcirrózis esetén is kifejezetten hatásos (Flora és mtsai. 1998).

Alkalmazzák alkoholizmus miatt kialakult májzsírosodásban, alkohol vagy vírus eredetű hepatitiszben (Hackett és mtsai. 2013). Hatásos szer gombamérgezésben, illetve más hepatotoxikus anyaggal szemben. Kompetitív gátolja a mérgezőanyagok bejutását a májsejtbe, segíti és gyorsítja a májsejtek regenerálódását, csökkenti a toxinok okozta szabadgyökök mennyiségét (Fraschini és mtsai. 2002). A szilimarin terápia védi a májsejteket különböző károsító hatás ellen, mint iszkémia, sugárzás, vastúlterhelés (Ramasamy és Agarwal 2008).

2.3.3. A szilimarin biohasznosulása

A flavonoidok rossz felszívódása két okra vezethető vissza. Az egyik az, hogy többgyűrűs szerkezetük van, amely túl nagy ahhoz, hogy egyszerű diffúzióval szívódjon fel, ugyanakkor aktív felszívódásuk sem jön létre. A második ok a flavonoid molekulák rossz elegyedése olajokkal és más lipidekkel, amely akadályozza speciális gyógyszerformák kialakításának lehetőségét, és átjutásukat a lipidekben gazdag membránokon.

A máriatövis hatóanyagainak, mint az említett flavonoidoknak, rossz a biohasznosulása, melynek két fő oka van, a fázis II metabolizáció nagy mértéke és a hatóanyag rossz vízoldékonysága (5. ábra) (Csopor D. 2013). Mindezek mellett a szilimarinnak alacsony a permeabilitása a vékonybél epitel sejtjein, ami szintén csökkenti a biohasznosulást (Javed és mtsai 2011). Patkányon végzett kísérletekben a szájon át beadott szilibin mennyiségének csupán 0,95%-a hasznosul (Javed és mtsai 2011). Hasonló eredményt írtak le Wu és munkatársai (Wu és mtsai. 2007) szilibin orális bevitele után 0,73 % biohasznosulást detektáltak patkány plazmában. Szilimarin

rossz vízdékonysággal rendelkezik (0.04 mg/ml). Az oldékonysága a következőképp alakul más oldószerben: transcutol (350,1 mg/ml), etanol (225.2 mg/ml), poliszorbát 20 (131.3 mg/ml), gliceril monooleát (33.2 mg/ml) (Javed és mtsai. 2011). A szilimarin a biofarmáciai osztályozási rendszer szerint a IV. osztályba tartozik (rossz oldékonyság, rossz permeabilitás), alacsony a biohasznosulása, amely sokszor gátat szab felhasználásnak, hiába mutat kedvező terápiás lehetőségeket. Az utóbbi években számos kutatás irányult arra, hogy a szilimarin biohasznosulását növelje, megváltoztassa az flavonoid-komplex oldékonyságát, permeabilitását, metabolizmusát és kiválasztását.



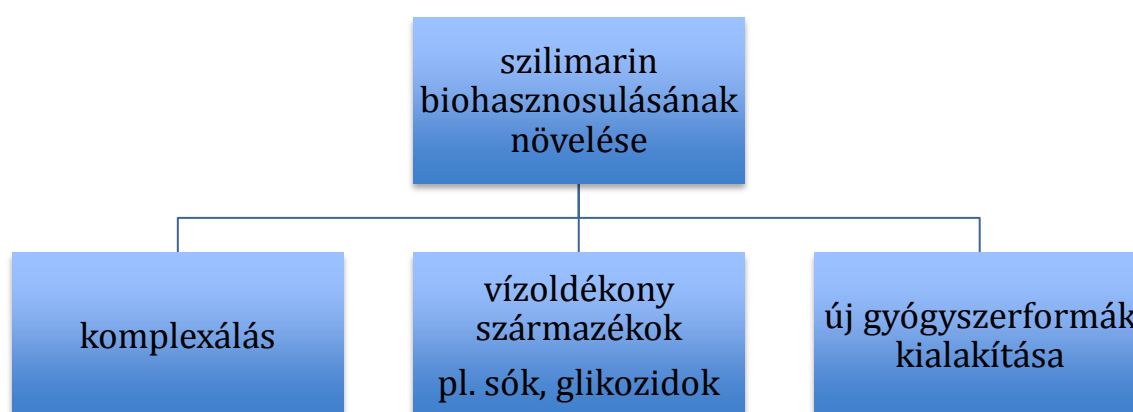
5. ábra. A szilimarin alacsony biohasznosulásának okai (Javed és mtsai 2011)

2.3.4. Szilimarin biohasznosulásnak növelése

Habár disszertációm anyagában nem szerepel a szilimarin por belsőleges gyógyszerformába történő felhasználása, de szerettem volna egy irodalmi áttekintést adni arról, hogy eddig milyen módszereket alkalmaztak arra, hogy a biohasznosulását növeljék.

A szilimarin por kedvezőbb biohasznosulása érdekében számos megoldást találhatunk az irodalomban. Jelentős mennyiségű adat bizonyítja, hogy a szilimarin sokkal kedvezőbb farmakokinetikai paramétereket mutat jól felszívódó származékok (pl. sók, glikozidok) esetében, illetve megfelelő gyógyszerformában, mint liposzómába ágyazva, szilárd diszperzióban, nanorendszerben stb. (6. ábra).

A következő fejezetben, röviden áttekintem azokat a fejlesztéseket, melyek a szilimarin belsőleges felhasználásának nehézségeit próbálták megoldani.



6. ábra. A szilimarin biohasznosulásának növelése

2.3.4.1. *Komplexált szilimarin képzése*

Komplekxképzés Foszfadilkolinnal

A máriatövis extraktum biohasznosulása növelhető, ha komplexképző segédanyaggal kombináljuk. A szilibin foszfadilkolinnal komplexálva növeli az orális

biohasznosulást emberben (Barzaghi és mtsai. 1990, Morazzoni és mtsai. 1992, 1993, Yanyu és mtsai. 2006). A komplexált szilibinnek nő a felszívódása, a biohasznosulása tízszer jobb, mint a nem komplexált szilibinnek, ezáltal csökkenthető a terápiás dózis (Kidd és Head 2005). Számos országban forgalomban van a Siliphos® néven védjegyzett készítmény, amely 1 rész szilibin, két rész foszfatidilkolin komplexet tartalmazó stabil gyógyszerforma. Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a készítmény hatásosabb a nem komplexált formában lévő szilibinnél számos májbetegségben, mint akut vírusos hepatitisz A, B, alkoholos hepatitisz (Kidd és Head 2005, Hackett és mtsai. 2013).

Kompleképzés β -ciklodextrinnel

Állatkísérletek bizonyítják, hogy a ciklodextrinek is alkalmasak a szilimarín biohasznosulását növelni (Voinovich és mtsai. 2009).

Arcari és munkatársai (Arcari és mtsai. 1992) kísérleteik során kimutatták, hogy a szilibin- β CD komplex nagymértékben növelte a hatóanyag felszabadulását, összehasonlítva a nem komplexált szilibininnel.

2.3.4.2. Vízoldékony szilimarín származék képzése

Jelentős fejlesztésnek bizonyult a szilibin vízoldékony sójának, a szilibinin-C-2,3-dihidrogén-szukcinát dinátrium előállítás (Mira és mtsai. 1994). Magyarországon forgalomban lévő készítmények közül a Legalon Sil® 10 mg/ml porampulla hatóanyaga a szilibinin-C-2,3-dihidrogén-szukcinát dinátriumot tartalmaz, mely intravénás injekció formájában beadható gyógyszer. A készítmény gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) mérgezés esetén alkalmazható. A leggyakrabban előforduló gombatoxin az *Amanita* fajban előforduló amanitin és falloidin, mindkét polipeptid redkívvül mérgező tulajdonságú. Az amanitin a DNS függő RNS polimeráz (II) gátlása során a fehérjeszintézist megakadályozza, míg a falloidin a májsejtek plazmamembránjával lép reakcióba (Fürst 1998). A szilimarín a sejtmembránok fehérjéihez kapcsolódik, megakadályozza a gombatoxinok bejutását a sejtekbe az OATP2 falloidintranszporter kompetitív gátlásával (Menges et al. 2012).

2.3.4.3. Szilimarin hatóanyag-tartalmú úszó pezsgőtabletta formulálása

Garg és Gupta szilimarin hatóanyag-tartalmú úszó pezsgőtablettát formulált, melynek gyomorban töltött ideje hosszabb volt, a szilimarin biohasznosulása javult és a betegcompliance szintén jobb eredményeket mutatott a hagyományos tablettával szemben (Garg és Gupta 2009).

2.3.4.4. Szilimarin hatóanyag-tartalmú lágy zselatin kapszula formulálása

Egy vizsgálat során összehasonlították a lágy és kemény zselatin kapszulába töltött szilibint. Cross-over, randomizált vizsgálatot végeztek 12 egészséges emberen. A lágy zselatinkapszulában 80 mg, 1:2 arányban szilibint komplexáltak foszfatidilkolinnal. A szilimarin háromszoros C_{max} és kétszeres AUC₀₋₁ értékeket mutatott lágy zselatin kapszulában, mint önmagában (Savio és mtsai 1998).

2.3.4.5. Szilimarin liposzómába történő ágyazása

Növényi eredetű anyagok liposzómába ágyazása megváltoztatja azok farmakokinetikai paramétereit, növeli a féléletidejüket és hatásukat (Chen és mtsai. 2012, Saraf 2010). A szilimarin liposzómában történő alkalmazására főként olyan adatokat találunk, melyek állatkísérleten alapulnak. A publikációkban leírtak alapján feltételezhetjük azt, hogy a biohasznosulás jeletősen növelhető, a liposzóma előállítási technikájától függően. Maheshwari és munkatársai (Maheshwari és mtsai 2003) alkohol-injektálás módszer segítségével szilibint ágyaztak liposzómába. A technológia célja, hogy liposzóma struktúrába inkorporált szilimarin hatását növeljék, adagolása biztonságos legyen, de e mellett célzott hatást érjenek el a májsejtekre. Az in vivo eredmények szerint egészen 55%-os hepatoprotektív hatást mutatott a szilibin-liposzóma gyógyszerforma. A szilimarin önmagában csak 33%-os, ugyanakkor a hatóanyag nélküli liposzóma 24%-os hatást mutatott, mivel a liposzómák önmagukban is mutatnak hepatoprotektív hatást a foszfolipid tartalmuk miatt (Maheshwari és mtsai 2003, Javes S. 2011).

2.3.4.6. Szilimarín szilárd diszperzióba történő inkorporálása

A hatóanyag szilárd diszperzióba történő inkorporálása segíti a nedvesíthetőséget, az egyenletesen elosztott kisméretű diszpergált részek miatt nő az oldhatóság és javul a biohasznosulás (Vasconcelos és mtsai 2007), melyre szilimarín tartalmú hatóanyag esetén is találhatunk megfigyeléseket. Sun és munkatársai szilimarín/polivinilpirrolidon szilárd diszperziós pelletet formuláltak, fluidizációs bevonással. Szájon át történő bevétel után (kutyában) ötször jobbnak bizonyult a pelletek relatív biohasznosulása mint a szilibin szuszpenzióknak (Sun és mtsai. 2008). Egy vizsgálat során szilimarín- β CD szilárd diszperziós tablettát formuláltak közvetlen préseléssel. Különböző koncentrációban alkalmaztak szuperdezintegránsokat, mint croscarmellóz-Na, Na keményítő glikolát és poliplasdone a formuláláshoz. Mindegyik készítmény jobb eloszlást mutatott a hagyományos készítményekkel szemben (Javed és mtsai 2011, Chen és mtsai 2005).

2.3.4.7. Szilimarín- szilárd lipid nanorészecskék előállítása (SLN)

Hasonló eredményeket tapasztaltak, ha szilimarín- szilárd lipid nanorészecskéket állítottak elő (He J. és mtsai. 2005). Szilimarín szuszpenzióval összehasonlítva szilimarín-lipid nanorészecske magasabb biohasznosulást mutatott szájon át történő bevétel után (He J. és mtsai. 2005, Javed és mtsai. 2011). Akár lassú felszívódást biztosító rendszer is előállítható szilárd lipid nanorészecskéket alkalmazva (Zhang és mtsai. 2007).

2.3.4.8. Szilimarinnal töltött mikroszférák kialakítása

Szilimarinnal töltött lipid mikroszférát formulált Abrol és mtsai (Abrol és mtsai. 2004). A gyógyszerforma kialakításakor a tenzid szójalecitin a kotenzidek span 20, tween 20, tween 80 és propilén glikol volt. A szilimarín mikroszférákból 36 óra elteltével 56% volt a gyógyszerfelszabadulás, míg a sima szilimarín propilén glikol oldatból csupán 18% (Abrol és mtsai 2004).

2.3.4.9. Szilimarinnal töltött polimer micellák kialakítása

Wu és munkatársai amfifil -szilimarinnal töltött - citozán micellákat formuláltak, melynek alkalmazása során a szilimarin felszívódása lényegesen magasabb volt a szilimarin szuszpenzióval összehasonlítva. (Wu és mtsai 2009)

2.3.4.10. Szilimarin nanoemulzió és nanoszuszpenzió formulálása

Parveen és munkatársai szilimarin tartalmú nanohordozó rendszert formulált, mellyel növelte a szájon át történő adagolás utáni biohasznosulást. A nanoemulzió farmakokinetikai paraméterei kedvezőbbek voltak, mint a szilimarin szuszpenzióknak (AUC négyszeres, C_{max} hatszoros értéket mutatott) (Parveen és mtsai. 2011, Javed és mtsai 2011).

2.3.4.11. Szilimarin por-SMEDDS formulálás

Az irodalomban nagyszámú lipofil, szilárd hatóanyagtartalmú gyógyszerformulációt találhatunk ön(mikro)emulgeáló rendszerben. A *Silybum marianum* magjából nyert szilárd szilimarin por SMEDDS gyógyszerformába vitelére is találhatunk néhány vizsgálatot, mely növelte a növényi kivonat relatív biohasznosulását szájon át történő bevétel esetén (Wei és mtsai. 2006).

Ez a gyógyszerforma azért is fontos számunkra, mert hosszú távú tervünk az, hogy a szilárd szilimarin tartalmú port önemulziós rendszerbe juttassuk be a szervezetbe.

Wu munkacsoportja több önmikroemulgeáló rendszer kialakításával próbálta növelni a szilimarin bejuttatását: Tween 80, etil-alkohol és etil linoleate segédanyagok segítségével megfelelő méretű részecskéket sikerült előállítani. A nyúlón végzett vizsgálatokban a szilimarin tartalmú SMEDDS készítmények farmakokinetikai paraméterei és a biohasznosulása jobbnak bizonyult a szilimarin szuszpenzióknál és oldatnál (polietilén glikol 400-ban oldott szilimarin) egyaránt (Wu és mtsai 2006).

Egy másik kísérlet során olaj fázisként gliceril-monooleát-ot, emulgensként polysorbát 20 és polioxietilén-50-hidrogénezet ricinusolaj keveréket, kotenzidként pedig transcutoolt használtak. A készítményt a Legalon kapszulával hasonlították össze, patkányban a hatóanyag biohasznosulása 3,6-szor magasabb értéket mutatott. Az

összetétel hátránya az, hogy vízzel véges az elegyedése, ami nem ideális orális bevitele esetén (Woo 2007).

Liu és munkatársai szintén SMEDDS-szilimarint formuláltak (Liu, 2007). A formulálásnál az olaj komponens etil-oleát: MCT 1:1 arányú keveréke (MCT: közepes láncosságú glicerid származék), a felületaktív anyag Cremophor EL és a kotenzid Transcutol P volt. A szilimarín felszabadulás a SMEDDS gyógyszerformából magasabb értékeket mutatott, összehasonlítva a hagyományos Legalon kapszulával és a Yiganling tablettával (Liu 2007).

Optimális szilimarín- SMEDDS gyógyszerformát alakítottak ki etil-linoleate/ Cremophor EL/ etil-alkohol felhasználásával Li munkacsoportja (Li és mtsai 2010). A készítmény in vitro hatóanyag felszabadulása jobb és gyorsabb volt a Legalon kapszulához viszonyítva. Az in vivo vizsgálatokat hím keverék kutyákon végezték, a szilimarín-SMEDDS biohasznosulása szignifikánsan magasabb volt a Legalon kapszulához képest (Li és mtsai 2010).

2.3.5. Olajok formulálása SMEDDS-ben

Nagyon kevés irodalmi adat található arra vonatkozóan, hogy ön(mikro)emulgeáló rendszerben az olaj komponens nemcsak segédanyagként, de hatóanyagként is jelen van. Zhao és mtsai a zedoária gyógynövény gyöktörzséből kivont kurkuma olajból formulált SMEDDS készítményt. A következő összetétel volt a legoptimálisabb a formuláció során: kurkuma olaj, etil-oleát, Tween 80, Transcutol P (30,8:7,7:40,5:21 v/v), ehhez még további 30% kurkuma olajat adtak. Vízzel hozzáadás után a kialakult átlagos cseppméret $68,3 \pm 1,6$ nm volt. A kurkuma olajból formulált SMEDDS készítményt és a kurkuma olajat önmagában hasonlították össze per os adagolást követően. Patkányban az AUC és a C_{max} értékek is magasabbnak bizonyultak a SMEDDS készítmény adagolása után (Zhao és mtsai 2010).

2.3.6. Ön(mikro)emulgeáló rendszerek

A SMEDDS rendszer fejlesztése is lehetőséget nyújt arra, hogy a szilimarín por biohasznosulását növeljük, ahogy említettem a jövőben szeretnénk olyan ön (mikro) emulziós rendszert fejleszteni, melyben a szilimarín szilárd formában van jelen. Ezért, kísérleteink első felében szilimarínolajat tartalmazó ön(mikro)emulgeáló rendszert alakítottunk ki, melyben a szilimarín olaj a gyógyszerforma olajos komponense és egyben hatóanyaga is volt. Disszertációmban fontosnak tartom azt, hogy az önemulgeáló rendszerek kialakításának szempontjait részletesen ismertessem.

Az önemulgeáló rendszerek izotróp keverékek, melyek olajból, tenzidből és/vagy kotenzidből állnak, vizet nem tartalmaznak. Vizes közegben o/v emulzió képződik minimális energiabefektetés hatására. A gasztrointesztinális traktus motilitása is elegendő energiát adhat a rendszer kialakításához. A kialakult részecskeméret szerint megkülönböztetünk önemulgeáló SEDDS (Self emulsifying drug delivery system) gyógyszerformát, melynek mérete 100-50 nm és ön-mikroemulgeáló rendszereket SMEDDS (Self –microemulsifying drug delivery system), amelyek mérete 50 nm alatt van (Pouton 1997, 2000, Constantinides 1995, Shah 1994).

Vízben nehezen vagy nem oldódó hatóanyagok orális bevitelére alkalmas lehet az ön(mikro)emulgeáló rendszerek alkalmazása (Lawrence és Rees 2000). Növeli a biohasznosulást a gasztrointesztinális szolubilizáció révén. Egyéb előnyük, hogy csökkenthető a hatóanyag dózisa, célzott hatás érhető el a gasztrointesztinális traktus lehetséges abszorpciós felületének kiválasztásával, valamint védik a hatóanyagot a gyomor- bélrendszer környezetével szemben (pl. savak, enzimatis lebonítás) (Javed és mtsai 2011, Panapisal és mtsai. 2012).

Minél kisebb a cseppméret az önemulgeáló rendszerben, annál nagyobb felületet biztosít a hatóanyag abszorpciójának és segíti a farmakon gyors eljutását a nyálkahártyához. A lipid fázis tovább befolyásolja a hatóanyag abszorpcióját, segíti annak biohasznosulását. (Aulton 2013).

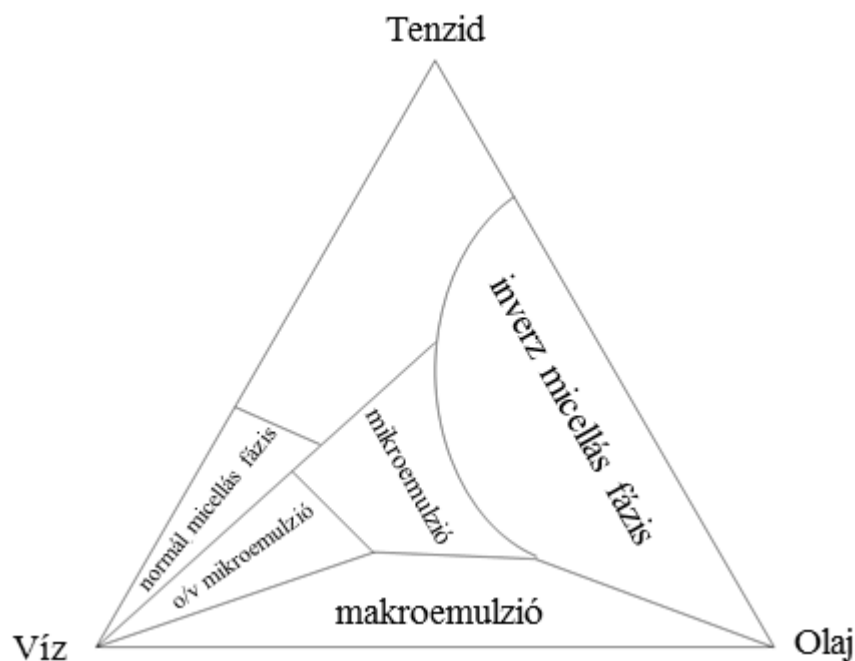
A hatóanyag felszabadulását befolyásolja a farmakon olaj/víz megoszlási koefficiense és a cseppméret (Sagar és Anderson 2008).

A SMEDDS-ből képződő mikroemulziók termodinamikailag stabilak, ennek feltétele, hogy a két egymással nem elegyedő folyadék határfelületi feszültsége közel 0 legyen, melyet a felületaktív anyagok biztosítanak. (Tan és mtsai. 2011)

A mikroemulziók szubmikroszkopikus diszkontinuitásokat tartalmazó kolloid rendszerek, o/v vagy v/o emulziók. A diszkontinuitások mérete jóval kisebb, mint a látható fény hullámhossza, ezért fényszóródás szabad szemmel nem, vagy csak alig észrevehető mértékben figyelhető meg, így a mikroemulziók átlátszóak (transzparenszek), de legalábbis áttetszőek (transzlucensek). A rendszer azon összetételét, ahol az önemulgeálódás maximálisan létrejön, fázisdiagramok segítségével határozhatjuk meg (7. ábra) (Sujoy és mtsai 2013). A háromszögdiagramokon feltüntetett három komponens a víz, az olaj és a megfelelő tenzid. A tenzidkomponens koncentrációja a segédtenziddel alkotott együttes koncentrációját jelenti. Hasonlóan a víz, mint komponens jelenthet adott koncentrációjú elektrolitoldatot, az olaj pedig különféle szénhidrogének elegyéből is állhat. A fázisdiagram háromszögének mindhárom csúcsa a komponensek 100%-át jelöli.

A fázisdiagram szerkesztése legtöbbször víz titrálási módszer (víz hígítási módszer) segítségével történik. Meghatározott mennyiségű tenzid, kotenzid és olaj keverékhez, adott hőmérsékleten folyamatosan, cseppenként adagoljuk a vizet állandó keverés mellett. Szabad szemmel megállapítható, hogy a keverék mikor lesz tiszta, átlátszó, illetve újra zavaros. A háromszögdiagram segítségével követhetjük, hogy mi játszódik le a rendszerben. A diagramon jegyzett koncentráció értékek kialakítják a mikroemulziós területet. A tiszta, átlátszó keveréket mikroemulziónak, ugyanakkor a kevésbé átlátszó, esetleg zavaros keveréket emulziónak definiáljuk (Liu és mtsai 2007). Az 7. ábra szemlélteti a mikroemulziós rendszer elhelyezkedését a háromszögdiagramon belül, illetve látható hogyan kapcsolódik közvetlen a normál és inverz micelláris rendszerekhez, valamint a makroemulziókhoz.

A SMEDDS készítményeknél az önemulgeálódást követően az egyik legfontosabb vizsgálat, hogy megállapítsuk a diszperz fázis cseppjeinek méretét. Az egyik ilyen módszer, hogy dinamikus fénymikroszkóp (DLS) segítségével meghatározzuk a diszperz fázis cseppjeinek átmérőjét, amely igazolja a mikroemulzió létrejöttét. Munkánk során a szilimarinolajat tartalmazó SMEDDS gyógyszerforma cseppméretét dinamikus fénymikroszkóp segítségével határoztuk meg és igazoltuk a mikroemulzió létrejöttét.



7. ábra. A mikroemulziós rendszer elhelyezkedése a terner rendszerben (forrás: Ujhelyi Z. Értekezés. 2014)

2.3.7. S(M)EDDS formulálásnál alkalmazott segédanyagok

Az **olaj** komponens segíti az önmulgeálást, segítheti a hatóanyag abszorpcióját a GI traktusból. A formulálásnál főleg természetes olajokat és hosszú láncú triglicerideket alkalmaznak (Gowri és mtsai 2012).

Az olaj komponens elősegíti a hatóanyag intesztinális limfatikus transzportját (Dixit és mtsai 2010). Ennek a komponensnek a tulajdonsága és aránya határozza meg leginkább az önmulgeáló rendszereket. Ugyanakkor az is bizonyított, hogy maga a gyógyszerforma az olaj komponens abszorpcióját és terápiás hatását is növelheti. (Zidan és mtsai 2007, Gang és Yan 2011).

A **felületaktív anyag(ok)** közül a nemionos felületaktív anyag(ok) választása előnyös, mivel azok enyhe, visszafordítható változásokat okoznak az intesztinális fal permeabilitásában. Ennek az összetevőnek a koncentrációja általában: 30-60 % a gyógyszerformában (Gowri és mtsai 2012). Amfifil tulajdonságuk révén a hidrofób komponenseket szolubilizálják, megakadályozzák a hatóanyag bomlását, hosszantartó hatást érhetünk el. A tenzid természete és koncentrációja határozza meg a vizes közegbe kerülés után a cseppméretet.

A harmadik segédanyagcsoport a **kotenzidek**. Céljuk, a nagyobb hidrofil felületaktív anyagok vagy hidrofób hatóanyagok oldása a lipid fázisba. Pl. Dietilén glikol monoetil éter, polietilén glikol. A kotenzid koncentrációjának növelése, segíti a hatóanyag felszabadulását a gyógyszerformából (Gowri és mtsai 2012).

2.4. A szilimarin hatóanyagainak külsőleges hatása és a külsőleges gyógyszerforma kialakításának szempontjai

2.4.1. A szilimarin por külsőleges hatása

A belsőleges terápiás hatás mellett a szilimarin por külsőleges alkalmazásáról és hatásáról is számos leírást találunk. A máriatövis magból nyert szilárd kivonatról megállapították, hogy fényvédő hatással rendelkezik és védelmet nyújt az UV sugárzás okozta bőrkárosodások ellen (Katiyar 2002, Narayanapillai és mtsai. 2012). Bőrön alkalmazott szilimarin készítmények segíthetik a napégés elleni készítmények védelmét valamint hatásos lehet olyan bőrbetegségek kezelésében, amelyeknél az UV sugárzás gyulladást és oxidatív stresszt okoz (Couteau és mtsai 2012, Campanini és mtsai 2013).

Ezen kívül gyorsítja a sebgyógyulást, lassítja a bőröregedést, rosaceae kezelésben csökkenti a bőr kipirosodását és bőrfehéřítő hatás is van (Aliabadi és mtsai. 2011, Rasul és Akhtar 2012, Rasul és mtsai. 2011, Nield és Ippersiel 2002)

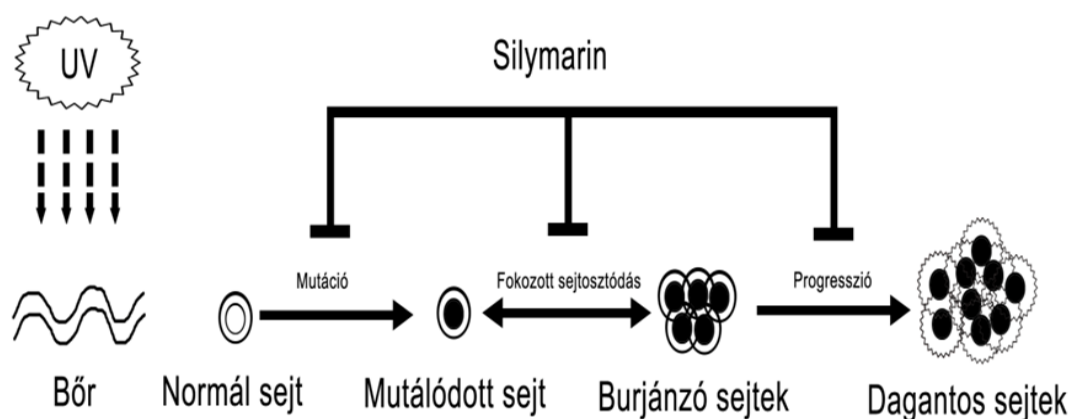
A máriatövis extraktum külsőleges alkalmazása is főleg a kiváló antioxidáns hatásán alapszik, mely a terápiás felhasználásnak alapja. Az antioxidáns hatás több szinten is érvényesül, egyrészt a szilimarin direkt szabadgyökfogó képességén. Ugyanakkor, megakadályozza a szabadgyökök és reaktív oxigén gyökök (ROS) képződését úgy, hogy gátolja a speciális ROS képző enzimeket. Befolyásolja az intracelluláris glutation szintet, amely megakadályozza a membránok lipidperoxidációját (Vargas Mendoza és mtsai. 2014). E mellett javítja a mitokondrium integritását stresszben. Optimális redox egyensúlyt tart fenn a sejtben, aktiválja az antioxidáns enzimek és nem enzimátikus antioxidánsok képződését, főleg az Nrf2 aktivációja révén. Ezt a mechanizmust tartják a szilimarin legfőbb antioxidáns útvonalának (Surai 2015).

Az általunk áttekintett tudományos publikációk nagy részében a *Silybum marianum* magjából nyert szilárd kivonat külsőleges hatását úgy vizsgálták, hogy a szilimarin port valamilyen oldószerben feloldották és a bőrön így, és nem gyógyszerformába ágyazva applikálták.

Katiyar és munkatársai a szilimarin port acetonban oldották és vizsgálták külsőleges hatását az UVB sugárzás okozta bőrrák kialakulása ellen. A kísérleteket SKH-1 szőrtelen egeren végezték. A vizsgálatok szerint csökkent a tumor kialakulása, terjedése

és a tumor mérete is a kezeletlen csoporthoz képest (Katiyar és mtsai. 1997). Egy másik kísérletsorozatban azt is megállapították, hogy a szilimarin por külsőleges alkalmazása az UV sugárzás által kiváltott hidrogén-peroxid és nitrát-oxid képződést is gátolta az egér epidermisz és dermiszben egyaránt (Katiyar 2002).

Az UV sugárzás okozta bőrrák, másnéven fotokarcinogenezis kialakulásának összetett folyamata három szakaszra különíthető el (8. ábra). A tumor kifejlődésének kiinduló lépése egy mutáció okozta sejtszintű elváltozás, mely háttérében a genotoxikus UV sugárzás áll. Ezután a mutálódott sejt osztódásnak indul, aminek következtében elburjánzik és jóindulatú daganat alakul ki, azonban a tumor ebben a fejlődési szakaszában még visszafordítható. Végül a tumor progressziója zajlik le, mely során az addig benignus sejtburjánzás transzformáció útján malignus daganattá alakul, ez az átalakulás azonban csak további genotoxikus hatás eredményeként következik be. A szilimarin helyi alkalmazásával erősen gátolható az UV sugárzás okozta daganatok kialakulásának mindhárom lépése, vagyis a teljes karcinogenezis (Vaid és Katiyar 2010, Katiyar 2005).



8. ábra: UV sugárzás okozta bőrrák kialakulásának sematikus ábrázolása, a szilimarin hatása az UV sugárzás okozta bőrdaganatok kialakulására (Vaid és Katiyar 2010)

2.4.2. Szilimarín porból formulált külsőleges készítmények

Az irodalmi adatokat áttekintve, csak néhány külsőleges készítmény és rendszer található, amelynek hatóanyaga szilimarín port tartalmaz. A feltüntetett adatokból sajnos nem derül ki egyértelműen az, hogy a hatóanyag részlegesen, vagy teljesen oldott, illetve szuszpendált állapotban van-e jelen a készítményben.

2.4.2.1. *Leviaderm®*

Szilimarín port tartalmazó, Németországban forgalomban lévő készítmény a Leviaderm®. A krém összetételében a Silybum marianum extraktum mellett található még szőlő, málnavész virág, árpa extraktum, bisabolol (kamilla illóolaj egyik komponense), E-vitamin és Adelmidrol, amely az azelainsav etanolamid származéka. Mellrákban szenvedő, a műtét után sugárkezelést kapott betegeknél vizsgálták a Leviaderm® hatását a kezelés során kialakult bőrgyulladás kezelésében. A szilimarín tartalmú krémet egy pantenol tartalmú krémmel hasonlították össze. Az 5. hét elteltével a Leviaderm® készítménnyel kezelt betegeknél a Grade II. fokozatú bőrgyulladás csak a betegek 9,8%-ban jelentkezett, míg a pantenol tartalmú krémmel kezelték 52%-nál alakult ki. A sugárterápia végén a Leviaderm® krémet használt betegek 23,5%-nak nem alakult ki semmilyen bőrtünete ugyanakkor csupán 2%-volt ez az érték a pantenol tartalmú krémet használóknál (Becker-Schiebel és mtsai 2011). A biológiai hatás igazolása mellett nem állapítható meg az, hogy a szilimarín részlegesen oldott, vagy szuszpendált formában van-e jelen ebben a készítményben.

2.4.2.2. *Organogél formulálása szilimarín porból*

Szilimarín por hatóanyagtartalmú organogéleket formuláltak Pluronic 127 és lecitin felhasználásával és vizsgálták a gél hatását atópiás dermatitiszben. A szilimarín port etil-alkoholban vagy DMSO-ban oldották és a gél vizes fázishoz elegyítették. A klinikai vizsgálatok szerint a szilimarín tartalmú gél csökkentette a bőrpírt, duzzadást és a gyulladás mértékét is a betegek bőrén (Mady és mtsai 2016).

2.4.2.3. v/o emulziós krém formulálása máriatövis mag etanolos kivonatából

A *Silybum marianum* etanolos extraktumát v/o emulziós rendszerű krémbe formulálták. A krém olajos fázisa paraffin olajat (14%) és emulgensként ABI® EM90 (2%) nemionos felületaktív anyagot tartalmazott. A vizes/alkoholos fázis tartalmazza a szilimarint. A krém bőröregedés gátló hatását 12 hétig tartó kezelés alatt és közben vizsgálták egészséges emberek bőrén, az átlagéletkor 46 év volt. A szilimarint krém külsőleges alkalmazása során a TEWL értékek csökkentek, vagyis a bőr nedvességtartalma javult. Ezen kívül a bőr mechanikai tulajdonságai is javultak, a bőr kevésbé volt érdes, puhasága nőtt és a ráncok is csökkentek (Rasul és mtsai 2012).

2.4.3. A kenőcsformulálás szempontjai

Munkánk második felében a célunk szilimarint port tartalmazó kenőcs előállításának és biológiai hatásának vizsgálata volt. A megfelelő hatóanyagleadó rendszer kialakításához fontos ismernünk a kenőcsstervezés általános szempontjait, amit ebben a fejezetben szeretnénk ismertetni.

A kenőcsök összetételének tervezésekor, ahhoz hogy a megfelelő hatást elérjük, három dolgot figyelembe kell vennünk. A megfelelő terápiás eredményt a hatóanyag, a vivőanyag és a bőr együttes hatása alakítja ki (Nino és mtsai. 2010).

A **hatóanyag** szempontjából figyelembe kell venni annak koncentrációját, oldékonyságát, penetrációs és diffúziós képességét egyaránt. Oldott farmakon felszívódása a kenőcsből függ a hatóanyag kezdeti koncentrációjától, annak diffúziós állandójától és az alkalmazás időtartamától (Higuchi 1960). Ugyanakkor szuszpendált hatóanyag esetén a farmakon felszívódása a kenőcsből ezen paraméterek mellett még a farmakon kenőcs fázisban lévő oldhatóságától is függ. Amennyiben a hatóanyag felszabadulási rátája nő a megfelelő formuláció segítségével, a perkután abszorpcióban is javulás mutatkozhat (Higuchi 1961). Ezen kívül a növényi kivonatok gyógyszerforma tervezésénél figyelembe kell venni, hogy a kivonatok hatóanyaga a növény származásától, gyűjtési idejétől nagyban függ. Jól ismert az a tény is, hogy a növényi kivonatok több tíz vagy akár száz komponensből álló anyagkeverékek, melyek számos hatással rendelkeznek. A komponensek frakcionálása vagy izolálása megbonthatja az optimális egyensúlyt, ami a hatás csökkenésében, esetleg a toxicitás növekedésében nyilvánulhat meg (Hudaib és mtsai. 2002; Prajapati és mtsai. 2009).

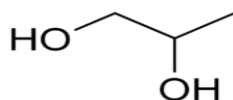
Napjainkban már meglévő növényi hatóanyagok újratervezett formulációja sokszor a terápiás hatás növekedését okozhatja.

A **vivőanyag** összetétele két részből tevődik össze, az alapanyagból és a segédanyagokból. Az **alapanyag** saját hatása, bőrbe való behatolási képessége is hozzájárul a terápiás hatás kialakulásához. Nagyon fontos hogy milyen típusú alapanyagot választunk a formulálásnál. Kísérleteinkben o/v emulziós rendszerű krémeket formuláltunk. Célunk az volt, hogy lágy konzisztenciájú, könnyen felkenhető krémeket állítsunk elő, melyek hatóanyagleadása kedvező. Az o/v emulziós rendszerű krémek könnyen felszívódó, vízzel lemosható, tetszetős küllemű készítmények, ezért a betegcompliance is megfelelő. Nagy mennyiségű (60-80%) emulgeált vizet tartalmaznak, melyhez egy vagy több felületaktív anyagra is szükség van az összetételben. Számos előnye van az emulziós krémeknek. A legfontosabb tulajdonságuk, hogy a gyógyszerleadásuk jobb, mint a vízmentes rendszereké és megfelelő emulgens kiválasztásával a hatóanyag penetrációját tovább segíthetjük (Rácz I. és Selmeczi B. 2001).

A **segédanyagok** közül a felszívódást elősegítő segédanyagok alkalmazása jelentős mértékben befolyásolhatja a hatóanyag penetrációját. A külsőleges készítményeknél és a transzdermális terápiás rendszereknél széles körben alkalmazják a penetráció fokozó segédanyagokat a formulálás során. A kémiai penetrációfokozó anyagok alkalmazásával reverzibilisen lehet megnyitni a stratum corneum szigorúan rendezett szerkezetét (Liu X. És mtsai. 2017)

Chattaraj és Walker (1995) 10 csoportba sorolja a penetráció fokozókat kémiai szerkezetük alapján: szulfoxidok, alkoholok, poliolkok, zsírsavak, zsírsav-észterek, amidok, felületaktív anyagok, terpének, alkánok és szerves savak (Chattaraj és Walker 1995).

A **propilénglikol** 3 szénatomos dialkohol a kozmetikai és a gyógyszeriparban főképp oldószerként alkalmazzák (9. ábra). Külsőleges dermális készítményekben a leggyakrabban ko-szolvensként használják. Penetrációt növelő hatását számos esetben leírták, a lipofil hatóanyagok bőrön keresztüli átjutását segítik. Kimutatták, hogy hatással van egyes gyógyszerek termodinamikus aktivitására is. A propilénglikol a felületaktív anyagokkal együtt jobban segíti a hatóanyag felszívódását (Trommer és Neubert 2006).



9. ábra. Propilén-glikol kémiai szerkezete

A **Transcutol** (dietylén glikol monoetil-éter) egy szintelen, átlátszó, higroszkópos folyadék, melyet az iparban elsősorban oldószerként használnak, azonban számos hatóanyag számára hatásos szolubilizálószer, mivel poláris és apoláris oldószerekkel is elegyedek (10. ábra) (Csizmazia és mtsi. 2011).



10. ábra Transcutol kémiai szerkezete

A Transcutol bőrön keresztüli penetráció fokozó hatással rendelkezik, mivel vizet abszorbeál a bőr mélyebb rétegeiből, így a stratum corneum, azaz a bőr legkülsőbb rétegének víztartalmát növeli. Ez a víztartalom növekedés a stratum corneum megduzzadásával jár, így az intercelluláris lipidek úgy képesek egymástól eltávolodni, hogy ez a szerkezetük megváltozásával járna. Az egymástól történő eltávolodással csökken a bőrön keresztüli diffúziós ellenállás, így a hatóanyag könnyebben jut be a bőr mélyebb rétegeibe a Transcutol alkalmazása mellett (Shokri és mtsi. 2012).

Mivel a Transcutol csak a víztartalom megváltozásával éri el a penetrációfokozó hatását és szerkezetbeli változást nem okoz, így nem jelent toxikus veszélyt a bőrre, azzal biokompatibilis.

A Transcutol számos hatóanyag perkután penetrációját segíti önállóan, de a megfelelő felületaktív anyaggal vagy koszolvenssel együtt alkalmazva a hatás erősödhet. Delgadillo és mtsai bizonyították, hogy a cukor-észter és transcutol kombinációja a lidokain in vitro diffúzióját és a bőrön keresztüli penetrációját is szignifikánsan növelte (Cazares-Delgadillo és mtsai 2005). Klonazepám hatóanyagtartalmú gél formulálása során a transcutol propilén-glikollal együttesen alkalmazva az in vitro diffúziós vizsgálatokban növelte a hatóanyag diffúzióját (Mura és mtsai 2000).

A nemionos felületaktív anyagok segíthetik a hatóanyag perkután abszorpcióját. A segédanyag szerkezete, vagyis funkcionális csoportjai, a szénhidrogén lánc hosszúsága és telítettsége határozza meg a penetrációt segítő hatást. Ugyanakkor a készítményben lévő hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai és a vivőanyag természete is befolyásolja a nemionos felületaktív anyag felszívódást elősegítő hatását.

A **cukor észterek** természetes eredetű nemionos felületaktív anyagok. Előállításuk során a szacharóz α -D-glükóz 6-os C-atom OH-csoportját zsírsavakkal észteresítik. A szacharóz 8 hidroxil csoportja maximum 8 zsírsavval észteresíthető. A cukor észterek előállítása során a leggyakrabban használt zsírsavak a következők: laurinsav, mirisztinsav, palmitinsav, sztearinsav, olajsav, behénsav és erucinsav (Szűts A. és Szabó-Révész P. 2012). Minél nagyobb az észterezettség foka, és minél hosszabb a zsírsavlánc a cukorészterben, annál kisebb a HLB érték. A cukor rész felel a hidrofilitásért, míg a zsírsav rész a lipofilitásért. A 12 szénatomszámú alkil lánc mutatja a leghatékonyabb membrán permeabilitást, mivel a C12-es lánc közepes olaj/víz oldékonysága révén képes penetrálni a kettős lipid rétegbe. A cukor észterek segítik az abszorpciót és penetráció fokozó hatással is rendelkeznek. Előnyük még, hogy nem irritálják a bőrt és biodegradábilis anyagok. Az élelmiszeripar mellett a kozmetikai és gyógyszeripar is széles körben alkalmazza a cukor észtereket (Szűts A. és Szabó-Révész P. 2012). A cukor észterek jó emulgeáló és szolubilizáló tulajdonsággal rendelkeznek. E mellett javítják a hatóanyag felszabadulását és eloszlását, valamint elősegítik az abszorpciót/ penetrációt, amely javítja a hatóanyag biohasznosulását. Kísérleteinkben háromféle cukorészter típust használtunk fel, melyek közül kettő - az SP50 és SP70 -sztearinsavval, míg a PS750 palmitinsavval van észteresítve. Mindhárom típus magas, de különböző HLB értékkel rendelkező, o/v emulgens (1. táblázat).

Cukor észter	Kémiai szerkezet	Mono-észter %	HLB
SP50	szacharóz-sztearát	50	11
SP70	szacharóz-sztearát	70	15
PS750	szacharóz-palmitát	75	16

1. táblázat: A szilimarin krémek formulálásához felhasznált cukor észterek típusai

A **bőr** állapota (pl. ép vagy sérült bőrfelület) meghatározza, hogy a készítményből felszabadult hatóanyag milyen mélyre juthat a bőrszövetben. Az ép, egészséges bőr barrier funkciója gátat szab számos gyógyszermolekula átjutásának, viszont a sérült bőrfelületről a hatóanyag felszívódása gyorsabb, valamint a bőr előkezelése (pl. szaruréteg eltávolítása) is segítheti a hatóanyag felszívódását (Rácz I. és Selmeczi B. 2001).

A bőr legfelső rétege a stratum corneum felelős a bőr barrier funkciójáért. A korneocyták rendezett struktúrájának („téglafal-szerkezet”) és a bőr diffúziós ellenállásának köszönhető, hogy számos hatóanyag számára a bőrön keresztüli átjutás nehezített, olykor lehetetlen. A szarurétegen keresztüli penetráció fokozását segédanyagokkal és a megfelelő gyógyszerforma kialakításával segíthetjük. Ahhoz hogy olyan külsőleges vivőanyagrendszert fejlesszünk, amelyből a gyógyszerfelszabadulás optimális és megfelelő a bőrön keresztüli penetráció, számos preformulációs vizsgálatra van szükség (Godin B. és Touitou E. 2007).

A legtöbb gyógyszermolekula, amely képes áthatolni az epidermiszen a transzcelluláris útvonalat választja. Ezen az útvonalon a molekuláknak direkt módon át kell jutniuk a stratum corneum lipid struktúráin és az elhalt keratinociták és citoplazmáin is. Ez a legrövidebb út egy molekula bejutásához, viszont az adott hatóanyag erős ellenállásba ütközik penetrációkor, mivel mind lipofil, mind hidrofil struktúrákon keresztül kell

haladnia. Az intercelluláris úton a gyógyszermolekulák a keratinociták közötti területen áthaladva küzdik le a stratum corneum barrier funkcióját. Mivel a különböző függelékek csak a bőr összfelületének minimális hányadát (kb. 0,1%) teszik ki, így az alternatív útnak inkább csak teoretikus jelentősége van, de folynak kutatások ennek a bejuttatási módnak a kiaknázására is.

2.5. A gyógyszerformák fejlesztéséhez alkalmazott in vitro és vivo módszerek áttekintése

A gyógyszerforma kialakítása alatt és után fontos a különböző biokémiai markerek tanulmányozásával igazolni a következőket:

- a vivőanyag rendszer biokompatibilitását (in vitro, in vivo vizsgálatok)
- a gyógyszer hordozó rendszer és a hatóanyag biohasznosulását és ezek összefüggéseit (in vitro és in vivo kísérletek)

2.5.1. Franz diffúziós cella

A félszilárd gyógyszerformák hatóanyagának kioldódására a gyógyszerkönyvi módszerek nem egységesek. A gyakorlatban két berendezés-típus terjedt el, a Franz diffúziós cella és a forgólapátos készülék. Az Amerikai Gyógyszerkönyv (USP), az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal (FDA) és Amerikai Gyógyszerésztudományi Társaság (AAPS) irányelveiben a Franz vertikális diffúziós cellát jelölik meg a legalkalmasabb készüléknek a dermatológiai készítményekben lévő hatóanyagok kioldódási vizsgálatára. A vertikális Franz diffúziós cellát a hatóanyag vivőanyagból történő felszabadulásának, illetve membránon keresztüli diffúziójának és bőrbe jutásának a modellezésre használják. (Csizmazia és mtsai. 2012, Petró és mtsai. 2012)

A szintetikus membránon keresztül végzett in vitro diffúziós vizsgálatok során célszerű a membránt lipofillé tenni, hogy a stratum corneum átjárhatóságát modellezzük. A szilimarin por tartalmú o/v emulziós krémek vizsgálatánál a cellulóz-acetát szintetikus membránt előzőleg izopropil-mirisztáttal (IPM) impregnáltuk. A lipofil tulajdonságú IPM-ben áztatott szintetikus membránon keresztül történő diffúzió gyakran alkalmazott módszer, mely helyettesítheti az állati eredetű bőrmodelt. Siewert és mtsai szerint (Siewer és mtsai. 2003) a Franz diffúziós cellában alkalmazott IPM-ben áztatott

szintetikus membránon keresztüli hatóanyag felszabadulás előrevetítheti az in vivo eredményeket.

A kioldódott szilimarinnal mennyiségét mikrogramm/cm² egységnyi felületre számítva ábrázoltuk az idő négyzetgyökének függvényében. Az így kapott egyenes meredeksége jellemző a hatóanyag felszabadulási sebességére.

2.5.2. Külsőleges gyógyszerformák sejtleletképeségi vizsgálatai

A sejtkultúrákon végzett vizsgálatoknál leginkább az életképes és elpusztult sejtek arányát határozzák meg, ez alapján állapítják meg az adott készítmény, hatóanyag vagy segédanyag toxicitását (Kasugai és mtsai. 1990). Kísérleteinkben a szilimarinnal porból formulált krémek összetételét vizsgáltuk meg MTT teszt segítségével. A citotoxicitási vizsgálatokat két különböző sejtvonalon végeztük el. A HeLa és HaCaT sejtvonalon elvégzett biokompatibilitási vizsgálatokat egymással is összehasonlítottuk.

A HeLa sejtvonal Henrietta Lacks afroamerikai nő méhnyakából származó hámsejtek a világon az első in vitro immortalizált sejtkultúra (Sharrer 2006). A halhatatlanságát egy enzimnek, a telomeráznak köszönheti, ami a kromoszómák sejtosztódás közbeni rövidülését akadályozza meg. Ezen a sejtvonalon való vizsgálat nagyban hozzájárult számos orvosi kutatás eredményéhez pl. ráksejtek kutatása, gyógyszerek preklinikai vizsgálata. A legelterjedtebben használt sejtvonal a laboratóriumokban szerte a világon, a legtöbb kozmetikai cég is ezen a sejtkultúrán végzi a külsőleges készítmények tesztelését (Lucey és mtsai. 2009).

A HaCaT, immortalizált humán keratinocita sejtvonal. 1988-ban Boukamp és munkatársai készítették a sejtvonalat (Boukamp és mtsai. 1988). A keratinociták egy 62 éves férfibetegből származtak, aki melanómában szenvedett. A daganat eltávolítása biztonsági zóna ráhagyásával történt, s a HaCaT keratinociták elődjait ebből a biztonsági zónából nyerték ki. A sejteket ezt követően alacsony kalciumtartalmú (0.2 mM) tápoldatban, magas hőmérsékleten (38.5 °C) tenyésztették. A sejtvonal neve is innen ered: **H**uman **a**dult skin keratinocytes, low **Ca**²⁺ elevated **T**emperature (HaCaT). A HaCaT sejtek a humán keratinociták széles körben alkalmazott modeljei. Mivel a hámréteg sejteji 95%-ban keratinociták, a HaCaT sejtvonalon végzett vizsgálatok rámutathatnak a hámrétegben zajló jelenségekre (Wilson 2014). A keratinociták az epidermisz bazális rétegében helyezkednek el, ahol sokszorosodnak és szétválnak. A

bőr felszíne felé való vándorlásuk során lipideket, keratint és egyéb természetes hidratáló faktort (NMF) termelnek. Ez alatt a keratinociták egyre jobban kisimulnak, elveszítve sejtmagjukat, majd elhalnak. Ezt követően már korneocitáknak hívjuk őket (Boukamp és mtsai 1988).

Az MTT tesztek részletes bemutatására az anyagok és módszerek fejezetben kerül sor.

2.5.3. Transzepidermális vízvesztés

Bőrünk védi a szervezetünket a külső hatásoktól, megfelelő hidratáltsága elengedhetetlen ahhoz, hogy a természetes egyensúlyi állapotát megtartsa. A tartósan száraz bőr érzékenyebbé válik, megjelennek az irritáció tünetei, mint bőrpír, hámlás, viszketés, esetleg kirepedezés. Ha a bőr vízmegtartó képessége romlik az a védelmi rendszerének a károsodására utal. A bőr lipidrendszerének sérülésekor a bőr vízvesztése megnő és a károsító anyagok is könnyen bekerülhetnek a bőrbe. A bőr hidratáltságát legtöbbször a külső környezeti hatások (pl. levegő páratartalma, UV sugárzás, hőmérséklet stb.) befolyásolják. E mellett a vízvesztés oka lehet belső hormonális tényező, és egyéb anyagok külsőleges hatása is pl. szappan, meleg víz, alkohol és a felületaktív anyagok (Plessis és mtsai. 2013).

A bőr hámrétegén távozó vízmennyiséget (TEWL) mérhetjük Tewameter segítségével. A transzepidermális vízvesztés utalhat a bőr védelmi funkciójának zavarára (Pinnagoda és mtsai. 1990).

A kozmetikai cégek a termék hatásának és biokompatibilitásának vizsgálatára használják a transzepidermális vízvesztés mérést. A TEWL érték többek között utal arra, hogy az adott készítmény okoz-e bőrirritációt vagy mennyire képes a bőr lélegezni és regenerálódni felhasználása során.

Munkánk során tengerimalac bőrén vizsgáltuk a transzepidermális vízvesztést, az in vitro diffúziós eredmények alapján kiválasztott szilimarinnal tartalmú krémeknél.

2.5.4. Antioxidáns rendszer

Az evolúció során az élő szervezetekben speciális antioxidáns rendszer fejlődött ki, amely az oxidációs folyamatok és a szabadgyökös láncreakciókkal szemben védelmet nyújtanak. A szabadgyökök olyan atom vagy molekula származékok, amelyek egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak, amely megváltoztatja ezen származékok kémiai reaktivitását (Halliwell 1994). A szabadgyökök mellett reaktív köztitermékek is keletkeznek az oxigén redukálásával vagy gerjesztésével, ezeket közös néven reaktív oxigén intermediereknek (ROS) nevezzük (Murphy 2013).

Az antioxidáns védelemnek három szintje van. Az első védelmi vonal antioxidáns enzimekből és fémkötő fehérjékből áll, megelőzi a szabadgyökök képződését a szabadgyökök prekursorainak eltávolításával, valamint a katalizátorok inaktiválásával. Három antioxidáns enzim, a szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (KAT) és a glutation peroxidáz (GPx) vesz részt a reakcióban. Mivel a szuperoxid gyökök keletkeznek nagy mennyiségben fiziológias körülmények között a sejten belül, az első védelmi vonal legfőbb eleme a SOD.

A SOD enzim elhelyezkedés és fémtartalma szerint három típusát különböztetjük meg az állatokban. A réz-cink szuperoxid-dizmutázok (Cu/Zn-SOD) a citoszolban (Markund 1982), a mangán szuperoxid-dizmutázok (Mn-SOD) a mitokondriumokban és az extracelluláris szuperoxid-dizmutázok (ec-SOD) a sejten kívül lokalizálódnak. Az enzim a szuperoxid gyököket dizmutálja hidrogen-peroxiddá és oxigénné. A keletkezett hidrogén-peroxidot a KAT és GPx képes vízzé alakítani (Mc Cord és Fridovich 1969, Weisiger és Fridovich 1973).

A fémkötő fehérjék szintén fontos szerepet töltenek be az első védelmi vonalban, mivel megelőzik a lánccindító reakciókat azáltal, hogy megkötik a fémionokat (pl. Cu, Fe). Ilyen fémkötő fehérje például a ferritin, albumin, transzferrin, cöruoplazmin vagy metalloprotein. Az első védelmi vonal működése nem elegendő a sejtek számára, hogy teljesen megelőzze a szabadgyökök kialakulását, egyes gyökök áthaladnak ezen a vonalon és lipid-peroxidációt indítanak el, valamint DNS, fehérje és zsírsav károsodást okoznak (Birben 2012).

Az antioxidáns védelmi vonal második szintjét a kis molekulatömegű antioxidánsok alkotják, amelyek megszakítják a gyökös láncreakciókat. Ide zsírolédkony (A és E-vitamin, karotinoidek) és vízóldékony (C-vitamin, húgysav, glutation) antioxidáns molekulák tartoznak (Lindahl 1982).

A védelmi vonal harmadik szintje végzi a károsodott molekulák helyreállítását vagy eltávolítását. Ide tartoznak a hősokk fehérjék, proteázok, lipázok, DNS repair enzimek és a glutation-reduktáz (GR) (Surai 2015).

Az oxidatív stressz akkor jön létre, amikor a reaktív oxigén gyökök képződését az antioxidáns védelmi rendszer nem tudja semlegesíteni. A prooxidánsok és antioxidánsok közötti egyensúly eltolódik a prooxidánsok javára, emiatt túlzott mértékű ROS képződés történik. Az oxidatív stressz állapota a makromolekulák károsodásához vezet (Sies 1993). A lipidperoxidáció következtében a membránlipidek károsodnak, megbomlik a membrán integritása, ami további irreverzibilis szövet és szervkárosodáshoz vezethet. A lipidperoxidáció okozza a különböző citotoxikus termékek keletkezését is pl. aldehidek, dialdehidek és hidroxialdehidek. Ezek a termékek a DNS-t is károsítják, amely mutációkhoz és a sejtműködés zavarához vezetnek (Arora és mtsai. 2002). A reaktív oxigén gyökök a fehérjéket is károsíthatják. Oxidatív stressz hatására a sejtek apoptotikus vagy nekrotikus halála következhet be (Sheldon és Pinnel 2003).

Munkánk első felében egér májszövetben mértük az antioxidáns enzimek aktivitását és az MDA szintet a szilmarin-olajat tartalmazó SMEDDS készítmények kezelése során szén-tetraklorid intoxikációban. A külsőleges szilimarintartalmú port és emulgensként cukorészteret tartalmazó krémek esetében vizsgáltuk a készítmény hatását UVB sugárzás következtében. Az *in vitro* kísérletekben HaCaT sejtek elő és utókezelése során mértük az antioxidáns enzimek értékeit. Az állatkísérletekben tengerimalac bőrszövetében határoztuk meg az antioxidáns enzimszinteket ugyanezen összetételű krémek elő és utókezelése során.

2.5.5. HO-1 fehérje

A hemoxigenáz (HO) enzimek a hem lebontásának első, sebességmeghatározó lépését katalizálják. A hem szétesésekor szénmonoxid (CO), vas és biliverdin keletkezik. A biliverdin ezután bilirubinná alakul a biliverdin reduktáz enzim hatására. A vas főként az új hem szintézisében használódik fel (Tenhunen és mtsai. 1968). HO enzimsaládnak három tagja van (HO-1, HO-2, HO-3), mindegyiket különböző gén kódol (Maines és mtsai. 1986, McCoubrey és mtsai. 1997). A HO enzim indukálható formája a HO-1, melyet, hősokk proteín 32-nek is neveznek (Shibahara és mtsai. 1987). A HO-1 fiziológiai körülmények között a legtöbb szövetben alacsony szinten

expresszálódik, de számtalan stimulus hatására indukálódik. Ilyen stimulus egyebek mellett az UV sugárzás, reaktív oxigén gyökök (ROS), nehézfémterhelés, hőszokk, iszkémia, GSH szint csökkenés, hipoxia, hiperoxia (Panchenko és mtsai. 2003). E mellett szintén megnő a HO-1 aktivitás citokinek, prosztaglandinok, lipopoliszacharid, egyes gyógyszer (pl. aspirin, simvastatin stb) és antioxidáns anyag hatására is (pl. kurkumin, rezveratrol) (Balogun és mtsai. 2003, Abraham és Kappas 2008).

A HO-1 antioxidáns hatása a biliverdin bilirubin átalakulás eredménye. A keletkezett bilirubin erős gyökfogó képességgel rendelkezik, megköti a peroxil, nitrogén gyököket, a szuperoxid aniont, hidroxidokat, hipoklórossavat és a szinglet oxigént is. A bilirubin mérsékli az oxidánsok hatására bekövetkezett sejtkárosodást, csökkenti a lipidperoxidációt. Nagyobb koncentrációban azonban sárgaságot okoz (Tenhunen és mtsai. 1970).

HO-1 indukció véd az oxidatív stressz és az apoptotikus sejthalál ellen. HO-1 –ről bebizonyosodott immunmodulátor és gyulladáscsökkentő hatása is. A gyulladáscsökkentő hatása annak köszönhető, hogy segíti a bilirubin és szénmonoxid képződést, ugyanakkor speciális sejtfunkciót tölt be a mieloid sejtekben (pl. makrofágok, monociták), az endotel sejtekben. Mindkét sejttípus fontos szerepet játszik a gyulladási válasz kialakításában. Az antiapoptotikus és gyulladáscsökkentő hatás is főként a CO termelésnek köszönhető. A szövetben felszaporodó CO több gyulladáskeltő mediátor molekulának a termelését csökkentheti, ilyen például a TNF α , IL-6, IL-1 β . A HO-1 gyulladáscsökkentő hatás még annak is köszönhető, hogy az NF κ B útvonalon keresztül csökkenti a gyulladáskeltő granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) termelését, amely a bakteriális endotoxinok hatására könnyen és gyorsan termelődik. (Al-Owais és mtsai 2012, Otterbein és mtsai. 2000)

A HO-2 hasonló fizikai és kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a HO-1, nem indukálható, leginkább az agyban és herében expresszálódik (Raju és mtsai. 1997). A HO-3 90%-os homológiát mutat a HO-2 enzimmel, a katalitikus aktivitása azonban alacsonyabb (Hayashi és mtsai. 2004).

Kísérleteinkben az emulgensként cukor-észtert tartalmazó, szilimarinnal hatóanyagú krémek elő és utókezelése során mértük a HO-1 enzimszintet tengerimalac bőrszövetében UVB sugárzást követően.

2.5.6. A kísérletes májkárosodás és mértékének jellemzése

A máj a szervezet legnagyobb, létfontosságú mirigye, amely a szervezet anyagcsere-folyamatainak központi szerve. A máj számos feladatot lát el, többek között az epeelválasztást, szénhidráttraktározást, ketontestképzést, plazmafehérjék előállítását, valamint a gyógyszerek és toxinok detoxikálását (Ganong, 1990). A szervezetben keletkező vagy kívülről bekerülő idegen anyagokat (xenobiotikumok: gyógyszerek, vegyszerek stb.) főként a máj közömbösíti (Szollár, 1993). A hepatotoxikus anyagok májkárosodást okoznak, melynek mértéke eltérő. Az erősen károsító anyagok májsejtnekrozist okoznak, melynek eredményeként a szérumban extrém magas a transzferázok szintje, melyből két enzim, az alanin-aminotranszferáz (ALT) és aszpartát-aminotranszferáz (AST) eltérése jelzi a károsodás mértékét, mivel elsősorban a májban találhatóak meg (Giannini és mtsai. 2005).

Előzőleg ismertetett antioxidáns védelmi rendszert alkotó enzimek is fontos indikátorai a májkárosodásnak (SOD, CAT GPx). Az antioxidáns enzimek csökkenését lehet tapasztalni májkárosodásban, mivel a károsító szabadgyökök szintje jelentősen megnő, és akár visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozhat (Sies 1993).

A májszövetben észlelt hisztológiai elváltozások szintén utalnak májkárosító hatásra. Ilyenkor a máj szövettani metszetében zsírosodás és nekrozis látható. Megemlítenéd az, hogy a máj nekrozisa a szerv különböző területén helyezkedhet el és az elhalás mérete is a károsító tényezőtől függően változó lehet (Guicciardi és mtsai. 2013).

Vizsgálataink során a szén-tetrakloridot alkalmaztuk a krónikus májkárosodás modeljeként (Johnson és Kroenung 1998). A szén-tetraklorid reaktív metabolitjai, a triklórmetil és peroxi triklórmetil gyökök okozzák a májkárosító hatást, melyek májenzim eltéréseket, cirrózist és fibrózist hoznak létre (Weber és mtsai, 2003).

A belsőlegesen alkalmazott SMEEDS kísérleteinkben vizsgáltuk azt, hogy a szilimarín olajat tartalmazó gyógyszerleadó rendszer kivédi-e a szén-tetraklorid okozta májkárosodást. Az állatkísérletek során az egér májenzim (ALT, AST) értékeit plazmából, az antioxidáns enzimek aktivitásának mértékét máj-homogenizátumból határoztuk meg. E mellett elvégeztük a máj szövettani vizsgálatát is, mely során hemoxicillin-eozin és Oil-Red O festést alkalmaztunk.

2.6. Célkitűzés

Összefoglalva, az irodalmi előzmények tükrében, célul tűztük ki a *Silybum marianum* magjából nyert olaj és por belsőleges és külsőleges gyógyszerformába történő formulálását annak érdekében, hogy magas biohasznosítású gyógyszerformát állítsunk elő.

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

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

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

- II. Kísérleteink **második részében** szilimarin porból formuláltunk krémet. A külsőleges készítmény kialakításánál az elsődleges célunk az volt, hogy a krém oldatos formában tartalmazza a szilimarin port, valamint a megfelelő segédanyagok kiválasztásával növeljük a hatóanyag penetrációját. A terápiás cél az volt, hogy UVB sugárzás okozta bőrkárosodás kezelésére és megelőzésére megfelelő antioxidáns hatással rendelkező krémet állítsunk elő.

A következő kísérleti tervet követtük a kísérleteink második felében:

1. Szilimarin por oldódásának optimalizálása.
2. o/v emulziós rendszerű, szilimarin port tartalmazó krém formulálása penetrációfokozó segédanyagok alkalmazásával.

3. A krémek konzisztencia vizsgálata Textura Analizáló készülékkel és a hatóanyag in vitro felszabadulásának vizsgálata Franz-diffúziós cella segítségével.
4. A krémek in vitro citotoxicitási vizsgálata HeLa és HaCaT sejtvonalon.
5. In vivo irritációs tesz során a TEWL értékek meghatározása tengerimalac modellen.
6. A krém antioxidáns hatásának vizsgálata in vitro HaCaT sejtvonalon és in vivo tengerimalacon UVB sugárzás előtt és után.
7. A HO-1 enzim aktivitás meghatározása tengerimalac bőrszövetéből a krémmel való elő és utókezelésben UVB sugárzás ellenében.

3. Metodika

3.1 Felhasznált anyagok

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

HeLa, humán adenokarcinoma sejtvonal a Sejtkultúrák Európai Gyűjteményéből (ECACC, European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) a HaCaT sejtek (humán keratinocita sejtek) a Cell Lines Service-től származott (CLS, Heidelberg, Németország)

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

3.2. Silybum marianum mag származási helye

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

3.3. Szilimarin olaj és szilimarin por kivonása

A Silybum marianum magból Kahol és mtsai. (Kahol és mtsai. 2001) által leírt módszer szerint készült a szilimarin por és olaj kivonat a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén. A kivonás után egy szilárd és egy folyékony fázist kaptak, a szilárd fázisból szárítás után nyerték a szilárd szilimarin port. A folyékony hexános kivonatból, vákuum alatt, rotációs bepárlóval, hexántól teljesen mentessé vált szilimarin olajat használtuk a kísérleteinkben. A szilimarin por sem tartalmazott oldószermaradványt. HPLC-MS módszerrel a bioaktív flavonoidok mennyiségi és minőségi meghatározását végezték el. A szilimarin olaj komponenseit Shimadzu QP-2010 GC-MS készülék segítségével jellemezték (Kuki és mtsai. 2012).

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

3.4.1. SMEDDS-szilimarin olaj formulálása

A SMEDDS gyógyszerforma kialakítását a következő felületaktív anyag segítségével végeztük: Cremophor RH40, Labrasol, Capryol 90 és Transcutol HP. A SMEDDS olajos fázisát a szilimarin olaj alkotta, amely egyben a gyógyszerhordozó rendszer hatóanyagaként is szerepelt. Különböző SMEDDS összetételeket víz hígításos módszerrel készítettük. Az 2. táblázat szemlélteti a szilimarin olajat tartalmazó különböző SMEDDS összetételeket. A tenzid komponenseket 37°C-on összekevertünk -Schott Tritronic diszpenzer és Radelkis OP-912 mágneses keverő - segítségével. A szilimarin olajat szobahőmérsékleten inkorporáltuk a rendszerhez. A keverékeket 24 órán keresztül állni hagytuk, hogy megfigyeljük az esetleges fázis-szeparációt. Erweka DT 800 forgólapátos kioldódásvizsgáló készülék segítségével (Erweka GmbH, Heusenstamm, Germany) néztük a különböző keverékek ön-emulgeáló képességét. 1 gramm keveréket adtunk 200 ml tisztított vízhez és enyhe keverés mellett (70 fordulatszám, 37 °C) szemmel követtük az ön-emulgeálás folyamatát, majd a megfigyeléseink alapján Turner háromszög diagramokat szerkesztettünk. Számításainkhoz Cartesian koordináta számolást használtunk.

Összetétel	Szilimarin olaj	Transcutol HP	Cremophor RH 40	Labrasol	Capryol 90
1.	30 %	45%	20%	5%	0%
2.	25 %	20 %	33,3 %	16,6 %	5 %
3	16,6 %	16,6 %	16,6 %	33,3 %	16,6 %
4	16,6 %	16,6 %	16,6 %	16,6 %	33,3 %

2. táblázat. A szilimarin olajat tartalmazó különböző SMEDDS összetételek

3.4.2. SMEDDS cseppméretének meghatározása

A diszperz fázis átmérőjét DLS (dinamikus fénymikroszkóp) készülék (Brookhaven Fotometer) segítségével határoztuk meg. A diffúziós koefficiens kiértékeléséhez az

intenzitás korrelációs funkciót használtuk. A vizsgálat során a részecske mérő 3.1 részecskeméret meghatározó programját használtuk, melyhez a következő paramétereket állítottuk be: hőmérsékletet 25°C, lézer detektálási szög: 90 fok, lambda: 533 nm, index: 1,334. A számítógépes program automatikusan meghatározta a diszperz fázis cseppjeinek átmérőjét.

3.4.3. Kísérleti állatok

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

3.4.4. Kezelési protokoll szilimarín olaj- SMEDDS-el egerekben

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

Csoport	Előkezelés (7 napon keresztül)	Izotóniás nátrium oldat adása (7 napon keresztül)	CCl ₄ I.P. injektálás a 8. nap (1.0 ml/kg)	Eutanázia és nyaki diszlokáció a 9. nap
1. csoport	-	+	-	+
2. csoport	-	+	+	+
3. csoport	SMEDDS p.o. 500 mg/kg	-	+	+
4. csoport	SMEDDS p.o. 1000 mg/kg	-	+	+
5. csoport	SMEDDS p.o. 500 mg/kg	-	-	+
6. csoport	SMEDDS p.o. 1000 mg/kg	-	-	+

3. táblázat: A szilimarín olajat tartalmazó SMEDDS kísérletek kezelési protokollja egeren végzett in vivo vizsgálatokban

3.4.5. Májenzim értékek meghatározása egeren

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

3.4.6. Máj fehérje extraktum készítése

A totál fehérje extraktum készítése során 0,1g májszövetet szuszpendáltunk hideg 0,1M Tris-HCl pufferben (pH 7,4), mely 5mM EDTA-t és frissen hozzáadott proteáz gátló koktélt is tartalmazott. Ezután golyósmalomban (MM 301 típusú, Retsch GmbH and

Co, Haa, Németország) homogenizáltuk 2 percen keresztül 16 Hz-en és a homogenizátumot centrifugáltuk (8,000 rpm, 30 perc, 4 °C). A felülúszóból határoztuk meg az enzimértékeket (SOD, CAT, GPX, GR), ezen kívül Glutathion (GSH), malondialdehid (MDA) koncentrációt.

3.4.7. Hisztopatológiai vizsgálatok

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

3.4.8. Máj antioxidáns státuszának feltérképezése

3.4.8.1. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás meghatározása májszövetből

SOD aktivitást spektrofotometriás módszerrel (Paoletti és Mocali, 1990) határoztuk meg 340 nm-en. A módszer alapja a szuperoxid anion képződés okozta NADH oxidáció következtében abszorbancia csökkenése. Egy egység enzim-aktivitás az az enzim mennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy a NADH oxidáció 50%-ban gátolva legyen, az aktivitást U/mg protein-ben határoztuk meg.

3.4.8.2. Kataláz (CAT) aktivitás meghatározása májszövetből

CAT aktivitást spektrofotometriai módszerrel mértük 240 nm-en, a H₂O₂ bomlást monitorozva (Aebi 1974). A CAT aktivitást U/mg protein-ben határoztuk meg. Egy egység enzim egy µmole H₂O₂ bomlását okozza egy perc alatt, 25°C-on pH=7 –en.

3.4.8.3. Glutation peroxidáz (GPx) meghatározása májszövetből

GPx aktivitást Beutler által leírt módszer (Beutler 1984) segítségével spektrofotometriás mérést (340 nm) végeztünk. A detektálás alapja a NADPH-NADP⁺ oxidációs átalakulás, tert-butil-hidroperoxide által. A NADPH koncentrációt moláris extinkciós koefficient ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) segítségével számoltuk, az aktivitást U/mg-ban fejeztük ki. Egy egység (U) aktivitás annak az enzimnek a mennyisége, amely ahhoz szükséges, hogy 1 μmol NADPH egy perc alatt oxidálódjon.

3.4.8.4. Glutation reduktáz (GR) aktivitás meghatározása májszövetből

GR aktivitást spektrofotometriás méréssel (340 nm) határoztuk meg a NADPH oxidáció miatt létrejövő optikai sűrűség csökkenése alapján. Ez a folyamat a GSSG (oxidált glutation) enzimatis redukciója miatt történik. Az enzim aktivitását U/mg-ban fejeztük ki. Egy egység enzim 1 μmol NADPH-t oxidál egy perc alatt meghatározott körülmények között (Goldber és Spooner, 1983).

3.4.8.5. GSH koncentráció meghatározása májszövetből

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

3.4.8.6. Lipid peroxidáció meghatározása

Del Rio által leírt (Del Rio és mtsi. 2003) fluorimetriás módszer segítségével mértük a máj lipid peroxidációt, melynek alapja a képződött MDA termék mennyisége. A máj homogenizátumot (200 μl) 700 μl 0,1 M HCL ban, 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Majd a homogenizátumhoz 900 μl 0,025 M tiobarbitursavat adtunk, és keveréket tovább inkubáltuk 37°C-on, 65 percen keresztül. A mintákat fluoreszens analízisnek vetettük alá ($\lambda_{\text{ex}} = 520$, $\lambda_{\text{em}} = 549$)

(Spektrófluorométer FP-6300 JASCO). A malondialdehid koncentrációját 1,1,3,3-tetrametoxipropán standard segítségével határoztuk meg. Az eredményeket nmol MDA/mg fehérjében fejeztük ki.

3.5. Szilimarin port tartalmazó krém formulálása és vizsgálata

3.5.1. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása

A krémek formulálásához különböző emulgenseket használtunk úgy, mint Poliszorbát 60 (P60), Cremophor A6 és A25 (C) 1:1 arányban, valamint különböző típusú cukorésztert (SP50, SP70, PS750). Az o/v típusú krémek előállítása során a cetilsztearil alkohol, sztearinsav és izopropil-mirisztát (IPM) melegítése (60 °C) és keverése alakította ki az olajos fázist. A vizes fázis propilénglikolt, emulgenst és a tisztított vizet tartalmazott, melyet azonos hőmérsékletre (60 °C) felmelegítettünk és az olajos fázishoz kevertünk. A készítmény homogenizálása és lehűtése (25 °C) után adtuk a Nipagin M-t és az aktív hatóanyagot, a szilimarin port a krémekhez. A krémekbe 5% por került vagy szuszpendált (I-V összetétel) vagy oldott formában (VI-X összetétel). Az oldott összetételeknél a szilimarin port, előzőleg Transcutol HP (TC)-ben oldottuk (4. táblázat).

Összetevők (g)	Szuszpendált					Oldott				
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.
Szilimarin por	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Transcutol	-	-	-	-	-	14,2	14,2	14,2	14,2	14,2
Poliszorbát 60	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Cremophor A6: A25 (1:1)	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-
Cukor észter SP50	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-
Cukor észter SP70	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-
Cukor észter PS750	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
Cetil-sztearil alkohol	4,6									
Sztearinsav	10									
Propilénglikol	5									
Izopropil- mirisztát	5									
Konzerváló oldat	1									
Tisztított víz	ad 100									

4. táblázat. A szilimarin port tartalmazó o/v emulziós krémek összetétele

3.5.2. Krémek gyógyszerforma vizsgálata

3.5.2.1. Krémek konzisztencia vizsgálata

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

3.5.3. In vitro vizsgálat Franz diffúziós cellával

Membrán diffúziós és permeabilitási vizsgálatokat vertikális Franz-diffúziós cellában végeztük (Hanson Microette TM Topical and Transdermal Diffusion Cell System) (Liebenberg, W. és mtsai 2004). A donor fázisba 0,3 g mintát raktunk, a cellulóz-acetát membránra helyezve (0,45 μm pórusméret). A membránt izopropil-mirisztátban (IPM) áztatva készítettük elő. Az effektív diffúziós terület 1,767 m^2 volt. 30%-os alkoholt használtunk akceptor fázisnak, azért hogy segítsük a szilimarín oldódását. A mágneses keverő rotációja 450 rpm-re volt állítva. A receptor oldat 32,5 °C-ra volt termosztálva az egész kísérlet alatt, hogy a Franz cella membránja hasonló legyen a fiziológiás bőr hőmérsékletéhez. A kísérleteket 6 órán keresztül végeztük. Az akceptor fázisból 0,8 mL mintát vettünk, melyet friss receptor közeggel helyettesítettünk. A szilimarín mennyiségének mérését UV spektrofotométer segítségével végeztük (Shimadzu Spectrophotometer, Japan, Tokyo), 287 nm hullámhosszon.

3.5.4. Sejttenyésztés

A HeLa sejteket műanyag sejttenyésztő edényben növesztettük DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő médium folyadékban. A tenyésztő médium 3.7 g/L NaHCO_3 , 10% (v/v) hő-inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS), 1% (v/v) nem esszenciális aminosav oldatot, 1% (v/v) l-glutamint, 100 IU/mL penicillint és 100 IU/mL sztreptomocint tartalmazott, 37 °C-on, 5% CO_2 atmoszférában. A szükséges anyagokat a Sigma-Aldrich-től (Magyarország) szereztük be.

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

A sejttenyésztő médiumot hetente kétszer cseréltük mindkét sejttípusnál lamináris áramlású steril fülke alatt (Bigansoli és mtsai 1999). A sejteket 1×10^5 sejt/cm² sűrűsége szélesztettük és a kísérletekhez közel konfluensre növesztettük. A konfluens sejtréteg kialakulásakor történt a sejtek passzálása lamináris box alatt. A sejttenyésztő médiumot eltávolítottuk, majd a maradék tápoldatot PBS (Phosphate Buffered Saline) oldattal lemostuk. A letapadó sejteket tripszinezés segítségével szuszpenzióba vittük. A tripszinezéshez 0,05 (m/v)% tripszin oldatot és kelátképzőként 0,02 (m/v)% etiléndiamin-tetraacetát (EDTA) oldatot használtunk (0,5% g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA (Sigma-Aldrich, Magyarország). A sejteket 2 percig 37°C-on inkubáltuk az emésztés alatt, majd a reakciót ötszörös mennyiségű friss médium hozzáadásával állítottuk le, mivel a médiumban lévő szérum inaktíválja a tripszint. A sejtsuszpenziót centrifugáltuk (1100 rpm fordulatszám, 6 perc, 25 °C). A felülúszót eltávolítottuk, a sejteket 10 ml friss médiummal szuszpendáltuk és a sejteket Bürker kamra segítségével megszámoltuk. A sejtsuszpenzióban 10^6 db sejtet tartalmazó mennyiséget steril telepítő edénybe pipettáztunk és a tápoldat mennyiségét kiegészítettük 10 ml-re. 20-40 passzázsszám közötti sejteket használtunk a citotoxicitási és antioxidáns kísérleteknél.

3.5.5. MTT teszt

A kísérletek során a sejtek mitokondriális aktivitás változását mértük. Az életképes sejtek mitokondriumaiban zajló oxidatív reakcióban résztvevő dehidrogenázok a vízben oldható sárga színű 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) oldatot lila színű vízben oldhatatlan formazán kristályokká alakítják. (Palamakula és mtsai 2004) HaCaT keratinocitákon és Hela sejtvonalon végeztük az in vitro citotoxicitási vizsgálatokat. A vizsgálatot a következőképp végeztük: HaCaT és HeLa sejteket sima felületű 96 lyukú tenyésztő plate-ben szélesztettük 10^3 sejt/lyuk sűrűsége és CO₂ inkubátorban, 37°C-on hagytuk nőni 7 napig, amíg a konfluens sejtréteg kialakult. A növesztés során a 3. napon a tenyésztő médiumot lecseréltük lamináris box alatt. A kísérletek során a sejttenyésztő médiumot eltávolítottuk, vizsgálati mintákat ráraktuk a sejtre és a sejteket további 30 percig inkubáltuk 37°C-

on. A minták eltávolítása után a sejteket kétszer 1 ml PBS odattal mostuk, és további 3 órán keresztül inkubáltuk (37°C-on) az MTT –t tartalmazó médiummal, 5mg/ml. A lila formazán kristályokat sósavas izopropanolban oldottuk (izopropanol : 1,0 N sósav= 25:1). Az abszorbanciát 570 nm –en mértük, 690 nm háttér mellett FLUOstar OPTIMA Microplate Reader segítségével. (BMG LABTECH, Offenburg, Németország). A sejt életképességet kezeletlen kontrol-hoz viszonyítva százalékban fejeztük ki. Mindegyik kísérletet ötször megismételtünk, mindegyik komponenst 5 lyukban vizsgáltuk (Gursoy és mtsai 2003).

3.5.6. In vivo kísérletekhez használt kísérleti állatok

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

3.5.7. In vivo bőr irritációs teszt

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

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

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

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

3.5.9. UV-B sugárzás tengerimalac bőrén in vivo, a bőr elő- és utókezelése

Az állatokat UV-B sugárzásnak tettük ki (akut sugárzás, 350μW) 20 cm távolságban. A kísérlet előtt a tengerimalacok hátát leborotváltuk és olyan alumínium fóliával fedtük le, amelyen 10 téglalap alakú (0,8 X 13 cm) vágás volt, majd 0,1 g krémet vittünk fel mindegyik vágásra. (Bak és mtsai 2011)

Az antioxidáns és HO-1 enzim vizsgálatoknál az állatokat két csoportra osztottuk, mindegyik csoporthoz 10 állat tartozott. Az I. csoportban a tengerimalacok bőrét előkezeltük a krémmel 20 percig, majd az állatokat az UV-B készülék alá helyeztük és 10 percig sugároztuk a fedetlen bőrfelületet. A krémeket lemostuk majd 24 órával a sugárzást követően a bőrmintákat összegyűjtöttük. A II. csoportban az állatokat először 10 percig besugároztuk, majd bőrüket utókezeltük a krémmel, melyet 20 perc múlva lemostuk és 24 óra elteltével a bőrmintákat összegyűjtöttük. A vizsgálatok végén az állatokat altatásban tartottuk ketamin/xylazine (50/5 mg/ttkg) segítségével és a szövetszövetmintákat kivágtuk. Az állatokat cervikális diszlokációval termináltuk. A mintákat PBS-ben (foszfát puffer pH 7.4) áztattuk és lemostuk, majd eltávolítottunk

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

3.5.10. Szuperoxid dizmutáz aktivitás meghatározása

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

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

A kolorimetriás mérés a tetrazólium só detektálásán alapszik, mely a következő reakción alapul. A xantin oxigén jelenlétében xantin-oxidáz enzim segítségével alakul át hígysavvá, a reakció során szuperoxid anion gyök és hidrogén-peroxid is keletkezik. A xantán oxidáz enzim aktivitása lineáris összefüggést mutat a keletkező szuperoxid anion gyökkel, melyet a képződő tetrazólium só jelez. SOD a keletkező szuperoxid anion gyököt semlegesíti oxigénné és hidrogén-peroxiddá, miközben a tetrazólium só vízdékony formázán festékké alakul. Egy egység SOD az az enzimmennyiségnek, amely a szuperoxid gyökök 50%-át dizmutálja. A keletkező formázán festéket 450 nm-en mértük FLUOstar OPTIMA Microplate Reader segítségével.

3.5.11. Kataláz aktivitás meghatározása

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

A sejteket (1×10^6) gumibot segítségével felszedtük, $1000 \times g$ -n, 10 percen keresztül $4^\circ C$ -on centrifugáltuk. A sejtpelletet homogenizáltuk jégen, 2 ml hideg kálium foszfát pufferben, pH 7.0, 1mM EDTA per gram szövet, $10000 \times g$ –n 15 percen keresztül centrifugáltuk $4^\circ C$ -on, a felülúszó CAT aktivitását mértük Cayman kit segítségével. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf) A mérés a kataláz enzim peroxidációs aktivitásán alapszik. A módszer lényege, hogy a kataláz enzim reakcióba lép a metanollal megfelelő mennyiségű hidrogen-peroxid jelenlétében. A keletkezett formaldehid kolorimetriásan mérhető Purpald festékképző (kromogén) jelenlétében, mivel reakcióba lépnek egymással és lila színű terméket hoznak létre. A keletkező lila terméket 540 nm -en mértük FLUOstar OPTIMA Microplate Reader segítségével. Egy egység kataláz aktivitás az az enzimmennyiség amely 1.0 nmol formaldehid átalakulást okoz egy perc alatt $25^\circ C$ -on.

3.5.12. Glutation peroxidáz aktivitás

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

A sejteket (1×10^6) gumibot segítségével felszedtük, $1000 \times g$ -n, 10 percen keresztül $4^\circ C$ -on centrifugáltuk. A sejtpelletet homogenizáltuk jégen, 2 ml hideg kálium foszfát pufferben, pH 7.0, 1mM EDTA per gram szövet, $10000 \times g$ –n 15 percen keresztül centrifugáltuk $4^\circ C$ -on, a felülúszó GPX aktivitását mértük Cayman kit segítségével (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; www.caymanchem.com/pdfs/703102.pdf) A mérés indirekt módon méri a glutation peroxidázt a következő reakciók alapján. A glutation glutation peroxidáz hatására alakul át oxidált glutationná (GSSG) és hidrogén-peroxiddá. Az oxidált glutation (GSSG) enzimatis úton, glutation-reduktázzal (GR) alakulhat vissza redukált formájává. A folyamathoz az elektront NADPH szolgáltatja. A NADPH oxidációja $NADP^+$ -vé, abszorbancia csökkenéssel jár 340 nm -en. Az abszorbancia csökkenés mértéke egyenesen arányos a glutation peroxidáz aktivitással.

3.5.13. Lipid peroxidációs (MDA) teszt

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

3.5.14. HO-1 aktivitás mérés

A tengerimalac bőrszövetet homogenizáltuk 200 mM foszfát pufferben (pH=7,4), majd 20.000g-vel, 4°C-on 30 percen keresztül centrifugáltunk. A felülúszóból a HO-1 enzim aktivitást Tenhunen és mtsai által leírt módszer (Tenhunen és mtsai 1968) segítségével határoztuk meg. A módszer alapja a hem átalakulása bilirubinná, mely spektrofotometriásan meghatározható. A felülúszóhoz a következő reakcióelegyet adtuk: 2mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 15 μ M hem, 105 μ M NADPH, 120 μ g/mL biliverdin reduktáz (patkány máj citoszolból), 2mM MgCl₂ és 100 mM KH₂PO₄. Az így kapott mintát (2ml) 37° C-on inkubáltuk 1 órát sötétben, majd a reakciót a minták jégre helyezésével és kloroform hozzáadásával állítottuk le. A HO-1 aktivitást a bilirubin reakcióelegyben való képződésének spektrofotometriás mérése alapján számoltuk ki 460 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbségét alapul véve. Az aktivitás mértékegységét nmol bilirubin / mg / óra-ban fejeztük ki.

3.6. Statisztikai analízis

A szilimarín olajat tartalmazó SMEDDS gyógyszerforma vizsgálatok az eredményeket GraphPad Prism 5 szoftver segítségével végeztük. A csoportok közötti szignifikanciák összehasonlítását kétutas ANOVA módszerrel és a csoportok közötti eltérést Bonferroni teszttel végeztük. Az adatokat átlag \pm S.D. formában közöltük. Csillaggal és üres kereszttel jelöltük a szignifikáns különbségeket az ábráinkon. A

különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Mindegyik kísérlet során öt párhuzamos mérést végeztünk és legalább ötször megismételtük ($n=5$).

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

3.7. Az értekezésben szereplő, együttműködésben kivitelezett metodikák

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

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

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

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

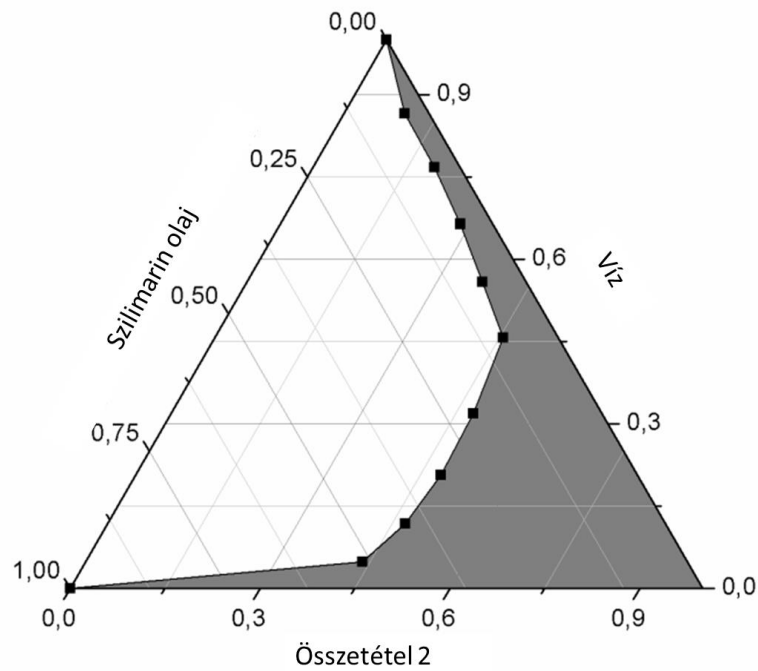
Az értekezésben szereplő egyéb módszert és annak kiértékelését a jelölt saját maga végezte.

4. Eredmények

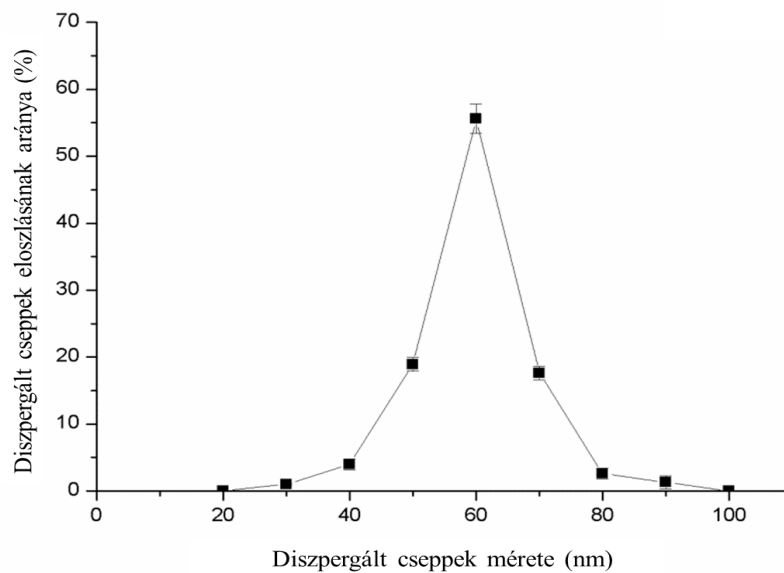
4.1. Szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS formulálása és a gyógyszerforma hatásvizsgálata

4.1.1. SMEDDS cseppméretének meghatározása

A pszeudoterner fázisdiagram eredményei alapján a 2. összetételt választottuk ki a mikroemulzió formulálásához, mivel ezen a diagramon észleltük a maximális mikroemulziót jelző zónát (11. ábra). Előző munkánk során meghatároztuk a 2. összetételben lévő felületaktív anyagok kritikus micellaképződési koncentrációját, illetve CaCo-2 sejtvonalon MTT citotoxicitási tesztet is végeztünk (Ujhelyi és mtsai 2012, 2013). Az előző vizsgálatok során kapott CMC és a citotoxicitási vizsgálatok eredményeit összevetettük a fázisdiagramon látható értékekkel, amely igazolta, hogy a 2. összetétel megfelelő. A 2. összetétel a következő komponensekből állt: 25% szilimarin olaj, 33,3% Cremophor RH40, 20% Transcutol HP, 16,6% Labrasol, 5% Capryol 90. DLS készülék segítségével a 2. összetétel cseppmérete: 57.8 ± 3.32 nm (12. ábra). A mikroemulzió spontán kialakult az összetétel vízzel történő összekeverésekor, és az emulzióképzési idő 20-30 másodperc között volt. Az átláthatósági index értéke: 97.68 ± 1.31 % a refraktív index értéke: $1,337 \pm 0,13$ % volt. A készítmény 25°C-on 1 hónapig stabil maradt.



11. ábra. A 2. összetétel pszeudoterner fázisdiagramja. A diagramon látható sötét rész szemlélteti a mikroemulziós zónát.



12. ábra. DLS mérések alapján a kiválasztott 2. SMEDDS összetétel cseppmérete vízzel való hígítás után. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=5)

4.1.2. A szilimarin olaj-SMEDDS hatása a májenzim értékekre

Az 5. táblázat összegzi a szilimarin olaj-SMEDDS készítmények (500 mg/kg és 1000 mg/kg) befolyását az AST és ALT értékekre. A szén-tetraklorid expozíciót követően az enzimértékek lényegesen emelkedtek a kontrol csoporthoz képest. Az 500mg/kg és 1000 mg/kg szilimarin olaj-SMEDDS előkezelés szignifikánsan mérsékelte a szén-tetraklorid okozta enzimértékek növekedését. A nagyobb dózisban (1000 mg/kg) adott szilimarin-olaj SMEDDS előkezelés hatásosabbnak bizonyult.

	KONT -ROL	CCL ₄	SMEDD S 500 mg	SMEDD S 1000 mg	SMEDDS 500 mg + CCL ₄	SMEDDS 1000 mg + CCL ₄
AST (IU/L)	80.742 ±15.0 92	2318.225±1 66.311***	68.614±2 .273 ###	62.391±4 .471 ###	2163.142±15 8.848***/#	1352.714±69. 643***/###
ALT (IU/L)	48±4. 873	2384.457±1 97.398***	45.542±3 .820 ###	46.714±3 .039 ###	1934.285±10 9.809***/###	1261.542±10 8.993***/###

5. táblázat. Szilimarin olaj-SMEDDS (1000 mg/kg, 500 mg/kg) készítmények és szén-tetraklorid (1 ml/kg) intoxikáció hatása az szérumban mért AST és ALT enzimszintre. A mért adatokat átlag ±SD formában ábrázoltuk (n=8). A kontrol csoporthoz viszonyított szignifikanciát csillaggal * jelöltük (p < 0,05). A szén-tetraklorid intoxikációt kapott csoporthoz viszonyított szignifikanciát üres kereszttel # jelöltük (p < 0,05).

4.1.3. A szilimarin olaj-SMEDDS hatása az antioxidáns enzimek értékeire

A májhomogenizátumból mért antioxidáns enzimértékek változását a táblázat szemlélteti (6. táblázat). Az eredmények szerint az intraperitoneális CCL₄ injekció (1ml/ttkg) sziginfikánsan csökkentette a májhomogenizátumból kimutatott CAT és GPX enzimaktivitást a kontrol csoporthoz képest. A SOD és GR értékek csökkenése nem volt szignifikáns. A szilimarin olaj- SMEDDS készítmények előkezelése csökkentette a CCL₄ intoxikáció okozta májkárosodást dózistól függően. A SOD értékek 28.5%-al és 37.5%-al nőttek 500 mg/kg és 1000 mg/kg készítmény beadását követően, összehasonlítva a CCL₄ csoport értékeivel.

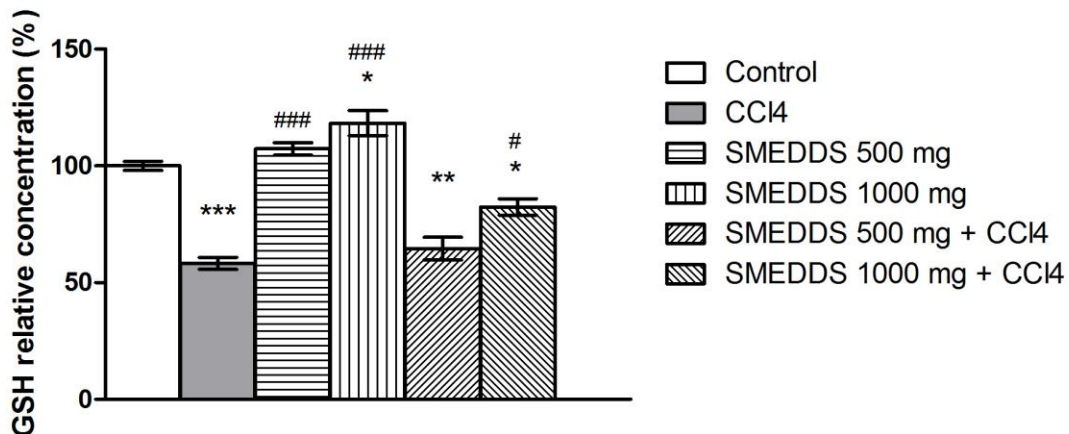
A készítmény előkezelése a CCl₄ expozíció előtt a CAT és GPx enzim növekedését is okozta. A CCl₄ csoporthoz képest a CAT aktivitás 22,5%-al és 45,5%-al a GPx aktivitást 18,6%-al és 48,6%-al növelte a készítmény dózisától (500 mg/kg, 1000 mg/kg) függően. Habár a GR aktivitás csökkenése nem volt szignifikáns a CCl₄ adást követően, de így is 22,5%-al és 33,5%-al növekedett a SMEDDS készítmény dózisától függően.

	Kontrol	CCl ₄	SMEDDS 500 mg	SMEDDS 1000 mg	SMEDDS 500 mg + CCl ₄	SMEDDS 1000 mg + CCl ₄
SOD	100±0.032	75.5±0.024	112±0.068	120±0.043 _#	104±0.013	113±0.016
CAT	100±0.655	81.5±0.388*	123±0.519*/###	148±0.346**/###	104±0.198###	127±0.605###
GPX	100±0.777	83.4±2.406***	122±0.831***/###	136±2.220***/###	102±0.112###	132±4.287***/###
GR	100±0.019	84.5±0.003	116±0.003*/#	138±0.010**/#	107±0.001	118±0.006

6. táblázat. A májhomogenizátumból mért antioxidáns enzimértékek változása szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) után és szén-tetraklorid (1ml/kg) intoxikációban. A mért adatokat átlag ±SD formában ábrázoltuk (n=8), %-ban adtuk meg az értékeket a kezeletlen kontrol csoporthoz viszonyítva. A kontrol csoporthoz viszonyított szignifikanciát csillaggal * jelöltük (p < 0,05). A szén-tetraklorid intoxikációt kapott csoporthoz viszonyított szignifikanciát üres kereszttel # jelöltük (p < 0,05). A csoportok közötti szignifikanciák összehasonlítását kétutas ANOVA módszerrel és Bonferroni teszttel végeztük.

4.1.4. GSH mérés eredménye

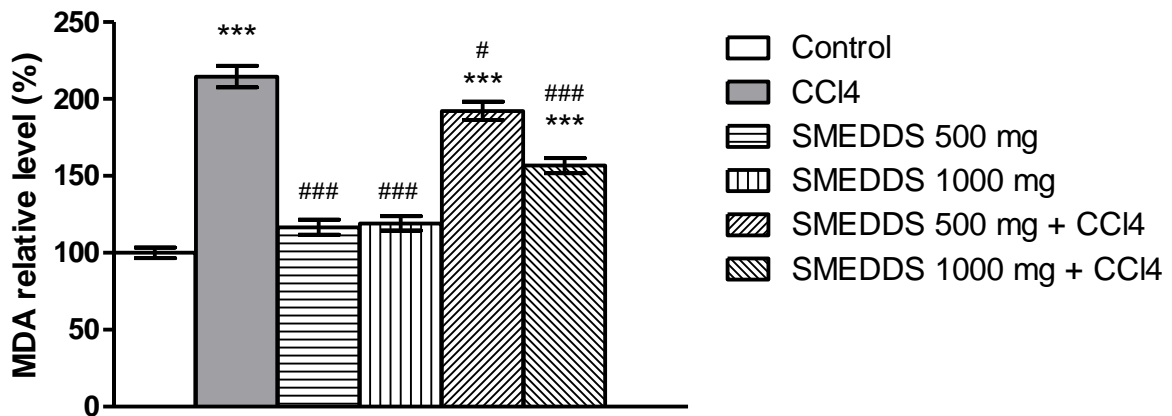
Az 12. ábra mutatja a májhomogenizátumból mért GSH koncentráció értékeit a különböző csoportoknál. A CCl₄ injekció után az értékek 42%-al csökkentek a kontrol csoporthoz képest. A szilimarin olaj-SMEDDS készítmény előkezelése 6%-al és 24%-al növelte a GSH szintet a készítmény dózisától függően (500 mg/kg és 1000 mg/kg). A nagyobb dózisban adott SMEDDS (1000 mg/kg) előkezelés szignifikánsan növelte a GSH szintet a CCl₄ csoporthoz képest.



12. ábra. A májhomogenizátumból mért GSH értékek változása szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) után és szén-tetraklorid (1 ml/kg) intoxikációban. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=8), %-ban adtuk meg az értékeket a kezeletlen kontrol csoporthoz viszonyítva. A kontrol csoporthoz viszonyított szignifikanciát csillaggal * jelöltük ($p < 0,05$). A szén-tetraklorid intoxikációt kapott csoporthoz viszonyított szignifikanciát üres kereszttel # jelöltük ($p < 0,05$). A csoportok közötti szignifikanciák összehasonlítását kétutas ANOVA módszerrel és Bonferroni teszttel végeztük.

4.1.5. MDA koncentrációk mérésének eredménye

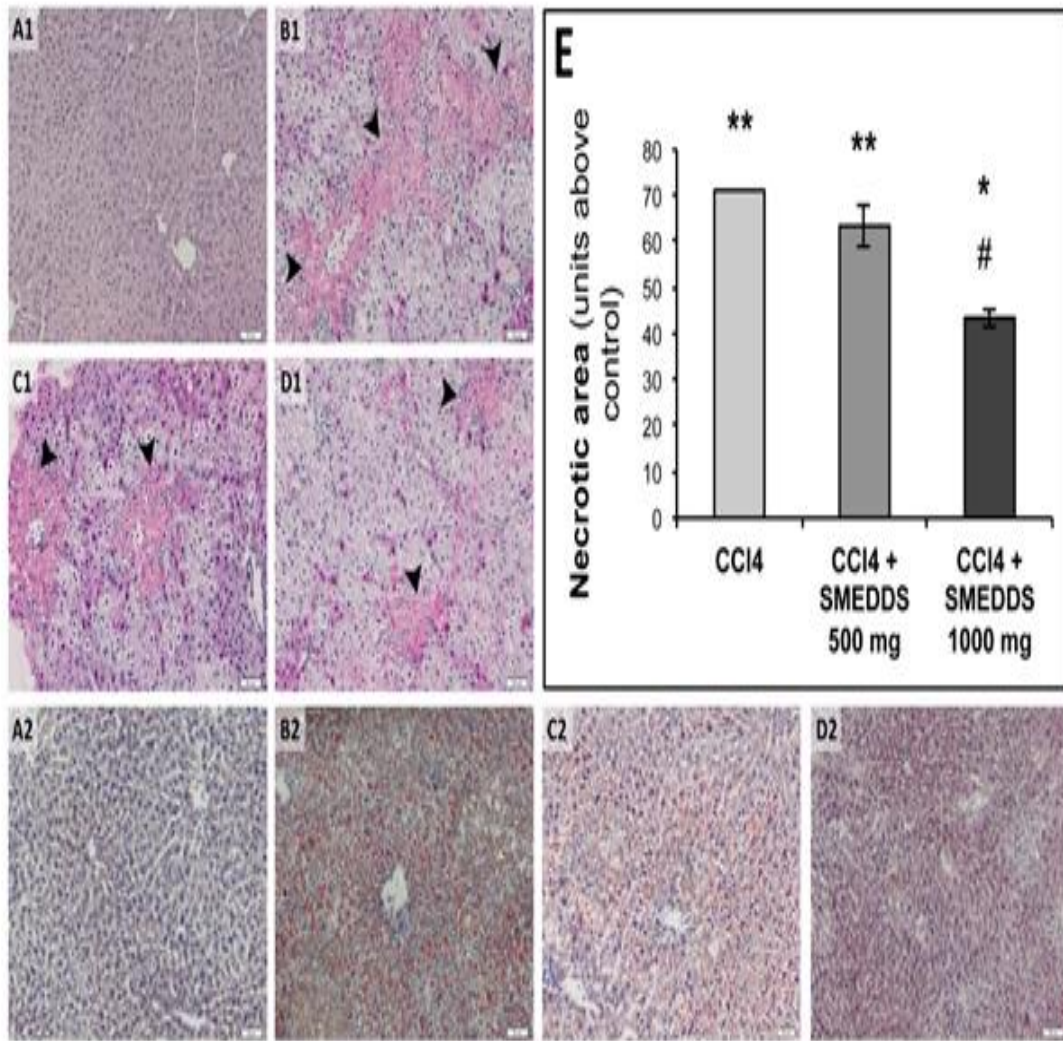
Az 13. ábra a májszövetből mért MDA koncentrációk változását mutatja. A lipid peroxidáció végtermékének a koncentrációja 114,5%-al magasabb értéket mutatott a CCl₄ toxikációt követően a kontrol csoporthoz képest. A SMEDDS készítmények előkezelése mindkét dózisban (500 mg/kg és 1000 mg/kg) szignifikánsan csökkentette a májszövetben mért MDA koncentrációkat, (22% és 58%-kal). A kontrolhoz képest a SMEDDS készítmények beadása nem szignifikáns, kismértékű növekedést okoztak.



13. ábra. A májhomogenizátumból mért MDA értékek változása szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) után és szén-tetraklorid (1 ml/kg) intoxikációban. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=8), %-ban adtuk meg az értékeket a kezeletlen kontrol csoporthoz viszonyítva. A kontrol csoporthoz viszonyított szignifikanciát csillaggal * jelöltük ($p < 0,05$). A szén-tetraklorid intoxikációt kapott csoporthoz viszonyított szignifikanciát üres kereszttel # jelöltük ($p < 0,05$). A csoportok közötti szignifikanciák összehasonlítását kétutas ANOVA módszerrel és Bonferroni teszttel végeztük.

4.1.6. A máj hisztopatológiai vizsgálata

A kontrol minták egér májszövege normál struktúrát mutatott. A CCl₄ kezelést követően a májszöveten nagymértékű centrolobuláris nekrozist, vacuoláris zsírosodást (14. ábra) detektáltunk. A szilimarín olaj-SMEDDS alacsonyabb dózisban (500 mg/kg) történő előkezelése nem védte ki a CCl₄ toxikációt és nagy nekrotikus részek maradtak a májszöveten. A nagyobb dózisban adott SMEDDS (1000 mg/kg) készítmény esetében kisebb mértékű máj nekrozist és a zsírosodást figyelhettünk meg (14. ábra).

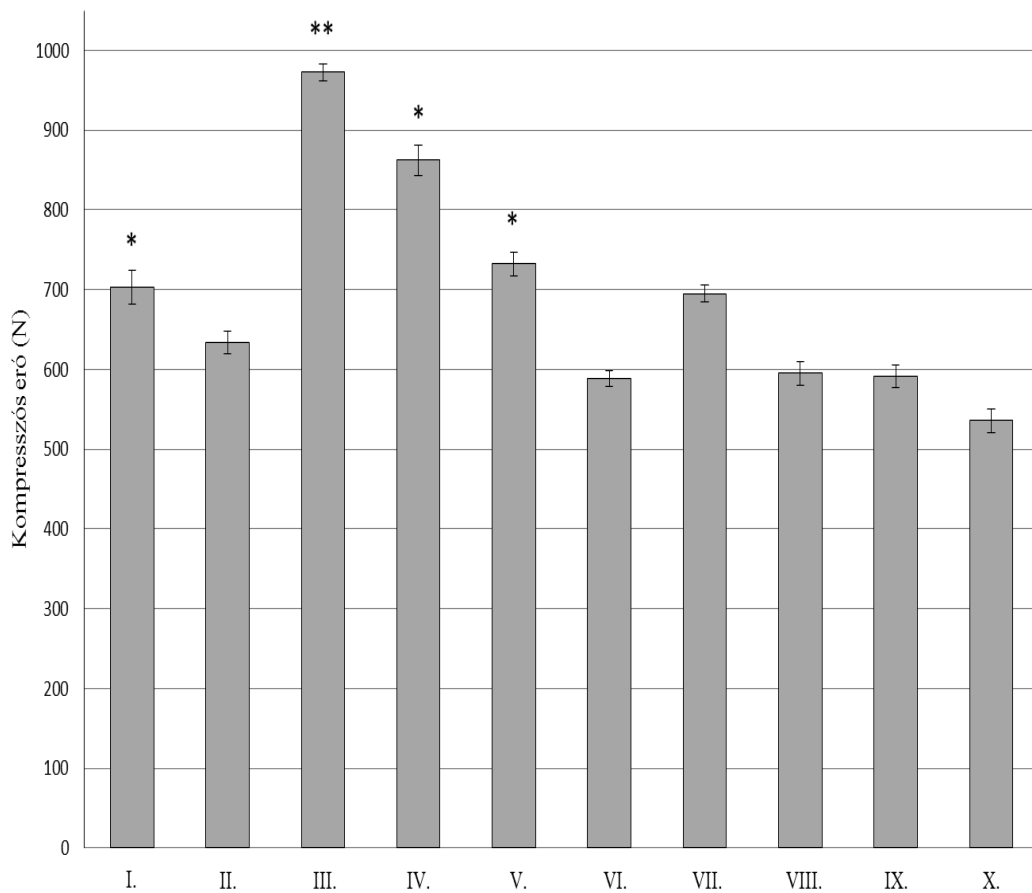


14. ábra. A szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) és szén-tetraklorid intoxikáció (1ml/kg) hatása egér májszövetre, annak hisztopatológiai változásai. (A) Kontrol csoport, (B) Szén-tetraklorid intoxikációt kapott csoport, (C) SMEDDS (500 mg/kg) és szén-tetraklorid kezelést kapott csoport, (D) SMEDDS (1000 mg/kg) és szén-tetraklorid kezelést kapott csoport, 1 hemoxicillin-eozin festés (nyilak jelzik a centrolobuláris nekrozist), 2 Oil-Red O festés (piros pöttyök jelzik a vacuoláris zsírosodást). A nekrotikus terület nagyságát az átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=8), %-ban adtuk meg az értékeket a kezeletlen kontrol csoporthoz viszonyítva. A kontrol csoporthoz viszonyított szignifikanciát csillaggal * jelöltük ($p < 0,05$). A szén-tetraklorid intoxikációt kapott csoporthoz viszonyított szignifikanciát üres kereszttel # jelöltük ($p < 0,05$). A csoportok közötti szignifikanciák összehasonlítását kétutas ANOVA módszerrel és Bonferroni teszttel végeztük.

4.2. Szilimarin port tartalmazó krém formulációs vizsgálatának és a krém UVB sugárzás okozta károsodás kivédésének és kezelésének eredménye

4.2.1. Textúra analízáló készülékkel történő kompressziós vizsgálatok eredménye

A kompressziós vizsgálat során minden szilimarin port tartalmazó összetétel különböző ellenállást mutatott. Az 15. ábra mutatja a krémek penetrációjához szükséges erőt (N). A hasonló emulgenst tartalmazó krémeket összehasonlítva, azoknál a készítményeknél, amelyekben Transcutol HP-ben volt oldva a szilimarin por, kisebb ellenállásértékeket mértünk, mint azoknál az összetételeknél, amelyeknél a por szuszpendált formában volt. A legkisebb ellenállásértéket azoknál az összetételeknél tapasztaltuk, melyeknél a szilimarin por oldott formában volt jelen és az emulgens cukor-észter volt. (VIII., IX., X.).



15. ábra. A szilimarin krém összetételek (I-X) ellenállása, kompressziós erőben (N) kifejezve. Mindegyik adat az átlagot \pm S.D jelöli, n=5. Az adatok kiértékelésénél több utas Anova módszert használtunk, a csoportok közötti összehasonlítást Persian korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.01$) és két csillaggal ** ($p < 0.1$) jelöltük a szignifikáns különbségeket a szilimarin port szuszpendált és oldott formában tartalmazó összetételek között.

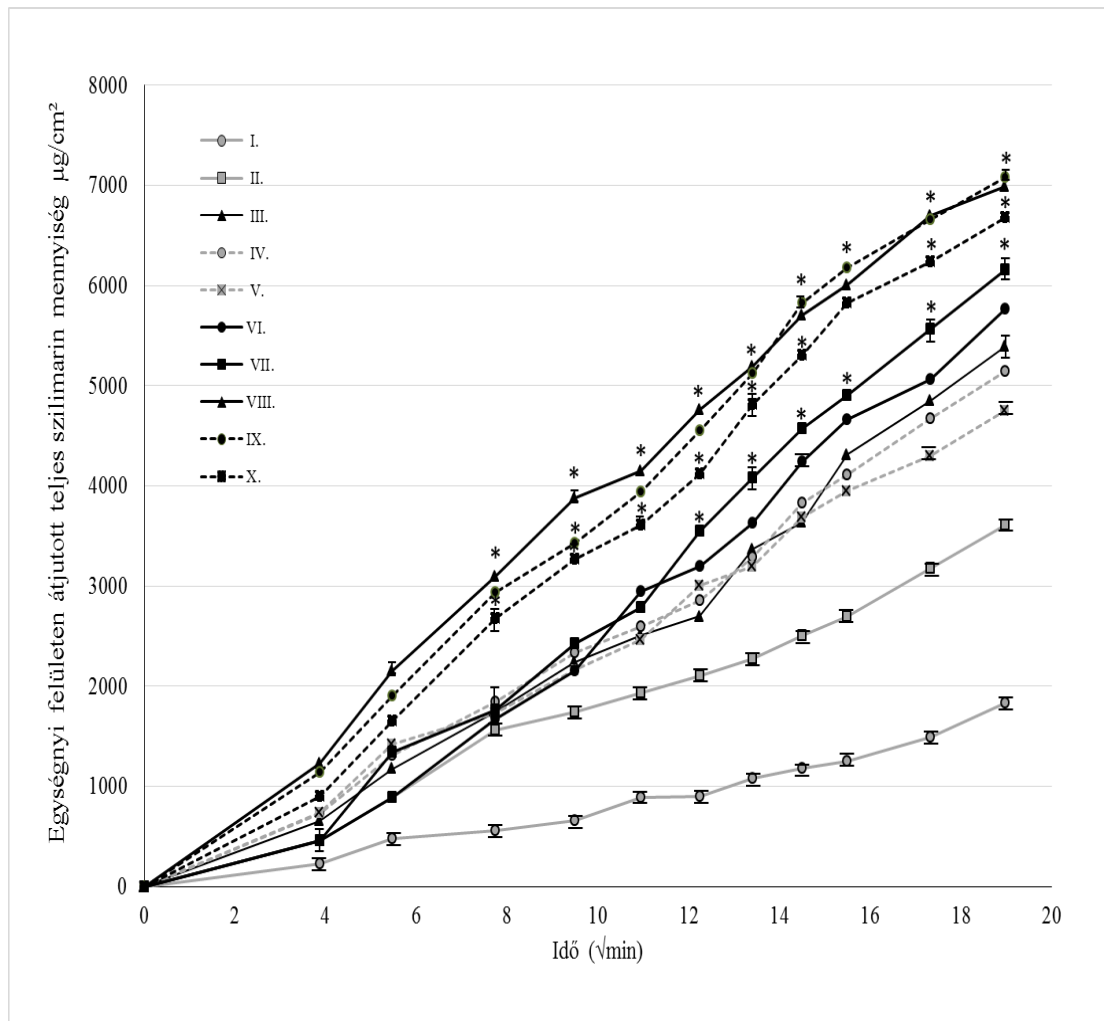
4.2.2. in vitro membrán diffúziós vizsgálatok eredménye

A 16. ábra egységnyi területre számított szilimarin diffúziójának kumulatív értékeit mutatja a különböző összetételeknél (I-X) az idő négyzetgyökéhez viszonyítva. Azok az összetételek mutattak a legjobb diffúziós értékeket, amelyeknél a szilimarin port előzőleg TC-ban oldottuk.

Megállapítottuk, hogy a hatóanyag felszabadulása a különböző formulációkból a következő csökkenő sorrendet mutatott: IX>VIII>X>VII>VI>III>IV>V>II>I. Magasabb értékeket kaptunk azoknál az összetételeknél, amelyeknél az SM port előzőleg TC-ban oldottuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a legjobb gyógyszerfelszabadulás azoknál az összetételeknél volt, ahol emulgensként SP50 és SP70 cukor-észtert alkalmaztunk.

A legjobb diffúziós értéket a IX. összetételnél tapasztaltuk, ahol TC-ban volt oldva a szilimarin por és SP70-et használtunk emulgensként. A hatóanyag diffúziós értéke $7083.47 \pm 40.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ volt.

Szilimarin felszabadulási rátát, k a görbék meredekségéből számoltuk, ahol az egységnyi területre számolt hatóanyag felszabadulás értékeit ábrázoltuk. A vivőanyagból a hatóanyag diffúziós koefficiens (D) értékeit a felszabadulási ráta értékeiből számoltuk (Guy és Hadgraft 1990). A felszabadulási ráta értékei és a diffúziós koefficiens értékeket a 7. táblázat tartalmazza.



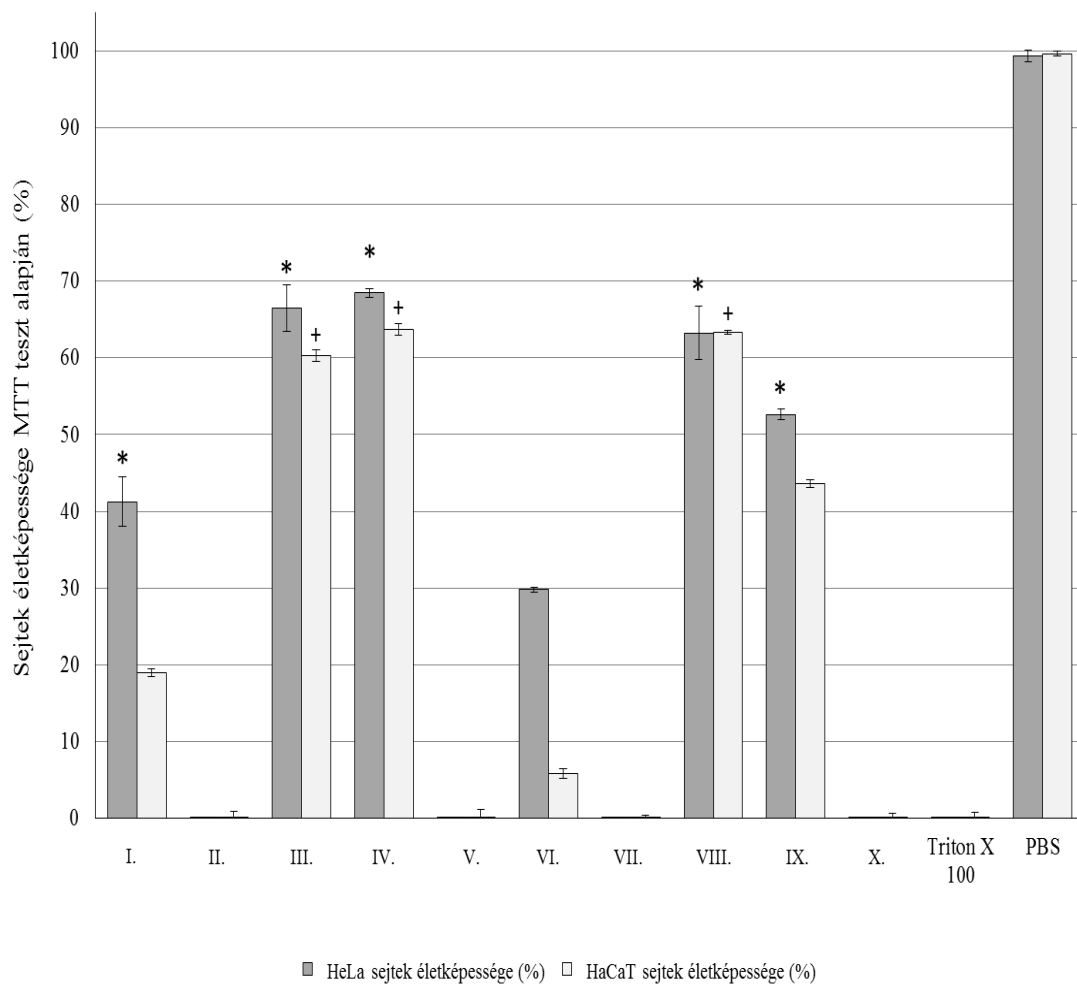
16. ábra. A szilimarín por felszabadulása a készítményekből (I-X), IPM-mel impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül. Mindegyik adat az átlagot \pm S.D jelöli, $n=5$. Az adatok kiértékelésénél több utas Anova módszert használtunk, a csoportok közötti összehasonlítást Persian korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.05$) jelöltük a szignifikáns különbségeket a szilimarín port szuszpendált és oldott formában tartalmazó összetételek között.

<u>Összetételek</u>	<u>Felszabadulási Ráta</u> $k \cdot 10^2 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{1/2}] \pm \text{SD}$	<u>Diffúziós koefficiens</u> $D 10^5 [\text{cm}^2/\text{min}] \pm \text{SD}$
I	0,075±0,12	0,21± 0,02
II	1,30±0,32	0,73±0,05
III	1,41±0,33	1.36± 0,23
IV	2,01±0,23	1,57±0,25
V	4,24±0,14	0,71± 0,23
VI	2,00±0,31	0,93± 0,25
VII	5,94±0,45	24,1±0,24
VIII	4,68±0,26	47,23± 0,42
IX	4,71±0,13	30,22± 0,20
X	3,99±0,35	18,00±0,13

7. táblázat. Az összetételek (I-X) szilimarín felszabadulási rátájának és diffúziós koefficiens értékei. Mindegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, n=5

4.2.3. MTT teszt eredménye

Mindegyik szilimarín krém összetételét (I-X) megvizsgáltuk MTT citotoxicitási teszttel, a HeLa és HaCaT sejtvonalon (17. ábra). Az összetételek toxikusabbnak bizonyultak HaCaT sejtvonalon. Megállapítottuk, hogy a vizsgált összetételek sejtelétképességre gyakorolt hatása a krémekben lévő emulgens típusától függött. A sejtelétképesség értékei a következő csökkenő sort mutatott az emulgenstől függően: SP70 > P60 > SP50 > PS750 = C. HeLa és HaCaT sejtvonalon egyaránt az SP70 emulgenstartalmú krém volt a legjobban tolerálható, a sejtelétképesség értéke 68.45%±0.6 HeLa és 63.7±0.6 % HaCaT sejteken. Az sejtelétképesség eredményeit a TritonX-100 pozitív kontrollhoz viszonyítottuk.

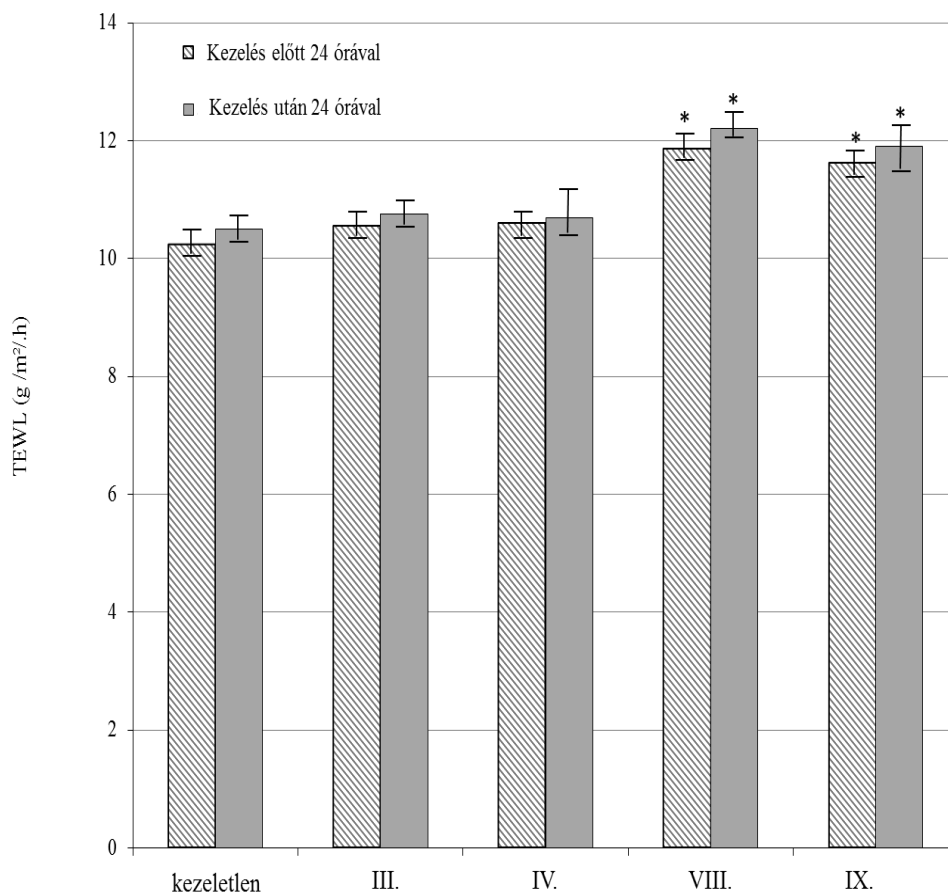


17. ábra. Az MTT teszt sejtleletképesség eredménye HaCat és HeLa sejteken a szilimirin tartalmú krémösszetételek (I-X) kezelése után.

Mindenegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, n=10. Az adatok kiértékelésénél több utas Anova módszert használtunk, a csoportok közötti összehasonlítást Pearson korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.05$) és kereszttel + ($p < 0.05$) jelöltük a szignifikáns különbségeket a pozitív (Triton-X) és negatív (PBS) kontrol eredményekhez viszonyítva.

4.2.4. in vivo TEWL mérések eredménye

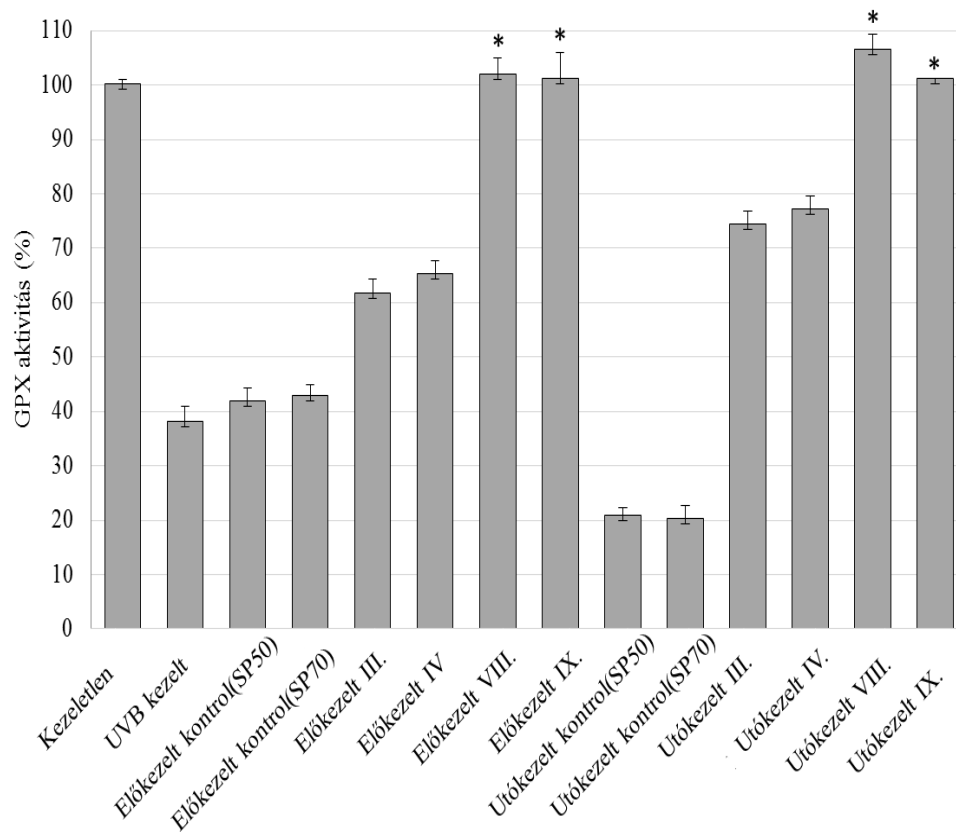
Az in vivo antioxidáns tesztek előtt a III, IV, VIII, IX formulációt bőr irritációs tesztnek vetettük alá. A VIII és IX. összetétel magasabb TEWL értéket mutatott (18. ábra). Egyik krémmnél sem mutatkozott szignifikáns különbség a TEWL értékben 24 órával a krém felkenése előtt és után.



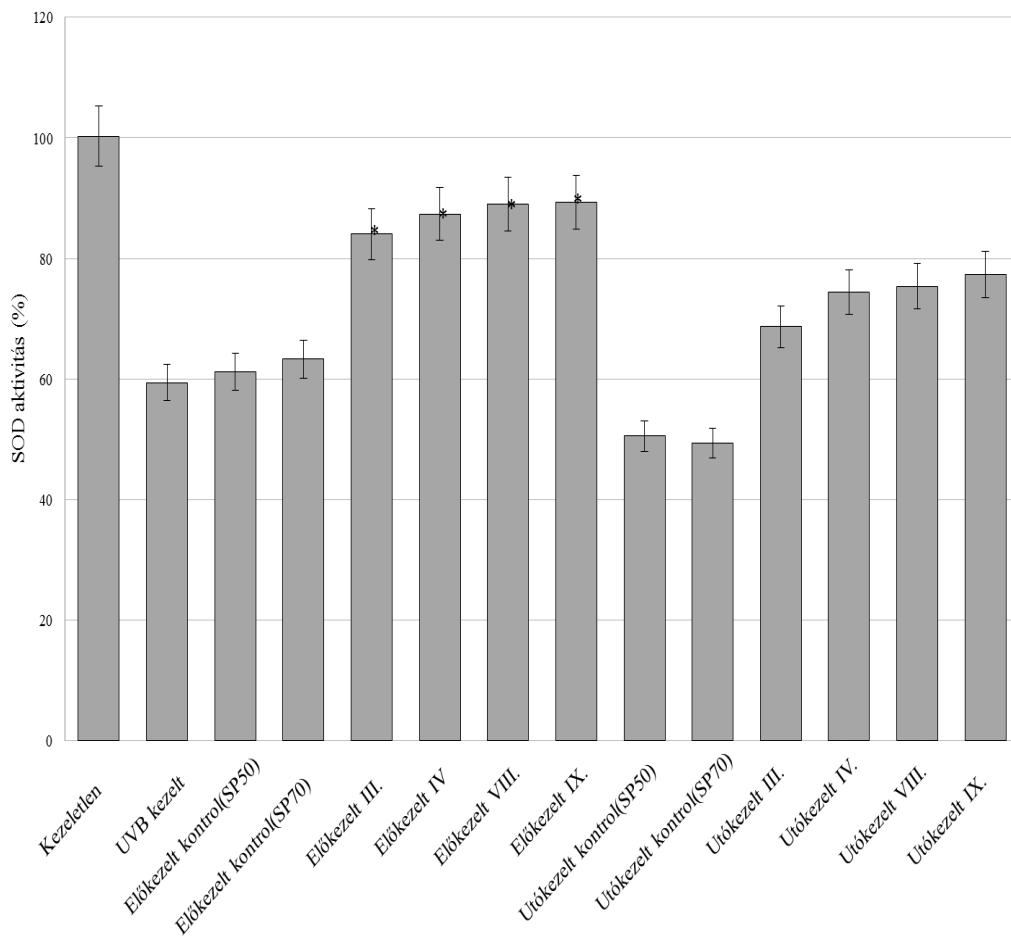
18. ábra. Tengerimalac hátán végzett in vivo bőr irritációs teszt eredménye. A TEWL értékek változása a szilimarin tartalmú krémek kezelése előtt és után 24 órával. Mindegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, $n=5$. Az adatok kiértékelésénél több utas Anova módszert használtunk, a csoportok közötti összehasonlítást Persian korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.05$) jelöltük a szignifikáns különbségeket kezeletlen csoporthoz viszonyítva.

4.2.5. UV-B sugárzás hatásának vizsgálata HaCaT sejteken. A szilimarin krémek antioxidáns hatása elő- és utókezelésben

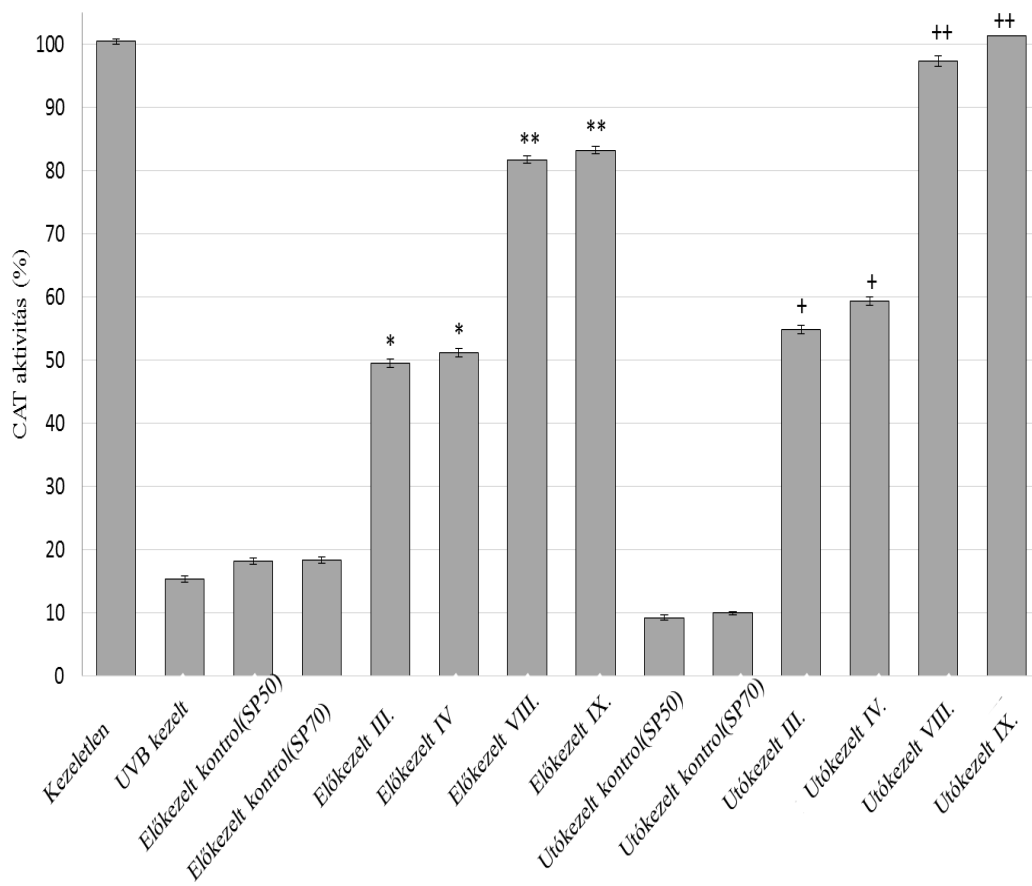
Az MTT citotoxicitási vizsgálatok és a TEWL mérések alapján azt a négy összetételt választottuk ki a további antioxidáns vizsgálatokhoz, melyek emulgensként SP50 vagy SP70 típusú cukorésztert tartalmaznak. Ennek a négy összetételnek (III, IV, VIII, IX) az antioxidáns hatását vizsgáltuk HaCaT sejtvonalon, a krémek a szilimarin port vagy oldott vagy szuszpendált formában tartalmazták. A sejtuszuspenzióban mértük az antioxidáns enzimek közül a GPX, CAT és SOD értékeket valamint az MDA koncentrációt. UVB sugárzást követően a GPX (19. a ábra), SOD (19.b ábra) és CAT (19.c ábra) enzimszintek mindaránt csökkentek a kezeletlen csoportokhoz képest. A krémek elő és utókezelése növelte mindhárom antioxidáns enzim értékét. Mindegyik összetétel esetében nagyobb mértékű növekedést tapasztaltunk a hatóanyag nélküli kontrol csoportokhoz képest. A szilimarin port oldott formában tartalmazó krémek nagyobb mértékben növelték az antioxidáns enzimértékeket. A szilimarin port oldott formában tartalmazó készítmények (VIII., IX.) elő és utókezelése is szignifikánsan növelte a GPX enzimszintet a kontrol csoporthoz képest. A SOD enzim szintje szignifikánsan nőtt a krémek előkezelése során, de az utókezelésben az enzimmnövekedés nem volt szignifikáns. A CAT aktivitás szignifikáns emelkedést mutatott az elő és utókezelésekben is a kontrol csoportokhoz képest. Az MDA szint az UV sugárzást követően emelkedett a kezeletlen csoporthoz viszonyítva (19.d ábra). A készítmények elő és utókezelése egyaránt csökkentette a lipid peroxidáció végtermékét, a VIII. és IX. összetétel elő és utókezelésben is szignifikáns csökkenést okozott a kontrol csoportokhoz képest.



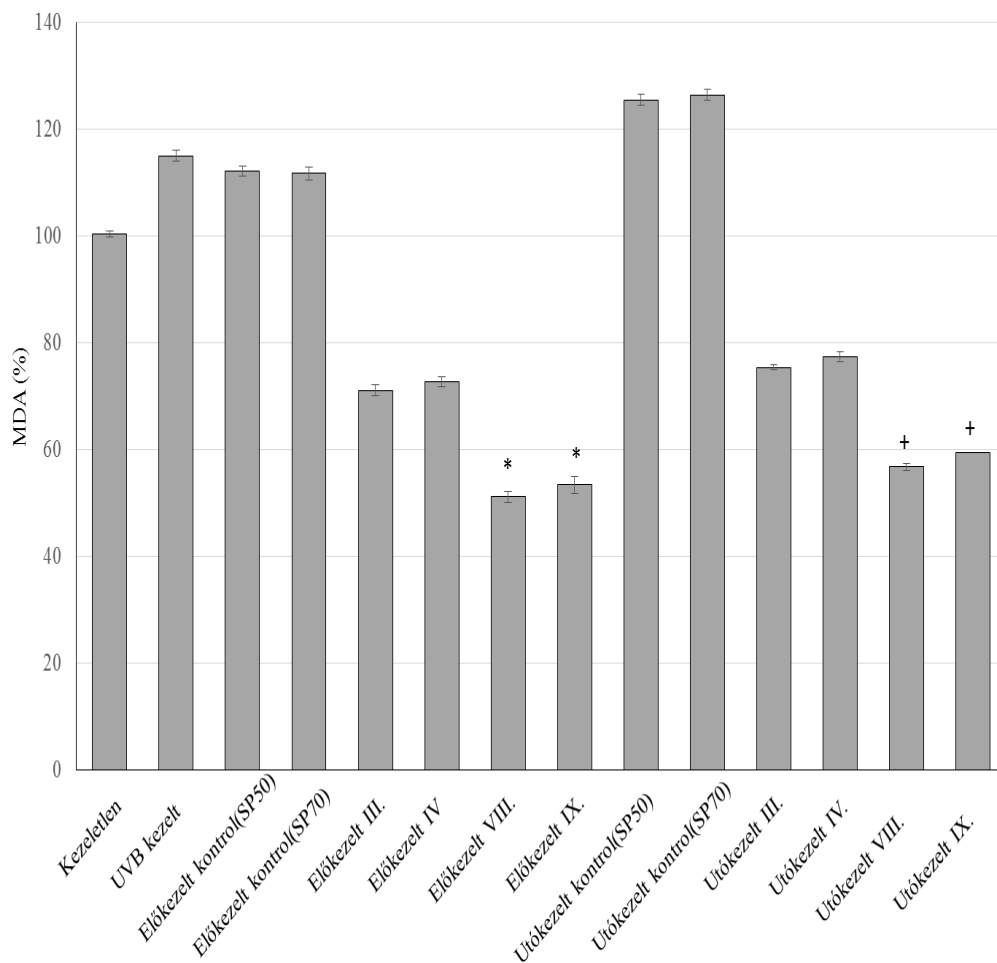
19.(a)



19.(b)



19.(c)



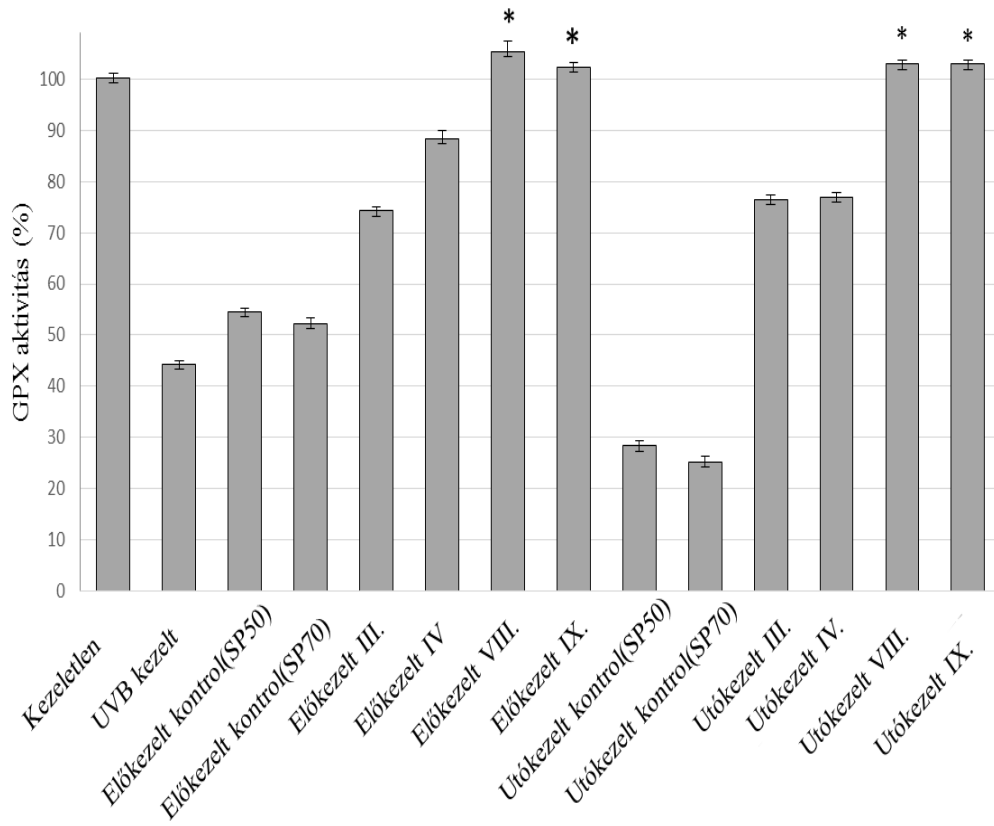
19.(d)

19 (a-d) ábra. A szilimarin tartalmú krémek (III, IV, VIII, IX) elő és utókezelésének a hatása különböző antioxidáns enzim aktivitásra HaCaT sejtvonalon, UVB sugárzás után.

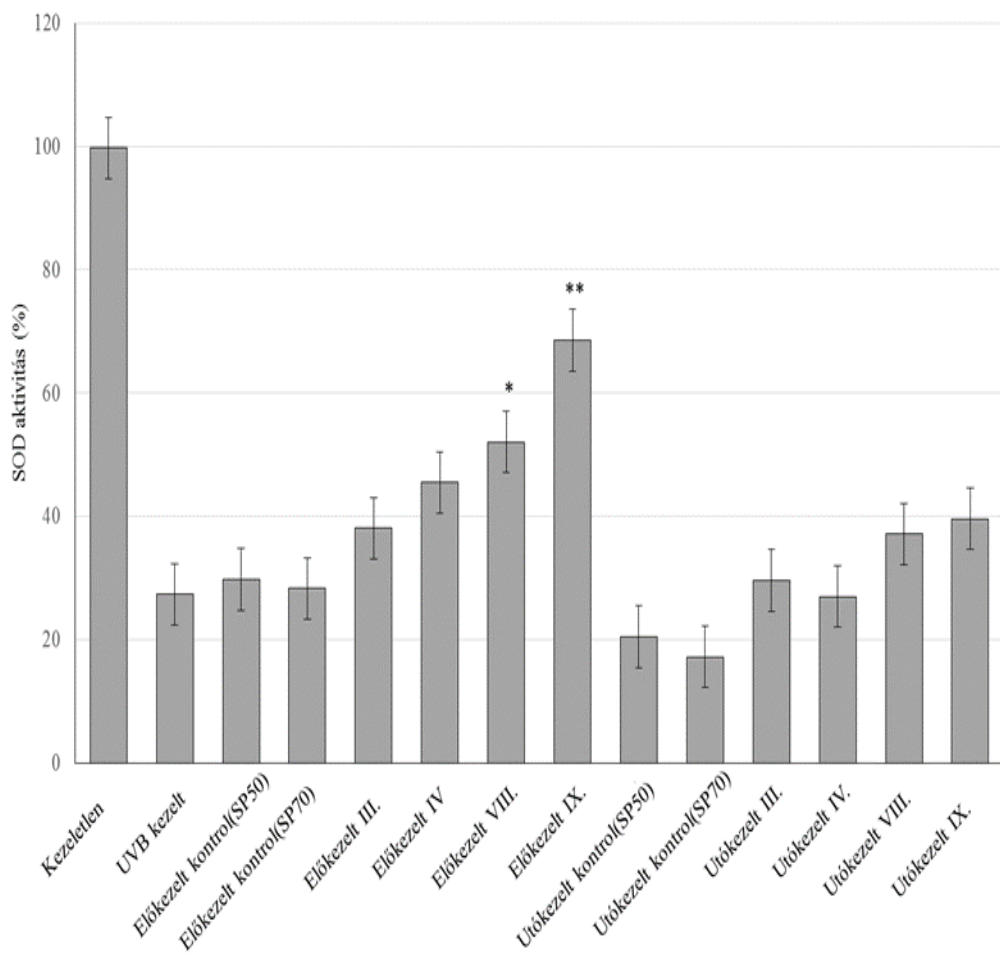
A glutation peroxidáz (a), szuperoxid dizmutáz (b), kataláz (c) és malondialdehid (d) aktivitásokat a kezeletlen keratinocitákhoz viszonyítottuk és százalékban fejeztük ki. Mindegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, n=10. A GPX, SOD, CAT, MDA kiértékelésnél több utas ANOVA módszert alkalmaztunk, a csoportok összehasonlítását Pearson korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.05$) és kereszttel + ($p < 0.05$) jelöltük a szignifikáns különbségeket a szilimarin port szuszpendált és oldott állapotban tartalmazó készítmények között.

4.2.6. UV-B sugárzás hatásának vizsgálata tengerimalac modelen. A szilimarin krémek antioxidáns hatásának vizsgálata elő és utókezelésben

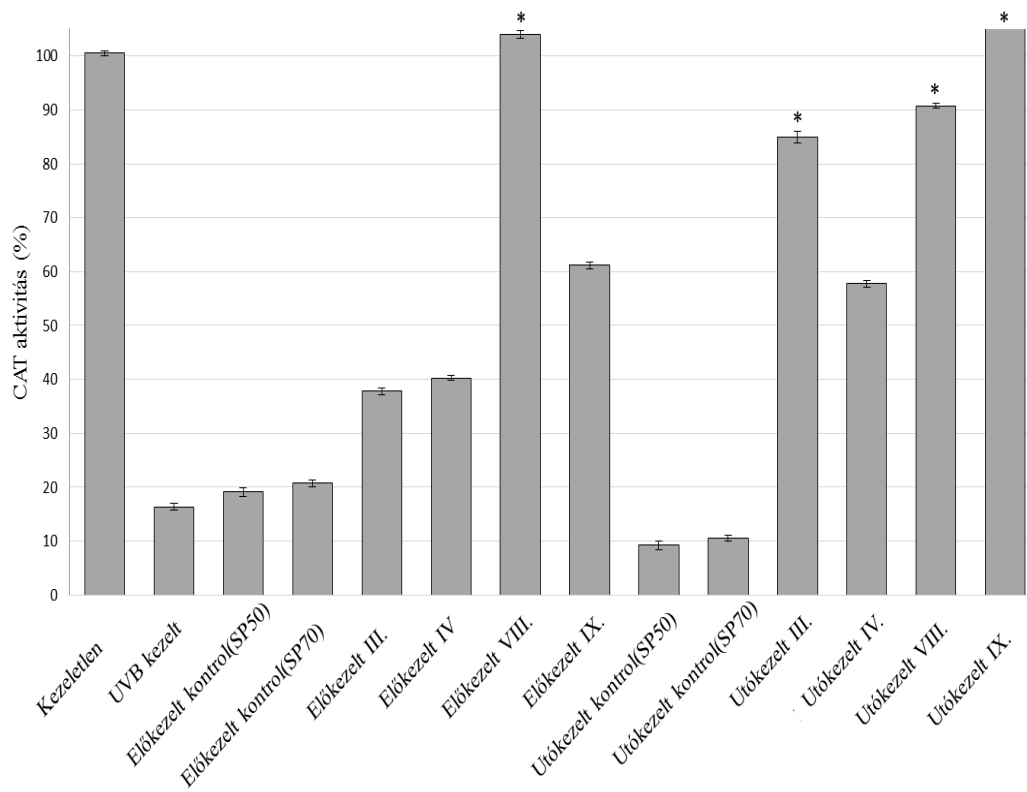
Az előzőekben leírt kritériumok alapján választott négy krémösszetétel (III., IV., VIII., IX.) antioxidáns hatását vizsgáltuk tengerimalac bőrszövetén. Az 20. (a-c) ábrák az antioxidáns enzimszintek változását mutatják. Az UV-B sugárzást követően mindhárom antioxidáns enzimszint (GPX, SOD, CAT) csökkenést mutatott a kezeletlen csoporthoz képest. A krémek elő és utókezelése a bőrszövetben mért antioxidáns enzimszintek növekedését okozta a kontrol csoportokhoz képest. A szilimarin port oldott formában tartalmazó krémek esetében a növekedés mértéke minden esetben nagyobb volt összehasonlítva azokkal a készítményekkel, amelyekben a hatóanyag szuszpendált formában volt jelen. A GPX szintek szignifikáns növekedést mutattak a kontrolhoz képest azoknál a készítmények elő és utókezelésében is, amelyeknél a szilimarin por transcutolban oldott formában volt jelen (VIII., IX.). A VIII. és IX. krém előkezelése szignifikánsan növelte a SOD enzim szintjét. Az antioxidáns enzimek közül a CAT aktivitás szignifikáns növekedést mutatott az VIII. összetételnél elő és utókezelésben egyaránt, ezen kívül a III., VIII. és IX. krém utókezelése szintén szignifikáns emelkedést okozott a kontrol csoportokhoz képest. Az MDA koncentráció az UV-B sugárzást követően emelkedett a kezeletlen csoporthoz képest (20.d ábra). Mindegyik krémösszetétel elő és utókezelése csökkentette a lipid-peroxidáció végtermékének szintjét. A VIII. és IX. összetétel elő és utókezelése szignifikáns csökkenést okozott az MDA koncentrációban a kontrol csoporttal összehasonlítva.



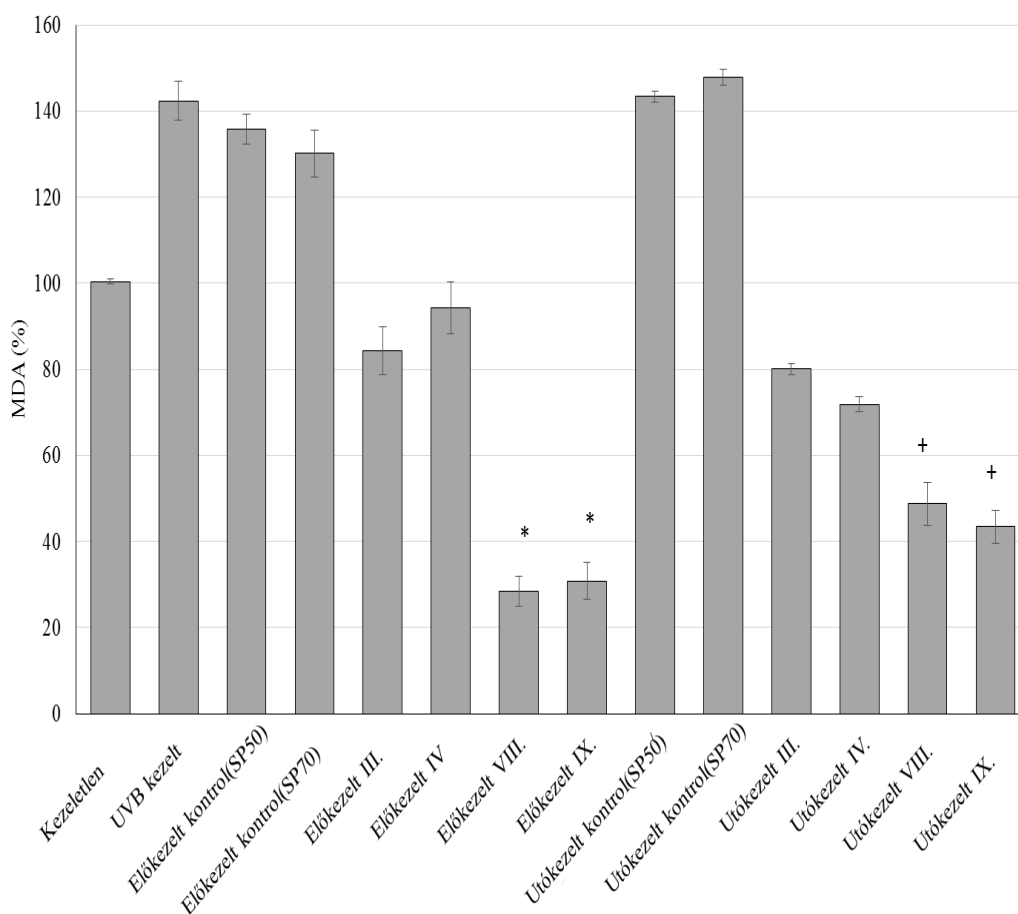
20. (a)



20.(b)



20.(c)



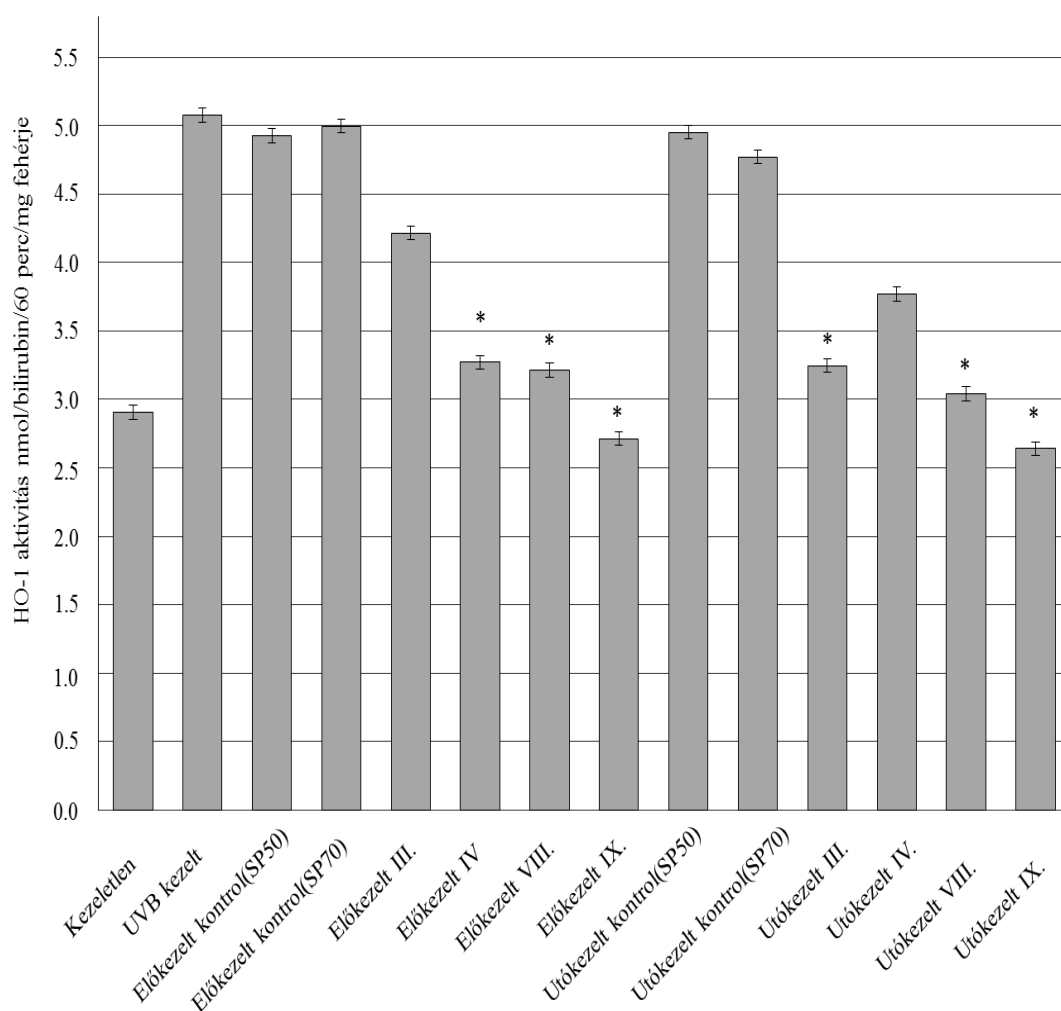
20.(d)

20. (a-d) ábra. Tengerimalac bőrszövetéből mért antioxidáns enzimaktivitások értéke a szilimarín tartalmú krémek (III, IV, VIII, IX) elő és utókezelése során, UVB sugárzás után.

A glutation peroxidáz (a), szuperoxid dizmutáz (b), kataláz (c) és malondialdehid (d) aktivitásokat a kezeletlen bőrszövetéhez viszonyítottuk és százalékban fejeztük ki. Mindegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, $n=5$. A GPX, SOD, CAT, MDA kiértékelésnél több utas ANOVA módszert alkalmaztunk, a csoportok összehasonlítását Pearson korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.05$) és kereszttel + ($p < 0.05$) jelöltük a szignifikáns különbségeket a szilimarín port szuszpendált és oldott állapotban tartalmazó készítmények között.

4.2.7. HO-1 enzim aktivitás

A HO-1 enzimszint változását négy krémösszetétel (III, IV, VIII, IX.) esetében vizsgáltuk tovább UVB sugárzás előtt és után. Az 21. ábra mutatja, hogyan változik a HO-1 aktivitás UVB sugárzást követően, illetve a krémekkel való elő és utókezelés során. Az UVB sugárzást követően a HO-1 enzim aktivitása nőtt a kezeletlen csoporthoz képest. A krémekkel való elő és utókezelés során az enzimaktivitás csökkenést mutatott a kontrol csoportokhoz képest. A csökkenés mértéke szignifikáns volt a VIII. és IX. összetétel elő és utókezelésében egyaránt, illetve a IV. krémösszetétel előkezelésekor valamint a III. készítmény utókezelésében.



21. ábra. Tengerimalac bőrszövetében mért HO-1 enzimértékek a szilimarintartalmú krémek (III., IV, VIII., IX.) elő és utókezelése során, UVB sugárzás után. A HO-1 aktivitás mértékegysége mmol/bilirubin/60 perc/mg fehérje. Mindegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, n=5. Az eredmények kiértékelésnél több utas ANOVA

módszert alkalmaztunk, a csoportok összehasonlítását Pearson korrelációval végeztük. Az ábrán csillaggal * ($p < 0.05$) jelöltük a szignifikáns különbségeket a kezeletlen csoporthoz viszonyítva.

5. Megbeszélés

5.1. Szilimarinolaj-SMEDDS készítmények formulálása és terápiás hatásának vizsgálata

A megfelelő gyógyszerforma kialakítása a perorális olajok bevitelét segítheti, a hatóanyag biohasznosulását növelheti. Munkánk során modern emulziós formát, önmikroemulgeáló rendszert alakítottunk ki szilimarin olajból, mely nemcsak vivőrendszerként alkalmaztuk, hanem egyúttal a hatóanyagként is.

A SMEDDS-ben lévő olaj komponens tulajdonsága és koncentrációja meghatározó elemei a gyógyszerformának (Zidan és mtsai. 2007). Az önemulgeáló rendszerben az olaj saját terápiás hatása azáltal növekszik, hogy perorális felszívódása jelentősen fokozódik (Gang és Yan 2011).

Az olajos fázis mellett a megfelelő felületaktív anyag kiválasztása is növeli a hatóanyag terápiás hatását az önemulgeáló rendszerben (Zidan és mtsai. 2007). Az összetételünkben Cremophor RH 40, Transcutol HP felületaktív anyagot, kotenzidként pedig Labrasol és Capryol 90-et használtunk. A formuláláshoz alkalmazott felületaktív anyagok citotoxicitását és membrán permeabilitásra gyakorolt hatását a munkacsoportunk előzőleg már megvizsgálta, így az eredmények alapján kerültek kiválasztásra a jelenlegi munkában (Ujhelyi és mtsai. 2012, Konsoula és Barile 2005). Előző kísérleteink során azt is megállapítottuk, hogy a felületaktív anyagok megváltoztathatják a sejtmembrán permeabilitását és a paracelluláris transzportot (Ujhelyi és mtsai. 2012). Feltételezésünk szerint, a szilimarin olajból és a megfelelő felületaktív anyagokból formulált önmikroemulgeáló rendszer valószínűleg a paracelluláris transzportot is befolyásolta, így növelve az olaj szájon át történő biohasznosulását.

A megfelelő gyógyszerforma kialakítása a hatóanyagok terápiás hatását növelheti, ugyanakkor a dózist csökkentheti, erre a célra megfelelő lehet az ön (mikro) emulgeáló rendszerek kialakítása. Ezt igazolja az, hogy állatkísérletekben, csak extrém magas dózisban, 2000 mg/kg (patkány) (Batakov és mtsai. 2001) illetve 10 g/ kg (egér) (Hermenean és mtsai. 2015) mutatott védő hatást májszövetben szén-tetraklorid toxikáció után.

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

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

A szilimarin olaj-SMEDDS előkezelés ugyanakkor antioxidáns védelmet mutatott az eger májszövetből mért antioxidáns enzimértékek alapján. A szén-tetraklorid okozta expozíció az antioxidáns enzimek csökkenését okozta, de a májhomogenizátumban mért enzim aktivitások (SOD, CAT, GPX, GR) nőttek a szilimarin-olaj-SMEDDS kezelést követően. Az antioxidáns enzimszintek növekedésének egyik lehetséges oka a szilimarinolaj linolénsav tartalma, amely az olaj egyik fő komponense. A linolénsav az endogén GSH oxidációját idézi elő, ami a szuperoxid anionok képződést generál. A szuperoxid-anion egy kaszkádot elindítva, növeli a SOD termelődést, mely emeli a máj hidrogén-peroxid koncentrációját, és ez a GPX és CAT reakciót katalizálja (Roy és mtsai 1995).

A szilimarin-olaj SMEDDS készítmény az eger májszövetében növelte a GR szintet a szén-tetraklorid okozta enzimszinthez képest, mely változás szintén a linolénsavhoz kapcsolható. Az eredményeink összhangban vannak Choi és mtsai. megfigyeléseivel, melyben a linolénsav izomerek GR növelő hatását írta le. (Choi és mtsai. 2007).

A lipidperoxidáció végtermékének, az MDA szintjének növekedése jelzi a szabadgyökök keletkezését (Fraga és mtsai. 1988). A szén-tetraklorid expozíciót követően az antioxidáns enzimek csökkenése az antioxidáns védelmi rendszer gyengüléséhez vezetett, amely automatikusan az MDA koncentráció növekedését vonta maga után. A szilimarin-olaj SMEDDS előkezelés csökkentette az MDA szintet, amely a formuláció antioxidáns hatását feltételezi, melynek oka valószínű az olajban lévő magas linolénsav, tokoferol és aszkorbinsav 2,6 dihexadekonát.

5.2. Szilimarin port tartalmazó krémek formulálása és terápiás hatásának vizsgálata

A szilimarin rossz vízoldékonysága a legfőbb oka az alacsony biohasznosíthatóságnak ezáltal korlátja a belsőleges és külsőleges gyógyszerformák kialakításának. (Woo és mtsai.2007). Hung és mtsai. (Hung és mtsai 2010) megfigyelése szerint a szilimarin főbb antioxidáns komponensei, a szilibinin, szilidianin és szilikrisztin, eltérő lipofilitásuk ellenére alig változtatják meg a bőr permeációját, vagyis a hatóanyag bejutásában a segédanyagoknak kulcsfontosságú szerepe van.

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

A formulálás során a szilimarin port szuszpenziós formában tartalmazó összetételek mellett sikerült olyan krémeket előállítani, melyekben a hatóanyag oldott állapotban volt. A szilimarin port Transcutolban oldottuk, amely jó szolubilizáló és penetrációt fokozó anyag, ugyanakkor nem toxikus és a bőrrel biokompatibilis (Mura és mtsai. 2000).

A krémek előállítása során különböző nemionos, amfifil tenzidet használtunk, úgy mint Poliszorbát 60, Cremophor A6, A25, cukorészter SP50, SP70 és PS750. Az emulziós rendszerű külsőleges készítményeknél a megfelelő, penetrációt fokozó emulgens kiválasztásával növelhetjük a készítmények penetrációját. A felületaktív anyagoknak fontos szerepe van a szolubilizációban is, ugyanakkor megváltoztathatják a gyógyszerek biohasznosíthatóságát, hiszen befolyásolják a hatóanyag abszorpcióját és penetrációját (Szűts és Szabó Révész 2012). A Franz diffúziós vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a szilimarin port oldott állapotban tartalmazó krémekből a hatóanyag felszabadulása és membránon való átjutása lényegesen jobb volt, mint a szuszpenziós összetételeknek. Az *in vitro* membrán diffúziós vizsgálatok során azt is megállapítottuk, hogy a membránon átjutott szilimarin mennyisége az emulgensként cukor-észtert tartalmazó összetételek esetében volt a legnagyobb.

A felületaktív anyagok toxikus koncentrációjának a meghatározása is szükséges ahhoz, hogy a gyógyszeradagolás biztonságos legyen (Ujhelyi és mtsai. 2012). Ennek érdekében, elsőként *in vitro* biokompatibilitási vizsgálatokat végeztünk (MTT teszt) HeLa és HaCaT sejteken. A HeLa sejtek a humán méhnyakrák megbízható modellje, de külsőleges készítmények vizsgálatára is használják (Ujhelyi és mtsai 2015,

Lewinska és mtsai. 2014) A HaCaT sejtek alkalmasak arra, hogy megállapítsuk a segédanyagok bőr irritációs potenciálját (Choi és mtsai. 2013). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az összetételekben lévő emulgensek hogyan befolyásolja a krémek tolerálhatóságát. Az MTT sejtéletképesség vizsgálatok során emulgensként cukor-észtert tartalmazó készítmények biztonságosabbnak bizonyultak, mint az emulgensként Cremofort és poliszorbátot tartalmazó krémek.

Az in vivo biokompatibilitási vizsgálatok során bőrirritációs tesztet (TEWL teszt) végeztünk az in vitro vizsgálatok során megfelelőnek bizonyult krémösszetételekkel (III., IV., VIII., IX.). A mért TEWL értékek szerint a szilimarin krémek nem okoztak bőrirritációt a tengerimalac bőrén.

A szilimarin ismert antioxidáns hatása alapján terveztük meg a külsőleges szilimarin tartalmú krém antioxidáns vizsgálatait. Az in vitro és in vivo kísérletekben 5féle antioxidáns vizsgálatot végeztünk, mert szerettünk volna egy átfogó képet kapni a készítmények antioxidáns hatásával kapcsolatban, valamint megfelelően alátámasztani a készítmény antioxidáns hatását. Így vizsgáltuk, a SOD, KAT, GPx illetve a MDA szintek változását. A szilimarin krémek vizsgálati során a HO-1 enzimszintet is mértük, mivel ilyen irányú vizsgálatot nem találtunk az irodalomban. A tesztek segítségével igyekeztünk az antioxidáns védelmi vonal legjelentősebb lépéseit feltérképezni.

Az in vitro antioxidáns vizsgálatok során a sejteket UVB sugárzásnak tettük ki és feltérképeztük a szilimarin krém hatását elő és utókezelésben úgy, hogy HaCaT keratinociták antioxidáns enzim aktivitás értékeit meghatároztuk.

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

Eredményeink összhangban vannak azzal, hogy a szilimarin dózistól függően védő hatást mutatott UV indukált károsodás ellen humán keratinocitákon az NF-kappa-B aktiváció gátlásával (Sailou és mtsai. 1999).

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

A szilimarin krémek elő és utókezelése a tengerimalac bőrszövetében mért antioxidáns enzimszintek növekedését okozta UVB sugárzást követően. Az MDA szint ugyanakkor ezekben az esetekben csökkenést mutatott. Az in vitro és in vivo eredmények igazolták, hogy a szilimarin tartalmú o/v emulziós krémek kivédik az UVB okozta oxidatív stresszt, mely a hatóanyag antioxidáns hatásával összefüggést mutat. Megfigyelésünk megegyezik Katiyar (Katiyar 2002) vizsgálataiban tapasztaltakkal, ahol a szilimarin külsőleges használata gátolta az UV okozta oxidatív stresszt egér bőrszövetben, UVB besugárzásban. A kísérletekben a szilimarint alkoholban oldották, de nem alakítottak ki gyógyszerformát.

Svobodavá és mtsai (Svobodavá és mtsai. 2003, 2007) megfigyelései szerint, a szilimarin flavonoid komponensei, az UVA okozta oxidatív stressz bőrkárosodást okozó hatását mérsékeltek. A kísérletek során a szilimarin port DMSO-ban oldották és ennek hatását vizsgálták.

A HO-1 enzim szintjének nagymértékű növekedése szintén a stresszválasz egyik jele a különböző környezeti hatásokra (Paine és mtsai. 2010). Az UV-A és UV-B sugárzás is magas HO-1 szintet hoz létre a sejtekben (Tyrell 2004, Xiang és mtsai. 2011). Kísérleteink során az UVB sugárzás után a tengerimalac bőrszövetében magas HO-1 értékeket mértünk. Ugyanakkor a szilimarin krém kezelése nem befolyásolta a HO-1 enzim értékeket összehasonlítva a kezeletlen csoporttal. Feltételezésünk szerint, abban az esetben, mikor a szilimarin krémmel történő kezelés során az antioxidáns enzimek nagymértékben aktiválódnak (oldott hatóanyag bejutás esetén), az aktivált antioxidáns enzim rendszer gyorsan eliminálja a szabad gyököket, ezért a HO-1 enzim ekkor nem képes aktiválódni.

Összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy a *Silybum marianum*ot szuszpendált vagy oldott formában tartalmazó külsőleges készítmények elő és utókezelésben gátolták az UV-B sugárzás okozta oxidatív stresszt, szőrtelen tengerimalac bőrében és HaCaT sejteken.

6/A Összefoglalás

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

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

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

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

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

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

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

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

6/B Summary

In the **first part** of our experiments SMEDDS preparation containing silymarin oil was formulated in which the oil component was also the active substance.

We determined that the silymarin oil-SMEDDS dosage form diminished hepatic enzyme levels and elevated antioxidant enzyme levels in mouse liver tissue against carbon tetrachloride intoxication.

The hepatoprotective effect of SMEDDS containing silymarin oil was also verified by histopathological investigations on mouse liver tissue after carbon-tetrachloride toxicity.

Our results showed that silymarin oil-SMEDDS compositions prevent carbon-tetrachloride induced hepatotoxicity presumably by the inhibition of lipid peroxidation and the membrane stabilization of hepatocytes.

To summarize our investigations we can conclude that per oral use of silymarin oil SMEDDS preparations have hepatoprotective effect.

In the **second part** of our work o/v creams containing silymarin powder and penetration enhancers were formulated with appropriate consistency. The results of in vitro membrane diffusion studies justified that Transcutol – which also helped in the dissolution of silymarin powder- with sugar-ester type emulgents elevated the amount of active substance across the diffusion membrane.

The pre and post-treatment of creams containing silymarin powder in dissolved form showed sufficient antioxidant activity against UV-induced oxidative stress in guinea pig model and HaCaT cells. Significance of post-treatment is outstanding because silymarin creams may provide alternative potentials against solar UV radiations. In vitro and in vivo data did not showed total correlation during our experiments. It can be concluded that evaluation of in vitro data alone is not sufficient but complemented with in vivo animal experiments may anticipate that possibility of human clinical trials.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom

Abraham N.G., Kappas A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 2008. 60 (1): p. 79-127.

Abrol S., Trehan A., Katare O.P. 2005. Comparative study of different silymarin formulations: formulation, characterisation and *in vitro/in vivo* evaluation. *Current Drug Deliv*. 2: 45–51.

Abrol S., Trehan A., Katare O.P. 2004. Formulation, characterization, and *in vitro* evaluation of silymarin-loaded lipid microspheres. *Drug Deliv*. 11:185-191.

Afolayan A.J., Els A., Teng R.J., Bakhutashvili I., Kaul S., Davis J.M., Konduri G.G. 2012. Decreases in manganese superoxide dismutase expression and activity contribute to oxidative stress in persistent pulmonary hypertension in the newborns, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 15: L870–L879.

Aliabadi A., Yousefi A., Mahjoor A., Farahmed M., 2011. Evaluation of wound healing activity of silymarin (*Silybum Marianum*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (24), 3287-3292

Al-Owais, M.M., et al. 2012. Carbon monoxide mediates the anti-apoptotic effects of heme oxygenase-1 in medulloblastoma DAOY cells via K⁺ channel inhibition. *J Biol Chem*. 287 (29): p. 24 754-64.

Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability, *Pharm Res*. 12 (3):413-20.

Arcaria M., Brambilia A., Brandt A., Caponi R., Corsi G., Di Rella M., Solinas F., Wachter W.P. 1992. A new inclusion complex of silibinin and

beta.cyclodextrins: *in vitro* dissolution kinetics and *in vivo* absorption in comparison with traditional formulation. *Boll Chim Farm* 131: 205–209.

Arora A., Sairam R.K., SriFetava G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82:1227-1238.

Bak I., Czompa A., Csepányi E., Juhasz B., Kalantari H., Najm K., Aghel K., Varga B., Haines D.D.; Tosaki A. 2011. Evaluation of systematic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels. *Phytother. Res.* 25, 1714–1720.

Balogun E. et al. 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J*, 371(Pt 3): p. 887-95

Barzaghi N., Crema F., Gatti G., et al. 1990. Pharmacokinetic studies on Idb 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 15:333-338.

Batakov E.A. 2001. Effect of Silybum marianum oil and legalon on lipid peroxidation and liver antioxidant systems in rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Eksp Klin Farmakol* 64: 53–55.

Becker-Schiebel M., Mengs U., Schaefer M., Bulitta M., Hoffmann W. 2011. Topical use of a silymarin-based preparation to prevent radiodermatitis. Results of a prospective study in breast cancer patients. *Strahlenther Onkol* 187: 485–491.

Beutler E. 1984. In: Red cell metabolism (eds). A manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton. Pp. 68–73.

Biedermann, D., Vavrikova, E., Cvak L., Kren V. 2014. Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1138–1157.

Bigansoli E., Cavenaghi L.A., Rossi R., Brunati M.C., Nolli M.L. 1999. Use of Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of

antibiotics. *Farmacol.* 54. 594-599.

Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan; 5(1): 9–19.

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. 1988. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology.* (106) 761.-771.

Boveris A., Cadenas E. 1975. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54: 311–314.

Brassai A., Dóczy K.Z., Bán E.Gy. 2012. *Gógyszertan 5. Az emésztőrendszer gyógyszerterana.*

Buckley, S.T.; Frank, J.K.; Fricker, G.; Brandl, M. 2013. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations”. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 8–16,

Campanini, M.Z.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Ivan, A.L.M.; Ferriera, V.S.; Vilela, F.M.P.; Vicentini, F.T.; Martinez, R.M.; Zarpelon, A.C.; Fonseca, M.J.V.; Faria, T.J.; et al. 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extracts against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photoch. Photobiol. B.* 127, 153–160.

Cázares-Delgadillo J., Naik A, Kalia Y.N., Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A. 2005. Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon. *Int J Pharm.* 297(1-2):204-12.

Chattaraj S.C., Walker R.B. 1995. Penetration enhancer classification. In Smith E.W., Maibach H.I. Eds. *Percutaneous Penetration Enhancers*. Boca Raton. CRC Press. 5-20

Chen M., Zhou Y., Huang J., Zhu P., Peng X., Wang Y. 2012. Liposome-Based

Delivery Systems in Plant Polysaccharides. *Journal of Nanomaterials*. Volume 2012.

Chen W., Xia H., Wu W. 2005. Optimized preparation of silymarin dripping pills by central composite design-response surface method. *Chin Trad Herb Drug* 36: 679–683.

Choi J.S., Koh I.U., Jung M.H., Song J. 2007. Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Brit J Nutr* 98: 264–275.

Choi, S.Y., Seop S.Y., Hyun M.Y., Yoo K.H., Kim B.J., Kim M.N., Cho J.W. 2013. Safety evaluation of topical valproate application. *Toxicol. Res.* 29, 87–90.

Constantinides P.P. 1995. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res* 12: 1561–1572.

Couteau, C.; Cheignon, C.; Papis, E.; Coiffard, L.J. 2012. Silymarin, a molecule of interest for topical photoprotection. *Nat. Prod. Res.* 26, 2211–2214.

Csizmazia E., Berkó Sz., Maroda M., Szabó-Révész P., Csányi E. 2012. A bőrön keresztüli hatóanyag permeáció modellezése és penetrációfokozók hatásának vizsgálata. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 82. 15-22.

Csizmazia E., Erős G., Berkesi O., Berkó Sz., Szabó-Révész P., Erzsébet Csányi E. 2011. Penetration enhancer effect of Sucrose laurate and Transcutol on Ibuprofen. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 21(5), 411-415.

Csóka I., Csányi E., Zapantis G., Nagy E., Fehér-Kiss A., Horváth G., Blazsó, G., Eros I. 2005. In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: Case studies. *Int. J. Pharm.* 291, 11–19.

Csupor D., Csorba A., Hohmann J. 2016. Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *J. Pharmaceut. Biomed.* 130, 301-317.

Csupor D. 2013. Máratövis-Az Év Gyógynövénye 2013-ban. *Gyógyszerészet.* 57, 413-415, 417-425.

Del Rio D., Pellegrini N., Colombi B., Bianchi M., Serafini M., Torta F., Tegonim S.M., Musci M., Brighenti F. 2003. Rapid fluorimetric method to detect total plasma malondialdehyde with mild derivatization conditions. *Clin Chem* 49: 690–692.

Demicheli V., Quijano C., Alvarez B., Radi R. 2007. Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Rad Biol Med* 42: 1359–1368.

Dixit A.R., Rajput S.J., Patel S.G. 2010. Preparation and Bioavailability Assessment of SMEDDS Containing Valsartan. *AAPS PharmSciTech.* 11 (1): 314–321.

Fathi-Achachlouei, B., Alirezalu, K., Azadmard-Damirchi, S., 2016. Evaluation of Oil Content, Fatty Acids Profile and Phytosterols of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) Oil in Several Different Ecotypes in North -West of Iran. *Journal of Food Science & Technology* (2008-8787), 13 (52):27-36.

Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K. 1998. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol.* 93: 139–143.

Fraga, C.; Leibovitz, B. & Tappel, A. 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Vol. 4: 155-161.

Frascini, F., Demartini, G., Esposti, D. 2002. Pharmacology of silymarin. *Clin. Drug Investig.* 22, 51–65.

Fürst Zs. 1998. Gyógyszertan. Medicina Könyvkiadó RT. Budapest.

Gang Y., Yan L. 2011. Preparation, characterization and evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) of Ligusticum chuanxiong oil. *Biomed Prevent Nutr* 1: 36–42.

Garg R., Gupta G.D. 2009. Preparation and evaluation of gastroretentive floating tablets of silymarin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 57:545-549.

Gazák, R., Walterová, D., Kren, V. 2007. Silybin and Silymarin—New and Emerging Applications in Medicine. *Curr. Med. Chem.* 14, 315–338.

Giannini E. G., Testa R., Savarino V. 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 172(3): 367–379.

Godin, B., Touitou, E. 2007. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59: 1152–1161.

Goldberg D.M., Spooner R.J. 1983. Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (Eds.) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd (eds); Verlag Chemie: Weinheim, Germany; 111:258–265.

Gowri R., Balaji P., Harshapriya G., Siji M., Shaik B.S. 2012. Self emulsifying drug delivery system- a promising tool to enhance dissolution of poorly soluble drugs. *Int. J. Chem. Pharm. Sci.* 3(4), 19-23.

Guicciardi M.E., Malhi H., Mott J.L., Gores G.J. 2013. Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr Physiol.* 3(2).

Gursoy N., Garrigue J.S.; Razafindratsita, A.; Lambert G.; Benita, S. 2003. Excipient effects on in vitro cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* 92: 2411–2418.

Guy, R.H.; Hadgraft, J. 1990. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. *Int. J. Pharm.* 60, R1–R3.

Hackett E.S., Twedt D.C., Gustafson D.L. 2013. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *J Vet Intern Med.* 27(1):10-6.

Hadolin M., Škerget M., Knez Z., Bauman D. 2001. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. *Food Chemistry.* 74 (3) 355–364.

Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 344: 721-724.

Hayashi S. et al., 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene.* 336 (2): 241-50

He J., Feng J.F., Zhang L.L., et al. 2005. Freeze- drying of silymarin-loaded solid lipid nanoparticles (SM-SLN). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005;30:110-112.

Hermenean A., Stan M., Ardelean A., Nagy L., Deák G., Zsuga M., Kéki S., Bácskay I., Fenyvesi F., Costache M., Dinischiotu A., Vecsernyés M. 2015. Antioxidant and hepatoprotective activity of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) seed oil. *Open Life Sci.* 10: 147–158.

Higuchi, T. 1960. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 11: 85–97.

Higuchi, T. 1961. Rate release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 50:874–875.

Hudaib M., Fiori J., Bellardi M.G., Rubies-Autonell C., Cavrini V. 2002. GC–MS analysis of the lipophilic principles of *Echinacea purpurea* and evaluation of

cucumber mosaic cucumovirus infection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volume 29, Issue 6, 1053–1060

Hung, C.F., Lin, Y.K., Zhang, L.W., Chang, C.H., Fang, J.Y. 2010. Topical delivery of silymarin constituents via the skin route. *Acta Pharm. Sin.* 31, 118–126.

Javed, S., Kohli K., Ali M. 2011. Reassessing Bioavailability of Silymarin. *Altern. Med. Rev.* 16, 239–249.

Johnson D.E., Kroenung C. 1998. Mechanism of early carbon tetrachloride toxicity in cultured rat hepatocytes. *Pharmacol Toxicol* 83: 231–239.

Kahol, A.; Singh, K.; Tandon, S.; Kumar, S. 2001. Process for Isolation of Hepatoprotective Agent Silymarin from Seeds of the Plant *Silybum marianum*. Indian Patent 06309678, 23 October.

Kasim N.A. Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernas H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L. 2004. Molecular properties of WHO Essential Drugs and Provisionel Biopharmaceutical Classification, *Mil.Pharm.*, 1, 85-96.

Kasugai S., Hasegawa N., Oqura H. 1990. 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 JPharmacol.* 52(1):95-100

Katiyar S.K, Korman N.J., Mukhtar H., Agarwal R. 1997. Protective Effects of Silymarin Against Photocarcinogenesis in a Mouse Skin Model. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(8).

Katiyar, S.K. 2002. Tretament of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light-induced immune suppression and in oxidative stress in mouse skin. *Int. J. Oncol.* 21: 1213–1222.

- Katiyar, S.K. 2005. Silymarin and skin cancer prevention: Antiinflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects (Review). *Int. J. Oncol.* 26, 169–176.
- Kidd, P., Head, K. 2005. A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: A silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos®) 13(3), 193-201.
- Konsoula, R.; Barile, F.A. 2005. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicol. Vitro.* 19, 675–684.
- Kuki Á., Nagy L., Deák G., Nagy M., Zsuga M., Kéki S. 2012. Identification of Silymarin Constituents: An Improved HPLC-MS Method. *Chromatographia.* 75: 175–180.
- Lawrence M.J., Rees G.D. 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 45:89–121.
- Lewinska A., Adamczyk J., Palak J., Stoklosa S., Kubis B., Pastuszek P., Slota E., Wnuk M. 2014. Curcumin-mediated decrease in the expression of nucleolar organizer regions in cervical cancer (HeLa) cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 1, 43–52.
- Li X., Yuan Q., Huang Y., Zhou Y., Liu Y. 2010. Development of Silymarin Self-Microemulsifying Drug Delivery System with Enhanced Oral Bioavailability. *AAPS PharmSciTech.* 11(2).
- Liebenberg W., Engelbrecht E., Wessels A., Devarakonda B., Yang W., Villiers M. 2004. A comparative study of the release of active ingredients from semisolids cosmeceuticals measures with Franz, Enhancer or Flow-through cell diffusion apparatus. *J. Food Drug Anal.* 12, 19–28.
- Lindahl T. 1982. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 61.
- Liu L., Pang X., Zhang W., Wang S. 2007. Formulation design and in vitro

evaluation of silymarin loaded self micro emulsifying drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci.* 2:150-160.

Liu X., Quan P., Li S., Liu C., Zhao Y. Zhao Y. Fang L. 2017. Time dependence of the enhancement effect of chemical enhancers: Molecular mechanisms of enhancing kinetics. *J Control Release.* 248:33-44.

Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 193: 265–275.

Lucey B.P., Nelson Rees W.A., Hutchins G.M. 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells and cell culture contamination, *Arch Pathol Lab Med.* 133(9): 1463-76.

Luper S. 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. *Altern Med Rev* 3: 410–421.

Mady F.M., Essa H., El-Ammawi T., Abdelkader H., Hussein A.K. 2016. Formulation and clinical evaluation of silymarin pluronic-lecithin organogels for treatment of atopic dermatitis. *Drug Des Devel. Ther.* 10:1101-10.

Maheshwari H., Aggarwal R., Patil C., Katare O.P. 2003. Preparation and pharmacological evaluation of silibinin liposomes. *Arzneimittelforschung.* 53:420-427.

Maines M.D., Trakshel G.M., Kutty R.K., 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem,* 261(1):411-9.

Marklund S.L. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7634-7638.

McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

McCoubrey W.K., Jr. Huang T.J., Maines M.D., 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 247 (2): 725-32.

Mengs U., Pohla R.T., Mitchellb T. 2012. Legalon® SIL: The Antidote of Choice in Patients with Acute Hepatotoxicity from Amatoxin Poisoning. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 13, 1964-1970

Mira L., Silva M., Manso C.F. 1994. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol.* 48:753-759.

Morazzoni P., Magistretti M.J., Giachetti C., Zanolo G. 1992. Comparative bioavailability of Silipide, a new flavanolignan complex, in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 17:39-44.

Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G. 1993. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 18:289-297.

Mura P., Faucci M.T., Bramanti G., Corti P. 2000. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 9, 365–372.

Murphy M.P. 2013. Mitochondrial Dysfunction Indirectly Elevates ROS Production by the Endoplasmic Reticulum Cell Metabolism. 18.

Narayanapillai S., Agarwal, C., Tilley C., Agarwal R. 2012. Silibinin is a potent sensitizer of UVA radiation-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. *Photochem Photobiol.* 88, 1135–1140.

Nield G.L., Ippersiel R. 2002. Open Evaluation of Silymarin Cream in the Management of Facial Redness Associated with Rosacea. *Cosmetic Dermatology.* Cedar Knolls, Vol. 15. Issue 2, 15–20.

Nino M., Calabrò G., Santoianni P. 2012. Topical delivery of active principles: The field of dermatological research. *Dermatol. Online J.* 16, 4.

Nyíredi Sz. 2002. Gyógynövénykutatás: a gyógyszerkutatás természetes része. *A Magyar Tudományos Akadémia lapja.*

Otterbein L.E. et al. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 6(4): 422-8.

Paine A., Eiz-Vesper B., Blasczyk R., Immenschuh S. 2010. Signaling to Heme Oxygenase-1 and its Anti-Inflammatory Therapeutic Potential. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1895.

Palamakula A., Khan M.A. 2004. Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q10 Self-emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS). *Int. J. Pharm.* 273, 63–73.

Panapisal V., Charoensri S., Tantituvanont A. 2012. Formulation of Microemulsion Systems for Dermal Delivery of Silymarin. *AAPS PharmSciTech* 13: 389–399.

Paoletti F., Mocali A. 1990. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NADP(H) oxidation. *Methods Enzymol* 186: 209–221.

Parveen R., Baboota S., Ali J., et al. 2011. Oil based nanocarrier for improved oral delivery of silymarin: in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm.* 413:245-253.

Pepping J. 1999. Milk thistle: *Silybum marianum*. *Am J Health Syst Pharm* 56: 1195–1197.

Petró É., Erős I., Csóka I. 2012. Félzilárd gyógyszerformák fejlesztése – a hatóanyag felszabadulás és bioekvivalencia vizsgálatok alapjai (Alkalmazott elvek,

módszerekés berendezések: Irodalmi áttekintés) II. rész. Gyógyszerészet 56. 195-202.

Pinnagoda J., Tupker R.A., Agner T., Serup J. 1990. Guidelines for trans-epidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis*. 22: 164–178

Plessis J., Stefaniak A., Eloff F., John S., Agner T., Chou T.C., Nixon R., Steiner M., Franken A., Kudla I., Holness L. 2013. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Research and Technology*. 19: 265–278

Pouton C.W. 1997. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 25: 47–58.

Pouton C.W. 2000. Lipid formulation for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems *Eur J Pharm Sci* 11: S93-S98.

Rácz I., Selmeczi B. 2011. Gyógyszer-technológia I-III.

Ramasamy K., Agarwal R. 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett*. 269 (2):352-62.

Rasul A., Akhtar N. 2012. Anti-aging potential of a cream containing milk thistle extract: formulation and in vivo evaluation. *Afr. J. Biotechnol*. 11 (6):1509–1515.

Rasul A., Akhtar N., Khan B.A., Mahmood T., Zaman S., Atif A., Haji M., Khan S., Parveen S. 2011. Assessment of anti erythmic and skin whitening effects of milk thistle extract. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 5: 2306–2309.

Roy P., Sajan M.P., Kulkarni A.P. 1995. Lipoygenase-mediated glutathione oxidation and superoxide generation. *J Biochem Toxicol*. 10: 111–120.

Sagar S.R., Anderson B.D. 2008. What determines drug solubility in lipid vehicles: Is it predictable? *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 638-656.

Sailou C., Kitazawa M., McLaughlin L., Yang J. P., Lodge J.K., Tetsuka T., Iwasaki K., Cillard J., Okamoto T., Packer L. 1999. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 174–183.

Saraf A.S. 2010. Application of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia* 81, 680-689

Savio D., Harrasser P.C., Basso G. 1998. Softgel capsule technology as an enhancer device for the absorption of natural principles in humans. A bioavailability cross-over randomised study on silybin. *Arzneimittelforschung.* 48:1104-1106.

Sha X., Yan G., Wu Y., Li J., Fang X. 2005. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 24: 477–486.

Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S.2010. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol* 48: 803–806.

Sharrer T. 2006. HeLa Herself. *Scientist.* 20, 22–23.

Sheldon R., Pinnel M.D. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48, 1–19. .

Shibahara S., Muller R.M., Taguchi H., 1987. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem.* 262(27): 12889-92.

- Shokri J., Azarmi S.H., Fasihi Z., Hallaj-Nezhadi S., Nokhodchi A., Javadzadeh Y. 2012. Effects of various penetration enhancers on percutaneous absorption of piroxicam from emulgens, *Res Pharm Sci.* 7(4): 225-234.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. 1993. *Eur. J. Biochem.* 215, 213–219.
- Siewert M., Dressman J., Brown C.K., Shah V.P. 2003. *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 4. 1- 10. and *Dissolut. Technol.* 10. 6-15.
- Sujoy P., Amiya K.J. 2013. Physico-chemical studies on ionic liquid microemulsion: Phase manifestation, formation dynamics, size, viscosity, percolation of electrical conductance and spectroscopic investigation on 1-butyl-3-methyl imidazolium methanesulfonate water/ Tween 20 n-pentanol/n-heptane pseudoternary system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 419, 113-124
- Sun N., Zhang X., Lu Y., Wu W. 2008. In vitro evaluation and pharmacokinetics in dogs of solid dispersion pellets containing *Silybum marianum* extract prepared by fluid-bed coating. *Planta Med.* 74:126-132.
- Surai P.F. 2015. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants.* 4, 204–247.
- Svobodová A., Psotová J., Walterová D. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-Induced skin damage. A review. *Biomed. Pap.* 147, 137–145.
- Svobodová A., Zdarilová A., Walterová D., Vostálová J. 2007. Flavonolignans from *Silybum marianum* moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 48, 213–224.
- Szollár L. 1993. *Kórélettan. Egyetemi tankönyv, Semmelweis kiadó, Budapest*
- Szőke É., Balázs A., Blázovics A., Kéry Á., Kursinszki L., Lemberkovics É., Then M., Alberti-Dér Á., Balogh Gy., Bányai P., Blazics B., Böszörményi A., Kalász H.,

Könczöl Á., Lugasi A., Szarka Sz., Szentmihályi K., Vasas G. 2012. Gyógynövény és Drogismeret Farmakognózia – Fitokémia, gyógynövények alkalmazása. Semmelweis Egyetem, Egyetemi jegyzet

Szűts A.; Szabó-Révész P. 2012. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems—A mini-review. *Int. J. Pharm.* 433, 1–9.

Tan T.T.Y., Liu S., Zhang Y., Han M.Y., Selvan S.T. 2011. Microemulsion Preparative Methods (Overview). *Comprehensive Nanoscience and Technology* 5, 399-441.

Tenhunen R., et al., 1970. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry.* 9 (2): 298-303.

Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 61, 748–755.

Trommer H., Neubert R.H.H. 2006. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 19:106–121.

Tyrell R.M. 2004. Solar ultraviolet a radiation: An oxidizing skin carcinogen that activates heme oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* 6: 835–840.

Ujhelyi Z., Róka E., Fenyvesi F., Fehér P., Váradi J., Réti-Nagy K., Vecsernyés M., Bácskay I. 2013. Assessment of the hemolytic activity and cytotoxicity of different PEG-based solubilizing agents. *Pharmazie.* 68: 383–384.

Ujhelyi Z., Fenyvesi F., Váradi J., Fehér P., Kiss T., Veszélka S., Deli M.A., Vecsernyés M., Bácskay I. 2012. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 564–573.

Ujhelyi Z., Kalantari A., Vecsernyés M., Róka E., Fenyvesi F., Póka R., Kozma B., Bácskay I. 2015. The enhanced inhibitory effect of different antitumor agents in self-microemulsifying drug delivery systems on human cervical cancer HeLa cells. *Molecules*. 20, 13226–13239.

Vaid M., Katiyar S.K. 2010. Molecular mechanisms of inhibition of photocarcinogenesis by silymarin, a phytochemical from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) (Review). *Int. J. Oncol.* 36, 1053–1060,

Vargas-Mendoza N., Madrigal-Santillán E., Morales-González A., Esquivel-Soto J., Esquivel-Chirino C., García-Luna Y González-Rubio M., Gayosso-de-Lucio JA1, Morales-González J.A.. 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.* 6(3):144-9.

Vasconcelos T., Sarmanento B., Costa P. 2007. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug. Discov. Today* 12, 23-24.

Voinovich D., Perissutti B., Grassi M., et al. 2009. Solid state mechanochemical activation of *Silybum marianum* dry extract with betacyclodextrins: characterization and bioavailability of the coground systems. *J Pharm Sci.* 98:4119-4129.

Weber, L.W., Boll M., Stampfl A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Rev Toxicol* 33: 105–136.

Wei W., Yang W., Li Q. 2006. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm* 63: 288–294.

Weisiger R.A., Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248: 4793-4796.

- Wilson V.G. 2014. Growth and differentiation of HaCat keratinocytes. *Methods Mol. Biol.* 1195, 33–41.
- Woo J.S., Kim T.S., Park J.H., Chi S.C. 2007. Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Arch. Pharm. Res.* 30, 82–89.
- Wu J. W., Lin L.C., Hung S.C., Chi C.W., Tsai T.H. 2007. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45: 635-641.
- Wu W., Wang Y., Que L. 2006. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm.* 63:288-294.
- Wu Y.P., Huo M.R., Zhou J.P. 2009. Preparation of silymarin-loaded amphiphilic chitosan micelle and its in situ absorption in rat intestine. *Yao Xue Xue Bao* 44:651-657.
- Xiang Y., Liu G., Zhong J.L. 2011. UVA-induced protection of skin through the induction of heme oxygenase-1. *BioSci. Trends.* 5, 239–244.
- Yanyu X., Yunmei S., Zhipeng C., Qineng P. 2006. The preparation of silybin-phospholipid complex and study on its pharmacokinetics in rats. *Int J Pharm* 307: 77–82.
- Zhang J.Q., Liu J., Li X.L., Jasti B.R. 2007. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing silibinin. *Drug Deliv.* 14:381-387.
- Zhao Y., Wang C., Chow A.H., Ren K., Gong T., Zhang Z., Zheng Y. 2010. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies. *Int J Pharm.* 4;383(1-2):170-7.
- Zhu S.Y., Dong Y., Tu J., Zhou Y., Zhou X.H., Xu B. 2014. *Silybum marianum* oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice

treated with D-galactose. *Pharmacogn Mag.* 10(Suppl 1): S92–S99.

Zidan A.S., Sammour O.A., Hammad M.A., Megrab N.A., Habib M.J., Khan M.A.
2007. Quality design: understanding the product variability of a self-nanoemulsified drug delivery system of cyclosporine. *A. J Pharm Sci* 96: 9.

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények ellenőrzött jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

Jelölt: Fehér Pálma
Neptun kód: A8GZ19
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036708

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

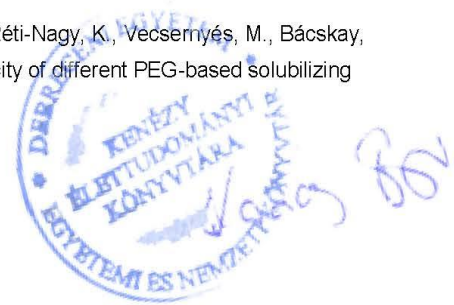
1. **Fehér, P.**, Ujhelyi, Z., Váradi, J., Fenyvesi, F., Róka, E., Juhász, B., Varga, B., Bombicz, M., Priksz, D., Bácskay, I., Vecsernyés, M.: Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea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





További közlemények

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





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





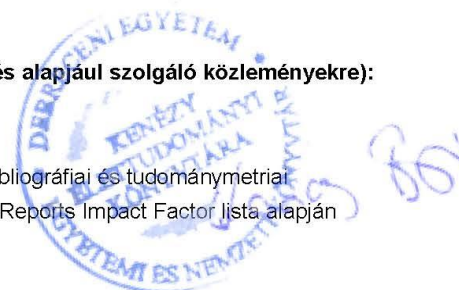
15. Oláh, M., **Fehér, P.**, Ihm, Z., Bácskay, I., Kiss, T., Freeman, M. E., Nagy, G. M., Vecsernyés, M.: Dopamine-Regulated Adrenocorticotrophic Hormone Secretion in Lactating Rats: functional Plasticity of Melanotropes.
Neuroendocrinology. 90 (4), 391-401, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000232313>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

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 37,338

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

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

Debrecen, 2017.05.30.



7.3. Ábrajegyzék

1. ábra. A hatóanyag felszívódásának elősegítése a BCS besorolás alapján (forrás: Antal I. előadás 2008)

2. ábra. A kísérletes munka vázlata (saját szerkesztés)

3. ábra. Silybum marianum

/forrás: http://evgyogynovenye.hu/2013_mariatovis/ /Letöltve: 2016. 10.11.

4. ábra. Szilimarin főbb komponenseinek kémiai struktúrája (Kuki és mtsai 2012)

5. ábra. A szilimarin alacsony biohasznosulásának okai (Javed és mtsai 2011)

6. ábra. A szilimarin biohasznosulásának növelése (saját szerkesztés)

7. ábra. A mikroemulziós rendszer elhelyezkedése a terner rendszerben

(forrás: Ujhelyi Z. :Értekezés. 2014)

8. ábra. UV sugárzás okozta bőrrák kialakulásának sematikus ábrázolása, a szilimarin hatása az UV sugárzás okozta bőrdaganatok kialakulására (Vaid és Katiyar 2010)

9. ábra. Propilén-glikol kémiai szerkezete. /forrás: <http://www.donauchem.hu/Products-Solutions/ProductView.aspx?productId=105>
Letöltve: 2017.01.12.

10. ábra Transcutol kémiai szerkezete /forrás: <http://www.gattefosse.com/en/applications/transcutol-p.html/> Letöltve: 2016.01.29.

11. ábra. A 2. összetétel pszeudoterner fázisdiagramja. A diagramon látható sötét rész szemlélteti a mikroemulziós zónát (saját szerkesztés)

12. ábra. A májhomogenizátumból mért GSH értékek változása szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) után és szén-tetraklorid (1 ml/kg) intoxikációban (saját szerkesztés)

13. ábra. A májhomogenizátumból mért MDA értékek változása szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) után és szén-tetraklorid (1 ml/kg) intoxikációban (saját szerkesztés)

14. ábra. A szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) és szén-tetraklorid intoxikáció (1ml/kg) hatása egér májszövetre, annak hisztopatológiai változásai (saját szerkesztés)

15. ábra. A szilimarín krém összetételek (I-X) ellenállása, kompressziós erőben (N) kifejezve (saját szerkesztés)

16. ábra. A szilimarín por felszabadulása a készítményekből (I-X), IPM-mel impregnált cellulóz-acetát membránon keresztül (saját szerkesztés)

17. ábra. Az MTT teszt sejtéletképesség eredménye HaCat és HeLa sejteken a szilimarín tartalmú krémösszetételek (I-X) kezelése után (saját szerkesztés)

18. ábra. Tengerimalac hátán végzett in vivo bőr irritációs teszt eredménye. A TEWL értékek változása a szilimarín tartalmú krémek kezelése előtt és után 24 órával (saját szerkesztés)

19 (a-d) ábra. A szilimarín tartalmú krémek (III, IV, VIII, IX) elő és utókezelésének a hatása különböző antioxidáns enzim aktivitásra HaCaT sejtvonalon, UVB sugárzás után (saját szerkesztés)

20. (a-d) ábra. Tengerimalac bőrszövetéből mért antioxidáns enzimaktivitások értéke a szilimarín tartalmú krémek (III, IV, VIII, IX) elő és utókezelése során, UVB sugárzás után (saját szerkesztés)

21. ábra. Tengerimalac bőrszövetében mért HO-1 enzimértékek a szilimarintartalmú krémek (III., IV., VIII., IX.) elő és utókezelése során, UVB sugárzás után

7.4. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: A szilimarin krémek formulálásához felhasznált cukor észterek típusai (saját szerkesztés)

2. táblázat. A szilimarin olajat tartalmazó különböző SMEDDS összetételek (saját szerkesztés)

3. táblázat. A szilimarin olajat tartalmazó SMEDDS kísérletek kezelési protokollja egeren végzett in vivo vizsgálatokban (saját szerkesztés)

4. táblázat. A szilimarin port tartalmazó o/v emulziós krémek összetétele (saját szerkesztés)

5. táblázat. Szilimarin olaj-SMEDDS (1000 mg/kg, 500 mg/kg) készítmények és szén-tetraklorid (1 ml/kg) intoxikáció hatása az szérumban mért AST és ALT enzimszintre (saját szerkesztés)

6. táblázat. A májhomogenizátumból mért antioxidáns enzimértékek változása szilimarinolaj-SMEDDS kezelés (1000 mg/kg, 500 mg/kg) után és szén-tetraklorid (1ml/kg) intoxikációban (saját szerkesztés)

7. táblázat. Az összetételek (I-X) szilimarin felszabadulási rátájának és diffúziós koefficiens értékei. Mindegyik érték az átlagot \pm S.D mutatja, n=5. (saját szerkesztés)

8/A Tárgyszavak

Silybum marianum, Önemulgeáló rendszerek, HeLa-sejtvonal, HaCaT-sejtvonal, MTT, Antioxidáns rendszer, HO-1 enzim

8/B Keywords

Silybum marianum, Self-emulsifying systems, HeLa cellline, HaCaT celline, MTT, Antioxidant system, HO-1 enzyme

9. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

Dr. Ujhelyi Zoltán

Dr. Fenyvesi Ferenc

Dr. Réti-Nagy Katalin

Dr. Róka Eszter

Dr. Sinka Dávid

Dr. Váradi Judit

Dr. Vasvári Gábor

Vaszily Mária

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

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

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

10. Függelék

10.1. Támogatás

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

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

10.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények