



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Intézetvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó

A Ph.D. értekezés tézisei

INNOVATÍV DERMÁLIS HABRENDSZEREK FORMULÁLÁSA ÉS VIZSGÁLATA

dr. Falusi Fanni

okleveles gyógyszerész

Témavezetők:

Dr. habil. Kovács Anita, Ph.D.

Dr. habil. Berkó Szilvia, Ph.D.

Szeged

2024

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Hohmann Judit, D.Sc., akadémikus

Képzési program: Gyógyszertechnológia, gyógyszerfelügyelet

Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, tanszékvezető egyetemi tanár

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezetők: Dr. habil. Kovács Anita, Ph.D., egyetemi docens

Dr. habil. Berkó Szilvia, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Falusi Fanni

**INNOVATÍV DERMÁLIS HABRENDSZEREK FORMULÁLÁSA ÉS
VIZSGÁLATA**

Komplex vizsga vizsgabizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szabóné Révész Piroska, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
- Tagok:** Dr. Csóka Gabriella, Ph.D., Meditop Gyógyszeripari Kft.,
Pilisborosjenő
- Dr. habil. Budai-Szűcs Mária, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bírálni bizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szatmári István, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerkémiai Intézet
- Opponensek:** Dr. habil. Fehér Pálma, Ph.D., Debreceni Egyetem,
Gyógyszertechnológiai Tanszék
- Dr. Horváth Gabriella, Ph.D., Egis Gyógyszergyár Zrt., Budapest
- Titkár:** Dr. habil. Matuz Mária, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Klinikai
Gyógyszerészeti Intézet
- Tag:** Dr. Lőrinczi Bálint, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerkémiai Intézet

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AD-MSC	Humán zsírszövet eredetű mezenchimális őssejt
ANOVA	Varianciaanalízis
CAM	Korioallantoikus membrán vizsgálat
CMA	Kritikus anyagi paraméter
CPP	Kritikus folyamat paraméter
CQA	Kritikus minőségi paraméter
DEXP	Dexpantenol
DMEM-HG	Dulbecco-féle módosított sejttenyésztő médium magas glükóz-tartalommal
DS	Diklofenák-nátrium
FE	Habtágulás
FVS	Habtérfogat stabilitás
HA	Hialuronsav
HA _{CL}	Keresztkötéses hialuronsav
HA _{HMW}	Nagy molekulású hialuronsav
HA _{LMW}	Alacsony molekulású hialuronsav
HEC	Hidroxietyl-cellulóz
HET-CAM	Tyúktojás korioallantoikus membrán vizsgálat
HPMC	Hidroxietyl-metilcellulóz
ICCVAM	Alternatív Módszerek Hitelesítésével foglalkozó Intézményközi Koordináló Bizottság
IPA	Izopropanol
IS	Irritációs érték
IVPT	<i>In vitro</i> hatóanyag-permeáció vizsgálat
IVRT	<i>In vitro</i> hatóanyag-felszabadulás vizsgálat
logP	Oktanól/víz megoszlási hányados logaritmus
LVE	Lineáris viszkoelasztikus tartomány
NIAC	Niacinamid
PEG 200	Polietilén-glikol 200
QbD	Quality by Design
QTPP	Minőségi céltermékprofil
REM	Kockázatelemzési mátrix
RI	Relatív intenzitás

RFD	Relatív habsűrűség
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SLES	Nátrium-lauril-éter-szulfát
TPP	Céltermékprofil
UHPLC	Ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia
XANT	Xantángumi

1. BEVEZETÉS

A dermális készítmények széles skálája áll rendelkezésünkre a készítményfejlesztés során. A hagyományos formákon belül szilárd, félszilárd és folyékony készítményeket különítünk el a VIII. Európai Gyógyszerkönyv osztályozása szerint. A hagyományos formák mellett egyre több új, innovatív formával találkozhatunk a gyógyszeripar területén, mint például nanoemulziók, nioszómák, filmképző-rendszerek, habok, stb. Az elmúlt évtizedben fókuszba kerültek a habok a dermális területen, például sebek és égési sérülések gyógyításánál. Több új területen alkalmazzák őket, illetve nagyon fontossá vált a környezetbarát kialakítás, vagyis a hajtógáz-tartalmú rendszereket egyre inkább a hajtógázmentes rendszerek váltják fel.

A habot képző rendszerekben nagy lehetőség rejlik mind a gyógyszer-, mind a kozmetikai ipar számára is. Könnyen és kényelmesen alkalmazhatók, pontos adagolás érhető el velük, ami egészben eltávolítható a bőr felszínéről. Számos előnye mellett, rendkívül sok kihívással szembesülhetünk a formulálás során. Az összetételek megtervezésénél fontos szempont, hogy kellő ideig tartózkodjon a bőrön a készítmény. A felhasználói igényeket kielégítve gyorsan szétterüljön, és kellemes bőrérzetet biztosítson.

A gyógyszeres habokról szóló irodalmi kutatások száma csekély, ezért ezen rendszerek megismerése, fejlesztése és vizsgálata által egy sokkal előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező készítmény formulálható.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Ph.D. munkám célja stabil habformulák tervezése, valamint azok fizikai-kémiai, biofarmáciai tulajdonságainak és biokompatibilitásának vizsgálatára alkalmas módszerek fejlesztése volt. Továbbá célul tűztem ki a habok bőrön keresztüli permeációjának vizsgálatát és hatásmechanizmusuk megértését.

Ennek megfelelően a kutatásom az alábbi célkitűzéseknek megfelelően zajlott:

- I. Munkám első részében stabil habformulák összetételét dolgoztam ki, majd a formulák fizikai-kémiai és szerkezeti tulajdonságainak, valamint stabilitásának vizsgálatára alkalmas módszereket dolgoztam ki Quality by Design (QbD) megközelítés alkalmazásával. Ezen felül, vizsgáltam a különböző polimerek hatását a habstabilitásra és a habszerkezetre.
- II. Kutatásom második lépéseként céloim egy azonnali hatóanyag-felszabadulást biztosító, diklofenák-nátrium hatóanyag-tartalmú habkészítmény formulálása volt.

A biofarmáciai és fizikai-kémiai vizsgálatok eredményét a kiindulási habalap és a hagyományos gyógyszerhordozó-rendszerek csoportjába tartozó hidrogél eredményeivel vettem össze.

III. Kutatásom harmadik szakaszában a formulált habkészítmények biokompatibilitását vizsgáltam *in vitro* citotoxicitási tesztek és egy *in ovo* modell segítségével.

A komponensek hatását a sejtletképeségre humán zsírszövetből izolált mezenchymális őssejtek (AD-MSK) és keratinociták felhasználásával vizsgáltam. Emellett, a készítmények sebgyógyulásra gyakorolt hatását is értékeltem kétféle sebgyógyulási modell segítségével AD-MSK sejteken.

Végül, egy *in ovo* modellt alkalmaztam a habkészítmények irritációs potenciáljának értékelésére.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált anyagok

A polioxil-40-hidrogénezett-ricinusolajat a BASF SE Chemtrade GmbH-től (Ludwigshafen, Németország) vásároltuk. A Gattefossé (Saint-Priest Cedex, Franciaország) által gyártott kaprilokaproil-polioxil-8 glicerideket az Azelis Hungary Kft. (Budapest, Magyarország) biztosította. A CP Kelco A Huber Company (Atlanta, GA, USA) vállalattól származó xantángumit (XANT), valamint a fenoxietanol és a kaprilil-glikol keverékét a Biesterfeld Speciális Kemikáliák Magyarország Kft. (Budapest, Magyarország) ajándékozta. A hidroxietil-cellulózt (HEC) a Molar Chemicals Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A tisztított, ionmentesített vizet pedig a Millipore (Milford, MA, USA) szolgáltatta. Ezen kívül, a HyaCare50 (HA_{LMW}), a HyaCare Filler CL (HA_{CL}) és a HyaCare Tremella (HA_{HMW}) a Finecon s.r.o. (Bratislava, Szlovákia) által szolgáltatott termékminták voltak. A diklofenák-nátriumot (DS) és a fluoreszcein-nátriumot a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország), az izopropanolt (IPA) az Avantortól (Radnor, PA, USA), a hidroxipropil-metilcellulózt (HPMC) a Colorcon-tól (Budapest, Magyarország), a polietilén-glikol 200-at (PEG 200) a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország), a cellulóz-acetát szűrőt pedig a Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Németország) cégtől szereztük be. A nátrium-lauril-éter-szulfátot (SLES) és niacinamidot (NIAC) a Biesterfeld Speciális Kemikáliák Magyarország Kft. (Budapest, Magyarország) szolgáltatta. A dexpanentolt (DEXP) a DSM Nutritional Products Ltd. (Bázel, Svájc) biztosította. A korioallantoikus membrán vizsgálathoz a nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) a Sigma-Aldrich-től (Steinheim, Németország) vásároltuk.

3.2. Az 1. kísérleti rész módszerei - A habok fizikai-kémiai tulajdonságainak vizsgálata és jellemzése

3.2.1. Quality by Design megközelítés

A QbD megközelítés a célok meghatározásával kezdődik, és a termék, valamint a folyamat megértését helyezi előtérbe, a folyamat ellenőrzésére összpontosítva a kockázatkezelésen keresztül. A QbD megközelítés magába foglalja a céltermékprofil (TPP), a minőségi céltermékprofil (QTPP), kritikus anyagi jellemzők (CMA), a kritikus folyamatparaméterek (CPP) és a termék kritikus minőségi jellemzőinek (CQA) azonosítását a fejlesztés kezdetén.

3.2.2. Habok előállítása

Az előállított habkészítmények összetétele az 1. táblázatban látható. Viskozitásnövelő polimerek alkalmazásával a habok élettartamának növelése volt a cél, amelyek különböző koncentrációban voltak jelen (B fázis) a készítményekben. Emellett, felületaktív anyagok szolgálták fő habképző segédanyagként (A fázis), amelyeket minden készítményben azonos koncentrációban alkalmaztam, míg a C fázis a mikrobiológiai tartósítószer tartalmazta.

1. táblázat Habformulák összetétele („+”: a készítmény tartalmazza a segédanyagot, „-”: a készítmény nem tartalmazza a segédanyagot).

	F- Opolimer	F- XANT_0,1	F- XANT_0,2	F- HEC_0,2	F- HEC_0,4	F- HA _{LMW} _0,1	F- HA _{LMW} _0,2	F- HA _{HMW} _0,1	F- HA _{HMW} _0,2	F- HA _{CL} _0,1	F- HA _{CL} _0,2
A fázis											
Kaprilokaproil-polioxil-8 gliceridek /felületaktív anyag/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polioxil-40-hidrogénezett-ricinusolaj /felületaktív anyag/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B fázis											
Xantángumi /polimer/	-	0,1%	0,2%	-	-	-	-	-	-	-	-
HEC /polimer/	-	-	-	0,2%	0,4%	-	-	-	-	-	-
HA _{LMW} /polimer/	-	-	-	-	-	0,1%	0,2%	-	-	-	-
HA _{HMW} /polimer/	-	-	-	-	-	-	-	0,1%	0,2%	-	-
HA _{CL} /polimer/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1%	0,2%
Tisztított víz /oldószer/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C fázis											
Fenoxietanol és kaprilil-glikol keverék /tartósítószer/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.2.3. A habok kritikus paramétereinek jellemzése

3.2.3.1. A habok makroszkópos tulajdonságainak vizsgálata

A habok makroszkópos tulajdonságait a mérőhenger („cylinder”) módszer segítségével határoztam meg. Az kiindulási habalap 5 perces mechanikai keverése után, a képződött habot egy üveg mérőhengerbe öntöttem, majd 30 perc elteltével feljegyeztem a hab kezdeti és az öregedett térfogatát. A vizsgált paraméterek közé tartozott a relatív habsűrűség (RFD), a habtágulás (FE) és a habtérfogat stabilitás (FVS), amelyeket speciális, az irodalomban is megtalálható képletek segítségével számítottam ki.

3.2.3.2. A habkinetika és buborék alak mikroszkópos vizsgálata

A mikroszkópos méréseket a Leica DM6 B felsőállású automata mikroszkóppal (Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Németország) végeztem. Ez a módszer lehetővé teszi a habszerkezet és a buborékméret meghatározását, betekintést nyújtva a habok kinetikájának vizsgálatába. A rendszerek kinetikája a buborékméret-analízis segítségével figyelhető meg. A buborékok számát a 0, 10, 20 és 30 perces időpontokban vizsgáltam. A hab homogenitása ezzel a módszerrel bizonyíthatóan meghatározható. A légbuborékok mérete, kerekdedsége és méretaránya, valamint a buborék mennyisége egy előre meghatározott területen a habszerkezet jellemzésének fontos paraméterei lehetnek.

3.2.3.3. Reológia

A kiindulási habalap és a habok reológiai tulajdonságait Anton Paar Physica MCR302 reométerrel (Anton Paar, Graz, Ausztria) elemeztem, hab esetében lap-lap geometriájú mérőfejjel (50 mm átmérő, 2 mm réstávolság). A habalapok folyásgörbéit kúp-lap geometriájú mérőfejjel (átmérő: 25 mm, réstávolság: 0,1 mm) vettem fel a 0,1-100 1/s és 100-0,1 1/s nyírási sebességtartományban 25 °C-on. A habokat amplitúdó-söprés módszerével vizsgáltam, kitérést 0,1%-tól 100%-ig növelve 10 rad/s szögfrekvenciával.

3.2.3.4. Szétterülőképeség vizsgálata

A habok szétterülőképeségét egy TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Egyesült Királyság) szerkezetanalizáló berendezés segítségével figyeltem meg, amely egy TTC típusú állvánnyal volt felszerelve. Az alkalmazott apparátus egy felső hemiszférikus mérőfejből („male cone”) és egy pontosan illeszkedő plexi, kúp alakú („female cone”) mintatartóból állt. A mérés során a habot az alsó mintatartóba kell adagolni, majd a mintára a hemiszférikus fejjel erőt fejtettem ki, amelyet meghatározott mélységig nyomtam a habon keresztül. Ezt a mintára gyakorolt erőt határoztam meg, az erő-távolság görbén rögzített maximális erő (szilárdság) segítségével, modellezve a dermális gyógyszerformák alkalmazását.

3.3. A 2. kísérleti rész módszerei – Diklofenák-nátrium tartalmú habrendszer biofarmáciai tulajdonságainak összehasonlítása a habalappal és egy hagyományos hidrogéllal

3.3.1. A vizsgált készítmények előállítása

Ebben a kísérleti részben a habok tulajdonságait hasonlítottam össze a kiindulási habalappal (amely egy polimeroldat) és egy hagyományos hidrogéllal. A vizsgált formulákat tekintve, a hab/habalap és a hidrogél ugyanazt a két nemionos emulgenst és tartósítószer tartalmazta ugyanabban a koncentrációban. A különbség az oldószer típusában, polimer típusában és koncentrációjában található. A kísérletekben a habokat hajtógáz mentes habpumpával állítottam elő. A vizsgált készítmények részletes összetételeit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat A hidrogél, a hab és a kiindulási habalap összetétele

(„-”: a készítmény nem tartalmazza a segédanyagot).

	Hidrogél	Hab/Kiindulási habalap
DS (%) /hatóanyag/	1	1
PEG 200 (%) /oldószer/	3,5	–
IPA (%) /oldószer/	15	–
HPMC (%) /polimer/	3	–
Xantángumi (%) /polimer/	–	0,2
Kaprilokaproil-polioxil-8 gliceridek (%) /felületaktív anyag/	2	2
Polioxil-40-hidrogénezett- ricinusolaj (%) /felületaktív anyag/	2	2
Fenoxietanol és kaprilil-glikol keverék (%) /tartósítószer/	0,5	0,5
Tisztított víz (%) /oldószer/	ad 100	ad 100

3.3.2. A habformula preformulációs vizsgálata: A bőrön keresztüli *ex vivo* permeáció vizsgálata fluoreszcens mikroszkóp segítségével

A hatóanyag-mentes habkészítmény bőrpermeációjának megfigyelésére fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztam, ahol a készítmény permeációs képességét értékeltem a *stratum corneum*on keresztül. Rutin plasztikai műtét során nyert bőrmintákon zajlottak a vizsgálatok (Etikai engedély száma: BMEÜ/2339-3/2022/EKU). A műtétet követően a bőrt alaposan megtisztítottuk, majd legfeljebb hat hónapig -20°C-on tároltuk a felhasználásig.

A teljes hasi bőrmintákat fluoreszcens festéket tartalmazó készítménnyel kezeltem, majd 10 és 30 perces kezelési időt követően vizsgáltam a bőrpermeációt.

A metszeteket a LEICA DM6 B fénymikroszkóppal, piros fluoreszcens szűrő alatt vizsgáltam. A kezeletlen bőrmintáról készült képet használtam negatív kontrollként, míg a SLES oldattal kezelt bőrminta szolgált pozitív kontrollként a mérések során. A képek elemzését az ImageJ szoftverrel végeztem, majd meghatároztam a relatív intenzitást (RI), ami a színintenzitás növekedésének mértékét jelezte a kezeletlen bőrhöz képest.

3.3.3. A habformula reológiai tulajdonságainak összehasonlítása a kiindulási habalappal és a hidrogéllal

A kiindulási habalap, a hab és a hidrogél viszkozitását Anton Paar Physica MCR302 reométerrel (Anton Paar, Graz, Ausztria) vizsgáltam, kúp-lap típusú mérőfejjel, 25°C-on. A viszkozitás érték meghatározását RheoCompass szoftver segítségével határoztam meg 50 1/s nyírási sebességnél, három egyidejű mérés alapján, majd 0,1 és 100 1/s közötti nyírási sebességtartományban felvettem a folyásgörbét.

3.3.4. A habformula biofarmáciai tulajdonságainak összehasonlítása a kiindulási habalappal és a hidrogéllal

3.3.4.1. *In vitro* hatóanyag-felszabadulás és -permeáció vizsgálata Franz diffúziós cellával

A hab, a kiindulási habalap és a hidrogél hatóanyag-felszabadulását szintetikus membránon, a hatóanyag-permeációt hőszeparációs technikával előállított humán epidermiszen keresztül vizsgáltam vertikális Franz diffúziós cella (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA USA) segítségével. A plasztikai műtét során eltávolított emberi bőrt a fluoreszcens mikroszkóppal végzett módszerhez hasonlóan készítettem elő és használtam. A felszabadult és permeálódott hatóanyag koncentrációját ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia segítségével (UHPLC - Shimadzu Nexera X2 UHPLC szoftver) határoztam meg. Az *in vitro* permeáció számítása az epidermiszen keresztül permeálódott diklofenák-nátrium kumulatív mennyiségen alapult, figyelembe véve a diffúziós területet. Ezen elemzés során az inkubációs idő 6 óra volt, amely idő alatt a diklofenák-nátrium fluxusadatait (J) határoztam meg.

3.3.4.2. *Ex vivo* hatóanyag-permeáció vizsgálata Raman spektroszkópiával

A konfokális Raman mikroszkóp használható topikális készítmények vizsgálatára, mind a permeáció, mind a behatolási mélység megállapítására.

Kutatásomban Raman spektroszkópia segítségével felvett spektrumokkal korrelációs térképet állítottam fel, amelyek ábrázolták a diklofenák-nátrium térbeli eloszlását az emberi bőrben. A profilozásnál a diklofenák-nátrium jellemző, karakterisztikus csúcsait vettem alapul a kezelt és kezeletlen bőrrétegek értékelése során. Az adatok felvételét és elemzését a Dispersive Raman OMNICTM 8.2 (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) szoftverrel végeztem.

3.3.5. Statisztikai analízis

Az *in vitro* hatóanyag-felszabadulási vizsgálatok eredményeinek elemzése kétutas ANOVA varianciaanalízissel (Bonferroni-teszt) történt, Windows 10 Prism 5.0 szoftverrel (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Hat párhuzamos mérés átlagát \pm szórást tüntettem fel az ábrákon. A különbség szignifikáns, ha $*p \leq 0,05$ és $***p \leq 0,001$ a habformulához viszonyítva.

3.4. A 3. kísérleti rész módszerei - A habkomponensek és készítmények biokompatibilitásának és sebgyógyulásra kifejtett hatásának értékelése

3.4.1. A vizsgált készítmények előállítás

A citotoxicitási vizsgálatokhoz a komponenseket egyenként oldottam fel magas glükóztartalmú Dulbecco-féle módosított sejttenyésztő médiumban (DMEM-HG) a készítményekben alkalmazott koncentrációkhoz képest százszoros hígításban. A karcolásos és az impedancia alapú sebgyógyulás vizsgálat célja a polimerek és hatóanyagok hatásainak vizsgálata volt.

Ezen felül, az *in ovo* vizsgálat az ígéretes anyagok további irritáló hatásának elemzését célozta meg. A vizsgálatok során a korábbi hatóanyag-mentes formulák közül az F-0polimer, az F-XANT_0,2 és az F-HA_{HMW}_0,2 formulákat is teszteltem. A hatóanyagokat tartalmazó új formulák összetétele a 3. táblázatban található. A kísérletek során a kiindulási habalapot vizsgáltam, kontrollként a tiszta DMEM-HG médium szolgált.

3. táblázat A hatóanyag-tartalmú készítmények összetétele

(„-”: a készítmény nem tartalmazza a segédanyagot).

	F-XANT_0,2- DS_1	F-XANT_0,2- HA _{HMW} _0,2- DEXP_1- NIAC_1	F-HA _{HMW} _0,2- NIAC_5	F-HA _{HMW} _0,2- DEXP_5	F-HA _{HMW} _0,2- DS_1
DS (%) /hatóanyag/	1	–	–	–	1
DEXP (%) /hatóanyag/	–	1	–	5	–
NIAC (%) /hatóanyag/	–	1	5	–	–
HA _{HMW} (%) /polimer/	–	0,2	0,2	0,2	0,2
Xantángumi (%) /polimer/	0,2	0,2	–	–	–
Kaprilokaproil-polioxil- 8 gliceridek (%) /felületaktív anyag/	2	2	2	2	2
Polioxil-40- hidrogénezett- ricinusolaj (%) /felületaktív anyag/	2	2	2	2	2
Fenoxietanol és kaprilil- glikol keverék (%) /tartósítószer/	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tisztított víz (%) /oldószer/	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

3.4.2. Sejtenyésztés

Humán, hasi bőrből izolált keratinocitákat és humán zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteket (AD-MSK) alkalmaztunk a sejtes vizsgálatok során. A sejtenyésztő médium DMEM-HG volt, amely 10% foetális szarvasmarha szérummal, 1% L-Glutaminnal és 1% antibiotikum-antimikotikum keverékkel lett kiegészítve, majd 37°C-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk.

3.4.3. Citotoxicitás vizsgálat

A komponenseknek sejtleletképesre gyakorolt hatását a gyártó utasításait követően MTT-tesztekkel vizsgáltuk, ahol az AD-MSK-eket és keratinocitákat 96 lyukú lemezen szélesztettük, lyukanként a kezdeti sejt sűrűség 5×10^3 volt, valamint az alkalmazott koncentrációhoz képest 100-szoros hígításban vizsgáltuk a komponenseket tartalmazó oldatokat.

3.4.4. A habformulák hatásának vizsgálata *in vitro* sebgyógyulási modelleken

3.4.4.1. AD-MSK sejtekkel, karcólasos sebgyógyulás modellen végzett vizsgálat

A formulált készítmények hatását *in vitro* körülmények között, 24 lyukú lemezen vizsgáltuk az AD-MSK sejtekre. Első lépésként a sejtrétegen egyenletes sebeket hoztunk létre az AutoScratch Wound Making eszközzel (Agilent/BioTek, Santa Clara, CA, USA).

A gyógyulási folyamatot 48 órán keresztül figyeltük meg egy Okolab inkubációs rendszerrel felszerelt Olympus IX83 (Olympus, Tokió, Japán) mikroszkóp segítségével, a sebfelületet 1 órás időközönként megmérve, és a kezeletlen kontrollal összehasonlítva elemeztük.

3.4.4.2. Sebgyógyulás impedancia alapú mérése

A formulált készítmények hatását *in vitro* körülmények között, E-Plate WOUND 96 (Agilent/BioTek, Santa Clara, CA, USA) lemezeken vizsgáltuk az AD-MSK sejtekre. Első lépésként az AccuWound 96 (Agilent/BioTek, Santa Clara, CA, USA) eszközzel egyenletes sebeket hoztunk létre. A sebgyógyulás mértékét ezután 48 óráig az xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Agilent/BioTek, Santa Clara, CA, USA) berendezéssel értékeltük. A készítményekre adott sejtválasz kiértékelésére az impedancia változása arany elektródok segítségével került rögzítésre, majd elemeztük az adatokat.

3.4.5. Irritáció értékelése HET-CAM vizsgálattal

A nyálkahártya- vagy bőrszövetekre gyakorolt potenciális toxicitás elemzése az *in vivo* tyúktojás korioallantoikus membrán teszt (HET-CAM) segítségével történt, amely az érplexusra gyakorolt irritáló hatásokat értékeli. Az Alternatív Módszerek Hitelesítésével foglalkozó Intézményközi Koordináló Bizottság ajánlásait követve, bizonyítja a természetben, kozmetológiában és bőrgyógyászatban való alkalmazással kapcsolatos biokompatibilitást. Negatív kontrollként desztillált víz, pozitív kontrollként pedig 0,5%-os koncentrációjú SDS oldat szolgált.

A vaszkularizált CAM-szövetekre gyakorolt potenciális irritatív hatások értékeléséhez az olyan paraméterek előfordulási ideje került feljegyezésre, mint a vérzés (H), az érlízis (L) és a koaguláció (C). Ezután egy speciális egyenlet segítségével történt az irritációs pontszám (IS) kiszámítása. Az IS-értékek a Luepke által ajánlott, 0-tól 21-ig terjedő irritációs skála alapján a következőképpen osztályozzák a pontszámokat: 0–0,9 (nem irritáló), 1–4,9 (gyengén irritáló), 5–8,9 (mérsékelten irritáló) és 9–21 (erősen irritáló).

3.4.6. Statisztikai analízis

A citotoxicitási vizsgálat és az impedancia alapú sebgyógyulás módszer eredményeinek statisztikai elemzését a Prism 5.0 for Windows 10 szoftverrel végeztem, az egyutas ANOVA varianciaanalízis tesztel (Dunett-próba). Citotoxicitás vizsgálat esetén négy, impedancia alapú sebgyógyulás módszer esetén három párhuzamos mérés átlagát \pm szórást tüntettem fel az ábrákon. A különbség szignifikáns, ha $***p \leq 0,001$, $**p \leq 0,01$ és $*p \leq 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva.

4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

4.1. 1. kísérleti rész - A habok fizikai-kémiai tulajdonságainak vizsgálata és jellemzése

4.1.1. A QTPP, CQA, CMA, és CPP paraméterek definiálása habrendszerek esetén

A tervezés kezdetén mind a kiindulási habalap, mind a habrendszer QTPP-jét és minőségi jellemzőit (CQA) figyelembe vettem, majd a kritikus anyagi (CMA) és folyamatparamétereket (CPP) is meghatároztam. Öt magas kockázatú CQA-t azonosítottam, köztük a habtérfogatstabilitást, a habtágulását, az amplitudó-söprés görbék metszéspontját, a buborékméretet és a buborékok számát, míg három közepes kockázatú CQA-t, nevezetesen a szétterülőképeséget, a habsűrűséget és a kiindulási habalap viszkozitását azonosítottam a habkészítmények fejlesztése során. Ezeket a paramétereket vizsgáltam a kutatási folyamat során.

4.1.2. Habok preformulációs vizsgálata

Preformulációs vizsgálatokat végeztem a kívánt habállag eléréséhez szükséges keverési idő és sebesség optimalizálása érdekében. Különböző keverési sebességeket (1000 rpm, 1500 rpm, 2000 rpm) és időtartamokat (5, 10, 15 perc) vizsgáltam a vizsgálandó kiindulási habalap kétszeresének megfelelő habmennyiség eléréséhez. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgálati célokra megfelelő habállagot 2000 rpm 5 percig tartó keverésnél lehetett elérni.

4.1.3. Kritikus paraméterek jellemzése

4.1.3.1. Habok makszorkópos tulajdonságainak vizsgálata

A makroszkópos vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a polimermentes összetétel nagy habtágulás értéket, de gyenge habtérfogat stabilitást mutatott, ami a habszerkezet gyors széteséséhez vezet. Hasonlóképpen, az F-HEC_0,2, F-HA_{LMW}_0,1 és F-HA_{LMW}_0,2 készítmények nagy habtágulást, de alacsony habstabilitást mutattak. Az F-HA_{CL} mindkét vizsgált koncentrációban alacsony habstabilitást mutatott, mérsékelt habtágulás értékkel. Ezzel szemben, az F-XANT és az F-HA_{HMW} készítmények mindkét koncentrációban magas habstabilitást mutattak. Az általam vizsgált habok esetén a jól habzó készítmények a 150% feletti habtágulást mutató habok voltak. A legstabilabb formulák a 70% feletti habtérfogat stabilitással rendelkező készítmények voltak, nevezetesen az F-XANT_0,2 és az F-HA_{HMW}_0,2.

4.1.3.2. A habkinetika és buborék alak mikroszkópos vizsgálata

A habok kinetikai elemzése lehetővé tette a habok stabilitásának meghatározását, amely megmutatta a buborékok száma és az idő közötti kapcsolatot.

A 100-nál nagyobb kezdeti buborékszámmal rendelkező habok jó mikroszkopikus stabilitást mutattak, ami jól korrelált a makroszkópos „cylinder” módszerrel végzett habtérfogat-stabilitási eredményekkel. Ezek az F-XANT_0,1, F-XANT_0,2, F-HA_{LMW}_0,2, F-HA_{HMW}_0,1 és F-HA_{HMW}_0,2 habok voltak.

4.1.3.3. A habok reológiai vizsgálata (oszcillometriai mérések)

A vizsgálatok során két különböző amplitúdó söprési görbét figyeltem meg: az egyik szélesebb lineáris viszkoelasztikus tartományt (LVE) és magasabb rugalmassági modulust (G') mutat, ami stabilitásra utal, a másikban pedig a veszteségi modulus (G'') dominál, ami a koherens habszerkezet hiányát jelzi. Egyes habkészítmények folyadékként viselkedtek, a vizsgálati tartományban a G'' értékek magasabbak voltak, mint a G' értékek, így hiányzott a folyáspont. Az F-0polimer hab 10 perc után a folyadékvesztés miatt a legmagasabb LVE értéket mutatta. Az F-XANT_0,1 és F-XANT_0,2 kezdetben jobb stabilitást mutatott, mint a polimermentes hab, de a magasabb koncentrációjú habok esetén 30 perc után csökkent a stabilitás. Az F-HEC_0,2 és F-HEC_0,4 polimer-koncentrációjának növelése az idő múlásával a koherencia csökkenését eredményezte, míg az F-HA_{LMW} készítmények 20 percig stabilak maradtak, valamint a magasabb polimertartalommal javultak. Az F-HA_{HMW}_0,1 azonban 30 perc után fokozott koherenciát mutatott, ellentétben a keresztkötött hialuronsavval, amely magasabb polimerkoncentráció esetén felgyorsította a hab szétesését. Az F-XANT és F-HA_{HMW} rendszerek ígéretes hosszú távú stabilitást mutattak, összhangban az FVS% értékekkel.

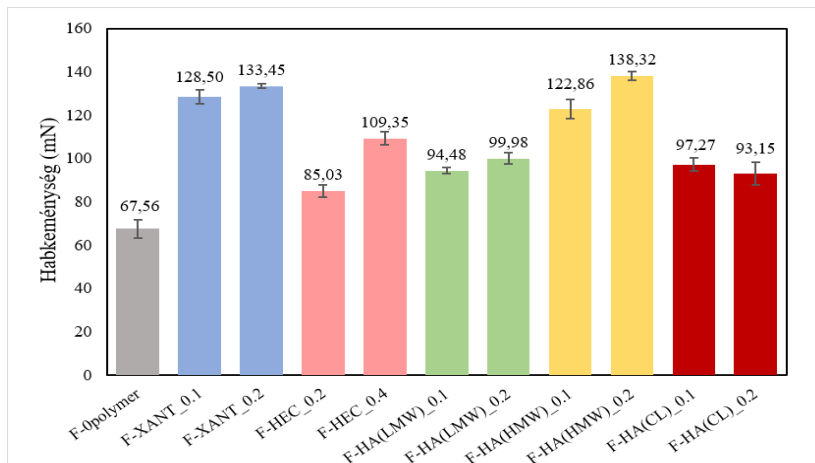
4.1.3.4 Reológiai vizsgálat: A kiindulási habalap folyási tulajdonságai

A vizsgált polimeroldatok (kiindulási habalap) jellemzően nyírásra vékonyodó viselkedést mutattak a makromolekulák nyírás hatására történő rendeződése miatt, ami különösen a xantángumit és a HEC-tartalmú oldatoknál volt megfigyelhető, ahol a viszkozitás a koncentrációval nőtt. Az alacsony molekulatömegű hialuronsav és a keresztkötött hialuronsav-tartalmú oldatok a polimermentes oldatokhoz hasonló reológiai viselkedést mutattak, míg a nagy molekulatömegű hialuronsavnál a xantángumihoz hasonlóan, nyírásra vékonyodó viselkedés volt megfigyelhető, enyhe tixotrópia mellett.

4.1.3.5. Szétterülőképeség vizsgálata

A polimermentes hab könnyű szétterülőképeséget és gyors elfolyósodást mutatott, míg a polimertartalom általában növeli a habszilárdságot, megakadályozva a bőrről való lefolyást. Az 1. ábra szemlélteti, hogy a nagyobb polimertartalommal rendelkező habok szétterüléséhez nagyobb erő szükséges.

A nagy molekulatömegű hialuronsavat tartalmazó habok igényelték a legnagyobb erőt a szétterüléshez. A xantángumi és a nagy molekulatömegű hialuronsavat tartalmazó habok megfeleltek az előre felállított követelményeknek, és korreláltak a makroszkópos eredményekkel.



1. ábra. A vizsgált készítmények habkeménység értékei.

4.1.4. 1. kísérleti rész összefoglalása

Tizenegy készítmény fizikai-kémiai és mechanikai tulajdonságait elemeztem kezdeti kockázatértékelés alapján, olyan kritikus minőségi paraméterekre összpontosítva, mint a habtérfogat stabilitás, a habtágulás, az amplitudó söprés görbék metszéspontja, a buborékok mérete és száma, valamint olyan közepesen kritikus jellemzők, mint a szétterülőképesség, a habsűrűség és a kiindulási habalap viszkozitása. A polimer koncentrációját és típusát a CQA-kat befolyásoló, rendkívül kritikus anyagi paraméterekként azonosítottam, amelyek jelentős hatással vannak a habok mechanikai tulajdonságaira. Az olyan készítmények, mint az F-XANT_0,1, F-XANT_0,2, F-HA_{HMW}_0,1 és F-HA_{HMW}_0,2 ígéretes tulajdonságokat mutattak, és eredményeik erős korrelációt mutattak a különböző vizsgálati módszerek között. A makroszkópos stabilitás vizsgálatot, a mikroszkópos kinetikai vizsgálatot és az oszcillometriai méréseket ötvöző protokoll új megközelítést kínál az optimális habösszetétel kidolgozásához, ami előrelépést jelent a korábbi módszerekhez képest.

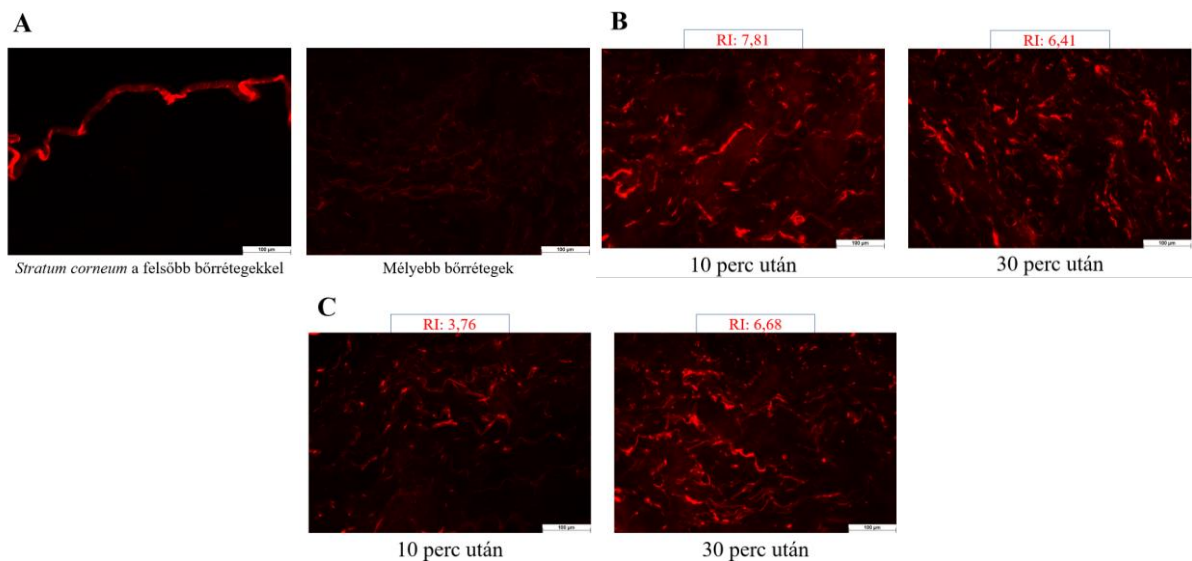
4.2. 2. kísérleti rész – Diklofenák-nátrium tartalmú habrendszer biofarmáciai tulajdonságainak összehasonlítása a habalappal és egy hagyományos hidrogéllal

4.2.1. A habformula preformulációs vizsgálata: A bőrön keresztüli *ex vivo* permeáció vizsgálata fluoreszcens mikroszkóp segítségével

A fluoreszcens mikroszkóppal végzett vizsgálatban a habot negatív és pozitív kontrollokkal hasonlítottam össze.

Negatív kontrollként a kezeletlen bőr szolgált, pozitív kontrollként pedig a SLES-t tartalmazó oldattal (a permeáció fokozása érdekében) kezelt bőrt alkalmaztam. Az eredmények a fényintenzitás jelentős növekedését mutatták az SLES kezelést követően, a fluoreszcencia intenzitása 10 perc után 7,81-szeresére, 30 perc után pedig 6,41-szeresére nőtt a kezeletlen bőrhöz képest.

Hasonlóképpen, a hab idővel észrevehető növekedést mutatott a fluoreszcencia intenzitásában, és 30 perc után a pozitív kontrollhoz hasonló relatív intenzitást (RI) ért el, ami a pozitív kontrollhoz hasonlóan mély permeációs képességre utal (2. ábra).



2. ábra. A negatív kontroll (A), a pozitív kontroll (B) és a habkészítménnyel kezelt bőr (C) fluoreszcens mikroszkópos képei.

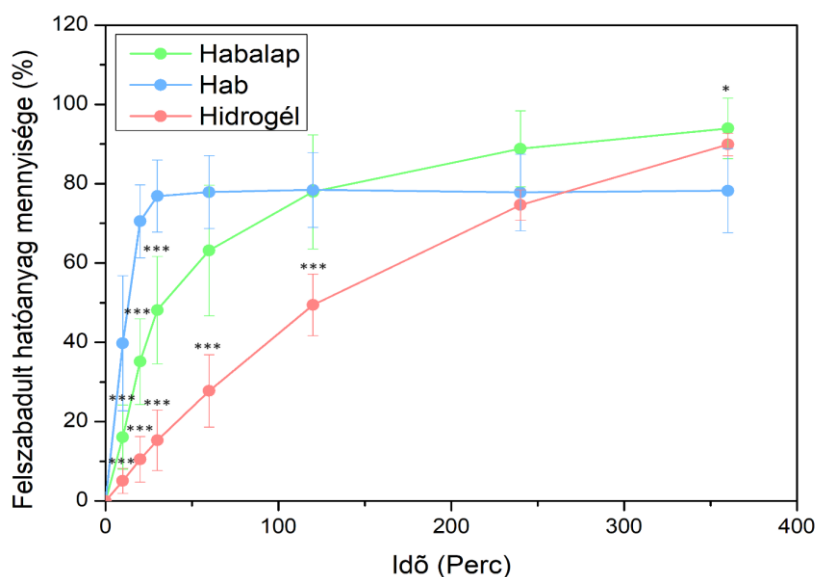
4.2.2. A habformula reológiai tulajdonságainak összehasonlítása a kiindulási habalappal és a hidrogéllal

A reológiai méréseket a rendszerek konzisztenciájának vizsgálatára alkalmaztam. Mind a kiindulási habalap, mind a hab szétesését követően visszamaradt folyadékfilm viszkozitását elemeztem és összehasonlítottam egy hidrogél viszkozitásával. Idővel a hab a kötőerők és a polimerláncok közötti kölcsönhatások miatt folyadékfilmmé alakult, ami a kiindulási habalaphoz képest szervezettebb hálózatot eredményezett. Ez a strukturált hálózat megnövelte a folyékonyfilm viszkozitását, ami csökkent térkitöltést és nagyobb sűrűséget eredményezett. Mivel a hidrogél viszkozitása 6,5-szeres volt a habalaphoz és a visszamaradt folyadékfilmhez képest, ez a bőrpermeáció késleltetéséhez vezethet a megnövekedett deformációs ellenállás miatt.

4.2.3. A habformula biofarmáciai tulajdonságainak összehasonlítása a kiindulási habalappal és a hidrogéllal

4.2.3.1. *In vitro* hatóanyag-felszabadulás és -permeáció vizsgálata Franz diffúziós cellával

A hatóanyag-felszabadulás eredményei azt mutatták, hogy a diklofenák-nátrium gyorsan szabadul fel a habból, körülbelül a hatóanyag 80%-a 30 perc alatt szabadult fel, míg a hidrogél esetében körülbelül 5 óra kellett ugyanezen eredmény eléréséhez (3. ábra). A habból történő gyors felszabadulás pórusos szerkezetének köszönhető. A hab szerkezetében lévő pórusokban a hatóanyag könnyebben eloszlik. A pórusos szerkezetnek köszönhetően, nagyobb a felszabadulás felülete, a hatóanyagok gyorsabban mozoghatnak és érhetik el a célfelületet. A felszabadulás kinetikája a kiindulási folyadék és a hidrogél között hasonló volt; azonban a diklofenák-nátrium kicsit gyorsabb diffúziót mutatott a kiindulási folyadékból. Ez azzal magyarázható, hogy egyrészt a polimeroldatok alacsonyabb viszkozitással rendelkeznek, ami lehetővé teszi, hogy a hatóanyag könnyebben diffundáljon a polimeroldatból a környező közegbe vagy a bőrre. Másrészt a felszabadulást befolyásolhatja a polimerhálózat szerkezete. A hidrogélek általában egy szervezettebb, összekapcsolt szerkezettel rendelkeznek, ami lassabb felszabaduláshoz vezethet.



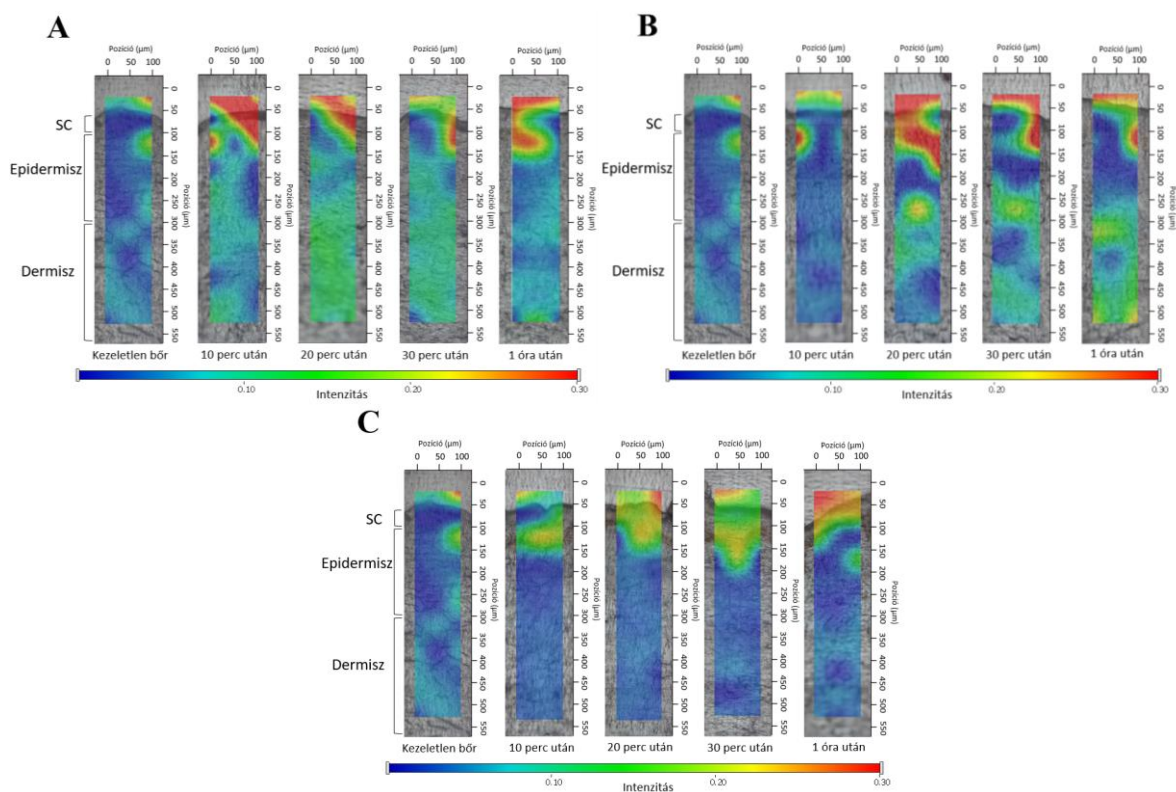
3. ábra. A diklofenák-nátrium felszabadulási profilja különböző rendszerekből (***) $p \leq 0,001$ vs. Hab, * $p \leq 0,05$ vs. Hab).

A permeációs sebességre vonatkozó adatok (flux értékek) azt mutatták, hogy a gyors hatóanyag-felszabadulás a habból gyors hatóanyag-permeációhoz vezetett.

A hab szétesése után kialakult folyadékfilm túltelítetté válhatott, ami a hidrogél és kiindulási habalapozó képest gyorsabb permeációt eredményezett.

4.2.3.2. *Ex vivo* hatóanyag-permeáció vizsgálata Raman spektroszkópiával

A diklofenák-nátrium emberi bőrön keresztüli *ex vivo* permeációját Raman spektroszkópia segítségével vizsgáltam. A 4. ábra a hatóanyag eloszlását mutatja a hab, a kiindulási habalap és a hidrogél alkalmazását követően, ahol a térképeken a melegebb színek magasabb diklofenák-nátrium koncentrációt jeleznek. A kiindulási habalap esetében a hatóanyag 10 percen belül detektálható volt a mélyebb bőrrétegekben, és 30 perc után már intenzívebben jelen volt ezekben a rétegekben. A habbal kezelt bőrmetszet esetében a diklofenák-nátrium 10 perc után az epidermisz felső rétegeiben koncentrált, majd a hatóanyag jelenléte a mélyebb rétegekben is megjelent az idő előrehaladtával (10. ábra). A hab fokozatos szétesése miatt 10 perc után egy szupersaturált folyadékréteg alakult ki, melynek eredménye volt, hogy 20-30 perc után a bőr mélyebb rétegeiben is megjelent a diklofenák-nátrium. A hidrogél esetében látható, hogy a diklofenák-nátrium a vizsgálat ideje alatt az epidermisz felsőbb rétegig tudott csak permeálódni. 1 óra után nagyobb koncentrációt a bőr felsőbb rétegeiben tudott elérni.



4. ábra. A diklofenák-nátrium *ex vivo* permeációja a kiindulási habalapból (A), a habból (B), és a hidrogélből (C).

4.2.4. 2. kísérleti rész összefoglalása

Munkám második részében a habok biofarmáciai tulajdonságait hasonlítottam össze a hagyományos gyógyszerhordozó-rendszerek közé tartozó hidrogéllal és polimeroldattal (kiindulási habalap). Az eredmények azt mutatták, hogy a hab gyorsabb hatóanyag-felszabadulást és mélyebb bőrpermeációt mutatott a hidrogélhez képest, a diklofenák-nátrium körülbelül 80%-a 30 percen belül felszabadult, míg a hidrogélnek körülbelül 5 órára volt szüksége ugyanilyen mértékű felszabadulás eléréséhez. A habból megfigyelt gyors felszabadulás a porózus szerkezetnek tulajdonítható, amely nagyobb felületet biztosít, így segíti a hatóanyagok jobb eloszlását, ezáltal gyorsabban jut el a hatóanyag célterületre.

A Raman bőrpermeációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a hab kezdetben a felső epidermális rétegekben koncentráldott, majd idővel fokozatosan a mélyebb rétegekbe hatolt. Ezzel szemben, a hidrogél nagyobb viszkozitása miatt még 1 óra elteltével sem ért el a diklofenák-nátrium mélyebb bőrpermeációt, amit a Raman térképezés is alátámasztott.

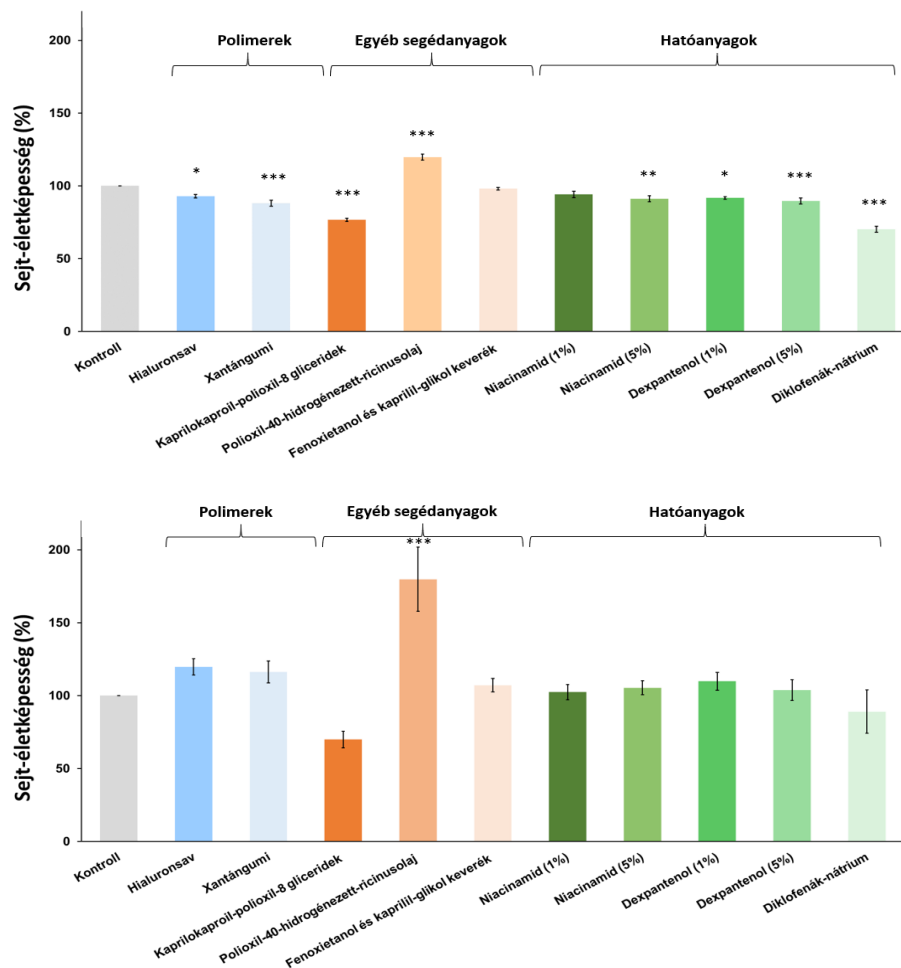
4.3. 3. kísérleti rész- A habkomponensek és készítmények biokompatibilitásának és sebgyógyulásra kifejtett hatásának értékelése

További kísérleteim során sebgyógyulásban potenciónalisán alkalmazható hatóanyagok kerültek a habkészítményekbe. A sebgyógyulásban betöltött szerepéről ismert dexpanthenol, a gyulladáscsökkentő hatású diklofenák-nátrium és a remodelling fázisban részt vevő, szintén gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkező niacinamid töltötték be a hatóanyag szerepét a készítményekben. Ezenkívül polimerként xantángumit és hialuronsavat használtam a habkészítményekben, amelyek sebgyógyító tulajdonságaik miatt előnyösek lehetnek a kisebb sebek és hegek kezelésében.

4.3.1. Citotoxicitás vizsgálat

Az MTT-vizsgálat segítségével értékeltem a habkészítmények komponenseit (5. ábra), és az eredmények azt mutatták, hogy a polimerek, a niacinamid és a dexpanthenol hasonló hatással voltak a sejtek életképességére, továbbá a dexpanthenol és a niacinamid koncentrációjának változtatása nem volt hatással a mesenchymális őssejtekre. Az eredmények alapján az AD-MSK-k esetében a komponensek enyhén csökkentették a sejtek életképességét (kivéve a Polioxil-40-hidrogénezett-ricinusolajat), a diklofenák-nátriumnak volt a legszignifikánsabb csökkentő hatása; ugyanakkor minden komponens 70% feletti életképességet tartott fenn, ami így megfelelt az ISO 10993-5 szabványnak.

Keratinocitákban, a diklofenák-nátrium és az egyik felületaktív anyag kivételével, minden komponens növelte a sejtek életképességét, a Polioxil-40-hidrogénezett-ricinusolaj nagyobb életképességet mutatott, mint a hatóanyagok és a polimerek. Az átlagértékek magasabb standard hibája miatt ebben a vizsgálatban nem lehetett szignifikánsabb különbségeket megfigyelni. Az eredmények ebben az esetben is megfeleltek az ISO 10993-5 szabványnak, mivel minden komponens elérte a 70%-os sejtéletképességet.



5. ábra. A habkomponensek hatása az AD-MSC-k (fent) és a keratinociták (lent) sejt-életképességére (***) $p \leq 0,001$ vs. Kontroll, ** $p \leq 0,01$ vs. Kontroll, * $p \leq 0,05$ vs. Kontroll).

4.3.2. AD-MSC sejtekkel végzett, karcólasos sebgyógyulás és impedancia alapú sebgyógyulás modellek összehasonlítása

Kutatásom ezen részében öt habformula hatását vizsgáltam két, széles körben alkalmazott sebgyógyulási modellen.

A karcolásos vizsgálat, egy egyszerű, de hatékony módszer, két dimenzióban elemzi a sejtmigrációt, míg az impedancia alapú megközelítés, amely az utóbbi időben egyre nagyobb teret nyer, ígéretesnek tűnik a háromdimenziós proliferációs vizsgálatokhoz.

A karcolásos vizsgálat során kapott eredmények alapján, a legtöbb seb hatékonyan záródott, kivéve a diklofenák-nátrium-tartalmú habbal kezelt sebet, ami a hatóanyag esetleges gátló hatására utal a sebgyógyulás kezdeti szakaszában. Korábbi kutatások szerint a diklofenák gátolja az őssejtek sejtfunkcióit, bár megfelelő kombinációban felgyorsíthatja a sebgyógyulást. Az impedancia alapú sebgyógyulási vizsgálati eredmények szerint az olyan polimerek, mint a xantángumi (43,05%) és a hialuronsav (46,13%) javították a sejtmigrációt a polimermentes habhoz képest (30,9%), míg a diklofenák-nátriumot tartalmazó hab formulák viszonylag alacsony migrációs százalékot mutattak (15,99%).

Bár a polimerek dexpanthenollal és niacinamiddal való kombinálása kissé csökkentette a migrációt, még mindig magasabb értékeket eredményezett a polimermentes formulákhoz képest, ami korrelált a karcolásos modell eredményeivel.

4.3.3. Irritáció értékelése HET-CAM vizsgálattal

A sebgyógyulás modelleken végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a hialuronsav fokozta a sebgyógyulást, emiatt további vizsgálatokat végeztünk egy *in ovo* modell segítségével, ahol mind önmagában, mind a habformulációkban kombinálva vizsgáltuk a hialuronsav hatását.

Az irritatív pontszámok, amelyek az alkalmazást követő 5 perces megfigyeléseken alapultak, a pozitív kontrollhoz képest egyik mintában sem mutattak irritációt. Azonban 30 perc elteltével csak a negatív kontroll és az F-HA_{HMW}_0,2-DEXP_5 formuláció nem mutatott irritációt a mérés során.

4.3.4. 3. kísérleti rész összefoglalása

A formulált habrendszerek előnyösek lehetnek a nedves sebkörnyezet fenntartásában, ami segíti a hatékony sebgyógyulást. Az olyan hatóanyagok alkalmazása előnyös lehet, mint a dexpanthenol, a niacinamid és a diklofenák-nátrium, amelyek a sebgyógyulás különböző szakaszaiban játszhatnak szerepet, emellett a citotoxicitási vizsgálatok megerősítik biztonságosságukat.

A sebkarcolás és az impedancia alapú vizsgálatok összehasonlító elemzései kihangsúlyozták a polimertartalom szerepét a sejtmigráció és a sebzáródás elősegítésében. A diklofenák-nátriumot tartalmazó habkészítmény azonban nem mutatott teljes sebzáródást, ami a hatóanyag esetleges gátló hatására utal a sebgyógyulás kezdeti szakaszában.

Az impedancia-alapú mérés jól korrelált a karcolásos vizsgálat eredményeivel, a diklofenákot tartalmazó habnál mutatta a legalacsonyabb migrációs értéket (15,99%).

Az *in ovo* vizsgálat továbbá alátámasztotta a hialuronsav- és dexpanthenol-tartalmú habkészítmény hatását, amely készítmények nem mutattak irritációra utaló jeleket, ezáltal elősegíthetik a szövetek helyreállítást a sebgyógyulás során.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A dermális habok gyógyászati célú alkalmazása egyre népszerűbb a lakosság körében. Alkalmazásuk esztétikus, nem kelt zsíros bőrérzetet, és könnyen eltávolíthatók a bőrről, így javítva a betegadherenciát. A habok kiválóan szétterülnek a bőrön, megkönnyítve a hatóanyagok azonnali felszívódását, intenzív dörzsölés nélkül. Számos előnyük ellenére a dermális habok formulálása jelentős kihívást jelent. A gyors kenhetőségre és a kellemes bőrérzetre vonatkozó felhasználói igények kielégítése mellett kulcsfontosságúvá vált a környezetbarát kialakítás biztosítása. Ezen kívül, bár a habok számos előnyt nyújtanak, elérhetőségük a piacon viszonylag alacsony az olyan hagyományos gyógyszerformákhoz képest, mint a krémek és gélek.

Doktori munkám során, innovatív habrendszerek formulálását tűztem ki célul, és új vizsgálati módszereket dolgoztam ki, amelyek alkalmasak a habok fizikai-kémiai, majd biofarmáciai tulajdonságainak vizsgálatára. Végül a biokompatibilitást (citotoxicitást, irritációt) és a formulált készítmények sebgyógyulásra gyakorolt hatását vizsgáltam.

Munkám során sikerült a habok mechanikai tulajdonságainak értékelésére alkalmas vizsgálati módszereket kidolgoznom, és az eredmények azt mutatták, hogy a habok, mint gyógyszerformák alkalmasak a gyors hatóanyag-felszabadulás biztosítására, mélyebb permeációra, és a hagyományos hordozórendszerek alkalmas alternatívájaként szolgálhatnak.

6. A MUNKA ÚJDONSÁG TARTALMA ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

- A QbD megközelítés először lett alkalmazva a habok fejlesztésében, bizonyítva annak hatékonyságát a rendszerek kritikus paramétereinek azonosításában és számszerűsítésében.
- Sikerült kidolgozni egy új fénymikroszkópos mérési módszert a hab kinetikájának és a buborékok morfológiájának értékelésére.
- Kutatómunkámban bemutattam a habokban használt különböző stabilitásfokozó polimerek hatását, és megvizsgáltam a különböző polimerek hatását a habok fizikai-kémiai tulajdonságaira.

Megállapítottam, hogy a makroszkópos, mikroszkópos és reológiai mérési módszerek együttes alkalmazása lehetővé teszi a habkészítményekben használt segédanyagok megfelelő kiválasztását.

- A Texture Analyzer készülék először volt alkalmazva a habok fizikai stabilitásának meghatározására.
- A biofarmáciai vizsgálatok során bebizonyítottam, hogy a hab gyógyszerhordozó-rendszerek azonnali hatóanyag-felszabadulást és mélyebb bőrpermeációt tesznek lehetővé. Az *in vitro* kvantitatív IVPT és a kvalitatív *ex vivo* Raman térképezési vizsgálatok eredményei jól korreláltak. Az IVRT, az IVPT és a Raman spektroszkópia kombinációja először lett alkalmazva a habok biofarmáciai tulajdonságainak meghatározására, alátámasztva azok gyors hatóanyag-felszabadulását és mély bőrpermeációját.
- A Raman spektroszkópia eredményei jó korrelációt mutattak a fluoreszcens mikroszkóppal végzett vizsgálattal, ami további bizonyítékot szolgáltatott a rendszer gyors permeációjára.
- A bőrön alkalmazott habok összetevőinek biokompatibilitását humán zsírszövet eredetű mezenchimális őssejtekkel és emberi bőrből kivont keratinocitákkal bizonyítottuk, ami alátámasztja a bőrön történő alkalmazás biztonságosságát. A két MTT-teszt közötti összefüggés azt jelezte, hogy érzékenységük miatt a humán zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteken végzett vizsgálatok alkalmasabbak a habkomponensek sejtletképeségének meghatározására.
- A kiindulási habalap sebgyógyító hatását két különböző modellen is igazoltuk. A két modell együttes alkalmazása jó korrelációt mutatott, ami alkalmas lehet a sebkezeléshez szükséges optimális formula kiválasztására.
- Továbbá, az *in ovo* HET-CAM vizsgálat alkalmas volt a habkészítmények irritációjának meghatározására.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Fanni Falusi**; Mária Budai-Szűcs; Erzsébet Csányi; Szilvia Berkó; Tamás Spaits; Ildikó Csóka; Anita Kovács: Investigation of the effect of polymers on dermal foam properties using the QbD approach.
European Journal of Pharmaceutical Sciences, 173, 106160 (2022) **(Q1, IF:4.6 by JCR)**
- II. **Fanni Falusi**; Szilvia Berkó; Anita Kovács; Mária Budai-Szűcs: Application of Xanthan Gum and Hyaluronic Acid as Dermal Foam Stabilizers.
Gels, 8(7), 413. (2022) **(Q1, IF: 4.6 by JCR)**
- III. **Fanni Falusi**, Szilvia Berkó, Mária Budai-Szűcs, Zoltán Veréb, Anita Kovács: Foams Set a New Pace for the Release of Diclofenac Sodium.
Pharmaceutics 16, 287 (2024) **(Q1, IF:5.4 by JCR)**

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Anita Kovács, Stella Zsikó, **Fanni Falusi**, Erzsébet Csányi, Mária Budai-Szűcs, Ildikó Csóka, Szilvia Berkó: Comparison of Synthetic Membranes to Heat-Separated Human Epidermis in Skin Permeation Studies In Vitro.
Pharmaceutics 13, 2106 (2021) **(Q1, IF:6.525 by JCR)**
- II. Anita Kovács, **Fanni Falusi**, Attila Gácsi, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi, Zoltán Veréb, Tamás Monostori, Ildikó Csóka, Szilvia Berkó: Formulation and investigation of hydrogels containing an increased level of diclofenac sodium using risk assessment tools.
European Journal of Pharmaceutical Sciences 193, 106666, (2024) **(Q1, IF:4.6 by JCR)**

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

Szóbeli előadások

- I. **Fanni Falusi**; Anita Kovács; Erzsébet Csányi
Investigation of foams for topical use
III. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2021
- II. **Falusi Fanni**
Dermális habok formulálása és vizsgálata
IV. Fiatal Technológusok Fóruma, online, 2021
- III. **Falusi Fanni**; Berkó Szilvia; Csóka Ildikó; Kovács Anita
Dermális habok jellemzése és vizsgálata
MKE Kozmetikai Szimpózium, Budapest, 2021
- IV. **Falusi Fanni**
Különböző polimer tartalmú habok formulációja és vizsgálata
XIV. Clauđer Ottó Emlékverseny, Budapest, 2021
- V. **Fanni Falusi**; Anita Kovács; Szilvia Berkó
Formulation and investigation of the effect of polymers on dermal foam properties using the QbD approach
IV. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2022

- VI. **Falusi Fanni**; Kovács Anita; Budai-Szűcs Mária; Berkó Szilvia
Dermális habok, mint innovatív gyógyszerformák formulálása és vizsgálata
Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '22, Herceghalom, 2022
- VII. **Falusi Fanni**; Kovács Anita; Budai-Szűcs Mária; Csóka Ildikó; Berkó Szilvia
Dermálisan alkalmazott készítmények hatóanyag-felszabadulásának és penetrációjának *in vitro* modellezése
MKE Kozmetikai Szimpózium, Budapest, 2022
- VIII. **Fanni Falusi**; Szilvia Berkó; Anita Kovács
Influence of polymers and active substances on foam stability
V. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2023
- IX. **Falusi Fanni**
A gyógyszeres habok nyújtotta ígéretes lehetőségek a hagyományos gyógyszerhordozó rendszerekkel szemben
VI. F fiatal Technológusok Fóruma, Budapest, 2023
- X. **Falusi Fanni**; Berkó Szilvia; Kovács Anita
Dermálisan alkalmazott gyógyszerhordozó rendszerek komparatív vizsgálata
Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '23, Herceghalom, 2023
- XI. **Falusi Fanni**
A dermális habok nyújtotta ígéretes lehetőségek
MKE Kozmetikai Szimpózium, Budapest, 2023

Poszter prezentációk

- I. **Fanni Falusi**; Szilvia Berkó; Mária Budai-Szűcs; Anita Kovács
Formulation and investigation of the effect of polymers on dermal foam properties using the Quality by Design (QbD) approach
9th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences - Pharma Sciences of Tomorrow, Ljubljana, 2022
- II. **Falusi Fanni**; Berkó Szilvia; Budai-Szűcs Mária; Kovács Anita
Hialuronsav és xantángumi, mint habstabilitás növelő komponensek vizsgálata
Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, 2022
- III. **Fanni Falusi**; Szilvia Berkó; Mária Budai-Szűcs; Anita Kovács
Development and evaluation of stable hydrogel formulations with enhanced diclofenac sodium concentration for effective topical drug delivery
14th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Ohrid, 2023

EGYÉB ELŐADÁSOK

- I. **Fanni Falusi**; Szilvia Berkó; Anita Kovács
Advancements in formulation and investigation of innovative foam-based *in situ* film-forming systems
VI. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, 2024

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Csóka Ildikónak**, a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget teremtett, hogy kutatásomat az intézetben végezhessem.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, **Dr. Kovács Anitának** és **Dr. Berkó Szilviának**, akik már hallgatói éveim alatt is támogattak szakmailag, valamint köszönöm folyamatos bátorításukat és érzelmi támogatásukat. Hálás vagyok korábbi témavezetőmnek, **Dr. Csányi Erzsébetnek**, aki tudományos munkámat végig kísérte és tanácsaival segítette tudományos pályafutásomat. Hálával tartozom továbbá **Dr. Budai-Szűcs Máriának**, aki tapasztalataival és tudásával segítette munkámat.

Köszönettel tartozom **Szalai Andreának**, **Tóth Krisztinának** és **Varga Valériának** a számtalan önzetlen segítségéért és támogatásáért.

Külön köszönet kooperációs partnereinknek, akik közül kiemelném **Dr. Veréb Zoltánt** és **Monostori Tamást** a Szegedi Tudományegyetem munkatársait, valamint **Dr. Stefana Avramot** és **Prof. Dr. Corina Danciut** a temesvári Victor Babes Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetemről.

Köszönettel tartozom **Dr. Party Petrának** és **Dr. Sipos Bencének**, hogy az elmúlt években minden egyes napomat szebbé és vidámabbá tették, köszönöm a rengeteg közös élményt. Igazán szerencsés vagyok, hogy ilyen csodálatos barátok állnak mellettem.

Legmélyebb hálám szeretett **Szüleimnek** és **Nagyszüleimnek** szól, akik nemcsak felneveltek és támogattak minden lépésemben, hanem szeretetükkel és bölcs tanácsaikkal segítettek formálni az életemet. Nélkülük nem lennék az, aki ma vagyok, és örökké hálás leszek nekik a támogatásukért és szeretetükért. Hálás vagyok vőlegényemnek, **Leventének**, aki mindig megértő és támogató volt, még a nehéz időkben is. Az Ő személye megnyugvást ad, és igazán szerencsés vagyok, hogy mellettem van.

