

Pickering emulziók gyógyszer technológiai alkalmazása vízben nem oldódó hatóanyagok és illóolajok formulálására

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



Vörös-Horváth Barbara

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Gyógyszerészi kémia alprogram

Programvezető: Dr. Perjési Pál

Témavezető

Dr. Secenji Aleksandar

tudományos főmunkatárs

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszer technológiai és Biofarmáciai Intézet

Pécs

2021

1. Bevezetés

Az emulziók gyógyszer technológiai jelentősége vitathatatlan, mivel számos különböző gyógyszerforma előállításánál használják őket, többek között krémek, gélek, transzdermális tapaszok vagy infúziók formulálásánál. A vízben rosszul vagy egyáltalán nem oldódó hatóanyagok [HA] formulálására megoldást nyújthat az emulziós forma alkalmazása, így a HA biohasznosulása is növelhető, illetve helyileg alkalmazandó készítmények esetén elősegíti a HA bőrön keresztül történő penetrációját. Az emulziók alkalmasak továbbá a gyógyszerforma küllemének, állagának, ízének és a HA eltarthatóságának javítására.

Hátrányuk azonban, hogy stabilizálásukhoz különböző felületaktív anyagokat, tenzideket alkalmaznak, amelyek rövidtávon irritáció okozói lehetnek, mind külsőleges, mind belsőleges alkalmazás esetén, hosszútávon pedig akár karcinogén hatást is kiválthatnak.

A felületaktív anyagok helyett biokompatibilis, szilárd részecskéket is alkalmazhatunk az emulziók stabilizálására, ezáltal a felületaktív anyagok káros hatásai kiküszöbölhetők lehetnek. A szilárd részecskékkel stabilizált emulziókat Pickering emulzióknak nevezzük [PE]. Számos kutatás bizonyítja, hogy a HA biohasznosulása PE-ből nagyobb mértékű, mint oldatokból vagy hagyományos emulziókból, mind orális mind topikális terápiára szánt készítmények esetén, ami valószínűleg annak köszönhető, hogy a PE cseppjeit borító szilárd részecskék preferáltan kötődnek a sejtekhez. A PE forma másik előnyös tulajdonsága, hogy segítségével szabályozott HA leadás is elérhető, amely a szabályozható cseppméretnek és a szilárd részecskéken keresztüli, ún. diffúz rétegen át történő HA ledásnak köszönhető.

A PEk fizikai kémiai tulajdonságait (pl. termodinamikai- és kinetikai stabilitás, emulzió típusa, cseppméret) számos tényező befolyásolja, többek között az emulziókat stabilizáló részecskék mérete, felületi tulajdonsága, az olajos és vizes fázis aránya, a folytonos közeg viszkozitása, vagy a diszpergált közeg viszkozitása és sűrűsége.

Az illóolajok [IO] gyógyászati alkalmazása napjainkban is nagy népszerűségnek örvend, mivel több megbetegedés kezelésére és megelőzésére is alkalmasak lehetnek, hatásukat ma már kutatásokkal is alátámasztották. Bár az IOak kedvező mellékhatás profillal rendelkeznek, alkalmazásuk mégsem veszélytelen, hiszen irritáció és allergiás reakció is felléphet alkalmazásukat követően. Biztonságos alkalmazásukhoz mikrobiológiai vizsgálatok elvégzése és a hatásmechanizmusuk pontos feltérképezése szükséges. Mivel az IOak

lipofil tulajdonságú anyagok, ezért emulziós formában történő alkalmazásuk, a vízben nem oldódó HAhoz hasonlóan elősegítheti biohasznosulásukat. Az IOak formulálásra és tesztelésére a PE forma alkalmas lehet. Előnye a PEknak a hagyományos emulziókkal szemben, hogy az IO párolgását csökkentik, o/v típusú emulzió készítése esetén. Továbbá az o/v típusú PEk alkalmazása a biológiai vizsgálatokat is megkönnyítheti, mivel azokat kivétel nélkül vizes közegben végzik.

A PEk fent említett paramétereinek megfelelő változtatásával, finomhangolásával olyan emulziós gyógyszerhordozó rendszert készíthetünk, amely alkalmas IOak és vízben nem oldódó HA formulálásra, illetve az alkalmazásnak megfelelő tulajdonságokkal rendelkeznek, segítségével szabályozott és célzott HA leadás is elérhető.

2. Célkitűzések

Munkám során olyan PEk előállítására törekedtünk, amelyek alkalmasak lehetnek IOak és lipofil HA formulálására, azok topikális alkalmazásra. A megfelelő gyógyszerhordozó rendszerek előállítása során figyelni kell arra, hogy a PEk stabilitása és cseppmérete mindig az alkalmazásnak megfelelő legyen, továbbá segítségével célzott HA leadás legyen elérhető. A PEk megfelelő fizikai kémiai tulajdonságainak eléréséhez első lépésben méretpontos szilika nanorészecskék [SN] szintézisének elvégzését, majd azok felületmódosítását tűztük ki célul; az így elkészült SNk felhasználhatók PEk stabilizálására.

A nanotechnológia egyre nagyobb térhódítása miatt a mai napig több kutatócsoport dolgozik azon, hogy megfelelő tulajdonságú, lehetőség szerint 200 nm részecskeméret alatti, monodiszperz méreteloszlású és szabályos gömb alakú Stöber szilikát tudjanak előállítani, minél nagyobb reprodukálhatóság mellett. Feldolgozva számos publikációt a témában megállapítottuk, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre olyan közlemény, amely lehetővé teszi a SNk méretpontos szintézisét. Ez alatt azt értjük, hogy nincs olyan szisztematikus vizsgálat és eredmény, amely alapján a kívánt SN részecskemérethez kapcsolódóan ki tudnánk választani a reakció egyes paramétereit, és reprodukálhatóan szintetizálni azt. Ezért kutatómunkám során célul tűztem ki egy ilyen szisztematikus vizsgálat megvalósítását és gyakorlati alkalmazhatóságának, reprodukálhatóságának vizsgálatát. A kísérletek paramétereinek tervezéséhez a jelenleg rendelkezésre álló kutatási eredményeket használtam fel.

Mivel a formulálni kívánt IOak és lipofil HA fizikai kémiai tulajdonságai (sűrűség, viszkozitás, felületi feszültség) esetenként jelentősen különböznek, ezért empirikus úton határozzuk meg, hogy milyen méretű és felületi tulajdonságú részecskével történjen a PEk stabilizálása.

Kamilla és fehérüröm IO formulálását tervezzük elvégezni, és a PEkat felhasználni mikrobiológiai vizsgálatokra. A mikrobiológiai kísérletek célja többek között a PE formuláció antibakteriális és antifungális hatásának vizsgálata, melyhez Gram negatív, Gram pozitív baktériumokat, továbbá sejtes és fonalas gombákat is felhasználunk. Továbbá vizsgálni kívánjuk, milyen hatása van a PEknak a bakteriális- és fungális biofilm degradációjára. A lehetséges hatásmechanizmus felderítése érdekében célul tűztük ki a PEk és sejtmodell kölcsönhatásának vizsgálatát. A PE forma mellett hagyományos emulziókat és etanolos oldatokat is vizsgálunk minden egyes kísérletben, az egyes formák hatásának összehasonlíthatósága érdekében.

A *Streptococcus mutans* fogászati biofilm helyi kezelését tűztük ki további célul. A jelenleg forgalomban kapható, biofilmek kezelésére szánt szájvizek szerves oldószereket és felületaktív anyagokat tartalmaznak, melyek nem kívánt mellékhatások okozói lehetnek. Ezeknek a segédanyagoknak a használata kiküszöbölhető, ha PE formát alkalmazunk. Figyelembe véve a *Streptococcus mutans* fogászati biofilm fizikai kémiai tulajdonságait, annak kellemetlen mellékhatások nélküli kezelésére, a 0,3 µm méretnél kisebb cseppmérettel rendelkező, o/v típusú PEk megoldást jelenthetnek. A PE formuláláshoz négy IOat választottunk, melyek mindegyike bizonyítottan rendelkezik antibakteriális és biofilm degradációs hatással: borsmenta (*Mentha x piperita* L.), fahéj (*Cinnamomum verum* J. Presl.), kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) és szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. és Perry.). A mikrobiológiai vizsgálatok mellett *in vitro* diffúziós vizsgálatokat is tervezünk elvégezni, melyben modell biofilm membránnal dolgozunk. Modell biofilm membránként agar gélt választottunk, mivel annak hidrofil jellege és tortuózus porózus szerkezete a *S. mutans* biofilm tulajdonságaival nagymértékben megegyezik. A PE forma mellett hagyományos emulziókat és etanolos oldatokat is vizsgálunk minden egyes kísérletben, az egyes formák hatásainak összehasonlíthatósága érdekében.

A másik, szintén topikális terápiára szánt PE formulációt körömgomba kezelésére szánjuk, mely azol származék és IO kombinációt tartalmaz, ezzel várhatóan szinergista antifungális hatás érhető el. Kísérleteinkhez az azol

származékok közül tiokonazolt [TIO] választottunk, mivel széles spektrummal rendelkező antifungális HA, amely a köröm gombás fertőzéseinek a kezelésére is alkalmas. Nenoff és kollégái megállapították, hogy a teafa IO (*Melaleuca alternifolia* [MA]) gátolja számos, klinikailag izolált gomba szaporodását, ezért javaslatot tettek annak topikális, antifungális terápiában való alkalmazására. Az o/v típusú PE emulzió, mint gyógyszerforma alkalmazása lehetővé teheti a TIO és MA kellő mennyiségben történő penetrációját a körömlemezen keresztül. Továbbá ha a PE cseppmértét megfelelően alakítjuk, a csepp átdiffundálhat a pórusos körömlemezen, ezáltal eléri a fertőzés valódi helyét, a körömágybort. A célzott HA leadást *in vitro* diffúziós vizsgálatokkal tervezzük vizsgálni, melyben modell körömlemez membránt, és kompozit membránt egyaránt használunk. A megfelelő PEk formulálásán és jellemzésén kívül, elvégezzük azok mikrobiológiai vizsgálatát *Candida albicans* és *Trichophyton rubrum* ellen, amelyek a körömgomba megbetegedésért leginkább felelős fajok. A PE forma mellett hagyományos emulziókat és etanolos oldatokat is vizsgálunk minden egyes kísérletben, az egyes formák hatásának összehasonlíthatósága érdekében.

Kísérleteinkből és eredményeinkből összességében azt várjuk, hogy sikerül olyan IO és lipofil HA tartalmú PEk előállítását elvégezni, melyek tulajdonságaiknál fogva nem irritatívak, stabil formulációt eredményeznek és hosszú távon is alkalmazhatók topikális terápiában.

3. Vizsgálati anyagok és módszerek

3.1. Szilika nanorészecskék szintézise, felületmódosítása és vizsgálata

A SNk szintézise tetraetoxi-szilán [TEOS] etanolos közegben végzett hidrolízisével történt, ammónium-hidroxid katalizátor jelenlétében. A TEOS koncentrációja minden esetben állandó volt, $c=0,26 \text{ mol/dm}^3$. A reakció hőmérsékletét, illetve az ammónia és a víz koncentrációját szisztematikusan változtattam az alábbiak szerint:

- változó ammónia koncentráció $0,29\text{-}0,097 \text{ mol/dm}^3$ érték között, állandó víz koncentráció 5 mol/dm^3 , hőmérséklet 25°C
- változó víz koncentráció $2\text{-}5 \text{ mol/dm}^3$ érték között, állandó ammónia koncentráció $0,29/0,194/0,097 \text{ mol/dm}^3$, hőmérséklet 25°C
- változó hőmérséklet $25\text{-}50^\circ\text{C}$ között, állandó ammónia koncentráció $0,29/0,194/0,097 \text{ mol/dm}^3$, állandó víz koncentráció 5 mol/dm^3

A reakcióidő minden esetben 24 óra volt, majd az elkészült SNket további felhasználásig az anyalúgban tároltam. Minden kísérletet legalább háromszor ismételt meg.

A szintézist követően elvégeztem a SNk felületmódosítását különböző szilanol származékokkal (metil-, etil-, propil-, fenil-trietoxi-szilán). Annak érdekében, hogy a felületmódosítás jól szabályozható és lehetőség szerint minél jobban reprodukálható legyen, minden egyes kísérlet előtt egyszerű, geometriai megközelítéssel kiszámoltuk, hogy a kívánt felületi borítottság (%) eléréséhez, hány mól szilanol származékra van szükség. A reakció 6 órán át zajlott 25°C hőmérsékleten. A reakció végeztével a SNket tartalmazó szuszpenzióból elpárologtattam az ammóniát, folyamatos kevertetés mellett, 50°C-on. Az így elkészült, módosított SN szuszpenziók aggregáció, illetve méret- vagy morfológia változás nélkül hónapokig eltarthatók.

Az SNk részecskeméretét és részecskeméret eloszlását dinamikus fényszórás méréssel [Dynamic Light Scattering=DLS] vizsgáltam, alkoholos és vizes közegű szuszpenzióban egyaránt. A DLS mérésekkel meghatározott eredmények alátámasztásának érdekében, illetve a SNk alakjának meghatározása miatt, transzmissziós elektronmikroszkópiai [TEM] vizsgálatok is történtek. A módosított SNket infravörös spektroszkópiai mérésekkel (IR) is vizsgáltam, melynek célja a felületmódosítás sikerességének igazolása volt.

3.1.1. Méretpontos szilika nanorészecske szintézis – Statisztikai módszer

Microsoft Excel® program segítségével elemeztük a kísérleti eredményeket, melynek célja volt, hogy összefüggéseket keressünk a SN szintézisének reakció körülményei és a kapott részecskeméretek között; és vizsgáltuk, hogy a kapott összefüggések alapján méretpontosan tervezhető-e a SN szintézis. A SN szintézis körülményei és a kialakult részecskeméret közötti összefüggéseket lineáris regresszió segítségével kerestük. A modellek illeszkedésének megállapításához meghatároztuk a lineáris regressziós együtthatót (R^2), és megvizsgáltuk az egyes modellek konfidencia intervallumait, hogy meghatározzuk a modellek által készített előrejelzés pontosságát.

A statisztikai elemzéshez legalább három párhuzamos kísérlet eredményéből számított részecskeméretek átlagát és szórás értékeit használtuk fel. A statisztikai eredmények segítségével további kísérleteket terveztünk, és vizsgáltuk a módszer gyakorlati alkalmazhatóságát.

3.2. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz

3.2.1. Kamilla és fehérüröm illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása

A formulálás során alkalmazott IO koncentrációk 0,1-3,5 mg/ml értékek között változtak. Kamilla IO esetén a PEK stabilizálásához 20 nm méretű és 50%-ban propil funkciós csoporttal módosított SNket [50PR], illetve fehérüröm IO esetén 20%-ban propil funkciós csoporttal módosított SNket [20PR] használtam. A SNk koncentrációja a kísérletek során állandó volt, 1 mg/ml.

Az emulgeálás két lépésben zajlott: az előemulgeálás során ultrahangos kezelés történt, majd az így kapott emulziót tovább emulgeáltam UltraTurrax segítségével. A PEkat további felhasználásig szobahőmérsékleten (25°C), fénytől védett helyen tároltam. Minden formulálást legalább háromszor ismételt meg.

3.2.2. Pickering emulziók vizsgálata – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás

Vizsgáltam, hogyan változik az PEK cseppmérete és stabilitása az IO koncentráció függvényében. A PEK cseppméretét és stabilitását DLS méréssel határoztam meg, utóbbinál időben követve a cseppméret esetleges változását, továbbá megfigyeltem, hogy időben változik-e a PEK külleme. Az emulziókat stabilnak tekintetem, amennyiben cseppméretük legalább 1 hétig nem változott, továbbá nem lépett fel aggregáció vagy részecskék ülepedése, és fázisszeparáció sem volt tapasztalható.

Az emulziók típusát vezetőképesség mérésekkel határoztam meg. A vizsgálatokhoz összehasonlításként minden esetben megmértem a különböző SN vizes szuszpenziók, illetve az illóolajok vezetőképességét is.

3.2.3. Pickering emulziók és sejtmembránok közötti kölcsönhatás vizsgálata sejtmoddellen

Az unilamelláris liposzómák egy foszfolipid kettősrétegből felépülő vezikulumok, melyek alkalmasak sejtek vagy biológiai membránok modellezésére. Sejtmodellként 3,5 µm átmérőjű unilamelláris liposzómákat készítettem Alexander Moscho és munkatársainak munkássága nyomán, fosztfatidil-kolin felhasználásával.

A sejtmodelles vizsgálatoknál célunk volt különböző formulációkat összehasonlítani, így készítettem hagyományos emulziókat Tween80 felületaktív anyaggal, illetve etanolos oldatokat is. A formulációkban az IOak

koncentrációja azonos volt, a hagyományos emulziók Tween80 tartalma megegyezett az PEK SN tartalmával, ami 1 mg/ml. A hagyományos emulziók emulgeálásánál a paraméterek a PEK előállításával teljesen egyeztek.

A vizsgálatoknál megfelelő mennyiségű unilamelláris liposzómát és mintát keverttem 24 vagy 48 órán át 37°C vagy 30°C-on, így a mérési körülmények megegyeztek a baktériumokkal, illetve gombákkal végzett mikrobiológiai vizsgálatok paramétereivel. A liposzómák kamilla és fehérröröm IO tartalmát 1, 2 és 24 vagy 1, 2, 24 és 48 óra elteltével, UV-Vis spektrofotometriás méréssel határoztam meg. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztem.

3.2.4. Mikrobiológiai vizsgálatok

A mikrobiológiai vizsgálatok során az alábbi kórokozókkal dolgoztunk: *Escherichia coli* PMC 201, *Pseudomonas aeruginosa* PMC 103, *Bacillus subtilis* SZMC 0209, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* SZMC 0119, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 38366, *Candida albicans* ATCC 1001, *Candida tropicalis* SZMC 1368, *Candida dubliniensis* SZMC 1470, *Candida krusei* SZMC0779. Meghatároztuk az IOak különböző formulációinak MIC₉₀ és MEC₁₀ értékét, továbbá mikrobiális oxidatív egyensúlyi vizsgálatokat, idő-halálzási kinetikai méréseket, a sejtek életképességének diszkriminatív vizsgálatát, illetve egyes gombafajok esetén biofilm degradációs kísérleteket végeztünk el.

3.3. *Streptococcus mutans* fogászati biofilm kezelése Pickering emulziókkal

3.3.1. Különböző illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása

A kísérletek során borsmenta (*Mentha x piperita* L.), fahéj (*Cinnamomum verum* J. Presl.), kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) és szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. és Perry) IOkal dolgoztam. A formulálás során alkalmazott illóolaj koncentráció tartomány megfelelt az ún. csőhígítási eljárás során használt koncentráció tartománynak, amellyel a különböző illóolajok minimális gátlási koncentrációját [Minimum Inhibitory Concentration=MIC] lehet meghatározni adott kórokozókra nézve. Az alkalmazott IO koncentrációk ennek megfelelően 0,05-2,00 mg/ml értékek között változtak fahéj, kakukkfű és szegfűszeg IO esetén, míg borsment IONál 0,15-3,25 mg/ml között.

A PEk stabilizálásához 20 nm méretű és 20%-ban etil funkciós csoporttal módosított SNket [20ET] használtam, melyek koncentrációja a kísérletek során állandó volt, 1 mg/ml.

Az emulgeálás két lépésben zajlott: az előemulgeálás során ultrahangos kezelés történt, majd az így kapott emulziót tovább emulgeáltam UltraTurrax segítségével. A PEkat további felhasználásig szobahőmérsékleten (25°C), fénytől védett helyen tároltam. Minden formulálást legalább háromszor ismételttem meg.

3.3.2. *Pickering emulziók vizsgálata – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás*

Az emulziók vizsgálata a 3.3.2. fejezetben leírtakkal azonos módon történt.

3.3.3. *Biofilm degradációjának in vitro vizsgálata*

A biofilm degradációs kísérletek Peeters és kollégái munkájának metodikáján alapulnak, kristályibolya festés alkalmazásával.

3.3.4. *In vitro diffúziós vizsgálatok modell biofilmen*

Az *in vitro* diffúziós vizsgálatok során a minták IO tartalma megegyezett az *in vitro* biofilm degradációs kísérletek során alkalmazott koncentráció értékekkel, azaz a MIC felével [MIC/2], melyet előzőleg csőhígítással módszerrel állapítottunk meg. A MIC/2 koncentráció értékek az alábbiak: borsmenta 0,98 mg/ml, fahéj 0,4 mg/ml, kakukkfű 0,20 mg/ml, szegfűszeg 0,51 mg/ml. A vizsgálatok során célunk volt összehasonlítani különböző formulációkat, így Tween80 felületaktív anyaggal stabilizált emulziókat és etanolos oldatokat is készítettünk.

A biofilm modellen végzett diffúziós vizsgálatokat az *in vitro* biofilm degradációs kísérleteknek megfelelő, 37°C-os hőmérsékleten, statikus, vertikális Franz diffúziós cellákban végeztem, hat párhuzamos cellát alkalmazva. A biofilm modell membrán 2,1 mm vastag 2 m/m%-os agar gél volt, melynek effektív penetrációs területe 2,54 cm², a receptor folyadék PBS puffer volt. A vizsgálat időtartama 6 óra volt, mintavétel az első fél órában, majd minden egész órában történt. A minták illóolaj tartalmát UV-Vis spektroszkópiai vizsgálattal határoztam meg.

3.4. Körömgomba helyi kezelése teafa illóolajat és tiokonazol hatóanyagot tartalmazó Pickering emulzióval

3.4.1. Teafa illóolaj gázkromatográfiás analízise

Az MA minta statikus göztéranalízise szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME) történt, majd ezt követte a gázkromatográfia és tömegspektrometria (GC-MS) analízis. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software segítségével értékeltük ki. A komponensek azonosítása során a retenciós adatokat és tömegspektrumokat a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést a csúcs alatti terület normalizációjával végeztük el.

3.4.2. Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban

Miután elvégeztük az MA gázkromatográfiás analízisét, és megállapítottuk melyek a főkomponensei, elvégeztük a tiokonazol Hansen-féle oldhatósági paramétereinek számítását, melyhez az 5.0.11 Hansen Solubility Parameters in Practice (HSPiP) szoftvert használtuk. Az angol betűszóból származó, ún. SMILES azonosítóját használtuk fel a főkomponenseknek és a tiokonazolnak [SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification, azaz egyszerűsített, begépelhető molekula-leíró rendszer], melyeket a PubChem weboldal adatbázisából vettünk.

A TIO kinetikai oldhatóságát vízzel telített MAban, oldószer addíciós módszerrel határoztam meg. A három párhuzamos kísérlet szobahőmérsékleten (25°C) végeztem el. A szuszpenzió állapotát, illetve a szuszpenzió-valódi oldat közötti átmenetet DLS méréssel és vizuális megfigyeléssel vizsgáltam. DLS mérés esetén manuális korrelációt alkalmaztam, amellyel a mérési paraméterek állandó értéken tarthatók, így a szuszpenzió-valódi oldat közötti átmenet egyértelműen megfigyelhető.

3.4.3. Teafa illóolaj és tiokonazol tartalmú Pickering emulziók formulálása

Első lépésben tiszta MAval dolgoztam, a PEK formulálásához különböző méretű, továbbá különböző funkciós csoporttal és változó felületi borítottságban módosított SNket használtam fel. Arra vonatkozóan is végeztem kísérleteket, hogy miként befolyásolja a SN koncentráció, illetve az emulgeálási energia változtatása a PEK cseppméretét és stabilitását. Minden kísérletet legalább háromszor ismételtam meg.

MA és TIO 20 m/m% olajos fázis esetén is a PEK stabilizálásához három különböző, 20, 50 és 100 nm méretű, 20%-ban etil funkciós csoporttal

módosított SNket használtam fel [20ET, 50ET, 100ET], mivel előkísérleteim során ezek bizonyultak megfelelő stabilizáló ágensnek. A SNk koncentrációja a kísérletek során állandó volt, 1 mg/ml. Az olajos fázisok koncentrációját 0,9-17,9 mg/ml érték között változtattam.

Az emulgeálás két lépésben zajlott: az előemulgeálás során ultrahangos kezelés történt, majd az így kapott emulziót tovább emulgeáltam UltraTurrax segítségével. A PEkat további felhasználásig szobahőmérsékleten (25°C), fénytől védett helyen tároltam. Minden formulálást legalább háromszor ismételtam meg.

3.4.4. Pickering emulziók tulajdonságainak meghatározása – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás

Az emulziók vizsgálata a 3.3.2. fejezetben leírtakkal azonos módon történt, az alábbi kiegészítésekkel.

Mivel a PEk stabilitását számos tényező befolyásolhatja, többek között az olajos fázis fizikai kémiai paramétereinek változása, ezért meghatároztam, miként változik a MA dinamikus viszkozitása, ha 20 m/m% mennyiségben TIOt tartalmaz. A méréseket Ostwald-Fenske kapilláris viszkoziméterrel végeztem el, 25°C hőmérsékleten, három párhuzamos vizsgálattal.

3.4.5. Pickering emulziók in vitro diffúziós vizsgálata körömmódellem

Az *in vitro* diffúziós vizsgálatoknál célunk volt különböző formulációkat összehasonlítani, így készítettem Tween80 felületaktív anyaggal stabilizált emulziókat, illetve etanos oldatokat is. A formulációkban az olajos fázis koncentrációja azonos volt, a hagyományos emulziók Tween80 koncentrációja megegyezett az PEK SN koncentrációjával, ami 1 mg/ml volt.

Az *in vitro* vizsgálatokhoz 2,1 mm vastag, 6 m/m% agar gélt használtam, illetve az agar gélt kombináltam 0,8 mm vastag cellulóz-acetát membránnal. Mindkét membrán effektív penetrációs területe 2,54 cm² volt. Az agar gélt minden egyes vizsgálat előtt frissen készítettem el.

A diffúziós vizsgálatokat statikus, vertikális Franz cellában végeztem 32°C-on, melyek effektív penetrációs területe 2,54 cm², a receptor folyadék PBS puffer volt. A mérés időtartama 2 óra volt, mintavételezés az 5, 10, 15, 30, 60, 90 és 120 percben történt. Minden minta diffúzióját hat párhuzamos méréssel vizsgáltam.

A minták TIO tartalmát HPLC mérésekkel állapítottuk meg, a metodika Bagary és kollégáinak munkáján alapul.

3.4.6. Mikrobiológiai vizsgálatok *Trichophyton rubrum* és *Candida albicans* gombafajokon

A körömgombás megbetegedésekért leginkább felelős két gombafajjal dolgoztunk: *Trichophyton rubrum* (T. rubrum) DSM 21146 és *Candida albicans* (C. albicans).

Kísérleteink során már korábban leírt metodikákat követtünk a *T. rubrum* és *C. albicans* gombák preparálásához. A *T. rubrum* gomba spórák populációját $0,5 \cdot 10^6$ spóra/ml értékre állítottunk be, *C. albicans* esetén $1 \cdot 10^6$ sejt/ml értékre, melyek pontos meghatározása Bürker sejtszámláló kamrával, illetve turbidimetriás méréssel történt 520 nm hullámhosszon.

Az antifungális aktivitás megállapításához a *T. rubrum* és *C. albicans* minimális gátlási koncentráció értékének [Minimal Inhibitory Concentration=MIC] és minimális fungicid koncentráció értékének [Minimal Fungicid Concentration=MFC] meghatározását végeztük el. A TIO és MA etanolos oldatán kívül különböző SNkel stabilizált PEkat és hagyományos emulziókat egyaránt teszteltünk a 0,5-300 µg/ml koncentráció tartományban. Minden kísérletet hatszor ismételtünk meg. Az MFC értékben azt a legalacsonyabb hatóanyag koncentrációt tekintettük, ahol már nem tapasztaltunk gomba növekedést ($\geq 99,9\%$ növekedés gátlás).

A mikrobiológiai vizsgálatokhoz a statisztikai kiértékelést OriginPro7® szoftverrel végeztük el, független mintás varianciaanalízist (ún. egyutas ANOVA) alkalmazva, a szignifikancia szint $p \leq 0,05$ érték volt.

4. Eredmények és következtetések

4.1. Szilika nanorészecskék méretpontos szintézise, felületmódosítása és vizsgálata

Elsőként vizsgáltam azt, hogyan hat az ammónia, mint katalizátor koncentrációjának változtatása a kialakult SNk tulajdonságaira. A reakciókat állandó hőmérsékleten végeztem el, 25°C-on, a víz koncentrációja állandó volt (5 mol/dm^3). A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy $0,019 \text{ mol/dm}^3$ ammónia koncentráció alatt nem alakulnak ki részecskék, ezért a továbbiakban a $0,291\text{-}0,097 \text{ mol/dm}^3$ koncentráció tartományban vizsgáldtunk, ahol a méretek 190,8-27,05 nm között alakultak. Ebben a tartományban a szintézis nagy kitermeléssel végezhető el ($\geq 80 \%$), a SNk részecskeméret eloszlása monodiszperz, amelyet a TEM felvételek is megerősítettek, illetve mindegyik szabályos gömb alakú.

A hőmérséklet hatásának vizsgálatakor a 25-50°C közötti tartományban végeztem el a reakciókat. Az eredmények alapján elmondható, hogy növelve a reakció hőmérsékletét a SNk mérete csökken, melynek mértéke változó az egyes ammónia koncentrációk esetén. 0,291 mol/dm³ értéknél a részecskeméret 190,8-69,3 nm között változik; alacsonyabb koncentrációnál, azaz 0,194 mol/dm³ értéknél a részecskeméret 99,1-30,2 nm között; illetve a legalacsonyabb koncentrációnál, 0,097 mol/dm³, az értékek 27,1-61 nm között változnak. Minden kísérletet legalább háromszor ismételt meg, és a szórás értékek alapján úgy találtuk, hogy a reakciók reprodukálhatósága kiváló, továbbá a részecskék monodiszperz méreteloszlásúak (PDI_{DLS}: 0,002-0,091). Utóbbit alátámasztják a TEM felvételek is, melyek alapján megállapítható, hogy a hőmérséklet nem befolyásolja az alakjukat, minden esetben szabályos gömb alakú részecskék állíthatók elő. Az eredményeket tanulmányozva lineáris összefüggést találtunk a SNk mérete és a reakció hőmérséklete között, melyet méretpontos kísérlettervezésre használtunk fel.

A víz koncentrációjának változtatása esetén a kísérletekben a reakciókat állandó hőmérsékleten, 25°C-on végeztem el, a víz koncentrációját pedig 2-5 mol/dm³ érték között változtattam. Az eredmények azt mutatják, hogy a víz koncentrációjának csökkenésével a SNk mérete csökken. Hasonlóan a reakció hőmérsékletével kapcsolatos kísérletek esetén, itt is megfigyelhető, hogy a részecskeméret csökkenésének mértéke változik, ha az ammónia koncentrációja változik. 0,291 mol/dm³ ammónia koncentráció esetén a SNk mérete 190,80-52,18 nm között alakul az 5-2 mol/dm³ víz koncentráció tartományban; 0,194 mol/dm³ koncentráció esetén a méretek 99,0-27,81 nm között változnak; míg 0,097 mol/dm³ koncentrációnál a változás 27,10-6,92 nm között figyelhető meg. A SNk polidiszperzitási indexe itt már jóval nagyobb értékek között változik, mint a korábbi kísérletek esetén, amely akár 0,250 is lehet. A TEM felvételek is igazolják, hogy a kevesebb, mint 3 mol/dm³ vízzel szintetizált SNk nagyon polidiszperz méreteloszlásúak, illetve szabálytalan alakúak. Ebben az esetben is megfigyeltünk lineáris összefüggést a SNk mérete és a reakció során alkalmazott víz koncentrációja között, azonban az adatokat nem használtuk fel méretpontos kísérlettervezésre a jelentős alakváltozás miatt. A lineáris regressziós egyenesek segítségével három különböző hőmérséklet értékre (32, 43 és 48°C) számoltuk ki a részecskeméretet, majd a SN szintéziseket el is végeztük ezen paraméterekkel. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a számolt és kísérleti eredmények jó egyezést mutatnak. Ezt követően statisztikai elemzést végeztünk, célunk volt, hogy megadjuk, milyen megbízhatósággal végezhető el a méretpontos SN szintézis. Összességében

elmondható, hogy a hőmérséklet pontos szabályozása lehetővé teszi kívánt részecskeméretű SNk előállítását. A különböző ammónia koncentráció értékek esetén más-más részecskeméret intervallumban tervezhetünk. 0,291 mol/dm³ ammónia koncentráció értéknél 65 és 200 nm között tervezhető a méret, 0,194 mol/dm³ értéknél 30 és 100 nm között, míg 0,097 mol/dm³ koncentrációnál 30 nm alatti SNk szintetizálhatók, ahol a méretek egészen finomhangolása lehetséges 6,1-22,5 nm mérettartományban.

Mivel a SNket PEK stabilizáló ágensének szánjuk, ezért szükség volt a felületük módosítására, hogy a kezdetben csak –OH funkciós csoportokat tartalmazó, ezáltal rendkívül hidrophil SNk felületi tulajdonságait, azaz hidrophil-lipofil jellegét változtatni tudjuk. Mivel az SNket különböző IOkat tartalmazó PEK stabilizálásához szeretnénk a továbbiakban felhasználni, ezért különböző funkciós csoportokkal (metil-, etil-, propil- és fenil-) és különböző mértékben borított (10-50%) részecskét állítottunk elő.

Az eredmények alapján a SNk részecskemérete és polidiszperzitási indexe nem változott jelentősen a felületmódosítás hatására. A DLS mérések alátámasztására, illetve a módosított SNk morfológiájának vizsgálatára TEM felvételeket is készítettünk, melyeken jól látszik, hogy a részecskék valóban megőrizték méretüket és diszperzitás fokukat, illetve szabályos gömb alakjukat.

A SNk felület módosításának sikerességét infravörös spektroszkópia mérésekkel igazoltuk. A felületmódosítás nélküli, azaz hidrophil SN infravörös spektrumán egyértelműen beazonosítható a sziloxán láncokra jellemző összes vegyértékrezgés. A felületmódosítás hatására a spektrumon megjelennek az alifás –CH₃, illetve –CH₂ csoportokra jellemző aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgések, melyek intenzitása nő a funkciós csoportok szénatomszámának növekedésével. A felületmódosítást igazolja továbbá, hogy a Si-O-Si aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgések estén a csúcsok intenzitása csökken a hidrophil SN értékeihez viszonyítva, illetve csökkenő tendencia figyelhető meg a felületet borító funkciós csoportok szénatomszámának növekedésével.

4.2. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz

A kamilla és fehérüröm IOak formulálása esetén PEK cseppméretei 160-1450 nm között alakultak, szórás értékei pedig 1,2-11,4% között. Stabilitásuk megfelelő volt, amely az IO koncentrációjának függvényében változott, továbbá legalább 3 hónapig megőrizték cseppméretüket.

Az emulziók típusát vezetőképesség méréssel határoztam meg. A vezetőképesség értékek a különböző SN vizes szuszpenziókra az alábbiak: 20PR 223,5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ és 50PR 193,2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A tiszta kamilla és fehérüröm IOak vezetőképesség értékei 0,018 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ és 0,056 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A PEk esetén mért értékek 162,0-212,0 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ között alakultak, melyek egyértelműen arra utalnak, hogy mindegyik PE o/v típusú emulzió.

4.2.2. *Pickering emulziók és sejtmembránok közötti kölcsönhatás vizsgálata sejtmódellem*

Ebben a kísérletben célunk volt megvizsgálni, hogy a kamilla és fehérüröm IO különböző formulációi esetén milyen az intracelluláris hatóanyag leadás, mely esetünkben IO leadást jelent.

Kamilla IO vizsgálatánál 24 órás kísérleteket végeztem 37°C-on, amely megegyezik a baktériumokkal végzett kísérletek körülményeivel. Az első mintavétel 1 órát követően történt, itt a PEből 27,2% IO penetrált keresztül a sejtmembránon, míg a hagyományos emulzióból és az oldatos mintákból nem penetrált detektálható IO mennyiség. A következő mintavétel 2 óra után történt, ahol a PEből már 48,3% IO leadást mértünk, hagyományos emulzió esetén ez az érték csupán 0,5% volt, míg az etanos oldatnál továbbra sem volt mérhető mennyiség. Az utolsó, 24 órát követő mintavétel során a PEből 82,2% IO távozott, a hagyományos emulzióból 66,8%, az etanos oldatból pedig 32,5%. Fehérüröm IO estén két különböző vizsgálatot végeztünk a formulációk és unilamelláris liposzómák között; az egyik esetben 24 órán át történt a kísérlet 37°C-on, a másik esetben 48 órán át, 30°C-on. Előbbi a különböző baktériumokkal történő kölcsönhatást, utóbbi a sejtes gombákkal történő kölcsönhatást modellezi. Mindegyik reakciókörülmény között PEk esetén mértem a legnagyobb értékeket, a fehérüröm IO koncentráció az unilamelláris liposzómák belső, vizes fázisában 29,8% volt 48 órát követően 30°C-on, és 59,2% 24 óra után 37°C-on. A hagyományos emulziós formáknál ezek az értékek 25,0% és 27,3%-nak adódtak, míg a legkisebb értékeket az etanos oldatoknál mértem.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy kamilla és fehérüröm IO esetén egyaránt a PEk bizonyultak a leghatásosabbnak a különböző formulációk közül, amelyekből már rövid idő után jelentős mértékű az IO penetrációja a sejtmembránon keresztül.

A kamilla és fehérüröm IOak felhasználásával készült PEk, HEk és oldatos formulációk mikrobiológiai eredményei egy másik PhD disszertáció alapját képezik, ezért ezekről részletes információk a releváns közleményeinkben

olvashatók. Összességében elmondható, hogy a PEK kiemelkedő antifungális és antibakteriális hatással rendelkeznek a hagyományos emulzióhoz vagy etanolos oldathoz képest. Mivel a mikrobiológiai vizsgálatok eredményei jó egyezést mutatnak a sejtmodellel végzett kísérletekkel, ezért feltételezhetjük, hogy a PEK nagyobb hatékonysága a sejtmembránon keresztül történő effektívebb penetrációnak köszönhető.

4.3. *Streptococcus mutans* fogászati biofilm kezelése Pickering emulziókkal

4.3.1. *Különböző illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása és vizsgálata*

A különböző IOakból készült PEK vizsgálatainak eredményei azt mutatják, hogy az emulziók cseppmérete nő az olajos fázis koncentrációjának növelésével, PEK és hagyományos emulziók esetén egyaránt. A PEK stabilitása egyértelműen jobb, mint a hagyományos emulzióké, a kakukkfű és borsmenta IOból készült PEK mutatkoztak a legstabilabbnak, amelyek cseppmérete és külleme több mint 4 hónapig nem változott, míg ugyanezen olajokból készült hagyományos emulziók stabilitása csupán 4 illetve 2 hét volt. A PEK cseppmérete borsmenta IO esetén 295-1445 nm, fahéj IO esetén 196-3100 nm, kakukkfű IO-nál 155-1680 nm, szegfűszeg IO esetén pedig 180-4300 nm között alakult, a cseppméretek szórás értékei 1,8-8,3% között alakultak.

Az emulziók típusát vezetőképességgel határoztam meg. A 20ET SNK vezetőképessége $215,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, a hagyományos emulzió stabilizáló ágensének, azaz a Tween80 vizes oldatának vezetőképessége $199,8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A különböző IOak vezetőképessége: borsmenta $0,071 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, fahéj $0,043 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, kakukkfű $0,065 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, szegfűszeg $0,048 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A PEK vezetőképességének értékei összességében $110,5-269,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ érték között alakultak, amely egyértelműen arra utal, hogy mindegyik PE o/v típusú emulzió.

4.3.2. *Biofilm degradációjának in vitro vizsgálata*

A biofilm degradációjával kapcsolatos mikrobiológiai vizsgálatok eredményei egy másik PhD disszertáció alapját képezik, ezért ezekről részletes információk a releváns közleményünkben olvashatók. Összességében elmondható, hogy a fahéj IO PE formájával sikerült a legjobb eredményeket elérni, ebben az esetben a *Streptococcus mutans* okozta biofilm degradáció 85,9%-os volt.

4.3.3. *In vitro* diffúziós vizsgálat biofilm modell membránon

A biofilm modell membránon végzett diffúziós kísérletek célja az volt, hogy összefüggést találjunk az *in vitro* biofilm degradációs kísérletek eredményei és a különböző IO formulációk diffúziós viselkedése között. Mivel a PEK és hagyományos emulziók cseppmérete az egyes IOaknál közel egyezett, ezért feltételezhető, hogy eltérő diffúziós viselkedésüket az eltérő kolloidkémiai tulajdonságaik okozzák. A biofilm modell membránon átdiffundált illóolaj mennyiséget kumulatív IO mennyiségben fejeztem ki [KM, %].

Általánosságban elmondható, hogy minden IO esetén a PE formából történik legnagyobb mennyiségben a diffúzió, majd ezt követi hagyományos emulziós forma és az etanolos oldat. Annak ellenére, hogy a kakukkfű IO MIC értéke a legkisebb, ami a legjobb antibakteriális hatásra utalna, a biofilm degradációs készsége alacsony, ami jó egyezést mutat a diffúziós tulajdonságával. Ebben az esetben ugyanis etanolos oldat esetén a biofilm modell membránon átdiffundált KM mennyisége nem is mérhető (<LOD), illetve hagyományos emulzió és PE esetén is alacsonyak az értékek, 9,4 és 18,9%. A legnagyobb KM értékek borsmenta IO esetén adódtak, mely PE formánál, több mint 80% volt. Fahéj IO esetében a KM érték 51,4%, bár a borsmenta PE KM értéke jóval magasabb, mégis utóbbival érhető el a leghatékonyabb biofilm degradáció. A jelenséget magyarázhatja, hogy fahéj IO MIC értéke alacsonyabb, mint a borsmenta olajáé.

Összességében elmondható, hogy az *in vitro* biofilm degradációs és *in vitro* diffúziós vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a megfelelő hidrophil/lipofil karakterrel rendelkező részecskékkel történő PE stabilizálás hozzájárulhat a megfelelő mennyiségű IO célba juttatásához.

4.4. ***Körömgomba helyi kezelése teafa illóolajat és tiokonazol tartalmazó Pickering emulziókkal***

4.4.1. *Teafa illóolaj gázkromatográfiás analízisének eredménye*

Az MA komponensek azonosítása standard vegyületek retenciós idejének összevetésével és pontosan ismert összetételű MA elemzésének összehasonlításával történt. Két főkomponenst azonosítottunk be, melyek a p-cimén 35,2%-ban, illetve a terpinén-4-ol 32,5%-ban.

4.4.2. *Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban*

A Hansen-féle oldhatósági paraméterek számítása alapján egyértelműen kijelenthettük, hogy a TIOt megfelelő mennyiségben lehet MAban oldani. Ezt

alátámasztja a kinetikai oldhatóság meghatározásának eredménye is, amely szerint a TIO maximális oldhatósága 0,213 mg/ml érték volt, ami 23,8 m/m% koncentrációnak felel meg. Ennek alapján a PEk formulálása során kicsivel a maximális oldhatósági érték alatt maradva, 20 m/m% koncentrációban dolgoztunk.

4.4.3. Teafaolaj és tiokonazol tartalmú Pickering emulziók formulálása és vizsgálata

Munkám során megvizsgáltam, miként hat a PEk cseppméretére és stabilitására az olajos fázis koncentrációjának, a stabilizáló részecskék méretének, felületi módosításának és borítottságának, illetve koncentrációjának a változtatása.

Binks és Horozov kutatásaik során kimutatták, hogy a PEk cseppméretét befolyásolni lehet a stabilizáló részecskék méretének változtatásával, ha a többi paramétert, többek között az olajos és vizes fázis arányát állandó értéken tartjuk. Az általuk leírt jelenség a mi kísérleti eredményeinkben is megfigyelhető, mind a MA és TIO MA olajos fázis felhasználásával készült PEk esetén is. Ugyanazon olajos fázis koncentráció esetén a cseppméret növekszik, ha a PEkat stabilizáló SNk mérete nő, mely tendencia az általunk vizsgált teljes koncentráció tartományban érvényes. A különböző méretű SNk alkalmazása nem csak a cseppméretre, hanem a stabilitásra is hatással van. Eredményeink alapján megfigyelhető, hogy a kisebb részecskeméret esetén stabilabb emulziót kapunk, ugyanazon olajos fázis koncentráció értéknél.

Ha összehasonlítjuk a MA felhasználásával készült PEk tulajdonságait a TIO MA olajos fázissal készült PEkéval, láthatjuk, hogy a cseppméret-stabilizáló SN méret és cseppméret-olajos fázis koncentráció összefüggések a fent leírt tendenciát mutatják. Ugyanazon olajos fázis koncentrációnál végezve az eredmények összehasonlítását megfigyelhetjük, hogy a cseppméret szignifikánsan nem változik, azonban a stabilitás jelentősen csökken.

Valószínűleg azért nincs jelentős változás a PEk cseppméretében, amikor MA helyett TIO MA oldatot használjuk, mert a főbb paraméterek, azaz az emulgeálás körülményei, a stabilizáláshoz használt SNk mérete és felületi borítottsága, az olajos és vizes fázis koncentrációjának az aránya nem változik, illetve az olajos fázis viszkozitás értéke és sűrűsége is közel állandó marad, a TIO oldását követően is.

Tovább vizsgálva a cseppméretet megállapítottuk, hogy a 20ET PEk esetén lineáris összefüggés van a cseppméret és az olajos fázis koncentrációja között. MA olajos fázis esetén 0,9-7,16 mg/ml, míg MA TIO olajos fázis esetén 0,9-5,37 mg/ml koncentráció tartományban figyelhető meg a linearitás. A lineáris

összefüggéseket felhasználva kiszámoltuk a tervezett cseppmérethez tartozó olajos fázis koncentrációját, majd elkészítettük az emulziókat. A 20 nm méretű részecskék alkalmazásával a PEK cseppmérete jól tervezhető, amely hozzájárulhat célzott HA leadású PEK készítéséhez.

A PEK típusát vezetőképesség méréssel határoztam meg. A vezetőképesség értékek a különböző SN vizes szuszpenziókra az alábbiak: 215,0, 211,4, és 268,3 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 20ET, 50ET és 100ET részecskék esetén. Az MA vezetőképessége 0,058 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, míg az MA TIO oldatáé 0,063 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ értéknek adódott. A PEK vezetőképességének értékei összességében 139,9-263,9 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ között alakultak, amely egyértelműen arra utal, hogy mindegyik PE o/v típusú emulzió.

4.4.4. *In vitro* diffúziós vizsgálatok körömmodellen

A vizsgálatok során célunk volt a különböző formulációk diffúziós tulajdonságainak összehasonlítása, ezért a PEkon kívül hagyományos emulziókat és etanolos oldatot is készítettem. A PEkat stabilizáló részecskék eltérő méretéből adódóan más-más cseppmérettel rendelkeztek, az alábbiak szerint: PE 20ET $D_{\text{csepp}}=1850$ nm, a PE 50ET $D_{\text{csepp}}=2380$ nm, PE 100ET $D_{\text{csepp}}=3090$ nm. A hagyományos emulziók cseppmérete 2470 nm volt, amely összevethető a PEkéval, így feltételezhetjük, hogy az eltérő diffúziós viselkedésük a különböző kolloid rendszerek tulajdonságaiból adódik. A formulációkban az olajos fázis koncentrációja azonos volt, 17,91 mg/ml, ami 3,58 mg/ml TIO hatóanyagot jelent.

A kísérleti eredmények PEK esetén sokkal hatékonyabb TIO diffúziót mutattak az agar membránon keresztül (PE 20ET KM=89,88%), mint a hagyományos emulzió (KM=35,02%) vagy etanolos oldat esetén (KM=18,33%). Továbbá megfigyelhető, hogy minél kisebb a PE cseppmérete, annál több HA képes átdiffundálni az agar membránon; 1850 nm esetén a KM 89,88%, míg 3090 nm cseppméretnél csak 45,22%.

A kompozit membránon történő vizsgálódás esetén megállapítottuk, hogy az oldatos mintából gyakorlatilag a teljes TIO mennyiség keresztüljut a membránon, és csak nagyon kis mennyiség marad a célterületen, azaz a modell körömágybőr felületén (2,4%). A PE 20ET minta esetén ez az érték jóval kedvezőbb: agar gélen a TIO 89,88%-a jutott keresztül, a kompozit membránon pedig csupán 5,7%, így a többi TIO tartalom, azaz 84,18% a célterületen maradt. Ez a mennyiség PE 50ET esetén 61,1%, míg PE 100ET esetén 45,13%. Az eredmények alapján tehát kijelenthetjük, hogy PEK alkalmazásával elérhető a célul kitűzött, célzott HA leadás.

4.4.5. *T. rubrum* és *C. albicans* gombafajokon végzett mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

A *T. rubrum* és *C. albicans* gombafajokra meghatároztuk az MIC és MFC értékeket. Az etanolos oldat formájában történő vizsgálatok alapján egyértelműen látszik, hogy mind a *T. rubrum* mind a *C. albicans* esetén a kombinációban alkalmazott MA és TIO MFC és MIC értékek is jelentősen csökkentek, a külön-külön alkalmazott MA és TIO értékekhez képest. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy valóban fellép szinergista hatás az IO és az azol származék között.

A különböző formulációk összehasonlításakor láthatjuk, hogy a PEk jóval hatékonyabbak a két gombafaj ellen, mint a TIO MA hagyományos emulzió vagy etanolos oldat formája. A 100ET PE mutatja a legnagyobb hatékonyságot a gombák ellen, MIC és MFC értéke *T. rubrum* és *C. albicans* esetén is a legalacsonyabb.

5. Összefoglalás és új megfigyelések

Munkánk során célunk volt SNk méretpontos, reprodukálható szintézisének megvalósítása, majd ezt követően a nanorészecskék megfelelő mértékű felületi módosítása. Stöber reakcióban, TEOS prekursorból állítottunk elő SNket különböző reakciókörülmények között, majd kerestük a reakciók paraméterei és a nanorészecskék tulajdonságai közötti összefüggéseket. Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy sikerült megvalósítani 6-191 nm közötti nanorészecskék szintézisét, melyek mérete az ammónia koncentrációjának, a hőmérsékletnek és a víz koncentrációjának változtatásával befolyásolható. Kísérleteink bebizonyították, hogy az általunk vizsgált körülmények között, lineáris összefüggés áll fenn az ammónia koncentráció és részecskeméret, a reakció hőmérséklete és részecskeméret, illetve a víz koncentrációja és részecskeméret között. A lineáris összefüggés segítségével pontosan megtervezhető, hogy adott méretű szilika előállításához milyen reakció körülményeket kell alkalmaznunk. A méret szabályozásához elsősorban az ammónia koncentráció és/vagy a hőmérséklet változtatását javasoljuk, mivel ebben az esetben kaptunk szabályos gömb alakú és monodiszperz részecskeméret eloszlású SNket.

A SNk hidrophil-lipofil jellegének változtatásához elvégeztük a felületi módosításukat. A felület módosításának mértékét geometriai megközelítéssel számítottuk ki, majd ez alapján terveztük meg a kísérleteket. A reakciókban különböző funkció csoportokat tartalmazó szilanol származékokat

használtunk fel, úgymint metil-,etil-, propil- és fenil-trietoxi-szilánt. A sikeres felületmódosítást infravörös spektroszkópiai vizsgálatokkal igazoltuk, továbbá megállapítottuk, hogy a módosítás hatására a részecskék mérete, alakja és polidiszperzitása nem változik.

A szilika nanorészecskéket PEk stabilizálásra használtuk fel, célunk volt az alkalmazásnak megfelelő cseppméretű és stabilitású emulziók előállítása. Elsőként kamilla és fehérüröm IOak formulálását végeztük el, mikrobiológiai vizsgálatokhoz. Munkám során legalább 3 hónapig stabil, o/v típusú PEkat állítottam elő, melyek cseppmérete 160-1415 nm között alakult. A formuláláshoz 20 nm méretű SNket használtam fel. Kamilla IO esetén 50%-ban, míg fehérüröm IO esetén 20%-ban propil funkciós csoportokkal felületmódosított SNk bizonyultak megfelelő stabilizáló ágensnek a 0,1-3,5 mg/ml illóolaj koncentráció tartományban. Mindkét IO esetén a PE forma jóval hatékonyabbnak bizonyult az oldatos- és hagyományos emulziós formával szemben, különböző Gram negatív és Gram pozitív baktériumok, illetve gombák kezelésénél egyaránt.

A különböző formulációk és a sejtmodell közötti kölcsönhatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy a PE formából nagyságrenddel nagyobb a sejtmembránon keresztül történő penetráció, mint oldatos- vagy hagyományos emulziós forma esetén. Amennyiben feltételezzük, hogy a PE cseppek abszorbeálódnak a sejtmembránra, az azon keresztül történő nagyfokú penetrációt két jelenség okozhatja. Az IOak passzív diffúzióval jutnak át a sejtmembránon, amelyet az adszorpció miatt, helyileg kialakuló nagy koncentráció gradiens okoz; vagy a PE cseppek endocitózissal közvetlenül a sejtbe jutnak. A pontos mechanizmus jelenleg tisztázására vár. A mikrobiológiai vizsgálatok során megfigyeltük, hogy míg a SNk inerte, önmagukban nem váltanak ki sem antibakteriális, sem antifungális hatást, addig az etanol, mint oldószer, illetve a Tween80 felületaktív anyag önmagában is rendelkezik antimikrobás hatással. A PEk hatékonyabb sejtmembránon keresztül történő penetrációja, és a SNk inert tulajdonsága mind azt igazolja, hogy a PE megfelelő lehet IO formulálásra és mikrobiológiai vizsgálatára.

Munkánk során, melyben a *Streptococcus mutans* fogászati biofilm helyi kezelését tűztük ki célul, sikerült kívánt cseppméretű és stabilitású, o/v típusú PEkat előállítanunk, borsmenta, fahéj, kakukkfű és szegfűszeg IOból egyaránt. Stabilizáló ágensként a 20 nm méretű, 20%-ban etil funkciós csoportokkal

módosított SNk bizonyultak megfelelőnek. A PEK cseppmérete 210-370 nm között alakult, amelyek méretüknél fogva alkalmasak lehetnek a biofilm kisebb pórusaiba, így mélyebb rétegeibe történő célzott IO szállítására. Az elkészített emulziók minden esetben legalább 1 hétig stabilak voltak, bizonyos esetekben a stabilitás a 4 hónapos időtartamot is elérte.

A mikrobiológiai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az IOak PE formájával jóval hatékonyabb biofilm degradáció érhető el, mint az oldatokkal vagy hagyományos emulziókkal. Feltételezhetően a különbség a formulációk eltérő diffúziós tulajdonságainak köszönhető. Ezt alátámasztandó, elvégeztük mindegyik IO különböző formulációjának *in vitro* diffúziós vizsgálatát modell biofilm membránon. A diffúziós vizsgálatok eredményei összhangban voltak a mikrobiológiai vizsgálatokkal. A legnagyobb IO mennyiség a Pickering emulziókból diffundált át a membránon, minden IO esetén, majd ezt követte a hagyományos emulzió és az oldatos forma. A kakukkfű IO rendelkezik a legjobb antimikrobás hatással, mivel MIC értéke ennek a legalacsonyabb. Ennek ellenére alacsony biofilm degradációs aktivitást mutat, ami a diffúziós vizsgálatok eredményével magyarázható, mivel PE esetén is kevesebb, mint 19% kakukkfű IO diffundált át a modell biofilm membránon. A leghatékonyabb biofilm degradáció a fahéj IO PEval érhető el, mely esetben 85,9%-os a degradáció, és a diffúziós vizsgálat során mért kumulatív IO mennyiség 51,4% volt. Összességében megállapíthatjuk, hogy a SNkkel stabilizált, o/v típusú PEK hatékonyabb gyógyszerformának bizonyulnak a *S. mutans* fogászati biofilm helyi kezelésére.

A körömgombás megbetegedések helyi kezelésére szánt PEK előállítására és vizsgálatára során az alábbi eredményeket kaptuk. A két lipofil hatóanyag, a TIO és a MA formulálása elvégezhető egy azon gyógyszerkészítményben. A Hansen oldhatósági paraméter számításával, majd a kinetikai oldhatóság vizsgálatával megállapítottuk, hogy a TIO nagy mennyiségben (>20 m/m%) oldható a MAban, így oldatuk felhasználható a PEK olajos fázisaként. Mikrobiológiai kísérleteket végeztünk *Trichophyton rubrum* és *Candida albicans* gombafajok esetén, melyek igazolták a kezdeti feltevésünket, miszerint a TIO és MA között szinergista hatás lép fel. Ezt a MIC és MFC értékek meghatározásával erősítettük meg.

A PEK előállítása során azonos felületi módosítású (20% etil), azonban három különböző méretű SNvel dolgoztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a PEK-at stabilizáló SNk mérete befolyásolja a cseppméretet és a stabilitást is: kisebb részecskeméretű SNt alkalmazva kisebb cseppméret és nagyobb

stabilitás érhető el. Amennyiben 20 nm méretű SNt használunk, a PEK cseppmérete lineárisan változtatható az olajos fázis koncentrációjának függvényében. Munkánk során a célzott HA leadást tűztük ki célul, melyben a nagy molekulatömegű, lipofil tulajdonságú TIO átjut a körömlemezen, és a fertőzés helyén, azaz a körömágybőrön marad. Ehhez *in vitro* diffúziós vizsgálatokat végeztünk el, modellezve a körömlemezt és a körömágybőrt. A diffúziós vizsgálatok eredményei egyértelműen bizonyították, hogy a PE forma alkalmazásával elérhető a célzott HA leadás, szemben a TIO oldatos- vagy hagyományos emulziós formájával. Továbbá a leadott HA mennyisége, az emulziót stabilizáló részecskék méretének, így a cseppméretnek a változtatásával befolyásolható. Az eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy a PEK alkalmazása ígéretes lehet körömgombás megbetegedések célzott, helyi kezelésére.

6. Publikációk

6.1. A doktori értekezés alapját képező publikációk

Barbara Horváth, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi: Preparation and *in vitro* diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour and Fragrance Journal* **2018**, 33, 385–396.

IF: 1.970 DOI: 10.1002/ffj.3463

Barbara Horváth*, Viktória L. Balázs*, Adorján Varga, Andrea Böszörményi, Béla Kocsis, Györgyi Horváth, Aleksandar Széchenyi: Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Scientific Reports* **2019**, 9, 16611.

*Osztott első szerzők. **IF: 4.525** DOI: 10.1038/s41598-019-52998-6

Sourav Das*, Barbara Horváth*, Silvija Šafranko, Stela Jokić, Aleksandar Széchenyi, Tamás Kőszegi: Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules* **2019**, 24, 4321.

*Osztott első szerzők. **IF: 3,060** DOI: 10.3390/molecules24234321

Sourav Das*, Barbara Vörös-Horváth*, Tímea Bencsik, Giuseppe Micalizzi, Luigi Mondello, Györgyi Horváth, Tamás Kőszegi, Aleksandar Széchenyi: Antimicrobial Activity of Different Artemisia Essential Oil Formulations. *Molecules* **2020**, 25, 2390.

*Osztott első szerzők. **IF: 3,060** DOI: 10.3390/molecules25102390

Barbara Vörös-Horváth, Sourav Das, Ala' Salem, Sándor Nagy, Andrea Böszörményi, Tamás Kőszegi, Szilárd Pál#, Aleksandar Széchenyi#. Formulation of Tioconazole and Melaleuca alternifolia Essential Oil Pickering Emulsions for Onychomycosis Topical Treatment. *Molecules* **2020**, 25(23), 5544.

#Osztott felelős szerzők. **IF: 3,267** DOI: 10.3390/molecules25235544

Σ**IF: 15,882**

6.2. Egyéb, a doktori értekezéshez fel nem használt publikációk

Viktória Lilla Balázs, Barbara Horváth, Erika Kerekes, Kamilla Ács, Béla Kocsis, Adorján Varga, Andrea Böszörményi, Dávid U. Nagy, Judit Krisch, Aleksandar Széchenyi, Györgyi Horváth: Anti-Haemophilus Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition. *Molecules* **2019**, 24, 3301. **IF: 3,060** DOI: 10.3390/molecules24183301

Salem A., Hagymási A., Vörös-Horváth B., Šafarik T., Balić T., Szabó P., Gősi F., Nagy S., Pál S., Kunsági-Máté S., Széchenyi A. Solvent dependent 4-aminosalicylic acid-sulfamethazine co-crystal polymorph control. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, 156, 105599. **IF: 3,616** DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105599 7.2

7. Konferencia közlemények

7.1. Előadás absztraktok

Barbara Horváth, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi: Theoretical and practical aspects of essential oil emulsions stabilization with solid nanoparticles. *48th International Symposium on Essential Oils ISEO2017, Pécs, Hungary, 10-13 September 2017*.

Széchenyi A., Horváth B., Šafarik T., Sándori, D., Nagy S., Pál Sz.: Application of solid nanoparticle as emulsifiers and surface modifiers in controlled drug delivery. *7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred, Hungary, 5-7 October 2017*.

Horváth Barbara, Nagy Sándor, Balázs Viktória Lilla, Das Sourav, Pál Szilárd, Kocsis Béla, Kőszegi Tamás, Széchenyi Aleksandar. Pickering nano emulziók a gyógyszertechnológiában. *Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia 2019, Siófok, Magyarország, 2019. szeptember 26-28*.

7.2. *Poszter prezentáció absztraktok*

Horváth, B., Bárdonicsek, N., Takácsi-Nagy, A., Pál, Sz., Széchenyi, A. Pickering emulsion of tea tree oil in water, stabilized with silica nanoparticles for onychomycosis topical treatment. *7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred, Hungary, 5-7 October 2017.*

K Kvell, B Kollar, B Horvath, A Szechenyi, Sz Pal. Steroid-harboring nanoparticles provide anti-inflammatory response with less adverse effects. *6th International Conference and Exhibition, Austria, Vienna, November 09-11, 2017.*

Barbara Horváth, Viktória Lilla Balázs; Nikolett Bárdonicsek, Szilárd Pál; Györgyi Horváth; Aleksandar Széchenyi. In vitro diffusion study of tee tree essential oil emulsions stabilized by silica nanoparticles. *11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain, 19-22 March 2018*

Balázs Viktória L, Horváth Barbara, Széchenyi Aleksandar, Varga Adorján, Kocsis Béla, Ács Kamilla, Kerekes Erika, Krisch Judit , Horváth Györgyi. A fahéj és a szegfűszeg illóolajának nanotechnológiai formulálása és biofilm gátló hatásvizsgálata. *Gyógyszer Innováció 2018 Konferencia, Velence, Magyarország, 2018. április 9 11.*

Barbara Horváth, Viktória L. Balázs, Györgyi Horváth, Széchenyi Aleksandar. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles for Streptococcus mutans biofilm inhibition. *49th International Symposium on Essential Oils ISEO 2018, September 13-16, 2018, Niš, Serbia.*

Viktória L. Balázs, Barbara Horváth, Erika Kerekes, Aleksander Széchenyi, Adorján Varga, Béla Kocsis, Kamilla, Ács, Judit Krisch, Györgyi Horváth. The nanotechnological formulation and anti-biofilm activity of thyme essential oil against Streptococcus pneumoniae. *49th International Symposium on Essential Oils ISEO 2018, September 13-16, 2018, Niš, Serbia.*

Horváth, B., Nagy, S., Pál, Sz., Széchenyi, A. Application of nanotechnology in formulation of tioconazole and melaleuca alternifolia essential oil for onychomycosis topical treatment. *12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs and Satellite Symposium on Pharmaceutical Biotechnology, Szeged, Hungary, 20-22 September 2018.*

Barbara Horváth, Ala' Salem, Tatjana Šafarik, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi. Systematic study of reaction conditions for size controlled synthesis of silica nanoparticles. *6th Nano Today Conference, Lisbon, Portugal, 16-20 June 2019.*

Horváth Barbara, Nagy Sándor, Balázs Viktória Lilla, Pál Szilárd, Széchenyi Aleksandar. Teafaolajban oldott tiokcoanzol tartalmú pickering emulziók előállítás és alkalmazása körömgomba helyi kezelésére. I. *FKF Szimpózium, Fiatal Kémikusok Fóruma Debrecen, Magyarország, 2019. április 3.*

8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőm, *Dr. Széchenyi Aleksandar* támogatását, akivel 2009 óta, kémia BSc szakos hallgató koromtól fogva van szerencsém együtt dolgozni. Külön köszönet illeti *Prof. Dr. Perjési Pált*, a PTE Gyógyszerészi Kémia Intézet munkatársát, akinek a segítségével elengedhetetlen volt a PhD tanulmányaim megkezdéséhez, illetve *Dr. Pál Szilárdot*, a PTE Gyógyszertechnológiai Intézet igazgatóját, aki kutatómunkám során végig támogatt az ötletek megvalósításában. Szeretném *megköszönni Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak*, a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársának a lelkes támogatást, és hogy ötleteivel hozzájárult munkánk sikeréhez.

PhD munkám során három hallgató társammal is volt alkalmam együtt dolgozni, akikkel lelkiismeretes és lelkes hozzáállásuk miatt mindig gördülékenyen ment a munka. Szeretném megköszönni *Balázs Viktória Lillának*, *Sourav Das-nak* és *Salem Ala'-nak* a sikeres, közös munkát.

Továbbá hálás vagyok, *Dr. Nagy Sándornak* és *Brunner Jánosnak* az analitikai feladatok megoldásában és asszisztálásában nyújtott segítségükért. Köszönöm *Dr. Böszörményi Andreának*, a Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognóziái Intézet munkatársának a teafa illóolajának GC analízisét, illetve az *Osip Juraj Strossmayer egyetem kollégáinak* a szilika nanorészecskék IR vizsgálatait.

Végül, de természetesen nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családom és barátaim támogatását, lelkesítését. Külön köszönet illeti *édesanyámat* és *nagyszüleimet*, akik erkölcsi és anyagi támogatása végigsegített egyetemi tanulmányaimon, illetve *férjemet* végtelen türelméért és feltétel nélküli támogatásáért.