

ÚJ TÍPUSÚ PLANTAGO LANCEOLATA (PL) TARTALMÚ FOLYADÉKKRISTÁLYOS RENDSZEREK (LC) FORMULÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE HaCaT SEJTVONALON

Kósa Dóra^{1,3,4}, Pető Ágota^{1,3,4}, Fenyvesi Ferenc^{1,3}, Váradi Judit^{1,3}, Vecsernyés Miklós^{1,3}, Gonda Sándor², Vasas Gábor², Fehér Pálma^{1,3}, Bácskay Ildikó^{1,3,4}, Ujhelyi Zoltán^{1,3*}

¹ Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék

² Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar, Növénytan Tanszék

³ Debreceni Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

⁴ Debreceni Egyetem, Egészségipari Intézet



Absztrakt

A szervezetünket érő reaktív oxigén gyökök olyan súlyos betegségek kiváltói lehetnek, mint például különböző hiperproliferatív bőrbetegségek vagy akár a bőr daganatos elváltozása. Néhány gyógynövény kivonat széles körben elterjedt antioxidáns forrásként több készítményben is megtalálható. Az antioxidáns terápia szerepe egyre jelentősebb a különböző gyulladással járó folyamatokban. Különböző innovatív formulációk lehetőséget biztosítanak a fitofarmakonok hatásának növelésére. A *Plantago lanceolata* bioaktív vegyületeinek gyulladáscsökkentő, antioxidáns és baktericid hatása egyaránt jól ismert. Az alábbi kísérletsorozat célja egy olyan új típusú folyadékkristály rendszer formulálása volt, amely amellett, hogy megvédi a *Plantago lanceolata* kivonatot annak hidrolitikus bomlásától, növeli az extractum biohasznosulását is. Tekintettel arra, hogy a gyógyszerkészítmények biztonságossága kiemelkedően fontos szempont a gyógyszerformulálás során, az alkalmazott segédanyagokat és összetételeket, azok biokompatibilitását, különböző *in vitro* módszerekkel vizsgáltuk humán keratinocita (HaCaT) sejtvonalon. Az előzetes citotoxicitás vizsgálatok alapján a kiválasztott felületaktív anyagaink a Labrasol, Lauroglycol 90, és Gelucire 44/14 voltak. A *P. lanceolata* kivonat kioldódási sebességét Franz diffúziós cella segítségével határoztuk meg. A gyógyszerhordozó rendszerek antioxidáns tulajdonságait MDA (malonaldehid), valamint DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) antioxidáns tesztekkel vizsgáltuk. Eredményeink alapján a formulált készítmények a hatóanyag gyors felszívódását biztosítják azáltal, hogy az alkalmazott penetrációfokozó segédanyagok reverzibilisen módosítják a stratum corneum barrier tulajdonságait. Ezek a segédanyagok nem csak biztonságosan alkalmazhatók és jól tolerálhatók, de előnyös tulajdonságaik révén képesek a hatóanyag jobb biohasznosulása által javítani a készítmények használhatóságát.

Kulcsszavak: Folyadékkristályos rendszerek, *Plantago lanceolata*, Penetrációfokozók, antioxidáns, DPPH teszt, Sejtleletképeségi vizsgálatok, MTT teszt, ROS; MDA; RTCA; TEER; HaCaT sejtvonal

FORMULATION OF NOVEL LIQUID CRYSTAL (LC) FORMULATIONS WITH SKIN-PERMEATION-ENHANCING ABILITIES OF PLANTAGO LANCEOLATA (PL) EXTRACT AND THEIR ASSESSMENT ON HaCaT CELLS

Abstract

Exposure to reactive oxygen species can easily result in serious diseases, such as hyperproliferative skin disorders or skin cancer. Herbal extracts are widely used as antioxidant sources in different compositions. The importance of antioxidant therapy in inflammatory conditions has increased. Innovative

* A levelező szerző elérhetősége: Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék, 4032 Debrecen, Nagyterdei krt. 98; ujhelyi.zoltan@pharm.unideb.hu

formulations can be used to improve the effects of these phytopharmaco-ns. The bioactive compounds of *Plantago lanceolata* (PL) possess different effects, such as anti-inflammatory, antioxidant, and bacteri-
cidal pharmacological effects. The objective of this study was to formulate novel liquid crystal (LC) com-
positions to protect *Plantago lanceolata* extract from hydrolysis and to improve its effect. Since safety
is an important aspect of pharmaceutical formulations, the biological properties of applied excipients
and blends were evaluated using assorted *in vitro* methods on HaCaT cells. According to the antecedent
toxicity screening evaluation, three surfactants were selected (Gelucire 44/14, Labrasol, and Laurogly-
col 90) for the formulation. The dissolution rate of PL from the PL-LC systems was evaluated using a
Franz diffusion chamber apparatus. The antioxidant properties of the PL-LC systems were evaluated with
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and malondialdehyde (MDA) assessments. Our results suggest
that these compositions use a nontraditional, rapid-permeation pathway for the delivery of drugs, as
the applied penetration enhancers reversibly alter the barrier properties of the outer stratum corneum.
These excipients can be safe and highly tolerable thus, they could improve the patient's experience and
promote adherence.

Keywords: liquid crystals; *Plantago lanceolata*; penetration enhancers; antioxidant and anti-inflammatory
effects; DPPH test; cytotoxicity investigation; MTT test; ROS; MDA; RTCA; TEER; HaCaT cells

BEVEZETÉS

A cuAz emberi bőr, mint elsődleges védelmi vonal számos környezeti hatástól, többek közt a reaktív oxigén gyökök (ROS) káros következményeitől védi szervezetünket.¹ Bár a reaktív oxigéngyökök patogén hatásának pontos mechanizmusa jelenleg még nem teljesen ismert, szerepük bizonyos súlyos kórképek, mint hiperproliferatív bőrbetegségek vagy bőrrák kialakulásában már egyértelműen bizonyított.² Az elmúlt évtizedekben számos erőfeszítés irányult a ROS behatás csökkentésére és/vagy semlegesítésére.³ A 200-280 nm hullámhosszú UV-C sugárzás gyakran eredményezheti a reaktív gyökök kialakulását.⁴ Mivel az UV-C olyan ionizáló sugárzás, amely erős mutagénként a fent említett immunmediált betegségeket, vagy akár bőrrákot is okozhat. A jellemzően gyakori UV-C expozíció miatt a sugárzás csökkentése azonban jelenleg sajnos lehetetlennek tűnő feladat. Mindezek alapján innovatív fejlesztésű antioxidáns terápia hatékony megoldásnak bizonyulhat.

A gyógynövények a bennük található hasznos kémiai anyagoknak köszönhetően alapvető szerepet töltenek be az egészség megőrzésében.⁵ A *Plantago* nemzetségbe tartozó közel 275 faj közül az egyik legfontosabb a *Plantago lanceolata* (PL), magyar nevén lándzsás útifű.⁶ A *P. lanceolata* bioaktív komponensei különféle farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, beleértve a gyulladáscsökkentő, vizelethajtó, antibakteriális,⁷ hepato-

protektív⁸ és antioxidáns⁹ hatásokat. A gyógyászatban napjainkban leginkább légzőrendszeri betegségek, továbbá bőrsérülések kezelésére alkalmazzák.¹⁰ A népgyógyászat évszázadokon keresztül használta sebek, égések kezelésére, vérzéscsillapításra is.¹¹

A *P. lanceolata* fő aktív komponense a feniletanoid-glikozidok közé tartozó verbaszkozid (akteozid).¹² Bár közismerten kiváló biztonsági profillal rendelkezik, a hidrolízisre való hajlamból adódó gyenge kémiai stabilitása korlátozza a gyógyszer technológiai felhasználhatóságát.¹³ Számos előnyös hatásának ellenére az akteozid magas hidrofil jellege miatt limitáltak a lehetséges alkalmazási módszerek.¹⁴ A fent említett korlátok kiküszöbölésének érdekében folyadékkristály rendszereket formuláltunk, melyek amellet, hogy védik a *P. lanceolata* kivonatot a hidrolízistől, fokozzák annak hatásait is.

A folyadékkristályok nem kovalens kötéssel kapcsolódó molekulák különböző molekuláris orientációjú fázisokkal (mezofázis).¹⁵ Anizotróp jellegükből adódóan részben folyadékokra, részben pedig kristályokra jellemző tulajdonságokat mutatnak, továbbá képesek szolubilizálni az olaj- és vízdoldható vegyületeket egyaránt.¹⁶ A folyadékkristályok általában vízből vagy esetleg olajból, illetve egy, vagy több tenzidből képződnek meghatározott koncentráció és hőmérséklet-tartományban.¹⁷ Mivel a felületaktív anyagok egy meg-

határozott csoportjának egyértelmű penetráció-fokozó hatása van, ezen segédanyagok körültekintő megválasztása ellensúlyozhatja az észter típusú vegyületek káros hatását. A kémiai indukált sejtműködés megváltoztatása előnyös lehet. A penetrációfokozó segédanyagok sejtelképességre és celluláris transzportra gyakorolt hatása egyaránt meghatározható *in vitro* körülmények között. A vegyületek, sejt-sejt közötti szoros kapcsolatának kialakításában résztvevő junkciós fehérjékre (ZO-1, claudin-1, béta-catenin stb.), és ezáltal a paracelluláris integritás növelésére gyakorolt hatását már korábban leírták.¹⁸ Hatékonyságuk mértéke a segédanyagok és összetételek fizikai tulajdonságaitól és kémiai szerkezetétől egyaránt függ.¹⁹ Hasonló szerkezetek esetén, ha a hidrofil fejet polietilénről propilén-glikolra cseréljük, a citotoxicitás fő meghatározó tényezője a monoészter tartalom és a szénlánc hossza lesz.²⁰

Azonban nem csak a szénlánc hossza befolyásolja a bélből történő felszívódás mértékét, hanem számos más szerkezeti paraméter is, mint például az észtereződés mértéke, a telítetlenség helyzete, vagy a szubsztituensek típusa, melyek egyaránt befolyásolhatják a felületaktív anyagok penetrációfokozó hatását.²¹

Kísérletsorozatunk célja egy olyan biztonságos gyógyszerforma kialakítása volt, melyből a *Plantago lanceolata* kivonat bőrön keresztül történő felszívódása fokozott. A bőrön keresztül történő gyógyszerbevitel során két fő kihívással kell szembenéznünk. Tekintettel arra, hogy a helyi gyógyszeres terápiával szembeni beteg compliance alacsony, a hatóanyag szolubilizációja, valamint a szarurétegen keresztül történő megfelelő penetrációja mellett kiemelten fontos a kezeléssel szemben tanúsított beteg adherencia is. A különböző gyógyszerterológiai segédanyagok az előzőekben említett kihívások kiküszöbölésében is segíthetnek.²²

Kutatásunk célja PL tartalmú folyadékkristály rendszerek formulálása és vizsgálata volt. Az LC rendszerek formulálásával a hatóanyag védelmén kívül növeltük annak biohasznosulását is. A preformulációs vizsgálatok alapján három különböző penetrációfokozó segédanyagot (Labrasol, Lauroglycol 90, és Gelucire 44/14) tartalmazó összetételből választottunk ki négyet.²³ Mivel a

gyógyszerkészítmények biztonságossága elengedhetetlen szempont, az alkalmazott segédanyagok és összetételek biológiai tulajdonságait RTCA (Real-Time Cell Electric Sensing), illetve MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) sejtelképességi teszttel vizsgáltuk humán keratinocita (HaCaT) sejtvonalon.²⁴ A sejtvonalat széles körben alkalmazzák helyileg alkalmazott gyógyszerkészítmények citotoxicitásának *in vitro* modellezésére.²⁵ A hiperproliferatív bőrbetegségek *in vitro* modelljeként IL-1 és TNF-alfa indukált keratinocitákat használtunk.²⁶ A formulált PL-LC rendszerek hatásának vizsgálatához a keratinocita sejtekben UV-C sugárzással indukált oxidatív stresszt váltottunk ki. A gyógyszerhordozó rendszerek antioxidáns tulajdonságait MDA (malonaldehid), valamint DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) antioxidáns tesztekkel vizsgáltuk. Kísérleteink eredményei nem csak a különböző penetrációfokozó segédanyagokat tartalmazó formulációk hatékonyságbeli különbségét, de azok hiperproliferatív bőrbetegségek kezelésében történő alkalmazásának előnyeit is bizonyították.

EREDMÉNYEK

Folyadékkristály rendszerek formulálása

A folyadékkristályok kialakulásának paramétereit pszeudoterner fázisdiagram segítségével határoztuk meg. A Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1)/Gelucire 44/14/víz pszeudoterner diagram az [1. ábrán](#) látható. Annak érdekében, hogy a víztartalomnak a folyadékkristályos szerkezetre gyakorolt hatását tanulmányozzuk, különböző víztartalmú (10% - 90%) mintákat készítettünk. A titrálás során főként mikroemulziók képződtek. Amikor a víz aránya 90% fölé emelkedett makroemulziók alakultak ki, függetlenül a Labrasol/Lauroglycol 90 és Gelucire 44/14 felületaktív anyagok arányaitól. Ezzel szemben folyadékkristályos rendszerek csak az összetevők egy bizonyos, szűkebb tartományában keletkeztek, amikor a keverék Labrasol/Lauroglycol 90 tenzid párt 10% alatt tartalmazott. A diagram alapján négy különböző összetételt választottunk ki a Labrasol/Lauroglycol 90 állandó 6:1 arányával további vizsgálatokra. A formulációk tiszták és stabilok voltak 4,1–9,9%-os Labrasol/Lauroglycol 90, valamint 31,1% – 52%-os Gelucire 44/14 tartományokban. A kiválasztott PL kompozíciókat az [1. táblázat](#) mutatja.

In vitro kioldódás vizsgálat

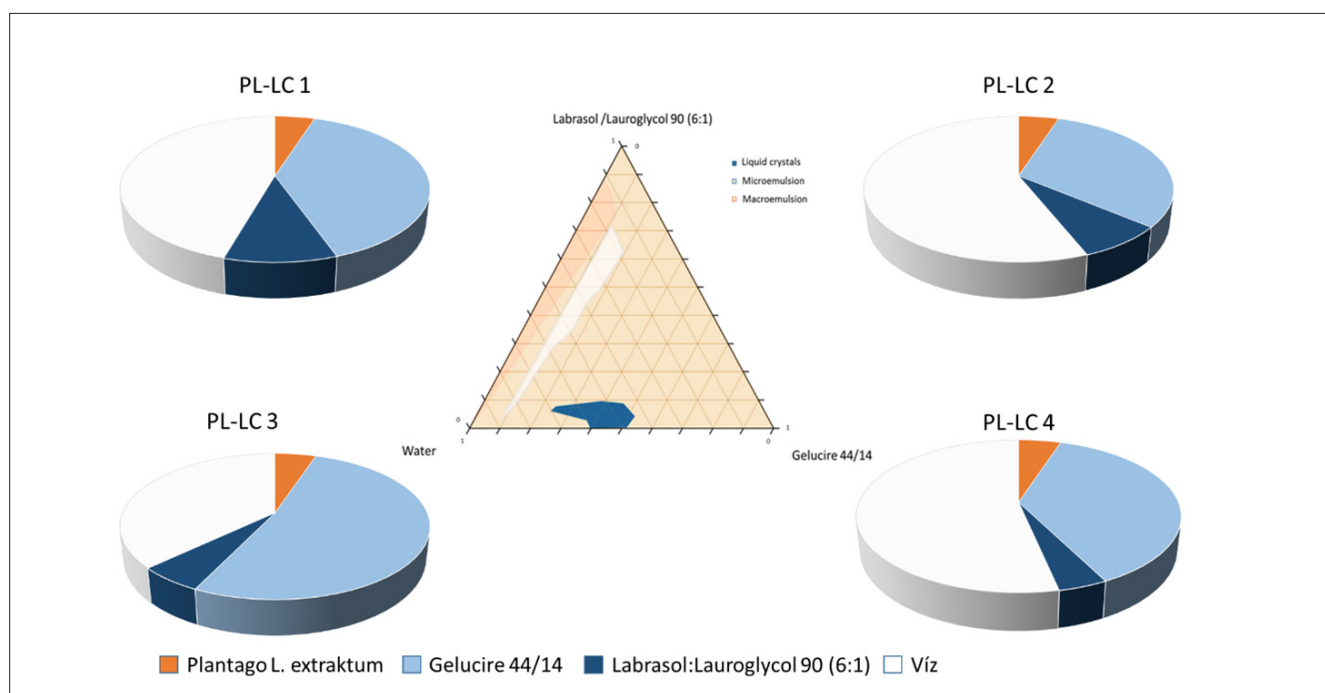
A 2. ábra a szintetikus cellulóz-acetát membránon keresztül diffundált PL-kivonat százalékos arányát mutatja az idő függvényében. Az összetételekből felszabadult hatóanyag mennyisége alapján az alábbi csökkenő sorrendet állítottuk fel: PL-LC 2 > 1 > 4 > 3. Eredményeink alapján jobb hatóanyag kioldódás történt azokból a készítményekből, melyek a Labrasol/Lauroglycol 90 tenzid párból többet tartalmaztak. A legjobb diffúziót az I. és II. kompozíció esetében sikerült elérni, ahol a felületaktív anyagok tartománya 9,9% és 7,8% volt, a diffundált PL-kivonat mennyisége pedig meghaladta az 50% -ot. A III. és a IV. kompozíció esetében, amelyek kevesebb felületaktív anyagot tartalmaztak, rosszabb hatóanyag diffúziót tapasztaltunk, a felszabadult gyógyszer mennyisége 40% alatt volt.

HaCaT sejtproliferációs vizsgálat

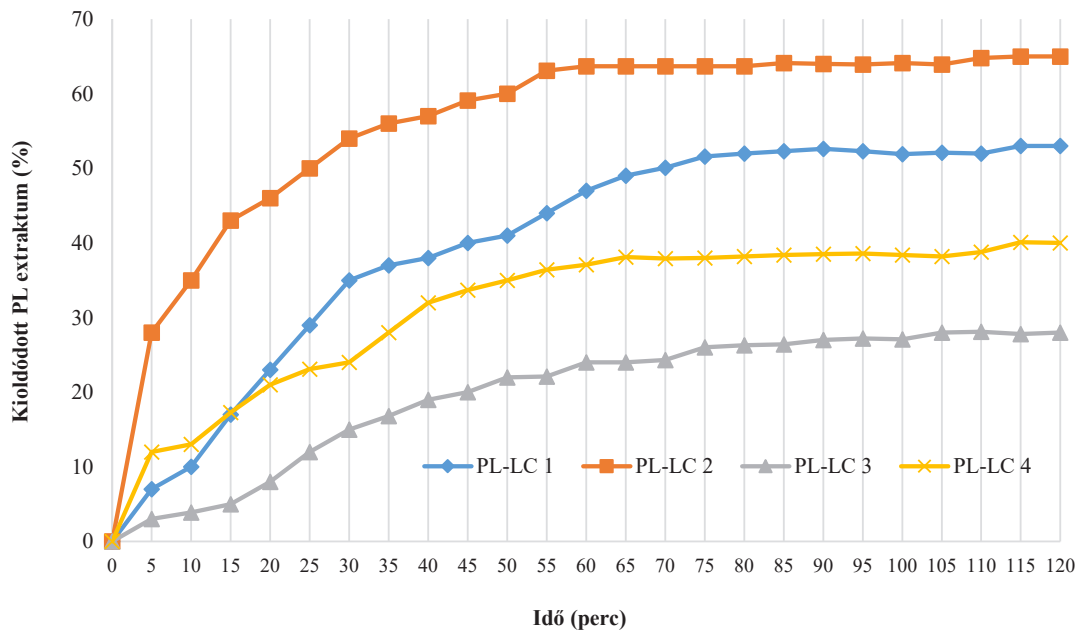
A proliferációs vizsgálatokat $10^4/200 \mu\text{L}$ sűrűséggel szélesztett HaCaT sejteken végeztük az xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) segítségével. A 3. ábra szemlélteti a vizsgált minták között tapasztalt jelentős különbségeket. A HaCaT sejtproliferáció impedancia mérésen alapuló meghatározása azonban a sejtindex nyilvánvaló növekedését mutatta mindegyik esetben eltérő proliferációs kinetika mellett. Míg a kezeletlen HaCaT sejtek hét nap elteltével alakították ki a konfluens monolayer sejtréteget, az IL-1-béta - és a TNF-alfa stimulált keratinociták (PSmHaCaT) a gyors proliferáció következtében hamarabb elérték a platófázist. Ezen felül a PSmHaCaT keratinociták magasabb sejtindex értékeket mutattak ebben a szakaszban. Ennek megerősíté-

1. táblázat: A kiválasztott folyadékkristályos rendszerek összetételei a pszeidoterner fázisdiagramok alapján

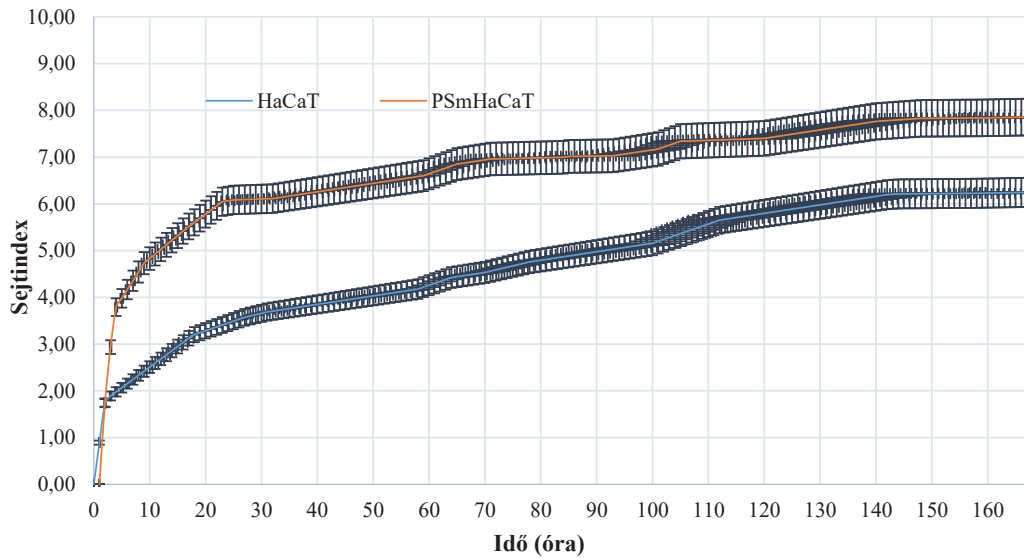
PL-LC Összetétel	Plantago Extractum	Gelucire 44/14	Labrasol/Lauroglycol 90	Víz
1	1.25 mL (4.95%)	10 mL (39.60%)	2.5 mL (9.90%)	11,5 mL (45.55%)
2	1.6 mL (4.92%)	10 mL (31.15%)	2.5 mL (7.79%)	18 mL (56.08%)
3	1.1 mL (5.09%)	11.25 mL (52.08%)	1.25 mL (5.79%)	8 mL (37.04%)
4	1.5 mL (5.00%)	11.25 mL (37.50%)	1.25 mL (4.17%)	16 mL (53.33%)



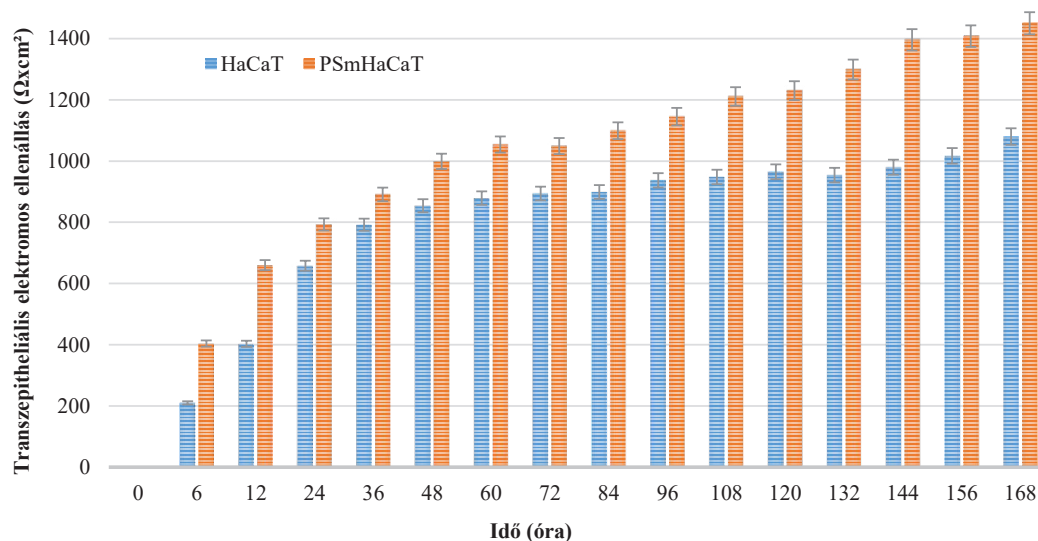
1. ábra. Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1)/Gelucire 44/14/víz rendszer pszeidoterner fázisdiagramja; a sötétkék terület a folyadékkristályok képződésének tartományát jelöli (LC). A kiválasztott *Plantago lanceolata* (PL)-LC összetételek (I-IV) komponenseinek aránya



2. ábra. A kompozíciók kioldódás profiljai



3. ábra. HaCaT sejtproliferáció impedancia alapú méréseinek eredménye



4. ábra. Transepithelialis elektromos ellenállás (TEER) mérés eredményei

sére a sejtek transzepithelialis elektromos ellenállását (TEER) is mértük, mely mérések eredménye összhangban van az RTCA tesztekkel. Amint az a 4. ábrán is látható, magasabb TEER értékeket figyeltünk meg a PSmHaCaT sejteknél, mint a kezeletlen keratinociták esetében.

MTT sejtéletképesség vizsgálat

A biztonságos alkalmazás biztosításának érdekében MTT citotoxicitás vizsgálatokat végeztünk HaCaT sejtvonalon. A formulációk citotoxicitását különböző koncentrációkban vizsgáltuk. Az egyes összetevőket szintén teszteltük külön-külön. Az 5. ábrán látható, hogy a készített LC rendszerek, illetve azok alkatrészei sem befolyásolták jelentősen a sejtéletképességet. A sejtéletképesség még magasabb koncentrációk esetében is 50% felett volt a negatív kontrollhoz képest (foszfát-puffer, PBS). Megállapítottuk, hogy az összes kompozíció jól tolerálható. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az LC-rendszerekkel, illetve a negatív kontrollként alkalmazott PBS-sel kezelt csoportok esetében, bár mind közül a II. összetétel csökkentette legkevésbé a sejtéletképességet.

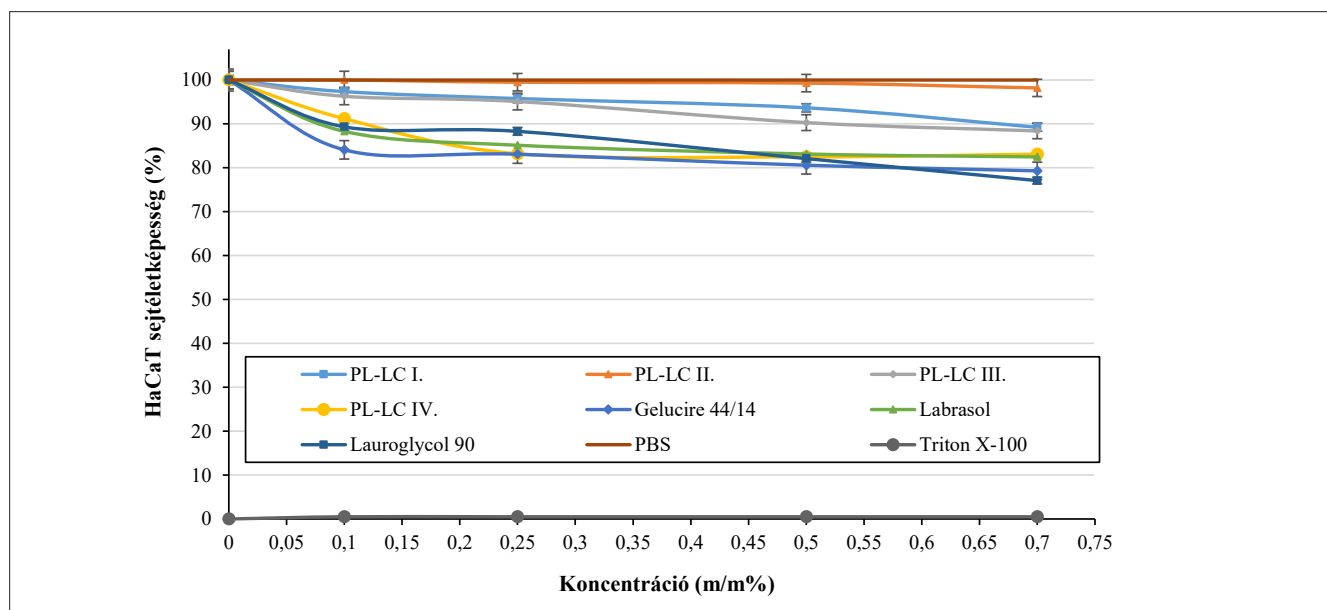
DPPH gyökfogó aktivitás vizsgálat

A vizsgálat alapja a DPPH szabadgyök antioxidáns jelenlétében történő színváltozása. A folyadékkristály rendszereket *Plantago lanceolata* kivonattal,

illetve anélkül is vizsgáltuk. Kontrollként a megfelelő vak formulációkat és 5% *Plantago lanceolata* kivonat vizes diszperzióját (CE) alkalmaztuk. Mint azt már korábban leírtuk, a formulált LC minták szintén 5 v/v% PL kivonatot tartalmaztak. Az antioxidáns aktivitás százalékos arányát DPPH teszttel mértük. A DPPH gyökfogó aktivitást Brand-Williams és munkatársai által leírt módszer alapján mértük.²⁷ Eredményeink alapján szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a vizsgált csoportok között, melyet a 6. ábrán csillaggal jelöltünk. Az elvégzett vizsgálat megerősítette, hogy az összes kompozíció képes jelentősen gátolni a DPPH oxidációját. Megállapítottuk, hogy az I. és a II. összetételek a leghatékonyabbak, ezzel szemben a IV. összetétel mutatta a legkisebb aktivitás, bár antioxidáns kapacitása így is jelentősen magasabbnak bizonyult, mint a kontroll csoporté (CE).

Lipidperoxidáció (MDA) vizsgálat

A formulációk UV sugárzással szembeni védőhatását HaCaT, illetve PSmHaCaT sejteken vizsgáltuk. Az *in vitro* antioxidáns aktivitás mérések eredményeit a 7. ábra mutatja be. Az MDA szintjében mért különbségek megerősítették a *P. lanceolata* kivonat antioxidáns hatékonyságát, és a megfelelően kiválasztott komponensek fontosságát egyaránt. Amellett, hogy az összes formuláció csökkentette az MDA szintet a kontroll csoportokhoz képest, azt tapasztaltuk, hogy az I. összetétel (a legna-

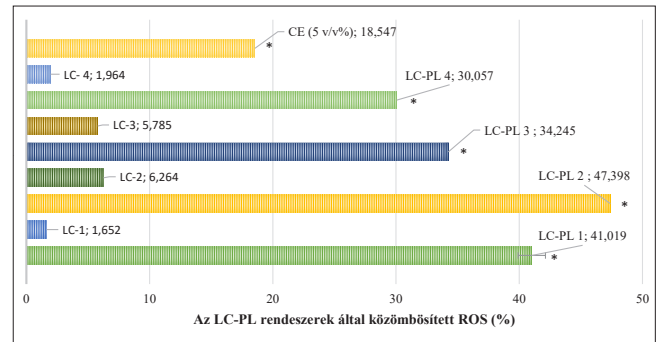


5. ábra. A formulációk, illetve azok komponenseinek toxicitás vizsgálata HaCaT sejtvonalon. Pozitív kontrollként Triton-X-100-at; negatív kontrollként foszfát-puffert (PBS) használtunk

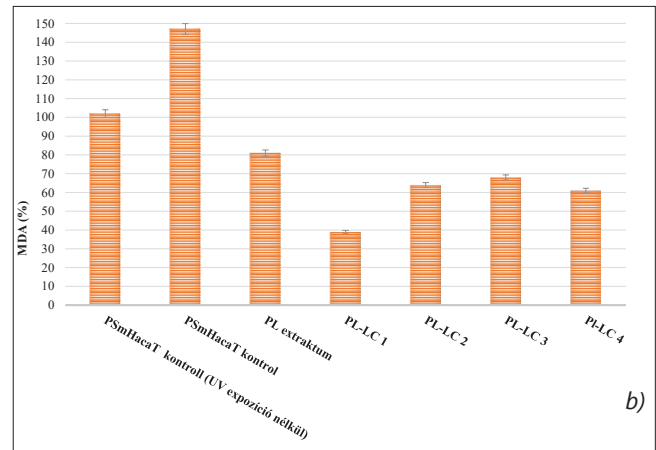
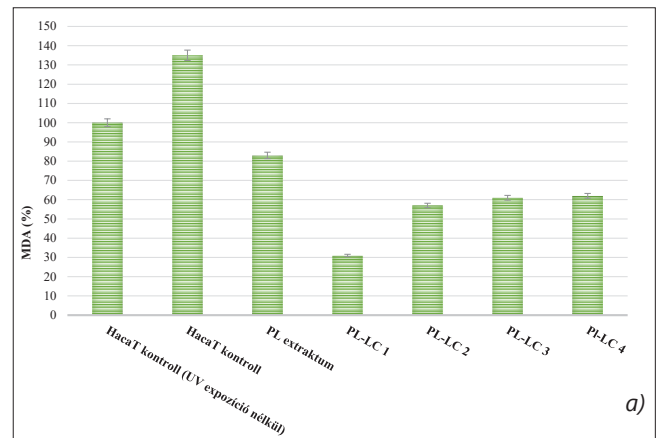
gyobb penetrációfokozó segédanyag tartalommal) esetében jelentősebb ez a csökkenés.

UV-C expozíció HaCaT sejteken

Az LC-PL kompozíciók UV-C besugárzás elleni hatását HaCaT, illetve stimulált keratinocita (PSmHaCaT) sejtvonalakon vizsgáltuk. A formulációk összetételét annyiban módosítottuk (2. táblázat), hogy desztillált víz helyett azonos térfogatú DMEM sejtkultúras médiumot használtunk a víz káros hatásainak elkerülése érdekében. A 8. ábra az UV-indukált oxidatív stresszt követő sejtéletképességet mutatja. Az első kísérletben nem alkalmaztunk PL-LC kezelést. Az eredmények alátámasztották az UV-C sugárzás különböző sejtvonalakra kifejtett káros hatását, továbbá megfigyeltük, hogy 6 perc UV-C expozíció a sejtéletképesség jelentős csökkenését eredményezte. A sugárzás által stimulált proliferációs változásokat MTT-tesztel vizsgáltuk az expozíció követő 12., 24. és 48. órában. Azt tapasztaltuk, hogy 6 perc UV-C expozíció robusztus PSmHaCaT sejtproliferációt eredményezett. Két nap elteltével az UV-C-stimulált PSmHaCaT sejtek életképessége meghaladta a kezeletlen sejtek életképességét. A 9. ábra PL-LC-vel kezelt sejtek életképességét mutatja 6 perc UV-C expozíció okozta oxidatív stressz után. Az eredmények alapján a PL-LC kezelés részben gátolta az UV-C sugárzás káros hatásait. A *Plantago* kivonat antioxidáns hatása mellett a Labrasol/Lauroglycol 90 penetrációfokozó hatása is érvényesült, mivel az I. és III. kompozícióból, amelyek a tenzid párt nagyobb koncentrációban tartalmazzák, időegység alatt nagyobb mennyiségű hatóanyag került a sejtekbe, növelve ezzel a sejtéletképességet. Az átfogó elemzés kimutatta, hogy ugyan az LC-PL kezelés nem képes teljes mértékben megvédeni a keratinocitákat, a PSmHaCaT sejtek esetében megfigyelt UV-C expozíció okozta hiperproliferációt azonban megelőzte.



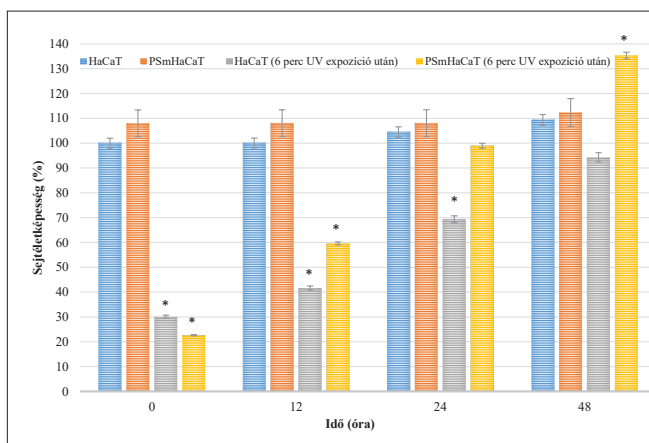
6. ábra. Az LC-PL összetételek által közömbösített reaktív oxigéngyökök százalékos aránya. Pozitív kontrollként 5 v/v% *P. lanceolata* kivonat vizes diszperzióját választottuk, negatív kontrollként pedig hatóanyag nélküli folyadékkristályt. A szignifikanciát csillaggal jelöltük (*). * p < 0,05 a negatív kontrollhoz viszonyítva



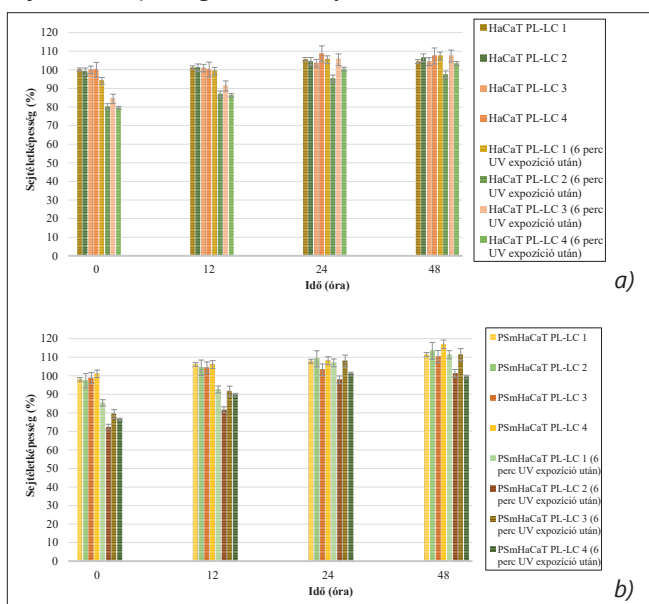
7. ábra. Az LC-PL rendszerek HaCaT (a) és PSmHaCaT (b) sejtek MDA szintjére gyakorolt hatása 6 perc UV expozíció követően. Pozitív kontrollként PL kivonatot, negatív kontrollként pedig kezeletlen sejteket alkalmaztunk

2. táblázat: Módosított folyadékkristályos rendszerek összetételei

PL-LC Összetétel	<i>Plantago Extractum</i>	Gelucire 44/14	Labrasol/Lauroglycol 90	DMEM
1	1.25 mL (4.95%)	10 mL (39.60%)	2,5 mL (9.90%)	11,5 mL (45.55%)
2	1.6 mL (4.92%)	10 mL (31.15%)	2,5 mL (7.79%)	18 mL (56.08%)
3	1.1 mL (5.09%)	11,25 mL (52.08%)	1,25 mL (5.79%)	8 mL (37.04%)
4	1.5 mL (5%)	11,25 mL (37.50%)	1,25 mL (4.17%)	16 mL (53.33%)



8. ábra. MTT citotoxicitás vizsgálat eredményei HaCaT, illetve PSmHaCaT sejteken UV expozíciót követő 12., 24., 48. órában. A szignifikanciát csillaggal jelöltük (*). * p < 0,05 a kezeletlen sejtek életképességéhez viszonyítva



9. ábra. MTT citotoxicitás vizsgálat eredményei HaCaT (a), illetve PSmHaCaT (b) sejteken 6 perccel az UV expozíciót követően

DISZKUSSZIÓ

A fitofarmakonok antioxidáns terápiában betöltött szerepe folyamatosan növekszik.²⁸ Annak ellenére azonban, hogy hatásuk bizonyítottan előnyös, a vegyületek hatékonyságának növelése különböző gyógyszer technológiai formulációs módszerekkel elengedhetetlen.²⁹ A folyadékkristályos rendszerek helyi terápiában elért hatékonyságát már korábban leírták.³⁰ A folyadékkristályok nem kovalens kötéssel kapcsolódó molekulák különböző molekuláris orientációjú fázisokkal (mezofázis).¹⁵ Anizotróp jellegükből adódóan részben folyadékokra, részben pedig kristályokra jellemző tulajdonságokat mutatnak, továbbá képe-

sek szolubilizálni az olaj- és vízdoldható vegyületeket egyaránt.¹⁶ Mindezekon felül a folyadékkristályok képzéséhez olyan felületaktív anyagként használható speciális észtervegyületek is alkalmazhatóak melyek penetrációfokozó hatása bizonyított.³¹ Ezen tulajdonságaik miatt az LC rendszerek nemcsak gyógyszer technológiai szempontjából, hanem a biohasznosulás és egész terápiás értéküket számítva is előnyösek. Kísérletsorozatunkban különböző *Plantago lanceolata* kivonatot tartalmazó készítményeket formuláltunk majd elvégeztük ezek részletes gyógyszer technológiai jellemzését is. Kísérleti eredményeink rámutattak, hogy a felhasználni kívánt segédanyagok és felületaktív anyagok megfelelő kiválasztása egyaránt rendkívül fontos tényező.

Formuláció során a Labrasol/Lauroglycol 90 (6:1)/Gelucire 44/14 tenzideket, valamint vizet számkunkra megfelelő arányban tartalmazó összetételeket strukturált pseudoterner fázisdiagram segítségével határoztuk meg, továbbá meghatároztuk a felszabadult hatóanyag mennyiségét is. Az előállított LC rendszerek biokompatibilitását különböző in vitro sejt kultúras vizsgálatokkal elemeztük. Ezekhez a kísérletekhez humán keratinocita HaCaT sejtvonalon kívül TNF-alfa és IL-1 indukált humán PSmHaCaT sejteket használtunk. A sejtproliferáció impedancia mérésen alapuló meghatározása minden esetben a sejtindex egyértelmű növekedését mutatta. Ezenfelül, a proliferáció kinetikájában is különbséget tapasztaltunk: míg a natív HaCaT sejtek a konfluens sejtréteget 7 nap után érték el, az IL-1 és TNF-alfa stimulált keratinociták (PSmHaCaT) gyorsabb proliferáció következtében hamarabb elérték a platófázist. Mindezek mellett, a PSmHaCaT sejtek magasabb sejtindex értéket mutattak ebben a fázisban. Az elvégzett MTT tesztek megerősítették, hogy a formulált LC rendszerek, valamint azok összetevői sem befolyásolták jelentősen a sejtéletképességet. A készítmények tehát biztonságosnak bizonyultak. A gyökfogó aktivitás vizsgálat kimutatta, hogy a formulációk jelentős mértékben gátolták a DPPH oxidációját. A tesztelt LC-PL rendszerek közül az I. és II. bizonyult a leghatékonyabbnak, míg a IV. összetétel mutatta a legkisebb aktivitást. A PL-LC készítmények antioxidáns hatását MDA lipidperoxidációs vizsgálattal is ellenőriztük. A vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy

a kontroll csoportokhoz képest az összes formulációképes volt csökkenteni a malondialdehid (MDA) szintet, továbbá azt láttuk, hogy az I. összetétel esetében ez a csökkenés szignifikáns. Eredményeink tehát alátámasztják a penetrációfokozó segédanyagok szerepét az antioxidáns hatás elérésében. Ezt a megfigyelést igazolták az UV-C besugárzás eredményei, mely szerint a sugárzás destruktívan hatott az egyes sejtvonalakra. Hat perc UV-C expozíciót követően ugyanis jelentős sejtleletképeség csökkenést tapasztaltunk. A sugárzást követően végzett MTT teszt alapján jelentős PSmHaCaT sejtproliferációt láttunk. Két nap elteltével a besugárzott PSmHaCaT sejtek életképessége meghaladta a kezeletlen sejtekét. A formulációkkal történő kezelés részben egyértelműen blokkolta az UV-C sugarak káros hatását. Mindezek mellett, a *Plantago* kivonat antioxidáns hatása, valamint a Labrasol/Lauroglycol 90 penetrációfokozó hatása is érvényesült, mivel az I. és III. összetételekből, melyek arányaiban többet tartalmaztak a tenzidpárból, nagyobb mennyiségű hatóanyag jutott a sejtekbe. Megfigyeléseink alapján ugyan a PL-LC kezelés nem tudta megvédeni a keratinocitákat, a PSmHaCaT sejtek UV-C sugárzás okozta hiperproliferációját képes volt csökkenteni. Kísérletsorozatunk eredményei tehát igazolják az antioxidáns terápia fontosságát, különösen gyulladással járó állapotok esetén. Összességében elmondható, hogy kutatásunk hasznos adatokat szolgáltathat egy innovatív, biztonságos és hatékony helyi készítmény kifejlesztéséhez.

ANYAGOK, MÓDSZEREK

Anyagok

A *Plantago lanceolata* kivonatot Vasas Gábor és munkatársai biztosították számunkra. A Gelucire 44/14, Labrasol, illetve Lauroglycol 90 tenzidek kedves ajándék volt a Gattefossétól (Lyon, Franciaország). A 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid MTT-festéket, DMEM sejtenyészítő médiumot, a foszfát-puffert (PBS), a tripszin-etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), a hőinaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS), az L-glutamint, a nem esszenciális aminosav-oldatot és a penicillin–streptomocint a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A 96 lyukú lemeget és sejtenyészítő flaskákat a VWR

International-től (Debrecen, Magyarország) vásároltuk. A HaCaT sejtvonalat (humán keratinocita sejtek) a Cell Lines Service-től (CLS, Heidelberg, Németország) szereztük be. A TBARS Assay készletet a Cayman Chemical-től (Ann Arbor, MI, USA) vásároltuk. A 2,2-difenil-1-pikril-hidrazilt (DPPH), az abszolút etanolt, az IL-1-et és a TNF-alfát a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

Száraz *Plantago lanceolata* levél metanolos kivonata

A gyógyszerkönyvi standard minőségű *P. lanceolata* leveleket kereskedelmi forgalomból vásároltuk. A leveleket ledaráltuk, majd finom eloszlású porrá redukáltuk a további alkalmazás céljából. A port 30 percig visszafolyatás közben extraháltuk metanollal, szűrtük, majd rotációs vákuum bepárlóban szárítottuk. A kivonatot hexánnal zsírmentesítettük (3x50 mL). Az eljárás végén 100 g növényi kiindulási anyag 25,2 g *Plantago* kivonatot eredményezett. Az extraktumot hiteles standardokkal végzett kalibrálás után LC-ESI-MS módszerrel¹⁹ jellemeztük. A kivonat 5,99% acteoizidot, 2,34% aucubint, valamint 1,21% katalpolt tartalmazott, amely 1.51%, 0.59%, valamint 0.31% szárított növényi droggal ekvivalens.

Folyadékkristályok formulálása

Ahhoz, hogy meghatározzuk a folyadékkristályok komponenseinek optimális koncentrációtartományát, titrálásos módszer segítségével pszeudoterner fázis diagramot szerkesztettünk.¹⁵ A citotoxicitási vizsgálatok alapján a Labrasol, Lauroglycol 90-et és Gelucire 44/14-et választottuk felületaktív anyagokként. Első lépésben a szükséges mennyiségű *Plantago lanceolata* extraktumot (minden összetétel esetében 5%-nak megfelelő mennyiséget) a felületaktív anyagok keverékében oldottuk. Ezt követően folyamatos keverés közben vizet adtunk a rendszerhez. A víztartalom a különböző összetételek esetében 37% és 56% között változott állandó 6:1 Labrasol/Lauroglycol 90 arány mellett. A pszeudoterner diagram alapján munkánkat a továbbiakban négy különböző összetételű minta vizsgálatával folytattuk, melyek összetételét az 1. táblázat mutatja.

In vitro kioldódás vizsgálat

A formulált LC rendszerekből történő *Plantago lanceolata* kivonat kioldódását Franz diffúziós cella (Hanson Microette TM Topical and Transdermal Diffusion Cell System) segítségével jellemeztük három párhuzamos méréssel.³² A mintákat az előzetesen izopropil-mirisztátba áztatott cellulóz-acetát membránokra helyeztük.³³ Receptor fázisként 30 v/v% alkoholt használtunk folyamatos mágneses keverés mellett (350 rpm) annak érdekében, hogy segítsük az extraktum komponenseinek oldódását. A receptoroldat hőmérsékletét a fiziológiás bőr hőmérsékletének imitálására 32°C-on termosztáltuk a kísérlet ideje alatt. A receptor közegből előre meghatározott időpontokban (15 percenként 6 órán át) 1,0 mL mintát vettünk, amit minden esetben friss receptoroldattal pótolunk. A hatóanyag tartalmat UV-Vis spektrofotométer (Shimadzu, Tokyo, Japan) segítségével határoztuk meg 517 nm hullámhosszon. A spektroszkópos méréseket megelőzően felvettük a kivonat kalibrációs görbéjét.

HaCaT sejtkultúra

A HaCaT sejteket 2 mM L-glutamint, 100 mg/L gentamicint, és 10 (v/v)% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) sejtenyészítő médiumban növesztettük 37°C-on CO₂ termosztátban (5% CO₂ atmoszférában). A sejtkultúrás médiumot hetente kétszer cseréltük. A sejteket heti rendszerességű passzálassal tartottuk fent. A citotoxicitás- és antioxidáns vizsgálatokra 10 és 30 passzázs számú HaCaT sejtvonalat használtunk. A keratinocitákat Da Hee Choi és munkatársai²⁶ munkája alapján TNF-alfa (20 ng/mL) és IL-1-béta (25 ng/mL) proinflammatorikus citokinek kombinációjával kezeltük, hogy TNF-alfa/IL-1-béta indukált humán PSmHaCaT sejteket kapjunk.

MTT sejtleletképeség vizsgálat

Az alkalmazott segédanyagok citotoxicitását MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) sejtleletképeségi teszttel vizsgálatuk. A kísérlethez a keratinocita sejteket 96 lyukú plate-be szélesztettük. 7 nap elteltével eltávolítottuk a sejtekről a fáradt táptalajt, PBS-sel mostuk őket, majd

megkezeltük a kiválasztott felületaktív anyagok oldataival, amit további 60 perc inkubáció követett. A minták eltávolítása után 100 µL MTT festékkel történő 3 órás inkubáció következett. A keletkező sötétkék formazán kristályokat sósavas izopropanollal (izopropanol:sósav = 25:1) oldatba vittük. Az oldat abszorbanciáját 570 nm-en mértük FLUOstar OPTIMA Microplate Reader segítségével. A sejtleletképeséget a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva számítottuk.

RTCA és transepitheliális elektromos ellenállás mérés

A sejtréteg in vitro permeabilitását a jól ismert transepitheliális elektromos ellenállás (TEER) érték mérésével ellenőriztük. A mérés viszonylag egyszerű, váltakozó áramú elektródokat helyezve az apikális és bazális cellákba a mért feszültség értékekből megkapjuk a barrier elektromos ellenállását. A kísérlet során 10⁴ sejtet szélesztettünk DMEM sejtkultúrás médiumban speciális e-microplatekre. A PSmHaCaT sejtek esetében a gyulladást IL-1-béta és TNF-alfa keverékével indukáltuk, a korábban leírtak szerint. Az ellenállást az xCELLigence RTCA eszköz segítségével mértük, az adatokat, mint például a sejtindexet pedig az Integrated RTCA szoftver automatikusan elemezte. A mérési eredményeket a hagyományos TEER mérésekkel támasztottuk alá. A transepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréséhez a HaCaT és PSmHaCaT sejteket DEMEM médiumban 12 lyukú Transwell inzeretekre (Corning Transwell Clear, átmérője: 6,5 mm, pórusmérete: 3,0 µm) szélesztettük 2x10⁴ sejt/ 500 µL sűrűséggel.³⁴ A TEER értékeket szélesztést követő 6 óra után mértük először, majd 7 napig 12 óránként mértük Millipore Millicell-Ers 00.001 készülék segítségével.

UV-C expozíció HaCaT sejteken

A PL-LC összetételek UV-sugárzással szembeni védő hatását HaCaT keratinocita sejteken vizsgáltuk.³⁵ A sejteket a fentiekben leírt körülmények között tartottuk fenn. A HaCaT és PSmHaCaT sejteket 96 lyukú műanyag platekre szélesztettük 10⁴/200 µL sűrűséggel. A kísérletet a szélesztést követő 5. napon végeztük (amikor az RTCA méréseink szerint a sejtek még nem érték el a teljes

konfluens állapotot). A formulációk összetételét annyiban módosítottuk, hogy desztillált víz helyett azonos térfogatú DMEM sejt kultúrák médiumot használtunk a víz káros hatásainak elkerülése érdekében. Mindkét sejt vonalat az Oriol Sol-UV-4 UV Solar Simulator (Newport, Irvine, CA, USA) segítségével vizsgáltuk készítményekkel kezelve, illetve kezelés nélkül egyaránt. Az első kísérlet során a PL-LC összetételekkel dolgoztunk, a HaCaT és a PSmHaCaT sejt vonalak két-két csoportjával. UV sugárzást mindkét esetben csak a második csoport kapott. A különböző sejtek életképességét közvetlenül, illetve 12, 24 és 48 órával az expozíciót követően MTT-teszttel vizsgáltuk. A kísérlet második részében a sejteket 0,5 v/v% PL-LC összetételekkel inkubáltuk 24 órán át (a proliferáció 4. napjától kezdve), majd 6 percig UV-indukált oxidatív stressznek tettük ki őket. A HaCaT sejtek életképességét közvetlenül az expozíciót követően szintén MTT-teszttel vizsgáltuk.

DPPH gyökfogyó aktivitás mérés

A *Plantago lanceolata* tartalmú folyadékkristályok gyökfogyó aktivitását DPPH-teszttel vizsgáltuk. A DPPH egy stabil szabadgyök, amely különböző antioxidánsok jelenlétében megváltoztatja színét. Kontrollként a megfelelő vak kompozíciók és PL-kivonat 5 v/v% -os vizes diszperzióját használtuk (CE). Minden PL kivonatot tartalmazó mintát etanolban (96%) reagáltattunk a stabil DPPH gyökkel. A reakcióelegy 100 µL mintából, 900 µL abszolút alkoholból és 2mL etanos DPPH oldatból (0,06 mM) állt. Az elegyeket 30 percig inkubáltuk. Amikor a DPPH reagál egy hidrogén donor antioxidáns vegyülettel, redukálódik. Ez a reakció színváltozással jár, sötét ibolyából halvány-sárga oldatot kapunk. A nem redukálódott DPPH mennyiségi mérését UV spektrofotométerrel (Shimadzu Spectrophotometer, Tokió, Japán) végeztük 517 nm hullámhosszon. A fotometriás meghatározások háttéréként etanolt használtunk. Kontrollként *P. lanceolata* kivonatot nem tartal-

mazó összetételeket használtunk. A formulált összetételek jobb antioxidáns tulajdonságának bizonyítására vak *P. lanceolata* kivonatot (5 v/v%) is alkalmaztunk. A gyökfogyó aktivitás százalékos mértékét (AA% = antioxidáns aktivitás) Mensor és munkatársai módszere alapján határoztuk meg (1).³⁶

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{blank}}) \cdot 100}{Abs_{\text{control}}} \right] \quad (7)$$

Lipidperoxidáció (MDA)

A reaktív oxigéngyökök lipidperoxidációs folyamatokat képesek generálni a szervezetben. A malondialdehid (MDA) a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjának egyik végterméke a sejtekben. A szabadgyökök emelkedése MDA túltermelést okoz. A lipidperoxidációs vizsgálat szerint a mintában lévő MDA tiobarbitursavval (TBA) reagálva MDA – TBA adduktumot eredményez. A kísérlet során a sejteket (1×10^6) először jégen homogenizáltuk 300 µL MDA lízis pufferrel (3 µL BHT-vel (100), majd centrifugáltuk (13 000x g, 10 perc). A felülúszót TBARS Assay Kit-tel (Cayman Chemical) elemeztük. A lipidperoxidáció mértékét a malondialdehid (MDA) és tiobarbitursav (TBA) reakciójából keletkező kolorimetrikus (532 nm) MDA – TBA addukt mérésével határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Az adatokat Microsoft Excel 2013 és SigmaStat 4.0 (3.1 verzió; SPSS, Chicago, IL, USA, 2015) programokkal elemeztük. Az MTT sejtéletképességi vizsgálat, a gyökfogyó aktivitás vizsgálat és az in vitro kioldódás vizsgálat eredményeit egy- és többszemponos ANOVA-val hasonlítottuk össze, amelyet Tukey- vagy Dunnett-teszt követett. A középértékek közötti különbségeket szignifikánsnak tekintettük, mivel $p < 0,05$ -nél. Valamennyi kísérletet öt párhuzamos méréssel hajtottunk végre, és legalább ötször ismételtük.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A közlemény a TKP2020-NKA-04 számú projekt keretében, az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A kutatás az EFOP-3.6.1- 16-2016- 0002 azonosító számú "Debrecen Venture Catapult program" című projekt és a Felsőoktatási intézményi kiválósági program, 20428 3/2018/FEKUTSTRAT iktatószámú támogatói okirat keretében zajlott. A kutatás a GINOP-2.3.3-15-2016-00021 projekt keretén belül valósult meg. A publikáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatást a Richter Gedeon Táler Alapítvány támogatta.

MEGJEGYZÉS

A publikáció az MDPI Molecules folyóiratban 2021. február 21-én megjelent „Formulation of Novel Liquid Crystal (LC) Formulations with Skin-Permeation- Enhancing Abilities of Plantago lanceolata (PL) Extract and Their Assessment on HaCaT Cells” című publikáció magyar nyelvű másodközlése. Hivatkozás: <https://doi.org/10.3390/molecules26041023>.

A publikációban közölt kísérletes módszerek és eredmények Kósa Dóra „Innovatív heterogén diszperz rendszerek formulálása és gyógyszer technológiai vizsgálata” című doktori (PhD) értekezésének alapjául szolgál (témavezető: Dr. Ujhelyi Zoltán).

ÖSSZEFÉRHETLENSÉGI NYILATKOZAT

Nincs összeférhetlenség.

IRODALOM

- Lin TK, Zhong L, Santiago JL. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;19:70.
- Liu-Smith F. UV-induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. In: Crusio WE, Dong H, Radeke HH, Rezaei N, Steinlein, O, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 996. Springer, Cham; 2017. p. 27-40.
- Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *Anais Brasilienses de Dermatologia* 2017;92: 356–362.
- Mohania D. Ultraviolet radiations: Skin defense-damage mechanism In: Crusio WE, Dong H, Radeke HH, Rezaei N, Steinlein, O, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 996. Springer, Cham; 2017. p. 71-87.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS. Medicinal plants in therapy. *Journal of Ethnopharmacology* 1987;19:336.
- Goncalves S, Romano A. The medicinal potential of plants form the genus Plantago (Plantaginaceae). *Industrial Crops and Products* 2016;83:213–26.
- Fons F, Gargadennec A, Gueiffier A, Roussel JL, Andary C. Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*. *Phytochemistry* 1998;49:697–702.
- Yang J, Yan Y, Liu H, Hu J. Protective effects of acteoside against X-ray-induced damage in human skin fibroblasts. *Molecular Medicine Reports* 2015;12:2301–6.
- Chiou WF, Lin LC, Chen CF. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2004;56:743–8.
- Oloumi MM, Vosough D, Derakhshanfar A, Nematollahi, MH. The healing potential of *Plantago lanceolata* ointment on collagenase-induced tendinitis in burros (*equus asinus*). *J Equine Veterinary Sciences* 2011;31:470–4.
- Jarić S, Kostić O et al. Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). *Journal of Ethnopharmacology* 2018;211:311–28.
- He J, Hu XP et al. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *Journal of Asian Natural Products Research* 2011;13:449–64.
- Isacchi B, Bergonzi MC, Iacopi R, Ghelardini C, Galeotti N, Bilia AR. Liposomal formulation to increase stability and prolong antineuropathic activity of verbascoside. *Planta Medica* 2016;83:412–9.
- Vertuani S, Beghelli E et al. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules* 2011;16:7068–80.
- Iwabata K, Sugai U, Seki Y, Furue H, Sakaguchi K. Applications of biomaterials to liquid crystals. *Molecules* 2013;18:4703–17.
- Dierking I. Chiral liquid crystals: structures, phases, effects. *Symmetry* 2014;6:444–472.
- Fehér A, Csányi E, Csóka I, Kovács A, Erős I. Thermoanalytical investigation of lyotropic liquid crystals and micro-emulsions for pharmaceutical use. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2005;82:507–12.
- Ujhelyi Z, Fenyvesi F et al. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47:564–573.
- Kalantari A, Kósa D et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems containing plantago lanceolata—an assessment of their antioxidant and anti-inflammatory effects. *Molecules* 2017;22:1773.
- Duangjit S, Opanasopit P et al. Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *International Journal of Nanomedicine* 2014;9:2005–2017.
- Yasir M, Som I, Bhatia K. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2012;4:2–9.
- Czajkowska-Kośnik A, Szekalska M, Winnicka K. Nanostructured lipid carriers: a potential use for skin drug delivery systems. *Pharmacological Reports* 2019;71:156–166.
- Dubray O, Jannin V, Demarne F, Pellequer Y, Lamprecht A, Beduneau A. In-vitro investigation regarding the effects of Gelucire® 44/14 and Labrasol® ALF on the secretory intestinal transport of P-gp substrates in *International Journal of Pharmacy* 2016;515:293–9.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology* 1988;106:761–71.
- Schoop VM, Fusenig NE, Mirancea N. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1999;112:343–53.
- Choi DH, Hwang HS. Anti-inflammation activity of brazilin in TNF- α induced human psoriasis dermatitis skin model. *Applied Biological Chemistry* 2019;62:1–9.
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 1995;28:25–30.
- Zhang YJ, Gan RY et al. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* 2015;20:21138–56.
- Gunasekaran T, Haile T, Nigusse T, Dhanaraju MD. Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014;4:S1–S7.
- Yamada K, Yamashita J et al. Preparation and evaluation of liquid-crystal formulations with skin-permeation-enhancing abilities for entrapped drugs. *J Oleo Sci* 2011;60:31-40.
- Kim B, Cho HE et al. Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomedical Dermatology* 2020;4:10.
- Suarato G, Spanò R, Bertorelli R, Diaspro A, Athanassiou A, Surdo S. 3D-printed, pocket-size diffusion cells for skin permeation investigation. *Proceedings* 2018;2:945.
- Karadzovska D, Riviere JE. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013;50:569–576.
- Sha X, Yan G, Wu Y, Li J, Fang X. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing labrasol on tight junctions in Caco-2 Cells. *Eur J Pharm Sci* 2005;24:477–486.
- Adom MB, Taher M et al. Chemical constituents and medical benefits of plantago major. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;96:348–360.
- Mensor LL, Menezes FS et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 2001;15:127–130.