

**„VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF PHARMACY
ACADEMIC DEPARTMENT OF
PHARMACOGNOSY-PHYTOTHERAPY
DEPARTMENT II**

BORA C. LARISA



ABSTRACT

***Origanum aetheroleum* – a new perspective for the
management of fibroepithelial polyps**

Scientific coordinator

Prof. Dr. CORINA DANCIU

**Timișoara
2025**

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION	3
2. AIM AND OUTLINE.....	4
3. RESULTS	6
3.1. DETERMINATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF OEO. ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANT EFFECT.....	6
3.2. DEVELOPMENT OF THE POLYMERIC MICELLE-BASED HYDROGEL FORMULATION AS AN OEO DELIVERY SYSTEM	6
3.3. <i>IN VITRO</i> STUDIES OF OEO RELEASE AND SKIN PENETRATION FROM THE HYDROGEL	7
3.4. QUALITY TESTS FOR OEO-PBH. LONG-TERM STABILITY EVALUATION. STERILITY AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT	7
3.5. EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OEO AND OEO-PBH.....	8
3.6. EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTI-MIGRATORY, CYTOTOXIC, AND PRO-APOPTOTIC EFFECT OF OEO-PBH ON THE HACAT HUMAN KERATINOCYTE CELL LINE.....	9
3.7. EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF OEO- PBH ON DENDRITIC CELLS.....	10
3.8. <i>IN OVO</i> OEO-PBH EVALUATION OF THE BIOCOMPATIBILITY AND EFFECTS ON ANGIOGENESIS. HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF THE CAM	10
3.9. CLINICAL EVALUATION OF OEO-PBH EFFICACY IN HUMAN SUBJECTS	12
4. CONCLUSION.....	13

1. Introduction

Cutaneous papillomas, also known as fibroepithelial polyps (FP), are small benign skin growths, with a prevalence of 50–60% among adults, especially after the fourth decade of life. These lesions are composed mainly of keratinocytes, fibroblasts, collagen fibers, small blood vessels, and dilated capillaries. Although harmless, FP can be bothersome for inaesthetic appearance and may cause discomfort due to mechanical irritation. Conventional treatment of FPs consists of removing them by minimally invasive procedures—surgical excision, cauterization, cryotherapy, or laser. In recent times, patients have shown increased interest in over-the-counter remedies, as these are non-invasive and can be administered at home. However, the clinical efficacy of such topical products is often unsatisfactory or not rigorously proven through scientific methods.

In the context of the need for effective non-invasive therapeutic options, research has shifted toward the use of plant-derived active compounds with pharmacological properties. *Origanum vulgare* L. (oregano) is an aromatic plant in the *Lamiaceae* family, well known for its essential oil rich in volatile compounds with multiple biological activities, including antibacterial, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory, choloretic-cholagogue, stomachic, and antitumor effects. Oregano essential oil (OEO) has potential applications in dermatology and is considered a possible natural remedy for treating FPs. However, incorporating volatile oils into various dermato-cosmetic formulations brings challenges related to their low stability, high volatility, and limited solubility in aqueous media. To overcome these limitations, innovative formulations have been developed to improve the bioavailability and stability of volatile oils. One such strategy is the micellar solubilization of the volatile oil in a polymeric system.

In this doctoral research, *Origanum vulgare* L. essential oil was incorporated into a binary poloxamer-based hydrogel (OEO-PbH) using micellization, designed as a non-invasive topical delivery system for the treatment of FPs. Thus, the research topic addresses the valorization of a natural product, oregano essential oil, by incorporating it into a modern pharmaceutical system, to obtain an effective and safe treatment for FPs.

2. Aim and outline

The objective of the doctoral research is the characterization and evaluation of a modern hydrogel formulation based on polymeric micelles used as delivery systems for *Origanum vulgare* L. essential oil, intended for application on FP. A series of specific objectives were pursued to achieve this goal.

The general part of the doctoral thesis presents the latest scientific data regarding advancements in phytotherapy, an overview of essential oils, and a depiction of the *Origanum vulgare* L. aromatic plant, with emphasis on the general aspects, phytochemistry, and biological activity of *Origanum vulgare* L. essential oil on skin level. The general part concludes with a description of the fundamental aspects related to the anatomy and management of FP.

The original contributions of this work include:

a) Phytochemical characterization and evaluation of the therapeutic potential of OEO. For this purpose, an analysis of the volatile compounds was performed and a series of biological activities were evaluated: antioxidant capacity; antimicrobial effect on bacterial and fungal strains; antiproliferative, anti-migratory, cytotoxic, and pro-apoptotic activity on the human keratinocyte cell line (HaCaT); immunomodulatory potential on human dendritic cells under inflammatory conditions. These evaluations provided the scientific basis for the use of OEO as an active ingredient against FP.

b) Formulation of an innovative hydrogel based on polymeric micelles used as delivery systems for OEO. A semi-solid binary hydrogel formulation based on Pluronic F127/L31 was developed, in which OEO was incorporated via micellar solubilization. The physicochemical properties of this formulation were characterized (pH, hydrogel consistency, spreadability, particle size and charge, polydispersity index, zeta potential) to determine if the resulting product is stable, homogeneous, and suitable for cutaneous application.

c) Long-term stability and microbiological safety studies. Long-term tests over 6 months were conducted to determine the stability profile of OEO-PbH under controlled storage conditions. Physical properties and active ingredient concentration were monitored. Additionally, susceptibility to microbial contamination was assessed to verify and validate the pharmaceutical formulation's compliance from a microbiological standpoint.

d) Evaluation of the biocompatibility and *in ovo* effects of OEO and OEO-PbH on the chick chorioallantoic membrane (CAM). The behavior of the OEO-PbH formulation was investigated employing the hen egg test–chick chorioallantoic membrane (HET-CAM) assay in order to evaluate the product's tolerability and influence on local angiogenesis. This approach provided indications regarding the safety of application on living tissue and the possible mechanism of action of the formulation.

e) Clinical evaluation of the efficacy of OEO-PbH. A clinical study (No. 16/02 March 2022, No. 04 a/17 June 2022) was conducted involving patients with FPs and their treatment with OEO-PbH for 2 months. A series of parameters were then evaluated by non-invasive methods, followed by histological analysis of the changes induced in the structure of the FPs.

This doctoral thesis employed some of the latest globally recognized methodologies in experimental research. Part of the experiments received financial support through project PN-III-P1-1.1-TE-2019-0130, funded by the Ministry of Education and Research of Romania, CNCS-UEFSCDI, under PNCDI III.

3. Results

3.1. DETERMINATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF OEO. ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANT EFFECT

The essential oil extracted from *Origanum vulgare* L. was subjected to GC-MS analysis, identifying 43 different volatile compounds, the most important being: carvacrol, thymol, β -linalool, *p*-cymene, γ -terpinene, β -bisabolene, caryophyllene, α -terpinene, and β -myrcene. The antioxidant activity of OEO was evaluated by four established methods: CUPRAC, ABTS, ORAC, and DPPH. All four methods revealed a significant antioxidant potential of OEO (DPPH – 86% scavenging, ABTS – 1304 TE $\mu\text{mol/mL}$, CUPRAC – 5320.1 TE $\mu\text{mol/mL}$, ORAC – 3752.7 TE $\mu\text{mol/mL}$).

3.2. DEVELOPMENT OF THE POLYMERIC MICELLE-BASED HYDROGEL FORMULATION AS AN OEO DELIVERY SYSTEM

OEO was successfully encapsulated by micellar solubilization into a binary poloxamer hydrogel (Pluronic F127 and L31). The obtained formulation (OEO-PbH) was characterized from a physicochemical standpoint. It was found that the hydrogel has a slightly acidic pH (6.3), compatible with skin pH, and presents a firm consistency and rheological properties appropriate for topical application. Compared to the blank formulation without OEO (B-PbH), OEO-PbH showed a slightly increased firmness, due to the presence of the volatile oil within the network. The polydispersity index is increased (0.858), confirming the heterogeneous

distribution of particles. Scanning electron microscopy (SEM) analysis indicated a uniform appearance after the encapsulation process.

In conclusion, the physicochemical analysis results indicated that a homogeneous, stable, and skin-appropriate topical product was obtained.

3.3. *IN VITRO* STUDIES OF OEO RELEASE AND SKIN PENETRATION FROM THE HYDROGEL

To examine the release of the essential oil from the hydrogel matrix, the release profile of OEO through a synthetic polysulfone membrane and the transdermal permeability profile through pig ear skin were evaluated. A sustained release profile was observed throughout the experiment. The kinetic data fit a zero-order model, indicating a constant release rate over time. Regarding skin permeability, tests using pig ear skin showed that OEO-PbH can penetrate the skin barrier.

In conclusion, the *in vitro* release and skin penetration studies demonstrated a sustained and prolonged release of OEO from the polymeric micelle-based hydrogel through the synthetic polysulfone membrane and pig ear skin.

3.4. QUALITY TESTS FOR OEO-PBH. LONG-TERM STABILITY EVALUATION. STERILITY AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT

A crucial aspect of a topical product is maintaining its stability and safety over time. OEO-PbH was subjected to a stability study over 6 months. Throughout the monitoring period, the formulation maintained its initial physical properties. The appearance remained homogeneous, clear, and yellowish, with no signs of phase separation or precipitation, and the specific oregano oil odor remained unchanged. Additionally, the hydrogel's pH stayed constant (around 6.3), with no significant variations over the 6 months. It was found that OEO-PbH has very good chemical

stability, with the OEO concentration in the hydrogel remaining above 98% of the initial value throughout the testing period.

From a microbiological perspective, OEO-PbH showed no signs of microbial contamination. The total count of viable aerobic microorganisms remained below the limits accepted by current pharmaceutical standards. Moreover, the PET (Preservative Efficacy Test) demonstrated that OEO-PbH can prevent the growth of microorganisms if they are accidentally introduced into the product. At 48 h after the deliberate inoculation of microbial cultures (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*) into a sample, no pathogenic microorganism was isolated, with the inoculated culture media remaining sterile.

In conclusion, OEO-PbH exhibits an excellent stability profile and presents no risk of microbial contamination.

3.5. EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OEO AND OEO-PBH

The antimicrobial effect of OEO and OEO-PbH was tested on 7 microbial strains: Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), and fungi (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*). Both OEO and OEO-PbH showed comparable antibacterial and antifungal activities against the tested strains, suggesting that incorporating OEO into the hydrogel did not diminish its antimicrobial effect. *Candida* spp. were the most sensitive to the tested samples (MIC = 2.5 µg/mL), followed by Gram-positive bacteria (MIC = 5–10 µg/mL).

3.6. EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTI-MIGRATORY, CYTOTOXIC, AND PRO-APOPTOTIC EFFECT OF OEO-PBH ON THE HACAT HUMAN KERATINOCYTE CELL LINE

Given that FPs are composed mainly of epidermal cells, the antiproliferative, anti-migratory, cytotoxic, and pro-apoptotic effects of OEO-PbH were tested on the HaCaT human keratinocyte cell line, using the following concentrations: 5, 20, 50, 100, 150, and 200 µg/mL.

Employing the MTT assay, it was observed that OEO-PbH exhibits a marked dose- and time-dependent antiproliferative effect on HaCaT cells. After 72 h, even the lowest concentration (5 µg/mL) reduced cell viability (70.3%), while the highest concentration (200 µg/mL) was extremely effective (reducing viability to 2%). The calculated IC_{50} after 72 h of exposure to OEO-PbH was 29.69 µg/mL. B-PbH did not affect cell viability at any of the tested concentrations.

The anti-migratory effect of OEO-PbH was determined using the Scratch assay. Following treatment with the samples, keratinocyte migration decreased in a dose-dependent manner, with a significant reduction observed at concentrations above 100 µg/mL.

The cytotoxic effect of OEO-PbH at 72 h post-treatment was evaluated based on lactate dehydrogenase release using the LDH assay. It was observed that starting at 50 µg/mL, there was an increase in LDH release. At the highest concentrations, a significant cytotoxic effect was evident: $26.1 \pm 1.2\%$ at 150 µg/mL and $26.4 \pm 1.7\%$ at 200 µg/mL. B-PbH exhibited no cytotoxic effect on HaCaT cells at the tested concentrations.

To gain more detailed insight into the pro-apoptotic effect at the nuclear level, Hoechst 33342 staining was used. Treatment with OEO-PbH induced nuclear changes—fragmentation and the appearance of „membrane blebbing.”

In conclusion, the *in vitro* results obtained were promising, as the reduction in cell viability is necessary to achieve the expected effect of OEO-PbH, namely the drying and falling of FPs.

3.7. EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF OEO-PBH ON DENDRITIC CELLS

Dendritic cells (DCs) were treated with OEO-PbH to evaluate the effect on cell viability and cytokine secretion. No cytotoxic effects or morphological changes were observed after 24 h post-stimulation. Subsequently, the response of these cells to OEO-PbH treatment under inflammatory conditions (induced with lipopolysaccharides) was investigated. The results showed an immunomodulatory effect, with OEO-PbH causing a significant decrease in the production of pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , and IL-23, compared to untreated inflamed cells. Importantly, the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was not reduced, suggesting that OEO-PbH treatment lowers the inflammatory response without suppressing regulatory factors.

The *in vitro* data indicate that OEO-PbH can limit the growth of the cells that compose FPs, a desired mechanism in the context of their elimination.

3.8. *IN OVO* OEO-PBH EVALUATION OF THE BIOCOMPATIBILITY AND EFFECTS ON ANGIOGENESIS. HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF THE CAM

To investigate the irritant potential, the HET-CAM test was used. OEO-PbH did not induce any changes in the vascularized CAM, and no signs of hemorrhage, coagulation, or vascular lysis were observed during the 5 minutes of analysis or 24 h after hydrogel application. By comparison, the application of 1% sodium lauryl sulfate (SLS) solution, used as a positive control, immediately caused severe

irritation and hemorrhagic reactions in the CAM, reflected also by the high irritation score. No irritation reaction was observed in the cases of OEO or B-PbH either. No signs of embryotoxicity were detected throughout the experiment.

Next, the influence of OEO-PbH on the process of angiogenesis was evaluated, a process relevant in the context of FP elimination because these lesions are highly vascularized. CAMs were treated with doses of 200 µg/mL of OEO-PbH and OEO, respectively, and evaluated after 24 and 48 h. It was found that OEO-PbH limited the formation of new blood vessels. At the application site, capillaries were thinner, fewer in number, and less branched compared to areas where B-PbH was applied. In the stereomicroscopic images, after 48 h, the membranes treated with OEO-PbH or OEO showed a much lower vascular density than the control, indicating an inhibitory effect on local angiogenesis. The semi-quantitative morphometric analysis confirmed that both OEO-PbH and OEO significantly reduced the number of vessels around the application area.

The same experiment was then performed in the presence of leptin, a pro-angiogenic adipokine overexpressed in skin pathologies such as FPs. It was noted that the inhibition of vasculogenesis at the CAM level under treatment with OEO-PbH or OEO is pronounced in the presence of leptin.

Histological analysis of the CAM provided valuable insights into the effects of OEO-PbH and OEO on angiogenesis and tissue architecture. Treatment with OEO led to a reduction in the thickness of the mesodermal layer, thinning of the allantoic ectoderm, and a decrease in the number of blood vessels, whereas after treatment with OEO-PbH, the mesodermal layer underwent a complete architectural change, the allantoic ectoderm was thinned, and the blood vessels were reduced in both number and size.

In conclusion, the anti-angiogenic effect of OEO-PbH, corroborated with its local antiproliferative action, indicates a dual mechanism by which OEO-PbH treatment could influence the elimination of FPs.

3.9. CLINICAL EVALUATION OF OEO-PBH EFFICACY IN HUMAN SUBJECTS

The efficacy and tolerability of the OEO-PbH formulation were validated in a clinical study conducted on 20 patients who had multiple FPs. This study was approved by the Scientific Research Ethics Committee of „Victor Babeş” University of Medicine and Pharmacy Timișoara (No. 16/02 March 2022, No. 04a/17 June 2022) and adhered to the good practice guidelines in biomedical research and the standards established by the Declaration of Helsinki.

According to the dermatologist's instructions, a collaborator in this study, patients applied OEO-PbH onto the FPs using an applicator, twice a day for 8 weeks, and were monitored every 2 weeks with non-invasive measurements and clinical examinations.

Throughout the OEO-PbH treatment, the functional skin parameters of the treated area showed moderate changes. A gradual increase in transepidermal water loss (TEWL) was observed, accompanied by a slight increase in local erythema. At the same time, the skin water content (SWC) of the *stratum corneum* decreased, indicating the drying of the FP surface. The values of these parameters did not exceed safety limits and did not indicate marked irritation or damage to the skin surrounding the papillomas, a sign that the formulation is well tolerated after repeated and prolonged use.

Macroscopically, the FPs began to dry out and shrink within the first weeks of application. After 4 weeks of treatment, patients showed approximately a 20–30% reduction in the number of lesions in the treated area. After 8 weeks of treatment, the reduction in the number of papillomas reached around 50%, with some FPs disappearing completely and others considerably decreasing in size. Lesions larger than 5 mm were not influenced by OEO-PbH treatment during the two months of treatment.

Histopathological analysis of FPs before and after treatment provided concrete data regarding the mechanism of action of OEO-PbH. The treated FPs exhibited profoundly altered tissue structures compared to untreated FPs. The epidermal layer was thinned, with signs of atrophy, the underlying dermis and the fibrovascular core of the FP showed reduced cellular density, and the caliber and number of blood vessels in the FP were greatly diminished. These findings are consistent with the results recorded *in vitro* and *in ovo*.

4. Conclusion

The research presented in this doctoral thesis described the effects of using *Origanum vulgare* L. essential oil incorporated into polymeric micelles as a non-invasive therapeutic approach for the treatment of FP up to 5 mm in size. It was demonstrated that the proposed formulation meets all the requirements of a topical treatment—it is stable over time and easy to apply, has a very good safety profile, and exerts multiple beneficial therapeutic effects in the context of eliminating FPs smaller than 5 mm. In conclusion, the polymeric micelle-based hydrogel formulation used as a delivery system for *Origanum vulgare* L. essential oil represents a promising alternative to classical methods of removing FPs, offering patients an effective, safe, and comfortable treatment for a widespread skin condition. The results obtained provide a solid foundation for continuing research and potential further developments—elucidating in-depth the mechanisms of action, extending clinical studies, improving the formulation for managing FP larger than 5 mm, and exploring its use in other dermatological conditions.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR
BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
CATEDRA UNIVERSITARĂ DE FARMACOGNOZIE-
FITOTERAPIE
DEPARTAMENT II

BORA C. LARISA



REZUMAT

***Origani aetheroleum* – o nouă perspectivă pentru
gestionarea papiloamelor cutanate**

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Dr. CORINA DANCIU

**Timișoara
2025**

Cuprins

1. INTRODUCERE	3
2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII.....	4
3. REZULTATE	6
3.1. DETERMINAREA COMPOZIȚIEI CHIMICE A OEO. ANALIZA EFECTULUI ANTIOXIDANT	6
3.2. DEZVOLTAREA FORMULĂRII DE TIP HIDROGEL PE BAZĂ DE MICELE POLIMERICE CA SISTEME DE CEDARE PENTRU OEO	6
3.3. STUDII <i>IN VITRO</i> DE ELIBERARE ȘI PENETRARE CUTANATĂ A OEO DIN HIDROGEL.....	7
3.4. TESTE DE CALITATE PENTRU OEO-PBH. EVALUAREA STABILITĂȚII PE TERMEN LUNG. TESTE DE STERILITATE ȘI EVALUARE MICROBIOLOGICĂ	7
3.5. EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A OEO ȘI OEO-PBH	8
3.6. EVALUAREA EFECTULUI ANTIPROLIFERATIV, ANTI-MIGRATOR, CITOTOXIC ȘI PRO-APOPTOTIC AL OEO-PBH ASUPRA LINIEI CELULARE DE KERATINOCITE UMANE HACAT.....	9
3.7. EVALUAREA EFECTULUI IMUNOMODULATOR AL OEO-PBH PE CELULE DENDRITICE.....	10
3.8. TESTAREA <i>IN OVO</i> A BIOCOMPATIBILITĂȚII ȘI EVALUAREA EFECTULUI ASUPRA ANGIOGENEZEI A OEO-PBH. ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ A CAM	10
3.9. EVALUAREA CLINICĂ A EFICACITĂȚII OEO-PBH PE SUBIEȚI UMANI.....	12
4. CONCLUZII.....	13

1. Introducere

Papiloamele cutanate, denumite și polipi fibroepiteliali (FP), sunt mici excrescențe cutanate benigne, având o prevalență de aproximativ 50–60% în rândul adulților, în special după a patra decadă de viață. Acestea sunt compuse în principal din keratinocite, fibroblaste, fibre de colagen, vase de sânge mici și capilare dilatate. Deși sunt inofensive, papiloamele cutanate pot fi deranjante din motive estetice și pot provoca disconfort prin iritare mecanică. Tratamentul convențional al FP constă în îndepărtarea lor prin procedee minim invazive—excizie chirurgicală, cauterizare, crioterapie sau laser. În ultima vreme, pacienții manifestă un interes crescut pentru remedii „over-the-counter”, fiind neinvazive și putând fi administrate la domiciliu. Totuși, eficacitatea clinică a acestor produse topice este adesea nesatisfăcătoare sau nedovedită riguros prin metode științifice.

În contextul necesității unor opțiuni terapeutice non-invazive eficiente, cercetările s-au orientat către utilizarea compușilor activi din plante cu proprietăți farmacologice. *Origanum vulgare* L., oregano sau șovârf, este o plantă aromatică din familia *Lamiaceae*, bine cunoscută pentru uleiul volatil bogat în compuși volatili cu activitate biologică multiplă, printre care se pot aminti efectele antibacteriene, antifungice, antioxidante, antiinflamatoare, coleretic-colagoge, stomahice, antitumorale. Uleiul esențial de oregano (OEO) are potențială aplicabilitate în dermatologie, fiind considerat un posibil remediu natural pentru tratarea FP. Totuși, încorporarea uleiurilor volatile în diferite formulări dermato-cosmetice aduce cu sine provocări legate de stabilitatea lor scăzută, volatilitatea ridicată și solubilitatea limitată în medii apoase. Pentru a depăși aceste obstacole, au fost dezvoltate formulări inovative menite să îmbunătățească biodisponibilitatea și stabilitatea uleiurilor volatile. Una dintre aceste strategii este solubilizarea micelară a uleiului

într-un sistem polimeric. În cadrul acestei cercetări aferente studiilor doctorale, uleiul volatil de *Origanum vulgare* L. a fost încorporat într-un hidrogel binar pe bază de poloxamer (OEO-PbH) prin tehnica micelizării, conceput ca un sistem de administrare topică non-invazivă pentru tratamentul FP. Astfel, tema de cercetare abordează valorificarea unui produs natural, și anume a uleiului volatil de oregano, prin formularea sa într-un sistem farmaceutic modern, în scopul obținerii unui tratament eficient și sigur pentru FP.

2. Scop și contribuții

Obiectivul cercetării doctorale îl reprezintă caracterizarea și evaluarea unei formulări moderne de tip hidrogel pe bază de micle polimerice utilizate ca sisteme de cedare pentru uleiul esențial de *Origanum vulgare* L. cu scopul de a fi aplicat pe papiloamele cutanate. Pentru atingerea acestui scop, s-au urmărit o serie de obiective specifice.

Partea generală a tezei de doctorat prezintă cele mai recente date științifice cu privire la actualități în fitoterapie, generalități despre uleiurile esențiale, caracterizarea speciei *Origanum vulgare* L., cu accent pe aspectele generale botanice, compoziția fitochimică, activitatea biologică a uleiului esențial de oregano la nivelul pielii. Partea generală se încheie cu descrierea aspectelor generale legate de anatomia și managementul papiloamelor cutanate.

Contribuțiile originale ale acestei lucrări includ:

a) Caracterizarea fitochimică și evaluarea activității terapeutice pentru OEO. În acest scop s-a realizat analiza compușilor volatili și s-au evaluat o serie de activități biologice: capacitatea antioxidantă; efectul antimicrobian pe tulpini bacteriene și fungice; activitatea antiproliferativă, anti-migratoare, citotoxică și pro-apoptotică pe linia celulară de keratinocite umane (HaCaT); potențialul imunomodulator pe celule

dendritice umane în condiții de inflamație. Aceste evaluări au furnizat baza științifică pentru utilizarea OEO ca ingredient activ împotriva papiloamelor cutanate.

b) Formularea unui hidrogel inovativ pe bază de micelle polimerice utilizate ca sisteme de cedare a OEO. S-a dezvoltat o formulare semisolidă de tip hidrogel binar pe bază de Pluronic F127/L31, în care uleiul volatil de oregano a fost încorporat prin solubilizare micelară. S-au caracterizat proprietățile fizico-chimice ale acestei formulări (pH, consistența hidrogelului, gradul de întindere, dimensiunea și încărcarea particulelor, indicii de polidispersitate, potențialul zeta), pentru a stabili dacă produsul rezultat este stabil, omogen și adecvat pentru aplicare cutanată.

c) Studii de stabilitate și siguranță microbiologică pe termen lung. S-au efectuat teste pe termen lung, timp de 6 luni, pentru a determina profilul de stabilitate al OEO-PbH în condiții de depozitare controlată, monitorizându-se proprietățile fizice și concentrația de ingredient activ. De asemenea, s-a evaluat susceptibilitatea la contaminare microbiană pentru verificarea și validarea conformității formulării farmaceutice din punct de vedere microbiologic.

d) Evaluarea biocompatibilității și a efectelor *in ovo* a OEO și OEO-PbH pe membrana corioalantoidă de embrion de găină (CAM). S-a investigat comportamentul formulării OEO-PbH într-un model *in ovo* de membrană corioalantoidă de embrion de găină (HET-CAM) pentru a testa tolerabilitatea produsului și influența asupra procesului de angiogeneză locală. Această abordare a oferit indicii privind siguranța aplicării pe țesut viu și posibilul mecanism de acțiune al formulării.

e) Evaluarea clinică a eficacității formulării OEO-PbH. S-a derulat un studiu clinic (Nr. 16/02 Martie 2022, Nr. 04 a/17 Iunie 2022) care a implicat pacienți cu FP și tratamentul acestora cu OEO-PbH timp de 2 luni. S-au evaluat apoi o serie de

parametrii prin metode non-invazive, ulterior analizându-se histologic modificările induse în structura FP.

În cadrul acestei teze de doctorat s-au folosit unele dintre cele mai recente metode experimentale, recunoscute la nivel global și avizate de comunitatea științifică. O parte dintre experimente au beneficiat de sprijin financiar prin proiectul PN-III-P1-1.1-TE-2019-0130, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării din România, CNCS-UEFSCDI, în cadrul PNCDI III.

3. Rezultate

3.1. DETERMINAREA COMPOZIȚIEI CHIMICE A OEO. ANALIZA EFECTULUI ANTIOXIDANT

Uleiul esențial extras din *Origanum vulgare* L. a fost supus analizei GC-MS, identificându-se 43 de compuși volatili diferiți, cei mai importanți fiind: carvacrol, timol, β -linalool, *p*-cimen, γ -terpinen, β -bisabolen, cariofilen, α -terpinen și β -mircen. Activitatea antioxidantă a OEO a fost evaluată prin patru metode consacrate: CUPRAC, ABTS, ORAC și DPPH. Cele patru metode au evidențiat un potențial antioxidant semnificativ al OEO (DPPH – 86%, ABTS – 1304 TE $\mu\text{mol/mL}$, CUPRAC – 5320.1 TE $\mu\text{mol/mL}$, ORAC – 3752.7 TE $\mu\text{mol/mL}$).

3.2. DEZVOLTAREA FORMULĂRII DE TIP HIDROGEL PE BAZĂ DE MICELE POLIMERICE CA SISTEME DE CEDARE PENTRU OEO

OEO a fost încapsulat cu succes prin solubilizare micelară într-un hidrogel binar de poloxameri (Pluronic F127 și L31). Formularea obținută (OEO-PbH) a fost caracterizată din punct de vedere fizico-chimic. S-a constatat că hidrogelul are un pH ușor acid (6.3), compatibil cu pH-ul pielii, prezintă o consistență fermă și proprietăți reologice adecvate aplicării cutanate. Comparativ cu formularea blank,

fără OEO (B-PbH), OEO-PbH a prezentat o consistență ușor crescută, datorită prezenței uleiului volatil în rețea. Indicele de polidispersitate este ridicat (0.858), confirmând distribuția heterogenă a particulelor. Analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM) a indicat un aspect regulat după procesul de încapsulare.

În concluzie, rezultatele analizei fizico-chimice au indicat că s-a obținut un produs topic omogen, stabil și potrivit aplicării la nivel cutanat.

3.3. STUDII *IN VITRO* DE ELIBERARE ȘI PENETRARE CUTANATĂ A OEO DIN HIDROGEL

Pentru a examina modul de eliberare a uleiului esențial din matricea de hidrogel, s-au evaluat profilul de eliberare al OEO prin membrana sintetică din polisulfonă și profilul de permeabilitate transdermică prin pielea urechii de porc. S-a observat un profil de eliberare susținută pe toată durata experimentului. Datele cinetice s-au potrivit modelului de ordin zero, indicând o rată de eliberare constantă în timp. În ceea ce privește permeabilitatea cutanată, testele efectuate folosind pielea de porc au evidențiat că OEO-PbH poate penetra bariera cutanată.

În concluzie, studiile *in vitro* de eliberare și de penetrare a pielii au arătat o eliberare susținută și prelungită de OEO din hidrogelul pe bază de micle polimerice prin membrana sintetică din polisulfonă și pielea urechii de porc.

3.4. TESTE DE CALITATE PENTRU OEO-PBH. EVALUAREA STABILITĂȚII PE TERMEN LUNG. TESTE DE STERILITATE ȘI EVALUARE MICROBIOLOGICĂ

Un aspect crucial pentru un produs topic este menținerea stabilității și siguranței în timp. OEO-PbH a fost supus unui studiu de stabilitate pe parcursul a 6 luni. Pe tot parcursul monitorizării, formularea și-a menținut proprietățile fizice inițiale. Aspectul a rămas omogen, clar și de culoare gălbuie, fără semne de

separare a fazelor sau precipitare, iar mirosul specific de ulei volatil de oregano s-a menținut neschimbat. De asemenea, pH-ul hidrogelului a rămas constant (în jur de 6.3), neînregistrând variații semnificative de-a lungul celor 6 luni. S-a constatat că OEO-PbH prezintă stabilitate chimică foarte bună, concentrația de OEO din hidrogel rămânând peste 98% din valoarea inițială pe întreg intervalul de testare.

Din punct de vedere microbiologic, OEO-PbH nu a prezentat semne de contaminare microbiană. Numărul total de microorganisme aerobe viabile s-a situat sub limitele acceptate de standardele farmaceutice în vigoare. Mai mult, testul PET (Preservative Efficacy Test) a demonstrat că OEO-PbH poate preveni dezvoltarea microorganismelor dacă acestea ajung accidental în produs. La 48 de ore după inocularea deliberată a unor culturi microbiene în eșantion (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus*), nu s-a izolat niciun microorganism patogen, mediile de cultură rămânând sterile.

În concluzie, OEO-PbH prezintă un profil de stabilitate excelent și nu prezintă risc de contaminare microbiană.

3.5. EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A OEO ȘI OEO-PBH

S-a testat efectul antimicrobian al OEO și OEO-PbH pe 7 tulpini microbiene: bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*), bacterii Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) și fungi (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*). Atât OEO, cât și OEO-PbH au prezentat activități antibacteriene și antifungice comparabile împotriva tulpinilor testate, sugerând că încorporarea OEO în hidrogel nu i-a diminuat efectul antimicrobian. *Candida* sp. au fost cele mai sensibile la acțiunea probelor testate (MIC = 2.5 µg/mL), urmând bacteriile Gram-pozitive (MIC = 5–10 µg/mL).

3.6. EVALUAREA EFECTULUI ANTIPROLIFERATIV, ANTI-MIGRATOR, CITOTOXIC ȘI PRO-APOPTOTIC AL OEO-PbH ASUPRA LINIEI CELULARE DE KERATINOCITE UMANE HACAT

Având în vedere faptul că FP sunt alcătuiți predominant din celule epidermice, s-a testat efectul antiproliferativ, anti-migrator, citotoxic și pro-apoptotic al formulării OEO-PbH asupra liniei celulare de keratinocite umane HaCaT, folosind următoarele concentrații: 5, 20, 50, 100, 150 și 200 $\mu\text{g/mL}$.

Aplicând testul MTT, se poate observa că OEO-PbH prezintă un efect antiproliferativ marcant, dependent de doză și de timp, asupra celulelor HaCaT. După 72 de ore, chiar și concentrația cea mai mică (5 $\mu\text{g/mL}$) reduce viabilitatea celulară (70.3%), în timp ce concentrațiile mari (200 $\mu\text{g/mL}$) sunt extrem de eficiente (2%). IC_{50} calculat după 72 de ore de la stimularea cu OEO-PbH a fost de 29.69 $\mu\text{g/mL}$. B-PbH nu afectează viabilitatea celulelor la niciuna din concentrațiile testate.

Efectul anti-migrator al OEO-PbH a fost determinat utilizând testul Scratch. În urma aplicării probelor, migrarea keratinocitelor a scăzut într-un mod dependent de doză, cu o scădere semnificativă observată la concentrațiile mai mari de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Efectul citotoxic al OEO-PbH la 72 de ore după stimulare a fost evaluat pe baza eliberării de lactat dehidrogenază prin testul LDH. Se observă că începând cu 50 $\mu\text{g/mL}$ are loc o creștere a eliberării de LDH. La concentrațiile cele mai ridicate, s-a evidențiat un efect citotoxic semnificativ: $26.1 \pm 1.2\%$ la 150 $\mu\text{g/mL}$ și $26.4 \pm 1.7\%$ la 200 $\mu\text{g/mL}$. B-PbH nu a prezentat niciun efect citotoxic asupra liniei celulare HaCaT la concentrațiile testate.

Pentru a obține o perspectivă mai detaliată asupra efectului pro-apoptotic al probei la nivel nuclear, s-a aplicat colorarea Hoechst 33342. Stimularea cu OEO-PbH a indus modificări la nivelul nucleilor — fragmentare și apariția fenomenului de „membrane blebbing”.

În concluzie, rezultatele obținute *in vitro* sunt promițătoare, deoarece scăderea viabilității celulare este necesară pentru a obține efectul așteptat al OEO-PbH, reprezentat de uscarea și căderea FP.

3.7. EVALUAREA EFECTULUI IMUNOMODULATOR AL OEO-PBH PE CELULE DENDRITICE

Celulele dendritice (DCs) au fost tratate cu OEO-PbH pentru a evalua efectele asupra viabilității și secreției de citokine. După 24 de ore post-tratament, nu s-au observat efecte citotoxice sau modificări morfologice. În continuare, s-a investigat răspunsul acestor celule la tratamentul cu OEO-PbH în condiții de inflamație, indusă prin intermediul lipopolizaharidelor. Rezultatele au arătat un efect imunomodulator, OEO-PbH determinând scăderea semnificativă a producției citokinelor proinflamatorii IL-6, TNF- α și IL-23, comparativ cu celulele inflamatorii netratate. E important de menționat că nivelul citokinei antiinflamatoare IL-10 nu a fost diminuat, sugerând că tratamentul cu OEO-PbH reduce răspunsul inflamator fără a suprima factorii cu rol reglator.

Datele obținute *in vitro* indică faptul că OEO-PbH poate limita creșterea celulelor care compun FP, mecanism de dorit în contextul eliminării acestora.

3.8. TESTAREA *IN OVO* A BIOCOMPATIBILITĂȚII ȘI EVALUAREA EFECTULUI ASUPRA ANGIOGENEZEI A OEO-PBH. ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ A CAM

Pentru a investiga potențialul iritativ, s-a utilizat testul HET-CAM (Hen Eggs Test–Chorioallantoic Membrane). OEO-PbH nu a indus nicio modificare în membrana corioalantoidă (CAM) vascularizată și nu s-au observat semne de hemoragie, coagulabilitate sau liză vasculară pe parcursul celor 5 minute de analiză sau după 24 de ore de la aplicarea hidrogelului. Ca termen de comparație, la aplicarea soluției de laurilsulfat de sodiu (SLS 1%), folosită drept control pozitiv,

CAM a prezentat imediat reacții severe de iritație și hemoragie, reflectate și de un scor de iritare ridicat. Apariția unei reacții iritative nu a fost observată nici în cazul OEO și B-PbH. Nu au fost detectate semne de embriotoxicitate pe parcursul experimentului.

În continuare, s-a evaluat influența OEO-PbH asupra procesului de angiogeneză, proces relevant în contextul eliminării FP deoarece sunt leziuni bogat vascularizate. CAM au fost tratate cu doze de 200 $\mu\text{g/mL}$ OEO-PbH, respectiv OEO, și evaluate după 24 și 48 de ore. S-a constatat că OEO-PbH a limitat formarea de vase sanguine noi. La locul de aplicare, capilarele au fost mai subțiri, mai puțin numeroase și cu un grad redus de ramificare comparativ cu zonele unde s-a aplicat B-PbH. În imaginile stereomicroscopice, după 48 ore, membranele tratate cu OEO-PbH sau OEO au prezentat o densitate vasculară mult scăzută față de control, evidențiind un efect inhibitor asupra angiogenezei locale. Analiza semi-cantitativă morfometrică a confirmat că atât OEO-PbH, cât și OEO au redus semnificativ numărul de vase de sânge în zona de aplicare.

Același experiment a fost realizat apoi și în prezența leptinei, o adipokină pro-angiogenică supraexprimată în patologii cutanate precum FP. S-a remarcat că inhibiția vasculogenezei la nivel de CAM sub tratament cu OEO-PbH, respectiv OEO, este pronunțată în prezența leptinei.

Analiza histologică a CAM a oferit perspective valoroase asupra efectelor OEO-PbH, respectiv OEO, asupra angiogenezei și arhitecturii țesuturilor. Tratamentul cu OEO a dus la reducerea grosimii stratului mezodermic, subțierea ectodermului alantoidian și scăderea numărului de vase de sânge, în timp ce după tratamentul cu OEO-PbH, stratul mezodermic a suferit o schimbare arhitecturală completă, ectodermul alantoidian a fost subțiat, iar vasele de sânge au fost reduse atât ca număr, cât și ca dimensiune.

În concluzie, efectul anti-angiogenic al OEO-PbH coroborat cu acțiunea sa antiproliferativă locală indică un dublu mecanism prin care tratamentul cu OEO-PbH ar putea influența eliminarea FP.

3.9. EVALUAREA CLINICĂ A EFICACITĂȚII OEO-PBH PE SUBIECȚI UMANI

Eficacitatea și tolerabilitatea formulării OEO-PbH au fost validate în cadrul unui studiu clinic desfășurat pe un număr de 20 de pacienți care prezentau multiple papiloame cutanate. Acest studiu a fost aprobat de Comisia de etică a Cercetării Științifice UMFT (Nr. 16/02 Martie 2022, Nr. 04 a/17 Iunie 2022) și a respectat regulile de bună practică în cercetarea biomedicală și standardele stabilite prin Declarația de la Helsinki.

Conform indicației medicului dermatolog, colaborator în cadrul acestui studiu, pacienții au aplicat OEO-PbH pe papiloamele cutanate, cu ajutorul unui aplicator, de două ori pe zi timp de 8 săptămâni, fiind monitorizați la fiecare 2 săptămâni prin măsurători non-invazive și examinări clinice.

Pe tot parcursul tratamentului cu OEO-PbH, parametrii funcționali cutanați ai zonei tratate au suferit modificări moderate. S-a observat o creștere treptată a pierderii transdermice de apă (TEWL), însoțită de o accentuare ușoară a eritemului local. Concomitent, nivelul de hidratare al stratului cornos (SWC) a scăzut, indicând o uscare a suprafeței papiloamelor cutanate. Valorile acestor parametri nu au depășit limitele de siguranță și nu au indicat semne de iritație marcantă sau o afectare a pielii din jurul papiloamelor, semn că formula este bine tolerată după utilizări repetate și prelungite.

Macroscopic, papiloamele cutanate au început să se usuce și să se micșoreze încă din primele săptămâni de aplicare. După 4 săptămâni de tratament, pacienții au prezentat o reducere cu aproximativ 20–30% a numărului de leziuni în zona tratată. După 8 săptămâni de tratament, reducerea numerică a papiloamelor

a ajuns în jurul a 50%, unele FP dispărând complet, altele diminuându-și considerabil dimensiunile. Leziunile mai mari de 5 mm nu au fost influențate de OEO-PbH pe parcursul celor două luni de tratament.

Analiza histopatologică a FP înainte și după tratament a furnizat date concrete cu privire la mecanismului de acțiune a OEO-PbH. FP tratați au prezentat structuri tisulare profund alterate prin comparație cu FP netratați. Stratul epidermic a fost subțiat, cu semne de atrofie, dermul subiacent și miezul fibrovascular al FP au prezentat o densitate celulară redusă, iar calibrul și numărul vaselor de sânge din FP au fost mult micșorate. Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele înregistrate *in vitro* și *in ovo*.

4. Concluzii

Cercetarea din cadrul acestei teze de doctorat a descris efectele utilizării uleiului esențial de *Origanum vulgare* L. încorporat în miclele polimerice, ca abordare terapeutică non-invazivă pentru tratamentul papiloamelor cutanate cu o dimensiune mai mică sau egală cu 5 mm. S-a evidențiat că formularea propusă îndeplinește toate cerințele unui tratament cutanat—este stabilă în timp și ușor de aplicat, are un profil de siguranță foarte bun și exercită multiple efecte terapeutice benefice în contextul eliminării FP cu o dimensiune mai mică sau egală cu 5 mm.

În concluzie, formularea de tip hidrogel pe bază de miclele polimerice utilizate ca sisteme de cedare pentru uleiul esențial de *Origanum vulgare* L. reprezintă o alternativă promițătoare la metodele clasice de îndepărtare a papiloamelor cutanate, oferind pacienților un tratament eficient, sigur și confortabil pentru o afecțiune cutanată larg răspândită. Rezultatele obținute constituie o bază solidă pentru continuarea cercetărilor și eventuale dezvoltări ulterioare—elucidarea în profunzime a mecanismelor de acțiune, extinderea studiilor clinice, îmbunătățirea

formulării în vederea managementului papiloamelor cu dimensiunea mai mare de 5 mm, explorarea aplicării sale și în alte condiții dermatologice.