

Terápiásan alkalmazható *S*-nitrozoglutation formuláció fejlesztése

Doktori Tézisek

Hornyák István

Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományok
Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lacza Zsombor, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Antal István, Ph.D.
Dr. Kerényi Andrea, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hell Zoltán, Ph.D.
Dr. Zádori Zoltán, Ph.D.

Budapest
2012

Bevezetés

Az 1980-as évektől kezdve jelentős felfedezések történtek a biológiában egy egyszerű vegyületnek, a nitrogén monoxidnak (NO) köszönhetően. A NO részt vesz a vaszkuláris tónus szabályozásában, mint az adrenerg szabályozás antagonistája. A vérlemezke aggregációt és az érfalhoz való tapadást gátolja. Emellett a NO simaizom relaxációt okoz az érfalban és az emésztőrendszerben. A NO a központi és a perifériás idegrendszerben is kifejti hatását. A légzőszervrendszer, az emésztőszervrendszer és a nemzőszervek aktivitását is befolyásolja. A felfedezések jelentőségét az is alátámasztja, hogy 1998-ban az orvosi Nobel díjat a NO molekula szerepének vizsgálatáért osztották ki.

A kutatások ebben a témában annyira szerteágazóak voltak, hogy egy új biológiai témakör épült a NO szerepére. A NO vizsgálata elkülönült kémiai, biológiai és gyakorlati ágakra is. A NO-nak a jelen dolgozat a terápiás alkalmazását vizsgálja, ezen belül a NO szerepét a lokális vérellátás javításában. Ezen kívül egy közismert endogén NO donor, az *S*-nitrozoglutation (GSNO) stabilitását, topikális terápiás alkalmazhatóságának lehetőségeit.

Az endotél funkció romlásának közismerten komoly szerepe van a nem megfelelő lokális vérellátás kialakulásában. Kezelés hiányában érszűkület, diabétesz mellitusz és ehhez kapcsolódó szervi elégtelenségek alakulhatnak ki. Az endotél funkció romlásának egyik fő oka az endotél NO termelő rendszerének elégtelen működése. Amennyiben a NO termelő enzim rendszer működésképtelen, például cukorbeteg láb szindróma esetén, a perifériás vérellátás fokozására csak a direkt NO leadásra képes vegyületek hatásosak.

A NO donor vegyületeket öt fő csoportba oszthatjuk. Ezek közül a két legegyszerűbb képviselő a szerves nitrátok (nitroglicerín), és a szerves nitritek (amil nitrit) csoportja. Használunk továbbá szervetlen nitrozo vegyületeket (nátrium nitroprusszid), szerves imineket (molszidomin), illetve nitrozált tiolokat (*S*-nitrozoglutation).

A NO donorok közül az GSNO-t kivéve mind szisztémásan hatnak, így a GSNO fő előnye az, hogy a többi hatóanyaggal szemben helyileg alkalmazható topikális értágító, emellett metabolizmusa is jól ismert, mivel az emberi endotél eredetű értágító rendszer fontos része.

Az *S*-nitrozotiolokat (RSNO-kat) általánosságban egy tiol és egy NO forrás reakciójából állítjuk elő, ez GSNO esetén a glutation (GSH) és egy NO forrás reakciójából ered.

A GSNO alkalmazásának a legnagyobb akadálya a gyors bomlás. Szilárd formában a GSNO stabilitását főleg hűtéssel lehet fenntartani, ezért -20°C -on vagy még alacsonyabb hőmérsékleten kell tárolni. Ezen kívül fokozható a stabilitás mikronizálással, GSNO sók képzésével, illetve az inert gáz alatti tárolás is hatékony (CO_2 , N_2).

Terápiás szempontból a legfontosabbak a vizes oldatok, a GSNO stabilitását oldatban széleskörűen vizsgálták. A GSNO két tautomer formában lehet jelen, ezek megoszlása, koncentrációja is befolyásolja a stabilitást. Emellett vizsgálták fém ionok hatását, aszkorbinsav és kénhidrogén pH függő hatását.

Az irodalomból ismert NO leadásra kifejlesztett GSNO formulációk főleg filmek és hidrogélek, azonban ezeket az előállítás után azonnal felhasználták vagy lefagyasztották. Eltarthatóságot, illetve a stabilitás és a hatásosság közötti összefüggéseket nem vizsgálták. A kutatásaink során gél, film és fagyasztva szárított párnákat vizsgáltunk, mint potenciálisan alkalmazható formulációkat.

A NO leadást az egyes formulációkban spektrofotometriás méréssel követtük nyomon. Az általunk használt primer RSNO-k élekvörösek, karakterisztikus hullámhosszuk látható tartományban az 540-545 nm-es tartományban van, illetve UV tartományban 333 nm-en. Ezen a két karakterisztikus tartományban abszorbeál legintenzívebben az -S-NO kötés. Tekintve, hogy a GSNO bomlása során oxidált glutationra és NO gázra bomlik, felbomlik az -S-NO kötés, ezért a bomlást UV tartományban a 333 nm-es karakterisztikus hullámhosszon, illetve látható tartományban az 545 nm-es hullámhosszon vizsgálhatjuk.

Korábbi kísérleti GSNO alkalmazások eredményei alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy a vérnyomás csökkentő hatás alatti koncentrációjú GSNO hatékonyan csökkenti az embolizációt és a vérelemek aggregációt, ezeket akut beavatkozásoknál vizsgálták leginkább. Nagyobb dózisu GSNO alkalmazható vérnyomáscsökkentésre, például az egyéb értágító kezelésre nem reagáló pácienseknél. További előny, hogy a GSNO helyi alkalmazása bőrön, vagy nyálkahártyán át hatékonyan használható helyi értágítóként szisztémás vérkeringési zavarok kiváltása nélkül.

Célkitűzés

1. Kísérleteink során a kémiai környezetben belül a másodrendű kötések, a pH, az inert atmoszféra és gyökfogó enzimek bomlásra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Azt vizsgáltuk, hogy ezeknek a tényezőknek a változtatásával lassítható-e a bomlás, illetve azt, hogy milyen mechanizmus állhat a stabilizálás/destabilizálás hátterében?
2. A terápiás alkalmazás szempontjából fontos kérdés, hogy maga a GSNO-e a hatóanyag, és ha igen, akkor hogyan fejt ki a hatását. Ez két fő lehetőséget vet fel: az egyik során a GSNO a szervezetben belül fejt ki a hatását (a GSNO enzim katalizált körforgásában, vagy mint NO donor), míg a másik esetben a GSNO nem jut be a szervezetbe, csak a bomlásterméke, a NO. Ezért arra kerestük a választ, hogy ha a GSNO nem jut be a szervezetbe, akkor a bediffundáló gáz önmagában elég hatékony-e?
3. A hatékony formuláció kifejlesztéséhez szükséges a hatásmechanizmus ismerete, és egyfajta „controlled release” szabályozás szükséges. Ennek a megvalósításához számba kell venni a kémiai környezet, a stabilitás és a hatásosság optimális értékeit és mindezt egy gyógyszerészetileg használható formulációban szükséges ötvözni. A jelen kutatás végcélja, hogy a tudományosan megalapozott stabilitás vizsgálatokat át lehessen ültetni a gyakorlatba. A fő kérdés tehát az volt, hogy terápiásan alkalmazható topikális lokális értágító formuláció kifejleszthető-e az eredményeink alapján?

Anyagok és módszerek

Gél mátrixok előállítása (hidrogél, film, liofilizált párna)

A vizes GSNO oldatokat a fent említett segédanyagok használatával próbáltuk stabilizálni. A tesztelt géleket víz és különböző koncentrációjú PVA (0-12 m/m %), PEG (0-55 m/m %) és gyógyászatilag elfogadott segédanyagok (pl. kitozán) hozzáadásával állítottuk elő. A

gélképzőket vízben, homogén oldat eléréséig kevertettük 20-60°C között. A stabilitás vizsgálatokhoz a 80 mM-os kiindulási törzsoldatot hígítottuk 1:1 arányban a polimerek vizes oldatával, tehát a használt hidrogél oldatok 40 mM-os GSNO koncentrációjúak voltak. A megmaradt GSNO mennyiségét a kiindulási abszorbancia százalékában fejeztük ki, vagyis a frissen elkészített GSNO elegyek abszorbanciáját lemértük, majd a tárolási szakasz után ismét mértük az abszorbanciát. A stabilitást a tárolási időszak után megmaradt hatóanyag mennyiségével jellemeztük, százalékban kifejezve. A gélképzők hatását a fent említett gyógyászati elfogadott segédanyagok hozzáadásával is fokoztuk:

- PVA (polivinil-alkohol)
- PEG (polietilén-glikol)
- kitozán (Chi)
- Na-alginát
- dextrin
- dextrans
- HPC (hidroxipropil cellulóz)
- HPMC (hidroxipropil metilcellulóz)
- galaktán

Ezekből a segédanyagokból 0,01g/ml (1 m/m %) mennyiséget használtunk fel minden esetben. Az arra alkalmas gél mátrixokból filmeket képeztünk, egyszerűen csak a gélek víztartalmának elpárologtatásával, és a filmek stabilizáló hatását is mértük. A filmképzésen kívül a stabilizálást fagyasztva szárítással (liofilizálás) is próbáltuk növelni. Az oldatokat 4°C-on tároltuk fény kizárása mellett, különböző tárolási időszakon át, zárt 96 lyukú lemezekon, hogy az oldat párolgását megelőzzük.

Enzimek és inert atmoszféra hatása

A GSNO törzsoldat stabilitását enzimek jelenlétében is vizsgáltuk. A kísérlethez szuperoxid diszmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) és kataláz (Cat, EC 1.11.1.6) enzimeket használtunk, mindkettőből 500 U/ml-t. A stabilitást N₂ atmoszféra alatt is vizsgáltuk, mely esetben N₂-t buborékoltattunk át a savas illetve a módosított pH-jú oldatokon. A bomlást spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk 540 nm-es hullámhosszon. Az oldatokat 4°C-on tároltuk, 5 napig fény kizárása mellett, zárt, 96 lyukú lemezekon, hogy az oldat párolgását megelőzzük.

pH hatása

A pH stabilizáló hatását a GSNO, és két további RSNO; *S*-nitrozoacetilcisztein (SNAC) és *S*-nitrozo-3-merkaptopropionsav (SN3MPA) esetében is vizsgáltuk, mind az előállítás, mind a tárolás tekintetében. A GSNO és SNAC oldatokat különböző pH-n állítottuk elő, a pH értéket 0,3 és 12,6 között teszteltük. Az oldatokat 4°C-on tároltuk, fény kizárása mellett, zárt, 96 lyukú lemezekon, hogy az oldat párolgását megelőzzük.

Ionos mechanizmus vizsgálata UV spektroszkópiával

Az ionos mechanizmust vizes oldatban UV spektroszkópiával tudjuk nyomon követni, ugyanis az UV spektrumon bekövetkező változás mindenképpen valamelyik összetevő atom-, vagy molekulapályájának megváltozott elektronszerkezetéről ad tanúbizonyságot. A bomlás karakterisztikájának vizsgálatához ezért a GSNO mellett a GSNO-hoz hasonló szerkezetű vagy elnyelésű tiolok (GSH, nátrium hidrogénszulfid), nitrozovegyületek (SNAC, SN3MPA) UV spektrumának változását is vizsgáltuk a kémiai környezet (esetünkben a pH) megváltoztatásának hatására. A mérésekhez 20-80 mM-os koncentrációjú oldatokat használtunk.

Gyökös bomlás vizsgálata TEMPOL és DEPMPO gyökfogó jelenlétében

80 mM-os GSNO oldatok bomlását vizsgáltuk 1 mM TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil), illetve 20 mM DEPMPO (5-(di-tioxifoszforil)-5-metil-1-pirrolin-N-

oxid) jelenlétében, vizes oldatban. A mérés során a TEMPOL gyök jelének csökkenését vizsgáltuk elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópiával. A TEMPOL jele a GSNO-ból keletkezett gyökökkel arányosan csökkent. Négy oldatot vizsgáltunk, a kontroll oldat pH-ja 4,2 volt, a módosított pH-jú oldaté 8,8 volt, mindkét oldatot légköri és N₂ atmoszféra alatt is vizsgáltuk. A mérést a TEMPOL középső ESR jelének maximális amplitúdójához tartozó frekvenciáján mértünk 300 másodpercig, 20°C-on.

A DEPMPO esetében a szabad gyökkel alkotott addukt jelintenzitását vizsgáltuk ESR spektroszkópiával, ami a GSNO bomlás során keletkezett gyökökkel arányos jelintenzitás növekedésen alapszik. Két oldatot vizsgáltunk, a kontroll oldatot légköri körülmények között (pH= 4,2), illetve a módosított pH-jú oldatot (pH=8,8) N₂ gáz alatt.

Véráramlás mérés

A bőrfelszín alatti mikrocirkulációt egy 'PERIMED Pericam PSI' típusú készülékkel végeztük, amely a laser Speckle kontraszt elemzés elvén mér. A kísérlet során 20 µl 40 mM GSNO oldat értágító hatását vizsgáltuk 0,8 mm x 0,8 mm-es területen, 25 miliszekundomonként mértünk. Mindkét készülék használata során minden mérés után a vörösvértest intenzitást minimum, maximum és átlagos értékkel jellemeztük. Ezek alapján pedig kiszámoltuk a véráramlás maximális növekedését (Q_{max}), azt az időt, ami a maximális véráramlás eléréséhez szükséges (t_{peak}), és azt az időt, ami alatt a véráramlás a maximális értékről az 50%-ára ($t_{1/2}$) csökkent. A kísérleteket humán alanyokon végeztük.

Statisztikai analízis

Minden adatot átlagértékben fejeztünk ki, az esetszám n=1 vagy n=2 volt, a mintákat duplikáltuk. Az adatokat a Student féle t-próbával, egy vagy két változós varianciaanalízissel, és Bonferroni post-hoc teszttel elemeztük, annak megfelelően, hogy az adott értékalmazra melyiket célszerű használni (Graphpad, Prism 4). Az egyes adatok közötti különbséget akkor vettük szignifikánsnak, amennyiben $p < 0,05$ volt. Ezt a szignifikancia különbséget „*“-gal jelöltük, $p < 0,01$ esetén „**“, $p < 0,001$ esetén „***“.

Eredmények

GSNO formulációk előállítása (hidrogél, film, liofilizált párna)

A három tesztelt formuláció eltérően stabilizálta a GSNO-t, az optimalizált összetételű formulációk tárolási kísérleteinek eredménye az 1. táblázatban szerepel.

	napok	maradék GSNO %	hőmérséklet
gél	14	több mint 90 %	4°C
film	28	több mint 36 %	4°C
liofilizált párna	7	több mint 88 %	4°C

1. táblázat: A három különböző formulációval elért tárolási kísérletek eredményei

Az eredmények alapján arra jutottunk, hogy a vizes gél kompozíció a legkedvezőbb, ezért ezt a formulációt választottuk a további kutatás-fejlesztés alapjául. A tárolási időket úgy választottuk meg, hogy az ugyanahhoz a kísérlethez tartozó minták összehasonlíthatóak legyenek.

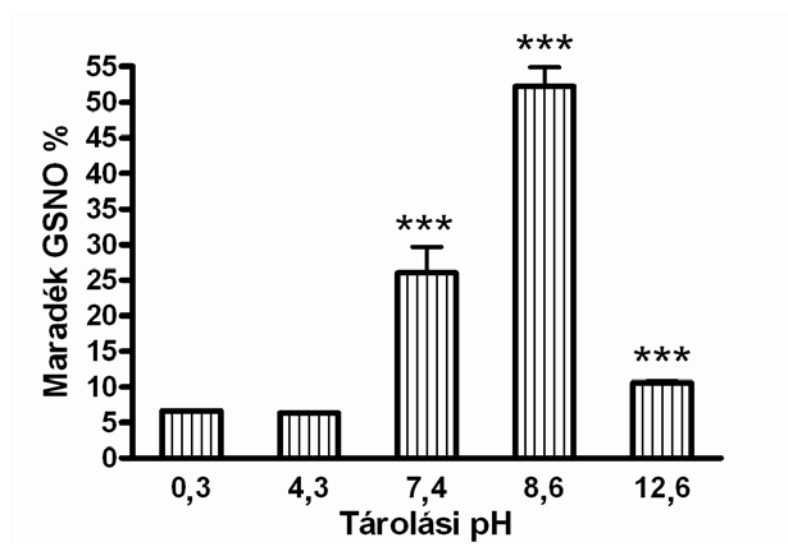
Enzimek és inert atmoszféra hatása

A mérés során azt tapasztaltuk, hogy a N₂ atmoszféra stabilizáló hatása a meghatározó, a Cat és az SOD együttes hatása sem olyan hatékony, mint a N₂-es átbuborékoltság.

pH hatása

A pH módosítása a GSNO képződési reakciót is és a stabilitást is befolyásolja, a pH-t kezdetben egyszerű vizes oldatokban 0,3 és 12,6 közötti értékek között változtattuk, mértük a kiindulási abszorbanciát, majd 7 napig tároltuk az oldatokat 4°C-on, fény kizárása mellett. Meglepő, hogy ugyan az előállításnak az erősen savas pH kedvez, azonban a stabilitás nagyon

gyenge, mindössze $6,7 \pm 0,1$ % maradt a kiindulási mennyiségből 0,3-as pH értéken. Az is váratlan volt, hogy enyhén lúgos pH-n volt a legstabilabb (stabilabb, mint fiziológias pH-n), majd a stabilitás ismét csökkent az erősen lúgos tartományban. Az eredmények alapján a GSNO pH=8,6-os értéken volt a legstabilabb, 7 nap után a kiindulási mennyiség $52,17 \pm 2,72$ %-a maradt meg (1. ábra).



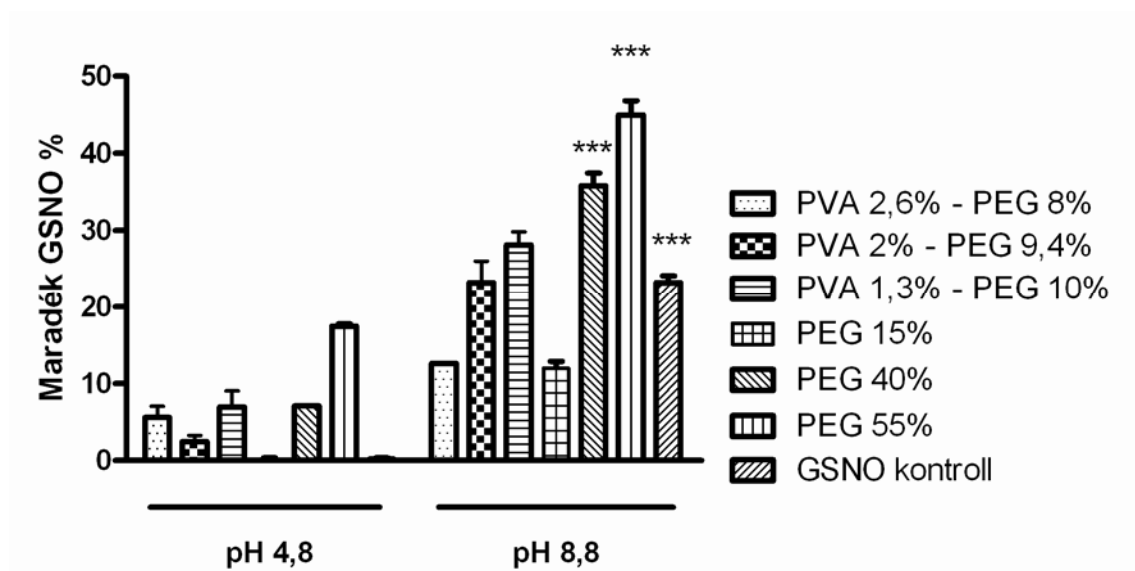
1. ábra: A pH hatása a GSNO lebomlásra, egyszerű vizes oldatokban 7 nap tárolás után 0,3-12,6-os tartományban, (n=4). Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** p <0,001 a pH=8,6-os oldat és az összes többi oldat között. *** p <0,001 a pH=7,4-es oldat és az összes többi oldat között. *** p <0,001 a pH=12,6-os oldat és az összes többi oldat között.

Az enzimek és a N₂ atmoszféra hatását összevetettük a pH változtatásával, és azt az eredményt kaptuk, hogy az enyhén lúgos pH stabilizáló hatása szignifikáns, sem a N₂ atmoszféra sem az enzimek nem növelték szignifikánsan a stabilitást, a pH módosítás volt a legfontosabb tényező.

A pH-t, mint az eredményeink szerinti meghatározó stabilizáló hatású körülményt ezek után kombináltuk azokkal a gyógyászatilag ismert gélképző segédanyagokkal, amelyek (feltételezhetően másodrendű kötések segítségével) gátolják a GSNO bomlását.

A pH módosítás nélküli gélekben (pH=4,8) a kiindulási GSNO-nak mindössze 0-25 %-a maradt meg 25 nap után. Fontos megjegyezni, hogy a gélekben semmi fizikai változás nem volt

látható, mind transzparens és homogén volt. A legjobb eredményt az 55% PEG-et tartalmazó oldatnál érték el, ebben a kompozícióban a kiindulási GSNO 45,3 %-a maradt meg 25 nap után. Az elegyeket 4°C-on tároltuk, fény kizárása mellett (2. Ábra).



2. ábra: A gélképzők stabilizáló hatása módosítatlan (pH=4,8) és módosított kémhatású (pH=8,8) oldatokban, (n=4). Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** p <0,001 a 40 % PEG-et, az 55 % PEG-et tartalmazó pH=8,8-as oldat és az összes többi pH=4,8-es oldat között. Ezen kívül a kontroll pH=8,8-as GSNO oldat és az összes többi pH=4,8-es oldat között

Ionos mechanizmus vizsgálata UV spektroszkópiával

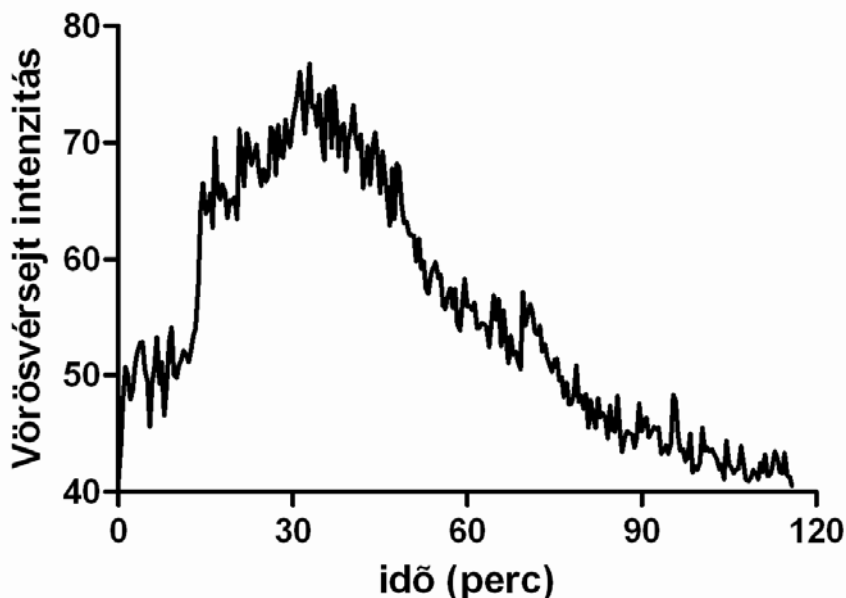
A pH módosítás során vizsgáltuk a GSNO spektrumán fellépő változásokat, és azt tapasztaltuk, hogy új karakterisztikus sávok jelentek meg enyhén lúgos pH-n.

Gyökös bomlás vizsgálata TEMPOL és DEPMPO gyökfogó jelenlétében

Mind savas mind lúgos GSNO oldatban mértük a TEMPOL jelének csökkenését légköri körülmények között és N₂ gáz alatt is. Az eredmények alapján a gyök képződés (ami egyenesen arányos a TEMPOL redukciójával) csökkent az enyhén lúgos (pH = 8,8) oldatokban a savas oldathoz képest. Két nagyságrendnyi különbség van a leggyorsabb és a leglassabb bomlási

sebesség között. A legstabilabb a lúgos N_2 alatt tárolt oldat, a N_2 minden esetben lassította a bomlást a légköri körülmények között tartott oldatokhoz képest, de a pH módosítás volt a hatásosabb. A DEPMPO-val végzett mérések eredményeként azt kaptuk, hogy a pH eltolása nem más útra tereli a reakciót, csak a reakció sebességét lassítja, valószínűleg polarizáció miatt, vagyis az ionos komplex létrejötte helytállóan tűnik.

Véráramlás mérés



3. ábra: 40 mM-os GSNO oldat hatása a véráramlásra
laser Speckle kontraszt elemzéssel (n=8).

A relatív véráramlás növekedést az optimális, 25 napig tárolt GSNO hidrogél alkalmazásával váltottuk ki. A mérést laser Speckle kontraszt elemzéssel végeztük, a mért maximális relatív véráramlás érték $96,20 \pm 35,29$ volt, a kiindulási relatív érték $36,29 \pm 10,16$ volt (3. ábra). Ennek a kísérletsorozatnak az eredményei szerint a véráramlás $24,16 \pm 9,38$ perc alatt érte el a maximális intenzitást, ez a véráramlás érték ezután $33,75 \pm 15,06$ perc múlva csökkent a maximális érték 50%-ára (n=8).

Megbeszélés

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az RSNO oldatok (GSNO és SNAC) előállításánál 20,04 %-kal, illetve 23,18 %-kal magasabb kezdeti koncentrációt értünk el, ha az előállítást savas kémhatású NaNO_2 oldatban ($\text{pH}=1,6$) végeztük lúgoshoz képest. A kezdeti NO donor koncentráció pedig lassabban csökkent, ha a pH -t enyhén lúgosra ($\text{pH}=8,4-8,8$) módosítottuk a tárolási szakaszban. A bomlás sebességét tovább lehetett csökkenteni PVA/PEG polimer mátrixok alkalmazásával. A kombinált módszerrel a kiindulási GSNO koncentráció 45,3 %-át lehetett megőrizni 25 nappal az előállítás után. Ennek a kompozíciónak a topikális alkalmazásával 200 % fölé emeltük a vörösvértest intenzitást, ezzel bizonyítva, hogy a stabilizálás nem ront a biológiai hatáson.

Tehát mi is alátámasztottuk a polimerek stabilitás fokozó hatását, de a pH -nak még jelentősebb a szerepe eredményeink alapján. Mivel a szerkezetvizsgálat vizes oldatokban nagyon limitált, ezért a bizonyításainkat csak az UV spektroszkópiára és az ESR spektroszkópiára alapoztuk. A bomlás során az UV spektrumon bekövetkezett változások és a tárolási szakasz alatti folyamatos pH csökkenésből arra lehet következtetni, hogy a bomlás során sav keletkezik, valószínűleg a GSSG keletkezése miatt. Mivel a tárolási szakasz után a jelenlévő csúcsok mellett újakat nem láttunk a spektrumon, ezért logikus magyarázat, hogy a pH módosítás miatt nem új útra tereltük a bomlást, nincs eddig ismeretlen bomlástermék. A GSNO bomlásterméke GS^- (általánosan az RSNO bomlásterméke a megfelelő RS^-) a lebomlás során. A GS^- ionok részt vesznek a GSNO lebomlásában, mint köztes bomlástermék, majd a bomlás végső terméke GSSG, amely további pH változtatások hatására sem változott. Az eredményeink tehát azt mutatják, hogy a pH változtatás miatt bekövetkező növelt stabilitás a szulfid ion elektronszerkezetében létrejött változások miatt van, valószínűleg egy ionos átmeneti komplex formálódása miatt.

Az ESR spektroszkópia során meghatározott bomlási sebesség különbség majdnem két nagyságrendnyi volt. Ebből is arra lehet következtetni, hogy a gyökös mechanizmusú lebomlás lassult, valószínűleg polarizáció és ionos komplex keletkezése miatt, ami lassítja a gyökös bomlást, feltételezhetően az RSNO tautomer arány ionos forma felé tolásával, és ennek stabilizálásával. Összehasonlításként és kiegészítésként vizsgáltuk bizonyos gélképzők stabilitását módosítatlan és lúgos kémhatású vizes oldatokban, hogy tovább növeljük a GSNO

stabilitását. A fő szempont a stabilizáló hatás volt, de fontos volt a kezelhetőség, egyszerűség, ár is.

Számos kísérlet után a legjobb gélképzők a PEG és a PVA voltak, különböző koncentrációkat vizsgáltunk a továbbiakban. Nagy mennyiségű PEG hozzáadásával majdnem 20 %-a maradt meg a kiindulási GSNO-nak, 25 nap tárolás után, savas kémhatású oldatban, kísérleteink azonban alátámasztották, hogy a pH módosítás hatékonyabb, mint önmagában csak a PEG hozzáadása. A mi kísérleteink is bebizonyították, hogy viszonylag alacsony mennyiségben használt polimerek is csökkentik a bomlást, de a pH módosítással kombinálva szignifikánsan jobb hatást értünk el, tehát a stabilizáló hatást erősen pH függőnek találtuk. A legjobb kompozícióban, amelyben 55 m/m% PEG-et használtunk, közel a fele maradt meg a kiindulási GSNO mennyiségének 25 nap után. Mindent összevetve bizonyos polimerek, illetve szacharidok, ezek közül is kimondottan a PEG valószínűleg intermolekuláris kötésekén keresztül stabilizál, és a pH módosítással kiegészítve a stabilitás tovább fokozható az elméletünk szerinti szulfid komplex létrejöttével.

A biológiai hatékonyság tesztelésére humán alanyokon vizsgáltuk a GSNO értágító hatását, a legstabilabb kompozíciót használtuk 25 nap tárolás után. A kísérletben azt tapasztaltuk, hogy ez a megmaradt GSNO mennyiség az adott kompozícióban még mindig több mint 200 %-kal növelte a vörös vérttest intenzitást. Ezzel arra az eredményre jutottunk, hogy a GSNO potenciálisan alkalmazható topikális értágító.

Következtetések

Az *S*-nitrozotiolok kiszámíthatatlanul gyors bomlása komoly akadálya annak, hogy terápiásan alkalmazható NO donorokként használjuk ezeket a vegyületeket. Emiatt klinikailag indokolt, hogy elérhessünk és megtarthassunk egy magasabb RSNO koncentrációt, illetve hogy megalkossunk egy olyan formulációt, amellyel az előállításától megőrizzük a biológiai aktivitást addig, amíg eljut a felhasználóig.

Kísérleteinkkel alátámasztottuk, hogy a GSNO és a SNAC oldatokat szinte sztöchiometrikus mennyiségben sikerült előállítani a kiindulási tiolokból, erősen savas NaNO₂ oldattal, amelyet a legcélszerűbb enyhén lúgos pH-n tárolni, polimer mátrixok jelenlétében.

Az enyhén bázikus pH a módosíthatlan kémhatású oldattal szemben közel két nagyságrenddel (95,9 %) lassította a gyökös bomlást. Az ESR mérések alapján ezt egy stabilabb ionos komplex képződésével magyarázzuk. A pH módosítás miatt bekövetkező RSNO szerkezeti változásra az UV spektrumon megjelenő új elnyelési sávokból következtettünk. A módosított pH, amely a hosszú távú eltárolhatóságot teszi lehetővé enyhén lúgos, de még a fiziológiásan elfogadható tartományban van, tehát alkalmassá teszi terápiás alkalmazásra.

Az optimalizált komponensek és pH módosítás alkalmazásával a kiindulási hatóanyag 45,3 %-át tudtuk megőrizni 25 nap után, ez a kompozíció még mindig több mint 200 %-kal fokozta a véráramlást.

Ez a felfedezés egy új lehetőséget nyújt egy stabil, de ettől függetlenül biológiailag aktív topikálisan alkalmazható RSNO oldat, vagy gél formuláció megalkotására, amit széles körben lehet alkalmazni a helyi vérellátás javítására, a cukorbetegséggel járó mikrocirkulációs panaszoktól a sebgyógyítás elősegítéséig.

Publikációk

[Az értekezés témájában megjelent cikkek](#)

[Tudományos cikkek:](#)

Hornyak, I.; Pankotai, E.; Kiss, L.; Lacza, Z. Current Developments in the Therapeutic Potential of S-Nitrosoglutathione, an Endogenous NO-donor Molecule. *Curr Pharm Biotechnol.* **12**:1368-1374; 2011.

IF:3,35

Dongó, E.; **Hornyak, I.**; Benkő, Z.; Kiss, L. The cardioprotective potential of hydrogen sulphide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Acta Physiol Hung.* **98**:369-381; 2011.

IF:1,2

Hornyak, I.; Marosi, K.; Kiss, L.; Gróf, P.; Lacza, Z. Increased stability of S-nitrosothiol solutions via pH modulations. *Free Radis Res.* **46**:214-225; 2012.

IF:2,8

Szabadalmak:

Lacza, Z.; **Hornyak, I.** Pharmaceutical Composition Comprising S-nitrosoglutathione and polisaccharide. 2009. **WO2009050527A1**

Lacza, Z.; **Hornyak, I.** Method for stabilitation of S-nitrosoglutathione and composition prepared by the same. 2009. **WO2009090439A2**

3.1. Nem a tézis témájához kapcsolódó publikációk

Niesz, K., **Hornyak, I.**, Borcsek, B., Darvas, F., Nanoparticle synthesis completed with in situ catalyst preparation performed on a high-pressure high-temperature continuous flow reactor, *Microfluid Nanofluidics*, 2008, 1613-4982

IF:3,314

