

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet

ABSZORPCIÓFOKOZÓ FELÜLETAKTÍV ANYAGOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA BIOLÓGIAI GÁTRENDSZEREK TENYÉSZETES MODELLJEIN

Ph.D. értekezés tézisei

Kiss Lóránd

Témavezetők:

Dr. habil. Deli Mária, M.D., D.Sc.
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biofizikai Intézet

Prof. Dr. habil. Révész Piroska, Pharm.D., D.Sc.
Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertechnológiai Intézet



Szeged
2014

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológiai Ph.D. program
Programvezető: Prof Dr. Révész Piroska

Gyógyszertechnológiai Intézet

Témavezetők

Dr. habil. Deli Mária, M.D., D.Sc.
Prof. Dr. habil. Révész Piroska, Pharm.D., D.Sc.

Kiss Lóránd

ABSZORPCIÓFOKOZÓ FELÜLETAKTÍV ANYAGOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA BIOLÓGIAI GÁTRENDSZEREK TENYÉSZETES MODELLJEIN

Szigorlati Bizottság

Elnök

Prof. Dr. Erős István, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet

Tagok

Dr. Vecsemyés Miklós, DE, Gyógyszertechnológiai Intézet
Dr. Gáspár Róbert, SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló Bizottság

Elnök

Prof. Dr. Hohmann Judit, SZTE Farmakognóziai Intézet

Opponensek

Dr. Tihanyi Károly, Gedeon Richter Nyrt.
Prof. Dr. Zelkó Romána, SE, Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet

Tagok

Dr. Borsodi Anna, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet
Dr. Martinek Tamás, SZTE Gyógyszeranalitikai Intézet

Szeged
2014

1. BEVEZETÉS

A gyógyszerek biohasznosulását több tényező is befolyásolja, így az aktív molekulák fizikokémiai tulajdonságai, az alacsony penetrációs képességük a biológiai gáton, az alkalmazás helye, a vérplazma fehérjékhez való affinitás, a lebontó enzimekre való érzékenység, vagy a kiválasztás gyorsasága. Ebből kifolyólag számos hatóanyag farmakokinetikája és átjutása a biológiai gáton nem elég hatékony. A gyógyszer technológiai kutatások fontos tárgyát képezi a hatóanyagok felszívódásának elősegítése, mely különböző módszerek és segédanyagok alkalmazásával történhet.

A biológiai gátak, mint például a bőr, a bélrendszer, a vér-magzat vagy a vér-agy gátak elválasztják a szervezetet a külső környezettől, illetve a belső szerveket egymástól. Ezek a védőfunkcióval rendelkező fiziológiás gátrendszerek elengedhetetlen szerepet játszanak testünk homeosztázisának fenntartásában, azonban a gyógyszerek bejutását is korlátozzák. A hatóanyagok perorális alkalmazása széles körben elfogadott, biztonságos és hatékony gyógyszerbeviteli kapu, azonban a gyógyszerek bejutása a szoros zárókapcsolatokat (tight junction) kialakító epitélisejtek miatt korlátozott. A hatóanyagok átjutását elsősorban a sejtek membránpermeabilitása (transzcelluláris átjutása) határozza meg ezen a barrieren, de jelentős szerepe van a sejtek közötti paracelluláris traszportútnak is.

Abszorpció fokozó segédanyagokkal lehetséges az alacsony penetrabilitású gyógyszerek átjutását javítani, így jelentősen növelni a biohasznosulásukat. Az intesztinális abszorpció fokozók különböző mechanizmusok útján fokozzák a hatóanyagok bejutását és a biohasznosulását: (1) megnövekedett hatóanyag oldékonysággal, (2) szoros zárókapcsolatok nyitásával, (3) membrán fluiditás növelésével vagy a lipid kettősréteg átmeneti módosításával, (4) komplex képzéssel vagy ion-párok kialakításával, (5) lebomlás/metabolizmus megakadályozásával.

A felületaktív anyagok (tenzidek) olyan amfifil molekulák, amelyek egyszerre rendelkeznek lipofil és hidrofil sajátsággal. Ezek általánosan használt oldékonyság javítók a perorális, nazális és injekciós formulációkban, továbbá számos közlemény beszámolt abszorpció fokozó hatásukról is. A Cremophor^R és Tween^R nem-ionos tenzid családok, melyek gyakran alkalmazott segédanyagok a gyógyszerészeti kutatásban és fejlesztésben. Jó emulgeáló és abszorpció fokozó tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban kedvező tulajdonságaik ellenére néhányuk alkalmazása mellékhatásokkal jár. Ezért fontos a jobb tulajdonságokkal és kedvezőbb farmakológiai sajátsággal rendelkező új, innovatív abszorpció fokozók kutatása és vizsgálata.

A cukorészterek, a szacharóz és zsírsavak észterei, egyre intenzívebben vizsgált anyagok a gyógyszerkutatásokban, mert jó oldódástnövelő és abszorpció fokozó sajátságokkal rendelkeznek. Korábbi vizsgálatok alapján ezek az anyagok különböző gyógyszer formulálásokban hatékony segédanyagoknak bizonyultak, így ígéretes új jelöltek a hatóanyagok biohasznosulásának fokozására. A kutatásaink és a Ph.D. tézisem fókuszában a klinikailag alkalmazott, valamint új gyógyszerészeti segédanyagok vizsgálata és összehasonlítása áll *in vitro* intesztinális és vaszkuláris tenyészetes modelleken.

2. CÉLKITŰZÉS

A munka fő célkitűzése volt feltárni azokat a mechanizmusokat, amelyek a nem-ionos felületaktív anyagok esetében, különös tekintettel a cukorészterekre, fokozzák a gyógyszerek permeabilitását az intesztinál barrier sejtes modelljén. Három kiválasztott cukorészter, amelyek megfelelő segédanyagok lehetnek, hatását hasonlítottuk össze a klinikailag alkalmazott Tween 80, Cremophor RH40 és Cremophor EL referencia felületaktív anyagok hatásához. A tézis fő céljai a következők voltak:

- (I) meghatározni és összehasonlítani a felületaktív anyagok intesztinális epitél- és vaszkuláris endotélsejtek életképességére kifejtett hatását,
- (II) megállapítani a vizsgált anyagok hatásait a hatóanyagok permeabilitására,
- (III) azonosítani a gyógyszer átjutás fokozásának útvonalait az intesztinális barrier modellen,
- (IV) részletesen vizsgálni a kiválasztott tenzidek hatását a sejtközötti kapcsolatokra és a membrán fluiditásra.
- (V) meghatározni a felületaktív anyagok efflux transzporterekre gyakorolt hatásait

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált felületaktív anyagok

Három, különböző zsírsavészterert használtuk a kísérleteinkben, a palmitát (P-1695), a mirisztát (M-1695) és laurát (D-1216) zsírsavak cukor észtereit (Mitsubishi Kagaku Foods Co., Tokió, Japán). A Tween 80, Cremophor RH40 és Cremophor EL (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Németország) voltak a referencia felületaktív anyagok.

3.2. Sejttenyésztés

Az abszorpció fokozók tesztelésére humán Caco-2 intesztinális epitél, humán hCMEC/D3 agyi endotél, humán MES-SA uterin szarkóma és ennek doxorubicin-szelektált változata, MES-SA/Dx5 sejtvonalak és primer patkány agyi endotélsejtek kerültek felhasználásra. A Caco-2 sejteket Eagle's Minimal Essential Medium tápfolyadékban tenyésztettük 10 % magzati borjú szérummal, 1% nátrium-piruváttal, és 50 µg/ml gentamicinnel kiegészítve. A hCMEC/D3 endotélsejtek tenyésztése Endothelial Basal Medium-2 tápfolyadékban Endothelial Growth Medium-2 BulletKit (Lonza, Basel, Switzerland) és 2,5 % magzati borjú szérummal kiegészítve történt. A primer agyi endotélsejtek 3 hónapos patkányok agyából lettek izolálva, melynek részletes leírása Veszelka és mtsai. munkájában található (Neurochem Int, 2007, 50:219-228). A MES-SA sejtek és a szelektált változata (MES-SA/Dx5), amely magas P-glikoprotein (P-gp) expressziót mutat, a P-gp funkcionalitásának vizsgálatára használtuk fel. Ezeket a sejteket Dulbecco's Modified Eagle Medium tápfolyadékban tenyésztettük, amelyet kiegészítettünk 10 % magzati borjú szérummal, 5 mM L-glutaminnal és 50 U/ml penicillin/sztreptomocinnel. A sejteket 37°C-on, 5 % CO₂-on és magas páratartalmú inkubátorban tenyésztettük. A rezisztencia és permeabilitás mérésekhez, valamint az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a Caco-2 sejteket Transwell betéteken tenyésztettük (polikarbonát membrán, 0,4 µm pórus méret, Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA). A sejtmag, a sejtkapcsolatok és F-aktin festésekhez a sejtek üveg fedőlemezekben (Menzel-Gläser, Braunschweig, Németország) nőttek.

3.3. *In vitro* életképesség mérések

A nem-ionos felületaktív anyagok hatását sejtek életképességére különböző módszerekkel határoztuk meg: MTT festék konverzával, laktát dehidrogenáz (LDH) enzim felszabadulás

méréssel, és kettős sejtmag festéssel. A valós idejű sejt impedancia mérés szintén megbízható információval szolgál a sejtek állapotáról, így jól használható sejttoxicitás mérésre is.

A három kiválasztott cukorésztert 3-3000 µg/ml koncentráció tartományban alkalmaztuk, míg a Tween 80, Cremophor RH40 és Cremophor EL-t 1-100000 µg/ml koncentrációk között vizsgáltuk. A kezeletlen sejtek (kontroll csoport) csak tápfolyadékot kaptak.

MTT festék átalakítás: a sárga 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT) festéket az élő sejtek felveszik és átalakítják kék színű formazán kristályokká. A festékátalakítás mértéke meghatározza a sejtek metabolikus aktivitását, így utal az életképességükre. Caco-2 epitél- és hCMEC/D3 endotélsejteket a felületaktív anyagokkal kezeltük meg, majd inkubáltuk az MTT festékoldattal. Az MTT-ből képződött formazán kristályokat dimetil-szulfoxiddal oldottuk fel és mennyiségüket abszorbancia méréssel (Fluostar Optima microplate reader, Németország) határoztuk meg.

LDH felszabadulás mérés: a sejtekből felszabaduló citoplazmatikus laktát dehidrogenáz enzim a sejtmembrán károsodását jelzi, ezért a nekrotikus sejtpusztulás indikátoraként is használható. A membránkárosító hatás mértékével arányosan nő a felülúszóból mérhető LDH mennyisége, amit kolorimetriás módszerrel határoztunk meg (Roche Kit).

Kettős fluoreszcens sejtmag festés: a sejtek életképességét morfológiai mérésekkel is igazoltuk. A *bis*-bezimide (Hoechst 33342) minden sejtmagot kékre fest, míg az etidium-homodimer-1 csak az elpusztult sejtek magját képes pirosra festeni. Caco-2 intesztinális és primer patkány endotélsejteket Cremophor RH40 és Cremophor EL segédanyagokkal kezeltünk meg, majd a kezelt sejtekhez hozzáadtuk a fluoreszcens sejtmagfestékeket. Az inkubáció végén a sejteket fixáltuk, majd a junkciós fehérjék immunfestésével folytattuk a folyamatot.

3.4. Fluoreszcens aktin-jelölés és sejtkapcsoló fehérjék immunfestése

A kezelések kiváltotta morfológia változások és a sejtkapcsolatok vizsgálatára Caco-2 sejtek klaudin-1 és -4 szoros zárófehérjéit (tight junction), ZO-1 citoplazmatikus kapcsoló fehérjéjét és β-katenin adherens fehérjéjét festettük meg. Az aktin mikrofilamentumok (F-aktin) fluoreszcensen jelölt falloidinnel, míg a sejtek magja bis-benzimiddel lett megfestve. Továbbá vizsgáltuk a primer patkány agyi endotélsejtek szoros kapcsolatait is a sejtek klaudin-5 fehérjéinek festésével. A sejteket üveg fedőlemezen növesztettük és a konfluens tenyészetet a felületaktív anyagokkal kezeltük. A kezeléseket követően a sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk és a nem specifikus antitest kötőhelyeket blokkoltuk. A fixált sejteket az elsődleges antitestekkel inkubáltuk, majd mosást követően a másodlagos fluoreszcens jelölést tartalmazó

antitesteket adtuk a sejtekhez. A festéseket Leica SP5 konfokális, valamint NikonEclipse TE2000 fluoreszcens mikroszkópokkal vizsgáltuk.

3.5. Elektronmikroszkópia

A polikarbonát membránokon tenyésztett Caco-2 sejteket kezeltünk a nem-ionos tenzidekkel, majd ezt követően fixáltuk a sejteket. A mintákat a fixálás után háromszor mostuk kakodilát pufferben, majd kivágtuk a membránokat a tenyésztőbetétekből és 24-lyukú lemezbe helyezve utófixáltuk osmium-tetraoxidban. Desztillált vizes mosást követően a mintákat felszálló alkohol sorral dehidratáltuk és uranil-acetátban inkubáltuk, majd Taab 812 beágyazószerral blokkot készítettünk. Leica UTC ultramikrotóm (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) segítségével ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket Hitachi 7100 transmmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi Ltd., Tokió, Japán) vizsgáltuk meg.

3.6. Impedancia és rezisztencia mérés

Az impedancia mérés sejtrétegek biológiai állapotának jelzőanyag nélküli, valós idejű nyomonkövetésére alkalmas. Az RTCA SP (ACEA Biosciences, USA) műszerrel 10 kHz frekvenciát alkalmazva a sejtrétegeken mért impedancia értékek jól korrelálnak a sejtek proliferációjával, életképességével vagy a transzcelluláris ion áramlással.

A transzepitheliális elektromos rezisztencia, amit EVOM műszerrel és STX-2 elektródok használatával mértünk, jól kifejezi az ionok paracelluláris permeabilitását a sejtrétegen. Caco-2 sejtek kezelését követően rezisztencia meghatározással mértük a változásokat, így a felületaktív anyagok hatását a sejtek közötti ion áramlására.

3.7. Permeabilitás vizsgálat

A hatóanyagok, a koffein, az antipirin, az atenolol, a vinbalsztin és a fluoreszcens festékek, a fluoreszcein és a rodamin 123 permeabilitásának mérése apikálisból bazális (AB) irányban Caco-2 sejteken történt. A vinbalsztin, fluoreszcein és rodamin 123 permeabilitásának meghatározása az ellenkező, a bazálisból apikális (BA) irányban is meghatározásra került. A sejteket Transwell betéteken tenyésztettük és a tenyésztés 21. napján végeztük a kísérletet. A tápoldatot lecseréltük a sejtek apikális részén Ringer-Hepes pufferre, ami hatóanyagokat és markereket valamint a kezeléseket tartalmazta. A betéteket hordozó lemezeket 1 órán keresztül inkubáltuk a koffein, az atenolol, az antipirin és a rodamin 123 esetén. A vinblasztin és fluoreszcein sejtrétegen való átjutásának mérése során 2 óráig végeztük a kísérletet úgy, hogy

az 1 és 2 óra letelténél a akceptor fázisból mintát vettünk. Az inkubációkat követően, mind az apikális, mind a bazális részekből összegyűjtöttük a mintákat. A fluoreszcein és rodamin 123 koncentrációit a mikroplate olvasóval (Fluostar Optima), míg a gyógyszerek koncentrációit HPLC-vel mértük. A tesztanyagok epitelsejten való átjutását a látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}), valamint az ürüléssel (clearance) jellemeztük.

3.8. Membrán fluiditás mérése Caco-2 sejteken

A sejteket TMA-DPH (1-(4-trimetilammoniumfenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrien; Molecular Probes, Life Technologies) festékkel jelöltük és fluoreszcens anizotrópiát detektáltunk T-alakú fluoreszcens spektrofotométerrel (Quanta Master QM-1, Photon Technology International, Princeton, NJ, USA), ami indikátora a membrán fluiditásnak. A pufferes előinkubációt követően a sejteket a felületaktív anyagok növekvő koncentrációjával kezeltük. A benzil alkohol, mint hatékony membrán fluiditás növelő volt a pozitív kontroll.

3.9. Efflux pumpák aktivitásának meghatározása

Az efflux transzporterek aktivitásának meghatározására ligandjaik, a rodamin 123 és a calcein AM molekulák sejtes akkumulálódásának mértékét vizsgáltuk Caco-2 sejtvonalon. A sejtek kezelése a rodamin 123 jelenlétében történt. Egy órás inkubációt követően a sejteket NaOH oldattal feltártuk és a sejten felhalmozódott rodamin 123 koncentrációját mikroplate olvasóval mértük. A calcein AM molekula a P-gp, MRP-1 és -2 efflux pumpák ligandja, ezáltal az efflux transzportereket expresszáló sejtbe való bejutása mérsékelt. A bejutott calcein AM-et az intracelluláris észterázok fluoreszcens metabolittá alakítják. A felületaktív anyagokkal vagy efflux pumpa gátlókkal való kezeléseket a calcein AM jelenlétében végeztük Caco-2 sejteken és a fluoreszcenciát microplate olvasóval detektáltuk.

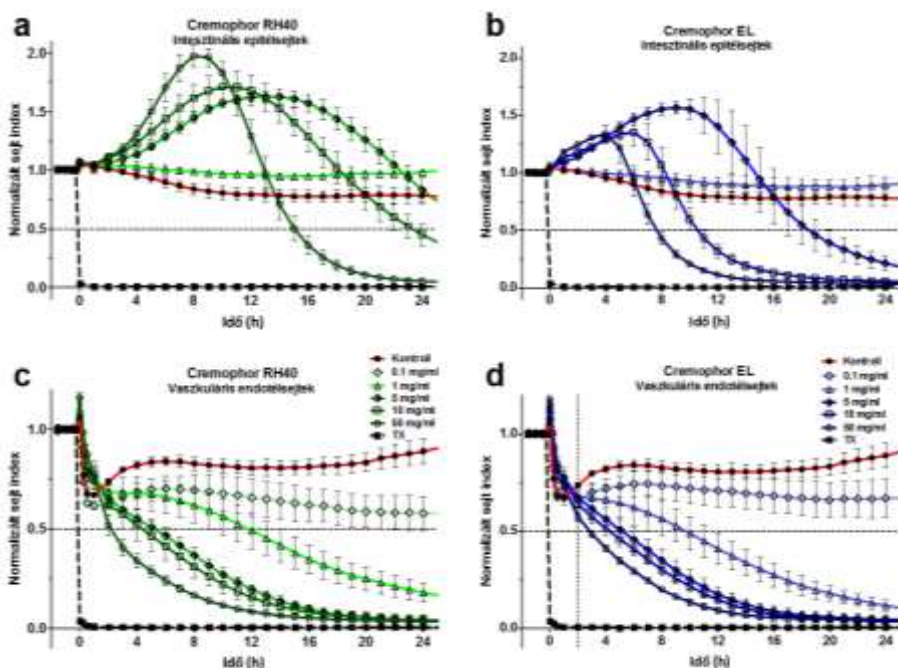
Ahhoz, hogy vizsgáljuk az abszorpció fokozók hatását a P-glikoprotein pumpa működére, a calcein AM akkumulációs tesztet MES-SA és MES-SA/Dx5 sejteken is elvégeztük. A sejteket előkezeltük verapamillal vagy a felületaktív molekulákkal, majd a calcein AM hozzáadása és további inkubálás következett. A TO-PRO3 pozitív sejteket eltávolítottuk a mérési eredményekből. A minták FACSCalibur™ áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) voltak elemezve.

4. EREDMÉYNEK ÉS ÉRTEKEZÉS

4.1. A felületaktív anyagok hatása intesztinális epitél és vaszkuláris endotél sejtekre

A felületaktív anyagok emulgeáló tulajdonságaik folytán a sejtek lipid membránjaival könnyen kölcsönhatásba kerülnek, így módosíthatják vagy roncsolhatják azokat. Ez a hatás koncentráció és idő függvényében reverzibilis lehet, de magas koncentrációkban a tenzidok a membránokat elvékonyítják, roncsolják a sejtek apikális felén található mikrovillusokat és a sejtek pusztulását idézik elő.

A Cremophor EL nem-ionos tenzidet több gyógyszerkészítmény is tartalmazza és az alkalmazás során különböző mellékhatását jegyezték fel. Ezen káros hatások okának megismerése és megértése biztonságosabb formulációk kifejlesztését és a Cremophor EL megfelelőbb felhasználását eredményezheti. A Cremophor RH40 felületaktív anyag toxikus hatásairól azonban még keveset tudunk.

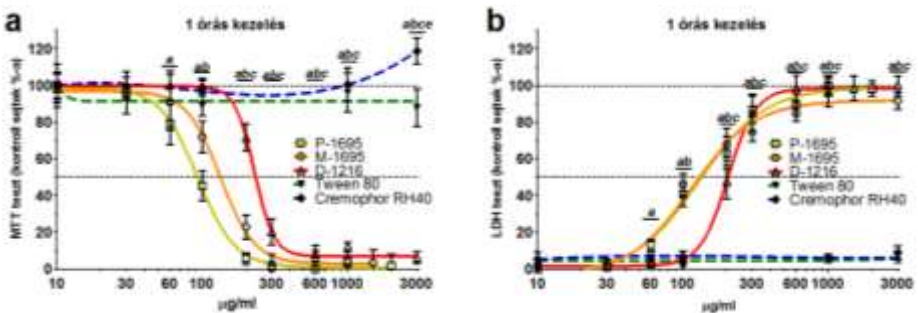


1. ábra. A Cremophor RH40 és EL (0,1-50 mg/ml) humán Caco-2 intesztinális epitél (a, b) és hCMEC/D3 (c,d) endotélsejtekre való toxikus hatásainak megállapítása sejtréteg impedancia mérésével. A sejtinдекс és az elektródok közötti impedancia mérésből származtatott érték. Az adatok átlag \pm S.D. értékekben vannak kifejezve, n = 4. TX, Triton X-100 (10 mg/ml)

A vizsgálataink során az előző kétféle Cremophor klinikailag releváns koncentrációinak sejtoxikus hatásait mértük intesztinál epitél és vaszkuláris endotél sejtenyészeten. Mindkét sejttípust a vizsgált Cremophor-k koncentráció és idő függvényében károsították (1. ábra) és ezek az igazolt hatások összefügghetnek a klinikumban tapasztalt mellékhatásokkal.

Az epitelsejtek kezelése alatt egy különleges jelenséget figyelhetünk meg, mind az MTT, mind pedig az impedancia mérést alkalmazva. Az MTT festék konverzió a Cremophor-s kezelése hatására átmeneti növekedést mutatott a magasabb koncentrációkban. Ilyen változás az endotélsejtek esetén is tapasztalható volt, de csak egy órán át tartott. Több sejtés folyamat járul hozzá az MTT festék átalakításához, amiket a Cremophor-k befolyásolhatnak. Különböző G-fehérjéhez kapcsolt receptorok aktiválása sok emlős sejtben a sejtlak, valamint a letapadás erősségének módosulásához vezethet, impedancia növekedést idézve elő. A Cremophor-k hatása az előbb leírt folyamatokra és fehérjékre magyarázatot adhat az MTT átalakítás és impedancia átmeneti növekedésére, de további vizsgálatok szükségesek a pontos kölcsönhatás tisztázásához.

Az endotélsejtek érzékenyebbek voltak, mint az epitelsejtek a nem-ionos felületaktív anyagokra, mert a rövid idejű kezelések alatt csak az endotél sejtrétegek impedanciája csökkent, az epitelsejteké nem (1. ábra). A Cremophor RH40 kevésbé volt toxikus, mint az EL mindkét sejttípuson, aminek oka ismeretlen, de a molekulák különböző szerkezete összefügghet a kapott eredményekkel.



2. ábra. A P-1695, M-1695, D-1216 cukorészterek (10-3000 µg/ml) és a Tween 80, Cremophor RH40 referencia abszorpció fokozók (10-3000 µg/ml) hatásai humán Caco-2 intesztinális epithelsejtek életképességére amely az MTT festékkátalakítás (a) és az LDH felszabadulás mérésekkel volt meghatározva. Az adatok átlag ± S.D. értékekben vannak kifejezve, n = 6; statisztikai elemzés során ANOVA-t majd ezt követően Dunnett tesztet alkalmaztunk. A szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) kimutatása a kontroll csoporthoz viszonyítva: a: P-1695 csoport; b: M-1695 csoport; c: D-1216 csoport; e: Cremophor RH40 csoport.

A cukorészterek sejtkárosító hatásainak vizsgálata Caco-2 sejteken történt. A D-1216 laurát-észter volt a legkevésbé toxikus, míg a mirisztát- és a palmitát-észterek magasabb sejtkárosítást mutattak az 1 és 24 órás kísérletekben (2. ábra). A referencia felületaktív anyagok, a Tween 80 és Cremophor RH40 egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban voltak károsak a sejtekre, mint a cukorészterek, így a cukorésztereknél biztonságosabb anyagoknak bizonyultak.

4.2. A gyógyszer abszorpció és a nem-ionos felület aktív anyagok

A felületaktív anyagok képesek fokozni a gyógyszerek felszívódását, de ennek mechanizmusai csak részben ismertek. Munkánk célja volt felderíteni azokat az útvonalakat, amiken keresztül kifejtik a kiválasztott tenzidok az abszorpció fokozó hatást.

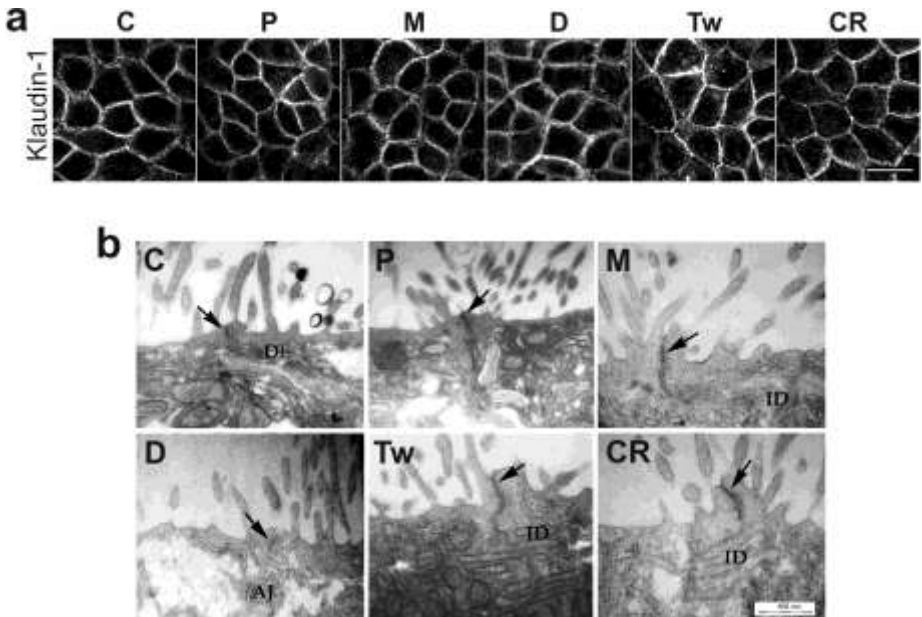
A cukorészterek csökkentették a Caco-2 sejtréteg rezisztenciáját és impedanciáját, ami a paracelluláris és transzcelluláris ion permeabilitás növekedésére utal. Ezzel szemben a referencia abszorpció fokozók nem változtatták meg a sejtréteg rezisztenciáját, vagyis a paracelluláris barrier érintetlen maradt. Ezeknek az adatoknak az alapján megállapítható, hogy a cukorészterek, mind para-, mind pedig transzcelluláris úton fokozzák az ionok átjutását a sejtrétegen.

	Passzív hidrofíl	Passzív lipofíl	
	Atenolol	Koffein	Antipirín
P-1695 30µg/ml	1.46 ± 0.02 ***	1.01 ± 0.01	0.95 ± 0.06
M-1695 60µg/ml	2.37 ± 0.63 ***	0.99 ± 0.01	1.00 ± 0.02
D-1216 100µg/ml	1.58 ± 0.08 ***	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.03
Tween 80 1000µg/ml	2.11 ± 0.02 ***	1.06 ± 0.02	1.00 ± 0.02
Cremophor RH40 1000µg/ml	1.20 ± 0.15 ***	1.00 ± 0.03	0.98 ± 0.01

1. táblázat. Caco-2 sejtrétegen mért atenolol, koffein, antipirín permeabilitás változásai 1 órás P-1695, M-1695, D-1216 cukorészter és Tween 80, Cremophor RH40 referencia abszorpció fokozó kezeléseket követően. A táblázatban megadott értékek a kezelések P_{app} mennyiséginek kontroll csoporthoz viszonyított változásait mutatják. Az adatok átlag ± S.D. értékekben vannak kifejezve, n = 3; statisztikai elemzés során ANOVA-t majd ezt követően Dunnett tesztet alkalmaztunk a szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) kimutatására; kezeléseket a kontroll csoporthoz lettek viszonyítva.

A cukorészterek növelték az atenolol átjutását a Caco-2 intesztinális sejtrétegen, ami megerősíti ezen anyagok abszorpció fokozó hatását (1. táblázat). A koffein és antipirín, jó penetrációval rendelkező anyagok alapvetően nagyon magas átjutását már egyik vizsgált tenzid sem fokozta tovább (1. táblázat). A hidrofíl fluoreszcein permeabilitását koncentráció függő

módon növelték a segédanyagaink az AB irányban. Míg a kezelések az apikális részen voltak, mint a gyógyszerek *per os* alkalmazásánál, ezek nem vagy csak mérsékelten fokozták a fluoreszcein átjutását az ellenkező irányban. A Tween 80 és Cremophor RH40 referencia anyagok csak magasabb koncentrációkban javították a fluoreszcein penetrációját a Caco-2 sejtretegen, míg a cukorészterek már alacsony koncentrációkban is sokkal hatékonyabbak voltak.



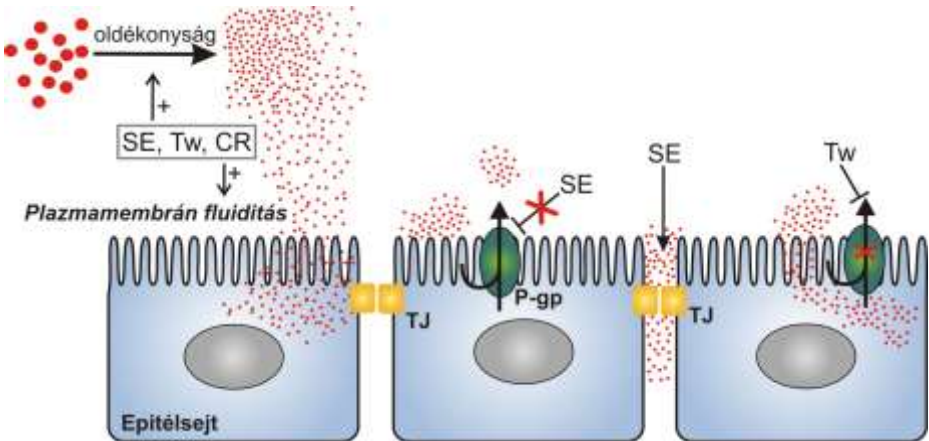
3. ábra. A felületaktív anyagok hatása a sejtek és kapcsolataik morfológiájára. (a) A kaludin-1 szoros kapcsolat fehérje immunfestése humán Caco-2 sejtvonalon 1 órás szurfaktáns kezelést követően. A mérővonal hossza 20 µm. (b) Transzmissziós elektron mikroszkópia a sejt-sejt kapcsolatoknál 1 órás szurfaktáns kezelést követően; a mérővonal hossza 400 nm. Kezelési koncentrációk: P, 30 µg/ml; M, 60 µg/ml; D, 100 µg/ml; Tw, 1000 µg/ml; CR, 1000 µg/ml. Rövidítések: C, kontroll; P, P-1695; M, M-1695; D, D-1216; Tw, Tween 80; CR, Cremophor RH40; nyíl: szoros kapcsolatok; AJ: adherens jukció; DE: dezmoszóma; ID: interdigitáció

A sejtkapcsoló fehérjék immunfestésével, az F-aktin fluoreszcens festése és a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata által, az intercelluláris kapcsolatokat és a paracelluláris gát integritását vizsgáltuk (3. ábra). Első alkalommal lett megfigyelve, hogy a cukorészterek és a referencia abszorpció fokozók láthatóan nem változtatják meg a kapcsoló fehérjéket, a kaludin-1 (3.a ábra), ZO-1 és β-katenin immunfestéseinek a morfológiáját a Caco-2 sejtekben. Ezzel ellentétben az F-aktin rendezettsége a jukcionális régiókban és a sejtek bazális részén enyhén módosult. Ez az F-aktin átrendeződés kapcsolatban állhat a sejtkapcsolatok átjárhatóságával.

Elektronmikroszkóppal vizsgálva a tenzidek kezelések hatásait a sejtek szoros kapcsolatai láthatóan nem nyíltak meg és a morfológiájuk sem változott (3.b ábra).

A cukorészterek hatását a sejtmembránokra korábban már feltételezték, de eddig még nem vizsgálták élő sejteken. Az általunk használt cukorészterek a Caco-2 sejtek plazmamembránját nagyobb mértékben fluidizálták, mint a referencia anyagok. Ezen felül a TMA-DPH fluoreszcens anizotrópia jobban csökkent a cukorészter kezelések hatására, mint a Tween 80 vagy a Cremophor RH40 alkalmazását követően. Ez a membrán fluiditás csökkenés kapcsolatban állhat a membrán átjárhatóságának fokozódásával és a membrán transzporterek, valamint az efflux pumpák aktivitásának megváltozásával.

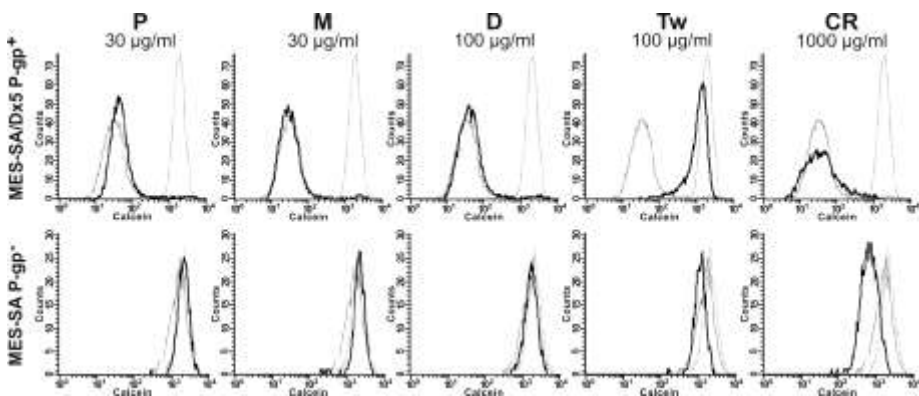
A rezisztencia, impedancia, permeabilitás, junctionális morfológia, valamint a membrán fluiditás mérések alapján különböző mechanizmusok érintettek a cukorészterek által kifejtett abszorpció fokozásában (4. ábra). Mindegyik felületaktív anyag megnövelte a fluiditást, ami fokozott transzcelluláris permeabilitáshoz vezethet. A cukorészterek a rezisztenciát és az impedanciát is csökkentették utalva arra, hogy befolyásolják a sejt kapcsolatok funkcióját és a membránok átjárhatóságát, vagyis a gyógyszer penetráció transz- és paracelluláris úton is fokozódik az alkalmazásuk során. A referencia anyagok nem módosították a sejt kapcsolatok morfológiáját és nem csökkentették a réteg rezisztenciáját sem, így kizárhatjuk a hatásukat a paracelluláris transzportra.



4. ábra. Hogyan fokozzák a cukorészterek, Tween 80 és Cremophor RH40 a permeabilitást az epitelsekben? Különböző útvonalakon javíthatják a molekulák felszívódását a cukorészterek és referencia anyagok. (i) A felületaktív anyagok növelik a gyógyszerek oldékonyságát és megváltoztatják a membrán fluiditást, ami fokozza az anyagok penetrációs tulajdonságait. (ii) A Tween 80 gátolja a P-glikoprotein működését, de a cukorészterek nem. (iii) Csak a cukorészterek változtatják meg a sejt kapcsolatok funkcióját, viszont a látható morfológiájukat nem módosítják. Rövidítések: CR, Cremophor RH40; P-gp, P-glikoprotein; SE, cukorészterek; TJ, szoros kapcsolatok; Tw, Tween 80.

4.3. A nem-ions felületaktív anyagok hatása az efflux pumpákra

Az efflux transzporterek megakadályozzák a gyógyszerek átjutását a biológiai barrieréken, így ezek gátlása növelheti a hatóanyag penetrációt. A vizsgálatunkban a cukorészterek, a gátlószerekkel és a referencia abszorpció fokozókkal ellentétben, az AB irányban növelték a vinblasztin és a rodamin 123 permeabilitását, de már az ellenkező irányban nem tudták növelni. Ez arra utal, hogy nem gátolják az efflux pumpákat. A rodamin 123 és calcein AM sejtes akkumulációját növelték, ami ugyan jelenthetne efflux transzporter gátlást, de a P-gp-t expresszáló sejteken végzett vizsgálatok ezt a hatást kizárják. A cukorészterek a MES-SA/Dx5 sejtekben nem csökkentették a P-gp mediálta calcein AM transzportot (5. ábra). Takaishi és mtsai. már feltételezték, hogy a cukorészterek a daunomicin penetrációjának javítását a Caco-2 sejtekben a membránok permeabilizálásával érik el (Takaishi és mtsai., Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70:2703-2711), de a miénk az első munka, ami kísérletesen is bizonyítja, hogy a cukorészterek permeabilitás fokozása nincs kapcsolatban a P-gp gátlással (4. és 5. ábra)



5. ábra. A felületaktív anyagok hatása calcein AM akkumulációjára P-gp pozitív MES-SA/Dx5 és P-gp negatív MES-SA sejtvonalakban. A hordozó oldat (sötét szürke), a verapamil (világos szürke) és a felületaktív anyagok (fekete) kezelése után mért celluláris calcein AM fluoreszcencia hisztogramja van ábrázolva. Kezelési koncentrációk: P, 30 µg/ml; M, 30 µg/ml; D, 100 µg/ml; Tw, 100 µg/ml; CR, 1000 µg/ml; Verapamil, 100 µM. Rövidítések: C, kontroll; P, P-1695; M, M-1695; D, D-1216; Tw, Tween 80; CR, Cremophor RH40.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógyszerkészítményekben használt felületaktív anyagok számos előnyös tulajdonsággal bírnak, fokozzák a hatóanyagok oldódását és abszorpcióját, valamint óvják a farmakonokat. Azonban az alkalmazásuk során mellékhatásokat is tapasztaltak, ami szükségessé teszi a meglévő felületaktív anyagok további vizsgálatát és új típusú abszorpció fokozó anyagok keresését.

A Cremophor RH40 és EL gyakran alkalmazott segédanyagok az perorális és intravénás gyógyszerkészítményekben. Azonban toxikus mellékhatásait korábbi kutatások már igazolták, különösen az EL estében, de eddig kevés információ állt rendelkezésre epitél- és endotélsejtes hatásairól, amik a biológiai gátakat alkotják és közvetlenül kitétek a segédanyagoknak. A vizsgálatainkban a humán intesztinális epitél és vaszkuláris endotélsejteket kezeltünk Cremophor RH40 és EL klinikailag releváns koncentrációival és toxikus hatásait több módszer alkalmazásával követtük. A Cremophor-k koncentráció- és időfüggő módon károsították az epitél- és endotélsejteket. Az endotélsejtek érzékenyebbek voltak a kezelésekre, mint az epitélsejtek, valamint a Cremophor EL toxikusabb hatást mutatott mindkét sejt típusban, mint az RH40. Eredményeink alátámasztják és kiegészítik a Cremophor EL korábban tapasztalt toxikus hatásait amely kapcsolatban állhat a Cremophor EL-t tartalmazó készítmények klinikumban felismert mellékhatásaival. A zsírsavak szacharózzal alkotott észterei (cukorészterek) a gyógyszerkutatások egyre intenzívebben vizsgált anyagai, amelyek egy része hivatalos az Európai és az Amerikai Egyesült Államok Gyógyszerkönyvében. Számos közlemény leírta már előnyös sajátosságait, de eddig kevés ismeret állt rendelkezésre a toxicitási profiljukról és hatásmódjukról, valamint hatékonyságukról az intesztinális epitél sejtmodellen. Caco-2 sejteken három vízdékony cukorésztert és két referencia tenzid abszorpció fokozó segédanyagot vizsgáltunk. Előbbiek a palmitát- (P-1695), mirisztát-(M-1695) és laurát (D-1216) észterei, míg utóbbiak a Tween 80 és a Cremophor RH40 voltak. A cukorészterek nem-toxikus koncentrációi szignifikánsan csökkentették a sejtrétegek rezisztenciáját és impedanciáját. Mindegyik tenzid növelte a gyógyszerek permeabilitását és fluidizálta a sejt membránját a szoros kapcsolatok látható módosítása nélkül, valamint a P-glikoprotein pumpa működését csak a Tween 80 gátolta. Munkánk igazolja, hogy a cukorészterek a P-glikoprotein transzporter gátlása nélkül képesek fokozni a gyógyszerek permeabilitását a transzcelluláris és a paracelluláris utakon keresztül.

Eredményeink igazolták a különböző nem-ionos felületaktív anyagok eltérő sejtes hatásait, ami fontos lehet új gyógyszerformulációk és gyógyszerbeviteli rendszerek fejlesztése során.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. Szűts A, Láng P, Ambrus R, **Kiss L**, Deli MA, Szabó-Révész P.
Applicability of sucrose laurate as surfactant in solid dispersions prepared by melt technology
International Journal of Pharmaceutics 410: 107–110 (2011)
IF: 3.350
- II. **Kiss L**, Walter FR, Bocsik A, Veszelka S, Ozsvári B, Puskás LG, Szabó-Révész P, Deli MA.
Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells
Journal of Pharmaceutical Sciences, 102:1173-81 (2013)
IF: 3.130 (2012)
- III. **Kiss L**, Hellinger E, Pilbat AM, Kittel A, Török Z, András Füredi, Gergely Szakács, Veszelka S, Sipos P, Ózsvári B, Puskás LG, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA.
Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit P-glycoprotein in Caco-2 intestinal epithelial cells.
Journal of Pharmaceutical Sciences (elfogadásra került 2014. június 14-én)
IF: 3.130 (2012)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, Veszelka S, Tóth A, **Kis L**, Kurunczi A, Balogh G, Kürti L, Erős I, Szabó-Révész P, Deli MA.
Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 72: 252-259 (2009)
IF: 4.304
- II. Horvát S, **Kis L**, Szabó-Révész P, Erős I, Deli MA.
Targeting pharmacocons to the brain via the nasal pathway
Gyógyszerészet 53: 259-266 (2009)
IF: -
- III. Jańczewski D, Song J, Csányi E, **Kiss L**, Blazsó P, Katona RL, Deli MA, Gros G, Xu J and Vancso JG.
Organometallic polymeric carriers for redox triggered release of molecular payloads
Journal of Mataterials Chemistry 22: 6429-6435 (2012)
IF: 6.101
- IV. Némethy Á, Solti K, **Kiss L**, Gyarmati B, Deli MA, Csányi E, Szilágyi A.
pH and temperature responsive poly(aspartic acid)-l-poly(*N*-isopropylacrylamide) conetwork hydrogel
European Polymer Journal 49: 2392–2403 (2013)
IF: 2.562 (2012)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

Szöbeli előadások

Kiss L, Walter F, Bocsik A, Veszelka S, Szűts A, Kittel Á, Szabó-Révész P, Deli MA
Investigation of pharmaceutical excipients on cell cultures: morphological and functional changes
A Magyar Mikroszkópos Társaság Éves Konferenciája, Siófok, 2012. május 10-12.

Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Ózsvári B, Puskás L, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA
Sucrose esters as novel absorption enhancers to improve drug delivery
Első Innováció a Természettudományban 2014 – Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2014. május 2-3.

Pószter prezentációk

Kis L, Szűts A, Szabó-Révész P, Deli MA.
The potential of sucrose esters to be used as oral absorption enhancers
6. PhD Symposium, Medical University of Vienna, Bécs, Ausztria, 2010. június 16-17.

Kiss L, Szűts A, Otomo N, Szabó-Révész P, Deli MA.
The potential of sucrose esters to be used as oral absorption enhancers
8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Graz, Ausztria, 2010. szeptember 16-18.

Kis L, Szűts A, Szabó-Révész P, Deli MA.
The potential of sucrose esters to be used as oral absorption enhancers
Straub Napok, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged, 2010. december 1-2.

Kiss L, Szűts A, Szabó-Révész P, Deli MA.
Cukorészterek orális abszorpciófokozóként való alkalmazásának lehetőségei
41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május 17-20.

Kiss L, Szűts A, Szabó-Révész P, Deli MA.
The potential of sucrose esters to be used as oral absorption enhancers
ISCOMS; Groningen, Hollandia, 2011. június 7-10.

Kiss L, Szűts A, Szabó-Révész P, Deli MA.
The potential of sucrose esters to be used as oral absorption enhancers
ITC Alumni International Conference; Szeged, 2011. szeptember 1-3.

Kiss L, Walter F, Szűts A, Szabó-Révész P, Deli MA.
Abszorpciófokozók vizsgálata biológiai barrierék sejtenyészetes modelljein
XVIII Szent-Györgyi Days, Szeged, Hungary, November 14-19, 2011

Kiss L, Walter F, Bocsik A, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás L, Szűts A, Révész P, Deli MA.
Toxicity and absorption enhancer profile of surfactants on a human intestinal barrier model
75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, March 22-25, 2012

Kiss L, Walter F, Bocsik A, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás L, Szűts A, Révész P, Deli MA
Toxicity and absorption enhancer profile of surfactants on a human intestinal barrier model
Straub-days, BRC HAS, Szeged, May 23-24, 2012

Kiss L, Kürti L, Bocsik A, Walter FR, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás L, Szabó-Révész P, Deli MA
Toxicity of surfactants on cultured human cells: comparison of different methods
Impedimetry Based Cellular Assays (IBCA) 2013 conference, Budapest, Hungary, August 21-23, 2013

Kiss L, Walter F, Bocsik A, Veszelka S, Szabóné Révész P, Deli M
Gyógyszertechnológiában használatos segédanyagok toxicitásának vizsgálata sejtenyészeten
Tox'2013 conference, Velence, Hungary, October 16-18, 2013

Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Ózsvári B, Puskás L, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA
Sucrose esters as novel absorption enhancers to improve drug delivery
Straub days, BRC HAS, Szeged, Hungary, May 28-29, 2014

Kutatási támogatás

A kutatás a TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0013; TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005; TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-2012; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035; TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0012 azonosító számú projektek finanszírozásával valósult meg. További anyagi támogatást nyújtott a Magyar Tudományos Akadémia három éves fiatal kutatói ösztöndíja és a Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj (TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001).