DOI: 10.14753/SE.2013.1789

Terápiásan alkalmazható *S*-nitrozoglutation formuláció fejlesztése

Doktori értekezés

Hornyák István

Semmelweis Egyetem, Doktori Iskola
Klinikai Kísérleti Kutató és Humán Élettani Intézet

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, egyetemitanár, az MTA tagja
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hell Zoltán, Ph.D.
Dr. Zádori Zoltán, Ph.D.

Budapest
2012

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

Tartalomjegyzék:

Használt rövidítések 4
1. Bevezetés 6
1.1. NO szerepe a lokális vérellátásban 7
1.1.1. NO donor típusok 8
1.1.2. NO donorok hatása, stabilitása 9
1.2. *S*-nitrozotiolok, GSNO 10
1.2.1. RSNO kémiai tulajdonságok 10
1.2.2. GSNO előállítás 12
1.2.3. GSNO stabilitás 14
1.2.4. GSNO formulációk, NO leadás 15
1.2.4.1. GSNO formulációk irodalmi áttekintése 15
1.2.4.2. Potenciálisan alkalmazható polimerek 16
1.2.4.3. NO leadás 17
1.2.5. GSNO és az *S*-nitrozálás szerepe a sejtben 19
1.2.6. Terápiás alkalmazási lehetőségek 20
2. Kérdésfeltevés 22
2.1. A kémiai környezet és a stabilitás összefüggése 22
2.2. A stabilitás és a hatásosság összefüggéseinek vizsgálata 23
2.3. Lebomlási kinetika mérése a terápiás alkalmazhatóság érdekében 23
3. Anyagok és módszerek 24
3.1. NO donorok és gél mátrixok előállítása 24
3.1.1. NO donorok előállítása 24
3.1.2. Gél mátrixok előállítása (hidrogél, film, liofilizált párna) 25
3.2. Stabilitás vizsgálatok 26
3.2.1. Gél mátrixok hatása 26
3.2.2. Enzimek és inert atmoszféra hatása 26
3.2.3. pH hatása 27
3.3. Szerkezet, stabilitás és hatás vizsgálati módszerek 28
3.3.1. UV és látható spektroszkópia 28

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

3.3.2. A bomlás mechanizmusának vizsgálata 28
3.3.2.1. Ionos mechanizmus vizsgálata UV spektroszkópiával 29
3.3.2.2. Gyökös mechanizmus vizsgálata ESR spektroszkópiával 29
3.3.2.3. Gyökös bomlás vizsgálata TEMPOL gyökfogó jelenlétében 30
3.3.2.4. Gyökös bomlás vizsgálata DEPMPO gyökfogó jelenlétében 30
3.4. Véráramlás mérés 30
3.5. Statisztikai analízis 31
4. Eredmények 32
4.1. NO donorok előállítása 32
4.1.1. NO donorok előállításának pH függése 32
4.2. Stabilitás vizsgálatok 34
4.2.1. Gél mátrixok hatása a stabilitásra 34
4.2.1.1. Gélek összetételének optimalizálása 34
4.2.1.2. Filmek stabilizáló hatása 38
4.2.1.3. Stabilizálás liofilizálással 40
4.2.2. Enzimek és inert atmoszféra hatása a stabilitásra 42
4.2.3. pH stabilizáló hatása 43
4.3. Szerkezet és stabilitás vizsgálati módszerek 49
4.3.1. pH módosítás kiváltotta szerkezeti változások vizsgálata 49
4.3.1.1. Protonált állapotok és pH összefüggése 49
4.3.1.2. UV spektroszkópia 53
4.3.2. ESR spektroszkópia 56
4.3.2.1. Gyökös bomlás vizsgálata TEMPOL jelenlétében 56
4.3.2.2. Gyökös bomlás vizsgálata DEPMPO jelenlétében 58
4.4. Véráramlás fokozás 60
4.4.1. GSNO formulációk véráramlás fokozó hatása 60
5. Diszkusszió 62
6. Konklúzió 66
7. Összefoglalás (angol, magyar) 67
7.1. Magyar nyelvű összefoglaló 67
7.2. Angol nyelvű összefoglaló 68
8. Referenciák 69

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

9. Publikációs lista 80
9.1. A tézis témájához kapcsolódó publikációk 80
9.2. Nem a tézis témájához kapcsolódó publikációk 81
10. Köszönetnyilvánítás 82

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

Használt rövidítések

3-MPA	3-merkaptopropionsav
Cat	Kataláz
cGMP	Ciklikus guanozin monofoszfát
Chi	Kitozán
DEPMPO	5-(dietoxifoszforil)-5-metil-1-pirrolin-*N*-oxid)
EDRF	Endotél eredetű relaxációs faktor
ESR	Elektron spin rezonancia
GSH	Glutation
GSNO	*S*-nitrozoglutation
GSSG	Oxidált glutation
GTN	Nitroglicerin
HONO	Salétromossav
HPC	Hidroxipropil cellulóz
HPMC	Hidroxipropil metilcellulóz
IR	Infravörös
MS	Tömegspektroszkópia
NAC	*N*-acetilcisztein
NaSH	Nátrium hidrogénszulfid
NO	Nitrogén monoxid
NOS	Nitrogén monoxid szintáz
OD	Optikai denzitás
PEG	Polietilén-glikol
PET	Pozitron emissziós tomográfia
PVA	Polivinil-alkohol
RSNO	*S*-nitrozotiol
SN3MPA	*S*-nitrozo-3-merkaptopropionsav
SNAP	*S*-nitrozo-*N*-acetilpenicillamin
SNAC	*S*-nitrozoacetilcisztein
SNP	Nátrium nitroprusszid
SOD	Szuperoxid diszmutáz

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
UV	Ultraibolya
Vis	Látható (fény tartomány)

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

1. Bevezetés

Az 1980-as évektől kezdve jelentős felfedezések történtek a biológiában, egy egyszerű vegyületnek, a nitrogén monoxidnak (NO) köszönhetően. Az egyik fontos felismerés az volt, hogy a NO-ot folyamatosan termeli az emberi szervezet is, és valamilyen általános metabolizmus szabályzó vegyületnek képzelték. Az 1980-as évek végétől hatalmas érdeklődés övezte és számos publikáció jelent meg a NO biológiájával kapcsolatban. Olyannyira fontosnak találták ezt a molekulát, hogy 1992-ben a Science az év molekulájának kiáltotta ki [1]. Később felismerték, hogy 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 NO-ot a nitrogén monoxid szintáz (NOS) különböző izoformái szintetizálják L-argininből, a NOS által szintetizált egyensúlyi NO koncentráció néhány mikromólos nagyságrendű. A NO-dal kapcsolatos legfontosabb felfedezések egyike a nitritek és nitrátok endogén forrásból származó előállítása és összefüggése a gyulladási folyamatokkal. Azt fedezték fel, hogy a nitritek és nitrátok redukált nitrogén származékok oxidálásából keletkeznek, és a NO csak átmeneti termék [2]. Az aktivált makrofágok NO termelését csak később fedezték fel, a termelést a makrofágok citosztatikus és citotoxikus hatásával is összevetették. Azt tapasztalták, hogy a NO L-argininből szabadul fel, és találtak olyan L-arginin származékokat is, amelyek gátolták a makrofágok NO termelését [3-5]. Elektron spin renozancia (ESR) mérésekkel később sikerült gyökös nitrozo komplexeket kimutatni, ezáltal sikerült a mechanizmusról újabb részleteket megismerni, illetve felmerült az exogén és endogén NO donorok szerepe, amelyeket NO komplexek kiindulási anyagainak tekintették [6-9].

Később felismerték a NO szerepét, mint guanilát cikláz aktivátor. Ez az enzim a másodlagos hírvivő ciklikus guanozin monofoszfát cGMP szintéziséért felelős. Ez kulcsfontosságú volt a NO donorok hatásmechanizmusának megértésében [10-12]. Az endotél eredetű relaxációs faktor (EDRF) vizsgálata során is fontos szerepe volt a NO-nak. Az EDRF-et vaszkuláris endotél sejtek bocsájtják ki, például acetilkolin, bradikinin

hatására, és végeredményben a vaszkuláris sima izmok ellazulásához vezet. Az EDRF és a NO fizikokémiai összehasonlítása után Furchgott arra a következtetésre jutott, hogy a két anyag ugyanaz, ezt később kísérletekkel is alátámasztották [13-16]. Ezt az elméletet később annyiban módosították, hogy az EDRF valószínűleg egy nitrozo származék, és NO az aktív komponense [17, 18]. Az EDRF-hez hasonló aktivitást agyi metszeteken is megfigyeltek, a fentebb említett L-arginin származékok alkalmazásával, ezzel az endogén NO központi idegrendszerre és perifériás idegrendszerre gyakorolt hatása vált kutatási témává [19, 20]. Az 1990-es évek elején az említett felfedezések mind egy univerzális problémára szűkültek le, ez a NO biológiai szerepe volt. 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.

1.1. NO szerepe a lokális vérellátásban

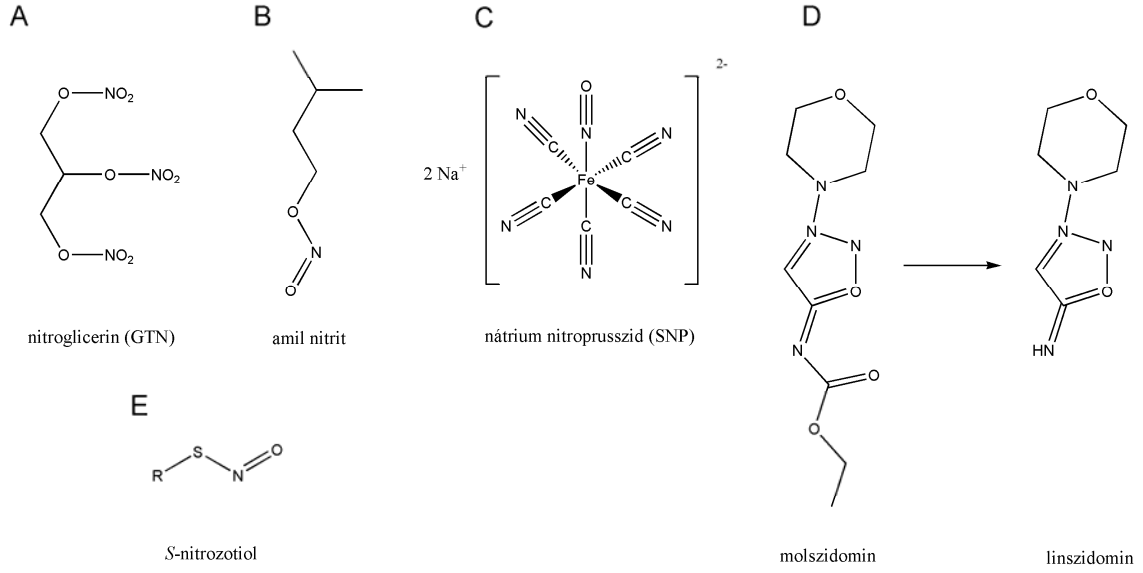
Az endotél funkció romlásának közismerten komoly szerepe van a nem megfelelő lokális vérellátás kialakulásában. Kezelés hiányában érszűkület, diabétesz mellitusz és ehhez kapcsolódó szervi elégtelenségek alakulhatnak ki. Az endotél funkció romlásának egyik fő oka az endotél nitrogén monoxid (NO) termelő rendszerének elégtelen működése. Nem célszerű az endotél funkció javítását az endotél nitrogén monoxid szintáz (NOS, E.C.14.13.39) aktivitásának növelésével elérni, ugyanis amennyiben az endotél válik működésképtelenné, abban az esetben a NO termelő enzim rendszer is működésképtelen, például cukorbeteg láb szindróma esetén, így a perifériás vérellátás fokozására csak a direkt NO leadásra képes vegyületek hatásosak.

1.1.1. NO donor típusok

A NO donor vegyületeket öt fő csoportba oszthatjuk, legegyszerűbb képviselői a szerves nitrátok (nitroglicerin), és a szerves nitritek (amil nitrit). Ezeknek a fő hátránya,

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

hogy hatásuk rövid ideig tart, és tolerancia alakulhat ki irántuk [21, 22]. A szervetlen nitrozo vegyületek (nátrium nitroprusszid) esetében a probléma az, hogy cianid melléktermékek keletkeznek a bomlás során [23, 24]. A negyedik típusba tartozik a molszidomin, ami egy imin funkciós csoportú stabil prodrug, a májban alakul át a biológialag aktív linszidominná. Hosszútávon használható stabil anginás páciensek számára [25]. Egyik fő hátránya, hogy a lebomlása során szuperoxid gyökök keletkeznek, illetve, hogy csak orálisan alkalmazható [26]. Előnye viszont, hogy vele szemben nem alakul ki tolerancia, ellentétben a nitroglicerinnel [27]. Az ötödik típus a nitrozált tiolok csoportja. Az 1. ábrán mindegyik csoport legelterjedtebben használt képviselőjének szerkezeti képletét láthatjuk, illetve a nitrozotiolok képletét általánosságban, ezek a vegyületek a jelen dolgozat fő témáját képezik, tulajdonságaikat a következő fejezetekben fejtjük ki.



1. ábra A NO donor típusok szerkezeti képlet: szerves nitrát (A), szerves nitrit (B), szervetlen nitrozo vegyület (C), imin (D), nitrozotiol (E)

1.1.2. NO donorok hatása, stabilitása

Mind az öt típusból kiválasztottuk a leggyakrabban használt NO donor vegyületet, és a tulajdonságaikat farmakodinamika, kémiai stabilitás és humán alkalmazás szempontjából az 1. táblázatban hasonlítottuk össze.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

Hatóanyag	**Farmakodinamika**	**Kémiai stabilitás**	**Első humán alkalmazás**	**Referencia**
nitroglicerin (GTN)	vazodilatáció	Levegőtől elzárva, fénytől védve stabil	1860-as évek	[21, 22, 28]
amil nitrit	Hatása ugyanaz, mint a GTN-é, de erősebb véráramlás fokozó hatás, rövidebb ideig	15 perc a felezési idő oldatban (pH= 7,4, 1mg/ml hatóanyag koncentrációban)	1860-as évek	[29, 30]
nátrium nitroprusszid (SNP)	vazodilatáció a kontraktilis sejtek alkotta erekben, NO felszabadulás következtében.	Stabil, sárga és kék fény hatására bomlik, de a bomlástermék is biológialilag aktív	1950-es évek	[23, 24, 31]
molszidomin	Csökkenti a bal kamra telődési nyomását és a miokardiális oxigén fogyasztást	stabil, prodrug	1970-es évek	[32]
S-nitrozo-glutation (GSNO)	NO-mediált értágító	7 óra felezési idő oldatban (pH=7,4, 500μM)	1990-es évek	[33, 34]

1. táblázat: A NO donorok összehasonlítása farmakodinamika, kémiai stabilitás, és humán alkalmazás szempontjából

A táblázat alapján megállapíthatjuk, hogy a hatóanyagok az *S*-nitrozoglutationt (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 [35]. A topikális alkalmazhatóság, és az ismert metabolizmus miatt a GSNO-t választottuk hatóanyagként.

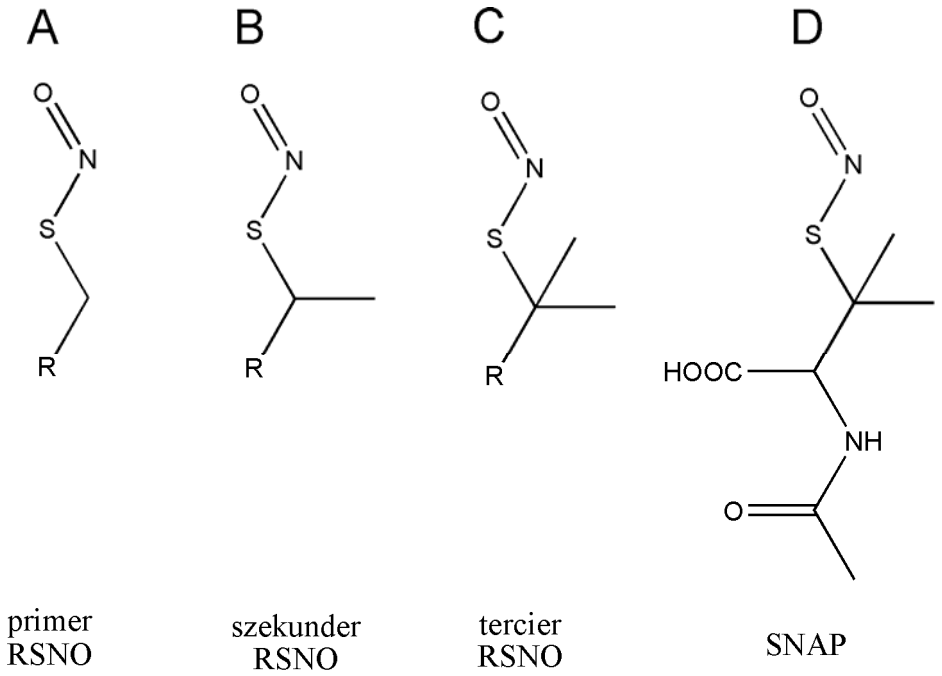
1.2. *S*-nitrozotiolok, GSNO

A szervezeten belül fellelhető *S*-nitrozotiolokat (RSNO) általánosságban, mint könnyen bomló NO donorokat, főként NO raktározó vegyületként tartják számon [36]. Emiatt a nitrozált vegyületek szervezeten belüli keletkezése a NOS enzimek helyéhez köthető. A könnyű NO leadás és az ebből következő transznitrozálási reakciók miatt sejteken belül és kívül is találunk *S*-nitrozotiolokat, például *S*-nitrozoalbumin, *S*-nitrozohemoglobin. A GSNO egyike a szervezeten belül megtalálható RSNO-knak, ami a NOS által termelt NO és glutation reakciója során keletkezik. Önmagában a GSNO nem hatóanyag, a NO leadás következtében fejti ki hatását, ilyen hatás például a guanilát cikláz enzim stimulálása [37]. A GSNO és a többi endogén *S*-nitrozotiol terápiás elterjedésének fő akadálya a gyors bomlás, ami alkalmatlanná teszi terápiás használatra [38]. Ennek a hátterében a kémiai szerkezet, a tárolás körülményei és a kémiai környezet hatása áll. A stabilitás növelésének lehetőségeit széles körben vizsgálták és vizsgálják még a mai napig is, csakúgy, mint a lebomlás lehetséges útjait.

1.2.1. RSNO kémiai tulajdonságok

A GSNO, mint általában az RSNO-k többsége, instabil kristályos formában és vizes oldatokban. Szobahőmérsékleten a GSNO UV vagy látható fény jelenlétében néhány órán belül lebomlik, a bomlástermék általában NO és oxidált glutation (GSSG). A primer és szekunder RSNO-k (*S*-nitrozocisztein, *S*-nitrozo-*N*-acetilcisztein, GSNO) jellemzően instabilak, színűk narancssárga, illetve vörös. A lebomlást a legegyszerűbben spektroszkópiás módszerekkel lehet nyomon követni, például infravörös (IR), ultraibolya (UV), látható (Vis) hullámhossz tartományban [39]. Ezzel szemben a tercier RSNO-k általában véve stabilak és zöld színűek, például az *S*-nitrozo-*N*-acetilpenicillamin (SNAP) és származékai [40] (2. ábra). Mivel ezek stabil vegyületek, ezek vizsgálatára krisztallográfiás stabilitás méréseket is alkalmazhatunk [41, 42].

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



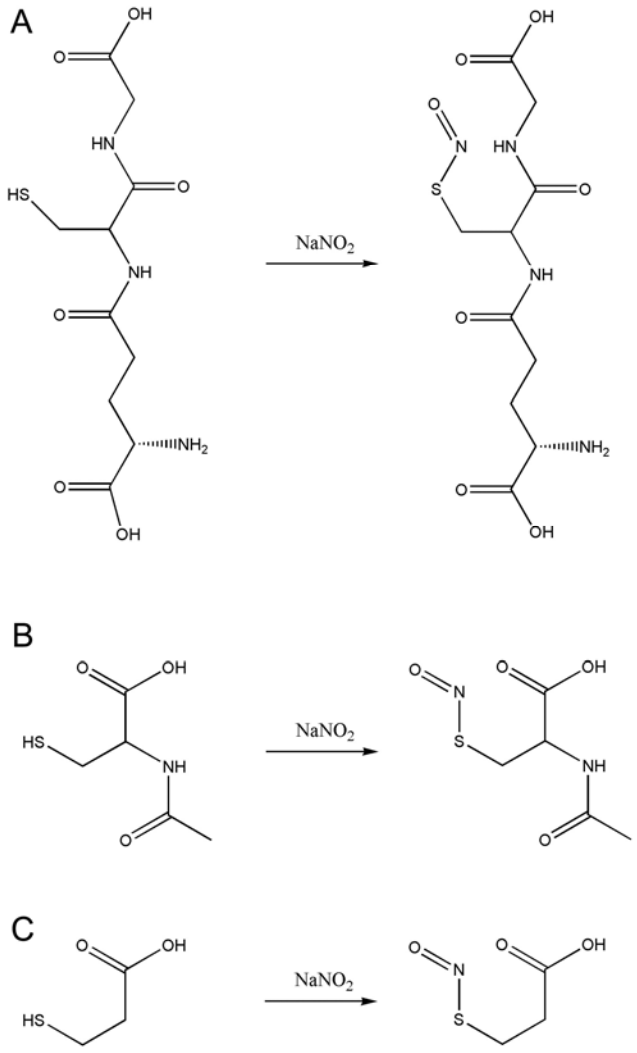
2. ábra *S*-nitrozotiol típusok szerkezeti képlete: primer RSNO (A), szekunder RSNO (B), tercier RSNO (C), SNAP szerkezeti képlete (D)

A stabilabb tercier RSNO-k mellett szintetizáltak már nagy stabilitású *S*-nitrozotiol komplexeket is [43, 44]. Az *S*-nitrozotiolok közül a továbbiakban a biológiailag leginkább kompatibilis képviselő, a GSNO a tulajdonságait mutatjuk be.

1.2.2. GSNO előállítás

Az 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 NO forrás lehet savas közegű nitrit [35, 45-50], vagy általánosságban a megfelelő kiindulási tiol sósavas sója és nátrium nitrit (3. ábra).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

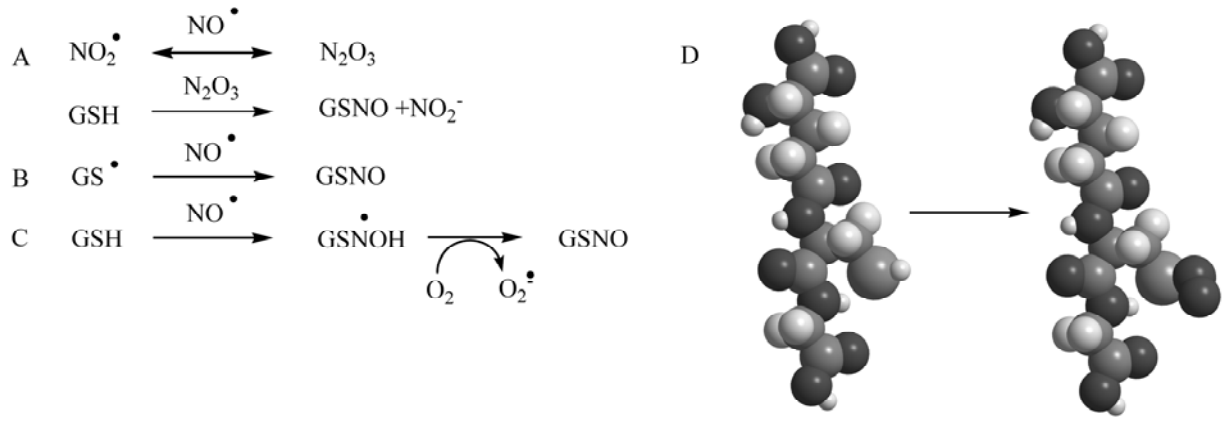


3. ábra: A GSNO (A), SNAC (B) és az SN3MPA (C) előállításának reakcióegyenlete

Egy másik lehetséges GSNO előállítási út a GSH és salétromos sav (HONO) reakciója [51]. Találtunk irodalmi példát arra is, hogy egyszerűen csak NO gázt buborékoltattak át GSH oldaton, a reakciót vizsgálták diszpergálószer jelenlétében és az oldott oxigén katalitikus hatását is vizsgálták. Azt találták, hogy oldott oxigén jelenléte szükséges a reakció lejátszódásához [52].

Keszler és munkatársai a GSNO általános előállítására három útvonalat dolgoztak ki, egy gyökös eredetű ionos mechanizmusút, N_2O_3 intermedieren keresztül (4. ábra, A), illetve két tisztán gyökös mechanizmusú reakciót (4. ábra, B, C). Egy preparatív szerves kémiai előállítási példában a GSNO-t szilárd formában nyerik ki. A recept szerint glutation

savas, hidegvizes oldatához nátrium nitritet, majd acetont adagolunk, kevertetés közben. A kapott csapadékot elválasztva és mosva megfelelő tisztaságú *S*-nitrozoglutationt kapunk [53]. Egyéb preparatív előállítási módszerek is ismertek [54], ezekben szintén leírták, hogy a reakciót savas közegben célszerű megvalósítani, a pH hatását az előállításra azonban nem taglalták. A felsorolt előállítási lehetőségeken kívül a GSNO-t enzimatikusan is elő lehet állítani *in vitro* körülmények között a GSH transzferáz enzimmel [55, 56]. A molekula modelljén a -NO csoport elhelyezkedését láthatjuk a három aminosavból álló GSNO molekulán (4. ábra, D).



4. ábra: A GSNO létrejöttének feltételezett gyökös mechanizmusú útjai (A, B, C), a GSH és a GSNO molekula modellje (D)

1.2.3. GSNO stabilitás

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) [46]. Terápiás szempontból a legfontosabbak a vizes oldatok. Oldatokban a stabilitás megértéséhez fontos megemlíteni, hogy a GSNO két tautomer formában lehet jelen (1. egyenlet). A két forma megoszlása függ a környezet (az oldószer) polaritásától, illetve másodrendű kötések stabilizáló hatásától (pl. filmek, gél mátrixok).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

$$GSN{=}O \leftrightarrow GS^{+}{=}NO^{-} \qquad \text{(1. egyenlet)}$$

A kémiai környezet hatását, a pH és a fém ionok befolyását a stabilitásra részletesen vizsgálták. Azt találták, hogy az RSNO-k nagy koncentrációban (10 mM) gyorsabban bomlanak, mint alacsony koncentrációban (0,1 mM), illetve, hogy a savas pH stabilizálja a tercier RSNO-kat [57, 58]. A fém ionok vizsgálata során azt az eredményt kapták, hogy a Cu (II) ionok katalizálják a bomlást [59]. Emellett a Zn (II) és a Cd (II) növeli, de a Ni (II) csökkenti a GSNO stabilitását pH=7,4-en [60]. Az aszkorbinsav, csakúgy, mint a Cu (II) ionok fokozza a bomlást, és az eredmények szerint ez is pH függő, mivel pH=5,5 alatt elhanyagolható volt az aszkorbinsav szerepe, majd drámaian fokozta a bomlást pH=6-8 között [61]. Az aszkorbinsav pH függő bomlást elősegítő hatását Holmes és munkatársai is igazolták [62]. Egy másik tanulmány a nitrozonium ionok bomlást fokozó hatásáról számol be [63]. A pH, hőmérséklet és fény hatását Heikal és társai vizsgálták, az eredményeik alapján az erősen savas közeg növeli a stabilitást, és a GSH molekulák jelenléte is megváltoztatja a bomlást transznitrozálási reakciók következtében, fontos megjegyezni, hogy viszonylag alacsony, 250 μM-os koncentrációjú GSNO oldatokkal dolgoztak [50]. A H_2S szintén elősegíti a GSNO bomlását *in vitro* Ondrias és munkatársai kutatásai szerint, ezt a hatást is erősen befolyásolta a pH. Ebben a kutatásban a lúg fokozta a bomlást [64]. Aszkorbinsav és H_2S jelenlétében is fokozta a bomlást a bázikus kémhatás. Fontos megjegyezni, hogy ezekben az esetekben a pH változtatásával az aszkorbinsav, és H_2S disszociációját és ezzel a reaktivitását fokozták, nem az RSNO stabilitására gyakorolt hatást vizsgálták.

1.2.4. GSNO formulációk, NO leadás

1.2.4.1. GSNO formulációk irodalmi áttekintése

Az irodalomból ismert NO leadásra kifejlesztett GSNO formulációk főleg filmek és hidrogélek. Egy ilyen film formulációt felhasználó irodalmi példa GSNO-t, vizet, gélesítőt (Carbopol® polimer), viszkozitás növelőt (módosított cellulóz) tartalmaz és nyálkahártyán alkalmazták [65]. Ennél a formulációnál a stabilitási problémák miatt a filmet elkészítés után fagyasztóban (-20°C-on) tárolták, amennyiben nem használták fel azonnal. Seabra és

munkatársai GSNO tartalmú hidrogélt használtak a mikrocirkuláció javítására. Ez a kompozíció GSNO-t, gélképzőt (Pluronic™ F 127), és vizet tartalmazott, a bomlékonyság miatt ezt a formulációt is azonnal elkészítés után fel kellett használni [66]. Az eddigi legstabilabb kompozíciót szintén Seabra és kollégái állították elő, ami egy viszkozitás növelő folyékony polimerből, a polietilén-glikolból (PEG), GSNO-ból és vízből állt. Ennek a formulációnak egy további előnye az volt, hogy a GSNO-t ebben a gélben állították elő és ebben is tárolták. Ezzel a módszerrel egy, vagy több elválasztási lépést is ki lehetett hagyni, a stabilitást a csökkent NO leadással igazolták, azonban ezt a kompozíciót is csak fagyasztva tudták stabilan tartani, az eredményeik alapján 65 nap fagyasztás után egyáltalán nem tapasztaltak bomlást [67]. Ennek a gélnek a fő hátránya, hogy amennyiben a hatóanyag nem önmagában a GSNO, hanem az ebből a bomlás során felszabaduló NO gáz az, ami átduffundál a bőrön és okoz értágulatot, akkor szükséges a GSNO bomlása a hatáshoz. Ebben a GSNO készítményben nem vizsgálták a véráramlás fokozó hatást, de valószínűleg a stabilitás fokozása az értágító hatás csökkenésével jár együtt.

1.2.4.2. Potenciálisan alkalmazható polimerek

A PEG és a PVA stabilizáló hatását mi is vizsgáltuk, illetve teszteltünk további segédanyagokat, gélképzőket amelyek alkalmasak lehetnek egy optimálisabb GSNO formuláció fejlesztéshez. A vizes alapú kompozíciók összeállításához azokat a gyógyászatilag elfogadott segédanyagokat teszteltük, amelyek a szerkezetük, és az irodalmi példák alapján alkalmasak másodrendű intermolekuláris kötések kialakítására, ez a szempont a GSNO poláris jellege miatt lényeges. Előnyt jelent az, ha a segédanyag biológiailag lebomló, és elengedhetetlen, hogy vízben jól oldódjon. Az egyik közismert gélképző segédanyag a kitozán (Chi), amit kitinből, hidrolízissel állítanak elő. Irodalmi példák alapján a kitozánt polikationos molekulaszerkezetének köszönhetően széleskörűen vizsgálják hatóanyagok és vakcinák szállítására nyálkahártyán keresztül, változatos formulációkban: mikrokapszulák, gélek, filmek formájában, illetve kompozit hártyák,

graftok összetevőjeként [68-73]. Fontos kiemelni, a jelen tanulmány szempontjából, hogy a kitozán csak savas oldatban oldódik, 7-es pH felett oldhatatlan.

Egy másik gyakran használt poliszacharid a dextrán, aminek a bioadhéziós tulajdonságait támasztották alá kutatásokban, formulációi között nanorészecskéket is említenek [74].

A dextrin a keményítő fő összetevője, egy tanulmány során a bioadhéziós tulajdonságait a kitozánnal is összevetették, kiderült, hogy alternatívaként helyettesítheti a kitozánt, alkalmas hatóanyag szállításra és biológiailag lebomlik [75].

A segédanyagok között két cellulóz származékot is teszteltünk, a hidroxipropil metilcellulózt (HPMC) és hidroxipropil cellulózt (HPC). Mindkét vegyület módosított cellulóz, azzal a különbséggel, hogy a HPC hirdoxipropil egységekkel szubsztituált cellulóz, a HPMC pedig hidroxipropil és metil csoportokkal szubsztituált cellulóz. A szerkezeti különbség fizikai-kémiai különbségekben is megnyilvánul, mindkét származék jól oldódik hideg vízben, de a HPMC kicsapódik meleg vízben, ez egyfajta kontrollált hatóanyag leadást segíthet elő. Ezeknek a cellulóz származékoknak fő előnye az, hogy szerves és szervetlen anyagok közötti kötések kialakulását segítik elő [76].

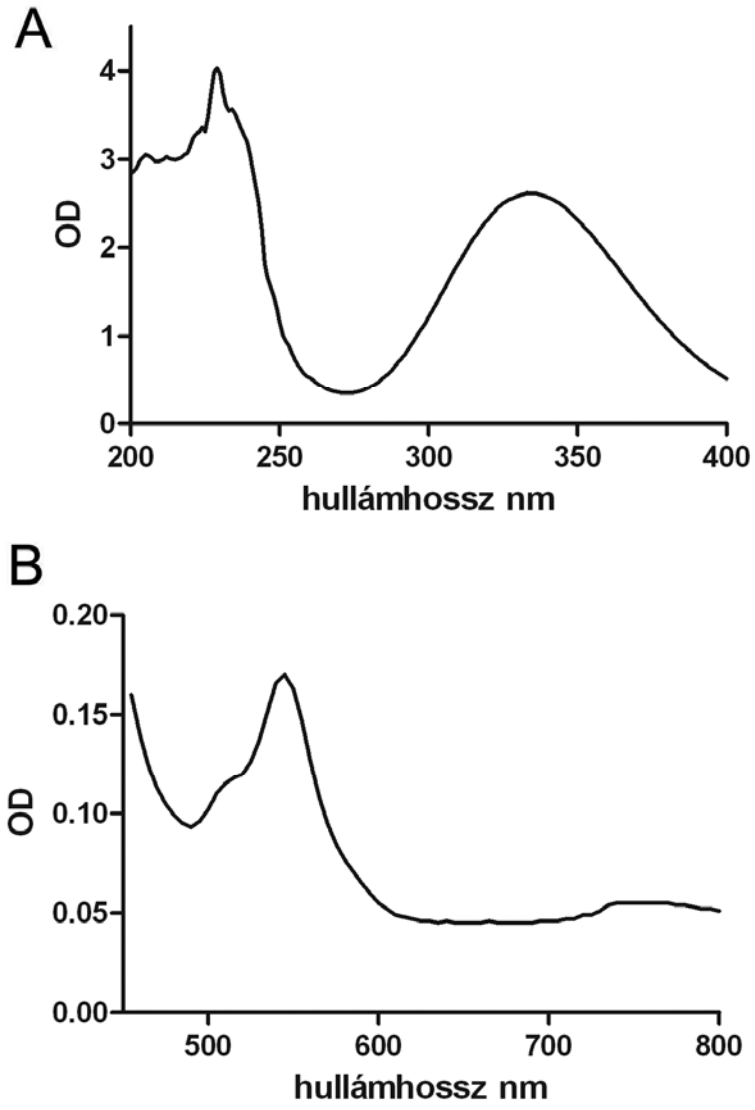
Az alginát mint gél és filmképző segédanyag két fő tulajdonsággal rendelkezik, egyrészt a kitozánnal ellentétben – ami egy polikationos szerkezetű anyag – az alginát anionos szerkezetű, és komplexet képez kationokkal (a GSNO vizes oldatban kationos formában van jelen). Másrészt a kationokkal képzett komplex további fontos változásokat okoz, a kation jellegétől függően, a Na(I)-alginát vízben oldható, a Ca(II)-alginát vízben oldhatatlan, térhálós szerkezetet alkot. A kitozánnal szintén komplexet képez, emiatt is folyik sok kutatás a kitozán-alginát kompozitok hatóanyag leadását illetően. Az alginát és kitozán alapú hatóanyag szállító mátrixokat fehérje és aminosav leadás szempontjából is széleskörűen vizsgálják [77, 78].

A felsorolt adalékanyagok mellett a galaktánt teszteltük még, erre irodalmi példákat nem találtunk, mindössze azért lehet érdekes, mert egy vízben jól oldható természetes cellulóz származék poliszacharid.

1.2.4.3. NO leadás

Egy terápiásan alkalmazható termék fontos, hogy a felhasználás helyén és megfelelő időben fejtse ki a hatását. Esetünkben a NO leadás a tárolás utáni célzott stabilitás csökkentéssel lenne optimális, amit a hőmérséklet, a pH, adott hullámhosszú látható vagy UV fénnyel is ki lehet váltani. Az utóbbi technikát fotoszenzitizációnak is hívják, és kiváltképpen a célzott lokális NO leadásra lehet használni. Furchgott és munkatársai az 1950-60-as években figyeltek fel a látható fény szerepére, a kísérleteik során azt tapasztalták, hogy izolált erek dilatáltak látható és UV fény hatására [79]. Az értágító hatás 450 nm és 310 nm között volt jelentős, és az UV tartományban, különösen 310nm-en – ahol a frekvencia és a fotonok energiája is nagyobb – volt a legerőteljesebb. Habár az összefüggést akkor még nem tudták, a GSNO UV spektruma adhat magyarázatot a jelenségre (5. ábra, A), ugyanis a GSNO maximális elnyelése is ebben a tartományban van, 333 nm-en [80]. A másik karakterisztikus sáv a látható tartományba esik, a primer RSNO-k ugyanis élénkvörösek, karakterisztikus hullámhosszuk az 540-545 nm-es tartományban van (5. ábra, B). A két karakterisztikus tartományban abszorbeál legintenzívebben az -S–NO kötés. Tekintve, hogy a GSNO bomlása során oxidált glutationra és NO gázra bomlik, a bomlást UV tartományban a 333 nm-es karakterisztikus hullámhosszon, illetve látható tartományban az 545 nm-es hullámhosszon vizsgálhatjuk [54, 81].

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



5. ábra: A GSNO vizes oldatának UV abszorbancia spektruma 200 nm és 400 nm között (A) és a GSNO látható spektruma 450 nm és 800 nm között (B). A diagramon a hullámhosszt ábrázoltuk az optikai denzitás relatív értékének (OD) függvényében

Több tanulmány is foglalkozott a GSNO célzott bontásával, fény hatására (fotoaktiválás) amely során a cél az volt, hogy adott területen toxikus mennyiségű NO gyököt próbáltak fejleszteni tumorok kezeléséhez [81, 82].

A NO leadás és a transznitrozálás megfigyelésére Llop és munkatársai kifejlesztettek egy ^{13}N-GSNO izotópot, ami a pozitron emissziós tomográfiás (PET) képalkotásban nyithat meg új utakat a nitrozotiolok *in vivo* metabolizmusának vizsgálatában [83].

Mindezek a kutatások azt bizonyítják, hogy a GSNO és a NO donorok valószínűleg alkalmazhatóak lennének terápiásan, és igény is van rá, de nincs jelenleg gyógyszerészeti értelemben alkalmazható formuláció, habár különösen a GSNO esetében a biológiai aktivitás és a metabolizmus jól ismert, tekintve, hogy a GSNO endogén természetes hatóanyag.

1.2.5. GSNO és az *S*-nitrozálás szerepe a sejtben

A GSNO, illetve az *S*-nitrozotiolt tartalmazó fehérjék az emberi szervezetben szintetizálódnak, NO addicióval, vagy egy NO donorral való transznitrozálási reakcióban. Fontos tulajdonsága a GSNO-nak, hogy képes NO leadásra a sejten belül és azon kívül is [84]. A sejtben lévő RSNO-k képesek nitrozálni több fontos fehérjét a sejtmagban, plazmában és a mitokondriumban. Száznál is több nitrozilált fehérjét azonosítottak, legtöbbjüket a mitokondriumban. A GSNO a sejten belül vagy a mitokondriumban keletkezik, és alapvetően egy NO donor és transzport molekula [85]. Az *S*-nitrozált mitokondriális fehérjék között az elektronszállító lánc és a Krebs-ciklus tagjait is megtalálhatjuk. Az *S*-nitrozálás, ami az RSNO-k lebomlása során fordul elő, megváltoztathatja enzimek aktivitását, az esetek többségében inaktiválja őket, ez sejthalálhoz is vezethet. Általánosságban a fehérjék *S*-nitrozálása GSNO, vagy más NO-donor által, megváltoztatja az aktivitását és a működését az adott sejtmagbeli, plazmában található, vagy mitokondriális fehérjének. A túlzott *S*-nitrozálást az Alzheimer és a Parkinson kórral is összefüggésbe hozták [86].

1.2.6. Terápiás alkalmazási vizsgálatok

A GSNO humán terápiás alkalmazási lehetőségeit a 2. táblázat mutatja be, 13 tudományos közlemény alapján. Az alkalmazás módjától és a megfelelő dózis kiválasztásától függően a GSNO-val szelektív hatást érhetünk el annak ellenére, hogy a GSNO több folyamatban is részt vesz. A felsorolt kutatások mind a GSNO jótékony hatásáról számolnak be, amelyekben minimális mellékhatás volt, vagy egyáltalán nem volt mellékhatás, ezek után ismét érdemes elgondolkodni, hogy a GSNO-t miért csak kísérleti

céllal alkalmazzák nem pedig terápiásan. Mindössze egy cégről (N30 Pharma) derült ki, hogy egy asztma kezelésére szánt, GSNO hatóanyagú formuláción dolgozik, ami hamarosan a klinikai tesztelés fázisába kerül [86].

A táblázat eredményeiből azt a következtetést lehet levonni, hogy a vérnyomás csökkentő hatás alatti koncentrációjú GSNO hatékonyan csökkenti az embolizációt, és a vérlemezke aggregációt, ezeket akut beavatkozásoknál vizsgálták leginkább. Nagyobb dózisú 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. Fontos megemlíteni, hogy az alkalmazott GSNO koncentráció viszonylag széles határok között mozgott, nanomólostól milimólos tartományig használták. Emellett a formulációkat áttekintve az is szembetűnő, hogy csak vizes GSNO oldatot és gélt használtak, sem film, sem szilárd hatóanyag kompozíciót nem teszteltek. A készített kísérleti jellegű kompozíciókat az előállítás után frissen felhasználták, tárolást, eltarthatóságot nem vizsgáltak.

Páciens	Adagolás	Dózis	Hatás	Megjegyzések	Referencia
Koronária bypass páciensek, n=24, karotisz angioplasztikán átesett páciensek, n=6, instabil anginás páciensek, n=10	Centrális vénas bolus injekció, iv injekció	40 nmol/perc	Vérlemezke aktiválás gátlás, vérnyomás csökkenés		[34, 87-90]
Egészséges felnőttek, n=5	iv	1 pmol/perc és 1 µmol/perc között	Értágító hatás		[91-93]
Endarteriektómián átesett páciensek, n=12, karotisz angioplasztikán átesett páciensek, n=8, katotid plakk páciensek, n=10	iv infúzió	2,2 vagy 4,4 nmol/kg/perc operáció alatt és 120 perccel utána	Csökkent embolizáció	A dózis úgy állították be, hogy a vérnyomást még ne csökkentse	[94-96]
Egészséges felnőttek, n=8	Hidrogél, topikális alkalmazás (alkar)	20 µl GSNO hidrogél 0,3 mol/g	Javult a mikrocirkuláció	Sem szisztémás, sem vérnyomás változást nem tapasztaltak	[35]
Cisztás fibrózisban szenvedő páciensek, n=9	inhaláció	0,05 ml/kg és 3 ml/kg közötti 10 mM GSNO	Növekedett az oxigén felvétel	A GSNO dózisa megegyezett a fiziológiás koncentrációval	[97]
Egészséges fiatal felnőttek, n=12	bolus iv	0,5 µmol	Javult a bal kamra funkció		[98]

2. táblázat A GSNO humán alkalmazásainak összehasonlítása a dózis, az alkalmazás módja és a hatás szempontjából

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

2. Kérdésfeltevés

A bevezetésben felvázolt tanulmányok alapján a GSNO hatása egyértelműen bizonyított, mint NO donor vegyület. A stabilitás és a NO leadás összefüggéseiben fontos előrelépések történtek az utóbbi 15 évben, amelyek érdekes kérdéseket vetnek fel a stabilitás és a kémiai környezet közötti összefüggésekre. Ezeket a kérdéseket azért is fontos megvizsgálni, mert a terápiásan alkalmazható gyógytermékről mindössze egy példa van, az is még csak a klinikai tesztelés szakaszában tart, ami egyértelműen a GSNO hatóanyagú formuláció eltarthatóságából ered.

2.1. A kémiai környezet és a stabilitás összefüggése

A GSNO, mint a többi NO donor vegyület, stabilizálásával mélyrehatóan foglalkoztak, és a jelen dolgozat is több kísérleti módszert és eredményt mutat be a GSNO stabilizálására. A felsorolt irodalmi példákban találkozhattunk gél mátrixok, ionok, redukáló szerek (kémiai ágensek), a koncentráció és hőmérséklet, (fizikai-kémiai befolyásoló tényezők) hatásáról szóló tanulmányokkal. A stabilizálási lehetőségek megértéséhez azonban komplex vizsgálatot igényel a GSNO bomlásának módja, amint az az irodalmi példákban szerepel ionos és gyökös mechanizmus is felléphet, ezt az oldatban jelenlévő ionok, oldott gázok (mint potenciális gyökös intermedier képzők), és másodrendű kötések is befolyásolják. Ez a dolgozat elsősorban a kémiai környezet stabilizáló hatásáról ad egy komplex képet. Kísérleteink során a kémiai környezeten 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 bomlást, illetve azt, hogy milyen mechanizmus állhat a stabilizálás/destabilizálás hátterében?

2.2. A stabilitás és hatásosság összefüggéseinek vizsgálata

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

A vizsgált tanulmányokból egyértelműen nem derül ki, hogy mi az értágító hatóanyag, és hogyan szabadul fel egy topikális készítményben. A terápiás alkalmazás szempontjából fontos kérdés, hogy maga a GSNO a hatóanyag, és ha igen, akkor hogy fejti ki a hatását. Ez két fő lehetőséget vet fel, az egyik során a GSNO a szervezeten belül fejti ki a hatását (a GSNO enzim katalizált körforgásában, vagy mint NO donor). 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?

2.3. Lebomlási kinetika mérése a terápiás alkalmazhatóság érdekében

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?

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

3. Anyagok és módszerek:

A kísérletekhez használt vegyszerek mindegyikét a Sigma-Aldrichtől szereztük be, kivéve a DEPMPO vegyületet, amelyet a Santa Cruz Biotechnology szolgáltatott.

3.1. NO donorok és gél mátrixok előállítása

3.1.1. NO donorok előállítása

A NO donor oldatokat a megfelelő szerves tiol és $NaNO_2$ reakciójából állítottuk elő, a kiindulási elegy 1:1 arányban tartalmazta a reagenseket. A reakcióban 0,364 mmol glutationt (GSH) (112 mg), vagy *N*-acetilciszteint (NAC) (59,4 mg), vagy 3-merkaptopropionsavat (3-MPA) (38,6 mg) oldottunk fel 2 ml vízben, majd hozzáadtuk 0,364 mmol $NaNO_2$ (25,2 mg) 2ml vizes oldatát. A reakcióelegyet jégfürdőn, fény kizárása mellett kevertettük 5 percig [35]. A GSNO (A), SNAC (B), SN3MPA (C) előállításának reakcióegyenleteit a 3. ábrán láthatjuk.

A „reakció pH” alatt a $NaNO_2$ oldat vegyítés előtti pH-ját kell érteni, a „tárolási pH” alatt pedig a reakció lejátszódása után beállított pH értéket kell érteni. A pH-t tömény HCl, és tömény NaOH oldatokkal állítottuk be, ’Denver Instruments UB-10 pH/mV meter’ pH mérőt használtunk. A NO donor oldatokat minden kísérlethez frissen a szintetizálás után használtuk fel. A OH^- egyenérték függvény felvételéhez 2 mM-os NaOH oldatot használtunk, amelyet egy folyamatosan kevert oldathoz csöpögtettünk, pH=4,2-es kiindulási értéktől. A pH értékeket az adott NaOH ekvivalens mennyiség függvényében ábrázoltuk. Az egyes OH^- ekvivalencia pontokat az egyenérték függvény inflexiós pontjainak feleltettük meg (17. ábra).

3.1.2. Gél mátrixok előállítása (hidrogél, film, liofilizált párna)

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

A legegyszerűbb stabilizálási lehetőség másodrendű kötések kialakítása gélképzőkkel. A tesztelt géleket víz és különböző koncentrációjú PVA (0-12 m/m %), PEG (0-55 m/m %) és kitozán (Chi, 0-1 m/m %) gélképzőkből állítottuk elő. A gélképzőket vízben, homogén oldat eléréséig kevertettük 20-60°C között. A stabilitás vizsgálatokhoz a 80mM-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 gyógyászatilag elfogadott segédanyagok hozzáadásával is fokoztuk, ezek a segédanyagok az alábbiak voltak:

- dextrin
- dextrán
- galaktán
- hidroxipropil cellulóz (HPC)
- hidroxipropil metilcellulóz (HPMC)
- Na-alginát

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 méréshez a filmeket 28 nappal az előállításuk után újra kiegészítettük vízzel a kiindulási térfogatúra, mintát vettünk, és összehasonlítottuk a kiindulási oldat abszorbanciájával, 540 nm-en. Filmek képzéséhez a használt polimernek szilárdnak és rugalmasnak kellett lennie, illetve fontos volt, hogy megtartsa az alakját. Ezeknek a kritériumoknak a PEG, a PVA és a Chi felelt meg.

A filmképzés mellett a stabilizálást fagyasztva szárítással (liofilizálás) is próbáltuk növelni. Liofilizált szerkezeteket, másnéven párnákat akkor tudunk létrehozni, ha az alkalmazott gélképző fagyasztva szárítás után kialakít, és megtart egy viszonylag stabil

szerkezetet, és hamar újra oldatot lehet képezni (5 percen belül) víz hozzáadásával. A liofilizáláshoz használt készülék egy ’Labconco Freezone 2,5’ típusú készülék volt. Fagyasztva szárítás előtt a minták abszorbanciáját lemértük 540 nm-es hullámhosszon (200 µl mintát vettünk), és ezt vettük kiindulási értéknek. A mintákat minden esetben -80°C-ra hűtöttük, majd ezután liofilizáltuk a géles oldatokat. A liofilizáló hűtőegysége -54°C-os volt, a vákuumpumpát 0,2 Pa végvákuumra állítottuk, a liofilizálást 24 órán át végeztük, 500 µl mintákkal dolgoztunk. A liofilizálás után a mintákat lefedtük, 4°C-on, fénytől elzárva tartottuk. Az adott tárolási idő után a mintákat újra feloldottuk 500 µl víz hozzáadásával, majd az oldatból kivettünk 200 µl-t, és újra lemértük az abszorbanciát.

3.2. Stabilitás vizsgálatok

3.2.1. Gél mátrixok hatása

A gélek pH-ját 3,8 és 8,4 közötti értékre állítottuk be a tárolási időszakra. A kiindulási abszorbanciákat és a tárolási periódus utáni abszorbanciákat hasonlítottuk össze. Az oldatokat 4°C-on tároltuk fény kizárása mellett, zárt 96 lyukú lemezeken, hogy az oldat párolgását megelőzzük. A reakció pH semleges (pH=7) volt, vagyis a keletkezett GSNO oldat savas volt, ezt módosítottuk tömény NaOH-val.

3.2.2. Enzimek és inert atmoszféra hatása

A használt GSNO oldat minden esetben 80 mM-os volt, a kontroll oldat pH-ja 4,2 volt. Mind a szuperoxid diszmutáz (SOD, EC 1.15.1.1), mind a kataláz (Cat, EC 1.11.1.6) enzimekből 500 U/ml-t használtunk. A stabilitást N_2 atmoszféra alatt is vizsgáltuk, ebben az esetben N_2-t buborékoltattunk át a savas illetve módosított pH-jú oldatokon. A bomlást spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk, 540 nm-es hullámhosszon. Az oldatokat 5 nap tárolás után vizsgáltuk, a mintákat 4°C-on tároltuk, sötétben.

3.2.3. pH hatása

A pH stabilizáló hatását a GSNO, *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 lemezeken, hogy az oldat párolgását megelőzzük.

A tárolási kísérlethez használt előállításkor a reakció pH semleges (pH=7) volt, a pH-t az RSNO előállítása után módosítottuk. A tárolási időszak után a pH-t és az abszorbanciát is mértük. Vizsgáltuk azt is, hogy a gélképzők stabilizáló hatását, felhasználhatóságát hogyan változtatja a pH módosítás.

Az enzimek és inert gáz esetében is vizsgáltuk a pH hatását, a pH-t minden esetben cc. NaOH-dal állítottuk be. Fontos kiemelni, hogy kísérleteink során nem puffert használtunk, mivel az előkísérletek alapján a pufferek minden esetben csak gyorsították a bomlást. Ezt a korábban említett irodalmi példákkal is megmagyarázhatjuk, amelyekben a H_2S, és az aszkorbinsav is fokozta a bomlást lúgos közegben [61, 64]. Emiatt a cél az volt, hogy minimális hozzáadott ionnal módosítsuk a pH-t.

A méréseket különböző tárolási idő után értékeltük ki, attól függően, hogy a formuláció vizes oldat, gél, film, vagy liofilizált párna volt. A tárolási időt úgy választottuk meg, hogy az ugyanahhoz a kísérlethez tartozó minták összehasonlíthatóak legyenek. A különböző formulációkat (vizes oldat, gél, film, liofilizált párna) egymással nem hasonlítottuk össze, mivel más technológia, halmazállapot, mintaelőkészítés volt szükséges az előállításhoz. A pH beállítása során, tekintve, hogy időnként 200 µl-es mintákkal dolgoztunk, az adalékanyagok is változtattak a pH-n, és tömény NaOH-t használtunk, főleg arra törekedtünk, hogy az ugyanahhoz a kísérlethez tartozó minták összehasonlíthatóak legyenek. A pH beállítás során a NaOH mennyiségét rögzítettük, nem korrigáltuk az adalékanyagok pH-jával, szintén a bevitt ion mennyiségének minimalizálása miatt. Az eltérő tárolási és a mérési körülmények típusonként az ’Eredmények’ fejezetben szerepelnek részletesen.

3.3. Szerkezet, stabilitás és hatás vizsgálati módszerek

3.3.1. UV és látható spektroszkópia

A GSNO és a használt nitrozotiolok mindegyike vízben oldható, színes vegyület, két karakterisztikus elnyelési sávval, az egyik az UV tartományba eső 333 nm-es hullámhosszon, a másik a látható tartományba eső 540-545 nm-es tartományban van (5. ábra, A, B).

Az UV tartományba eső karakterisztikus hullámhosszon a moláris abszorpciós koefficiens nagyjából 20 szorosa a látható tartományba esőének. Így UV-ban kisebb koncentrációkkal is pontosan lehet dolgozni, illetve ebben a tartományban nyomon lehet követni a vegyérték elektronok szerkezeti változását. Az UV tartomány mérésére ’Greiner UV-Star® plate, 96 well, flat bottom’ lemezeket használtunk, 200 µl-es mintákkal dolgoztunk.

A bomlás kinetikát a látható tartományban mértük, az RSNO oldat koncentrációját a spektrofotometriás optikai denzitás (OD) értékből származtattuk. Az 540 nm-es hullámhosszon mértünk, abban a koncentráció tartományban, ahol a koncentráció - OD függvény lineáris volt (15 – 100 mM). A méréshez 200 µl-es mintákat használtunk 96 lyukú lemezen.

A használt spektrofotométer egy ’Biotek PowerWave XS’ típusú készülék volt, ami UV és látható tartományban is használható.

3.3.2. A bomlás mechanizmusának vizsgálata

A GSNO bomlás során két mechanizmust vizsgáltunk, a gyökös és az ionos bomlást, a két típushoz két különböző berendezést használtunk

3.3.2.1. 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, NaSH), nitrozovegyületek (SNAC, SN3MPA) UV spektrumának változását is vizsgáltuk a kémiai környezet

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

(esetünkben a pH) megváltoztatásának hatására. A mérésekhez 20-80 mM-os koncentrációjú anyagokat használtunk.

3.3.2.2. Gyökös mechanizmus vizsgálata ESR spektroszkópiával

Az elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópiát a gyökös mechanizmusú reakciók vizsgálatára használják, esetünkben a GSNO bomlás során keletkezett gyökök jel intenzitását mértük és így a bomlás kinetikáját vizsgáltuk gyökfogók alkalmazásával, és anélkül is. A használt berendezés egy 'Bruker EMX6 on-line X-band, ~9.5 GHz' spektrométer volt. A készüléket 0,1°C-os pontossággal tudtuk termosztálni, a hőmérsékletet 0°C és 40°C között használtuk. A minták GSNO koncentrációja 4-80 mM között volt, a mérés során 20 µl minta oldatokat mértünk be 1,2 mm belső átmérőjű kapillárisokba. Azokban a mérésekben, ahol gyökfogót nem használtunk, a spektrumot 3400 G középérték körül 200 és 50 G közötti intervallumokban vettük fel, 2048 pontos felbontással. Két szkennelést végeztünk mintánként, egy szkennelés 167 másodperces volt, a mikrohullámokat 20 mW-os teljesítményen használtuk, 3 G modulációs amplitudóval.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

3.3.2.3. Gyökös bomlás vizsgálata TEMPOL gyökfogó jelenlétében

80 mM-os GSNO oldatok bomlását vizsgáltuk 1 mM TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil) jelenlétében, vizes oldatban. A mérés során a TEMPOL gyök jelének csökkenését vizsgáltuk ESR spektroszkópiával. A TEMPOL jele a GSNO-ból keletkezett gyökökkel arányosan csökkent [99]. Négy oldatot vizsgáltunk, a kontroll oldat pH-ja 4,2 volt, a módosított pH-jú oldaté 8,8 volt, mindkét oldatot légköri és N_2 atmoszféra alatt is vizsgáltuk. A mérést a TEMPOL középső ESR jelének maximális amplitudójához tartozó frekvenciáján mértünk 300 másodpercig, 20°C-on.

3.3.2.4. Gyökös bomlás vizsgálata DEPMPO gyökfogó jelenlétében

80 mM-os GSNO oldatok bomlását vizsgáltuk 20 mM DEPMPO (5-(dietoxifoszforil)-5-metil-1-pirrolin-N-oxid) jelenlétében, vizes oldatban. A mérés során a DEPMPO szabad gyökkel alkotott adduktjának 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) N_2 gáz alatt. A mérés során a mikrohullám teljesítménye 20 mW volt, a modulációs amplitudó 0,6 G, a vevő erősítése 10^5. 140 G intervallumban végeztük a mérést 1024 pontos felbontással, 32-szer szkenneltük az intervallumot egy szkennelés időtartalma 83,886 másodperc volt, a mérést 40°C-on végeztük. A kapott spektrumokat ’BRUKER WINEPR Simfonia’ szoftver segítségével szimuláltuk. A szimulációhoz a Karoui és munkatársai, illetve a Schrammel és munkatársai publikációiban szereplő csatolási állandókat használtuk [99, 100].

3.4. 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. A készülék használata során minden mérés után a vörös

vértest 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.

3.5. 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 variancia analízissel, és Bonferroni post-hoc teszttel elemeztük, annak megfelelően, hogy az adott értékhalmazra 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 „***”.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

4. Eredmények

A GSNO elméleti maximális elérhető koncentrációja az alkalmazott reakcióegyenlet szerint – amennyiben az összes GSH átalakul GSNO-vá – 91 mM lehet. A semleges, pH módosítás nélküli $NaNO_2$ oldat pH-ja 7-es volt, és a semleges $NaNO_2$ oldat felhasználásával előállított GSNO oldat pH-ja 4,2 volt a kísérleteink során.

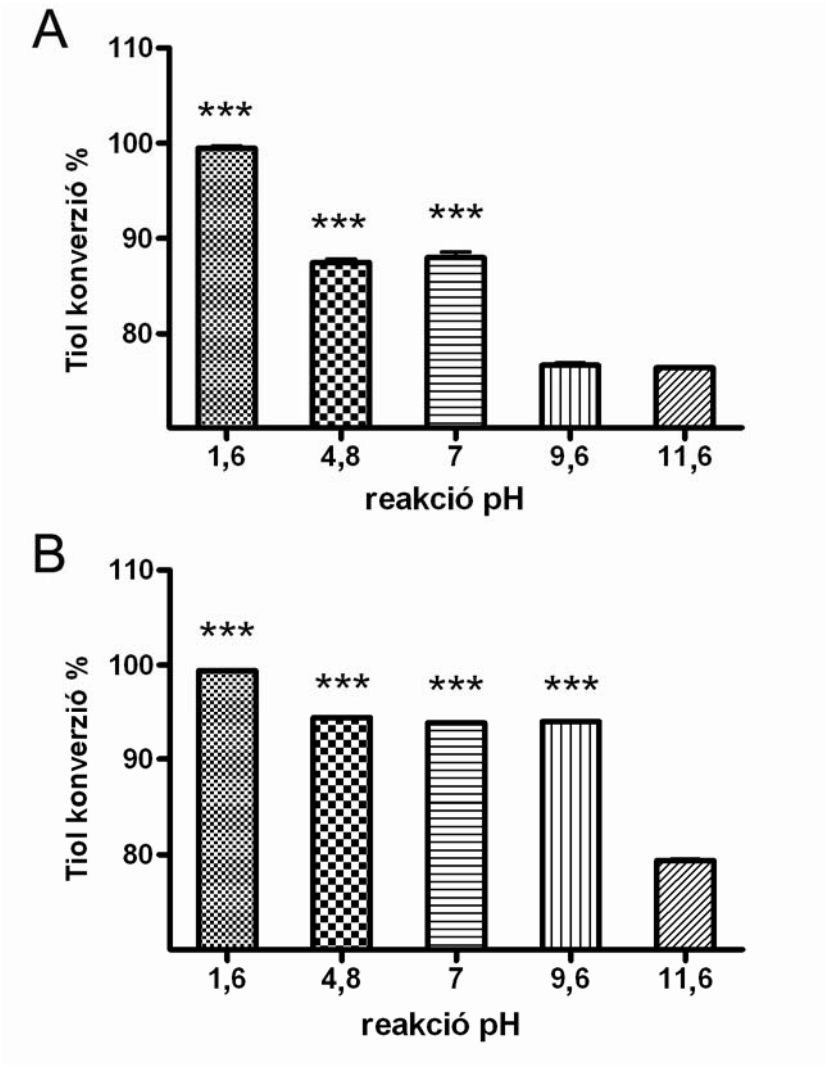
4.1. NO donorok előállítása

A NO donorok szintetizálása során az előállítás pH függését tanulmányoztuk.

4.1.1. NO donorok előállításának pH függése

A reakció pH alatt a $NaNO_2$ oldat pH-ját értjük, az GSNO előállítás során azt tapasztaltuk, hogy erősen savas körülmények között a legmagasabb megfigyelt átalakulás az elméleti maximum 99,5%-a (90,5 mM, pH=1,6) volt (6. ábra A). A SNAC előállítása során a tendencia ugyanez volt, itt is az erősen savas pH kedvezett az előállításnak.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



6. ábra: A GSNO (A) és a SNAC (B) képződésének pH függése. 0,364 mmol kiindulási tiolt és $NaNO_2$-et használtunk, a pH-t cc. HCl és cc. NaOH oldatokkal módosítottuk. Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel, n=4. *** p <0,001 pH=1,6 és az összes többi pH-n mért között. *** p <0,001 pH=4,8 és pH=9,6, valamint pH=11,6 között (A) *** p <0,001 pH=7 és pH=9,6, valamint pH=11,6 között (A). *** p <0,001 pH=4,8 és pH=11,6 között (B). *** p <0,001 pH=7 és pH=11,6 között (B). *** p <0,001 pH=9,6 és pH=11,6 között (B).

Az ábra alapján megállapíthatjuk, hogy a szintézis során a reakció elegy pH-ja szignifikáns hatással van az átalakulás hatékonyságára. A különböző pH értékeken kapott GSNO és SNAC koncentrációkat összehasonlítva azt az eredményt kaptuk, hogy 20,04 %, illetve 23,18 % különbség van savas és lúgos oldatban előállított termék koncentráció

között, a GSNO illetve a SNAC esetében (6. ábra). Az is szembetűnő, hogy az enyhén savas és az enyhén lúgos reakció pH a SNAC esetében nem változtatta meg szignifikánsan az átalakulást a semleges reakció pH-hoz képest. Azt a következtetés azonban egyértelműen levonhatjuk, hogy az erősen savas pH kedvez leginkább a reakciónak, gyakorlatilag teljes átalakulás érhető el, ha a szintézist erősen savas körülmények között végezzük. Az SN3MPA előállítását nem vettük bele az összehasonlításba, mert túl gyorsan bomlott, ahhoz, hogy reprezentatív mérést végezhessünk vele.

4.2. Stabilitás vizsgálatok

Az előállított RSNO oldatok lebomlását spektrofotométeren követtük, 540 nm-es hullámhosszon. A stabilitást gyógyszerészetileg alkalmazható gélképzők jelenlétében vizsgáltuk, mértük a pH módosítás hatását, inert gáz szerepét, és vizsgáltuk olyan enzimek jelenlétében is, amelyek az oldott oxigén eredetű szabadgyök képződést befolyásolják.

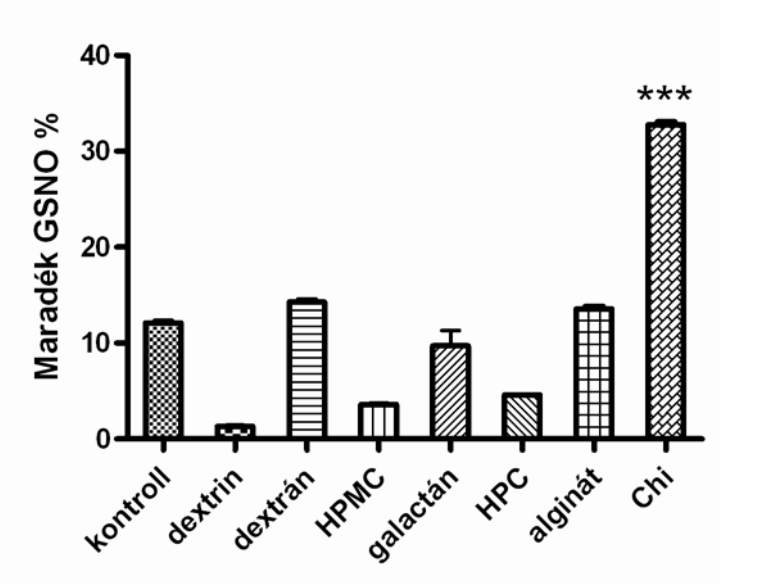
4.2.1. Gél mátrixok hatása a stabilitásra

A cél olyan GSNO formuláció előállítása volt, amelyben egyszerű másodrendű kötések stabilizáló hatását vizsgáltuk gyógyászatilag elfogadható polimerek és gyógyászatilag elfogadható segédanyagok felhasználásával.

4.2.1.1. Gélek összetételének optimalizálása

Az adalékanyagok lehetséges stabilizáló hatását 7 napon át vizsgáltuk, módosítatlan pH-jú oldatban (pH=4,2), az oldatokat 7 napig zárt 96 lyukú lemezkben tároltuk, fény kizárása mellett, a GSNO koncentrációja 40 mM volt. Az eredményeket a 7. ábra foglalja össze:

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



7. ábra: A stabilizáláshoz használt adalékanyagok hatása a GSNO lebomlására, 7 nap után, (n=2), minden adalékot 10mg/ml koncentrációban használtunk, vagyis 1 m/m %-os oldatok stabilizáló hatását mértük. Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** $p < 0{,}001$ a kitozán (Chi) és az összes többi adalékanyagot tartalmazó elegy között.

A legjobb eredményt az 1%-os kitozánnal (Chi) értük el (32,78±0,29 %), így a továbbiakban lehetséges szinergista hatást kerestünk a kitozán és a PVA, PEG között.

A filmképzésre is alkalmas gélképzők a tapasztaltak és az irodalmi példák alapján három polimerre korlátozódtak, ezért a három fő gélképző (PVA, PEG, Chi) összetételét változtattuk, az alábbi táblázat szerint, 16 duplikált mintában:

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

	PVA %	PEG %	Chi %	Maradék GSNO %
1. minta	6,67	0,00	0,33	81,28±3,45
2. minta	10,00	0,00	0,17	81,73±1,44
3. minta	11,67	0,00	0,08	78,65±4,49
4. minta	13,33	0,00	0,00	82,20±3,51
5. minta	5,00	1,67	0,33	80,51±2,56
6. minta	7,50	2,50	0,17	80,36±2,84
7. minta	8,75	2,92	0,08	79,68±2,67
8. minta	10,00	3,33	0,00	74,77±3,43
9. minta	3,33	3,33	0,33	79,95±0,79
10. minta	5,00	5,00	0,17	80,21±2,08
11. minta	5,83	5,83	0,08	77,97±2,03
12. minta	6,67	6,67	0,00	81,90±0,00
13. minta	1,67	5,00	0,33	80,16±2,35
14. minta	2,50	7,50	0,17	79,46±4,32
15. minta	2,92	8,75	0,08	78,03±1,16
16. minta	3,33	10,00	0,00	81,73±0,48

3. táblázat: Gélképző és adalékanyag összetételek, potenciális szinergista hatás vizsgálatához, a vizsgálatot 14 napig végeztük, 4°C-on, fény kizárása mellett, a GSNO kiindulási koncentrációja 40 mM volt. A maradék GSNO a kiindulási és a 14. napon mért abszorbanciák százalékos különbsége átlag±SEM-ben kifejezve, n=2.

A polimerek változtatása a 3. táblázatban használt arányokban nem vezetett szignifikáns stabilitás fokozó hatással. A kompozíciók összességében a kiindulási GSNO 79,91±1,9 %-át őrizték meg 14 nap után. A Chi koncentrációjának változtatása nem befolyásolta szignifikánsan a stabilitást a 0 - 0,33 m/m %-os tartományban. A további kísérletekben a Chi mennyiségét csökkentettük, és a PEG mennyiségét növeltük. Az optimális értékeket a 4. táblázat alábbi táblázat foglalja össze:

	PVA %	PEG %	Chi %	Maradék

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

				GSNO %
1. minta	2,92	8,75	0,08	65,58±2,67
2. minta	3,02	9,06	0,06	51,09±0,62
3. minta	3,13	9,38	0,04	40,66±1,51
4. minta	3,23	9,69	0,02	28,70±0,30
5. minta	3,33	10,00	0,00	14,07±0,61
6. minta	2,19	9,48	0,08	**90,30±4,85**
7. minta	2,27	9,82	0,06	72,87±2,74
8. minta	2,34	10,16	0,04	69,85±5,85
9. minta	2,42	10,49	0,02	37,35±3,82
10. minta	2,50	10,83	0,00	16,21±0,31
11. minta	1,46	10,21	0,08	**89,76±0,60**
12. minta	1,51	10,57	0,06	**88,79±2,73**
13. minta	1,56	10,94	0,04	**79,94±8,21**
14. minta	1,61	11,30	0,02	29,97±0,00
15. minta	1,67	11,67	0,00	15,68±2,07
16. minta	0,73	10,94	0,08	75,96±1,19
17. minta	0,76	11,33	0,06	74,92±2,14
18. minta	0,78	11,72	0,04	60,06±0,30
19. minta	0,81	12,11	0,02	57,80±4,77
20. minta	0,83	12,50	0,00	7,49±0,90
21. minta	0,00	11,67	0,08	54,29±7,67
22. minta	0,00	12,08	0,06	52,62±0,31
23. minta	0,00	12,50	0,04	29,32±2,16
24. minta	0,00	12,92	0,02	17,28±1,23
25. minta	0,00	13,33	0,00	4,01±0,31

4. táblázat: Gélképző és adalékanyag optimalizált összetételek, potenciális szinergista hatás vizsgálatához, a vizsgálatot 14 napig végeztük, 4°C-on, fény kizárása mellett, a GSNO kiindulási koncentrációja 40 mM volt. A maradék GSNO a kiindulási és a 14. napon mért abszorbanciák százalékos különbsége átlag±SEM-ben kifejezve, n=2.

Az optimális összetétel a 2,19 % PVA, 9,48 % PEG, 0,08 % Chi elegyhez tartozott, a GSNO 90,3 ± 4,8 %-a maradt meg emellett az összetétel mellett. Azonban nem volt szignifikáns különbség a négy legstabilabb gél maradék GSNO tartalma között. A Chi-t tartalmazó és a Chi-t nem tartalmazó oldatok között azonban szignifikáns különbség volt ($p<0,05$).

A gélek stabilizáló hatását csak intramolekuláris kötések fokozták egyszerű vizes oldatokban, a legjobb eredmény alapján több, mint 90%-ot tudtunk megőrizni a kiindulási GSNO mennyiségéből két hét tárolás után.

4.2.1.2. Filmek stabilizáló hatása

A gélképzők optimális összetételének megállapítása után a gélképzők mennyiségét tovább változtattuk, olyan összetételt dolgoztunk ki, amelyek a gél kiszárításával filmeket képeztek. Így azt tudtuk megvizsgálni, milyen stabilizáló hatást érhetünk el film formulációkkal, vagyis az oldószer (víz) csökkentése jár-e fokozott stabilitással.

A legjobb eredmény 36,15±0,79 % volt 28 nap tárolás után, ez a 1,00% PVA, 1,33% PEG, 0,33% Chi összetételhez tartozott (5. táblázat).

Az eredmény alapján arra a következtetésre kell jutni, hogy nem elég hatékony a film, mint formuláció a GSNO stabilan tartására, hosszú távon.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

	PVA %	PEG %	Chi %	Maradék GSNO %
1. minta	3,33	0,00	0,33	8,41±0,24
2. minta	1,67	0,00	0,50	23,15±2,02
3. minta	0,83	0,00	0,58	25,56±1,02
4. minta	1,33	0,67	0,33	16,37±1,12
5. minta	0,67	0,33	0,50	18,01±0,62
6. minta	0,33	0,17	0,58	13,36±1,57
7. minta	1,00	1,33	0,33	25,22±2,01
8. minta	0,50	0,67	0,50	**36,15±0,79**
9. minta	0,25	0,33	0,58	18,85±1,92
10. minta	0,67	2,00	0,33	33,12±1,31
11. minta	0,33	1,00	0,50	28,86±0,81
12. minta	0,17	0,50	0,58	16,56±2,25
13. minta	0,33	2,67	0,33	20,39±3,90
14. minta	0,17	1,33	0,50	16,14±1,39
15. minta	0,08	0,67	0,58	17,50±1,86
16. minta	0,00	3,33	0,33	15,76±0,21
17. minta	0,00	1,67	0,50	13,95±2,16
18. minta	0,00	0,83	0,58	11,21±1,29
19. minta	0,00	0,00	0,33	12,20±2,61
20. minta	0,00	0,00	0,50	12,53±0,21
21. minta	0,00	0,00	0,58	15,62±1,14
22. minta	0,00	0,00	0,66	18,18±4,74

5. táblázat: Gélképző és adalékanyag összetételek filmek előállításához, a filmeket 4°C-on tároltuk fény kizárása mellett, majd 28 nap után a filmeket újra feloldottuk az eredeti mennyiségű vízben, és az eredeti abszorbancia százalékában fejeztük ki az értékeket, (n=2)

4.2.1.3. Stabilizálás liofilizálással

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

A liofilizálás segítségével azt vizsgáltuk, hogy ha a GSNO molekulákat egy vízmentes környezetben tároljuk, és így feltételezhetően kizárjuk az oldószer által okozott polarizációt, amivel akadályozhatjuk a bomlást. Emellett a molekulákat térben is el tudjuk választani egymástól, tehát a molekulák egymásra gyakorolt hatását is kiküszöbölhetjük.

8. ábra: Liofilizált párna fénymikroszkópos felvétele, a felvételen 3%-os liofilizált Chi párna reprezentatív képét látjuk, 4-szeres nagyításban

A kísérlethez olyan gélképzőket kellett választani, amelyek szobahőmérsékleten szilárdak (ezzel a PEG-et kizártuk, kísérleteink során PEG200-at használtunk), létrehoznak egy térhálós szerkezetet és megtartják a szerkezetüket alacsony nyomáson is, ennek a PVA sem felelt meg. Az alábbi komponensekkel sikerült stabil szilárd mátrixokat előállítani, amelyek megtartották a szerkezetüket, és könnyen sikerült a tárolási időszak után víz hozzáadásával homogén oldatot, vagy gélt kapni. A segédanyagokat 1 m/m %-ban használtuk, csakúgy, mint a kitozánt, az eredményeket a 6. táblázatban foglaltuk össze:

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

minta	Maradék GSNO %
Chi	82,28±0,39
Chi dextrin	88,35±1,43
Chi dextrán	83,83±1,36
Chi HPMC	88,59±0,62
Chi HPC	58,85±0,43
dextrin	58,19±0,60
dextran	78,95±2,13
HPMC	81,87±3,12
galactan	82,45±0,60
HPC	76,65±1,95

6. táblázat: GSNO tartalmú liofilizált párnák stabilizáló hatása.
A liofilizált párnákat 7 napig tároltuk, 4°C-on, fény kizárása mellett,
A tárolás után a kiindulási víz mennyiségével újra kiegészítettük,
és mértük az abrszorbanciát, n=2

Az eredmények alapján a legjobb összetétel a kiindulási GSNO 88,59±0,62 %-át őrizte meg 7 nap után, ez az összetétel az 1% Chi, 1% HPMC-hez tartozott. Az adatok alapján a liofilizálás közel sem olyan hatékony, mint a gél formulációk, ahol a GSNO kiindulási értékének több, mint 90%-át tudtuk megőrizni 14 nap után.

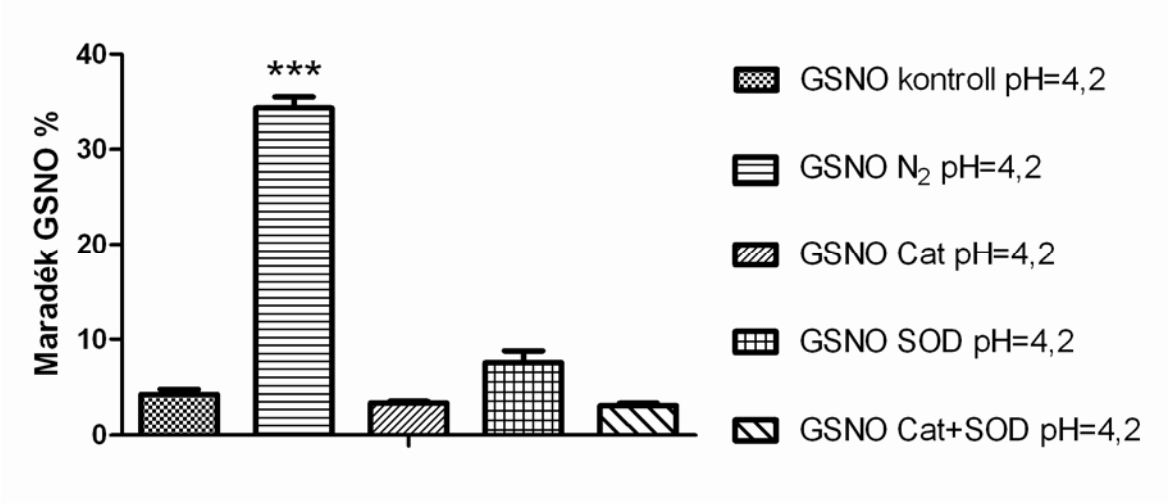
A gél mátrixos kísérletek során tehát a legjobb eredményt a hűtött vizes oldatokkal tudtuk elérni, azokkal a gélekkel, amelyek a PVA, PEG és Chi összetevőket tartalmazták megfelelő arányban. A komponensek felhasználását kimondottan GSNO oldatok stabilizálására szabadalmaztattuk is Európában, jelenleg PCT bejelentés alatt áll.

4.2.2. Enzimek és inert atmoszféra hatása a stabilitásra

A GSNO lebomlását inert gáz átbuborékoltatásával (N_2) is vizsgáltuk, ezzel a vízben oldott oxigén eltávolításának hatását vizsgáltuk. A stabilitást SOD és Cat enzimek jelenlétében is vizsgáltuk. A SOD enzim az O_2^- és az $O_2^{\cdot-}$ átalakítását katalizálja, H^+ jelenlétében H_2O_2-dá, az enzim pH=4-12 között működik [101]. A Cat enzim a H_2O_2

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

átalakítását katalizálja H_2O-é és O_2-é, az enzim pH=3,5-10,5-es intervallumban működik [102].



9. ábra: Az inert gáz, illetve enzimek stabilizáló hatása módosítatlan kémhatású oldatokban (n=4). Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** $p < 0{,}001$ a N_2 atmoszféra alatti pH=4,2-es oldat és az összes többi oldat között.

A mintákat 5 napig tároltuk 4°C-on, fény kizárása mellett, az eredményeket a kiindulási és a tárolási időszak abszorbanciájának százalékában adtuk meg.

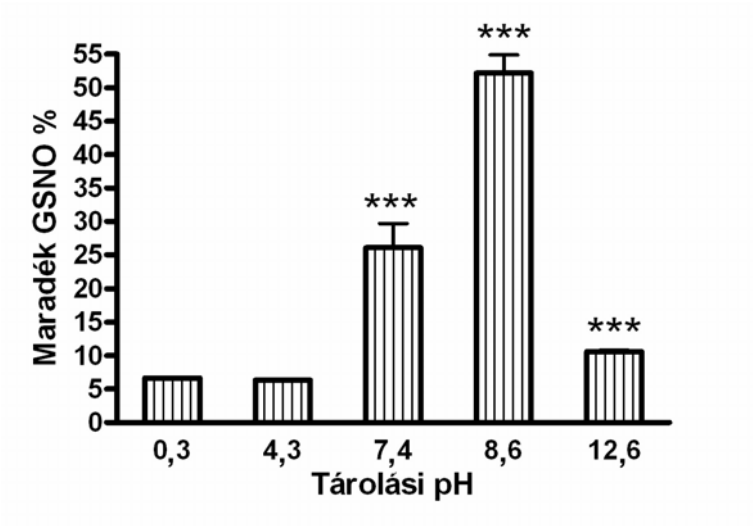
Tekintve, hogy az enzimek a használt pH értékeken aktívak, az eredmény alapján arra lehet következtetni (9. ábra.), hogy nem az oldatban lévő O_2^- és az $O_2^{\cdot-}$ felelős közvetlenül a GSNO bomlásért, de mivel a N_2 gáz növelte a stabilitást, ezért valószínűleg az oldott légköri gázok egy része részt vesz a bomlásban, sőt elősegíti azt. Például egy $NO^{\cdot}$ - $NO_2^{\cdot}$ átalakulás következtében, vagy egy $NO^{\cdot}$ / O_2 rendszeren keresztül, mivel a Cat enzim növelte a bomlást a csak SOD-t tartalmazó elegyhez képest. A módosítatlan pH-jú oldatok esetében a stabilitást tehát a N_2 atmoszféra szignifikánsan növelte, a SOD kis mértékben növelte.

4.2.3. pH stabilizáló 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,

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

mértük a kiindulási abszorbanciát, majd 7 napig tároltuk az oldatokat 4°C-on, fény kizárása mellett. Az abszorbanciákat 7 nap után újra mértük, a maradék GSNO-t a kiindulási érték százalékában fejeztük ki (10. ábra).

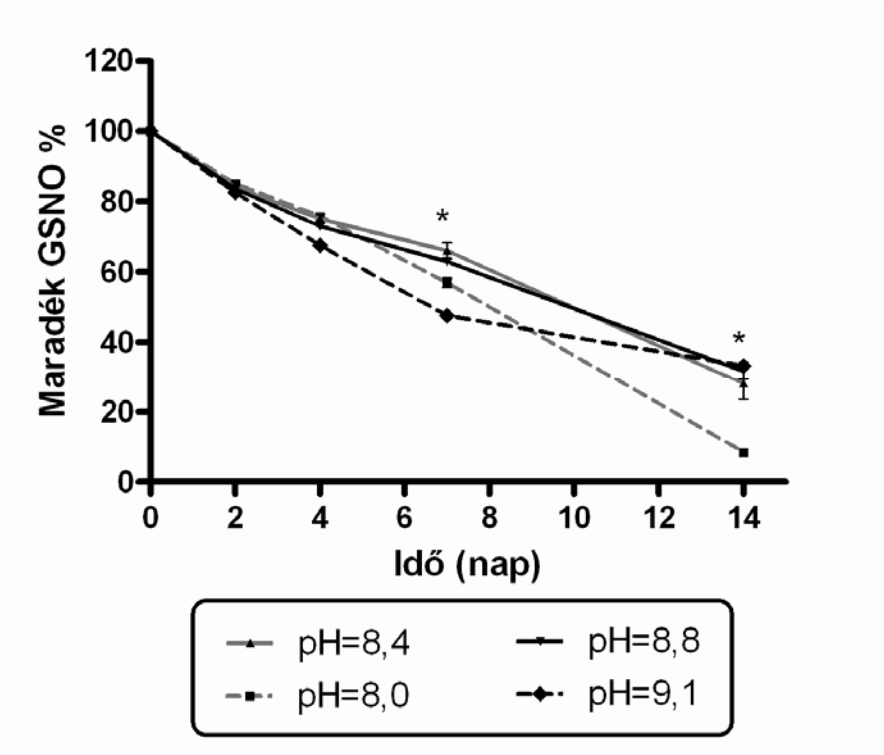


10. ábra: A pH hatása a GSNO lebomlásra,
egyszerű vizes oldatokban 7 nap tárolás után 0,3-12,6-os tartományban, (n=4). Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** p <0,001 a pH=8,6-os oldat és az összes többi oldat között. *** p <0,001 a pH=7,4-es oldat és az összes többi oldat között. *** p <0,001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

Meglepő, hogy ugyan az előállításnak az erősen savas pH kedvez, azonban a stabilitás nagyon gyenge, mindössze 6,7±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 fiziológiás 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±2,72 %-a maradt meg.

Ezek alapján az enyhén lúgos tartományt vizsgáltuk különböző pH értékeken, és 14 napig vizsgáltuk a stabilitást, az oldatokat 4°C-on tároltuk, fény kizárása mellett. A kiindulási és a 14. nap utáni abszorbanciák arányát százalékban fejeztük ki (11. ábra).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



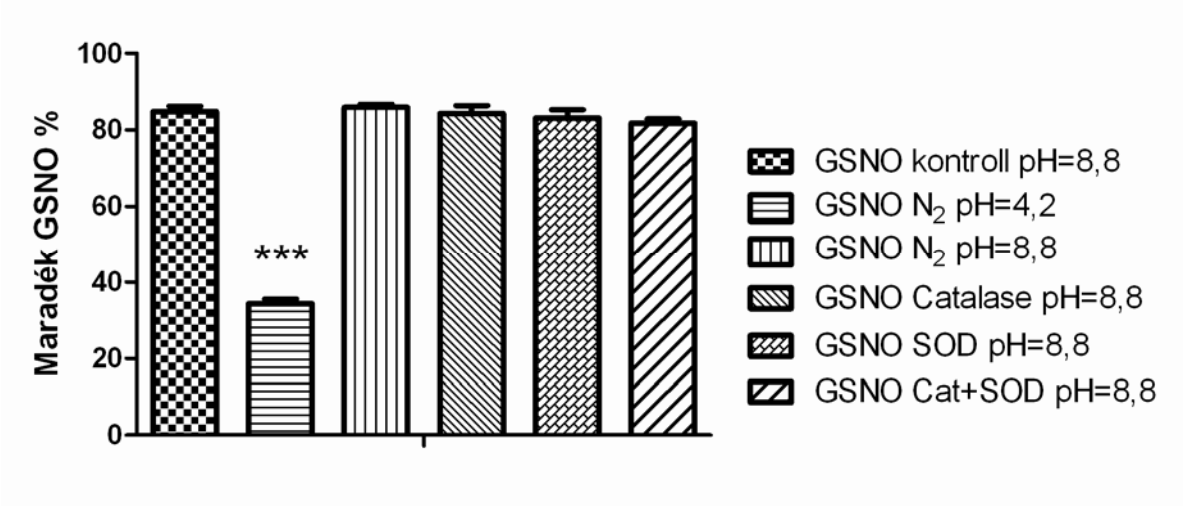
11. ábra: A pH hatása a GSNO lebomlásra,
egyszerű vizes oldatokban 14 nap tárolás után pH= 8,0 – 9,1-es tartományban,
(n=4). Az eredményeket átlag±SEM-ként tüntettük fel. * $p < 0,05$ a pH=8,4-es illetve a pH=8,8-as oldat és az összes többi oldat között 7 nap után, és * $p < 0,05$ a pH=8,8-os, illetve a pH=9,1-es oldat és az összes többi oldat között 14 nap után.

A szűkebb tartományt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 8,8-as és a 9,1-es pH gátolta leginkább a bomlást, ezekben az esetekben a maradék GSNO 31,8±4,6 %, illetve 33,3±2,1 % volt.

További érdekesség, hogy a tárolási időszak leteltével az oldatok pH értéke lecsökkent, a módosított és a módosítatlan pH-jú oldatokban egyaránt, ebből arra lehet következtetni, hogy a bomlás során sav keletkezik.

Az enzimek és inert atmoszféra hatását (9. ábra) összevetettük és kiegészítettük az enyhén lúgos pH (pH=8,8) hatásával, hogy megtudjuk melyik stabilizáló hatás mennyire meghatározó (12. ábra). Az ábrán összehasonlításként szerepel a savas tárolás legstabilabb eredményeként a N_2 alatt tárolt oldat is.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



12. ábra: Az inert gáz, illetve enzimek stabilizáló hatása módosított kémhatású (pH=8,8) oldatokban, (n=4). Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** p <0,001 a N_2 atmoszféra alatti pH=4,2-es oldat és az összes többi oldat között

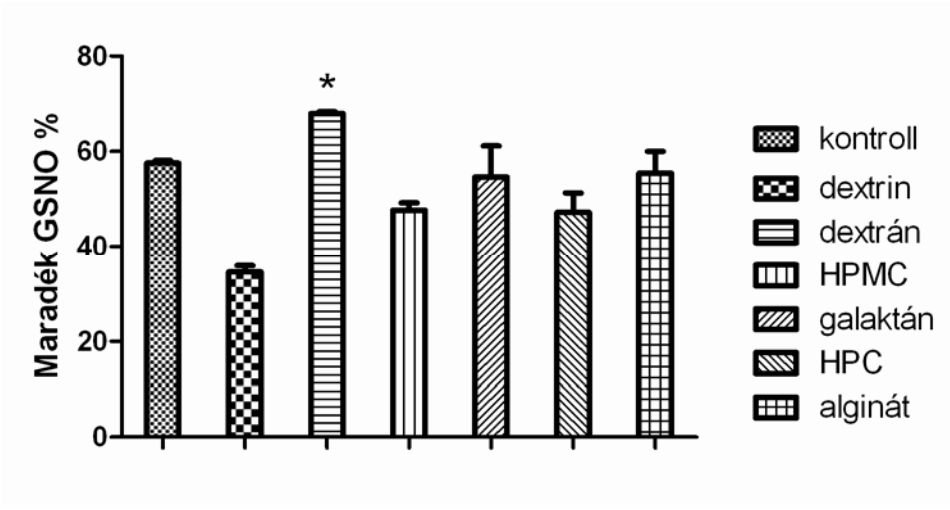
A kapott eredmények alapján a pH stabilizáló hatása szignifikáns, a légköri körülmények között tárolt GSNO 84,76±1,5 %-a maradt meg, ezt a hatást kis mértékben fokozza a N_2 atmoszféra (85,87±0,86 %). Azonban sem a N_2 atmoszféra sem az enzimek nem növelték szignifikánsan a stabilitást, a pH módosítás 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 film és a liofilizált formulációk esetében a pH módosítás nem használható, hiszen a pH csak vizes oldatokban értelmezhető. Emiatt a pH-nak köszönhető növelt stabilitást vizes oldatokban és gélekben teszteltük a továbbiakban.

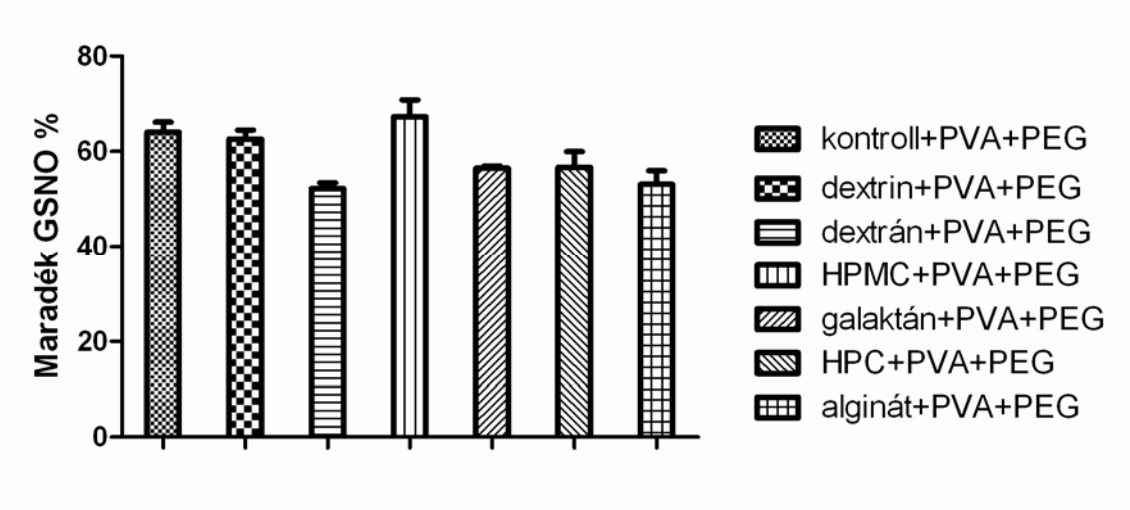
A segédanyagok közül a kitozánt, ami a leghatékonyabb stabilizáló volt, sajnos nem tudtuk alkalmazni, mert csak savas oldatban oldódik, így enyhén lúgos körülmények között csapadékot képez. Az összetevőket ugyanabban az arányban alkalmaztuk, mint a 7. ábrán láthatóékat (a kitozánt kivéve, mert azt nem tudtuk használni). Az adalékanyagok lehetséges stabilizáló hatását 7 napon át vizsgáltuk, 8,5-ös pH-jú oldatokban (13. ábra). Látható, hogy a segédanyagok közül a dextrán fokozta kis mértékben a stabilitást, a többi a kontroll oldatnál is jobban bomlott.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



13. ábra: Az adalékanyagok stabilizáló hatása módosított kémhatású (pH=8,5) oldatokban, (n=4), Az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. * p <0,05 a dextránt tartalmazó oldat és az összes többi oldat között

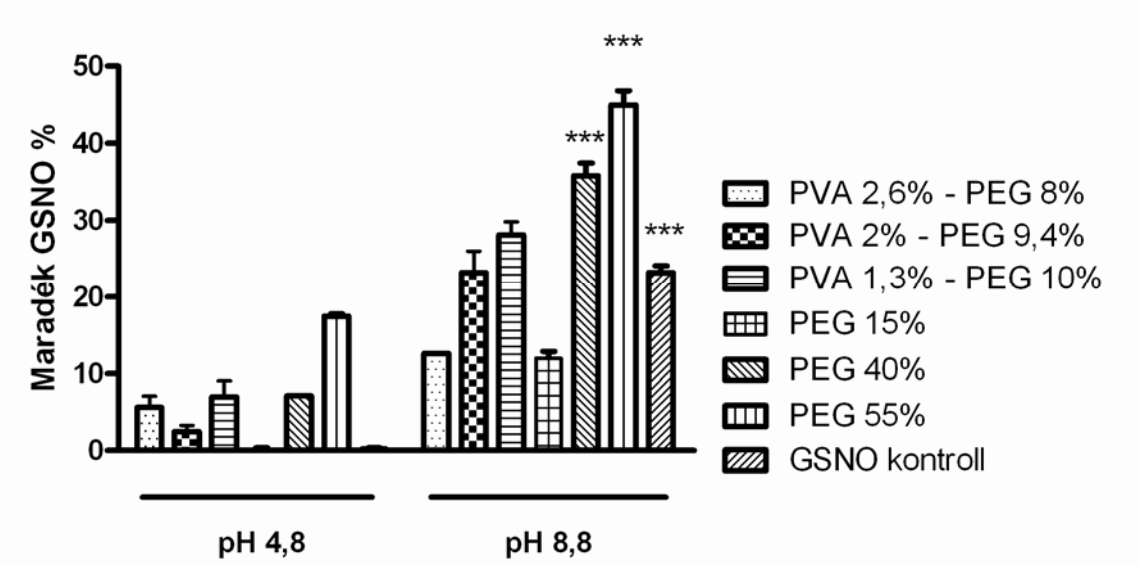
A segédanyagokat ezután a már korábban optimalizált PVA és PEG elegyekkel vegyítettük, és vizsgáltuk a pH hatását, az összetevők ugyanolyan arányban szerepeltek, mint a 4. táblázat legoptimálisabb értékénél, természetesen kitozán nélkül. A stabilizáló hatást 7 napon át vizsgáltuk, 8,5-ös pH-jú oldatokban (14. ábra).



DOI: 10.14753/SE.2013.1789

14. ábra: Az adalékanyagok és gélképzők stabilizáló hatása módosított kémhatású (pH=8,5) oldatokban, (n=4)

Az eredmények nem voltak szignifikánsan jobbak, mint a PVA és PEG hozzáadása előttiek, ezért egy irodalmi példából kiindulva a PEG mennyiségét fokoztuk, mivel a 10%-os PEG oldat stabilizáló hatása nem volt megfelelő, illetve azért is a PEG mennyiségét fokoztuk, mert a cél kimondottan hidrogél előállítása volt. Seabra és munkatársai közel 90 m/m %-os PEG oldatot használtak GSNO előállítására és stabilizálására, jó eredménnyel [67], azonban amint ez a bevezetésben is szerepel, ennek a kompozíciónak a véráralmás fokozó hatását nem vizsgálták. Kísérleteink során ilyen mennyiségben PEG-et tartalmazó vizes gél kompozíció használatakor nem tapasztaltunk véráramlás fokozó hatást, ezért alacsonyabb koncentrációban használtuk a PEG-et, és a pH eltolásával vetettük ösze a hatást (15. ábra).



15. 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

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

Ismét azt láthatjuk, hogy a GSNO lebomlásra jelentős hatással van a pH. 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 8,8-es pH-ra módosított adalékanyag hozzádás nélküli GSNO oldatban is szignifikánsan kisebb volt a bomlás, mint általában a savas oldatokében. Az is érdekes eredmény, hogy önmagában a 15 m/m % PEG kevésbé stabilizál, mint az enyhén bázikus pH, tehát az egyes polimer mátrixok között is szignifikáns volt a különbség, a legjobb eredményt az 55% PEG-et tartalmazó oldatnál értük el, ebben a kompozícióban a kiindulási GSNO 45,3 %-a maradt meg 25 nap után. Az elegyeket 4°C-on tároltuk, fény kizárása mellett.

4.3. Szerkezet és stabilitás vizsgálati módszerek

Feltételeztük, hogy a GSNO enyhén alkalikus közegben tapasztalt növelt stabilitás oka a szerkezet változás, vagy a gyökös bomlás kinetikájával lehet kapcsolatban. Ezek vizsgálatára további módszereket alkalmaztunk, a Vis spektroszkópián felül UV spektroszkópiát és ESR spektroszkópiát használtunk, hogy további magyarázatokat kapjunk.

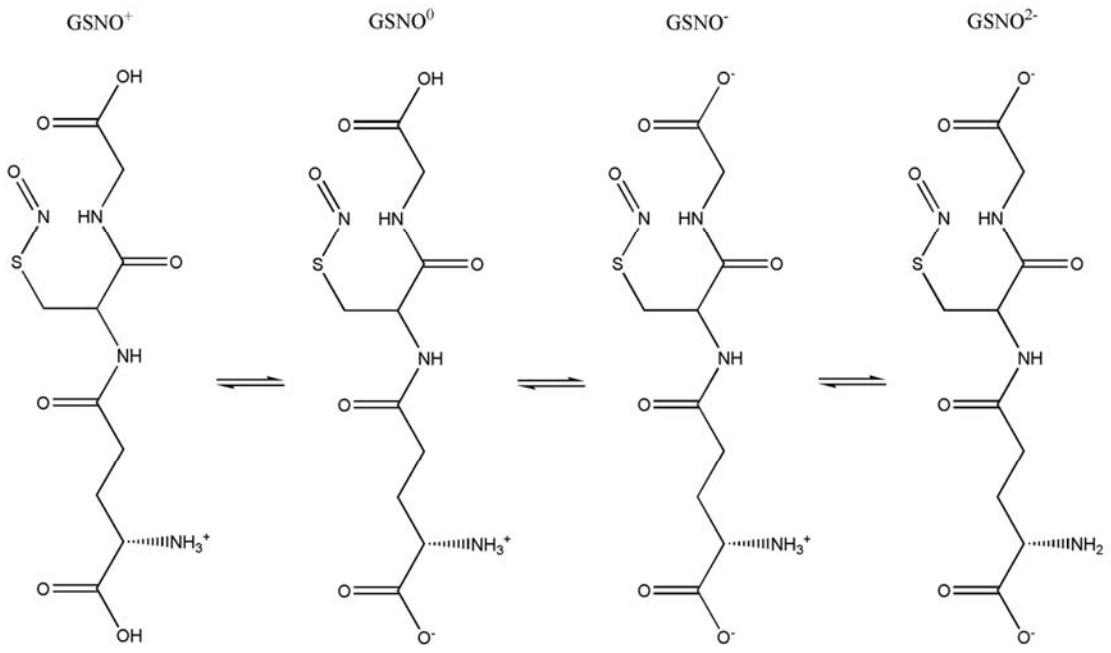
4.3.1. pH módosítás kiváltotta szerkezeti változások vizsgálata

A pH módosítás során elért növelt stabilitás okai között először a GSNO szerkezetét vizsgáltuk, itt elsősorban a protonálódni illetve deprotonálódni képes funkciós csoportok (amino csoport, karboxil csoport) változását vizsgáltuk, a fő kérdés az volt, hogy lehetséges-e molekulán belüli stabilizáló kötések kialakulása, illetve melyek azok a protonált szerkezetek, amik az alkalmazott pH intervallumban megjelennek.

4.3.1.1. Protonált állapotok és pH összefüggése

Vizes oldatokban különböző pH értékeken különböző protonált formában lehet jelen a GSNO, a szerkezetét tekintve négy lehetséges állapot van (16. ábra).

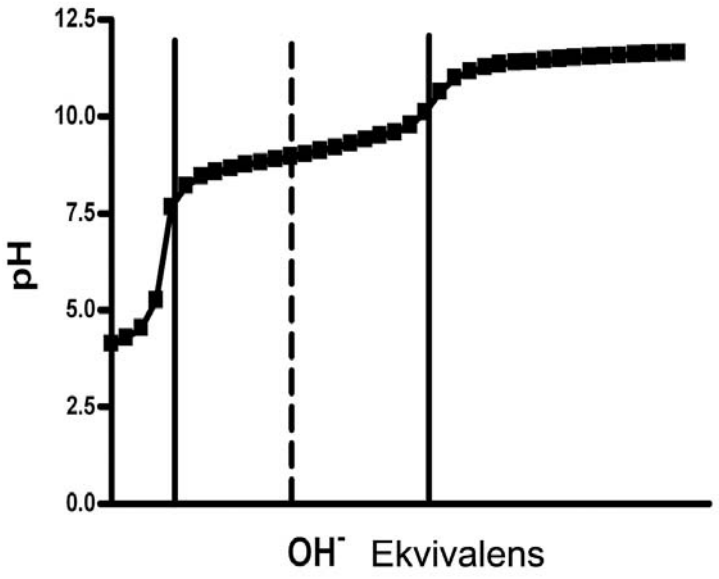
DOI: 10.14753/SE.2013.1789



16. ábra: A GSNO lehetséges protonált állapotai

A GSNO vizes oldatában, pH módosítás nélkül (pH=4,2) a $GSNO^+$ és a $GSNO^0$ jelölésű protonált állapotok vannak jelen. Lúg hozzáadásával tudjuk az egyensúlyt a jobb oldalra eltolni. A 17. ábrán a GSNO lúg hozzáadásával kapott egyenérték görbéjét láthatjuk, ennél a kísérletnél 200 mM-os NaOH oldatot csepegtettünk egy folytonosan kevert 80 mM-os GSNO oldathoz, és mértük a pH-t.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

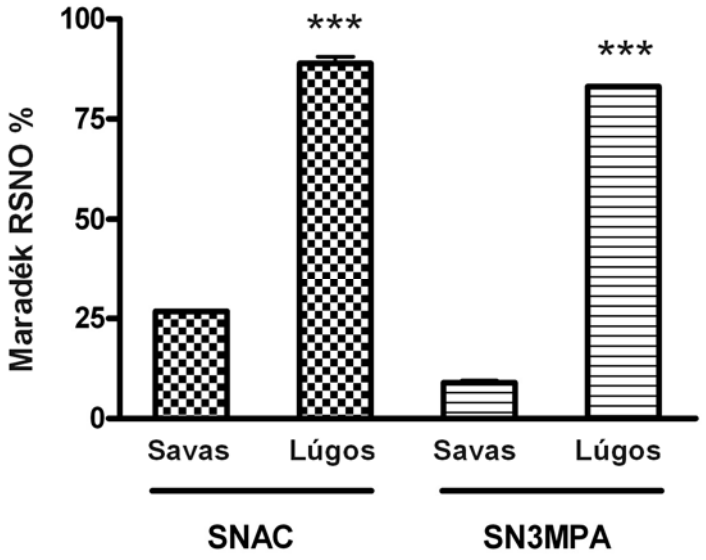


17. ábra: A GSNO vizes oldatának OH^- egyenérték görbéje

A kiindulási pH 4,2, ez főként a $GSNO^+$ protonált állapotához tartozik. A vertikális vonalak az első és a második OH^- ekvivalencia vonalat jelentik. A vertikális szaggatott vonal a 1,5 OH^- ekvivalencia mennyiségnek felel meg, a kísérleteink alapján ez az optimális tárolási pH tartomány. Ebben a tartományban a $GSNO^0$ és a $GSNO^-$ azok a szerkezetek, amelyek főként jelen vannak.

Annak érdekében, hogy magyarázatot kapjunk a funkciós csoportok szerepére először azt próbáltuk kideríteni, hogy a GSNO szerkezeti sajátossága-e a növelt stabilitás, vagy más primer RSNO-k is hasonlóan viselkednek. Ezért a tárolási pH és stabilitás összefüggését vizsgáltuk két további NO donorral, ezek a SNAC (3. ábra B) és az SN3MPA (3. ábra C) voltak (18. ábra). A mintákat ebben az esetben 7 nap után vizsgáltuk, a mintákat addig 4°C-on tároltuk, fény kizárása mellett.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



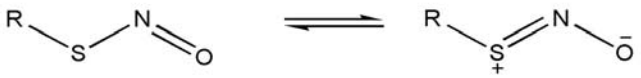
18. ábra: SNAC és SN3MPA (80mM) pH függő stabilitása (n=4), az eredményeket átlag+SEM-ként tüntettük fel. *** p <0,001 mindkét vegyület esetében az enyhén lúgos és a savas oldat között

A stabilitás a GSNO mintájára változott, a SNAC (88,8±3,4 % maradt) és az SN3MPA (83,2±0,4% maradt) esetében is. Ebben a kísérletben a savas pH 2,2 illetve 3,8 volt, a lúgos pH pedig 8,4 illetve 10,2 volt. A pH-t ugyanazzal a mennyiségű cc. NaOH oldattal módosítottuk (hogy ugyanannyi iont vigyünk a rendszerbe), de mivel a két vegyület disszociációs állandója más volt, ezért ugyanannyi cc NaOH hozzáádásával más pH-t kaptunk a két vegyületnél.

Az eredmények alapján azt látjuk, hogy a savasan tárolt oldatok hatóanyag tartalma háromszor volt kisebb a tárolási időszak után, mint a lúgosan tároltaké. A kísérlet alapján tehát ki lehet zárni a GSNO glutamin vagy glicin része miatti stabilizálást, mivel a SNAC és az SN3MPA is stabilabb enyhén lúgos pH-n. Ezek alapján a pH módosítás okozta szerkezetváltozás miatt létrejövő intramolekuláris stabilizálás nem meghatározó. A felfedezést olyan fontosnak tartottuk, hogy a módosított pH-jú kompozíciót szabadalmaztattuk, jelenleg PCT bejelentés alatt áll .

A pH okozta stabilitás másik fontos tényezője, hogy az adott RSNO vizes oldatban hogyan szolvatálódik, két tautomer szerkezet ismert, a megoszlásukat az oldószer polaritása és a kémiai környezet határozza meg (19. ábra).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



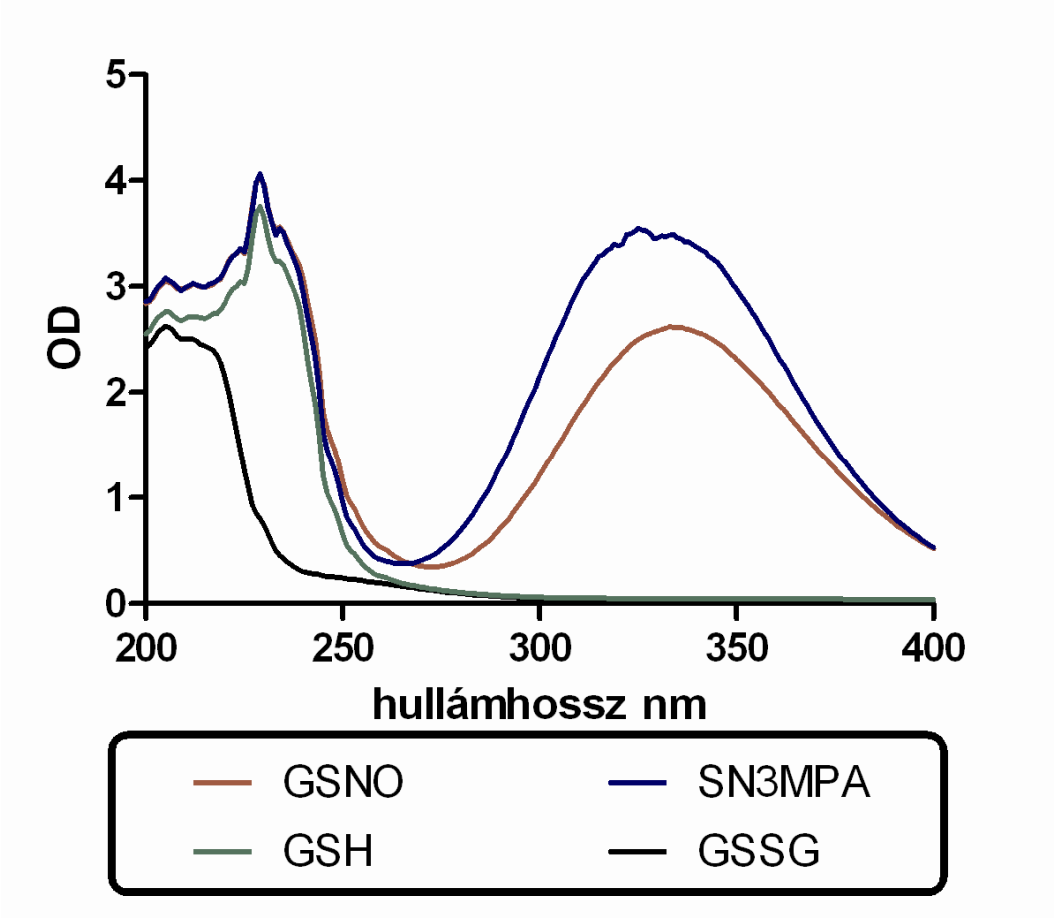
19. ábra: RSNO-k tautomer szerkezetei

A két szerkezet közül a bal oldali valószínűleg apoláris szerves oldószerekben a fő forma, a jobb oldali pedig valószínűleg poláris oldószerekben (pl. víz) jelentős.

4.3.1.2. UV spektroszkópia

Az egyik módszer, amivel nyomon követhetjük a változásokat, az az UV spektroszkópia, mert az UV spektrumon megjelenő változások a molekula kötő elektronszerkezetének változásából következnek. Emellett fontos az is, hogy így az oldatot tudjuk vizsgálni, nincs szükség semmilyen feldolgozásra, vagy elkülönítésre. A GSNO UV spektrumán (5. ábra, A) két karakterisztikus hullámhossz látható 228 nm-en és 333 nm-en. Az összehasonlítás miatt a GSH, a GSSG és az SN3MPA UV spektrumát is felvettük (20. ábra).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

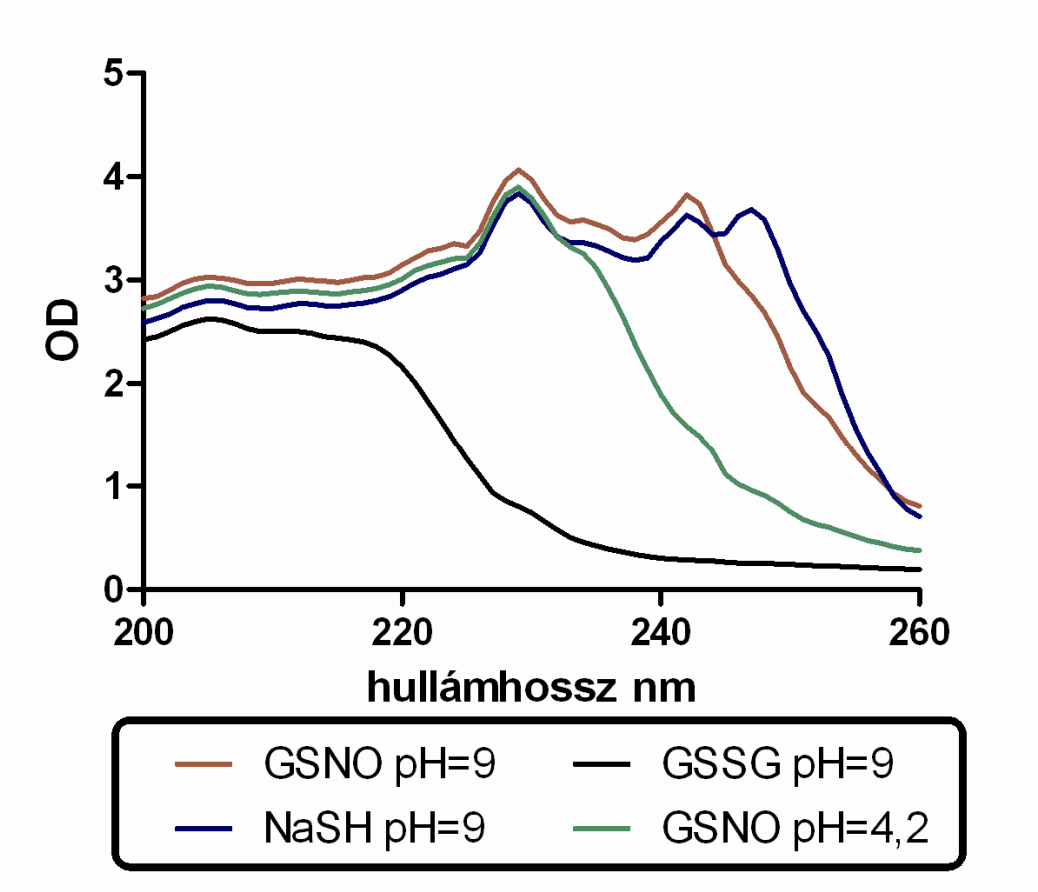


20. ábra: A GSNO, SN3MPA, GSH és GSSG UV abszorbancia spektruma

Az ábrán azt láthatjuk, hogy a 333 nm-es hullámhossz mindkét NO donor vegyület spektrumán (a GSNO és az SN3MPA) megtalálható, ez az –S-NO kötésre jellemző hullámhossz, ennek az intenzitása arányosan csökken az RSNO bomlásával, az 540 nm-es hullámhosszon mérhetőhöz hasonlóan. A 228 nm es hullánhosszon is láthatunk egy karakterisztikus csúcsot, ami a GSH, SN3MPA, GSNO spektrumán is látható. Azonban az oxidált glutation (GSSG) spektrumán nem látszik 228 nm-en karakterisztikus elnyelés, a GSSG karakterisztikus hullámhossza 210 nm ezt irodalmi példa is alátámasztja [103], a pH-t ezekben az oldatokban nem módosítottuk, mindegyik oldat pH-ja 4 körüli volt. Annak érdekében, hogy azonosíthassuk a pH módosítás és a karakterisztikus sávok közötti összefüggéseket, mértük a módosított pH-jú és a módosítatlan pH-jú GSNO oldat spektrumát. Ezt a pH módosítást a GSSG-vel is elvégeztük, és az ismert H_2S donor, a nátrium hidrogénszufid (NaSH) spektrumával is összevetetettük (25. ábra). A NaSH gyenge

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

bázis, ezért a natív oldat pH-ja eleve lúgos, és szinte teljesen disszociál HS^- ionokká, csakúgy mint a H_2S .



21. ábra: A savas és lúgos kémhatású GSNO oldatok, illetve a lúgos kémhatású GSSG és NaSH UV abszorbancia spektruma

A GSSG spektruma semmit sem változott lúgos oldatban, nem jelent meg új elnyelési sáv, tehát valószínűleg nem történt átalakulás. A GSNO és NaSH esetében a karakterisztikus elnyelés 228 nm-en egyértelműen látható, irodalmi példa támasztja alá, és mi is igazoltuk, hogy ez a hullámhossz a HS^- karakterisztikus hullámhossza [22]. Azonban a kísérleteink alapján egyértelmű, hogy nem csak a HS^-, hanem általánosan az RS^- ionokra is jellemző elnyelési hullámhossz a 228 nm-en található, mivel ez a GSNO, GSH, SN3MPA oldatokban is látható. 9-es pH-n a 228 nm-en látható csúcs mellett egy további

csúcs is látható a GSNO spektrumán 242 nm-en, és egy további csúcs látható 246 nm-en a NaSH esetében.

4.3.2. ESR spektroszkópia

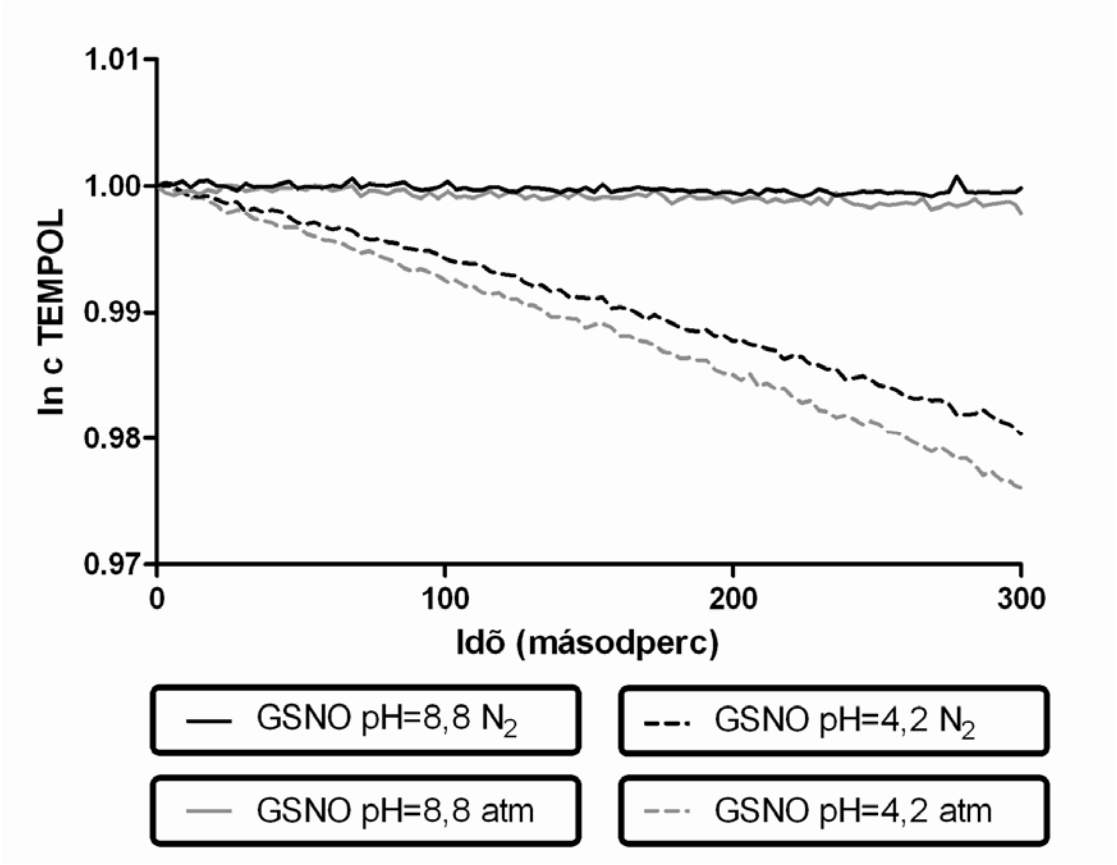
ESR spektroszkópiával a GSNO gyökös bomlásának kinetikáját vizsgáltuk, a cél a pH módosítás és a gyökképződés sebessége, illetve a lebomlás módja közötti összefüggés megállapítása volt.

Az ESR méréseket 4 mM és 80 mM közötti koncentrációjú GSNO oldatokban vizsgáltuk, módosítatlan pH-jú oldatokban (a pH 4 körüli volt), és erősen savas (pH=1), illetve enyhén lúgos oldatokban (pH=9). A méréseink során nem találtunk hosszú életű szabad gyököket. Ez egyrészt erősítheti azt a teóriát, hogy ionos mechanizmusú a bomlás vizes oldatban, de természetesen az is lehetséges, hogy a szabad gyökök koncentrációja túl alacsony volt, vagy olyan rövid a szabad gyökök felezési ideje, hogy nem érte el a kimutatási határt. A további vizsgálatokhoz ezért gyökfogókat alkalmaztunk.

4.3.2.1. Gyökös bomlás vizsgálata TEMPOL jelenlétében

A reakció során a TEMPOL jelintenzitás csökkenését mértük az idő függvényében, a módosított pH és az inert atmoszféra hatását is vizsgáltuk. A végzett kísérlet alapján a gyök képződés (amely arányos a jel intenzitás csökkenésével) nagy mértékben csökkent enyhén bázikus pH-n, és a N_2 atmoszféra is csökkentette a bomlást, ez a módosítatlan pH-jú oldatban volt a szembetűnőbb (22. ábra).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



22. ábra: A módosítatlan és az enyhén lúgos pH hatása a GSNO lebomlására légköri (atm) és inert (N_2) gáz alatt. A relatív TEMPOL intenzitás értékek a nulla időpontban maximálisak, a csökkenést logaritmikus skálán ábrázoltuk (n=2)

A TEMPOL redukciója alatt mértük a jel intenzitás csökkenését 20°C-on. Savas és lúgos oldatban is mértünk légköri és N_2 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. A grafikonból kiszámoltuk mind a négy bomlás sebességi állandóját, illetve százalékosan is kifejeztük a különbséget (7. táblázat).

	Nitrogén gáz alatt	Atmoszférikus körülmények között

pH=4,2	$7{,}97 \cdot 10^{-5}$ (1/s) (78,81%)	$6{,}28 \cdot 10^{-5}$ (1/s) (100%)
pH=8,8	$2{,}6 \cdot 10^{-6}$ (1/s) (4,13%)	$4{,}25 \cdot 10^{-6}$ (1/s) (6,76%)

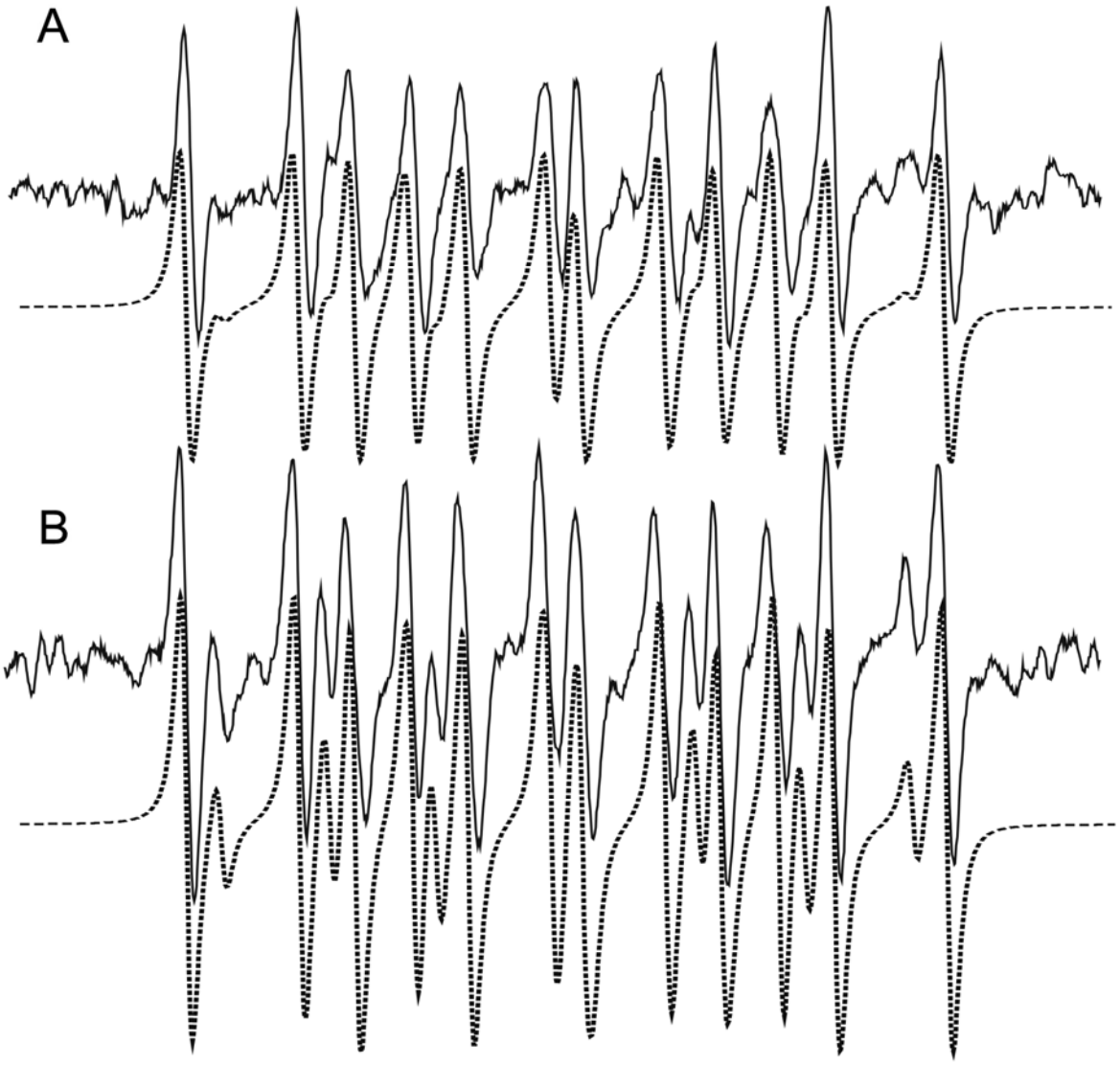
7. táblázat: A GSNO bomlás sebességi állandói négy vizsgált körülmény között, SI mértékegységben és százalékban kifejezve (a leggyorsabb bomlás értékét vettük 100 %-nak)

A táblázat alapján láthatjuk, hogy két nagyságrendnyi különbség van a leggyorsabb és a leglassabb bomlási sebesség között. A legstabilabb a lúgos N_2 alatt tárolt oldat, a N_2 gáz minden esetben lassította a bomlást a légköri körülmények között tartott oldatokkal szemben, de a pH módosítás volt a hatásosabb.

4.3.2.2. Gyökös bomlás vizsgálata DEPMPO jelenlétében

A DEPMPO-val végzett kísérletek során célzottan a $GS^{\cdot}$ gyökök jelenlétét próbáltuk bizonyítani, a DEPMPO-t kimondottan az oxigén, a kén, és a szén centrumú gyökök csapdázására használják [99]. A mérés során a két stabilitás szempontjából legeltérőbb oldatot vizsgáltuk, az enyhény lúgos, N_2 gázzal átbuborékoltatott oldatot (23. ábra, A), és a savas atmoszférikus oldatot (23. ábra, B). A mérés során egyáltalán nem tudtunk $GS^{\cdot}$ gyököt kimutatni, ez természetesen jelentheti azt, hogy ez a típusú addukt hamar elbomlik, vagy azt, hogy a bomlás nem ezen a gyökös mechanizmuson keresztül játszódik le. Mind a két oldatban nagyrészt ugyanazt a gyökös terméket találtuk ami egybevág egy irodalmi példával is. Karoui és társai a DEPMPO-s GSNO csapdázás során találtak egy viszonylag stabil szén centrumú gyököt, az ESR spektrum alapján mi ugyanezt a gyököt találtuk meg, a gyök pontos képletét még azóta sem sikerült azonosítani [100]. A talált két jel csatolási állandói (a_P= 46,7G, a_N= 14,5 G, és a_H= 21,6 G illetve a_P= 47,6 G, a_N= 14,0 G, és a_H= 21,4 G) ugyanazok voltak, mint az említett irodalmi példában találtak.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



23. ábra: Az enyhén lúgos pH-n, inert (N_2) gáz alatt képződött DEPMPO adduktok ESR spektruma (A) és az enyhén savas pH-n légköri atmoszférán képződött DEPMPO adduktok ESR spektruma (B). A folytonos vonal a mért spektrum, a szaggatott vonal a szimulált spektrum

Érdekesség, hogy felfedeztünk egy harmadik komponenst, amelynek különbözött a mennyisége a savas oldatban (20%) és a lúgos oldatban (5%) (csatolási állandói a_P= 47,1 G, a_N= 13,6 G, és a_H= 14,1 G). A 15% különbség azonban nem magyarázhatja meg a két nagyságrendnyi reakciósebességbeli különbséget. Illetve, mivel a két fő összetevő gyököt mindegyik oldatban ugyanolyan intenzitással találtuk meg, ezért feltételezhető, hogy

közvetlenül nem a NO leadásért felelős mechanizmus során képződött gyököket találtuk meg. A DEPMPO-s kísérleteink során $NO^{\cdot}$ nem tudtunk kimutatni.

Ezekből az eredményekből szintén arra lehet következtetni, hogy a pH eltolása nem más útra tereli a reakciót, csak a reakció sebességét lassítja, valószínűleg polarizáció miatt, vagyis az ionos komplex létrejötte helytállónak tűnik.

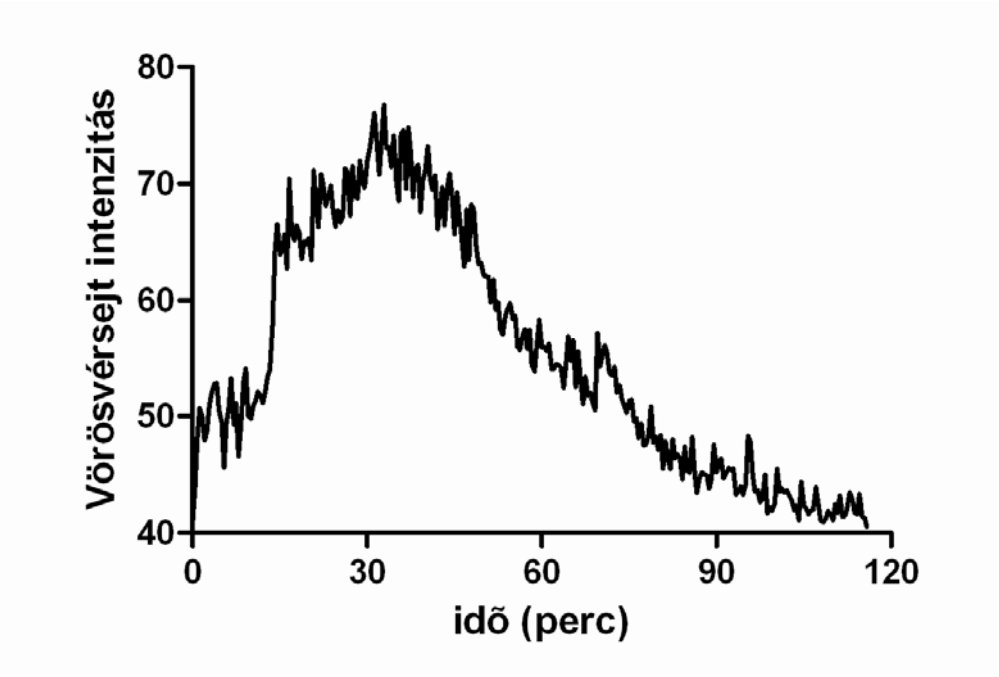
4.4. Véráramlás fokozás

Az értágító hatásról laser Speckle kontraszt elemzéssel bizonyosodtunk meg. A legstabilabb formuláció (55% PEG) véráramlás fokozó hatását teszteltük a tárolási szakasz (25 nap) után.

4.4.1. GSNO formuláció véráramlás fokozó hatása

Általánosságban az RSNO-k stabilitásának növelése csökkentheti a hatásosságot, tekintve, hogy az RSNO bomlása során felszabaduló NO gáz az értágításért felelős hatóanyag. Önmagában az RSNO valószínűleg nem szívódik fel a bőrön át. Annak érdekében, hogy megvizsgáltuk a legstabilabb GSNO formulációnk biológiai hatását, humán alanyokon teszteltük a hatást a dermális véráramlásra. A relatív véráramlás növekedést a 25 napig tárolt GSNO hidrogél alkalmazásával váltottuk ki. A mérést laser Speckle kontraszt elemzéssel végeztük, a mért maximális relatív véráramlás érték 96,20±35,29 volt, a kiindulási relatív érték 36,29±10,16 volt (24. ábra).

DOI: 10.14753/SE.2013.1789



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

Ennek a kísérletsorozatnak az eredményei szerint a véráramlás 24,16±9,38 perc alatt érte el a maximális intenzitást, ez a véráramás érték ezután 33,75±15,06 perc múlva csökkent a maximális érték 50%-ára (n=8). Negatív kontrollként az optimális elegy összetevőit is ellenőriztük, nem tapasztaltunk véráralmás változást a hatóanyag nélküli elegyek alkalmazása során.

Az elméletünk szerint a topikálisan alkalmazott NO donorok értágító hatása nem közvetlenül a bőrön át felszívódott RSNO hatása, hanem az RSNO bomlása során bediffundált NO gázé. A bőrön át bejutott NO mennyiségét nem mértük, de valószínűleg a felszabadult NO gáz döntő része az atmoszférába távozott. Ezt a problémát egy jövőbeli GSNO termék esetében egy további bevonattal, vagy fedéssel lehet megoldani. A kísérleteink során a fő szempontunk a terápiás alkalmazhatóság volt, és a méréseink alapján a bediffundált NO mennyiség elég volt, hogy több mint 200 %-kal növelje a vörösvértest intenzitást, 20 µl GSNO gél alkalmazásával.

5. Diszkusszió

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a GSNO és a SNAC oldatok előállítása során 20,04 %-kal, illetve 23,18 %-kal magasabb kezdeti koncentrációt értünk el, ha az előállítást savas kémhatású $NaNO_2$ oldatban (pH=1,6) végeztük, lúgoshoz képest. A kezdeti NO donor koncentráció pedig lassabban csökkent, ha a pH-t enyhén lúgosra (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 vörös vértest 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.

Habár az ismert volt, hogy a GSNO előállítás hatékonysága növekszik savas közegben, pontosan megállapítottuk, hogy savas oldatban 99,5 % volt a tiol konverzió.

Az eredményeink viszont épp ellentétesek a Heikal és munkatársai által publikáltakéval [50], tekintve, hogy ők azt tapasztalták, hogy a GSNO stabilabb savas oldatban. Ezzel szemben mi arra jutottunk, hogy a GSNO és SNAC stabilitása is nőtt mind egyszerű vizes oldatban, mind gél mátrixokban enyhén lúgos pH-n. Mindenesetre azt is fontos megjegyezni, hogy az említett cikkben a használt GSNO koncentráció 250 μM volt. Ez jóval kevesebb, mint az általunk használt koncentráció, ami viszont jobban jellemzi a topikálisan alkalmazott RSNO koncentráció tartományt [104]. Azt is figyelembe kell venni, hogy ez a koncentráció különbség befolyásolhatja a pH hatását, mivel a kiindulási RSNO koncentráció önmagában is hatással van a bomlás mértékére [104].

Az enyhén lúgos pH hatása egyrészt magyarázható lehet a a különböző protonált állapotok szerkezeti különbségeivel (16. ábra), illetve a GSNO tautomer szerkezeteivel (19. ábra). Ismert ugyanis, hogy a két fő tényező, ami megváltoztathatja a a stabilitást, az a GSNO szerkezetbeli változása, illetve a szolvatációja [105]. Hogy kiderítsük a lehetséges pH módosítás okozta szerkezet változásokat, teszteltük a SNAC és az SN3MPA stabilitására gyakorolt hatást is. Azt tapasztaltuk, hogy az enyhén bázikus kémhatás mellett a SNAC és az SN3MPA bomlása is lecsökkent. Ezzel kizártuk a GSNO molekulában levő glutamin és glicin csoportok szerepét. További magyarázat az intramolekuláris kötések

létrejötte, vagy ionos komplexek keletkezése lehet. Korábbi publikációból ismert [106], hogy fém ionok fokozhatják, vagy csökkenthetik a bomlást komplexek formálása miatt. A pH módosítás esetében, hasonlóan a fém ionokhoz, lehetséges az, hogy az H_3O^+ és a OH^- ionok stabilizálnak intramolekolásis kötések, vagy komplexek létrejöttével.

További magyarázatokat UV spektroszkópiás vizsgálatokal kerestünk (20. ábra). A GSSG (GSNO bomlás végterméke) és GSH (a GSNO előállítás kiindulási anyaga) közötti fő különbséget vizsgáltuk. A két anyag közötti különbség (az UV elnyelésre alkalmas funkciós csoportok jelenlétét tekintve) a –SH csoport (228 nm-en látható), amely, mint gyenge sav könnyen deprotonálódik, és RS^- ionokat képez, ezt fokozza a lúg hozzáadása, ilyet a GSSG spektrumán nem tapasztaltunk, valószínűleg a stabil diszulfid kötés miatt. Minden esetben, amikor savat adtunk az RSNOk-hoz (pH=1 körül), a spektrumukból eltűnt a 228 nm-es csúcs és a GSSG spektrumához váltak hasonlóvá, mivel savas kémhatáson fokoztuk a bomlást és visszaszorítottuk az RS^- képződést (diagramon nem ábrázoltuk). Fontos megjegyezni, hogy bár a GSSG esetében nem, de a NaSH, GSH és a tesztelt RSNOk lúgos oldatáról felvett spektrum különbözött a savas, vagy semleges oldatokétól (21. ábra). Korábban már bizonyítottuk, hogy ez a hatás nem a molekula egyéb funkciós csoportjai (glutamin, glicin rész) miatt van, hiszen a SNAC és az SN3MPA stabilitását is fokozta az enyhén lúgos pH (18. ábra). Tehát a hatás nem is a protonált állapotok miatti intramolekuláris kötések miatt van. Ezek alapján az egyetlen logikus magyarázat a szulfid ion elektronszerkezetével lehet kapcsolatban, ami jelen van a NaSH, GSH, GSNO molekulák szolvatált formájában, de nincs jelen a GSSG szolvatált formájában, az elmített stabil diszulfid kötés miatt. Az enyhén lúgos pH (8-9) további növelése (11) csak fokozta az RSNO bomlást. A GSH és NaSH esetében további csúcsok jelentek meg 252 nm és 260 nm körül (az adatokat nem mutatjuk be). Ezt a jelenséget Millero és munkatársai poliszulfid képződéssel magyarázták, ami pH=9 fölött megy végbe [107]. A kísérleteink során az UV spektrum változása mellett ezt a sárga szín megjelenése is alátámasztja. Ez ugyan megmagyarázza az új csúcsok létrejöttét, de mivel a stabilitásra ez már csak rossz hatással van, ezért a vizsgálatokat tovább folytattuk 9-es pH körül. A GSNO esetében (ha a pH-t 9-re változtattuk) csak egy új csúcsot figyeltünk meg 242 nm-en, és azt tapasztaltuk, hogy a 7 nap tárolás után a módosított pH-jú GSNO oldat kisebb mértékben bomlott.

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 konklúzió tehát hasonló, mint a Manoj és munkatársai által talált [108] vagyis 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 elektron szerkezetében létrejött változások miatt van, valószínűleg egy ionos átmeneti komplex formálódása miatt.

Az ESR spektroszkópia során meghatározott bomlási sebesség különbség majdnem két nagyságrendnyi volt (22. ábra, 7. táblázat). 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 jobbra tolásával, és ennek stabilizálásával (19. ábra). 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 kiinduási GSNO-nak, 25 nap tárolás után, savas kémhatású oldatban. Seabra és munkatársai [67] szintén megállapították, hogy a GSNO stabilitása növelhető gél mátrixok hozzáadásával, 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 (15. ábra). 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 kötéseken 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 vértest intenzitást. Ezzel arra az eredményre jutottunk, hogy a GSNO potenciálisan alkalmazható topikális értágító.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

6. Konklúzió

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 előállítástól 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 $NaNO_2$ oldattal, amelyet a legcélszerűbb enyhén lúgos pH-n tárolni, polimer mátrixok jelenlétében.

Az enyhén bázikus pH a módosítatlan 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.

7. Összefoglalás (magyar, angol)

7.1. Magyar nyelvű összefoglaló

Az *S*-nitrozotiol (RSNO) oldatok értékes NO források, topikális értágítóként való felhasználásukat azonban korlátozza a gyors lebomlásuk. A célunk az volt, hogy jellemezzük és számszerűsítsük a pH hatását a RSNO előállítására és lebomlására, egyszerű, vizes oldatokban. A vizsgált *S*-nitrozotiolok az *S*-nitrozoglutation (GSNO), az *S*-nitrozoacetilcisztein (SNAC) és az *S*-nitrozo-3-merkaptopropionsav (SN3MPA) voltak. Ezen kívül vizsgáltuk a pH hatátását polietilén-glikol (PEG) és polivinil-alkohol (PVA) gélképzőket tartalmazó elegyekben. Az *S*-nitrozotiol koncentrációt spektrofotométerrel mértük, a véráramlást laser Doppler szkennerrel és laser Specle kontraszt analízissel mértük. A glutation (GSH) és *N*-acetilcisztein (NAC) oldatokat savas $NaNO_2$ oldatban szinte teljesen át tudtuk alakítani a megfelelő nitrozotiollá. Az összes vizsgált RSNO kiindulási koncentrációja lassabban csökkent ha a pH-t enyhén bázikusra (8,4-8,8) módosítottuk a tárolási szakaszban. Ezt a jelenséget UV és ESR spektroszkópiával is vizsgáltuk. Az UV spektroszkópiás vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a pH módosítás következtében új karakterisztikus csúcsok jelentek meg, amiből arra lehet következtetni, hogy új ionos komplexek jönnek létre enyhén bázikus pH-n. Az ESR spektroszkópiás eredmények azt mutatták, hogy a gyök képződés mintegy két nagyságrenddel alacsonyabb lúgos pH-n. Minden eredmény arra enged következtetni, hogy a gyökös mechanizmus lassabb enyhén bázikus kémhatású oldatban, valószínűleg polarizáció és ionos komplexek létrejötte miatt. További formulációs kísérletek eredményeként arra jutottunk, hogy PVA/PEG polimer mátrixokban a bomlást még jobban tudtuk gátolni, és legjobb eredményként a kiindulási GSNO 45,3 %-át tudtuk megőrizni 25 nap tárolás után. Ezt a koncentrációt topikálisan alkalmaztuk, és ez a GSNO mennyiség több, mint 200 % fölé növelte a humán alanyok dermális véráramlását.

Seabra, A. B. et al. S-Nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* **11:**263-272; 2004.

Karoui, H et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem.* **271:**6000-6009; 1996.

Manoj, V. M.; et al. One-electron reduction of S-nitrosothiols in aqueous medium. *Free Radic Biol Med.* **41:**1240-1246; 2006.

7.2. Angol nyelvű összefoglaló

S-nitrosothiol (RSNO) solutions represent a valuable source of nitric oxide and could be used as topical vasodilators, but their fast decomposition rate poses a serious obstacle to their potentially widespread therapeutic use. Our aim was to characterize and quantify the effect of pH on *S*-nitrosothiol formation and decomposition in simple aqueous solutions of *S*-nitrosoglutathione (GSNO), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (SNAC) and *S*-nitroso-3-mercaptopropionic acid (SN3MPA). Furthermore we investigated the effect of storage pH on the stability of GSNO incorporated in poly(ethylene glycol)/ poly(vinyl alcohol) matrices. *S*-nitrosothiol concentrations were measured spectrophotometrically. Laser Doppler scanning method and laser Speckle contrast analysis was used to assess dermal blood flow. GSH and NAC solutions reached a complete transformation to nitrosothiols when synthesized using acidic $NaNO_2$ solution. The initial concentration of all investigated RSNOs decreased more slowly with pH adjusted to mildly basic values (8.4-8.8) for the storage period. This phenomenon was also investigated using UV spectroscopy and ESR spectroscopy. Using UV spectroscopy we found that due to the pH modification new peaks can be found, which suggests the formation of ionic complexes at mildly basic pH. The results of the ESR spectroscopy showed that radical production is slower by almost two orders of magnitude at alkaline pH. All the results showed that the decomposition via radical mechanism is slower at mildly alkaline pH probably through polarization and an ionic complex formation. Further formulation experiments showed that polymer gels of PVA/PEG compositions at mildly basic storage pH further reduced the decomposition rate succeeding to contain 45.3% of the initial GSNO concentration for 25 days. This amount of topically administered GSNO was still capable of increasing the dermal blood flow over 200% in human subjects.

Seabra, A. B. et al. S-Nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* **11:**263-272; 2004.

Karoui, H et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem.* **271:**6000-6009; 1996.

Manoj, V. M.; et al. One-electron reduction of S-nitrosothiols in aqueous medium. *Free Radic Biol Med.* **41:**1240-1246; 2006.

8. Referenciák:

[1] Stamler, J. S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258:**1898-1902; 1992.

[2] Wagner, D. A.; Young, V. R.; Tannenbaum, S. R. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of 15NH3 into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80:**4518-4521; 1983.

[3] Hibbs, J. B., Jr.; Taintor, R. R.; Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235:**473-476; 1987.

[4] Iyengar, R.; Stuehr, D. J.; Marletta, M. A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84:**6369-6373; 1987.

[5] Hibbs, J. B., Jr.; Taintor, R. R.; Vavrin, Z.; Rachlin, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* **157:**87-94; 1988.

[6] Vanin, A. F.; Kubrina, L. N.; Lisovskaia, I. L.; Malenkova, I. V.; Chetverikov, A. G. [Endogenous nitrosyl complexes of heme and non-heme iron in microorganisms and animal tissues]. *Biofizika* **16:**650-656; 1971.

[7] Varich, V.; Vanin, A. F.; Ovsiannikova, L. M. [Discovery of endogenous nitric oxide in the mouse liver by electron paramagnetic resonance]. *Biofizika* **32:**1062-1063; 1987.

[8] Lancaster, J. R., Jr.; Hibbs, J. B., Jr. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87:**1223-1227; 1990.

[9] Drapier, J. C.; Pellat, C.; Henry, Y. Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *J Biol Chem.* **266:**10162-10167; 1991.

[10] Arnold, W. P.; Mittal, C. K.; Katsuki, S.; Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74:**3203-3207; 1977.

[11] Gruetter, C. A.; Barry, B. K.; McNamara, D. B.; Gruetter, D. Y.; Kadowitz, P. J.; Ignarro, L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial

guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* **5:**211-224; 1979.

[12] Gerzer, R.; Hofmann, F.; Schultz, G. Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem.* **116:**479-486; 1981.

[13] Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288:**373-376; 1980.

[14] Furchgott, R. F.; Carvalho, M. H.; Khan, M. T.; Matsunaga, K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels* **24:**145-149; 1987.

[15] Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327:**524-526; 1987.

[16] Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84:**9265-9269; 1987.

[17] Myers, P. R.; Minor, R. L., Jr.; Guerra, R., Jr.; Bates, J. N.; Harrison, D. G. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* **345:**161-163; 1990.

[18] Myers, P. R.; Guerra, R., Jr.; Harrison, D. G. Release of multiple endothelium-derived relaxing factors from porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* **20:**392-400; 1992.

[19] Garthwaite, J.; Charles, S. L.; Chess-Williams, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336:**385-388; 1988.

[20] Bredt, D. S.; Snyder, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86:**9030-9033; 1989.

[21] Nossaman, V. E.; Nossaman, B. D.; Kadowitz, P. J. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. *Cardiol Rev.* **18:**190-197; 2010.

[22] Sutherland-Stacey, L.; Corrie, S.; Neethling, A.; Johnson, I.; Gutierrez, O.; Dexter, R.; Yuan, Z.; Keller, J.; Hamilton, G. Continuous measurement of dissolved sulfide in sewer systems. *Water Sci Technol.* **57:**375-381; 2008.

[23] Harrison, D. G.; Bates, J. N. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* **87:**1461-1467; 1993.

[24] Arnold, W. P.; Longnecker, D. E.; Epstein, R. M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. *Anesthesiology* **61:**254-260; 1984.

[25] Messin, R.; Bruhwyler, J.; Dubois, C.; Famaey, J. P.; Geczy, J. Tolerability to 1-year treatment with once-daily molsidomine in patients with stable angina. *Adv Ther.* **23:**601-614; 2006.

[26] Feelisch, M.; Ostrowski, J.; Noack, E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol.* **14 Suppl 11:**S13-22; 1989.

[27] Yamamoto, T.; Bing, R. J. Nitric oxide donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **225:**200-206; 2000.

[28] Rabinowitch, I. M. Acute Nitroglycerine Poisoning. *Can Med Assoc J.* **50:**199-202; 1944.

[29] Nossaman, V. E.; Nossaman, B. D.; Kadowitz, P. J. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. *Cardiol Rev.* **18:**190-197; 2010.

[30] McFadden, D. P.; Carlson, G. P.; Maickel, R. P. The role of methemoglobin in acute butyl nitrite toxicity in mice. *Fundam Appl Toxicol.* **1:**448-451; 1981.

[31] Bonaventura, D.; Lunardi, C. N.; Rodrigues, G. J.; Neto, M. A.; Bendhack, L. M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. *Nitric Oxide* **18:**287-295; 2008.

[32] Messin, R.; Fenyvesi, T.; Carreer-Bruhwyler, F.; Crommen, J.; Chiap, P.; Hubert, P.; Dubois, C.; Famaey, J. P.; Geczy, J. A pilot double-blind randomized placebo-controlled study of molsidomine 16 mg once-a-day in patients suffering from stable angina pectoris: correlation between efficacy and over time plasma concentrations. *Eur J Clin Pharmacol.* **59:**227-232; 2003.

[33] Floryszak-Wieczorek, J.; Milczarek, G.; Arasimowicz, M.; Ciszewski, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* **224:**1363-1372; 2006.

[34] Langford, E. J.; Wainwright, R. J.; Martin, J. F. Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **16:**51-55; 1996.

[35] Seabra, A. B.; Fitzpatrick, A.; Paul, J.; De Oliveira, M. G.; Weller, R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Br J Dermatol.* **151:**977-983; 2004.

[36] Cals-Grierson, M. M.; Ormerod, A. D. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide* **10:**179-193; 2004.

[37] Murthy, K. S. Inhibitory phosphorylation of soluble guanylyl cyclase by muscarinic m2 receptors via Gbetagamma-dependent activation of c-Src kinase. *J Pharmacol Exp Ther.* **325:**183-189; 2008.

[38] Bian, K.; Murad, F. Nitric oxide (NO)--biogeneration, regulation, and relevance to human diseases. *Front Biosci.* **8:**d264-278; 2003.

[39] Askew;, S. C.; Barnett;, D. J.; McAninly;, J.; Williams, D. L. H. Catalysis by Cu2+ of nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2:**741-746; 1995.

[40] Field, L.; Dilts, R. V.; Ravichandran, R.; Lenhert, P. G.; Carnahan, G. E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.***:**249-250; 1978.

[41] Bartberger;, M. D.; Houk;, K. N.; Powell;, S. C.; Mannion;, J. D.; Lo;, K. Y.; Stamler;, J. S.; Toone, E. J. Theory, Spectroscopy, and Crystallographic Analysis of S-Nitrosothiols: Conformational Distribution Dictates Spectroscopic Behavior. *J Am Chem Soc.* **122:**5889-5890; 2000.

[42] Carnahan, G. E.; Lenhert, P. G.; Ravichandran, R. S-Nitroso-N-acetyl-dl-penicillamine. *Acta Cryst.* **34:**2645-2648; 1978.

[43] Perissinotti, L. L.; Estrin, D. A.; Leitus, G.; Doctorovich, F. A surprisingly stable S-nitrosothiol complex. *J Am Chem Soc.* **128:**2512-2513; 2006.

[44] Perissinotti, L. L.; Leitus, G.; Shimon, L.; Estrin, D.; Doctorovich, F. A unique family of stable and water-soluble S-nitrosothiol complexes. *Inorg Chem.* **47:**4723-4733; 2008.

[45] Hogg, N. Biological chemistry and clinical potential of s-nitrosothiols. *Free Radical Biology & Medicine,* **28:**1478-1487; 2000.

[46] Looker, D. L.; Beyer, W. F. S-NITROSOTHIOL FORMULATIONS AND STORAGE SYSTEMS, WO 2008/153762A2. 2008.

[47] Gordge, M. P.; Meyer, D. J.; Hothersall, J.; Neild, G. H.; Payne, N. N.; Noronha-Dutra, A. Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol.* **114:**1083-1089; 1995.

[48] Jourd'heuil, D.; Laroux, F. S.; Miles, A. M.; Wink, D. A.; Grisham, M. B. Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Arch Biochem Biophys.* **361:**323-330; 1999.

[49] Arnelle, D. R.; Day, B. J.; Stamler, J. S. Diethyl dithiocarbamate-induced decomposition of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* **1:**56-64; 1997.

[50] Heikal, L.; Martin, G. P.; Dailey, L. A. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatins. *Nitric Oxide* **20:**157-165; 2009.

[51] Kettenhofen, N. J.; Broniowska, K. A.; Keszler, A.; Zhang, Y.; Hogg, N. Proteomic methods for analysis of S-nitrosation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **851:**152-159; 2007.

[52] Keszler, A.; Zhang, Y.; Hogg, N. Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed? *Free Radic Biol Med.* **48:**55-64; 2010.

[53] Terance W, H. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett.* **26:**2013-2016; 1985.

[54] Williams, D. L. H. The Chemistry of S-Nitrosothiols. *Acc. Chem. Res.* **32:**869-876; 1999.

[55] Meloche, B. A.; O'Brien, P. J. S-nitrosyl glutathione-mediated hepatocyte cytotoxicity. *Xenobiotica* **23:**863-871; 1993.

[56] Meyer, D. J.; Kramer, H.; Ketterer, B. Human glutathione transferase catalysis of the formation of S-nitrosoglutathione from organic nitrites plus glutathione. *FEBS Lett.* **351:**427-428; 1994.

[57] Oliveira;, M. G. d.; Shishido;, S. l. M.; Seabra;, A. B.; Morgon, N. H. Thermal Stability of Primary S-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release. *J. Phys. Chem. A* **106:**7019-7027; 2002.

[58] Roy;, B.; Hardemare;, A. d. M.; Fontecave, M. New Thionitrites: Synthesis, Stability, and Nitric Oxide Generation. *J. Org. Chem.* **59:**7019-7027; 1994.

[59] McAninly, J.; Williams, D. L. H.; Askew, S. C.; Butler, A. R.; Russell, C. Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*:1758-1760; 1993.

[60] Krezel, A.; Bal, W. Contrasting effects of metal ions on S-nitrosoglutathione, related to coordination equilibria: GSNO decomposition assisted by Ni(II) vs stability Increase in the presence of Zn(II) and Cd(II). *Chem Res Toxicol.* **17:**392-403; 2004.

[61] Smith, J. N.; Dasgupta, T. P. Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* **4:**57-66; 2000.

[62] Holmes AJ, W. D. Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*:1639-1644; 2000.

[63] Zhao, Y. L.; McCarren, P. R.; Houk, K. N.; Choi, B. Y.; Toone, E. J. Nitrosonium-catalyzed decomposition of s-nitrosothiols in solution: a theoretical and experimental study. *J Am Chem Soc.* **127:**10917-10924; 2005.

[64] Ondrias, K.; Stasko, A.; Cacanyiova, S.; Sulova, Z.; Krizanova, O.; Kristek, F.; Malekova, L.; Knezl, V.; Breier, A. H(2)S and HS(-) donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells. *Pflugers Arch.* **457:**271-279; 2008.

[65] Yoo, J. W.; Acharya, G.; Lee, C. H. In vivo evaluation of vaginal films for mucosal delivery of nitric oxide. *Biomaterials* **30:**3978-3985; 2009.

[66] Seabra, A. B.; Pankotai, E.; Feher, M.; Somlai, A.; Kiss, L.; Biro, L.; Szabo, C.; Kollai, M.; de Oliveira, M. G.; Lacza, Z. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Dermatol.* **156:**814-818; 2007.

[67] Seabra, A. B.; de Souza, G. F. P.; da Rocha, L. L.; Eberlin, M. N.; de Oliveira, M. G. S-Nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* **11:**263-272; 2004.

[68] Günbeyaz, M.; Faraji, A.; Özkul, A.; Puralı, N.; Şenel, S. Chitosan based delivery systems for mucosal immunization against bovine herpesvirus 1 (BHV-1). *Eur J Pharm Sci.* **41:**531-545; 2010.

[69] Varshosaz, J.; Sadrai, H.; Heidari, A. Nasal delivery of insulin using bioadhesive chitosan gels. *Drug Deliv.* **13:**31-38; 2006.

[70] Varshosaz, J.; Sadrai, H.; Alinagari, R. Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. *J Microencapsul.* **21:**761-774; 2004.

[71] Xu, Z.; Wan, X.; Zhang, W.; Wang, Z.; Peng, R.; Tao, F.; Cai, L.; Li, Y.; Jiang, Q.; Gao, R. Synthesis of biodegradable polycationic methoxy poly(ethylene glycol)–polyethylenimine–chitosan and its potential as gene carrier. *Carb. Pol.* **78:**46-53; 2009.

[72] Sayin, B.; Somavarapu, S.; Li, X. W.; Sesardic, D.; Senel, S.; Alpar, O. H. TMC-MCC (N-trimethyl chitosan-mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines. *Eur J Pharm Sci.* **38:**362-369; 2009.

[73] van der Lubben, I. M.; Verhoef, J. C.; Borchard, G.; Junginger, H. E. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci.* **14:**201-207; 2001.

[74] Bertholon, I.; Ponchel, G.; Labarre, D.; Couvreur, P.; Vauthier, C. Bioadhesive properties of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysaccharide. *J Nanosci Nanotechnol.* **6:**3102-3109; 2006.

[75] Qi, X.; Tester, R. F. Bioadhesive properties of beta-limit dextrin. *J Pharm Pharm Sci.* **14:**60-66; 2011.

[76] Lim, W.-S.; Choi, J.-W.; Iwata, Y.; Koseki, H. Thermal characteristics of Hydroxypropyl Methyl Cellulose. *J. Loss Prev. Process Ind.* **22:**182-186; 2009.

[77] Fahmy, H. M.; Fouda, M. M. G. Crosslinking of alginic acid/chitosan matrices using polycarboxylic acids and their utilization for sodium diclofenac release. *Carb. Pol.* **73:**606-611; 2008.

[78] George, M.; Abraham, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *J Control Release.* **114:**1-14; 2006.

[79] Furchgott, R. F.; Ehrreich, S. J.; Greenblatt, E. The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta. *J Gen Physiol.* **44:**499-519; 1961.

[80] Veleeparampil;, M. M.; Aravind;, U. K.; Aravindakumar, C. T. Decomposition of S-Nitrosothiols Induced by UV and Sunlight. *Advances in Physical Chemistry* **2009:**1-5; 2009.

[81] Sexton, D. J.; Muruganandam, A.; McKenney, D. J.; Mutus, B. Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications. *Photochem Photobiol.* **59:**463-467; 1994.

[82] Singh, R. J.; Hogg, N.; Joy Joseph, B. Photosensitized decomposition of S-nitrosothiols and 2-methyl-2-nitrosopropane Possible use for site-directed nitric oxide production. *FEBS Lett.* **360:**47-52; 1995.

[83] Llop, J.; Gomez-Vallejo, V.; Bosque, M.; Quincoces, G.; Penuelas, I. Synthesis of S-[13N]nitrosoglutathione (13N-GSNO) as a new potential PET imaging agent. *Appl Radiat Isot.* **67:**95-99; 2009.

[84] Yang, Y.; Loscalzo, J. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. *ProProc Natl Acad Sci U S A.* **102:**117-122; 2005.

[85] Steffen, M.; Sarkela, T. M.; Gybina, A. A.; Steele, T. W.; Trasseth, N. J.; Kuehl, D.; Giulivi, C. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem J.* **356:**395-402; 2001.

[86] Foster, M. W.; Hess, D. T.; Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* **15:**391-404; 2009.

[87] Salas, E.; Langford, E. J.; Marrinan, M. T.; Martin, J. F.; Moncada, S.; de Belder, A. J. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts in vitro and in vivo. *Heart* **80:**146-150; 1998.

[88] Lees, C.; Langford, E.; Brown, A. S.; de Belder, A.; Pickles, A.; Martin, J. F.; Campbell, S. The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal Doppler in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol.* **88:**14-19; 1996.

[89] Langford, E. J.; Brown, A. S.; Wainwright, R. J.; de Belder, A. J.; Thomas, M. R.; Smith, R. E.; Radomski, M. W.; Martin, J. F.; Moncada, S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* **344:**1458-1460; 1994.

[90] Ramsay, B.; Radomski, M.; De Belder, A.; Martin, J. F.; Lopez-Jaramillo, P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol.* **40:**101-102; 1995.

[91] de Belder, A. J.; MacAllister, R.; Radomski, M. W.; Moncada, S.; Vallance, P. J. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res.* **28:**691-694; 1994.

[92] Rassaf, T.; Kleinbongard, P.; Preik, M.; Dejam, A.; Gharini, P.; Lauer, T.; Erckenbrecht, J.; Duschin, A.; Schulz, R.; Heusch, G.; Feelisch, M.; Kelm, M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO:

experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood. *Circ Res.* **91:**470-477; 2002.

[93] MacAllister, R. J.; Calver, A. L.; Riezebos, J.; Collier, J.; Vallance, P. Relative potency and arteriovenous selectivity of nitrovasodilators on human blood vessels: an insight into the targeting of nitric oxide delivery. *J Pharmacol Exp Ther.* **273:**154-160; 1995.

[94] Molloy, J.; Martin, J. F.; Baskerville, P. A.; Fraser, S. C.; Markus, H. S. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation* **98:**1372-1375; 1998.

[95] Kaposzta, Z.; Baskerville, P. A.; Madge, D.; Fraser, S.; Martin, J. F.; Markus, H. S. L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation* **103:**2371-2375; 2001.

[96] Kaposzta, Z.; Clifton, A.; Molloy, J.; Martin, J. F.; Markus, H. S. S-nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty. *Circulation* **106:**3057-3062; 2002.

[97] Snyder, A. H.; McPherson, M. E.; Hunt, J. F.; Johnson, M.; Stamler, J. S.; Gaston, B. Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* **165:**922-926; 2002.

[98] Rassaf, T.; Poll, L. W.; Brouzos, P.; Lauer, T.; Totzeck, M.; Kleinbongard, P.; Gharini, P.; Andersen, K.; Schulz, R.; Heusch, G.; Modder, U.; Kelm, M. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J.* **27:**1699-1705; 2006.

[99] Schrammel, A.; Gorren, A. C.; Schmidt, K.; Pfeiffer, S.; Mayer, B. S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and (*)NO/O(2)(*-). *Free Radic Biol Med.* **34:**1078-1088; 2003.

[100] Karoui, H.; Hogg, N.; Frejaville, C.; Tordo, P.; Kalyanaraman, B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem.* **271:**6000-6009; 1996.

[101] Dolashki, A.; Abrashev, R.; Stevanovic, S.; Stefanova, L.; Ali, S. A.; Velkova, L.; Hristova, R.; Angelova, M.; Voelter, W.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; Dolashka-Angelova, P. Biochemical properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal strain

Aspergillus niger 26. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **71:**975-983; 2008.

[102] Ekanayake, P. M.; De Zoysa, M.; Kang, H. S.; Wan, Q.; Jee, Y.; Lee, Y. H.; Kim, S. J.; Lee, J. Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (Haliotis discus discus) catalase. *Fish Shellfish Immunol.* **24:**267-278; 2008.

[103] Basu, S.; Keszler, A.; Azarova, N. A.; Nwanze, N.; Perlegas, A.; Shiva, S.; Broniowska, K. A.; Hogg, N.; Kim-Shapiro, D. B. A novel role for cytochrome c: Efficient catalysis of S-nitrosothiol formation. *Free Radic Biol Med.* **48:**255-263; 2010.

[104] M.G. de Oliveira, S. M. S., A.B. Seabra and N.H. Morgon. Thermal stability of primary S-nitrosothiols: roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem. A* **106:**8963-8970; 2002.

[105] Miller, M. R.; Roseberry, M. J.; Mazzei, F. A.; Butler, A. R.; Webb, D. J.; Megson, I. L. Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. *Eur J Pharm Sci.* **408:**335-343; 2000.

[106] Stamler, J. S.; Toone, E. J. The decomposition of thionitrites. *Curr Opin Chem Biol.* **6:**779-785; 2002.

[107] Millero, F. J. The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar. Chem.* **18:**121-147; 1986.

[108] Manoj, V. M.; Mohan, H.; Aravind, U. K.; Aravindakumar, C. T. One-electron reduction of S-nitrosothiols in aqueous medium. *Free Radic Biol Med.* **41:**1240-1246; 2006.

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

9. Publikációs lista

9.1. A tézis témájához kapcsolódó publikációk

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 suphide 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**

9.2. Nem a tézis témájához kapcsolódó publikációk

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

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

DOI: 10.14753/SE.2013.1789

10. Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Lacza Zsombornak, aki az elmúlt évek során sok hasznos gyakorlati és elméleti tapasztalatot adott át nekem, mindvégig segítette a munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Kollai Márknak és Dr. Benyó Zoltánnak, hogy a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézetben biztosították számomra a PhD kutatómunkámhoz szükséges feltételeket.

Köszönöm a segítséget Dr. Poppe Lászlónak és Dr. Tomin Annának a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen. Dr. Gróf Pálnak a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben. Dr. Kiss Leventének, Dr. Pankotai Eszternek, Dr. Cselenyák Attilának, Vácz Gabriellának, a többi munkatársamnak a laborban, a tudományos diákköri hallgatóknak, az összes társszerzőnek és az intézet összes dolgozójának.

Végül köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindig mellettem álltak, segítettek a munkámban és támogattak a döntéseimben.