

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. prof. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk



mgr inż. Olga Gawryś

Wykorzystanie amino-prenoli w próbach
zwiększenia efektywności działania leków
modyfikujących czynność nerek u szczurów

*Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Elżbiety Kompanowskiej-Jeziarskiej
w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych*

Warszawa 2015

STRESZCZENIE

Skutki uboczne wielu obecnie stosowanych leków, czy ich niedostateczna biodostępność stanowią poważny problem medyczny, z którym muszą zmagać się lekarze i sami pacjenci. Istnieje wiele substancji o potwierdzonej skuteczności terapeutycznej, ale ze względu na ich niekorzystne właściwości wywołujące skutki uboczne, nie mogą być stosowane w klinice. Jedną z powszechnie używanych strategii ulepszania terapii jest poszukiwanie substancji pomocniczych, takich jak nośniki leków, które modyfikują drogę terapeutyków w organizmie biorcy. W ten sposób można ułatwić dotarcie substancji aktywnej do miejsca działania, opóźnić jej metabolizm, czy ochronić przed szybkim usuwaniem przez nerki. Wszystkie te działania mogą umożliwić obniżenie dawki substancji aktywnej i tym samym zmniejszenie lub wyeliminowanie niekorzystnych efektów ubocznych leków. Nośniki liposomowe zyskały na przestrzeni ostatnich lat ogromne zainteresowanie ze względu na swoje lipofekcyjne właściwości i szerokie spektrum zastosowań. Skład liposomów, ich wielkość, ładunek oraz strukturę powierzchni można dowolnie modyfikować, tak aby biodystrybucja i działanie niesionego leku w organizmie było optymalne.

Ostatnie badania wykazały, że półsyntetyczne, kationowe pochodne alkoholi poliizoprenoidowych (dalej zwane amino-prenolami lub APren) posiadają lipofekcyjne właściwości – ułatwiają przenoszenie materiału genetycznego do komórek.

Alkohole poliizoprenoidowe stanowią szeroką grupę hydrofobowych polimerów, które występują we wszystkich żywych organizmach, poczynając od bakterii, aż do ssaków. Te liniowe cząsteczki zbudowane są z 5-150 jednostek izoprenowych z grupą hydroksylową (-OH) na końcu alfa (α) i atomem wodoru na końcu omega (ω). Poliizoprenoidy pełnią wiele funkcji w komórkach ale przede wszystkim jako komponenty błon biologicznych wpływają na ich właściwości.

W badaniach biofizycznych potwierdzono, że dzięki zdolności alkoholi-poliizoprenoidowych do tworzenia w błonach domen o strukturze fazy heksagonalnej II, odgrywają one rolę modulatorów błon modelowych, wpływając na ich przepuszczalność i płynność. Amino-prenole zostały uzyskane przez chemiczne przekształcenie grupy wodorotlenowej znajdującej się na końcu α cząsteczki do czwartorzędowej grupy amoniowej, co nadało im specyficzne właściwości, dzięki którym te kationowe lipidy jeszcze łatwiej oddziałują z błonami biologicznymi.

Celem przedstawionej dysertacji było zbadanie właściwości amino-prenoli pod względem ich przydatności w medycynie i farmakologii jako

składników liposomowych nośników leków. Do badań wybrano pochodną zawierającą 7 jednostek izoprenowych (APren-7).

Badania podzielono na trzy zasadnicze zadania. W pierwszym etapie badano toksyczność amino-prenoli, natomiast w drugim i trzecim etapie badano wpływ zamknięcia w nowych nośnikach dwóch wybranych leków o różnej charakterystyce, działaniu i strukturze, na ich skuteczność terapeutyczną, w porównaniu do leków podanych w klasycznych rozpuszczalnikach.

ETAP1: *Toksyczność APren-7*

Modelem doświadczalnym były samce szczurów Sprague-Dawley, które codziennie przez cztery tygodnie otrzymywały podskórne zastrzyki ze świeżo przygotowanych roztworów: (i) liposomy zbudowane z DOPE (dioleilo-fosfatydylo-etanolamina) i badanych pochodnych, (ii) „klasyczne” liposomy zbudowane tylko z DOPE lub (iii) wodę do iniekcji. W ciągu czterotygodniowej obserwacji mierzono ciśnienie krwi tętniczej (pomiar na ogonie nieinwazyjną metodą mankietów okluzyjnych), prowadzono obserwacje w klatkach metabolicznych, połączone z dobową zbiórką moczu oraz pobierano próbki krwi do oznaczeń biochemicznych. Część szczurów uśmiercano w celu pobrania narządów do przeprowadzenia analizy histopatologicznej i morfometrycznej, a u pozostałej części szczurów badano czynność układu krążenia i wydalania (doświadczenia ostre w narkozie).

Otrzymane wyniki pozwalają sądzić, że badane amino-prenole nie są toksyczne dla organizmów żywych, przynajmniej w zakresie badanych parametrów. Badane pochodne nie wpłynęły na rozwój, czy dojrzewanie zwierząt. Nie zaobserwowano znaczących różnic między grupami przy porównaniu parametrów metabolicznych, czy osoczowych. Analiza dobowego wydalania albuminy (biomarker uszkodzenia nerek) nie wykazała negatywnego wpływu badanych pochodnych na funkcjonowanie tego narządu. Obraz struktur nerkowych oraz wyniki badań czynnościowych były typowe dla zdrowych szczurów Sprague-Dawley. Wartości wskaźników funkcjonowania układu krążenia (ciśnienie krwi, stan lewej komory serca) także kształtowały się podobnie we wszystkich grupach. Na tej podstawie uznano, że amino-prenole nie są szkodliwe dla organizmów żywych i mogą być dalej badane pod względem ich przydatności jako składników liposomowych nośników leków.

ETAP 2: *Efektywność desmopresyny zamkniętej w nośnikach zawierających APren-7*

Desmopresyna (dDAVP) jest analogiem wazopresyny (AVP), działającym selektywnie poprzez receptory V₂R dla AVP, powodując jedynie zahamowanie wydalania moczu (działanie antydiuretyczne), a nie

powodując skurcz naczyń krwionośnych. dDAVP jest powszechnie używanym terapeutycznym w leczeniu moczówki prostej, moczenia nocnego, czy diagnostyce i leczeniu zaburzeń krzepnięcia krwi.

Modelem doświadczalnym były szczury Sprague-Dawley, u których po uśpieniu i przygotowaniu chirurgicznym wywoływano stan wzmożonej diurezy wodnej (2,5% roztwór glukozy podany ze stosunkowo dużą prędkością (36 ml/kg/h), w celu zablokowania endogennej wazopresyny oraz umożliwienia zaobserwowania efektu antydiuretycznego dDAVP). Po 30 min. szczurom podawano w krótkiej infuzji dożylniej (60 s) jeden z następujących roztworów: (i) dDAVP w liposomach z APren-7; (ii) dDAVP w wodzie; (iii) puste liposomy z APren-7; (iv) wodę. Przez dwie godziny obserwowano zmiany w diurezie, wydalaniu substancji osmotycznie czynnych oraz osmolalności osocza.

Zaobserwowano opóźnienie efektu hamowania wydalania moczu po podaniu dDAVP w nośniku liposomowym z APren-7, w stosunku do grupy otrzymującej dDAVP w wodzie, ale końcowy efekt antydiuretyczny był bardzo zbliżony w obu grupach. Wydaje się, że stopniowe uwalnianie leku z liposomów zawierających APren-7 przyczyniło się do przedłużenia działania desmopresyny w ustroju, co może być w wielu przypadkach bardzo korzystne (rzadsze dawkowanie leków, ochrona przed degradacją czy wydalaniem nerkowym). Otrzymano też dodatkowe potwierdzenie, że badane pochodne nie są szkodliwe dla szczurów Sprague-Dawley po podaniu dożylnym, przynajmniej w zakresie badanych wskaźników układu krążenia i wydalania.

ETAP 3: *Efektywność kandesartanu zamkniętego w nośnikach zawierających APren-7*

Kandesartan jest lipofilowym lekiem, należącym do grupy sartanów, czyli antagonistów receptorów AT₁ dla angiotensyny II (ANG II), powszechnie używanym w leczeniu nadciśnienia.

Modelem doświadczalnym były szczury spontanicznie nadciśnieniowe (SHR), które codziennie przez dwa tygodnie otrzymywały podskórne zastrzyki ze świeżo przygotowanych roztworów: (i) kandesartan zamknięty w liposomach z APren-7; (ii) kandesartan w „klasycznych” liposomach, zbudowanych tylko z DOPE; (iii) roztwór kandesartanu w PBS zawierającym węglan sodu (w stosunku 24:1) lub (iv) sam rozpuszczalnik (jw.). W ciągu dwutygodniowej obserwacji co drugi dzień zwierzętom mierzono ciśnienie krwi tętniczej (metodą telemetryczną), raz w tygodniu prowadzono obserwacje w klatkach metabolicznych oraz pobierano próbki krwi. Po dwóch tygodniach część szczurów uśmiercano w celu pobrania narządów do przeprowadzenia analizy morfologicznej i morfometrycznej, a u części badano czynność układu krążenia i wydalania (doświadczenia ostre w narkozie).

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że kandesartan podany w liposomowych nośnikach z APren-7 wykazywał lepszą antyhipertensyjną skuteczność w porównaniu do pozostałych grup otrzymujących lek.

Wyraźne różnice między poszczególnymi grupami były widoczne już od 6 dnia podawania leku. Zaobserwowano istotne obniżenie skurczowego ciśnienia tętniczego (SBP) w grupie otrzymującej kandesartan w liposomach z APren-7 w porównaniu do pozostałych grup. Obniżenie SBP pogłębiało się w tej grupie prawie do końca doświadczenia, osiągając maksymalną wartość (najniższe ciśnienie) w dniu 13.

Najwyższą skuteczność kandesartanu podanego w liposomach z APren-7 spośród wszystkich zastosowanych nośników potwierdza także analiza zmian poziomu kreatyniny w osoczu – historycznie jednego z najstarszych i najczęściej badanych biomarkerów układu wydalniczego. Stężenie kreatyniny istotnie obniżyło się jedynie w grupie otrzymującej kandesartan w nośnikach z APren-7, co może świadczyć o poprawie czynności nerek, najprawdopodobniej dzięki największemu obniżeniu ciśnienia krwi tętniczej w wyniku blokowania receptorów AT₁ dla ANG II. Pod uwagę można również brać pewne antyoksydacyjne właściwości samych amino-prenoli.

Na podstawie zaobserwowanych różnic, można przypuszczać, że kandesartan wykazuje lepszą skuteczność antyhipertensyjną po podaniu w nośniku z APren-7. Wydaje się, że lepsza efektywność leku podanego w nowych nośnikach, wynika z obecności samych amino-prenoli. Efekt wywołany podaniem kandesartanu w „klasycznych” liposomach był widoczny później niż dla pozostałych grup otrzymujących lek, a wielkość obniżenia SBP w kolejnych dniach doświadczenia była zbliżona do zaobserwowanej w grupie otrzymującej kandesartan w węglanie sodu.

Podsumowanie

W przedstawionej rozprawie badano potencjalne zastosowanie pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych, zwanych amino-prenolami, jako składników liposomowych nośników leków. Przedstawione powyżej badania można podsumować w kilku punktach:

1. APren-7 podawany podskórnie przez cztery tygodnie szczurom Sprague-Dawley, nie spowodował żadnych zmian w strukturach i czynności układu wydalniczego oraz krążenia; nie miał wpływu na dojrzewanie i wzrost zwierząt. Także po podaniu dożylnym szczurom w uśpieniu nie zaobserwowano negatywnych zmian w badanych parametrach, dlatego wnioskuje się, że nie jest on szkodliwy dla organizmów żywych w zakresie badanych parametrów i może być stosowany jako składnik liposomowych nośników leków.

2. Zamknięcie desmopresyny w liposomach z APren-7 spowodowało niewielkie opóźnienie w jej działaniu, ale końcowy efekt antydiuretyczny był bardzo zbliżony do zaobserwowanego w grupie otrzymującej desmopresynę w wodzie. Wydaje się, że powolne uwalnianie leku z liposomowego nośnika powodujące przedłużenie jego działania może być w wielu przypadkach bardzo korzystne.

3. Zamknięcie kandesartanu w liposomach z APren-7 polepszyło jego antyhipertensyjną skuteczność w porównaniu do kandesartanu rozpuszczonego w roztworze węgłanu sodu oraz zamkniętego w klasycznych liposomach. Wydaje się, że lepsze właściwości nowych nośników, wynikają z obecności samych amino-prenoli, ponieważ jedynie przy ich zastosowaniu kandesartan obniżał poziom kreatyniny w osoczu, wykazując pewne protekcyjne działanie w odniesieniu do nerek.