

Ciklodextrinek kölcsönhatása kolloidokkal

PUSKÁS István¹, SZENTE Lajos² és CSEMPESZ Ferenc^{1*}

¹Eötvös Loránd Tudományegyetem Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszék, H-1518 Budapest, 112 Pf. 32

²CYCLOLAB Kft., H-1525 Budapest Pf. 435

Bevezetés

Farmakonok hatékonyságának, biohasznosításának és biztonságának növelését célzó gyógyszer technológiai fejlesztések során fokozott érdeklődés mutatkozik kolloid komponenseket is tartalmazó, komplex gyógyszerhordozó rendszerek iránt¹.

Az utóbbi évtizedekben emiatt is széleskörű kutatásokat végeztek nanométer mérettartományú liposzómák² és ciklodextrinek³ gyógyszerhordozóként való felhasználhatóságának beható vizsgálatára. A kolloid és a kis molekulájú komponensek eltérő fizikai és kémiai sajátságaiból adódóan gyógyszer- és egyéb oldott molekulákkal való kölcsönhatásuk jellege, mechanizmusa és alkalmazási területeik is számottevően különböznek⁴.

Liposzómákat széles körben használnak kontrollált hatóanyag felszabadulást és célzott hatást biztosító hordozóként, valamint kísérleti biológiai membránmodellként⁵. A foszfolipid kettősrétegek bipoláris karaktere miatt elvben lipofil és hidrofil anyagok befogadására és szállítására is alkalmasak. Megfelelő terápiás hatás eléréséhez ezen szállító rendszerek kinetikai állandóságának, a foszfolipid molekulák és a vezikulumok stabilitásának biztosítása egyaránt szükséges^{6,7,8}.

Gyógyszerészeti szempontból is megkülönböztetett figyelmet érdemelnek a 100 nm átmérőjűnél kisebb, egy foszfolipid kettősréteget tartalmazó, ún. SUV (small unilamellar vesicle) liposzómák. Ezek előnyös sajátsága a nagyobb méretű liposzómákkal szemben - többek között -, hogy széles körű a szöveti eloszlásuk. Hosszabb ideig maradhatnak a keringésben, diszperzióik membránszűrővel is sterilizálhatók⁹.

Ciklodextrinek gyógyszerészeti alkalmazásának fontos oka, hogy jelentősen megnövelhetik gyengén vízoldható vegyületek, ún. vendégmolekulák oldhatóságát¹⁰.

Komplekképzésre alkalmas hidrofób karakterű belső üregük révén (ún. „host-guest”-típusú) kölcsönhatásba léphetnek az oldott farmakonokkal³. A ciklodextrinek jól ismert komplekképző sajátsága a sejtek lipofil membránalkotó komponenseivel való kölcsönhatásban is megnyilvánul, ami a membrán összetételének és fizikai stabilitásának változását eredményezheti¹¹. Ciklodextrin jelenlétében megnövekedhet a farmakon hatékonysága¹², de az is ismert, hogy nagyobb koncentrációban a ciklodextrinek sejtmembránkárosító¹³ és toxikus hatást fejtenek ki³.

Molekuláris és kolloidális gyógyszerhordozók együttes alkalmazása olyan komplex készítmény kifejlesztésének

elvi lehetőségét kínálja, amelyben mindkét komponens „carrier”-sajátságai előnyösen használhatók¹⁴. Gyakorlati alkalmazás szempontjából azonban alapvető fontosságú a kétféle hordozó kötött lehetséges kölcsönhatások minél részletesebb felderítése.

Jelen munkánk elsődleges célja kolloidális DPPC-liposzómák és különböző szerkezetű ciklodextrinek közötti kölcsönhatások vizsgálata és az oldott ciklodextrin molekulák vezikulumok fizikai stabilitására kifejtett hatásának jellemzése volt.

Felhasznált anyagok

Liposzómák készítéséhez dipalmitoil-foszfa-tidilkolint (DPPC) [Sigma Chemical Co. St. Louis MO] használtunk.

A kísérleti munka során vizsgált α , β , és γ -ciklodextrin (CD), valamint módosított szerkezetű DIMEB [heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin] származék a CYCLOLAB Ciklodextrin Kutató, Fejlesztő Laboratórium Kft. (Budapest) terméke.

Polivinil pirrolidon: PVP K-30. A vízdékony polimer a Fluka Rt. terméke. $\bar{M}_n = 4,2 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Kísérleti módszerek

A liposzómák előállítására

A liposzómák előállításához Realsonic 40SF ultrahangos készüléket használtunk (maximális teljesítménye: 300 W, a kibocsátott ultrahang frekvenciája 37 kHz). A készülék víztartályának hőmérsékletét 25,0 - 45,0 °C hőmérséklettartományban ± 1 °C pontossággal termostáttal szabályoztuk.

Kremer és munkatársai által leírt kondenzációs módszer¹⁵ módosításával eljárást dolgoztunk ki SUV liposzómák előállítására. A liposzómákat etanolos foszfolipid oldat befecskendezése helyett a DPPC diszperzió ultrahangos kezelése révén állítottuk elő. A liposzóma diszperzió készítéshez 0,050 g DPPC-t oldottunk 2,50 cm³ absz. etanolban. A foszfolipid oldatból 0,24 cm³-t fecskendővel ellátott vékony üvegpipetta segítségével a kívánt hőmérsékletre termostált $V = 4,50 \text{ cm}^3$ térfogatú diszperziós közegbe csepegtettük ~ 1 csepp/s sebességgel. Csepegtetés közben ultrahangos kezelést alkalmaztunk. Az adagolás befejeztével az ultrahangos besugárzást további 5 percig folytattuk. Az így kapott liposzóma diszperzió töménysége DPPC-re nézve 0,10 %-os, míg etanolra közel 4 %-os.

A liposzómák kinetikai állandóságának jellemzése

A vezikulumok mérete, méreteloszlása és a méretparaméterek időbeli változása a liposzóma diszperziók kinetikai állandóságának érzékeny jelzői. A liposzómák ezen jellemzőit fotonkorrelációs spektroszkópiás mérési módszerrel Zetasizer 4 készülékkel (Malvern Inst. UK) 25 °C-on határoztuk meg.

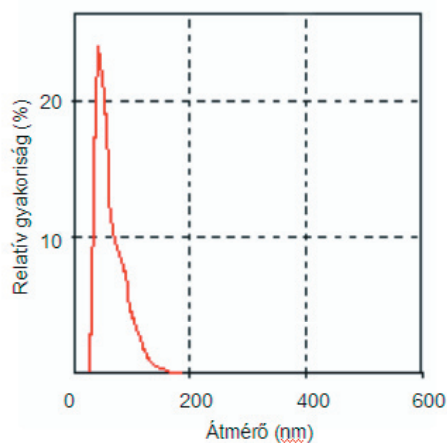
Membránszerkezet vizsgálata

Differenciál pásztázó kalorimetriás (DSC) módszerrel, NETZSCH DSC 200 típusú készülékkel vizsgáltuk a különböző ciklodextrinek és makromolekulás adalékanyagok hatását a DPPC kettősréteg szerkezetére.

Kísérleti eredmények és értékelésük

DPPC-liposzómák méreteloszlása

A liposzóma diszperziókat a kísérleti részben leírt formulálási eljárással 36,5 °C hőmérsékleten állítottuk elő. A Zetasizer 4 készülékkel végzett méretanalízis során meghatároztuk a vezikulumok szám szerinti, és térfogat szerinti méreteloszlásfüggvényeit és polidiszperzitását. Potenciális gyógyszerhordozóként alkalmazható vezikulumok hatóanyag kapacitása a bezárt térfogattól is függ, ezért közleményünkben a liposzóma diszperziók jellemzőiként általában a térfogat szerinti méreteloszlásfüggvényeket, illetve átlagméreteket adtuk meg. (1. ábra)

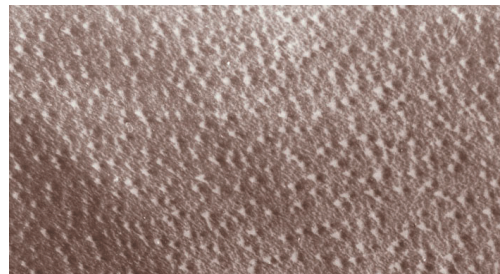


Térfogat szerinti csúcsanalízis			
Csúcs	Terület	Átlag	Szélesség
1	100	52,9	33,3
Szám szerinti csúcsanalízis			
Csúcs	Terület	Átlag	Szélesség
1	100	42,4	22,99

1. Ábra. 36,5 °C-on előállított DPPC liposzóma diszperzió térfogat szerinti méreteloszlása

Az eloszlásfüggvény és a részecskék átlagmérete alapján megállapítható, hogy az általunk alkalmazott eljárással közel monodiszperz, kis unilamelláris vezikulumok, ún. SUV típusú liposzómák állíthatók elő.

Az 1. képen a diszperzióról fagyasztva-töréses eljárással készített elektronmikroszkópos felvétel látható. A dinamikus fényszórásmérés eredményeit az elektronmikroszkópos felvétel is megerősíti. A képen látható gömb alakú részecskék átlagos mérete: 40-50 nm.

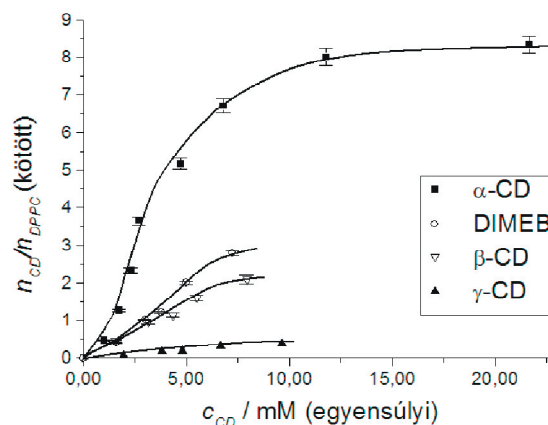


1. Kép. 0,1 tömeg%-os DPPC liposzóma fagyasztva töréses eljárással készített elektronmikroszkópos képe (64000-szeres nagyítás)

Ciklodextrin molekulák kötődése liposzóma membránokon

Oldott ciklodextrinek kölcsönhatását a liposzómák foszfolipid kettősrétegével a CD-molekulák lipidmembránba történő beépülésének vizsgálatával tanulmányoztuk.

A liposzómákat ismert töménységű ciklodextrint tartalmazó diszperziós közegekben formuláltuk 36,5 °C-on. 2 napi 25 °C-on való tárolás után 30000 ford./perc sebességű centrifugálással (MOM 3170 típusú ultracentrifugával) 30 percig üleptítettük a mintákat, majd a felülúszó oldatban meghatároztuk a ciklodextrinek koncentrációját. A kiindulási és az egyensúlyi CD-koncentrációk ismeretében kiszámítható a liposzóma-membránban megkötött ciklodextrin mennyisége. 0,1 tömeg%-os liposzóma diszperziókkal meghatározott „kötődési izotermákat” a 2. ábrán tüntettük fel. Az ábrán a lipidmembrán által megkötött ciklodextrinek mennyiségét ábrázoltuk az egyensúlyi ciklodextrin koncentráció függvényében.



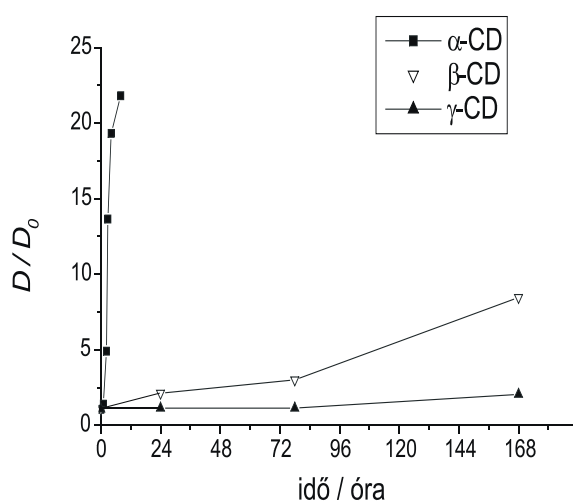
2. Ábra. Ciklodextrinek kötési izotermái DPPC liposzómákon (T=25 °C)

Az ábrán jól látható, hogy a különböző ciklodextrinek jelentősen különböző mennyiségben kötődnek a liposzómákhoz. A kötődés mértéke az α -CD > DIMEB > β -CD > γ -CD sorrendben csökken. A kötött mennyiségben lévő különbségek feltehetően a ciklodextrinek eltérő

üregméretében lévő eltéréseknek tulajdoníthatók. Vizsgálataink szerint az azonos üregméretű β -ciklodextrin származékok felszínén található funkciók csoportok hozzájárulása viszonylag csekély, bár a DIMEB vélhetően O-metil csoportjai miatt valamelyest nagyobb affinitással kötődik a lipidmembránhoz, mint az alapvegyülete, a β -ciklodextrin.

Ciklodextrinek hatása a liposzóma-membrán stabilitására

Az oldott ciklodextrinek DPPC-liposzómák fizikai stabilitására gyakorolt hatását a CD-tartalmú diszperziókörökben előállított vezikulumok átlagméretének (D) időbeni változása révén vizsgáltuk. 3. ábra szemlélteti a liposzóma-diszperziók átlagméretének időbeli változását a ciklodextrin nélküli diszperzió átlagméretéhez (D_0) viszonyítva.



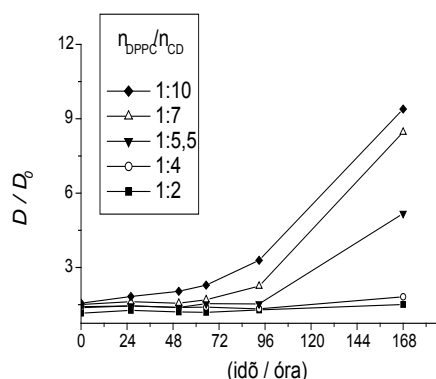
3. Ábra. DPPC liposzómák relatív méretnövekedése ciklodextrinek hatására

Tárolási hőmérséklet: 25 °C $n_{\text{DPPC}} / n_{\text{CD}} = 1:7$

A 36,5 °C-on előállított DPPC liposzómák CD nélkül 7 napig monomodális eloszlásúak maradnak¹⁶. Az ábrán jól látszik, hogy ciklodextrinek jelenlétében már néhány napos tárolási idő után jelentős méretnövekedés következik be, polidiszperzzé válik a minta. Ezek a változások a vezikulumok fizikai stabilitásának jelentős csökkenésére (aggregációra és/vagy fúzióra) utalnak.

Az α -CD membránkárosító hatása a leginkább szembetűnő, de egy hét után a β - és a γ -CD is destabilizálja a liposzóma diszperziót. Ez a hatás teljes összhangot mutat a CD-molekulák DPPC membránon való kötődési sorrendjével.

A ciklodextrinek membránkárosító hatása igen jelentősen függ a foszfolipid/CD aránytól is. A 4. ábra alapján a liposzómák változó DPPC : β -CD molarányoknál meghatározott relatív méretnövekedése hasonlítható össze. Figyelmet érdemel az a tény, hogy 1:5-nél nagyobb DPPC: β -ciklodextrin molarányoknál igen jelentős membránkárosító hatás tapasztalható, de kisebb mértékű CD felesleg nem okoz számottevő membránkárosítást. Hasonló tendencia mutatkozott α - és γ -CD esetében is

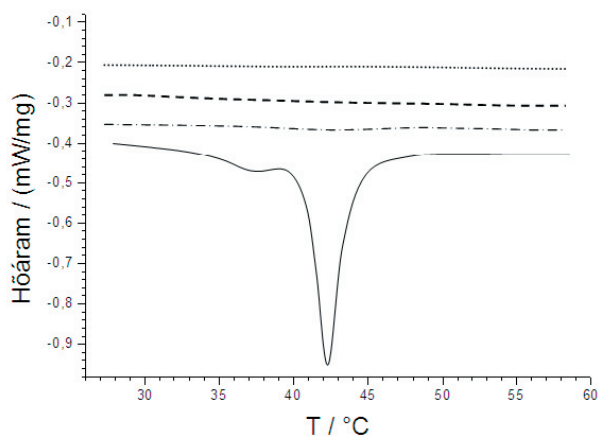


4. Ábra. DPPC liposzómák relatív méretnövekedése β -ciklodextrin jelenlétében különböző foszfolipid/CD arányoknál

Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok

A kalorimetriás vizsgálatok a ciklodextrinek és a DPPC-liposzómák közötti kölcsönhatás más módszerrel történő kísérleti megerősítésén túlmenően a membránkárosító hatás mechanizmusának felderítését is szolgálták. Fontos kérdés, hogy az oldott CD molekulák a foszfolipid kettősrétegek rendezett szerkezetének megbontását, vagy csak a membrán kooperativitásának csökkenését idézik elő. A vizsgálatokhoz 15 tömeg%-os liposzóma diszperziókat használtunk, mert a DSC-készülék érzékenysége (a PCS-vizsgálatokhoz használt) 0,1 tömeg% töménységű SUV-liposzómák diszperzióiban nem volt elegendő a fázisátalakulások detektálásához.

Az 5. ábrán víz közegű 15 tömeg%-os DPPC liposzóma-diszperzió DSC görbéje látható (folytonos vonal). A minta T_c' (előfázisátalakulási) hőmérséklete 37,7 °C, a T_c (főfázisátalakulási) hőmérséklete 42,4 °C.



5. Ábra α, β, γ -CD, hatása a DPPC-diszperzió fázisátalakulási görbéjére

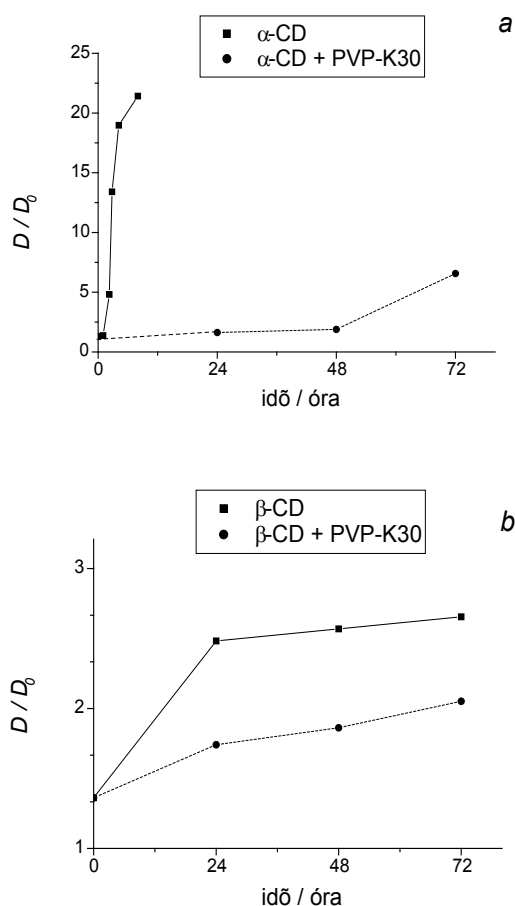
a: α -CD, b: β -CD, c: γ -CD ($n_{\text{DPPC}} / n_{\text{CD}} = 1:7$)
d: DPPC liposzóma (15 tömeg%)

A ciklodextrinek jelenlétében felvett DSC görbék (szaggatott vonalak) egyértelműen jelzik, hogy a liposzóma diszperzió, 30-45 °C hőmérséklettartományban megfigyelt fázisátalakulásai megszűnnek és nem mutatnak szerkezeti

változásra utaló entalpiaváltozást. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a CD-molekulák a lipidmembránba történő beépüléskor (véltetően komplexképzés miatt) teljesen megszüntetik a membránba rendeződött foszfolipid molekulák kooperativitását. Az α , β , és γ -ciklodextrinek membránkárosító hatásában ezzel a módszerrel nem tudunk különbséget kimutatni. A DSC-vizsgálatok azonban egyértelműen megerősítik a fotonkorrelációs stabilitási vizsgálatok azon eredményeit, mely szerint a ciklodextrin-molekulák a DPPC-membrán rendezett szerkezetének megbontása révén idézik elő a liposzóma diszperzió nagymértékű destabilizációját.

Lipidmembrán stabilizálása PVP-vel ciklodextrinek jelenlétében

Megvizsgáltuk, hogy a makromolekulás kolloidok ismert sztérikus stabilizáló hatása¹⁷ hasznosítható-e DPPC-liposzómák stabilizálására, illetve hogy oldott makromolekulák jelenlétében is érvényesül-e ciklodextrinek membránszerkezetet romboló hatása. A liposzómákat 1:7 DPPC/CD molarányú és 4:1 DPPC/PVP tömegarányú közegben formuláltuk 36,5 °C-on. A foszfolipid és a polimer arányát előzetes stabilitási vizsgálatok alapján választottuk ki. A 6. a és b ábrán bemutatott függvények egyértelműen mutatják a makromolekulák stabilizáló hatását.



6. Ábra DPPC-liposzómák relatív méretnövekedése ciklodextrinek jelenlétében a: α -CD, b: β -CD

Polimer jelenlétében két nap után is csak csekély mértékű méretnövekedés detektálható. Ezekből az eredményekből egyértelműen megállapítható, hogy a PVP hatékonyan blokkolja mind az α -, mind pedig a β -ciklodextrin jelentős membránkárosító hatását. A stabilizáló hatás vélhetően a PVP molekulák DPPC vezikulákon történő adszorpciójának tulajdonítható. A sztérikus stabilizáló hatáson túlmenően azonban szerepe lehet a CD molekulák és a PVP molekulák oldatbeli kölcsönhatásának is. Ennek felderítése további vizsgálatokat tesz szükségessé.

A szerzők köszönetüket fejezik ki az OTKA T034929 számú pályázati támogatásáért

Összefoglalás

Kolloidális (SUV) liposzómák, és különböző ciklodextrinek (α , β , γ -CD és DIMEB) páronkénti kölcsönhatásait tanulmányoztuk. Kondenzációs módszerrel monomodális méreteloszlású dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) liposzómákat állítottunk elő. Vizsgáltuk a vezikulumok fizikai stabilitását, és diszperziókinetikai állandóságának lehetséges szabályozását.

Változó kísérleti körülmények között előállított liposzómák stabilitásának jellemzésére fotonkorrelációs spektroszkópiás (PCS) eljárással meghatározott részecskeméret-eloszlás függvényeket használtunk.

Ciklodextrinek kölcsönhatását a foszfolipid membránnal kötődési izotermákkal jellemeztük.

Kötődési izotermák alapján megállapítottuk, hogy a kötött CD mennyisége γ -CD < β -CD, (DIMEB) < α -CD sorrendben nő. Igazoltuk, hogy a különböző ciklodextrinek (a kötődési vizsgálatokkal összhangban) adott DPPC/CD arány felett csökkentik a foszfolipid-membrán stabilitását. A membránkárosító hatás sorrendje: γ -CD < β -CD < α -CD.

Oldott CD molekulák és PVP molekulák hatását a DPPC membrán stabilitására differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) görbék alapján jellemeztük.

Kimutattuk, hogy a ciklodextrinek membránkárosító hatása hatékonyan gátolható vezikulumokon szorbeálódó vízoldható PVP molekulákkal.

Irodalom

- Müller, R. H. *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, **1991**.
- Gregoriadis, G. *Liposomes as Drug Carriers. Recent Trends and Progress*, Wiley: Chichester, **1988**.
- Frömmling, K. H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, **1993**.
- McCormack, B.; Gregoriadis, G. *Int. J. of Pharmaceutics* **1994**, *112*, 249.
- Gregoriadis, G.; Allison, A.C. *Liposomes in biological systems*, John Wiley & Sons: New York, **1986**.

6. Grohmann, F. L.; Csempez, F.; Szögyi, M. *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276*, 66.
7. Dékány, Gy.; Csóka, I.; Erős, I. *Colloid and Polymer Science* **2001**, *279*, 966.
8. Dékány, Gy.; Csóka, I.; Erős, I. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2001**, *107*, 491.
9. Crommelin, D.J.A.; Schreier, H. *Colloidal Drug Delivery Systems*, Ed.: Jörg Kreuter Vol. 66., **1994**.
10. Szejtli, J. *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1982**.
11. Nishijo, J.; Shiota, S.; Mazima, K et al. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 48.
12. Sente, L. *Cyclodextrin News*, **2002**, *16*, 59.
13. Irie, T.; Uekama, K. *J. Pharm. Sci* **1997**, *86*, 147.
14. Loukas, Y. L. ; Jayasekera, P.; Gregoriadis G. *Int. J. of Pharmaceutics* **1995**, *117*, 85.
15. Kremer, J.M.H.; Esker; M.W.J.; Pathamano-haran, C.; Wiersema, P.H. *Biochem.* **1977**, *16*, 3932.
16. Puskás István *Ciklodextrinek kölcsönhatása liposzómákkal. Szakdolgozat*, ELTE Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszék, **2003**.
17. Grohmann Ferenc Levente, Csempez Ferenc *Magyar Kémiai Folyóirat* **1998**, *104./2*, 53.

Interaction between cyclodextrins and colloids.

Interactions in binary systems between colloidal (SUV) liposomes, dissolved macromolecules (polyvinyl pyrrolidone, PVP) and cyclodextrins (CD) of different chemical compositions, respectively, were studied. Dispersions of dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) liposomes with monomodal size distribution were prepared. The physical stability of liposomes and its possible control were also investigated. The interactions between CD molecules and colloidal components were examined as follows : For characterizing the kinetic stability of the liposomal dispersions under various conditions, size-distribution functions determined by photon-correlation spectroscopy (PCS) were used. The

affinity of cyclodextrins to the phospholipid membranes was characterized by „binding isotherms” The effect of dissolved CD and PVP molecules, respectively, on the physical stability of DPPC membranes was detected by differential scanning calorimetry (DSC). Based on the binding isotherms, the sorption of cyclodextrin molecules onto DPPC liposomes was found to increase in the order: γ -CD < β -CD, (DIMEB) < α -CD. The order of reducing the physical stability of the DPPC due to the dissolved cyclodextrins was the same, i. e.: γ -CD < β -CD < α -CD. It has also been shown that the destabilizing effect of cyclodextrin molecules can be well regulated and prevented by adding water-soluble PVP molecules to the dispersion.