

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszertechnológiai Intézet

# **BIOLÓGIAI BARRIEREKEN KERESZTÜLI GYÓGYSZERBEVITEL FOKOZÁSA SZOROS SEJTKÖZÖTTI KAPCSOLATOKAT MÓDOSÍTÓ PEPTIDEK SEGÍTSÉGÉVEL**

Ph.D. értekezés tézisei

**Bocsik Alexandra**

Témavezetők:

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

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



Szeged  
2016

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

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

Gyógyszertechnológiai Intézet

Témavezetők

**Dr. habil. Deli Mária, M.D., D.Sc.**

**Prof. Dr. habil. Révész Piroska, Pharm.D., D.Sc.**

**Bocsik Alexandra**

**BIOLÓGIAI BARRIEREKEN KERESZTÜLI GYÓGYSZERBEVITEL  
FOKOZÁSA SZOROS SEJTKÖZÖTTI KAPCSOLATOKAT  
MÓDOSÍTÓ PEPTIDEK SEGÍTSÉGÉVEL**

**Szigorlai Bizottság**

Elnök

Prof. Dr. Erős István, SZTE GYTK, Gyógyszertechnológiai Intézet

Tagok

Dr. Vecsernyés Miklós, DE GYTK, Gyógyszertechnológiai Intézet  
Dr. Csont Tamás, SZTE ÁOK, Biokémiai Intézet

**Bíráló Bizottság**

Elnök

Prof. Dr. Falkay György, SZTE GYTK, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Opponensek

Dr. Jemnitz Katalin, MTA KPI, Funkcionális Farmakológiai Kutatócsoport  
Dr. Martinek Tamás, SZTE GYTK, Gyógyszeralanitikai Intézet

Tagok

Dr. Csupor Dezső, SZTE GYTK, Farmakognóziai Intézet  
Dr. Doró Péter, SZTE GYTK, Klinikai Gyógyszerészeti Intézet

Szeged

2016

## 1. BEVEZETÉS

Az emberi testben az epitél és endotél sejtek alkotják a biológiai gátrendszereket, melyek elválasztják a szervezetet a külső környezettől, illetve a belső szerveket egymástól. Ezek a védőfunkcióval rendelkező fiziológiás barrierek elengedhetetlen szerepet játszanak testünk állandó homeosztázisának fenntartásában, mely a központi idegrendszer esetében különösen fontos. A gátrendszerek anatómiai alapját az endotél- és epitélsejtek közötti sejtkapcsolató struktúrák alkotják, melyek meghatározzák a biológiai gátak szorosságát illetve megakadályozzák a sejtek közötti szabad anyagátáramlást, így limitált az ionok, nagyobb vízdékony molekulák és a fehérjék átjutása. Ennek köszönhetően a sejtek közötti permeabilitás egy fontos meghatározó tényezője a gyógyszerbejutásnak. Különösen a nagyobb vízdékony biofarmakonok hatékony bejuttatása jelent nagy kihívást, hiszen penetrációjukat a sejtekben található enzimek is korlátozzák. Az enzimeknek köszönhető metabolikus gát és a szoros kapcsolóstruktúrák alkotta fizikai gát tehát erősen korlátozza a gyógyszerbejutást, ezért a barriereken keresztüli permeabilitás fokozás vizsgálata nagyon fontos kutatási terület.

**1. táblázat:** A kiválasztott módosító peptidek jellemzői.

Peptid	Célpont	Aminosav sorrend	Mechanizmus	Eredet
<b>ADT-6</b>	E-kadherin	Ac-ADTPPV-NH <sub>2</sub>	EC1 domén analóg	szintézis E-kadherin szerkezet alapján
<b>HAV-6</b>	E-kadherin	Ac-SHAVSS-NH <sub>2</sub>	EC1 domén analóg	szintézis E-kadherin szerkezet alapján
<b>C-CPE</b>	Klaudin-3, -4	SSYSGNYPYSILFQKF-OH	ECL domén interakció	mikrobiális toxin fragment
<b>AT-1002</b>	ZO-1	FCIGRL	Zot receptor	mikrobiális toxin fragment
<b>7-mer</b>	ismeretlen	FDFWITP	nem ismert	fág display
<b>PN159</b>	ismeretlen	KLALKLALKALKAALKLA-amide	nem ismert	fág display

Rövidítés: ZO-1, zonula okkludens fehérje-1; EC1, extracelluláris domén 1; ECL, extracelluláris loop.

A hatóanyagok bejuttatásának fokozására különböző lehetőségek állnak rendelkezésre. Ezek egyike a barrierek paracelluláris megnyitása. Az közelmúlt kutatásainak köszönhetően ismertek már olyan proteinek, peptidek melyek képesek közvetlenül hatni a sejtek közötti szoros és adherens kapcsolófehérjékre. Ezek a különböző célponton és mechanizmussal ható peptidek nyitják a sejtek közötti utat anélkül, hogy károsítanák a sejteket, ezért alkalmazásuk ígéretesnek tűnik, például az intesztinális gát vagy a vér-agy gát permeabilitásának növelésére. Irodalmi adatok alapján kiválasztottunk hat különböző célpontú modulátor peptidet (1 táblázat), melyek eltérő mechanizmussal működhetnek.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Kutatócsoportunk korábban kifejlesztett egy három sejtípusból álló patkány vér-agy gát modell, mely híven tükrözi a fiziológiás paramétereket. Ez a jól jellemzett modell megfelelő rendszer hatóanyagok, új farmakonok tesztelésére, azonban korábban még nem vizsgáltunk rajta biokatív peptid átjutást. Ezért kísérleteink első célja a fájdalomcsillapításban szerepet játszó opiorfin neuropeptid transzportjának tesztelése volt.

Az irodalomban leírtak már számos szoros kapcsolóstruktúrákra ható peptidet, azonban vizsgálatuk sokszor csak egy típusú biológiai gátrendszerre terjed ki, továbbá hiányoznak az összehasonlító vizsgálatok. Kevés az adat arra vonatkozólag, hogy mennyire gátrendszer specifikusak illetve mennyire hatékonyak a már leírt peptidek egymáshoz képest. Összehasonlító munkák fő célja így az volt, hogy a kiválasztott modulátor peptideket hatékonyságát két eltérő gátrendszer sejtenyészetes modelljén megvizsgáljuk.

Fő célok, kísérleti lépések:

- (i) Módosító peptidek hatékonyságának tesztelése bélepitél és vér-agy gát modellen:
  - sejtéletképesség,
  - gátszorosság,
  - sejtmorfológiai vizsgálatok.
- (ii) A módosító peptidek specifikusságának, hatékonyságának, biztonságosságának valamint a gátrendszerek regenerálódó képességének vizsgálata.
- (iii) PN159 peptid vizsgálata bélepitél modellen:
  - koncentráció függő hatás,
  - hosszantartó kezelés hatása a sejtéletképességre,
  - a gátrendszer regenerálódásának kinetikája,
  - morfológiai változások,
  - jelzőmolekulák és hatóanyagok penetrációjának fokozása.
- (iv) PN159 modulátor peptid lehetséges célpontjainak meghatározása.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Vegyszerek

Minden reagenst a Sigma Aldrich Magyarország Kft.-től rendeltünk, hacsak másképp nem jelöltük.

#### 3.2. Peptid szintézis

Az összes peptid szintézise együttműködésben zajlott. Az opiorfin (QRFSR) Dr. Tóth Géza (MTA SZBK, Biokémiai Intézet), míg a hat különböző módosító peptidet Dr. Fülöp Livia (SZTE ÁOK, Orvos Vegytani Intézet) állította elő.

#### 3.3. Sejttenyésztés – humán Caco-2 sejtvonal és primer patkány agyi sejtek

A humán Caco-2 bélepitél sejtvonalat az ATCC cégtől vásároltuk, kísérleteinkhez hatvan passzálig használtuk. A Caco-2 sejteket tápfolyadékban (Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM/HAM's F-12) tartottuk, melyet 10 % magzati borjú szérummal, 1% nátrium-piruváttal, és 50 µg/ml gentamicinnel egészítettünk ki. Minden tenyésztési felületet patkány farok ínból nyert kollagénnel vontunk be, ezzel segítve a sejtek jobb letapadását.

A vér-agy gát *in vitro* modellezésére patkány agyból izolált sejteket használtunk. A kísérletekhez vagy csak patkány agyi endotélsejteket használunk egysejt rétegben, vagy három sejttypusból álló ko-kultúra modellt, amelyekhez primer patkány agyi endotél-, glia- és pericita sejteket tenyésztünk együtt. A sejtek izolálásának és a modellek összeállításának lépéseit több közleményünkben leírtuk (Nakagawa et al., 2009; Walter et al., 2015). Az endotélsejtek tenyésztőmédiuma a következő összetevőkből állt: DMEM/F12, borjúplazmából készített savó (15%, First Link Ltd., Egyesült Királyság), bázikus fibroblaszt növekedési faktor (1 ng/ml, Roche), heparin (100 µg/ml), inzulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), nátrium-szelenit (5 ng/ml) és gentamicin (50 µg/ml). A glia és pericita sejteket DMEM/HAM's F-12 médiumban tartottuk 10 % magzati borjú szérummal és gentamicinnel (50 µg/ml) kiegészítve.

#### 3.4. A peptid kezelések időtartama és az alkalmazott koncentrációk

Az összehasonlító vizsgálatokhoz egy órás kezeléseket alkalmaztunk valamint a következő koncentrációkat használtuk: ADT-6, HAV-6 és AT-1002 peptid: 2 mM; C-CPE peptid: 1 mM; 7-mer peptid: 100 µM és PN159 peptid: 10 µM. A PN159 peptiddel végzett kiegészítő kísérletekben 1-100 µM koncentráció tartományban alkalmaztuk a peptidet.

### **3.5. *In vitro* életképesség vizsgálatok**

A sejtek életképességében bekövetkezett változásokat két különböző módszerrel vizsgáltuk: festékredukción alapuló MTT teszttel és impedancia méréssel.

Az MTT teszt során az élő sejtek a sárga festéket felveszik és átalakítják kék színű formazán kristályokká. A festék átalakítás mértéke meghatározza a sejtek metabolikus aktivitását, így utal az életképességükre. Az MTT festékből képződött formazán kristályokat dimetil-szulfoxiddal oldottuk fel és mennyiségüket abszorbancia méréssel (Fluostar Optima microplate reader, Németország) határoztuk meg.

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

### **3.6. A sejtrétegek gátfunkciójának vizsgálata**

#### **3.6.1. Elektromos ellenállás mérése**

A transzepitheliális és -endoteliális elektromos ellenállás (TEER) értéke tükrözi a sejt közötti kapcsolatok szorosságát. Az ellenállást EVOM műszerrel és STX-2 elektródok használatával mértük. A TEER értékekből ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ) levontuk a sejtmentes tenyésztő betéteken mért értékek átlagát ( $130 \Omega \times \text{cm}^2$ ).

#### **3.6.2. Permeabilitás vizsgálat**

A kísérletek során a felső kompartmentekbe (bél lumen/agyi kapilláris) mértük a jelzőmolekulákat és a hatóanyagokat a módosító peptidek jelenlétében, az átjutott anyagok mennyiségét pedig az alsó kompartmentből (bél/agyszövet) határoztuk meg.

Az összehasonlító kísérletekben a sejtrétegek permeabilitásának meghatározására Evans késsel jelölt albumint (10 mg/ml; 65 kDa) és fluoreszceint (10  $\mu\text{g/ml}$ ; Mw: 376 Da) használtunk. A sejtrétegek regenerálódó képességét úgy vizsgáltuk, hogy tenyésztő folyadék cserét követően, egy nap elteltével megismételtük a mérést peptid-mentes környezetben. Az opiorfin peptid (10  $\mu\text{M}$ ) vér-agy gát modellen keresztüli átjutását 30 és 60 perces időpontokban mértük és az ürüléssel (clearance) jellemeztük. A PN159 peptiddel végzett kiegészítő kísérletekben fluoreszcein izotiacianáttal jelölt dextrán molekulák (FITC-dextrán) és hatóanyagok átjutását vizsgáltuk Caco-2 sejtrétegeken keresztül. A markermolekulákat 1 mM, míg a hatóanyagokat 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk. Az inkubációkat követően a különböző kompartmentekből összegyűjtöttük a mintákat. A fluoreszcein és albumin

koncentrációit mikroplate olvasóval (Fluostar Optima), az opiorphin peptid mennyiségét tömegspektrométerrel, és a FITC-dextrán molekulák koncentrációit spektrofluorométerrel (Fluorolog FL3-22) határoztuk meg, míg a hatóanyagok koncentrációit HPLC-vel mértük. A tesztanyagok sejtrétegeken való átjutását a látszólagos permeabilitási koefficiens ( $P_{app}$ ) értékével jellemeztük.

### **3.7. Immunhiszkémia**

Az epitel és endotélsejtrétegben bekövetkezett morfológiai változásokat immunfestéssel követtük nyomon. A kísérletek során az integráns membrán fehérjék közül az okkludin és claudin-5 fehérjét, a citoplazmatikus linker molekulák közül pedig a  $\beta$ -katenin és zonula okkludens-1 (ZO-1) fehérjét mutattuk ki immunfestéssel. A kezeléseket követően, valamint az egy napos regenerációs fázist követően pufferben mostuk a sejteket, majd fixáltuk hideg aceton-metanol oldatban. Ezt követően albuminnal blokkoltuk a nem specifikus antitest kötőhelyeket és a mintákhoz adtuk 12 órára az elsődleges antitesteket (Life Technologies, USA), majd mosást követően hozzáadtuk a másodlagos fluoreszcens jelölést tartalmazó antitesteket egy órára Hoechst 33342 sejtmagfesték jelenlétében. A minták mosása és lefedése után Leica SP5 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH, Germany) analizáltuk a festéseket.

### **3.8. Elektronmikroszkópia**

A polikarbonát membránokon tenyésztett Caco-2 sejteket 10  $\mu$ M PN159 peptiddel kezeltük. A mintákat a fixálás után háromszor mostuk kakodilát pufferben, majd kivágtuk a membránokat a tenyésztőbetétekből és 24-lyukú lemezbe helyezve utófixáltuk ozmium-tetraoxidban. Desztillált vizes mosást követően a mintákat felszálló alkohol sorral dehidratáltuk és uranil-acetátban inkubáltuk, majd Taab 812 beágyazószerrel blokkot készítettünk. Leica UTC ultramikrotóm (Leica Microsystems, UK) segítségével ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi Ltd., Japán) vizsgáltuk meg.

### **3.9. Molekula modellezés**

A fehérjék szerkezetét homológia modellezéssel állapítottuk meg, melyhez a MODELLER programot használtuk. A humán klaudin-1, -3, -4, -5 és -7 fehérjék szerkezetének modellezéséhez az irodalomban leírt egér klaudin-15 teljes fehérje szerkezetét használtuk mintaként. A dinamikus molekula szimulációhoz az NAMD programot, míg az

eredmények kiexportálásához a VMD v1.9.1. programot alkalmaztuk. A PN159 peptid dokkolását a különböző kaludin fehérjékkel a CABS szerveren futtattuk le, majd a MODELLER program segítségével rekonstruáltuk.

### **3.10. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia**

PN159 peptid (0.1 mg/ml) CD spektroszkópiás mérését UV tartományban, 25 °C –on végeztük J-810 spektropolariméterrel (JASCO International Co. Ltd., Japan). A peptidszerkezet hőstabilitását 25 °C és 95 °C-os tartományban mértük.. A CD spektrumokat 260 nm és 185 nm között vettük fel 1 mm-es optikai hullámhosszon. Az eredményeket a Dichroweb szerveren a CDSSTR módszer alapján értékeltük ki.

### **3.11. Statisztikai kiértékelés**

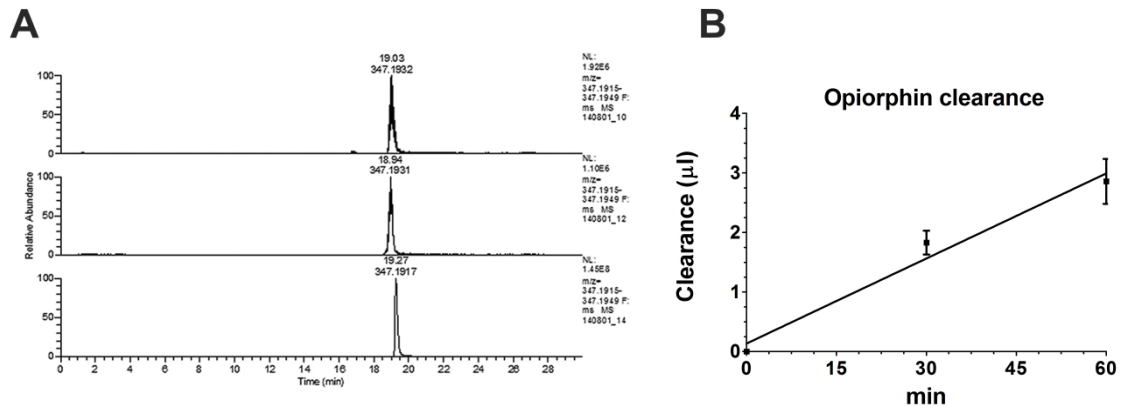
A statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk. A kísérletekben kapott eredményeket átlag  $\pm$  S.D. (az átlag standard szórása) formában adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket tekintettük. Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk, melyekben a párhuzamos elemek száma minimum három volt.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. Opiorfin penetráció vér-agy gát modellen keresztül**

A tömeg/töltés ( $m/z$ ) értékek alapján a mintákban megfigyelt jelintenzitás a következőképpen alakult: fogadó kompartment:  $1.5 \times 10^8$ , donor kompartment:  $1-2 \times 10^6$ . Az opiorfin peptid relatív átjutott mennyisége  $2.91 \pm 1.13$  %, melyet a kétszeresen töltött opiorfin görbe alatti területének ún. extracted ion kromatogrammja ( $m/z$  347.1932) alapján állapítottunk meg. Párhuzamos mintákon megvizsgáltuk a fluoreszcein és albumin jelzőmolekulák átjutását. Az eredmények alapján a fluoreszcein vér-agy modellen keresztüli penetrációja  $0.41 \pm 0.03$  % míg az albumin penetrációja  $0.03 \pm 0.01$  %, mely igazolja a modell alkalmazhatóságát. Az opiorfin clearance az 1. B ábrán látható, a látszólagos permeabilitási koefficiens értéke:  $0.53 \pm 1.36 \times 10^{-6}$  cm/s ( $n = 4$ ).



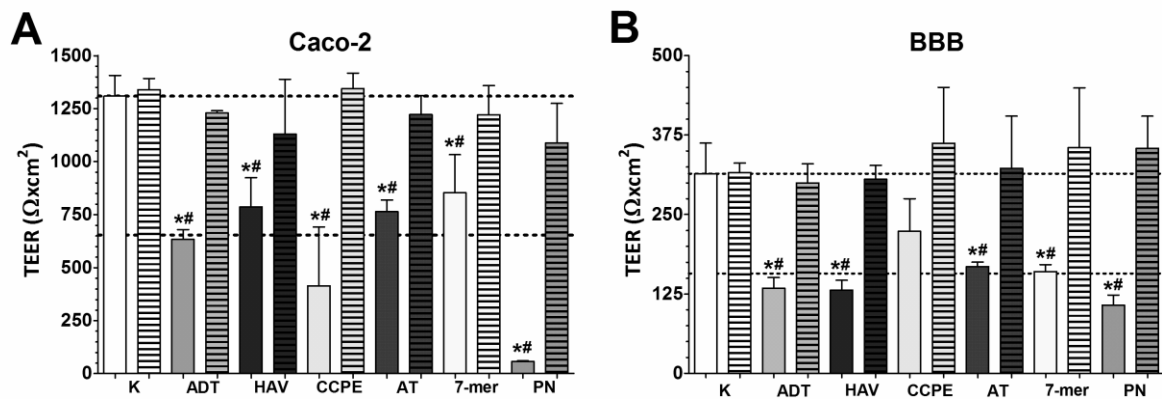


**1. ábra:** (A) A kétszeresen töltött opiorfin peptid extracted ion kromatogrammja ( $m/z$ :  $347.1932 \pm 5$  ppm). Felső panel: fogadó kompartment („agyszövet”) 30 perc kezelést követően; középső panel: fogadó kompartment 60 perces kezelést követően; alsó panel: donor kompartment („mikrokapillaris lumen”) 60 perces kezelést követően. A csúcsfeliratozás a retenciós időt és az  $m/z$  detektálását mutatja. (B) Vér-agy gát modellen keresztüli opiorfin clearance 30 és 60 perces értékei.

## 4.2. A módosító peptidek hatása bélepitél és vér-agy gát modellen

### 4.2.1. Peptidek hatása a sejtrétegek elektromos ellenállására

Az egy órás peptid kezeléseket nem-toxikus koncentráció tartományban végeztük. Az összes vizsgált peptid, szignifikánsan csökkentette a Caco-2 sejtréteg elektromos ellenállását (2. A ábra).



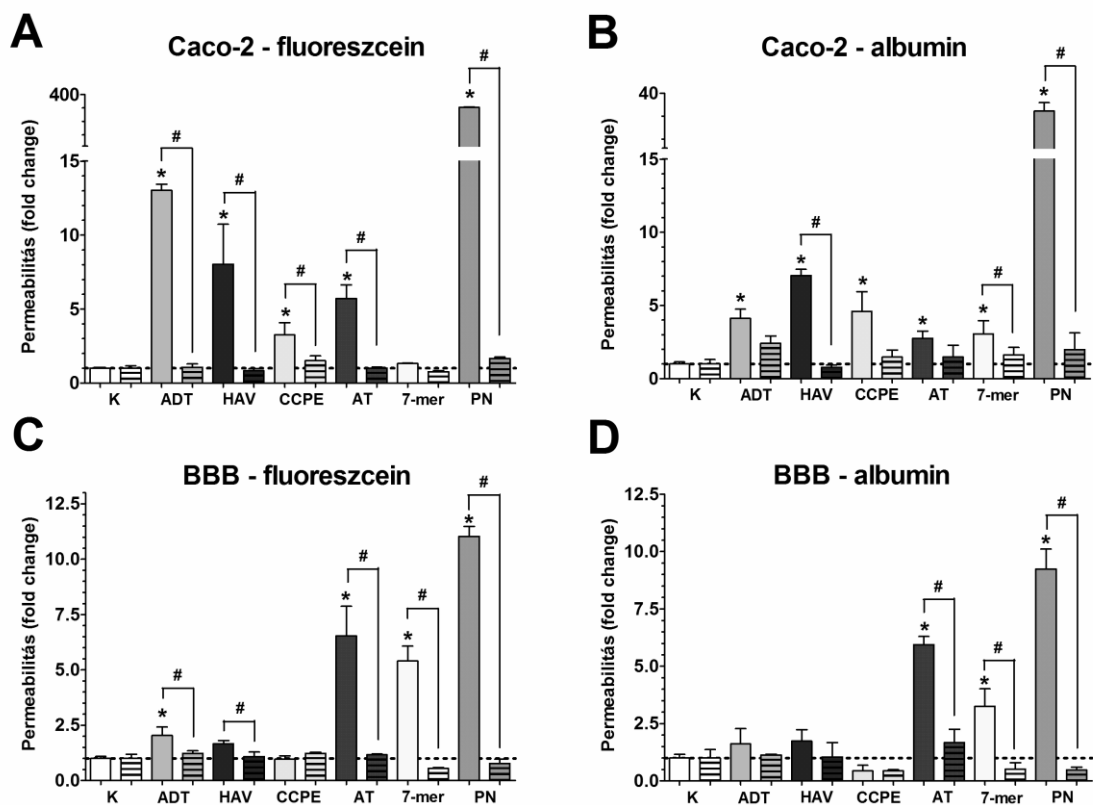
**2. ábra:** Peptidek hatása (A) Caco-2 epitél sejtréteg és (B) agyi endotélsejtek elektromos ellenállására. Az üres oszlopok az eórágy s peptid kezelést követő TEER értékeket mutatják, míg a csíkos oszlopok a 24-órás regenerációs fázis utáni TEER értékeket. Statisztikailag szignifikáns különbség:  $p < 0.05$ ; \* kontroll csoporthoz képest a különbség; # visszaállást követően a kontroll csoporthoz képest a különbség.

A kontroll csoport TEER értékéhez ( $1309 \pm 97 \Omega \times \text{cm}^2$ ) hasonlítva az ADT-6, C-CPE és PN159 peptidek 50 %-al csökkentették az elektromos ellenállást, míg a 7-mer, HAV-6 és AT-1002 peptidek csak 30-45 %-al (2. A ábra). Az agyi endotélsejtréteg elektromos ellenállását a C-CPE peptid kivételével minden peptid csökkentette több mint 50 %-al (2. B ábra) a kezeletlen kontroll csoporthoz képest ( $314 \pm 48 \Omega \times \text{cm}^2$ ). A C-CPE peptid alacsony

aktivitásának hátterében az ál, hogy célpontjai csak nagyon alacsony szinten expresszálódnak az agyi endotélsejteken. Mindkét tenyészetes modellen a PN159 peptid volt a leghatékonyabb. Az egy napos regenerációs idő után az összes kezelt csoport TEER értéke a kontrollhoz hasonló értéket mutatott, mely igazolja a regenerációs képességet.

#### 4.2.2. A peptidek hatása a sejtrétegek permeabilitására

A Caco-2 sejtrétegek permeabilitását minden modulátor peptid fokozta, melyet igazolt a megnövekedett fluoreszcein és albumin markermolekula átjutása (3. A és B ábra). Leghatékonyabban az ADT-6, a HAV-6 és a PN159 fokozta a bélepitél sejtréteg permeabilitását.



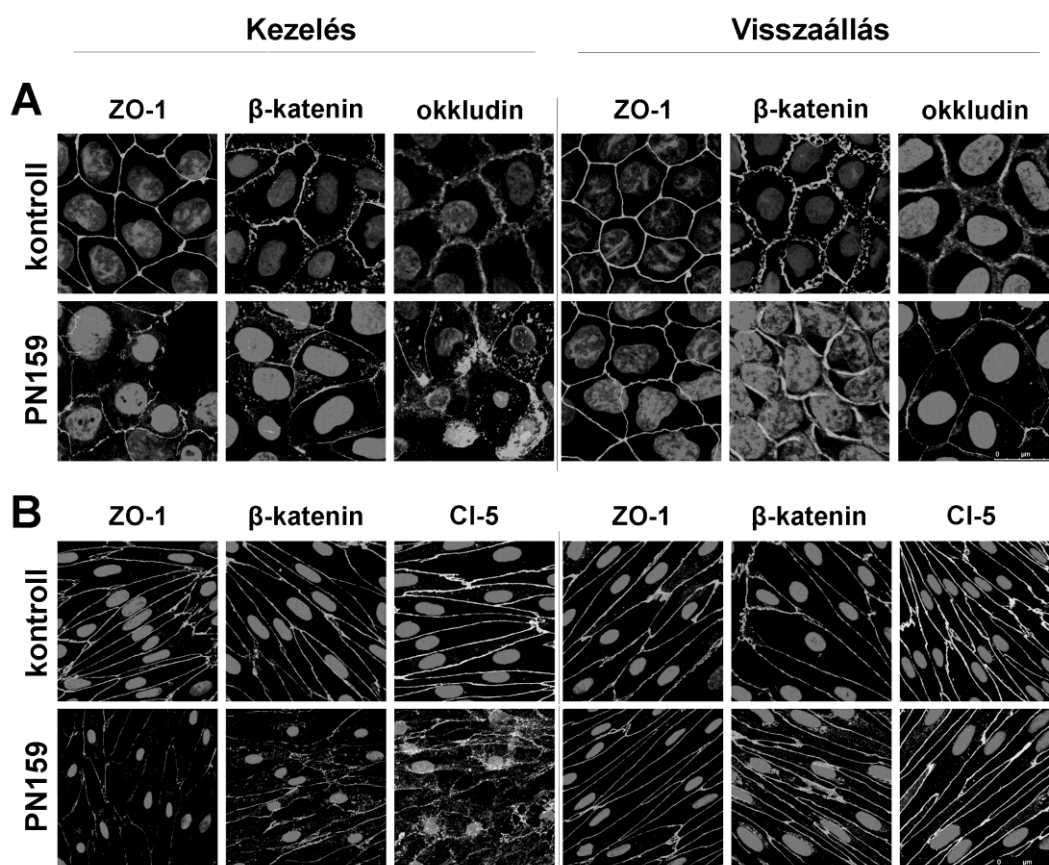
**3. ábra:** (A és B) Caco-2 sejtréteg és (C és D) vér-agy gát modell permeabilitása. (A, C) fluoreszcein permeabilitása, (B, D) albumin permeabilitása egy órás peptid kezelést követően és az egy napos regenerációs fázist követően. Az üres oszlopok az egy órás peptid kezelést követő permeabilitási értékeket mutatják, míg a csíkos oszlopok a 24-órás regenerációs fázis utáni értékeket. Statisztikailag szignifikáns különbség:  $p < 0.05$ ; \* kontroll csoporthoz képest a különbség; # visszaállást követően a kontroll csoporthoz képest a különbség.

A vér-agy gát modellen az AT-1002, a 7-mer és a PN159 peptidek okoztak szignifikás permeabilitás fokozódást mindkét markermolekula esetében (3. C és D ábra). Összhangban a TEER mérés eredményeivel legkevésbé az E-kadherin peptidek befolyásoltak az endotélsejtek permeabilitását. Mindkét tenyészetes barrier modelleken a PN159 peptid bizonyult a

leghatékonyabbnak. A permeabilitási tesztet megismételtük az egynapos regenerálódási fázist követően és azt tapasztaltuk, hogy a peptidok penetrációt fokozó hatása reverzibilis.

#### 4.3. Sejtközi kapcsolat morfológiai változása PN159 peptid kezelést követően

Kontroll körülmények között mindkét tenyészetes barrier modell sejtkapcsoló struktúrái szorosan összekapcsolják a szomszédos sejteket, festődésük folytonos (4. ábra).

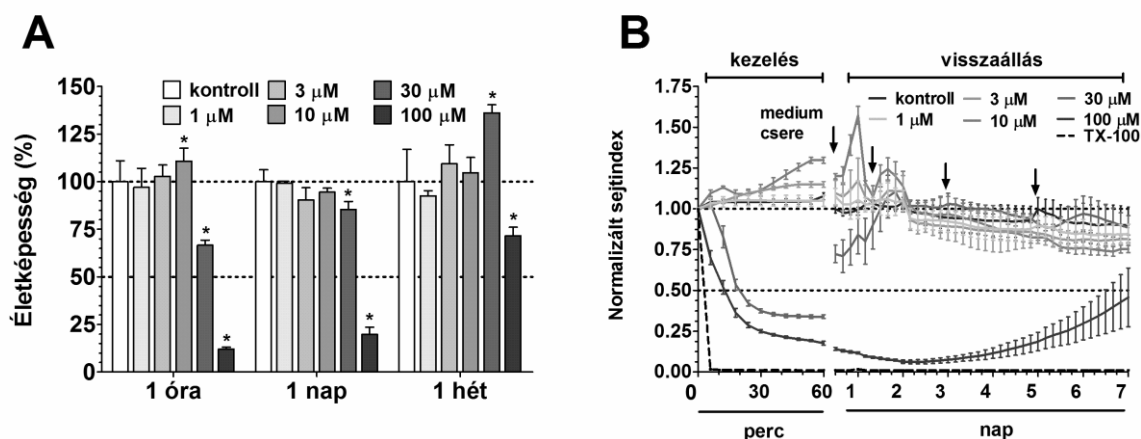


**4. ábra:** Sejtkapcsoló struktúrák morfológiai változásai PN159 peptid kezelés hatására. (A) Caco-2 sejtréteg, (B) agyi endotél sejtréteg. Zonula okkludens-1 (ZO-1), β-katenin, okkludin és klaudin-5 fehérjék immunfestése egy órás peptid kezelést követően és egy napos regenerációs fázis után. Bar = 25 μm.

Az eddigi kísérletekben leghatékonyabbnak bizonyult PN159 peptid drasztikus változásokat okozott mindkét tenyészetes barrier modellen. Az immunfestés alapján a szoros kapcsolófehérjék dezintegrálódtak, a fehérjék bevándoroltak a citoplazmába. Ezt a morfológiai változást azonban csak közvetlenül a peptid kezelést követően figyeltük meg, a regenerációs fázis után a festés újra a kontrollhoz hasonló eredményt adott.

#### 4.4. PN159 peptid hatása Caco-2 epitelsejtek életképességére

Mivel az összehasonlító kísérletekben a PN159 ismeretlen célpontú peptid bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért hatását tovább vizsgáltuk Caco-2 epitelsejteken különböző koncentrációkat alkalmazva. Az MTT festékredukciós teszt információt nyújt a sejtek metabolikus aktivitásáról és életképességéről. A mérést három időpontban végeztük el, (i) közvetlenül az egy órás peptid kezelés követően, (ii) egy napos regeneráció után és (iii) egy hetes regenerációs fázis után (5. A ábra). A peptid alacsony koncentrációi (1-10  $\mu\text{M}$ ) nem befolyásolták a sejtek életképességét, míg a 30  $\mu\text{M}$ -nál magasabb sejtkárosodást okozott.



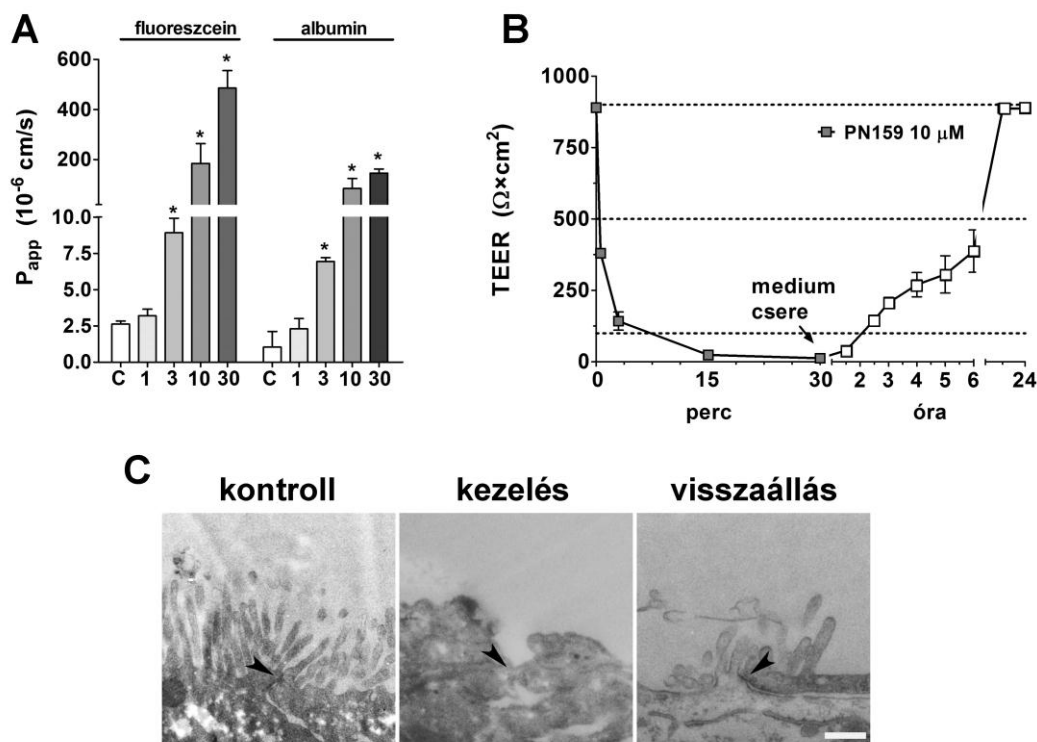
**5. ábra:** (A) MTT teszt PN159 peptid kezelés után (egy óra elteltével, egynapos és egy hetes regenerációs fázist követően). Az eredményeket a kontroll sejtek %-ban adjuk meg, mely a 100 %-os életképességet jelenti. Statisztikailag szignifikáns:  $p < 0.05$ , a kontroll csoporthoz hasonlítva. (B) Impedancia mérés egy órás peptid kezelést követően, a sejtréteg regenerálódását egy héten keresztül követtük. Az értékeket sejtinдексben fejeztük ki. A nyilak a tenyésztő médium cseréjét jelölik.

A valós idejű sejtanalízis kinetikai görbéjének alapján, az MTT teszthez hasonlóan csak a 30 és 100  $\mu\text{M}$ -os koncentráció okozott jelentős sejtinдекс csökkenést (5. B ábra). A 100  $\mu\text{M}$ -os PN159 peptid hatása mindkét életképességi vizsgálatban sejtkárosító hatású volt, így a továbbiakban ezt a koncentrációt már nem vizsgáltuk.

#### 4.5. Caco-2 sejtréteg integritásának és a sejtkapcsoló fehérjék ultrastrutúrális változásainak vizsgálata PN159 peptid kezelést követően

A két legmagasabb vizsgált koncentráció (10 és 30  $\mu\text{M}$ ) hatékonyan nyitotta a paracelluláris barriert és fokozta a sejtréteg áteresztőképességét mind a fluoreszcein, mind az albumin markermolekulára (6. A ábra). Mivel a peptid 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban biztonságos volt és hatékonyan fokozta a sejtréteg permeabilitását, így ezt a koncentrációt választottuk ki, hogy megvizsgáljuk a barrier nyitás kinetikáját és azt, hogy hogyan fokozza a peptid a kiválasztott hatóanyagok és markermolekulák penetrációját.

A PN159 peptid hatása nagyon gyors, egy perc alatt 42 %-al csökkentette a Caco-2 sejtréteg elektromos ellenállását (6. B ábra), ez a tendencia a kezelés végéig folytatódott. Miután eltávolítottuk a sejtekről a peptidet a barrier funkció fokozatosan helyreállt, 20 óra elteltével már 100 % regenerálódást figyeltünk meg.



**6. ábra:** (A) Fluoreszcein és albumin jelzőmolekula permeabilitása Caco-2 sejtrétegen keresztül ( $P_{app}$  A-B  $10^{-6}$  cm/s),  $p < 0.05$ . (B) Az epitelsejtréteg ellenállásának kinetikai jellemzése (TEER) PN159 peptid kezelés után. (C) Transzmissziós elektron mikroszkópos jellemzés, a sejtközötti kapcsolatokat nyílhegyek jelölik; bar = 400 nm.

Az elektronmikroszkópos felvételeken jól látható, hogy kontroll körülmények között a két szomszédos sejtet szoros kapcsolóstruktúrák kötik össze (6. C ábra). PN159 kezelés hatására ez a kapcsolat felszakad, a sejtek eltávolodnak egymástól. A változás azonban csak átmeneti, mivel a regenerációs fázist követően újra megfigyelhetők a szoros kapcsoló struktúrák.

#### 4.6. PN159 peptid permeabilitás fokozó hatása – marker molekulák és hatóanyagok átjutásának tesztelése

A korábbi funkcionális és morfológiai vizsgálatok alapján a PN159 peptid hatékonyan nyitja a sejtek közötti kapcsolófehérjéknek köszönhető gátat, így alkalmas lehet, mint gyógyszer penetráció fokozó. Caco-2 bélepitél sejtvonalon megvizsgáltunk négy különböző méretű vízdékony dextrán molekulát és négy hatóanyagot. A vízdékony atenololt és

cimeidint, valamint a lipidoldékony quinidint és verapamilt, melyek efflux transzporter kigandok (2. táblázat).

**2. táblázat:** Dextrán markermolekulák és hatóanyagok látszólagos permeabilitási koefficiense ( $P_{app}$  A-B,  $10^{-6}$  cm/s) kontroll körülmények között és PN159 peptid kezelést követően.

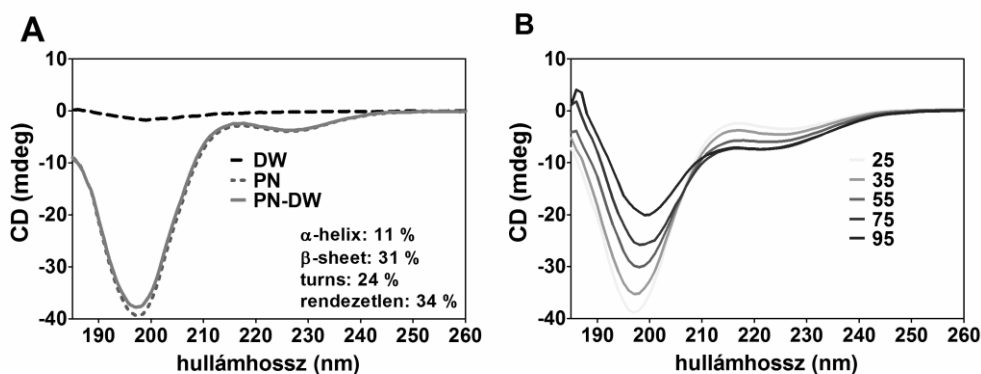
		$P_{app}$ A-B ( $10^{-6}$ cm/s) $\pm$ SD		Fold change
		kontroll	PN159	
marker	FD-4	0,021 $\pm$ 0,001	4,2 $\pm$ 0,1	42
	FD-10	0,025 $\pm$ 0,01	4,8 $\pm$ 0,7	48
	FD-20	0,022 $\pm$ 0,002	3,5 $\pm$ 1,0	35
	FD-40	0,015 $\pm$ 0,003	6,0 $\pm$ 0,3	60
hatóanyag	atenolol	1,2 $\pm$ 0,3	36,3 $\pm$ 1,9	30,3
	cimetidine	0,9 $\pm$ 0,2	34,5 $\pm$ 4,5	38,3
	quinidine	45,0 $\pm$ 13,3	72,6 $\pm$ 2,4	1,6
	verapamil	46,2 $\pm$ 3,9	86,7 $\pm$ 18,8	1,9

Rövidítés: FD, fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextrán.

A nagyméretű dextrán molekulák alacsony permeabilitást mutattak kontroll körülmények között, peptid kezelést követően azonban a látszólagos permeabilitási koefficiens jelentősen megnövekedett. A hatóanyagok közül az atenolol és cimeidin alacsony, míg a quinidin és verapamil magas permeabilitást mutatott. A PN159 peptid penetrációt fokozó hatása vízdékony hatóanyagok esetében volt jelentősebb, több mint harmincszoros különbséget figyeltünk meg a kontroll körülményekhez képest.

#### 4.7. PN159 másodlagos szerkezetének jellemzése

A CD spektroszkópia mérés eredményei alapján (7. A ábra.) a PN159 peptid random szerkezetű, emellett a domináns szerkezeti motívum a  $\beta$ -redő (31 %). Ez a szerkezet erős stabilitást mutat 25 és 95 °C között (7. B ábra).



**7.ábra:** Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia (A) PN159 peptid szerkezete; (B) PN159 peptid hőstabilitás mérése 25 és 95 °C között.

#### 4.8. PN159 peptid szerkezeté és kölcsönhatása klaudin-7 fehérjével

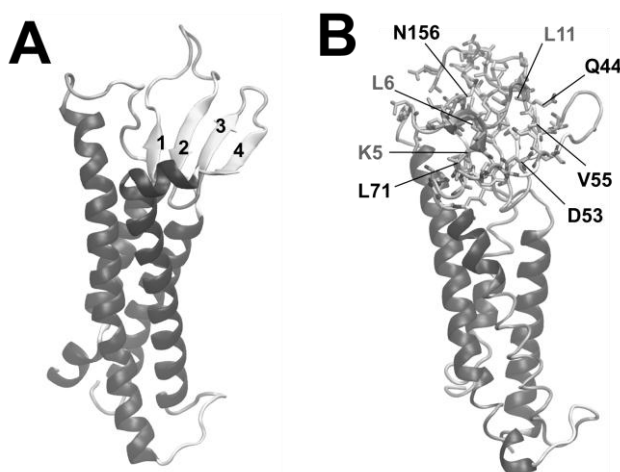
A klaudin fehérjék szerkezete homológia modellezéssel történt. A PN159 peptid és a humán klaudinok dokkolása a CABS szerveren zajlott. A dokkolás energiája három különböző energiával együttesen jellemezhető: ligand, kölcsönhatás és receptor energia. A modellezés alapján az energetikai szempontból kedvező kapcsolatokat vettük figyelembe, melyek alapján a PN159 peptid kölcsönhat a klaudin-1, -4, -5 és -7 fehérje első extracelluláris doménjével, de nem lép interakcióba a klaudin-3 fehérjével.

**3. táblázat:** A kiválasztott humán klaudin monomerek dokkolási energiájának összetevői.

	Klaudin-1	Klaudin-3	Klaudin-4	Klaudin-5	Klaudin-7
$E_{\text{lig}}$	-34	-17	-61	-100	-32
$E_{\text{int}}$	-63	-59	-79	-76	-186
$E_{\text{tot}}$	-1228	-1163	-1229	-1439	-1798

Rövidítés:  $E_{\text{tot}}$ : teljes energiái;  $E_{\text{lig}}$ : ligand energia;  $E_{\text{int}}$ : kölcsönhatás energia.

Összehasonlítva a dokkolás energiáit, megállapíthatunk egy sorrendet: (klaudin-3 < klaudin-1 < klaudin-4 < klaudin-5 < klaudin-7), mely alapján a peptid a klaudin-7 fehérjével lép a legerősebb kölcsönhatásba. A kölcsönhatás erőssége kapcsolatba hozható a  $\beta$ -redők eltűnésével. A 8. ábrán látható a klaudin-7 fehérje szerkezete (8. A ábra) valamint a peptiddel alkotott kölcsönhatása (8. B ábra).



**8. ábra:** (A) Human klaudin-7 fehérje modell. (B) PN159 peptid és a klaudin-7 dokkolása, feltüntetve a kölcsönható aminosavakkal.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A biológiai barrierék anatómiai és funkcionális alapját az epitélsejtek és endotélsejtek alkotják. A sejtek közötti szoros kapcsoló struktúrák és a sejtek metabolikus aktivitása korlátozza a gyógyszerek barrieréken keresztüli átjutását. A gátrendszerek ezen fontos tulajdonságai megvédik a szervezetünket, de ugyanakkor megnehezítik egyes betegségek hatékony kezelését. A sejtek közötti penetráció meghatározó jelentőségű a gyógyszerbejuttatásban, a permeabilitás fokozása, különösen a nagy molekulaméretű biofarmakonok esetében ezért nagy jelentőségű a gyógyszerkutatásban. A vér-agy gáton keresztüli biofarmakonok bejuttatását leginkább a fokozott enzimaktivitás nehezíti. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az opiorfin bioaktív peptid képes átjutni a vér-agy gát jól jellemzett tenyészetes modelljén. Adataink alapján az opirfon peptid egy lehetséges hatóanyag lehet a központi idegrendszeri fájdalomcsillapításban vagy a depresszió kezelésében.

A vízóldékony molekulák korlátozott bejuttatása fokozható, ha befolyásoljuk a sejtek közötti kapcsolóstruktúrákat, nyitva a paracelluláris utat. A kapcsolófehérjékre ható módosító peptidek alkalmazása ezért egy ígéretes megoldás lehet. Kísérleteinkben megvizsgáltunk hat különböző sejtkapcsoló struktúrára ható peptidet (ADT-6, HAV-6, C-CPE, AT-1002, 7-mer/PN-78, PN159), és hatékonyságukat összehasonlítottuk bélepitél és vér-agy gát tenyészetes modell rendszeren. Az összes peptid nyitotta a sejtek közötti utat, ez a hatás azonban csak átmeneti volt, és a sejtrétegek képesek voltak a regenerációra. A vizsgált peptidek szelektíven hatottak a különböző barrieréken és eltérő hatékonyságot mutattak. A C-CPE, ADT-6 és HAV-6 peptid célpontjai epitélsejteken expresszálódnak így specifikusan fokozták a bélepitél sejtréteg permeabilitását. Az AT-1002 és 7-mer peptid mindkét sejtípusra hatott, de jelentősebben fokozta a vér-agy gát permeabilitását. A peptidek szelektivitása nagy jelentőséggel bírhat a célzott gyógyszerterápiában. Mindkét modellen az ismeretlen célpontú PN159 volt a leghatékonyabb, így ezt a peptidet tovább vizsgáltuk a Caco-2 bélepitél sejtvonalon. A PN159 peptid reverzibilis hatású, gyors, biztonságos és már mikromoláris koncentrációban hatékony. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a klaudin-1, -4, -5 és -7 lehetséges célpontjai lehetnek a peptidnek, valamint feltártuk a peptid másodlagos szerkezetét és kimutattuk a hőstabilitását.

A bemutatott eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált peptidek szelektíven, és hatékonyan alkalmazhatóak lehetnek mint gyógyszerészeti segédanyagok biológiai gáton keresztüli gyógyszerbejuttatás fokozására.



## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Bocsik A.**, Darula Z., Tóth G., Deli M.A., Wollemann M.  
Transfer of opiorphin through a blood-brain barrier culture model  
*Archives of Medical Research* 46, 502-506 (2015)  
IF: 2.645 (2014)
- II. **Bocsik A.**, Walter R. F., Gyebrovski A., Fülöp L., Blasig I., Dabrowski S., Ötvös F., Rákhely G., Veszélka S., Deli M.A.  
Reversible opening of intercellular junctions of intestinal epithelial and brain endothelial cells with tight junction modulator peptides  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* 105, 754-765 (2016)  
IF: 2.59 (2014)
- III. **Bocsik A.**, Kiss L., Gróf I., Ötvös F., Zsíros O., Fülöp L., Vastag M., Kittel Á., Szabó-Révész P., Deli M.A.  
PN159 peptide increases drug penetration across Caco-2 intestinal barrier model by reversibly modulating tight junctions  
(*manuscript in preparation*)

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Kürti L., Veszélka S., **Bocsik A.**, Dung N.T.K., Ózsvári B., Puskás L.G., Kittel Á., Szabó-Révész P., Deli M.A.  
The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier  
*Toxicology in Vitro* 26, 445-454 (2012)  
IF: 2.546 (2012)
- II. Kürti L., Veszélka S., **Bocsik A.**, Ózsvári B., Puskás L.G., Kittel Á., Szabó-Révész P., Deli M.A.  
Retinoic acid and hydrocortisone strengthen the barrier function of human RPMI 2650 cells, a model for nasal epithelial permeability  
*Cytotechnology* 65, 395-406 (2013)  
IF: 1.449 (2013)
- III. Kürti L., Gáspár R., Márki A., **Bocsik A.**, Veszélka S., Bartos C., Ambrus R., Vastag M., Deli M.A., Szabó-Révész P.  
*In vitro* and *in vivo* characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration  
*European Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, 86-92 (2013)  
IF: 2.61 (2013)
- IV. Kiss L., Walter F. R., **Bocsik A.**, Ózsvári B., Puskás L. G., Szabó-Révész P., Deli M. A.  
Kinetic analysis of the toxicity of Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* 102, 1173-1181 (2013)  
IF: 3.13 (2013)

- V. Tóth A.E., Walter F.R., **Bocsik A.**, Sántha P., Veszeka S., Nagy L., Puskás L.G., Couraud P.O., Takata F., Dohgu S., Kataoka Y., Deli M.A.  
Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells  
*PLOS ONE* 9, e100152 (2014)  
IF: 3.73 (2014)
- VI. Schilling-Tóth B., Sándor N., Walter F.R., **Bocsik A.**, Sáfrány G., Hegyesi H.  
Role of GDF15 in radiosensitivity of breast cancer cells  
*VERSITA* 9, 982-992 (2014)  
IF: 0.28 (2014)
- VII. Sándor N., Walter F.R., **Bocsik A.**, Sántha P., Schilling-Tóth B., Léner V., Varga Z., Kahán Z., Deli M.A., Sáfrány G., Hegyesi H.  
Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice  
*PLOS ONE* 9, e112397 (2014)  
IF: 3.73 (2014)
- VIII. Lénárt N., Walter F.R., **Bocsik A.**, Sántha P., Tóth M.E., Harazin A., Tóth A.E., Vizler C., Török Z., Pilbat A.M., Vigh L., Puskás L.G., Sántha M., Deli M.A.  
Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment  
*Fluids Barriers CNS* 12, 17, doi: 10.1186/s12987-015-0013-y (2014)  
IF:-
- IX. Manczinger M., **Bocsik A.**, Kocsis G.F., Vörös A., Hegedűs Z., Ördögh L., Kondorosi É., Marton A., Vizler C., Tubak V., Deli A.M., Kemény L., Nagy I., Lakatos L.  
The absence of N-Acetyl-D-glucosamine causes attenuation of virulence of *Candida albicans* upon interaction with vaginal epithelial cells *in vitro*  
*Biomed Research Internationale* 2015:398045. doi: 10.1155/2015/398045 (2015)  
IF: 1.579 (2014)
- X. Róka E., Ujhelyi Z., Deli A.M., **Bocsik A.**, Fenyvesi É., Sente L., Fenyvesi F., Vecsernyés M., Váradi J., Fehér P., Gesztelyi R., Félix C., Perret F., Bácskay I.K.  
Evaluation of the cytotoxicity of  $\alpha$ -Cyclodextrin derivatives on the Caco-2 cell line and human erythrocytes  
*Molecules* 20, 20269-20285, doi:10.3390/molecules201119694, (2015)  
IF: 2.791 (2014)

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

### Szóbeli előadás

**Bocsik A**, Walter F, Veszelka S, Nagy IL, Vastag M, Fülöp L, Szabó-Révész P, Deli MA. Sejtek közötti szoros kapcsolatok nyitása peptidekkel endotél- és epitelsejteken. A Magyar Mikroszkópos Társaság Éves Konferenciája (Hungarian Society of Microscopy Meeting), Siófok, 2013. május 23-25.

### Poszter prezentációk

**Bocsik A**, Walter FR, Veszelka S, Blasig EI, Nagy L, Vastag M, Fülöp L, Pirocska Szabó-Révész P, Deli MA. Opening the intercellular junctions of brain endothelial with peptides. 17th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain and Blood-Retina Barriers, Dublin, Írország, 2014. szeptember 11-13.

**Bocsik A**, Walter FR, Veszelka S, Vastag M, Fülöp L, Szabó-Révész P, Deli MA. Microbial toxin fragments to open barriers for drug delivery. Gut-Brain-Axis - 2nd European Conference of Microbiology and Immunology, Berlin 2014 Juny 6-7.

**Bocsik A**, Ludányi D, Walter FR, Veszelka S, Blasig I, Nagy L, Vastag M, Fulop L, Szabo-Revesz P, Deli MA. PN-159 peptide reversibility opens the intercellular junctions of intestinal epithelial cells. MTA SZBK Straub-Napok, Szeged, 2014. május 28-29.

**Bocsik A**, Ludányi D, Walter FR, Veszelka S, Blasig I, Nagy L, Vastag M, Fulop L, Szabo-Revesz P, Deli MA. PN-159 peptide reversibility opens the intercellular junctions of intestinal epithelial cells. I. Innováció a Természettudományban – Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2014. május 2-3.

**Bocsik A**, Walter FR, Veszelka S, Vastag M, Fülöp L, Szabóné Révész P, Deli MA. Sejtkapcsolatokat módosító peptidek összehasonlító vizsgálata tenyészetes barrier modelleken. Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, 2014. április 10-12.

**Bocsik A**, Walter FR, Veszelka S, Vastag M, Fülöp L, Szabó-Révész P, Deli MA. Peptides acting on intercellular junctions reversibility open biological barriers. 16<sup>th</sup> International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers. Sümeg, 2013. szeptember 12-14.

**Bocsik A**, Walter FR, Veszelka S, Nagy IL, Vastag M, Fülöp L, Szabó-Révész P, Deli MA. Opening intercellular junctions of brain endothelial and intestinal epithelial cells with peptides. MTA SZBK Straub-Napok, Szeged, 2013. május 29-30.

### **Kutatási támogatás**

A kutatás a Gedeon Richter Nyrt. (RG-IPI-2009-TP3/006) és az “Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj” finanszírozásával valósult meg (TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001).