

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar, Természettudományi és Informatikai Kar
Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

**Nimodipin célzott bejuttatása szöveti acidózisra nyíló
nanopartikulumokkal agyi iszkémiában**

PhD Tézis

Dr. M Tóth Orsolya

Témavezetők:

Dr. Farkas Eszter és Prof. Dr. Bari Ferenc

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged, 2021

1. Bevezetés

Az iszkémiás stroke világszerte a harmadik leggyakoribb halálok, valamint a rokkantság vezető oka. Ennek ellenére jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan terápiás lehetőség, ami a betegek minden csoportjában hatékony lenne. Az iszkémiás stroke-on átesettek alig 3-5 %-a kerül az iszkémiás inzultust követően időablakon belül (3-4,5 óra) megfelelő betegellátó intézménybe, és ezen kis betegpopuláció kevesebb, mint egyharmadánál hatásosak a jelenleg „arany standardnak” számító trombolitikus vagy trombektómias terápiák. Ezen tények számos kutatót ösztönöztek arra, hogy olyan újszerű terápiás lehetőségeket fejlesszenek ki, amelyek segítségével a hatóanyagok a sérült területre célzottan juttathatók be, javítva ezzel a kezelés hatékonyságát, valamint mellékhatásprofilját.

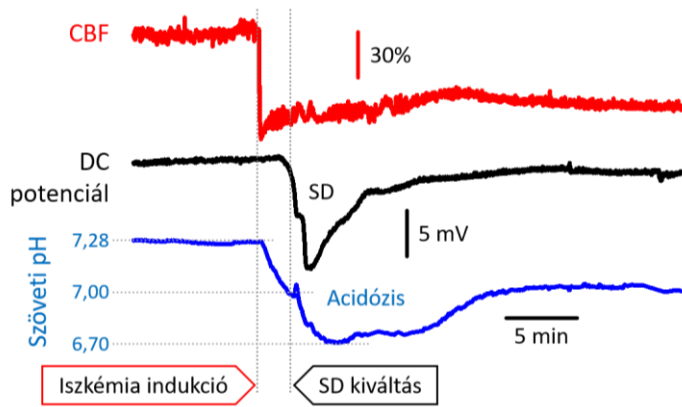
1.1. Az agyi iszkémiával járó sejtkárosodás patomechanizmusa és a terjedő depolarizáció

Az agy egészének keringészavara globális, míg az egyes agyterületek vérellátási zavara, atherosclerosis vagy embolizáció következtében, fokális agyi iszkémiához vezet. Az agyi iszkémiával járó O_2 - és tápanyag-hiányra a neuronok különösen érzékenyek, hiszen anyagcseréjük rendkívül aktív. Amennyiben a lokális agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) a normál 50 ml/100 g/min értékről 10 ml/100 g/min alá esik („infarktus küszöb”), a neuronok ionpumpafunkciói károsodnak és a sejtek energiatermelése anaerob útra terelődik. Ha ez az állapot 4 perccel tovább áll fenn, a neuronok elpusztulnak. Az iszkémiás területet, a károsodás mértékétől függően feloszthatjuk mag és penumbra régiókra. Az iszkémiás magban a szöveti perfúzió markánsan, az eredeti áramlás 20 %-a alá csökken (<15 ml/100 g/min), ami a sejtek végleges károsodásához vezet. A magot övező penumbrában a sejtkárosodás trombolízis esetén még visszafordítható, ebben a régióban az agyi vérátáramlás mérsékelte, 20-40 % (15-25 ml/100 g/min) közötti csökkenése figyelhető meg. Míg a mag régió sejtjei véglegesen károsodtak, a penumbra elektrofiziológiailag inaktív, de életképes sejteket tartalmaz. Mivel a penumbra sejtjei még megmenthetők, ez a terület került a neuroprotektív terápiás törekvések célpontjába.

Az agyi iszkémia során, a tápanyag- és O_2 -hiány következtében, a sejtek energia-termelése anaerob glikolízis útjára áll át, ami laktát-termeléssel jár. A szöveti laktát-koncentráció emelkedésével a szöveti pH egyre alacsonyabb értékek irányába tolódik. A laktát felhalmozódás mellett a szöveti pCO_2 is többszörösére emelkedik az anaerob glikolízis következtében. A felhalmozódó savi metabolitok hozzájárulnak az iszkémiás terület károsodásához, rontva a sejtek túlélési esélyét. Fokális iszkémia kísérletes modelljében, az

artéria cerebri media elzárásakor (middle cerebral artery occlusion, MCAO), a mag régióban a pH markánsan, 6,0-6,2 pH értékre esik, míg a penumbrára jellemző szöveti acidózis mérsékeltebb, 6,5-6,9 pH érték körüli.

Fontos kiemelni, hogy a penumbra egy dinamikusan változó régió, időben és térben egyaránt. Órákkal, vagy akár napokkal az iszkémiás inzultust követően a mag-penumbra régió határáról spontán terjedő depolarizációk indulnak ki (spreading depolarization, SD). Az SD-k az iszkémiás inzultust követően ismétlődő mintázatban még napokig kialakulhatnak, és hozzájárulnak az iszkémiás infarktus „éréséhez”, a penumbra elvesztéséhez. Az SD a neuronok és gliasejtek egy kritikus térfogatának (~1 mm³) hullámszerűen tovaterjedő, közel teljes depolarizációja, melyet az agyi elektromos aktivitás átmeneti depressziója követ. Az SD 2-6 mm/min-es terjedési sebességgel halad végig a szürkeállományon, a kiváltás fókuszából radiálisan, minden irányba. Az SD jellegzetes elektrofiziológiai jellemzője a tranziens, negatív DC-potenciál (direct current) kitérés, ami az agykérgi spontán elektromos aktivitás átmeneti depressziójával jár. Csökkent vérellátású agyszövetben, az elégtelen energia-ellátás mellett a megemelkedett extracelluláris K⁺, illetve glutamát-koncentráció tehető felelőssé a kialakulásáért. Az SD során felszabaduló vazoaktív metabolitok és ionok (K⁺, laktát, ATP/ADP, adenozin, prosztaglandinok), valamint a fokozott energia-igény a szövet metabolikus státuszára jellemző hemodinamikai választ vált ki. Kísérleti körülmények között, intakt, ép vérellátású agyszövetben az SD-vel járó vérátáramlási válasz 3 komponensű: a kezdeti negatív DC-potenciál kitéréssel párhuzamosan rövid tranziens hipoperfúzió, majd tranziens csúcs- és késői hiperémiás szakaszok következnek be, melyeket hosszantartó oligémia követ. Ezzel szemben, sérült agyszövetben (pl. iszkémiás vagy vérzéses stroke, zárt koponyasérülés), a vazokonstriktív tényezők túlsúlya miatt a lokális vérellátási válasz is károsodik, a hipoperfúziós komponensek kerülnek előtérbe. Az iszkémiás szövet metabolikus krízisét tovább mélyíti az SD-vel járó szöveti pH-változás. Ez az extracelluláris pH-változás jellegzetesen 2 komponensű: a kezdeti kisfokú alkalózist elnyújtott, tranziens acidózis követi, ami 0,3-0,5 pH egységgel csökkenti a szöveti pH-t. A neuron-károsító savas komponens hossza korrelál a szövet metabolikus állapotával; az iszkémiás penumbra régióban néhány percig tart, míg a súlyosan károsodott mag régióban ennél lényegesen tovább elhúzódik (**1. ábra**).



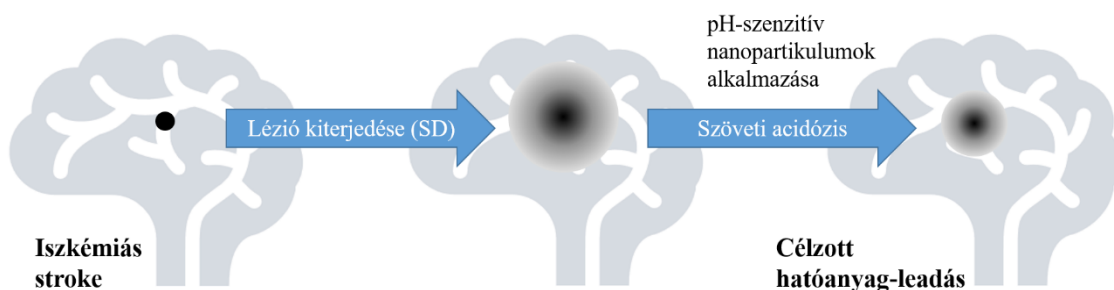
1. ábra. Reprezentatív felvétel az iszkémia indukcióval (kétoldali a. carotis communis okklúzió; piros nyíl), valamint terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD; fekete nyíl) járó agyi véráramlás- (cerebral blood flow, CBF; piros görbe), DC potenciál- (fekete görbe), valamint szöveti pH- (kék görbe) változásokról. A CBF-et lézer Doppler áramlásmérővel, a DC

potenciál-változást üvegkapilláris mikroelektrodával, a szöveti pH-t pH-szenzitív mikroelektrodával regisztráltuk az agykéregben.

1.2. A Ca^{2+} csatorna blokkolók alkalmazásának lehetőségei az iszkémiás stroke terápiájában

Az elmúlt évtizedek számos állatkísérletes kutatása vetette fel, hogy a feszültség-függő Ca^{2+} -csatorna (voltage-gated Ca^{2+} -channel, VGCC) blokkolók alkalmazása hatékony lehet az iszkémiás stroke terápiájában, ugyanakkor a kapott eredmények klinikai translációja korlátozott. Az L-típusú VGCC blokkoló, dihidropiridin-származék nimodipint hatékonyan alkalmazzák a subarachnoideális vérzés terápiájában. Lipofil tulajdonságának köszönhetően átjut a vér-agy gáton (blood-brain barrier, BBB), emellett az agyi erekben és neuronokon található L-típusú VGCC-kra relatív szelektivitást mutat. A nimodipin a Ca^{2+} -beáramlás blokkolásával az erek simaizomsejtjein értágító, a neuronokon hatva neuroprotektív hatású. *In vitro* agyszelet kísérletekben, oxigén-glükóz deprivációval kiváltott iszkémiás állapotban, a nimodipin csökkentette a neuronokban az iszkémiával járó intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedést, valamint a membrán depolarizáció hosszát. Iszkémiás körülmények között kismértékben gátolta az SD-k kialakulását, emellett fokozta az SD-vel járó hiperémiás válasz mértékét. Ezen ismeretek vetették fel az L-típusú VGCC-k védő szerepét az iszkémiás sejtkárosodás korai fázisában, és helyezték a nimodipint az iszkémiás stroke kutatások érdeklődési körébe. A nimodipin értágító hatása révén csökkenti a szisztémás vérnyomást, bár kisebb mértékben, mint más, nem szelektív VGCC blokkolók. Agyi iszkémiás állapotban az autoreguláció is sérül, így az artériás középnyomás (mean arterial blood pressure, MABP) változásait az agyi perfúzió passzívan követi. Az iszkémiás stroke-on átesett betegeknél különös figyelmet kell fordítani a MABP folyamatos monitorozására, valamint normo- és hipotenziós betegek esetén kerülendő a nimodipin szisztémás adagolása.

Mivel az iszkémiás penumbra sejtjei még életképesek, az iszkémiás stroke terápiás lehetőségei ezen sejtek megmentését célozzák. A trombektómiás, trombolitikus terápiák célja a sérült terület keringésének helyreállítása. A betegek többségénél azonban a rekanalizáció az időablak túllépése miatt nem valósítható meg, és a fennálló elégtelen perfúzió miatt a hatóanyagok eljuttatása is korlátozott a penumbra régió sérült sejtjeihez. A nanomedicina lehetőséget teremt a hatóanyagok szabályozott, célzott és szükség esetén elnyújtott bejuttatására biokompatibilis, biológiailag lebomló hordozók segítségével. A nanomedicina alkalmazásának lehetősége az iszkémiás stroke terápiájában is felmerült. A nanopartikulumok 1-1000 nm mérettartományba tartozó hordozó részecskék, melyek segítségével a hatóanyagok szelektíven egy adott célszövetbe juttathatók, megnyújtható expozíciós idejük, átjutásuk biológiai membránokon és a BBB-n fokozható. A nanopartikulumokból a hatóanyag-felszabadulás szabályozható. A hatóanyagleadás kezdeményezhető szervezetben belülről (pl. pH-változás, redoxi reakciók, specifikus biomolekulák vagy enzimek jelenléte), vagy kívülről (pl. hőmérséklet, elektromágneses sugárzás, ultrahang) biokémiai vagy biofizikai változásokkal, amelyek a sérült területre jellemzőek vagy a sérült területre fókuszálnak. A tumor terápiához hasonlóan, ahol már korábban kihasználták a tumoros szövet környezetének alacsonyabb pH-ját a gyógyszerek célzott bejuttatásához, lehetőségünk nyílt az iszkémiás stroke terápiája során is pH-szenzitív nanopartikulumok alkalmazására (2. ábra).



2. ábra. A pH-szenzitív nanopartikulumok alkalmazásával lehetőség nyílt neuroprotektív hatóanyagok penumbra régióra célzott bejuttatására az iszkémiás stroke terápiájában. Az agyi iszkémiához, és a terjedő depolarizációhoz (spreading depolarization, SD) társuló szöveti acidózis a célzott hatóanyag-leadás megfelelő kezdeményező stimulusa lehet.

A fentiek alapján **hipotéziseink** a következők voltak:

- Nanopartikulumokkal az iszkémiás agyszövetre célzott hatóanyagleadás érhető el.
 - Az agyi iszkémiával, illetve SD-kkel járó szöveti acidózis nanopartikulumokkal szállított hatóanyagok felszabadulását kezdeményezheti. .

- A nimodipin adagolása alkalmas lehet az újszerű, pH-szenzitív nanohordozó rendszer tesztelésére, *in vivo* globális előagyi iszkémia állatkísérletes modelljében.
 - A nimodipin várhatóan helyreállítja a szöveti iszkémia következtében sérült neurovaszkuláris csatolást.
 - A nanopartikulumokhoz kötött nimodipin előreláthatóan megőrzi ismert értágító és neuroprotektív hatását az iszkémiás agyszövetben.

Hipotéziseink bizonyításához az alábbi **célokat** tűztük ki:

- Olyan nanopartikulum-alapú gyógyszerbejuttatási módszer kidolgozását tűztük ki célul, amely csak az agyi iszkémiás sérülés helyén hat. A gyógyszerleadás indukálására az iszkémiával összefüggő szöveti acidózist jelöltük meg. A bejuttatandó hatóanyagként a nimodipint választottuk.
- A nimodipin hatását először önmagában adva, majd pH-szenzitív nanopartikulumokkal bejuttatva vizsgáltuk. A védő hatást a neurovaszkuláris csatolás, valamint az SD-k változóinak értékelésével jellemeztük.

2. Anyagok és módszerek

A nimodipin hatását oldatban adva (*1. Kísérletsorozat*), vagy pH-szenzitív nanopartikulumokhoz asszociálva, szuszpenzió formájában adagolva (*2. Kísérletsorozat*) vizsgáltuk. Kísérleteinket fiatal, altatott, hím Sprague Dawley patkányokon végeztük. Az állatokat spontán légzésük megtartása mellett, N₂O:O₂ (3:2) gázelegyhez kevert 1,5-2 % izofluránnal altattuk. Az *1. Kísérletsorozat*-ban az adatgyűjtés ideje alatt az altatást α -kloralózra vezettük át. A *2. Kísérletsorozat*-ban a teljes kísérlet alatt izofluránnal altattuk az állatokat. A bal oldali a. femoralis-ba kanült helyeztünk a MABP folyamatos regisztrálása, valamint vérgáz analízishez történő mintavétel céljából. Mindkét oldali a. carotis communisokat kiproparáltuk, és okklúderrel aláhurkoltuk a későbbi akut, globális előagyi iszkémia előidézéséhez. A parietális csonton két koponyaablakot alakítunk ki a dura mater megbontásával. A rosztrális koponyaablakból mindkét kísérletsorozatban helyi mezőpotenciál-változást (local field potential, LFP), és CBF-változásokat regisztráltunk. A *2. Kísérletsorozat*-ban extracelluláris pH-változást is mértünk. A nimodipint topikálisan, az agyfelszínre adagoltuk. A kaudális ablakból 1 M-os KCl-dal átitatott vatta segítségével SD-ket váltottunk ki. A koponyaablakokat mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal (artificial cerebrospinal fluid (aCSF) nedvesítettük, melyet folyamatosan frissítettünk.

Az *1. Kísérletsorozat*-ban topikálisan juttattuk az agyfelszínre a nimodipin-tartalmú oldatot (100 μ M), vagy annak oldószerét (aCSF), majd mindkét oldali a. carotis communis-ok

elzárásával globális előagyi iszkémiát váltottunk ki. Az iszkémiás inzultus kontroljaként álműtött állatokat vizsgáltunk. Az iszkémia indukciót követően a bajuszpárnák mechanikai ingerlésével funkcionális hiperémiát váltottunk ki az ellenoldali szomatoszenzoros kéregben. Ezt követően 3 SD-t váltottunk ki 1 M KCl topikális alkalmazásával. A szomatoszenzoros kéregből LFP és CBF jeleket regisztráltunk. A kezelésekből adódóan 4 kísérleti csoportot hoztunk létre (intakt oldószerrel kezelt, n=9; intakt nimodipinnel kezelt, n=6; 2VO oldószerrel kezelt, n=8; 2VO nimodipinnel kezelt, n=6).

A 2. *Kísérletsorozat*-ban az agyfelszínre nimodipint hordozó (100 μ M; n=10), pH-szenzitív nanopartikulum szuszpenziót juttattunk. Kontrollként a nanopartikulum szuszpenziót önmagában, hatóanyagtól mentesen adagoltuk (n=8). Ezután globális előagyi iszkémiát indukáltunk mind a két oldalon az a. carotis communis elzárásával, majd 3 SD-t váltottunk ki 1 M KCl oldattal. A vizsgált agyi régióból LFP, CBF és extracelluláris szöveti pH jeleket vezettünk el. A kísérletek végén az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, majd koronális agyi metszeteken immunhisztológiai módszerekkel vizsgáltuk a mikroglia aktivációt (Iba-1) és a neuronpusztulást (NeuN).

3. Eredmények

3.1. A lokális agyi alapáramlás és a szöveti pH változásai, valamint a nimodipin-felszabadulás igazolása pH-szenzitív nanopartikulumokból

Az élettani paraméterekben (artériás vér pH, vér parciális O₂ és CO₂ nyomás, MABP) nem találtunk statisztikailag kimutatható különbséget a csoportok között, egyik kísérletsorozatban sem.

A kezelés hatását a lokális agyi alapáramlásra a kísérleti protokoll meghatározott pontjain vizsgáltuk. Az 1. *Kísérletsorozat*-ban az iszkémia indukció hatására az alapáramlás markáns csökkenését figyelhettük meg (53 \pm 23 %), ami az oldószerrel kezelt csoportban 74 \pm 11 %-on stabilizálódott az első SD-t megelőzően, és 67 \pm 15 %-on az ismétlődő SD-k (recurrent SD, rSD) előtt. Az rSD-k CBF-válaszai az első SD-vel járó CBF-változás utolsó komponensére, egy hosszan elnyúló oligémiás fázisra épültek rá. A nimodipin-kezelés hatására szignifikánsan emelkedett az agyi alapáramlás már az iszkémia indukciót megelőző idő szakaszban (131 \pm 43 vs. 104 \pm 12 %, nimodipin vs. oldószer). Továbbá, mérséklődött az iszkémia-indukcióval járó CBF-esés (CBF-esés az alaphoz képest: 22 \pm 11 vs. -26 \pm 11 pp., nimodipin vs. oldószer) és az SD-vel járó oligémiás komponens mértéke (CBF-esés az alaphoz képest: 11 \pm 24 vs. -30 \pm 12 pp., nimodipin vs. oldószer az intakt csoportban).

A 2. *Kísérletsorozat*-ban az agyi alapáramlás változása megbízható jele volt a nimodipin-felszabadulás igazolásának. Az 1. *Kísérletsorozat*-tal összevetve az agyi alapáramlás értéke a nimodipint hordozó nanopartikulum szuszpenzió adagolását követően is a kiindulási szinten maradt az iszkémia indukcióig ($99,2 \pm 2,6$ vs. $99,9 \pm 3,0$ %, a nimodipin-tartalmú nanopartikulum szuszpenzió bejuttatása előtt, illetve 30 perccel utána), amíg a szöveti pH is fiziológiás tartományon belül maradt (pH $7,29 \pm 0,22$ vs. $7,28 \pm 0,18$, a nimodipin-tartalmú nanopartikulum szuszpenzió bejuttatása előtt, illetve 30 perccel utána). Az iszkémia-indukció markáns csökkenést eredményezett a CBF-ben ($29,4 \pm 10,2$ %), illetve a szöveti pH is savas irányba tolódott el (pH $7,06 \pm 0,30$). Innentől kezdve az agyi alapáramlás szignifikánsan magasabb értékeket vett fel a nimodipinnel kezelt csoportban ($47,8 \pm 23,7$ vs. $29,3 \pm 6,96$ %, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában; rSD-ket megelőző időpontban). Emellett az SD-kkel járó szöveti acidózis, az iszkémia okozta acidózishoz hozzáadódva, további pH csökkenést eredményezett (pH $6,71 \pm 0,29$, az első SD pH minimumán).

3.2. A nimodipin hatása a neurovaszkuláris csatolásra

Az 1. *Kísérletsorozat*-ban a nimodipin hatását vizsgáltuk a neurovaszkuláris csatolásra is, intakt és iszkémiás inzulturnak kitett patkányagyban. Ehhez a bajuszpárnák mechanikai ingerlésével járó, a szomatoszenzoros kéregben megjelenő kiváltott potenciálokat (evoked field potential, EFP), és az ezekhez társuló CBF-válaszokat elemeztük. Az EFP-k amplitúdója szignifikánsan csökkent iszkémiás körülmények között ($107,7 \pm 19,5$ vs. $418,9 \pm 53,5$ μ V, 2VO vs. intakt). A nimodipin szignifikánsan csökkentette az EFP-k amplitúdóját intakt agyban ($128,0 \pm 58,6$ vs. $418,9 \pm 53,5$ μ V, nimodipin vs. oldószer). A szomatoszenzoros ingerlésre adott hiperémiás válasz szignifikánsan kisebbnek bizonyult iszkémiás körülmények között ($6,2 \pm 2,9$ vs. $12,9 \pm 5,4$ %, 2VO vs. intakt). Ugyanakkor a nimodipin-kezelés hatására, iszkémiás körülmények között, a hiperémiás válasz mértéke meghaladta az intakt oldószerrel kezelt állatok CBF-válaszának értékeit ($15,4 \pm 6,7$ vs. $6,2 \pm 2,9$ % vs. $12,9 \pm 5,4$ %, 2VO nimodipin vs. 2VO oldószer vs. intakt oldószer).

3.3. A nimodipin hatása a terjedő depolarizációkra

Intakt (1. *Kísérletsorozat*) és iszkémiás (1., 2. *Kísérletsorozat*) körülmények között vizsgáltuk a nimodipin-kezelés hatását az SD-kkel járó elektrofiziológiai- (DC-potenciál, szöveti pH) és CBF-változásokra. A részletes analízis az rSD-kre irányult.

3.3.1. A terjedő depolarizációkat jelző DC-potenciál változások

Az *1. Kísérletsorozat*-ban, a nimodipin-kezelés hatására intakt körülmények között jelentősen csökkent az SD-k amplitúdója ($-13,2 \pm 2,5$ vs. $-15,1 \pm 2,1$ mV, nimodipin vs. oldószer). Iszkémiás körülmények között az SD-k időtartama az intakt szintre rövidült a nimodipinnel kezelt állatokban ($31,1 \pm 7,4$ vs. $61,4 \pm 41,9$ vs. $31,5 \pm 9,5$ s, 2VO nimodipin vs. 2VO oldószer vs. intakt oldószer).

Az *1. Kísérletsorozat*-hoz hasonlóan, a *2. Kísérletsorozat*-ban a nanopartikulumokból felszabaduló nimodipin hatására is nagymértékben csökkent az SD-k félamplitúdónál mért hossza ($48,07 \pm 23,29$ vs. $76,25 \pm 17,2$ s, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában). Emellett fokozódott a repolarizáció sebessége ($0,8 \pm 0,523$ vs. $0,279 \pm 0,153$ mV/s, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában).

3.3.2. A terjedő depolarizációkhoz társuló lokális agyi véráramlás változás

A kísérletben használt állatfajok, valamint anesztetikumok mellett a szövet aktuális metabolikus állapota is befolyásolja az SD-vel járó CBF-válasz kinetikáját. A két kísérletsorozatban az adatgyűjtéshez eltérő anesztetikumot alkalmaztunk (α -kloralózt az *1.* és izofluránt a *2. Kísérletsorozat*-ban), így különböző kinetikájú CBF-válaszokat regisztráltunk az *1.* és a *2. Kísérletsorozat*-ban. Mivel nem minden esetben jelentkezett a kezdeti hipoperfúziós komponens, analízisünkben elsősorban a hiperémiás válaszra fókuszáltunk.

Az *1. Kísérletsorozat*-ban az SD-hez társuló CBF-válasz 4 komponensét különböztettük meg; a tranziens hipoperfúziót csúcs hiperémia, majd késői hiperémiás válasz követett, ami után hosszan tartó oligémiás fázis jelentkezett. A késői hiperémia jelenlétének függvényében 2 csoportra osztottuk a mért CBF-válaszokat; 1-es típusú válasz esetén csak csúcs hiperémiás válasz jelentkezett, míg 2-es típus esetén a csúcs hiperémia mellett késői hiperémiát is megfigyeltünk. Intakt, oldószerrel kezelt csoportban a 2 típus előfordulási gyakorisága közel 50-50 %-os volt. Ugyanakkor mind az iszkémiás állapot, mind a nimodipin-kezelés hatására növekedett a 2-es típusú válasz előfordulási gyakorisága. Iszkémiás körülmények között, nimodipinnel kezelt állatokban szignifikánsan növekedett a csúcs hiperémia amplitúdója (185 ± 62 vs. 131 ± 66 %, nimodipin vs. oldószer), de a hiperémiás válaszok hosszát nem befolyásolta sem az iszkémia, sem a nimodipin-kezelés.

A *2. Kísérletsorozat*-ban 3 komponensű CBF-válaszokat regisztráltunk; a kezdeti tranziens hipoperfúziót csúcs hiperémia, majd hosszan tartó oligémiás szakasz követett. A nanopartikulumokból felszabaduló nimodipin hatására szignifikánsan fokozódott a hiperémiás válasz amplitúdója ($48,15 \pm 42,04$ vs. $17,29 \pm 11,03$ %, nimodipin vs. nanopartikulum

önmagában), valamint a változás görbe alatti területe ($4604,43 \pm 2572,3$ vs. $2368,05 \pm 1324,71$ %*s, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában).

3.3.3. A terjedő depolarizációval járó szöveti pH-változás

A 2. *Kísérletsorozat*-ban vizsgáltuk az iszkémiával és az SD-kkel járó extracelluláris szöveti pH-változást. Az iszkémia indukció savasodással járt, a szöveti pH a fiziológias 7,3-7,4 értékről $7,06 \pm 0,30$ értékre csökkent. Az SD-khez társuló szöveti pH-válasz rövid alkalózissal kezdődött, amit hosszan tartó tranziens acidózis követett. Az első SD-t követően a szöveti pH nem állt helyre, enyhén savas értéken állapodott meg (pH $7,14 \pm 0,29$ vs. $7,23 \pm 0,28$, rSD előtt vs. első SD előtt). A kezdeti alkalózisra nem hatott a nimodipin-kezelés, ugyanakkor befolyásolta a tranziens acidózis kinetikáját. A nanopartikulumokból felszabaduló nimodipin fokozta az acidózisból való visszatérés sebességét ($0,01 \pm 0,006$ vs. $0,005 \pm 0,002$ pH egység/s, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában), valamint csökkentette a tranziens acidózis hosszát ($65,46 \pm 20,2$ vs. $138,3 \pm 66,07$ s, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában). Következésképpen a tranziens acidózis görbe alatti területe is csökkent a nimodipinnel kezelt csoportban ($25,75 \pm 10,69$ vs. $49,46 \pm 23,38$ pH egység*s, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában).

3.4. Immunhisztokémia

Annak tisztázására, hogy a kitozán nanopartikulumok okoznak-e neuroimmun reakciót (ami a nanopartikulum alapú kezelés egy lehetséges káros mellékhatása), a 2. *Kísérletsorozat* végén agyszeleteken vizsgáltuk a mikroglia aktivációt. Az aktiválódott mikroglia kevésbé nyúlványozottak, gömbölyded, amőboid alakot vesznek fel, jelölésükhöz Iba1 markert használtunk. A mikroglia aktiváció számszerű kifejezéséhez ramifikációs indexet számoltunk, ami arányban van a sejtek nyúlványozottságával. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk a két agyfélteke szomatoszenzoros kérgi régiójában számolt ramifikációs indexben. A nyúlványozottság az ipszilaterális oldalon csökkent, ami kifejezettebb mikroglia aktivációt jelez (398 ± 203 vs. 1118 ± 300 , ipszi- vs. kontralaterális oldal, oldószerrel kezelt csoport). A trepanáció hatásának kizárása érdekében globális előagyi iszkémia modellünkben kétoldali kraniotómiát alakítottunk ki. Mivel a különbség a két agyféltekében mért ramifikációs indexekben továbbra is megfigyelhető volt (201 ± 102 vs. 483 ± 244 , ipszi- vs. kontralaterális oldal), feltételezzük, hogy az eltérésért az ipszilaterális oldalon kiváltott SD-k tehetők felelőssé. A nanopartikulum szuszpenzió sem önmagában, sem nimodipinnel asszociálva nem befolyásolta a mikroglia aktivációt az aCSF-fel kezelt kontrol állatokhoz viszonyítva (443 ± 208 vs. 398 ± 203 vs. 284 ± 107 , nimodipin vs. nanopartikulum önmagában vs. kontrol). Így arra a

következtetésre jutottunk, hogy a kitozán nanopartikulum szuszpenzió topikális alkalmazása nem okoz kimutatható mikroglia aktivációt a vizsgált időablakban.

Az idegsejtek túlélését NeuN jelöléssel jellemeztük, számszerűsítve ezzel az iszkémia- és az SD-okozta korai neurodegeneráció mértékét, valamint a nimodipin lehetséges neuroprotektív hatását a szomatoszenzoros kéregben és a hippocampusban. Habár bizonyos állatokban csökkenést figyeltünk meg az ipszilaterális agykéregben a NeuN-jelölt sejtek terület-arányában, nem találtunk szignifikáns különbséget az oldalak között ($26,9 \pm 5,0$ vs. $29,1 \pm 4,7$ %, ipszi- vs. kontralaterális oldal, oldószerral kezelt csoport). A nimodipin-kezelésnek sem volt statisztikailag kimutatható hatása a neurontúlélésre az általunk vizsgált rövid időablakban ($29,0 \pm 4,8$ vs. $26,9 \pm 5,0$ %, nimodipin vs. nanopartikulum önmagában).

4. Diszkusszió

Kísérleteink célja volt egy újszerű, nanopartikulum alapú hatóanyag-leadó rendszer tesztelése az iszkémiás stroke kísérletes modelljében. A nanopartikulumokból a hatóanyag az iszkémiás szövetre jellemző, alacsony szöveti pH-n szabadul fel, így közvetlenül a sérült szövetben fejt ki hatását. Az általunk alkalmazott kísérletes stroke modell az iszkémiás penumbrára jellemző viszonyokat modellez, hiszen az iszkémiás inzultust követően a CBF az agyi alapáramlás 20-40 %-a, és a szöveti pH 6,9-7,1 körüli értéket vesz fel. Az iszkémiás inzultussal, illetve SD-kkel járó szöveti acidózist a hatóanyag-felszabadulás megfelelő kiváltójának tartottuk. Ismert értágító, SD-gátló és neuroprotektív hatását figyelembe véve bejuttatandó hatóanyagként a nimodipint választottuk. Feltételeztük, hogy a nanopartikulumokból felszabaduló nimodipin megőrzi előnyös tulajdonságait, és a pH-szenzitív nanopartikulumok segítségével célzottan a sérült szövetben fejt ki hatását.

4.1. Az agyi iszkémiához társuló szöveti acidózis megfelelő kiváltó tényezője lehet a célzott hatóanyag leadásnak

A 2. *Kísérletsorozat*-ban a pH-szenzitív nanopartikulumokhoz kötött nimodipin nem okozott CBF emelkedést az iszkémia indukciót megelőzően, amíg a szöveti pH fiziológiás tartományban maradt. Az iszkémia indukcióval markáns, tranziens szöveti acidózis jelentkezett, ezt követően az agyi alapáramlás szignifikánsan magasabb értékeket vett fel a nimodipinnel kezelt csoportban. Ezen eredményeinkkel bizonyítottuk, hogy az agyi iszkémiához társuló szöveti acidózis megfelelő kiváltója lehet a célzott hatóanyag leadásnak *in vivo* stroke modellünkben.

4.1.1. Neuroprotektív hatóanyagok célzott bejuttatása pH-szenzitív hatóanyag-leadó rendszerrel az iszkémiás stroke terápiájában

Az elmúlt években egyre több tanulmány vetette fel a nanotechnológia alkalmazásának lehetőségeit az iszkémiás stroke terápiájában, ugyanakkor a lehetséges jelölteknek számos kritériumnak kell megfelelniük. Mivel a BBB minden központi idegrendszeri célpontú szisztémás kezeléssel szemben akadályt állít, azon hatóanyag-leadó rendszerek alkalmasak az iszkémiás stroke kezelésben, melyek 100 nm-nél kisebb mérettartományba tartoznak. Emellett biológiailag lebomló, biokompatibilis, nem toxikus és a vérbe kerülve is stabil rendszerek alkalmazhatóak. Elvárás, hogy a kiválasztott nanopartikulum képes legyen penetrálni a BBB-n, hatóanyagot szállítani, valamint ne váltson ki neuroimmun reakciót. Ideális esetben a hatóanyagleadó-rendszer elnyújtja és kontrolálja a hatóanyag felszabadulását. Ezen kritériumoknak megfelelően, a biokompatibilis, biológiailag lebomló természetes, vagy szintetikus polimer nanohordozók ígéretes terápiás lehetőségeket kínálnak. Emellett azon „smart” nanopartikulumok segítségével, melyekből adott jelre szenzitíven szabadul fel a hatóanyag, a sérült szövetre célzottá tehető a terápia. Így a szöveti pH csökkenése a fiziológias 7,3-7,4 pH értékről pH 7,0 alá konformációs és oldékonysági változásokkal jár több nanohordozónál, így a poliszacharid kitozánál is. Ezen változások teszik lehetővé a hatóanyag szöveti pH-változásra célzott felszabadulását.

4.1.2. Nanopartikulumok által kiváltott neuroimmun válaszreakciók

A 2. *Kísérletsorozat*-ban vizsgáltuk, hogy a kitozán alapú nanopartikulumok váltanak-e ki neuroimmun reakciót az agyszövetben. A kitozán, a kitin származéka, biokompatibilis, biológiailag lebomló természetes poliszacharid. A mikroglia a központi idegrendszer aktív immun védekező rendszerét képezik, gyulladásszerű válaszreakciójuk jellegzetes morfológiai változással jár; nyúlványaik visszahúzódnak, amöboid alakot vesznek fel. Ezért a mikroglia immunhisztokémiai jelölésével jellemeztük, majd számszerűsítettük a sejtek aktiválódását kitozán nanopartikulumok jelenlétében. Kísérleteink során a kitozán nanopartikulumok alkalmazása nem eredményezett mikroglia aktivációt az aCSF-fel kezelt, kontrol állatokhoz viszonyítva, így elmondható, hogy ezen nanopartikulumok nem váltanak ki a vizsgált időablakban lokális immun választ az agykéregben.

4.2. A nimodipin hatása a lokális agyi vérátáramlás, neuronális aktivitás, valamint szöveti pH szabályozására

A nimodipin, mint dihidropiridin-származék, gátolja az L-típusú VGCC-kon keresztül történő Ca^{2+} -beáramlást az érfal simaizomsejtekbe (vascular smooth muscle cell, VSMC), így

vazodilatációt okoz. A neuronális VGCC-k blokkolásával mérsékli a neuronok Ca^{2+} -túlterhelését, így iszkémiás körülmények között neuroprotektívnek tekinthető. Az általunk alkalmazott globális előagyi iszkémia modellben először a nimodipin hatását szomatoszenzoros stimulációval kiváltott neuronális aktivációra, és a társuló funkcionális hiperémiára vizsgáltuk. Ezt követően az SD-n, és a kapcsolódó CBF- és pH-változásokon kifejtett hatást monitoroztuk intakt, és iszkémiás agyban.

4.2.1. A nimodipin hatékonyan javította a neurovaszkuláris csatolást, fokozva a társuló funkcionális hiperémiát

Az 1. Kísérletsorozat-ban vizsgáltuk a nimodipin hatását a lokális CBF-szabályozásra. Ehhez a bajuszpárnák mechanikai ingerlésével váltottunk ki, és regisztráltunk funkcionális hiperémiát altatott állatok szomatoszenzoros barrel kortexében. Ezen kérgi régió szomatotópiás elrendeződést mutat, így adott bajuszpárna mechanikai ingerlése meghatározott neuronok aktivációjával jár, amit CBF-emelkedés is követ.

Mivel az agy energia-tároló raktárai végesek, az idegszövet folyamatos energia-ellátást igényel, melyet a folyamatos vérellátás biztosít. Számos mechanizmus felel a tápanyagok és az O_2 folyamatos, a változó igényeket kielégítő transzportjáért az agyba, melyek közül kiemelendő a neurovaszkuláris csatolás. Ez egy szabályozott interakció az aktiválódott neuronok, asztrociták és az érfal kontraktilis elemei között. Az érhálózat különböző szintjein különböző sejttípusok felelősek a CBF lokális szabályozásáért. A penetráló artériák és parenchimális arteriolák szintjén neuronok, asztrociták és VSMC-k alkotják a neurovaszkuláris egységet, míg a kapillárisokban a periciták a kontraktilis elemek. Az asztrociták végtalpjai kapcsolatban vannak mind a kontraktilis sejtekkel, mind a neuronokkal. Kedvező elhelyezkedésüknek köszönhetően közvetlenül szállítják az információt az aktiválódott neuronoktól a kontraktilis sejtekhez, így kiemelkedő szerepük van a lokális agyi mikrocirkuláció szabályozásában.

A nimodipin hatására, amellet, hogy fokozódott az agyi alapáramlás, jelentősen növekedett a szomatoszenzoros stimulációval kiváltott funkcionális hiperémia mértéke, de nem befolyásolta az EFP-k amplitúdóját iszkémia alatt. Intakt agyban csökkent az EFP-k amplitúdója, ugyanakkor a CBF-válasz mértéke nem változott. Mindkét megfigyelésünk azt mutatja, hogy a nimodipin hatás nélkül jelentkezik a funkcionális hiperémia mértékében, hogy az EFP amplitúdóját befolyásolná. Így feltételezzük, hogy a nimodipin, függetlenül a neuronális aktiváció mértékétől, értágító hatású anyagok felszabadulásán keresztül fejt ki áramlás-növelő hatását. Mivel értágító hatású prosztaglandinok és epoxieikozanoidok termelődnek az asztrocitákban a neurovaszkuláris csatolás során, és az L-típusú VGCC-k jelen vannak

asztrocitákon is, feltételezzük, hogy a nimodipin neuronális közreműködés nélkül, az asztrocitákon keresztül fejt ki funkcionális hiperémiát fokozó hatását.

4.2.2. A nimodipin gátolja a terjedő depolarizációk kialakulását, és fokozza az SD-khez társuló hiperémiás válasz mértékét

A neuronális L-típusú VGCC, a nimodipin támadáspontja, fontos szerepet játszik a neuronok ingerelhetőségének szabályozásában. Kísérletein során azt tapasztaltuk, hogy a nimodipin gátolta az SD-k kialakulását (kisebb amplitúdó és fél-amplitúdónál mért hossz), ami összecseng a témában megjelent korábbi közlemények eredményeivel. Eredményeink alátámasztották azon korábbi kutatási eredményeket is, melyek kimutatták, hogy az rSD-k száma, az ismétlődő mintázatban jelentkező SD-k kummulatív hossza, valamint a szövet SD-ből való visszatérésének késése jól korrelál a sérülés progressziójának mértékével. A nimodipin, kísérleteinkben is tapasztalt SD-t csökkentő hatása alátámasztja a hatóanyag neuroprotektív potenciálját. Az SD-vel járó neuronális Ca^{2+} -terhelés részben ionotróp glutamát-receptorokon (pl. N-metil-D-aszpartát, NMDA receptor) keresztül valósul meg, így az SD-hez társuló Ca^{2+} -akkumuláció farmakológiai gátlása lehetséges célpontja az SD gátlásának. Kimutatták, hogy az NMDA receptorok gátlása kis dózisu ketaminnal mérsékelte az SD-vel járó Ca^{2+} -terhelést, valamint javította a szövet SD-ből való visszatérését. Így elmondható, hogy a neuronális Ca^{2+} -terhelés mérséklése, akár az L-típusú VGCC-k, akár az NMDA receptor blokkolásán keresztül, neuroprotektív hatású az SD időtartamának csökkentése révén. Hogy igazoljuk a neuroprotektív hatást, immunhisztokémiai módszerrel jelöltük az élő neuronokat (NeuN jelölés), és számszerűsítettük a jelölt sejtek denzitását az agykéregben. A nimodipin védő hatása az általunk alkalmazott igen rövid időablakban (1 óra) nem volt kimutatható.

4.2.3. A nimodipin hatékonyan csökkentette az SD-hez társuló acidózis mértékét

A 2. *Kísérletsorozat*-ban pH-szenzitív mikroelektrodák segítségével mértük a extracelluláris szöveti pH-t, így elsőként volt lehetőségünk megmutatni a nimodipin hatását az az SD-hez társuló szöveti pH-válásra. Az SD-vel kapcsolatos acidózis hátterében részben a laktát kóros mértékű felhalmozódása áll, ami felelőssé tehető az iszkémiás inzultus súlyosbodásáért, valamint az életképes penumbra sejtek károsodásáért. Így ezen nagyfokú acidózis mérséklése jótékony hatású a sérült szövetre nézve. Eredményeink azt mutatták, hogy a nimodipin hatására jelentősen csökkent az SD-vel járó acidózis mértéke. Korábbi kutatások megmutatták, hogy az intravénásan adagolt nimodipin mérsékelte a fokális agyi iszkémiával

járó szöveti acidózis mértékét, amit a laktát clearance perfúziótól független, direkt fokozásának tulajdonítottak. Feltételezzük, hogy a neuronális Ca^{2+} -beáramlás gátlása fokozza a mitokondriumok működését, ezáltal az oxidatív laktát lebomlást, így mérséklődik az SD-vel járó acidózis is. Emellett elképzelhetőnek tartjuk, hogy a nimodipin az SD gátlásán keresztül is mérsékli a társuló pH-választ.

5. Konklúzió

Kísérleteink célja volt megmutatni, hogy a pH-szenzitív nanopartikulumokhoz asszociált nimodipin hatékonyan javítja a kísérletes agyi iszkémia kimenetelét. A pH-szenzitív nanopartikulumokhoz asszociált nimodipin nem befolyásolta a CBF-t az iszkémia indukciót megelőzően, amíg a szöveti pH fiziológiás tartományban maradt (pH 7,3-7,4), így igazoltuk, hogy a hatóanyag nem disszociált a nanopartikulumokról fiziológiás szöveti pH-n. Az iszkémia indukcióval markáns, tranzien szöveti acidózis jelentkezett, majd az agyi alapáramlás szignifikánsan magasabb értékeket vett fel a nimodipinnel kezelt csoportban. Így bizonyítottuk, **az agyi iszkémiával járó szöveti acidózis megfelelő kiváltó stimulusa lehet célzott, nanopartikulum alapú hatóanyag-leadásnak.** Továbbá immunhisztokémiai módszerrel igazoltuk, hogy az általunk alkalmazott **kitozán alapú nanopartikulumok nem aktiválják a mikrogliaikat** az agyban, biztonsággal alkalmazhatóak.

Emellett vizsgáltuk a topikálisan adagolt nimodipin hatását intakt és iszkémiás patkány agyban. Eredményeink azt mutatták, hogy a nimodipin, feltehetően a neuronális Ca^{2+} -beáramlás blokkolása révén, **gátolta az SD-ket, és fokozta a társuló hiperémiás válasz mértékét** iszkémiás körülmények között. Továbbá **mérsékelte az SD-hez társuló acidózist.** A nimodipin, az L-típusú VGCC gátlásán keresztül, **javította a neurovaszkuláris csatolás hatékonyságát,** így **fokozta a szomatoszenzoros stimulációval kiváltott funkcionális hiperémia mértékét** iszkémiás körülmények között.

A Tézis alapjául szolgáló publikációk:

- I. Szabó Í, **M Tóth O**, Török Z, Varga DP, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Hunya Á, Bari F, Horváth I, Vigh L, Farkas E. The impact of dihydropyridine derivatives on the cerebral blood flow response to somatosensory stimulation and spreading depolarization. *Br J Pharmacol*. 2019 May;176(9):1222-1234. doi: 10.1111/bph.14611. **IF: 7.73**
- II. **M Tóth O**, Menyhárt Á, Varga VÉ, Hantosi D, Ivánkovits-Kiss O, Varga DP, Szabó Í, Janovák L, Dékány I, Farkas E, Bari F. Chitosan nanoparticles release nimodipine in response to tissue acidosis to attenuate spreading depolarization evoked during forebrain ischemia. *Neuropharmacology*. 2020 Jan 1;162:107850. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107850. **IF: 4.431**
- III. **M Tóth O**, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Farkas E, Bari F. Tissue Acidosis Associated with Ischemic Stroke to Guide Neuroprotective Drug Delivery. *Biology (Basel)*. 2020 Dec 11;9(12):460. doi: 10.3390/biology9120460. **IF: 3.796**

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőimnek, Dr. Farkas Eszternek és Bari Ferenc Professzor Úrnak a felbecsülhetetlen szakmai és emberi támogatást, és hogy mérhetetlen tapasztalatukkal és tanácsaikkal segítettek TDK és PhD tanulmányaim alatt.

Köszönettel tartozom Dr. Szabó Írisznek és Dr. Menyhárt Ákosnak a közös munkáért, valamint tanácsaikért kísérletes munkám során. Szeretnék köszönetet mondani az Agyi Keringés és Metabolizmus Kutatócsoport valamennyi munkatársának: Frank Ritának, Ivánkovitsné Kiss Orsolyának, Dr. Varga Dánielnek, Dr. Varga Viktóriának, és Dr. Makra Péternek. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Institóris Ádámnak, hogy bevezetett a tudomány és a kísérletes munka világába.

Szeretnék köszönetet mondani Peták Ferenc Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette és támogatta munkámat az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben, valamint Jancsó Gábor Professzor Úrnak, hogy elfogadta jelentkezésemet az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskolába.

Teljes szívemből köszönöm Szüleimnek, Testvéreimnek és Nagyszüleimnek sosem múló támogatásukat. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Férjemnek, Bencének, és Kisfiunknak, Gergőnek végtelen türelmüket, támogatásukat és bátorításukat.