

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓINTÉZET
BIOFIZIKAI INTÉZET

ÉS
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ELMÉLETI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

**SZILÁRD ÉS VEZIKULÁRIS NANOPARTIKULUMOK CÉLZOTT AJUTTATÁSA
A VÉR-AGY GÁTON TÁPANYAGSZÁLLÍTÓ FEHÉRJÉK LIGANDJAINAK
SEGÍTSÉGÉVEL**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Mészáros Mária

Témavezetők:

Dr. Deli Mária tudományos tanácsadó

Dr. Veszeka Szilvia tudományos főmunkatárs

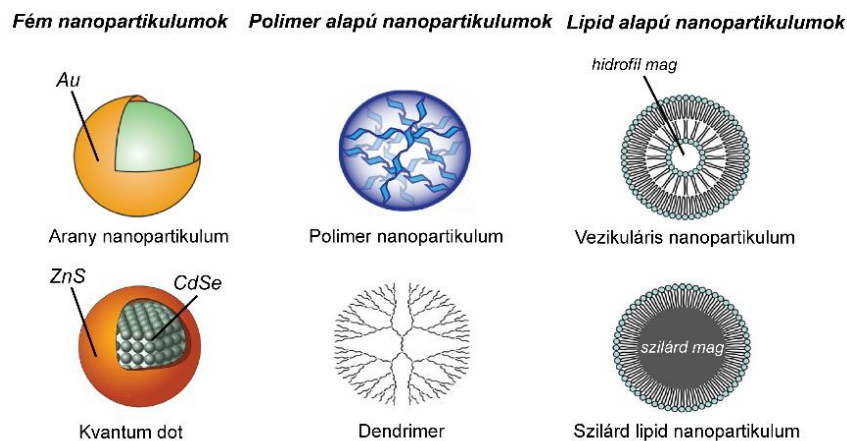


SZEGED

2019

1. BEVEZETÉS

A vér-agy gát jelentősen korlátozza a gyógyszerek bejutását az idegszövetbe ezért a központi idegrendszer betegségeinek, mint az agyvérzés, agytumrok vagy neurodegeneratív betegségek (Alzheimer- és Parkinson-kór), különösen nehéz a gyógyszeres kezelése. A vér-agy gát anatómiai alapját az agyi hajszálerek endotélsejtjei alkotják, amelyeket szoros sejtkapcsolatok (tight junction, TJ) kötnek össze. A potenciális gyógyszerjelölt molekulák, így a biofarmakonok, nuklein savak, peptid vagy fehérje természetű hatóanyagok jelentős része vagy egyáltalán nem, vagy csak kis hatékonysággal képes átjutni a vér-agy gáton. Noha nagy erővel folynak a kutatások a probléma megoldására, eddig még nem sikerült olyan módszert találni, amivel hatékonyan lehet gyógyszerjelölt molekulákat az agyba juttatni. A nanopartikulumok (NP-k), 1-1000 nm átmérőjű kolloidális rendszerek, melyek változatos makromolekuláris komponensekből vagy fémekből készülhetnek és bioaktív hatóanyagok hordozására képesek (1. ábra).



1. ábra. Agyi gyógyszerbejuttatás kutatásában használt főbb nanopartikulum fajták.

A sikeres agyi bejuttatáshoz azonban nem elegendő a gyógyszerjelölt anyagokat csak hozzákapcsolni vagy bezárni a NP-okba, szükség van olyan célzó molekulákra, amelyek megnövelik a nanohordozók átjutását a vér-agy gáton. Az agyi endotélsejteken nagyon sok szállítófehérjét találunk, amelyek a tápanyagokat a vérből az agyba juttatják. Ezeknek a transzportereknek, főképpen a solute carrier család tagjainak (SLC-transzporterek) ligandjai alkalmasak lehetnek nanorészecskék célzott agyba juttatására.

Habár az SLC szállítófehérjéket már vizsgálják gyógyszer-célpontokként, és folyamatosan növekszik az SLC fehérjékre tervezett hatóanyagok száma, az SLC-transzporterek kiaknázatlan lehetőségeket kínálnak NP-k célzott agyi bejuttatására. Az SLC-transzporterek közül a glükózt

szállító GLUT1 (SLC2A1) fehérje génexpressziós szintje a legmagasabb a vér-agy gáton, de az SLC2A transzporter család egyéb tagjai is nagy számban jelen vannak. A glükózanalóg molekulák hatékony és vér-agy gát specifikus célzóligandjai lehetnek mind szilárd, mind pedig vezikuláris nanorészecskéknek. Az aminosav szállító SLC fehérjék száma és génexpressziós szintje az agyi kapillárisokon szintén magas. Az alanin, szerin és cisztein aminosavakat a nátrium-függő neutrális aminosav transzporter család tagjai (SNAT/SLC38A és ASCT/SLC1A) szállítják, de az alanint, ezeknek a transzportereknek a ligandját eddig még nem használták célzó molekulaként NP-k vér-agy gáton való átjutásának fokozására.

Az SLC-transzporterek felelősek az agy vitaminokkal való ellátásért is. A vér-agy gát nátrium-függő multivitamin transzportere (SMVT/SLC5A6) látja el az agyat biotinnal (B7 vitamin). A biotint, mivel erősen köti az avidint, már hosszú ideje használják ligációs technikákban, képzőanyagokban és a diagnosztikában is. A biotin-avidin technológia ígéretes lehet daganatok gyógyszeres kezelésében, azonban még nem vizsgálták NP-k célzott jelölésére és nanocarrierek agyi bejuttatásának megkönnyítésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A hatékony és célzott agyi gyógyszerbejuttatás mindmáig egy megoldatlan probléma, ezért olyan nanohordozó rendszerek fejlesztését tűztük ki célul, amelyek segítségével megnövelhető hatóanyagok átjutása a vér-agy gáton keresztül. Mivel a tápanyagszállító fehérjék specifikusan és nagy mennyiségben fejeződnek ki a vér-agy gát endotélsejtjein, kutatási hipotézisünk az volt, hogy az SLC-transzporterek ligandjaival jelölt NP-k, különösen ezeknek a ligandoknak kettős kombinációi, megnövelhetik a nanorészecskék, vagy az azokba zárt modellanyag bejutását agyi endotélsejtekbe és átjutását a vér-agy gáton. Főbb céljaink a következők voltak:

- (I) Megvizsgálni kiválasztott SLC-transzporterek génexpressziós szintjeit izolált agyi kapillárisokban és *in vitro* vér-agy gát modellekben
- (II) Biotin és glutation liganddal jelölt szilárd NP-k tesztelése *in vitro* vér-agy modelleken
- (III) Vezikuláris NP-k (nioszómák) készítése albumin töltettel, SLC-ligandok és glutation célzó molekulák egyszeres és kettős kombinációival; az NP-k jellemzése
- (IV) A nioszómák toxicitásának, sejt felvételének és permeabilitásának vizsgálata *in vitro*
- (V) A nioszómák sejtbe jutásának lehetséges mechanizmusainak és a felületi töltés szerepének felderítése
- (VI) A nioszóma töltet *in vivo* agyi bejutásának vizsgálata optikai képzőanyag technikával egyszeres és kétszeres SLC-ligand kombinációkkal célzott nioszómák esetén

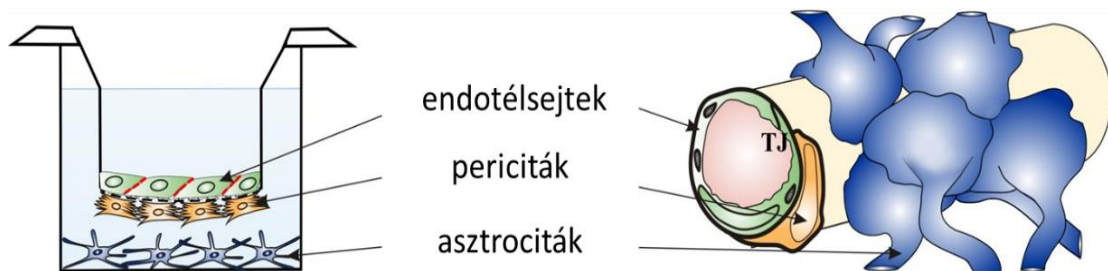
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Állatok

Az állatokon végzett vizsgálatok a magyarországi (1998. XXVIII.) és az Európai Unió által (2010/63/EU) állati jólétről szóló és az állatvédelem alapelveit meghatározó törvényeknek és előírásoknak megfelelően történtek. Állatkísérletes engedélyek száma: XVI./03835/001/2006, XVI./834/2012. Az *in vivo* kísérleteinkhez 10 hetes hím CD1-Foxn1nu szórtelen egereket használtunk. A mikroerek és a primer sejtek izolálásához az agyszövet 3 hónapos (mikroér), három hetes (primer agyi endotélsejt, pericita), illetve újszülött (asztroglia) Wistar patkányokból (hímek és nőtények vegyesen) származott.

3.2. Sejttenyészetek

In vitro kísérleteink során az alábbi sejttenyészeteket használtuk: humán agyi endotél sejt vonal (hCMEC/D3), primer patkány agyi endotélsejt (RBEC) monokultúra és vér-agy gát ko-kultúra modellben pericitákkal és asztroglia sejtekkel (2. ábra).



2. ábra. A vér-agy gát három sejtípusból álló ko-kultúra modellje és egy agyi kapilláris vázlatos képe. TJ: szoros kapcsolat.

3.3. Tápanyagszállító fehérjék génextpressziós vizsgálata

Patkány agyi mikroerekből, hCMEC/D3 és vér-agy gát ko-kultúra modellben (2. ábra) tenyésztett RBEC sejtekből RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t szintetizáltunk. Kvantitatív PCR segítségével analizáltuk a glükóz (*GLUT1/SLC2A1*, *GLUT3/SLC2A3*, *GLUT5/SLC2A5*), az alanin (*SNAT1/SLC38A1*, *SNAT2/SLC38A2*, *SNAT3/SLC38A3*, *SNAT5/SLC38A5*; *ASCT1/SLC1A4*, *ASCT2/SLC1A5*) és a biotin (*SMVT/SLC5A6*) szállításában részt vevő transzporter gének expressziós szintjeit.

3.4. Kísérletek célzott szilárd nanopartikulumokkal

3.4.1. Szilárd nanorészecskék funkcionálizálása és jellemzése

Kísérleteinkhez neutravidinnel bevont polisztrén, vörös fluoreszcens jelet adó szilárd nanopartikulumokat (SNP)-ket funkcionalizáltunk biotinnal (SNP-B) és biotinilált-glutatioonnal (SNP-B-GSH). Dinamikus fényszóráson alapuló mérésekkel határoztuk meg az SNP-k méreteloszlását és mértük meg felületi töltésüket (zéta potenciál). Pásztázó elektronmikroszkópiával vizsgáltuk az SNP-k alakját.

3.4.2. A sejtek életképességének és a szilárd nanorészecskék sejtbe jutásának vizsgálata

A hCMEC/D3 sejtek életképességének és metabolikus aktivitásának meghatározására az SNP kezelések után MTT-tesztet használtunk. Az SNP-k sejt felvételének vizsgálatához a hCMEC/D3 sejteket 24-lyukú tenyésztőlemezekre szélesztettük. Miután a sejtek egybefüggő réteget alkottak SNP, SNP-B, SNP-B-GSH oldattal (150 µg/mL) kezeltük őket (4 és 8 h, 37 °C, CO₂ inkubátor). Az inkubációs idő végén a sejteket jéghideg foszfát pufferrel (PBS) mostuk és Triton X-100 detergenssel lizáltuk. A sejt minták fluoreszcens intenzitását spektrofluoriméterrel mértük meg 488 nm excitációs és 605 nm emissziós hullámhosszon. A fluoreszcens SNP-k sejtbe jutását konfokális lézer szkennelési mikroszkóppal is vizsgáltuk.

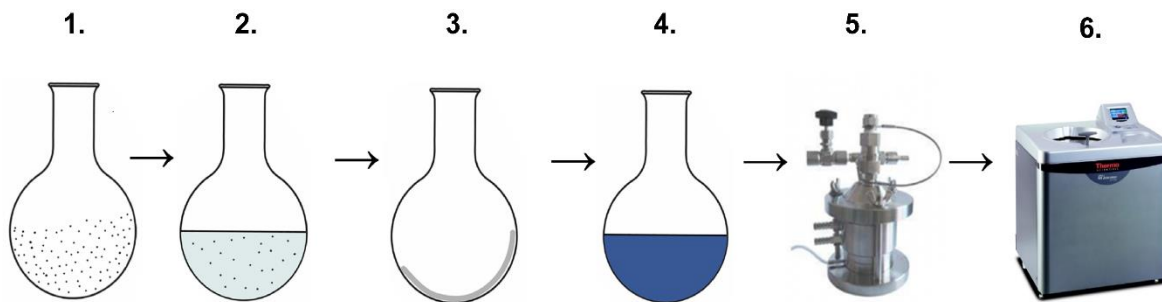
3.4.3. Szilárd nanorészecskék permeabilitásának vizsgálata vér-agy gát modellen

A permeabilitási vizsgálatok során a hCMEC/D3 sejteket kollagénnel bevont tenyésztőbetétekre szélesztettük, majd öt napig tenyésztettük. A sejtréteg integritását Evans-kékkel jelölt szérum albumin (EBA, 67 kDa; 0,167 mg/mL Evans-kék, 10 mg/mL albumin) jelzőanyag átjutásának vizsgálatával ellenőriztük. A sejteket a tenyésztőbetét feletti folyadéktérben (donor kompartment; 0,5 mL) nanorészecskékkel kezeltük (SNP, SNP-B vagy SNP-B-GSH, 150 µg/mL) 8 órán keresztül. Az inkubáció végén az alsó folyadéktérből (akceptor kompartment; 1,5 mL) vett minták fluoreszcens intenzitását 488 nm excitációs és 605 nm emissziós hullámhosszokon határoztuk meg. Az SNP-k sejtrétegen való átjutását látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app} , cm/s) értékekkel jellemeztük.

3.5. Kísérletek célzott vezikuláris nanorészecskékkel

3.5.1. Nioszómák funkcionálizálása és jellemzése

Nem-ionos felületaktív anyagokból – Span 60 (szorbitán-monosztearát) és Solulan C24 (koleszteril-poli-24-oxietilén-éter) – és koleszterinből vezikuláris nanorészecskéket (nioszómákat) készítettünk a 3. ábrán látható lépéseket követve.



3. ábra. A nioszóma készítés lépései: (1-2) Felületaktív anyagok, koleszterin és célzó ligandok feloldása etanolban és kloroformban, (3) lipid film képződés a szerves oldószerek eltávolításával, (4) a kiszáradt lipid film hidratálása EBA oldattal, szonikálás, (5) magas nyomású extrudálás, (6) ultracentrifugálás.

A nioszómákat N-dodecil- β -D-glükopiranóz (GP), dodekanoil-alanin (A) és pegilált-glutation (GSH) célzó ligandokkal funkcionálizáltuk. Az egyszeres liganddal jelölt NP-k (N-GP, N-A, N-GSH) mellett alanin-glükopiranóz (N-A-GP), glükopiranóz-glutation (N-GP-GSH) és alanin-glutation (N-A-GSH) kettős ligand-kombinációval célzott nioszómákat is előállítottunk. A töltésként a nagy biomolekula EBA-t (67 kDa) zártuk a nioszómák belsejébe. Dinamikus fényszóráson alapuló mérésekkel határoztuk meg a nioszómák méreteloszlását és zéta potenciálját, míg fluoreszcens spektrofotometriával mértük a bezárt EBA mennyiségét. A nioszómák fizikai tulajdonságait transzmissziós elektron- és atomerő mikroszkóppal is vizsgáltuk. Az NP-k tulajdonságainak változását 6 hónapon keresztül követtük nyomon.

3.5.2. A sejtek életképességének és a nioszómák sejtbe jutásának vizsgálata

Valós idejű impedancia mérésekkel követtük az RBEC sejtek életképességének kinetikáját nioszóma kezelések hatására. Az egyszeres és kettős ligandkombinációkkal célzott nioszómák töltetének sejtbe jutását egybefüggő RBEC sejtrétegeken vizsgáltuk (10 mg/mL koncentráció, 4 h, 37 C és 4 °C). A sejtfelvételi mechanizmusok felderítésére a sejteket metabolikus gátlószerekkel (nátrium-azid, 1 mg/mL) és endocitózis gátlókkal (filipin, 6 μ M, 15 min; citokalazin D, 20 μ M, 1 h) kezeltük. A felületi töltés szerepének vizsgálatához az RBEC sejtek felszíni glikokalix rétegét neuraminidáz enzimmel emésztettük (1 U/mL, 1 h

előkezelés), vagy a sejteket kationos lipiddel kezeltük (TMA-DPH, 54 μ M, 30 min). A kísérletek végén a sejteket PBS-sel mostuk, lizáltuk és a sejtekbe jutott EBA töltet mennyiségét fluoreszcens spektrofotométerrel határoztuk meg.

3.5.3. A nioszómák permeabilitásának vizsgálata vér-agy gát ko-kultúra modellen

A nioszómák permeabilitásának vizsgálatához a vér-agy gát ko-kultúra modelljén a sejteket a felső, donor kompartmentben szabad EBA-val, egyszeres és kettős liganddal célzott és EBA töltött nioszmákkal kezeltük (4 h, 37 °C) Az akceptor kompartmentből származó mintákban fluoriméterrel mértük az átjutott EBA mennyiségét 584 nm excitációs és 663 nm emissziós hullámhosszon. Az EBA átjutást P_{app} értékekkel jellemeztük.

3.5.4. A nioszóma kezelés plazmamembrán fluiditásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az RBEC sejteket N és N-A-GSH nioszómákkal kezeltük (4 h, 37°C). A sejteket fluoreszcens lipid próbával (TMA-DPH, 0,2 μ M) kezeltük, majd a fluoreszcencia anizotrópiát 360 nm gerjesztési és 430 nm emissziós hullámhosszon mértük T-formájú fluoreszcens spektrofotométerrel 5 percig. Ezután 30 mM benzil-alkoholt, egy erős membrán fluidizáló szert adtunk a sejtekhez, majd folytattuk a mérést további 5 percen keresztül.

3.5.5. *In vivo* képalkotás

Az *in vivo* vizsgálatokhoz 10 hetes hím CD1-Foxn1^{nu} szőrtelen egereket használtunk. A fluoreszcens nioszóma mintákat (N, N-A, N-GP, N-A-GP) farokvénába adtuk, majd a nioszómákba zárt EBA agyi bejutását valós időben követtük *in vivo* optikai képalkotó eljárással (eXplore Optix). Az állatokat folyamatosan monitoroztuk, és altatásban az agyi terület fluoreszcens intenzitásáról felvételeket készítettünk (10 és 30 min, 3, 6, 24 h).

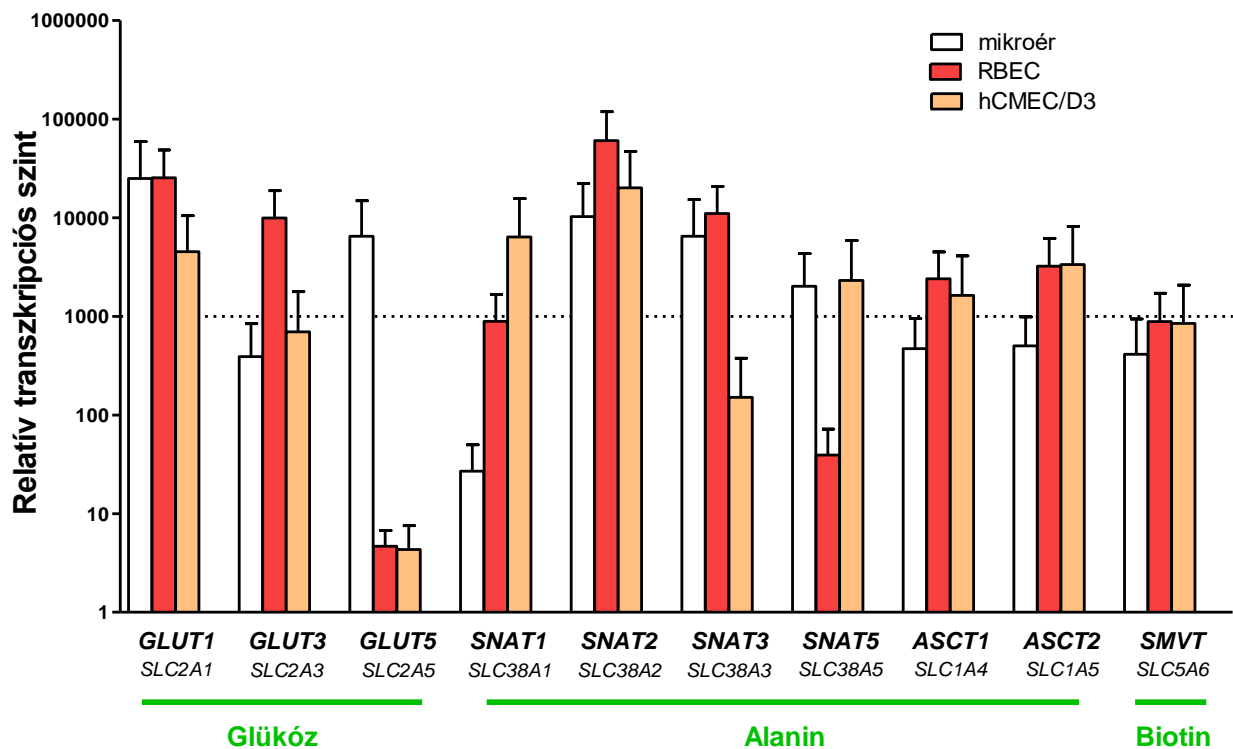
3.5.6. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 5.0 programot használtuk. A kísérletekben kapott adatokat átlag \pm SEM vagy \pm SD formában adtuk meg. Az adatsorokon kétmintás *t*-próbát, egy- vagy kétutas variancia-analízist (ANOVA) majd ezt követően Dunnett- vagy Bonferroni-tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0.05$ értékeket tekintettük. A kísérleteket legalább kétszer megismételtük, és kísérletenként 4-10 párhuzamos mintát használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A tápanyagszállító fehérjék génexpressziós szintjeinek meghatározása

Megvizsgáltuk a glükóz, alanin és biotin agyi bejuttatásáért felelős SLC-transzporterek géneinek expressziós szintjeit izolált agyi mikroér, vér-agy gát ko-kultúrában tenyésztett RBEC és hCMEC/D3 sejteken (4. ábra). A glükóz transzporterek közül a *GLUT1* expressziós szintje volt a legmagasabb. A neutrális aminosav transzporterek közül a *SNAT2* mRNS-szintje volt a legmagasabb. Az *SMVT* gén kifejeződése hasonló mértékű volt a vér-agy gát modellben és a hCMEC/D3 sejteken. A vizsgált tíz gén közül csak három esetben, a *GLUT5*, *SNAT1* és *SNAT5* gének transzkripció szintjei voltak alacsonyabbak a vér-agy gát modellben az izolált mikroerekkel összehasonlítva (4. ábra).

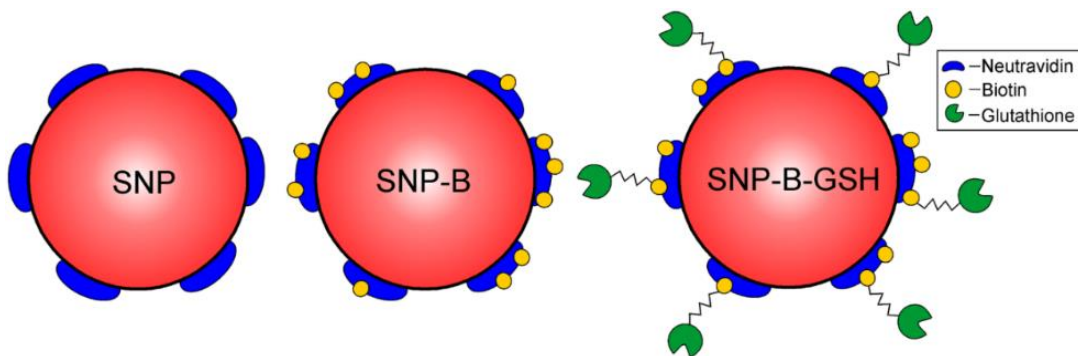


4. ábra. A glükóz, alanin és biotin SLC-transzportereinek expressziós szintjei izolált agyi mikroér, vér-agy gát hármass ko-kultúrában tenyésztett RBEC és hCMEC/D3 mintákban.

4.2. Eredmények szilárd nanopartikulumokkal

4.2.1. Szilárd nanopartikulumok jellemzése

A fluoreszcens SNP-eket biotin és glutation célzó ligandokkal jelöltük (5. ábra) A nanorészecskék mérete 93-120 nm között volt. Minden SNP csoportban alacsony polidiszperzitási indexet mértünk, ebből szűk méreteloszlásra következtethetünk. A célzott SNP-k felületi töltése egymáshoz nagyon hasonló volt (-23 mV). A nem targetált SNP-k zéta potenciálja pedig kevésbé volt negatív (-17 mV). Az elektronmikroszkópos képeken a nanorészecskék gömb alakúak voltak, és aggregáció nem volt megfigyelhető.

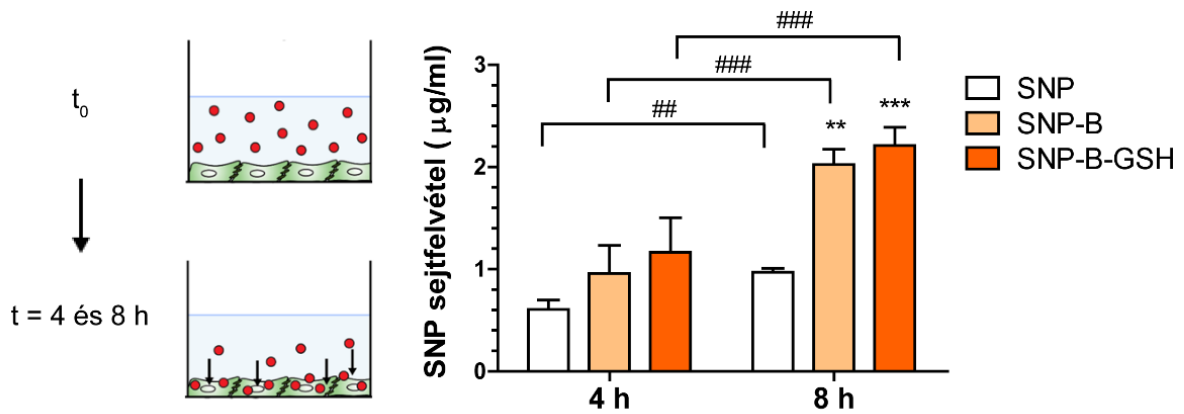


5. ábra. Nem-targetált (SNP), biotin- (SNP-B) és glutation-jelölt (SNP-B-GSH) szilárd nanopartikulumok.

4.2.2. Szilárd nanopartikulumok hatása a sejtek életképességére és bejutása sejtekbe

A sejtek életképessége MTT-teszt alapján nem változott SNP kezelést követően (10-1000 $\mu\text{g/mL}$ koncentráció tartomány, 24 h). Ezek alapján mindhárom SNP csoportból a biztonságosnak ítélt 150 $\mu\text{g/mL}$ kezelési koncentrációt választottuk ki további kísérleteinkhez.

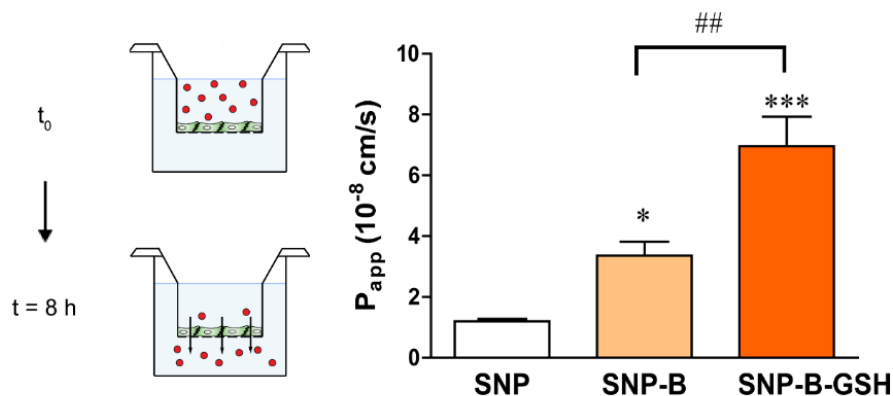
Az SNP-k hCMEC/D3 sejtekbe való bejutását két időpontban teszteltük (4 és 8 h). Nyolc órás inkubáció után mindhárom kezelési csoportban az SNP-k jobban bejutottak az endotélsejtekbe, mint négy óra után. Az SNP-B és SNP-B-GSH célzott nanorészecskékből kétszer több jutott be a sejtekbe, mint a nem-targetált SNP-kból (6. ábra).



6. ábra. A nem-targetált (SNP), biotin-jelölt (SNP-B) és glutation-jelölt (SNP-B-GSH) nanorészecskék (150 µg/mL) bejutása endothélszövetbe 4 és 8 órás inkubációt követően. Átlag ± SEM. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA és Bonferroni-teszt; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, az SNP kezelt csoporttal összehasonlítva, # $P < 0,01$; ### $P < 0,001$, a négy órás kezelési csoporttal összehasonlítva; $n = 4-6$.

4.2.3. Szilárd nanopartikulumok átjutása a vér-agy gát modellen

Mind a három SNP típus átjutott az agyi endothélszövet rétegeken, de eltérő mértékben. (7. ábra). Nyolc órás kezelést követően majdnem háromszor több SNP-B jutott keresztül a sejteken összehasonlítva a nem targetált csoporttal. Az SNP-B-GSH nanorészecskék átjutása volt a legmagasabb (5,8-szor nagyobb P_{app} érték az SNP csoportéhoz viszonyítva).

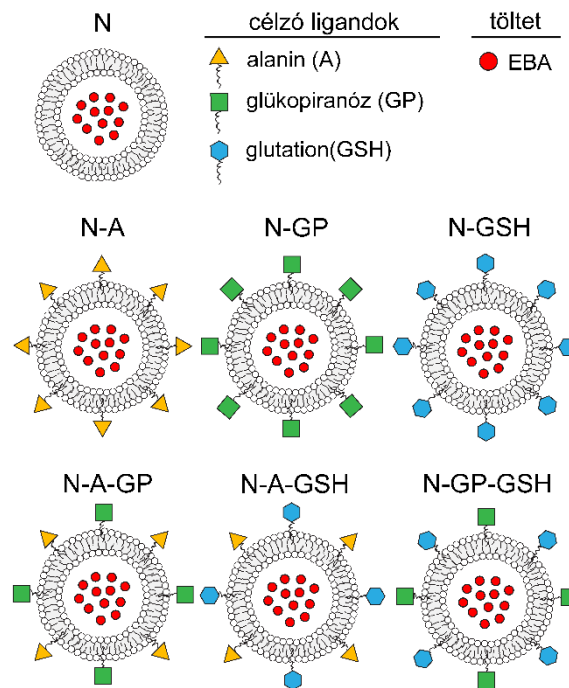


7. ábra. Nem-targetált és targetált SNP-k permeabilitása (150 µg/mL, 8 h) hCMEC/D3 sejtrétegen. Átlag ± SEM. Statisztikai analízis: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, az SNP kezelt csoporttal összehasonlítva, # $P < 0,01$, az SNP-B csoporttal összehasonlítva; $n = 6$.

4.2. Vezikuláris nanorészecskékkel kapott eredmények

4.2.1. A nioszómák jellemzése

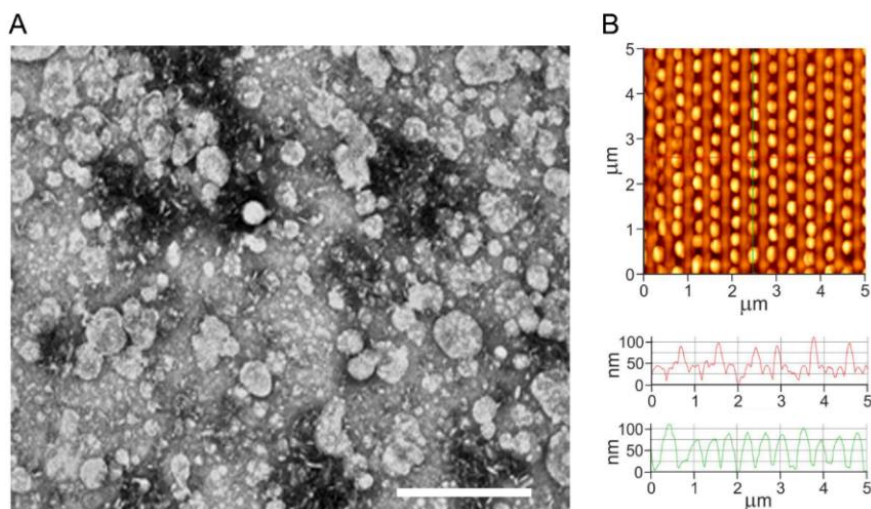
Hétféle nioszómát készítettünk, amit fluoreszcens EBA modellanyaggal töltöttünk (8. ábra). A nanorészecskék között volt nem-targetált (N), egyszeresen célzott (N-GP, N-A, N-GSH), és kettős ligandkombinációval célzott (N-A-GSH, N-A-GP, N-GP-GSH).



8. ábra. Nem-targetált (N), egyszeres liganddal targetált (N-A: alanin, N-GP: glükopiranóz, N-GSH: glutation) és kétszeres ligandkombinációkkal targetált (N-A-GP: glükóz-alanin, N-A-GSH: alanin-glutation, N-GP-GSH: glükóz-glutation) nioszómák vázlatos képe. Töltet: Evans-kék albumin komplex (EBA, 67 kDa).

A nioszómák átlagos mérete 92 és 107 nm között volt. Minden nioszóma csoportban alacsony polidiszperzitási indexet mértünk, amelyből szűk méreteloszlásra következtettünk. A nioszómák zéta potenciálja -3 és -4 mV körül mozgott, kivéve a GSH-val célzott csoportokat (N-GSH, N-A-GSH, N-GP-GSH), amelyek még negatívabb töltéssel rendelkeztek (-7 mV). A nioszómák bezárási hatékonysága a nagyméretű hidrophil EBA töltetre nézve $4,6$ – $10,4$ % volt, ami $0,5$ – $1,1$ mg töltetnek felel meg 100 mg nioszómában.

Nem aggregálódott, kerek nioszómákat figyeltünk meg a transzmissziós elektronmikroszkópos (9A. ábra) és atomerő mikroszkópos (9B. ábra) vizsgálattal kapott képeken.



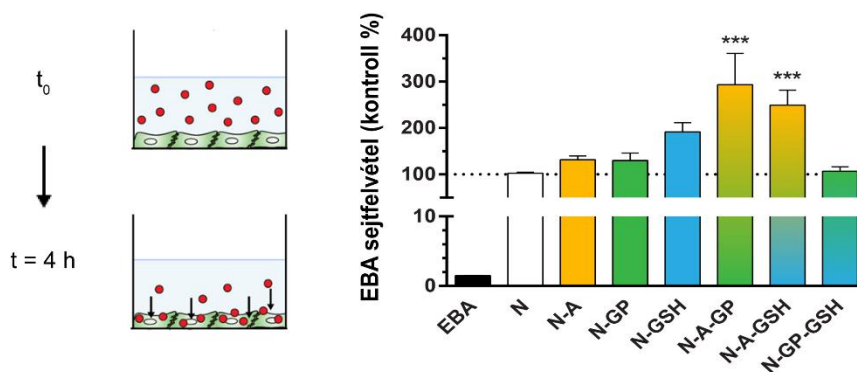
9. ábra. (A) Nioszómák transzmissziós elektronmikroszkópos és (B) atomerő mikroszkópos képe. Mércé: 500 nm.

A nioszómák stabilitását fél éven keresztül követtük. Hat hónap alatt a nanorészecskék fiziko-kémiai tulajdonságai minimálisan változtak. Megállapíthattuk, hogy stabil, aggregációra kevésbé hajlamos, jól tárolható hordozórendszert hoztunk létre.

4.2.2. A nioszómák sejtek életképességére gyakorolt hatása és töltetének sejtbe jutása

A nioszóma kezelések a 0,3–10 mg/mL koncentráció tartományban 4 óra elteltével sem csökkentették az RBEC sejtek életképességét. Ez alapján a további kísérleteinkhez a biztonságosnak ítélt 10 mg/mL kezelési koncentrációt választottuk.

Az agyi endotélsejtek a szabad, vagyis nioszómába nem zárt EBA-t nagyon kis mértékben veszik fel, ez csupán 1,5% a nem-targetált nioszóma (N) csoporthoz viszonyítva (10. ábra).

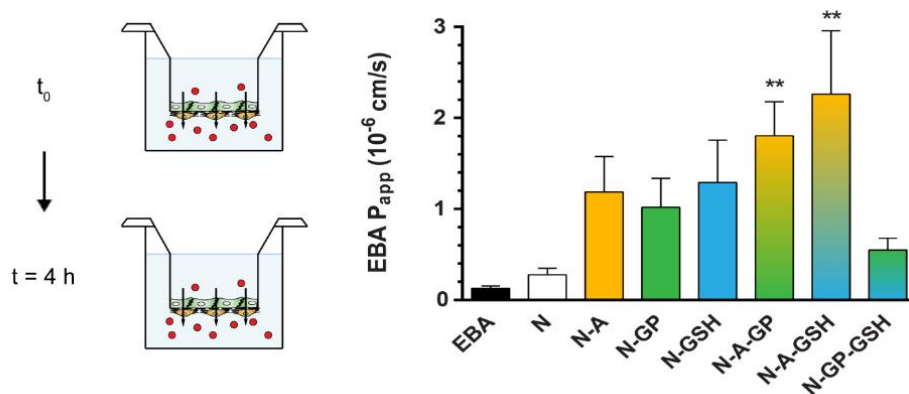


10. ábra. A nem-targetált (N), egyszeres (N-A, N-GP, N-GSH) és kettős (N-A-GP, N-A-GSH, N-GP-GSH) ligandkombinációkkal jelölt nioszómák bejutása RBEC sejtekbe (4 h). Átlag \pm SEM. Statisztikai analízis: egyutas ANOVA és Dunnett-teszt; *** $P < 0,001$, az N csoporthoz hasonlítva; $n = 10$.

Az agyi endotélsejtekbe több EBA jutott be az alaninnal, glükopiranozzal és glutationnal célzott nioszóma csoportokban a nem-targetált csoporthoz képest. A kettős N-A-GP és N-A-GSH ligandkombinációkkal célzott NP csoportokban szignifikánsan megnőtt az EBA töltet sejteken belüli koncentrációja. A N-GP-GSH csoportban nem mértünk ilyen változást (10. ábra).

4.2.3. Nioszómák töltetének átjutása a vér-agy gát modellen

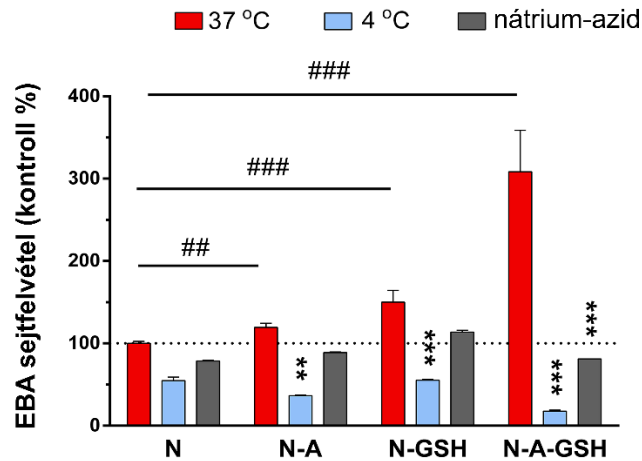
A szabad EBA komplex átjutása nagyon alacsony mértékű volt a modellen, így elmondhatjuk, hogy szoros, alacsony paracelluláris permeabilitású vér-agy gát modellt hoztunk létre (11. ábra). A nem-targetált nioszómába zárt EBA töltet permeabilitása emelkedett, amit tovább fokozott a nanorészecskék jelölése egyszeres ligandokkal. A kettős ligandkombinációval célzott nioszómák nagymértékben emelték az EBA átjutását a szabad EBA-hoz képest (N-A-GSH csoport: 17-szeres, N-A-GP csoport: 14-szeres növekedés) A GP-GSH ligandkombináció hatása ennél a kísérletnél is elmaradt. A következőkben ezért az N-A, N-GSH és N-A-GSH csoportokat választottuk *in vitro* kísérleteinkhez.



11. ábra. A szabad és nioszómákba zárt EBA töltet átjutása a vér-agy gát modellen (10 mg/mL, 4h). Átlag ± SEM. Statisztikai analízis: egyutas ANOVA és Dunnett-teszt, ** $P < 0,01$, az N csoporttal összehasonlítva; $n=10$.

4.2.6. A hőmérséklet és metabolikus gátlás hatása nioszómák töltetének sejtbé jutására

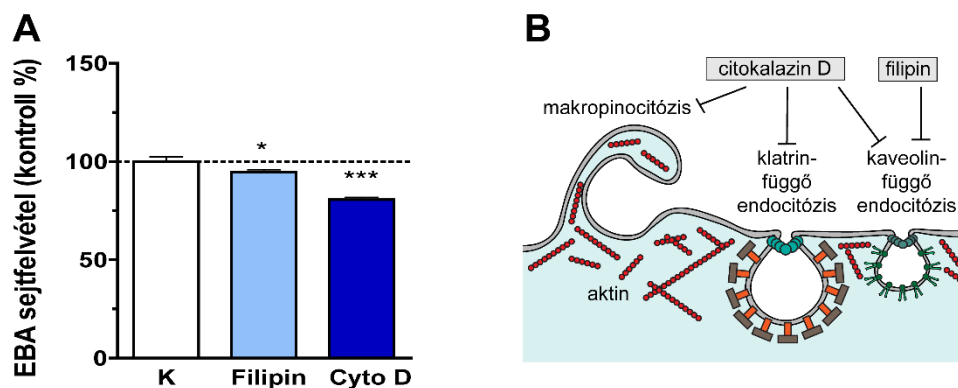
Az EBA töltet sejtbé jutása 37 °C-on magasabb volt minden célzott NP-csoportban a nem-célzott részecskékkel összehasonlítva. A hőmérséklet lecsökkentése 4 °C-ra és a metabolikus gátlószer (nátrium-azid) a targetált NP-csoportokban a nioszómákba töltött EBA sejtekbe jutását csökkentette (12. ábra).



12. ábra. A hőmérséklet és a metabolikus gátlószer nátrium-azid (0,1%) hatása nem-targetált (N), alanin- (N-A), glutation- (N-GSH) és alanin-glutation- (N-A-GSH) célzott nioszómákkal kezelt RBEC sejteken (4 h). Átlag ± SEM. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA és Bonferroni-teszt. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, a csoporton belül az első oszlophoz viszonyítva, ## $P < 0,01$ ### $P < 0,001$ az N csoporttal összehasonlítva; $n=4-6$.

4.2.7. A nioszómákba töltött EBA felvételének gátlása endocitózis inhibitorokkal

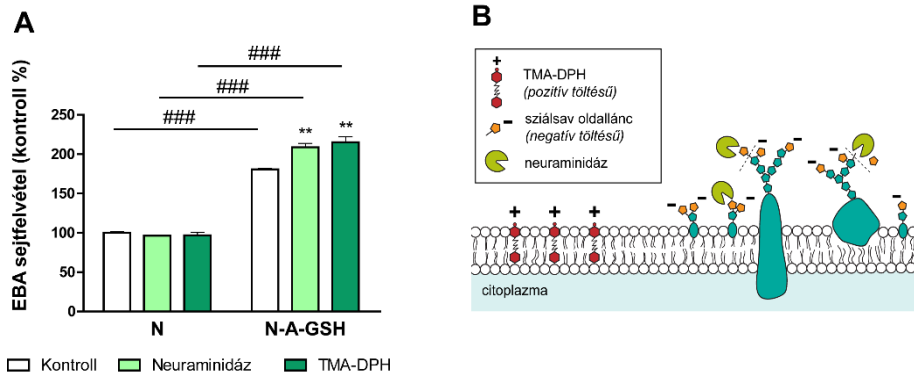
A nioszómák sejtfevételi mechanizmusainak felderítésére két gátlószert használtunk az N-A-GSH kettős liganddal targetált nioszóma kezelést megelőzően (13. ábra). A filipin, a lipid raft/kaveolin-függő endocitotikus útvonal gátlószere, részlegesen csökkentette az EBA töltet sejtekbe jutását (13A. ábra). Az F-aktin depolimerizációját akadályozó citokalazin D, ami az endocitózist több útvonalon is csökkenti (13B. ábra), szintén gátolta a nioszómák sejtekbe jutását (13A. ábra).



13. ábra. (A) A filipin (6 μM) és a citokalazin D (20 μM) endocitózist gátló szerek hatása célzott nioszómák (N-A-GSH) EBA töltetének sejtbe jutására (4 h). Átlag ± SEM. Statisztikai analízis: egyutas ANOVA és Dunnett-teszt, * $P < 0,5$; *** $P < 0,001$, a kontroll (gátlószerrerrel nem kezelt) csoporttal összehasonlítva; $n=6$. (B) A citokalazin D és a filipin hatásainak vázlatos képe.

4.2.8. A sejtek felületi töltésének szerepe a nioszóma töltet sejtbe jutására

Az RBEC sejtek felületi töltését kétféleképpen módosítottuk: a negatív töltésű glikokalix réteget neuraminidáz enzimmal emésztettük, illetve a plazmamembrán töltését a TMA-DPH kationos lipiddel tettük pozitívabbá (14B. ábra). A sejtek felületi töltésének megváltoztatása a nem-targetált nioszómák esetében nem befolyásolta a nanopartikulumokba zárt EBA sejtekbe jutását a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva (14A. ábra).

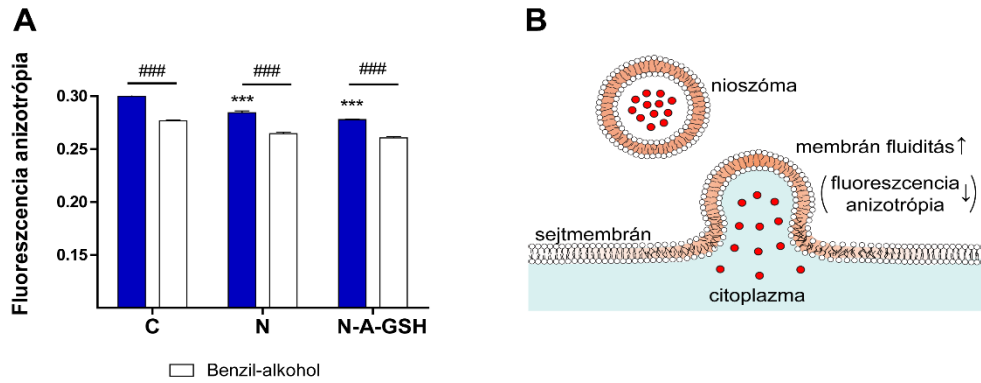


14. ábra. (A) A neuraminidáz (1 U/mL) és a TMA-DPH (54 μ M) hatása a nioszómákba zárt EBA sejtfevételére. N, nem-targetált nanorészecske; N-A-GSH, kettős ligandkombinációval célzott nioszóma. Átlag \pm SEM. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA és Bonferroni-teszt. $**P < 0,01$, a csoporton belül az első oszlophoz viszonyítva; $###P < 0,001$ az N csoporttal összehasonlítva; $n=6$. (B) A TMA-DPH és a neuraminidáz hatása az RBEC sejtek felületi töltésére.

Ezzel szemben mindkét felületi töltésmódosítás megnövelte a kettős liganddal célzott nioszómába zárt EBA felvételét a sejtekbe (14A. ábra). Az EBA töltet sejtekbe jutása 16%-kal nőtt a neuraminidáz és 19%-kal a kationos lipid kezelés hatására a töltésmódosítás nélküli sejtekkel összehasonlítva.

4.2.9. A nioszómák hatása a sejtek plazmamebrán fluiditására

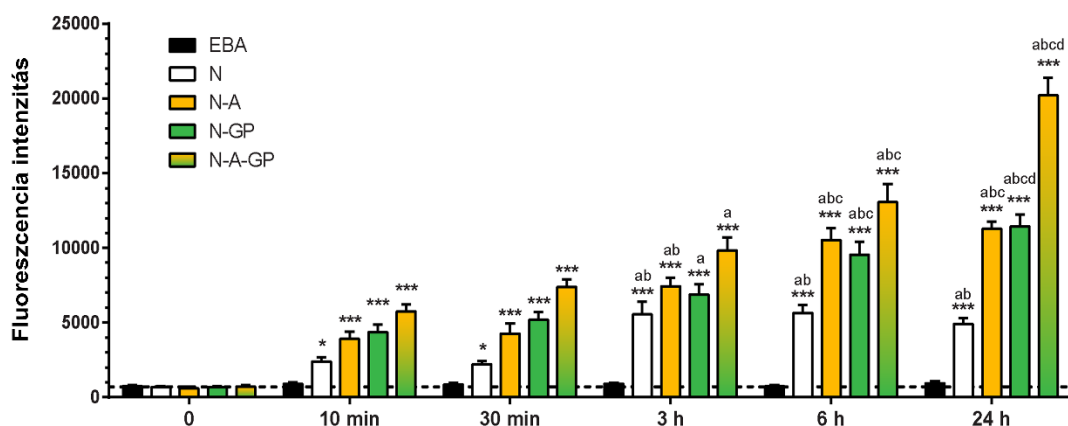
A sejtek plazmamembránjának fluiditását fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel határoztuk meg. Négy órás nioszóma (N és N-A-GSH) kezelést követően a TMA-DPH – a sejtmembrán lipid kettős rétegébe beépülő fluoreszcens lipidpróba – anizotrópiáját mértük. A nioszóma kezelése után a kezeletlen kontrollhoz képest a fluoreszcencia anizotrópiája csökkent, ami a sejtmembrán fluiditásának növekedésére, tehát nioszómákkal való fúziójára utal (15A. és B. ábra). A referencia vegyületként használt benzil-alkohol (30 mM) még jobban csökkentette a TMA-DPH anizotrópiáját, összhangban erőteljes membrán fluidizáló hatásával.



15. ábra. (A) A nem-targetált (N) és alanin-glutation kettős targetált (N-A-GSH) nioszómák és a benzil-alkohol (30 mM) hatása az endotélsejtek plazmamebránjának fluiditására. Átlag ± SEM. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA és Bonferroni-teszt. *** $P < 0,001$, a kezeltlen kontroll csoporthoz viszonyítva; ### $P < 0,001$ a csoportok első oszlopaihoz viszonyítva; $n=3$. (B) Nioszóma fúziója a sejt plazmamebránjával.

4.2.10. Célzott nioszómákba zárt EBA agyi bejutásának követése optikai képalkotással

A vörös fluoreszcens jelet adó EBA agyi bejutását élő, altatott szőrtelen egerekben monitoroztuk optikai képalkotással. Az egerek farokvénájába fecskendezett szabad EBA komplex nem okozott fluoreszcencia intenzitás fokozódást az agyi régióban a kísérlet ideje alatt (16. ábra). A nem-targetált nioszómákba zárt EBA esetén emelkedett a fluoreszcens jel az agyban. A nioszómák célzása ligandokkal (N-A, N-GP) tovább emelte az EBA töltet agyi bejutását. Az N-A-GP kettős ligandkombinációval célzott nioszóma csoportban mértük a legnagyobb intenzitás emelkedést az összes időpontban, és a legnagyobb különbséget a többi csoporttal összevetve 24 óra elteltével tapasztaltuk (16. ábra).



16. ábra. Az EBA fluoreszcens intenzitásának mérése optikai képalkotással egerek agyi régiójában szabad EBA, nem targetált (N), egyszeresen (N-A, N-GP) vagy kétszeres ligandkombinációval (N-A-GP) célzott nioszómák intravénás beadása után. Átlag ± SD. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA és Bonferroni-teszt. * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ a szabad EBA kezelt csoporthoz viszonyítva az összes kezelési csoportban; a: a 10 perces, b: a 30 perces, c: a 3 h, d: a 6 h időponttal összehasonlítva minden egyes csoportban, $n=3-4$.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A központi idegrendszer betegségeinek gyógyszeres kezelésére ígéretes megoldást jelenthetnek a nanopartikulumok, amelyek fokozhatják egyes biofarmakonok agyi bejutását. A nanorészecskék hatékony agyi bevitele azonban csak a vér-agy gát transzportrendszereinek kihasználásával valósítható meg. Jóllehet a vér-agy gáton nagy számban található tápanyagszállító fehérjéket, ezek ligandjai még kiaknázatlanok NP-k központi idegrendszeri célzására.

A tápanyagszállító fehérjék az agyi hajszálerek endotélsejtjein nagy mennyiségben fejeződnek ki, és specifikus mintázatot mutatnak a vér-agy gáton. Kutatási hipotézisünk az volt, hogy az SLC-ligandok egyszeres és kétszeres kombinációival célzott nanorészecskéket nagyobb mértékben veszik fel az agyi endotélsejtek és könnyebben jutnak át a vér-agy gáton. Célunk az volt, hogy azonosítsunk és teszteljünk SLC-transzporter ligandokat és referencia molekulaként a glutationt egyszeres és kétszeres kombinációban vér-agy gát specifikus célzó ligandként szilárd és vezikuláris NP-k esetében.

Kísérleteink első felében szilárd nanorészecskéket tanulmányoztunk *in vitro* vér-agy gát modellen. A fluoreszcens polisztrén NP-eket biotinnal és biotinilált-glutationnal jelöltük és humán agyi endotél sejt vonalon vizsgáltuk. Igazoltuk, hogy a hCMEC/D3 sejtek expresszálják a biotin transzportért felelős SMVT transzportert mRNS szinten. A biotinnal targetált SNP csoport jobban bejutott a sejtekbe, és fokozódott az átjutásuk is a vér-agy gát modellen. A glutation jelölés tovább fokozta a nanorészecskék átjutását az endotélsejtek rétegén, ami alátámasztja a vér-agy gátat célzó ligandként való használatát.

Kísérletsorozatunk második felében nanovezikulákat állítottunk elő és vizsgáltunk. A glükóz és neutrális aminosav transzporterek magas génexpressziós szinteket mutattak izolált patkány agyi mikroereken és a vér-agy gát ko-kultúrában tenyésztett primer RBEC sejteken. Nem-ionos felületaktív anyagokból nioszómákat készítettünk. Ezeket szintén glutationnal és SLC-ligandokkal (glükopiranoz és alanin) valamint kettős kombinációikkal funkcionalizáltuk. Töltetként Evans kézzel jelölt albumint, egy nagy biomolekulát használtunk. A targetáló ligandokkal jelölt nioszómákba zárt EBA jobban bejutott az agyi endotélsejtekbe, különösen a kettős ligandkombinációk esetében. A nanopartikulumokba zárt EBA sejtekbe jutása hőmérsékletfüggő volt, és csökkent a sejtek metabolizmusát és endocitózist gátló szerek alkalmazása után, ami az endotélsejtek és a nanorészecskék kölcsönhatásában aktív folyamatokra utal. Az agyi endotélsejtek negatív felszíni töltésének megváltoztatása (glikokalix réteg emésztése neuraminidáz enzimmel vagy TMA-DPH kationos lipid kezelés) fokozta a

célzott nanopartikulumokba zárt EBA sejtekbe jutását. A nioszóma kezelés megnövelte a sejtek plazmamembrán fluiditását, ami az NP-k endotélsejtekkel történő fúziójára enged következtetni. Az SLC-ligandok mint célzó molekulák megnövelték a nioszómába zárt töltet átjutását a vér-agy gáton tenyésztetes modellen és egerekben egyaránt, és a célzó ligandok kettős kombinációi hatékonyabb átjutást biztosítottak. Összefoglalva, kísérletes adataink arra utalnak, hogy az SLC transzporterek ligandjai használhatóak lehetnek nanorészecskék vér-agy gát specifikus célzására.

6. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- I. Veszelka S, **Mészáros M**, Kiss L, Kóta Z, Páli T, Hoyk Z, Bozsó Z, Fülöp L, Tóth A, Rákhely G, Deli MA.
Biotin and glutathione targeting of solid nanoparticles to cross human brain endothelial cells.
Current Pharmaceutical Design. 2017 Jul 27; 23:4198-4205.
IF: 2.86, Q1
- II. Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, **Mészáros M**, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA.
Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: gene expression and drug transport.
Frontiers in Molecular Neuroscience. 2018 May 22; 11:166.
IF: 3.902, Q1
- III. **Mészáros M**, Porkoláb G, Kiss L, Pilbat AM, Kóta Z, Kupihár Z, Kéri A, Galbács G, Siklós L, Tóth A, Fülöp L, Csete M, Sipos Á, Hülper P, Sipos P, Páli T, Rákhely G, Szabó-Révész P, Deli MA, Veszelka S.
Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier.
European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018 Oct 15; 123:228-240.
IF: 3.466, Q1

EGYÉB PUBLIKÁCIÓ

- I. Sántha P, Veszelka S, Hoyk Z, **Mészáros M**, Walter FR, Tóth AE, Kiss L, Kincses A, Oláh Z, Seprényi G, Rákhely G, Dér A, Pákáski M, Kálmán J, Kittel Á, Deli MA.
Restraint stress-induced morphological changes at the blood-brain barrier in adult rats.
Frontiers in Molecular Neuroscience. 2016 Jan 14; 8:88.
IF: 5.08, Q1

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Deli Máriának és Dr. Veszelka Szilviának a munkám során nyújtott szakmai irányításukért és támogatásukért.

Köszönöm Prof. Ormos Pálnak és Prof. Nagy Ferencnek, az MTA Szegedi Biológiai Kutatóintézet főigazgatóinak, Prof. Zimányi Lászlónak, a Biofizikai Intézet igazgatójának és Dr. Siklós Lászlónak, a Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegység vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat.

Köszönetet mondok együttműködő partnereinknek, Dr. Kupihár Zoltánnak és Dr. Bozsó Zsoltnak a célzó ligandok szintéziséért, Dr. Pilbat Ana-Mariának a membrán fluiditás kísérletekben nyújtott segítségével; Dr. Kóta Zoltánnak a fluorimetriás kísérletek során nyújtott segítségével; Dr. Kelemen Lórándnak a pásztázó elektron mikroszkópiáért; Dr. Fülöp Líviának és Dr. Siklós Lászlónak a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokért; Dr. Csete Máriának és Dr. Sipos Áronnak az atomerő mikroszkópos képekért; Dr. Galbács Gábornak és Kéri Albertnek a nioszómák lantán tartalmának meghatározásért és Dr. Petra Hülperek az *in vivo* vizsgálatokban nyújtott segítségével.

Hálás vagyok a Biológiai Barrierék Kutatócsoport jelenlegi és egykori munkatársainak, Dr. Sántha Petrának, Dr. Kiss Lórándnak, Dr. Hoyk Zsófiának, Dr. Walter Fruzsínának, Dr. Bocsik Alexandrának, Dr. Harazin Andrásnak, Gróf Ilonának, Ana Raquel Pato Santa Mariának, Barna Lillának, Barabási Beátának, Vigh Juditnak, Klepe Adriánnak, Szecskó Anikónak szakmai támogatásukért és a baráti légkörért.

Külön köszönöm Porkoláb Gergőnek a kísérletes munkám során nyújtott segítségét és támogatását.

Köszönetet mondok a Biofizikai Intézet dolgozóinak barátságukért és segítségükért a mindennapos teendőim elvégzése során.

Végezetül kimondhatatlanul hálás vagyok szüleimnek, nagyszüleimnek, öcsémnek és barátaimnak szeretetükért és a tanulmányaim során nyújtott szüntelen támogatásukért.

A kutatás az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA/NKFIH 105622), és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.2.115-2016-00007, GINOP-2.3.2-15-2016-00060 és EFOP-3.6.1-162016-00008) pályázatainak anyagi támogatásában részesült.