

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**  
**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**

**HUN-REN SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT**  
**BIOFIZIKAI INTÉZET**

**OTDK DOLGOZAT**

**Dexametazon tartalmú polimer micellák vizsgálata az orron  
keresztüli agyi gyógyszerbejuttatás fokozására**

**Szántó Milán**

Molekuláris biológia szak, MSc. I.

Témavezetők:

**Prof. Deli Mária**, kutatóprofesszor  
**Dr. Gróf Ilona**, tudományos munkatárs  
HUN-REN SZBK, Biofizikai Intézet

Belső konzulens:

**Dr. Huliák Ildikó**, egyetemi docens  
SZTE TTIK, Biológia Intézet  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai  
Tanszék

**37. OTDK Biológia Szekció**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Bevezetés.....                                                                              | 5  |
| 1.1. A központi idegrendszeri megbetegedések és gyógyításuk .....                              | 5  |
| 1.2. A vér-agy gát .....                                                                       | 5  |
| 1.3. Nazális útvonal.....                                                                      | 7  |
| 1.4. A dexametazon .....                                                                       | 9  |
| 1.5. A polimer micellák.....                                                                   | 10 |
| 1.6 Célkitűzés .....                                                                           | 11 |
| 2. Anyagok és módszerek.....                                                                   | 12 |
| 2.1. Vegyszerek .....                                                                          | 12 |
| 2.2. Sejtenyésztés .....                                                                       | 12 |
| 2.2.1. Nazális epitelsejtek.....                                                               | 12 |
| 2.2.2. Agyi endotelsejtek és periciták.....                                                    | 13 |
| 2.3. Sejtrétegek impedancia vizsgálata.....                                                    | 14 |
| 2.4. Permeabilitási kísérlet .....                                                             | 15 |
| 2.5. A modellek gátműködésének vizsgálata a permeabilitási kísérlet után.....                  | 15 |
| 2.5.1. Transzepteliális és-endoteliális elektromos ellenállás (TEER) .....                     | 15 |
| 2.5.2. Jelzőmolekulák permeabilitása.....                                                      | 16 |
| 2.5.3. Immuncitokémia.....                                                                     | 17 |
| 2.6. Statisztikai kiértékelés .....                                                            | 17 |
| 3. Eredmények.....                                                                             | 18 |
| 3.1. Sejtrétegek impedancia vizsgálata.....                                                    | 18 |
| 3.2. A dexametazon átjutása a gátmodellek sejtrétegein .....                                   | 20 |
| 3.3. A sejtrétegek szorosságának vizsgálata a permeabilitási vizsgálat után .....              | 20 |
| 3.3.1. Transzepteliális és endoteliális elektromos ellenállás és permeabilitás vizsgálat ..... | 20 |
| 3.3.2. Immuncitokémia.....                                                                     | 22 |
| 4. Diskusszió.....                                                                             | 24 |
| 5. Összefoglalás.....                                                                          | 26 |
| 6. Irodalomjegyzék.....                                                                        | 27 |
| 7. Köszönetnyilvánítás .....                                                                   | 30 |
| 8. Tételes szerzői hozzájárulás: .....                                                         | 31 |

## Rövidítések jegyzéke:

|                 |                                                            |
|-----------------|------------------------------------------------------------|
| ABC             | ATP-binding cassette transzporter                          |
| ATP             | adenozin trifoszfát                                        |
| BBB             | (blood-brain barrier) vér-agy gát                          |
| BSA             | borjú szérum albumin                                       |
| °C              | Celsius fok                                                |
| CO <sub>2</sub> | szén-dioxid                                                |
| cm <sup>2</sup> | négyzetcentiméter                                          |
| CSF             | cerebrospinális folyadék                                   |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                         |
| DXM             | dexametazon                                                |
| EBA             | (Evans blue albumin) Evans kék-albumin komplex             |
| EDTA            | Etilén-diamin-tetraecetsav                                 |
| FBS             | (fetal bovine serum) magzati borjú szérum                  |
| hEC             | humán endotélsejt                                          |
| kg              | kilogramm                                                  |
| kHz             | kilohertz                                                  |
| µg              | mikrogramm                                                 |
| mg              | miligramm                                                  |
| ml              | mililiter                                                  |
| µm              | mikrométer                                                 |
| µM              | mikromól                                                   |
| mm              | milliméter                                                 |
| mOsmol/kg       | milliosmol / kilogramm                                     |
| mPas            | millipascal                                                |
| MRP             | multidrog rezisztencia protein                             |
| nm              | nanométer                                                  |
| nM              | nanomól                                                    |
| PFA             | paraformaldehid                                            |
| SF              | nátrium fluoreszcein                                       |
| SLC             | solute carrier szállítófehérje                             |
| TEER            | transzepiteliális vagy -endoteliális elektromos ellenállás |
| TJ              | (tight junction) szoros kapcsolat                          |
| TPGS            | tokoferszolan polimer                                      |
| TX-100          | triton-X 100                                               |
| WHO             | World Health Organization                                  |
| ZO-1            | zonula occludens 1 fehérje                                 |

# 1. Bevezetés

## 1.1. A központi idegrendszeri megbetegedések és gyógyításuk

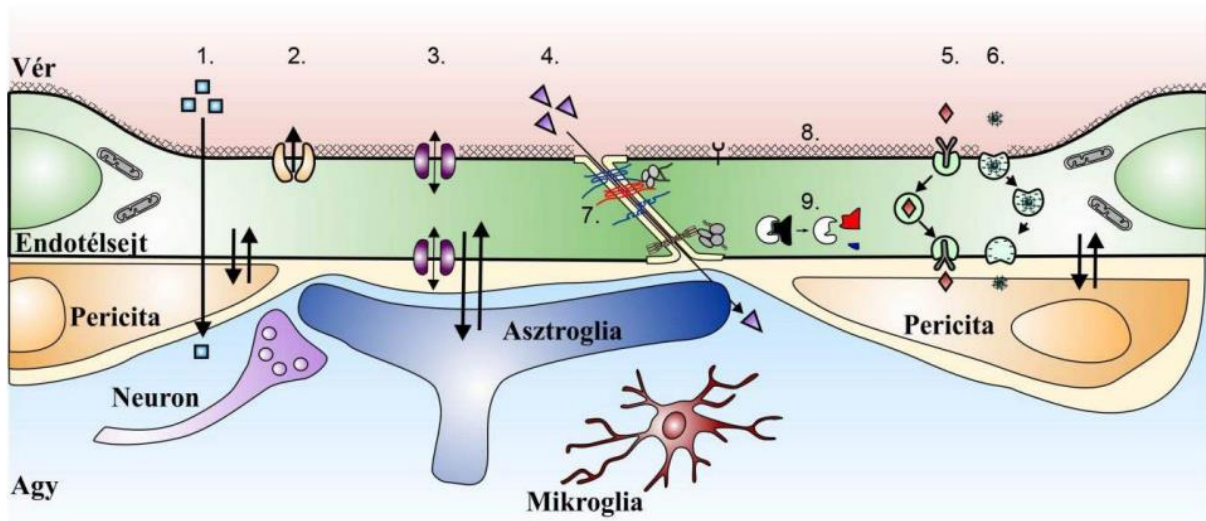
A legfrissebb felmérések alapján mára már megközelítőleg minden harmadik ember szenved valamilyen típusú idegrendszeri megbetegedésben (GBD 2021 Nervous System Disorders Collaborators, 2024). A központi idegrendszerünk egészsége, megfelelő működése elengedhetetlen életfolyamataink teljeskörű elvégzésében. Az idegrendszeri megbetegedéseken belül a neurodegeneratív megbetegedések robbanásszerű növekedésnek indultak az utóbbi évtizedekben. Leginkább a megnövekedett átlagéletkorral együtt járó megbetegedések száma mutat exponenciális növekedést, mint például az Alzheimer-kór, Parkinson-kór vagy sclerosis multiplex, azonban nem elhanyagolható a fiatalokat is nagyszámban érintő depresszió, amivel 2023-ban a Föld lakosságának 5%-át diagnosztizáltak (Depressive disorder, WHO). Ezen adatok is alátámasztják, hogy az agyi megbetegedések teljeskörű kezelése a mai napig egy megoldandó feladat az orvostudomány számára. A vér-agy gát magasfokú szelektivitásából kifolyólag azonban nagyban megnehezíti az agyi megbetegedések kezelését, mivel fizikai és kémiai védőmechanizmusával csökkenti az átjutni képes hatóanyagok mennyiségét.

## 1.2. A vér-agy gát

A vér-agy gát felfedezését a Paul Ehrlich kutatócsoportjában az 1800-as évek végén végzett kísérleteknek köszönhetjük, melyekben festékeket felhasználva megfigyelték, hogy a központi idegrendszert egy ekkor még általuk nem ismert gát választja el a vérkeringéstől, és ezzel a szervezet többi részétől (Saunders és mtsai, 2014). Mára már ismerjük a vér-agy gát élettanilag nélkülözhetetlen szerepét: különféle fizikai és kémiai védelmi rendszerekkel szabályozza a központi idegrendszerbe bejutni képes sejteket, vegyületeket és anyagokat. Azonban ezen védelmi mechanizmusok jelenléte a központi idegrendszeri megbetegedések gyógyszeres terápiáját jelentős mértékben gátolja. A vér-agy gát megnehezíti a hatóanyagok agyba juttatását, aminek következtében az agyi betegségek kezelése korlátozott.

A vér-agy gát egy dinamikus határfelületet képez a központi idegrendszer és a vérkeringés között. Összetettségét kiválóan demonstrálja, hogy felszíne megközelítőleg 12-20 m<sup>2</sup>, és az agyi hajszálerek becsült hossza pedig 600 kilométer (Pardridge, 2002). A vér-agy gát négy lefontosabb feladata a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartása, a tápanyagok agyi bejuttatása, a káros anyagoktól és a kórokozóktól való védelem, és az agy és a szervezet többi része közötti információcsere biztosítása. A vér-agy gátat három fő sejtípus

alkotja (1. ábra) : az agyi mikroerek endotélsejtjei és pericitái, valamint az asztroglia sejtek, melyeknek végtalpai teljes hosszukban körbeveszik az agyi hajszálereket (Abbott, 2002). A periciták jelenléte kifejezetten fontos a vér-agy gát tulajdonságok és a szoros kapcsolatok kialakításában, amit már sikeresen kimutattak *in vitro* modelleken is (Nakagawa és mtsai, 2009). A BBB működésében a legfontosabb szerepe az agyi endotélsejteknek van. A sejtek közötti szoros kapcsolatoknak (tight junctions, TJ) köszönhetően a vér-agy gát transzendoteliális elektromos ellenállása (TEER) az  $500\text{--}2500\text{ Ohm} \times \text{cm}^2$  sávban mozog, ami jóval magasabb a többi mikroér átlagosan  $3\text{--}30\text{ Ohm} \times \text{cm}^2$  ellenállásához képest (Vigh és mtsai, 2021). A szoros kapcsolatok az endotélsejtek között a paracelluláris résben helyezkednek el (1. ábra). A sejtek közötti szoros kapcsolatok felépítésében a klaudin, okkludin és junkcionális adhézíós molekulák vesznek részt, mint integráns membránfehérjék (Deli, 2009). Az agyi endotélsejtek közötti adherens kapcsolatok kadherinekből és a hozzájuk a citoplazmában kötődő kateninekből épülnek fel (Steed és mtsai, 2010).



**1. ábra:** A vér-agy gát szerkezetének és főbb működéseinek sematikus rajza. 1-6: transzportutak a vér-agy gáton keresztül: 1. passzív, lipid-mediált diffúzió, 2. aktív efflux transzporterek, 3. tápanyagszállító fehérjék (kétirányú transzport), 4. sejtek közötti, paracelluláris transzportút, 5. receptor-mediált transzcitózis, 6. adszorptív transzcitózis. Szoros sejt-közötti kapcsolatok (7.), sejt felszíni glikokalix (8.), fázis I és II metabolikus enzimek (9.). (Walter, 2015)

Az endotélsejtek lumenális oldalát vastagon beborító glikokalix réteg (1. ábra) negatív töltésével további védelmi vonalat biztosít (Walter és mtsai, 2021). A vér-agy gáton passzív diffúzióval csak gázok és kisméretű lipofil molekulák (koffein, alkohol, kokain) képesek átjutni (Pardridge, 2005). Az agy fontos tápanyagainak bejuttatását, mint például a cukrok, lipidek, aminosavak vagy vitaminok, az agyi endotélsejtek membránjában elhelyezkedő különféle

szállítófehérjék (SLC fehérjecsalád) végzik (Campos és mtsai, 2014). Továbbá fontos megemlíteni, hogy az ionok átjutása is aktív folyamat, amit transzporterek és ionpumpák látnak el. A vér-agy gát kémiai védelmi vonalát az efflux pumpák alkotják (1. ábra). Ezek az ABC és SLC transzporter családokba tartoznak, ilyen pumpák például a P- glikoprotein vagy az MRP-k. Működésük energaigényes folyamat, mivel az ATP hasításából keletkezett energiát használják fel, hogy egyirányú transzportmechanizmusukkal megakadályozzák a mérgező vegyületek agyi bejutását, illetve az agy felőli oldalról a vérbe juttassanak egyes neuronális metabolitokat vagy gyógyszereket (Terasaki és Ohtsuki, 2005).

Az agy két fő védelmi mechanizmusa, a fizikai gátat alkotó, paracellulárisan elhelyezkedő szoros kapcsolatok, és a kémiai védelmet biztosító efflux pumpák nagyban megnehezítik az idegrendszeri megbetegedések kezelését a gyógyszerek bejutásának akadályozása miatt. Ezt jelzi az is, hogy becslések szerint az Egyesült Államokban felhasznált gyógyszerek mindössze 5%-a képes átjutni a vér-agy gáton és ezekkel a hatóanyagokkal is nagyrészt csak a depresszió, skizofrénia és az álmatlanság kezelhető (Pardridge, 2005).

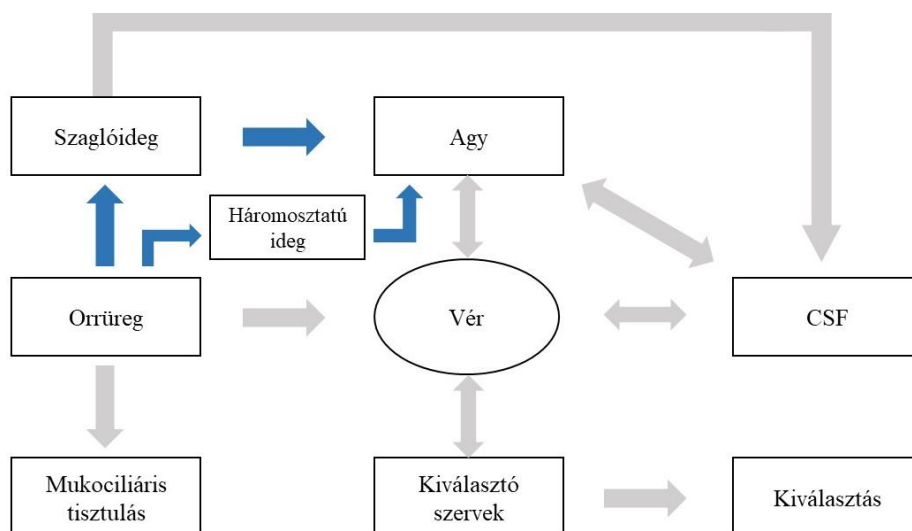
A központi idegrendszerbe való gyógyszerbejuttatás fokozására három fő módszer áll rendelkezésre: 1) vér-agy gáton való transzport útvonalak felhasználása a hatóanyagok kémiai módosításával vagy célzott nanorészecskékkel; 2) a vér-agy gát működésének megváltoztatása (szoros kapcsolatok átmeneti megnyitása, efflux pumpák gátlása); 3) a vér agy gát megkerülése: hatóanyag bevitel közvetlen, invazív módon, illetve a nazális útvonalon keresztül (Deli, 2011). Kísérleteink során olyan formulációkat vizsgáltunk, amelyek alkalmasak lehetnek hatóanyagok agyi bejuttatásának fokozására a vér-agy gát megkerülésével a szaglóhámon keresztül.

### **1.3. Nazális útvonal**

Az orr elsődleges funkciója a kémiai ingerek, vagyis a szag epitópok érzékelése. Emellett elengedhetetlen szerepet tölt be a belélegzett levegő mechanikai és biológiai tisztításában. Anatómiai szempontból az emberi orrüreg három fő területre osztható: a vestibuláris hámra, a légzőhámra és a szaglóhámra (olfaktorikus régió), ez utóbbi felülete emberben megközelítőleg 10 cm<sup>2</sup> (Crowe és mtsai, 2018). A hatóanyagok orrnyálkahártyán keresztüli bejuttatásnak az agyszövetbe két fő transzportútja lehet (2. ábra). Az egyik a direkt útvonal, melynek során a hatóanyag a szaglómezőben található szaglóideg rostok mentén, vagy a légzőhám régiójában lévő háromosztatú ideg rostjai mellett képes eljutni az agyba. A másik lehetőséget pedig az indirekt útvonalak jelentik. Ennek során a hatóanyag az orrnyálkahártya légzőhám régiójában átjut az epitélisejtek rétegén, a szubmukózában található áteresztő

mikroerek endotélsejtjein átjutva pedig bekerül a vérkeringésbe. Az orrnyálkahártya sűrűn erezett, ezért a hatóanyag felvételre kiváló felületként szolgál (3. ábra).

Amint a szisztémás keringésbe jutott hatóanyagok elérik az agyi kapilláris hálózatot, azaz a vér-agy gátat képesek lehetnek áthatolni az endotélsejtek szoros kapcsolatain, így bejutni az agyszövetbe és kifejthetik terápiás hatásukat (2. ábra). További előny még, hogy ezen a gyógyszerbeviteli úton elkerülhetjük a kiválasztó szerveket. Az orrnyálkahártya és a csillószőrök aktív együttműködése, az úgynevezett mukociliáris tisztulás, az orr elsődleges védekező mechanizmusa. A belélegzett levegővel bekerülő idegen részecskék és kórokozók a nyálkahártya felszínén lévő mucin rétegben tapadnak meg. A csillószőrök folyamatos mozgása ezt a nyálkaréteget a garat felé szállítja, ezzel megakadályozva a mélyebb légutakba jutást. Ez a hatékony tisztító mechanizmus azonban korlátozza az orron keresztül történő gyógyszerbevitel hatékonyságát, mivel a gyógyszermolekulák is a nyálkában rekedhetnek és az orrgaratba kerülhetnek, ez pedig csökkenti az ezen az útvonalon történő gyógyszerbevitel hatékonyságát (Hong és mtsai 2019).

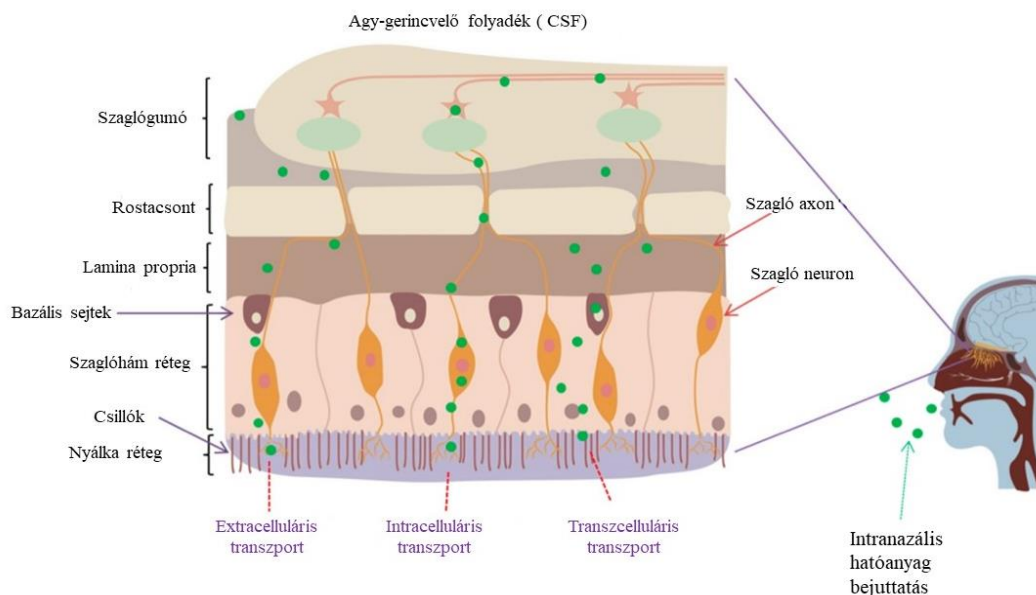


**2. ábra:** Intranazális hatóanyag beadás utáni transzportútvonalt az agyszövetbe. Kék nyíl: direkt útvonal; szürke nyíl: indirekt útvonal (Alam és mtsai, 2010).

Csoportunk korábbi kutatásai során vizsgálta a nazális barrier szerkezetét és a szaglómezőben található szaglóidegek mentén történő jelzőanyag bejutást az agyszövetbe (Wolburg és mtsai, 2008). A szagló neuronok bipoláris idegsejtek, dentritjeik kapcsolatban állnak az orrüreg légterével, sejttestjeik az orr laphámsejtjeik között helyezkednek el, axonjaik pedig a rostacsonton áthatolva a szaglógumóba küldik az ingereket (3. ábra).

A csoport korábbi eredményei igazolták, hogy a tractus olfactorius, azaz szaglóideg-köteg mentén, a nazális útvonal kihasználásával, a vér-agy gát kikerülésével mind

jelzőanyagok, mint a lantán vagy a fluoreszcensen jelzett dextrán (Wolburg és mtsai, 2008; Horvát és mtsai, 2009), mind hatóanyagok, mint a meloxicám (Kürti és mtsai, 2013) bejuttathatók különböző agyterületekre.



**3. ábra:** A szaglópórák felépítése és az orrból az agyba történő közvetlen gyógyszer szállítás lehetséges mechanizmusainak sematikus ábrázolása (Hong és mtsai, 2019).

Végül bármely útvonalon is jut el a hatóanyag az agyszövetbe, elmondható, hogy az intranasális bevitel egy fájdalommentes, nem invazív és viszonylag könnyen kivitelezhető gyógyszerbeadási mód. A nazális útvonal sikeres használhatóságát a hatóanyag bejuttatás szempontjából több évtizede vizsgálják preklinikai szinten (Illum, 2000). Az egyik lehetőséget a nazális formulációkra a hatóanyagok nanopartikulumban való csomagolása jelenti, ezzel növelhetjük a gyógyszerbevitelt. Ezek a nanopartikulumban lehetnek liposzómák, polimer nanopartikulumban, fém nanopartikulumban vagy éppenséggel polimer micellák (Veszélka és mtsai, 2015), ez utóbbi típust használtuk kísérleteinkben.

A hatóanyagok nanopartikulumban való csomagolása több szempontból is előnyös. Egyrészt csökkentjük annak az esélyét, hogy a szervezetbe jutva a molekula lebomlik, ezzel növeljük a hatóanyag eljutásának lehetőségét, továbbá annak gyorsaságát a kívánt területre. A hatóanyagok mellékhatása is mérsékelhető a nanorészecskék alkalmazásával.

#### 1.4. A dexametazon

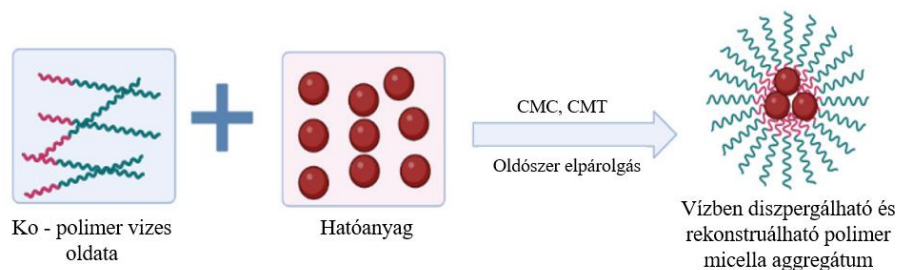
A dexametazon (DXM) egy gyulladáscsökkentő szintetikus glükokortikoid, amit klinikai területen széleskörben használnak (McMachon és mtsai, 2020). Alapvető gyógyszer

autoimmun betegségekben és szemészeti alkalmazása is igen elterjedt. Az agyödéma és számos idegrendszeri megbetegedés kezelésében is sikeresen alkalmazzák (Espinosa és mtsai, 2020). A COVID-19 járvány idején igazolták, hogy a DXM a súlyos betegek csoportjában 8-25%-kal csökkentette a halálozási mutatókat (Johnson és Vinetz, 2020). A DXM hosszútávú, magas dózisú adagolása azonban súlyos mellékhatásokkal járhat, elhízást, depressziót és csonttritkulást is okozhat. Továbbá a DXM jelentős lipofilitása miatt korlátozott vízdékonysággal rendelkezik. Mind a megfelelő oldhatósághoz, felszívódáshoz, mind a mellékhatások csökkentéséhez megfelelő gyógyszerészeti formulálásra van szükség.

A csoport korábbi munkájában már vizsgálta a DXM lipid nanopartikulum alapú formulációját, amit szemészeti célokra állítottak elő. Ebben a kísérlet sorozatban szaruhártya epitelsejt modellen vizsgáltuk a hatóanyag és a nanorészecskébe csomagolt DXM átjutását, valamint a gátmodellre kifejtett hatását (Kiss és mtsai, 2020). A vizsgálatok során igazoltuk, hogy a szemészeti formuláció nem befolyásolta a gátmodell barrier funkcióját, ugyanakkor növelte a DXM hatóanyag átjutását a modellen keresztül.

### 1.5. A polimer micellák

Manapság egyre nagyobb hangsúlyt kap a nanohordozó molekulák kutatása, amelyek kis méretüknek és hatékonyabb oldódási tulajdonságaiknak köszönhetően képesek megnövelni a bejuttatni kívánt hatóanyagoknak a mennyiségét, továbbá fokozzák azok felszabadulásának mértékét. A becsomagolt hatóanyagok biológiai gátrendszereken való átjutását a nanohordozók fiziko-kémiai tulajdonságaik szabják meg mint például a méret, felszíni töltés, alak, szerkezeti összetétel (Sipos és mtsai, 2023). Ezeknek a nanohordozóknak kifejezetten sokféle ko-polimer változata lehet (polietilén-glikol, politejsav, poliakrilsav). A kísérleteink során a hatóanyagot polimer micellába burkoltuk és megvizsgáltuk permeabilitási képességét, továbbá a sejtrétegre kifejtett hatását. A polimer micellákat strukturálisan két részre bonthatjuk: egyrészt rendelkeznek egy hatóanyaggal megtöltött hidrofób maggal, valamint egy hidrophil külső héjjal (4.ábra).



**4. ábra:** Polimer micella felépítésének sematikus ábrája (Sipos, 2023, módosítva)

Egyik legfontosabb tulajdonságuk, hogy nem toxikusak a sejtekre, nem károsítják a sejtmembrán integritását (Zakharova és mtsai, 2019; Katona és mtsai, 2022). Felhasználásuk azért előnyös a hatóanyagszállítás szempontjából, mert olyan hidrofób anyagokat is képesek átjuttatni a membránokon keresztül, amelyek önálló átjutása alacsony. A hatóanyag becsomagolásának további előnye, hogy csökkenthető a biológiai degradációnak a mértéke. Általánosan elmondható a polimer micellákról, hogy méretük 10-100 nm közé esik (Croy és Kwon, 2006), így könnyebben átjuthatnak a különféle biológiai gátrendszeren, ezáltal megnövelve a szövetekbe bejuttatni kívánt hatóanyag mennyiségét.

A kísérleteink során vizsgált formuláció egy dexametazonnal töltött polimer micella volt. Ez a biológiailag lebomló formuláció állatkísérletekben megnövelte a hatóanyag átjutását, ugyanakkor a toxicitása alacsony volt (oral LD50: > 5 g/kg) (Sipos és mtsai, 2023). Hipotóniás tulajdonsága miatt (240 mOsmol/l) abszorpciós képessége is magasabb mintha csak önállóan a dexametazont adagolnánk az orrüregbe. Mivel egy alacsony viszkozitású molekuláról beszélünk (32.5 mPas) célszerű lehet akár klinikai használat folyamán folyadékban oldani, így felhasználható lehet orrspray vagy orrcsepp formában is.

## 1.6 Célkitűzés

A vér-agy gát védőszerepe miatt nagyban megnehezíti a különböző központi idegrendszeri betegségek kezelését, úgymint az Alzheimer-kór, Parkinson-kór, vagy agyi tumorok. A nazális útvonal, azaz az ornyálkahártyán keresztüli agyi hatóanyag bejuttatás, alternatív mód lehet a vér-agy gát kikerülésével ezeknek a betegségeknek a hatékonyabb kezelésére.

Kísérletes munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- 1.) A dexametazon tartalmú nanorészecskék hatásának vizsgálata a nazális epitelsejtek és az agyi endotelsejtek impedanciájára.
- 2.) A dexametazon hatóanyag átjutásának vizsgálata a nazális epithélium és a vér-agy gát humán tenyésztetes modelljén önállóan és nanopartikulum formulációban.
- 3.) A gátrendszerek funkcionális és morfológiai vizsgálata a nanopartikulummal történő kezelés után ellenállás méréssel, permeabilitási vizsgálattal és a sejtközzötti kapcsolófehérjék immuncitokémiai festésével.

## **2. Anyagok és módszerek**

### **2.1. Vegyszerek**

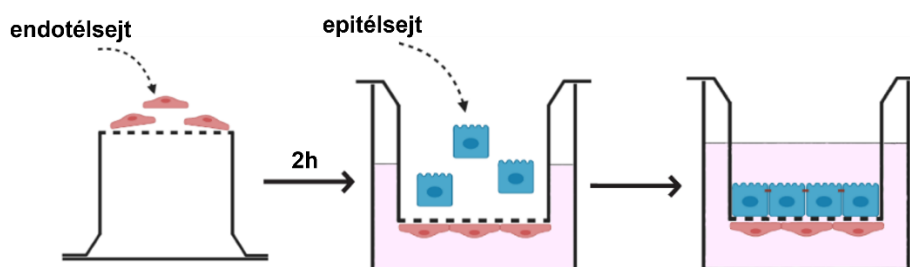
A kísérletek során használt anyagokat és reagenseket a Merck Magyarországtól rendeltük, hacsak másképp nem jelöltük. A dexametazon tartalmú polimer nanopartikulumokat Dr. Sipos Bence biztosította számunkra, amiket az SZTE GYTK Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetében állított elő.

### **2.2. Sejttenyésztés**

#### **2.2.1. Nazális epitélsejtek**

A humán RPMI 2650 (ATCC katalógusszám: CCL 30) orrhámsejteket 10% borjú szérummal (FBS, Pan-Biotech GmbH, Németország) és 50 µg/ml gentamicinnel kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, USA) tápfolyadékban tenyésztettünk 37 °C-os inkubátorban, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A tenyésztőedények felszínét patkányfarok ínból kinyert 0,05% kollagénnel vontuk be steril desztillált vízben, így támogatva a sejtek jobb letapadását és növekedését. A tápfolyadékot 2-3 naponta cseréltük a tenyészeteken. Amikor az RPMI 2650 sejtek megközelítőleg 80-90%-os konfluenciát értek el az edényben, a sejteket 0,05% tripszin és 0,02% EDTA oldattal távolítottuk el a tenyésztőfelszínről. Egy nappal a kísérlet előtt retinsavat (10 µM) és hidrokortizont (500 nM) adtunk a sejtekhez, hogy szorosabb barriert képezzenek (Kürti és mtsai, 2013).

A permeabilitási kísérletekhez a nazális hámsejteket humán vaszkuláris endotélsejtekkel tenyésztettük együtt ko-kultúrában, így létrehozva egy fiziológiásabb barrier modellt, amely reprezentálja mind az orrhámot, mind a szubmukózális vaszkuláris endotéliumot. Az endotélsejteket 5% FBS-sel, 1% endoteliális növekedést elősegítő oldattal (ECGS, Sciencell, USA) és 0,5% gentamicinnel kiegészített endotélsejt tenyésztő tápfolyadékban (ECM, Sciencell, USA) tenyésztettük. A permeabilitási kísérlethez a Transwell sejttenyésztő betétek (Corning, 0,4 µm pórus átmérő, 12 mm átmérő, polikarbonát membrán) felső (luminális) oldalát patkányfarok ínból kinyert 0,05% kollagénnel vontuk be, az alsó (abluminális) felszínét pedig IV. típusú kollagén (100 µg/ml) és fibronektin (25 µg/ml) keverékével, majd fél-fél órán keresztül UV alatt szárítottuk. A ko-kultúra létrehozásához az endotélsejteket a sejttenyésztőbetétek membránjának alsó felszínére passzáltuk  $2 \times 10^4$  sejt/ cm<sup>2</sup> sűrűségben. Ezután a sejteket 2 órán keresztül 37 °C-os inkubátorban tartottuk (5. ábra).



**5. ábra.** A nazális epitél - vaszkuláris endotél ko-kultúra modell összeállítása. 1. lépés: endotélsejtek kirakása az inwert aljára; 2.lépés: 2 óra elteltével az epitélsejtek kirakása az inwert belsejébe; 3. lépés: inwert feltöltése tápfolyadékkal

A sejtek letapadását követően a sejtenyésztió betéteket a 1,5 ml endotél médiumot tartalmazó 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyeztük, majd a nazális epitélsejteket a membrán felső felszínére pipettáztuk  $3 \times 10^5$  sejt/  $\text{cm}^2$  sűrűségben (5. ábra). A tápfolyadékot mindkét kompartmentben 2 naponta cseréltük. A kísérleteket 5 nappal a ko-kultúra összeállítása után végeztük el.

## 2.2.2. Agyi endotélsejtek és periciták

A humán köldökszínórvérből izolált  $\text{CD34}^+$  őssejtekből differenciáltatott vaszkuláris endotélsejteket együttműködő partnerünk Prof. Fabien Gosselet (Université d'Artois, Lens, Franciaország) biztosította számunkra. Az endotélsejteket 5% FBS-sel, 1% endoteliális növekedést elősegítő oldattal (ECGS, Sciencell, USA) és 0,5% gentamicinnel kiegészített endotélsejt tenyésztő tápfolyadékban (ECM, Sciencell, USA) tenyésztettük. A kísérlethez a sejteket 7 passzázsszámmal használtuk fel.

Az agyi pericitákat 0,2%-os zselatinnal bevont Petri-csészékben tenyésztettük DMEM tápfolyadékban 20% FBS-sel, 1% GlutaMAX-szal (Gibco, Life Technologies, USA) és 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicinnel kiegészítve. A kontakt vér-agy gát ko-kultúra modell létrehozásához a pericitákat IV. típusú kollagénnel (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bevont Transwell tenyésztőbetétek (Corning, 0,4  $\mu\text{m}$  pórus átmérő, 12 mm átmérő, polikarbonát membrán) alsó oldalára passzáltuk  $1,8 \times 10^4$  sejt/ $\text{cm}^2$  sűrűségben. A periciták letapadásához inkubátorban tartottuk őket 3 órán keresztül, 37 °C-on. Ezután a tenyésztőbetéteket 12-lyukú, endotélsejt tápfolyadékot (1,5 ml) tartalmazó tenyésztő lemezbe helyeztük. Az endotélsejteket a tenyésztőbetét felső, IV. típusú kollagénnel (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) és fibronectinnel (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bevont oldalára passzáltuk  $6 \times 10^4$  sejt/ $\text{cm}^2$  sűrűségben, endotélsejt tápfolyadékban (0,5 ml). A tápfolyadékot mindkét kompartmentben kétnaponta cseréltük. Négy nap elteltével az alsó kompartmentben lecseréltük a tápfolyadékot, a felső, vér felőli kompartmentet pedig 48 órán keresztül vár-agy gát érést elősegítő

kismolekulákat tartalmazó tápfolyadékkal kezeltük. A kísérleteket 6 nappal a ko-kultúra összeállítása után végeztük el.

### 2.3. Sejtrétegek impedancia vizsgálata

A sejtek állapotában bekövetkező változásokat impedancia mérésen alapuló valós idejű sejtanalízissel követtük nyomon (xCELLigence RTCA-SP, Agilent, USA). A módszer előnye, hogy jelzőmolekulák felhasználása nélkül, valós időben ad információt a sejtek állapotáról, ebbe beleértve azok letapadását, növekedését és életképességét, akár hosszabb időn keresztül (6. ábra). A nazális epitelsejtek vizsgálatához az integrált arany elektródákkal ellátott 96-lyukú lemezeket (E-plate 96; Agilent,) 0,05% I. típusú kollagénnel vontuk be. Az epitelsejteket  $3 \times 10^4$  sejt/lyuk sűrűségben passzáltuk a lemezbe. Az agyi endotelsejtek vizsgálatához a lyukakat 0,2%-os zselatinnal vontuk be és  $6 \times 10^3$  sejt/lyuk sűrűségben passzáltuk a sejteket a lemezekbe.



**6. ábra.** RTCA-SP valós idejű sejtanalizáló műszer (ACEA, [www.aceabio.com/products/rtcasp](http://www.aceabio.com/products/rtcasp)).

A sejtek kirakása előtt lemértük az üres, sejtmentes tápfolyadék háttérimpedanciáját. A műszer a sejtréteg integritást egy mértékegység nélküli paraméterrel, a sejtindekszel fejezi ki, amely a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok erősségével korrelál. A sejtindeket az  $(R_n - R_b)/10$  képlet alapján számoltunk ki, ahol  $R_n$  az adott lyukban a sejtek és az elektródák közti impedancia értéke,  $R_b$  pedig a sejtmentes tápfolyadék háttérimpedanciája. A sejtréteg impedanciáját 10 kHz-en, 10 percenként mértük amíg konfluens sejtréteget nem alkottak (plató fázis), majd a kezelést követő, kísérleti fázisban a mérés frekvenciáját 5 percre módosítottuk. A sejtindek értékeket a kezelés előtti utolsó időpontra normalizáltuk. A kísérlet során a konfluens tenyészeteket a nanoformuláció és annak összetevőinek 10-, 30-, és 100×-os hígításaival kezeltük tápfolyadékban, ezután 3 órán keresztül követtük nyomon a sejtek

állapotában bekövetkező változásokat. A teljes sejtpusztulás kontrolljaként 0,1% Triton X-100 (TX-100) detergenst tartalmazó tápfolyadékkal kezeltük meg a sejteket.

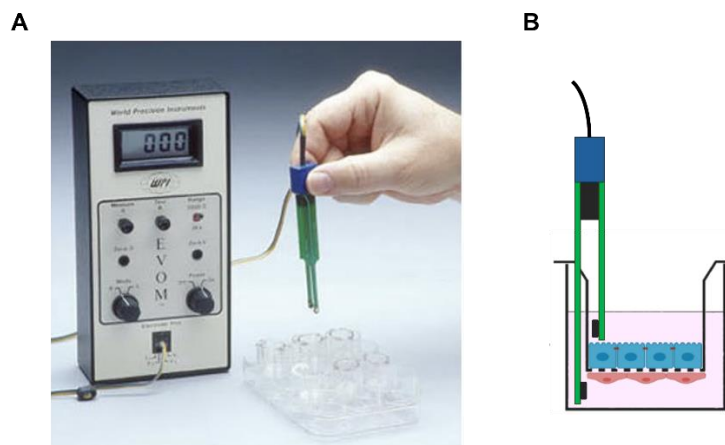
## **2.4. Permeabilitási kísérlet**

Megvizsgáltuk a nanoformulációba csomagolt és önálló DXM átjutását a nazális epitélium és a vér-agy gát tenyészetes ko-kultúra modelljén 0,5 és 1 óra alatt. Ehhez a sejtes tenyésztőbetéteket áthelyeztük egy új lemezbe, amelynek lyukai 1,5 ml steril, 37 °C-os Ringer-HEPES oldatot (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,5 mM D-glükóz, 20 mM Hepes, pH 7,4) tartalmaztak (akceptor kompartment). A felső (donor) folyadéktérbe 0,5 ml DXM vagy a nanoformuláció 10×-es hígítását tartalmazó Ringer-HEPES oldatot pipettáztunk. Mindkét kezelési csoportban 50 µg/ml volt a dexametazon koncentrációja. A tenyésztőedényeket 1 órán keresztül 37 °C-on CO<sub>2</sub> inkubátorban síkrázó készüléken (120 fordulat/perc; OS10 síkrázó, BioSan, Lettország) tartottuk, ezzel biztosítva az oldatok folyamatos mozgását, ami a permeabilitásmérés fontos része (Youdim és mtsai, 2003). Az első fél óra elteltével a kezelést tartalmazó tenyésztőbetéteket egy új, friss Ringer-HEPES oldatot tartalmazó lemezbe tettük át, és további fél órán át folytattuk a kísérletet. Amikor letelt az egy óra, eppendorfokba összegyűjtöttük a mintákat a felső (1 óra) és alsó (0,5 és 1 óra) folyadéktérből. A minták dexametazon koncentrációját HPLC műszerrel mérték vissza együttműködő partnereink.

## **2.5. A modellek gátműködésének vizsgálata a permeabilitási kísérlet után**

### **2.5.1. Transzepiteliális és-endoteliális elektromos ellenállás (TEER)**

A paracelluláris útvonalon keresztüli szabad anyagátjutást nagymértékben korlátozzák a sejtek közötti szoros kapcsolatok. A tenyésztőbetéteken mért transzepiteliális vagy -endoteliális elektromos ellenállás értéke a sejtek közötti szoros kapcsolatok ionokkal szembeni áteresztőképességét mutatja. A nazális epitél és a vér-agy gát ko-kultúrák sejtrétegeinek ellenállásértékeit EVOM rezisztencia-mérővel és STX-2 elektródákkal (World Precision Instruments, USA) mértük (7. ábra) a tápfolyadék cseréje előtt minden második nap.



**7. ábra.** A) EVOM rezisztencia mérő készülék a hozzácsatlakoztatott STX-2 elektródával és a B) tenyésztőbetétben történő sejtréteg elektromos ellenállás mérésének sematikus ábrája.

A TEER értékekből levontuk a tenyésztő betéteken sejtek nélkül mért ellenállásértékek átlagát ( $\sim 100 \Omega \times \text{cm}^2$ ), majd a tenyésztőmembrán felszínéhez viszonyítva ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ) átlagoltuk és ábrázoltuk a TEER értékeket. Az ellenállás mérést a permeabilitási kísérletek előtt és közvetlenül utána is elvégeztük.

### 2.5.2. Jelzőmolekulák permeabilitása

A sejtréteg szorosságát két olyan jelző molekulával vizsgáltuk, melyeknek fiziológiai körülmények között alacsony az átjutási képessége a sejtréteken keresztül. Az egyik jelzőmolekulánk a fluoreszcein (SF) volt, ami paracellulárisan képes átjutni a sejtréteken, a másik pedig az Evans kék albumin (EBA), amelyre pedig a transzcelluláris transzport jellemző. A dexametazont tartalmazó kezelőoldatok eltávolítása után a tenyésztőbetéteket 1,5 ml Ringer-HEPES oldatot tartalmazó új, 12 lyukú tenyésztőlemezbe helyeztük. Az apikális folyadéktérbe 0,5 ml Ringer-Hepes oldatot pipettáztunk, amely SF (10  $\mu\text{g/ml}$ ) és EBA (1 mg/ml BSA + 167,5  $\mu\text{g/ml}$  Evans-kék) jelzőanyagokat tartalmazott, majd a tenyésztőedényeket fél órán keresztül 37 °C-on  $\text{CO}_2$  inkubátorban síkrázó készüléken tartottuk. Fél óra után összegyűjtöttük az alsó folyadéktérből a mintákat és a jelzőanyagok fluoreszcenciáját Fluorolog 3 spektrofluorométerrel (Horiba Jobin Yvon) meghatároztuk. A fluoreszcein emisszióját 485 nm hullámhosszon történő gerjesztést követően 520 nm-en, míg az EBA elnyelését 584 nm-en történt gerjesztés után 680 nm-en mértük. A jelzőanyagok koncentrációját standard kalibrációs görbék segítségével határoztuk meg. A látszólagos permeabilitási együtthatókat ( $P_{\text{app}}$ ) a korábban leírtak szerint számoltuk ki (Veszélka és mtsai, 2018) a következő egyenlet segítségével:

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = \frac{\Delta[C]_A \times V_A}{A \times [C]^D \times \Delta t}$$

ahol  $[C]_A$  a jelzőanyag abluminális koncentrációja,  $V_A$  az abluminális kompartment térfogata (1,5 ml),  $[C]^D$  a jelzőanyag koncentrációja a donor kompartmentben a kezelés kezdetén,  $A$  permeabilitáshoz rendelkezésre álló felszín (1,12 cm<sup>2</sup>) és  $\Delta t$ : a mérés során eltelt idő (0,5h).

### 2.5.3. Immuncitokémia

A permeabilitási kísérletek után a sejteket 15%-os paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk. Ezután a sejteket háromszor megmostuk PBS-sel, majd 0,2% TX-100 oldattal 10 percig permeabilizáltuk a sejteket. Ismételt mosást követően 3% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-ben blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket egy órán keresztül.

A nazális epitelsejtek sejtkapcsoló struktúráinak festéséhez nyúl anti- $\beta$ -katenin (1:200, AB\_476831), az agyi endotelsejtekhez nyúl anti-ZO-1 (1:200, AB\_138452) elsődleges ellenanyagot használtunk, amit a blokkolóban hígítva adtunk a sejtekhez, majd 4 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Másodlagos ellenanyaggal történő festéskor Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot (1:400, AB\_258792) használtuk sejtmagfestékkel (Hoechst 33342; 1  $\mu$ g/ml) kombinálva, szobahőmérsékleten egy órán keresztül. Az egyes lépések között a sejteket háromszor mostuk PBS-ben. A sejttenyésztő betétekből kivágott membránokat tárgylemezre helyeztük és Fluoromount-G reagens (Southern Biotech) segítségével rögzítettük. A mintákról Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Németország) konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket.

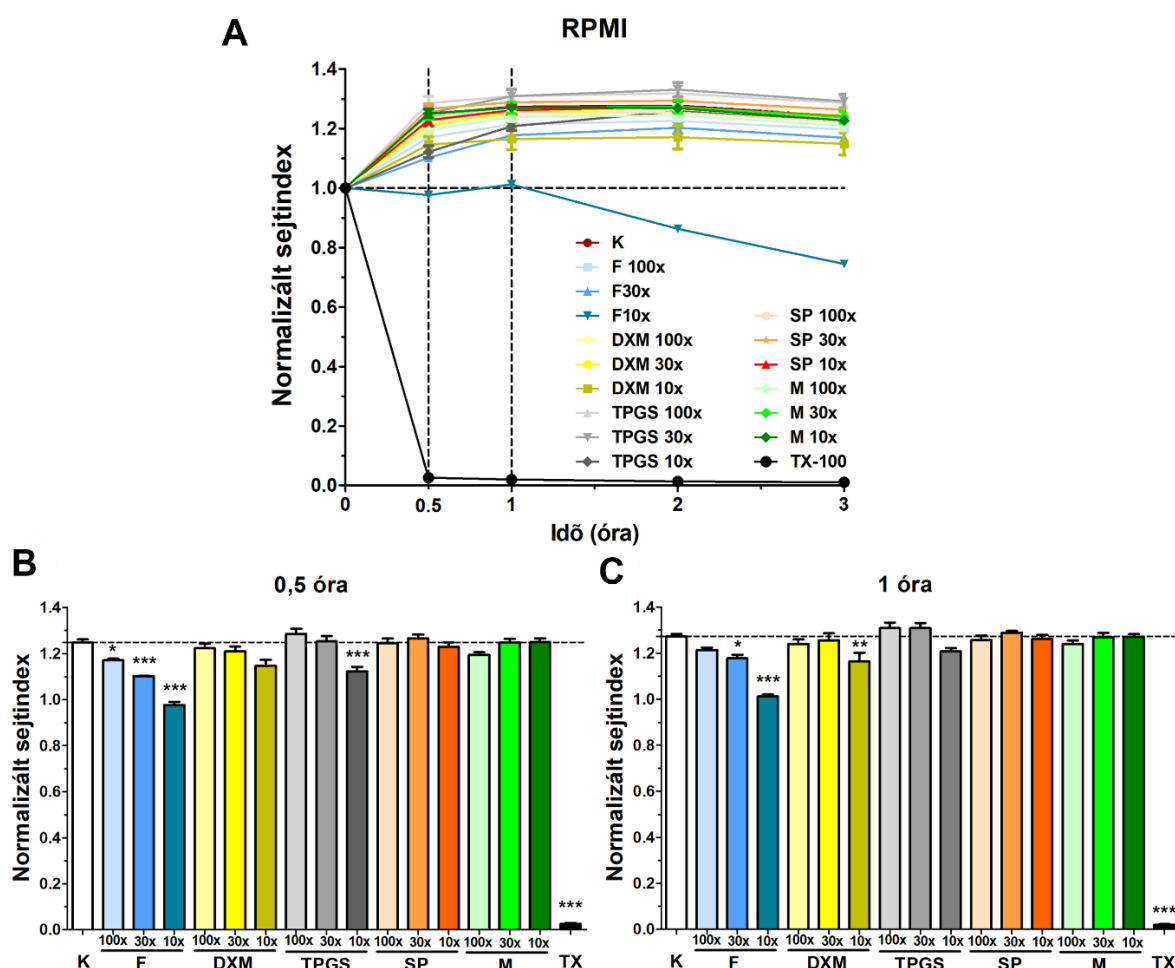
### 2.6. Statisztikai kiértékelés

Az adatok statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk. A kísérletekben kapott adatokat átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. Az egyes kezelési csoportok közötti különbségeket kétutas ANOVA-t követően Bonferroni-teszttel elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a  $P < 0.05$  értékeket tekintettük. A kísérleteket kétszer ismételtük, ezenfelül kísérletenként minimum kettő párhuzamos mintát használtunk.

### 3. Eredmények

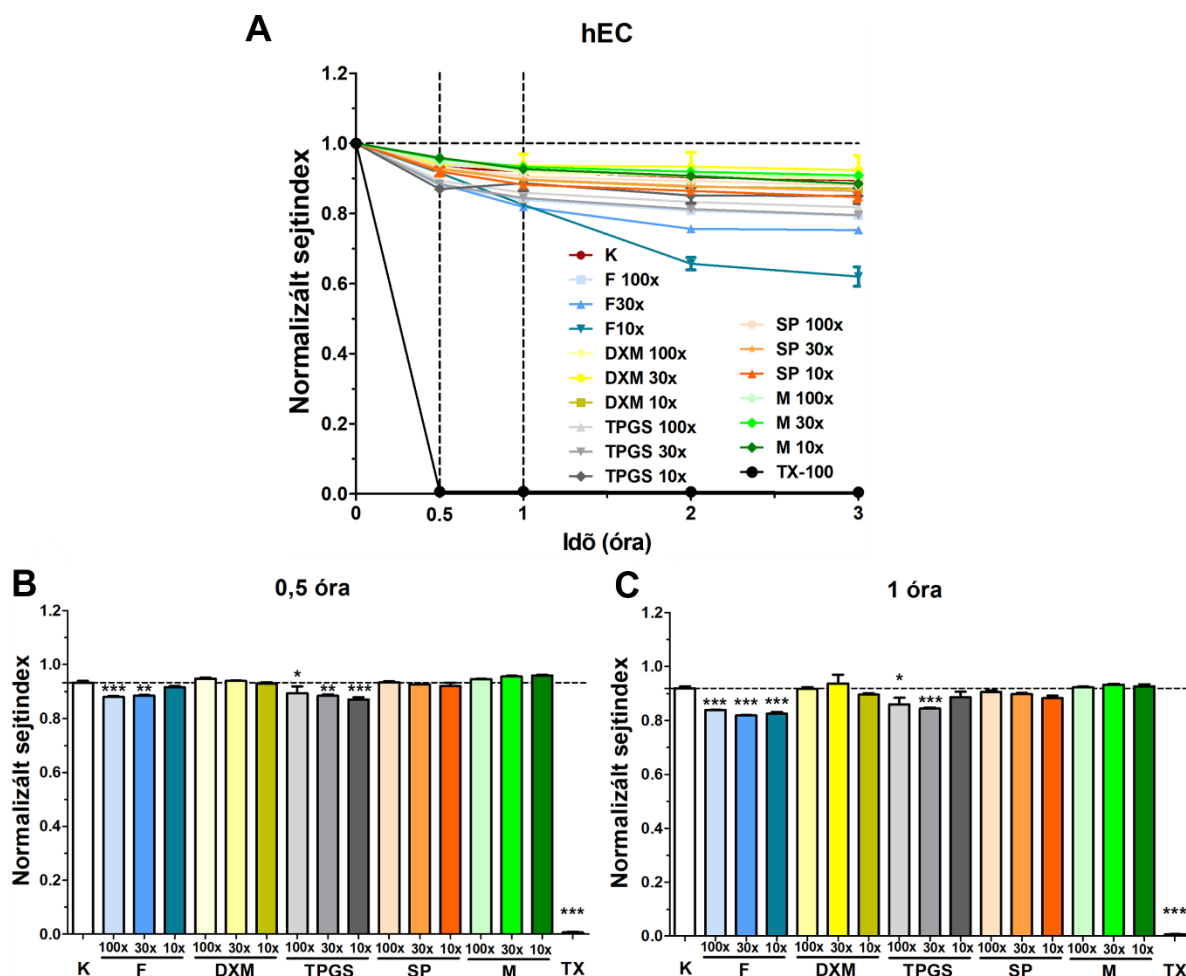
#### 3.1. Sejtrétegek impedancia vizsgálata

Első lépésként megvizsgáltuk a polimer micellába csomagolt dexametazon, és annak minden komponensének hatását az agyi endotél- és a nazális epitelsejt-rétegek életképességére, letapadására, folyamatosságára, amit impedancia méréssel követtünk nyomon valós időben. Amikor a sejtrétegek konfluensé váltak és impedanciájuk nem növekedett tovább, azaz elérte a platófázist, a vizsgált anyagok különböző hígításaival (10×, 30×, 100×) kezeltük meg az egyes csoportokat. Az endotél és epitelsejtek kezelését követő három órában vizsgáltuk a sejtréteg állapotában bekövetkező változásokat. A nazális epitelsejtek esetében a formuláció és a tokoferszolan polimer (TPGS) 10×-es hígítása fél óra elteltével csökkentette a sejtingexet a kontroll csoporthoz képest (8. ábra A-C).



**8. ábra.** Az RPMI nazális epitelsejtek állapotának monitorozása valósídejű impedancia méréssel a nanoformuláció és az összetevők különböző hígításaival (100×, 30×, 10×) történő kezelés után. **A)** A sejtek állapotának kinetikai változása az idő függvényében. Szaggatott vonallal jelöltük a **B)** 0,5 és **C)** 1 órási időpontokat valamint a normalizált sejtingex 1 értékét. K: kontroll, F: formuláció, DXM: dexametazon, TPGS: tokoferszolan polimer, SP: Soloplus, M: mannit, TX: TX-100. A kezelés hatását az impedanciára normalizált sejtingexként ábrázoltuk (átlag±SD, n = 6-8/csoport). Statisztikai próba: egyutas Anova és Dunnett teszt. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 a kontroll csoporthoz hasonlítva.

Azonban a kinetikát megnézve láthatjuk, hogy ez az eltérés nem sejtpusztulást tükröz, a sejtinдекс nem csökken a kezelést követő fél és egy órában (8. A ábra), ellentétben a negatív kontrollként használt TX-100 detergenssel, amely teljes sejtpusztulást idézett elő (8. ábra A-C). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a nazális sejtek érzékenyebbek a formulációra, illetve összetevőjére, a TPGS-re, amely a sejtkapcsolatok megnyílását idézte elő.



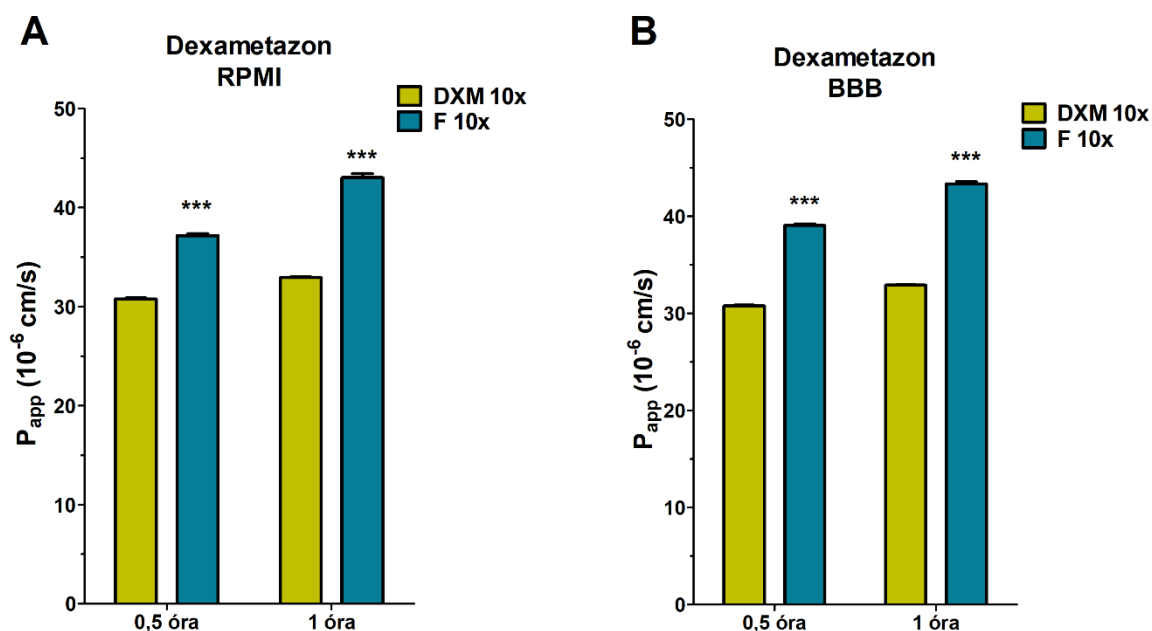
**9. ábra. A)** Az agyi endothelsejtek állapotának monitorozása valósídejű impedancia méréssel a nanoformuláció és az összetevők különböző hígításaival (100×, 30×, 10×) történő kezelés **B)** 0,5 óra és **C)** 1 óra után. K: kontroll, F: formuláció, DXM: dexametazon, TPGS: tokoferszolan polimer, SP: Soloplus, M: mannit, TX: TX-100. A kezelés hatását az impedanciára normalizált sejtinдексként ábrázoltuk (átlag±SD, n = 6-8/csoport). Statisztikai próba: egyutas Anova és Dunnett teszt. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 a kontroll csoporthoz hasonlítva.

Az agyi endothelsejtek esetében a sejtinдекс enyhébb csökkenését tapasztaltuk a formuláció és TPGS kezelés hatására fél és egy óra elteltével a kontrollhoz képest (9. ábra), azonban ez a csökkenés nem a sejtek pusztulását tükrözi, hanem a sejtek közötti kapcsolatok

enyhe megnyílását. Összehasonlításképpen a referencia vegyületként használt TX- 100 detergens teljes sejtpusztulást okozott már fél óra elteltével.

### 3.2. A dexametazon átjutása a gátmodellek sejtrétegein

Az önálló és a nanopartikulumba csomagolt DXM hatóanyag átjutását megvizsgáltuk a humán nazális és a vér-agy gát humán tenyészetes modelljein fél- és egy órás időpontokban (10. ábra). A kezelést követően mind az önálló, mind a nanoformulációba csomagolt DXM magas permeabilitási értékeket mutatott mindkét modell esetében (10. ábra), mindkét időpontban. A kontroll csoporthoz képest magasabb hatóanyag átjutást mértünk a formulációk esetében, amely a nazális epitelsejtek esetében fél óránál és egy óránál 19 és 30%-kal volt magasabb, az agyi endotelsejteknel pedig ugyanebben a két időpontban 30-30%-kal (10. ábra).



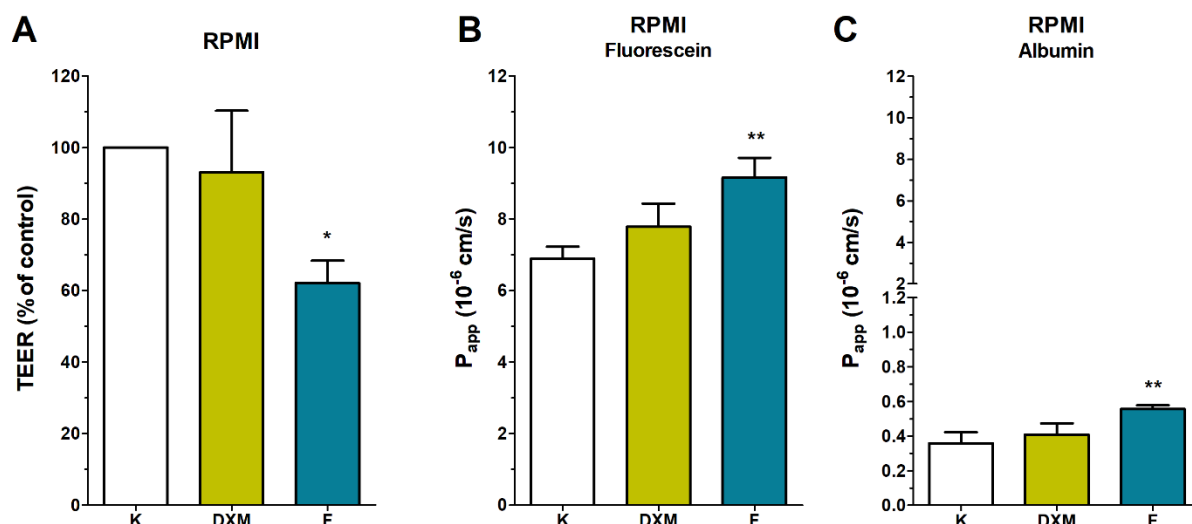
**10. ábra.** Az önálló (DXM 10×) és nanopartikulumba csomagolt dexametazon (F 10×) átjutása **A)** a nazális epitélium és **B)** agyi endotél sejtrétegén keresztül 0,5 és 1 óra alatt. P<sub>app</sub>: látszólagos permeabilitási együttható, K: kontroll, F: formuláció. n= 4. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. \*\*\*p<0,001, a kontroll csoporthoz hasonlítva.

### 3.3. A sejtrétegek szorosságának vizsgálata a permeabilitási vizsgálat után

#### 3.3.1. Transzepteliális és endoteliális elektromos ellenállás és permeabilitás vizsgálat

Az egy órás DXM permeabilitási kísérlet után ellenőriztük a nazális és az agyi endotelsejt-rétegek szorosságát (TEER) mérésel, valamint két különböző méretű vízdoldékony jelzőmolekula sejtrétegén keresztüli átjutásával. Az egy órás nanoformuláció kezelést követően a nazális epiteliális sejtréteg szorossága lecsökkent a kontroll csoporthoz képest. A sejtréteg TEER értéke a kontroll csoport 60%-ára esett le (11.A ábra), míg a passzív paracelluláris

transzport kisméretű jelzőmolekulájának, az SF-nek, illetve a nagyobb molekulásúlyú EBA-nak a fél órás permeabilitási értékei szignifikánsan megnöttek (11.B-C ábra). A DXM-al kezelt csoportok sejtréteg ellenállás értékei, illetve a jelzőmolekulák permeabilitási értékei nem változtak az egy órás kezelést követően a kontroll csoporthoz képest (11.ábra).

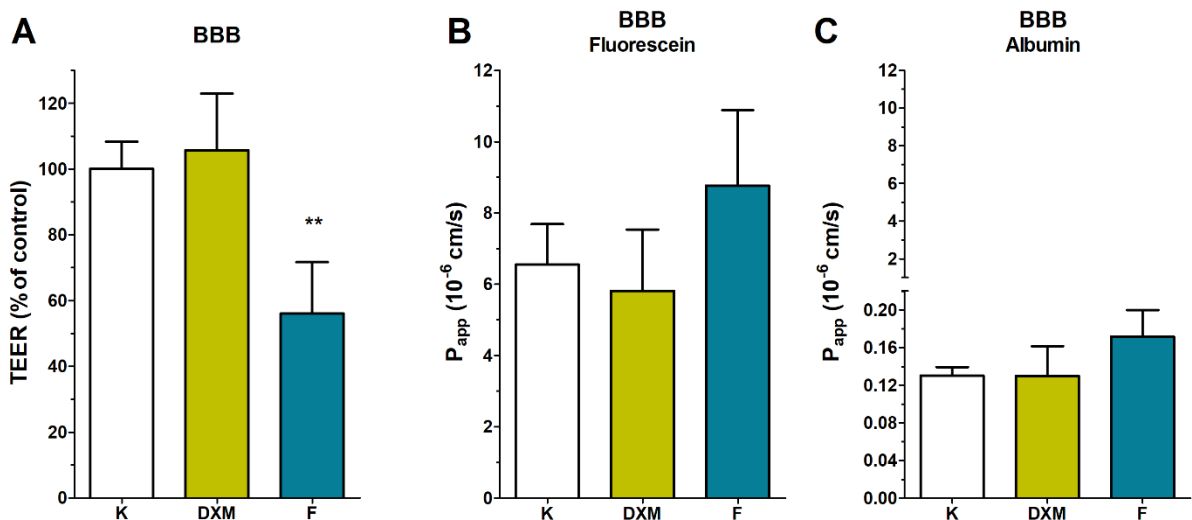


**11. ábra. A)** A nazális epitelsejtek transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) értékei valamint permeabilitási értékei **B)** a kis molekulásúlyú fluoresceinre és **C)** a nagy molekulásúlyú Evans-kék jelölt albuminra az 1 órás hatóanyag kezelést követően. A TEER értékeket a kontroll százalékában adtuk meg. Az értékeket átlag  $\pm$  SD-ként ábrázoltuk,  $n = 3-4$ /csoport. Statisztikai próba: egyutas Anova és Dunnett teszt. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz hasonlítva.

Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a formuláció alacsony szinten, de megváltoztatta a gátréteg átjárhatóságát: megnyitotta a sejtek között lévő szoros kapcsolatokat (TEER és fluoreszcein átjutás) és a transzcitotikus útvonalat is (albumin átjutás).

Az egy órás nanoformulációval történő kezelés jelentősen csökkentette a vér-agy gát modell endotél sejtrétegének integritását (12.ábra). Ezt a hatást a transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) értékének közel 50%-os csökkenése (12. A ábra) valamint az SF és az EBA sejtrétegen keresztüli átjutásának növekvő tendenciája támasztja alá, azonban ez statisztikailag nem volt szignifikáns (12. B-C ábra).

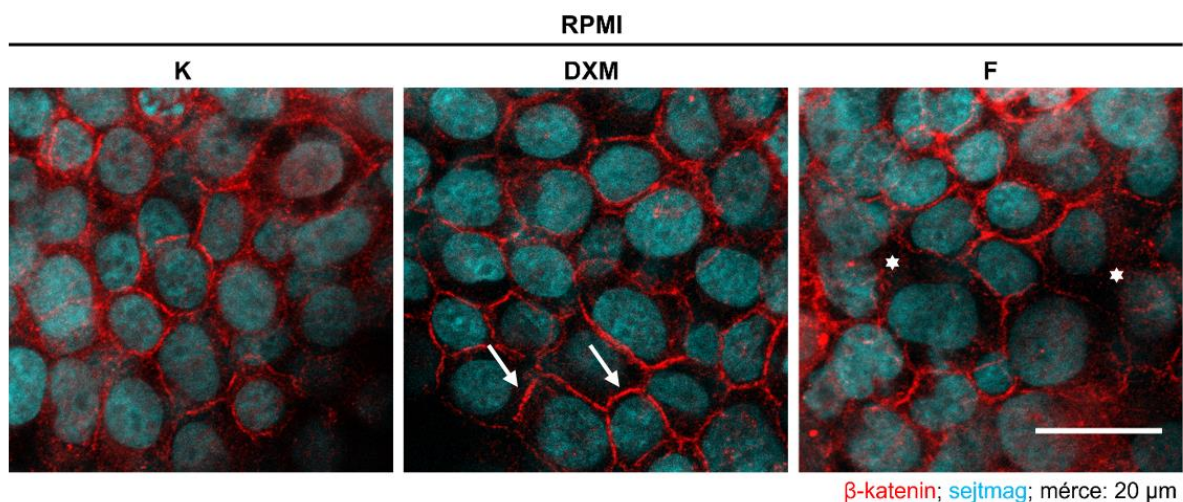
A DXM kezelés nem változtatta meg az agyi endoteliális sejtréteg szorosságát a kontroll csoporthoz képest, ahogy azt a TEER és permeabilitási értékek mutatják (12. ábra).



**12. ábra.** A humán vér-agy gát modell (BBB) **A)** transzendentoteliális elektromos ellenállás (TEER) értékei valamint permeabilitási értékei **B)** a kis molekulásúlyú fluoresceinre és **C)** a nagy molekulásúlyú Evans-kék jelölt albuminra az 1 órás hatóanyag kezelést követően. A TEER értékeket a kontroll százalékában adtuk meg. Az értékeket átlag ± SD-ként ábrázoltuk, n = 3-4/csoport. Statisztikai próba: egyutas Anova és Dunnett teszt. \*\*p<0,01, a kontroll csoporthoz hasonlítva.

### 3.3.2. Immuncitokémia

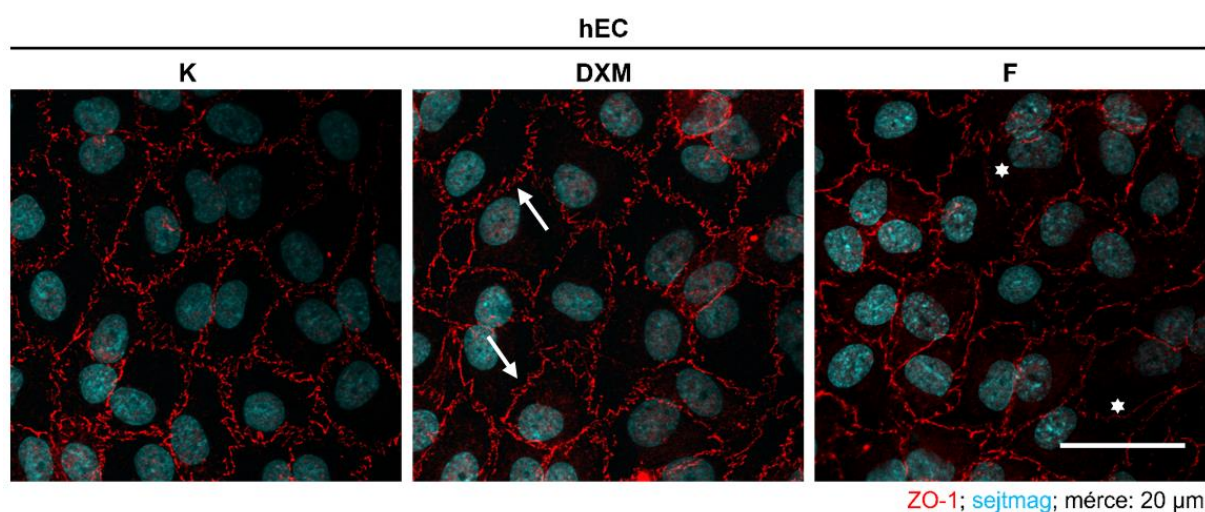
A nazális epitelsejtek közötti kapcsolófehérjék szerkezetének vizsgálatához a  $\beta$ -katenint, az adherens kapcsolatok linker fehérjéjét, immunfestéssel tettük láthatóvá (13. ábra). A dexametazon kezelés következtében a  $\beta$ -katenin festődése a sejtek határvonalán élesebbé vált, melyből arra következtethetünk, hogy a kezelés megerősítette az adherens kapcsolatok szerkezetét a kontroll csoporthoz képest.



**13. ábra.** A nazális epitelsejtek (RPMI)  $\beta$ -katenin kapcsoló fehérjéinek immunfestése az 1 órás dexametazon és nanoformuláció permeabilitási kísérlet után. Ciánkék: sejtmag, piros:  $\beta$ -katenin, mércé: 20  $\mu$ m. Nyíl: a festődés mintázata élesebbé, folytonosabbá vált a sejtek határára Csillag: az immunfestés gyengül a sejthatáron és megjelenik a sejtek citoplazmájában.

Ezzel ellentétben, a nanoformuláció hatására a  $\beta$ -katenin a sejtek citoplazmájában vált jobban megfigyelhetővé, ami egy sejten belüli fehérje átrendeződésre utal. Ez a megfigyelés is alátámasztja a megnövekedett jelzőanyag átjutást, valamint a csökkent TEER értékeket (12. ábra).

Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok szerkezetének vizsgálatához a szoros kapcsolat asszociált citoplazmatikus ZO-1 linker fehérjét festettük meg az egy órás hatóanyag és nanoformuláció permeabilitási kísérlet után. A DXM kezelés hatására a sejtek határán elhelyezkedő ZO-1 fehérje festődési mintázata élesebbé vált a kontroll csoportéhoz képest (14. ábra).



**14. ábra.** A humán agyi endotélsejtek (hEC) zonula occludens-1 (ZO-1) kapcsoló fehérjéinek immunfestése az 1 órás dexametazon és nanoformuláció permeabilitási kísérlet után. Ciánkék: sejtmag, piros: zonula occludens-1, mérce: 20  $\mu$ m. Nyíl: az immunfestés erősödik a sejthatáron. Csillag: az immunfestés elhalványulása a sejthatáron

A nanoformuláció kezelés a sejthatárokon az RPMI epitélsejtek közötti kapcsolófehérjék festődésének elvékonyodását, intenzitásának csökkenését okozta, azonban ez a hatás kisebb volt agyi endotélsejteken. Ez a különbség a tenyészetes gátmodellek között megfigyelhető volt a jelzőmolekula átjutásban is.

## 4. Diszkusszió

A biológiai gátrendszerek az egyik legfontosabb védelmi vonalai az emberi szervezetnek. Ezen védelmi vonalak legfőbb funkciója, hogy megakadályozzák a káros anyagok és mikroorganizmusok bejutását a szervezetbe, ezzel megelőzve az esetleges megbetegedéseket. A fontosabb gátrendszerek közé tartozik például a bőr, a szem szaruhártyája, illetve a kísérleteinkben vizsgált ornyáلكahártya és a vér-agy gát, melyek felületén az intranazálisan beadott hatóanyagok átjutása zajlik. A modern gyógyszerkutatás során fontos feladat a gyógyszerhatóanyagok agyba való bejutásának és hatásainak vizsgálata sejtenyészetes modelleken. Munkánk során két ko-kultúra modellt alkalmaztunk, az egyik rendszer a vér-agy gát, a másik pedig az ornyáلكahártya modellje volt. Ezeken a csoport által régóta használt és korábban jól jellemzett modelleken vizsgáltuk a dexametazon és a nanohordozóba csomagolt dexametazon hatásait.

A humán sejtés vér-agy gát és nazális epitélium modelleken végzett kísérleteink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az önálló dexametazon kezelés nem eredményezett szignifikáns változást a sejtréteg szorosságában. Ezt a megállapítást egyrészt a változatlan TEER értékekből vontuk le. A módszer során a sejtréteg elektromos ellenállását vizsgáltuk, ami kísérletes körülmények között a nátrium ion átjutást jelenti. A TEER értékek a kontrollhoz hasonlítottak mind két modell esetében, ami azt jelenti, hogy a dexametazon kezelés hatására nem változott a sejtközötti kapcsolatok szorossága. A másik mérésünk során olyan jelzőmolekulák átjutását vizsgáltuk, amelyeknek fiziológias körülmények között alacsony a permeabilitása. Az egyik jelzőanyagunk a vízóldékony fluoreszcein volt, ami paracellulárisan, vagyis a sejtek közötti úton képes átjutni a sejtrétegen (Deli és mtsai, 2005). A másik pedig a szérum albumin, amit Evans kék festékkel komplexáltunk, ez pedig a transzcelluláris transzportút markere (Abbott és mtsai, 2006). Ezeknek a permeabilitási jelzőmolekuláknak az átjutását mind a kontroll, mind a dexametazon csoportokon megmértük és eredményeinkből azt állapítottuk meg, hogy a dexametazonnal való kezelés következtében nem volt magasabb a jelzőmolekula átjutása. Az immuncitokémiai festések vizsgálata során a  $\beta$ -katenin és a ZO-1 fehérjék intenzívebb és lokalizáltabb festődési mintázata a tenyészetek bizonyos területein a sejtek közötti kapcsolatok megerősödésére utalt. Azonban a morfológiai megfigyeléseket nem tükrözték a funkcionális eredmények. Ez a megfigyelés összhangban áll a csoport korábbi munkájával, amelyben a szaruhártya emberi epitelsejtes modelljén vizsgáltuk a dexametazon és annak nanolipid formulációinak hatását (Kiss és mtsai, 2020). A dexametazon ebben a tenyészetes gátmodellben sem változtatta meg a gát szorosságát. Legfontosabb eredményünk,

hogyan a polimer micellákba csomagolt dexametazon jobban átjutott az orrnyálkahártya és a vér-agy gát tenyészetes modelljein, mint az önálló hatóanyag. Egy másik, nanolipid partikulum típussal a csoport hasonló megfigyelést tett szaruhártya modellen (Kiss és mtsai, 2020). Ezek az adatok alátámasztják azt a szakirodalmi véleményt, hogy a nanorészecskék ígéretes gyógyszerformák lehetnek nazális és szemészeti hatóanyagok jobb bejuttatáshoz.

A gátrendszeren keresztüli abszorpció és penetráció fokozása több mechanizmussal valósulhat meg. A csoport korábban gyógyszerészeti segédanyagok vizsgálata során igazolta, hogy a cukorészterek egyszerre fokozzák a jelző- és hatóanyagok átjutását bélepitelsejt modellen a szoros kapcsolatok megnyitásával és a sejtmembrán fluiditás növelésével (Kiss és mtsai, 2014). A nanopartikulumba csomagolt dexametazonnal kezelt modelleken a sejtréteg szorosságának csökkenését, a sejtkapcsolatok szerkezetének megváltozását figyeltük meg. A nazális epitelsejt modellen csökkent az impedancia és a TEER, és ezzel párhuzamosan növekedett a jelzőmolekulák átjutása. Ez egyértelműen a sejtkapcsolatok megnyílására utal, amit a sejtmorfológiai adataink is alátámasztottak. A vér-agy gát modellen az impedancia és TEER szintén csökkent, de a jelzőanyagok átjutása nem változott. Mivel a ZO-1 sejtkapcsoló fehérje festődése sem különbözött jelentősen a kontroll csoportéhoz képest, azt feltételezzük, hogy agyi endotelsejteken a permeabilitást fokozó hatás mögött sejtmembránváltozás állhat.

Kíváncsiak voltunk, hogy a formuláció melyik komponense van a legnagyobb hatással a modellek gátműködésére. Az impedancia kinetika vizsgálata során a nazális epitelsejteken és az agyi endotelsejteken elemeztük a formuláció összetevőinek önálló hatását is. Az adatok alapján a TPGS volt az a komponens, ami a legjobban csökkentette a sejtréteg impedanciáját. A szakirodalom alapján a TPGS egy olyan nem toxikusnak tartott összetevője a nanohordozóknak, ami növeli a hatóanyagok oldhatóságát, felszívódását és penetrációjának mértékét (Gou és mtsai, 2013; Na és mtsai, 2020). Adatainkkal összeegyeztethető egy emlőrák sejteken végzett impedancia mérésen alapuló tanulmány eredménye, miszerint 24 órás TPGS kezelés hatására lecsökkent a sejtréteg szorosságának mértéke (Neophytou és mtsai, 2014).

Ezek alapján a vizsgált polimer micellák ígéretes jelöltek lehetnek a dexametazon orrnyálkahártyán keresztüli, közvetlen bejuttatására az agyszövetbe, továbbá adataink hozzájárulhatnak olyan új nanohordozók kifejlesztéséhez, amelyek fokozzák az agyi gyógyszerbejutást a nazális úton keresztül.

## 5. Összefoglalás

Az agyi megbetegedések teljeskörű kezelése a mai napig egy megoldandó feladat az orvostudomány számára. Az alternatív útvonalak vizsgálata és működésüknek megértése azért fontos a kutatások szempontjából, mivel így innovatív megoldásokat vagyunk képesek használni a vér-agy gát szelektivitásának kikerülésére, ezáltal növelve az agyi megbetegedések kezelésének lehetőségét. Egyik útvonal ezek közül, az orrból való hatóanyag eljuttatás az agy szövetébe. Ennek is számos útvonala ismert, viszont az eddigi kutatások és szakirodalom alapján a legígéretesebb a szaglóideg mentén való, közvetlen transzport lehet. Előnye, hogy nem invazív, teljesen fájdalommentesen és könnyedén adagolható gyógyszerbevitelt tesz lehetővé. Kísérleteink során a dexametazon és a polimer micellába csomagolt dexametazon hatását és permeabilitását vizsgáltuk a vér-agy gát és az ornyálkahártya tenyészetes ko - kultúra modelljén.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a nanoformuláció fokozta a dexametazon átjutását az önálló hatóanyaghoz képest a vér-agy gát és az ornyálkahártya tenyészetes modelljein a gátműködés csökkentésén keresztül. További terveink között szerepel a nanoformuláció által előidézett barrier megnyílás visszafordíthatóságának és annak kinetikájának vizsgálata.

## 6. Irodalomjegyzék

- Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002 Jun;200(6):629-38.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53.
- Alam MI, Beg S, Samad A, Baboota S, Kohli K, Ali J, Ahuja A, Akbar M. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Aug 11;40(5):385-403.
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszélka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 2014 Nov;45(8):610-38.
- Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* 2018 Feb 15;195:44-52.
- Croy SR, Kwon GS. Polymeric micelles for drug delivery. *Curr Pharm Des.* 2006;12(36):4669-84.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Feb;25(1):59-127.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1788(4):892-910.
- Deli MA. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates, Tihanyi K, Vastag M. (szerkesztők), Bentham E-books, 2011; pp. 144-165
- Depressive disorder. WHO, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (2024. 05. 14.)
- Espinosa A, Meneses G, Chavarría A, Mancilla R, Pedraza-Chaverri J, Fleury A, Bárcena B, Pérez-Osorio IN, Besedovsky H, Arauz A, Fragoso G, Sciutto E. Intranasal Dexamethasone Reduces Mortality and Brain Damage in a Mouse Experimental Ischemic Stroke Model. *Neurotherapeutics.* 2020 Oct;17(4):1907-1918.
- GBD 2021 Nervous System Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol.* 2024 Apr;23(4):344-381.
- Guo Y, Luo J, Tan S, Otieno BO, Zhang Z. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2013 May 13;49(2):175-86.
- Hong SS, Oh KT, Choi HG, Lim SJ. Liposomal Formulations for Nose-to-Brain Delivery: Recent Advances and Future Perspectives. *Pharmaceutics.* 2019 Oct 17;11(10):540.
- Horvát S, Kis L, Dr. Révész P, Dr. Erős I, Dr. Deli M. Hatóanyagok agyba juttatása a nazális útvonalon keresztül. *Szeged Gyógyszerészet* 2009; 53. 259-266.

- Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci.* 2000 Jul;11(1):1-18.
- Johnson RM, Vinetz JM. Dexamethasone in the management of covid -19. *BMJ.* 2020 Jul 3;370:m2648.
- Katona G, Sipos B, Ambrus R, Csóka I, Szabó-Révész P. Characterizing the Drug-Release Enhancement Effect of Surfactants on Megestrol-Acetate-Loaded Granules. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Jan 18;15(2):113.
- Kiss EL, Berkó S, Gácsi A, Kovács A, Katona G, Soós J, Csányi E, Gróf I, Harazin A, Deli MA, Balogh GT, Budai-Szücs M. Development and Characterization of Potential Ocular Mucoadhesive Nano Lipid Carriers Using Full Factorial Design. *Pharmaceutics.* 2020 Jul 20;12(7):682.
- Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Füredi A, Szakács G, Veszélka S, Sipos P, Ózsvári B, Puskás LG, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA. Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit p-glycoprotein in caco-2 intestinal epithelial cells. *J Pharm Sci.* 2014 Oct;103(10):3107-19.
- Kürti L, Gáspár R, Márki Á, Kápolna E, Bocsik A, Veszélka S, Bartos C, Ambrus R, Vastag M, Deli MA, Szabó-Révész P. In vitro and in vivo characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Sep 27;50(1):86-92.
- McMahon D, Oakden W, Hynynen K. Investigating the effects of dexamethasone on blood-brain barrier permeability and inflammatory response following focused ultrasound and microbubble exposure. *Theranostics.* 2020 Jan 1;10(4):1604-1618.
- Na YG, Pham TMA, Byeon JJ, Kim MK, Han MG, Baek JS, Lee HK, Cho CW. Development and evaluation of TPGS/PVA-based nanosuspension for enhancing dissolution and oral bioavailability of ticagrelor. *Int J Pharm.* 2020 May 15;581:119287.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 2009 Mar-Apr;54(3-4):253-63.
- Neophytou CM, Constantinou C, Papageorgis P, Constantinou AI. D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in Survivin-overexpressing breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2014 May 1;89(1):31-42.
- Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Feb;1(2):131-9.
- Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2005 Jan;2(1):3-14.
- Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K, Bauer HC. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci.* 2014 Dec 16;8:404.

- Sipos B, Bella Z, Gróf I, Veszelka S, Deli MA, Szűcs KF, Sztojkov-Ivanov A, Ducza E, Gáspár R, Kecskeméti G, Janáky T, Volk B, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Szabó-Révész P, Csóka I, Katona G. Soluplus® promotes efficient transport of meloxicam to the central nervous system via nasal administration. *Int J Pharm.* 2023 Feb 5;632:122594.
- Sipos B, Quality by Design based development and investigation of nasal polymeric micelles loaded with meloxicam, PhD disszertáció, SZTE Doktori Repoitórium, 2023
- Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* 2010 Mar;20(3):142-9.
- Terasaki T, Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx.* 2005 Jan;2(1):63-72.
- Veszelka S, Bocsik A, Walter FR, Hantosi D, Deli MA. Blood-brain- barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: focus on co-culture systems. *Acta Biol. Szegediensis.* 2015;59(S2):157-168.
- 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. *Front Mol Neurosci.* 2018 May 22;11:166.
- Vigh JP, Kincses A, Ozgür B, Walter FR, Santa-Maria AR, Valkai S, Vastag M, Neuhaus W, Brodin B, Dér A, Deli MA. Transendothelial Electrical Resistance Measurement across the Blood-Brain Barrier: A Critical Review of Methods. *Micromachines (Basel).* 2021 Jun 11;12(6):685.
- Walter FR. Új lehetőség a vér-agy gát megnyitására: a tezmilifen és a rövidláncú alkilglicerolok hatása agyi endotélsejteken. PhD disszertáció, SZTE Doktori Repoitórium. 2015.
- Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszelka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers.* 2021 Jul 3;9(3):1904773.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Sam H, Horvát S, Deli MA, Mack AF. Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jul;130(1):127-40.
- Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today.* 2003 Nov 1;8(21):997-1003.
- Zakharova LY, Pashirova TN, Doktorovova S, Fernandes AR, Sanchez-Lopez E, Silva AM, Souto SB, Souto EB. Cationic Surfactants: Self-Assembly, Structure-Activity Correlation and Their Biological Applications. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 6;20(22):5534.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom,

Dr. Prof Deli Máriának, témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy kiváló szakmai és felszereltségi körülmények között dolgozhassak a kutatócsoportjában. A TDK dolgozatom megírásához való elengedhetetlen szakmai hozzájárulását és kooperatív útmutatását.

Dr. Gróf Ilona témavezetőmnek, odaadó és alapos szakmai felkészítéséért és lelkiismeretes irányításáért. Mindezekfelett köszönöm a tanításom alatt belém fektetett bizalmát és türelmét, továbbá hogy kedves, támogató körülmények között ott volt mellettem és segített, amikor szükségem volt rá.

Szecső Anikónak, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet Biológiai Barrierék Kutatócsoport PhD hallgatójának, hasznos szakmai tanácsait és a laborban nyújtott fáradhatatlan segítőkészségét.

A Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet Biológiai Barrierék Kutatócsoport további munkatársainak és szakdolgozóinak a kedves baráti légkört és a labormunkálatok alatti hozzájárulásukat a fejlődésemhez.

Dr. Sipos Bencének, együttműködő partnerünknek, hogy biztosította számunkra a kísérlet során vizsgált hatóanyagokat és formulációkat, valamint a hatóanyag koncentrációjának visszamérésében nyújtott segítségét. A kísérlet során felhasznált minták előállítása a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítvány finanszírozásával valósult meg.

Dr. Huliák Ildikónak, az SZTE TTK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék adjunktusának a naprakész tájékoztatásaival való segítőkészségét és belső konzulensi támogatását.

Végezetül pedig, családomnak és barátaimnak, hogy odaadóan támogattak és bíztattak TDK dolgozatom elkészítése alatt.

## 8. Tételes szerzői hozzájárulás:

### TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Szántó Milán** nyilatkozom, hogy a 2024-es őszi helyi biológia TDK-ra benyújtott „Dexametazon tartalmú polimer micellák vizsgálata az orron keresztüli agyi gyógyszerbejuttatás fokozására” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

| Részfeladat                                                             | A részvétel mértéke<br>(öt fokozatú skálán <sup>#</sup> jellemezve) |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Életképesség vizsgálatok                                                | 3                                                                   |
| Sejtek tenyésztése, vér-agy gát és ornyálkahártya modellek létrehozása  | 5                                                                   |
| Dexametazon és formuláció permeabilitási kísérlete a barrier modelleken | 5                                                                   |
| TEER és SF/EBA mérések                                                  | 4                                                                   |
| Immunitokémia                                                           | 4                                                                   |

Kelt: Szeged, 2024.11.08



A pályamunkát benyújtó hallgató (Szántó Milán)  
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Prof. Deli Mária,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
témavezető aláírása



Dr. Gróf Ilona,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
témavezető aláírása