

EÖTVÖS LORÁND KUTATÁSI HÁLÓZAT
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

Biofizikai Intézet

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

OTDK DOLGOZAT

Virális peptid hatásának vizsgálata agyi endotélsejteken

Szecskó Anikó

biológus MSc

Témavezetők:

Dr. Veszélka Szilvia
tudományos főmunkatárs

Dr. Mészáros Mária
tudományos munkatárs

ELKH SZBK Biofizikai Intézet
Biológiai Barrierek Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Rákhely Gábor
tanszékvezető egyetemi docens

SZTE TTIK
Biotechnológiai Tanszék

2022

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
1.1. A vér-agy gát felépítése és működése	4
1.2. Agyi gyógyszerhatóanyag szállító technológiák fejlesztése	6
1.3. Nanohordozó rendszerek alkalmazása az agyi gyógyszerbejuttatásban	7
1.4. Sejtpenetráló peptidek terápiás molekulák és nanohordozók agyi bejutásának fokozására	10
1.5. Célkitűzések	12
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
2.1. Vegyszerek	13
2.2. A nem-célzott és virális peptiddel targetált nanorészecskék előállítása	13
2.3. Nioszómák karakterizálása: méret, feszíni töltés, polidiszperzitási index és bezárási hatékonyság	14
2.4. Sejttenyésztés	16
2.5. Primer patkány agyi endotélsejtek életképességének vizsgálata	16
2.6. Az agyi endotélsejtek PepH3 peptid felvételének vizualizációja	16
2.7. A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák töltetének sejtfelvétel vizsgálata	17
2.8. A szabad PepH3 és a peptiddel funkcionizált nioszómák permeabilitásának vizsgálata háromsejtes vér-agy gát modellen	18
2.9. Statisztikai kiértékelés	20
3. EREDMÉNYEK	21
3.1. Az önálló PepH3 virális peptid vizsgálata vér-agy gát modellekben	21
3.1.1. A PepH3 peptid hatása az agyi endotélsejtek életképességére	21
3.1.2. A fluoreszcensen jelölt PepH3 peptid sejtfelvételének vizualizációja	21
3.1.3. Az önálló PepH3 peptid vér-agy gát permeabilitásának vizsgálata	22
3.2. A PepH3 peptiddel funkcionizált nanorészecskék vizsgálata vér-agy gát modellekben	23
3.2.1. Az előállított nioszómák jellemzése	23
3.2.2. A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák hatásai az agyi endotélsejtek életképességére	24
3.2.3. A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák töltetének sejtfelvétele	24
3.2.4. A PepH3 peptiddel funkcionizált nanorészecskék töltetének vér-agy gát permeabilitás vizsgálata	25
4. MEGBESZÉLÉS	26
4.1. Az önálló PepH3 virális peptid vizsgálata	26
4.2. A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák vizsgálata	28
5. ÖSSZEFOGLALÁS	30
6. IRODALOMJEGYZÉK	31
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
8. TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS	38

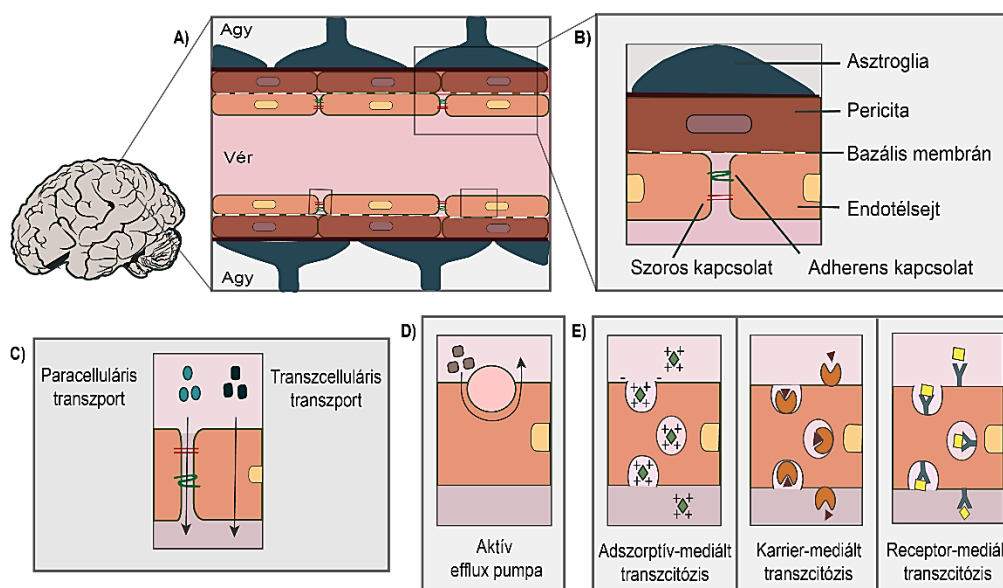
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP-binding cassette transzporter
ANOVA	variancia-analízis
BCRP	mellrák rezisztencia fehérje
bFGF	fibroblaszt növekedési faktor
BSA	borjú szérum albumin
CLS2	kollagenáz II
CO ₂	szén-dioxid
CPP	sejtpenetráló peptid
cPT-cAMP	8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát
DEN2C	Dengue vírus-2 kapszid fehérje
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium tápfolyadék
EBA	Evans-kék albumin
FBS	borjú szérum (fetal bovine serum)
GLUT	glükóz transzporter
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HIV-1 vírus	Humán Immundeficiencia Vírus-1
ITS	inzulin-transzferrin-szelenit
JAM	junkcionális adhézios molekulák
LAT	nagy neutrális aminosav transzporter
MRP	multidrog rezisztencia-asszociált fehérjecsald
N	nioszóma
N-PepH3	PepH3 peptiddel funkcionalizált nioszóma
P _{app}	látszólagos permeabilitási együttható
PBS	foszfát pufferoldat
PDI	polidiszperzitási index
PDS	borjúplazmából készített szérum (plasma-derived serum)
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG	polietilén-glikol
P-gp	P-glikoprotein
PLGA	politejsav-glikolsav
RVG29	Rabies Virus Glycoprotein-29
SF	nátrium-fluoreszcein
SLC	solute carrier transzportercsalád
SMVT	nátriumfüggő multivitamin transzporter
SVCT	nátrium-aszkorbinsav kotranszporter
TAT	Trans-Activator of Transcription
TEER	transzendoteliális elektromos ellenállás
TR-BSA	Texas Red-borjú szérum albumin
ZO	zonula occludens
β-Gal	β-galaktozidáz
λ _{Em}	Emissziós hullámhossz
λ _{Ex}	Excitációs hullámhossz

1. BEVEZETÉS

1.1. A vér-agy gát felépítése és működése

A vér-agy gát a szervezet számára létfontosságú dinamikus határfelületet képez az agy és a vérkeringés között. A vér-agy gátat az agyi kapillárisok endotélsejtjei, a velük közös bazális membránon elhelyezkedő periciták, illetve a kapillárisokat az agy felőli oldalról beburkoló asztroglia végtalpak építik fel (1. A-B. ábra; Abbott és mtsai., 2006, 2010). A vér-agy gát sejtjei továbbá morfológiai és funkcionális kapcsolatban állnak az erek mentén elhelyezkedő neuronokkal és mikroglia sejtekkel. Szoros együttműködésükkel egy ún. neurovaszkuláris egységet alakítanak ki, amely esszenciális szerepet tölt be a központi idegrendszer anyagcserefolyamatainak szabályozásában (Abbott és mtsai., 2006; Obermeier és mtsai., 2013).

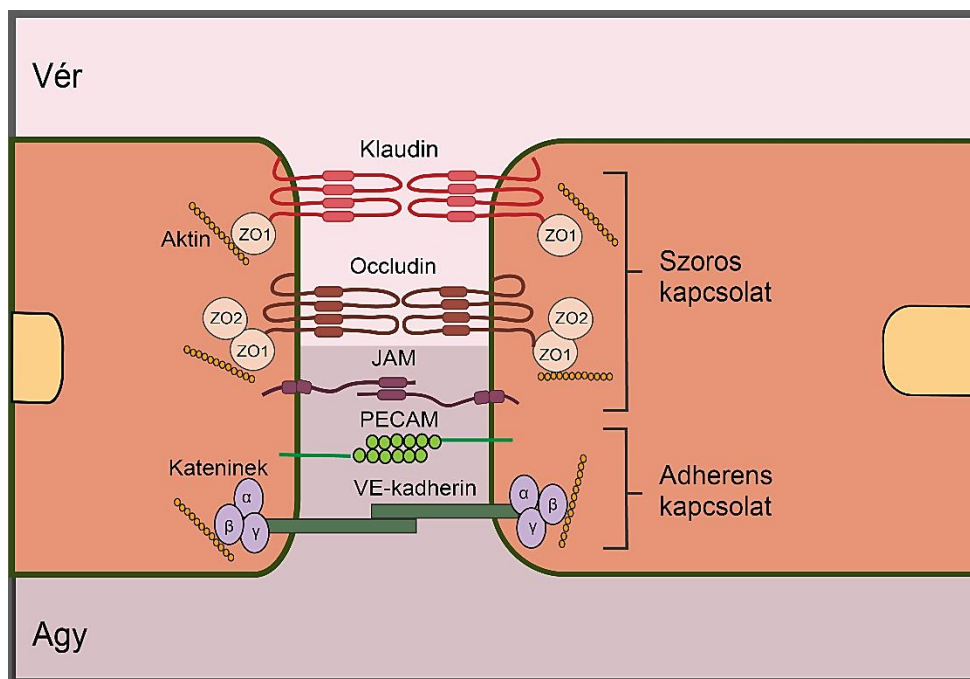


1. ábra. A vér-agy gát felépítése és transzport útvonalai. **(A-B)** Agyi kapilláris hosszmetzetének sematikus ábrázolása; **(C)** Paracelluláris és transzcelluláris diffúzió; **(D)** Aktív efflux pumpa; **(E)** Adszorptív-, karrier-, és receptor-mediált transzcitózis (Sánchez-Navarro és mtsai., 2017 alapján).

A vér-agy gát két alapvető funkciót lát el: egyrészt szigorúan szabályozott módon biztosítja az agy ionos homeosztázisát és tápanyagellátását, másrészt védelmet nyújt a különböző káros anyagokkal, kórokozókkal szemben (Abbott és mtsai., 2010). Az agyi hajszálerek nem fenesztráltak, így minimális mértékű a rajtuk keresztül történő nem-specifikus transzcelluláris anyagátjutás (1.C. ábra). Csak a gázok és a kis molekulatömegű (<500 Da) lipofil molekulák, mint például a nikotin, a koffein és az alkohol képes lipid mediált szabad diffúzióval keresztüljutni az agyi kapillárisokon (Pardridge, 2005).

A tápanyagok, mint a cukrok, aminosavak, zsírsavak, peptidek, vitaminok és nyomelemek kizárólag szabályozottan, specifikus szállítófehérjékhez vagy receptorhoz kötve, az endotélsejtekbe befelé irányú transzport-útvonalakon keresztül juthatnak el a vérből az idegsejtekig (Ohtsuki és Terasaki, 2007). A tápanyagszállító fehérjék közé tartoznak a solute carrier (SLC) család tagjai, amelyek ATP felhasználásával, koncentráció grádiens ellenében szállítják a nélkülözhetetlen tápanyagokat az agyba. Karrier-mediált transzcitózissal, a GLUT1 (SLC2A1) fehérjéhez kötve szállítódik például a glükóz, míg a nagy neutrális aminosavak transzportjért a LAT1 (SLC7A5) felel. A vitaminok közül a C-vitamin szállítását a nátrium-aszkorbinsav kotranszporter SVCT (SLC23A2) végzi, a biotin, tiamin, pantoténsav és folsav agyi bejuttatását a nátriumfüggő multivitamin transzporter SMVT (SLC5A6) látja el (1.E. ábra; Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Receptor-mediált transzcitózissal jutnak át az agyi endotélsejtek rétegén például az inzulin, transferrin vagy a lipoproteinek (1.E. ábra; Campos-Bedolla és mtsai., 2014; Patel és mtsai., 2013).

A tápanyagellátás mellett a vér-agy gát másik jelentős szerepe a központi idegrendszer védelme. Anatómiai alapját az agyi endotélsejtek között húzódó szoros kapcsolatok (tight junction) biztosítják (1.B. ábra és 2. ábra), melyek megakadályozzák a vízdékony, kis és nagy molekulák sejtek közötti, szabad paracelluláris átjutását (1.C. ábra).



2. ábra. Az agyi endotélsejtek között található szoros és adherens kapcsolatok (Weiss és mtsai., 2009).

A szoros kapcsolatok fehérjekomplexe transzmembrán fehérjékből (klaudin, occludin), valamint junkcionális adhézios molekulákból (JAM) áll. A transzmembrán fehérjéket, illetve a JAM-eket a zonula occludens (ZO) fehérjék kapcsolják össze az endotélsejtek aktin-citoszkeletális rendszerével (2. ábra; Wolburg és mtsai., 2008). Az endotélsejtek között az apikálisan elhelyezkedő szoros kapcsolatok mellett bazolaterális irányban megtalálhatóak az adherens sejtkapcsolatok, amiket a Ca^{2+} függő kadherineket, illetve a katenineket építenek fel. (2. ábra; Hervé és mtsai., 2008). A PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) transzmembrán glikoproteinek hozzájárulnak a sejt-sejt kapcsolatok kialakításához, ezáltal a gátfunkció erősítéséhez (Wimmer és mtsai., 2019).

A gátrendszer további tartópillérét az agyi endotélsejtek apikális membránjában található efflux pumpák adják (1.D. ábra). Ezek a fehérjék az ATP-kötő (ATP-binding cassette; ABC) transzporter családba tartoznak, mivel ATP felhasználása mellett képesek szubsztátjaikat a véráramba visszajuttatni, vagy az agyból a vérbe kipumpálni. Az efflux pumpák közé sorolhatóak többek között a P-glikoproteinek (P-gp vagy ABCB1), a mellrák rezisztencia fehérjék (BCRP vagy ABCG2), valamint a multidrog rezisztencia-asszociált fehérjecsalád (MRP, ABCC) tagjai (Terasaki és Ohtsuki, 2005).

Az agyi endotélsejtek lumenális (vér felőli) oldalán a membránkötött glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok egy ún. glikokalix réteget alkotnak (Reitsma és mtsai., 2007). A glikokalix oldalláncai egységes negatív töltést biztosítanak az endotélsejteknek, ezzel egy elektrosztatikus barriert képeznek a feszínükön. A glikokalix csökkenti a vérben keringő negatív töltésű molekulák sejten keresztüli átjutását, ami fiziológiásan meggátolja a szérumfehérjék szabad agyi penetrációját. A glikokalix továbbá elősegítheti a pozitív töltetű molekulák vér-agy gáton keresztüli átjutását adszorptív-mediált transzcitózissal (1.E. ábra; Hervé és mtsai., 2008).

1.2. Agyi gyógyszerhatóanyag szállító technológiák fejlesztése

Világszerte minden hatodik ember szenved napjainkban valamilyen neurodegeneratív (Alzheimer-kór, a Parkinson-kór, szklerózis multiplex), illetve egyéb, a központi idegrendszert érintő betegségben (Feigin és mtsai., 2020). Hatékony gyógyszeres kezelésük óriási kihívást jelent az orvostudomány számára. Ennek az egyik fő oka, hogy a vér-agy gát speciális felépítése és gátló funkciói megakadályozzák, hogy a neuroterápiás hatóanyagok döntő többsége eljusson a vérkeringésből az agyba (Pardridge, 2017). A nagy molekulatömegű farmakonok, mint például a peptidek, rekombináns fehérjék, monoklonális antitestek, RNS interferencia alapú gyógyszerek és a génterápiás szerek legtöbbje nem jut el hatékony koncentrációban az agyi

célpontokig (Pardridge, 2005; Majerova és mtsai., 2020). A kis molekulatömegű, depresszióra, skizofréniára, krónikus fájdalomra és az epilepsziára fejlesztett gyógyszereknek is csak csekély hányada képes átjutni a vér-agy gáton (Pardridge, 2005; Zhou, Smith és Liu, 2021).

A probléma megoldására már számos, a vér-agy gát reverzibilis megnyitásán, megkerülésén vagy a hatóanyagok kémiai módosításain alapuló technológiával próbálkoztak. A vér-agy gát megnyitása hiperozmotikus mannitollal (Brown és mtsai., 2004), vagy alkilglicerolokkal (Hülper és mtsai., 2013) például egy invazív, nagy kockázattal járó módszer, mivel a gyógyszerek mellett a vérkeringésből az idegsejtekre toxikus molekulák is átjuthatnak a vérből az endotélsejtek között. A vér-agy gát efflux pumpaműködését gátló szerek fokozhatják citosztatikumok, antiepileptikumok agyi bejutását, de a klinikumban ezek sem alkalmazhatóak biztonságosan (Veszeka és mtsai., 2015). A vér-agy gát megkerülésére szolgáló másik lehetőség a neuroterápiás gyógyszerek intranazális bevitele, sajnos a módszer széleskörű alkalmazhatóságát azonban megnehezítik a felszívódási és adagolási problémák (Crowe és mtsai., 2018). A terápiás molekulák agyi bejutása növelhető lipidoldékonyságuk fokozásával, illetve kationosabbá tételükkel (Banks, 2009). Hátránya, hogy a kémiai módosítások következtében a hatóanyagok elveszíthetik biológiai aktivitásukat, valamint felhalmozódhatnak a perifériás szervekben, csökkentve ezzel az agyi bejutásuk hatékonyságát (Deli, 2011).

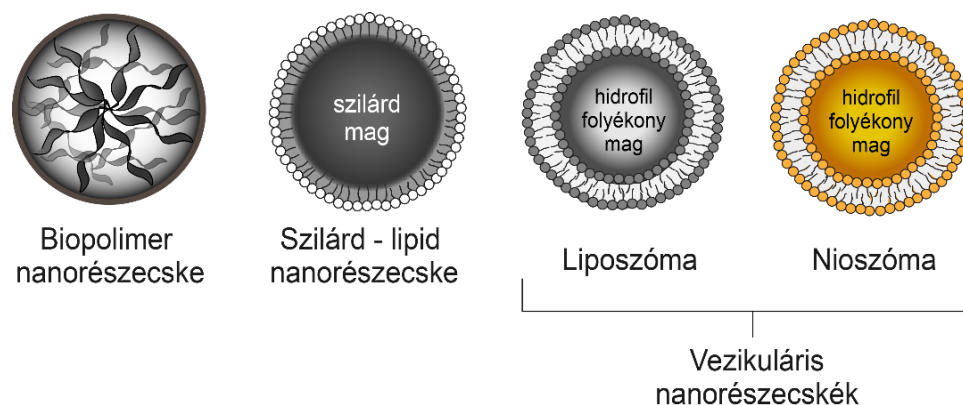
A vér-agy gát befelé irányuló transzportrendszereinek kihasználása innovatív gyógyszerbeviteli technológiákkal jó stratégia lehet, mivel ezek a platformok elősegíthetik a gyógyszerjelöltek idegrendszeri bejutását. Ezeknek a rendszereknek az alapját képezi a terápiás szerek korszerű formulálása a vér-agy gáton keresztüli átjutásukat és a célsejtekig történő szállításukat segítő molekulákkal, illetve gyógyszerhordozó rendszerekkel (Saraiva és mtsai., 2016; Lombardo és mtsai., 2020).

1.3. Nanohordozó rendszerek alkalmazása az agyi gyógyszerbejuttatásban

Az agyi gyógyszerbejuttatás hatékonyságának fokozására az egyik intenzíven kutatott módszer a gyógyszerjelöltek nanoméretű hordozórendszerekbe zárása (Lombardo és mtsai., 2020). A központi idegrendszeri célpontú nanopartikulumok segítségével csökkenthető a formulált terápiás molekula kezelési dózisa, ami egyaránt mérsékelheti a perifériás mellékhatásokat (Mc Carthy és mtsai., 2015; Irvine és mtsai., 2018). A nanorészecskék a „nano” tartományba eső, méretüknek köszönhetően nagy fajlagos felülettel rendelkeznek, így nagy mennyiségű hatóanyag bezárására és szállítására alkalmas rendszerek. Az agyi

gyógyszerbejutás fokozásának céljából fejlesztett nanorészecskék legtöbbje 100 nm körüli mérettartományba esik.

Az irodalomban megtalálhatunk változatos alakú, szerkezetű, a legkülönbözőbb szerves és szervetlen anyagokból készült nanoplatformokat (Saraiva és mtsai., 2016). A legtöbb központi idegrendszeri célpontú nanorészecske azonban biokompatibilis és nem immunogén polimerekből, de főként lipidekből épül fel. Közéjük tartoznak a biopolimer nanorészecskék, a szilárd-lipid nanopartikulák, továbbá a vezikuláris liposzómák vagy nioszómák (3. ábra; Masserini, 2013).



3. ábra. Az agyi gyógyszerbejuttatásra fejlesztett leggyakoribb szilárd és vezikuláris nanohordozók (Masserini, 2013 alapján).

A nanohordozók közül a vezikuláris nanopartikulák különösen ígéretesnek bizonyulhatnak agyi gyógyszerbeviteli szempontból (Carter és mtsai., 2019). Ezek ugyanis egy hidrofil maggal rendelkeznek, amelyet körbevesz egy vagy több amfipatikus lipidekből álló koncentrikus réteg. Szerkezetük lehetővé teszi, hogy víz- és zsírdékony, kis- és nagyméretű biomolekulákat (töltet; kargó) zárhassanak be, illetve adhassanak le szabályozott módon (Begley, 2004; Kreuter, 2014; Dos Santos Rodrigues és mtsai., 2019). Már a legtöbb idegrendszeri megbetegedés gyógyszeres kezelésére fejlesztettek liposzómákat, azonban ezek klinikai tesztekben változó hatékonysággal működtek (Vieira és Gamarra, 2016; Ross és mtsai., 2018). A nem-ionos felületaktív anyagokból és koleszterinből felépülő nioszómák a liposzómákkal ellentétben kevésbé oxidálódnak, stabilabbak, hosszabb ideig tárolhatók, illetve költséghatékonyabb az előállításuk (Abdelkader és mtsai., 2014). A nioszómák pozitívuma továbbá, hogy poliszorbát felületaktív anyagaiknak köszönhetően, fokozhatják a sejtmembrán fluiditását, ami elősegítheti a sejtfelvételüket (Abdelkader és mtsai., 2014; Kiss és mtsai., 2014).

A nanorészecske alapú hatékony agyi gyógyszerbejuttatás kulcsát a hordozók specifikus célzása jelenti a vér-agy gáton való átjutásukat elősegítő ligandokkal (Wohlfart és mtsai., 2012; Kreuter, 2014). Targetálás alkalmazása nélkül a szisztémás vérkeringésbe beadott gyógyszerhordozó nanopartikulumok leginkább a perifériás szervekben, a májban, a vesében vagy a lépben dúsulnak fel (Masserini, 2013). Az agyi gyógyszerbevitel növelésére a leggyakrabban alkalmazott célzó molekulák az endotélsejtek által magasan expresszált receptorok (transzferrin-, inzulin-, lipoprotein-receptor és az arra specifikus antitest) ligandjai. Ezek molekuláris trójai falóként képesek hatóanyagokat a vér-agy gáton keresztül az agyba bejuttatni (Wohlfart és mtsai., 2012). Liposzómákhoz kapcsolt transzferrin molekulával például hatékonyan növelték már meg kemoterápiás szerek központi idegrendszeri penetrációját (Johnsen és Moos, 2016; Sonali és mtsai., 2016). Az apolipoprotein E ígéretesnek bizonyult számos vezikuláris és szilárd gyógyszerhordozó nanopartikulum vér-agy gáton való átjutásának megkönnyítésében (Wagner és mtsai., 2012; Neves és mtsai., 2015; Topal és mtsai., 2020). Az SLC-transzporterek célzása cukrok, aminosavak nanorészecskékhez kapcsolásával szintén kiaknázható lehetőséget biztosít a központi idegrendszeri gyógyszerbevitel szempontjából (Lombardo és mtsai., 2020). Kutatócsoportunk korábbi munkáiban tápanyagszállító fehérje ligandok úgy, mint alanin, leucin, aszkorbinsav, glükopiranoz és glutation egyszeres és többszörös ligandkombinációival segítette elő a nanorészecskékbe zárt töltet vér-agy gáton keresztüli átjutását sejtenyészetes modellekben és egerekben (Mészáros és mtsai., 2018; Porkoláb és mtsai., 2020; Veszélka és mtsai., 2021). Az agyi targetálás szempontjából az eddigi legsikeresebb célzóligand a glutation (Rip és mtsai., 2014; Gaillard, 2016). Habár transzporterét a vér-agy gáton eddig még nem sikerült azonosítani, napjainkig kizárólag a glutationnal célzott liposzómális metilprednizolon (Kanhai és mtsai., 2018) és a doxorubicin jutott el klinikai vizsgálatokig. Utóbbi eredményeit azonban eddig még nem publikálták.

A különféle sejtbejutást fokozó peptidek szintén rendkívül jó hatékonyságú agyi bejutást biztosíthatnak a nanohordozók számára (Guarnieri és mtsai., 2013). Fejlesztésük azonban rendkívül nagy kihívást jelent, mivel a receptorok és SLC-transzporterek fiziológiás ligandjaival szemben kevésbé specifikus bejutást biztosítanak. A nagyfokú vér-agy gát transzcitózist mutató, potenciális nanorészecske targetáló peptidek tervezése és alkalmazása kiváló lehetőséget biztosít a nanohordozók agyi terápiás hatékonyságának fokozására (McCully és mtsai., 2018).

1.4. Sejtpenetráló peptidek terápiás molekulák és nanohordozók agyi bejutásának fokozására

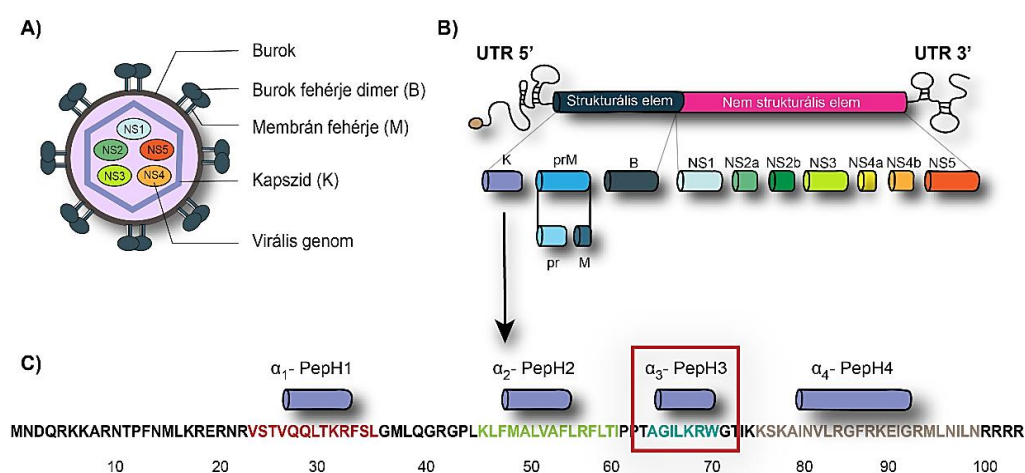
Az elmúlt két évtizedben intenzíven tanulmányoztak olyan természetes vagy szintetikus oligopeptideket, amelyek a sejtek membránján keresztül a citoszólba jutva képesek hordozó molekulaként elősegíteni a gyógyszerhatóanyagok célsejtekben történő felhalmozódását. Ezeket sejtpenetráló peptideknek (cell-penetrating peptid, CPP) nevezzük, amelyek közé tipikusan a rövid, az 5-30 aminosav-szekvenciával rendelkező molekulák tartoznak (Hudecz és mtsai., 2005; Oller-Salvia és mtsai., 2016). Az irodalomban fellelhető CPP-k legtöbbször kationos, de megtalálható néhány amfipatikus, hidrofób, valamint anionos targetáló peptid is (Martín és mtsai., 2011; Neves-Coelho és mtsai., 2017). A túlnyomóan pozitív töltésű arginin, lizin, illetve hisztidin aminosavösszetételüknek köszönhetően kationos CPP-k könnyebben lépnek elektrosztatikus kölcsönhatásba a sejt felszíni negatív töltetű glikokalixszal (Kristensen és mtsai., 2016; Milletti, 2012). A CPP-k a többi hordozórendszerrel ellentétben kismértékű toxicitással és immunogenitással rendelkeznek és makromolekulák rendkívül gyors átjuttatására képesek a sejtmembránokon (McCully és mtsai., 2018). A hatóanyagok agyi bejuttatására azonban nem minden CPP képes, mivel nagyobb részük csak internalizálódik a sejtekben, vagy az efflux pumpaműködés miatt nem jut át kellő mértékben az agyi hajszálereken. A gyógyszerhatóanyagok és a nanohordozó rendszerek vér-agy gáton való átjutását elősegítő peptideket a szakirodalom vér-agy gát shuttle peptidnek (blood-brain barrier shuttle peptide; BBB-shuttle peptide) nevezi. A peptidek tervezésekor fontos szempont, hogy azok a vér-agy gát valamely fiziológiás szállítófehérjéjéhez kötődni tudjanak (McCully és mtsai., 2018; Zhou, Smith és Liu, 2021).

A sejtekbe történő hatóanyagbejutás fokozására elsőként azonosított és a legtöbbet vizsgált a HIV-1 vírusból (Humán Immundeficiencia Vírus-1) izolált TAT (Trans-Activator of Transcription) fehérje (Frankel és Pabo, 1988). A TAT peptidhez későbbiekben β -galaktozidáz (β-Gal) konjugáltak, aminek egerekbe történő intraperitoneális beadását követően β-Gal enzimaktivitást mértek a tüdő és szív mellett az agyban is (Schwarze és mtsai., 1999; Kristensen és Brodin, 2017). Számos további CPP-ről (angiopep-2, SynB1 vagy a D-penetratin) írtak le az irodalomban, hogy használatukkal elősegíthető a gyógyszerhatóanyagok célsejtekben történő akkumulációja. Rousselle és munkatársai doxorubicinhoz SynB1-et, valamint egy másik kísérletben D-penetratint kötöttek, míg Thomas és kutatócsoportja paclitaxelhez konjugált angiopep-2 peptidet használtak. A klinikumban használt terápiás hatóanyagok a peptidekkel

történő targetálásának köszönhetően nemcsak a perifériás szervekben jelentek meg, hanem agyi bejutást is mutattak (Rousselle és mtsai., 2000; Thomas és mtsai., 2009).

A hatóanyagok közvetlen jelölése mellett a vér-agy gát shuttle peptideket ligandként már több tanulmányban alkalmazták a nanohordozók központi idegrendszeri bejutásának elősegítésére (Guarnieri és mtsai., 2013). Ezek a peptidek jellemzően az adszorptív-, és/vagy receptor- mediált transzcitózis segítségével juttatják át a nanopartikulumokat az agyi hajszálerek endotélsejtjein (McCully és mtsai., 2018). A TAT-peptid jelöléssel PLGA polimer nanopartikulumokkal formulált ritonavir antivirális szer agyi bejutását fokozták egerekben intraperitoneális beadást követően (Rao és mtsai., 2008). Az angiopep-2 oligopeptid nagy vér-agy gát transzcitózis kapacitással rendelkezik, mivel célolni képes az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDLR) receptorokat (McCully és mtsai., 2018). Számos szerves (liposzóma, szilárd-lipid, polimer) és szervetlen (fém, szilika, mágneses) anyagból felépülő nanohordozó célzására már vizsgálták. Főként az agyvérzés, az epilepszia és a neurodegeneratív betegségek kezelésére szolgáló hatóanyagok átjutását fokozta az angiopep-2 targetálás sejtenyészetes vér-agy gát modellekben, valamint ráegcsálókban. Angiopep-2 jelölt szervetlen nanopartikulumokat diagnosztikai céllal is alkalmaztak (Habib és Singh, 2022).

Prof. Miguel Castanho és munkatársai, kutatócsoportunk együttműködő partnerei a 12 kDa-os, 100 aminosav hosszúságú Dengue vírus-2 kapszid fehérjéből (DEN2C) tisztítottak négy különböző helikális doménjét (PepH1; PepH2; PepH3; PepH4; 4. ábra).



4. ábra. (A-B) Dengue vírus 2 felépítésének sematikus ábrája. **(C)** Dengue vírus-2 kapszid fehérjéje. K: kapszid, pr: prekursor, M: membrán fehérje, B: burok fehérje dimer, NS: nem strukturális, α : alfa-helikális domének (Internetes forrás 1; del Angel és Reyes-del Valle, 2013; Neves és mtsai., 2017 alapján).

Neves és munkatársai széleskörűen tanulmányozták a peptid domének tulajdonságait, valamint vér-agy gáton keresztüli átjutási képességüket (Neves-Coelho és mtsai., 2017; Neves és mtsai., 2017). Közülük a PepH3 bizonyult a legígéretesebbnek, mivel rövid idő alatt nagyfokú vér-agy gát penetrációt mutatott rágsáló és humán *in vitro* vér-agy gát modellekben. CD1 egerekben a radioaktívan jelölt PepH3 intravénás beadását követően már öt perc után emelkedett agyi biodisztribúciót mutatott (Neves és mtsai., 2017). A portugál kutatócsoport eredményei rávilágítottak arra, hogy a PepH3 potenciális vér-agy gát shuttle molekulaként alkalmas lehet hatóanyagok és nanohordozók a központi idegrendszeri bejutásának megkönnyítésére (Neves-Coelho és mtsai., 2017; Neves és mtsai., 2017; Cavaco és mtsai., 2020).

1.5. Célkitűzések

Hipotézisünk, hogy a nioszómák felszínéhez kapcsolt virális PepH3 peptid képes a nanorészecskék felvételét megnövelni primer patkány agyi endotélsejtekben, továbbá elősegíteni a bezárt modellanyag a vér-agy gáton keresztüli transzportját.

A kutatás során ezért vizsgálni kívántuk az együttműködő partnereink segítségével tisztított szabad PepH3 önálló hatását, illetve ligandként alkalmazva az általunk előállított vezikuláris nanohordozók felszínén a patkány primer tenyészetes vér-agy gát modelljeinken.

Ezért tudományos diákköri munkám céljai voltak:

I. A szabad PepH3 fluoreszcensen jelölt peptid

- 1) az agyi endotélsejtek életképességére gyakorolt önálló hatásának felderítése;
- 2) az agyi endotélsejtekbe történő sejtfelvételének;
- 3) átjutásának vizsgálata a vér-agy gát háromsejtes tenyészetes modelljén.

II. A PepH3 peptiddel célzott, töltetként nagy molekulásúlyú fluoreszcens modellanyagot hordozó nioszómák

- 4) előállítása;
- 5) fiziko-kémiai tulajdonságainak (átmérő, polidiszperzitási index, felszíni töltés, bezárási hatékonyság) jellemzése;
- 6) az agyi endotélsejtekbe történő sejtfelvételének;
- 7) átjutásának vizsgálata a vér-agy gát sejttenyészetes modelljén.

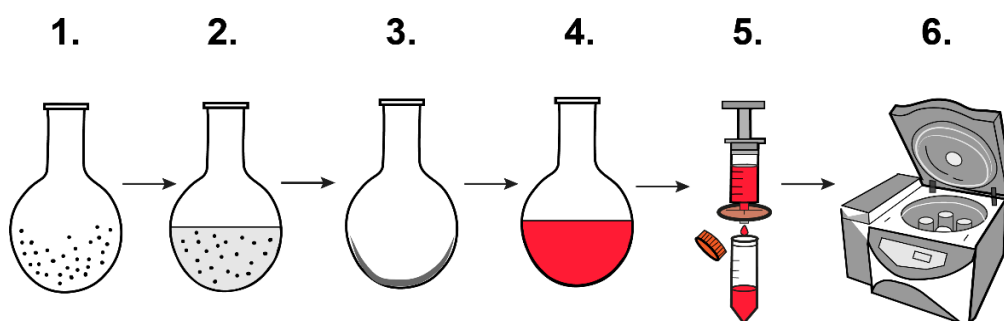
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Vegyszerek

Minden reagens beszerzési forrása, hacsak másképp nem jelöltük, a Merck Life Science Kft. A fluoreszcensen jelölt és a PEG linkerrel ellátott PepH3 virális peptideket (AGILKRW-NH₂) kollaborációs partnerünk Prof. Miguel Castanho és kutatócsoportja biztosította számunkra a Lisszaboni Egyetemről.

2.2. A nem-célzott és virális peptiddel targetált nanorészecskék előállítása

A nioszómák előállítása során a kutatócsoportunk előzetes protokolljait alkalmaztuk (Mészáros és mtsai., 2018; Veszélka és mtsai., 2021). Először a nem-célzott nanorészecskék (N) elkészítéshez nem-ionos felület aktív anyagokat; Span 60-t (szorbitán-monosztearát) és Solulan C24-et (koleszterin- poli-24-oxietilén éter), valamint a nanopartikulumok stabilitásáért felelős koleszterint mértünk össze. A virális peptiddel célzott nanopartikulumokat (N-PepH3) ezen felül kiegészítettük további 5% DSPE-PEG liganddal kapcsolt PepH3 peptiddel (teljes lipid tömegszázalék), amelyet a kollaborációs partnereink tisztítottak Dengue vírus-2 kapszid fehérjéből (5.1. ábra).



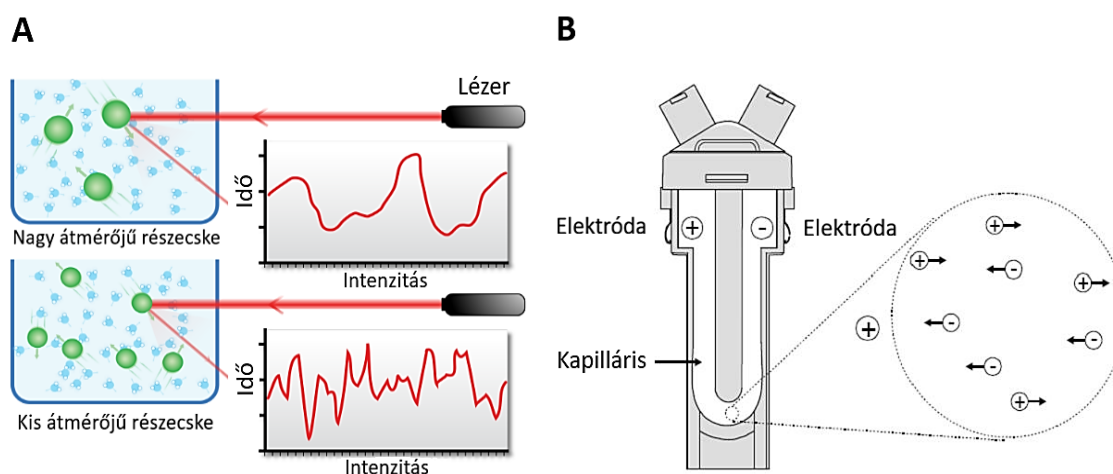
5. ábra: A nioszómák előállítási lépései: **(1-2)** Nioszóma felépítő anyagainak feloldása etanolban és kloroformban, **(3)** lipid film képződés, **(4)** lipidfilm hidratálása Texas Red-BSA-PBS oldattal, **(5)** ultracentrifugálás (Szecskó, 2020 alapján).

A nanopartikulumok elkészítésének második lépéseként a nioszómák alapanyagait forró (70 °C), 2:1 arányú etanol kloroform elegyében oldottuk fel (5.2. ábra), majd nitrogéngáz segítségével eltávolítottuk a szerves oldószereket. Ennek következtében a gömblombik falán egy vékony lipidfilm réteg keletkezett (5.3. ábra), amelyet 12 órán keresztül vákuumos ekszikátorral szárítottuk, hogy a maradék szerves oldószer is elpárologjon. A képződött lipidfilm réteget Texas Red fluoreszcens festékkel jelölt borjú szérum albumint (TR-BSA; 0,1

mg/ml, 67,12 kDa, Thermo Fischer Scientific, Amerikai Egyesült Államok) tartalmazó foszfát pufferrel (PBS; 2,7 mM KCL, 1,5 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; pH 7,4) hidratáltuk (5.4. ábra), valamint 60 percig, 45 °C-on szonikáltuk. A nioszómák méretének beállításához, illetve optimalizálásához a meleg (45 °C) nanopartikulum oldatokat először 0,45 μm , majd 0,22 μm pórusátmérőjű fecskendőfilteren keresztül szűrtük át (5.5. ábra). Az így elkészített nioszómákat ultracentrifugálással (45 000 rpm, 3 óra, 4 °C) választottuk el a bezáratlan TR-BSA fluoreszcens modellanyagtól (5.6. ábra). Az ultracentrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, a keletkező pelleteket a nioszóma fiziko-kémiai jellemzéséhez PBS-ben, a sejtenyészetes vizsgálatokhoz pedig fenolvörös mentes DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, Amerikai Egyesült Államok) médiumban oldottuk. A nioszóma oldatokat 0,45 μm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel sterilre szűrtük, gentamicin antibiotikumot (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) adtunk hozzá, és felhasználásig fénytől elzártan, 4 °C-on tároltuk.

2.3. Nioszómák karakterizálása: méret, felszíni töltés, polidiszperzitási index és bezárási hatékonyság

Az előállított nioszómák fiziko-kémiai tulajdonságát, mint a nanopartikulumok átmérőjét, polidiszperzitási indexét (PDI), felszíni töltését (zéta potenciál) He-Ne lézerrel felszerelt ($\lambda=632,8 \text{ nm}$), dinamikus fényszórás elvén működő műszerrel (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, Egyesült Királyság) határoztuk meg. A nioszómák karakterizálása alatt minden 13 elemű mérési sorozatot mintánként legalább háromszor ismételtük meg.



6. ábra. (A) a kis és nagy átmérőjű részecskék fényszórási intenzitásának változása az idő függvényében. (B) Mérőcella a zéta potenciál mérésekhez (Forrás: Szecskó, 2020).

A nioszómák méretének és a hozzájuk tartozó PDI-nek a meghatározása során szűkített műanyag küvetákba a nanorészecskék 2 mg/ml koncentrációjú PBS oldatát töltöttük. A mérés elméleti hátterében az áll, hogy az oldott nanorészecskék felületükkel és Brown-mozgási sebességükkel arányos módon visszaverik a lézernyalábokat. A nagyobb mérettel rendelkező nanorészecskék lassabban mozognak, így lassabb intenzitásbeli változásokat mutatnak, míg a kisebb részecskékről visszaverődő fény intenzitás-változásai gyorsabbak (6.A. ábra; Hoo és mtsai., 2008). A műszer detektálja ezeket az eltéréseket, majd egy korrelációs függvény segítségével kiszámítja a nanohordozók átmérőjét és méreteloszlását.

A felszíni töltés mérések során arany bevonatú berillium/réz elektródpárt tartalmazó kapilláris mérőcellákat (DTS1070; Malvern Panalytical, Egyesült Királyság) alkalmaztunk (6.B. ábra). A küvetákat használat előtt abszolút etanollal aktiváltuk, desztillált vízzel átmostuk, majd egy standard zéta potenciállal rendelkező latex mikrogöngyöket tartalmazó oldattal (Malvern Panalytical, Egyesült Királyság) ellenőriztük a minőségüket. Az elektródapárral ellátott mérőcellákat 1 mg/ml 50% PBS-DW-zel hígított mintákkal töltöttük fel. Az elektromos térben a kolloid részecskék töltésükkel arányos módon a pozitív vagy negatív elektróda felé vándorolnak. A műszer a helyzetváltoztatásukból számítja a partikulumok zéta potenciál értékeit az elektromos térerősség függvényében (6.B. ábra; Kaszuba és mtsai., 2010).

A nanopartikulumokba csomagolt TR-BSA fluoreszcens modellanyag bezárási hatékonyságát spektrofлуорiméterrel (Fluorolog 3, Horiba Jobin Yvon, Japán) határoztuk meg. Ehhez a nioszómákat 50% (v/v) etanollal feltártuk és spektrofлуорiméterrel 592 nm gerjesztési (excitációs) és 612 nm emissziós hullámhosszokon megmértük a minták fluoreszcens intenzitását. Ismert koncentráció tartományba eső kalibrációs egyeneshez viszonyítva ($R^2=0,98$) kiszámoltuk a fluoreszcens modellanyag koncentrációit a nioszóma oldatokban. A bezárási hatékonyságot a nioszóma mintákba bezáródott töltet TR-BSA mennyiségének és a kezdeti hidratáló oldat összes TR-BSA tartalmának hányadosaként határoztuk meg százalékos formában, az alábbi egyenlet segítségével:

$$\text{Bezárási hatékonyság (\%)} = \frac{\text{Nioszóma minta TR – BSA tartalma}}{\text{Összes TR – BSA tartalom}} \times 100$$

1. egyenlet. A nioszómák Texas Red-BSA (TR-BSA) töltetének bezárási hatékonyságát leíró matematikai egyenlet.

2.4. Sejtenyésztés

A kísérletekhez szükséges primer sejteket, mint az endotélsejteket, pericitákat és asztrogliaikat patkányokból izoláltuk, a csoportunk által korábban kidolgozott protokollok szerint (Walter és mtsai., 2015; Barna és mtsai., 2020), az Állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény figyelembevételével.

2.5. Primer patkány agyi endotélsejtek életképességének vizsgálata

Az életképesség vizsgálatok során primer patkány agyi endotélsejteken nem-invazív, jelölésmentes, valós idejű impedanciaméréseken alapuló sejtanalízissel (RTCA-SP készülék; ACEA Biosciences, Amerikai Egyesült Államok) végeztük. A kísérletekhez az agyi endotélsejteket speciális, integrált aranyelektrodákat tartalmazó 96-lyukú (E-plate 96, ACEA Biosciences), IV típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronectin (25 µg/ml) elegyével bevont tenyésztőlemezekbe passzáltuk (6×10^3 sejt/lyuk). A sejtek növekedését valós időben nyomon követtük, a plató fázis elérésekor pedig megkezeltek a DMEM/F-12-t, 10% borjúplazmából készített szérumot (PDS, First Link, Egyesült Királyság), HEPES-t (10 mM), heparint (100 µg/ml), valamint ITS-t (5 µg/ml inzulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml nátrium-szelenit, Pan-Biotech GmbH., Németország), bázikus fibroblaszt növekedési faktort (bFGF, 1 ng/ml Roche, Svájc) és gentamicint (50 µg/ml) tartalmazó tápfolyadékban oldott anyagokkal. A szabad peptid toxicitás-vizsgálata során a Quasar 570-nel fluoreszcensen jelölt PepH3-mat 1,875–120 µM, a nem-célzott, illetve a PepH3-targetált nanorészecskék hatásait 0,1–10 mg/ml közötti koncentráció tartományban teszteltük. A sejtek impedancia változásait 24 órán keresztül 5 perces mérésenként követtük nyomon. A sejtek életképesség változásait a kezelés kezdési pontjára normalizált sejtindex értékeként adtuk meg, az $[R_n - R_b]$ számítás eredményeként. A képletben az R_n az adott lyukban a sejtek és az elektrodák közti impedancia értékét, míg az R_b a sejtmentes tápfolyadék háttérimpedanciáját adja meg (Bocsik és mtsai., 2016).

2.6. Az agyi endotélsejtek PepH3 peptid felvételének vizualizációja

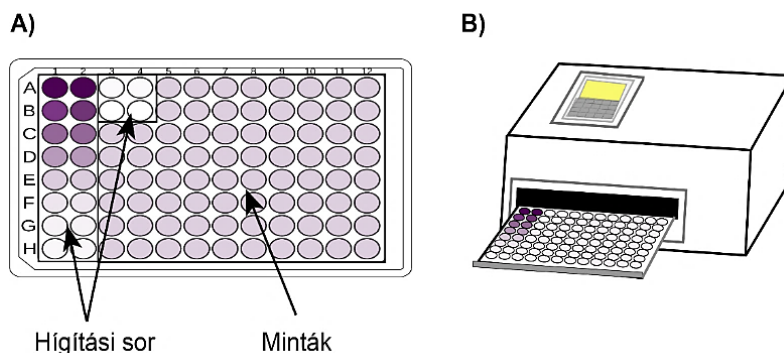
Az agyi endotélsejtek PepH3 peptid sejtfelvételét konfokális mikroszkóp segítségével követtük az idő függvényében. A Quasar 570-nel fluoreszcensen jelölt PepH3 agyi endotélsejtekbe jutásának vizsgálatához a sejteket gyárilag bevont üvegaljű Petri-csészében (3,5 cm², Advanced TC, Greiner Bio-One, Németország) tenyésztettük. A konfluens állapot elérése után az endotélsejteket 100 nM fluoreszcensen jelölt PepH3-mat tartalmazó fenolvörös mentes komplett médiumban 30 percen, 5 és 24 órán keresztül kezeltük. A sejtmagok

kimutatásához a Hoechst 33342 magfestéket alkalmaztunk (1 µg/ml, 10 perc). Az inkubációt (37 °C, 5% CO₂, 30 perc, 5 óra és 24 óra) követően eltávolítottuk a kezelő oldatokat, majd a sejteket 1% PDS-t tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5,5 mM D-glükóz, 20 mM HEPES; pH 7,4) mostuk. A jelölt PepH3 peptid önálló sejtekbe jutását élő sejteken vizualizáltuk, 37 °C-ra fűthető mintatartó és konfokális lézer mikroszkóp segítségével (Leica Microsystems, Németország).

2.7. A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák töltetének sejtfelvétel vizsgálata

Megvizsgáltuk a nem-célzott és az N-PepH3 nanorészecskébe zárt TR-BSA töltet primer patkány agyi endotélsejtekbe jutását. A kísérletekhez a sejteket IV típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronektinnel (25 µg/ml) bevont, 24-lyukú tenyésztőlemezekben (Corning Costar, Amerikai Egyesült Államok) növesztettük. A sejteket konfluens állapotban kezeltük meg 0,3 mg/ml nem-célzott (N töltet koncentrációja: 1,59 µg/ml), illetve PepH3-mal funkcionizált (N-PepH3 töltet koncentrációja: 1,36 µg/ml) fenolvörös mentes komplett médiumban hígított nioszóma oldatokkal. A mintákat 15 és 30 percen, valamint 1 órán át inkubáltuk (37 °C, 5% CO₂) síkrázó készüléken (100 fordulat/perc; OS10 Orbital Shaker BioSan, Lettország). Az inkubációs idő leteltével a kezelő oldatokat eltávolítottuk, majd a sejtek felszínéhez tapadt, de sejtbe be nem jutott nanorészecskéket 0,1% BSA-t tartalmazó jéghideg PBS-sel, valamint egyszeri savas pufferrel (acid-stripping oldat; 50 mM glicin, 100 mM NaCl; pH 3) mostuk le. A savas puffer eltávolítása érdekében további PBS-es mosást alkalmaztunk. A kísérlet végén a sejteket 1% Triton X-100 tartalmú desztillált vízzel tártuk fel. A sejtekbe bejutott TR-BSA nioszóma töltet fluoreszcencia intenzitásait spektrofluoriméterrel mértük le 592 nm gerjesztési és 612 nm emissziós hullámhosszokon.

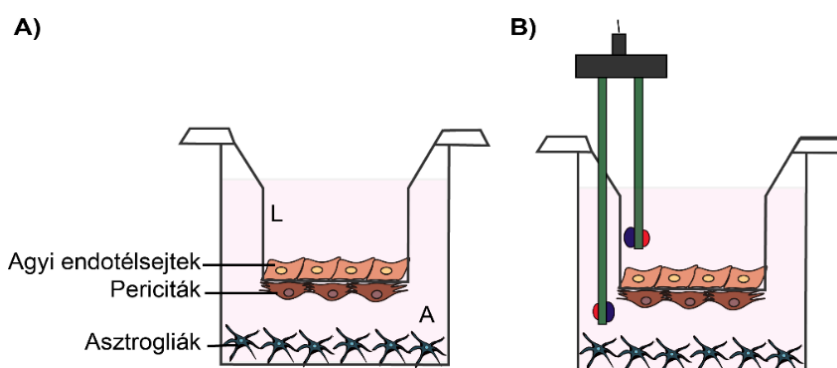
Az agyi endotélsejtekbe internalizálódott nagy molekulatömegű kargó koncentrációját a sejtek összfehérje tartalmához viszonyítottuk, amelyet bicinkininsavas vizsgálattal (BCA Protein Assay, Thermo Fischer Scientific, Amerikai Egyesült Államok) határoztunk meg. A módszer elméleti háttérében a fehérjékben lejátszódó réz(II)-ionok réz(I)-ionokká redukálódása áll, amellyel a bicinkininsav-reagens (2,2'-bikinolin-4,4'-dikarbonsav) kelát komplex képzése során átlátszóból lila színelváltozást mutat. A lila színintenzitása tehát reflektál a réz(I)-ion mennyiségén keresztül a fehérjék koncentrációjára (Cortés-Ríos és mtsai., 2020). A mintáinkat a vizsgálat során egy ismert koncentrációjú kalibrációs standard hígítási sorhoz ($R^2=0,99$) viszonyítottuk (7.A. ábra). A színreakció végén plate reader (Labsystems Multiskan Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific, Amerikai Egyesült Államok) segítségével 570 nm hullámhosszon mértük le a minták és a hígítási sor abszorbancia intenzitásait (7.B. ábra).



7. ábra. (A) BCA Protein assay alkalmazása során a mintákban megfigyelhető lila színváltozás. **(B)** Plate reader sematikus ábrája.

2.8. A szabad PepH3 és a peptiddel funkcionizált nioszómák permeabilitásának vizsgálata háromsejtes vér-agy gát modellen

A permeabilitási kísérleteket a vér-agy gát *in vitro*, endotél-, periciták és asztrogliá sejtek együtt tenyésztésével létrehozott modelljén végeztük (8.A. ábra; Nakagawa és mtsai., 2009; Veszélka és mtsai., 2018). A háromsejtes ko-kultúra létrehozását először az asztrogliá sejtek tenyésztésével kezdtük, amiket IV típusú kollagénnel (100 $\mu\text{g/ml}$) bevont, kísérleti elrendezéstől függően 24- vagy 12-lyukú tenyésztőlemezekbe szélesztettünk (P1 passzázs szám, $8,5 \times 10^4$ sejt/ cm^2).



8. ábra. (A) A vér-agy gát háromsejtes tenyésztetes modelljének sematikus ábrája. L: luminális oldal, A: abluminális oldal. **(B)** A transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérése ko-kultúra modellben STX-2 elektródával.

Az asztrociták konfluens fázisának elérése után három héttel a tenyésztőbetétek belső felszínére (luminális oldal, L) agyi endotélsejteket, a külsőre (abluminális oldal, A) pedig pericitákat tenyésztettünk az anatómiai elhelyezkedésüknek megfelelően (8.A. ábra). Az endotélsejtek (P1 passzázs szám, $7,5 \times 10^4$ sejt/ cm^2) tenyésztéséhez a filterek luminális felszínét Matrigéllal (alacsony növekedési faktor tartalom, Corning Costar, Amerikai Egyesült Államok)

vontunk be, a pericitákat (P2 passzásszám, $1,5 \times 10^4$ sejt/cm²) pedig a filter IV kollagénnel bevont felszínre szélesztettük. A modell összerakása után a három sejttípust 4-5 napig együtt tenyésztettük komplett endotélsejt médiumban. A kísérletet megelőző 24 órával a szoros kapcsolatok zártságának növelése érdekében a felső kompartment tenyésztő médiumát 250 μ M cPT-cAMP-vel (8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát) és 17,5 μ M cAMP-specifikus foszfodiészteráz szelektív inhibitorral (Ro-20-1724) egészítettük ki.

A modellben a sejtek növekedését és az endotélsejtek közötti szorosság mértékét transzendoteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérésekkel követtük nyomon. A TEER ugyanis reflektál a szoros kapcsolatok ionokkal szembeni áteresztőképességére (Vigh és mtsai., 2021). Az ellenállás mérésekhez EVOM rezisztenciamérő műszert használtuk és a 24-lyukú lemezekben összeállított modellen kamra elektródákkal, míg a 12-lyukban növesztett tenyészetekben STX-2 elektródák (World Precision Instruments Inc., Amerikai Egyesült Államok, 8.B. ábra) segítségével mértünk. Az értékeket átlagoltuk és levontuk belőle a sejtmentes tenyésztőbetéteken mért háttérértéket. Az önálló PepH3 virális peptid, valamint a nioszómák permeabilitási kísérleteit akkor végeztük el, amikor a ko-kultúra modellünk elérte kellően magas ($\geq 200 \Omega \times \text{cm}^2$) TEER-t, amely a tenyészet plató fázisát jelezte.

A fluoreszcensen jelölt PepH3 vér-agy gáton keresztüli permeabilitás kísérlete során a 24-lyukú tenyésztőbetétek felső kompartmentjét (0,2 ml; felszín: 0,3 cm²) megkezeltek 10 nM, 1% PDS-sel kiegészített fenolvörösmentes DMEM/F-12 tápfolyadékban (Gibco, Amerikai Egyesült Államok) oldott PepH3 kezelőoldattal. Ezt követően a modellt 30 percig inkubáltuk (37 °C, 5% CO₂) síkrázó készüléken (150 fordulat/perc; OS10 Orbital Shaker BioSan, Lettország).

A nem-célzott, valamint PepH3-mal funkcionalizált nioszómák töltetének permeabilitás vizsgálataihoz a 12-lyukú tenyésztőbetét luminális oldalát (0,5 ml; felszín: 1,12 cm²) 1 mg/ml (TR-BSA töltet koncentráció: 5 μ g/ml) 1% PDS-t tartalmazó fenolvörösmentes DMEM/F-12-ben hígított nioszóma oldattal kezeltük, majd síkrázóra helyezve inkubáltuk 15 percen keresztül (37 °C, 5% CO₂). A vér-agy gát modell fiziológiás paramétereinek ellenőrzésére a paracelluláris marker nátrium-fluoreszceint (SF; 10 μ g/ml; 376 Da) és a transzcelluláris átjutás jelzőanyagát az Evans-kék-albumin komplexet (EBA; 167,5 μ g/ml Evans-kék és 10 mg/ml BSA; 67 kDa) használtunk.

Az inkubációs idők leteltével spektrofotométerrel meghatároztuk az alsó, akceptor kompartmentek fluoreszcensen jelölt PepH3 peptid (λ_{Ex} : 552 nm; λ_{Em} : 567 nm), a nioszómák tölteteinek TR-BSA (λ_{Ex} : 592 nm; λ_{Em} : 613 nm), valamint az SF (λ_{Ex} : 485 nm; λ_{Em} : 520 nm) és

EBA (λ_{Ex} : 584 nm; λ_{Em} : 680 nm) fluoreszcencia intenzitásait. Kiszámoltuk a mért adatok alapján az átjutott agyagok koncentrációit standard kalibrációs egyenesekhez viszonyítva. A fluoreszcens anyagok permeabilitását a lúminálisból az ablúminális kompartmentbe a látszólagos permeabilitási együtthatóval (P_{app}) jellemezzük a következő képlet szerint:

$$P_{\text{app}} \text{ (cm/s)} = \frac{[C]_{\text{A}} \times V_{\text{A}}}{[C]_{\text{L}} \times A \times \Delta t}$$

2. egyenlet. A látszólagos permeabilitási együttható (P_{app}) számolásához használt képlet. $[C]_{\text{A}}$: a modellanyag ablúminális koncentrációja, $[C]_{\text{L}}$: a modellanyag lúminális koncentrációja, V_{A} : az ablúminális kompartment térfogata, A : a tenyésztőbetét felszíne, Δt : az eltelt idő.

2.9. Statisztikai kiértékelés

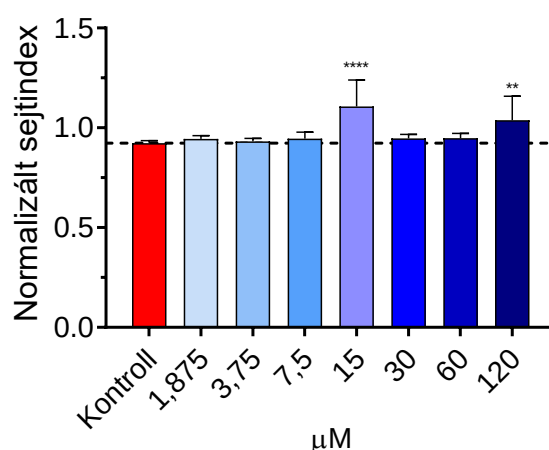
A dolgozatomban leírt kísérletek eredményeit a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., Amerikai Egyesült Államok) statisztikai program segítségével értékeltük ki. Az adatokat átlag $\pm$ SD (szórás) értékekben adtuk meg. Az adatsorokon variancia-analízist (ANOVA) követően Dunnett-tesztet vagy Bonferroni-tesztet alkalmaztunk és statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,05$ értékeket tekintettük. Minden vizsgálatot legalább háromszor megismételtünk, a párhuzamos minták száma pedig 4-10 volt kísérletenként.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az önálló PepH3 virális peptid vizsgálata vér-agy gát modellekben

3.1.1. A PepH3 peptid hatása az agyi endotélsejtek életképességére

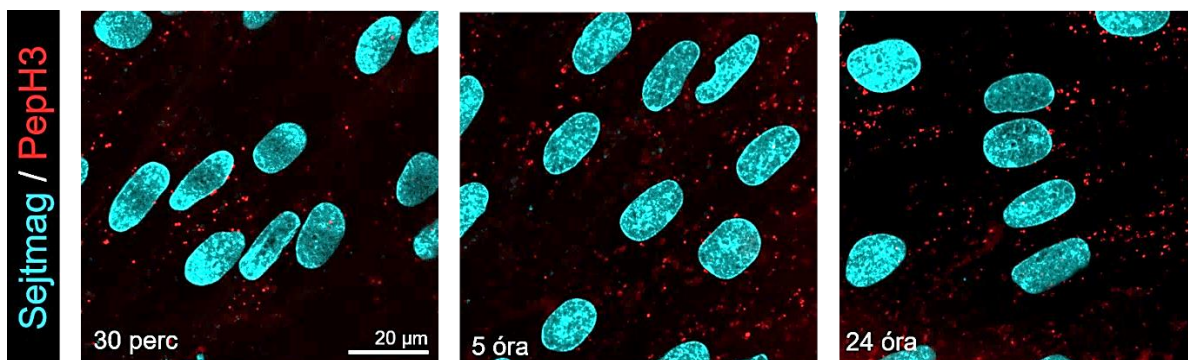
A szabad PepH3 peptid agyi endotélsejtekre gyakorolt hatását 1,875–120 μM közötti koncentráció tartományban 24 órán keresztül követtük nyomon valósídejű impedanciaméréssel (9. ábra). Kontrollnak a nem-kezelt, csak tápfolyadékot kapott mintákat tekintettük, a statisztikai kiértékelés során ehhez viszonyítottuk a különböző csoportokban a kezelés kezdőpontjára normalizált sejindexeket. A fluoreszcensen jelölt PepH3 peptid 24 óra elteltével sem csökkentette az endotélsejtek életképességét egyik vizsgált koncentráció esetében sem.



9. ábra. A PepH3 peptid önálló hatása az agyi endotélsejtek életképességére 24 órát követően. Átlag $\pm$ SD. Statisztikai analízis: ANOVA és Dunett-posztteszt, **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$ csoporton belül a kontroll mintákhoz viszonyítva; $n = 6-12$.

3.1.2. A fluoreszcensen jelölt PepH3 peptid sejtfelvételének vizualizációja

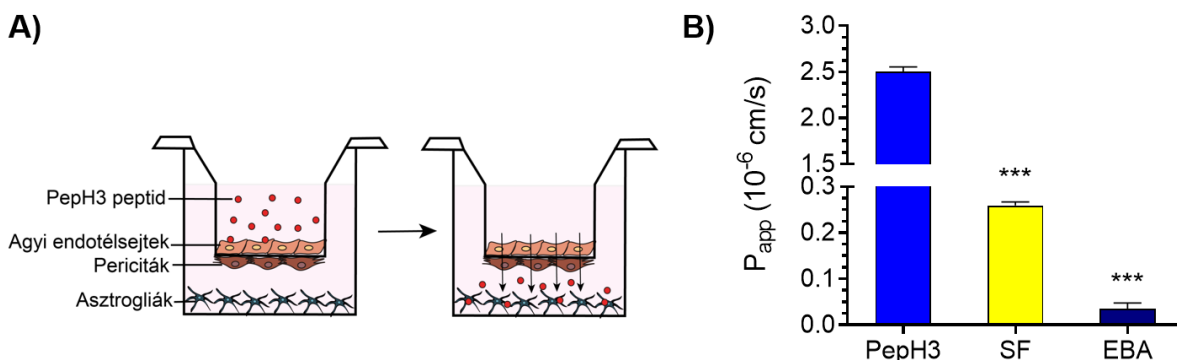
Konfokális lézermikroszkóp segítségével nyomon követtük a vörös fluoreszcens jelet adó Quasar 570-nel jelölt PepH3 peptid (100 nM) élő agyi endotélsejtek általi felvételét az idő függvényében (10. ábra). A sejtekbe bejutott PepH3 peptid fluoreszcens intenzitása már a gyors, 30 perces kezelés után szemmel láthatóan jelentős volt. A 30 perc után készült képeket összehasonlítva az 5 és 24 órás kezeléseket utáni felvételekkel elmondhatjuk, hogy a hosszabb kezelésekre hatására sem nőtt tovább nagyobb mértékben a peptid sejtfelvétele.



10. ábra. A Quasar 570-nel fluoreszcensen jelölt PepH3 peptid (100 nM) élő agyi endotélsejtekbe jutásának vizualizációja konfokális lézermikroszkóppal a 30 perces, 5 és 24 órás, 100 nM-os kezeléseket követően. Vörös: jelölt PepH3, kék: sejtmagok. Mércé: 20 μm .

3.1.3. Az önálló PepH3 peptid vér-agy gát permeabilitásának vizsgálata

A sejtfelvételi vizsgálatokat követően a jelölt PepH3 gyors és intenzív sejtekbe jutására alapozva a vér-agy gát permeabilitási kísérletekhez (11.A. ábra) a rövid idejű, 30 perces kezelési időtartamot választottuk. A PepH3 10 nM-os koncentrációban jelentős ($2,5 \times 10^{-6}$ cm/s) átjutást mutatott a ko-kultúra modellünkön, ami szignifikánsan magasabb volt, mint a modell barrier funkciójának ellenőrzésére használt vér-agy gát markermolekulák átjutása (11.B. ábra). A PepH3 vér-agy gát penetrációja a kis molekulású SF ($0,26 \times 10^{-6}$ cm/s) paracelluláris átjutásával összevetve tízszeres, míg a nagy molekulatömegű EBA ($0,04 \times 10^{-6}$ cm/s) transzcelluláris penetrációjával szemben hatvanszoros növekedést mutatott. A markerek irodalmi standard értékek (SF: 1×10^{-6} cm/s; EBA: $0,1 \times 10^{-6}$ cm/s) alatti alacsony átjutása azt jelzi, hogy kellően zárt, jó minőségű vér-agy gát modellt sikerült létrehozunk.

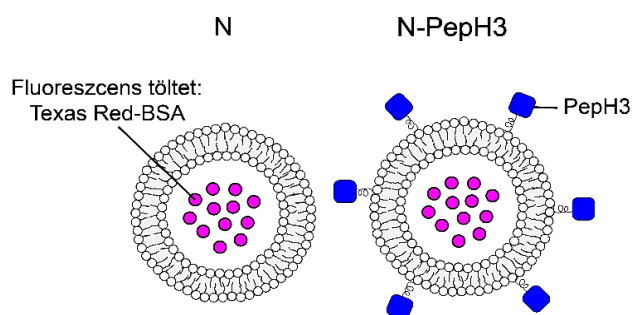


11. ábra. (A) A jelölt PepH3 peptid vér-agy gát átjutásának sematikus ábrája. **(B)** A fluoreszcensen jelölt PepH3 peptid, valamint a nátrium-fluorescein (SF) és az Evans-kék albumin komplex (EBA) markermolekulák átjutása a vér-agy gát ko-kultúra modellen (30 perc, 10 nM). Átlag $\pm$ SD. Statisztikai analízis: ANOVA és Bonferroni-posztteszt, *** $P < 0,001$ csoporton belül PepH3 peptidhez viszonyítva; $n = 4$. P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható.

3.2. A PepH3 peptiddel funkcionizált nanorészecskék vizsgálata vér-agy gát modellekben

3.2.1. Az előállított nioszómák jellemzése

Meghatároztuk az általunk előállított nem-célzott (N), illetve a PepH3 virális peptiddel funkcionizált (N-PepH3), töltetként fluoreszcens Texas Red-BSA modellanyagot hordozó nioszómák főbb fiziko-kémiai tulajdonságait (12. ábra).



12. ábra: Az előállított nioszómák sematikus felépítése. N: nem-célzott nioszóma, N-PepH3: PepH3 virális peptiddel funkcionizált vezikuláris nanorészecske, fluoreszcens töltet: Texas Red-BSA.

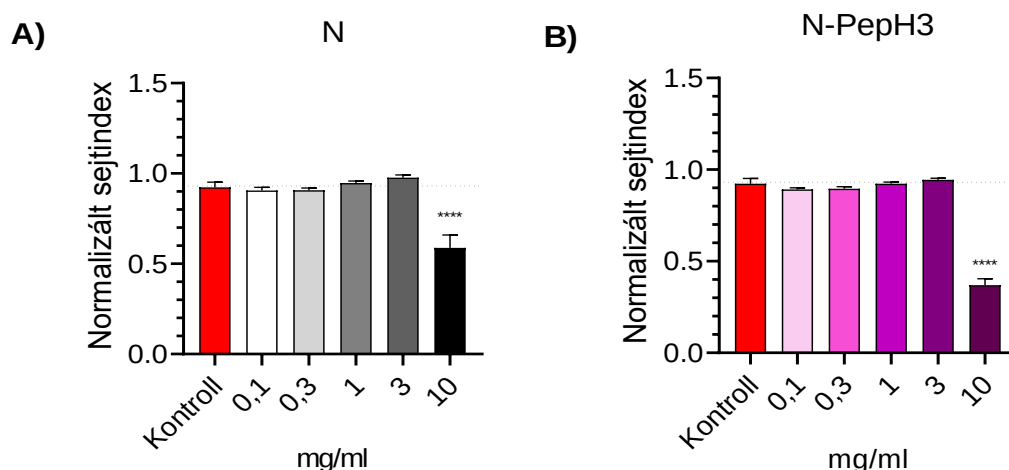
A dinamikus fényszórás mérések alapján a nanohordozók átmérője a nem-célzott nioszómák esetén 110,17 nm, míg a PepH3 peptiddel funkcionizált nanorészecskék mérete ennél kissé nagyobb 117,13 nm volt (1. táblázat). Mindkét típusú partikulum polidiszperzitási indexe 0,3 alatti (N: 0,23 és N-PepH3: 0,27) értékeket vett fel, amely a nioszóma minták szűk méreteloszlására utalt. A nioszómák felszíni töltése a zéta potenciál mérések alapján mindkét esetben enyhén negatív (N: -5,16 és N-PepH3: -3,44) volt. A nioszómákba csomagolt Texas Red-BSA fluoreszcens modellanyag bezárása a kétféle nanorészecske esetében közel azonos (N: 35% és N-PepH3: 36%) hatékonysággal valósult meg (1. táblázat).

1. táblázat. Az előállított nioszómák főbb fiziko-kémiai tulajdonságai.

Típus	Átmérő (nm)	Polidiszperzitási index	Zéta potenciál (mV)	Bezárási hatékonyság (%)
N	110,17 ± 0,67	0,23 ± 0,01	-5,16 ± 0,75	35
N-PepH3	117,13 ± 2,02	0,27 ± 0,01	-3,44 ± 0,29	36

3.2.2.A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák hatásai az agyi endotélsejtek életképességére

Megvizsgáltuk valós idejű sejtanálízissel a nem-targetált és a PepH3-mal funkcionizált nioszómák agyi endotélsejtek életképességére gyakorolt hatásait, 0,1–10 mg/ml koncentráció tartományban 24 órán keresztül. A kezeletlen kontrollhoz képest 0,1–3 mg/ml koncentráció tartományban egyik kezelési csoport (N és N-PepH3) sem okozott szignifikáns impedancia változást. A 10 mg/ml-es kezelés azonban mind az N, mind pedig az N-PepH3 esetén szignifikáns csökkenést okozott az agyi endotélsejtek életképességben. További kísérleteinkhez ezért a biztonságos 0,1–3 mg/ml közötti tartományból választottuk ki a kezelési koncentrációkat.

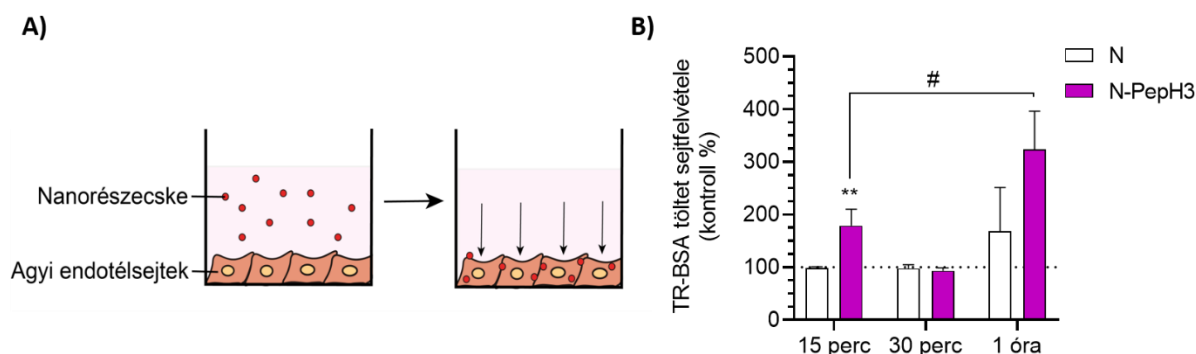


13. ábra. (A) A nem-célzott (N) és **(B)** a PepH3 peptiddel (N-PepH3) funkcionizált nanorészecskék agyi endotélsejtek életképességére gyakorolt hatása 24 órás kezelést követően. Átlag $\pm$ SD. Statisztikai analízis: ANOVA és Dunett-posztteszt, **** $P < 0,0001$ csoporton belül a kontrollhoz viszonyítva; $n = 6-12$.

3.2.3.A PepH3 peptiddel funkcionizált nioszómák töltetének sejtfelvétele

A kutatásunk egyik fő hipotézisének tesztelésére megvizsgáltuk, hogy vajon a nioszómák PepH3 funkcionizálása megnöveli-e a partikulumokba zárt TR-BSA sejtekbe jutását. Ehhez 15 perc, 30 perc, valamint 1 órán át kezeltük az agyi endotélsejteket nanopartikulumokkal (0,3 mg/ml), majd megmértük a sejtekbe jutott fluoreszcens TR-BSA töltet mennyiségét (14.A. ábra). Rendkívül gyorsan, már 15 perc után szignifikánsan megemelkedett a TR-BSA sejtfelvétele a PepH3 peptiddel célzott nanorészecskékkel történő kezelést követően (N-PepH3_{15perc}: 179%) a kontroll, nem-targetált nioszómák töltetével összehasonlítva. A 30 perces kezelés esetében nem volt szignifikáns eltérés a két kezelési csoport között, az N-PepH3 töltet sejtbefutásának mértéke csökkent a 15 perces értékekkel összehasonlítva. Az 1 órás inkubáció

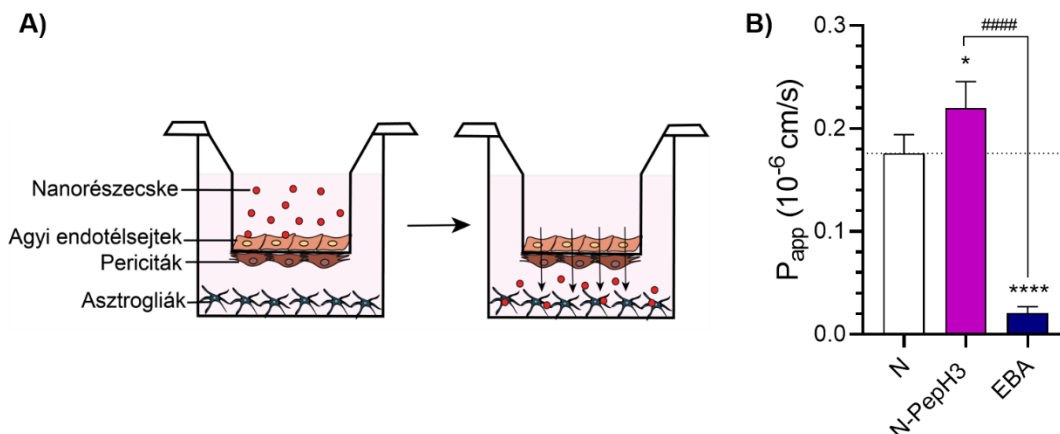
elteltével az N és N-PepH3 csoport között az adatok nagy szórása miatt nem volt szignifikáns különbség. A 1 órás adatokat összevetve a 15 perces eredményekkel a TR-BSA sejntinternalizációja szignifikánsan nőtt (N-PepH3_{1óra}: 324%) a peptiddel funkcionális nioszómákkal kezelt csoportokban (14.B. ábra).



14. ábra. (A) A nioszómákba zárt TR-BSA töltet felvételének sematikus ábrája. **(B)** A nem-célzott (N; 0,3 mg/ml) és a PepH3 peptiddel funkcionális (N-PepH3; 0,3 mg/ml) nanorészecskék töltetének agyi endotélsejtek általi sejtfelvétele a kezelést követő 15 és 30 percben, illetve 1 óra után. Átlag $\pm$ SD. Statisztikai analízis: ANOVA és Bonferroni-posztteszt, ** $P < 0,01$ csoporton belül a nem-célzott nanorészecske mintákhoz viszonyítva; # $P < 0,05$ a 15 perces PepH3-mal funkcionális nanopartikulumokhoz viszonyítva; $n = 4-6$.

3.2.4.A PepH3 peptiddel funkcionális nanorészecskék töltetének vér-agy gát permeabilitás vizsgálata

A kutatásunk második fő hipotézisének felderítésére teszteltük a PepH3-mal funkcionális nanorészecskék átjutását *in vitro* vér-agy gát modellünkön (11.A. ábra). A primer ko-kultúra modellen végzett kísérletünkben az N-PepH3 nioszómák esetén 15 perces kezelést követően szignifikánsan (N-PepH3: $0,22 \times 10^{-6}$ cm/s) megnőtt a bezárt TR-BSA vér-agy gáton keresztüli penetrációja a nem-célzott nanorészecskék töltetének átjutásához képest (N: $0,18 \times 10^{-6}$ cm/s) (15.B. ábra). A modell barrier funkciójának ellenőrzésére teszteltük az EBA és az SF markerek permeabilitását. A 67 kDa molekulatömegű EBA $0,02 \times 10^{-6}$ cm/s-os transzcelluláris átjutásával összevetve az N-PepH3 penetrációja több, mint tízszer magasabb volt. Mind az EBA, mind pedig az SF (SF: $0,3 \times 10^{-6}$ cm/s) a standard irodalmi határok alatti (EBA: $0,1 \times 10^{-6}$ cm/s, SF: 1×10^{-6} cm/s) P_{app} értékeket vett fel, amely igazolja az általunk előállított vér-agy gát modell megfelelő szorosságát.



15. ábra. (A) A sematikus ábra a nanopartikulumok átjutását mutatja a háromsejtes vér-agy gát modellünkön. **(B)** A nem-célzott (N; 1 mg/ml) és PepH3 peptiddel (N-PepH3; 1mg/ml) funkcionizált nanorészecskék töltetének, illetve az Evans-kék albumin (EBA) marker molekula 15 perces vér-agy gát átjutása. Átlag $\pm$ SD. Statisztikai analízis: ANOVA és Bonferroni-posztteszt, * $P < 0,1$; **** $P < 0,0001$ csoporton belül a nem-célzott nanorészecskékhez viszonyítva; #### $P < 0,0001$ az N-PepH3-hoz viszonyítva; $n = 4-6$. P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható.

4. MEGBESZÉLÉS

A központi idegrendszert érintő betegségek hatékony gyógyszeres kezelése a mai napig hatalmas, megoldásra váró probléma, mivel jelenleg csak olyan terápiás szerek vannak forgalomban, amelyek csak kis hatásfokkal, sok mellékhatás mellett működnek (Furtado és mtsai., 2018; Tosi és mtsai., 2019). A probléma hátterében főként a vér-agy gát működése áll, amely megakadályozza, hogy a kis és nagy molekulású neurofarmakonok többsége az agyba jusson (Abbott, 2013). Napjainkban az agyi gyógyszerbevitel hatékonyságát fokozó technológiák közül a vér-agy gáton való átjutást segítő peptidek és nanohordozó rendszerek fejlesztése intenzíven kutatott területnek számít (Zhou, Smith és Liu, 2021).

4.1. Az önálló PepH3 virális peptid vizsgálata

A terápiás molekulák vér-agy gáton keresztüli átjutásának elősegítésére az egyik ígéretes lehetőség a CPP-kkel, vagy vér-agy gát shuttle molekulákkal konjugált gyógyszerek fejlesztése (McCully és mtsai., 2018). A peptideket a kutatók régóta vizsgálják már vakcinák, daganatok elleni immunterápia, génbejuttatás, illetve a diagnosztika különböző területein, de ezek főképp a perifériás szervekben voltak hatásosak (Gupta és mtsai., 2005; McCully és mtsai., 2018). A peptidek és a hozzájuk kapcsolt gyógyszermolekulák agyi bejuttatásának fő kritériuma, hogy valamely tulajdonságuknak köszönhetően képesek legyenek átjutni a vér-agy gáton (Jafari és mtsai., 2019). Ennek elősegítésére legtöbbször a peptidek fiziko-kémiai tulajdonságait

változtatják meg, illetve úgy módosítják a molekulákat, hogy azok valamely fiziológiás szállítófehérjéhez kapcsolódhassanak (Jafari és mtsai., 2019). Ismert stratégia továbbá a vírusokból származó olyan peptidszakaszok felhasználása, melyek elsődleges szerepe a patogének sejtekbe jutásának elősegítése (Guarnieri és mtsai., 2013; McCully és mtsai., 2018). Az irodalomban már megtalálhatóak olyan virális, a vér-agy gáton átjutni képes peptidek, mint például TAT vagy az RVG29 (Rabies Virus Glikoprotein-29), melyek fokozták az agyi endotélsejteken található transzportrendszereken keresztül a doxorubicin, paklitaxel, és metotrexát agyi bejutását (Jafari és mtsai., 2019; Desale és mtsai., 2021).

Csoportunk portugál együttműködő partnerei Dengue vírus-2 kapszid fehérjéjéből tisztítottak és széles körben tanulmányoztak CPP-ket (Neves és mtsai., 2017; Neves-Coelho és mtsai., 2017). Közülük a PepH3 peptid mutatott legjobb sejtfelvételt és átjutást HBEC-5i humán, illetve bEnd.3 egér agyi endotélsejt vonalakon és rágsálókban (Neves és mtsai., 2017; Cavaco és mtsai., 2020). Munkám első fő célja ezért az volt, hogy megvizsgáljam a PepH3-at a csoportunk által japán partnerekkel kifejlesztett és szabadalmaztatott primer patkány vér-agy gát modellen is, ami széleskörben elfogadott sejtenyészeti modell gyógyszerhordozók agyi bejutásának vizsgálatára (Nakagawa és mtsai., 2009; Veszélka és mtsai., 2018; szabadalom: WO/2007/072953).

A biológiailag aktív peptidek tulajdonságait: toxicitását, sejtfelvételi mechanizmusát és vér-agy gát permeabilitását *in vitro* és *in vivo* modellekben vizsgálják. A legtöbb módosított molekula esetén, különösen azoknál, amelyek valamely fluoreszcens jelölőt hordoznak fennáll a veszélye, hogy a konstrukt negatívan befolyásolja a sejtek életképességét. A biológiai vizsgálatok megkönnyítése érdekében a PepH3 peptidet a portugál partnereink egy intenzív fluoreszcens jelet adó, de kevésbé toxikus Quasar 570 fluorofórral konjugálták. Vizsgálataik alapján a fluoreszcens molekula nem változtatta meg a peptid biológiai aktivitását (Cavaco és mtsai., 2020). A jelölt PepH3 kezelés az alkalmazott koncentráció tartományban nem gyakorolt toxikus hatást a patkányokból izolált primer agyi endotélsejt kultúráinkra, ennek köszönhetően biztonsággal tesztelhetjük további kísérleteinkben. A fluoreszcens PepH3 élő primer endotélsejtek általi felvétele már rövid idejű, 30 perces kezelés után is igen jelentős volt, csakúgy, mint az átjutása a háromsejtes vér-agy gát modellünkben. Eredményeink alátámasztják Neves és munkatársai által publikált adatokat, melyben a peptid rendkívül gyors (5 és 15 perces) sejtfelvételt és vér-agy gáton való átjutást mutatott tenyészetes modellben és egerekben (Neves és mtsai., 2017). Kimutatták továbbá, hogy a PepH3 nagyméretű, 27 kDa-os GFP molekula átvitelére is képes bEnd.3 egér endotélsejt monokultúra modellben a vér-agy gát

integritásának megőrzése mellett. Ez utóbbit igazolta, hogy az 5 órás peptid kezelést követően a fluoreszcein-izotiocianát konjugált dextrán (FD40; 40 kDa) paracelluláris átjutása nem nőtt meg (Neves-Coelho és mtsai., 2017). Az *in vitro* permeabilitási kísérletek esetén elengedhetetlen azonban a megbízható vér-agy gát modellek kiválasztása, amelyek megfelelően expresszálják a gyógyszerhordozók tanulmányozása szempontjából nélkülözhetetlen fiziológiás transzportereket (Veszélka és mtsai., 2018). A vér-agy gát permeabilitási vizsgálatok esetében az immortalizált sejtvonal alapú modellekkel szemben az állatokból frissen izolált, primer sejtekből álló modellek sokkal megbízhatóbbak (Uchida és mtsai., 2020). A háromsejtes ko-kultúra modellünkben az endotélsejtek közötti szoros kapcsolat kialakítását és a transzporterek kifejeződését erősíti a periciták és asztroglia sejtek együtt tenyésztése. Az irodalom alapján jó minőségű vér agy gát modellnek tekinthetjük azt, amelyben az EBA transzcelluláris marker P_{app} értékei $0,1 \times 10^{-6}$ cm/s alattiak, illetve a transzcelluláris SF átjutás esetén alacsonyabbat mérünk, mint 1×10^{-6} cm/s (Nakagawa és mtsai., 2009; Helms és mtsai., 2016). A PepH3 peptid permeabilitásának vizsgálata során a modellünkben mindkét markermolekula penetrációja alatta volt az irodalmi határértékeknek. A jelölt PepH3 $2,5 \times 10^{-6}$ cm-es permeabilitása ebben a jó vér-agy gát tulajdonságú modellben is magas, az SF és EBA átjutását többszörösen meghaladó volt.

A szabad PepH3-mal végzett kísérletei eredményeink alapján megerősíthetjük együttműködő partnereink azon állításait, hogy az általuk tisztított peptid gyors és hatékony sejtinternalizációs és vér-agy gát átjutási képességgel rendelkezik. A molekula ezért alkalmas lehet gyógyszerhordozó konstruktok fejlesztésére az agyi bejuttatás fokozásának céljából.

4.2. A PepH3 peptiddel funkcionális nioszómák vizsgálata

A központi idegrendszer érintő betegségek hatékony gyógyszeres kezelésére a nanoméretű hordozórendszerek jól kiaknázható innovatív lehetőséget biztosítanak (Lombardo és mtsai., 2020). A hatóanyagok sikeres agyi bejuttatáshoz azonban nem elegendő a terápiás szerek nanorészecskébe zárása, elengedhetetlen a hordozók funkcionálizálása az agyi bejutásukat fokozó molekulákkal. Csoportunk korábbi, célzott nanopartikulumokkal kapott eredményei (Mészáros és mtsai., 2018; Porkoláb és mtsai., 2020; Veszélka és mtsai., 2021) és számos preklinikai és klinikai vizsgálat igazolja például a glutation tripeptid célzóligandal ellátott gyógyszerhordozó nanopartikulumok központi idegrendszeri terápiás hatékonyságát (Rip és mtsai., 2014; Gaillard, 2016; Kanhai és mtsai., 2018). A glutation mellett azóta számos CPP-ről a kutatások során bebizonyosodott, hogy nemcsak önállóan, hanem nanopartikulumok

felszínére kapcsolva is képesek megnövelni a nanorészecskék töltetének agyi bejutását *in vitro* modellekben és rágsálókban (McCully és mtsai., 2018). Sharma és munkatársai a transferrin mellett második targetáló molekulaként TAT, penetratin vagy Mastoparan (*Vespula lewisii* darázs mérge) ligandokkal célzott liposzómákat állítottak elő, melyekbe doxorubicin hatóanyagot csomagoltak. A TAT-tal és penetratinnal funkcionizált transferrines liposzómákba zárt hatóanyag internalizációja és vér-agy gát átjutása fokozódott bEnd.3 sejtvonalakon és egerekben az egy célzóliganddal ellátott hordozókhoz képest. A Mastoparan és transferrin funkcionizált nanohordozók is kiválóan bejutottak ugyan a sejtekbe, de erőteljes toxikus hatásuk nem tette lehetővé a további *in vivo* vizsgálatukat (Sharma és mtsai., 2014).

A portugál együttműködő partnereink és a fentebb ismertetett saját eredményeikre alapozva készítettük el a PepH3 peptiddel funkcionizált vezikuláris nanopartikulumainkat nem-ionos felületaktív anyagokból és koleszterinből. Nioszómáink az agyi gyógyszerbejuttatás szempontjából ideális, 100 nm körüli mérettartományba estek, enyhe negatív felületi töltéssel rendelkeztek, ami szintén támogathatja a nanopartikulumok sejtek általi felvételét (Masserini, 2013; Walter és mtsai., 2021). A töltétként a fluoreszcens TR-BSA-t választottuk, aminek a bezáródása 35% körül volt, ami a nagy molekulásúlyú kargók esetén hatékonynak számít (Colletier és mtsai., 2002).

A PepH3 sejtpenetrációt elősegítő peptid alkalmazása nem volt toxikus hatással a sejtekre és a nioszómák felszínén már 15 perc után szignifikánsan fokozta a TR-BSA töltetet sejtfelvételét primer patkány agyi endotélsejtekben. A CPP-k felvétele a hozzájuk kapcsolt kargó vagy a hordozórendszerek tulajdonságaitól függően történhet energia független adszorptív-mediált transzcitózissal, és/vagy energia függő endocitotikus folyamatokon keresztül (Neves-Coelho és mtsai., 2017). Kísérletünkben a 30 perces kezelést követően visszaesett, azonban egy óra után tovább nőtt a funkcionizált nioszómák TR-BSA felvétele, ami a nanopartikulumok internalizálódása mögötti, általunk még felderítésre váró többelémű mechanizmusok működésére utalhat.

A PepH3 funkcionizált nanorészecskék töltetének átjutása 15 perc alatt igen hatékony (N-PepH3: $0,22 \times 10^{-6}$ cm/s) volt, ami a nem-funkcionizált nioszómához képest 1,2-szeres, míg a TR-BSA töltettel közel azonos molekulásúlyú paracelluláris EBA marker permeabilitásához képest tízszeres növekedés. Dos Santos és munkatársai TAT és transferrin célzóliganddal targetált liposzómák esetén bEnd.3 sejtvonal és gliasejtek együtt tenyésztésével

létrehozott vér-agy gát modellen vizsgálták a nanopartikulumba zárt töltet (plazmid DNS) átjutását. A funkcionális hatására csak hosszabb időtartamú kezelés, 8 óra után nőtt meg 1,7-szeresére a nanopartikulumok kargójának penetrációja a nem-targetált nanopartikulumokkal összehasonlítva (Dos Santos Rodrigues és mtsai., 2019).

Primer sejtes modelljeinkben a PepH3-mal funkcionális nioszómák sejtfelvételi és permeabilitási eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a peptidet egy nem toxikus, gyors átjutást biztosító vér-agy gát shuttle peptidnek tekinthetjük, amely alkalmas lehet központi idegrendszeri célpontú nanopartikulumok agyi bejutásának fokozására.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Tudományos diákköri munkám eddigi eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a virális eredetű PepH3 sejtpenetrációt elősegítő peptid önállóan és nanorészecskék felszínére kötve is képes fokozott sejtfelvételt biztosítani. Szoros barrier tulajdonságokkal rendelkező vér-agy gát modellben az önálló peptid rövid idejű, hatékony átjutást mutat, illetve nanorészecskék felszínére kötve növeli a nanopartikulumok nagy molekulású töltetének permeabilitását is. Eredményeink alapján a PepH3 vér-agy gát shuttle peptid ezért további vizsgálatokat követően alkalmas lehet agyi célpontú gyógyszerhordozó konstruktok, illetve nanohordozó rendszerek fejlesztésének céljára.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 2010; 37(1): 13-25.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7(1): 41-53.
- Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2013; 36: 437–449.
- Abdelkader H, Alani AW, Alany RG. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Deliv.* 2014; 21(2): 87-100.
- Abo-Al-Ela HG. RNA Interference in Aquaculture: A Small Tool for Big Potential. *J Agric Food Chem.* 2021; 69(15):4343-4355.
- Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.* 2009; 9 Suppl 1: S3.
- Barna L, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V, Jósvay K, Zvara Á, Campos-Bedolla P, Deli MA. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage. *Fluids Barriers CNS.* 2020; 17(1):5.
- Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* 2004; 104:29-45.
- Bocsik A, Walter FR, Gyebrovszki A, Fülöp L, Blasig I, Dabrowski S, Ötvös F, Tóth A, Rákhely G, Veszélka S, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA. Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides. *J Pharm Sci.* 2016; 105(2):754-765.
- Brown RC, Egleton RD, Davis TP. Mannitol opening of the blood-brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not 86Rb+ or albumin. *Brain Res.* 2004; 1014(1-2): 221-227.
- 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; 45(8): 610-38.
- Carter P, Narasimhan B, Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *Int. J. Pharm.* 2019; 555: 49-62.
- Cavaco M, Pérez-Peinado C, Valle J, Silva RDM, Correia JDG, Andreu D, Castanho MARB, Neves V. To What Extent Do Fluorophores Bias the Biological Activity of Peptides? A Practical Approach Using Membrane-Active Peptides as Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8:552035.
- Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol.* 2002; 2:9.
- Cortés-Ríos J, Zárate AM, Figueroa JD, Medina J, Fuentes-Lemus E, Rodríguez-Fernández M, Aliaga M, López-Alarcón C. Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry.* 2020; 608:113904.
- Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* 2018; 195:44-52.
- Danyu, M, Huile G, Wei G, Zhiqing P, Xinguo J, Jun C. Anti glioma effect of doxorubicin loaded liposomes modified with angioprep-2. *Afr. J. Pharmacy Pharmacol.* 2011; 5, 409–414.
- de Figueiredo IR, Freire JM, Flores L, Veiga AS, Castanho MARB. Cell-penetrating peptides: A tool for effective delivery in gene-targeted therapies. *IUBMB Life.* 2014; 66(3):182-194.

- del Angel RM, Reyes-del Valle J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10):e1003551.
- Deli MA. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates*, szerkesztők: Tihanyi K and Vastag M, Bentham E-books, 2011; pp. 144-165.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem.*; 1994; 269(14):10444-50.
- Desale K, Kuche K, Jain S. Cell-penetrating peptides (CPPs): an overview of applications for improving the potential of nanotherapeutics. *Biomater Sci.* 2021; 9(4):1153-1188.
- Dos Santos Rodrigues B, Lakkadwala S, Kanekiyo T, Singh J. Development and screening of brain-targeted lipid-based nanoparticles with enhanced cell penetration and gene delivery properties. *Int. J. Nanomedicine.* 2019; 14: 6497–6517.
- Falanga AP, Pitingolo G, Celentano M, Cosentino A, Melone P, Vecchione R, Guarnieri D, Netti PA. Shuttle-mediated nanoparticle transport across an in vitro brain endothelium under flow conditions. *Biotechnol Bioeng.* 2017; 114(5):1087-1095.
- Feigin VL, Vos T, Nichols E, Owolabi MO, Carroll WM, Dichgans M, Deuschl G, Parmar P, Brainin M, Murray C. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol.* 2020; 19(3):255-265.
- Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988; 55(6):1189-93.
- Furtado D, Björnmalm M, Ayton S, Bush AI, Kempe K, Caruso F. Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Adv. Mater.* 2018; 30(46): e1801362.
- Futaki S. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers.* 2006; 84(3):241-9.
- Gaillard PJ. BBB crossing assessment and BBB crossing technologies in CNS Drug Discovery. *Drug Discov. Today Technol.* 2016; 20: 1-3.
- Guarnieri D, Falanga A, Muscetti O, Tarallo R, Fusco S, Galdiero M, Galdiero S, Netti PA. Shuttle-mediated nanoparticle delivery to the blood-brain barrier. *Small.* 2013; 9(6):853-62.
- Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(4):637-51.
- Habib S, Singh M. Angiopep-2-Modified Nanoparticles for Brain-Directed Delivery of Therapeutics: A Review. *Polymers (Basel).* 2022; 14(4):712.
- Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, Förster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, Stebbins MJ, Vandenhoute E, Weksler B, Brodin B. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; 36(5):862-90.
- Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* 2008; 10(3): 455-472.
- Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartne LM. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J. Nanopart. Res.* 2008; 10(1): 89.
- Hudecz F, Bánóczy Z, Csík G. Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds. *Med Res Rev.* 2005; 25(6):679-736.

- Hülper P, Veszelka S, Walter FR, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 169(7):1561-73.
- Irvine J, Afrose A, Islam N. Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2018; 44:173-183.
- Jafari B, Pourseif MM, Barar J, Rafi MA, Omid Y. Peptide-mediated drug delivery across the blood-brain barrier for targeting brain tumors. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019; 16(6):583-605.
- Johnsen KB, Moos T. Revisiting nanoparticle technology for blood-brain barrier transport: Unfolding at the endothelial gate improves the fate of transferrin receptor-targeted liposomes. *J Control Release.* 2016; 222:32-46.
- Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(5):1864-8.
- Kanhai KMS, Zuiker RGJA, Stavarakaki I, Gladdines W, Gaillard PJ, Klaassen ES, Groeneveld GJ. Glutathione-PEGylated liposomal methylprednisolone in comparison to free methylprednisolone: slow release characteristics and prolonged lymphocyte depression in a first-in-human study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2018; 84(5):1020-1028.
- Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light- scattering techniques. *Phios. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 2010; 368(1927): 4439-4451.
- Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Füredi A, Szakács G, Veszelka 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; 103: 3107-3119.
- Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014; 71: 2-14.
- Kristensen K, Urquhart AJ, Thormann E, Andresen TL. Binding of human serum albumin to PEGylated liposomes: insights into binding numbers and dynamics by fluorescence correlation spectroscopy. *Nanoscale.* 2016; 8(47): 19726-19736.
- Kristensen M, Brodin B. Routes for Drug Translocation Across the Blood-Brain Barrier: Exploiting Peptides as Delivery Vectors. *J Pharm Sci.* 2017; 106(9):2326-2334.
- Lombardo SM, Schneider M, Türeli AE, Günday Türeli N. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein J Nanotechnol.* 2020; 11:866-883.
- Majerova P, Hanes J, Olesova D, Sinsky J, Pilipcinec E, Kovac A. Novel Blood-Brain Barrier Shuttle Peptides Discovered through the Phage Display Method. *Molecules.* 2020; 25(4):874.
- Malakoutikhah M, Teixidó M, Giralt E. Shuttle-mediated drug delivery to the brain. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011; 50(35):7998-8014.
- Martín I, Teixidó M, Giralt E. Design, synthesis and characterization of a new anionic cell-penetrating peptide: SAP(E). *Chembiochem.* 2011; 12(6):896-903.
- Masserini M. Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN. Biochem.* 2013; 2013: 238428.
- Mc Carthy DJ, Malhotra M, O'Mahony AM, Cryan JF, O'Driscoll CM. Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharm. Res.* 2015; 32: 1161-1185.
- McCully M, Sanchez-Navarro M, Teixido M, Giralt E. Peptide Mediated Brain Delivery of Nano- and Submicroparticles: A Synergistic Approach. *Curr Pharm Des.* 2018; 24(13):1366-1376.

- 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, Veszélka S. Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier. *Eur J Pharm Sci.* 2018; 123:228-240.
- Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today.* 2012; 17(15-16):850-60.
- Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res.* 2000; 56(5):318-25.
- 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; 54(3-4): 253-63.
- Neves AR, Queiroz JF, Weksler B, Romero IA, Couraud PO, Reis S. Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: Two new strategies of functionalization with apolipoprotein E. *Nanotechnology.* 2015; 26, 495103.
- Neves V, Aires-da-Silva F, Morais M, Gano L, Ribeiro E, Pinto A, Aguiar S, Gaspar D, Fernandes C, Correia JDG, Castanho MARB. Novel Peptides Derived from PaVirus Capsid Protein Translocate Reversibly the Blood-Brain Barrier through a Receptor-Free Mechanism. *ACS Chem Biol.* 2017; 12(5):1257-1268.
- Neves-Coelho S, Eleutério RP, Enguita FJ, Neves V, Castanho MARB. A New Noncanonical Anionic Peptide That Translocates a Cellular Blood-Brain Barrier Model. *Molecules.* 2017; 22(10):1753.
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Med.* 2013; 19(12): 1585.
- Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* 2007; 24: 1745-1758.
- Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Giralt E, Teixidó M. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev.* 2016; 45(17):4690-707.
- Pardridge WM. Delivery of Biologics Across the Blood-Brain Barrier with Molecular Trojan Horse Technology. *BioDrugs.* 2017; 31(6):503-519.
- Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2005; 2(1):3-14.
- Patel PJ, Acharya NS, Acharya SR. Development and characterization of glutathione-conjugated albumin nanoparticles for improved brain delivery of hydrophilic fluorescent marker. *Drug Deliv.* 2013; 20: 143–155.
- Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Scherrmann JM, Tamsamani J, Couraud PO, Deli MA, Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem.* 2005; 93(2): 279-89.
- Pooga M, Langel Ü. Classes of Cell-Penetrating Peptides. *Methods Mol Biol.* 2015; 1324:3-28.
- Porkoláb G, Mészáros M, Tóth A, Szecskó A, Harazin A, Szegletes Z, Ferenc G, Blastyák A, Mátés L, Rákhely G, Deli MA, Veszélka S. Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit. *Pharmaceutics.* 2020; 12(7):635.
- Rao KS, Reddy MK, Horning JL, Labhasetwar V. TAT- conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs. *Biomaterials.* 2008; 29(33):4429–4438.
- Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007; 454(3):345-59.

- Rip J, Chen L, Hartman R, van den Heuvel A, Reijerkerk A, van Kregten, J, Gaillard, J. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood-brain barrier in rats. *J Drug Target*. 2014; (5): 460-7.
- Ross C, Taylor M, Fullwood N, Allsop D. Liposome delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13:8507-8522.
- Rousselle C, Clair P, Lefauconnier JM, Kaczorek M, Scherrmann JM, Temsamani J. New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol Pharmacol*. 2000; 57(4):679-86.
- Ruiz-López E, Schuhmacher AJ. Transportation of Single-Domain Antibodies through the Blood-Brain Barrier. *Biomolecules*. 2021; 11(8):1131.
- Sánchez-Navarro M, Giralt E, Teixidó M. Blood-brain barrier peptide shuttles. *Curr Opin Chem Biol*. 2017; 38:134-140.
- Saraiva C, Praca C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardo L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release*. 2016; 235: 34-47.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 1999; 285(5433):1569-72.
- Sharma G, Modgil A, Zhong T, Sun C, Singh J. Influence of short-chain cell-penetrating peptides on transport of doxorubicin encapsulating receptor-targeted liposomes across brain endothelial barrier. *Pharm Res*. 2014; 31(5):1194-209.
- Sonali, Singh RP, Singh N, Sharma G, Vijayakumar MR, Koch B, Singh S, Singh U, Dash D, Pandey BL, Muthu MS. Transferrin liposomes of docetaxel for brain-targeted cancer applications: formulation and brain theranostics. *Drug Deliv*. 2016; 23(4):1261-71.
- Szecsó A. Célzott nanorészecskék sejtfelvételének vizsgálata a neurovaszkuláris egység különböző sejtípusain. BSc szakdolgozat, Szegedi Tudományegyetem 2020.
- 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; 2(1):63-72.
- Thomas FC, Taskar K, Rudraraju V, Goda S, Thorsheim HR, Gaasch JA, Mittapalli RK, Palmieri D, Steeg PS, Lockman PR, Smith QR. Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer. *Pharm Res*. 2009; 26(11):2486-94.
- Topal GR, Mészáros M, Porkoláb G, Szecsó A, Polgár TF, Siklós L, Deli MA, Veszeka S, Bozskir A. ApoE-Targeting Increases the Transfer of Solid Lipid Nanoparticles with Donepezil Cargo across a Culture Model of the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics*. 2020; 13(1):38.
- Tosi G, Pederzoli F, Belletti D, Vandelli MA, Forni F, Duskey JT, Ruozzi B. Nanomedicine in Alzheimer's disease: Amyloid beta targeting strategy. *Prog. Brain Res*. 2019; 245: 57-88
- Uchida Y, Yagi Y, Takao M, et al. Comparison of Absolute Protein Abundances of Transporters and Receptors among Blood-Brain Barriers at Different Cerebral Regions and the Blood-Spinal Cord Barrier in Humans and Rats. *Mol. Pharm*. 2020; 17:2006-2020
- Verdurmen WP, Brock R. Biological responses towards cationic peptides and drug carriers. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32(2):116-24.
- Veszeka 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 Biologica Szegediensis* 2015; 59(Suppl 3).

- Veszélka S, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Kondor N, Ferenc G, Polgár TF, Katona G, Kóta Z, Kelemen L, Páli T, Vigh JP, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA. A Triple Combination of Targeting Ligands Increases the Penetration of Nanoparticles across a Blood-Brain Barrier Culture Model. *Pharmaceutics*. 2021; 14(1):86.
- Veszélka 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; 11: 166.
- Vieira DB, Gamarra LF. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:5381-5414.
- Vigh JP, Kincses A, Özgür 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; 12(6):685.
- Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, Worek F, Pietrzik CU, Kreuter J, Von Briesen H. Uptake mechanism of apoe-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PLoS ONE*. 2012; 7, e32568.
- Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszélka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers*. 2021; 9(3):1904773.
- Walter FR, Veszélka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA. Tesmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *J. Neurochem*. 2015; 134: 1040–1054.
- Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(4):842-57.
- Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, Lyck R, Muller WA, Lassmann H, Engelhardt B. PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation. *Front Immunol*. 2019; 10:711.
- Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release*. 2012; 161: 264-273.
- 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; 130(1): 127-40.
- Zhou X, Smith QR, Liu X. Brain penetrating peptides and peptide-drug conjugates to overcome the blood-brain barrier and target CNS diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2021; 13(4):e1695.

INTERNETES FORRÁS

1. https://www.arigobio.com/files/editor/images/Material_0039%20%28%20for%20mail%20news%29-09%282%29.jpg
Letöltés dátuma: 2022.03.22.

SZABADALOM

- Niwa M, Nakagawa S, Deli MA. Blood-brain barrier *in vitro* model, pathologic blood-brain barrier *in vitro* model, drug screening method using the same, pathologic blood-brain barrier function analysis method and pathogenesis analysis method. WO/2007/072953 (2007).

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani

Témavezetőimnek Dr. Veszeka Szilviának, az SZBK Biofizikai Intézet tudományos főmunkatársának és

Dr. Mészáros Máriának, az SZBK Biofizikai Intézet tudományos munkatársának, munkám során nyújtott folyamatos szakmai támogatásukért, segítségükért és hasznos tanácsaikért;

Prof. Deli Máriának az SZBK Biofizikai Intézet tudományos tanácsadójának, hogy lehetőséget adott csoportjában a tudományos labormunka elsajátítására;

Dr. Rákhely Gábornak, az SZTE TTIK, Biotechnológiai Tanszékvezetőjének, belső konzulensként nyújtott segítségét;

Köszönetet szeretnék mondani a *Biológiai Barrierek Kutatócsoport* minden tagjának kiemelve Porkoláb Gergőt, hogy nyitott szemléletükkel és segítségükkel hozzájárultak munkám sikereihez.

Hálával tartozom szüleimnek, nővéremnek és a barátaimnak, hogy az elmúlt évek során végig mellettem álltak.

8. TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Szecsó Anikó** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott „**Virális peptid hatásának vizsgálata agyi endotélsejteken**” című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Rész/feladat	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
Nanorészecskék fiziko-kémiai jellemzése	60	40
Sejtek izolálása és tenyésztése	90	10
Sejtfelvétel és vér-agy gáton keresztüli átjutás vizsgálat	80	20
PepH3 peptid élősejtes vizualizálása	70	30
Eredmények értelmezése, az adatok statisztikai kiértékelése	70	30
Ábrák, grafikonok elkészítése	100	0

Kelt: 2022. 04. 11.



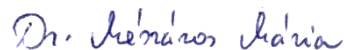
Pályamunkát benyújtó hallgató (Szecsó Anikó)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető aláírása

Dr. Veszélka Szilvia
SZBK Biofizikai Intézet



Témavezető aláírása

Dr. Mészáros Mária
SZBK Biofizikai Intézet