

Beszámoló

Új terápiás lehetőség a fokális agyi infarktus kezelésében: szöveti pH-tól függő gyógyszeradagolás nanopartikulumok segítségével (K 120358) NKFIH pályázat keretében elért eredményekről.

Kutatócsoportunk a pályázat célkitűzéseinek megfelelően azt vizsgálta, hogy az agyi iszkémiás inzultusok (globális, előagyi, vagy fokális iszkémia) során jelentkező agykérgi terjedő depolarizációk (spreading depolarization, SD), illetve a jelenséghez csatolt agyi vérkeringési változások miként módosulnak potenciálisan védelmet nyújtó farmakológiai kezelések hatására. A sérült agyszövetben ugyanis az SD hatására csökkent dilatáció, vagy éppen hipoperfúzió alakul ki, amely tovább rontja az energetikai viszonyokat. Munkánk másik nagy része olyan nanopartikulum alapú gyógyszerhatóanyag-hordozó kidolgozása volt, amely az agyszöveti pH savas irányú változásának függvényében adja le a szállított hatóanyagot.

Ennek érdekében célul tűztük ki, hogy tovább vizsgáljuk az L-típusú, feszültségfüggő kalcium csatorna blokkoló nimodipin SD-re és a járulékos agyi mikrocirkulációs változásra gyakorolt hatásait.

Kifejlesztettünk egy olyan chitozan alapú nanopartikulum hordozó rendszert, amely segítségével lehetőség nyílt a nimodipin pH-tól függő aktivációjára. Kísérleti modellrendszerünkben eredményesen teszteltük az így előállított hatóanyagot, azt találtuk, hogy a sérülés helyén, ahol az agyi pH akár 6.5 körüli értékre is csökkenhet aktiválódik a nimodipin és hatására helyi perfúzió növekedés, pH csökkenés és rövidül az SD időbeli lefutása.

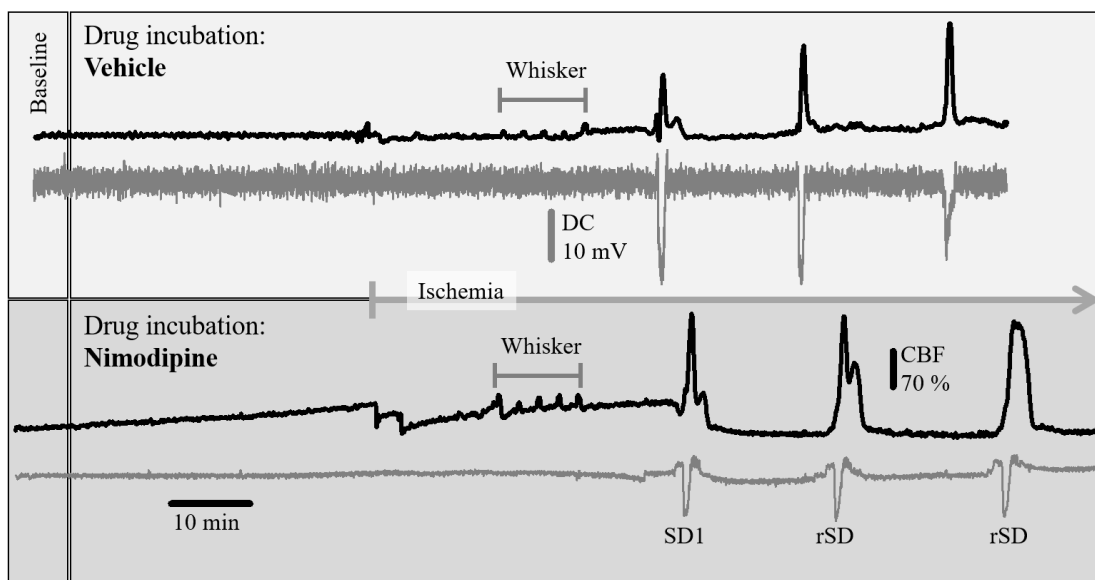
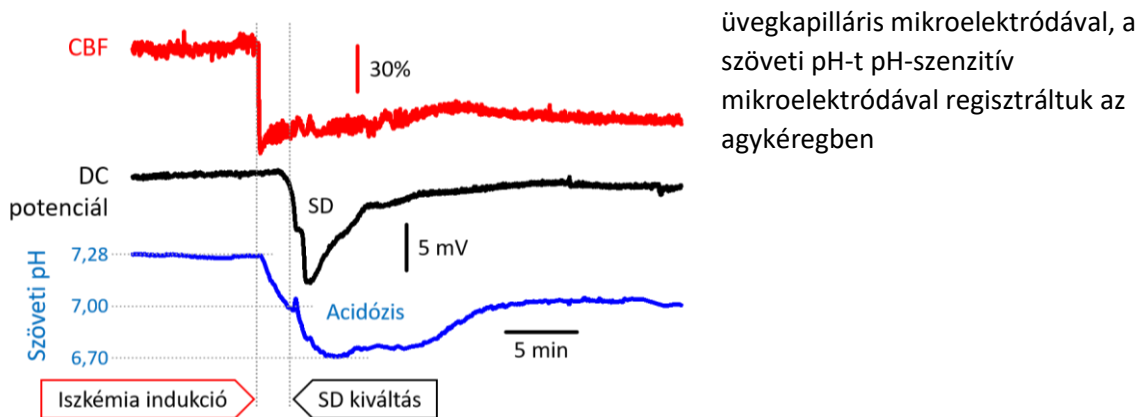
Dihidropiridinek hatása az agykérgi terjedő depolarizáció kialakulására és a csatolt keringési válasz dinamikájára

1.1. Az iszkémiás agysérülések során az idegszöveti degeneráció egyik oka a neurovaszkuláris csatolás sérülése, az idegi aktivitásra adott elégtelen perfúziós válaszkészség. A nimodipin a klinikumban is használt értágító gyógyszerhatóanyag, de a neurovaszkuláris csatolásra kifejtett hatása nem ismert. Mivel betegeknek szisztémásan adagolják, alkalmazhatóságának határt szab vérnyomáscsökkentő hatása. Ezeket figyelembe véve célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a nimodipin hatását a neurovaszkuláris csatolásra, és kidolgozzunk egy módszert a nimodipin célzott bejuttatására.

Altatott patkányok agykérgéből elektróda segítségével helyi mezőpotenciál-változásokat és lézer-doppleres áramlásméréssel agyi vérátáramlást regisztráltunk. A neurovaszkuláris csatolás vizsgálatához az ellenoldali bajuszpárnát mechanikailag ingereltük, majd az agykéregben SD-ket váltottunk ki. A kísérleteket megismételtük a kétoldali a. carotis communis elzárása (2VO) után, illetve a rostralis koponya ablakba juttatott nimodipin (100 μ M) kezelés mellett is.

A nimodipin a vérnyomást nem befolyásolta, míg a 2VO utáni agykérgi áramlasesést teljesen kivédte. A 2VO alatt a bajuszingerlésre adott áramlási válasz a kontrollhoz képest amplitúdójában a felére csökkent, amit a nimodipin a kontroll szintjére helyreállított. Végül a nimodipin az SD kialakulását gátolta, és az SD-hez csatolt áramlási választ megnyújtotta. Eredményeink szerint a nimodipin lokálisan alkalmazva megőrzi a neurovaszkuláris csatolás hatékonyságát az iszkémiás agykéregben, a vérnyomásra ugyanakkor nincs hatással.

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



2. ábra (representatív regisztrátum). Az ábrán az oldószer, ill. az agyfelszínre juttatott nimodipin egyrészt a bajuszpárna ingerlésre jelentkező agyi véráramlás fokozódásra, másrészt SD-re gyakorolt hatását mutatjuk be.

1.2. A stroke következtében kialakuló neurodegeneráció enyhítésére a dihidropiridin-származékok hatékonynak bizonyultak, ugyanakkor a kezelésnek kedvezőtlen mellékhatása lehet a szisztémás vérnyomás révén. A közelmúltban a vegyületeket kémiaiailag úgy módosították, hogy neuroprotektív hatásukat potenciózzák, ugyanakkor Ca^{2+} -csatorna blokkoló tulajdonságuk háttérbe szoruljon. Megvizsgáltuk tűztük ki egy ilyen új vegyület, az LA1011 hatását a már leírt kísérleti paradigmánkban. Az LA1011 nem befolyásolta a bajusz ingerlésre adott funkcionális hiperémia amplitudóját az intakt és az iszkémiás kondíciókban. Nem hatott továbbá az SD-hez társuló tranziens hiperémia amplitudójára sem. Ugyanakkor növelte a depolarizáció amplitudóját az intakt és az iszkémiás csoportokban egyaránt. Eredményeink szerint az LA1011 kezelés nincs hatással a neurovaszkuláris csatolásra, ellenben elmélyíti az SD-vel járó depolarizáció mértékét. Ez a változás feltételezhetően az LA1011 anti-inflammatórikus hatásának következménye.

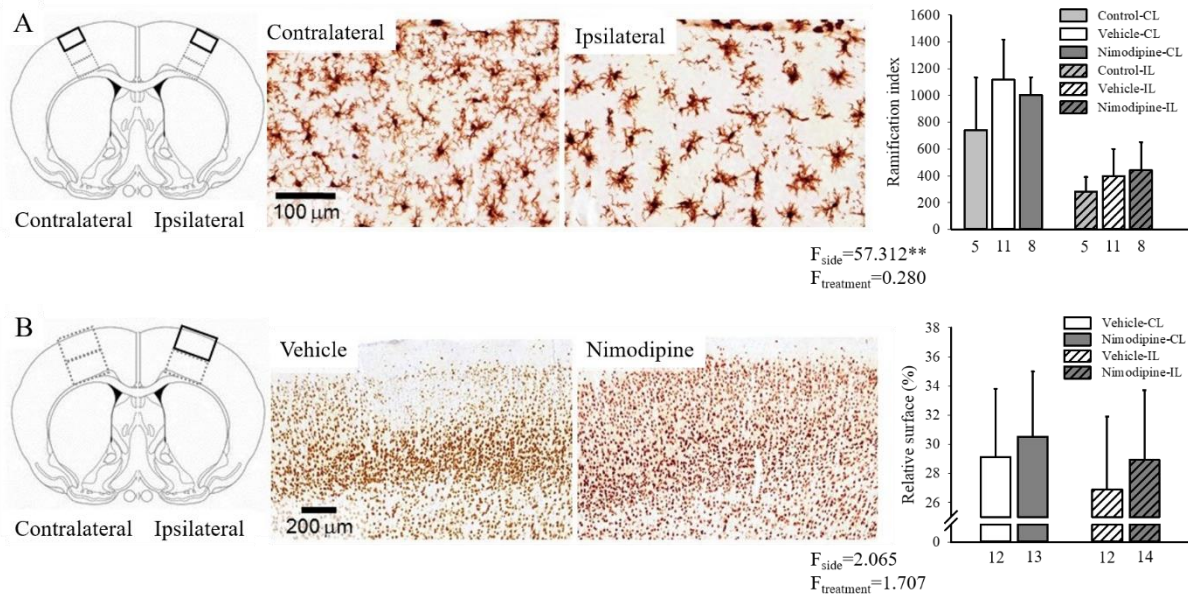
2. pH-szenzitív nanopartikulumok tervezése, előállítása

A nanopartikulumok anyaga úgy lett megválasztva, hogy az a szöveti acidózisra mutasson nyitó tulajdonságokat, ezáltal lehetővé téve a nanorészecskékben helyet foglaló nimodipin hatóanyag pH változás indukált környezetbe jutását. Ehhez kiindulási anyagként egy pozitív töltésű poli- kationt, a kitozánt választottuk. Szükség volt azonban a kiindulási makromolekula kémiai módosítására, ui. a méréseink alapján a kitozán nyitó pH értéke 7.47 volt, amit hexanállal történő hidrofóbizálás

hatására el tudtuk tolni 6.73-ra. A polimer nanorészecskék dezaggregációja/ nyitása pH<7 alatt, kevesebb, mint fél pH egység alatt megtörténik. A hidrofóbizálás sikerességét IR mérésekkel igazoltuk, ill. a kiindulási hidrofil kitozán molekula hidrofóbizálás hatására történő megváltozott szolvatációs tulajdonságait temoanalitikai (TG és DSC) módszerekkel is alátámasztottuk. A nimodipin hatóanyag polimer nanokapszulába történő becsomagolása precipitációs úton történt. Az előállított nanorészecskék $d = 5.2 \pm 1.1$ nm átmérővel rendelkeztek a TEM felvételek alapján. Bemutattuk, hogy a polimer héjjal rendelkező nanopartikulomok kinetikailag stabil, nagy diszperzitásfokú szolt képeznek vizes közegben, még a fedetlen nimodipin részecskék mikronos méretű tús kristályokat alkotnak, melyek azonnal kiülepsznek. XRD mérésekkel azt is igazoltuk, hogy a polimer által burkolt nimodipin részecskék kisebb kristályossági fokkal rendelkeznek, mint a kontroll minta. Mind a kisebb méret által okozott nagyobb felület, mind a kisebb kristályossági fokkal rendelkező szerkezet előnyt jelent a rosszul oldódó nimodipin későbbi in vitro és in vivo kioldódási tesztjei során.

2.1 Az elért eredmények rövid ismertetése:

Az eredeti terveknek megfelelően megvalósítottuk a nanopartikulomokon alapuló gyógyszer bevitt is. Kísérleteinket altatott Sprague-Dawley patkányokon végeztük. Miután a parietális csonton kialakított koponyaablakra mostuk a nimodipin-tartalmú, vagy nimodipin-mentes nanopartikulom szuszpenziót, az a. carotis communis kétoldali elszorításával (2VO) globális előagyi iszkiémiát idéztünk elő. Az inzultus súlyosbítására SD-ket váltottunk ki. Ag/AgCl elektródával helyi mezőpotenciál, pH-szenzitív mikorelektrodával szöveti pH-, lézer-doppleres áramlásméréssel agyi vérátáramlás változásokat regisztráltunk. A kísérlet végén az állatokat szövettani vizsgálatokhoz perfundáltuk. A nanopartikulomokból való hatóanyag leadást az iszkiémia indukciójával járó szöveti acidózis indukálta, melyet az alap CBF szignifikáns emelkedése igazolt. A nimodipin csökkentette az SD-k és a csatolt szöveti acidózis hosszát, továbbá emelte az SD-vel járó hiperémia mértékét is. A szöveti pH-alapú hatóanyag leadás sikeressége igazolódott a nimodipin várt protektív hatásának megjelenésével. A nanopartikulomokból felszabaduló nimodipin hatékonyan növelte az SD hez társuló hiperémiát, és jelentősen csökkentette az SD-k hosszát és az acidózis mértékét. Vizsgálataink további súlyponti kérdése az volt, hogy a nanopartikulomok, ill. a nanopartikulomokba csomagolt hatóanyag okoz-e korai immunválaszt az agykéregben. Ennek megítélésére immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk paraformaldehidben fixált, vibratómmal metszett agyszeleteken. A mikroglia sejteket Iba-1 antitestekkel jelöltük. A fenotípus megváltozását a ramifikációs index kiszámításával kvantifikáltuk (ha az index nagy, akkor a mikroglia nincs aktiválva). Vizsgálataink szerint a műtéti beavatkozás jelentős mikroglia aktivációt okoz amelynek nagyságát azonban sem a tovaterjedő depolarizációk, sem a topikálisan alkalmazott oldószer, nanopartikulom, illetve a hatóanyag sem változtatja meg. Ennek megfelelően a kitozán nanopartikulomok rövid távú immunológiai hatásaival kísérleti modellünkben nem kell számolni.



A nimodipinnel vagy nimodipin nélkül alkalmazott nanorészecske-szuszpenzió helyi alkalmazásának hatása a mikroglia aktiválódására és a neuronális életképességre. A nanorészecske-szuszpenzió önmagában (vehicle) vagy nimodipint tartalmazó oldata nem váltott ki további mikroglia-aktivációt az agykéregben. A mikroglia-aktivációt a mikroglia-folyamatok dinamikáját jelző elágazási indexszel fejeztük ki. B) A NeuN-immunjelölt neuronok által lefedett terület a neurodegeneráció korai jeleit hivatott kifejezni az agykéregben (ipsilaterálisan az SD és a kraniotómia kapcsán). A nimodipin nem akadályozta meg az infarktusz következtében kialakuló neurodegenerációt. Az adatokat átlag \pm stddev-ben adjuk meg. A statisztikai elemzést kétszemponyos ANOVA-val végeztük. A szignifikanciaszintet $p < 0,05^*$ -ben határoztuk meg.

További kísérleteink célja volt a nanopartikulomok intranazális adagolásának kidolgozása a klinikai alkalmazhatóság érdekében. Eddigi eredményeink szerint az intranazális alkalmazás jelentősen befolyásolja az állatok vérnyomását, valamint az orrnyálkahártya aktuális pH értékét a kioldódást. Ezért eddig konkluzív eredményekről nem tudunk beszámolni.

3. Kollaborációban lehetőségünk nyílt az SZTE TTK-n üzemeltetett mikroCT –vel is vizsgálatokat végezni. Kísérleteink célja az volt, hogy ezzel a képalkotó módszerrel megvizsgáljuk az öregedéssel járó változásokat fiatal és idős patkányok agykéregi érhálózatában. Fiatal (8-10 hetes) és idősödő (18-20 hónapos) állatok agykéregi érhálózatán végeztünk 3D rekonstrukció után objektív morfológiai számításokat. A jelen képalkotó technikánkkal kapott és korábbi eredményeink együttesen azt jelzik, hogy az öregedés során az agyi érreaktivitás csökkenése megelőzi a kis ér denzitás csökkenését, az érhálózat megtartott szerkezete mellett gyengülnek az egyes stimulusokra adott reakciók. Mindezek mellett jelentős módszertani fejlesztéseket is végeztünk a jelfeldolgozás területén. Egyrészt a rövid idejű tranziensek összehasonlításának spektrális és fraktál analízisét végeztük el fiatal és idős állatokon. Megállapítottuk hogy, ugyan a multifraktális analízis érzékenyen jelzi mind az agyi ischemia kialakulását, mind az SD-ket nem nyújt lényegesen újabb információt az ablakozott Fourier analízishez képest.

A pályázat utolsó harmadát jelentősen befolyásolta a COVID-19 járvány, lelassította a kísérleteket így a beszámolási időszak végén csak részben tudtuk a munkatervben meghatározottak szerint végezni a munkánkat. A tervezett állatkísérleteknek csak egy kis részét tudtuk elvégezni. Ennek legfontosabb oka az, hogy 2020 márciusa óta – a nyári hónapok kivételével- a COVID-19 számtalan akadályt gördített a

laboratórium munka elé. (Az Intézetünket praktikusán lezárták több hónapra, a dolgozók sokáig nem kaptak védőoltást, a laboratóriumok mérete miatt egy légtérben nem tudtak dolgozni a munkatársak, a hallgatók nem járhattak be az intézetbe stb.) Ennek ellenére számos előrelépés történt. Kihazsnálva a "home-office nyújtotta lehetőségeket" egy review cikkben összegeztük az eddigi saját eredményeinket és a nemzetközi irodalomban fellelhető tapasztalatokat. A közleményt 2020 decemberében a Biology (Basel) folyóirat megjelentette.

A nem várt , objektív akadályok ellenére sikeres pályázatról számolhatunk be. Az NKFIH támogatásával 11 közleményünk jelent meg, melynek összes impakt faktora 47, 6. Közülük 6 esetében már most is jelentős nemzetközi érdeklődés figyelhető meg. az egyenkénti idézetek száma meghaladja a 10-et.

A pályázat témájából Dr. M.Tóth Orsolya elkészítette PhD értekezését, melynek védésére 2021 júniusában fog sor kerülni. Emellett számos TDK dolgozat és pályamunka is született a munka kapcsán. Kiemelkedő teljesítményt nyújtott Hantosi Dóra (OTDK 1. díj), Szarvas Péter Archibald (OTDK I. díj), Tóth Réka (OTDK 2.díj) valamint Bálint Armand (OTDK 2. díj).