

Egyedi fehérje nanorészecskék orvosi alkalmazása: hatóanyag átjuttatás a vér-agy gáton

Biomedical Application of Single Protein Nanoparticles: Transport Through the Blood Brain Barrier

Aplicații medicale ale unor nanoparticule proteice: transferul substanțelor active prin bariera hemato-encefalică

HEGEDÜS Imre¹, FARAGÓ Eszter², Prof. Dr. KÁLMÁN Mihály³, Prof. Dr. NAGY Endre¹

¹Pannon Egyetem, Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet
Egyetem u. 2. P. O. Box 158, H-8200 Veszprém, Hungary, tel.: +36-88/624-040,
e-mail: nagy@mukki.richem.hu, honlap: www.richem.hu

²Eötvös Loránd Tudományegyetem., Fizikai Kémia Intézet, 1518 Budapest 112, P.O.Box 32. Hungary

³Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,
1450 Budapest, Tűzoltó u. 58, P.O. Box 98. Hungary

ABSTRACT

Single protein nanoparticles means, that each individual protein molecule is covered with a nanometer scale polymer layer. Our previous studies show that this layer does not reduce seriously the enzymatic function of protein molecules, but can stabilize this structure. Single albumin nanoparticles can pass through the blood brain barrier in rat. Polymer nano-layer around protein molecules has two functions: 1) stabilizes the ternary structure of proteins 2) carries the proteins as drugs through the blood brain barrier.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az egyedi fehérje nanorészecskék esetében minden egyes fehérje molekulát néhány nanométer vastag polimer réteggel vonunk be. Korábbi vizsgálataink szerint ez a réteg nem csökkenti jelentősen az enzimek működését, de stabilizálja azok szerkezetét. Egyedi albumin nanorészecskék patkányban átjutnak a vér-agy gáton. A fehérje molekulák körül kialakított polimer nano-rétegnek két funkciója is van: 1) stabilizálja a fehérjék harmadlagos szerkezetét 2) hatóanyag hordozóként átjuttatja a fehérjéket a vér-agy gáton.

Kulcsszavak: egyedi fehérje nanorészecskék, hatóanyag hordozó, bovin serum albumin, vér-agy gát

1. BEVEZETÉS

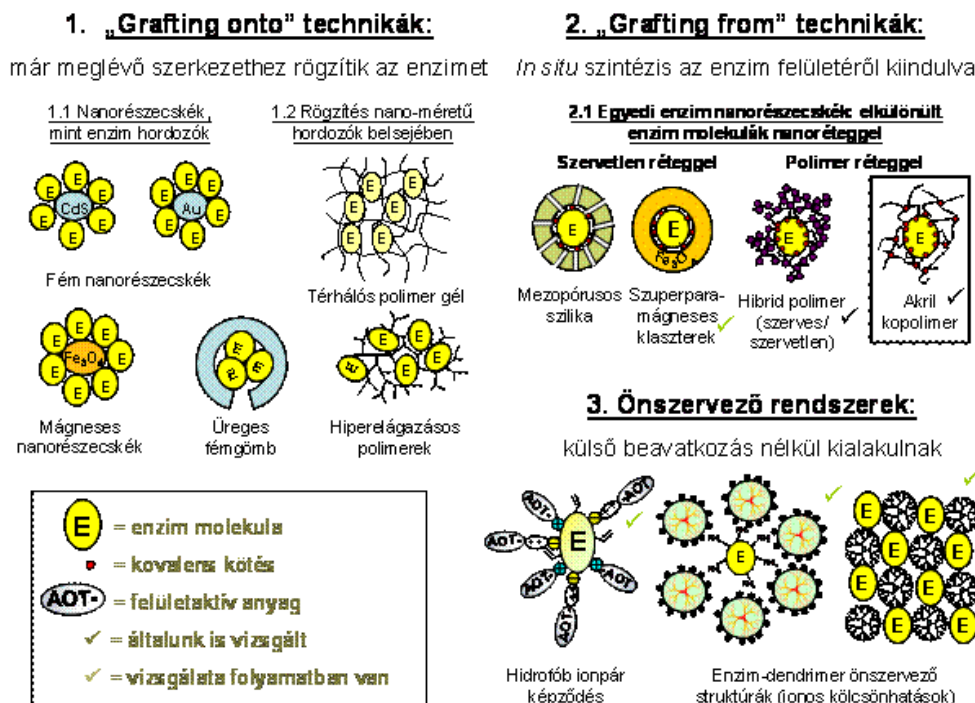
Az egyedi fehérje nanorészecskék először az ipari enzim stabilizálás területén jelentek meg, mint egyedi enzim nanorészecskék. Az iparban egyre növekvő jelentőséget tulajdonítanak az enzimeknek, mint biokatalizátoroknak, mert nagyon specifikusak és szelektívek. Hátrányuk viszonylag nagy érzékenységük és rövid élettartamuk a hagyományos katalizátorokhoz képest. Ez jelentősen behatárolja alkalmazhatóságukat. A legintenzívebben kutatott területek a gyógyszerek, finomvegyszerek előállítása, mosószer alapanyagok, bioérzékelők, bioszabályozók, biotisztítók, fehérje emésztés és elemzés, bioüzemanyag cellák készítése [1].

Az enzimek behatárolt élettideje korlátozza alkalmazhatóságukat. Az élettidő növelése alapvető valamennyi felhasználás számára. Hosszabb élettidővel rendelkező enzimekből kevesebb mennyiség elegendő, ugyanakkor növekedik az enzim reaktorok működési ideje és kibővülnek az enzim újrafelhasználás lehetőségei is. Az enzimek stabilitásának (élettidejének) növelésére a kezdetektől fogva számos kísérlet történt. Az egyik ilyen lehetőség az enzimek stabilizálása szempontjából az enzimek hordozóhoz történő rögzítése (enzim immobilizáció). Az enzim immobilizáció az enzim molekulának nagy szerkezetek üregeibe vagy felületére való rögzítését jelenti egyszerű adszorpcióval, illetve kovalens kötással [2, 3]. Az enzim molekula és a gazda anyag közötti több ponton történő kötés csökkenti az enzim harmadlagos szerkezetének széttekeredési (un-

folding) mechanizmusait és ilyen módon növeli az enzim működésének stabilitását [4]. Az enzim módosítás az enzim molekula olyan kovalens reakciójával definiálható, amely funkciós csoportok vagy polimerek felszínhez kötődésével megváltoztathatja a felszíni tulajdonságokat és az enzim stabilabb működését eredményezheti [4-7]. A fehérje mérnökség a fehérje aminosav szekvenciájának molekuláris biológiai módszerekkel történő megváltoztatását jelenti (pl. irányított evolúció vagy helyspecifikus mutagenézis) egy stabilabb belső szerkezet elérése érdekében [8-11]. A reakcióközeg mérnökség ezzel szemben az enzim körüli közeg változtatásával módosítja az enzim szerkezetét. Alkalmazhatunk nem vizes reakcióközeget, vagy változtathatjuk a reakcióközeg ionösszetételét [5, 12-13]. Az enzim rögzítése a katalizátor újrafelhasználás, a folyamatos működés és a termék tisztítás szempontjából is jelentős. A rögzített enzimeknek azonban gyakran kicsi az aktivitása [14-15].

1.1. Enzimek stabilizálása nano-méretű hordozóval

Az enzim működés hatékonysága javítható a hordozó anyag szerkezetének változtatásával, vagy a hordozó méretének csökkentésével. A kisméretű hordozó részecskék nagyobb felületet biztosítanak az enzim rögzítéséhez, valamint az enzimek a hordozókkal együtt nem tekinthetők már külön (szilárd) fázisnak az oldatban, ennek következtében a nano-méretű részecskék viszonylag szabad diffúziója az oldatban segíti az enzimek hatékonyabb működését [16].

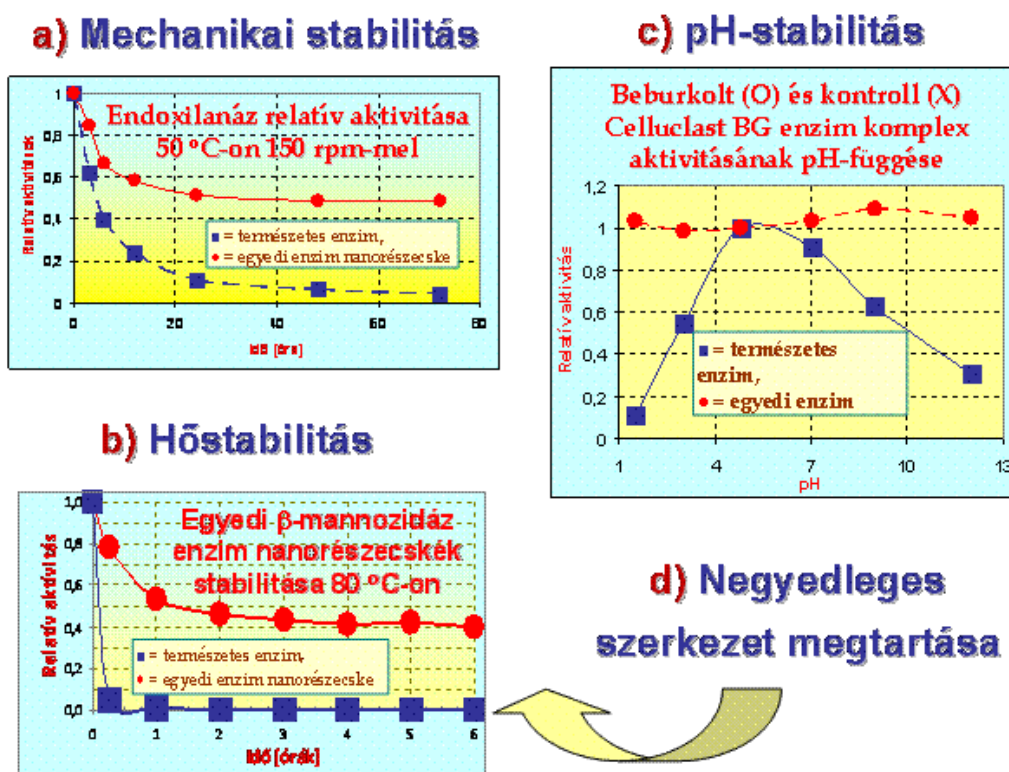


1. ábra

Nano-méretű hordozóval történő enzim stabilizálás technikái

Az enzimek nanoméretű hordozóhoz történő rögzítésének technikái az utóbbi évtizedben rendkívül széles spektrumú és intenzív fejlődésen mentek keresztül. Három alapvető technológiát különböztethetünk meg: a) az enzim rögzítése egy már előzetesen előállított nanorészecskéhez, vagy nano-gél belsejébe történő juttatása („grafting onto” technikák), b) a stabilizáló nanoréteget közvetlenül az enzim felületéről kiindulva szintetizáljuk („grafting from” technikák) c) megemlíthetjük még az ún. „önszervező rendszereket”, amelyek esetében a kívánt nanobiokompozit anyag a komponensek hozzáadása után külső beavatkozás nélkül spontán módon kialakul (1. ábra) [17]. Az enzimek a „grafting onto” módszerrel rögzíthetők fém tartalmazó [18, 19], illetve mágneses nanorészecskékhez [20] (1. ábra: 1.1). Speciális lehetőség üreges fém részecske belsejébe juttatni az enzim molekulákat [21]. Ezeknek a technikáknak az előnye, hogy egy külső mágnes segítségével az enzimek a művelet követően összegyűjthetők és újra felhasználhatóak. Elterjedt módja az enzim stabilizálásnak nano-méretű térhálós polimer (ún. nanogél) belsejébe juttatni az enzimeket [22], ugyanakkor hiperelágazásos polimerek is képesek enzimeket felvenni belső üregeikbe [23] (1. ábra: 1.2). A „grafting from” módszerrel a fehérje molekulák felületéről kiindulva történhet a hordozó kialakítása. Ebben az esetben

a hordozót in situ szintézissel állítjuk elő és az általában teljesen körülveszi az enzimet. A „grafting from” módszerrel előállított monomolekuláris nanogéleket egyedi enzim nanorészecskének nevezzük, ha a beburkolt molekula enzim, általánosságban egyedi fehérje nanorészecskének, ha a beburkolt óriásmolekula fehérje természetű. Az egyedi enzim nanorészecskék különálló, néhány nanométeres, az enzim méretével összevethető vastagságú burokokban tartalmazzák az enzim molekulákat, amelyek a burok stabilizáló hatása miatt stabilisabbak és aktivitásuk sem csökken jelentős mértékben [24, 25]. Az így átalakított enzim molekulák egy-két nagyságrenddel stabilisabb katalitikus aktivitást mutatnak és a szubsztrátum szabad mozgása sem korlátozódik [24, 25, 26, 27]. A „grafting from” technikával előállított nanobiokompozitokat (más néven egyedi fehérje nanorészecskéket) osztályozhatjuk a fehérjék felületén kialakított burok típusa szerint (1. ábra: 2.1). A burok lehet pórusos szeretlen anyag (mezopórusos szilika [28]), vagy szuperparamágneses tulajdonságokkal rendelkező, tehát külső mágneses térre reagáló, de mágneses tulajdonságait mágneses tér nélkül elvesztő kluszterekkel beburkolt enzimek [29] (1. ábra: 3.) Az egyedi fehérje nanorészecskék körül kialakított burok lehet térhálós polimer gél (szerves-szeretlen hibrid szilika gél [24, 25, 26], vagy akrilamid-biszakrilamid térhálós gél [27], 1. ábra: 2.1).



2. ábra

Polimer réteggel stabilizált egyedi enzim nanorészecskék enzim stabilizáló funkciói

További lehetőség a nano-méretű hordozókkal történő enzim stabilizálás megvalósítására önszervező rendszerek kialakítása. Ebben az esetben külső beavatkozás nélkül kialakulnak olyan struktúrák, amelyek stabilizálják a fehérjét. A rendszer általában reverzibilis, ionos kölcsönhatások révén stabilizálódik. A fehérjékhez hozzáadott stabilizáló ágensek lehetnek detergensok, foszfolipidek, polimerek [30], vagy dendrimerek (1. ábra: 3.) Kis mennyiségű, a reakcióelegyben jelen lévő enzim moláris mennyiségével összevethető mennyiségű felületaktív anyagot (AOT detergens), valamint kétértékű pozitív ionokat (Ca^{2+}) hozzáadva, enyhe keverést követően kialakul egy ún. hidrofób ionpár („hydrophobic ion pair” complex, más néven surfoplex), amelynek következtében a fehérje töltéssel rendelkező felületi csoportjait a felületaktív anyag segítségével lefedik és az egész ionpár-komplex felülete teljesen apoláris lesz, vízben oldhatatlanná válik, azonban kitűnően oldódik hexánban, vagy más apoláris oldószerekben [31], ugyanakkor jelentős stabilizáló funkcióval is bír [32] (1. ábra). Sikerült létrehozunk dendrimer-enzim önszervező rendszereket 3.5 és 4.5 generációjú karboxil végcsoportokat tartalmazó poliamidoamin (PAMAM) dendrimerekkel. A hozzáadott dendrimer és enzim moláris arányától függően különböző struktúrájú enzimek alakultak ki (1. ábra).

1.2. Az egyedi fehérje nanorészecskék funkciói

Az egyedi enzim nanorészecskék segítségével történő enzimstabilizálás lehetőségei közül eddig a szerves/szerveetlen hibrid polimerrel [24, 25, 26], illetve a szerves akril kopolimerrel [27] történő burokképzést tanulmányoztuk. Az ilyen módon kialakított polimer nanoréteg az enzimek körül többféle funkcióval is rendelkezhet.

1) Korábbi vizsgálataink során a polimer réteg enzim stabilizáló funkcióját tanulmányoztuk. A kísérleti eredmények megerősítették, hogy mind a szerves/szerveetlen polimer réteg, mind pedig az akril kopolimer réteg rendelkezik enzimstabilizáló funkcióval. Mindkét fajta polimer réteg képes stabilizálni egyedi enzimeket, több különböző enzim párhuzamos működésével funkcionáló multifunkcionális multienzim komplexeket (pl. celluláz multienzim komplex). A lebontott szubsztrátum mérete lehet nagy is, természetes kristályos cellulóz molekulákat is sikerült lebontani. Továbbá megállapíthatjuk, hogy a polimer réteg stabilizáló funkciója többértű. Beszélhetünk a) mechanikai stabilitásról: amikor az enzim természetes működési hőmérsékletén, de intenzív rázatás (150 rpm) mellett jelentős mértékben megnövekedik az egyedi enzim nanorészecskék stabilitása (2. ábra). Megkülönböztethetünk emellett még b) hőstabilitást: olyan magas hőmérsékleten (80 °C), ahol a természetes enzimek már néhány perc alatt denaturálódnak, az egyedi enzim nanorészecskék megőrzik stabilitásukat a természetes enzimek életidejének akár százszorosáig (2. ábra). c) Ugyanakkor extrém pH-értékeken (pH = 1,5 és pH = 12,5 között) is megőrzik eredeti aktivitásukat. A természetes enzimek az erősen savas és lúgos pH értékeken szintén denaturálódnak, aktivitásuk elvész. d) A kísérleti eredmények tanúsága szerint olyan enzimek esetében, amelyek monomerként nem aktívak, hanem csak több enzim molekula által kialakított ún. negyedleges szerkezetekben aktívak, egyedi enzim nanorészecskéként mérhető aktivitásuk. Például a *Thermobifida fusca* fajból izolált β -xilozidáz enzimek monomerként nem aktívak, hanem legalább dimer kell az aktivitásukhoz, de teljes aktivitás értéket tetramer formában mutatnak. Az egyedi enzim nanorészecskéként történő stabilizálást követő aktivitás azt bizonyítja, hogy az enzim molekulák körül kialakított polimer burok nem befolyásolja a negyedleges szerkezetet, képesek a finomabb kölcsönhatások is kialakulni a stabilizálást követően. Valószínűleg a művelet során a már kialakult tetramer egységeket burkolják be.

Az enzim stabilizáló funkció mellett felmerült annak a lehetősége, hogy az egyedi enzim nanorészecskéket stabilizáló néhány nanométer vastagságú polimer háló további funkciókkal is rendelkezik.

2) A szakirodalom tanulmányozása során kiderült, hogy mind a metakriloxi-propil [33] csoportokat tartalmazó, mind az akril kopolimereket [34] elterjedten használják gyógyszer-hordozókként és rendelkeznek azokkal a tulajdonságokkal, amelyek a hatóanyagnak a célszervbe történő juttatásához szükségesek. Vagyis átjutnak a biológiai membránokon, nem toxikusak és nem immunogének [35, 36]. Ezek a gélek azonban nagyobb méretűek voltak és csupán kis molekulák szállítására használták őket. Egyedi fehérje nanorészecskék formájában a hatóanyag szállító funkciójukat még senki sem vizsgálta. Fehérjék, mint gyógyszer hatóanyagok transzportjára az élő szervezetben sok esetben használnak polimer hordozókat [37]. Azonban ezek a hordozók jóval nagyobb (többnyire mikrométeres) mérettartományban helyezkednek el. A polimer hordozó segítségével a szervezetbe juttatott fehérje hatóanyagoknak ugyanakkor nagyon rövid az élettartamuk, a szervezetből hamar kiürülnek, vagy lebomlanak, mielőtt a hatásukat megfelelően ki tudnák fejteni. Ezek a hagyományos fehérje hordozó polimerek ugyanis a fehérjéket nem stabilizálják, hanem a fehérjék csupán bediffundálnak és viszonylag gyenge kölcsönhatásokkal megrekednek a polimer hálók belső üregeiben. Felmerült a kérdés, hogy az akril, illetve szilil funkciós csoportokkal rendelkező polimerek képesek-e átjuttatni a biológiai membránokon fehérje természetű hatóanyagokat egyedi fehérje nanorészecskék formájában.

Az egyedi fehérje nanorészecskék gyógyszer hatóanyag hordozó funkciójának vizsgálatát a biológiai membránokon történő átjutásának vizsgálatával kezdtük. A gyógyszer hordozó anyagok egyik legfontosabb tulajdonsága a gyógyszer hatóanyag átjuttatása olyan biológiai membránokon, amelyek normál esetben átjárhatóak. Az emberi szervezetben az egyik legnehezebben átjárható biológiai határfelület (barrier) a vér-agy gát. A gyógyszer hatóanyagok [38], különösen a peptid és fehérje természetű hatóanyagok [39] átjuttatása a vér-agy gáton ezért intenzíven kutatott terület. Célul tűztük ki egyedi fehérje nanorészecskék átjuttatását a vér-agy gáton, hogy bizonyíthassuk, a fehérje nanorészecskéket körülvevő polimer réteg gyógyszer-hordozó funkcióval is rendelkezik.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Anyagok

2.1.1. Vegyszerek

Akrilsav-klorid, 1,3-bisz-trisz-hidroximetil-metilamino-propán vagy Bis-Tris propane (Sigma), nátrium-bisz(2-etilhexil)szulfoszukcinát vagy aerosol OT (AOT) (Fluka), dinátrium-hidrogénfoszfát, kálium-dihidrogénfoszfát, kalcium-klorid, 2-propanol, n-hexán (Spektrum-3d, Scharlau), metakriloxipropil-

trimetoxiszilán (MAPS), 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (Fluka), akrilamid-biszakrilamid mix (1:10, Sigma, ill. házilag összekevert biszakrilamid hozzáadásával, Sigma), tetrametil-etiléndiamin (Sigma), 3,5-dinitrozalicilsav (Sigma), nátrium-metabiszulfid (Spektrum-3D), fenol (Sigma), nátrium-peroxo-diszulfát (Sigma), fluoreszcein-izotiocianát (Fluka), bovin serum albumin (Sigma).

2.1.2. Műszerek

Az enzimek koncentrációjához, aktivitáshoz, valamint stabilitáshoz szükséges abszorbancia értékeket Biochrom 4060 spektrofotométerrel (Pharmacia) mértük. Az egyedi enzim nanorészecskék előállításához a polimerizációs lépésnél Vilber Lourmat UV-lámpát használtunk (365 nm). Az elektronmikroszkópos felvételek JEOL-1200X transzmissziós elektronmikroszkóppal készültek (gyorsító feszültség 80 kV).

2.2. Módszerek

2.2.1. Az egyedi fehérje nanorészecskék előállításának módszere

Egy tipikus reakció a következőképpen játszódik le: 25 ml 10 mg/ml-es koncentrációjú BSA-oldatot készítünk pH = 7,15 120 mM-os foszfát pufferben. (Háromszor ioncserélt vizet használunk, fajlagos vezetőképesség: $\rho = 8,15 \mu\text{S}$.) Szobahőmérsékleten 3 mg fluoreszcein-izotiocianátot adtam a feloldott BSA-hoz és mágneses kevertetés mellett 2 órán keresztül reagáltattam szobahőmérsékleten. Az el nem reagált FITC eltávolítására dialízist végeztem. A dialízishez 10 kDa-os vágóélel rendelkező, 12 mm-es átmérőjű dialízis csövet használtam. A dialízist 2 x 6 órán keresztül 4 °C-on végeztem 1,5 l 120 mM-os pH = 7,15 foszfát-pufferrel végeztem, az el nem reagált festékmolekulákra vonatkozóan összesen 10000 x hígítást értem el.

A BSA fehérjék felületének módosításához 0 °C-ra hűtöttem az elegyet és állandó kevertetés mellett 100 μl akrilsav-kloridot adtam hozzá. Oxigén-mentesített vízben, N₂-atmoszférában 152 μl ml 10:1 arányú akrilamid: biszakrilamid elegyet adtam hozzá, majd 45,8 mg ammónium-peroxo-diszulfátot adtam, majd miután összekeveredtek, 2 μl TEMED iniciátorral indítottam a polimerizációs reakciót. A reagáltatást szobahőmérsékleten 6 órán keresztül végeztem.

Az el nem reagált monomerek és a reagensek eltávolítására ismét dialízist végeztem (10 kDa-os vágóélel rendelkező, 12 mm-es átmérőjű dialízis csővel). A dialízist most is 2 x 6 órán keresztül 4 °C-on végeztem 1,5 l 120 mM-os pH = 7,15 foszfát-pufferrel végeztem (összesen 10000 x hígítás).

2.2.2. Állatkísérletek

Az állatkísérletekhez 200-250 g-os Wistar típusú felnőtt patkányokat használtunk mindkét nemből. Az állatokon mély ketamin-xilazinos altatást végeztünk (intramuszkulárisan 20-80 mg/kg testtömeg). Altatás után a patkányok hasfalán ejtett metszést követően a beleket félrehajtva a kísérleti anyagot a vena cava inferiorba juttattuk (1 ml/100 g testtömeg mennyiségben 5 mg/ml egyedi albumin nanorészecskét tartalmazó oldatot, illetve 5 mg/ml kontroll albumint tartalmazó oldatot 1 percen belül). A kettős festés esetében (ld. 6. ábra) két kontrollt csináltunk. Az egyik kontroll ugyanúgy 5 mg/ml-es koncentrációjú albumin oldat volt, a másik 1%-os rodamin oldat. A kettős festés esetében a beadott oldat 5 mg/ml egyedi albumin nanorészecske mellett 1% rodamin is tartalmazott.

1, 2, 3, 10 és 30 perc elteltével az állatokat leöltük és az agyukat 0,1 M-os Na-foszfát pufferben (pH = 7,4) oldott 4%-os paraformaldehid oldatban 48 órán keresztül fixáltuk. A formalinban fixált agyakon Vibrotome készülékkel 50 μm vastagságú koronális metszeteket készítettünk. A fluoreszcens mikroszkópiát Olympus BX-51 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük, a fényképeket DP50 digitális kamerával készítettük (mindkettő Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan).

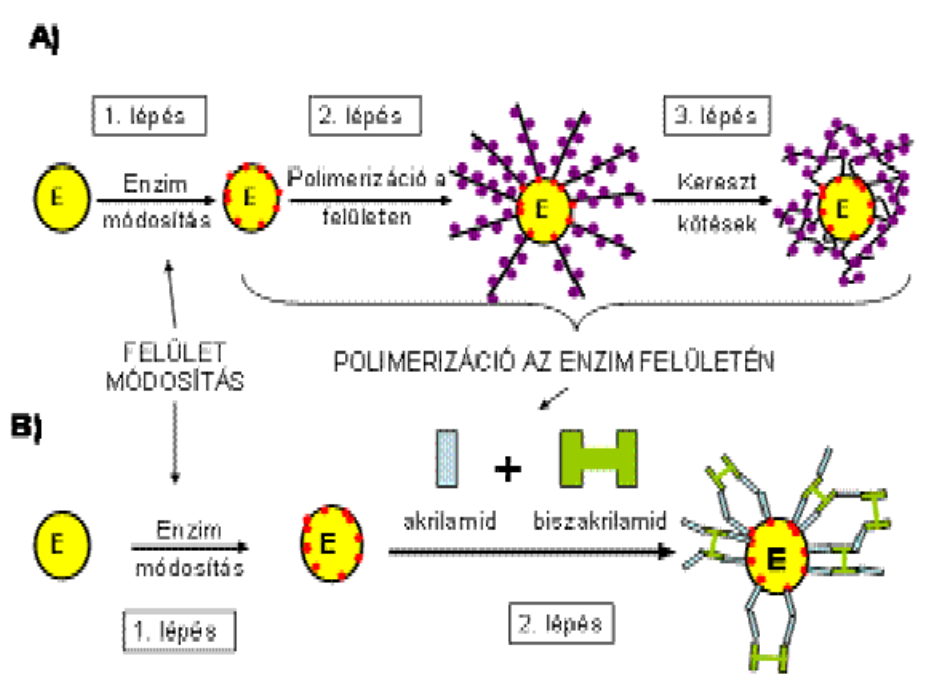
3. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Hatóanyag hordozónak alkalmazható egyedi fehérje nanorészecskék előállítása

Az egyedi enzim nanorészecskék előállításával kapcsolatban korábban kétfajta módszert tanulmányoztunk (3. ábra). Mindkét módszer esetében a fehérje molekulák felületéről kiindulva történik a polimer réteg kialakítása. A Kim és munkatársai [24] által kidolgozott módszer három lépésből áll. Az enzim felületét az első lépésben akrilsav-kloriddal vizes közegben módosítjuk úgy, hogy a fehérje molekulák felületén található primer aminosav csoportok (pl. a lizin aminosav oldalláncában található amino csoport) elreagálnak és akril csoportok alakulnak ki a helyükön (3. ábra). A felület-módosított fehérjét a korábban említett hidrofób ionpárosodás (hydrophobic ion pairing) módszerével (1. ábra) molekulárisan szerves oldószerben (hexánban) oldjuk úgy, hogy a fehérje molekulák apoláris felületi oldalláncai közvetlenül érintkezzenek az oldószerrel.

Ez ugyanis az apoláris oldószerben lejátszódó polimerizáció alapfeltétele. A hozzáadott metakriloxipropil-trimetoxiszilán (MAPS) monomerek 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) iniciátor segítségével 360 nm-es UV-fény jelenlétében polimerizálódnak. A polimer szálak a kompozit termék vizes közegbe juttatásával keresztkötések alakítanak ki és létrejön a térhálós polimer réteg a fehérje molekulák körül. A bovin serum albumin molekulákat a hidrofób ionpárosodás módszerével [31] nem sikerült stabilizálni, a fehérje kicsapódott, ezért ezt a módszert a továbbiakban nem részletezzük.

A Yan és munkatársai által kidolgozott egyedi enzim nanorészecskéket előállító módszer [27] (3. ábra) első lépésében az enzim molekula felületén elhelyezkedő primer amino-csoportok alakulnak át vinil-csoportokká. A Yan és munkatársai által alkalmazott módszer esetében ezt a felület módosítást amino-antipirin jelenlétében N-akrilszukcimiddel hajtották végre és a reagenst dimetil-szulfidban oldják és azt kromatográfiásan távolítják el a reakcióbefejeződése után a reakció elegyből. A lépések egyszerűsítése érdekében ezt az első lépést módosítottam és akrilsav-kloridot reagáltattam a BSA molekulákkal 0 °C-on és a maradék, el nem reagált akrilsav-klorid a hőmérséklet emelkedésével spontán elbomlik, illetve a vízzel metil-akriláttá és sósavvá bomlik. A következő lépésben vizes közegben kialakítható a térhálós polimer réteg (3. ábra). A reakció módosításával elértük, hogy oldószer csere nélkül, közvetlenül a felület módosító lépést követően kialakítható legyen a polimer réteg a fehérje molekulák körül („one pot reaction”).



3. ábra

Az egyedi fehérje nanorészecskék előállításának módszerei A) három lépésben Kim és munkatársai szerint [24] B) két lépésben Yan és munkatársai szerint [27]

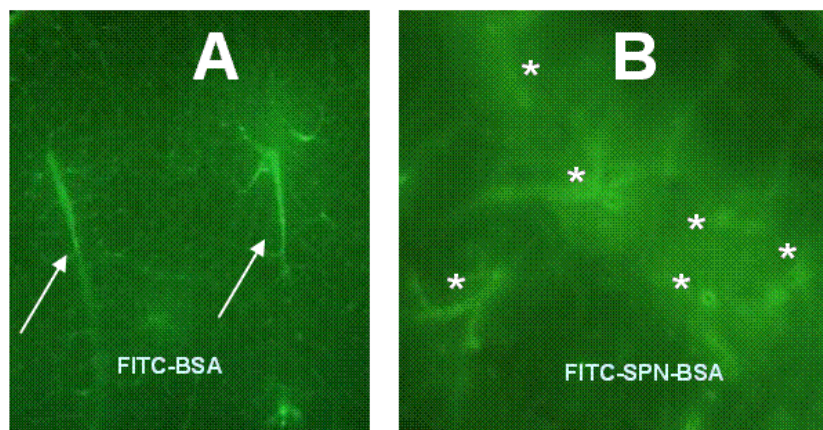
3.2. Egyedi BSA nanorészecskék átjutása a vér-agy gáton

A kísérletben használt bovin serum albumin molekulák megfestéséhez fluoreszcein-izotiocianát (FITC) fluoreszcens festéket használtunk. A FITC molekula a fehérjék festésekor szintén a primer aminos csoportokhoz kötődik. Mivel a felületmódosításhoz szükséges akrilsav-kloridot a bomlékonysága miatt mintegy százszoros feleslegben adjuk hozzá a reakció elegyhez, először a festést végeztük el 1:1 FITC: BSA molarányban adagolva. Ezt követően történt a fentiekben részletezett lépéssorozat az egyedi fehérje nanorészecskék kialakítására.

10 perccel a kísérleti anyag beadása után a metszeteken az erek körül a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) megfestett egyedi albumin nanorészecskék (FITC-SPN-BSA) homályos felhőt alkotva az agyi erek körül helyezkednek el, már kijutottak a kapillárisokon és átjutottak a vér-agy gáton, henger alakban diffundálnak tovább a kapillárisok környezetéből az agy távolabbi irányába (4.A ábra, csillaggal jelölt területek). Összehasonlítva a kontroll anyaggal, 10 perc után a FITC-tal megfestett nanoréteg nélküli albumin (FITC-BSA) az erekben belül marad, ezért az erek kontúrjai élesen kirajzolódnak (4.B ábra, nyilak).

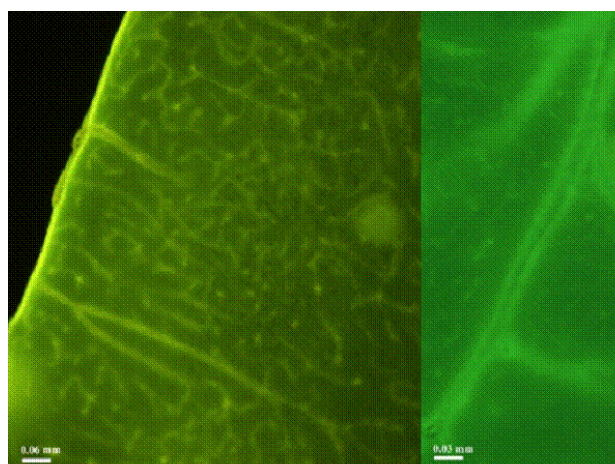
3.2.1. A vér-agy gáton történő átjutás pillanata

2-3 perccel a kísérleti anyag beadását követően a fluoreszcens mikroszkópiás felvételeken látható az a pillanat, amikor a FITC-tal festett egyedi albumin nanorészecskék éppen átjutnak a vér-agy gáton (5. ábra). Az ábra jobb oldalán látható nagyobb nagyításnál világosan kivehető az ér belső ürege, amely üres, mert a fluoreszcens anyag éppen átjutott rajta. Az ér fala, illetve a vér-agy gát képlete az erek körül élénken fluoreszkál, ami azt mutatja, hogy az egyedi albumin nanorészecskék éppen a vér-agy gáton való átjutás fázisában vannak.



4. ábra

Kontroll (B) és egyedi albumin nanorészecskék (B) átjutása a vér-agy gáton 10 perccel a beadást követően



5. ábra

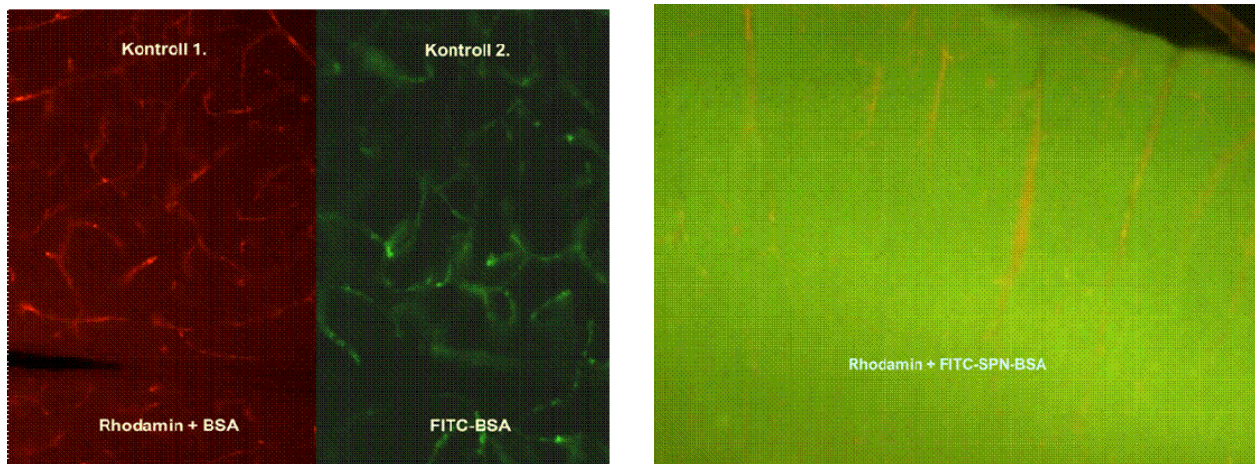
FITC-tal festett egyedi albumin nanorészecskék átjutása a vér-agy gáton 2-3 perc után. A kis felbontású metszet (A) látszólag nem különbözik élesen a kontrolltól, azonban a nagyított képen (B) látható, hogy a kísérleti anyag elhagyta az erek belső üregét és az érfalban, illetve a vér-agy gáton belül tartózkodik.

3.2.2. A vér-agy gáton történő átjutás kettős festéssel

Abban az esetben, ha az agy nem kap elegendő oxigént (hipoxia), a vér-agy gát átjárhatóvá válik. Annak a kizárására, hogy az oxigénhiányos állapot okozta az egyedi albumin nanorészecskék átjutását a vér-agy gáton, kettős festést alkalmaztunk. A FITC mellett jól elkülöníthető, piros színű fluoreszcenciát adó rodamin festéket használtunk (6. ábra).

Ennél a kísérletnél két vak próbát is végeztünk. Az egyik esetben rodamin adtuk a kísérleti állatoknak, majd fél órával a beadást követően leöltük őket és az agyukat a leírás szerint fixáltuk, majd metszeteket készítettünk belőlük (ld. 2.2.2 fejezet). Az eredmények azt mutatják, hogy ebben az esetben nem került át rodamin festék a vér-agy gáton (6. ábra, Kontroll 1). Második kontrollként FITC-tal megfestett nanorég nélküli bovin serum albumint adtunk a kísérleti állatoknak és a beadást követően fél órával a többivel analóg módon feldolgoztuk az agyukat. A szövettani kép (6. ábra, Kontroll 2) mutatja, hogy a FITC-BSA ebben az esetben sem jutott át a vér-agy gáton. Az erek a metszeten jól elkülöníthetők az agy állományától. A kísérletben egyszerre kaptak a kísérleti állatok rodamin festéket, amelyet nem kötöttünk semmihez, 1%-os koncentrációban, illetve

a FITC festékkel megfestett és zölden fluoreszkáló egyedi albumin nanorészecskéket (FITC-SPN-BSA konjugátumot) 5 mg/ml-es koncentrációban (1 mg/100 g testtömeg mennyiségben). A szövettani képen jól látható, hogy a két festék a beadás után 30 perccel már jól elkülönül egymástól. A FITC-SPN-BSA konjugátum már homogéne eloszlik az agy állományában, az erek lumenében viszont nem található (6. ábra, lent). Ellenben a piros színű rodamin festék megmarad a véredények falán belül (ld. nyilak) és élesen elkülönül a környezetétől.



6. ábra

FITC-tal festett egyedi enzim nanorészecskék átjutása a vér-agy gáton (30 perc, kettős festés)

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérleti eredmények bizonyítják, hogy az egyedi fehérje nanorészecskéket körülvevő polimer réteg a fehérjék stabilizálásán kívül hordozó funkcióval is rendelkezhet. Néhány nanométer vastag polimer réteg is elegendő ahhoz, hogy specifikus szállító funkcióval rendelkezzen az élő szervezetben olyan nehezen, csak specifikus aktív transzporttal átjárható biológiai határfelületek (barrierék) esetében is, mint a vér-agy gát. (Számításaink szerint, valamint irodalmi adatok [27, kieg. anyag] alapján kijelenthetjük, hogy az egyedi fehérje nanorészecskéket körülvevő polimer burok mintegy 10 monomerből álló oligomer tüskéket tartalmaz, szám szerint 5-6 db oligomer szál/fehérje molekula, amely a fehérjék tömegének mintegy 10%-a).

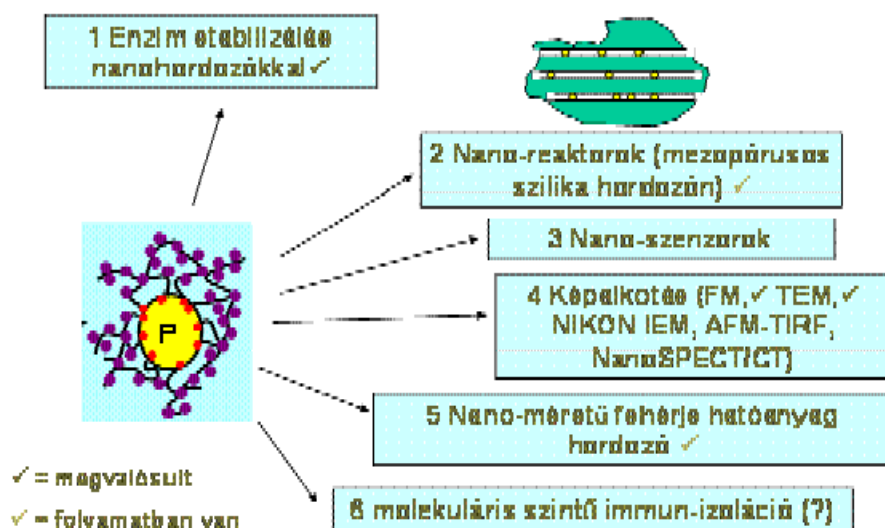
Összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy az egyedi fehérje nanorészecskéket körbeölelő polimer réteg multifunkcionális, eddigi eredményeink alapján legalább kétfajta funkcióval rendelkezik: 1) stabilizáló funkció. A polimer szálka között kialakuló keresztkötések megakadályozzák a fehérjék széttekeredését (unfolding) és azáltal növelik a fehérjék stabilitását. Ipari szempontból ez a technika elsősorban az enzimek stabilizálása szempontjából lehet hasznos. Megkülönböztethetünk a) mechanikai stabilitást, amikor optimális hőmérsékleten rázógéppel történő rázás mellett tapasztalunk a SPN-nél stabilitás növekedést (ld. 2.a ábra) b) hőstabilitást, amikor extrém magas hőmérsékleteken tapasztalhatunk stabilitás növekedést, amelyeken a természetes fehérjék már denaturálódnak (2.b ábra), c) pH-stabilitást, amikor erősen savas (pH = 1,5), illetve lúgos (pH = 12,0) pH-értékek mellett is tapasztalhatunk aktivitást (2.c ábra), valamint d) negyedleges szerkezet megőrzését (2.d ábra). 2) egy újonnan megismert funkciója a nano-rétegnek a biológiai membránon keresztül történő szállító funkció. 3) Folyamatban van annak megvizsgálása, hogy rendelkezik-e a polimer-nanoréteg a beburkolt fehérjékre vonatkozó molekuláris szintű immunizáló funkcióval.

Az egyedi fehérje nanorészecskék felhasználási területei tehát az ipari enzim stabilizáláson, illetve a mezopórusos szilika gélbe, mint hordozóba való rögzítésen (enzim alapú nano-reaktorok), valamint nanoméretű szenzorokként való alkalmazhatóságukon kívül tovább bővültek. Megvizsgáltuk különböző képalkotó eljárásokban, – úgymint fluoreszcencia mikroszkópia (FM), transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) – való felhasználhatóságukat (7. ábra).

6. TÁVLATI KILÁTÁSOK

Folyamatban van az egyedi fehérje nanorészecskék atomerő mikroszkópiával kombinált teljes visszaverődésen alapuló infravörös spektroszkópia (AFM-TIRF), illetve a térbeli és időbeli eloszlást egyaránt követni tudó nanoSPECT/CT berendezéssel történő vizsgálatuk (7. ábra). Jelenleg hemoglobin molekulákból állítunk elő egyedi fehérje nanorészecskéket, amelyeket liposzómákba csomagolva művérként alkalmazhatunk. A nanoréteg anyagi minőségét is változtatva hiperelágazásos polimereket, illetve mágneses nanoréteget is kipróbálunk.

A nanoréteg immunizáló képességének vizsgálata folyamatban van (ez egy harmadik funkció lehet). További kérdés, hogy működhetnek-e finom fehérje-fehérje kölcsönhatások egyedi fehérje nanorészecskék alkalmazásával, illetve a biodegradabilitás mennyire lassú.



7. ábra

Az egyedi enzim nanorészecskék felhasználási lehetőségei

Rövidítésjegyzék

AFM-TIRF	atomerő mikroszkópiával kombinált teljes infravörös visszaverődésen alapuló fluoreszcencia spektroszkópia
AOT	nátrium-bisz(2-etilhexil)szulfoszukcinát vagy aerosol OT
BSA	bovin serum albumin
FITC	fluorescein-izotiocianát
FM	fluoreszcens mikroszkópia
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
MAPS	metakriloxipropil-trimetoxiszilán
nanoSPECT/CT	laborállat komputer tomográfiával kombinált izotópos SPECT (single photon emission computed tomography)
PAMAM	polimamidoamin dendrimer
SPN	egyedi fehérje nanorészecskék (single protein nanoparticles)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatómunka NKTH projekt keretében történt (NKTH TECH_08_A3/2-2008-0385).

*A 3. ábrán említett endoxilánáz és β -mannozidáz hőstabil enzimeket a *Thermobifida fusca* fajtól Dr. Kukolya József izolálta (Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő) és Dr. Barna Teréz, valamint Fekete Csaba Attila tisztította (Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék).*

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Cheetham P.S.J., Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology. UK: Ellis Horwood; 83–234. (1995)
- [2] Tischer, W. and Kasche, V., Immobilized enzymes: crystals or carriers?, *Trends in Biotechnology*, 1999, 17, 326–335.
- [3] Livage, J., Coradin, T. and Roux, C., Encapsulation of biomolecules in silica gels, *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2001, 13, R673–R691.
- [4] Mozhaev, V. V., Melik-Nubarov, N. S., Sergeeva, M. V., Siksnis V., and Martinek, K., Strategy for stabilizing enzymes, Part One: increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support, *Biocatalysis*. 1990, 3, 179–187.
- [5] Mozhaev, V. V., Mechanism-based strategies for protein thermostabilization, *Trends in Biotechnology*, 1993, 11, 88–95.
- [6] Desantis G. and Jones, J. B., Chemical modification of enzymes for enhanced functionality, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10, 324–330.
- [7] Govardhan, C. P., Crosslinking of enzymes for improved stability and performance, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10, 331–335.
- [8] Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K. and Gershenson, A., How enzymes adapt: lessons from directed evolution, *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26, 100–106.
- [9] Lehmann, M. and Wyss, M., Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution, *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12, 371–375.
- [10] Brannigan, J. A. and Wilkinson, A.J., Protein engineering 20 years on, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3, 964–970.
- [11] O’fagain, C., Enzyme stabilization — recent experimental progress, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33, 137–149.
- [12] Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, 2001, 409, 241–246.
- [13] Lee, M. Y. and Dordick, J. S., Enzyme activation for nonaqueous media, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13, 376–384.
- [14] Caruana, C. M., Enzymes tackle tough processing, *Chemical Engineering Progress*, 1997, 93, 13–20.
- [15] Demirjian, D., Moris-Varas, F., Gololobov, M. and Calugaru, S., Biocatalysis in chemical processing, *Chemical Process*, 1999, 62, 57–58.
- [16] Jia, H., Zhu, G. and Wang, P., Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility, *Biotechnology & Bioengineering*, 2003, 84, 406–414.
- [17] Ge, J., Lu D., Liu Z., Liu Z., Recent advances in nanostructured biocatalysts, *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44 (1), 53-59.
- [18] Hong R., Emrick T., Rotello V.M., Monolayer-Controlled Substrate Selectivity Using Noncovalent Enzyme-Nanoparticle Conjugates, *Journal of American Chemical Society*, 2004, 126 (42), 13572-13572.
- [19] Yang Z, Shihui S, Chunjing Z, Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367, 169-175.
- [20] Hong J., Xu D., Gong P., Ma H., Dong L., Yao S., Conjugation of Enzyme on superparamagnetic nanogels covered with carboxil groups, *Journal of Chromatography B*, 2007, 850 (1-2), 499-506.
- [21] Kumar, R., Maitra A.N., Patanjali P.K., Sharma P., Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase, *Biomaterials* 2005, 26, 6743–6753.
- [22] Gill, I., Ballesteros A, Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals, *Tibtech* 2000, 18, 282-296.
- [23] Ge Y, Minf Y, Lu D, Zhang M, Liu Zh, Hyperbranched polymer conjugated lipase with enhanced activity and stability *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 36, 93-99.
- [24] Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science*, 2006, 61 (3), 1017-1026.
- [25] Hegedüs I., Nagy E., Improvement of enzyme stability as single enzyme nanoparticles, *Chemical Engineering Science*, 2009, 64, 1053-1060.
- [26] Hegedüs, I., Nagy E., Comparison of the structure and the stability of single enzyme nanoparticles, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 2009, 37 (2), 123-130.
- [27] Yan M., Ge Y., Liu Z., Ouyang P. K., Encapsulation of single enzyme in nanogel with enhanced biocatalytic activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11008-11009.
- [28] Ma, D., Li, M., Patil A.J., Mann, S., Fabrication of Protein/Silica Core–Shell Nanoparticles by Microemulsion-Based Molecular Wrapping, *Adv. Mat.*, 2004, 16 (20), 1838-1841.
- [29] Yang Z., Shihui S., Chunjing Z., Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367, 169-175.
- [30] Zhu G., Wang P., Polymer–Enzyme Conjugates Can Self-Assemble at Oil/Water Interfaces and Effect Interfacial Biotransformations, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126 11132–11133.
- [31] Novick S.J., Dordick J.S., Protein-containing hydrophobic coatings and films, *Biomaterials*, 2002, 23, 441–448.

- [32] Rastogi R., Anand S., Koul V., Evaluation of pharmacological efficacy of 'insulin–surfoplex' encapsulated polymer vesicles, *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 373, 107–115.
- [33] Mori, A., Ohtsuki, C., Sugino, A., Kuramoto K., Miyazaki, T., Tanihara, M., Osaka, A., Bioactive MMPA-based bone cement modified with methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium salts, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2003, 111 (10), 738-742.
- [34] Al-Karawi A. J. M., Al-Daraji A. H. R., Preparation and using of acrylamide grafted starch as polymer drug carrier, *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79 (3), 769-774.
- [35] Shirotsaki, Y., Tsuru K., Hayakawa, S., Osaka, A., Takashima, S., Cytocompatibility of silicon elastomer grafted with β - methacryloxypropyltrimethoxysilane, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2006, 114 (1), 72-76.
- [36] Vallée J.-N., Lo D., Guillemin R., Reb Ph., Adem C., Chiras J., In Vitro Study of the Compatibility of Tris-acryl Gelatin Microspheres with Various Chemotherapeutic Agents *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 2003, 14, (5), 621-628.
- [37] Lee K. Y., Yuk S. H., Polymeric protein delivery systems, *Progress in Polymer Science*, 2007, 32, (7), 669-697.
- [38] Tsuji A., Tamai I., Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood–brain barrier, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 36 (2-3), 277-290.
- [39] Brasnjevic I., Steinbusch H. W.M., Schmitz Ch., Martinez-Martinez P., Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier, *Progress in Neurobiology* 2009, 87, 212–251.