

Nano-gyógyszerek kórélettana, különös tekintettel a keringési vonatkozásokra

Doktori értekezés

Dr. Órfi Erik

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Szénási Gábor, C.Sc., *tudományos főmunkatárs*
Prof. Dr. Szebeni János M.D., D.Sc., Med. Habil., *egyetemi tanár*

Hivatalos bírálók: Dr. Garami András, Ph.D., *egyetemi docens*
Dr. Tóvári József, Ph.D., *OOI osztályvezető*

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Klebovich Imre, D.Sc., *egyetemi tanár*

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bertalanné Balogh Emese, Ph.D., *egyetemi adjunktus*

Prof. Dr. Pethő Gábor, Ph.D., Med. Habil., *egyetemi tanár*

Budapest
2022

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS	6
2.1 A KOMPLEMENTRENDSZER	6
2.1.1 A komplementrendszer aktiválódási mechanizmusai a liposzómák által	10
2.2 A CARPA TERMINOLÓGIA ELTERJEDÉSE.....	11
2.3 A CARPA JELLEMZŐI.....	14
2.4 A CARPA PATOMECHANIZMUSA.....	15
2.5 A TÚLÉRZÉKENYSÉGI REAKCIÓ, PSZEUDOALLERGIA, ÉS CARPA ILL. CIPA FOGALMAKRÓL	16
2.6 A C3A ÉS C5A KOMPLEMENT JELENTŐSÉGÉNEK ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATA 17	
2.7 PROBLÉMAFELVETÉS	19
3. CÉLKITŰZÉSEK	21
4. MÓDSZEREK.....	22
4.1 EGÉR VIZSGÁLATOK.....	22
4.1.1 Vizsgálati anyagok, liposzómák és ELISA kitek	22
4.1.2 Kísérlet során felhasznált állatok.....	22
4.1.3 Kísérleti protokoll.....	23
4.1.4 A plazma extravazáció mérése (kapilláris permeabilitás)	25
4.1.5 Komplement assay.....	25
4.1.6 Vérminták kezelése a különböző mérésekhez	26
4.1.7 Statisztikai feldolgozás	26
4.2 PATKÁNY VIZSGÁLATOK.....	27
4.2.1 Vizsgálati anyagok	27
4.2.2 A patkánykísérleteknél készült liposzómák karakterisztikája és elkészítésük	27
4.2.3 Kísérlet során felhasznált állatok.....	28
4.2.4 Kísérleti protokoll.....	28

4.2.5	Analitikai eljárások.....	28
4.2.6	Statisztikai elemzés.....	29
4.3	ETIKAI JÓVÁHAGYÁS	29
5.	EREDMÉNYEK.....	30
5.1	EGÉR EREDMÉNYEK	30
5.1.1	A liposzómák alapvető jellemzői	30
5.1.2	A C aktivátorok és liposzómák hemodinamikai hatásai.....	30
5.1.3	Hematológiai és plazma koncentráció változások a C aktivátorok és a liposzómák hatására egerekben	32
5.1.4	C3aR antagonistá hatása Abelcettel kiváltott hipertenzióra	36
5.1.5	Az Abelcettel okozott átmeneti hipertenzió törzsfüggősége	37
5.1.6	Az ismételt Abelcet kezelés hatásai.....	38
5.1.7	A C kimerítés és a C5a receptor antagonistá hatása az Abelcettel kiváltott hipertenzióra.....	39
5.1.8	A C3a peptid fragmens (63-77) hatása a vérnyomásra és a pulzusszámmra40	
5.1.9	A makrofág kimerítés és a trombociták gátlásának hatásai.....	41
5.1.10	Az Abelcet hatása COX-1 vagy TP hiányos kontroll egerekben és komplement kimerített egerekben	42
5.2	PATKÁNY EREDMÉNYEK	44
5.2.1	Liposzóma jellemzők.....	44
5.2.2	Komplement aktiválás a különböző kezelésesek után	44
5.2.3	A liposzómák hatása a vérnyomásra, valamint a vérnyomás és a C3 fogyasztás korrelációja.....	46
5.2.4	A komplement aktivátorok és a különböző liposzómák hatásai a vérsejtekre	49
5.2.5	A komplement aktivátorok és a különböző liposzómák hatása a plazma TXB ₂ koncentrációra.....	52
6.	MEGBESZÉLÉS.....	54
6.1	AZ ABELCETTEL OKOZOTT REAKCIÓK JELLEMZŐI EGÉRBEN	54
6.1.1	Az Abelcettel okozott keringési változások mechanizmusa egérben	54

6.2	A VAZOAKTÍV MEDIÁTOROK SZEREPE AZ ÁBELCETTEL OKOZOTT HIPERTENZIÓBAN, EGÉRBEN	57
6.3	A VÉRLEMEZKÉK ÉS MAKROFÁGOK SZEREPE A VÉRNYOMÁSVÁLTOZÁSBAN, EGEREKKBEN.....	58
6.3.1	A liposzómákkal kiváltott reakciók jellemzése patkányban.....	59
6.3.2	A komplement aktiváció jelentősége a patkány HSR-ban	62
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	66
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	67
9.	SUMMARY.....	68
10.	IRODALOMJEGYZÉK	70
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	78
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	87

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AT: Anafilatoxin

BP: Blood pressure (Vérnyomás)

C: Complement (Komplement)

CARPA: Complement activation-related pseudoallergy (Komplement aktiváción alapuló pszeudoallergia)

CIPA: Complement independent pseudoallergy (Komplement független pszeudoallergiás reakció)

Chol: Cholesterol (Koleszterin)

COX-1: Ciklooxygenáz 1

CVF: Cobra venom factor (Kobra méreg faktor)

DAF: Decay accelerating factor (Bomlásgyorsító tényező)

DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholine (Dipalmitilfoszfátidilkolin)

DSPE: 1,2-distearoyl-SN-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine (1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfátidil-etanol-amin)

DSPG: Distearoylphosphatidylglycerol (Disztearoil-foszfátidil-glicerin)

DSR: Danger signal receptors (Veszélyjelző receptorok)

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay („Enzimhez kötött immunszorbiens próba”)

HC-MLV: High cholesterol multilamellar vesicles (Magas koleszterintartalmú multilamelláris vezikulum)

HR: Heart Rate (Szívfrekvencia)

HSR: Hypersensitivity reaction (Túlérzékenységi reakció)

HSPC: Hydrogenated soy phosphatidylcholine (Hidrogénezett szója-foszfátidilkolin)

HTC: Hematocrit (Hematokrit)

LEH: Liposome-encapsulated hemoglobin (Liposzómába kapszulázott hemoglobin)

LPS: Lipopolysaccharide (Lipopoliszacharid endotoxin)

MABP: Mean Arterial Blood pressure (Artériás középnyomás)

MAC: Membrane Attack Complex (Membránkárosító komplex)

MBL: Mannose-binding lectin (Mannóz kötő lektin)

MCP: Membrane cofactor protein (Membrán kofaktor fehérje)

NHS: Normal human serum (Normál humán szérum)

PAF: Platelet activating factor (Trombocita aktiváló faktor)

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns (Kórokozóval kapcsolatos molekuláris mintázat)

PBS: Phosphate buffered saline (Foszfát pufferolt sóoldat)

PAP: Pulmonary arterial pressure (Pulmonáris artériás nyomás)

PDI: Polydispersity index (Polidiszperzitási index)

PE: Polyethylene (Polietilén)

PEG: Polyethylene glycol (Polietilén glikol)

PEGiláció: Gyógyszermolekula polietilén glikol polimerhez történő (kovalens) kötése

PIM: Pulmonary intravascular macrophages (Pulmonális intravaszkuláris makrofágok)

PGD2: Prostaglandin D2

PGE2: Prostaglandin E2

PGI2: Prostaglandin I2, prosztaciklin

PL: Phospholipid (Foszfolipid)

PLT: Platelet, thrombocyte (Trombocita)

PMN: Polimorphonuclear cell (Polimorfonukleáris sejt - neutrofil, eozinofil, bazofil granulocyták)

SAP: Systemic arterial pressure (Szisztémás artériás nyomás)

SEM: Standard error of the mean (Átlagtól való eltérés)

SRBC: Sheep red blood cell (Birka vörövértest)

sCR1: Soluble complement receptor 1 (Szolubilis komplement receptor-1)

TLRs: Toll like receptors

TP: Tromboxán prosztanoid

TXB₂: Tromboxán B₂, a TXA₂ stabil metabolitja

USP: United States Pharmacopeia (Amerikai gyógyszerkönyv)

Vit-E: γ -Tocopherol (γ -Tokoferol)

WBC: White Blood Cell (Fehérvérsejt)

WT: Wild type (Vad típus)

2. BEVEZETÉS

2.1 A komplementrendszer

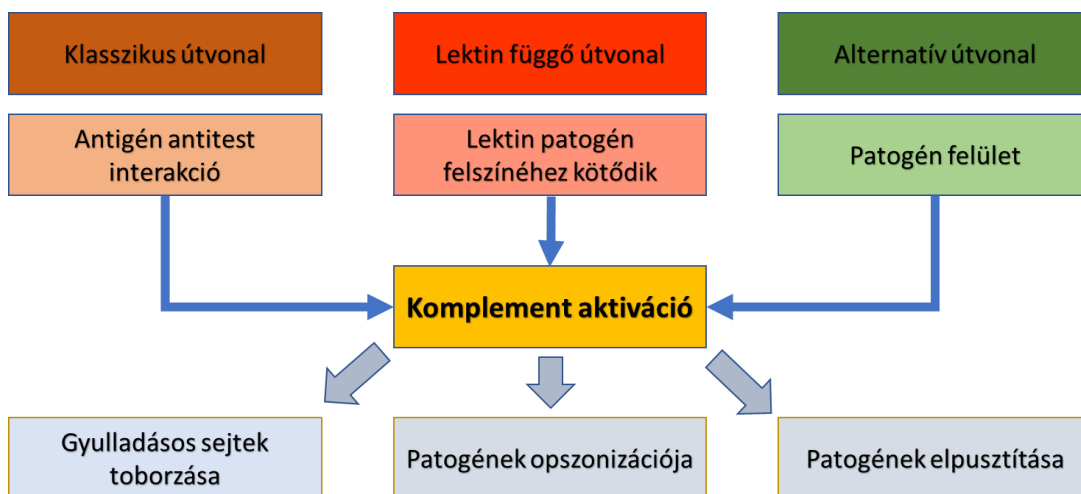
A komplementet a XIX. század vége felé fedezték fel a normál vérplazma hőérzékeny összetevőjeként, amely serkenti a baktériumok opszonizációját. Az opszonizáció során a szervezetbe jutott kórokozók és idegen anyagok, ill. a szervezetben előregedett, sérült sejtek és anyagok felszínére jelzőfehérjék (opszoninok) kötődnek, ezzel megjelölve ezeket a struktúrákat a fagocitáló immunsejtek számára, amelyek így felismerik a kórokozókat és káros anyagokat és fagocitálják azokat. Bár először a komplement rendszernek az antitest válasz során játszott szerepét fedezték fel, később azt is felismerték, hogy a komplement rendszer aktiválható a fertőzés korai szakaszában antitestek hiányában is. Az opszonizálást megelőzően a mintázatfelismerő receptorok kötődnek az idegen vagy sérült sejtekhez vagy anyagokhoz, ez aktiválja a veleszületett immunrendszert (innate immune system), ezen belül a komplement rendszert, és a beinduló komplement hasítási láncolat termeli azokat a fehérjéket, amelyek opszonizálják a struktúrákat. A veleszületett immunrendszer fehérjéi (opszoninok; C3b, C4b stb.) révén lehetővé válik olyan baktériumok és idegen anyagok felismerése, amelyekkel a szervezet korábban nem találkozott, így elindul azok bekebelezése és elpusztítása. A komplement kifejezés arra a folyamatra utal, amely az antitestek antibakteriális aktivitását egészíti ki. A mai eredmények alapján már egyértelmű, hogy a komplement fehérjék révén a veleszületett immunrendszer fontos szerepet játszik a szervezet védekező reakcióiban (1).

A komplement rendszer különböző plazmafehérjéi együttműködve reagálnak a kórokozókra és gyulladást váltanak ki, amelyek segítenek a fertőzés elleni küzdelemben és az opszonizációban. Számos komplementfehérje proteáz típusú, amelyeket a proteolitikus hasítás aktivál. A még nem aktivált (prekurzor) enzimeket zimogéneknek nevezik. A komplementrendszer esetében a zimogének széles körben fellelhetők a testnedvekben és szövetekben. Ezek alap esetben hatással nem rendelkeznek, a fertőzés helyén azonban aktiválódnak és a gyulladásban szerepet játszó útvonalakat indítanak be. A komplement rendszer egy proteolitikus lépésekből álló enzim kaszkádon keresztül aktiválódik. A folyamat során a kaszkádon belül a zimogén prekuzort egy proteáz elhasítja, ezáltal egy aktív komplement enzim képződik, amely következő szubsztrátot is elhasítja. Az útvonal elején néhány csak „kiegészítő szerepet

játszó” fehérje aktiválódik, minden egymást követő enzimatis reakció nagymértékben felerősíti a jelátvitelt, ami erős és gyors komplement választ generál (2).

Számos szabályozási mechanizmusra van szükség ahhoz, hogy a komplement aktiváció ne ellenőrizetlen körülmények között menjen végbe. A komplement komponensek aktivitását olyan szabályozó fehérjék rendszere modulálja, amelyek megakadályozzák a szövetkárosodást, az aktivált komplement komponensek véletlen kötődését a gazdasejtekhez, illetve a komplement komponensek spontán aktiválódását a plazmában.

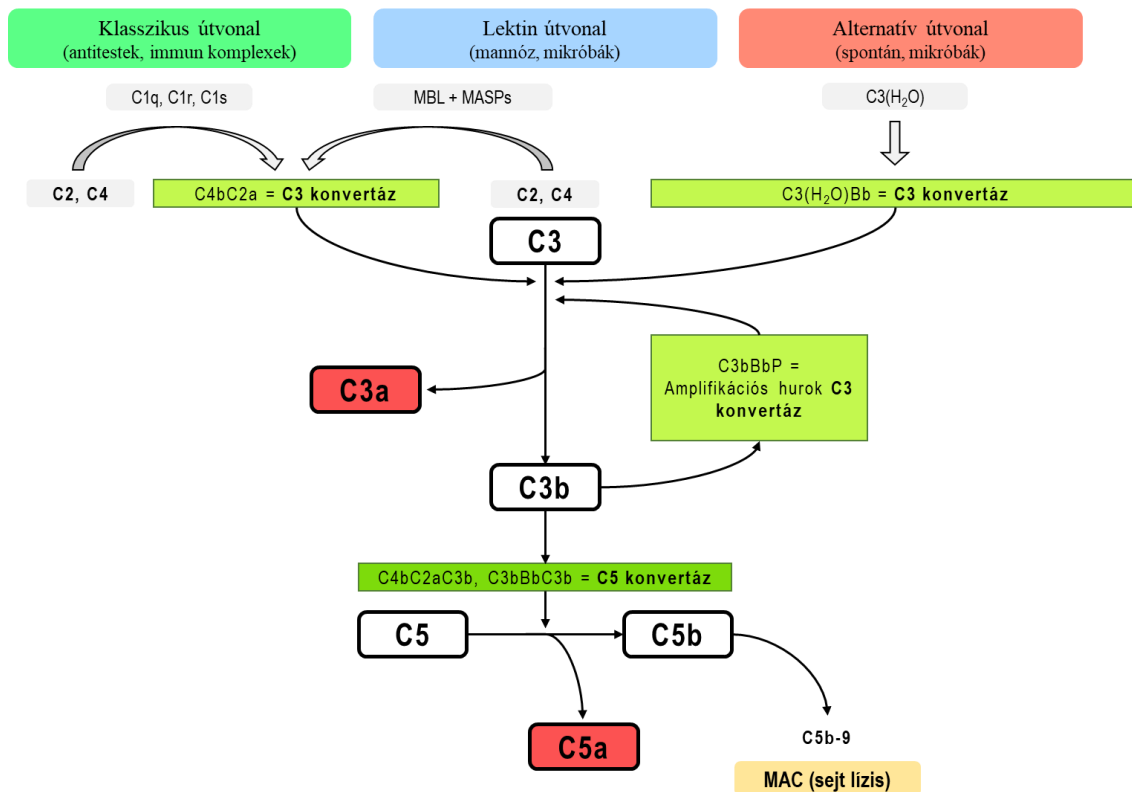
A komplement rendszer három különböző útvonalon keresztül aktiválódhat. Ezeket az útvonalakat a külvilágból bejutott különböző baktériumok, vírusok, illetve antigének megjelenése indíthatja be. Az útvonalak egy közös ágon egyesülnek és végül ugyanazok az effektor molekulák jönnek létre, amelyek végül a patogén elpusztításához vezetnek (1. ábra). Az egyes komplement fehérjék kis töredékei kemotaktikus hatásúak, és fagocitákat toboroznak a komplement aktiváció helyére, és aktiválják azokat. A második mód a patogének opsonizációja. Ekkor az antitestek, vagy pedig az aktív komplementfehérjék feldúsulnak, amelyek kovalensen kötődnek a kórokozókhoz, előkészítve azokat a komplement receptorokat hordozó fagociták általi bekebelezésre. Harmadik lehetőség az, hogy a folyamat végén létrejövő terminális komplement komplex károsítja a baktériumokat oly módon, hogy pórusokat hoznak létre a sejtmembránban.



1. ábra: A komplement aktiváció három útvonala: 1. A klasszikus útvonal, amelynek aktiválódását főleg a C1q komplement komponens és az antitest-ellenanyag (IgG, IgM) komplex kötődése indítja el; 2. A lektin függő útvonal, amelyet néhány általános szérumösszetevő, a mannán-kötő lektin, valamint két hasonló lektin–proteáz (MASP-1,

MASP-2) vált ki, amelyek képesek a tokkal rendelkező baktériumokon lévő különböző mannóz származékok megkötésére; 3. Az alternatív útvonal a C3 spontán aktivációjával kezdődik, de csak közvetlenül a kórokozók felületén erősödik fel. Mindezek az utak kulcsfontosságú komplement enzimek egymást követő aktiválásával járnak, amelyek létrehozzák a komplement effektor molekuláit. A komplement aktiváció három fő következménye a kórokozók opszonizációja, a gyulladós sejtek toborzása és a kórokozók közvetlen elpusztítása (3).

Az útvonalak aktiválódása során proteolitikus reakciólépések sorozatai indul be. A C3 hasítása során keletkező C3b, a C3a mellett a nagyobb hasítási termék, kovalensen kötődik a kórokozó felületén lévő hidroxil, vagy amin csoportokhoz, és hozzájárul a következő komponens aktiválásához. A korai események közös eredőjeként képződik a C3 konvertáz enzim (az alternatív útvonalon C3(H₂O)Bb és C3bBb formában az amplifikációs hurok következtében, a klasszikus és lektin útvonalon pedig C4bC2a formában), és a C3 konvertáz bontja a C3 komplementfehérjét aktív C3a és C3b komplement komponensé alakítja át. A nagyszámú C3b molekula kötődése a kórokozóhoz a komplement aktiváció egyik központi eseménye. A megkötött komplementeket, különösen a C3b-t és annak töredékeit a fagocita sejtek specifikus komplement receptorai ismerik fel, amelyek bekebelezik a C3b és töredékei által megjelölt kórokozókat. A C3, C4 és különösen a C5 kis fragmentjei fagocitákat toboroznak a fertőzés helyére és aktiválják őket a G fehérje-kapcsolt receptorokhoz kötődéssel. Ezek együttesen elősegítik a kórokozók fagociták általi felvételét és megsemmisítését. A C3b molekulái magához a C3 konvertázhoz is kapcsolódnak (C3bBb), amelyek elindítják a késői eseményeket, valamint az így képződő C5 konvertáz enzimek (C4bC2aC3b és C3bBbC3b) a C5 hasítása révén a C5a, illetve C5b termék képződését eredményezi (4). Mindhárom útvonal aktivációja során nagy mennyiségű C3b molekula keletkezik, a később felszabaduló, korlátozott számú C5b mellett. A nagyobb, C5b-töredék a membránkárosító komplex (membrane attack complex, MAC, C5b-9) összeszereléséhez járul hozzá, ami a kórokozók membránjához kötődik és abban egy csatornát hoz létre, ami a kórokozó lízisét eredményezheti (5). (a folyamatot a 2. ábra szemlélteti)



2. ábra: A normál komplement kaszkád. A komplementrendszer a klasszikus útvonal, a lektin útvonal és az alternatív útvonal által aktiválható, ami mind C3 konvertázok kialakulását eredményezi. A klasszikus útvonalat olyan immunkomplexek indítják el, amelyek kölcsönhatásba lépnek a C1q-val, ami végül a klasszikus C3 konvertáz (C4bC2a) útvonal kialakulásához vezet. Az alternatív útvonalon a C3 konformációja megváltozik C3(H₂O)-ra, ennek átalakulásában a faktor B-nek van szerepe. A faktor B egy inaktív proenzim, amelyet a faktor D aktivál. A faktor D csak akkor tudja a faktor B-t hasítani, ha már kötődött a C3(H₂O) és C3b-hez. A faktor B két peptid fragmenssé hasad, amelyek a Ba és a Bb. A Bb tartalmazza a szerin proteáz domént, a C3(H₂O)-ból C3(H₂O)Bb keletkezik, illetve a C3b-ből C3bBb keletkezik. Bármelyik C3 konvertáz képes a C3-at C3a-ra és C3b-re hasítani. A C3bBb konvertáz több C3-at C3b-ra hasít, hogy még több C3 konvertázt hozzon létre egy erőteljes erősítési hurokban, ami a komplementrendszer teljes aktiválását eredményezi. A properdin plazmafehérje stabilizálja a C3bBb-t, és platformot biztosít a mikrobiális felületeken, apoptotikus sejteken és rosszindulatú sejteken való *in situ* összeszereléséhez. A C3b a C5 konvertáz képződésével is elindítja a terminális komplement kaszkádját a C3 konvertázok bármelyikével (C4bC2aC3b vagy C3bBbC3b) való társulás révén. A C5 konvertáz ezután C5-öt C5a-ra, a C5b-t pedig további folyamatok révén (C6-ra hasítja, megkönnyítve a C7, C8 és C9 kötődését (az

ábrán nem szerepel) és a C5b-9 MAC kialakulásával végződik. Ez utóbbi pórusokat képez a kórokozók és a sérült sejtek membránjában, ezáltal elősegítve a sejtlyízist. A C3a és a C5a anafilatoxinok a komplement aktiváció legerősebb effektorjai, amelyek képesek előidézni a chemotaxist, a sejtek aktiválását és a gyulladáshoz vezető jelzést. MASP, mannózkötő lektin asszociált szerin-proteáz fehérje. MBL, mannózkötő lektin (6)

2.1.1 A komplementrendszer aktiválódási mechanizmusai a liposzómák által

Régóta ismert, hogy a liposzómák aktiválhatják a komplementrendszert mind a klasszikus, mind az alternatív útvonalakon keresztül (7-9). Legutóbb nagy figyelmet fordítottak a lektin útvonal bevonására, mivel a PEGilált (Gyógyszermolekula polietilén glikol polimerhez történő kovalens kötése) nanorészecskékről, például a szén nanocsövekről kimutatták, hogy C1q-független, MBL-MASP-függő útvonalakon keresztül aktiválják a komplement rendszert (10, 11).

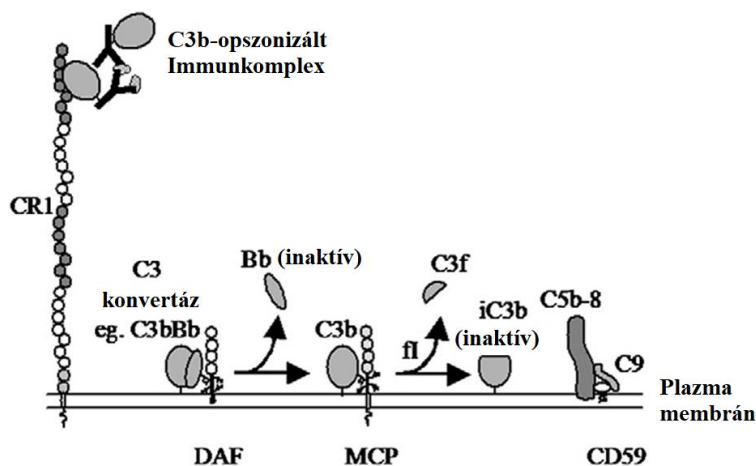
Széles körben elterjedt nézet, hogy az mesterséges foszfolipid kettősrétegek nem tartalmaznak fehérjéket, ezért nem immunogének. Ez azonban nem vonatkozik a veleszületett immunitásra, azaz az immunrendszer azon részére, amely elsővonalbeli, nem specifikus védelmet nyújt a külvilágból származó mikrobák és más káros részecskék ellen.

A liposzómák veleszületett immunrendszer általi felismerése egyszerű biológiai logikával történik: a foszfolipid vezikulumok hasonlítanak a patogén mikrobák méretéhez és alakjához, valamint a szubcelluláris organelumokra, amelyek ellen a nem specifikus immunrendszer a több millió éves evolúció során hatékony eliminációs mechanizmusokat fejlesztett ki (12).

A méretüket tekintve a klinikai célra használt liposzómák és patogén emberi vírusok közötti hasonlóság figyelemre méltó. Ez a méretbeli átfedés nem véletlen, mivel az eddig forgalomba hozott liposzómák legtöbbször foszfolipid kettősréteg vezikulumok, amelyekből a sejt élet kifejlődése mintegy 3–4 milliárd évvel ezelőtt kezdődött (13-15).

A vírusok mellett a liposzómák hasonlítanak az exoszómákra, nevezetesen a sejtekről leválasztott membrán vezikulumokra, valamint a legtöbb más organelumra (apoptotikus testek) és sejttermékekre, amelyek a sejthalál után képződnek. A nanobaktériumok, a legkisebb önreprodukcióra képes kórokozók, szintén a liposzómás mérettartományban (100–200 nm) vannak (16).

A liposzómák immunrendszer általi felismerésének második fő oka az önmegkülönböztető molekulák hiánya a kettősréteg membránon. A liposzómákból hiányoznak azok a komplement-kontroll fehérjék, amelyek megvédik a sejteket a komplement támadástól, nevezetesen a komplement C3b/C4b receptor 1 (CR1, CD35), a „decay accelerating factor” (DAF, CD55; bomlásgyorsító tényező), membrán kofaktor fehérje (MCP, CD46) és MAC-gátló protein protektin (CD59) (3. ábra). A fenti membránfehérjék hiányában az immunrendszer számára a liposzómás gyógyszerek felismerése visszafordíthatatlanul célponttá válik. Az ezt követő gyulladásos reakció, amely túlérzékenységi reakcióként (hypersensitivity reaction, HSR) nyilvánul meg, károsítja a liposzómás gyógyszert és súlyos esetben a szöveteket.



3. ábra. Komplement inhibitorok a sejtfelületeken. A CR1 nagy affinitással megkötí a C3 konvertáz aleggységeket, a C3b-t és a C4b-t, és elősegíti fizikai disszociációjukat (DAF, bomlásgyorsító aktivitás). Ezenkívül a CR1 fokozza a C3 konvertázok katalitikus lízisét a plazma szerin-proteáz, a faktor I. (fI) (kofaktor aktivitás) által. Ezenkívül a CR1 megkötí a C3b-opszonalizált részecskéket és immunkomplexeiket, kivonja őket az aktiválási kaszkádból, és a retikuloendoteliális illetve más sejtjeibe szállítja őket. A DAF megkötí a C3 konvertázt, és felgyorsítja az aleggységekre bomlását. Az MCP a kofaktor aktivitását jeleníti meg, míg a CD59, mint a C-károsodás elleni utolsó védelmi vonal, zavarja a C9 kibontakozását és polimerizációját a membránkárosító komplexum (MAC) kialakításához. Reprodukálva (17)-ből engedéllyel.

2.2 A CARPA terminológia elterjedése

Az akut túlérzékenységi reakciók problémája a liposzómák és más lipid segédanyagú terápiás készítményeknél időről időre felmerül. A liposzómás túlérzékenységi reakciókat

már az 1994-es évben megemlítik, amit nagy dózisú rákellenes liposzómás készítmény infúziója során figyeltek meg. Azóta számos újabban kifejlesztett liposzómás készítménynél látták, hogy létrejöhet HSR (18).

A később CARPA-nak (Complement activation related pseudoallergy) nevezett szindrómát először Rabonovici et al. (1989) mutatta be éber patkányokban. Potenciálisan vörösvértest helyettesítőként alkalmazott, liposzómába kapszulázott hemoglobin (liposome-encapsulated hemoglobin, LEH) hemodinamikai, hematológiai és vér kémiai hatásait tanulmányozta (19).

A LEH intravénás infúziója átmeneti, de viszonylag tartós (<120 perces) hipertenziót és tahikardiát váltott ki, amelyet a hematokrit és a fehérvérsejtek számának növekedése kísért, miközben a trombocitaszám csökkent. A plazma tromboxán B₂ (TXB₂, a TXA₂ stabil metabolitja) szintje fordított arányban változott a trombocitaszámmal.

A hemoglobinmentes liposzómás vehikulum (vivőanyag) injekciója hipotenziót és tahikardiát, megnövekedett hematokrit értéket, magas fehérvérsejtszámot és emelkedett plazma TXB₂ koncentrációt okozott, miközben a trombocitaszám szintén csökkent (19, 20). Egy későbbi vizsgálatban a LEH-t szintetikus disztearoil-foszfatidilkolinnal készítették el, hidrogénezett szójalecitin helyett. Ez a változtatás csökkentette a készítmény pulzusszáma és a plazma TXB₂ koncentrációra gyakorolt hatását, míg a liofilizált LEH alkalmazása közben nem volt kimutatható hemodinamikai, biokémiai vagy hematológiai hatás (20, 21). Ezen eredmények alapján megállapították, hogy a liposzómák mérete és összetétele kulcsfontosságú tényezők a hemodinamikai és hematológiai mellékhatások kialakulása szempontjából. A szerzők azt is kimutatták, hogy a trombocita-aktiváló faktor (PAF) blokkoló szer (BN 50739) előkezelésével megakadályozhatóvá vált a LEH által indukált CARPA a patkányokban, ami arra utalt, hogy a PAF a CARPA egyik kulcsfontosságú közvetítője patkányokban (22). A LEH-nal és a hemoglobinmentes liposzómákkal (vehikulummal) végzett kezelés néhány perccel belül csökkentette a plazma hemolitikus komplement aktivitást, szemben a hemoglobinmentes liposzómákkal (vehikulummal), amelynél kisebb mértékű volt a változás. Mindkét esetben a plazma TXB₂ szintjének emelkedése volt tapasztalható a patkányokban (23). A C aktivációs mechanizmus feltárására irányuló kísérletben két modellt alkalmaztak, a LEH-et patkányszérumban inkubálták EGTA /Mg²⁺ jelenlétében, amely így gátolta a C aktivációt a klasszikus útvonalon keresztül, illetve a másik esetben

a szérumot 50°C-ra előmelegítették, ami az alternatív úton keresztül végbemenő C aktivációt gátolta. Mivel a hőkezelés megakadályozta, hogy a LEH C fogyaszt okozzon, de az EGTA /Mg²⁺ kezelés nem, arra a következtetésre jutottak, hogy a LEH az alternatív útvonalat aktiválta (23). Továbbá, a kobraméreg faktor (CVF), ami C rendszer kimerülését okozta, vagy szolubilis C receptor 1-es (sCR1) kezelés megakadályozta a LEH által kiváltott plazma TXB₂ koncentráció emelkedését. Ezek az eredmények ok-okozati összefüggésre utaltak, a LEH által kiváltott C aktiválás és a TXB₂ szint emelkedése között (24). Egy későbbi vizsgálatban éber patkányoknál kimutatták, hogy az anionos foszfolipid-metoxipolietilén-glikolt (mPEG) tartalmazó liposzómás vezikulumokkal végzett kezelés csökkentette a szérum hemolitikus C aktivitást és növelte a plazma TXB₂ szintjét, míg a nemionos, metilált foszfolipid-mPEG mentes volt az ilyen hatásoktól. Ezért arra a következtetésre jutottak, hogy a C aktiválás az ikerionos foszfolipid csoportoknak köszönhető, amelyek alkalmazását el kell kerülni annak érdekében, hogy biztonságosabb vezikulumokat állíthassanak elő a célzott gyógyszereléshez (25).

Egy másik kutatócsoport különböző lipid összetételű liposzómákba csomagolt kontrasztanyagokat, hogy megakadályozza a kontrasztanyagok glomeruláris szűrését, és ezáltal meghosszabbítsa keringési idejüket. Mivel a kontrasztanyagokat nagy dózisban kellett beadni, a bejuttatott liposzómák mennyisége is magas volt. Nem meglepő, hogy 300 mg/kg i.v. hidrogénezett szója-foszfátidilkolin (HSPC) vagy 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfokolin (DSPC) drasztikus hipotenziót indukált, csökkentve a teljes perifériás ellenállást és a szív kontrakciót (26). A szója-foszfátidilkolin (SPC) vagy a koleszterin hozzáadása a DSPC-hez csökkentette a liposzómák hemodinamikai hatásait ugyanabban az adagban. A C aktiválási paramétereket azonban nem követték. Egy későbbi vizsgálatban liposzómákat injektáltak patkányba i.v. maleinsavba/NaOH vagy Na₂-EDTA (pH 6,65) vagy Tris-HCl pufferben (pH 7,33), és 300 mg/ttkg iopromidot is tartalmaztak 1-1 lipid/gyógyszer arányban. A savas készítmény hipotenziót indukált és csökkentette a teljes perifériás keringési ellenállást és a szívkontrakciót, míg a pufferelt készítmény sokkal kevésbé volt hatékony. Az acetilszalícilsav megakadályozta a hemodinamikai hatásokat (27). A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a liposzómák mérete, elektromos töltése és összetétele rendkívül fontos a szív és érrendszeri válaszok kiváltása szempontjából (27, 28)

2.3 A CARPA jellemzői

A gyógyszeres terápia egyik ígéretes új iránya a nanorészecske hordozók (liposzóma) használata a szabályozott, célzott gyógyszer szállításban, a biológiai anyagoknál és sok más, modern terápiás és diagnosztikai eszközöknél (29, 30). A jelentős előrelépések mellett azonban az egyik megoldatlan probléma az ilyen készítményekkel kapcsolatban, hogy sokszor infúziós reakciót okoznak, amelyek akut, IgE-független HSR-k (31-33). A szakirodalomban a jelenségről infúziós reakció néven vagy komplement (C) aktiváción alapuló pszeudoallergia (CARPA) kulcsszavakat használva számos cikket találni.

A CARPA főbb tünetei az enyhe vagy súlyos keringési változások, kipirulás, csalánkiütés, mellkasi és hátfájdalom, légszomj, láz, köhögés, és sok más általános allergiás tünet. (34, 35) A reakció potenciális halálos kimenetele miatt a jelenséget biztonsági kérdésnek tekintik a nanofarmakoterápiában (36, 17, 25, 37-39), amelynek preklinikai immuntoxicitási teszttel történő ellenőrzését előírja az Európai Gyógyszerügynökség a (generikus) liposzómás gyógyszerek kifejlesztése során (40).

A C aktivációt előidéző nanogyógyszereket és azok káros következményeit vizsgálták *in vitro* körülmények között is, a C hasítási termékek emberi vagy állati szérumban történő mérésével. A vizsgálati anyagokat állatokban, főleg i.v. bolusban történő befecskendezéssel, és az azt követő hemodinamikai változások megfigyelésével, valamint a hematológiai és biokémiai változásokat mérve tesztelték, amelynek során több esetben a súlyos emberi túlérzékenységi reakciók tünetei megfigyelhetőek voltak a vizsgált állatfajokban, elsősorban sertésben (41, 38). Ezeknél a vizsgálatoknál azonban általában sokféle körülményt és végpontot alkalmaztak, amelyeket még nem standardizáltak. Egy korai *in vivo* vizsgálat eredménye arra utalt, hogy a magas koleszterin tartalmú liposzómák csak nagyobb dózisban okoznak CARPA tüneteket patkányban, mint sertésben (42).

Mint azt saját vizsgálataink igazolják, a reakciók reprodukálhatóak sertés, kutya, patkány állatmodellen is, de nem kérdéses, hogy az egyik legérzékenyebb állatfaj a sertés (43). A sertésben néha már néhány milligramm liposzóma (foszfolipid) képes anafilaktikus reakciót okozni, amelynél az előbb említett reakciók erőteljes megjelenése mellett aritmiák is észlelhetőek. A sertéseknél szintén megfigyelhető a jellegzetes bőrpír, csalánkiütéses reakció. Kutyaiban hasonló a keringési változás, mint sertésben, viszont a

kutyák micelláris lipidekre is reagálnak (mint például a Cremophor EL), és kialakulnak a hematológiai és vegetatív idegi változások is (leukopénia leukocitózist követően, trombocitopénia, stb.) (42). Ezek az első vizsgálatok azonban legtöbbször egy liposzóma hatását hasonlították össze a különböző állatfajokban, így előremutató jellegük ellenére nem voltak alkalmasak általános következtetések levonására.

2.4 A CARPA patomechanizmusa

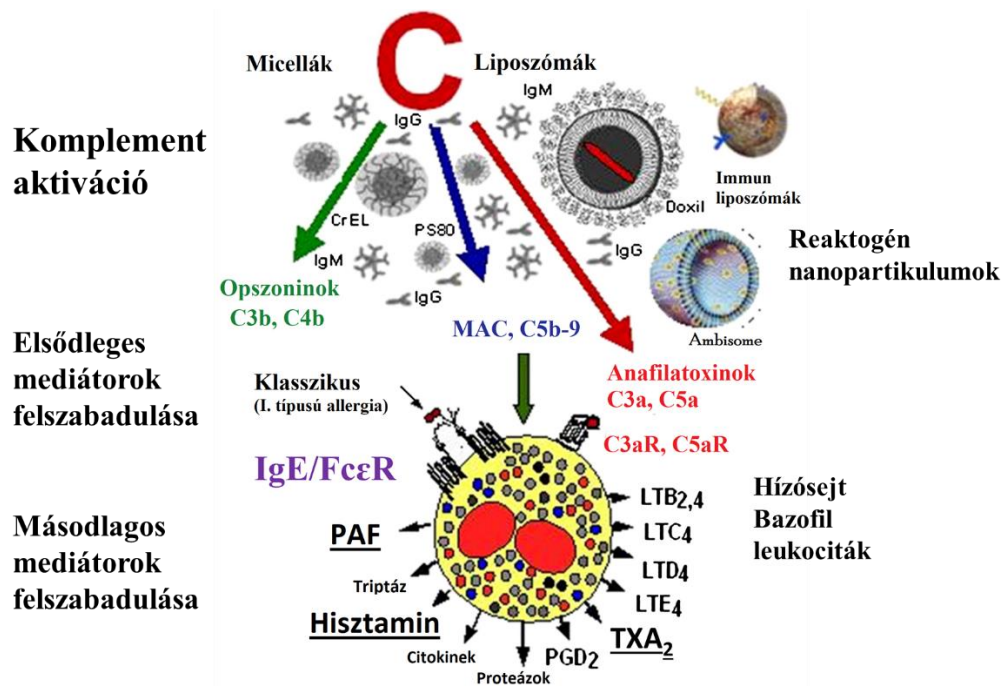
A 4. ábra a CARPA alapjául szolgáló sejt és molekuláris kölcsönhatások kaszkádját szemlélteti. A komplement aktiváció többek között a C3a, C5a és C5b-9 felszabadulásához vezet, amely a hízósejteket, a bazofil granulocitákat és más fagocitáló sejteket specifikus receptoraikon keresztül kiváltja a vasoaktív mediátorok szekrécióját, amelyeket allergomedineknek nevezünk.

Ezen közvetítők némelyike (pl. hisztamin és triptáz) az aktiválás után azonnal felszabadul a sejten belüli raktárakból, míg más mediátorok de novo szintetizálódnak, és így fokozatosan szabadulnak fel. Ez a differenciálódás, az allergomedinek anafilatoxin-reszponzív sejtekből történő többlépcsős felszabadulása magyarázhatja a klinikai tünetek kezdetének egyéni változását. Pontosabban, a H1 receptorok aktiválása gyorsan deszenzitivizáló vazokonstrikciónak és a kapilláris permeabilitás fokozódásához vezet, és felelős az anafilaxia szív és érrendszeri, valamint bőr tüneteierért (44, 39). A H2 receptorok növelik a sejtek cAMP szintjét, és vazodilatációt, megnövekedett pulzusszámot és pulzusnyomást okoznak. A HSR tünetek fajok közötti különbségének másik potenciálisan fontos tényezője az allergomedin szekretáló sejtek száma és tulajdonságai az egyes szervezetben, elsősorban a pulmonális intravaszkuláris makrofágok (PIM) sejtek száma. A pulmonális hipertenzió kialakulását a nagy számú PIM sejt tromboxán felszabadításával magyarázzák sertésben, míg emberben és rágcsálókban kevés PIM sejt található a tüdőben (39).

Ezen túlmenően többnyire rövid hatású mediátorok, hosszanható hatású interleukinek és citokinek is hozzájárulhatnak a tünetekhez. Például a CARPA során fellépő hidegrázás és láz általában a makrofágok által történő TNF termeléshez és a megnövekedett IL-1 monocita expresszióhoz kapcsolódik. A megnövekedett IL-6 felszabadulás szintén a C aktiválás ismert hosszú távú következménye (45, 46).

Az anafilatoxinoktól eltérően a pszeudoallergiát kiváltó lehetséges okokat tekintve a nanorészecskéknek a Toll-szerű receptorokhoz (Toll like receptors, TLRs) vagy más mintázatfelismerő receptorokhoz (pattern recognition receptors, PRR) való közvetlen kötődését feltételezhetjük a hízósejteken és a makrofágokon.

Ismert, hogy a TLR vagy más PRR felismeri a kórokozók felszínén található molekuláris jellemzőket, az úgynevezett kórokozóval kapcsolatos molekuláris mintázatot (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), és így keresztreakció jöhet létre a nanogyógyszerek és nanodiagnosztikumok PAMP-re hasonlító felszíni elemeivel. Ezek a "pszeudo-PAMP-ek" is részt vehetnek a C aktiválásban, ezáltal pszeudoallergiát válthatnak ki. Jelenleg azonban csak feltételezés a pszeudo-PAMP koncepció, mert nem bizonyított, hogy a nanorészecskék felületén található mintázatokhoz kötődnek a TLR/PRR-ek, és az anafilatoxinokkal kooperálva pszeudoallergiát indukálnak.



4. ábra. A CARPA patomechanizmusa. Reprodukálva (17).

2.5 A túlérzékenységi reakció, pszeudoallergia, és CARPA ill. CIPA fogalmáról

A liposzómás készítményekkel kezelt betegek egy részénél a CARPA az első kezelés során jelentkezik, azonban lehetnek kivételek, így előfordulnak olyan esetek, amikor a reakció a második vagy harmadik kezelés során jelentkezik. Mivel a CARPA egyértelműen túlérzékenységi reakció, vagyis már az első kezeléskor megfigyelhető, sőt

az első alkalommal a legsúlyosabbak a tünetek, ezért a második vagy harmadik kezelés során jelentkező mellékhatások már egyértelműen allergiás (és nem pszeudoallergiás) reakciók. Az ilyen helyzetekben nehéz felismerni, hogy az allergiás reakciót a nanogyószert melyik komponense okozza, de ismert néhány olyan immunglobulin (IgG és / vagy IgM) válasz, amit korábbi expozíciók hatására jön létre. Az egyik lehetőség, hogy a liposzómás készítmények előállításához használt polietilén-glikol (PEG) képes súlyos allergiás reakciót okozni, így azok az ilyen szerkezetű liposzómák használata során mind allergiás mind pszeudoallergiás (CARPA) reakció létrejöhet.

Azt is érdemes megjegyezni, hogy a liposzómával indukált CARPA a legtöbb esetben nem jelezhető előre az embereken végzett szokásos allergiavizsgálatokkal, amelyek magukban foglalják a bőr allergiai teszteket (prick-teszt, intradermális teszt). A HSR-t mutató betegek százalékos aránya jelentősen függ a beadott nanodrug fizikai-kémiai jellemzőitől. Liposzómás amfotericin B készítmények esetében a betegek 20%-a mellkasi fájdalmat, légzési nehézséget és a hipoxiát, súlyos hasi, alhasi vagy lábfájdalmat, kipirulást és csalánkiütést produkál (47).

A sertéseken és saját, egereken végzett legújabb vizsgálatok azonban (48) felvetették a C független mechanizmusok lehetőségét is, amelyet C független pszeudoallergia (CIPA) néven említenek. Jelenleg nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a C aktiválás nyilvánvaló hiánya ezekben az esetekben mérési vagy kísérlettervezési hiba, például az alacsony érzékenység és/vagy a nem megfelelő vizsgálati és/vagy helytelen mintavételi időpontok miatt csak látszólagos eredmény, és valójában C aktiválás jelen volt, csak nem észlelték (45).

Ennek felismerése után született a "double hit theory" kifejezés, ami arra utal, hogy a HSR mechanizmusát mind CARPA mind CIPA magyarázhatja, és relatív hozzájárulásuk eltérő lehet a különböző fajokban (48) és a különböző kísérleti körülmények között (32, 49).

2.6 A C3a és C5a komplement jelentőségének állatkísérletes vizsgálata

A C5a desArg-kezelés csökkentette az átlagos artériás középnyomást, a polimorfonukleáris (PMM) sejteket és a trombocitaszámot, de a hematokritot nem befolyásolta patkányokban (5 µg/patkány). A C5a desArg a C5a proteolitikus hasítása következtében létrejövő „inaktív”, de biológiai hatással rendelkező peptid (pl. kontrakció,

vaszkuláris permeabilitást, hisztamin felszabadulást fokozó, stb.), amely okozhat anafilaxiát, de ez a C5a-val okozott anafilaxiánál gyengébb (50). Az rhC5a (rekombináns humán C5a) alkalmazása szinte azonnali, 2 óránál hosszabb hipotenziót váltott ki, és rövidebb ideig tartó, kevesebb, mint 30 perces PMN sejtszám esést eredményezett patkányokban (51). Ezzel szemben a rhC3a kezelés gyors, dózisfüggő magas vérnyomást okozott, amely legfeljebb 5 percig tartott. A hipertenziós hatást karboxipeptidáz N-inhibitor előkezelés elősegítette, de az indometacin megszüntette. Az rhC3a alkalmazása után körülbelül 90 perces késéssel a PMN sejtszám emelkedett alacsony dózisban, míg nagy dózisban hasonlóan emelkedett a PMN sejtszám, de azt megelőzőt egy körülbelül 60 percig tartó kismértékű neutropénia, de ez a korai válasz nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. A karboxipeptidáz N gátlóval történő előkezelés megszüntette a PMN sejtek számának késleltetett növekedését, amelyet az rhC3a alacsony dózisa okozott, de korai és kismértékű neutropéniát váltott ki, amely hasonló volt az rhC3a nagy dóziséval kiváltotthoz (51). A két rövid C5a agonista peptid származékok egyike kötődött a C5aR-hez mind a PMN-en, mind a makrofágokon, míg a másiknak csak a makrofág C5aR-hoz volt affinitása. Mindkét C5a agonista származék csökkentette az altatott patkányok vérnyomását, míg neutropéniát csak a granulocita C5aR affinitású agonista okozott (52).

Ezek az eredmények betekintést nyújtanak a C aktiválás különböző hatásainak mechanizmusába, és felvetik a CARPA különböző következményeinek szelektív megváltoztatásának lehetőségét. Csak néhány tanulmány foglalkozott a C hatásával a tüdő érrendszerében patkányokban. Fontos megfigyelés, hogy a C3a (C3a57-77) 21 karboxi-terminális peptid infúziója azonnali vazokonstriktiót okozott az izolált, pufferrel perfundált patkánytüdő ereiben, ami mintegy 10 percig tartott. Ezzel párhuzamosan nőtt a tüdőből kifolyó TXB₂ koncentrációja, ami közvetlenül felelős a tüdő ereinek vazokonstriktiójáért, mivel mind az indometacin, mind a CGS 13080 és U63,357 tromboxán szintesztáz inhibitorok gátolták a pulmonális artériás nyomás választ (53).

Ezek az eredmények felhívják a figyelmet arra a lehetőségre, hogy a patkány tüdő a CARPA közvetlen célszerve lehet a PIM sejtek hiánya ellenére is. A PIM sejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak abban, hogy a tüdő az elsődlegesen reagáló szerv a rendkívül CARPA érzékeny sertésekben (43).

2.7 Problémafelvetés

Az ma még nem ismert, hogy a HSR (vagy CARPA) során létrejövő hemodinamikai változásokban van-e szerepe az anafilatoxin (AT) receptorok stimulációjának emberben. A C3aR és C5aR receptorokról tudjuk, hogy befolyásolhatják a vérnyomást (54, 55, 51). Több rágcsálófajban egyértelműen kimutatták, hogy a C5aR aktiválás csökkenti a vérnyomást, és a C5aR gátlása képes a CVF kezeléssel kiváltott C aktiváció hatására kialakuló hipotenziót kivédeni patkányban (54, 56). Ez utóbbi megfigyelés alapján kijelenthető, hogy a C aktiváció során kialakuló vérnyomás változást a C5aR aktiváció túlsúlya jellemzi. A C3aR stimulálása éppen ellenkezőleg, hipertenziót válthat ki (54, 56). Arra vonatkozóan nincsenek klinikai adatok, hogy a humán HSR alatt fokozódik-e a plazma anafilatoxin vagy MAC koncentráció. Ugyanakkor egy munkacsoport kimutatta, hogy az IgE függő anafilaxia során kismértékű C aktiváció mutatható ki gyermekekben (57).

A tézisem alapját képezi az egereken végzett tanulmány, amelyben az AmBisome és az Abelcet, két klinikailag alkalmazott amfotericin B-t tartalmazó liposzóma készítményt vizsgáltuk. Ezekről ismert, hogy embereken CARPA jellegű tüneteket okoznak viszonylag magas százalékban (>10%) (58-62). Az előkísérletek jól mutatták, hogy a vizsgált anyagok hemodinamikai változásokat produkálnak egereken. Ezeket a változásokat korábban már vizsgálták emberben (63, 64), sertésben (65-70), minisertésben (71) és patkányban (43), de egérben nem, annak ellenére, hogy ma már ezt a fajt használják leggyakrabban immunológiai, genetikai és élettani/kóréletteni vizsgálatokban. Pozitív kontrollként a C rendszer ismert aktivátorait alkalmaztuk, zymosant és CVF-t. Mivel az AmBisome és az Abelcet liposzóma struktúrák lényegesen különböznek (kis, unilamelláris liposzómákból és nagy multimikron méretű szalagszerű lipid komplexek) (72, 73), kísérletünk azzal a kérdéssel is foglalkozott, hogy vajon a liposzómák mérete hatással van a hemodinamikai és egyéb változásokra. Továbbá, teszteltünk magas koleszterintartalmú (71%) multilamelláris liposzómákat (HC-MLV), mivel ezek a liposzómák súlyos hemodinamikai változásokat indukálnak patkányban (74) és sertésben (70).

A tézis kitér a CARPA egy standardizált állatkísérlet kifejlesztésének lehetőségére is, amikor a patkányok reakcióit bemutatom, mert a liposzómák jelentős hemodinamikai, hematológiai és biokémiai változásokat okoznak, és ezek a reakciók használhatóak

lehetnek a CARPA előre jelzésére a nanokészítmények fejlesztése során. A sertések liposzómás CARPA-ra való nagy érzékenységet, és ezáltal az állat CARPA-modellként való használatának részleteit és előnyeit korábbi tanulmányok (65-67, 75, 68, 69) alátámasztják. A liposzómák patkányokban megfigyelhető főbb élettani/kórélettani hatását korábban leírták, azonban ezt a fajt nem tekintették a nano-gyógyszerekkel okozott túlérzékenységi reakciók standardizálható állatmodelljének. Ennek fő oka az volt, hogy a 1990-es évek elejétől végzett vizsgálatok középpontjában a hemoglobin tartalmú liposzómák káros hatásai álltak, mert vérpótló készítményt akartak előállítani. (19, 76-78, 21, 22, 79, 80, 23) A patkányok immuntotoxicitási tesztként való alkalmazására később irányult a figyelem, elsősorban azért, mert az időközben klinikára bevezetett liposzómás készítmények HSR-i miatt a hatóságok előírták a fejlesztés alatt álló nanokészítmények ellenőrzését (40).

A patkánykísérletek során fontos kérdés volt, hogy a klinikumban használt liposzómás készítmények okoznak-e CARPA-t. Arra is választ kerestünk, hogy a liposzómák felületi töltésének és a PEGiláció hogyan befolyásolja a reakciók erősségét. A felületi tulajdonságokat korábban a C aktiválás és a CARPA fő okozóinak tekintették a sertés vizsgálatokban (75). Sikeres patkány és egérvizsgálatokkal, amennyiben jól vizsgálható a CARPA, lehetővé válna egy olcsó és megbízható rágszálómodell, ezáltal felgyorsulhatnának a nanoformulált készítmények immunotoxicitás vizsgálatai.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A vizsgálatok fő célja a hiperszenzitivitási reakciót (HSR) okozó liposzómás készítmények mellékhatásainak elemzése patkányban és egérben, valamint a keringési hatás mechanizmusának feltárása egérben. Ezen belül elsősorban arra kerestünk választ, hogy a komplement (C) aktiváció, hozzájárul-e, és ha igen, milyen mértékben járul hozzá az egyes mellékhatások kialakulásához.

Patkányban:

1. A komplement aktivátor zymosan és kobra mérge faktor hasonló mellékhatásokat okoznak-e patkányban, mint a humán terápiában használt liposzómás készítmények és azok módosított változatai?
2. A liposzómás készítmények okoznak-e C aktivációt, és ha igen, milyen mértékű C aktivációt okoznak?
3. A liposzómás készítmények vérnyomáscsökkentő hatása és a C aktiváció mértéke között megfigyelhető-e összefüggés, korreláció?

Egérben:

4. A komplement aktivátor zymosan és kobra mérge faktor és a humán terápiában használt liposzómás készítmények és azok módosított változatai milyen mellékhatásokat okoznak egérben?
5. A liposzómás készítmények okoznak-e C aktivációt, és ha igen, milyen mértékű C aktivációt okoznak?
6. Az Abelcet egérben okozott vérnyomás hatása milyen mértékben függ a ciklooxygenáz-1 (COX-1) aktiválódásával járó reakciótermékektől, és a tromboxán prosztanoid receptor stimulálástól (amit korábban más fajokban már kimutattak)?
7. A C rendszer kimerítése és a C3a és C5a receptorok gátlása befolyásolja-e az Abelcet hatását a vérnyomásra?
8. A más fajokban kimutatott trombocitopénia és leukocitózis kimutatható-e egérben, és ha igen, a trombociták glikoprotein IIb/IIIa receptorainak gátlása és a granulociták kimerítése befolyásolja az Abelcet hatását a vérnyomásra?

Kísérleteink arra a kérdésre is választ keresnek, hogy a rágcsáló fajok alkalmasak-e a fejlesztés alatt álló nanogyógyszerekkel esetleg okozott HSR reakció előre jelzésére, ill. a HSR reakció mechanizmusának tesztelésére.

4. MÓDSZEREK

4.1 Egér vizsgálatok

4.1.1 Vizsgálati anyagok, liposzómák és ELISA kitek

A zymosant és a birka vörösvértest antitesteket (hemolizin) a Sigma-tól (St Louis, MO, USA) vásároltuk. Az AmBisome, az Abelcet és az eptifibatid (Iloprost), a trombocita glikoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor készítményeket pedig a Semmelweis Egyetem Egyetemi Gyógyszertárából szereztük be. A magas koleszterin koncentrációt tartalmazó liposzómákat (HC-MLV) egy korábban leírt módszert használva Mészáros Tamás kollégánk állította elő (74). Az egér C3a, ELISA kitet és CVF-et a TECOMedical-től szereztük be (Sissach, Svájc). A TXB₂ (a TXA₂ stabil metabolitja) ELISA kit a Cayman Chemical cégtől származik (Ann Arbor, MI, USA). A hirudinnal bevont vérvételi csöveket a Roche-tól (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az SB-290157 C3a receptor (C3aR) antagonistát és a DF2593A C5a receptor (C5aR) antagonistát a Merck Hungary Zrt-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A klodronát liposzómákat, a makrofágot lebontó készítményt a Liposoma BV (Amszterdam, Hollandia) szállította.

4.1.2 Kísélet során felhasznált állatok

Kültenyésztett (outbred) egér törzset használtunk, ami a „Naval Medical Research Institute”-ből származik (Crl: NMRI BR). Az 25–35 g tömegű hím egereket a Toxicoop Kft-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az egerek szabadon hozzáférhettek a táplálékhoz (Altromin 1328 Hybridpellet táp, Németország) és csapvízhez. A kísérleteket az egerek érkezése után legalább 1 hetes adaptáció után kezdtük meg. A COX-1 hiányos egereket saját tenyészetünkéből kaptuk, a törzstenyészetet Ingvar Bjarnason professzor (King's College Hospital, London, Egyesült Királyság) biztosította, és több, mint 10 alkalommal keresztezték őket vissza a C57Bl6/N egértörzsbe. A tromboxán prosztanoid receptor (TP) hiányos egerek Dr. Shuh Narumiya-tól (Kiotói Egyetem, Kiotó, Japán) származtak, és több, mint 10-szer keresztezték C57BL/6-ra (81). A COX-1 és TP hiányos genotípust ellenőriztük, mielőtt az egereket használtuk a kísérletekben.

4.1.3 Kísérleti protokoll

Az egereket pentobarbitállal (90 mg/kg, i.p.) altattuk, szükség esetén további kis adagokat adtunk be a kísérletek során. A jobb nyaki artériába és a bal oldali nyaki vénába PP10 kanült vezetünk a vérnyomás méréséhez, illetve az anyagbeadásához.

A vérnyomást BPR-02 nyomásérzékelővel (Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) mértük, és egy HG-01D vérnyomás erősítő (Experimetria Ltd.) valamint egy PowerLab adatgyűjtő rendszer (ADInstruments Ltd., Oxford, UK) segítségével folyamatosan regisztráltuk.

Egy asztali számítógépen a LabChart adatokat elemző szoftver felhasználásával, (ADInstruments Ltd.) az artériás középnyomást (MABP) és a szívfrekvenciát (HR) a monitorozott pulzáló vérnyomás görbéből származtattuk. A mérések egy 10 perces kontroll periódussal kezdődtek, majd a vizsgálati anyagokat 10 ml/kg térfogatban kb. 1 percen belül, lassú injekcióban adtuk be az egereknek.

Azokban a vizsgálatokban, amelyekben akut kezelést alkalmaztunk, a vizsgálati anyag beadása után 5 perces periódusban mértük az anyag hatását, majd az egereket liposzómás amfotericin B (Abelcet) készítménnyel kezeltük egy perc alatt a nyaki vénás katéteren keresztül, 30 mg/kg-os dózisban, 10 ml/kg térfogatban.

A vizsgálatok NMRI egereken történtek, azonban az Abelcet hatását COX-1 vagy TP génkiütött C57Bl/6N egerekben is vizsgáltuk.

A következő csoportokat tanulmányoztuk NMRI egereken:

A kontroll (n=6-6) csoportba tartozó egereket sóoldattal vagy az alkalmazott vizsgálati anyagok oldószerével kezeltük.

Néhány egérnek (n=5) az Abelcet-et kétszer adtuk be, a második kezelés 30 perc múlva követte az elsőt.

Az eptifibatidot (n=6) 3 mg/kg-os dózisban, 10 ml/kg térfogatban injektáltuk.

A fiziológiás sóoldattal hígított CVF-et (n=6) a farokvénába fecskendeztük be 30, illetve 100 U/kg dózisban, 10 ml/kg térfogatban, felületes izoflurán altatásban 18, illetve 2 órával a kísérlet előtt. (A két dózist – először a kisebbet, majd a nagyobbat - etikai megfontolásból alkalmaztuk, hogy az első kezelés kisebb mellékhatást okozzon, de sikerüljön teljes komplement kimerítést okozni. Az irodalomban leírt módszerek nem

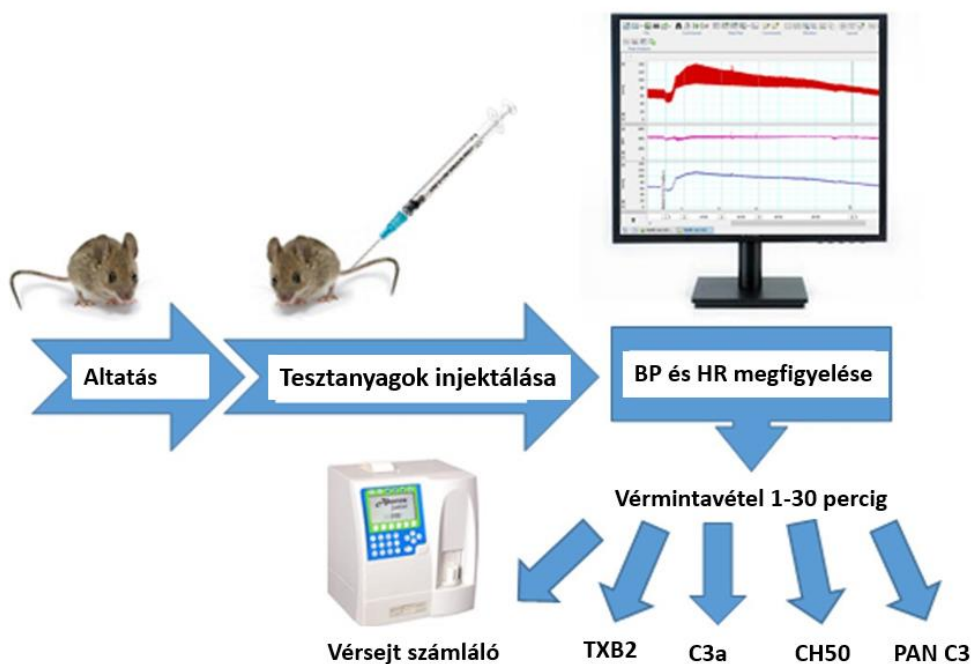
voltak megbízhatóan iránymutatóak, mert korábban rendkívül eltérő dózis és kezelési protokollokat közöltek.)

Az SB-290157-et (n=6) DMSO-ban (10 %) és fiziológiás sóoldatban oldott 10 mg/kg-os dózisban adtuk be.

A DF2593A-t (n=6) DMSO-ban (10 %) és sóoldatban oldott 10 mg/kg-os dózisban alkalmaztuk.

A klodronátos (n=5) vagy az üres liposzómákat (n=5) két nappal a kísérlet előtt 200 µl/egér (1 mg klodronátot tartalmazó) dózisban, felületes izoflurán altatásban a farokvénába injektáltuk. Az immunhisztokémiai ellenőrzés szerint ez az adag teljesen kimerítette az F4/80 pozitív sejteket a májból a két nappal a kezelés után [Kerkovits et al., munkacsoport kísérletei alapján].

További egér csoportokból vért vettünk a hematológiai és néhány laboratóriumi paraméter méréséhez. Az egereket (2-3%-os) izofluránnal narkotizáltuk, és a vizsgálati anyagokat a farokvénán keresztül juttattuk be. Az állatokat ezután lepirudinnal (Refludan, Aventis Pharma, 0,15 mg/g ip.) kezeltük a véralvadás megakadályozása érdekében. Mollnes és társai (82) és Cedrone és társai (83) korábban leírták, hogy a hirudin hasonló dózisa nem befolyásolja a C aktivációt. Az állatokat cervikális diszlokációval termináltuk, majd a vért a mellkasi üregben gyűjtöttük a véna cava átvágása után, az állat testsúlyától függően 300-500 µl mennyiségben. A mintavételezés 0. (kezelés előtt), 1, 3, 5, 10, 30 perccel (kezelés után) történt. A vizsgálat protokollját az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra: A vizsgálat sematikus vázlata. Rövidítések: BP, vérnyomás; HR, pulzus.

4.1.4 A plazma extravazáció mérése (kapilláris permeabilitás)

Az egereket izofluránnal narkotizáltuk, és a zymosant (30 mg/kg, 10 ml/kg) a farok vénán keresztül fecskendeztük be, majd 20 perccel később 100 µl Evans kék oldatot (100 mg/ml) adtunk be a retroorbitális sinus-on keresztül. 10 perccel később az állatokat cervikális diszlokációval termináltuk, a mellkast felnyitva és a vena cava-t átvágva, 10 ml ill. 0,5 ml hideg sóoldatot áramoltattunk a bal, ill. a jobb szívkamrákon keresztül. A pulmonális vértérfogat kimosásához a 0,5ml elegendő és javasolt a szakirodalom szerint, a nagyobb térfogat az Evans festéket is kimoshatja a tüdőből. A különböző szervekből vett mintákat lemértük, és ezután 0,5 ml formalin oldatban 48 órán keresztül szobahőmérsékleten extraháltuk a szövetekből az Evans kéket. A festék koncentrációját 96 lyukú mikroplate reader segítségével 620 nm hullámhosszon mértük.

4.1.5 Komplement assay

Az eger plazma C3a koncentrációt a TECO Medical eger C3a ELISA teszttel mértük. A teljes C fogyást módosított birka vörösvértest hemolitikus módszerrel (SRBC) mértük. A juh vörösvértest egy részét PBS-EDTA pufferrel (10 mM), illetve dextróz-zselatin-veronal oldattal (Veronal) kétszer mostuk. Ezután 3000 fordulat/perc

sebességgel centrifugáltuk 4 percig. A pelletet barbitonnal reszuszpendáltuk, majd a sejteket Eppendorf csövekbe osztottuk. Az érzékenyítés során α -Sheep RBC antitestet (1:500) adtunk azonos térfogatú vörösvértestekhez és 30 percig 37°C-on inkubáltuk, majd a mintákat kétszer mostuk Veronallal. C3 mentesített humán szérumot adtunk a kezelt plazmához (1:1,2). Tízszeres hígítású plazmát adtunk a pellethez és 10 percig 37°C-on inkubáltuk. Ismét centrifugáltuk (3000 fordulat/perc 4 perc), majd a felülúszót ezután egy 96 lyukú lemezre pipettáztuk. Pozitív kontrollként desztillált vizet, negatív kontrollként PBS-t és a vizsgált anyag megfelelő hígítását használtuk a hemolitikus vizsgálathoz. Az abszorbanciát mikroplate reader (FLUOstar Omega, BMG) készülékkel mértük 541 nm-en. Két párhuzamos mérést végeztünk (43).

4.1.6 Vérminták kezelése a különböző mérésekhez

A vérminták három különböző típusú csőben, a következőképpen gyűjtöttük:

Az SRBC vizsgálatokhoz a csövek 15 μ g Lepirudint (10 μ L) tartalmaztak,

A C3a és a véréjtek számlálásához K₃EDTA-t (MiniCollect®, Greiner Bio-One Hungary Kft, Budapest, Magyarország) tartalmaztak,

A TXB₂ teszthez pedig K₃EDTA-t és indometacint (10 μ g/cső, 5 μ L) tartalmazó csöveket használtunk.

4.1.7 Statisztikai feldolgozás

Minden bemutatott adat az átlagot \pm az átlag szórását mutatja (mean \pm SEM). Minden kezelt csoportot az oldószerrel kezelt kontroll csoporthoz hasonlítottuk. A hemodinamikai paramétereket a 10 perces kontroll periódus átlagának százalékában adtuk meg, és a két csoportot minden időpontban összehasonlítottuk két szempontos ismétléses ANOVA majd a Dunnett féle próba használatával. Ha a Brown-Forsythe teszt vagy a Bartlett-teszt szignifikánsan eltérést jelzett, akkor a statisztikai elemzést az adatok logaritmikus transzformációja után végeztük. A többi paraméter összehasonlítását egy szempontos ANOVA és Dunnett féle próba használatával végeztük. A statisztikai teszteket GraphPad Prism Windows nyolcas verziójával (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) végeztük, valamint az ábrák nagy része is ezzel a szoftverrel készült.

4.2 Patkány vizsgálatok

4.2.1 Vizsgálati anyagok

Kereskedelmi AmBisome-ot (Gilead, Astellas Pharma Inc., USA) és Doxil-t a Semmelweis Egyetem Egyetemi Gyógyszertárából szereztük be. Az AmBisome szója foszfatidil-kolinból (HSPC), koleszterin (Chol), disztearoil-foszfatidil-glicerín (DSPG), az alfa-tokoferol és dinátrium-szukcinát hexahidrátpufferből áll a következő tömegarányban: 50: 213: 52: 84: 0,64: 27.

A PEGilált liposzómák előállításához használt dipalmitoil-foszfatidil-kolin (DPPC) és a 1,2-disztearoil-foszfatidil-metil-polietilén-glikol konjugátum (2K-mPEG-DSPE) (Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA)), 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfatidil-etanol-amin (DSPE), koleszterin-2K és 5K-PEG konjugátumok (2K-PEGChol, 5K-PEGChol) a NOF Europe-tól (Grobbendonk, Belgium) és a Chol a Sigma-Aldrich-től (Hollandia) származnak.

Minden lipid gyógyszerészeti anyag >97%-os tisztaságú volt, és további tisztítás nélkül alkalmaztuk. A foszfát pufferolt sóoldatot (PBS) B. Braun cégtől (Melsungen, Németország) vásároltuk meg.

A zymosan a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, Mo) származik. Az egészséges önkéntes donoroktól származó humán szérummintákat egy intézmény által jóváhagyott flebotomia protokollon keresztül kaptuk, és -70 ° C-on tároltuk használatig. A kobraméreg faktor (CVF) a Quidel Co-tól (San Diego, CA, USA) származik.

4.2.2 A patkánykísérleteknél készült liposzómák karakterisztikája és elkészítésük

A liposzómák film extrudálási módszerrel készítettük, amint azt korábban leírtuk. (43, 84) A lipideket az 1. táblázatban leírt arányban etanolban oldottuk fel, és 70°C-on rotációs párologtatás következtében vékony film jött létre. A fóliát PBS-ben hidratálták, és az ebből eredő durva diszperzió méretét több extrudálással, 100 nm pórusméretű polikarbonát szűrőmembránokon keresztül csökkentettük. A liposzómák méretét és méreteloszlását (polidispersity index, PDI) dinamikus fényszórással (DLS) határoztuk meg egy Malvern ALV CGS-3 rendszerrel (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Egyesült Királyság), 90°-os szórási szögben, 25°C-on. A mintákat a mérés előtt 200-szorosra hígítottuk PBS-ben. A liposzómás készítmények zétapotenciálját Laser Doppler Micro-Electrophoresis segítségével, Zetasizer Nano-Z

(Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) segítségével mértük. A mintákat 1:100-ra hígítottuk 10 mM HEPES pufferben.

4.2.3 Kísérlet során felhasznált állatok

A 350–450g súlyú hím Wistar patkányokat a Toxicoop Zrt-től vásároltuk. (Budapest, Magyarország). Az állatokat szabályozott hőmérsékletű és páratartalmú helyiségben tartottuk, ahol szabadon hozzáférhettek a standard rágcsáló táphoz (Altromin standard rágcsáló étrend, GmbH & Co. KG, Lage, Németország) és csapvízhez. Az állatkezeceket egy 12óra/12óra fény/sötét ciklusban megvilágított szobában tartottuk, ezen a helyen a hőmérséklet 21–24°C között, és a relatív páratartalom 40–60% között volt. Az állatok beérkezése után legalább egy hetes adaptáció időszakot hagytunk a kísérletek megkezdése előtt.

4.2.4 Kísérleti protokoll

A patkányokat tiobarbitál-nátriummal (120 mg/kg Inaktin, Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) altattuk. A légzés megkönnyítése érdekében PE csövet (OD 3,0 mm) helyeztünk a légcsőbe, és a patkányok spontán lélegeztek. A bal nyaki artériát, a bal femoralis artériát és a vénát PE-90 és PE-50 csővel kanuláltuk. A műtétet követően 30 perces pihenőidőt hagytunk, mielőtt a vizsgálati anyagot (liposzómákat vagy C aktivátorokat) bolusokban (injekció <60s) injektáltuk a bal comb vénán keresztül. A befecskendezett vizsgálati anyag mennyiségét mg PL/kg-ban (PL-phospholipid) adtuk meg, hacsak másképp nem jeleztük.

Az artériás vérnyomás mérése a femorális artérián keresztül történt, az egérkísérletben leírt módszerrel. A vérnyomás monitorozása mellett, Eppendorf csövekben körülbelül 0,5 ml-es vérmintákat gyűjtöttünk a bal nyaki artérián keresztül, egyet a kezelés előtt (0. idő), valamint a tesztanyag bejuttatása után a következő időpontokban: 1, 3, 5, 10 és 30 perc. Az ELISA mérésekhez a vérmintákat centrifugáltuk (1500 rpm, 10 perc, 4 °C) és a plazmát -80°C-on tároltuk.

4.2.5 Analitikai eljárások

A PAN-C3 vizsgálatához 1,5 mL Eppendorf csövet használtunk, amely 15 µg hirudint (10 µL) tartalmazott

A TXB₂ vizsgálathoz K₃EDTA csöveket használtunk (MiniCollect®, Greiner Bio-One Hungary Kft, Budapest, Magyarország), amely indometacint tartalmazott (10 µg/cső, 5µL).

A plazma C3 koncentrációt MicroVue Pan-specific C3 reagens készlettel (Quidel, San Diego, CA, USA), és a C3 fogyasztást százalékos változásként számítottuk ki a 0 perces kontroll mintához képest.

A tromboxán B₂ koncentrációt (TXB₂) ELISA-val (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) mértük.

A vörsejtek számát Abacus hematológiai automatával mértük (Diatron MI Co, Budapest, Magyarország).

4.2.6 Statisztikai elemzés

Minden bemutatott adat az átlagot ± az átlag szórását mutatja (mean±SEM). Az SAP, a HR, a WBC és a PLT, valamint a CH50 és TXB₂ értékek változásait a 0 időpontban mért értékekhez viszonyítva ismétléses ANOVA és Tukey-féle post hoc teszttel hasonlítottuk össze. Két csoportot azonos időpontban kétszemponos ismétléses ANOVA és Dunnett-féle többszörös összehasonlító teszttel hasonlítottunk össze. A MABP és a C3 fogyasztás közötti lineáris korrelációt a Pearson-korrelációs koefficiens segítségével számítottuk ki. A p <0,05 értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzést GraphPad Prism nyolcas verzió (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) segítségével végeztük.

4.3 Etikai jóváhagyás

Minden eljárást a National Institutes of Health (USA) és az állatgondozásról és állatvédelemről szóló magyar törvények által meghatározott szabályok szerint hajtottuk végre. A protokollt a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága és a Pest Megyei Kormányhivatal (nyilvántartási szám: PEI-001/3948-6/2014) hagyta jóvá.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Egér eredmények

5.1.1 A liposzómák alapvető jellemzői

Az 1. táblázat néhány fontos információt tartalmaz a vizsgálatok során felhasznált liposzómákról. A liposzómák a klinikai gyakorlatban vagy különböző állatmodellekben elsősorban sertésen megismert CARPA aktivitásuk alapján kerültek kiválasztásra.

1. táblázat: A liposzómák alapvető karakterisztikája

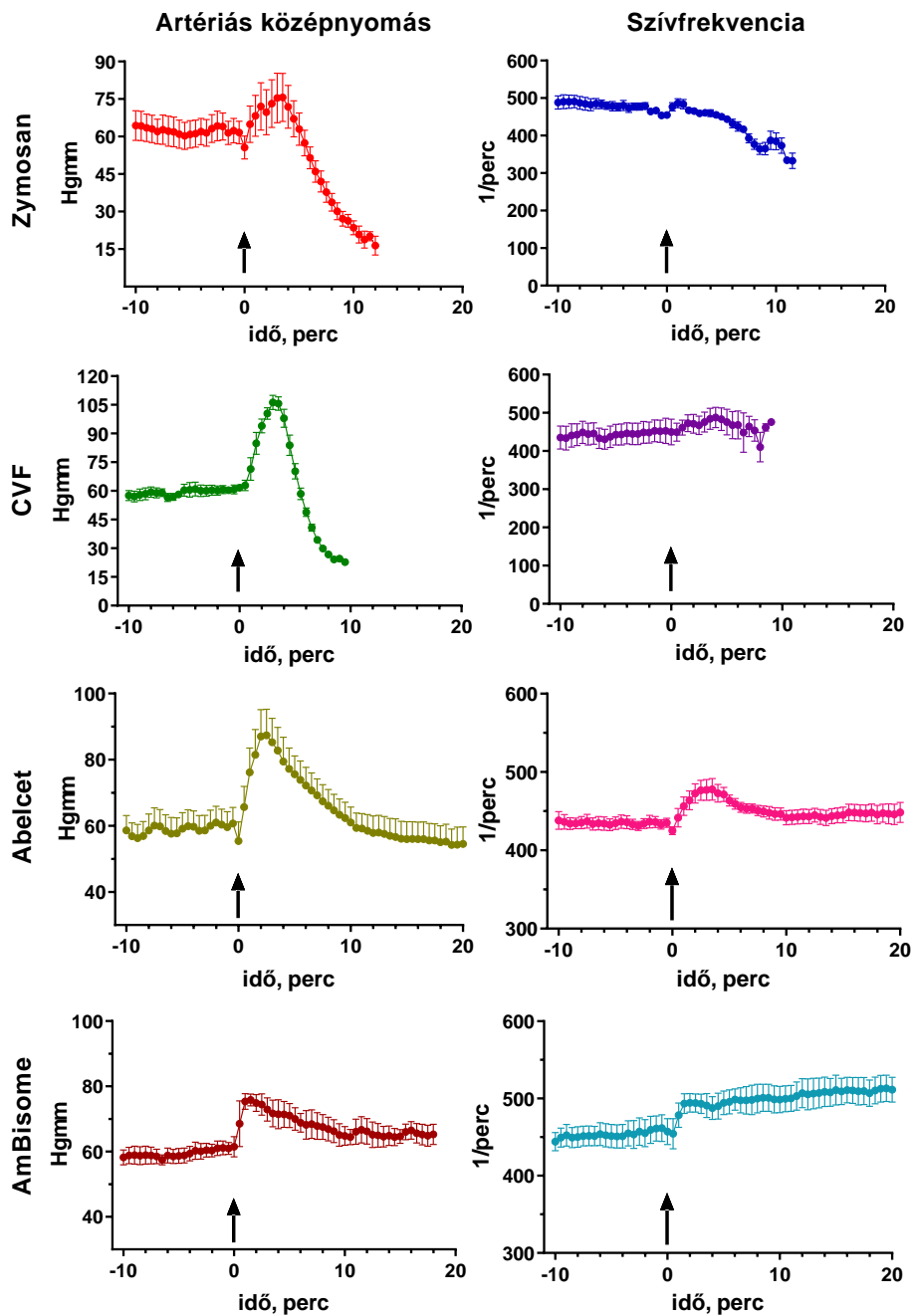
Rövidítések: αT , α -tokoferol; Chol, koleszterin; DSPG, disztearoil-foszfatidilglicerol; HC, magas koleszterinszint; HSPC, hidrogénezett szója-foszfatidilkolin; MLV, multilamelláris vezikulumok; SUV, kis, unilamelláris vezikulumok; DMPC, 1α -dimirisztoilfoszfatidil-kolin; DMPG, 1α -dimirisztoil-foszfatidilglicerol.

Név	Aktív hatóanyag	Lipidek	Alak és névleges méret	Eredet	Hivatkozások
AmBisome	Amfotericin B	HSPC, Chol, DSPG, αT	Gömb alakú SUV, <100 nm	Gileád, USA	1, 2
Abelcet	Amfotericin B	DMPC, DMPG	szalagszerű komplexek 10 > μm	Leadiant Biosciences, Inc., MD, USA	30, 31
HC-MLV	PBS	HSPC, Chol, DSPG	0.8–10 μm MLV	saját készítésű	32

5.1.2 A C aktivátorok és liposzómák hemodinamikai hatásai

Előzetes egér vizsgálatok során meghatároztuk azt a dózist, amelyik jelentős, statisztikailag is értékelhető változásokat eredményeztek az MABP-ben (az adatokat nem mutatjuk). A kezdetben kis dózisu vizsgálatok arra is rávilágítottak, hogy a hatástalan liposzómák beadásához használt 10 mL/kg-os fiziológiás sóoldat nem befolyásolta a vérnyomást, vagyis a vér és extracelluláris térfogat növekedése nem hatott az egerek vérnyomására (ezeket az eredményeket nem szemléltetem). A fenti ok miatt nem használtunk időkontroll csoportot, szemben a patkány vizsgálatokkal, ahol a vérvételek kismértékű vérnyomás csökkenést okoztak.

A liposzómás készítmények esetében a dózis 30–300 mg foszfolipid / testsúly kg volt, ami változó mértékben, minden esetben magasabb volt, mint ami a CARPA kiváltásához szükséges dózis a sertéseknél (~ 0,5 mg/kg). A C aktivátor pozitív kontroll és a liposzómás készítmények beadására kapott MABP és HR változásokat a ábra mutatja. A zymosan és a CVF, valamint a liposzómás amfotericin B készítmények, az Abelcet és az AmBisome lényegében hasonló mértékű, rövid ideig tartó hipertenziót váltott ki.



6. ábra: A komplement aktivátorok és liposzómák által okozott hemodinamikai változások hím NMRI egerekben (n = 5–6).

Megjegyzés: Zymosan (30 mg/kg), CVF 100 U/kg), Abelcet (30 mg/kg) és AmBisome (300 mg/kg) i.v. bolus injekcióban volt beadva a nyilakkal jelzett időpontokban.

Rövidítések: CVF, kobraméreg faktor; NMRI, Naval Medical Research Institute.

A MABP emelkedése a kezelés után ~1 percnél kezdődött, 2–4 percnél tetőzött, és a kezelés után 10–15 percen belül fokozatosan visszatért a kiindulási értékre. Azonban egy jelentős különbséget tapasztaltunk a hemodinamikai hatásokban a C aktivátorok (zymosan és CVF) és a liposzómák (Abelcet és AmBisome) között. Míg az MABP görbe a hipertenziós fázis után normalizálódott, ha liposzómás amfotericin B készítményeket adtunk be, a pozitív kontrollokkal végzett kezelést követően hipotenzív sokkos állapot jött létre. A 300 mg/kg iv. dózisú HC-MLV kevésbé emelte a MABP-t (az adatokat nem mutatjuk). Az egyes liposzómákkal ill. a pozitív kontroll anyagokkal okozott HR változások különbözőek voltak, de nem tapasztaltunk jelentős HR hatásokat. A zymosan esetén fokozatos csökkenés, AmBisome esetén pedig fokozatos emelkedés volt tapasztalható.

Összességében ezek az adatok megerősítik, hogy mind az ismert C aktivátorok (zymosan és CVF), mind a liposzómás amfotericin B készítmények (AmBisome és Abelcet) befolyásolják a vérnyomást altatott egerekben, amit más fajokban a CARPA-ra jellemző tünetként értékeltünk.

5.1.3 Hematológiai és plazma koncentráció változások a C aktivátorok és a liposzómák hatására egerekben

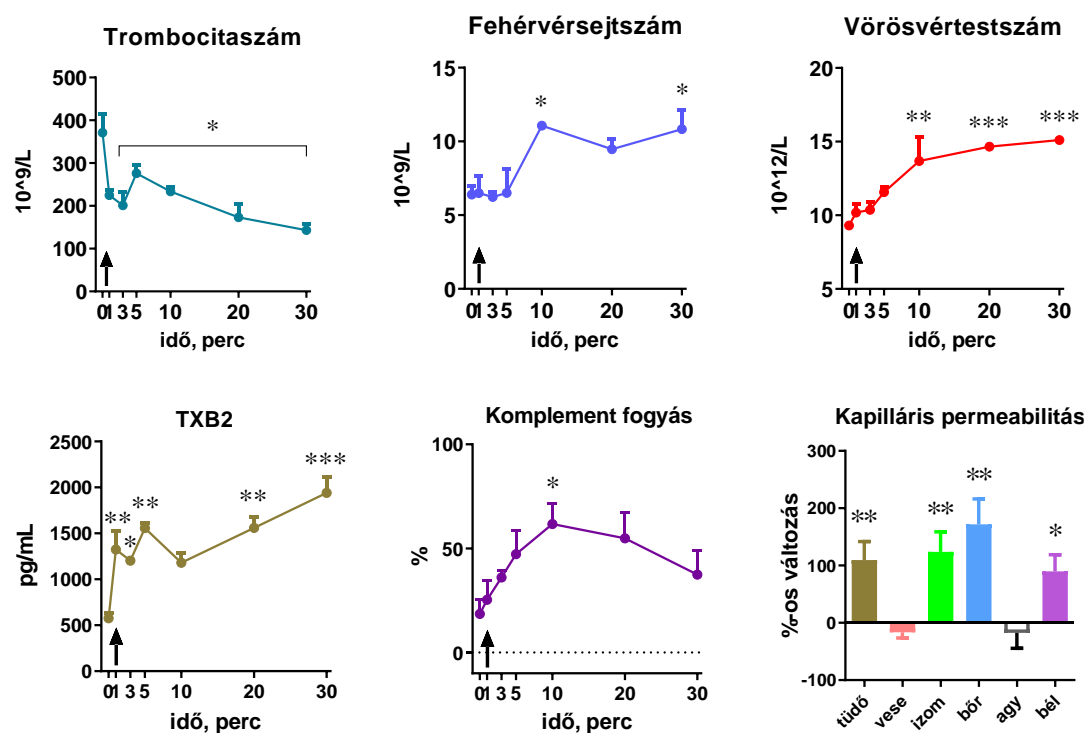
A sertésekben és patkányokban a hemodinamikai változások mellett a CARPA tünetek jellemzői a trombociták és fehérvérsejtek számának és az immunrendszer humorális és celluláris stimulációt jelző markereinek változása a plazmában (C aktivációs markerek, TXA₂) (43, 70).

Ezért ezeket a változásokat vizsgáltuk a C aktivátorral és a liposzómákkal kezelt egerekben is. A plazma TXA₂ változását a stabil metabolitjának, a TXB₂ plazma koncentrációjának a mérésével értékeltük (85).

A 7. ábra mutatja, hogy az azonos dózisú (30 mg/kg) zymosan kezelés után 2-3 percen belül a MABP emelkedés (6. ábra) mellett jelentős trombocitopénia, leukocitózis, eritrocitózis, TXB₂ felszabadulás és C fogyás figyelhető meg, amelyek a CARPA-ra

jellemző tünetek. A vörösvértestszám fokozatos, nagymértékű emelkedése részben a hemokoncentrációnak volt köszönhető, amiről ismert, hogy az anafilatoxinok által kiváltott kapilláris permeabilitás növekedés és plazma extravazáció következménye is lehet, ami a C aktiválás közvetett bizonyítéka. A hemokoncentráció mértéke azonban felveti annak a gyanúját, hogy a vérvétel során tapasztalt rendkívül gyors véralvadás miatt a százalékos változás nagyobb, mint a plazma extravazáció következtében kialakuló tényleges emelkedés.

A zymosan kezelés plazma extravazációt okozott a tüdőben, lábikraizomban, a bőrben és a vékonybélben, amit a beadás után 30 perccel mértünk (7. ábra).

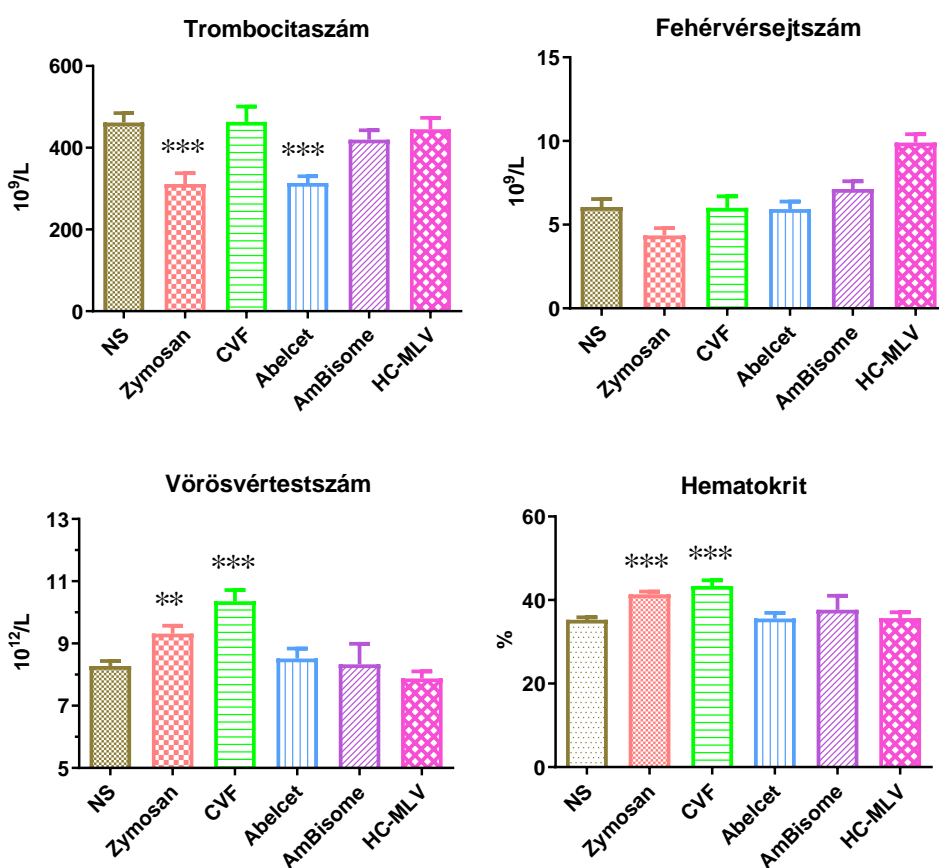


7. ábra: Időfüggő hematológiai változások zymosan kezelés hatására egerekben

(Trombocita, Fehérvérsejt, Vörösvértestszám), TXB₂ koncentráció, komplement fogyasztás. Az Evans kék plazma extravazációja (kapilláris permeabilitás) a kezelés után hím NMRI egerek különböző szerveiben a kontroll csoportban kapott értékek százalékában kifejezve. Megjegyzések: a nyíl a kezelés idejét jelzi. Az egerek száma n=3–5 az egyes időpontokban. A komplement fogyasztást módosított birka vörösvértest hemolitikus módszerrel értékeltük. A plazma extravazációs teszt során állatok száma mindkét csoportban tizenegy volt. A statisztikailag szignifikáns különbségeket (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001) a 0 időponthoz, ill. az extravazáció esetén az oldószerrel (fiziológiás sóoldat) kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva mutatjuk.

Rövidítések: NMRI, Naval Medical Research Institute; TXB_2 , tromboxán B_2 koncentráció.

A 8. ábra a vérsejt változásokat mutatja az egyes vizsgálati anyagok beadása után 3-5 perccel. Annak ellenére, hogy a C aktivátorok és a liposzómás amfotericin B készítmények egységesen hipertenziót okoztak, (6. ábra) trombocitopénia csak zymosan és Abelcet kezelés után látható (8. ábra), míg eritrocitózist és hematokrit emelkedést csak a zymosan és a CVF kezelés után figyeltünk meg. A HC-MLV zavarta a fehérvérsejtszám kimutatást, ezért ezt az eredményt nem értékeljük (74).



8. ábra: A C aktivátorok és liposzómák hematológiai hatásai.

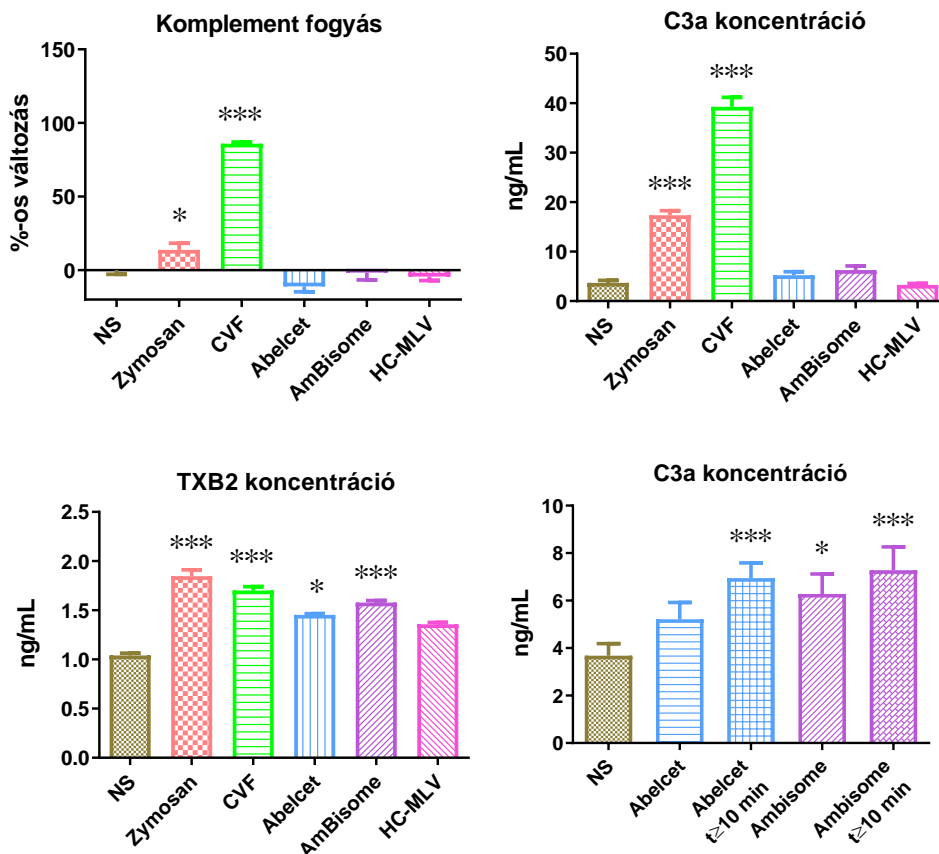
Megjegyzések: a vérlemezkék, a fehérvérsejtszám, a vörösvértest-szám és a hematokrit változásait mutatja a C aktivátorok és a liposzómák beadása után 3-5 perccel ($n=8-11/csoport$). Jelentős különbségek (** $P<0,01$; *** $P<0,001$) a sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva. A HC-MLV zavarta a fehérvérsejtszám mérését, ezért ezek az adatokat nem értékeltük.

Rövidítések: CVF, kobraméreg faktor; HC-MLV, magas koleszterinszint multilamelláris vezikulumok.

A 9. ábra a különböző kezelések C aktivációs markerekre gyakorolt hatását mutatja be 3-5 perccel az injekció beadása után. Ahogy az várható volt, a két C aktivátor, a zymosan és a CVF nagymértékű komplement fogyást és jelentős plazma C3a koncentráció emelkedést okozott, ami nagyarányú C aktiválást igazol. Érdekes módon a zymosan és a CVF által okozott relatív változások különböznek ezekben a vizsgálatokban, ami arra utal, hogy a CVF lényegesen hatékonyabb, mint a zymosan. A kezelés után 3-5 perccel a liposzómák nem okoztak szignifikáns C aktivációt. Ennek részben a korai mérés időpont lehetett az oka, ezért az Abelcet és AmBisome hatását a kezelés után 10-30 perccel is megmértük. A kezelést követő 10. perctől vagy annál későbbi mintavételnél a C3a koncentráció szignifikánsan emelkedett, tehát az eredmény C aktiválást mutatott AmBisome és Abelcet esetében is (9. ábra). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a liposzómák *in vivo* is aktiválhatják az egér C-et; ez az aktiváció azonban gyenge, és az anafilatoxin koncentráció lassabban emelkedik, mint a TXA₂ koncentráció és a szisztémás hipertenzió.

A plazma TXB₂ koncentrációk (9. ábra) jelentősen emelkedtek a C aktivátorok és a liposzómák beadását követően 3-5 perccel (kivéve a HC-MLV). Így a korai TXB₂ felszabadulása a liposzómák hipertenzív hatására adhat magyarázatot.

Az egerek vérében az anafilatoxin termelés hiánya AmBisome és Abelcet kezelést követően 3-5 perccel ellentmond az erős C aktivációnak.

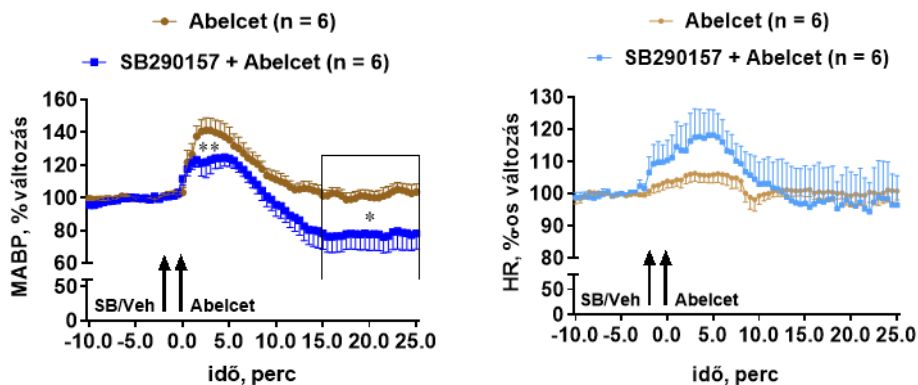


9. ábra A C3 aktivátorok és a liposzómák hatása a komplement aktivációt jelző biomarkerekre és a TXB₂ plazma koncentrációra. A C3 fogyasztó módosított birka vörösvérsejt-hemolitikus teszttel, a plazma C3a koncentrációját egér specifikus ELISA-val mértük. A jobb felső grafikonon a kezelés után 3-5 perccel, a jobb alsó grafikonon a kezelés után 10-30 perccel gyűjtött plazma minták C3a koncentrációját mutatják (n=3–5/csoport). A plazma TXB₂ koncentrációját ELISA kittel mértük; a vizsgált egerek száma n=8–11 minden mérésnél. Statisztikailag szignifikáns különbségek (*P<0,05; ***P<0,001) a sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva (NS).

Rövidítések: CVF, kobraméreg faktor; HC-MLV, magas koleszterinszintet tartalmazó multilamelláris vezikulumok; TXB₂, tromboxán B₂ szint;

5.1.4 C3aR antagonisták hatása Abelcettel kiváltott hipertenzióra

Az egereket SB-290157-tel, egy C3aR antagonisták vegyülettel előkezeltük, hogy vizsgáljuk a C3a anafilatoxin szerepét az Abelcettel okozott vérnyomás emelkedésben.



10. ábra: Az SB-290157 (SB, 10 mg/kg i.v.) előkezelés hatása az Abelcettel okozott vérnyomás és HR változásokra. A kontroll csoportot oldószerrel (Veh, 5% DMSO sóoldatban) kezeltük és utána 5 perccel adtuk be az Abelcetet (30 mg/kg-os i.v.). Az első nyíl az oldószer ill. SB-290157 beadásának időpontját (SB/Veh), a második nyíl az Abelcet beadásának időpontját mutatja.

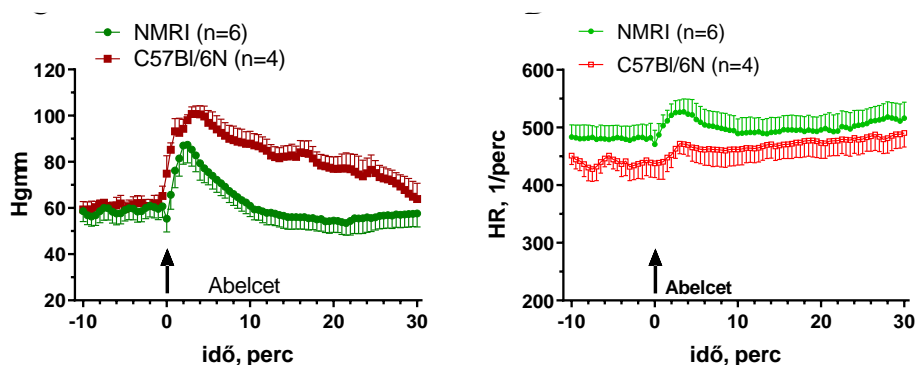
Megjegyzés: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Rövidítések: HR, pulzusszám; MABP, artériás középnyomás; NMRI, Naval Medical Research Institute.

Amint azt a 10. ábra mutatja, az SB-290157 szignifikánsan csökkentette az Abelcet maximális vérnyomásemelő hatását, valamint csökkentette a vérnyomást az átmeneti hipertenzió lezajlása után is. Tehát a C3a anafilatoxin plazma koncentráció emelkedés és következményes C3aR aktiválás kismértékben hozzájárul a liposzómákkal okozott vérnyomásváltozásban, de ez a hatás nem ad meggyőző bizonyítékot a C aktiváció oki szerepére a magas vérnyomásban. Az SB-290157 enyhe tahikardiát okozott, a különbség azonban nem volt statisztikailag szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva.

5.1.5 Az Abelcettel okozott átmeneti hipertenzió törzsfüggősége

Mivel a különböző beavatkozások után megfigyelt változások sokszor jelentősen eltérnek az egyes egértörzsekben, ezért összehasonlítottuk az Abelcet hatását a vérnyomásra és szívfrekvenciára az NMRI és C57Bl/6N egerekben. Hangsúlyozni kell, hogy egy kültenyésztett és egy beltenyésztett törzset vizsgáltunk, vagyis vélhetően jelentős genetikai különbség van a két törzs között. A 11. ábra mutatja, hogy csak csekély mennyiségi eltérés volt a MABP válaszokban a két törzsnél; az Abelcet valamivel nagyobb és hosszabb hipertenziót okozott a C57Bl/6N, mint az NMRI egerekben, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Hasonlóan, a két egértörzsből mért HR

változások sem különböztek egymástól. Ezek az adatok tehát arra utalnak, hogy a liposzómákkal kiváltott átmeneti hipertenzió nem különbözik jelentősen az általunk vizsgált két egértörzsből, bár mennyiségileg kismértékben eltérőek lehetnek.

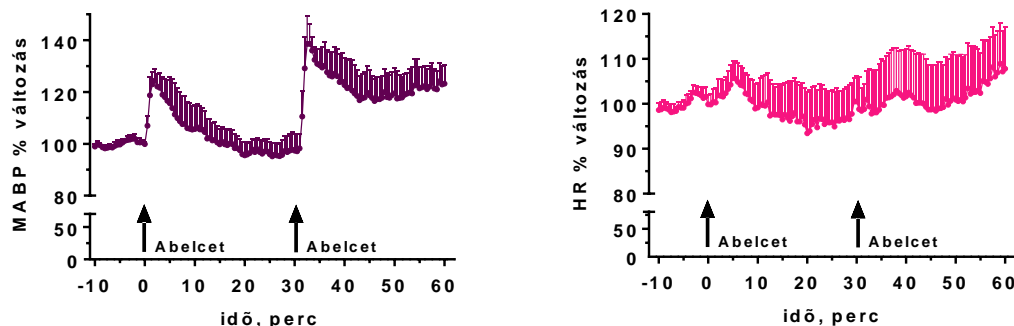


11. ábra Az Abelcet hatása vérnyomásra (C) és a szívfrekvenciára (D) NMRI és C57Bl/6N egerekben.

Megjegyzés: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Rövidítések: HR, pulzusszám; MABP, átlagos artériás nyomás; NMRI, Naval Medical Research Institute.

5.1.6 Az ismételt Abelcet kezelés hatásai

Az Abelcet 30 mg/kg-os intravénás alkalmazása a MABP jelentős növekedését (30 %) eredményezte, amely körülbelül 15 percig tartott. Az Abelcet-tel végzett második kezelés hasonló választ váltott ki, bár az MABP emelkedés valamivel nagyobb és hosszabb volt, azaz nem alakult ki tachifilaxis az Abelcet hatására (12. ábra). Ennek a megfigyelésnek azért van jelentősége, mert sertésben egyes nanokészítmények tachifilaxist okoznak, de az egérben felmerülő potencírozás lehetőségének előfordulására nincs adat.

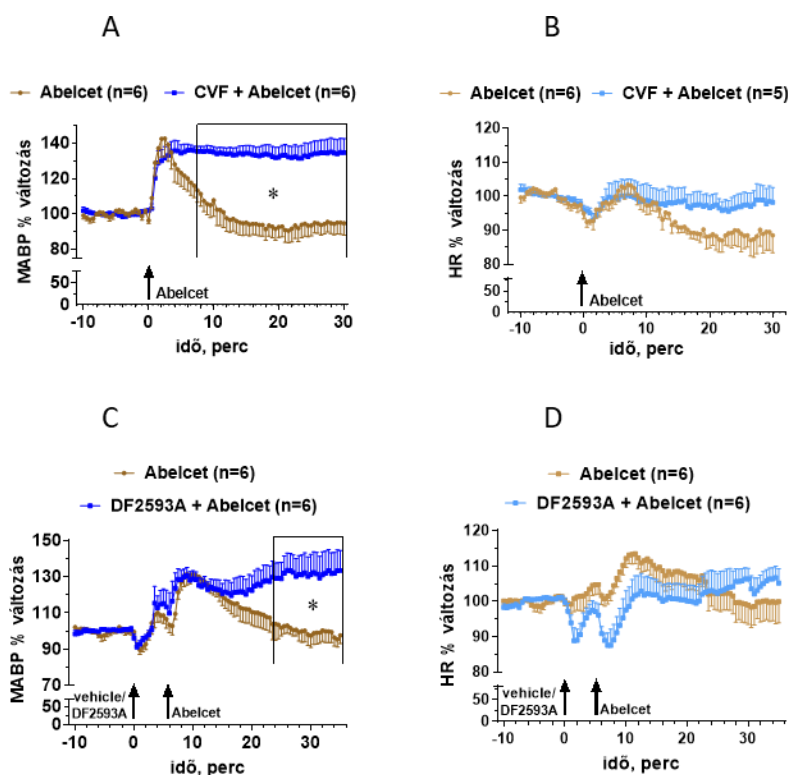


12. ábra. MABP és HR változása két egymást követő Abelcet (30 mg/kg, i.v.) kezelés után, altatott NMRI egerekben (n = 5). Az Abelcet i.v. injekciók beadásának idejét nyilak

jelzik. Bal oldali panel: átlagos artériás vérnyomás (MABP); jobb oldali panel: pulzusszám (HR). A két MABP és HR görbét (az Abelcet beadásától számított 30 percig) kétszemponos ismétléses ANOVA-val és Dunnett-féle post hoc teszttel hasonlítottuk össze. A MABP és a HR változások hasonlóak voltak a két Abelcet kezelés után.

5.1.7 A C kimerítés és a C5a receptor antagonistá hatása az Abelcettel kiváltott hipertenzióra

A CVF-fel történő komplement kimerítés jelentősen meghosszabbította az Abelcettel kiváltott magas vérnyomást, mivel a MABP az Abelcet-kezelés után 30 percig folyamatosan magas maradt. A komplement kimerítés nem befolyásolta az Abelcet-re adott HR választ. A DF2593A, egy C5aR antagonistá vegyület, hasonló hatást fejtett ki, mint a komplement kimerítés, mivel az Abelcet kezelés utáni 18. perctől kezdve a MABP szignifikánsan magasabb volt a DF2593A csoportban a kontroll csoporthoz képest. A DF2593A nem befolyásolta az Abelcet-re adott HR-választ (13. ábra).

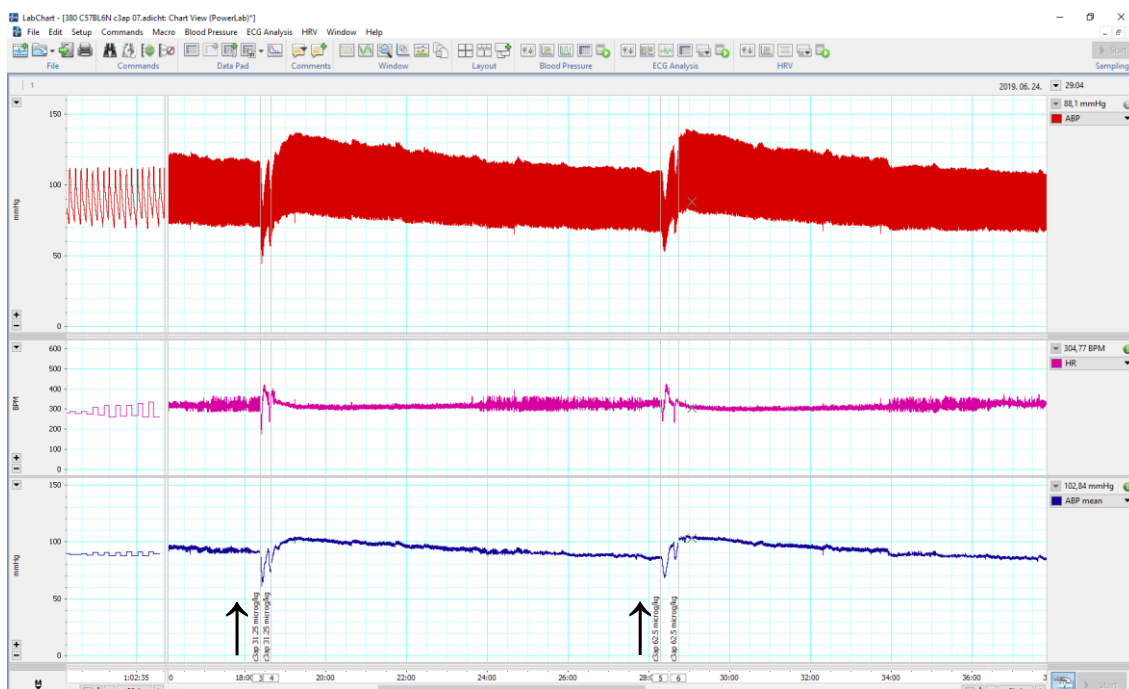


13. ábra: A kobraméreg faktorral történő komplement kimerítés (CVF, $n = 6$), és a DF2593A előkezelés ($n = 6$; C5a receptor antagonistá) hatása az Abelcettel indukált vérnyomás (MABP) és szívfrekvencia változásra NMRI egerekben. A barna színű görbe az oldószer előkezelés kezelés hatásait mutatják.

A DF2593A vagy oldószere (vehicle) 10 % DMSO fziológias sóoldatban) és az Abelcet injekció kezelésének idejét nyilak jelzik. A CVF-et 18, illetve 2 órával az altatás előtt adtuk be 30, illetve 100 U/kg dózisban, 10 ml/kg térfogatban. **A, C:** átlagos artériás vérnyomás (MABP); **B, D:** pulzusszám (HR). **A, B:** Komplement kimerítés CVF-fel; **C, D:** DF2593A ill. oldószer kezelés. A csoportokat kétszemponos ismétléses ANOVA és Dunnett-féle post hoc teszttel hasonlítottuk össze. A CVF-fel való komplement kimerítés meghosszabbította a MABP növekedését az Abelcet beadása utáni 8. perctől, de nem változtatta meg a HR-t. A DF2593A-val végzett kezelés szintén meghosszabbította a MABP növekedését az Abelcet beadása utáni 24. percről, de nem változtatta meg a HR-t.

5.1.8 A C3a peptid fragmens (63-77) hatása a vérnyomásra és a pulzusszámra

A C3a peptid fragmens (63-77) dózisfüggő, de rövid idejű emelkedést okozott a MABP-ban, de nem volt említendő hatás a HR-ra (14. ábra). Egy példát mutatunk be, egy egész csoport vizsgálatára nem állt rendelkezésre elegendő anyag.

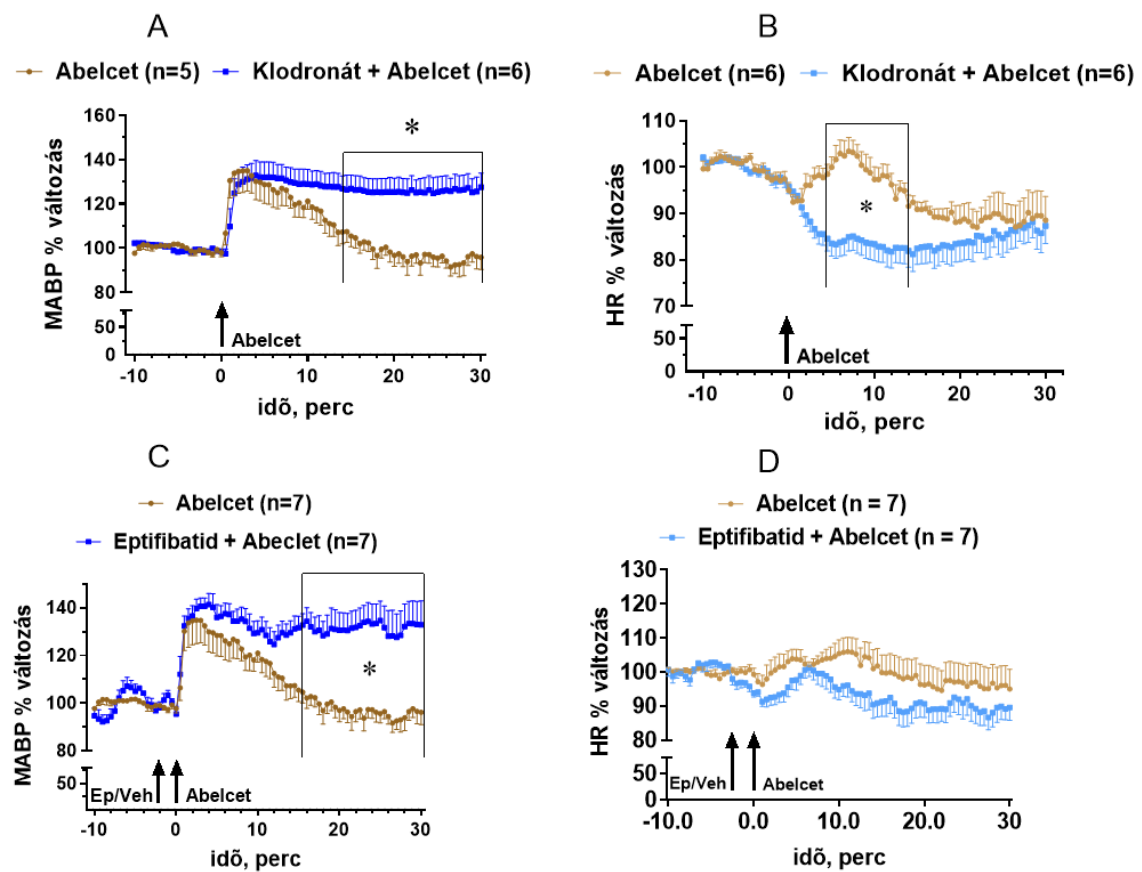


14. ábra: A C3a (63-77) peptid 32,25 és 62,5 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ bolus i.v. dózisok vérnyomásra és pulzusszámra gyakorolt hatásainak eredeti felvétele altatott C57Bl/6n egerekben.

A nyilak a C3a (63-77) peptid beadásának idejét jelzik. Felső diagram: pulzáló vérnyomás; középső diagram: pulzusszám; alsó diagram: artériás középnyomás. A C3a (63-77) peptid átmeneti MABP emelkedést okozott.

5.1.9 A makrofág kimerítés és a trombociták gátlásának hatásai

A makrofág kimerítése klodronát liposzómákkal meghosszabbította az Abelcet-re adott MABP-választ, mivel a MABP az Abelcet beadása után 30 perccel is magas maradt. Ezen kívül a HR a makrofág kimerített csoportban az Abelcet-kezelés után 4. perctől a 14. percgig csökkent kontroll a csoporthoz képest. A trombocita aktiválás gátlása eptifibatiddal, egy trombocita glikoprotein IIb/IIIa receptor inhibitorral szintén megnyújtotta az Abelcettel kiváltott magas vérnyomást, mivel a MABP az Abelcet-kezelés után 30 perccel is magas maradt. A HR hasonló volt a két csoportban. (15. ábra)



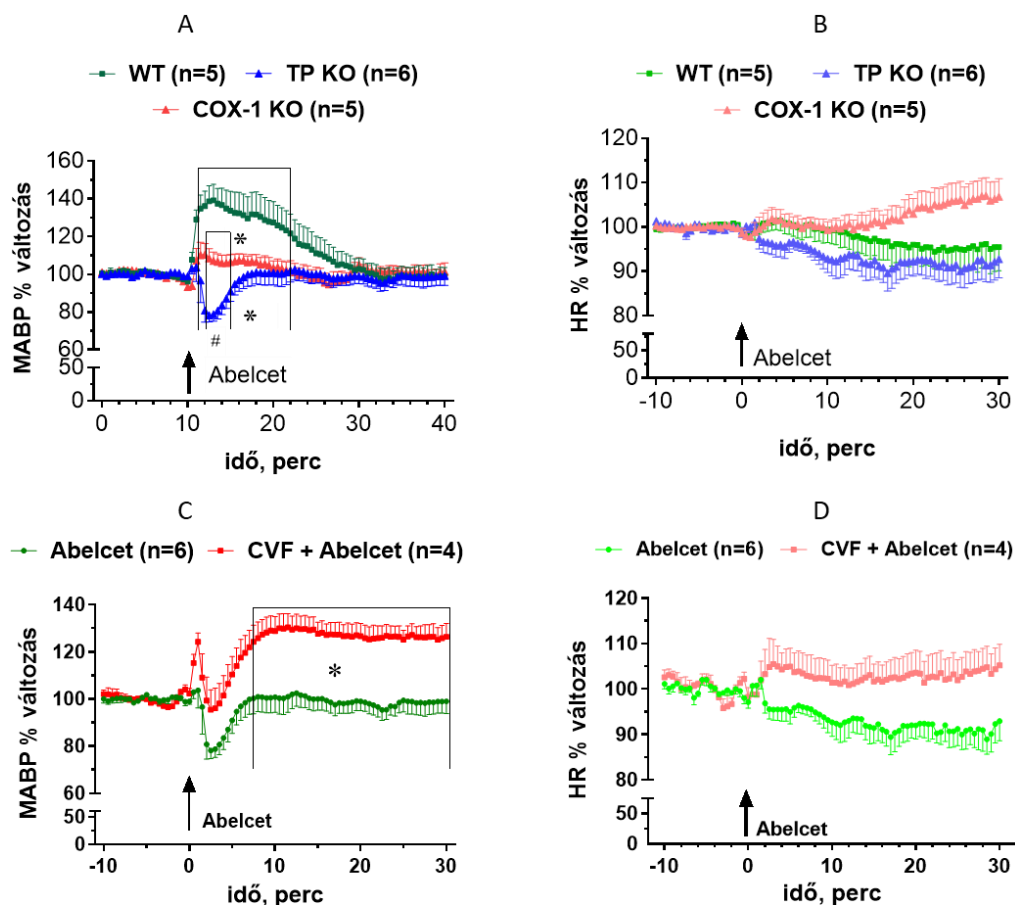
15. ábra: MABP és HR változása a granulocita kimerítése során klodronát liposzómákkal és trombocita glikoprotein IIb/IIIa receptor gátlással eptifibatiddal, altatott NMRI egereken vizsgálva Abelcet kezelése során.

Az eptifibatiddal vagy annak oldószerével és az Abelcet injekcióval történő kezelés idejét nyilak jelzik. Klodronátot vagy üres liposzómákat a farokvénába adtuk be 200 ml/egér térfogatban (1 mg klodronát/egér) két nappal a kísérlet előtt. A, C: átlagos artériás

vérnyomás (MABP); **B, D**: pulzusszám (HR). **A, B**: Granulocita kimerítés klodronát liposzómákkal; **C, D**: Eptifibatid előkezelés hatása. Veh: oldószer. A vehikulum- és klodronát-, valamint az eptifibatiddal kezelt csoportokat kétszemponos ismétléses ANOVA-val és Dunnett teszttel hasonlítottuk össze. A granulocita kimerítése klodronát liposzómákkal meghosszabbította a MABP növekedését az Abelcet beadása utáni 12. perctől, és az Abelcet beadása után 4-től 14 percig csökkentette a HR-t a kontroll csoporthoz képest. Az eptifibatiddal végzett kezelés meghosszabbította a MABP növekedését az Abelcet beadása után 16 perctől, de nem változtatta meg a HR-t.

5.1.10 Az Abelcet hatása COX-1 vagy TP hiányos kontroll egerekben és komplement kimerített egerekben

Az Abelcettel kiváltott hipertenzió teljesen megszűnt a COX-1 hiányos egerekben, míg a TP hiányos egerekben egy nagyon rövid idejű hipotenziót okozott a COX-1 hiányos egerekhez képest. A HR hasonló volt mindhárom csoportban, bár a COX-1 hiányos egerekben a HR növekedési tendenciát mutatott. A CVF-fel történő komplement kimerítés után az Abelcet késői hipertenziót okozott a TP-hiányos egerekben, hasonló hatást, mint a WT egereknél és növelte a HR-t az Abelcet beadása után 14 perccel (16. ábra).



16. ábra: Az Abilcet MABP-ra és HR-re gyakorolt hatása altatott, kontroll és komplement depletált, ciklooxygenáz-1 (COX-1) vagy tromboxán prosztanoid receptor (TP) hiányos és vad típusú (WT) C57BL/6N egerekben.

A: Az Abilcet hatása az átlagos artériás vérnyomásra (MABP) és **B:** a pulzusszámra (HR) COX-1 vagy TP hiányos és vad típusú (WT) C57BL/6N egerekben. **C, D:** Az Abilcet hatása a MABP-re és a HR-re komplement kimerítés után TP-hiányos C57BL/6N egerekben. A komplement kimerítését kobraméreg faktorral (CVF) végzett előkezeléssel valósítottuk meg. * $P < 0,05$ vs vad típusú (WT) egerek; # $P < 0,05$ a TP és a COX-1 hiányos egerek között. A WT és a TP vagy a COX1 hiányos vagy kontroll és komplement kimerített csoportokat kétszemponos ismétléses ANOVA-val és Dunnett teszttel hasonlítottuk össze. Az Abilcet MABP-ra gyakorolt hatása a COX-1 hiányos egerekben szinte teljesen megszűnt, de a pulzusszámot (HR) ez nem befolyásolta. Az Abilcettel kiváltott hipertenziót TP hiányos egerekben tranziens hipotenzió követte, de a pulzusszámot (HR) ez nem befolyásolta. A CVF-fel való komplement kimerítés után az Abilcet 8 perctől kezdve késleltetett magas vérnyomást okozott a TP-hiányos egerekben, és a HR is jelentősen megnőtt az Abilcet beadása utáni 14 percről.

5.2 Patkány eredmények

5.2.1 Liposzóma jellemzők

A 2. táblázat a vizsgálatban használt liposzómák összetételét és szerkezeti jellemzőit mutatja be. A liposzómák közel azonos méretűek és polidiszperzitásúak voltak, de különböztek a felületi töltésben és a PEG-méretben. Az AmBisome egy nem PEGilált, erősen anionos liposzóma, a DSPE-kötésű, a 2K-PEG liposzómák anionos (de kevésbé anionosak, mint az AmBisome) PEGilált vezikulumok, míg a koleszterint tartalmazó 2K-PEG liposzómák (rövidítve csak Chol-PEG liposzómák) és 5K-PEG liposzómák közel semleges, azaz "neutrális" PEGilált vezikulumok.

2. táblázat: A liposzómák jellemzői

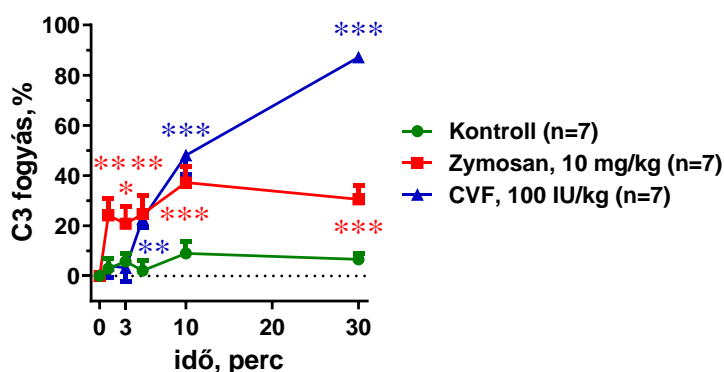
A méret, a polidiszperzitási index (PDI) és a zéta potenciál több független mérés eredményét mutatja. A mérési eredmények közötti különbség elhanyagolható volt. Rövidítések: Chol, koleszterin; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DSPE, 1,2-distearoyl-SN-glikero-3-foszfatidil-etanolamin; DSPG, distearoylphosphatidylglycerol; HSPC, hidrogénezett szója foszfatidilkolin; Vit-E, α -tokoferol; 2K-PEG-DSPE, 1,2-distearoil-foszfatidil-ethanolamin-metil-polietilén-glikol konjugátum. Az állatkísérletekhez használt liposzómák vastagítva szerepelnek a táblázatban.

Név	Karakter	Lipid összetevő	Mól arány	Méret (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
AmBisome	Anionos, nincs PEG	HSPC/Chol/DSPG/ Vit-E/Amph-B	49:23:1 8:0:3:9	98	0.12	-53.5
2K-PEG-DSPE	Anionos, PEG	DPPC/DSPE/Chol 1/2K-PEG-Chol	62:5:33	96	0.06	-8.5
2K-PEG-Chol	Neutrális-PEGilált	DPPC/DSPE/Chol 1/2K-PEG-Chol	62:5:28 :5	97	0.05	-0.49
5K-PEG-Chol		DPPC/DSPE/Chol 1/5K-PEG-Chol		96	0.09	-0.3

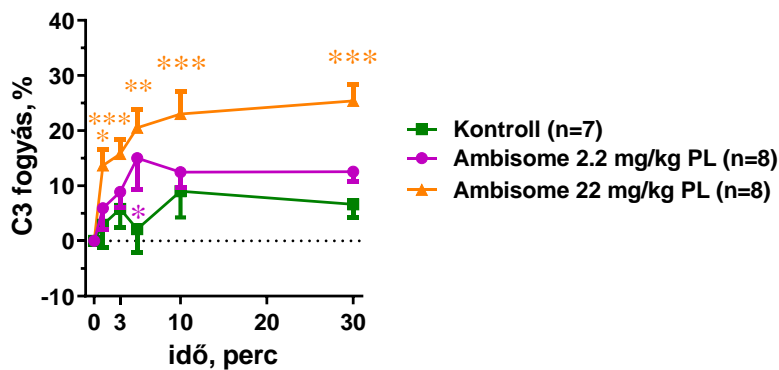
5.2.2 Komplement aktiválás a különböző kezelések után

A várakozásoknak megfelelően mind a zymosan, mind a CVF nagymértékű C aktivációt okozott a patkányban, bár a változások mértéke és kinetikája a két C aktivátor esetében

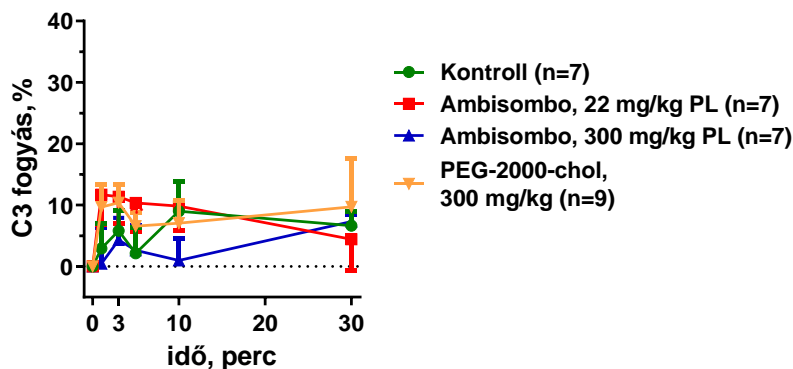
különböző volt (17. ábra). Nevezetesen, a zymosan esetén a C3 fogyás korán elérte a maximumot, ami alacsonyabb volt, mint a CVF-é, míg a CVF kezelés után a C3 fogyás folyamatosan emelkedett. Az AmBisome nagy dózisban szintén jelentős C aktivációt okozott, a hatása dózis arányos volt (18. ábra). Ezzel szemben az AmBisombo, az AmBisome-mal egyenértékű gyógyszermentes liposzóma, valamint a PEG-2000-Chol liposzóma még nagy dózisban sem okoztak C3 fogyást (19. ábra). Ez arra utal, hogy az amfotericin B jelentősen megváltoztatja a liposzómák tulajdonságát, valószínűleg a töltését ill. zéta-potenciálját, ami kulcsszerepet játszik a C aktivációban, patkányban *in vivo*. A PEG-2000-Chol, amelyről megállapították, hogy erős C aktivátor a humán szérumban (84), gyenge hatású patkányokban *in vivo*, vagyis a két faj érzékenysége jelentősen eltér egymástól.



17. ábra. A komplement aktivátorok, zymosan és kobra mérgező faktor (CVF) hatása a C3 plazma koncentrációra a fziológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban. A C3 plazma koncentráció változás alapján C3 fogyást számítottunk, amelyet a C3 koncentráció kiindulási értékéhez (0. perc) viszonyítva százalékos csökkenésként fejeztünk ki. Statisztikailag szignifikáns különbségek (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) a sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva.



18. ábra: Az amfotericin B tartalmú AmBisome liposzóma két dózisének hatása a C3 fogyasztásra a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban. Statisztikailag szignifikáns különbségek (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) a sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva.



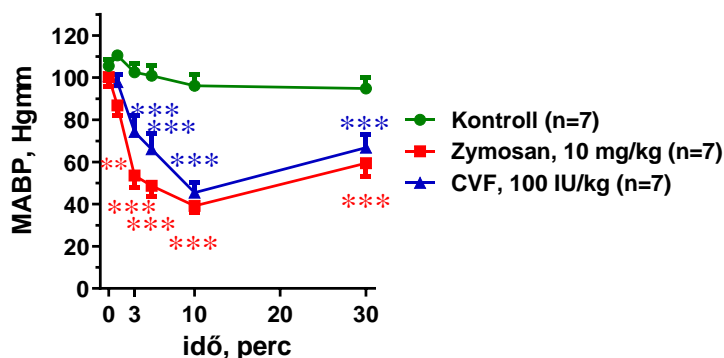
19. ábra: Az üres liposzómák, AmBisombo és PEG-2000-Chol hatásai a C3 fogyasztásra a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban. Statisztikailag szignifikáns különbségek (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A 17. ábra, 18. ábra és 19. ábra 17. ábraadatainak statisztikai elemzését kétszemponos ismétléses ANOVA és Dunnett-féle post hoc teszttel végeztük.

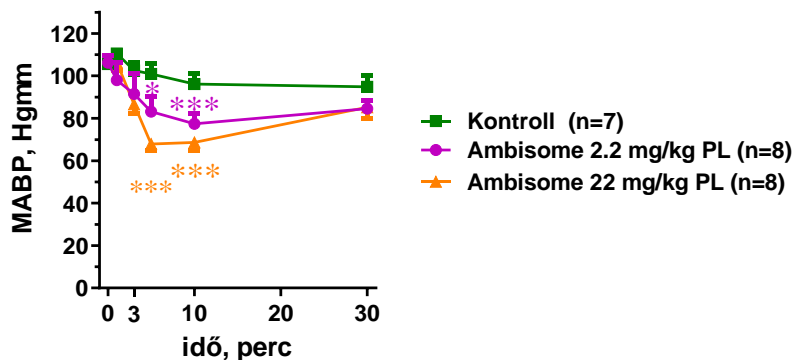
5.2.3 A liposzómák hatása a vérnyomásra, valamint a vérnyomás és a C3 fogyás korrelációja

Amint azt a 20. ábra mutatja, a két ismert C aktivátor, a zymosan és a CVF az artériás középnyomás (MABP) jelentős mértékű (~60%-os) esését okozták a kezelés után 10 percen belül, amelyet részleges visszatérés követett a 30 perces megfigyelési időszak végéig. A liposzómás amfotericin B (AmBisome) szintén dóziszfüggő módon csökkentette

az artériás középnyomást. Az AmBisome 10-szer nagyobb (22 mg PL/kg) adagjának beadása után az artériás nyomás 5 perc után 40%-kal csökkent, de ez a hatás kevésbé volt kifejezett a C aktivátorokéhoz képest. Az AmBisome 2,2 mg PL/kg dózisban alkalmazva, az artériás nyomás fokozatos, körülbelül 20%-os csökkenéséhez vezetett 10 perccel az injekció beadása után, ami statisztikailag szignifikáns, de viszonylag kis változást jelent a nagyobb adagok hatásaihoz képest (21. ábra).

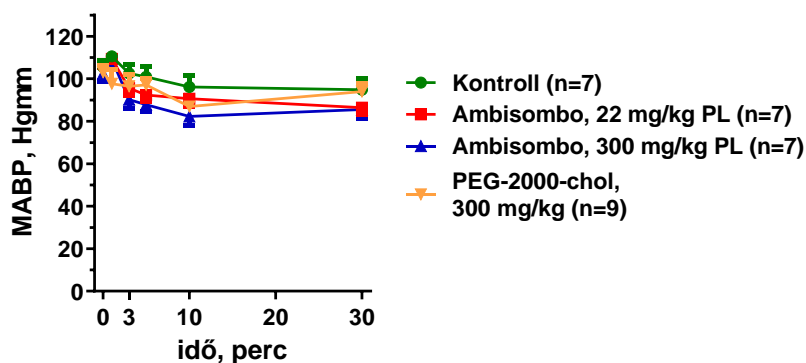


20. ábra: A vérnyomás változása a komplement aktivátorok, zymosan és kobra mérgező faktor (CVF) kezelést követően a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban. MABP – Artériás középnyomás (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



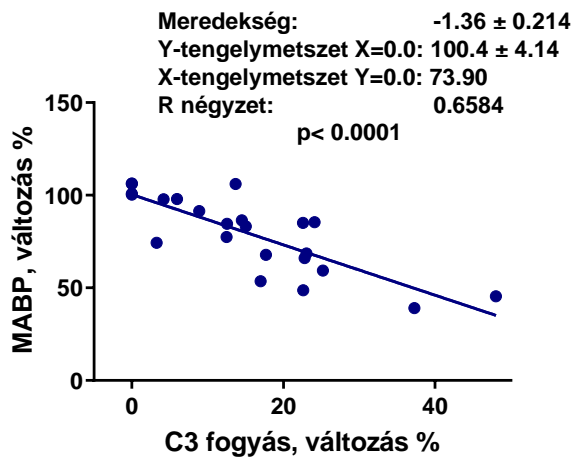
21. ábra: Az amfotericin B tartalmú AmBisome liposzóma hatása az artériás középnyomásra két különböző dózisban alkalmazva, a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Ezzel szemben a nagy dózisú AmBisombo és a kis unilamelláris vezikulumokat tartalmazó PEGilált koleszterin liposzóma, a PEG-2000-Chol, nem okozott vérnyomáscsökkenést a kontroll csoporthoz képest (22. ábra).



22. ábra: Az üres liposzómák, az AmBisombo és PEG-2000-Chol hatásai az artériás középnyomásra a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban.

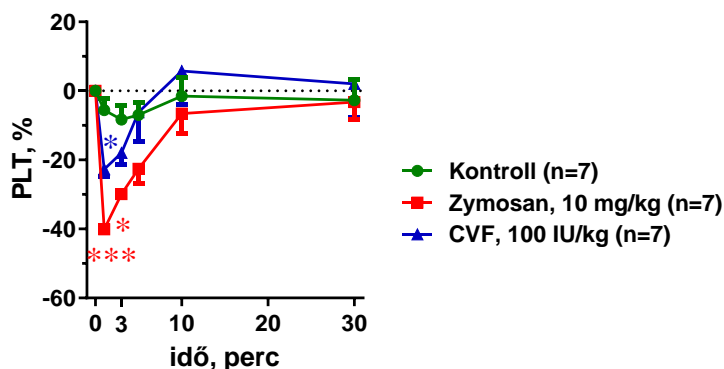
A fenti ábrák mutatják, hogy a kontroll csoportban is megfigyelhető egy kismértékű vérnyomáscsökkenés, amit valószínűleg az ismételt vérvételek miatti vértérfogat csökkenés okozott. A mintavételeket kezelés előtt, majd utána 1, 3, 5, 10, 30 perccel végeztük. A zymosannal, CVF-vel és AmBisome-mal (nagy dózis) kezelt állatokban mért legalacsonyabb MABP értékek és C3 fogyás között szoros korrelációt mutatott (23. ábra), ami arra utal, hogy a C aktiváció, amikor jelen van, ok-okozati szerepet játszott az átmeneti hipotenzióban.



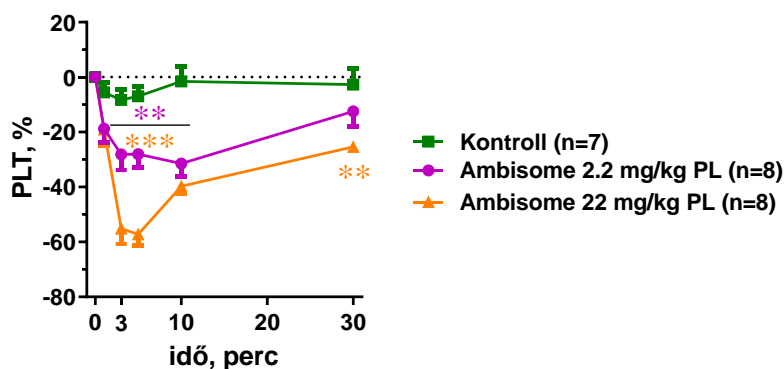
23. ábra: Korreláció a legalacsonyabb MABP érték és a C3 fogyás között a CVF, a zymosan és az AmBisome nagy dóziséval kezelt patkányokban. (43) Az 1, 3, 5, 10, 30 perces C3 fogyás érték közül azt vettük figyelembe, ahol a legalacsonyabb volt a vérnyomás. A vérnyomásváltozást és a C3 fogyaszt is százalékban fejeztük ki az alapértékhez viszonyítva ($t=0$ perc) A MABP és a C3 fogyasztás közötti összefüggést a Pearson-korrelációs koefficiens segítségével számítottuk ki.

5.2.4 A komplement aktivátorok és a különböző liposzómák hatásai a vérsejtekre

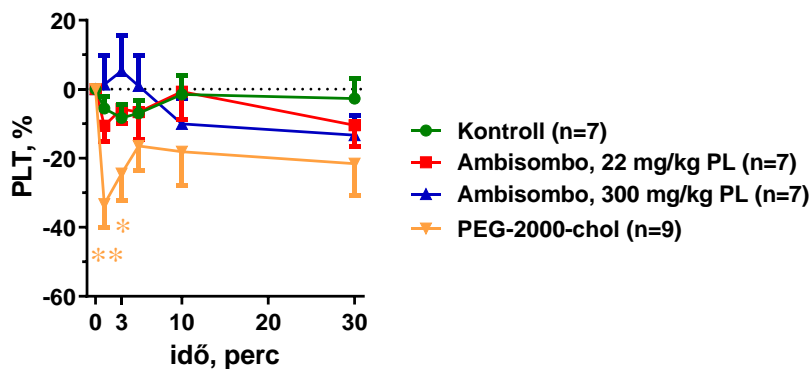
A 24. ábra, 25. ábra és a 26. ábra azt mutatja, hogy minden C aktivátor, beleértve a zymosant, a CVF-et és az AmBisome-ot, jelentős trombocitopéniát okozott. A PEG-2000-Chol, amelyik nem okozott C aktivációt, mégis súlyos trombocitopéniát okozott (26. ábra), ami nem volt jelentősen kisebb, mint a CVF és a nagy dózisu AmBisome hatása.



24. ábra: A komplement aktivátorok hatása a plazma vérlemezkék számára (PLT) a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban.



25. ábra: Az amfotericin B tartalmú AmBisome liposzóma hatása a plazma vérlemezék számára (PLT) a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban.

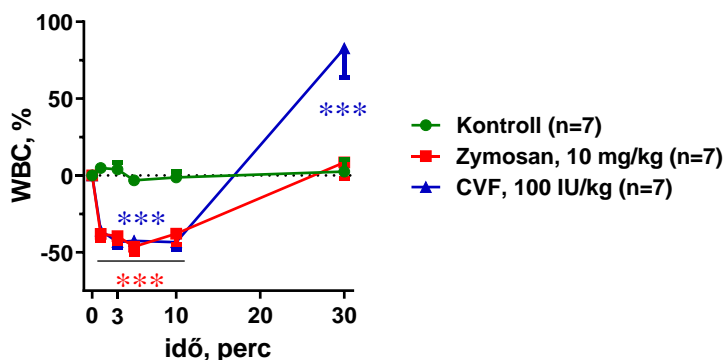


26. ábra: Az üres liposzóma hatása a plazma vérlemezék számára (PLT) a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban.

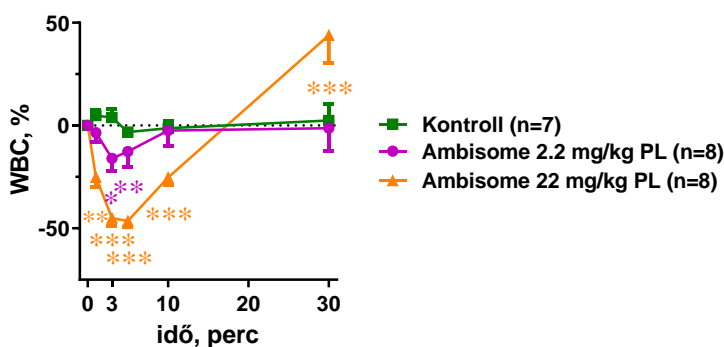
Magyarázat a 24-26 ábrákhoz: Az adatok a változás százalékos arányát mutatják az alapértékhez viszonyítva ($t = 0$ perc). A statisztikai elemzést kétszemponos ismétléses ANOVA és Dunnett-féle post hoc teszttel végeztük. A sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva jelentős különbségeket ($* = p < 0,05$; $** = p < 0,01$; $*** = p < 0,001$) jelöltük.

Hasonló eredményeket kaptunk a fehérvérsejt-szám esetében, mert a kezelések leukopéniát okoztak a legtöbb esetben, azzal a különbséggel, hogy a CVF és a nagy dózisú AmBisome esetében kompenzációs leukocitózist is megfigyeltünk. A leukopénia általában nagyobb volt, ha a C aktiváció nagyobb volt, mint zymosan, CVF és AmBisome esetében, és kisebb, de jelentős mértékű az üres liposzómák, AmBisombo és PEG-2000-Chol esetében. (27. ábra, 28. ábra, 29. ábra) Ezek az adatok arra utalnak, hogy a

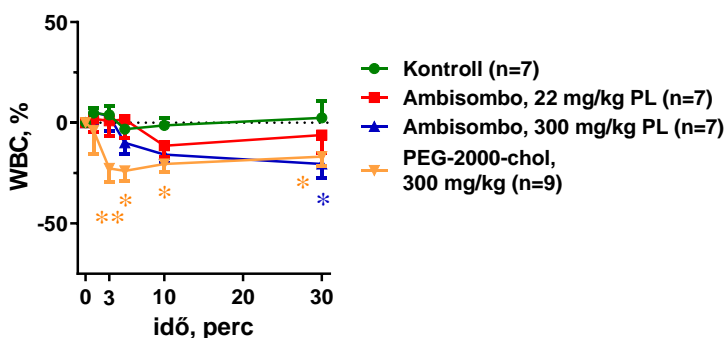
modellben megfigyelt vérsejtek változásai nagy valószínűséggel C függőek, de C független mechanizmusok részvétele, azaz CIPA sem zárható ki.



27. ábra: A komplement aktivátorok hatása a plazma fehérvérsejtre (WBC) a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban



28. ábra: Az amfotericin B-tartalmú liposzóma hatása a plazma fehérvérsejtre (WBC) a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban

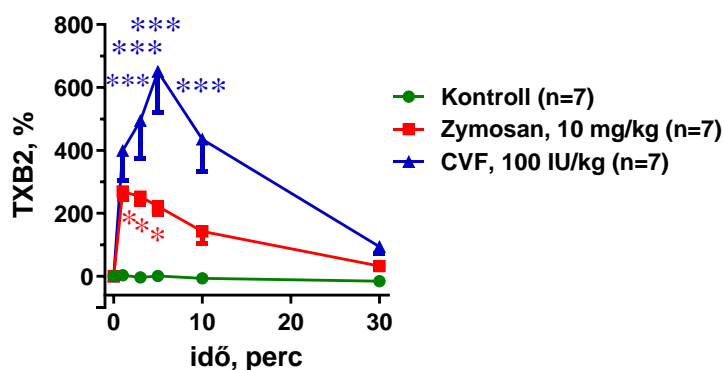


29. ábra: Az üres liposzómák hatása a plazma fehérvérsejtre (WBC) a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban

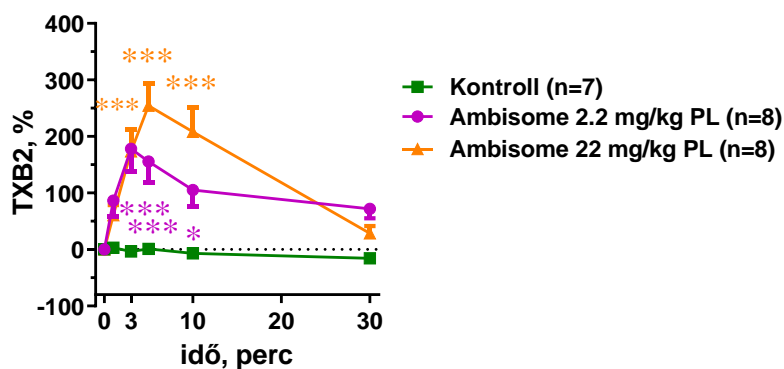
Magyarázat a 27-29. ábrákhoz: Az adatok a százalékos változásokat mutatják az alapértékhez viszonyítva ($t = 0$ perc). A statisztikai elemzést kétszemponos ismétléses ANOVA és Dunnett-féle teszttel végeztük. A sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva jelentős különbségeket (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$) jelöltük.

5.2.5 A komplement aktivátorok és a különböző liposzómák hatása a plazma TXB₂ koncentrációra

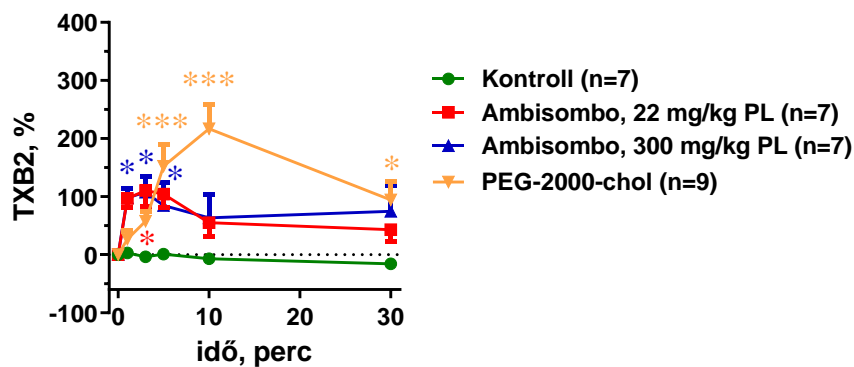
Ahogy a vérsejtek változásai (24-29. ábra), az összes C aktivátor, beleértve a zymosant, CVF-et és AmBisome-ot, jelentős emelkedést okozott a plazma TXB₂ koncentrációban, és az figyelhető meg, hogy minél nagyobb a C3 fogyás, annál nagyobb az emelkedés a TXB₂ koncentrációban (30, 31. ábra, 32. ábra). Azonban a nem C aktivátor liposzómák is jelentősen emelték a TXB₂ koncentrációt, különösen a PEG-2000-Chol (32. ábra **29. ábra**), ami arra utal, hogy a TXA₂ felszabadulást C független mechanizmusok váltották ki.



30. ábra: A komplement aktivátorok hatása a plazma tromboxán koncentrációra (TXB₂) a fziológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban



31. ábra: Az amfotericin B tartalmú liposzóma hatása a plazma tromboxán koncentrációra (TXB2) a fizioológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban



32. ábra: Az üres liposzómák hatása a plazma tromboxánra (TXB2) a fizioológias sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva, altatott patkányokban

Magyarázat a 30-32. ábrákhoz: Az adatok a százalékos változást mutatják az alapértékhez viszonyítva ($t = 0$ perc). A statisztikai elemzést két szempontos ismétléses ANOVA és Dunnett-féle teszttel végeztük. A sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyított jelentős különbségeket ($* = p < 0,05$; $** = p < 0,01$; $*** = p < 0,001$) mutatják.

6. MEGBESZÉLÉS

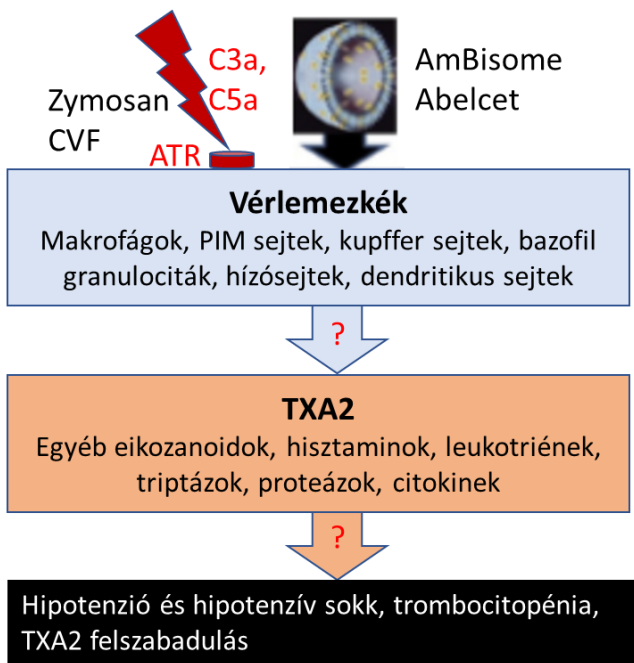
6.1 Az Abelcettel okozott reakciók jellemzői egérben

Az egerekben az infúziós reakció vagy CARPA jellemzői az átmeneti szisztémás vérnyomás emelkedés, trombocitopénia, leukocitózis (esetenként leukopénia), plazma TXB₂ koncentráció emelkedés, kapilláris permeabilitás fokozódása, valamint a komplement aktivációt jelzi a C fogyasztás és plazma C3a koncentráció emelkedése. Mindezeket a hatásokat megfigyeltük zymosan és CVF-fel okozott C aktiváció után. A különböző liposzómák hatékonysága jelentősen eltért egymástól, ezek egy része minden tünetet előidézett, más liposzómák beadása után csak a tünetek egy része jelentkezett. Mind ezek a változások tipikus megnyilvánulásai a túlérzékenységi reakcióknak (HSR) az emberben (34, 35), patkányban (74, 43) és sertésben (43, 67, 69, 70). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a változások részben összefüggenek a C aktivációval. Ez a tanulmány először szolgáltat bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a CARPA kialakulhat egerekben, csakúgy, mint a fent említett fajokban. A vizsgálat azt is mutatja, hogy az eddig vizsgált fajokban jelentős különbségek vannak a CARPA jellemzőit illetően. Nevezetesen, a zymosan, valamint a vizsgált liposzómák és más nano-gyógyszerek HSR reakciót kiváltó dózisa a jelen egér és patkány vizsgálatokban egy-két, esetenként három nagyságrenddel nagyobb, mint a sertéseknél, valamint a túlérzékeny embereknél, ami arra utal, hogy az egerek és a patkányok viszonylag alacsony CARPA érzékenységgűek. Továbbá, egerekben a keringési változás az átmeneti hipertenzió, amelyet esetleg hipotenzio követhet, míg patkányoknál a keringési válasz a vérnyomás csökkenése, míg sertéseknél a jellemző keringési változás a pulmonális hipertenzió, ami inkább csak nagymértékű pulmonális hipertenzió esetén jár együtt szisztémás vérnyomás csökkenéssel (43, 54, 86).

6.1.1 Az Abelcettel okozott keringési változások mechanizmusa egérben

A pontos mechanizmus ismerete nélkül nem egyértelmű a C aktiváció ok-okozati szerepe a hipertenziós válaszban. Az anafilatoxinok és a szekunder mediátorok hozzájárulhatnak mind a két hatáshoz, az egyik példa a C5aR által közvetített hipotenzio rágcsálókban (54). Az a megfigyelés, hogy az SB-290157, egy C3aR antagonistá csökkentette, de nem védte ki az Abelcet hipertenzív hatását, a C3a vagy más C3aR agonisták legalább részleges szerepére utal. A C3a szerepe azonban megkérdőjelezhető, ezt erősíti meg az az

eredmény, hogy a C3a peptid egyértelműen vérnyomásemelő hatású egerekben. A C3a, ill. a C3aR aktiválás hozzájárulása a hipertenzióhoz még nagyobb lehet a C aktivátorok esetében, hiszen azok sokkal nagyobb komplement aktivációt és plazma C3a koncentráció emelkedést okoztak, de ezt nem vizsgáltuk. Mivel a C5a plazma koncentrációt nem mértük, ennek hiányában nem tudjuk közvetlen bizonyítékkal megerősíteni, vagy cáfolni a C5a szerepét a korai vérnyomás változásokban. Irodalmi adatok szerint a C5a vérnyomáscsökkentő hatású rágsálókban, amit saját méréseink is alátámasztanak. Ugyanis az Abelcet késői vérnyomás emelkedést okozott mind a C rendszer kimerítése, mind a C5aR gátló vegyület alkalmazása után, ami arra utal, hogy a korai hipertenzió utáni vérnyomáscsökkenést a C aktiváció, ezen belül a C5a receptor aktiváció magyarázhatja (33. ábra) (86, 75, 33).



33. ábra: A "Double hit" hipotézis a C aktivátor és liposzómákkal kiváltott keringési változásokban, egereken vizsgálva.

Megjegyzések: a vasoaktív mediátorok (narancssárga) termelésére képes sejtek (kék) stimulálhatók anafilatoxin-receptorokon keresztül (ATR, "AT hit"), vagy ettől függetlenül ("C független útvonal"), ami CARPA-hoz és C független pseudoallergiához (CIPA) vezet. Az ezzel járó fiziológiai változások fekete háttérrel vannak felsorolva.

Rövidítések: AT, anafilatoxin; ATR, anafilatoxin receptor; CARPA, C aktiválással kapcsolatos pszeudoallergia; CIPA, C független pszeudoallergia; CVF, kobraméreg faktor.

A C aktivátorok, a CVF és a zymosan, sokkal jobban emelték a plazma C3a koncentrációt, mint az AmBisome és az Abelcet, ezért feltételezhető, hogy a C aktivátorok vérnyomásemelő hatásához a C3aR aktiváció nagyobb mértékben járul hozzá, mint a liposzómáknál. Ugyanakkor az erősen valószínűsíthető, hogy C aktivátorok jelentős C5a plazma koncentráció emelkedést is okoztak, ami magyarázhatja a hipotenzív sokk kialakulását. A klinikai tapasztalat számos jelentős mellékhatásról számol be az amfotericin B-t tartalmazó liposzómák során, azonban ritkán említenek vérnyomás változást még súlyos eseteknél is (87, 88). Ezzel szemben az AmBisone kezelés néhány betegben hipertenziót okozott (89).

Az egerekben elvégzett vizsgálatok értékelését számos korlát nehezíti. Az egyik az, hogy csak hím egereket használtunk, és jól ismert, hogy a patofiziológiai folyamatok eltérőek lehetnek a két nemben (90). Tehát nem zárhatjuk ki, hogy a nőstény egerekben a tünetek részben eltérnek, vagy a hímekben megfigyelt változásoknál kevésbé súlyosak vagy súlyosabbak. Továbbá, csak a zymosan és CVF okozott jelentős C3a plazma koncentráció emelkedést és C3 fogyást, tehát csak ebben az esetben beszélhetünk jelentős C aktivációról, és várható, hogy az anafilatoxinok jelentős biológiai hatást okoznak. A liposzómák esetében a C aktiváción kívül más, C független folyamatok egyértelműen hozzájárulnak a megfigyelt változásokhoz, vagyis a hatások nagy részét C független pszeudoallergia magyarázhatja (CIPA, 33. ábra). Ezenkívül nincs információ arra vonatkozóan, hogy az anafilatoxinok befolyásolják-e a szívfrekvenciát, ezért kérdéses a C3aR inhibitor tachikard hatásának mechanizmusa. Nem vizsgáltuk, de felmerül, a szabad, liposzómához nem kötött amfotericin B szerepe az AmBisome és az Abelcet hatásában. Erre vonatkozóan csak patkány adatokkal rendelkezünk (91), amely szerint az amfotericin B rendkívül toxikus, de alacsony dózisban nem befolyásolta a fehérvérsejt és trombocitaszámot, és nem fokozta a plazma C3a koncentrációt, de csökkentette a vérnyomást (91).

6.2 A vazoaktív mediátorok szerepe az Abelcettel okozott hipertenzióban, egérben

Amint azt korábban leírtuk, az Abelcet egy intravénás adagolású, amfotericin B tartalmú liposzómás készítmény, amely pszeudoallergiás reakciót okozott egerekben, amelynek a tünetei a trombocitopénia, a leukocitózis és a megnövekedett plazma C3a és TXB₂ koncentráció, valamint az átmeneti hipertenzió volt (48).

Vizsgálatunk kimutatta, hogy az Abelcettel kiváltott hipertenzióknak két fázisa van egerekben. A korai fázist COX-1-ből származó prosztanoidok, elsősorban a TXA₂ közvetíti a TP receptorok aktivációjával. A késői fázis nem TP/TXA₂ függő, és eredményeink szerint ez a szakasz a C és C5aR aktiválás miatt rejtve marad, ha nem gátoljuk a C5aR receptorokat. Ebből következően az Abelcettel kiváltott hipertenziós hatás C függő és C független mechanizmusokkal rendelkezik. Egyértelműnek tűnik, hogy a hipertenziós hatás korai fázisát ciklooxygenáz termékek közvetítik, mivel a COX-1 hiányos egerekben gyakorlatilag teljesen megszűnik. A korai hipertenziós hatás fő effektora valószínűleg a TXA₂, mivel nem figyeltünk meg MABP emelkedést a TP hiányos egereknél, ellenkezőleg, a MABP az Abelcet beadása után rövid ideig csökkent. Úgy tűnik, hogy ezt a rövid életű hipotenzív hatást a vazodilatációt okozó ciklooxygenáz termékek okozzák, mint például a prosztaglandin PGE₂ (92) PGD₂ (93) és/vagy prosztaciklin (PGI₂) (91). A TXA₂ kiemelkedő szerepét támasztják alá korábbi eredményeink, miszerint mind a liposzómákat tartalmazó amfotericin B, mind a C aktivátorok növelték a plazma TXB₂ koncentrációját egerekben és patkányokban egyaránt (94, 48, 91, 95). Továbbá, a munkacsoport más területen dolgozó kollégái azt is kimutatták, hogy ugyanaz a C3a peptid, amelyet a jelenlegi kísérletekben is használtunk, endotheliumtól független vazokonstriktiót indukált egér aortában, *in vitro*, ami majdnem teljesen elmaradt a TP receptor hiányos állatokban. Ezek szerint mind a vérnyomásemelkedést, mind az ér összehúzódást a C3a peptid hatására felszabaduló vazokonstriktor prosztanoidok, elsősorban a TXA₂ közvetítette (96). A vérlemezkék és makrofágok nem lehetnek a TXA₂ forrásai, mivel ezek gátlása nem változtatta meg az Abelcet hipertenziós hatásának első fázisát. Az is nyilvánvalónak tűnik, hogy a C rendszer csak kis mértékben járul hozzá a TXA₂ felszabadulásához, mivel a hipertenziós hatás TP receptor függő korai fázisát nem változtatta meg a C rendszer kimerítése, és csak kis mértékben csökkentette a C3aR gátlás. Ezért az Abelcettel kiváltott hipertenziós hatás korai fázisa elsősorban CIPA, azaz többé-kevésbé C független reakció (48). Meglepő

módon a CVF és a C5aR gátlás a magas vérnyomás egy még ismeretlen késői fázisát tárta fel az Abelcet alkalmazásakor. Nincs magyarázatunk a késői fázis mechanizmusára, mivel ez a kontroll állatokban rejtve marad, ezért eddig nem vizsgáltuk (48). A jelenlegi kísérletek azonban azt mutatták, hogy a C aktiválás jelentős szerepet játszik a kezelés utáni késői fázisban, mivel mind a komplement kimerülés, mind a C5aR gátlás megnyújtotta az Abelcettel kiváltott átmeneti hipertenziót. A késői hipertenzió független volt a TXA₂-tól, mivel egyértelműen kimutatható volt a komplement kimerített TP hiányos egerekben is. Ennek ellentmondani látszik, hogy a zymosan kezelés után a plazma TXB₂ koncentrációja tartósan magas maradt, vagyis a késői hipertenzió időszakában is. Mivel a zymosan sokkal nagyobb C aktivációt okozott, valószínű, hogy a tartósan magas TXB₂ plazma koncentráció kevésbé jellemző az Abelcet kezelés után. Ezt a feltételezést erősítik a patkány adatok is, mert patkányban minden kezelés után 3-5 perccel volt a legmagasabb a plazma TXB₂ koncentráció, majd lassan csökkent, és visszatért a kontroll szint közelébe (95). A késői hipertenziós hatást alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a második Abelcet kezelés után a MABP növekvő tendenciát mutatott, azaz a második TXA₂ felszabadulás és az eddig nem azonosított késői vazóaktív mechanizmus által kifejtett hatás részben összeadódott.

Fontos megjegyezni, hogy irodalmi adatok szerint a CVF-fel történő C kimerítés nem változtatta meg a liposzómák farmakokinetikáját, azaz a tartósabban magas vérnyomás nem lehet a liposzómák hosszabb keringési idejének következménye.

6.3 A vérlemezkék és makrofágok szerepe a vérnyomásváltozásban, egerekben

Jelenlegi eredményeink azt mutatják, hogy a hipertenzió késői fázisában a vazóaktív mediátorok makrofágokból és vérlemezkékből szabadulnak fel, és normalizálták a vérnyomást. Ezek az eredmények összeegyeztethetők azokkal a korábbi megállapításokkal, amelyek szerint a makrofágok és a vérlemezkék fontos sejtes közvetítói az egér pseudoallergiának. A vérlemezkék és makrofágok gátlása feltárta a hipertenzió késői fázisát, hasonlóan a C kimerítéshez és a C5aR receptor gátláshoz, ami arra utal, hogy ezek a sejtípusok vazodilatációt okozó mediátorokat bocsátottak ki, vagy az általuk termelt mediátorok a szervezet más sejtjeit (pl. hízósejtek) aktiválták, és azok termelték a vazóaktív hatású anyagokat. Mivel mind a C kimerülés/C5aR gátlás, mind a

trombocita/makrofág gátlás hasonló hatású volt, adódik a feltételezés, hogy az értágító mediátorok felszabadulását legalább részben a Ca²⁺ közvetítette.

A vérlemezkék és a makrofágok kölcsönösen szabályozhatják egymás funkcióit legalább gyulladás közben (97-102). Az effektor sejtek által kibocsátott vazóaktív mediátorok nagy száma összetett eseményláncot alkot. Egy elem gátlása is beavatkozhat a rendszerbe, ami magyarázatot adhat arra, hogy a vérlemezkék és a makrofágok gátlása miért ugyanazt a hatást fejtik ki. Ezért kísérletileg és elméletileg egyaránt nehéz azonosítani a fő effektor vérnyomáscsökkentő hatású vazóaktív mediátorokat. Ezt a feladatot tovább nehezíti, hogy az anafilaxiás reakciót okozó gyógyszerek növelik a vérnyomást az egérben, míg sok más fajban, például patkányokban hipotenzió figyelhető meg (103, 91, 95). Ezzel szemben az LPS-sel kiváltott anafilaxia egerekben is hipotenziót okoz (104).

Az anafilaxia fő közvetítői a hisztamin, (105) a PAF (106), de a prosztaglandinok (107), a leukotriének, (108) a szerotonin (105) is hozzájárulhatnak az anafilaxia vaszkuláris hatásainak mediálásához. Mivel PAF-ot mind a vérlemezkék, mind a makrofágok termelnek és felszabadítanak, így a PAF lehet az egyik vazóaktív mediátor, amely csökkenti a vérnyomást a magas vérnyomás késői szakaszában, egerekben (109, 110).

Korábbi tanulmányok is támogatják a makrofágok és a vérlemezkék szerepét a passzív szisztémás anafilaxiában. A monocita/makrofág kimerítése klodronát liposzómákkal megszüntette a testhőmérséklet csökkenését egerekben, ami a klasszikus komplement útvonalon közvetített, IgG-vel indukált anafilaxia súlyosságára jellemző paraméter (111).

6.3.1 A liposzómákkal kiváltott reakciók jellemzése patkányban

A túlérzékenységi reakciók a liposzómás gyógyszereknél, az emulgeálószerekben oldott rákellenes citosztatikumoknál, antitest terápiáknál, PEGilált fehérjéknél, intravénás vas készítményeknél, kontrasztanyagoknál, enzimeknél és fehérje terápiáknál jelentkeznek, és úgy tűnik, hogy a tüneteknek számos közös jellemzője van, amelyek nem kapcsolhatók a klasszikus IgE-mediált allergia tüneteivel. Az Allergológiai Világszervezet (World Allergy Organization) "nem immun" allergiának vagy "nem immun" túlérzékenységnek nevezi őket, míg más nomenklaturák pszeudoallergiának, anafilaxiás vagy

idioszinkratikus reakcióknak nevezi azokat. A CARPA fogalmat kb. 20 évvel ezelőtt vezették be a szakirodalomba, a C aktiválás sok esetben bizonyított ok-okozati szerepének felismerésére alapozva (69). Azóta a CARPA-ra vonatkozó nagyszámú klinikai példa alapján általánosan elfogadottá vált, hogy az új fejlesztésű nanomedicinák és biológiai anyagok használata komoly biztonsági problémát jelenthet a farmakoterápiában. Ma már a hatóságok is hangsúlyozzák, hogy standard *in vitro* és *in vivo* tesztrendszereket kell kifejleszteni a kockázat értékeléséhez és a súlyos reakciók kialakulásának előrejelzéséhez.

A most elvégzett vizsgálataink megerősítették azokat a korábbi felvetéseket, amelyek szerint sertés a CARPA (65-69) előrejelzésének legérzékenyebb modellje, és a kísérletekben használt liposzómák dózisa alapján megerősítették azt a korábbi állítást is, hogy a patkányok kevésbé érzékenyek a liposzómákkal kiváltott reakciókra, mint a sertések. A patkány vizsgálat jelentősége azonban túlmutat az alacsony érzékenységre vonatkozó állítás alapjául felhozott megfigyeléseken (24, 23). A sertés és patkány érzékenység különbsége a vizsgálat tesztanyagokra vonatkozó eredmények alapján 10x és 1000x között volt. Ugyanakkor van példa arra is, hogy a patkányok érzékenysége jól közelíti a humán adatot, elsősorban olyan anyagok esetén, amelyek emberben is gyakori és súlyos infúziós reakciót okoznak. Erre talán legjobb példa az Abelcet, amelynek a humán dózisa 2.5 mg/kg, és patkányban már 10 mg/kg dózisban is jelentős vérnyomáscsökkenést okoz (94). Ez az adat azonban annyiban félrevezető, hogy a humán gyógyászatban az Abelcetet 2 órás infúzióban kell beadni, míg a patkányban kapott eredmény 1 perces bolus injekcióra vonatkozik. Ismert ugyanis, hogy a pszeudoallergia súlyossága nagyon erősen függ az anyagok beadási sebességétől (94). Ez az egy adat azonban nem módosítja azt a megállapítást, hogy a patkány nem érzékeny modell az immunotoxicitás szűrésére vagy a CARPA kockázatának mennyiségi értékelésére. Mivel azonban a patkányok fiziológiai változásai lényegében megegyeznek a sertésekben és az emberben tapasztaltakkal, a patkány még mindig jó modell lehet a CARPA mechanizmusának tanulmányozására. Lényeges szempont azonban, hogy csak „érzékeny” emberben alakul ki HSR, sok betegben semmilyen mellékhatás sem tapasztalható. Ezzel szemben az állatkísérletekben homogén reakciókat tapasztalunk. Arra is rá kell világítani, hogy a betegek kezelése során tapasztalt HSR-t hasonlítjuk az egészséges állatok reakciójához. Tehát az állatkísérletes adatok valójában a nem

„érzékeny” betegek reakcióját modellezik, vagyis ebből a szempontból minden érzékenységre vonatkozó összehasonlítás bizonytalan. Mindezek alapján a további kutatásnak annak a felderítésére kell(ene) koncentrálnia, hogy mi az érzékenységbeli különbség oka az érzékeny, és nem reagáló betegek között.

A CARPA-t előidéző készítmények hatékonyságának különbsége sok tényezőtől függ. Ez a tanulmány is kimutatta, hogy a liposzómákra adott reakciók nagyon specifikus jellegűek és erősen függenek a felületi töltéstől (AmBisome) vagy annak kémiai összetevőitől (Chol-PEG), alakjától és méretétől, és ezek a tulajdonságok eltérő mértékben játszanak szerepet a különböző fajokban. Az AmBisome egy erősen töltött nem-PEGilált liposzóma foszfolipid felülettel, amely széles körben használatos a szisztémás gombás fertőzések kezelésére (112-118). Ismert, hogy anafilaxiás reakciókat okozhat az emberben, valamint erősebb CARPA induktor mindkét rágcsáló fajban, mint az azonos méretű (~ 100 nm), de nem töltött PEGilált megfelelője, a Chol-PEG liposzómák. A PEGilált liposzómákat széles körben használják a rák kezelésére (pl. Doxil/Caelyx, PEGilált liposzómás doxorubicin). Azonban ezek a liposzómák egy kis negatív töltés eredményeként az anionos PEGilált foszfolipid konjugátumot reprezentálják. A PEGiláció által kiváltott hatás kiemelésére a PEG-et használtuk, amelyet Chol-hoz konjugáltunk, ami töltés nélküli, és egy korábbi tanulmányban azt találtuk, hogy ezek a liposzómák jelentős C aktivációt is okoznak (84). Az a megállapítás, hogy a két liposzóma jelentős C aktiválást okoz humán szérumban, míg a mellékhatást okozó dózis jelentősen eltért egymástól patkányokban, arra utal, hogy nincs egyértelmű összefüggés az *in vivo* mellékhatást okozó dózis és a C aktiváló hatásban. Adataink azt sugallják, hogy a PEGilált nanorészecskék C aktiváló hatásának mechanizmusa összetett lehet, és nagymértékben függhet a felületi tulajdonságoktól, elsősorban a töltéstől, így a C aktiválás megszüntetésére irányuló eredeti szándék a 2K-PEG semleges liposzómák használatával nem feltétlenül oldja meg a CARPA problémát.

A CARPA érzékenységnek a sertés és a patkány közötti jelentős különbségének okát a mai napig sem tisztázták. A különbséget legegyszerűbben a sertéstüdőben kimutatott magas TXA₂ szekréciós kapacitású PIM-sejtek jelenléte magyarázhatja (119-121), mivel jól ismert, hogy a sertés tüdő az infúziós reakcióra legérzékenyebben reagáló szerv (67). Mivel a kardiopulmonális keringést átmenetileg nagymértékben csökkenti a súlyos tüdő- és koszorúér szűkület és a leukothrombotikus mikroembólia, a szív anafilaxia és a sokk

gyors lezajlása ezzel magyarázható (65). Kevésbé súlyos esetben a sertésben szinte kizárólag nagymértékű pulmonális hipertenzió figyelhető meg, amit esetenként vérnyomásesés is kísér. A pulmonális hipertenziót teljes egészében a ciklooxygenáz aktiváció, és TXA₂ felszabadulás magyarázza. Tekintettel arra, hogy a patkányok tüdejében nincsenek PIM sejtek, így az elsődleges keringési válasz a hipotenzio (25).

Ami a Chol-PEG liposzómák C-aktivációs mechanizmusát illeti, korábban (84) kimutattuk, hogy az alternatív útvonalon halad, kizárva a természetes antitestek (pl. anti-koleszterin, anti-PEG és foszfolipid antitestek) szerepét. A rejtély azonban még nem oldódott meg, és az egyik feltételezés az, hogy nem valószínű az, hogy a koleszterin tartja a PEG-et szilárdan a liposzómákon, hanem a PEG inkább leválik a kettős rétegről és komplex kölcsönhatásokba lép a plazma fehérjékkel. Ezt még tisztázni kell a jövőbeni vizsgálatokban, azonban azt is hangsúlyozni kell, hogy PEGilált liposzómák fokozott C aktiváló hatása a semleges az alternatív útvonalon keresztül, potenciálisan jelentős anafilaxiát okozhat sertésekben, ami fontos felfedezés a kísérleti immunológiában és toxikológiában, és felhasználható a C aktiválás és a CARPA mechanizmusának megismeréséhez.

6.3.2 A komplement aktiváció jelentősége a patkány HSR-ban

Ez a tanulmány azt mutatja, hogy a különböző C aktivátor makromolekulák és liposzómák *in vivo* alkalmazása minőségileg hasonló, de mennyiségileg különböző túlérzékenységi tüneteket okoztak, beleértve a tranziens hipotenziót, a plazma TXB₂ koncentrációjának növekedését, trombocitopéniát és leukopéniát, amelyet a CVF és nagy dózisú AmBisome kezelés esetén kompenzáló leukocitózis követett. Patkányokban a kezdeti vérnyomáscsökkenés jelentős C fogyasztással és a vér C3a koncentrációjának emelkedésével járt, ami a C aktiváció részvételét jelzi a keringési változásokban, legalábbis a zymosan, CVF és AmBisome esetében (33. ábra). Az erős C aktiváció, amely 20–40% C3 fogyasztást jelent 10 percen belül (CVF, zymosan és nagy dózisú AmBisome kezelés után) egyértelmű összefüggést mutatott a vérnyomáscsökkenéssel, ami arra utal, hogy a C szerepet játszhat a HSR-ek kialakulásában, ha jelentős a C aktiváció. Enyhe C aktivátor liposzómák esetén (AmBisombo, PEG-2000-Chol), amelyek 10 perc alatt <15% C3 fogyasztást okoztak, a különböző mellékhatások C függősége kérdéses. Jelenleg még nem tudjuk, hogy a C aktiváció, amit a C3a koncentráció emelkedése jelez, mely

mellékhatások kialakulását segítették elő. Figyelemre méltó, hogy bár nem volt jelentős a C aktiváló és vérnyomáscsökkentő hatásuk, az AmBisombo és PEG-2000-Chol liposzómák jelentős leukopéniát és TXB₂ felszabadulást okoztak, valamint a PEG-2000-Chol liposzómák beadása után jelentős trombocitopéniát tapasztaltunk. Ezek az eltérő hatások a C függő és C független folyamatok egyidejű jelenlétére utalnak a HSR-ekben (48, 32).

Ami a tiszta CIPA mechanizmus lehetőségét illeti, hangsúlyozni kell, hogy a C3 fogyás hiánya nem zárja ki a C aktiválást, csak az erős C aktiválás hiányát jelzi, amely láthatóan kimeríti a C3-at. Ez azért van, mert a C3-nak magas a plazma koncentrációja, amelynek csökkentése nagymértékű C aktiválást igényel. Így a C3 fogyás hiánya nem zárja ki az anafilatoxin termelés alacsony szintjét, amely biológiai hatással rendelkezik a C3 plazma koncentráció megváltoztatása nélkül. Ebben a szakaszban nem zárhatjuk ki a CARPA kis, de fontos hozzájárulását a HSR-ekhez, amelyek látszólag főként a CIPA mechanizmusra vezethetők vissza. Ez a feltételezés összhangban van azzal a megállapítással, hogy az AmBisombo és az AmBisome hasonló emelkedést idézett elő a plazma TXB₂ koncentrációban, de csak a C aktivátor AmBisome okozott szignifikáns hipotenziót, ami C aktiváláshoz kapcsolódó vérnyomáscsökkenést, és C független TXA₂ koncentráció emelkedést valószínűsít. Ismert más tanulmányokból, hogy a C aktiváció hemodinamikai hatásai patkányokban függetlenek a tromboxán felszabadulástól, ilyen például a C3a receptor agonistával okozott vérnyomásemelkedés, vagy a C5a receptor agonistákkal indukált hipotenzív hatás (51). A zymosan hipotenzív válaszát nagyrészt csökkentette a PAF antagonistá, ami a PAF jelentős szerepét igazolja, amely szintén indukálható C5a receptor agonistákkal (122). Eredményeinkre és korábbi jelentésekre alapozva azt feltételezzük, hogy a C aktiválás hozzájárul a hipotenzióhoz több különböző másodlagos útvonalon keresztül, amelyek magukba foglalják a különböző membrán receptorokat. Ugyanez vonatkozik a fehérvérsejt szám változásaira is, mivel kimutatták, hogy a C3aR stimulálásra nő, míg a C5aR stimulációja pedig csökkenti a fehérvérsejtek számát patkányokban (51, 50).

Ami a TXB₂ felszabadulásának C függőségét illeti, a C gátló szolúbilis C receptor 1 kezelés, és a C kimerítése a CVF előkezelés után a liposzómás hemoglobinnal okozott plazma TXB₂ koncentráció emelkedés elmaradt, ami ok-okozati összefüggést igazol (24). Ezzel szemben a PEG2000-Chol TXB₂ emelő hatása C függetlennek tűnik a jelen

tanulmányban. Hasonlóképpen, a CVF előkezelés megakadályozta a liposzómába csomagolt hemoglobinnal kiváltott trombocitopéniát és a vérlemezkék kitapadását a tüdőben és a májban, ezzel szemben a jelen vizsgálatban a PEG2000-Chol trombocitopéniás hatást váltott ki igazolható C aktiválás, pontosabban C3a koncentráció emelkedés hiánya ellenére is (123).

Eredményeink együttesen összhangban vannak a C aktivátor liposzómákkal és más nano-gyógyszerekkel az erre érzékeny betegekben, de a C aktiváció szerepére a HSR reakciók során megfigyelt tünetek kiváltására vonatkozó megállapításokat, azzal a megkötéssel fogadhatjuk el, hogy a C aktiválás mértéke meghatározó, és csak a kiterjedt C aktiválás tekinthető a HSR fő okának.

Hasonló következtetést vontak le egy liposzómás doxorubicinnel (Doxil) végzett klinikai vizsgálatban, amelyben szignifikáns korrelációt mutattak ki a súlyos HSR tünetek és a C aktiváció között, de csak olyan betegeknek, akiknél a C terminális komplex, a C aktiváció végtermékének (sC5b-9) jelentősen emelkedett (63). Hasonlóképpen, legutóbb szoros összefüggést mutattunk ki a Doxillal kiváltott C aktiváció és a sertések pseudo-anafilaxiája között, amikor az állatokat immunizálással érzékenyítették C aktivációra, növelve a vér anti-PEG antitest szintjét (124).

Ezek az eredmények illeszkednek a HSR-k „Double hit” hipotéziséhez, amely azt állítja, hogy a HSR tünetek széles spektruma tükrözi a C függő és a C független hatásokat az allergia kialakulásában részt vevő különböző sejtekben. A CARPA és a CIPA relatív hozzájárulása eltérő lehet a különböző gyógyszerek és állatmodellek esetében, és a kísérleti körülményektől is függhet (124, 32). Nem hangsúlyozható eléggé, hogy egy nagyon összetett mechanizmusról van szó. Ha abból indulunk ki, hogy a CVF minden CARPA tünetet kivált, pedig a CVF tisztán C aktivátor, akkor arra a következtetésre kell jutnunk, hogy minden mellékhatás a C aktiváció következménye. Ezzel szemben számos nano-készítmény mérhető C aktiváció hiánya ellenére is hasonló mellékhatásokat okoz, vagyis ugyanazokat a mellékhatásokat C független mechanizmusok is előidézhetik.

Ennek a vizsgálatnak egyik korlátja az, hogy a globális komplement aktiváció kimutatása szempontjából nem kellően szenzitív C3 fogyasztást mértük, ahelyett, hogy az anafilatoxin (C3a, C5a) koncentrációt, az opszonizáció hasadási termékeket (C3b és származékait), az aktiválási útvonal markereket (Bb, C4d) vagy más C aktiválási melléktermékeket mértünk volna, amelyek hatással lehetnek a HSR tünetek kiváltására

(124). Nem vizsgáltuk a C független változások mechanizmusát a lehetséges útvonalak nagy száma miatt (124, 125). Továbbá, a PEG-2000-Chol liposzómák nem jelentős C aktivációját kimutató jelenlegi *in vivo* patkányvizsgálatban levont következtetés ellentmond korábbi jelentésünk eredményének, amelyikben ezek a liposzómák erős C aktivátoroknak bizonyultak a humán szérumban *in vitro* (84). Az ilyen ellentétes eredmények valószínűleg a különböző fajok eltérő érzékenysége miatt jöhetnek létre. Az ezekkel a kérdésekkel foglalkozó további kísérletek remélhetőleg több fényt derítenek a CARPA/CIPA kettősség molekuláris részleteire a HSR-ben.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A patkányban elvégzett kísérletekben két komplement (C) aktivátor és néhány liposzómás készítmény hatását vizsgáltuk azzal a céllal, hogy az egyes liposzómás készítmények hatékonyságát és a kezelések hatására bekövetkező mellékhatásokat megismerjük és egymáshoz hasonlítsuk. Nem terveztük a mellékhatások mechanizmusának megismerését, tehát nem próbáltuk feltárni, hogy C aktiváció melyik mellékhatás kiváltásában és milyen mértékben felelős. Így a C aktiváció szerepére vonatkozó óvatos következtetéseket csak arra alapozva tehetünk, ha az egyes mellékhatások és a komplement aktiváció mértéke között összefüggés mutatkozott. Kimutattuk, hogy a C aktivátorok (zymosan és CVF) nagyobb mértékű C aktivációt okoztak, mint a leghatékonyabb liposzómás készítmény (AmBisome) nagy dózisa, és ezzel arányos vérnyomáscsökkenést okoztak. A C3 komplement fogyás és a vérnyomáscsökkenés korrelált egymással, így feltételezzük, hogy a vérnyomáscsökkenést elsősorban a C aktivációnak tulajdonítható. A további tünetek kiváltásához a C aktiváció valószínűleg csak akkor járul hozzá, ha a C aktiváció jelentős mértékű.

Az egérben kapott eredmények azt mutatják, hogy az Abecettel kiváltott anafilaxiás reakció legjellemzőbb tünete a szisztémás artériás nyomás átmeneti, nagymértékű emelkedése. A hipertenziós hatásnak két fázisa van, egy korai fázis, amelyet főként a TXA₂ közvetít a komplementrendszer kis hozzájárulásával, és egy második fázis, amelyet a C aktiválás a C5aR izgatásával gátol, lerövidítve ezzel a hipertenziós periódus időtartamát. A C5aR stimulálás hatására felszabaduló értágító hatású mediátorok valószínűleg a makrofágokból és vérlemezkékből származnak. Ezek az eredmények kiemelik korábbi megfigyeléseinket, miszerint az anafilaxiás reakció egy összetett mechanizmus, amelyet C függő és C független mechanizmusok közvetítenek.

A liposzómákkal okozott mellékhatások elemzése megerősítette azt az előfeltevést, hogy a rágcsálók alkalmasak HSR reakciók mechanizmusának vizsgálatára. Az eredmények transzlációs értéket képviselnek, mivel a különböző fajok immunrendszere és keringési rendszere közötti komplex interakció részleteinek megértése segíthet előre jelezni a HSR előfordulását a humán terápiában. Bár a vizsgálatban a fiziológiai változások pontos mechanizmusait nem tisztáztuk, az eredmények illeszkednek a „Double hit” hipotéziséhez, vagyis a HSR kialakulásához C függő (CARPA) és C független (CIPA) mechanizmusok aktiválódnak (33. ábra) (126, 68).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az infúziós reakció az intravénásan adagolt nano-gyógyszerek és -diagnostikumok néha súlyos, ritkán halálos mellékhatása lehet (34, 35). Az infúziós reakció már az első kezeléskor jelentkezik, nem IgE-mediált, de számos tünete hasonló az allergia tüneteéhez, ezért az infúziós reakciót pszeudoallergiának, vagy anafilaktoid reakciónak is nevezik. Szebeni és mtsai korábban felismerték a komplement rendszer szerepét, és bevezették az irodalomba a komplement aktiváción alapuló pszeudoallergia (CARPA - complement activation-related pseudoallergy) megnevezést (34, 35).

Az Európai Gyógyszerügynökség előírja a nano-gyógyszerek és -diagnostikumok immuntoxicitásának tesztelését a preklinikai fejlesztés során (36, 17, 25, 37-39) (15). Jelenleg a drága *in vivo* sertés vizsgálat az általánosan elfogadott módszer a CARPA előre jelzésére. Ezért tanulmányunkban egyrészt arra kerestünk választ, hogy az altatott patkány és egér is alkalmas-e preklinikai biztonsági vizsgálatok végzésére, másrészt megvizsgáltuk a komplement aktiváció szerepét a főbb tünetek kialakulásában (41, 38) (42).

Kimutattuk, hogy a rágcsálókban nagyobb dózisok okoznak CARPA-t, mint a sertésben. A liposzómás készítmények mellékhatás-erőssége függ a vezikulák töltésétől, formájától, a felületén elhelyezkedő anyagok minőségétől, de ezeknek a tulajdonságoknak a jelentősége eltér az egyes fajok között. A liposzómás készítmények patkányban hipotenziót, egérben hipertenziót okoztak, hasonlóan a komplement aktivátor zymosanhoz és C5A-hez. Patkányban a liposzómás készítményekkel okozott hipotenzio és komplement aktiváció között szoros korrelációt mutatunk ki, ezért a hipotenzio nagy valószínűséggel a C5a aktiváció következménye, a hematológiai hatások (trombocitopénia és leukocitózis) kialakulását részben ettől független mechanizmusok magyarázhatják. Egérben az Abelcet, egy liposzómás amfotericin B készítmény a COX-1 termékek, elsősorban a TXA₂ felszabadulás fokozása révén emelte a vérnyomást. A komplement aktiváció a C5a anafilatoxin receptor izgatásával csökkentette a vérnyomást a hipertenzio késői időszakában, lerövidítve ezzel a hipertenzios periódus időtartamát. A makrofágoknak és a vérlemezkéknek fontos szerepük van a C5aR izgatás hatására felszabaduló vérnyomáscsökkentő mediátorok termelésében. Az általunk feltárt információk segítik a nano-gyógyszerek biztonságossági vizsgálatára szolgáló

protokollok kidolgozását, és hozzájárulnak a CARPA mechanizmus részleteinek megismeréséhez.

9. SUMMARY

Infusion reaction can be a sometimes serious, rarely fatal side effect of intravenously administered nano-medicines and diagnostics. The infusion reaction occurs already at the first treatment, it is not IgE-mediated, but many of its symptoms are similar to the symptoms of allergy, which is why the infusion reaction is also called pseudoallergy or anaphylactoid reaction. Szebeni et al. recognized the role of the complement system earlier, and introduced the term complement activation-related pseudoallergy (CARPA) into the literature.

The European Medicines Agency (EMA) requires immunotoxicity testing of nano-medicines and diagnostics during preclinical development. Currently, the expensive *in vivo* pig test is the generally accepted method for predicting CARPA. In our study, we therefore looked for the answer to whether anesthetized rats and mice are suitable for performing preclinical safety tests, and, on the other hand, we studied the role of complement activation in the development of the main symptoms.

We demonstrated that higher doses cause CARPA in rodents than in pigs. The strength of the side effects of liposomal preparations depends on the surface charge of the vesicles, their shape, and the quality of the compounds located on their surface, but the importance of these properties differs among various species. The liposomal preparations caused hypotension in rats and hypertension in mice, similar to those of complement activators, zymosan and CVF. We showed a close correlation between hypotension and complement activation caused by liposomal preparations in rats, therefore, hypotension is most likely a consequence of complement activation, and the development of hematological side effects (thrombocytopenia and leukocytosis) can partly be explained by mechanisms independent of complement activation. In mice, Abelcet, a liposomal amphotericin B preparation, increased blood pressure by increasing the release of COX-1 products, primarily TXA₂. Complement activation reduced blood pressure by stimulating the C5a anaphylatoxin receptor in the late period of hypertension, thereby shortened the duration of the hypertensive period. Macrophages and platelets play an important role in the production of antihypertensive mediators released upon C5aR stimulation. The

information we have uncovered will help to develop protocols for the safety testing of nano-medicines and contribute to understanding the details of the CARPA mechanism.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Forsdyke DR. (2016) Almroth Wright, opsonins, innate immunity and the lectin pathway of complement activation: a historical perspective. *Microbes Infect*, 18: 450-459.
2. Elieh Ali Komi D, Shafaghat F, Kovanen PT, Meri S. (2020) Mast cells and complement system: Ancient interactions between components of innate immunity. *Allergy*, 75: 2818-2828.
3. Charles A Janeway J, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. (2001) *Immunobiology*, 5th edition: The Immune System in Health and Disease.
4. Varela JC, Tomlinson S. (2015) Complement: an overview for the clinician. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29: 409-427.
5. Janeway CA Jr TP, Walport M, et al. . *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science; 2001. The complement system and innate immunity., Part I.
6. De Vriese AS, Sethi S, Van Praet J, Nath KA, Fervenza FC. (2015) Kidney Disease Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway: An Etiologic Approach. *J Am Soc Nephrol*, 26: 2917-2929.
7. Szebeni J. (1998) The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 15: 57-88.
8. Szebeni J. (2001) Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 18: 567-606.
9. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Milosevits J, Bodo M, Bungler R, Alving CR. (2003) The interaction of liposomes with the complement system: in vitro and in vivo assays. *Methods Enzymol*, 373: 136-154.
10. Hamad I, Al-Hanbali O, Hunter AC, Rutt KJ, Andresen TL, Moghimi SM. (2010) Distinct polymer architecture mediates switching of complement activation pathways at the nanosphere-serum interface: implications for stealth nanoparticle engineering. *ACS Nano*, 4: 6629-6638.
11. Hamad I, Hunter AC, Szebeni J, Moghimi SM. (2008) Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process. *Mol Immunol*, 46: 225-232.
12. Banerjee, * PR, Noor H, Inamul H, Omar M, Saborni C, Snigdha B, Mohiuddin Q, Amanda EB, and Sushanta K. (2022) The Impact of Nanoparticles on the Immune System: A Gray Zone of Nanomedicine. *Journal of Immunological Sciences*, 5.
13. Bangham AD, Horne RW. (1964) Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol*, 8: 660-668.
14. Deamer D. (2009) On the origin of systems. *Systems biology, synthetic biology and the origin of life*. *EMBO Rep*, 10 Suppl 1: S1-4.
15. Deamer DW. (2008) Origins of life: How leaky were primitive cells? *Nature*, 454: 37-38.
16. Ciftcioglu N, McKay DS, Mathew G, Kajander EO. (2006) Nanobacteria: fact or fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Investig Med*, 54: 385-394.

17. Bawa RE, Szebeni J, Barenholz YC. Complement activation, immunogenicity, and immune suppression as potential side effects of liposomes. In: (szerk.), *Advances in Clinical Immunology, Medical Microbiology, COVID-19, and Big Data* (1st ed.). . Jenny Stanford Publishing., 2021.
18. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y. (1994) Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*, 54: 987-992.
19. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G. (1989) Characterization of hemodynamic, hematologic, and biochemical responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the conscious, freely moving rat. *Circ Shock*, 29: 115-132.
20. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G. (1990) Improved biological properties of synthetic distearoyl phosphatidyl choline-based liposome in the conscious rat. *Circ Shock*, 30: 207-219.
21. Rabinovici R, Rudolph AS, Vernick J, Feuerstein G. (1994) Lyophilized liposome encapsulated hemoglobin: evaluation of hemodynamic, biochemical, and hematologic responses. *Crit Care Med*, 22: 480-485.
22. Rabinovici R, Rudolph AS, Yue TL, Feuerstein G. (1990) Biological responses to liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) are improved by a PAF antagonist. *Circ Shock*, 31: 431-445.
23. Szebeni J, Wassef NM, Spielberg H, Rudolph AS, Alving CR. (1994) Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 205: 255-263.
24. Szebeni J, Spielberg H, Cliff RO, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. (1997) Complement activation and thromboxane secretion by liposome-encapsulated hemoglobin in rats in vivo: inhibition by soluble complement receptor type 1. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 25: 347-355.
25. Moghimi SM, Hamad I, Andresen TL, Jorgensen K, Szebeni J. (2006) Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. *FASEB J*, 20: 2591-2593.
26. Muschick P, Sachse A, Leike J, Wehrmann D, Krause W. (2008) Lipid Dependent Cardio- Haemodynamic Tolerability of Liposomes in Rats. *Journal of Liposome Research*, 5: 933-953.
27. Krause W, Gerlach S, Muschick P. (2000) Prevention of the hemodynamic effects of iopromide-carrying liposomes in rats and pigs. *Invest Radiol*, 35: 493-503.
28. Muschick P, Wehrmann D, Schuhmann-Giampieri G, Krause W. (1995) Cardiac and hemodynamic tolerability of iodinated contrast media in the anesthetized rat. *Invest Radiol*, 30: 745-753.
29. Otte A, Soh BK, Yoon G, Park K. (2018) Liquid crystalline drug delivery vehicles for oral and IV/subcutaneous administration of poorly soluble (and soluble) drugs. *Int J Pharm*, 539: 175-183.
30. Watermann A, Brieger J. (2017) Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer. *Nanomaterials* (Basel), 7.
31. He K, Tang M. (2018) Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. *Chem Biol Interact*, 295: 13-19.

32. Szebeni J. (2018) Mechanism of nanoparticle-induced hypersensitivity in pigs: complement or not complement? *Drug Discov Today*, 23: 487-492.
33. Szebeni J, Simberg D, Gonzalez-Fernandez A, Barenholz Y, Dobrovolskaia MA. (2018) Roadmap and strategy for overcoming infusion reactions to nanomedicines. *Nat Nanotechnol*, 13: 1100-1108.
34. Szebeni J. (2005) Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology*, 216: 106-121.
35. Szebeni J. (2014) Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals. *Mol Immunol*, 61: 163-173.
36. Andersen AJ, Hashemi SH, Andresen TL, Hunter AC, Moghimi SM. (2009) Complement: alive and kicking nanomedicines. *J Biomed Nanotechnol*, 5: 364-372.
37. Moghimi SM, Szebeni J. (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res*, 42: 463-478.
38. Szebeni J. (2012) Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions. *European Journal of Nanomedicine*, 4: 33-53.
39. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. (2011) Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 1020-1030.
40. Data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02
41. Dézsi L, Szénási G, Urbanics R, Rosivall L, Szebeni J. (2013) Cardiopulmonary and hemodynamic changes in complement activation-related pseudoallergy. *Health*, 05: 1032-1038.
42. Szebeni J, Alving CR, Rosivall L, Bunger R, Baranyi L, Bedocs P, Toth M, Barenholz Y. (2007) Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. *J Liposome Res*, 17: 107-117.
43. Dezsi L, Fulop T, Meszaros T, Szenasi G, Urbanics R, Vazsonyi C, Orfi E, Rosivall L, Nemes R, Kok RJ, Metselaar JM, Storm G, Szebeni J. (2014) Features of complement activation-related pseudoallergy to liposomes with different surface charge and PEGylation: comparison of the porcine and rat responses. *J Control Release*, 195: 2-10.
44. Piao H, Nagai S, Tsurumaki T, Niki T, Higuchi H. (2007) Potentiation by neuropeptide Y of histamine H1 receptor-mediated contraction in rat blood vessels. *Vascul Pharmacol*, 46: 260-270.
45. Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. (1998) Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med*, 188: 1895-1906.
46. Krohn CD, Reikeras O, Mollnes TE, Aasen AO. (1998) Complement activation and release of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in drained and systemic blood after major orthopaedic surgery. *Eur J Surg*, 164: 103-108.
47. Loo AS, Muhsin SA, Walsh TJ. (2013) Toxicokinetic and mechanistic basis for the safety and tolerability of liposomal amphotericin B. *Expert Opin Drug Saf*, 12: 881-895.

48. Orfi E, Meszaros T, Hennies M, Fulop T, Dezsi L, Nardocci A, Rosivall L, Hamar P, Neun BW, Dobrovolskaia MA, Szebeni J, Szenasi G. (2019) Acute physiological changes caused by complement activators and amphotericin B-containing liposomes in mice. *Int J Nanomedicine*, 14: 1563-1573.
49. Zamboni WC, Szebeni J, Kozlov SV, Lucas AT, Piscitelli JA, Dobrovolskaia MA. (2018) Animal models for analysis of immunological responses to nanomaterials: Challenges and considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, 136-137: 82-96.
50. Smedegard G, Cui LX, Hugli TE. (1989) Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. *Am J Pathol*, 135: 489-497.
51. Proctor LM, Moore TA, Monk PN, Sanderson SD, Taylor SM, Woodruff TM. (2009) Complement factors C3a and C5a have distinct hemodynamic effects in the rat. *Int Immunopharmacol*, 9: 800-806.
52. Short AJ, Paczkowski NJ, Vogen SM, Sanderson SD, Taylor SM. (1999) Response-selective C5a agonists: differential effects on neutropenia and hypotension in the rat. *Br J Pharmacol*, 128: 511-514.
53. Morganroth ML, Schoeneich SO, Till GO, Ward PA, Horvath SJ, Glovsky MM. (1990) C3a₅₇₋₇₇, a C-terminal peptide, causes thromboxane-dependent pulmonary vascular constriction in isolated perfused rat lungs. *Am Rev Respir Dis*, 141: 296-300.
54. Dézsi L, Rosivall L, Hamar P, Szebeni J, Szénási G. (2015) Rodent models of complement activation-related pseudoallergy: Inducers, symptoms, inhibitors and reaction mechanisms. *European Journal of Nanomedicine*, 7.
55. Engstrom G, Hedblad B, Berglund G, Janzon L, Lindgarde F. (2007) Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *J Hum Hypertens*, 21: 276-282.
56. Proctor LM, Strachan AJ, Woodruff TM, Mahadevan IB, Williams HM, Shiels IA, Taylor SM. (2006) Complement inhibitors selectively attenuate injury following administration of cobra venom factor to rats. *Int Immunopharmacol*, 6: 1224-1232.
57. Cugno M, Mancuso ME, Tedeschi A, Santagostino E, Lorini M, Carbonelli V, Peyvandi F, Mannucci PM. (2017) Involvement of the IgE-basophil system and mild complement activation in haemophilia B with anti-factor IX neutralizing antibodies and anaphylaxis. *Haemophilia*, 23: e348-e353.
58. Borro JM, Sole A, de la Torre M, Pastor A, Fernandez R, Saura A, Delgado M, Monte E, Gonzalez D. (2008) Efficiency and safety of inhaled amphotericin B lipid complex (Abelcet) in the prophylaxis of invasive fungal infections following lung transplantation. *Transplant Proc*, 40: 3090-3093.
59. Cook G, Franklin IM. (1999) Adverse drug reactions associated with the administration of amphotericin B lipid complex (Abelcet). *Bone Marrow Transplant*, 23: 1325-1326.
60. Furebring M, Oberg G, Sjolín J. (2000) Side-effects of amphotericin B lipid complex (Abelcet) in the Scandinavian population. *Bone Marrow Transplant*, 25: 341-343.
61. Ng TT, Denning DW. (1995) Liposomal amphotericin B (AmBisome) therapy in invasive fungal infections. Evaluation of United Kingdom compassionate use data. *Arch Intern Med*, 155: 1093-1098.

62. Schneider P, Klein RM, Dietze L, Sohngen D, Leschke M, Heyll A. (1998) Anaphylactic reaction to liposomal amphotericin (AmBisome). *Br J Haematol*, 102: 1108-1109.
63. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, Muggia FM. (2003) Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*, 14: 1430-1437.
64. Kozma GT, Mészáros T, Weiszhár Z, Schneider T, Rosta A, Urbanics R, Rosivall L, Szebeni J. (2015) Variable association of complement activation by rituximab and paclitaxel in cancer patients in vivo and in their screening serum in vitro with clinical manifestations of hypersensitivity: a pilot study. *European Journal of Nanomedicine*, 7: 289.
65. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Milosevits J, Alving CR, Bunger R. (2006) Complement activation-related cardiac anaphylaxis in pigs: role of C5a anaphylatoxin and adenosine in liposome-induced abnormalities in ECG and heart function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H1050-1058.
66. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Morse DS, Basta M, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. (2000) Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H1319-1328.
67. Szebeni J, Bedocs P, Csukas D, Rosivall L, Bunger R, Urbanics R. (2012) A porcine model of complement-mediated infusion reactions to drug carrier nanosystems and other medicines. *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 1706-1716.
68. Szebeni J, Bedocs P, Urbanics R, Bunger R, Rosivall L, Toth M, Barenholz Y. (2012) Prevention of infusion reactions to PEGylated liposomal doxorubicin via tachyphylaxis induction by placebo vesicles: a porcine model. *J Control Release*, 160: 382-387.
69. Szebeni J, Fontana JL, Wassef NM, Mongan PD, Morse DS, Dobbins DE, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. (1999) Hemodynamic changes induced by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin in pigs: a model for pseudoallergic cardiopulmonary reactions to liposomes. Role of complement and inhibition by soluble CR1 and anti-C5a antibody. *Circulation*, 99: 2302-2309.
70. Urbanics R, Bedocs P, Szebeni J. (2015) Lessons learned from the porcine CARPA model: constant and variable responses to different nanomedicines and administration protocols. *European Journal of Nanomedicine*, 7: 219.
71. Jackman JA, Meszaros T, Fulop T, Urbanics R, Szebeni J, Cho NJ. (2016) Comparison of complement activation-related pseudoallergy in miniature and domestic pigs: foundation of a validatable immune toxicity model. *Nanomedicine*, 12: 933-943.
72. Adler-moore JP, Proffitt RT. (2008) Development, Characterization, Efficacy and Mode of Action of Ambisome, A Unilamellar Liposomal Formulation of Amphotericin B. *Journal of Liposome Research*, 3: 429-450.
73. Janoff AS, Boni LT, Popescu MC, Minchey SR, Cullis PR, Madden TD, Taraschi T, Gruner SM, Shyamsunder E, Tate MW, et al. (1988) Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 6122-6126.
74. Baranyi L, Szebeni J, Sávay S, Bodo M, Basta M, Bentley T, Bunger R, Alving CR. (2003) Complement-Dependent Shock and Tissue Damage Induced by

- Intravenous Injection of Cholesterol-Enriched Liposomes in Rats. *Journal of Applied Research*, 3: 221-231.
75. Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Bathori G, Toth M, Bunger R, Barenholz Y. (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine*, 8: 176-184.
 76. Rabinovici R, Rudolph AS, Ligler FS, Smith EF, 3rd, Feuerstein G. (1992) Biological responses to exchange transfusion with liposome-encapsulated hemoglobin. *Circ Shock*, 37: 124-133.
 77. Rabinovici R, Rudolph AS, Ligler FS, Yue TL, Feuerstein G. (1990) Liposome-encapsulated hemoglobin: an oxygen-carrying fluid. *Circ Shock*, 32: 1-17.
 78. Rabinovici R, Rudolph AS, Vernick J, Feuerstein G. (1993) A new salutary resuscitative fluid: liposome encapsulated hemoglobin/hypertonic saline solution. *J Trauma*, 35: 121-126; discussion 126-127.
 79. Rudolph A. (1997) Red Blood Cell Substitutes. *Encapsulation of Hemoglobin in Liposomes Chapter 12* :24.
 80. Rudolph AS, Cliff R, Kwasiborski V, Neville L, Abdullah F, Rabinovici R. (1997) Liposome-encapsulated hemoglobin modulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in mice. *Crit Care Med*, 25: 460-468.
 81. Borsodi K, Balla H, Molnar PJ, Lenart A, Kenessey I, Horvath A, Keszthelyi A, Romics M, Majoros A, Nyirady P, Offermanns S, Benyo Z. (2021) Signaling Pathways Mediating Bradykinin-Induced Contraction in Murine and Human Detrusor Muscle. *Front Med (Lausanne)*, 8: 745638.
 82. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappégard KT, Kohl J, Lambris JD. (2002) Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood*, 100: 1869-1877.
 83. Cedrone E, Neun BW, Rodriguez J, Vermilya A, Clogston JD, McNeil SE, Barenholz Y, Szebeni J, Dobrovolskaia MA. (2017) Anticoagulants Influence the Performance of In Vitro Assays Intended for Characterization of Nanotechnology-Based Formulations. *Molecules*, 23.
 84. van den Hoven JM, Nemes R, Metselaar JM, Nuijen B, Beijnen JH, Storm G, Szebeni J. (2013) Complement activation by PEGylated liposomes containing prednisolone. *Eur J Pharm Sci*, 49: 265-271.
 85. Catella F, Healy D, Lawson JA, FitzGerald GA. (1986) 11-Dehydrothromboxane B2: a quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 5861-5865.
 86. Meszaros T, Kozma GT, Shimizu T, Miyahara K, Turjeman K, Ishida T, Barenholz Y, Urbanics R, Szebeni J. (2018) Involvement of complement activation in the pulmonary vasoactivity of polystyrene nanoparticles in pigs: unique surface properties underlying alternative pathway activation and instant opsonization. *Int J Nanomedicine*, 13: 6345-6357.
 87. Noris M, Remuzzi G. (2013) Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol*, 33: 479-492.
 88. Ringden O, Jonsson V, Hansen M, Tollemar J, Jacobsen N. (1998) Severe and common side-effects of amphotericin B lipid complex (Abelcet). *Bone Marrow Transplant*, 22: 733-734.

89. Rowles DM, Fraser SL. (1999) Amphotericin B lipid complex (ABLC)-associated hypertension: case report and review. *Clin Infect Dis*, 29: 1564-1565.
90. Consideration of Sex as a Biological Variable in NIH-funded Research. (2015).<https://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/not-od-15-102.html>
91. Staehr M, Madsen K, Vanhoutte PM, Hansen PB, Jensen BL. (2011) Disruption of COX-2 and eNOS does not confer protection from cardiovascular failure in lipopolysaccharide-treated conscious mice and isolated vascular rings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301: R412-420.
92. Xu H, Fang B, Du S, Wang S, Li Q, Jia X, Bao C, Ye L, Sui X, Qian L, Luan Z, Yang G, Zheng F, Wang N, Chen L, Zhang X, Guan Y. (2020) Endothelial cell prostaglandin E2 receptor EP4 is essential for blood pressure homeostasis. *JCI Insight*, 5.
93. Song WL, Ricciotti E, Liang X, Grosser T, Grant GR, FitzGerald GA. (2018) Lipocalin-Like Prostaglandin D Synthase but Not Hemopoietic Prostaglandin D Synthase Deletion Causes Hypertension and Accelerates Thrombogenesis in Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 367: 425-432.
94. Milosevits G, Meszaros T, Orfi E, Bakos T, Garami M, Kovacs G, Dezsi L, Hamar P, Gyorffy B, Szabo A, Szenasi G, Szebeni J. (2021) Complement-mediated hypersensitivity reactions to an amphotericin B-containing lipid complex (Abelcet) in pediatric patients and anesthetized rats: Benefits of slow infusion. *Nanomedicine*, 34: 102366.
95. Viana IMO, Grenier P, Defrene J, Barabe F, Lima EM, Bertrand N. (2020) Role of the complement cascade in the biological fate of liposomes in rodents. *Nanoscale*, 12: 18875-18884.
96. Kerkovits NM, Janovicz A, Ruisanchez É, Órfi E, Gál P, Szénási G, Benyó Z. (2019) Anaphylatoxin C3a induces vasoconstriction and hypertension mediated by thromboxane A2 in mice. 33: 1b510-1b510.
97. Ando Y, Oku T, Tsuji T. (2016) Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by macrophages in response to bacterial endotoxin. *Platelets*, 27: 344-350.
98. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzman M, Assinger A. (2016) Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus Med Hemother*, 43: 78-88.
99. Li Y, Ryan J, Xu F, Vostal JG. (2019) Macrophage Depletion Mitigates Platelet Aggregate Formation in Splenic Marginal Zone and Alleviates LPS-Associated Thrombocytopenia in Rats. *Front Med (Lausanne)*, 6: 300.
100. Linke B, Schreiber Y, Picard-Willems B, Slattery P, Nusing RM, Harder S, Geisslinger G, Scholich K. (2017) Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE(2) and Cytokines. *Mediators Inflamm*, 2017: 1463216.
101. Rossaint J, Thomas K, Mersmann S, Skupski J, Margraf A, Tekath T, Jouvencé CC, Dalli J, Hidalgo A, Meuth SG, Soehnlein O, Zarbock A. (2021) Platelets orchestrate the resolution of pulmonary inflammation in mice by T reg cell repositioning and macrophage education. *J Exp Med*, 218.
102. Uchiyama R, Toyoda E, Maehara M, Wasai S, Omura H, Watanabe M, Sato M. (2021) Effect of Platelet-Rich Plasma on M1/M2 Macrophage Polarization. *Int J Mol Sci*, 22.

103. Dézsi L, Rosivall L, Hamar P, Szebeni J, Szénási G. (2015) Rodent models of complement activation-related pseudoallergy: Inducers, symptoms, inhibitors and reaction mechanisms. *European Journal of Nanomedicine*, 7: 15.
104. Ehrentraut S, Frede S, Stapel H, Mengden T, Grohe C, Fandrey J, Meyer R, Baumgarten G. (2007) Antagonism of lipopolysaccharide-induced blood pressure attenuation and vascular contractility. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 2170-2176.
105. Bellou A, Lambert H, Gillois P, Montemont C, Gerard P, Vauthier E, Sainte-Laudy J, Longrois D, Gueant JL, Mallie JP. (2003) Constitutive nitric oxide synthase inhibition combined with histamine and serotonin receptor blockade improves the initial ovalbumin-induced arterial hypotension but decreases the survival time in brown norway rats anaphylactic shock. *Shock*, 19: 71-78.
106. Tacquard C, Oulehri W, Collange O, Garvey LH, Nicoll S, Tuzin N, Geny B, Mertes PM. (2020) Treatment with a platelet-activating factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock. *Clin Exp Allergy*, 50: 383-390.
107. Nakamura T, Fujiwara Y, Yamada R, Fujii W, Hamabata T, Lee MY, Maeda S, Aritake K, Roers A, Sessa WC, Nakamura M, Urade Y, Murata T. (2017) Mast cell-derived prostaglandin D(2) attenuates anaphylactic reactions in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 140: 630-632 e639.
108. Hui Y, Cheng Y, Smalera I, Jian W, Goldhahn L, Fitzgerald GA, Funk CD. (2004) Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. *Circulation*, 110: 3360-3366.
109. Giannattasio G, Lai Y, Granata F, Mounier CM, Nallan L, Oslund R, Leslie CC, Marone G, Lambeau G, Gelb MH, Triggiani M. (2009) Expression of phospholipases A2 in primary human lung macrophages: role of cytosolic phospholipase A2-alpha in arachidonic acid release and platelet activating factor synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1791: 92-102.
110. Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Shinoki N, Sakon M, Ikeda Y, Monden M. (1997) The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, 239: 101-105.
111. Jiao D, Liu Y, Lu X, Liu B, Pan Q, Liu Y, Liu Y, Zhu P, Fu N. (2014) Macrophages are the dominant effector cells responsible for IgG-mediated passive systemic anaphylaxis challenged by natural protein antigen in BALB/c and C57BL/6 mice. *Cell Immunol*, 289: 97-105.
112. Ambisome, Package label. www.ambisome.com, (2009)
113. Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, Pempinello R, Scott S, Raimondi F, Cascio A, et al. (1994) Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q J Med*, 87: 75-81.
114. Heinemann V, Bosse D, Jehn U, Kahny B, Wachholz K, Debus A, Scholz P, Kolb HJ, Wilmanns W. (1997) Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 1275-1280.

115. Meunier F, Prentice HG, Ringden O. (1991) Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J Antimicrob Chemother*, 28 Suppl B: 83-91.
116. Mills W, Chopra R, Linch DC, Goldstone AH. (1994) Liposomal amphotericin B in the treatment of fungal infections in neutropenic patients: a single-centre experience of 133 episodes in 116 patients. *Br J Haematol*, 86: 754-760.
117. Seaman J, Boer C, Wilkinson R, de Jong J, de Wilde E, Sondorp E, Davidson R. (1995) Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. *Clin Infect Dis*, 21: 188-193.
118. Tollemar J, Hockerstedt K, Ericzon BG, Jalanko H, Ringden O. (1995) Prophylaxis with liposomal amphotericin B (AmBisome) prevents fungal infections in liver transplant recipients: long-term results of a randomized, placebo-controlled trial. *Transplant Proc*, 27: 1195-1198.
119. Gaca JG, Palestrant D, Lukes DJ, Olausson M, Parker W, Davis RD, Jr. (2003) Prevention of acute lung injury in swine: depletion of pulmonary intravascular macrophages using liposomal clodronate. *J Surg Res*, 112: 19-25.
120. Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B. (2012) Pulmonary intravascular macrophages and lung health: what are we missing? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302: L498-503.
121. Sierra MA, Carrasco L, Gomez-Villamandos JC, Martin de las Mulas J, Mendez A, Jover A. (1990) Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence. *J Comp Pathol*, 102: 323-334.
122. Damas J. (1991) Involvement of platelet-activating factor in the hypotensive response to zymosan in rats. *J Lipid Mediat*, 3: 333-344.
123. Goins B, Phillips WT, Klipper R, Rudolph AS. (1997) Role of complement in rats injected with liposome-encapsulated hemoglobin. *J Surg Res*, 68: 99-105.
124. Kozma GT, Meszaros T, Vashegyi I, Fulop T, Orfi E, Dezsi L, Rosivall L, Bavli Y, Urbanics R, Mollnes TE, Barenholz Y, Szebeni J. (2019) Pseudo-anaphylaxis to Polyethylene Glycol (PEG)-Coated Liposomes: Roles of Anti-PEG IgM and Complement Activation in a Porcine Model of Human Infusion Reactions. *ACS Nano*, 13: 9315-9324.
125. Wibroe PP, Anselmo AC, Nilsson PH, Sarode A, Gupta V, Urbanics R, Szebeni J, Hunter AC, Mitragotri S, Mollnes TE, Moghimi SM. (2017) Bypassing adverse injection reactions to nanoparticles through shape modification and attachment to erythrocytes. *Nat Nanotechnol*, 12: 589-594.
126. Szebeni J. (2014) Complement activation-related pseudoallergy: A stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals. *Molecular Immunology*, 61: 163-173.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek témájához kapcsolódó közlemények:

- I. *Dezsi L, Fülöp T, Mészáros T, Szénási G, Urbanics R, Vázsonyi C, Órfi E, Rosivall L, Nemes R, Kok RJ, Metselaar JM, Storm G, Szebeni J. (2014)*

Features of complement activation-related pseudoallergy to liposomes with different surface charge and PEGylation: Comparison of the porcine and rat responses.

JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 195: 2-10. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.08.009 IF: 7,705

II. *Dézi L, Mészáros T, Órfi E, Fülöp T, Hennies M, Rosivall L, Hamar P, Szebeni J, Szénási G.* (2019)

Complement Activation-Related Pathophysiological Changes in Anesthetized Rats: Activator-Dependent Variations of Symptoms and Mediators of Pseudoallergy.

MOLECULES, 24. doi: 10.3390/molecules24183283 IF: 3,267

III. *Kozma GT, Mészáros T, Vashegyi I, Fülöp T, Órfi E, Dézi L, Rosivall L, Bavli Y, Urbanics R, Mollnes TE, Barenholz Y, Szebeni J.* (2019)

Pseudo-anaphylaxis to Polyethylene Glycol (PEG)-Coated Liposomes: Roles of Anti-PEG IgM and Complement Activation in a Porcine Model of Human Infusion Reactions.

ACS NANO, 13: 9315-9324. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03942> Epub 2019 Aug 6. IF: 14,588

IV. *Órfi E, Mészáros T, Hennies M, Fülöp T, Dézi L, Nardocci A, Rosivall L, Hamar P, Neun BW, Dobrovolskaia MA, Szebeni J, Szénási G.* (2019)

Acute physiological changes caused by complement activators and amphotericin B-containing liposomes in mice.

INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, 14: 1563-1573. doi: 10.2147/IJN.S187139 IF: 5,115

V. *Milosevits G, Mészáros T, Órfi E, Bakos T, Garami M, Kovács G, Dézi L, Hamar P, Györffy B, Szabó A, Szénási G, Szebeni J.* (2021)

Complement-mediated hypersensitivity reactions to an amphotericin B-containing lipid complex (Abelcet) in pediatric patients and anesthetized rats: Benefits of slow infusion.

NANOMEDICINE-NANOTECHNOLOGY BIOLOGY AND MEDICINE, 34. doi:
10.1016/j.nano.2021.102366 IF 2021.: 6,458

VI. **Órfi E, Hricisák L, Dézsi L, Hamar P, Benyó Z, Szebeni J, Szénási G.** (2022)

The Hypertensive Effect of Amphotericin B-Containing Liposomes (Abelcet) in Mice:
Dissecting the Roles of C3a and C5a Anaphylatoxins, Macrophages and
Thromboxane.

BIOMEDICINES: NANOTECHNOLOGY BIOLOGY AND MEDICINE 34, Paper:
102366, 7 p. (2021) doi: 10.3390/biomedicines10071764 IF 2021.: 4,757

Egyéb közlemények:

I. **Órfi E, Szebeni J.** (2016)

The immune system of the gut and potential adverse effects of oral nanocarriers on its
function.

ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 106: 402-409. doi:
10.1016/j.addr.2016.09.009 IF: 11,764

II. **Unterweger H, Janko C, Schwarz M, Dézsi L, Urbanics R, Matuszak J, Órfi E,
Fülöp T, Bäuerle T, Szebeni J, Journé C, Boccaccini AR, Alexiou C, Lyer S, Cicha
I.** (2017)

Non-Immunogenic Dextran-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. A
Biocompatible, Size-Tunable Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging.

INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, 12: 5223-5238. doi:
<https://doi.org/10.2147/IJN.S138108> IF: 4,370

Előadások/poszterek saját témában

1.

*László, Dézsi ; Rudolf, Urbanics ; Tamás, Mészáros ; Csenge, Vázsonyi ; Tamás, Fülöp
; Erik, Órfi ; László, Rosivall ; János, Szebeni ; Gábor, Szénási*

Cardiovascular manifestations of complement activation-related pseudoallergy following
administration of liposomal nanomedicines

IN: FEDERATION OF EUROPEAN PHYSIOLOGICAL SOCIETES (FEPS)
CONGRESS (2014)

p. P4.27

2.

Órfi, Erik

AmBisome által kiváltott, komplement által közvetített pszeudoallergiás reakció
(CARPA) vizsgálata in vivo patkány modellen

IN: SEMMELWEIS EGYETEM ORVOS-, FOGORVOS- ÉS GYÓGYSZERÉSZ-
TUDOMÁNYI DIÁKKÖRI KONFERENCIA (2015)

3.

*László, Dézsi ; Erik, Órfi ; Tamás, Mészáros ; Tamás, Fülöp ; Gábor, Szénási ; János,
Szebeni*

Comparison of the Animal Models of Complement Activation Related Pseudoallergy

IN: CLINAM - EUROPEAN FOUNDATION FOR CLINICAL NANOMEDICINE,
BASEL (2016)

4.

*Erik, Órfi ; László, Dézsi ; Tamás, Mészáros ; Tamás, Fülöp ; László, Rosivall ; János,
Szebeni ; Gábor, Szénási*

Characteristics of complement activation-related pseudoallergy of liposomal nanodrugs
in NMRI mice

IN: CLINAM - EUROPEAN FOUNDATION FOR CLINICAL NANOMEDICINE,
BASEL (2016)

5.

*Dézsi, László ; Órfi, Erik ; Mészáros, Tamás ; Fülöp, Tamás ; Rosivall, László ; Szebeni,
János ; Szénási, Gábor*

Komplement aktiváció által kiváltott pszeudoallergia (CARPA) egérben: zymosan és
liposzómás amphotericin b hemodinamikai és hematológiai hatásai

IN: FAMÉ 2016 : MAGYAR FARMAKOLÓGIAI, ANATÓMUS,
MIKROCIRKULÁCIÓS ÉS ÉLETTANI TÁRSASÁGOK KÖZÖS
TUDOMÁNYOS KONFERENCIÁJA (2016)

p. 45 , 1 p.

6.

*Dézsai, László ; Mészáros, Tamás ; Fülöp, Tamás ; Őrfi, Erik ; Rosivall, László ; Szénási,
Gábor ; Szebeni, János*

Nanomedicinák pseudoallergiás reakciói (CARPA): Kardiovaszkuláris és immunológiai
válaszok

IN: MAGYAR HAEMORHEOLOGIAI TÁRSASÁG, A MAGYAR
MIKROCIRKULÁCIÓS ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIAI TÁRSASÁG ÉS A
MAGYAR SZABADGYÖKKUTATÓ TÁRSASÁG V. KÖZÖS
KONGRESSZUSA. (2016)

7.

*Szénási, Gábor ; Mészáros, Tamás ; Mark, Hennies ; Fülöp, Tamás ; Őrfi, Erik ; Rosivall,
László ; Szebeni, János ; Dézsai, László*

Nanogyógyszerek pseudoallergiás reakciói patkányban

IN: A MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG ÉS A MAGYAR MIKROCIRKULÁCIÓS
ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIAI TÁRSASÁG KÖZÖS VÁNDORGYŰLÉSE
(2017)

p. S18.3

8.

*Őrfi, Erik ; Mészáros, Tamás ; Fülöp, Tamás ; Dézsai, László ; Rosivall, László ; Mark,
Hennies ; Szebeni, János ; Szénási, Gábor*

Liposzómákkal okozott pseudoallergiás reakció egérben

IN: A MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG ÉS A MAGYAR MIKROCIRKULÁCIÓS
ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIAI TÁRSASÁG KÖZÖS VÁNDORGYŰLÉSE
(2017)

p. S18.4

9.

*Szénási, Gábor ; **Órfi, Erik** ; Mészáros, Tamás ; Dézsi, László ; Fülöp, Tamás ; Rosivall, László ; Mark, Hennies ; Szebeni, János*

A komplement rendszer szerepe a pszeudoallergiában, egérben

IN: MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG 2018. ÉVI VÁNDORGYŰLÉSE : ELŐADÁS
ÉS POSZTER ABSZTRAKTOK (2018)

132 P. P. E15

10.

***Órfi, Erik** ; Mészáros, Tamás ; Dézsi, László ; Fülöp, Tamás ; Rosivall, László ; Szebeni, János ; Szénási, Gábor*

Liposzomás készítményekkel okozott pszeudoallergia és a komplement aktiváció hatásainak összehasonlítása egérben

IN: MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG 2018. ÉVI VÁNDORGYŰLÉSE: ELŐADÁS
ÉS POSZTER ABSZTRAKTOK (2018)

132 p. p. P1.66

11.

***Erik, Órfi** ; Tamás, Mészáros ; Mark, Hennies ; Tamás, Fülöp ; László, Dézsi ; László, Rosivall*

The role of complement in the adverse physiological effects of Abelcet and AmBisome,
Part 1.

IN: CLINAM - EUROPEAN FOUNDATION FOR CLINICAL NANOMEDICINE,
BASEL (2018)

12.

*Gábor, Szénási ; **Erik, Órfi** ; Tamás, Mészáros ; Mark, Hennies ; Tamás, Fülöp ; László, Dézsi*

Anaphylatoxin-dependent and independent circulatory changes in mice caused by
complement activators and amphotericin-B containing liposomes. Part 2

IN: CLINAM - EUROPEAN FOUNDATION FOR CLINICAL NANOMEDICINE,
BASEL (2018)

13.

*Szénási, Gábor ; **Órfi, Erik** ; Mészáros, Tamás ; Fülöp, Tamás ; Hricisák, László ;
Hamar, Péter ; Rosivall, László ; Dézsi, László ; Benyó, Zoltán ; Szebeni, János*
A tromboxán szerepe a komplement aktiválók és liposzómák hipertenzív hatásában,
egérben

IN: MAGYAR KARDIOLÓGUSOK TÁRSASÁGA TUDOMÁNYOS
KONGRESSZUSA, BALATONFÜRED, (2019)

14.

*Nóra, Melinda Kerkovits ; **Erik, Órfi** ; Éva, Ruisanchez ; Gábor, Szénási ; Zoltán, Benyó*
The C3a-induced vasoconstriction is mediated by thromboxane A2 in mouse thoracic
aorta

IN: EXPERIMENTAL BIOLOGY MEETING, ORLANDO, FLORIDA (2019)

15.

*Kerkovits, Nóra Melinda ; Janovicz, Anna ; Ruisanchez, Éva ; **Órfi, Erik** ; Gál, Péter ;
Szénási, Gábor ; Benyó, Zoltán*
Anaphylatoxin C3a induces vasoconstriction and hypertension mediated by thromboxane
A2 in mice

FASEB JOURNAL 33 : 51 Paper: DOI: 10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.lb510 , 1
p. (2019)

16.

*Tamás, Bakos ; **Erik, Órfi** ; Tamás, Mészáros ; Gergely, Milosevits ; Domokos, Csukás ;
László, Rosivall ; Péter, Hamar ; László, Dézsi ; János, Szebeni ; Gábor, Szénási*
Complement Activation-Related Pseudoallergy (CARPA) in Rats; The Example of
Liposomal Amphotericin-B (AmBisome)

ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 91 : 3-4 pp. 175-176. Paper: P-07 , 2 p.
(2021)

Előadások/poszterek egyéb témában:

1.

László, Dézsi ; Tamás, Mészáros ; Tamás, Fülöp ; Gábor, Szénási ; Rudolf, Urbanics ; Csenge, Vázsonyi ; Erik, Órfi ; László, Rosivall ; Réka, Nemes ; Robbert, Jan Kok et al.

Immune toxicological behaviour of liposomes with different surface charge and pegylation in porcine and rat models of complement activation-related pseudoallergy

IN: CLINAM - EUROPEAN FOUNDATION FOR CLINICAL NANOMEDICINE, BASEL (2014)

2.

Szebeni, János ; Dézsi, László ; Fülöp, Tamás ; Mészáros, Tamás ; Kozma, Gergely ; Vashegyi, Ildikó ; Órfi, Erik ; Rosivall, László ; Szénási, Gábor ; Urbanics, Rudolf

Complement aktivációs pseudoallergia: modern farmakonok stressz reakciója a vérben

IN: A MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG ÉS A MAGYAR MIKROCIRKULÁCIÓS ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIAI TÁRSASÁG KÖZÖS VÁNDORGYŰLÉSE (2017)

p. S18.1

3.

Kozma, Gergely Tibor ; Mészáros, Tamás ; Vashegyi, Ildikó ; Órfi, Erik ; Dézsi, László ; Urbanics, Rudolf ; Szebeni, János

Anti-PEG antitestek: nyomozás egy kéretlen vakcina ügyében

IN: A MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG ÉS A MAGYAR MIKROCIRKULÁCIÓS ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIAI TÁRSASÁG KÖZÖS VÁNDORGYŰLÉSE (2017)

p. S18.5

4.

*Dézi, László ; Harald, Unterweger ; Fülöp, Tamás ; **Órfi, Erik** ; Urbanics, Rudolf ; Jan, Zaloga ; Rosivall, László ; Christoph, Alexiou ; Szabeni, János*

Vas tartalmú nanorészecskékre adott hiperszenzitivitási reakció malacban

IN: A MAGYAR ÉLETTANI TÁRSASÁG ÉS A MAGYAR MIKROCIRKULÁCIÓS
ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIAI TÁRSASÁG KÖZÖS VÁNDORGYŰLÉSE
(2017)

p. S.18.7

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A Semmelweis Egyetem Doktori Iskoláját Prof. Szebeni János vezetésével kezdtem meg ösztöndíjas hallgatóként, a Nanomedicina Kutató és Oktató Központban. Ezúttal köszönöm, hogy lehetővé tette számomra, hogy az ott folyó projektmunkákban kutató munkát végezhessenek, és tevékenységemet rendszeres szakmai érdeklődésével bátorította és témavezetésem elvállalta.

Köszönöm Dr. Szénási Gábornak, a sokirányú szakmai, gyakorlati és elméleti útmutatást, valamint, hogy a nehezebb időszakokban is motiválni tudott, és bármikor számítani lehetett rá, akármikor szükségem volt erre. Gábor hallgatójaként megnyugtató volt dolgozni, mindig kijelöltünk egy reálisan megvalósítható irányt, ami felé haladni tudtam, így gördülékenyen folytak a kísérletek a lehetőségekhez képest.

Köszönöm prof. Rosivall Lászlónak, PhD éveim alatt bátorító és támogató hozzáállását.

Köszönöm prof. Benyó Zoltánnak a kiegészítő kísérletek elvégzéséhez szükséges háttér biztosítását.

Köszönöm Dr. Mészáros Tamásnak szakmai támogatását és segítségét az *in vitro* munkák megvalósításában, valamint az ELISA assayhez adott útmutatásait.

Köszönöm a SEROSCIENCE Kft. kísérletes munkám elvégzéséhez nyújtott támogatását.

Köszönöm a Nanomedicina Kutató és Oktató Központ minden munkatársának a munkámhoz nyújtott sokirányú segítséget.

Végül köszönöm Dr. Dézsi Lászlónak, aki elindított ezen a területen, és már TDK alatt gyakorlati és elméleti képzést, útmutatást nyújtott nekem.