

**Komplement aktivációs pseudoallergia: Biofizikai,  
immunológiai és fiziológiai vizsgálatok a mechanizmus  
felderítésére**

Doktori tézisek

**Mészáros Tamás**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Szebeni János, D.Sc., egyetemi tanár
- Hivatalos bírálók: Dr. Jedlovsky-Hajdú Angéla, Ph.D., tud. munkatárs  
Dr. Prechl József, Ph.D., tud. főmunkatárs
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zrínyi Miklós, az MTA tagja, egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dobó József, Ph.D., tud. főmunkatárs  
Dr. Mócsai Attila, D.Sc., egyetemi tanár

Budapest  
2018

# 1 Bevezetés

A nanotechnológia korunk egyik ipari forradalma, amely a  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  m tartományban igyekszik az anyag megismerésére, formálására és előállítására. A részecskeméret ezen tartományában az anyagok különleges fizikai tulajdonságokat vesznek fel és más törvények érvényesek rájuk, mint a magasabb dimenziókban. A „nanotechnológia” kifejezést először Taniguchi használta 1974-ben. Az azóta eltelt idő óta robbanásszerű fejlődés tapasztalható, mind az ezzel foglalkozók számában (több száz kutatóintézet és cég), mind az ezzel kapcsolatos cikkek és szabadalmak tekintetében (>100 ezer), valamint a nanotechnológiai termékek kereskedelmi forgalmát illetően (több százmillió euró 2015-ben). Ezt felismerve már az Európai Unió is egy nanotechnológiai kutatásokra vonatkozó új etikai kódexet javasolt, amely nagyobb felelősséget ruház ezen termékek kutatóira és fejlesztőire a biztonság garantálása érdekében.

Egyik leggyorsabban fejlődő területe a nanomedicina, amely a nanotechnológiát alkalmazza az elméleti és gyakorlati orvostudományban a diagnózis, a terápia, a betegségmegelőzés és kontroll érdekében. A nanotechnológia alkalmazása nagymértékben képes javítani a gyógyszerek olyan tulajdonságait, mint az oldhatóság vagy a farmakokinetika, elősegíti a hatékonyabb célzást és a mellékhatások csökkentését, valamint olyan új alkalmazások bevezetésére ad lehetőséget, mint a multifunkcionális gyógyszerek és a theragnosztikumok.

A nanomedicina fejlődése azonban különféle kihívásokkal szembesül. Az egyik legfontosabb klinikai probléma a nanorészecskén alapú gyógyszerek intravénás alkalmazásakor

gyakran fellépő túlérzékenységi reakció (HSR), amelyeket "infúziós" vagy "anafilaktoid" reakcióknak is neveznek. Ez a jelenség számos modern nanomedicina – többek között a liposzómák, micelláris gyógyszerek és terápiás ellenanyagok - terápiás használatának egyik fő gátja lehet. Ezeknek a HSR-eknek közös jellemzője, hogy IgE nem játszik szerepet, és általában a tünetei valamint az alapjául szolgáló mechanizmusok nem illszekdnek a klasszikus „I-es típusú” túlérzékenységi osztályba, ezért inkább a „pszeudoallergia” kategóriájába tartoznak. Mivel a komplement (C) aktiváció kulcsszerepet játszik ezen reakciók folyamataiban, a pontosabb megnevezés érdekében bevezetésre került a komplement aktiváció-függő pszeudoallergia (complement activation-related pseudoallergy, CARPA) kifejezés.

## **2 Célkitűzések**

### **2.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációjának vizsgálata**

Polietilénglikolt (PEG), széles körben alkalmazzák a hatóanyag leadó rendszerek esetében, mivel módosítja az aktív hatóanyag farmakokinetikai tulajdonságait. A PEG láncok csatolása hatékonyan csökkenti az enzimatis lebomlásukat és megnöveli a gyógyszerek keringési idejét a vérben. PEGilált liposzómák esetében segít elkerülni a liposzómák makrofágok általi fagocitózist és dózisfüggetlen farmakokinetikát eredményez.

Az ammónium-szulfát (AS) és más kozmotropikus szerek kiválthatják a PEGilált liposzómák aggregációját és a fúzióját. Az aggregátumok a hidrofób kölcsönhatások révén keletkeznek, amelyek a növekvő sókoncentráció szolvofób hatásának eredményei.

Az aggregátum képződés mechanizmusának megértése értékes információkkal szolgálhat a sikeres gyógyszerkészítmények tekintetében, ezért elsőként ezeket a folyamatokat vizsgáltuk meg a PEGilált liposzómák esetében.

## **2.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban**

A CARPA egyik leggyakrabban vizsgált példája a Doxil okozta HSR. Célunk az volt, hogy tisztázzuk a sertés HSR-ben a C szerepét, a Doxil okozta reakciók esetén. Különösen a PEG ellenes ellenanyagok reakcióban betöltött szerepét vizsgáltuk, aminek több oka is volt. Egyrészt, mert ezen ellenanyagoknak kiemelt szerepük lehet a klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációban. Másrészt, mert egérben és patkányban a C aktiváció jelentős mértékben hozzájárul az ismételt beadott PEGilált liposzómák gyors eliminációjához, harmadrészt, mert a piacról kivont Pegnivacogin esetében az anafilaktikus reakciók fellépését ezekkel az antitestekkel hozták kapcsolatba.

## **2.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktorial**

Az AmBisome és a széles körben alkalmazott rákellenes gyógyszeréről, a Cremophor EL (CrEL) micellák által szolubilizált Paclitaxelről (Taxol), már korábban leírták, hogy az alternatív útvonalon keresztül képesek aktiválni a C rendszert, és sertésekben kiváltják a CARPA-t. Különböző terápiás ellenanyagok szintén okozhatnak HSR-t. Így az volt a feltételezés, hogy a C aktiváció alternatív útjának gátlása befolyásolhatja ezeknek a gyógyszereknek a CARPA aktivitását.

## **2.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában**

Egy közelmúltban publikált vizsgálat megkérdőjelezte a C aktiválás szerepét a polisztirol nanorészecskék (PS-NP) által okozott HSR-ban sertéseken. A cikk arra a következtetésre jutott, hogy a jelenség egy gyors fagocita válasszal (RPR) magyarázható amiben a C aktiváció nem játszik szerepet. Ennek megfelelően az „RPR hipotézis” egy új CARPA-val versengő HSR teóriaként jelent meg. Kísérleteink célkitűzése a C aktiváció szerepének tisztázása volt a sertés PS-NP-okozta HSR-ben.

## **3 Módszerek**

### **3.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációja**

Az extrudálási módszerrel előállított liposzómák az FDA által jóváhagyott és forgalmazott Doxil összetételével voltak megegyezők. A méreteket Malvern Zetasizer Nano S műszerrel határoztuk meg. Az aggregációt turbidimetriás és dinamikus fényszórásos technikával (DLS), míg a felszíni töltés változásokat Zeta-potenciál mérésével követtük. Az aggregátumok morfológiáját atomerő mikroszkópia és fáziskontraszt mikroszkópia segítségével vizsgáltuk. A PEG réteg hidratációs szintjének megállapításához infravörös spektroszkópiát használtunk. A liposzómák okozta C aktivációt birka vörösvérsejt teszttel mértük.

### **3.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban**

Az extrudálási módszerrel előállított Doxebo (Doxorubicint nem tartalmaz) és Doxil összetétele megegyező volt. A sertés kísérletek kevert fajtájú hím Yorkshire/Magyar Lapály sertésekkel történtek. A sertések immunizálása vagy Doxeboval (0,1 mg foszfolipid (PL)/kg) vagy Pegfilgrastimmal (0,174 mg/kg), illetve Doxebot követő 0,1 mg PL/kg Doxil vagy Doxil humán ekvivalens dóziséval (HED: 6,4 mg PL/kg) történt. A CARPA reakciók vizsgálata során Doxebot, Doxilt (hasonló, majd 10x dózis) és Zymosan kaptak az állatok. A Pegfilgrastimmal immunizált állatok CARPA mérései során Pegfilgrastimot, Doxebot és Zymosan adtunk be. Hemodinamikai változások során a pulmonális (PAP) és szisztémás (SAP) artériás nyomás változásokat követtük, valamint meghatározott időpontokban az állatokból levett vérből sC5b-9 és anti-PEG ellenanyag (IgG és IgM) szinteket mértünk ELISA módszerrel.

### **3.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktoral**

Normál humán szérumban (NHS) ELISA módszerrel mért sC5b-9 szintek által határoztuk meg az extrudálási módszerrel előállított liposzómák, az AmBisome, a Cremophor EL (CrEL) és a Zymosan C aktivitását, illetve a H-faktor (FH) és a rekombináns mini-FH ezekre gyakorolt hatásait. A FH és a mini-FH gátló hatását Rituximab (Rituxan) tekintetében, teljes humán vérben néztük szintén sC5b-9 ELISA mérésekkel.

### **3.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában**

A PS-NP és az extrudálási módszerrel előállított kontroll liposzómák fizikai-kémiai analíze során az méreteloszlást DLS technológiával határoztuk meg, míg a Zeta-potenciál Malvern Zetasizer Nano ZS-sel voltak lemérve. A PS nanorészecskék morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk meg. A felszíni hidrofobicitást, a nanorészecskék Rose Bengal (RB) xantén festés adszorpciójának mérésével állapítottuk meg. A PS nanorészecskén történő C3b lerakódás és terminális komplex (C5b-9) képződés *in vitro* sertés szérumban FACS analízissel, míg C3 proteolitikus termékeinek (iC3b, C3d és C3dg) vizsgálata Western blot analízissel történt. NHS-ban PS-NP-k (a nanorészecskék felszíni területe megegyező volt) okozta C aktiváció elemzése C3a, Bb, C4d és sC5b-9 szintek révén történt ELISA kittek használatával. A sertés kísérletek kevert fajtájú hím Yorkshire/Magyar Lapály sertésekkel történtek. PS-NP-t (a nanorészecskék felszíni területe megegyező volt) és a Zymosan bólushént adtuk be az állatoknak. A reakció során a hemodinamikai változásokat (PAP és SAP) figyeltük.

## **4 Eredmények**

### **4.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációja**

A liposzóma csapadék képződés 0,7-0,8 M-os AS hozzáadása után kezdődött. PEGilált liposzómák nemcsak aggregálódtak, hanem fuzionáltak is. A fúzió mértéke koncentráció függő volt és a

koncentráció küszöbértéke 1M volt az alkalmazott inkubációs idő alatt. Az aggregált liposzómák felbonthatóak voltak, amihez jóval alacsonyabb AS koncentráció volt szükséges, mint amelyen a precipitálás elkezdődött. A precipitáció nem függött a felszíni töltéstől. AS hozzáadása a Zeta-potenciál masszív növekedéséhez vezetett már viszonylag alacsony koncentrációban is (<0,1 M AS).

A liposzómák felszínén lévő PEG láncok hiányában nem játszódtott le precipitáció, míg PEG tartalom növelése (2-10 M%) alacsonyabb AS koncentráción indította el a kicsapódást. Az AS és más kozmotróp sóknak precipitáló hatásuk volt és felületi töltésmódosító hatásuknak maximuma sokkal alacsonyabb koncentráción volt, mint ami az aggregációhoz kellett.

A 1 M és 2 M AS-ban kicsapott, majd fiziológiás sóoldatban visszavett minták között jelentős volt a méret különbség és szignifikáns eltérés volt C aktiváció tekintetében a kontroll és egymáshoz képest is.

#### **4.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban**

A Doxebóval immunizált állatokban a PEG ellenes ellenanyagok (IgG és IgM) szintjeinek növekedése a kezelés utáni 3. napon kezdődött és a 7-9. napon érte el a csúcspontot, majd 4-6 hét után tért vissza kiindulási szinthez, ráadásul a két ellenanyag titere teljesen egyforma ütemben változott. Az anti-PEG IgM szintek 0 percnél nem voltak nullák, ami bizonyítja a már meglévő (természetes) anti-PEG ellenanyagok jelenlétét. Doxebóval való kezelés után a természetes ellenanyagok titerei az első napon lecsökkentek a kiinduláshoz képest.



Nem immunizált állatokban a Doxil beadása, a PAP enyhe (2-szeres) emelkedését eredményezte 2 percen belül, majd az értékek 10 percen belül visszaálltak a kiindulási szintre. Az anti-PEG IgM titerek hirtelen kezdeti esés után lassan csökkentek, amit egy kétfázisú (gyors, valamint egy lassú fázis, melynek felezési ideje ~3 perc) exponenciális csökkenéssel lehetett jellemezni. A PAP és IgM változása a perc skálán szignifikáns lineáris korrelációt mutatott ( $R^2=0,966$ ).

Doxeboval immunizált állatok 4 héttel később súlyos reakciót mutattak i.v. Doxebo/Doxil beadása után, ami a megemelkedett anti-PEG IgM szintnek köszönhető (anti-PEG IgM és a HSR közötti dózis-hatás kapcsolat egy viszonylag alacsony anti-PEG IgM szintnél platózott). Immunizált sertésekben a Doxebo/Doxil beadása azonnali sC5b-9 emelkedést (C aktivációt) váltott ki, kinetikájuk pedig megegyezett a PAP-nál látottaknál (anafilatoxin termelődés). Immunizált sertésekben az első Doxebo injekciót követő második hasonló dózisú Doxilt lényegében azonos PAP és sC5b-9 változások követték.

A Doxebo immunizálás a Doxil HED dózisával előkezelt sertésekben nem érzékenyítette az állatokat 4 héttel később a liposzómára adott anafilaktikus válaszra és a Doxil teljes HED-je is biztonságosan beadható volt.

Pegfilgrastimmal immunizált sertések esetében 1 héttel később a Pegfilgrastim anti-PEG IgM emelkedést eredményezett, miközben nem indukált a HSR-t, ellenben a Doxeboval szembeni hemodinamikai reakciók viszonylag erősek voltak a naiv állatokban látottakhoz képest.

### **4.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása Faktor H-val**

Az exogén FH gátolta az AmBisome, különböző PEG tartalmú liposzómák és CrEL indukálta C aktivációt. Mini-FH szintén gátolta az AmBisome és CrEL C aktivációját, azonban hatása a FH-nál sokkal erőteljesebb volt. Mini-FH gátló hatása dózisfüggő volt, fele akkora mennyisége képes volt ugyanolyan gátlást okozni, mint a FH.

Rituximab esetében a C aktiváció mértéke különbözött a véralvadás gátlásához alkalmazott Lepirudin, illetve Heparin esetében. Exogén FH és a mini-FH különböző mértékben gátolta a Rituximab indukált C aktivációt Lepirudinnal alvadásgátolt teljes vérben.

### **4.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában**

PS-NP diszperziók egycsúcsúak és viszonylag keskeny méreteloszlásúak voltak, amelyek erős negatív töltéssel rendelkeztek, az alacsony és a magas ionerősség esetében is. A hidrofóbicitás NP méretétől (átmérő) függött növekvő sorrendben: 200<500<750 nm.

A FACS hisztogramok a C5b-9 és az iC3b kötődését mutatták 500 és 750 nm-es PS nanorészecskékhez 1 és 20 perc után. Az 500 nm-es PS-NP-hez való C5b-9 kötődés kivételével, 7-ből 4 sertés szérumban mindenhol növekedés volt megfigyelhető. A maximális változások a kiindulási értékhez képest szignifikánsak voltak ( $P < 0,05$ ). A vizsgált sertés szérumban általánosságban elmondható, hogy az iC3b csúcs később jelent meg, mint a C5b-9, ami megegyezik a C aktivációs melléktermékek képződésének kinetikájával. A 750 nm-es PS-NP-k erősebb kifejeződést mutattak a C5b-9-re és az iC3b-re.

A Western blot eredmények az 500 és 750 nm-es NP-k esetében a C3dg és C3d 2-30 percen belüli felhalmozódását mutatták. Az 500 nm-es NP esetében a iC3b, míg a 750 nm-es NP esetében a C3dg/C3d volt kifejezettebb.

NHS-ben az 500 és 750 nm-es PS-NP-k szignifikáns sC5b-9 emelkedést indukáltak a PBS kontroll mintához képest, míg a 200 nm-es részecskéknek csak egy kicsi, jelentéktelen hatásuk volt. Az 500 és 750 nm-es NP-k C3a és Bb esetében is sC5b-9-hez hasonló emelkedést mutattak, míg C4d tekintetében nem volt látható változás. NHS-ben nanorészecskék kiváltotta C3a változások azt mutatták, hogy C aktiválás percekben belül megkezdődött. Az 500 nm-es nanorészecskék 3 különböző dózisének (24,2, 72,7 és 218,1  $\text{cm}^2/\text{mL}$  szérum) sC5b-9 képződése hátról két NHS esetében azt mutatta, hogy már a legkisebb dózis is maximális hatást váltott ki.

A 200 nm-es nanorészecske legkisebb dózisa nem okozott PAP változást, míg az azonos felszínű 500 és 750 nm-es PS-NP-k masszív pulmonális hipertenzióhoz vezettek. Bár mindhárom nanorészecske 10 és 40-szer nagyobb dózisa jelentős pulmonális nyomásváltozást okozott, mégis úgy tűnik, hogy PS-NP-k pulmonális hipertenzív hatásának dinamikus ablaka egy NP méretfüggő alacsony küszöbértékű dózistartományban volt:  $<50$  ng/kg (200 nm),  $<12,5$  ng/kg (500 nm) és  $<19$  ng/kg (750 nm).

A különböző nanorészecskék egyenlő felszíni dózisének beadása utáni maximális PAP emelkedés hasonló a humán szérumban ugyanezen nanorészecskék egyenlő felszíni dózisa (72,5  $\text{cm}^2/\text{ml}$  szérum) okozta sC5b-9 emelkedésével. A párosított sC5b-9 és PAP átlag értékek között szignifikáns összefüggés volt ( $P=0,033$ ).

A sertések PS-NP indukálta pulmonális reakciói részecskeméret függőek voltak. A minimálisan reaktív NP szám 10-szeres növelése a pulmonális reakció különböző méretkü növekedéséhez vezetett, ami összefüggésben volt a különböző nanorészecskék méretével ( $200 < 500 < 750$  nm). Ezzel szemben a minimális dózis 40-szeres növelése maximális hatást váltott ki a nagy (500 és 750 nm) PS-NP-k esetében.

## **5 Következtetések**

### **5.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációja**

Eredményeink bizonyítják, hogy a PEGilált liposzómák aggregációja szabályozott és reverzibilis módon történik, amelyek koncentráció függő mechanizmusok. Az aggregáció reverzibilitása a kozmotróp anyag koncentráció csökkenésének egyszerű következménye. AS hozzáadása nem csak aggregációt, hanem fúziót is eredményezett, aminek a mértéke koncentráció és időfüggő folyamat. Ennek okát a PEG láncok hidrofób módosulásának köszönhető nagymértékű szerkezeti változása magyarázhatja.

Míg a felületi töltés nem befolyásolta az aggregációt, addig az emelkedett PEG tartalom növelte az aggregációra való hajlamot. Ez egyértelmű bizonyíték, hogy a PEGilált liposzómák AS kiváltotta aggregációja a PEG láncokhoz kapcsolódik. Mivel egyéb kozmotróp sók szintén precipitálták a PEGilált liposzómákat, míg a kaotróp sók nem, ez arra enged következtetni, hogy az aggregáció mechanizmusa mögött a PEG polimerláncok kozmotróp sók hatásának köszönhető hidratáltság csökkenése állhat.

A birka vörösvérsejtes mérések eredményei szerint, a több fuzionált vezikulát tartalmazó minták jobban aktiválták a C rendszert, ami a nagyobb méretnek, illetve ebből kifolyólag a megnövekedett felületnek volt köszönhető, amire hatékonyabban rakódhattak le a C fehérjék.

## **5.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban**

Az eredmények közvetlen bizonyítékot nyújtanak az IgM közvetített klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációra, valamint figyelemre méltó párhuzamosságot mutat az anafilaxiás sokk kifejlődésével. A Doxeboval immunizált állatokban azonos kinetikával emelkedett a PEG ellenes ellenanyagok (IgG és IgM) szintje, ami T-sejt független 2-es típusú immunogenitásra (TI-2) utal. A meglévő (természetes) anti-PEG ellenanyag titerek csökkenése az immunizálás utáni első napon a liposzóma indukálta clearance-re utalhat.

Az IgM okozta klasszikus útvonalon keresztüli C aktiváció, a PAP kezdeti emelkedésének és az anti-PEG IgM fogyásának azonos időbeli lefutása, illetve a PAP és a titer 1 perces értékei közötti kapcsolat arra enged következtetni, hogy részben a kialakult (természetes) anti-PEG IgM vezikulákhoz való azonnali kötődése C aktivációhoz, anafilatoxin termelődéshez és opszonizációhoz vezetett nem immunizált állatokban. Ezek, valamint egér modellben a PEGilált liposzómák IgM közvetített gyors clearance-e mind azt mutatja, hogy a C aktiváció és a kardiopulmonális reakció egybevágh az IgM kötött Doxil mennyiségének gyors clearance-ével. Az ellenanyagokkal szembeni liposzóma felesleg az anti-PEG IgM

közel teljes eltávolítását eredményezte, amivel a tachyphylaxis magyarázható. Immunizált állatokban a Doxebot követő hasonló dóziszú Doxilt lényegében azonos PAP és sC5b-9 változások követték, ez pedig a Doxebo indukálta tachypylaxis hiányát mutatta.

A sertések előkezelése a HED Doxillal gátolta a liposzómák immunogenitását és a pulmonális reaktivitását. Mivel az anti-PEG IgM titerek az előkezelés hatására nem változtak, úgy tűnik, hogy a jelenség a PEGilált liposzóma által kiváltott IgM termelésének szuppressziójával lehet kapcsolatban.

Pegfilgrastimmal immunizált sertések esetében is emelkedett az anti-PEG IgM titer, miközben újbóli beadása nem indukált HSR-t. Ennek oka, hogy Pegfilgrastim túl kicsi ahhoz, hogy megfelelő felületet biztosítson a C aktiváláshoz.

### **5.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktorial**

Az exogén FH és mini-FH *in vitro* hatékony gátlónak bizonyult AmBisome, liposzómák, CrEL és Rituximab okozta C aktiváció esetében. Ennek oka, hogy a FH a központi C3 C komponens és az alternatív útvonal amplifikációs hurok szintjén ható fő természetes C inhibitor, ezért ideális gátló molekula lehet a képződő C3a és C5a anafilatoxinok, valamint a C5b-9 csökkentésére vagy akár kialakulásuk megelőzésére, különösképpen azért, mert a bármelyik útvonalon kialakuló C aktiváció ezen a hurkon keresztül erősödhet.

A mini-FH hatása a FH-nál sokkal erőteljesebb volt. Fokozott aktivitása valószínűleg annak köszönhető, hogy a rövidebb molekulákban a C-terminális glikozaminoglikán/C3d kötőhelyek hozzáférhetősége megnövekszik, amelyek valószínűleg a teljes hosszúságú FH-ban egyébként részben rejtve vannak.

A lerakódott C3 fragmentek mennyisége és jellege, valamint a felszín fizikai-kémiai tulajdonságai szintén befolyásolhatják a FH lehetséges kölcsönhatását. Ezek legalább részben magyarázzák, hogy ugyanolyan mennyiségű FH, miért eredményezett különböző mértékű gátlást a különböző aktivátorok esetében.

Az exogén FH és a mini-FH képes *in vitro* csökkenteni vagy gátolni a Rituximab okozta C aktivációt szérumban, ami valószínűleg a FH és mini-FH folyadék fázisban történő C aktivációt gátló hatásának köszönhető.

#### **5.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában**

A PS-NP fizikai-kémiai tulajdonságaik (méreteloszlás, felszíni töltés, hidrofóbicitás) tekintetében különbségeket mutattak a kontroll liposzómához képest.

A FACS eredmények a C3b/iC3b és C5b-9 nanorészecskéhez történő kötődésvel és a Western blot adatok a C3 fragmentációval és az iC3b degradációs termékek képződésével (C3d és C3dg) mind arra engednek következtetni, hogy az 500 és 750 nm-es PS-NP-k okozta HSR megjelenésével egy időben, azonnali C aktiváció és opszonizáció is bekövetkezik.

A Bb, C3a és sC5b-9 szintek hasonló emelkedése NHS-ben azt mutatja, hogy a 500 és 750 nm-es részecskék okozta C aktiváció az alternatív útvonalon keresztül történik. Ebben a méretnek és a felszíni görbületnek jelentős hatása van, ami valószínűleg a részecske felszínének görbületével fordítottan arányos. Ennek oka, hogy a C3/C5-konvertázok és opszoninok működési hatékonysága nagyobb mértékű a lapos felületen, mint az ívelten.

## 6 Saját publikációk jegyzéke

### 6.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- 1) \*Bozó T, \***Mészáros T**, Mihály J, Bóta A, Kellermayer MSZ, Szebeni J, Kálmán B. (2016) Aggregation of PEGylated liposomes driven by hydrophobic forces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 147: 467-474. IF: 3,887
- 2) **Mészáros T**, Csincsi ÁI, Uzonyi B, Hebecker M, Fülöp TG, Erdei A, Szebeni J, Józsi M. (2016) Factor H inhibits complement activation induced by liposomal and micellar drugs and the therapeutic antibody rituximab in vitro. *Nanomedicine*,12(4): 1023-1031. IF: 5,720
- 3) \***Mészáros 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 Nanomed.* 13: 6345-6357. IF: 4,370 (2017)

\* Megosztott első szerzőség

### 6.2 Disszertációtól független közlemények

- 1) **Mészáros T**, Füst G, Farkas H, Jakab L, Temesszentandrás G, Nagy G, Kiss E, Gergely P, Zeher M, Griger Z, Czirják L, Hóbor R, Haris A, Polner K, Varga L. (2010) C1-inhibitor autoantibodies in SLE. *Lupus*,19(5): 634-8. IF: 2,600
- 2) Kocsis J, **Mészáros T**, Madaras B, Tóth EK, Kamondi S, Gál P, Varga L, Prohászka Z, Füst G. (2011) High levels of acute



- phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer. *Cell Stress Chaperones*, 16(1): 49-55. IF: 3,013
- 3) Kuznetsova NR, Sevrin C, Lespigneux D, Bovin NV, Vodovozova EL, **Mészáros T**, Szebeni J, Grandfils C. (2012) Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer. *J Control Release*, 160(2): 394-400. IF: 7,633
  - 4) **Mészáros T**, Szénási G, Rosivall L, Szebeni J, Dézsi L. (2015) Paradoxical rise of hemolytic complement in the blood of mice during zymosan- and liposomeinduced CARPA: a pilot study. *Eur J Nanomed*, 7(3): 257–262.
  - 5) Kozma GT, **Mészáros T**, Weiszhár Zs, 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. *Eur J Nanomed*, 7(4): 289–301.
  - 6) Bugna S, Buscema M, Matviykyiv S, Urbanics R, Weinberger A, **Mészáros T**, Szebeni J, Zumbuehl A, Saxer T, Müller B. (2016) Surprising lack of liposome-induced complement activation by artificial 1,3-diamidophospholipids in vitro. *Nanomedicine*, 12(3): 845-849. IF: 5,720
  - 7) Jackman JA, **Mészáros T**, Fülöp 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(4): 933-943. IF: 5,720

- 8) Buscema M, Matviykv S, **Mészáros T**, Gerganova G, Weinberger A, Mettal U, Mueller D, Neuhaus F, Stalder E, Ishikawa T, Urbanics R, Saxer T, Pfohl T, Szebeni J, Zumbuehl A, Müller B. (2017) Immunological response to nitroglycerin-loaded shear-responsive liposomes in vitro and in vivo. *J Control Release*, 264: 14-23. IF: 7,877 (2017)
- 9) Fülöp T, Nemes R, **Mészáros T**, Urbanics R, Kok RJ, Jackman JA, Cho NJ, Storm G, Szebeni J. (2018) Complement activation in vitro and reactogenicity of low-molecular weight dextran-coated SPIONs in the pig CARPA model: Correlation with physicochemical features and clinical information. *J Control Release*, 270: 268-274. IF: 7,877 (2017)
- 10) Fülöp T, **Mészáros T**, Kozma GT, Szebeni J, Józsi M. (2018) Infusion Reactions Associated with the Medical Application of Monoclonal Antibodies: The Role of Complement Activation and Possibility of Inhibition by Factor H. *Antibodies*, 7(1): 14
- 11) Kovács ÁF, Láng O, Turiák L, Ács A, Kőhidai L, Fekete N, Alasztics B, **Mészáros T**, Buzás EI, Rigó J Jr., Pállinger É. (2018) The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. *Sci Rep*, 8(1): 5426. IF: 4,122 (2017)
- 12) Matviykv S, Buscema M, Gerganova G, **Mészáros T**, Kozma GT, Mettal U, Neuhaus F, Ishikawa T, Szebeni J, Zumbuehl A, Müller B. (2018) Immunocompatibility of Rad-PC-Rad liposomes in vitro, based on human complement activation and cytokine release. *Prec Nanomed*, 1(1): 43-62.