Universiteit Leiden
The Netherlands

The Transferrin Receptor at the Blood-Brain Barrier - exploring the possibilities for brain drug delivery

Visser, Corine

Citation
Visser, C. (2005, January 18). *The Transferrin Receptor at the Blood-Brain Barrier - exploring the possibilities for brain drug delivery*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/586

Version:	Corrected Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/586

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

Synopsis in Dutch

De transferrine receptor op de bloed-hersenbarrière:

Onderzoek naar de mogelijkheden voor selectief transport van geneesmiddelen naar de hersenen

Inhoud hoofdstuk 9

1. Achtergrond en doel van het beschreven onderzoek
2. De bloed-hersenbarrière: biologie en functie
3. De transferrine receptor voor geneesmiddeltransport naar de hersenen
4. Geneesmiddeltransport met behulp van transferrine gelabelde liposomen
   4.1. Liposomaal geneesmiddeltransport tijdens ontstekingen
5. Toekomstperspectieven voor geneesmiddeltransport naar de hersenen.
6. Conclusie

1. Achtergrond en doel van het beschreven onderzoek

Vele ziekten in de hersenen, zoals bijvoorbeeld de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson, depressie, schizofrenie en multiple sclerose, kunnen nog niet behandeld worden. Dit heeft onder meer te maken met de aanwezigheid van de bloed-hersenbarrière (BHB). De BHB bevindt zich tussen het bloed en de hersenen en beschermt en voedt de hersenen. Dit wordt bereikt door selectief transport van voedingsmiddelen, zoals glucose, zuurstof en aminozuren naar de hersenen, en het tegenhouden en uitscheiden van lichaamsvreemde of toxische stoffen. In het algemeen kan gezegd worden dat alleen kleine vetoplosbare stoffen de BHB goed kunnen passeren. Echter, voor de meeste geneesmiddelen geldt dat ze de BHB met moeite passeren.

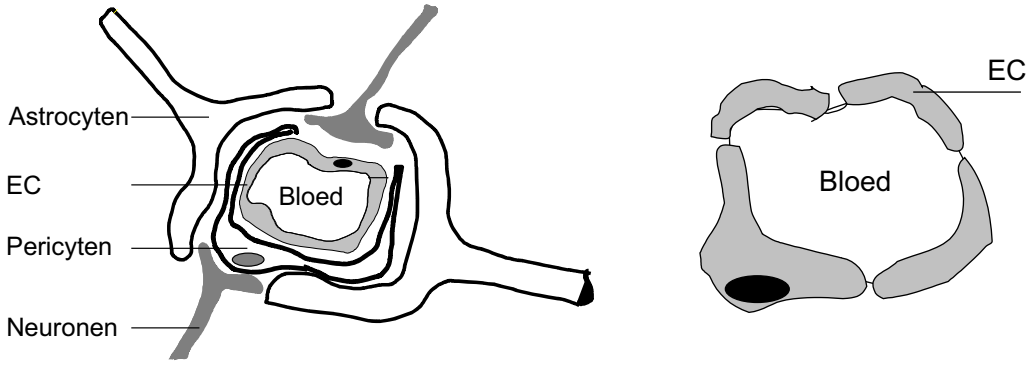
Het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift was gericht op de transferrine receptor voor het transport van stoffen over de BHB en werd volledig uitgevoerd *in vitro*. Hiervoor werd gebruik gemaakt van endotheelcellen, geïsoleerd uit de kleinste bloedvaten (capillairen) van kalfshersenen. De transferrine receptor is verantwoordelijk voor de ijzeropname door de hersenen. Het ijzer wordt vervoerd door transferrine, het endogene ligand voor de transferrine receptor. In een drietal stappen is onderzocht of de transferrine receptor geschikt is voor geneesmiddeltransport naar de hersenen. Voor de eerste stap is gebruik gemaakt van radioactief gelabeld transferrine, om de aanwezigheid van de receptor op het *in vitro* BHB model aan te tonen. Vervolgens is een enzym (peroxidase uit mierikswortel) aan transferrine gekoppeld, om vast te stellen of de transferrine receptor geschikt is om een lading (cargo) naar de hersenen te transporteren. Als laatste stap is voor een grotere lading gekozen, namelijk een liposoom beladen met transferrine. Liposomen zijn vetbolletjes, waarin geneesmiddelen verpakt kunnen worden. Deze liposomen kunnen langer in het bloed blijven circuleren en kunnen selectief naar een bepaald orgaan gestuurd worden (bijvoorbeeld door koppeling aan transferrine worden liposomen naar de hersenen gericht).

In de volgende paragrafen zal nader worden ingegaan op de biologische aspecten en de functie van de bloed-hersenbarrière, de transferrine receptor en het liposomale geneesmiddeltransport.

2. De bloed-hersenbarrière: biologie en functie

Het bestaan van de bloed-hersenbarrière (BHB) is aan het eind van de 19e eeuw ontdekt door Ehrlich en Goldman. Ehrlich injecteerde een blauwe kleurstof in de bloedbaan van een rat en vond dat deze stof niet in de hersenen kwam. Zijn opvolger Goldman heeft vervolgens de blauwe kleurstof in de hersenen geïnjecteerd. In deze situatie werden alleen de hersenen en de ruggengraat blauw gekleurd. Deze bevindingen hebben aanleiding gegeven tot het formuleren van het concept van de BHB. Sindsdien is er veel onderzoek gedaan naar de morfologie, biologie en functie van de BHB.

De BHB wordt gevormd door een viertal celtypen (figuur 1). De belangrijkste barrière wordt gevormd door de capillaire endotheelcellen, die de wand van de kleinste bloedvaten in de hersenen bekleden. Deze endotheelcellen liggen zeer dicht tegen elkaar aan, waardoor er alleen kleine openingen (zogenaamde 'tight junctions') aanwezig zijn tussen de cellen. In andere delen van het lichaam liggen de endotheelcellen verder uit elkaar, waardoor stoffen uit het bloed "langs" de cellen kunnen diffunderen. Een ander kenmerk van de endotheelcellen in de hersencapillairen is de geringe permeabiliteit van de cellen zelf. Bovendien komt P-glycoproteïne, een eiwit dat actief stoffen uit de cellen verwijdert, in hoge mate voor op het oppervlak van BHB endotheelcellen. Andere celtypen die betrokken zijn bij de barrière-functie zijn de astrocyten, die met hun uiteinde de capillairen omgeven en zorgen voor de specifieke BHB eigenschappen van de endotheelcellen. Ook andere hersencellen, zoals neuronen en pericyten zijn betrokken bij de BHB.



Figuur 1: Schematische vergelijking tussen een hersencapillair (links) en een capillair uit een ander deel van het lichaam (rechts). De BHB wordt gevormd door endotheelcellen (EC) die dicht tegen elkaar aanliggen en omgeven zijn door astrocyten, pericyten en neuronen. Endotheelcellen uit de rest van het lichaam liggen minder dicht tegen elkaar aan en zijn daardoor beter doorlaatbaar.

Naast de BHB zijn er ook barrières te vinden tussen de hersenen en de vloeistof uit de hersenen (liquor) en tussen het bloed en de hersenvloeistof. De BHB wordt echter gezien als de belangrijkste barrière voor stoffen om de hersenen te bereiken, omdat het met een oppervlak van ca. 20 m^2 en een lengte van ca. 650 km de grootste barrière in de hersenen vormt.

Voor het onderzoek, beschreven in dit proefschrift is gebruik gemaakt van een zogenaamd *in vitro* BHB model. Hiervoor worden de kleinste capillairen uit kalfshersenen geïsoleerd. Deze capillairen worden vervolgens in celkweekmedium bij 37 ºC gekweekt, totdat er na ca. 5 dagen genoeg endotheelcellen uitgegroeid zijn. Deze endotheelcellen worden overgebracht naar een plaat met kleine individuele kweekbakjes, waarna er na nogmaals ca. 5 dagen een experiment kan worden uitgevoerd. Tevens worden uit de hersenen van jonge ratten hersencellen, met name astrocyten, geïsoleerd. Deze astrocyten worden in kweekflessen gedurende enkele weken gekweekt. Het celkweekmedium van deze astrocyten wordt bewaard omdat hier stoffen inzitten die door de astrocyten zijn uitgescheiden. Dit zogenaamd astrocyt-geconditioneerd medium wordt toegevoegd aan de capillairen en aan de endotheelcellen, zodat de specifieke eigenschappen van de BHB geïnduceerd worden. Voor de experimenten beschreven in **hoofdstuk 7**, werd zelfs gebruik gemaakt van endotheelcellen die in direct contact staan met astrocyten. Hiervoor worden er op een doorlaatbaar kunststof membraan, astrocyten aan de onderkant gekweekt en endotheelcellen aan de bovenkant. Daardoor ontstaan twee aparte compartimenten, die representatief zijn voor de "bloed-zijde" en de "hersen-zijde" van de BHB.

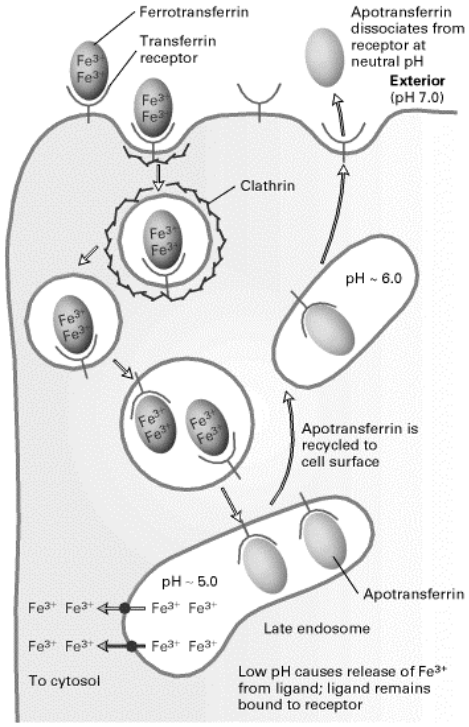
De functie van de BHB is het behouden van homeostase (evenwicht) in de hersenen. Dit wordt bereikt door het selectief doorlaten van voedingsstoffen, terwijl de meeste lichaamsvreemde stoffen worden tegengehouden. Voedingstoffen, zoals bijvoorbeeld glucose, zuurstof, ijzer en aminozuren kunnen via een aantal specifieke transportmechanismen op de BHB de hersenen bereiken. Grofweg kan onderscheid gemaakt worden tussen passief transport (alleen mogelijk voor kleine, vetoplosbare stoffen) en actief transport (d.w.z. dat het transport energie kost).

Een aantal van de beschikbare transportmechanismen wordt ook gebruikt voor geneesmiddeltransport naar de hersenen. Het meest bekende voorbeeld hiervan is L-dopa®, een geneesmiddel dat door een transportmechanisme voor aminozuren naar de hersenen wordt gebracht, waarna het in de hersenen wordt omgezet in dopamine. Als

gevolg van de ziekte van Parkinson neemt de concentratie dopamine in de hersenen af, maar kan dus op deze manier worden aangevuld. De symptomen van de ziekte van Parkinson worden hiermee bestreden. Ook andere transport mechanismen worden gebruikt of onderzocht voor geneesmiddeltransport naar de hersenen, zoals bijvoorbeeld de insuline receptor en de hexose tranporter (transport van glucose). Ook wordt het gebruik van positief geladen albumine (een eiwit wat normaal niet geladen is en in hoge concentraties in het bloed voorkomt) of melano-transferrine (wat niet via de transferrine receptor wordt opgenomen) onderzocht voor geneesmiddeltransport naar de hersenen.

3. De transferrine receptor: mogelijkheden voor geneesmiddeltransport naar de hersenen

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was gericht op de transferrine receptor (TfR). Deze receptor is verantwoordelijk voor het ijzertransport naar de hersenen. Ook komt deze receptor voor op rode bloedcellen, levercellen en cellen van de darmen. Figuur 2 laat schematisch zien hoe de opname van ijzer door endotheelcellen van de BHB verloopt. De TfR heeft bij een fysiologische zuurgraad (pH) een hoge affiniteit voor transferrine (Tf) dat 2 ijzeratomen bevat. Na binding van Tf aan de receptor wordt het TfR-Tf complex door de cel geïnternaliseerd in zogenaamde blaasjes, die gecoat zijn met het eiwit clathrine. Vervolgens wordt, nadat het clathrine losgelaten heeft, de zuurgraad in deze blaasjes (endosomen) verhoogd waardoor ijzer loslaat uit het TfR-Tf complex en via een transporteiwit voor metalen naar het cytosol (cellulaire vloeistof) wordt getransporteerd. Hier wordt het ijzer opgeslagen of verder getransporteerd naar de hersenen. Het TfR-Tf complex wordt na afgifte van ijzer terug getransporteerd naar het bloed, waar Tf loslaat van de receptor en weer opnieuw twee ijzeratomen kan opnemen.



Figuur 2: Schematisch overzicht van de opname van Tf door endotheelcellen van de BHB. Tf beladen met twee ijzeratomen (ferrotransferrin) bindt aan de receptor en wordt vervolgens opgenomen in clathrine-gecoate blaasjes. Nadat clathrine losgelaten heeft, wordt de pH in de blaasjes (endosomen) verlaagd en kan ijzer loslaten. Tf zonder ijzer (apotransferrin) wordt vervolgens met de TfR terug gebracht naar het oppervlak van de cel, terwijl het ijzer uit de endosomen wordt getransporteerd.

In **hoofdstuk 3** is met behulp van radioactief gelabeld Tf (^{125}I-Tf) de receptor dichtheid op de endotheelcellen van het *in vitro* BHB model bepaald. Tevens is de mate en de route van opname, alsook de invloed van de ijzerconcentratie in het celkweek medium hierop bestudeerd. In tabel 1 zijn de maximale TfR dichtheden bij 4 °C (temperatuur waarbij de TfR niet internaliseert) en bij 37 °C weergegeven. Ook is bij 4 °C een onderscheid gemaakt tussen de totale dichtheid van de TfR en de dichtheid van de TfR op het oppervlak van de endotheel cellen van de BHB. Hieruit bleek dat maar ca. 10 % van de totale TfR dichtheid op het oppervlak tot expressie wordt gebracht.

In de situatie waarbij ijzer wordt weggevangen door een ijzer-chelator (deferoxamine mesylate, DFO) wordt de TfR expressie groter, vooral op het oppervlak. Dit houdt in dat er niet alleen nieuwe TfR worden aangemaakt, maar ook dat er een verschuiving in expressie plaats vindt ten gunste van het celoppervlak. Als er extra ijzer aanwezig is, door toevoeging van $FeCl_3$ wordt de TfR minder tot expressie gebracht. Deze

bevindingen komen overeen met eerdere onderzoeken waaruit bleek dat ijzer de belangrijkste factor is in de regulatie van de TfR expressie. Ook heeft ons onderzoek bevestigd dat op de endotheelcellen van de BHB de TfR via clathrine-gecoate blaasjes wordt opgenomen. De opname is ook zeer effectief; na 1 uur incubatie van de endotheelcellen met radioactief gelabeld Tf werd ruim 70% in de cellen aangetroffen.

	maximale receptor dichtheid (fmol/µg cel eiwit)		
	4 °C		37 °C
	totale TfR expressie	extracellulaire TfR expressie	
controle	1.37	0.13	0.90
(BI)	(1.15 – 1.59)	(0.10 – 0.16)	(0.78 – 1.01)
DFO	3.68	0.63	2.31
(BI)	(2.73 – 4.63)	(0.55 – 0.71)	(2.03 – 2.59)
$FeCl_3$	1.64	niet detecteerbaar	0.56
(BI)	(1.09 – 2.19)		(0.49 – 0.63)

Tabel 1: TfR expressie dichtheden in normale situatie (controle), met ijzer chelator (DFO) en met extra ijzer ($FeCl_3$). De weergegeven waarden zijn gemiddelde waarden uit minimaal 3 experimenten, uitgevoerd in triplo, tussen haakjes staat het betrouwbaarheidsinterval (BI) vermeld.

Vervolgens is de invloed van astrocyt-geconditioneerd medium bepaald, omdat bekend is dat astrocyten BHB eigenschappen induceren in endotheelcellen. De expressie van de TfR bleef echter onveranderd in de aan- of afwezigheid van astrocyt-geconditioneerd medium. Dit werd bevestigd door de onveranderde Tf en ijzerconcentraties in astrocyt-geconditioneerd medium in vergelijking met gewoon celkweek medium.

Uit de resultaten in **hoofdstuk 3** kan worden geconcludeerd dat de TfR aanwezig is op de endotheelcellen van de BHB en actief Tf internaliseert. Ook is aangetoond dat de TfR expressie in belangrijke mate afhangt van de ijzerconcentratie.

In **hoofdstuk 4** is beschreven dat Tf in staat is een enzym (peroxidase, geïsoleerd uit mierikswortel) naar de BHB te sturen. Dit enzym wordt veelvuldig gebruikt in

onderzoeken naar de BHB, omdat het de BHB niet kan passeren. Ook wordt het, als het toch in de endotheelcellen komt, afgebroken. Een bijkomend voordeel is de eenvoudige methode waarmee de activiteit van dit enzym (omzetting van water en zuurstof naar peroxide) bepaald kan worden. Door Tf aan het enzym te koppelen werd dit enzym wel door de cellen opgenomen.

Tenslotte heeft ons onderzoek aangetoond dat het Tf-enzym conjugaat specifiek door de TfR wordt opgenomen via clathrine-gecoate blaasjes. Ook werd de opname verhoogd door de ijzerchelator DFO te gebruiken. Dit houdt in dat Tf waar iets aan gekoppeld is, ook via de TfR kan worden opgenomen. De belangrijkste conclusie was dan ook dat de TfR in principe geschikt is voor de selectieve versturing van geneesmiddelen naar de hersenen.

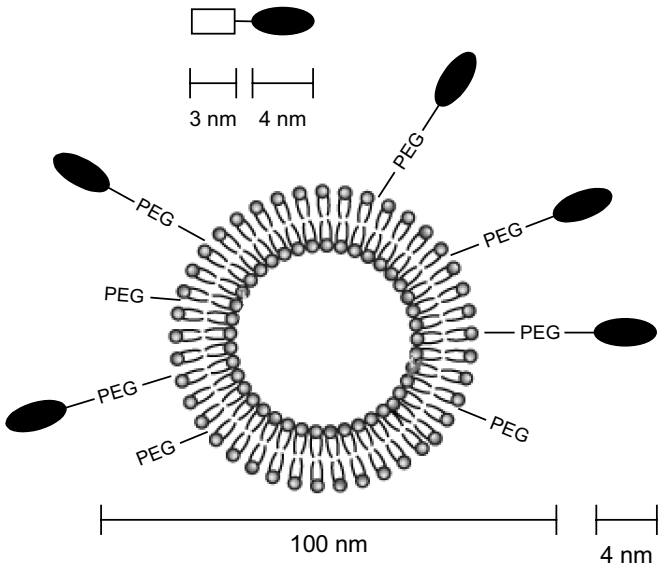
4. Geneesmiddeltransport met behulp van transferrine gelabelde liposomen

Nadat aangetoond was dat de TfR geschikt was voor transport van geneesmiddelen naar de hersenen, werd het onderzoek uitgebreid door liposomen te gebruiken. In liposomen kan namelijk een variëteit aan geneesmiddelen worden vervoerd. Bovendien veroorzaken ze geen immunologische reacties en zijn ze biologisch afbreekbaar. In eerste instantie werd, zoals beschreven in **hoofdstuk 5**, de bereiding van liposomen met Tf op het oppervlak geoptimaliseerd. Met behulp van een chemische reactie werd, in 2 stappen, een thiolaat bevattende groep in Tf aangebracht. In een volgende stap kon deze thiolaat dan reageren met een maleimide groep op het oppervlak van de liposomen om zo een stabiele verbinding te vormen. Hierbij was het enerzijds belangrijk om de thiolaat te stabiliseren, zodat de koppeling met maleimide plaats kon vinden. Anderzijds was het ook zeer belangrijk dat de ijzeratomen in Tf niet weggevangen werden, omdat Tf met twee ijzeratomen de hoogste affiniteit heeft voor de TfR. Hiervoor is uiteindelijk een chemische stof gevonden, te weten Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), die de thiolaat stabiliseert zonder ijzeratomen weg te vangen.

Vervolgens zijn, in **hoofdstuk 6**, deze Tf-gelabelde liposomen met het peroxidase enzym uit mierikswortel beladen, waarna de opname van deze liposomen door endotheelcellen is bepaald. Bij het bereiden van deze liposomen is ervoor gekozen om de deeltjesgrootte maximaal ca. 100 nm te maken, omdat opname van stoffen door

clathrine-gecoate blaasjes beperkt is tot een grootte van ca. 120 nm. Uit dit onderzoek bleek herhaaldelijk dat de binding van de liposomen aan de cellen hoger was dan de opname door de cellen. Hierbij moet wel in gedachten gehouden worden dat de activiteit van het enzym bepaald wordt en niet de hoeveelheid. Ons onderzoek heeft aangetoond dat de liposomen zeer waarschijnlijk wel door de endotheelcellen worden opgenomen, maar dat deze vervolgens intracellulair naar de lysosomen worden gestuurd. In deze lysosomen vindt afbraak plaats van zowel de liposomen als hun inhoud. Hierdoor is het niet meer mogelijk om het peroxidase enzym in de cellen aan te tonen met behulp van een methode die de enzymatische activiteit bepaalt.

De belangrijkste conclusie uit dit onderzoek is dat de opname en intracellulaire route van Tf-gelabelde liposomen en Tf-enzym conjugaten verschillend is. De opname van de Tf-enzym conjugaten is niet alleen hoger dan de binding van de conjugaten aan de cellen, maar is ook hoger dan de opname van de Tf-liposomen. Dit heeft met name te maken met de grootte van de deeltjes. Zoals in figuur 3 schematisch is weergegeven, hebben Tf en het peroxidase een diameter van ca. 3 - 4 nm, terwijl de liposomen een diameter van 100 nm hebben. Dit grootte verschil veroorzaakt zeer waarschijnlijk het verschil in opname en intracellulaire bestemming (routing).



Figuur 3: Schematisch vergelijking tussen een Tf-enzym conjugaat en een Tf-gelabeld liposoom. Tf is weergegeven als een zwarte ovaal, peroxidase als een open rechthoek. De structuur van een liposoom is in deze figuur ook duidelijk te zien; het polyethylene glycol (PEG) op het oppervlak bevat een maleimide groep waaraan Tf gekoppeld kan worden.

Afhankelijk van het intracellulaire doel van het geneesmiddel is een Tf-geneesmiddel conjugaat dan wel een Tf-gelabeld liposoom meer geschikt voor geneesmiddeltoediening. Een belangrijk voordeel van liposomen is de mogelijkheid om meerdere geneesmiddelmoleculen per liposoom te vervoeren. Bovendien is het voor insluiting in liposomen niet nodig om deze geneesmiddelen te modificeren, zoals voor directe koppeling aan Tf vaak wel het geval is. Tf-gelabelde liposomen lijken bij uitstek geschikt voor de behandeling van lysosomale stapelingsziekten (bijvoorbeeld de ziekte van Gaucher of de ziekte van Pompe), waarbij het belangrijk is dat een geneesmiddel in de lysosomen terecht komt. Daarbij is het ook mogelijk om Tf-gelabelde liposomen te optimaliseren door bestanddelen te gebruiken die na een verlaging van de zuurgraad (zoals gebeurt na opname van Tf via clathrine-gecoate blaasjes) uit elkaar vallen, waardoor de inhoud van de liposomen vrijkomt. Vervolgens kunnen peptides aan de liposomen worden toegevoegd die zorgen voor ontsnapping uit de endosomen. Een bekend voorbeeld is het TAT peptide uit het HIV virus, dat zorgt voor ontsnapping van het virus uit de endosomen.

4.1. Liposomaal geneesmiddeltransport tijdens ontstekingen

Ontstekingen, zoals bijvoorbeeld bacteriële meningitis (hersenvliesontsteking) kunnen de functie van de BHB aantasten. Hierbij speelt lipopolysaccharide (LPS), wat op het oppervlak van gram-negatieve bacteriën aanwezig is, een belangrijke rol. Omdat het ook in deze situatie belangrijk is om geneesmiddelen naar de BHB en naar de hersenen te sturen, werd eerst de expressie van de TfR in aanwezigheid van LPS bepaald. Vervolgens werd het liposomale geneesmiddeltransport in aanwezigheid van LPS onderzocht.

De TfR dichtheid was in aanwezigheid van LPS niet veranderd, en ook de opname bleek ongewijzigd (**hoofdstuk 3**). In eerste instantie leek het aantal TfR als gevolg van LPS wel verlaagd te zijn, maar de resultaten waren beïnvloed door de toename in totale hoeveelheid cel eiwit. Om resultaten tussen experimenten te kunnen vergelijken is het gebruikelijk om de receptor-dichtheid per milligram of microgram eiwit uit te drukken. LPS veroorzaakt echter, na ca. 2 uur incuberen, een verhoging in de hoeveelheid cel eiwit door de aanmaak van zogenaamde acute fase eiwitten. Na 16 uur incubatie met

LPS was de eiwitconcentratie in de cellen weer genormaliseerd. Omdat bekend is dat LPS dit eiwitverhogend effect heeft, is ervoor gekozen om in deze gevallen de receptordichtheid te corrigeren voor de hoeveelheid cel eiwit van de controle situatie (geen LPS, uitgevoerd in hetzelfde experiment). Dit gaf aan dat de TfR ook in de aanwezigheid van een bacteriële ontsteking geschikt is voor geneesmiddelafgifte aan de hersenen.

Om het liposomale geneesmiddeltransport tijdens een ontsteking te onderzoeken werd gebruik gemaakt van endotheelcellen en astrocyten die ieder aan een kant van een poreus membraan werden gekweekt. Doordat de endotheelcellen in dit model zeer dicht tegen elkaar aan liggen, zoals bij de BHB het geval is, kan er een Trans-Endothele Elektrische Weerstand (TEER) gemeten worden. Na toevoeging van LPS wordt deze TEER verlaagd, doordat de openingen tussen de endotheelcellen groter worden. Het doel van dit onderzoek was dan ook om te testen of liposomen die een ontstekingsremmer, te weten N-acetyl-L-cysteïne, bevatten een verlaging van TEER tegen kunnen gaan. Deze ontstekingsremmer vangt schadelijke radicalen weg, maar heeft alleen in hele hoge concentraties effect, omdat het zeer moeilijk de cel binnenkomt. De verwachting was dat door het gebruik van Tf-gelabelde liposomen, een lagere concentratie ontstekingsremmer gebruikt kan worden, omdat Tf-gelabelde liposomen makkelijker de endotheelcellen binnen kunnen komen.

Na 16 uur incuberen met liposomen bleek inderdaad dat er geen verlaging van de TEER werd gemeten na toevoeging van LPS (**hoofdstuk 7**). Echter, liposomen die geen ontstekingsremmer bevatten hadden hetzelfde effect. Om dit onverwachte effect verder uit te zoeken werden in eerste instantie liposomen met LPS gemengd en na 2, 6 of 16 uur aan de endotheelcellen toegevoegd. Hieruit bleek dat het LPS dat minimaal 6 uur geïncubeerd was met liposomen geen verlagend effect had op de TEER. Vervolgens is met behulp van fluorescerend LPS vastgesteld dat na 6 uur incuberen met liposomen, ca. 15 – 20 % van het LPS was weggevangen door de liposomen.

Uit deze resultaten blijkt dat liposomen op zich geschikt zijn voor geneesmiddeltoediening tijdens ontstekingen, maar dat de liposomen ook een eigen effect hebben tegen LPS. Wel moet nog worden onderzocht of de interactie van liposomen met LPS de opname van liposomen door endotheelcellen beïnvloedt. Ook moet worden gekeken naar het gebruik van andere ontstekingsremmers, die krachtiger zijn dan N-acetyl-L-cysteïne. Tevens bestaat dan wellicht ook de mogelijkheid om Tf-

geneesmiddel conjugaten te gebruiken, wat in het geval van N-acetyl-L-cysteïne niet mogelijk was.

5. Toekomst perspectieven voor geneesmiddeltransport naar de hersenen

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft zich toegespitst op het gebruik van de TfR voor geneesmiddeltransport naar de hersenen. Hierbij is gebruik gemaakt van een *in vitro* BHB model, waardoor een meer mechanistische aanpak mogelijk was. Voor doelgerichte geneesmiddeltoediening is verder gebruik gemaakt van het natuurlijke ligand voor de TfR. Voor gebruik *in vivo* is dit wellicht niet mogelijk, omdat het al aanwezige Tf in bloed dan al zorgt voor een volledige receptor bezetting. Daarom is er veelvuldig onderzoek gedaan naar het gebruik van antilichamen tegen de TfR voor geneesmiddelafgifte. Deze binden aan de TfR op een andere plaats dan Tf, maar veroorzaken wel opname van de TfR door de endotheelcellen van de BHB. Het nadeel van deze antilichamen is de immunologische reactie die ze opwekken. Idealiter zou een vector gericht tegen de TfR een klein, niet immunologisch ligand moeten zijn, wat opname van de TfR door endotheelcellen initieert. Recent is er onderzoek gedaan naar fragmenten van antilichamen en kleine peptiden die binden aan de TfR, maar er kan ook worden gedacht aan een synthetisch ligand.

Behalve de TfR kan er ook gedacht worden aan andere receptoren op de BHB, zoals bijvoorbeeld de insuline receptor. Ook niet-receptor gemedieerde transport-mechanismen kunnen wellicht gebruikt worden voor geneesmiddeltransport naar de hersenen. Met een nieuwe technologie op het gebied van gen-expressie is het ook mogelijk om nieuwe "targets" te vinden (receptoren of andere transporters), die zeer specifiek tot expressie worden gebracht op de endotheelcellen van de BHB. Of wellicht targets die alleen onder bepaalde condities (bijv. een ziekte) tot expressie worden gebracht op de BHB.

Als alternatieve mogelijkheid voor geneesmiddeltransport naar de hersenen kan ook gedacht worden aan ziekteverwekkers. Bepaalde virussen, bacteriën, schimmels en parasieten zijn namelijk in staat om de BHB te passeren. Bacteriën bijvoorbeeld gebruiken cellen uit het bloed als "het paard van Troje" om de BHB te passeren. Een

ander voorbeeld zijn prionen (ziekte van Creutzfeld Jakob), die de BHB omzeilen door van andere transportroutes naar de hersenen gebruik te maken. Door deze processen te bestuderen kan men in de toekomst wellicht niet alleen nieuwe geneesmiddelen ontwikkelen tegen deze ziekteverwekkers, maar ook gebruik maken van deze transportmogelijkheden.

6. Conclusie

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift draagt bij aan de ontwikkeling van nieuwe methoden voor selectief geneesmiddeltransport naar de hersenen. Hiervoor zijn, via een mechanistische aanpak, de mogelijkheden van de TfR onderzocht, waarbij gebruik is gemaakt van radioactief gelabeld Tf, Tf-enzym conjugaten en Tf-gelabelde liposomen. De efficiëntie van het geneesmiddeltransport hangt vooral af van de grootte van het deeltje: een Tf-enzym conjugaat wordt relatief makkelijk opgenomen door de TfR, terwijl de opname en de intracellulaire "routing" van Tf-gelabelde liposomen anders verloopt. De belangrijkste conclusie uit dit onderzoek is dat sturing van geneesmiddelen naar de hersenen via de TfR op de BHB mogelijk is.