

dc_157_11

**VÉR-AGY GÁT MODELLEK LÉTREHOZÁSA,
JELLEMZÉSE ÉS ALKALMAZÁSA
ORVOSBIOLÓGIAI KUTATÁSOKBAN**

Dr. Deli Mária Anna

Értekezés

a Magyar Tudományos Akadémia doktora

cím elnyerésére

2011

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések és jelölések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	7
1.1. A vér-agy gát felépítése és szerepe	7
1.2. A vér-agy gát vizsgálatok orvosi jelentősége	10
1.3. A vér-agy gát modellezése	14
2. Kutatási célok.....	19
2.1. A vér-agy gát modellezése sejtenyészetekkel	19
2.2. A vér-agy gát károsodásának és védelmének vizsgálata modellek segítségével	20
2.3. Új módszerek agyba való gyógyszerbejuttatás elősegítésére	21
3. Kísérleti modellek és legfontosabb vizsgálati módszerek.....	22
3.1. Anyagok	22
3.2. Sejtenyésztés	22
3.3. Permeabilitási, biokémiai és molekuláris biológia vizsgálatok sejtenyészeten	25
3.4. Morfológiai vizsgálatok	29
3.5. Állatkísérletek	31
3.6. Permeabilitási együtthatók számolása	36
3.7. Statisztikai kiértékelés	36
4. A vér-agy gát modellezése sejtenyészetekkel.....	37
I. Primer agyi endothelsejt-tenyészetek előállítása és jellemzése, a tenyésztési körülmények optimalizálása	37
II. Agyi mikroér pericyták hatása tenyésztett agyi endothelsejtek vér-agy gát sajátosságaira, és felhasználásuk egy új, három sejttypusból álló tenyésztéses vér-agy gát modellhez	48
5. A vér-agy gát károsodásának és védelmének vizsgálata modellek segítségével.....	54
5.1. Microbiális pathogének vizsgálat.....	54
III. A bakteriális lipopoliszacharidok hatása a vér-agy gát permeabilitására <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>	54
IV. A tumor nekrozis faktor- α hatása a vér-agy gát permeabilitására	63
V. HIV-1 Tat burokfehérje hatása agyi endothelsejtek kapcsolófehérjeire	66
VI. <i>Toxoplasma gondii</i> átjutásának vizsgálata <i>in vitro</i> vér-agy gát modellen	68
5.2. Agyi ischaemia kóroki tényezőinek vizsgálata.....	70
VII. Szabad oxigényökök hatása tenyésztett agyi endothel-egysejtrétegek ellenállására	70
VIII. Glutaminsav hatása agyi endothelsejtek okkludin fehérje szintjére és barrier funkciójára	71
IX. Szöveti plazminogén aktivátor hatása agyi endothelsejtek P-glikoprotein efflux pumpájának működésére	74
X. Agyi ischaemia és reperfusio vér-agy gátra kifejtett hatása, és annak befolyásolása 4 ér lekötéses modellen patkányokban	75
XI. Átmeneti előagyi ischaemia hatása a vér-agy gát permeabilitására stroke-ra Hajlamos spontán magasvérnyomású patkányon	78
XII. A pitavasztatin hatása primer agyi endothelsejtek vér-agy gát működésére	81
XIII. A gliasejtek szerepe a vér-agy gát prekondicionálás által létrehozott védelmében	82
5.3. Neurodegeneratív betegségekben szerepet játszó kóros fehérjék vizsgálata.....	84
XVI. A prion peptid hatása agyi endothelsejtekre	84
XVII. Az amiloid- β peptidek és a csonkolt tau fehérje hatása agyi endothelsejtekre	88
6. Új módszerek agyba való gyógyszerbejuttatás elősegítésére.....	97
XVI. Gyógyszervizsgálatok <i>in vitro</i> vér-agy gát modelleken	97
XVII. Bioaktív anyagok agyba történő bejuttatása a nazális úton keresztül	100

7. A kutatás eredményeinek összefoglalása.....	107
8. Saját közlemények.....	110
8.1. Az értekezés alapját képező közlemények	110
8.2. Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények	114
8.3. Az értekezéshez nem kapcsolódó, a PhD fokozat megszerzése óta megjelent egyéb publikációk	115
9. Irodalomjegyzék.....	117
10. Köszönetnyilvánítás.....	127

Rövidítések és jelölések jegyzéke

α -SM	símaizom aktin
A	felszín
A β	amiloid- β peptid
A β 1-40	amiloid- β peptid 1-40-es peptid szakasza
A β 1-42	amiloid- β peptid 1-42-es peptid szakasza
ABC transzporter	ATP-kötő kazetta szállítófehérje
ADME	adszorpció, disztribúció, metabolizmus, excretio
AE	abszorpció fokozó oldat
AEBSF	4-(2-aminoetil)benzénszulfonil-fluorid (Pefabloc)
AFM	atomerő-mikroszkópia
AGE	glikációs végtermék (advanced glycated end product)
AIDS	szerzett immunhiány tünetegyüttes
AMCA	7-amino-4-metil-3-kumarinilacetát
AMP	adenozin-monofoszfát
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
ATP	adenozin-trifoszfát
β -KAT	β -katenin adherens junkció fehérje
BCRP	mellrák rezisztencia fehérje, ABCG2 pumpa
BEC	agyi endothelsejt
BIM	bis-indolil-maleimid
BO	szaglógumó
BSA	szarvasmarha szérum albumin
BUI	az agyi anyagfelvétel mértéke
[C] _A	abluminalis koncentráció
[C] _L	luminalis koncentráció
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
Cat-1	kationos aminosav transzporter-1
Cat	kataláz
CCD	töltéscsatolt eszköz (optikai érzékelő)
CD	„cluster of differentiation” membrán-antigén
CI	sejtindex
CINC-3	citokin-indukált neutrophil kemoattraktáns-3
clearance	tisztulási hányados
CNS	központi idegrendszer
CO ₂	széndioxid
CPT-cAMP	8-(4-klorofeniltio)-ciklikus adenzin-monofoszfát
CsA	ciklosporin A
CTX	agykéreg
Da	dalton
DAF	4-amino-5-metil-amino-2',7'-difluoro-fluorescein-diacetát
DCFDA	klorometil-dikloro-dihidro-fluorescein-diacetát
DHA	dokozahexaénsav
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék
Dnáz I	deoxiribonukleáz I
DNQX	6,7-dinitrokvinoxalin-2,3-dion
DPBS	Dulbecco foszfát puffer
DHA	dokozahexaénsav
DNS	deoxiribonukleinsav
DPPE	N,N-dietil-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin [generikus neve: tezmilifén]
EB	Evans kék festék
EBA	albuminhoz kötött Evans kék festék
EDTA	etilén diamin tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
ELISA	enzimhez kötött ellenanyag módszer
EM	elektronmikroszkópos
EPA	endothelsejtek, pericyták és astroglia sejtek hármass ko-kultúrája
ER	endoplazmás retikulum
ERK	extracellular signal-regulált kinázok
ESAM	endoteliális sejtadhéziós molekula
FACS	fluoreszcencia aktivált sejtválogatás
F-aktin	citoszkeletális aktin filamentumok
FBS	foetalis borjú szérum
FD-4	fluorescein-izotiocianáttal jelölt 4 kDa dextrán
FGF-2	fibroblaszt növekedési faktor-2
g	gyorsulás
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
γ Gt1	gamma-glutamil-transzpeptidáz-1

GLUT-1	glükóz-transzporter-1
GMP	guanin-monofoszfát
GS-B	glutation-S-bimán
GSI-B ₄	<i>Griffonia simplicifolia</i> izolektin I-B ₄
H1 receptor	hisztamin 1 típusú receptor
H2 receptor	hisztamin 2 típusú receptor
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
H-89	bromocinnamil-aminoetil-5-izokvinolin-szulfonamid
HA	hialuronsav oldat
HC	hidrokortizon
HE	hematoxilin-eozin festés
Hic	intracelluláris hisztamin kötőhely
HIV-1	emberi immunhiányt okozó vírus 1-es típusa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A
HUVEC	emberi köldökvéna endothelialejt
ICAM-1	sejtközötti adhéziós molekula-1
Ig	immunglobulin
IFN _γ	interferon-γ
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor-1
IP ₃	inozitol-trifoszfát
IPC	ischaemiás prekondocionálás
IU	nemzetközi egység
JAM	junkcionális adhéziós molekulák
K _{in}	transzport együttható (mértékegység: μl/s/g)
KIR	központi idegrendszer
KLDN-3	klaudin-3
KLDN-5	klaudin-5
KO	knock-out egér
LAT-1	nagy neutrális aminosavakat szállító fehérje 1-es típusa
LC-MS/MS	kapcsolt tandem tömegspektrometria
LDH	laktát-dehidrogenáz
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanin
logBB	agyi és plazma koncentráció hányados
logPS	felszínre számított permeabilitási jelzőszám
LPS	lipopoliszacharid
LRP	LDL receptor kapcsolt fehérje
LY	Lucifer sárga festék
M	moláris tömeg (g/mol)
MA	mukoadhezív oldat
MCP-1	monocyta kemoattraktáns fehérje-1
Mct	monokarboxilsav transzporter
MEK1/2	mitogén-aktivált protein kináz kináz 1/2
MEOX-2	mesenchymális homeobox gén-2
MK-801	(+)-5-metil-10,11- dihidro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imin maleát (dipocilpin)
mM	millimólos koncentráció
μM	mikromólos koncentráció
m/V	vegyesszázalék
MOI	a fertőzés megsokszorozódása (multiplicity of infection)
MRI	mágneses rezonancia képalkotó vizsgálat
MRP	multidrog rezisztencia fehérje (ABCC transzporter család)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NF-κB	nukleáris faktor-κB
NG2	kondroitin-szulfát proteoglikán
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
OATP-1/2	szerves anion transzporter polipeptid 1/2, SLC21A6
Occl	occludin
OCT	szerves kation transzporter
OEC	a szaglőidegeket burkoló sejtek (olfactory ensheathing cells)
OGD	oxigén és glükóz megvonás
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PBMC	perifériás vér monocyta sejtek
PBS	foszfát puffer oldat
PDGF	vérlemezkéből származó növekedési faktor
PDS	vérplazmából készített szérum
P	valószínűség
Papp	permeabilitási együttható

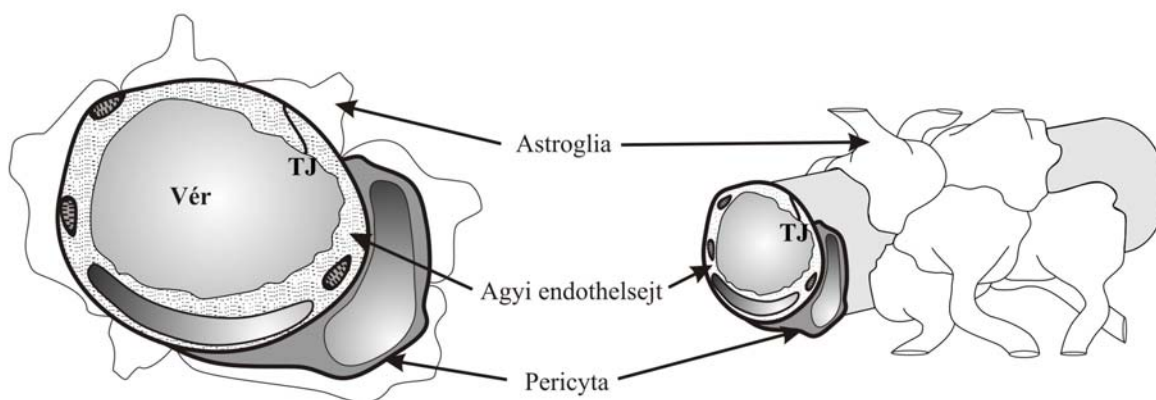
Pe	endothelsejtekre számított permeabilitási együttható
PECAM	vérlemezke-endothelsejt adhéziós molekula
PET	pozitron emissziós tomográfia
Pgp	P-glikoprotein, ABCB1 pumpa
PhS	fiziológiás sóoldat
PI-3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PMA	12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát
PMN	polymorphonuclearis leukocytákat
PPS	pentozán
Prkaca	protein kináz A katalitikus alegység
Prkar1a	protein kináz A regulátoros alegység
PrP	prionfehérje
PrP106-126	humán prionfehérje 106-126-os peptid szakasza
PrP ^{Sc}	prionfehérje kóros konformációja
PS	adott felszínre vonatkozó clearance sebessége
PSt	totál PS (filter + sejtréteg)
PSf	üres filterre vonatkozó PS
PTV	pítavasztatin
qPCR	kvantitatív polimeráz-láncreakció
R123	rodamin-123
R _n	a sejtek és az elektród között mért impedancia
R _b	háttér impedancia
RAGE	glikációs végtermék receptor
RNS	ribonukleinsav
RO	szaglóhám
RO 20-1724	4-3-butoxi-4-metoxi-benzil-imidazolidin
ROS	reaktív oxigén gyökök
RR	légzőhám
RSD	relatív standard deviáció
RT-PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SAP	szérum amiloid P komponens
Scr	kevert sorrendű, azonos aminosavakat tartalmazó peptid
SD	az átlag szórása (standard deviáció)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	az átlag hibája (standard error of the mean)
SF	nátrium-fluoreszcein
SLC	tápanyagszállító fehérjék
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SPECT	egyfoton emissziós számítógépes tomográfia
SHRSP	stroke-ra hajlamos magasvérnyomású patkánytörzs
SRF/MYOcD	szérum válasz faktor és myocardin transzkripció faktorok
Tat	a transzkripció transzaktivátora
TBS	Tris-sel pufferelt sóoldat
TEER	transendothelialis elektromos ellenállás
TGF-β	transzformáló növekedési faktor-β
Thy1.1	thymocyta antigén-1
TJ	szoros sejtközötti kapcsolat (tight junction, zonula occludens)
TNF-α	tumor nekrozis faktor-α
tPA	szöveti plazminogén aktivátor
V _A	abluminalis térfogat
V _L	luminalis térfogat
VEGF	érendotheliális növekedési faktor
VEGFR-2	érendothel növekedési faktor receptor 2
VE-kadherin	érendothelsejt-kadherin
vs.	versus
vWF	von Willebrand faktorhoz kapcsolódó antigén
WKY	Wistar-Kyoto patkány
WT	vad típusú
ZO	zonula occludens fehérjék

1. BEVEZETÉS

1.1. A vér-agy gát felépítése és szerepe

Paul Ehrlich és munkatársai 1885-ben közölt anilinfestékekkel végzett kísérletei óta ismert, hogy a központi idegrendszert a szervezet többi részétől valamiféle gát elválasztja, de ennek anatómiai alapját, jelentőségét, működését csak több nemzedék kutatómunkája révén sikerült azonosítani [Liddelow, 2011]. Az idegrendszer és a vér között dinamikus határfelületet képző sejtek funkcionális egysége a vér-agy gát [Abbott és mtsai, 2010]¹. Az emberi agy hajszálereinek becsült hossza 600 kilométer, és az általuk létrehozott vér-agy gát felszíne mintegy 12-20 m² [Pardridge, 2002]. Ezen a felületen zajlik a vér és a központi idegrendszer között a molekulák és sejtek szigorúan szabályozott cseréje. A vér-agy gát elsődleges szerepe az idegsejtek szinapszisainak működéséhez szükséges ionos homeosztázis megteremtése [Abbott, 2002], emellett tápanyagokkal látja el a központi idegrendszert, aktív pumparendszere révén megvédi a káros anyagoktól és metabolitoktól, és lehetővé teszi az idegrendszer és periféria közötti információ-átadást [Zlokovic, 2008].

A gerincesek többségében, így az emlősökben és az emberben is, a gát funkciót az endothelsejtek töltik be. Az astroglia sejtek végtalpai az agyi hajszál- és mikroereket teljes hosszukban beburkolják (1. ábra) [Abbott, 2002]. Mindkét sejtípus kölcsönhatásban áll az endothelsejtek bazális membránjába beágyazódott pericytákkal, valamint az erek körül elhelyezkedő mikrogliá sejtekkel és a mikroereket beidegző neuronokkal.



1. ábra. Az agyi hajszálerek szerkezete sematikus ábrán. TJ, tight junction, szoros sejtközi kapcsolat [Deli, 2011].

A neurovaszkuláris egység sejtjei közötti kölcsönhatás kulcsfontosságú a vér-agy gát működésének létrejöttében és fenntartásában [Abbott és mtsai, 2010]. Elsőként az astroglia sejtek szerepét tárták fel az agyi endothelsejtek tulajdonságainak és működésének szabályozásában [Tao-Cheng és mtsai, 1987; Nagy és Martinez, 1991; Haseloff és mtsai, 2005; Abbott és mtsai, 2006]. A közelmúltban felvetődött, hogy más perivaszkuláris sejtek, köztük a mikrogliá sejtek és pericyták is részt vehetnek a vér-agy gát kialakulásában, fenntartásában és szabályozásában [Zlokovic, 2008]. Ezek a szervspecifikus, sejt-specifikus kölcsönhatások hozzák létre az agyi endothelsejtek különleges, epithelsejtekhez hasonló tulajdonságait, amelyek a többi endothelsejttől megkülönböztetik és a vér-agy gát funkció betöltésére képessé teszik őket [Deli és Joó, 1996].

Az agyi endothelsejtek a perifériás erek belhámsejtjeihez hasonlóan szabályozzák a vérárvadást, és vazóaktív anyagok, mint nitrogén-monoxid, endotelinek, angiotenzinek, adrenomedullin, útján befolyásolják az értónust és ezáltal az agyi keringést is [Busija és mtsai, 2008].

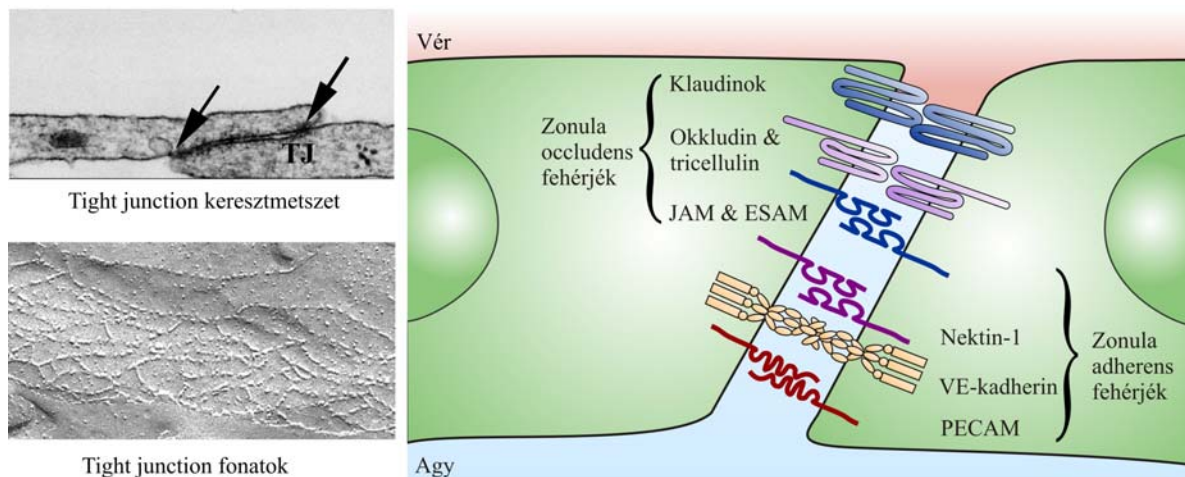
¹Az idegrendszer homeosztázisának fenntartásában részt vesz még a vér-ideg, vér-retina, valamint a plexus chorioideusok által alkotott vér-liquor gát is, de ezeket, a vér-agy gátnál kisebb felszínű barrier rendszereket a jelen értekezés nem tárgyalja.

Az agyi endothelsejtek vér-agy gát sajátosságai három fő csoportba sorolhatók (1. táblázat). A vér-agy gát morfológiai alapját az agyi endothelsejteket összekötő szoros kapcsolatok (*zonula occludens*, vagy tight junction, TJ) képezik (1. ábra), valamint csekély mértékű a sejten belüli vezikuláris transzport [Reese és Karnovsky, 1967]. Ez azt jelenti, hogy sem molekulák, sem sejtek nem jutnak át szabadon az ereket bélelő endothel egysejtére. Ezt tükrözi az agyi mikroereken *in vivo* mért igen magas, 2000 Ω elektromos ellenállás. Sokatmondó adat az agyi hajszálerek endothelsejteinek hézagmentes illeszkedésére, hogy mintegy százszor kisebb az átjárhatóságuk, mint a szervezetben másutt található hajszálereké [Pardridge, 2002].

1. táblázat. A vér-agy gát sajátosságok főbb csoportjai

	Alkotóelemei	Szerepe
Anatómiai gát	Szoros sejt-közötti kapcsolatok Kevés pinocitotikus vezikula Sejtfelsőzíni glikokalix	A vér és a központi idegrendszer közötti szabad sejt- és anyag-kicserélődés korlátozása
Transzport utak	Lipid-mediált diffúzió Karrierek Efflux pumpák Adsorptív és receptor-mediált transzendotheliális transzport	Tápanyagok, mint cukrok, aminosavak, lipidek, vitaminok, ásványi sók, metabolikus prekurzorok, peptidek, fehérjék Xenobiotikumokkal szembeni védelem Metabolitok mennyiségének szabályozása
Metabolikus gát	Fázis I és II metabolikus enzimek	Bioaktív molekulákkal szembeni védelem

A szoros kapcsolatokat alkotó fehérjéket három csoportra oszthatjuk. Az agyi endothelsejteken leírt integrális TJ membrán fehérjék közé soroljuk az okkludint, a klaudin család tagjait, amelyek közül a legfontosabb a klaudin-5, és a junkcionális adhéziós molekulákat [Deli, 2009]. A TJ-hoz a citoplazmában kapcsolódó fehérjékhez tartozik többek között a *zonula occludens* fehérjecsald (ZO 1-3), a cingulin, és az aktin hálózat. A harmadik csoportot a TJ-hoz kapcsolódó jeltovábbító molekulák alkotják, mint például a Ras-kötő fehérjék, a heterotrimer G-fehérjék, vagy a protein kináz C egyes izoformái.

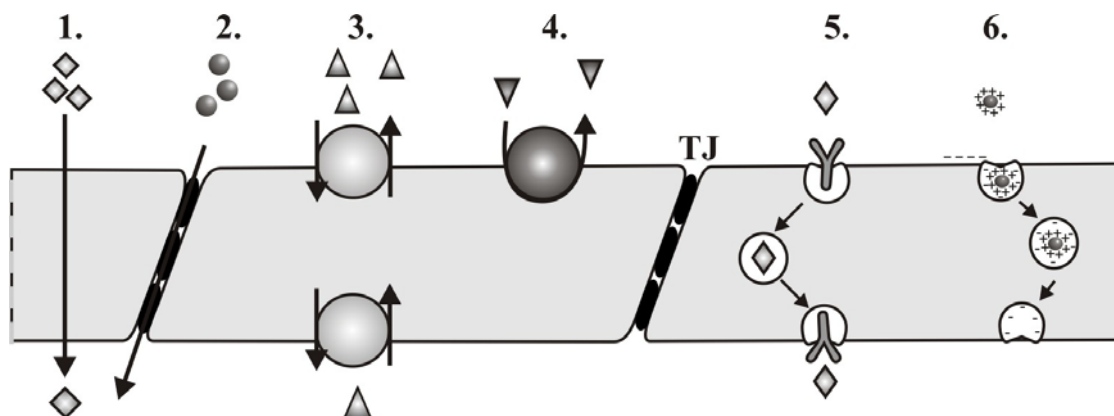


2. ábra. A szoros sejt-közötti kapcsolat (TJ, tight junction) szerkezetének keresztmetszete transzmissziós elektronmikroszkópos felvételen; a fonatok szerkezete pásztázó elektronmikroszkópos képen; a tight junction főbb integrális membránfehérjéi sematikus ábrán: ESAM, endothelsejt-szelektív adhéziós molekula; JAMs, junkciós adhéziós molekulák; PECAM, vérlemezke-endothelsejt adhéziós molekula; VE-kadherin, érendothelsejt-kadherin.

Az agyi endothelsejtek permeabilitásának egyik meghatározó eleme a sejt-közötti kapcsolatok szorossága, amit számos jelátvivő útvonal befolyásol. A mitogén-asszociált protein kinázok, a protein kináz C, a nitrogén-monoxid, vagy a ciklikus GMP fokozzák a TJ átjárhatóságát, míg a ciklikus AMP csökkenti azt [Krizbai és Deli, 2003; Deli és mtsai, 2005]. A sejt-közötti kapcsolatok képezik az agyi

endothelsejtek polaritásának alapját is, ez az ún. kerítés funkció, tehát eltérő a membránfehérjék expressziója a lumenális (vér felőli) és az abluminális (agy felőli) membránokon [Wolburg és mtsai, 2009]. Az enzimek és szállításfehérjék aszimmetrikus elhelyezkedése igen lényeges a vér-agy gát működése szempontjából. Így a P-glikoprotein efflux pumpa a lumenális membránban található, és ott hatékonyan gátolja a xenobiotikumok agyi bejutását, míg az agy felőli membránban elhelyezkedő Na^+/K^+ -adenozin-trifoszfátáz enzim felelős az agyi ionos egyensúly fenntartásáért [Abbott és mtsai, 2010]. A molekulák agyi endothelsejtek közötti szabad átjutását megakadályozó szoros kapcsolatok mellett fontos védelmi vonalat képez és a sejten keresztüli átjutást is jelentősen csökkenti a fenesztrációk hiánya, a vezikulák kis száma, és a lumenális sejtfezínen található erős negatív töltésű glikokalix (1. táblázat) [Wolburg és mtsai, 2009].

A zsírolékony, 400-500 Daltonnál kisebb molekulák, mint az alkohol, koffein vagy nikotin szabad diffúzióval jutnak az agyi endothelsejtek membránján át az idegrendszerbe, azonban a vízóldékony tápanyagok, gyógyszerek, biomolekulák, mint a peptidek és fehérjék bejutását a szoros kapcsolatok gátolják (3. ábra). Mindezek alapján nyilvánvaló, hogy az idegrendszert behálózó hajszálerek egymáshoz szorosan illeszkedő endothelsejtjeinek speciális szállításrendszerekre van szüksége a tápanyagok átjuttatásához (1. táblázat) [Abbott és mtsai, 2010]. Az idegrendszer sejtjeinek működéséhez szükséges energiaforrások, mint a cukrok és ketontestek, a fehérjéket felépítő aminosavak, a membránokhoz szükséges lipidek, a vitaminok, nyomelemek, biogén aminok, peptidek és hormonok átjuttatását ezért szállítófehérjék végzik (3. ábra) [Deli, 2011]. Ilyen specifikus transzport feladatot látnak el például az L- és A-típusú aminosav transzporterek és a glükóz transzporter-1.



3. ábra. A vér-agy gát szállítórendszerei: 1: lipid-mediálta diffúzió; 2: paracelluláris diffúzió; 3: karrierek; 4: aktív efflux transzport; 5: receptoron keresztüli transzport; 6: adszortív transzcitózis [Deli, 2011].

Az idegrendszeri működéshez nem szükséges, illetve kifejezetten káros anyagok kívül tartása, eltávolítása, illetve a metabolitok agyi szintjének szabályozása efflux transzporter pumpák segítségével történik [Terasaki és Ohtsuki, 2005]. Az ATP-kötő kazetta (ABC)-transzporterek családjába tartozó P-glikoprotein ligandjai elsősorban xenobiotikumok, mint a vinca alkaloid citosztatikumok, egyes antibiotikumok, antiepileptikumok, vagy a HIV proteáz inhibitorok [Löschner és Potschka, 2005]. A vér-agy gát multidrog rezisztencia fehérjéi (MRP 1, 4, 5 és 6) főleg leukotriéneket, glutation-konjugált vegyületeket pumpálnak az endothelsejtekből vissza a vérbe, megakadályozva bejutásukat az agyba [Scherrmann, 2005]. Más vér-agy gát efflux pumpák az organikus anionok, a szerves savak, és a neurotranszmitterek, úgymint a glutamát, szerotonin és kinurénsav eltávolításában vesznek részt [O’Kane és mtsai, 1999; Németh és mtsai, 2005]. A peptidek és fehérjék, mint a vasat szállító transferrin, a lipoproteinek vagy az inzulin, receptor-függő transzcitózissal jutnak át a vér-agy gáton [Pardridge, 2002; Banks és mtsai, 2006]. Az adszortív, nem-specifikus, endothelsejten keresztüli transzport, és ezen keresztül például a szérumfehérjék bejutása az idegrendszerbe élettani körülmények között a vér-agy gáton igen kicsi [Hervé és mtsai, 2008].

Számos fázis I és II enzimet, mint a γ -glutamil-transzpeptidáz, a butirilkolin- és acetilkolin-észteráz, a monoamin-oxidáz A és B vagy a glutamát-dekarboxiláz, találunk az agyi endothelsejteken,

amelyek transzport folyamatokban, illetve a metabolikus vér-agy gát kialakításában játszanak szerepet [Zlokovic, 2008]. Erre a legismertebb példa a dopamin. Prekurzorát, az L-DOPA-t a kétirányú LAT-1 (nagy neutrális aminosavakat szállító fehérje 1-es típusa) gyorsan és hatékonyan bejuttatja az agyi endothelsejteken át az agyszövetbe. Az endothelsejteken azonban a DOPA-dekarboxiláz *in situ* dopaminná alakítja, ami viszont csapdázódik az agyi endothelsejteken [Betz és Goldstein, 1986].

1.2. A vér-agy gát vizsgálatok orvosi jelentősége

Több közelmúltban megjelent, nagy jelentőségű tanulmány is felhívja a figyelmet arra, hogy a vér-agy gát, mint a neurovaszkuláris egység eleme sokkal több folyamatban vesz részt, mint pusztán a terápiás és diagnosztikus vegyületek központi idegrendszeri bejutásának korlátozása [Zlokovic, 2008; Neuwelt és mtsai, 2008 és 2011]. Az előzőleg részletezett, idegrendszeri homeosztázist biztosító működés mellett a vér-agy gát sejtjeinek fontos élettani szerepe az agyi véráramlás [Peppiatt és mtsai, 2006; Iadecola és Nedergaard, 2007; Busija és mtsai, 2008], valamint a idegi fejlődés szabályozása. Az idegi és érfejlődés számos közös molekulával és sejtes mechanizmussal rendelkezik, és a neuro- és angiogenezis az embrionális és felnőtt agyban közösen szabályozódik [Neuwelt és mtsai, 2011]. A neurovaszkuláris egység sejtjeinek élettani folyamatai egymáshoz szorosan kapcsolódnak, így az idegsejtek aktivitása és az agyi vérátáramlás, anyagcsere, érzékszervi és trofikus folyamatok kapcsolatban állnak [Neuwelt és mtsai, 2011].

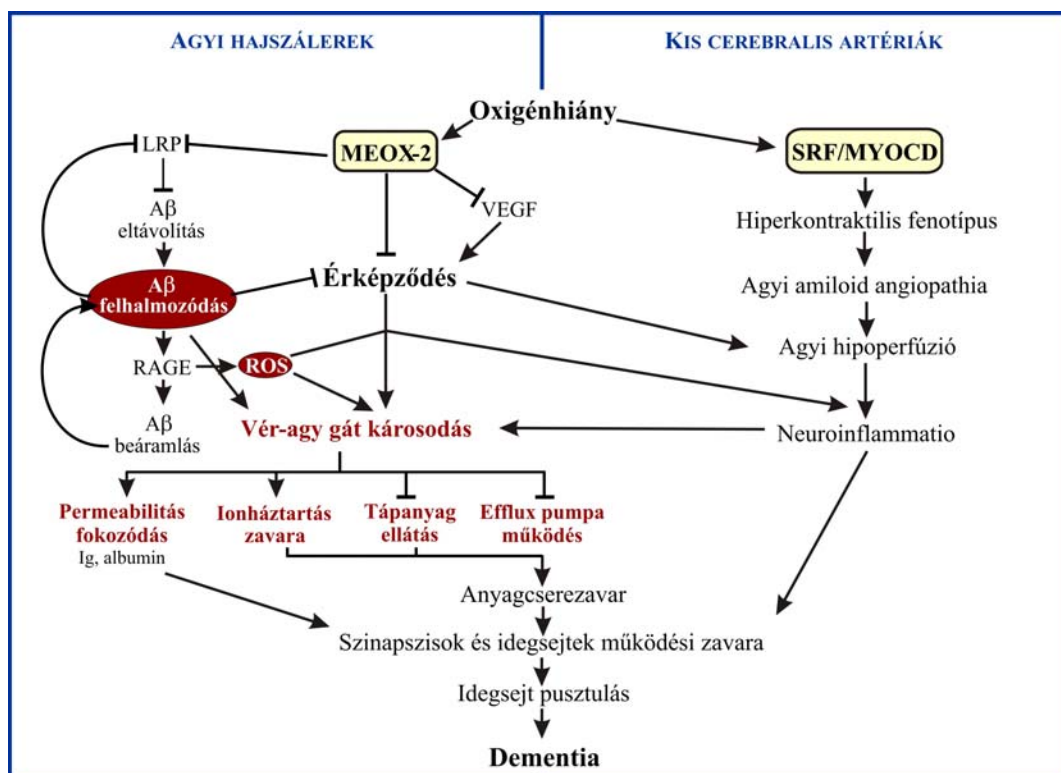
Orvosi szempontból azonban a legnagyobb jelentősége azoknak a keringési, fertőző és neurológiai betegségeknek van, ahol a vér-agy gát működése károsodik, és ez a működési zavar hozzájárul a betegségek pathológiájához (2. táblázat)².

2. táblázat. Betegségek és kórállapotok, amelyekben vér-agy gát sérülések és működési zavarok jönnek létre, illetve amelyek kialakulásában ezek szerepet játszanak [Deli, 2005; Zlokovic, 2008; Neuwelt és mtsai, 2011]. Kiemelés: azok a betegségek vagy kórállapotok, amelyek kísérletes vizsgálata szerepel az értekezésben. GLUT-1, glükóz-transzporter-1; HIV, emberi immunhiányt okozó vírus-1; tPA, szöveti plazminogén aktivátor.

Neurodegeneratív betegségek	Alzheimer-kór Prion betegség Parkinson-kór Amyotrophiás lateral sclerosis Huntington-kór
Agyérbetegségek	Stroke: ischaemiás agyoedema, tPA és reperfüzió kiváltotta agyi vérzés Akut hegyibetegség és magasság kiváltotta agyoedema Familiális cerebrális cavernosus malformációk
Epilepszia és görcsállapotok	Farmakorezisztencia epilepsziás betegekben GLUT-1 mutáció agyi endothelsejteken Alexander betegség
Fertőzések	HIV (neuroAIDS), Nyugat-Nílusi láz; E. coli , <i>H. influenzae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>B. burgdorferi</i> ; <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> ; <i>Plasmodium</i> spp. (agyi malária), <i>S. mansoni</i> , Toxoplasma és <i>Trypanosoma</i> spp. okozta idegrendszeri fertőzések Sepsis
Agydaganatok	Központi idegrendszeri eredetű és metasztatikus daganatok, és azok farmakorezisztenciája Agyoedema
Idegrendszeri gyulladásos betegségek	Sclerosis multiplex Gyulladásos fájdalom
Traumás sérülések	Koponyát és gerincet érő traumás elváltozások
Metabolikus betegségek	Diabetikus ketoacidózis során kialakuló agyoedema és agyi ischaemia Kóros elhízás (csökkentett vér-agy gát leptin transzport) Alkoholbetegség Hepaticus encephalopathia

² A vér-agy gátat érintő betegségek közül csak azok kerülnek említésre, amelyek kísérletes vizsgálatát az értekezés tárgyalja

Neurodegeneratív betegségekben, mint az Alzheimer- és Parkinson-kór, vagy az amyotrophiás lateral sclerosis a vér-agy gát működésének számos eleme sérül. A sejtek közötti szoros kapcsolatok meggyengülnek, megváltoznak az agyi endothelsejteken keresztüli transzportfolyamatok, és így a vér és az agy közötti anyag- és sejtátjutás, kórossá válik az angiogenesis, agyi hipoperfúzió alakul ki, és gyulladásos válaszreakciók jönnek létre [Deli, 2005; Zlokovic, 2008]. Az Alzheimer-kór neurovaszkuláris hipotézise az amiloid peptidek vér-agy gáton keresztüli efflux pumpa (P-glikoprotein) és receptor-mediálta (LRP, RAGE) transzportjának változását, ezzel az agyi amiloid metabolizmus és transzport felborulását kulcsfontosságú tényezőnek tartja a betegség kialakulásában (3. ábra) [Zlokovic, 2005 és 2008; Bell és Zlokovic, 2009]. Alzheimer-kórban az agyi endothelsejteken a mesenchymális homeobox gén 2 (MEOX-2) alacsony szintű kifejeződése gátolja a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) által létrehozott érképződést, ami apoptotikus sejthalálhoz, az agyi hajszálerek visszafejlődéséhez és az LDL receptor kapcsolt fehérje (LRP) transzporter működésének csökkenéséhez vezet. Ezek a folyamatok az amiloid- β peptid agyi felhalmozódását, és az agyi keringés csökkenését eredményezik. A glikációs végtermék receptor (RAGE) felerősíti ezt a kaskád. Agyi artériákban az erek simaizom sejtjeinek fenotípusát szabályozó szérum válasz faktor és myocardin transzkripciós faktorok túltermelődése hiperkontraktilitást hoz létre, ami csökkenti az agyi vérátfolyást. A vér-agy gát károsodás és az idegrendszer gyulladásos válaszreakciója súlyosbítja az idegsejtek működési zavarát, ami az idegsejtek pusztulásához és szellemi hanyatláshoz vezet (4. ábra).



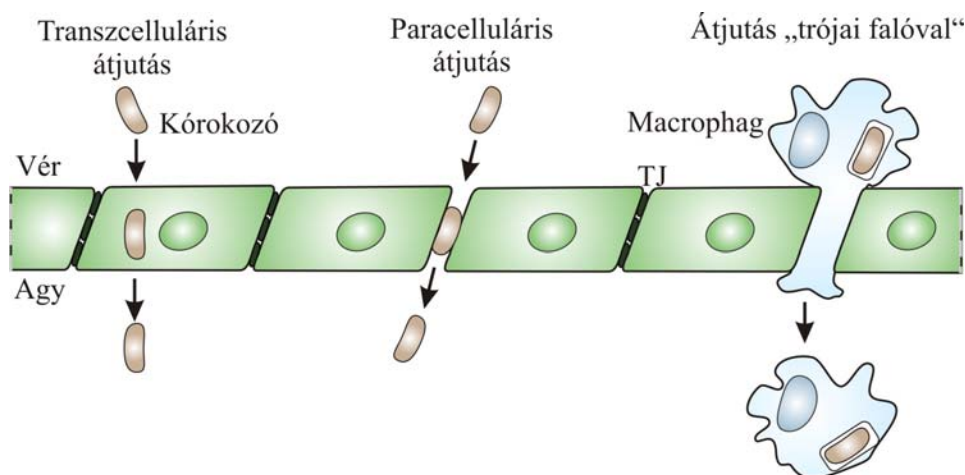
4. ábra. A vér-agy gát szerepe az Alzheimer-kór kialakulásában. A β , amiloid- β peptid; Ig, immunglobulin; LRP, LDL receptor kapcsolt fehérje; MEOX-2, mesenchymális homeobox gén 2; RAGE, glikációs végtermék receptor; ROS, reaktív oxigén gyökök; SRF/MYOC, szérum válasz faktor és myocardin transzkripciós faktorok; VEGF, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor [Zlokovic, 2008 nyomán]

Fontos megemlíteni, hogy az öregedés során az agyban a neurovaszkuláris egység sejtjeinek működése egymástól szétkapcsolódik, mind nyugalomban, mind működéskor csökken az agyi vérátfolyás, az agyi hajszálerekben degeneratív változások jönnek létre, amelyek a betegségek első tünetei lehetnek és megelőzik az idegsejtek pusztulását [Zlokovic, 2008]. Más neurológiai betegségek kialakulásában is szerepet játszanak a fenti folyamatok, így epilepsziában a görcsállapotok és a vér-

agy gát sérülése gyulladásos folyamatokon keresztül kölcsönösen fokozzák egymást [Friedman és Dingle, 2011]. A sclerosis multiplex kialakulásában és lefolyásában a vér-agy gát kulcsfontosságú a fehérvérsejtek, főként a citotoxikus T-limfociták idegrendszerbe való bejutásában, és a relapszusokat mindig fokozott vér-agy gát permeabilitás előzi meg [Zlokovic, 2008].

Az agyi érkatasztrófák a felnőttkori halálozás leggyakoribb okai között szerepelnek, és a felnőttkori rokkantság első számú okozói [Ovbiagele és Nguyen-Huynh, 2011]. Az akut ischaemiás stroke, és az intracerebrális vérzések, valamint a traumás agyi sérülések kialakulásának számos közös eleme van: mindegyikben létrejön a vér-agy gát sérülése és az agyödéma, amelyek mögött oxidatív stressz, gyulladás, excitotoxicitás és sejtpusztulás áll [Sangha és Gonzales, 2011]. A glutaminsav által kiváltott excitotoxicitás, a kalcium túltöltés és a szabad oxigénradikálok az infarktus magjában gyors sejtpusztulást eredményeznek, míg a határzónában, a penumbra-ban elhúzódó sejtkárosodás alakul ki a gyulladást és apoptózist okozó mediátorok, citokinek, az aktiválódó ciklooxygenáz-2 és a metalloproteinázok hatására [Candelario-Jalil, 2009]. A subarachnoideális vérzés során fellépő vazogén agyödémának mind pathogenetikusan, mind prognosztikusan jelentősége van [Dóczi, 1985]. Az agyödémának több mediátorát is azonosították, ezek közé tartozik a hisztamin, a bradikinin és a reaktív szabadgyökök [Joó és mtsai, 1994; Schilling és Wahl, 1999]. Ugyan az ischaemiás stroke patofiziológiájának megismerésében az utóbbi időben jelentős előrelépés történt, a gyógyításában egyelőre csak egy engedélyezett gyógyszert, a szöveti plazminogén aktivátort (tPA) tudják csak alkalmazni. A tPA használatát nehezíti, hogy a terápiás ablaka szűk, mindössze pár órás, és az intracranialis vérzés az egyik lehetséges mellékhatása.

Az emberi mikrobiális patogének közül számos okoz idegrendszeri fertőzést, amelyek jelentős morbiditással és mortalitással járnak. A fertőzés létrejöttének egyik alapvető lépése, hogy a kórokozók átjussanak az idegrendszert védő barriereken. Eközben nemcsak kapcsolatba lépnek az agyi endothelsejtekkel, felhasználva azok sejt felszíni molekuláit a kitapadáshoz és átjutáshoz, de különböző fokú vér-agy gát károsodást is okoznak, amely a betegség lefolyását befolyásolja. A neurotróp vírusok között, mint a Nyugat-Nílusi láz vírus vagy a herpeszvírusok, kiemelt fontosságú az emberi immunhiányt okozó vírus, a HIV-1 több okból is. A világjárvány nagysága miatt ennél a fertőzésnél a legnagyobb a morbiditás és mortalitás. A szerzett immunhiány tünetegyüttes (AIDS) betegség során igen gyakran alakul ki idegrendszeri szövődmény (neuroAIDS), encephalitis és demencia, amelynek során a vér-agy gát károsodás fontos pathogenetikusan tényező [Toborek és mtsai, 2005]. A vírusburok fehérjei elősegítik a vírus és a vírussal fertőzött immunsejtek átjutását a vér-agy gáton (5. ábra), és virális reservoir kialakulását az idegrendszerben [Banks és mtsai, 2006].



5. ábra. Mikrobiális kórokozók bejutása a központi idegrendszerbe vér-agy gáton át [Kim, 2008 nyomán]

A legtöbb agyhártyagyulladás okozó baktérium, mint az *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis* és gomba, mint a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a transzcelluláris úton jut át a vér-agy gáton, amit a mikrobák különböző ligandjai és az agyi endothelsejtek receptorai közötti kölcsönhatás segít (5. ábra). Fertőzött

immunsejtek segítségével tud az idegrendszerbe jutni a *Listeria monocytogenes*, és a *Mycobacterium tuberculosis* [Kim, 2008], hasonlóan egyes parazitákhoz, mint a *Toxoplasma gondii*. Az agyi endothelsejtek részt vesznek a szervezet fertőző mikroorganizmusok elleni válaszreakciójában citokinek termelésével, a vérárvadási kaszkád és a fehérvérsejtek a vér-agy gáton az idegrendszerbe való átjutásának szabályozásával [Lemichez és mtsai, 2010]. A vírusok, baktériumok, gombák és protozoonok, valamint azok toxinjai vagy alkotói, mint a bakteriális lipopoliszacharidok (LPS) és a HIV fehérjék az endothelsejtekkel közvetlen kapcsolatba lépnek, beindítják a gyulladásos és vérárvadási folyamatokat, megváltoztatják a sejtmembránt és a sejtközi kapcsolatokat, így elősegítik a mikroorganizmusok kitapadását a sejtfelületre, be- illetve átjutását a sejten, miközben károsítják a vér-agy gát működését [Kim, 2008; Elsheikha és Khan, 2010]. A kórokozók közvetlenül vagy az őket hordozó fertőzött fagocitákkal együtt — ez az úgy nevezett trójai faló mechanizmus — a sejten keresztül vagy a sejtek között, paracellulárisan jutnak át a vér-agy gáton (5. ábra). Jóllehet az utóbbi években jelentős előrelépés történt a kórokozók és vér-agy gát kölcsönhatásának megértésében, a folyamatok molekuláris hátterének jobb megismerése előfeltétele a központi idegrendszeri fertőzések megelőzésének és kezelésének.

Nem csak a fentebb említett betegségek (2. táblázat) kialakulásában, de gyógyításában is döntő szerepe van a vér-agy gát működésének több szempontból is. Egyrészt az utóbbi években nagyobb teret nyert a neurovaszkuláris egység sejtjeit átfogóan kezelő szemlélet, és ezzel több betegségben a vér-agy gátat, mint új lehetséges terápiás célpontot azonosították [Abbott és mtsai, 2010; Zlokovic, 2008]. Példa erre a sclerosis multiplex, amelynek kezelésében hatékonyan alkalmazható a natalizumab, egy anti- α 4-integrin ellenanyag, ami megakadályozza a fehérvérsejtek kitapadását és átjutását a vér-agy gáton, ezzel hatékonyan gátolja az autoimmun eredetű idegrendszeri gyulladás fellángolásait [Coisne és mtsai, 2009]. A vér-agy gát működését, illetve védelmét célzó terápiás megközelítések felmerültek többek között a prion betegség [Deli és mtsai, 1999], az Alzheimer-kór [Deane és mtsai, 2009], az agyi érkatasztrófák [Alfieri és mtsai, 2011] és a traumás idegrendszeri sérülések [Shlosberg és mtsai, 2010] esetében is.

Másrészt a vér-agy gát idegrendszert védő funkciói, a gátolt paracelluláris transzportút és az agyi endothelsejtek aktív efflux pumpái (3. ábra) azok a fő tényezők, amik a xenobiotikumok mellett a farmakonokat is, mint a daganatok vagy az epilepszia kezelésében használt szerek nagy hányadát, vagy az AIDS terápiájában alkalmazott antiretrovirális szereket távol tartja a központi idegrendszertől [Deli, 2011]. A központi idegrendszerbe történő gyógyszerbejuttatás komoly kihívás mind klinikai szempontból, mind a gyógyszerfejlesztés és formulálás szempontjából.

Három alapvető stratégia áll rendelkezésre: (i) a bevinni kívánt farmakon módosítása, (ii) a vér-agy gát működésének megváltoztatása, és (iii) a vér-agy gát megkerülése [Deli, 2011].

A gyógyszerjelölt vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságainak megváltoztatása, így például a molekula kationos töltésének növelése vagy a lipoldékonyság fokozása hasznos módszer lehet az agyi bejutás elősegítésére. Kationizált ferritin, albumin, vagy immunglobulin sejten keresztüli átjutása a vér-agy gát integritásának megváltozása nélkül fokozható. A lipid-analógok, liposzómák, lipid nanopartikulumok vér-agy gáton történő fokozott átjutását számos vizsgálat igazolja. Specifikus élettani transzport-folyamatok, így például a karrier-mediált, az adszorptív- és a receptor-mediált transzcitózis felhasználása is igen ígéretes lehetőség (3. ábra). A tápanyagokat szállító SLC transzporterek nagy számban állnak rendelkezésre a vér-agy gáton, ezért a glükózhoz vagy aminosavhoz kötött hatóanyagok célzott agyi bejuttatása sikeres stratégia lehet. Ismert, hogy egyes gyógyszerek, így az L-DOPA-hoz hasonlóan a baklofen is, ilyen módon jutnak be a központi idegrendszerbe a LAT1 aminosav transzporter révén [Ohtsuki és Terasaki, 2007]. Az utóbbi időben ígéretes klinikai fázisba jutott vizsgálatok zajlanak olyan targetált hatóanyagokkal, amelyek az LRP-1 és -2 receptor-mediált transzport-folyamatait aknázzák ki agyi gyógyszerbevitellel.

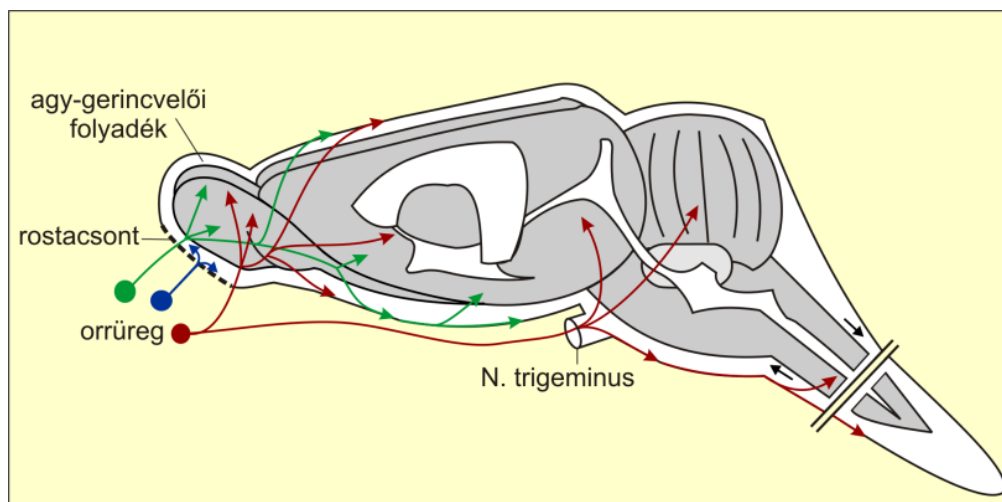
A vér-agy gát működésének megváltoztatása az efflux pumpák vagy a szoros zárókapcsolatok által szigorúan szabályozott paracelluláris barrier funkcióinak átmeneti, gyors, és biztonságos felfüggesztése révén történhet. Optimális esetben egy ilyen módszer alkalmas lehetne a daganatellenes szerek célzott módon történő agyba juttatására. Ozmotikus anyagok, vazotaktív

mediátorok, alkilglicerolok és más TJ modulátorok prae-klinikai és klinikai kipróbálása van folyamatban szerte a világon [Deli, 2009 és 2011].

A vér-agy gát funkció befolyásolására jó példa a P-glikoprotein is, amelynek szintje és aktivitása az agyi endothelsejteken az idegrendszer gyulladásos válaszreakciói miatt számos betegségben megnő [Potschka, 2010]. Ennek következtében alakul ki farmakorezisztencia epilepsziában, agyi tumorokban, vagy neuroAIDS-ben [Neuwelt és mtsai, 2011]. Epilepsziában a glutaminsav $\rightarrow$ N-metil-D-aszparaginsav receptor $\rightarrow$ ciklooxygenáz-2 jelátviteli útvonalat sikerült azonosítani a P-glikoprotein szint emelkedésében, így lehetővé vált egy új, innovatív beavatkozási mód, a P-glikoprotein transzkripció szabályozása szelektív ciklooxygenáz-2 gátlókkal [Potschka, 2010].

A harmadik lehetőség a vér-agy gát megkerülése, amelyek közül az invazív módszerek mint az intrathecalis, intracerebroventricularis, vagy közvetlenül az agyi parenchymába történő gyógyszerbejuttatás régóta ismertek. A nazális (Horvát és mtsai, 2009b) és az okuláris utak új, ígéretes, nem invazív alternatívát jelenthetnek.

Az orr epithelsejtjeinek felszíne kicsi, csak mintegy 150 cm^2 , de speciális anatómiai helyzete miatt közvetlen kapcsolatot biztosít a központi idegrendszerhez (6. ábra). Éppen ezért a nazális kapu kézenfekvő lehetőség sürgős szükség esetén, amikor centrálisan aktív gyógyszert vagy fájdalomcsillapítót kell azonnal bejuttatni. Állatkísérletekben nagy molekulák, hormonok sikeres bejuttatásáról is beszámoltak (Thorne és mtsai, 2004; Illum, 2004).



6. ábra. A nazális útvonal: zöld, N. olfactorius; piros, N. trigeminus útvonala [Thorne és mtsai, 2004 nyomán].

Az intranazális bejuttatáshoz szükséges hatékony dózis és gyógyszerformula kiválasztásához azonban több tényezőt is figyelembe kell venni. Az orrüregből a gyógyszerek a mukociliaris rendszer öntisztulási folyamataival hamar kiválasztódnak a gyomor-bél rendszer felé [Illum, 2003]. Másrészt az alacsony membrán-permeabilitás és az interepithelialis junctionok korlátozhatják a transzcelluláris és paracelluláris transzportot és a nagy molekulatömegű vagy a poláros gyógyszerek bejutását. Mindezen okokból kulcsfontosságú lehet a mukoadhezív szerek használata, amelyek fokozzák a gyógyszerformának az orrnyálkahártyán eltöltött idejét, valamint abszorpciófokozó szerek alkalmazása, amelyek az orrnyálkahártyán keresztüli transzport mértékét növelik.

A fenti példák alátámasztják a vér-agy gát kutatás elméleti és klinikai orvostudományi jelentőségét.

1.3 A vér-agy gát modellezése

Mind a vér-agy gát szerepének, sajátosságainak feltárásához élettani és kórtani körülmények között, mind a központi idegrendszeri támadáspontú hatóanyagok agyba való bejutásának becsléséhez szükség van vizsgálómódszerekre és modell rendszerekre. Egy molekula vér-agy gát permeabilitásának megállapítása különösképpen a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában fontos,

és ehhez *in silico*³, *in vitro* és *in vivo* modellek egyaránt használatosak [Vastag és Keserű, 2009; Veszelka és mtsai, 2011].

A vér-agy gát kutatás korai időszakában Paul Ehrlich és munkatársai festékekkel végzett vizsgálataihoz hasonlóan elsősorban állatkísérletekkel nyertek új adatokat [Bickel, 2005]. Ezek a ma is használatos módszerek mellett új, nem invazív eljárások is bevezetésre kerültek (3. táblázat).

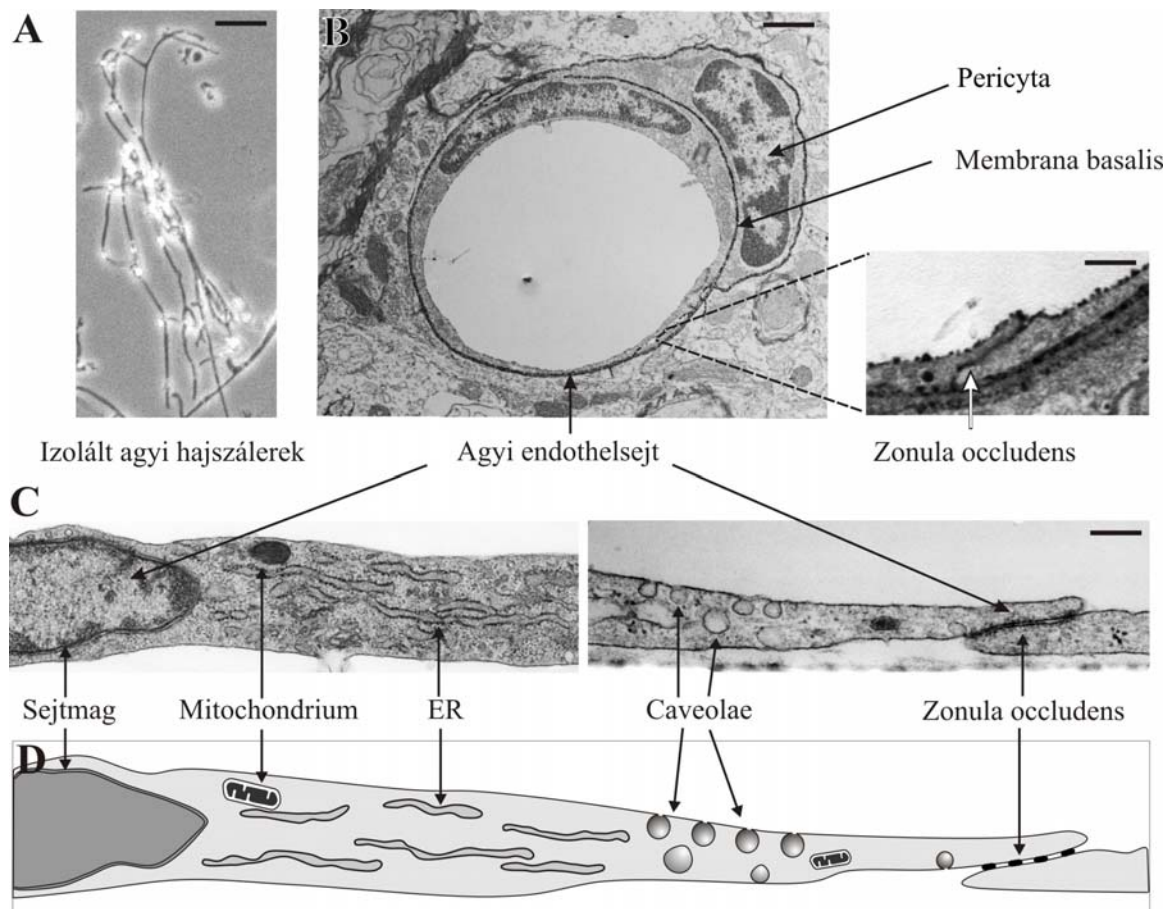
3. táblázat. *In vivo* módszerek a vér-agy gát permeabilitás meghatározására

Agyi mintavételen alapuló módszerek
Bolus injekció <i>Brain uptake index</i> (BUI, agyi anyagfelvétel mértéke) Agyi efflux index <i>In situ</i> agyi perfúzió Kvantitatív autoradiográfia
Nem invazív képalkotó eljárások
Mágneses rezonancia vizsgálat (MRI) Közeli infravörös időtartománybeli optikai képalkotó eljárás Pozitron emissziós tomográfia (PET) Egyfoton emissziós számítógépes tomográfia (SPECT)
Koncentráció mérés agyi sejtközötti és agy-gerincvelői folyadékban
Agyi mikrodialízis Liquor cerebrospinalis mintavétel

A legáltalánosabb állatkísérletes módszer a szisztémás bolus injekciót követő agyi és plazma koncentráció hányados ($\log BB$) meghatározása [Ohno és mtsai, 1978]. Rendelkezésre állnak az agyba való bejutást (*brain uptake index*) [Oldendorf, 1970], sőt molekulák agyból való távozását, effluxát (*brain efflux index*) vizsgáló eljárások is [Kusuhara és mtsai, 2003]. Az egyirányú agyi felvétel együttthatója (K_{in}), valamint a felszínre számított permeabilitási jelzőszám ($\log PS$) *in situ* agyi perfúzióval mérhető [Smith, 2003]. Az előző két paraméter mellett izotóppal jelzett molekulák agyi felvétele különböző agyterületeken jól láthatóvá tehető és mennyiségileg is mérhető kvantitatív autoradiográfiával [Chen és mtsai, 1995]. A nem invazív képalkotó eljárások közül az MRI, PET, SPECT módszereknek, amelyeket elsősorban a klinikumban alkalmaznak [Dóczi és mtsai, 2005; Szakáll és mtsai, 1998], limitált az érzékenysége és térbeli felbontása kisállatokban. A közeli infravörös időtartománybeli (time-domain) optikai képalkotó eljárással azonban nagy felbontásban is jól vizsgálható az agyi bejutás kinetikája egerekben és patkányokban. Az agyi mikrodialízis az egyetlen technika, amivel molekulák szabad agyi koncentrációja közvetlenül meghatározható [de Lange és mtsai, 1997], azonban invazív, technikai felszereltséget és jártasságot igényel, és nagyon lipofil molekulák esetén nem alkalmazható. Az agy-gerincvelői folyadék mintákból végzett koncentráció mérés fontos módszer mind humán vizsgálatokban [Bereczki és mtsai, 2000], mind kísérletes körülmények között, azonban nem csak a vér-agy gáton, hanem a choroid plexuson keresztül zajló transzport folyamatokat is tükrözi. Általánosságban elmondható, hogy az állatkísérletek költségesek, eszköz- és időigényesek, és kis áteresztőképességű vizsgálatokat tesznek lehetővé. Ugyanakkor ezekkel a módszerekkel összetettebb és élettanilag korrektebb becslés adható a vér-agy gát permeabilitásra, és az *in silico* és *in vitro* módszerek referenciáiként azok validálására is szolgálnak. Molekulák agyi bejutásának meghatározására szolgáló *in vivo* modellekről rövid áttekintést a közelmúltban megjelent közleményünkben adtunk [Veszelka és mtsai, 2011].

³ A vér-agy gát permeabilitás számítógépes modellezéséről részletesebben lásd Vastag és Keserű [2009], és Veszelka és mtsai [2011] összefoglaló közleményeit.

Igazi áttörést jelentett a vér-agy gát kutatásban az első *in vitro* modell, az agyból izolált mikroér preparátumok (7. ábra) használata, amely lehetővé tette az agyi endothelsejtek receptorainak, transzportereinek, hírvívó rendszereinek feltárását. Joó Ferenc és munkatársai úttörő szerepet játszottak a modell kifejlesztésében és alkalmazásában [Joó és Karnushina, 1973; Joó, 1985 és 1993].

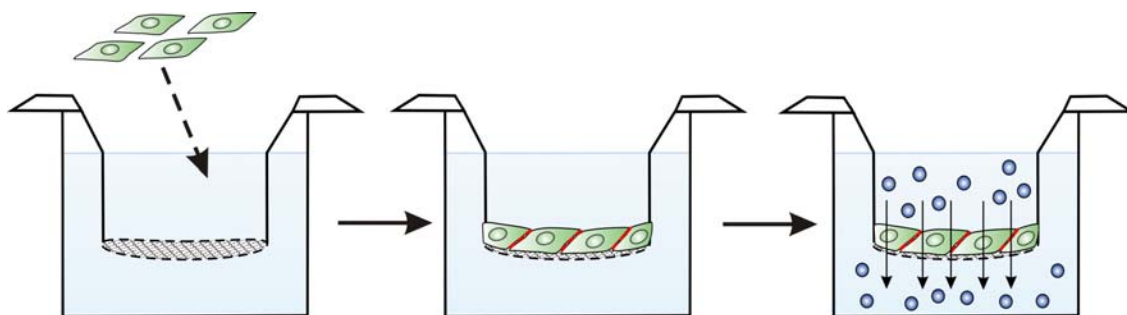


7. ábra. A vér-agy gát finomszerkezete. Izolált agyi hajszálerek fázismikroszkóp alatt. (A); Hajszálér keresztmetszete patkányagyban elektronmikroszkópos felvételen (B); Tenyésztett primer patkány agyi endothelsejt szerkezete elektronmikroszkópos felvételen (C), a finomszerkezet ábrázolása rajzon (D). ER, endoplazmás reticulum. Mércé: A: 20 μ m; B: 1 μ m; nagyításon: 500 nm; C: 500 nm. [Veszélka és mtsai, 2011]

Az agyi mikroér preparátumok fontos adatokat szolgáltatottak a közelmúltban a vér-agy gát fehérje és génmintázatának megismeréséhez [Enerson és Drewes, 2006]. Ugyanakkor ez a modell nem alkalmas sejten keresztüli transzport, valamint gyógyszerátjutás szűrővizsgálatára [Bickel, 2005].

Az agyi mikroér izoláláson alapulnak a sejtenyésztes modellek is. Már 1978-ban megfigyelték, hogy agyi mikroerekből tenyésztési körülmények között endothelsejtek nőnek ki [Panula és mtsai, 1978]. Agyi endothelsejtek primer tenyésztéseit már az 1980-as évektől sikerült előállítani különböző fajokból, azonban jól jellemzett, reprodukálható tulajdonságokkal rendelkező vér-agy gát modellek kísérleti egerek és patkányok, sertések és szarvasmarhák agyából, valamint humán autopsziából származó [Nagy és mtsai, 2005], illetve műtéti agyszövetmintákból készülnek. Agyi endothelsejtek primer tenyésztetben számos, az *in vivo* vér-agy gátra jellemző morfológiai tulajdonságot mutatnak (7. ábra) és összefüggő egysejtréteget alkotnak, amely alkalmas megfelelő tenyésztő felszínen transzport vizsgálatokra is (8. ábra)⁴.

⁴ A tenyésztéses vér-agy gát modellek tulajdonságait és alkalmazhatóságát részletesen az alábbi összefoglaló közleményeinkben tárgyaltuk [Deli és mtsai, 2005; Deli, 2007; Veszélka és mtsai, 2011].



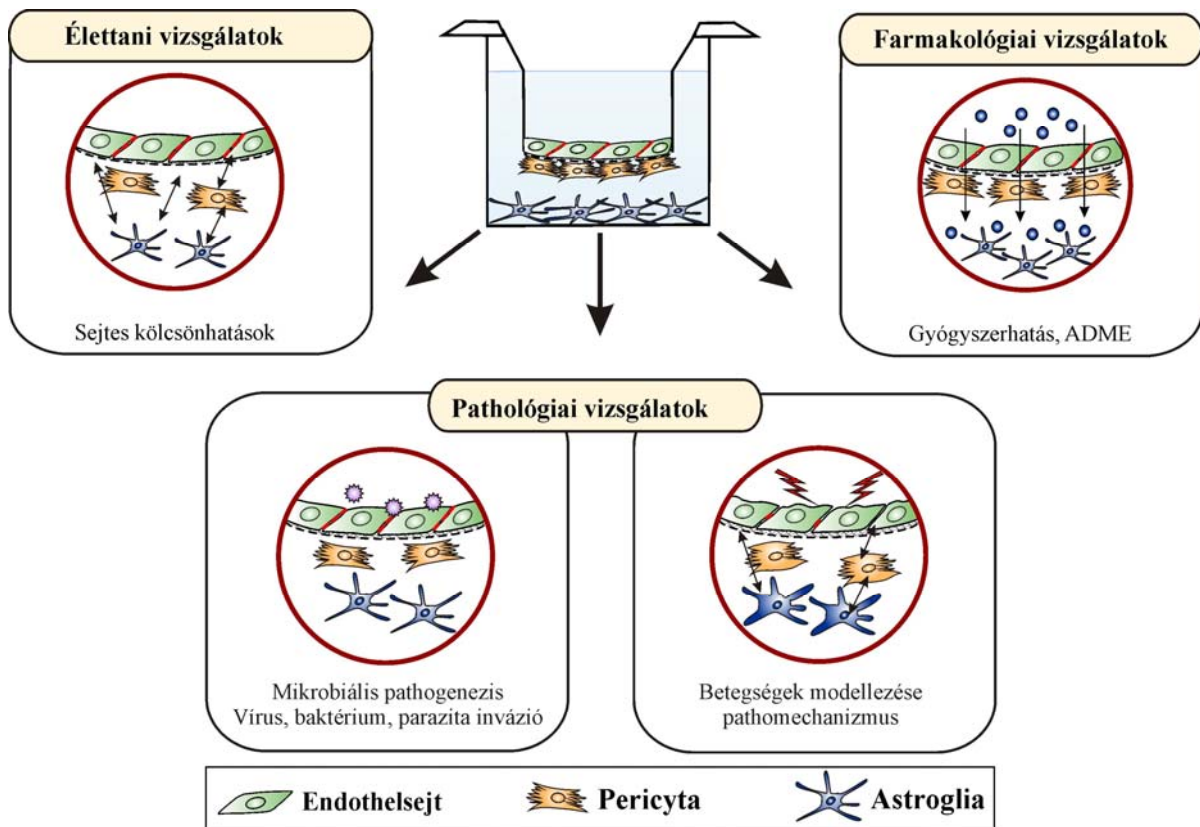
8. ábra. Agyi endothelsejtek tenyésztésével létrehozott vér-agy gát modell sematikus ábrája. A porózus membránt hézagmentesen benövő endothelsejt-rétegek alkalmasak permeabilitás vizsgálatokra. A pirossal jelzett szoros sejtkapcsolatok gátolják a sejtközi szabad anyagáramlást.

Mivel a primer tenyészetek előállítása költséges, időigényes, és technikailag nehéz, számos immortalizált sejtvonalat hoztak létre virális vektorok segítségével ugyanazokból a fajokból, amelyekből a primer tenyészeteken alapuló modellek is készültek [Deli és mtsai, 2005; Deli, 2007; Veszélka és mtsai, 2011]. Ezek közül az egér b.End3 és b.End5, a patkány RBE4, GP8, GPNT, a humán HCMEC/D3 agyi endothel sejtvonalak számos kutatócsoporthoz eljutottak, ahol a vér-agy gát különböző aspektusainak modellezésére használatosak. Ugyanakkor az immortalizálás során a vér-agy gát sajátosságok egy részét ezek a sejtvonalak elvesztették, és a sejtrétegek szorossága csak töredéke a primer tenyészetekének, így többek között permeabilitási vizsgálatokra nem alkalmasak [Deli és mtsai, 2005; Deli, 2007; Veszélka és mtsai, 2011].

Hosszú ideig tartó tenyésztés alkalmával, főképpen többszöri passzálás esetén azonban a vér-agy gát tulajdonságok elvesztését, a sejtek dedifferenciálódását figyelték meg primer tenyészetek esetében is. Ennek a jelenségnek a kivédésére a neurovaszkuláris egység egyéb sejteivel, elsőként astroglia sejtekkel tenyésztették együtt az agyi endothelsejteket [Tao-Cheng és mtsai, 1987; Nagy és Martinez, 1991], amire a porózus membránt tartalmazó sejtenyészítő betétek (9. ábra) lehetőséget adnak. Igazolódtott, hogy a gliasejtek jelenléte szorosabbá teszi az agyi endothelsejtrétegeket, és számos vér-agy gát tulajdonságot indukálnak. A gliasejtek által termelt transzformáló növekedési faktorról (TGF- β), és a bázikus fibroblaszt növekedési faktorról (FGF2) megállapították, hogy fokozzák a vér-agy gát funkciókat, azonban máig nem sikerült maradéktalanul azonosítani azokat a szekretált vagy bazális membrán fehérjéket, és egyéb mediátorokat, amelyek felelősek ezért a hatásért [Haseloff és mtsai, 2005; Abbott és mtsai, 2006]. Más sejttípusokról, például idegsejtekről, is bebizonyosodott, hogy együtt tenyésztés során agyi endothelsejtekben fokozzák a vér-agy gát sajátosságokat [Deli, 2007].

A pericytákról, amelyek az agyi endothelsejtekkel közös bazális membránon osztoznak, és az emlős szervezetben legnagyobb arányban az agy és a retina hajszál- és mikroereinek abluminális felszínén találhatóak, ellentmondó irodalmi adatok álltak rendelkezésre. A vér-agy gát anatómiai szerkezetét rekonstruáló, több mint két sejt együttes tenyészetéből álló modellekben kísérleteink [Nakagawa és mtsai, 2007; Nakagawa és mtsai, 2009] előtt a pericyta szerepét a vér-agy gát tulajdonságok szabályozásában szisztematikus módon nem vizsgálták.

A tenyésztéses modellek széleskörű alkalmazást nyertek az orvosi biológiai kutatásokban (9. ábra) a vér-agy gát élettani, patológiai és farmakológiai vizsgálataiban [Deli és mtsai, 2005; Deli, 2007]. A porózus membránú sejtenyészítő betétek alkalmazásával létrehozott két és háromsejtes modellek hasznos eszközei az alapkutatásnak. A vér-agy gát élettani működésének vizsgálatában hozzájárulnak a neurovaszkuláris egység sejtei közötti kölcsönhatás feltárásához, az agyi endothelsejtek és különböző gliasejtek, pericyták, idegsejtek, és fehérvérsejtek kommunikációjának megismeréséhez (9. ábra). Emellett segítenek felderíteni, hogy egyéb fiziológiai faktorok, mint a szérumfehérjék, hormonok, növekedési faktorok, bazális membránfehérjék hogyan hatnak az agyi endothelsejtek működésére [Deli és mtsai, 2005].

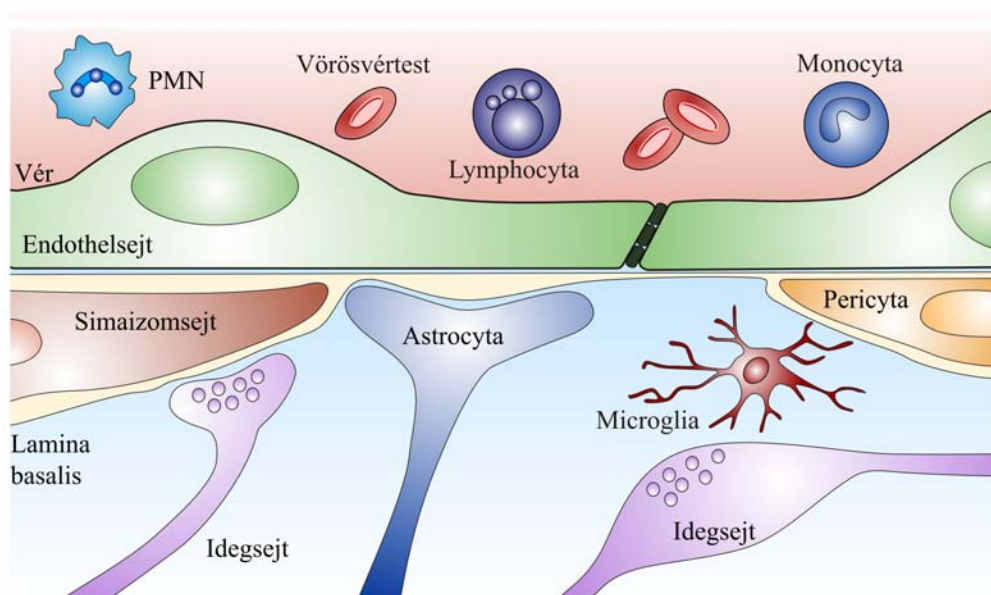


9. ábra. Agyi endothelsejtek tenyésztésével létrehozott vér-agy gát modellek alkalmazási lehetőségei orvosi biológiai kutatásokban. ADME, adszorpció, disztribúció, metabolizmus, excretio.

Egy másik alkalmazási terület a vér-agy gát károsodás mechanizmusának feltárása különböző betegségekben, illetve a pathogenetikus szerepet játszó tényezők vizsgálata, és védő hatást kifejtő farmakonok, molekulák tesztelése. A tenyésztéses modellek a vér-agy gát mikrobiális inváziójának kutatásában is új lehetőséget teremtenek. Ezek a modellek alkalmasak gyógyszerhatás és transzport vizsgálatokra is [Veszélka és mtsai, 2011].

2. KUTATÁSI CÉLOK

Annak felismerése, hogy a vér-agy gát nem pusztán egy ereket bélelő passzív sejtréteg, amin a molekulák és sejtek átjutása zajlik a keringés és a központi idegrendszer között, hanem több sejtípus kölcsönhatása révén kialakuló és működő, számos feladatot ellátó dinamikus rendszer, megváltoztatta a vér-agy gát élettani körülmények között és különböző betegségekben játszott lehetséges szerepéről alkotott nézetet [Neuwelt és mtsai, 2011]. Jelentős nézetformáló felismerés volt az is, hogy a vér-agy gát része a neurovaszkuláris egységnek (10. ábra) [Abbott és mtsai, 2006], a kiterjesztett neurovaszkuláris egység pedig magában foglalja a vér-agy gát endothelsejtjeivel kapcsolatba lépő keringő sejteket, a lymphocytákat, a monocytákat és a polymorphonuclear leukocytákat (PMN) is [Neuwelt és mtsai, 2011].



10. ábra. A kiterjesztett neurovaszkuláris egység sejtjei [Abbott és mtsai, 2006; Neuwelt és mtsai, 2011 nyomán].

Ezek alapján nemcsak az ideg- és gliasejteknek, hanem a neurovaszkuláris egység többi sejtjének, az agyi endothelsejteknek és pericytáknak a vizsgálata is indokolt a központi idegrendszer betegségeiben. A fentiek tükrében az alábbi fő kutatási célokat tűztem ki:

2.1. A vér-agy gát modellezése sejttenyészetekkel

Kutatásaink kezdetén, mintegy húsz évvel ezelőtt az agyi endothelsejtek tenyésztését rutinszerűen nagyon kevés kutató-laboratóriumban végezték. Főként endothel egysejtrégeket használtak, és csak a gliasejtekről igazolták, hogy egyes vér-agy gát sajátosságokat indukálni tudnak [Tao-Cheng és mtsai, 1987; Dehouck és mtsai, 1990; Nagy és Martinez, 1991; Kása és mtsai, 1991]. A Joó Ferenc professzor által vezetett kutatólaboratóriumban, amelyhez 1990-ben csatlakoztam, ekkor nem folyt sejttenyésztés, így a módszer beállítását kaptam feladatnak. Célunk az volt, hogy

- I. Különböző fajokból, elsősorban kísérleti patkány, egér, és újszülött sertés agyból mikroér frakciót izoláljunk, primer endothelsejt tenyészeteket készítsünk, az endothelsejt tenyészetek tisztaságát fokozzuk, a tenyésztési körülményeket optimalizáljuk, a sejtrégeket jellemezzük.
- II. Később komplexebb, az *in situ* anatómiai helyzetet jobban utánozó két és három sejtípusból álló vér-agy gát modelleket kívántunk létrehozni agyi mikrovaszkuláris endothelsejtek, pericyták, valamint gliasejtek primer tenyészeiteiből, azért hogy a modellek tenyésztési körülményeit beállítsuk és jellemezzük az endothelsejtek tulajdonságait és működését. Megvizsgáltuk az agyi mikroér pericyták hatását primer agyi endothelsejtek vér-agy gát sajátosságaira a sejtek együtt tenyésztésének segítségével patkány, majom és humán modellen is.

2.2. A vér-agy gát károsodásának és védelmének vizsgálata modellek segítségével

A neurovaszkuláris egység szemléletének térnyerésével a vér-agy gát szerkezetének és működésének károsodását növekvő számban vizsgálják és írják le idegrendszeri és szisztémás betegségekben. Ezekben a kórállapotokban a barrier funkció romlásával, és a szállítófehérjék aktivitásának csökkenésével sérül az agyi endothelsejtek idegrendszert tápláló és védő működése. A vér-agy gát áteresztőképességének megnövekedése másodlagos neuron-pusztuláshoz és a betegségek súlyosbodásához vezet. Mindezek alapján a vér-agy gátat alkotó agyi endothelsejtek védelme, mint új lehetséges terápiás célpont egyre elfogadottabbá válik [Neuwelt és mtsai, 2008, 2011]. Kísérleteink során fontosnak tartottuk az idegrendszeri kórállapotokban szerepet játszó tényezők károsító hatásának vizsgálatát az agyi mikroerek sejtjein. Mivel a vér-agy gát működésének károsodása hozzájárul az idegsejtpusztuláshoz, az endothelsejtekre védő hatást kifejtő hatóanyagok keresése is céljaink közt szerepelt.

2.2.1. Mikrobiális pathogének vizsgálata

- III. A mikrobiális pathogének és azok alkotói közül a sepsisben kulcsfontosságú bakteriális lipopoliszacharidok hatását kívántuk vizsgálni a vér-agy gát permeabilitására *in vivo* és *in vitro* modellen. Szerettük volna megállapítani, hogy a szérum amiloid P komponens (SAP) és a pentozán rendelkezik-e védő hatással agyi endothelsejteken.
- IV. Az újszülöttkori sepsisek és bakteriális meningitisek egyik pathogenetikus faktora a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), aminek vér-agy gát permeabilitásra kifejtett hatását tanulmányoztuk újszülött sertéseken. Ugyanezen a modellen megvizsgáltuk, hogy a szerin proteáz gátlás befolyásolja-e a TNF- α kiváltotta vér-agy gát működési változásokat.
- V. A HIV-1 vírus idegrendszerbe való bejutása során az agyi endothelsejtekkel való kölcsönhatásban a burokfehérjék is részt vesznek. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a Tat fehérje milyen hatást fejt ki az agyi endothelsejtek barrier funkcióját szabályozó szoros kapcsolatokra és azok fehérjeire.
- VI. Agyi endothelsejteken megvizsgáltuk, hogy a *Toxoplasma gondii* vér-agy gáton való átjutásában a szervezet milyen molekulái és sejtjei vesznek részt

2.2.2. Agyi ischemia kóroki tényezőinek vizsgálata

- VII. Feltételezve, hogy a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim magasabb szintje védőhatást fejthet ki oxidatív stresszben, vad típusú és SOD transzgént expresszáló egerekből tenyésztett agyi endothelsejteken teszteltük a szuperoxid hatását a sejtrétegek elektromos ellenállására.
- VIII. Agyi ischemia és stroke során drámaian megnő a glutaminsav szintje. Megvizsgáltuk, hogy a glutamát milyen hatást fejt ki tenyésztett agyi endothelsejtek barrier funkciójára, és ezt milyen receptorok közvetítik.
- IX. Felmerült, hogy az exogén tPA nem csak proteolitikus hatást fejt ki a központi idegrendszerben, ezért agyi endothelsejtekben tanulmányoztuk, hogyan befolyásolja a P-glikoprotein efflux pumpa működését.
- X. A hisztamin az agyoedema egyik mediátora. A tamoxifén-származék *N,N*-dietil-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin (DPPE) gátolni tudja a hisztamin intracelluláris hatásait. Arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e a DPPE-nek önálló hatása a vér-agy gát áteresztőképességére, illetve ki tudja-e védeni a DPPE az agyi ischaemia-reperfusio vér-agy gátra kifejtett hatását patkányokban a 4 ér lekötéses modellen. A DPPE agyi endothelsejtek barrier funkciójára kifejtett hatását tenyésztett vér-agy gát modellen is megvizsgáltuk.
- XI. A magasvérnyomás-betegség hajlamosító tényező mind a stroke, mind a vascularis dementia kialakulásában. Stroke-ra hajlamos spontán magasvérnyomású (SHRSP) patkányokon megvizsgáltuk, vajon milyen időbeli és regionális változás jön létre tranziens előagyi ischaemiát követően a vér-agy gát permeabilitásában.

XII. A sztatinok a szérumban LDL koleszterin szintjének csökkentésén túlmenően pleiotrop hatást fejtenek ki. A sztatinok kiváltotta neuroprotekciónak összefüggésbe hozták a vér-agy gát működésének befolyásolásával is. Célunk az volt, hogy letelesszljük a pitavasztatin hogyan hat az agyi endothelsejtek gát működésére.

XIII. A prekondicionálás védőhatású ischaemiás stroke-ban, ami nem csak az idegsejteket, hanem a vér-agy gátat is érintheti. Agyi endothel- és gliasejtek együtt tenyésztésével feltártuk a prekondicionálás hatását és azt is, hogy melyik sejttípus hogyan vesz benne részt.

2.2.3. Neurodegeneratív betegségekben szerepet játszó kóros fehérjék vizsgálata

XIV. Mivel nem volt rá irodalmi adat, elsőként azt kívántuk megvizsgálni, hogy van-e közvetlen hatása a humán prion fehérje hidrofób, fibrillogén 106-126-os peptid szakaszának (Prp 106-126) agyi endothelsejtek életképességére, és ez a hatás függ-e a Prp gén kifejeződésétől. Mivel korábbi adatok utaltak arra, hogy az erősen negatív töltésű, heparinhoz hasonló szerkezetű, a sűrűlőkor profilaxisában hatásos szulfatált poliszacharid, a pentozán nem megy át mérhető mennyiségben agyi endothelsejteken, a molekula a vér-agy gáton fejtheti ki védőhatását. Ezt a hipotézisünket is letelesszljük a vér-agy gát tenyésztéses modelljén.

XV. Az Alzheimer-kór kialakulásában mind a csonkolt tau fehérje, mind az amiloid- β peptidek pathogenetikus szerepét feltételezik, ezért megvizsgáltuk, hogy van-e közvetlen hatásuk agyi endothelsejtek életképességére, barrier funkciójára és egyéb működésére. A pentozán védő szerepét is tanulmányoztuk β -amiloid peptiddel kezelt endothelsejteken. Legújabb kísérleteinkben a dokozaheksaénsav (DHA) protektív hatását teszteltük tenyésztéses modellen.

2.3. Új módszerek agyba való gyógyszerbejuttatás elősegítésére

A vér-agy gát sajátosságai, az agyi endothelsejtek közötti szoros kapcsolatok, a vér felé irányuló efflux pumpák, és a metabolikus gát együtt megakadályozzák a lehetséges idegrendszeri hatóanyagok döntő többségének agyba való bejutását [Deli, 2009 és 2010]. Mivel a központi idegrendszeri támadáspontú gyógyszerjelöltek agyba való bejuttatása alapfeltétele a hatásosságuknak, nagy az igény mind az alap, mind az alkalmazott kutatás szintjén a vér-agy gáton való átjutás megállapítására szolgáló modellekre, valamint olyan új módszerekre, amelyek elősegítik hatóanyagok agyba való bevitelét [Deli, 2007, 2009 és 2010].

XVI. Az általunk kifejlesztett három sejttípusból álló vér-agy gát modellen tanulmányoztuk hatóanyagok agyba való bejuttatásának becslését, és az eredményeket *in vivo* mérésekkel validáltuk. *In vitro* vér-agy gát modelleken olyan szerek hatását kívántuk megvizsgálni, amelyek reverzibilisen megnyitják az agyi endothelsejtek szoros zárókapcsolatait és így elősegítik terápiás szerek bejutását a központi idegrendszerbe.

XVII. Gyógyszerek, biofarmakonok agyba való bejuttatásának egyik lehetséges stratégiája a vér-agy gát megkerülése alternatív beviteli módokkal. Az egyik ilyen lehetőség a nazális út, amely a szaglóhámon át és a szaglóidegkötegek mentén közvetlenül a központi idegrendszerbe jelent bejutási kaput. Vizsgálni kívántuk a patkány szaglóhám szerkezetét és tulajdonságait a sejtek közötti kapcsolatokat alkotó fehérjék immunhisztokémiai jelölésével, és elektronmikroszkópos megfigyelésével, valamint az elektrondenz lantán diffúziójának nyomon követésével. Tanulmányoztuk intranazális beadás után a dextrán és az amiloid- β 1-42 peptid bejutását patkány agyrégiókba.

3. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS LEGFONTOSABB VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1 Anyagok

Minden vegyszert a Sigma Magyarország Kft.-től szereztünk be, hacsak másképp nem jelöltük. Az N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]etán-amint (DPPE, M=399,5) Dr. Hudecz Ferenc szintetizálta az Eötvös Loránd Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén Budapesten.

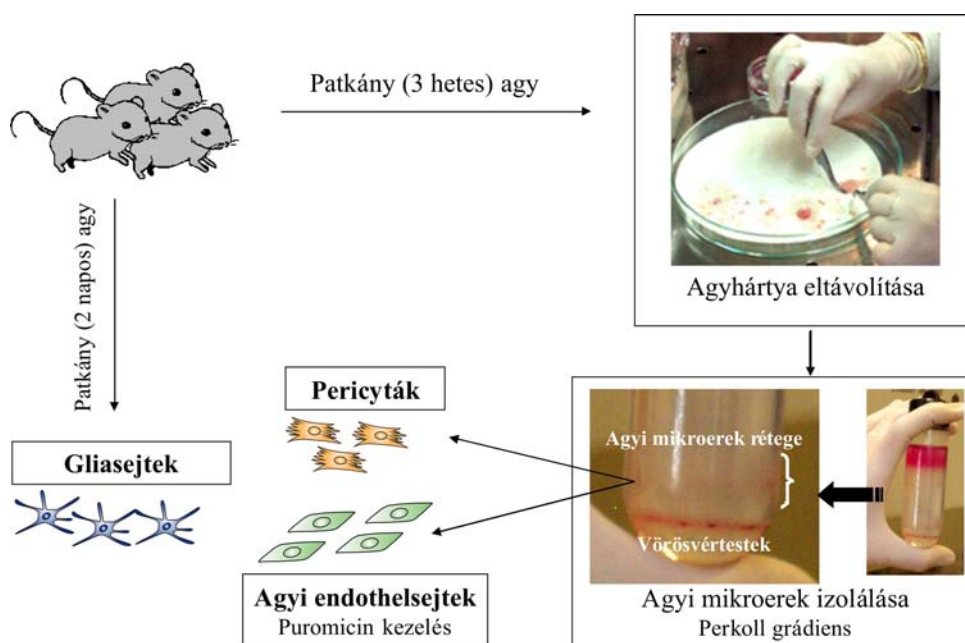
Peptidek

Az A β 1-42 és a Prp 106-126 peptideket a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében szintetizálta Prof. Penke Botond munkacsoportja [Zarándi és mtsai, 2007]. Mérés előtt a tisztított A β peptidet 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolban oldottuk, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten tartottuk, hogy az előzőleg képződött aggregátumokat teljesen feloldjuk. Az oldatot kiadagoltuk csövekbe, és a peptidet vákuum alatt beszárítottuk, majd - 80 °C-on tároltuk. Oligomereket a peptid foszfát puffer oldatban (PBS) történő feloldásával készítettünk. A peptid oligomereket transzmissziós elektronmikroszkópiával ellenőriztük [Deli és mtsai, 2010].

3.2. Sejtenyésztés

3.2.1. Agyi endothelsejtek tenyésztése

A primer agyi endothelsejteket háromhetes Wistar patkányokból izoláltuk több közleményünkben is leírt protokoll szerint [Deli és mtsai, 1997a; Perrière és mtsai, 2005; Veszélka és mtsai, 2007; Nakagawa és mtsai, 2009]. Vad típusú és génmódosított egerekből készült tenyészeteknél 3 hetes [Imaizumi és mtsai, 1996] és 8 hetes [Deli és mtsai, 2000a, 2003] állatokat is használtunk. Az állatokat dietiléterrel, vagy CO₂ gázzal túlaltattuk, ezt követően dekapitáltuk, az agyakat kivettük és 4 °C-os PBS-be helyeztük. Steril szűrőpapíron eltávolítottuk az agyhártyát és a fehérállomány egy részét, valamint a plexus chorioideusokat. A megmaradó szürkeállományt szikével 1-2 mm³ darabokra vágtuk, és kollagenázal (CLS2, Worthington Biochemical Corp., NJ, USA; 1 mg/ml) emésztettük 1,5 órán keresztül 37 °C-on Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) tápfolyadékban.



11. ábra. Primer agyi endothelsejt, pericyta és glia tenyészetek készítésének vázlata.

Ezt követően 20 %-os szérum albumin (BSA) grádiens segítségével centrifugálással (1000 × g, 20 perc) elválasztottuk a nagyobb sűrűségű mikroereket a myelin tartalmú rétegtől, amely ideg-, és

gliasejteket tartalmazott. A leülepedett mikroereket tovább emésztettük kollagenáz-diszpázt (1 mg/ml; Roche Applied Sciences, Basel, Svájc) és dezoxiribonuleázt (6,7 µg/ml) tartalmazó oldatban egy órán keresztül 37 °C-on, hogy a mikroerek bazális membránját tovább emésszük. A mikroérfrakciót 33 %-os folyamatos Perkoll (Pharmacia, Uppsala, Svédország) gradiensén centrifugálással (1000 × g, 10 perc) elválasztottuk a vörösvértestektől (11. ábra), majd kétszer mostuk tápfolyadékkal. Ezt a protokollt használtuk agyi endothelsejt izolálásra újszülött sertés (*Sus scrofa*) agyból is [Deli és mtsai, 1997b] és kis módosítással majom (*Macaca irus*) agyból is [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve]. A sejteket tenyésztő médiumban vettük fel, amely a következőket tartalmazta: borjúplazmából készített savó (15 %, PDS, First Link Ltd., UK), glutamin (2 mM Gibco, Invitrogen, USA), fibroblast növekedési faktor-2 (FGF-2; 1 ng/ml; Roche Applied Sciences, Svájc), heparin (100 µg/ml), inzulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), szelenin (5 ng/ml), gentamicin (50 µg/ml). A tenyésztés első három napjában 4 µg/ml puromicint adtunk a tápfolyadékhoz, hogy növeljük az endothelsejt tenyésztés tisztaságát [Perrière és mtsai, 2005]. Az endothelsejteket előzőleg IV. típusú kollagénnel és humán fibronektinnel bevont steril 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészékbe (Falcon, BD Biosciences USA) szélesztettük, és ezt követően 37 °C-on, CO₂ inkubátorban tartottuk. A tenyésztés 4. napján, amikor a tenyésztet elérte a 80 %-os konfluenciát, a sejteket 12-, 24- vagy 96-lyukú, kollagénnel és fibronektinnel bevont tenyésztőedényekbe, vagy tenyésztőbetétek porózus membránjára passzáltuk tripszin (0,05 %, m/V) – EDTA (0,02 %, m/V) oldat segítségével. Kísérleteinkhez egybefüggő endothelsejt-rétegeket használtunk, amelyeket a passzálás utáni 3.-4. napon kaptunk. Az agyi endothelsejt-tenyésztet tisztaságát immunhisztokémiával (von Willebrand faktor) ellenőriztük.

A puromicines módszert megelőzően az endothelsejt-tenyésztet tisztaságát komplement-mediálta sejtlyússal növeltük [Deli és mtsai, 1997a; Szabó és mtsai, 1997]. A szubkonfleuns tenyészteteket szérumentes tápfolyadékkal mostuk, majd pedig egy órán át anti-egeér Thy 1.1 ellenanyaggal (1:500 hígítás) inkubáltuk 37 °C-on. Újabb mosás után két órán keresztül tápfolyadékban háromszorosra hígított nyúl komplementtel kezeltük a sejteket, ennek során a tenyésztet szennyező Thy 1.1 pozitív sejtek, zömmel pericyták elpusztultak. Mosásokkal eltávolítottuk a komplementet és az elpusztult sejteket, és az agyi endothelsejtekre újból tenyésztő tápfolyadékot tettünk.

Az agyi endothelsejtek barrier funkciójának növeléséhez 500 nM hidrokortizon kezelést [Nakagawa és mtsai, 2009], vagy intracelluláris cAMP emelést alkalmaztunk CPT-cAMP (250 µM) és foszfodiészteráz gátló RO 201724 (17.5 µM; Roche) 24 vagy 48 órás adásával [például Perrière és mtsai, 2005].

A vizsgálataink során RBE4 [Durieu-Trautmann és mtsai, 1993; Roux és mtsai, 1994] és GP8 [Greenwood és mtsai 1996] patkány agyi endothel-sejtvonalakat használtuk [Kis és mtsai, 1999; Deli és mtsai, 2000b; Deli és mtsai, 2001]. Az RBE4 sejtvonal pE1A-neo plazmiddal immortalizált patkány agyi endothelsejtekből származik, a DMEM-F12 tápfolyadékba 10% hő-inaktivált FBS, 2 mM glutamin, 1 ng/ml FGF-2 és 30 mg/ml geneticin kiegészítés szükséges. Patkányfarok kollagénnel bevont tenyésztőedényeken 30 és 50 passzási szám között használtuk. A GP8 egy SV40 large T immortalizált patkány agyi endothel-sejtvonal, amelyet 10 és 20 közötti passzási számmal használtunk. A sejteket 20% PDS, 2 mM glutamin, 1 ng/ml FGF-2 és 200 mg/ml geneticin kiegészítést tartalmazó DMEM-F12 tápfolyadékban tenyésztettük.

3.2.2. Gliasejtek tenyésztése

A vegyes gliatenyésztet létrehozásához kétnapos Wistar patkányokat használtunk [Perrière és mtsai, 2005; Veszélka és mtsai, 2007; Deli és mtsai, 2010]. A kivett agyáról jéghideg PBS-ben csipeszekkel eltávolítottuk az agyhártyát. Az agykéreg szürkeállományát tápfolyadékban (90 % DMEM, 10 % borjúsavó) steril szikék segítségével apró darabokra vágtuk, és 15 ml-es steril centrifugacsőbe tettük. Steril fecskendőre szerelt hosszú tűvel (tű hossza 10 cm, átmérője 20 G) tovább folytattuk a mechanikus sejtdisszociálást. Az egyes homogenizálási lépések között a sejtszuspenzióban levő nagyobb aggregátumok leülepedtek, és a szuszpenzió felső 3/4-ét steril 40 µm-es nyílászűrőn engedték át. Ezt a lépést többször megismételtük, majd az így kapott sejteket előzetesen poli-L-lizinnel bevont 12-lyukú tenyésztőedényekbe szétosztottuk. A sejttenyésztet általában 2 hét alatt nőtték be a tenyésztőedény felszínét, és 3 hét múlva váltak használhatóvá ko-

kultúrához. A sejtek 90 %-a astrogliára jellemző gliális fibrilláris savas proteinre (GFAP), 10 %-a pedig a mikroglia marker CD11b-re immunopozitivitást mutatott.

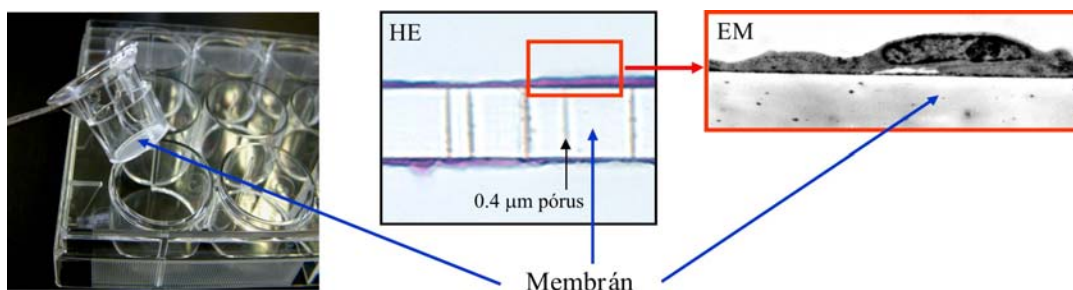
A kísérletek egy részében I típusú astroglia sejteket használtunk [Nakagawa és mtsai, 2007, 2009]. Ehhez a gliasejteket tenyésztőflaskába tettük izolálás után. Amikor a tenyésztőfelszín a sejtek benőtték, a szorosan lezárt flaskákat síkrázógépen 200-as fordulatszámon rázattuk egy éjszakán át 37 °C-on. A mikroglia, oligodendroglia és prekursor sejteket tartalmazó felülúszót eltávolítottuk. Az astroglia sejtek a tisztítás után több mint 98 %-ban festődtek GFAP-ra. A sejteket második passzálás után közvetlenül használtuk, vagy lefagyasztva (Cellbanker BCL-1 fagyasztófolyadék, Zenoaq, Koriyama, Japán) – 80 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.2.3. Pericyták tenyésztése

A primer pericytasejtek tenyésztésénél ugyanabból a mikroér frakcióból indultunk ki, mint a primer agyi endothelsejteknel [Nakagawa és mtsai, 2007, 2009]. A sejteket izolálás után 6 cm-es átmérőjű, kollagénnel bevont csészékbe szélesztettük. Puromicin kezelést nem kaptak, és a pericyták proliferációját kiegészítők nélküli 10 % borjúsavot tartalmazó DMEM tápfolyadék, hosszú, legalább kéthetes tenyésztési idő, és a további passzálásoknál bevonás nélküli tenyésztőedények használata támogatta. A pericytákat háromszori tripszines passzálást követően használtuk fel kísérletekhez, vagy a gliasejtekhez hasonlóan lefagyasztva tároltuk felhasználásig. A pericytakra jellemző a sejtek nagy mérete és elágazó külalakja, pozitív jelölődés α -simaizom aktin és NG2 proteoglikán immunfestés esetén, és negatív GFAP és von Willebrand faktor immunfestődés [Nakagawa és mtsai, 2009].

3.2.4. Több sejtípus együttes tenyésztésével létrehozott vér-agy gát modellek

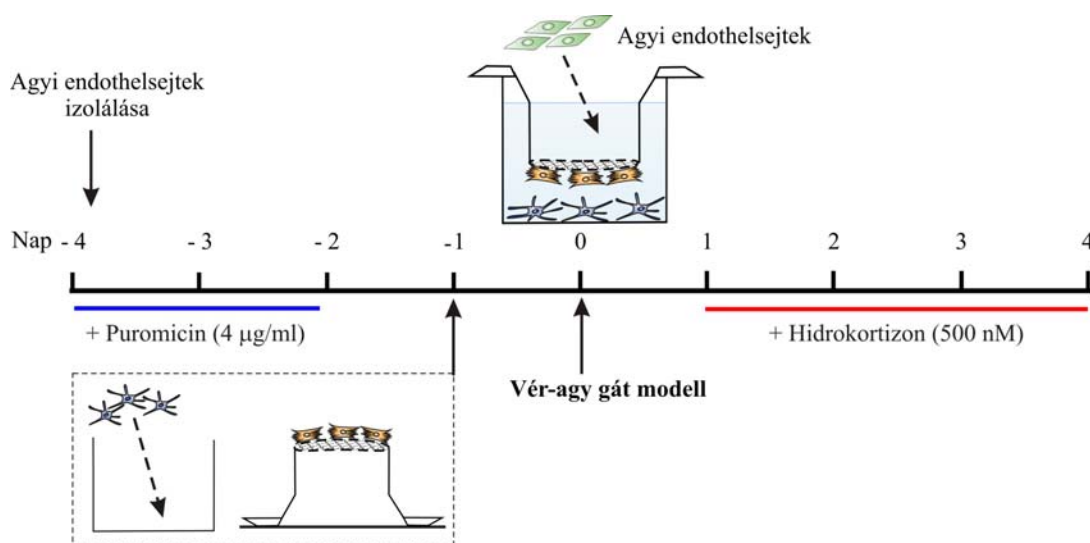
A ko-kultúrákat az előregyártott, permeábilis poliészter vagy polikarbonát membránnal (0,4-1 μ m pórusméret, 1 cm² felszín) rendelkező tenyésztőbetétek teszik lehetővé, amelyeknek mindkét oldalán jól nőnek a sejtek. A többféle típusból rutinszerűen Transwell inzerteket (Corning Life Sciences, USA) használtunk (12. ábra). A poliészter membránok fixálhatóak, metszhetőek, fluoreszcens hátterük minimális. Ez az elrendezés teszi lehetővé egysejtrétegek elektromos ellenállásának és permeabilitásának mérését (8. ábra).



12. ábra. Permeábilis membránnal rendelkező 12-lyukú lemezbe illeszkedő tenyésztőbetét (Transwell). Fénymikroszkópos felvétel a membránról két oldalán tenyésztett és fixált sejtekkel; HE, hematoxilin-eozin festés; EM, elektronmikroszkópos felvétel membránon tenyésztett agyi endothelsejtről.

A különböző vér-agy gát modellek létrehozásánál primer agyi endothelsejteket tenyésztünk együtt egy vagy több sejtípussal. Elsősorban gliasejteket, mint primer vegyes glia- [Perrière és mtsai, 2005; Veszélka és mtsai, 2007; Kovac és mtsai, 2009; Deli és mtsai, 2010], I típusú astroglia- [Nakagawa és mtsai, 2007, 2009], vagy patkány C6 gliómasejteket (CCL-107, American Type Culture Collection, USA) [Deli és mtsai, 2003] használtunk. Pericytákat kettős és hármas modellhez is alkalmaztunk [Nakagawa és mtsai, 2007, 2009]. A modellek összeállításánál az endothelsejteket az inzertek felső, a modell luminalis felszínére helyeztük. A gliasejteket a 12-lyukú tenyésztőedényekben növesztettük. A pericytákat a membránok alsó, a modell abluminalis felszínén tenyésztettük (13. ábra). A humán hármas modell létrehozásához szükséges humán agyi endothelsejteket, pericytákat, és gliasejteket a Biopredic cég (Rennes, Franciaország) bocsátotta rendelkezésünkre együttműködés keretében.

A hármas modell esetében a sejtekkel együtt az inzerteket a 12-lyukú tenyésztőedényekben tartott gliasejtekre helyeztük, és további 3-5 napig együtt tenyésztettük (13. ábra).



13. ábra. Három sejttípus együttes tenyésztésével létrehozott *in vitro* vér-agy gát modell készítésének sematikus ábrája [Nakagawa és mtsai, 2009].

3.3. Permeabilitási, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok sejtenyészeteken

3.3.1. Tenyészetek kezelése

Peptidekkel

Minden egyes kísérlet típusnál előkísérletben meghatároztuk a hatékony dózist, és azzal a koncentrációval végeztük a további kísérleteket. A A β 1-42 peptideket 1-100 μ M koncentráció sávban és 0-48 órás kezelési intervallumban vizsgáltuk. Kontrollként "scrambled" peptidet, azaz azonos aminosavakból random aminosav sorrendben szintetizált peptideket, illetve "fordított", azaz A β 42-1 peptidet használtunk. A kísérleteket szérumot tartalmazó és szérummentes tápfolyadékban egyaránt elvégeztük. Szérummentes közegben a peptidhatás erőteljesebb volt.

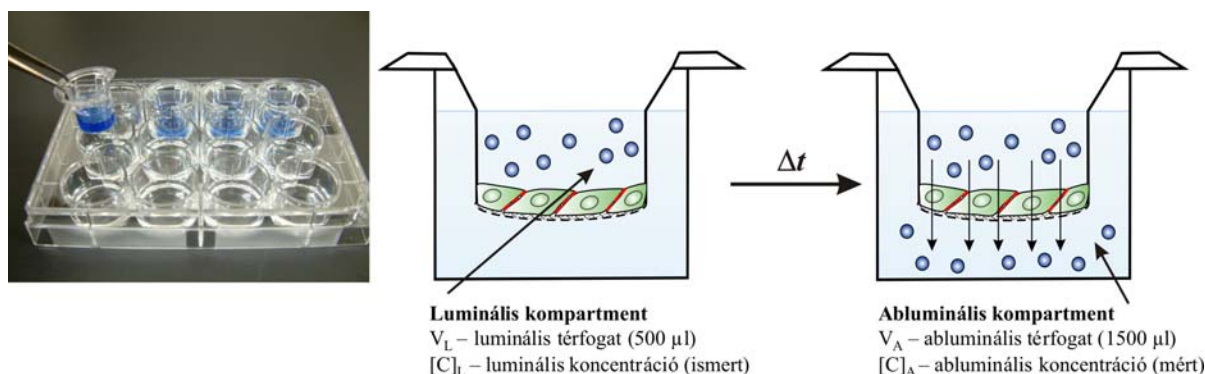
3.3.2. Transzendenteliális elektromos ellenállás mérése

Az *in vitro* mért transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER) tenyésztési körülmények között a sejtközötti kapcsolatok nátrium-ionnal szembeni áteresztőképességét mutatja, mivel a tenyésztő- és puffer oldatokban is a nátrium-ion a legnagyobb koncentrációban (150 mM) jelen lévő kation. Az ellenállást EVOM rezisztencia-mérővel, és STX-2 pálcá alakú, illetve Endohm kamra formájú elektródákkal (World Precision Instruments, USA) mértük. A TEER értékeket ($\Omega \times \text{cm}^2$) átlagoltuk és levontuk belőle a sejt nélküli, üres filtereken mért értékek átlagát. Az agyi endothel-egysejtrétegek ellenállása a sejtek közötti kapcsolatok szorosságát tükrözi [Deli és mtsai, 2005].

3.3.3. Permeabilitás vizsgálata

Az endothel-egysejtrétegek permeabilitásának meghatározására rutinszerűen két olyan jelzőanyagot használtunk, amelyekre a vér-agy gát áteresztőképessége élettani körülmények között *in vivo* igen alacsony. A paracelluláris útvonalon való szabad átjutást a sejtek közötti kapcsolatok akadályozzák, ennek mértékének meghatározására nátrium-fluoreszeint (SF; M: 376 Da) használtunk. A sejteken keresztüli transzcelluláris átjutást albuminhoz kötött Evans kék festékkel mértük (EBA; M: 67 kDa) [Deli és mtsai, 2005; Veszélka és mtsai, 2007].

A tenyésztőbetéteket a sejtek kezelése és rezisztencia-mérés után 12-lyukú steril tenyésztő-lemezekbe helyeztük, amely lyukanként 1,5 ml steril 37 °C-os Ringer-Hepes oldatot (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5,5 mM D-glükóz, 20 mM Hepes, pH 7,4) tartalmazott. Az inzerteken lévő agyi endothelsejt-egysejtréteget borító tápfolyadékot (luminális kompartment, 14. ábra) kicseréltük 500 μ l Ringer-Hepes oldattal, amely 10 μ g/ml fluoreszeint és 167,5 ng/ml Evans kék festéket tartalmazott 1 mg/ml BSA-hoz kötve.



14. ábra. A transzendotheliális permeabilitás mérésének sematikus ábrázolása. A kép bal szélén a tenyésztőbetétek elhelyezkedése látható a 12-lyukú tenyésztőlemezen. A rajzok a tenyésztőbetétek keresztmetszetét mutatják. Δt : a permeabilitás mérési pontjai között eltelt idő.

A filtereket a mérés 20., 40. és 60. percében áthelyeztük a lemez következő Ringer-Hepes-t tartalmazó lyukába. A permeabilitás-mérés alatt a lemezeket 37 °C-on CO₂ inkubátorban tartottuk, síkrázókészüléken (100 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország). Ezzel biztosítottuk az oldatok folyamatos, nagyon enyhe mozgását, ami a permeabilitás-méréshez szükséges [Youdim és mtsai, 2003]. A paracelluláris és transzcelluláris transzport markereinek koncentrációját a filterek alatt, a tenyésztőedény lyukaiban maradt oldatokból határoztuk meg soklyukúlemez-leolvasóval (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország). Az EBA abszorbanciáját 620 nm-en mértük, míg a SF emisszióját 440 nm-en történt gerjesztés után 525 nm-en határoztuk meg.

3.3.4. Folyékony fázisú endocitózis

A sejtek pinocitózisát egy a folyamat általános markereként használt fluoreszcens molekulával, a Lucifer sárga (LY) festékkel vizsgáltuk [Guillot és mtsai, 1990; Deli és mtsai, 2000b]. A 12-lyukú lemezekben tenyésztett agyi endothelsejteket Mg²⁺ és Ca²⁺ tartalmú Dulbecco foszfát puffer (DPBS) oldattal mostuk, majd különböző ideig 37 °C-on 500 µl DPBS-ben, kezeltük amely 0,5 mg/ml LY festéket tartalmazott. Az inkubációs idő letelte után a tenyészeteket háromszor mostuk jéghideg DPBS-BSA pufferrel, majd 1 ml 0,1 %-os Triton X-100 oldattal feltártuk a sejteket. A LY emisszióját fluoriméterrel 430 nm-en történt gerjesztés után 540 nm-en határoztuk meg (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország) és a felvett LY mennyiséget BCA kittel (Thermo Fischer Scientific, IL, USA) meghatározott sejtfehérjére vonatkoztatva adtuk meg. Negatív kontrollként olyan endothelsejteket használtunk, amelyek metabolikus folyamatait a kísérlet előtt 2-dezoxi-glükózzal (50 nM) 4 °C-on gátoltuk.

3.3.5. Toxicitási vizsgálatok

3.3.5.1. MTT teszt

Emlős sejtek életképességének megállapítására a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromidot (MTT) gyakran használják. Az élő sejtek a sárga MTT festéket kék színű formazán kristályokká alakítják. Az MTT teszthez az agyi endothelsejteket 96-lyukú edényben tenyésztettük. A peptid és egyéb hatóanyagokkal történő kezeléseket követően a 100 µl inkubációs térfogatokból 50 µl tápfolyadékot üres lemezekbe mértünk át, és laktát-dehidrogenáz felszabadulást határoztunk meg a mintákból. Az MTT törzsoldatot (0,5 mg/ml) PBS-ben hígítva közvetlenül a sejtekhez adtuk, majd 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A sejteket és az MTT-ből képződött formazán-kristályokat dimetilszulfoxiddal oldottuk fel. Ezután a festék mennyiségét abszorbancia-méréssel (595 nm) soklyukúlemez leolvasó készüléken határoztuk meg (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország). A sejtkárosító hatás mértékével arányosan csökken a festék redukciója.

3.3.5.2. Laktát-dehidrogenáz felszabadulás meghatározása

A sejtekből felszabaduló citoplazmatikus laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim membrán károsodást jelez, ezért a nekrotikus sejtpusztulás indikátoraként is használható. A sejtek felülúszójából az LDH mérését kittel (Cytotoxicity detection kit LDH, Roche 1644793) végeztük. A kezeléseket követően

levett 50 µl sejtmentes felülszó mintákhoz frissen elegyített, indikátor festéket és katalizátort tartalmazó oldatot pipettáztunk a mintával megegyező térfogatban. A reakció szobahőmérsékleten sötétben 15 perc alatt lezajlott, ekkor a minták LDH tartalmát 450 nm hullámhosszon abszorbancia mérésel mikroplate-leolvasó készüléken meghatároztuk (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország). A citotoxicitást az 1 % Triton X-100 detergenssel kezelt sejtekből felszabaduló teljes LDH mennyiség százalékában adtuk meg. A membránkárosító, nekrozist okozó hatás mértékével arányosan nő a felülszóból mérhető LDH mennyisége.

3.3.5.3. Valós idejű sejtanalízis

Az impedancián alapuló mikroelektronikus sejtérzékelés alkalmas a sejtenyészetek biológiai állapotának (növekedés, életképesség, letapadás) valós idejű nyomonkövetésére jelzőanyag használata nélkül [Ózsvári és mtsai, 2010]. Kísérleteinkhez xCELLigence (Roche Applied Science, Magyarország) műszert használtunk. A rendszer nagy előnye, hogy nem invazív, a sejtek monitorozása fiziológiai körülmények között zajlik. A sejteket speciális 96-lyukú steril lemezbe szélesztjük, amelynek alján arany mikroelektromos szenzorok, mikroelektrodák vannak (E-plate, Roche), majd a lemezt 37 °C-os inkubátorba helyezzük. A műszer segítségével elektromos impedanciát mérhetünk a sejtek és az érzékelő elektrodák között. A mérés előtt a háttér impedancia meghatározásához sejtmentes tápfolyadékot használunk. A sejtek növekedésével és letapadásával arányosan nő a mért impedancia, amit a sejtindex (CI) értékével fejezünk ki. A sejtindexet az xCELLigence rendszer programja számolja ki az $(R_n - R_b)/15$ formula segítségével, ahol R_n a sejtek és az elektrod között mért impedancia, az R_b pedig a háttér impedancia, amit sejtek nélkül tápfolyadék esetében mérünk. Az impedancia méréshez a speciális 96 lyukú lemezekben 100 µl/lyuk sejtmentes tápfolyadékkal megmértük a háttérimpedanciát. Ezt követően 100 µl sejtuszuszenziót adtunk lyukanként és az agyi endothelsejteket konfluencia eléréséig tenyésztettük, majd felvettük 6 órán át az xCelligence rendszerben a kezeletlen sejtek impedancia szintjeit. A rendszer stabilizálódása után a sejteket kezeltük és 24 órán keresztül rögzítettük az adatokat 2-3 percenkénti impedancia-méréssel és a sejtindexből meghatároztuk a rezisztenciát.

3.3.6. Efflux pumpa vizsgálatok

P-glikoprotein aktivitás mérés

A P-glikoprotein (Pgp) pumpa aktivitását a rodamin 123 ligand sejtekben való felhalmozódásával vagy kiáramlásával mértük [Fontaine és mtsai, 1996; Deli és mtsai, 2001; Veszelka és mtsai, 2007]. A rodamin felvételt vizsgáló kísérletben 24-lyukú lemezekre szélesztett agyi endothelsejt tenyészeteket 5 µM rodamin tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel 1 órán át inkubáltuk a Pgp működést gátló ciklosporin A (1,6 µM), vagy verapamil (100 µM), illetve kezelések jelenlétében. Majd az endothel-egysejtrétegeket háromszor mostuk jég hideg PBS-sel, és a 0,2 M nátrium-hidroxid oldattal feltárt sejtekből a rodamin mennyiségét, valamint a sejtek fehérjetartalmát meghatároztuk. A rodamin-efflux mérésekor a sejteket feltöltöttük 5 µM rodamin tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel történő 1 órás inkubálással, majd az endothel-egysejtrétegeket háromszor mostuk jég hideg PBS-sel és Pgp gátlószerek, illetve kezelések jelenlétében Ringer-Hepes pufferben a sejtekből a rodamin kiáramlását vizsgáltuk. Az inkubációs idő (1 óra) letelte után a felülszóból, valamint a 0,2 M nátrium-hidroxid oldattal feltárt sejtekből a rodamin mennyiségét 505 nm hullámhosszon történő gerjesztés után 534 nm hullámhosszon mértük (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország). A sejtekben a rodamin dúsulása, illetve a rodamin kiáramlás csökkenése jelzi a pumpa gátlását.

Multidrog rezisztencia fehérje-1 (MRP-1) aktivitás mérés

A bimán egy nem-fluoreszcens szerves anion, amely glutationnal kapcsolódva a fluoreszcens glutation-S-bimán (GS-B) vegyületté válik [Kosower és mtsai, 1979]. A GS-B az MRP1 efflux pumpa ligandja, és segítségével vizsgálható a transzporter aktivitása. Az agyi endothelsejteket 24-lyukú tenyészedenyekben 20 percig 20 µM mono-bromo-bimánt tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után az endothel-egysejtrétegeket háromszor mostuk jég hideg PBS-sel majd az MRP-1 gátló probenecid (100 µM), valamint kezelések jelenlétében Ringer-Hepes pufferben vizsgáltuk a sejtekből a GS-B kiáramlást. Az inkubációs idő (1 óra) letelte után a

felülúszóból és a 0,2 M nátrium-hidroxid oldattal feltárt sejtekből a GS-B mennyiségét fluoriméterrel (gerjesztés: 386 nm, emisszió: 476 nm; Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország) határoztuk meg.

3.3.7. Reaktív szabad oxigéngyökök és nitrogén-monoxid mérése

A szabadgyökök fluorometriás detektálására kétféle próbát alkalmaztunk (Molecular Probes, Invitrogen, USA). A klorometil-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetátot (DCFDA) a reaktív oxigén-származékok (ROS), a 4-amino-5-metil-amino-2',7'-difluoro-fluoreszcein-diacetátot (DAF) a nitrogén-monoxid (NO) tartalom meghatározására használtuk [Kojima és mtsai, 1998]. Mindét indikátor képes diffúzióval a sejtekbe jutni és sejten belüli deacetylálódni észterázok segítségével. A reaktív oxigéngyökök hatására a CM-H₂DCFDA oxidálódik, és fluoreszcenssé válik. A DAF-FM-diacetát a sejten belül nitrozónium kationnal reagál és egy heterociklikus, fluoreszcens vegyületet alkotnak, amely csapdázódik a citoplazmában. Az agyi endothelsejteket 96-lyukú lemezekben tenyésztettük, majd különböző ideig kezeltük. Ezt követően a sejteket 1 µM próbát tartalmazó Ringer-Hepes oldattal inkubáltuk 1 órán keresztül, 37 °C-on. Az inkubációs idő letelte után a sejtekben lévő ROS vagy NO mennyiségét fluoreszcencia méréssel határoztuk meg (gerjesztés: 485 nm, emisszió: 538 nm; Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország).

3.3.8. Intracelluláris cAMP mérés

Az agyi endothelsejtek sejten belüli teljes cAMP szintjének meghatározásához enzimhez kötött ellenanyag módszert használtunk (ELISA; cAMP Biotrak EIA assay kit, GE Healthcare, USA). A mérés során az ELISA lemezhez kötött nyúl-anti cAMP antitesthez cAMP-peroxidáz komplex illetve az endothelsejtekből a feltárás során felszabaduló cAMP kötődhet. Minél kevesebb a felszabaduló cAMP, annál több cAMP-peroxidáz komplex marad kötötten az anti-cAMP antitesten és annál erősebb lesz a színreakció. A kísérlethez agyi endothelsejteket 96-lyukú edényben tenyésztettünk, majd 5 perces kezeléseket (pozitív kontroll: 25 µM CPT-cAMP) követően feltártuk a sejteket és az ELISA lemezen a színreakciót 450 nm-en többlyukúlemez leolvasó készüléken határoztuk meg (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Németország).

3.3.9. Anti-humán Aβ 1-42 titer meghatározása ELISA módszerrel

Szérum mintákat gyűjtöttünk a magatartás vizsgálat végén a vivőanyaggal vagy humán Aβ 1-42 peptiddel nazálisan kezelt Wistar patkányokból (n = 6 állat-kezelési csoport) hogy meghatározzuk termelődött-e antitest a beadott peptid ellen. Ehhez egy ELISA tesztet állítottunk be. Maxisorp ELISA soklyukú lemezeket (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) 50 mM nátrium-karbonát pufferben (pH 9,6) feloldott 1,25 µg/ml Aβ 1-42 peptiddel vontunk be egy éjszakán át 4 °C-on. Háromszor átmostuk Tris-sel puffertelt sóoldattal (TBS; 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl; pH 7,4) ami 0,05 % BSA-t (m/V) tartalmazott. A lemez lyukaiba a nem-kötő helyeket blokkoló puffert pipettáztunk (1 % BSA, 5 % kecske szérum TBS-ben; pH 7,4) és két órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a patkány szérum hígításait (10–1000) tettük a lyukakba. Pozitív kontrollnak egér anti-humán Aβ 1-42 monoklonális ellenanyagot (4G8, AbCam, Cambridge, UK) használtunk (hígítás: 4000 - 16000). A lemezeket biotinnal konjugált anti-egér IgG és IgM ellenanyaggal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA; 1:10000; keresztreagál patkány immunglobulinokkal), majd pedig extravidin-peroxidázzal (1:2000) inkubáltuk 30 percen át szobahőmérsékleten. Mosás után a lemezekben az enzimreakciót fenilén-diaminnal (0,33 mg/ml citrát pufferben; pH: 6,0; 10 perc) hívtuk elő; a reakciót 2 M H₂SO₄ oldattal állítottuk le, és a lemezekben a lyukak denzitását soklyukúlemez-leolvasóval 50 nm hullámhosszon mértük.

3.3.10. Western blot

Pericytákkal és astroglia sejtekkel együtt vagy külön tenyésztett agyi endothelsejtekből származó fehérje mintákat SDS-agaróz gélen elektroforézissal elválasztottunk és nitrocellulóz membránra (Hybond, GE Healthcare, USA) vittünk át. A nem-specifikus kötést 0,1 % Tween-20 detergenst tartalmazó TBS pufferben oldott Perfect-Block reagenssel (1 % m/V; MoBiTec GmbH, Göttingen, Germany) blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyagokból (anti-klaudin-5 és anti-okkludin egér monoklonális, anti-ZO-1 nyúl poliklonális antitestek (Zymed Laboratories Inc., USA), anti-Pgp nyúl és anti-MRP1 kecske poliklonális antitestek (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), anti- GLUT-1

nyúl poliklonális antitest (Millipore Corp., USA)) a blokkoló oldatban 1:5000 hígítást készítettünk, amiben a membránokat egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Másodlagos ellenanyagként peroxidázhoz kapcsolt anti-egér, anti-nyúl és anti-kecske immunglobulinokat használtunk (GE Healthcare, USA). Az inkubálások közt a membránokat háromszor mostuk TBS pufferrel. Az immunreaktív fehérjecsíkokat ECL Plus reagenssel (GE Healthcare, USA) tettük detektálhatóvá, és FluorChem SP Imaging System segítségével készítettünk képeket (Alpha Innotech Corp., USA).

3.3.11. Génexpressziós mintázat vizsgálata

Tenyésztett sejtek, vagy frissen izolált agyi hajszálerek génexpressziós mintázatát egyedi TaqMan arrayk segítségével vizsgáltuk (Applied Biosystems, Life Technologies, Magyarország Kft.) Az endothelsejteket 10 cm-es tenyésztőbetéteken vagy csészékben növesztettük. Kezelések után a tápfolyadékot eltávolítva gyors jéghideg PBS-es mosás után steril sejtkaparókkal összegyűjtöttük a sejteket és 13,000 g-n, 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A sejttöledékről a PBS-t eltávolítva -70 °C-on tároltuk a mintákat a ribonukleinsav (RNS) izolálásig. A sejtek teljes RNS extrakciója a guanidinium-izotio-cianát-alapon működő RNAqueous-4PCR Kit (Ambion, Applied Biosystems) segítségével történt, majd 30 perces DNáz kezelést követően Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) rendszerrel mértük az RNS koncentrációt. Az RNS épségét agaróz gélen történt gélelektroforézissel, dezoxiribonukleinsav (DNS)-mentességét pedig valós idejű polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) mértük. Az össz-RNS mintán reverz transzkripciót hajtottunk végre random hexamerekkel High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) felhasználásával. A génexpressziós szint analízist kvantitatív PCR-rel (qPCR) végeztük, TaqMan Low Density Array 384-lyukú mikrofluidikai rendszerben, amely alkalmas az általunk meghatározni kívánt gének RT-PCR analízisére. A RT-PCR adatok analízise az ABI SDS 2.0 szoftverével történt, amely a $\Delta\Delta C_t$ értéket felhasználva határozza meg a kívánt gén relatív expressziós szintjét a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formulával. Minden mintát az S18-as riboszomális géntípusra normalizáltunk, amely belső kontrollként szolgált.

3.4. Morfológiai vizsgálatok

3.4.1. Sejtmagok fluoreszcens festése

Az agyi endothelsejtek magjának szerkezetében történő változást, a közvetlen károsodást jelző élő és elpusztult sejtek arányának meghatározását fluoreszcens sejtmagi jelöléssel végeztük [Deli és mtsai, 2000a]. A bis-benzimid (Hoechst festék 33342) kékre festi a sejtmagi nukleinsavat élő sejtekben is, míg az etidium-homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, USA) csak az elpusztult sejtek magját jelöli vörös fluoreszcenciával. A kezelések utolsó 30 percében vagy csak bis-benzimidet, vagy mindkét fluoreszcens festéket 10 μ M végső koncentrációban adtuk a sejtekhez. Háromszori gyors PBS mosást követően az agyi endothelsejteket 4 %-os paraformaldehidet tartalmazó PBS pufferben 20 percig fixáltuk. A fixált sejteket PBS-sel mostuk, majd fluoreszcens fedő- és rögzítőoldatot (Biomed, USA) cseppentettünk a mintákra, üveg tárgylemezzel fedtük, és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse TE2000, Japán) vizsgáltuk. A mikroszkópra szerelt SPOT RT digitális kamerával (Spot Diagnostic Instruments, USA) rögzítettük a felvételeket.

3.4.2. Metszetek fluoreszcens mikroszkópiája

A fluoreszcensen jelölt 7-amino-4-metil-3-kumarinilacetát (AMCA)-A β 1-42 peptid kimutatásához hím Wistar patkányok (n = 4) jobb orrlyukába 10 μ g peptidet pipettáztunk 40 μ l térfogatban [Sipos és mtsai, 2000]. A kontroll csoport vivőanyagot kapott. Két órával később transzkardiális perfúziót (100 ml PBS, pH = 7.4) követően az agyakat kivettük, OCT kriomédiumba (Tissue-Tek Compound, Sakura, Tokyo, Japán) ágyaztuk, 30 μ m-es szagittális metszeteket vágunk kriosztáttal, üveg tárgylemezekre tettük, megszárítottuk, és lefedtük (Gel/Mount (Biomed, USA). A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse TE 2000 U, Nikon, Japan), és CCD kamerával (Spot Diagnostic Instruments, USA) rögzítettük a felvételeket.

3.4.3. Immunfestések

Sejtenyésztéseken

Az agyi endothelsejtek TJ fehérjéi közül az okkludin, zonula occludens-1 (ZO-1) és a kladin-5 fehérjét (KLDN-5), az adherens sejt kapcsoló struktúrák fehérjéi közül a β -katenint (β -kat) mutattuk

ki immunfestéssel. A primer antitestek, az anti-ZO-1 (nyúl), anti- β -katenin (nyúl), az anti-klaudin-5 és anti-okkludin (egér) a Zymedtól (USA) származott, a Cy3-kapcsolt anti-nyúl, az anti-egér-Alexa 488 szekunder ellenanyagok és a Hoechst 33342 magfesték a Sigmától. A permeabilitás vizsgálat után az agyi endothelsejt tenyészeteket a filtereken röviden és gyorsan Ringer-Hepesben öblítettük, és etanol-ecetsav 95:5 arányú elegyével $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 20 percig fixáltuk. Ezt követően háromszori PBS-sel történő mosás után a sejteket 3 %-os BSA-PBS blokkoló oldattal szobahőmérsékleten 30 percig, a primer antitesttel egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, míg a szekunder antitesttel és a magfestéssel egy óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A két antitesttel való kezelés között és után háromszor mostuk a sejteket PBS-sel. A mintákat lefedtük (Gel/Mount, Biomedica, USA), és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse TE 2000 U, Nikon, Japan). A mikroszkópra szerelt SPOT RT digitális kamerával (Spot Diagnostic Instruments, USA) rögzítettük a felvételeket.

Metszeteken

A nazálisan beadott jelöletlen A β 1-42 peptid kimutatását agyi metszeteken immunfestéssel végeztük [Sipos és mtsai, 2010]. A magatartási vizsgálatok után az avertinnel túllaltatott állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 250 ml fiziológiás sóoldattal, majd 250 ml 4 % paraformaldehidet tartalmazó PBS pufferrel (pH 7,4). Az agyakat ugyanebben az oldatban utórögzítettük 6 órán át, majd cukoroldatban (30 % m/V PBS-ben) tartottuk legalább 36 órán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, hogy az ezt követő fagyasztás szövetet roncsoló hatását kivédjük. Fagyasztó oldattal történt beágyazás után 30 μm -es koronális metszeteket vágunk kriosztáttal. A metszeteket $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on PBS-ben tároltuk az immunfestésig. Az endogén peroxidáz aktivitás gátlása és a nem-specifikus kötőhelyek telítése után a metszeteket egér anti-A β 1-42 monoklonális ellenanyaggal (4G8; AbCam, Cambridge, UK; 1:500) egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 20 % kecske szérum és 0.2 % Triton X-100 jelenlétében, biotinilált kecske anti-egér másodlagos ellenanyaggal (Vector Labs, Burlingame, USA; 1:500) egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A peroxidáz reakció előhívásához Vectastain Elite ABC kitet (Vector Labs, Burlingame, USA), diaminobenzidint és NiCl_2 -ot használtunk. A festett metszeteket mosás után zselatinnal bevont tárgylemezre tettük, megszáritottuk, víztelenítettük és lefedtük (DPX fedőoldat, Fluka BioChemika, Buchs, Svájc). A mintákat fénymikroszkóppal (Olympus Vanox-T AH-2, Japán) vizsgáltuk, és CCD kamerával (Spot Diagnostic Instruments, USA) rögzítettük a felvételeket.

3.4.4. Elektronmikroszkópia

Tenyésztett sejteken

A tenyésztett sejtek elektronmikroszkópiás vizsgálatának egy részét saját laboratóriumunkban végeztük [Deli és mtsai, 2007], másik részét Dr. Kittel Ágnes végezte (MTA KOKI, Budapest) együttműködés keretében [Deli és mtsai, 2010]. A membránon növesztett sejteket 3 % paraformaldehidet tartalmazó kakodilát pufferben (pH 7,5) fixáltuk 30 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Többszöri kakodilát pufferes mosás után a betétekből a membránokat óvatosan kimetszettük, és 1 % OsO_4 -ot tartalmazó 0,1 M kakodilát pufferben posztfixáltuk 30 percig. A mintákat ezután desztillált vízben mostuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük, 70 %-os etanolban készített 2 %-os uranil-acetát oldatban kontrasztoltuk 1 órán át, végül Taab 812 gyantába ágyasztuk be (Taab; Aldermaston, Berks, UK). Ultravékony metszeteket vágunk a membrán síkjára merőlegesen Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK), amelyeket Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltunk (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Megaview II digitális kamerát (Soft Imaging System, Münster, Németország) használtunk a felvételek készítéséhez. A képek kontrasztját, amennyiben szükség volt rá, Adobe Photoshop CS3 programmal (San Jose, CA, USA) igazítottuk [Nakagawa és mtsai, 2009; Deli és mtsai, 2010].

Szöveteken

A nazális régió és agy vizsgálatához [Wolburg és mtsai, 2008, Horvát és mtsai, 2009] túllaltatott patkányokat transzkardiálisan perfundáltunk 2.5 % glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M kakodilát pufferrel (pH 7,4). A szaglórégiót kipreparáltuk, 4 órán keresztül utófixáltuk, majd kakodilát pufferben tároltuk. A transzmissziós és fagyasztva töréses elektronmikroszkópiát Prof. Hartwig

Wolburg és csoportja végezte Tübingenben. Röviden a szövetet 1 % OsO₄-ot tartalmazó 0,1 M kakodilát pufferben posztfixálták, felszálló alkoholsorban víztelenítették, és 70 %-os etanolban készített 2 %-os uranil-acetát oldatban kontrasztolták. A víztelenítést propilén-oxiddal fejezték be. A mintákat araldit gyantába (Serva, Heidelberg, Németország) ágyazták be. Az ultravékony metszeteket FCR Reichert Ultracut ultramikrotómmal (Leica, Bensheim, Németország) készítették, pioloform hártáival bevont réz tárgytartólemezekre vitték föl, ólom-citráttal kontrasztolták, majd EM10A típusú elektronmikroszkóppal (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) vizsgálták.

3.4.6. Atomerő-mikroszkópia

A biomolekulák atomerő-mikroszkópiáját (AFM) Dr. Csete Mária és munkacsoportja végezte az SZTE Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén. A mintákat az általuk készített lézerrel strukturált felszínre [Csete és mtsai, 2005] vittük fel. A felszínnek topográfiáját és adhézióját elővizsgálták atomerő-mikroszkópiával (PSIA XE-100 mikroszkóp, DPFM mód; Witec GmbH, Németország) standard PFM hegyekkel (NSC 18/NoA1, 2.5 N/m). A lézerrel megmunkált felszínű mintákat PBS-ben frissen készített Aß 1-42 (10 µg/ml) pentozánt (100 µg/ml) tartalmazó illetve nem tartalmazó oldatba merítettük, és egy órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd háromszor mostuk steril desztillált vízben síkrázón, végül szobahőmérsékleten egy éjszakán át szárítottuk. A biomolekulák detektálása *tapping* üzemmódban NT-MDT hegyekkel (NSG11, 5.5 N/m, 150 kHz) másnap történt. A lézeres felszínre letapadt biomolekulák számának és méretének meghatározását az AFM képeken Spot Advance programmal (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) végeztük. Két független kísérletből származó 3 különböző mintán 25-25 random kiválasztott 1 µm² mezőkön számoltuk meg a részecskéket [Deli és mtsai, 2010].

3.5. Állatkísérletek

3.5.1. Bakteriális lipopoliszacharidok hatása egéren [Veszélka és mtsai, 2003]

A kísérlethez az MTA SZBK Állatháza által tenyésztett hím CBAxBL/6 egereket (3 hónapos, 30-35 g) használtunk, az állatokat standard körülmények között tartottuk, csapvizet és tápot szabad hozzáféréssel kaptak. Az állatkísérletek során mindvégig betartottuk az Európai Unió *Council directive for the care and use of laboratory animals* testületének irányelveit és a vizsgálatokat az állategészségügyi hatóság jóváhagyta (XVI/72-45/a/2001).

Az egerek három intraperitonealis injekciót kaptak, amelyek egyenként 100 µg/adag *Salmonella typhimurium* lipopoliszacharidot (LPS) tartalmaztak 200 µl izotóniás sóoldatban (megközelítőleg 3 mg/kg dózis). Ezt a kezelést az állatok protokollja szerint a kísérlet elkezdése után 0, 6, és 24 órával kapták [Xaio és mtsai, 2001]. A kontroll állatok injekciója csak vivőanyagot tartalmazott. Egyes LPS- vagy vivőanyag-kezelt egerek 250 µg human szérum amiloid P komponenst (SAP; Calbiochem; La Jolla, CA, USA) is kaptak intravénásan (200 µl össztérfogatban). A SAP-ot liofilizált porból steril desztillált víz segítségével frissen oldottuk föl, a fehérjekoncentráció 1,25 mg/ml, az ionkoncentráció fiziológiás volt. Ezt a SAP adagot mind az LPS-kezelt, mind a kontroll állatok jól tolerálták és a szert 1 vagy 6 órán keresztül hagytuk hatni. Ekkor a SAP vérszintje megfelelhetett az egerek akut fázis reakciójában mért 250 µg/ml körüli értéknek (Neveu és mtsai, 1998). Az LPS és LPS + SAP kezelést kapó egereken jellegzetes klinikai tüneteket és magatartás-változásokat figyeltünk meg a perfúzió előtti 1 órában.

A vér-agy gát permeabilitási vizsgálatban az alábbi 7 állatcsoportot (n=5-12) hoztuk létre: (i) vivőanyag-kezelt kontroll egerek; LPS-kezelt egerek 6 (ii), 18 (iii), vagy 24 órával (iv) a harmadik injekció után; kombinált LPS- és SAP-kezelést kapott egerek, 18 és 1 órával (v), vagy 24 és 6 órával (vi) a kétféle kezelés után; valamint (vii) SAP-kezelt állatok 1 órával az injekció után.

A vazogén agyödéma kialakulását két ismert vér-agy gát permeabilitási jelzőanyag, a nátrium fluorescein (SF, molekulatömeg: 376, Stokes radius: 0.55 nm) és az albuminhoz kötődő Evans kék festék (EBA, együttes molekulatömeg: 67 000, Stokes radius: 3.5 nm; az Evans kék festék molekulatömege 961) agyszövetbe történő bejutásával határoztuk meg. Ezek a jelzőanyagok különféle extravázációs utakra adhatnak felvilágosítást, mert az albumin transcytosis révén jut át a vér-agy gáton, míg a SF a paracellularis permeabilitás markerének tekinthető jóllehet az MRP efflux

pumpák is szabályozhatják az agyba való bejutását. Az egerek mindkét festékből 2 %-os oldatot (5 ml/kg) kaptak a farokvénába 1 órával a kísérlet vége előtt, majd az állatokat 50 ml PBS-sel transzkardiálisan perfundáltuk, majd szérumszövet- és agyszövet-mintákat (jobb és bal oldali agykéreg, középagy, kisagy) vettünk, és a mintákat -20°C -on tároltuk. A szövetmintákat 1,5 ml 15 %-os (m/V) triklórecetsavban homogenizáltuk, 10000 g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszókból a SF koncentrációjának mérése 440 nm excitációs és 525 nm emissziós hullámhosszon, míg az EB abszorpció mérése 620 nm-en történt Polarstar Galaxy fluoreszcens soklyukú lemezleolvasó segítségével (BMG Labtechnologies, Németország). A vér-agy gát permeabilitását ng jelzőanyag/g agyszövet koncentrációval jellemeztük. Az egyéb állatfajokon végzett vér-agy gát permeabilitási vizsgálatok jelentős része is ezzel a két jelzőanyaggal történt, a továbbiakban csak a jelen leírástól való eltéréseket jelzem.

3.5.2. TNF- α hatása újszülött sertésen [Ábrahám és mtsai, 1996; Megyeri és mtsai, 2000]

Ebben a vizsgálat-sorozatban nőstény és hím újszülött sertéseket (4-8 óra, 1170-1580 g, n=84) használtunk. Pentobarbitál (30 mg/kg) anesztéziában az egyik köldökartériába katétert helyeztünk és ezen keresztül ellenőriztük a legfontosabb keringési adatokat és az artériás vérgáz és sav-bázis paramétereket. Feltártuk a kísérleti állatok bal oldali arteria carotis internáját, amit a carotis externán keresztül kanuláltunk, hogy ezen keresztül lassú intraarteriális infúziót tudjunk beadni. Az infúzió beadása után az intraarteriális kanült eltávolítottuk és az arteria carotis internát lekötöttük. A kísérletek az amerikai National Institute of Health állatkísérletes irányelvei (*Guidelines for the care and use of laboratory animals*) szerint zajlottak, a kísérleti beavatkozásokat a szegedi Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Állatvédő Tudományetikai Bizottsága jóváhagyta (No. ÁTB 53).

Az egyik vizsgálati elrendezésben [Ábrahám és mtsai, 1996] rekombináns humán TNF- α -t (rhTNF- α) adtunk be 0,5 ml fiziológiás sóoldatban az alábbi dózisokban: 0, 1000, 10 000 és 100000 IU (n=12 minden csoportban), majd a vér-agy gát permeabilitási változásait 1, 2, 4, 8, 16 órával a citokin infúzió után vizsgáltuk. A másik vizsgálatban [Megyeri és mtsai, 2000] 6 kontroll újszülött sertés fiziológiás sóoldatot, míg 30 állat 10000 IU rhTNF- α -t tartalmazó infúziót kapott intraarteriálisan. Itt a sertéseket 1 órával a rhTNF- α adása előtt intravénásan adott 4-(2-aminoetil)benzénszulfonil-fluoriddal (AEBSF, más néven Pefabloc; molekulatömege: 239,5; 0; 2,4; 4,8; 9,6 vagy 19,2 mg/kg adag 1,0 ml fiziológiás sóoldatban; n=6 minden csoportban) előkezeltük és a permeabilitást 4 órával a citokin infúziója után mértük.

Az SF és EBA jelzőanyagok vér-agy gát permeabilitását a már ismertetetthez hasonló módon mértük. Az újszülött sertések mindkét festéket (2%, 5 ml/kg) a kísérlet tervezett vége előtt 30 perccel kapták intravénásan, majd vérmintákat vettünk és a jelzőanyagokat az érrendszerből 200 ml/kg fiziológiás sóoldattal eltávolítottuk. A rhTNF- α hatásának dózis- és idő-függését vizsgáló kísérletünkben a bal oldali fali lebenyből vettünk agykéreg mintákat, míg az AEBSF hatásának vizsgálata az infúzióval azonos (bal) és ellenkező (jobb) oldali fali lebeny, hippocampus, striatum, periventricularis fehérállomány, és kisagy mintákból történt. A szérumszövet mintákat 3,0 ml jéghideg 7,5 %-os (m/V) triklórecetsavban homogenizáltuk, majd 10000 g-n 10 percen keresztül centrifugáltuk. A felülúszók abszorbanciáját 620 nm hullámhosszon Unicam SP 1800 spektrofotométerrel mértük, majd az EB koncentrációt standard hígítási sorral határoztuk meg. Azután 0,5 ml 5 N NaOH-t adtunk minden felülúszóhoz, és a SF koncentrációt Hitachi F 2000 fluoriméter (excitáció: 440 nm, emisszió: 525 nm) segítségével mértük. Az agyi erek áteresztőképességét a jelzőanyagok agyszövetben és szérumban mért koncentrációinak hányadosával fejeztük ki: $(\mu\text{g jelzőanyag} / \text{mg agyszövet}) * (\mu\text{g jelzőanyag} / \mu\text{l szérumszövet})^{-1}$.

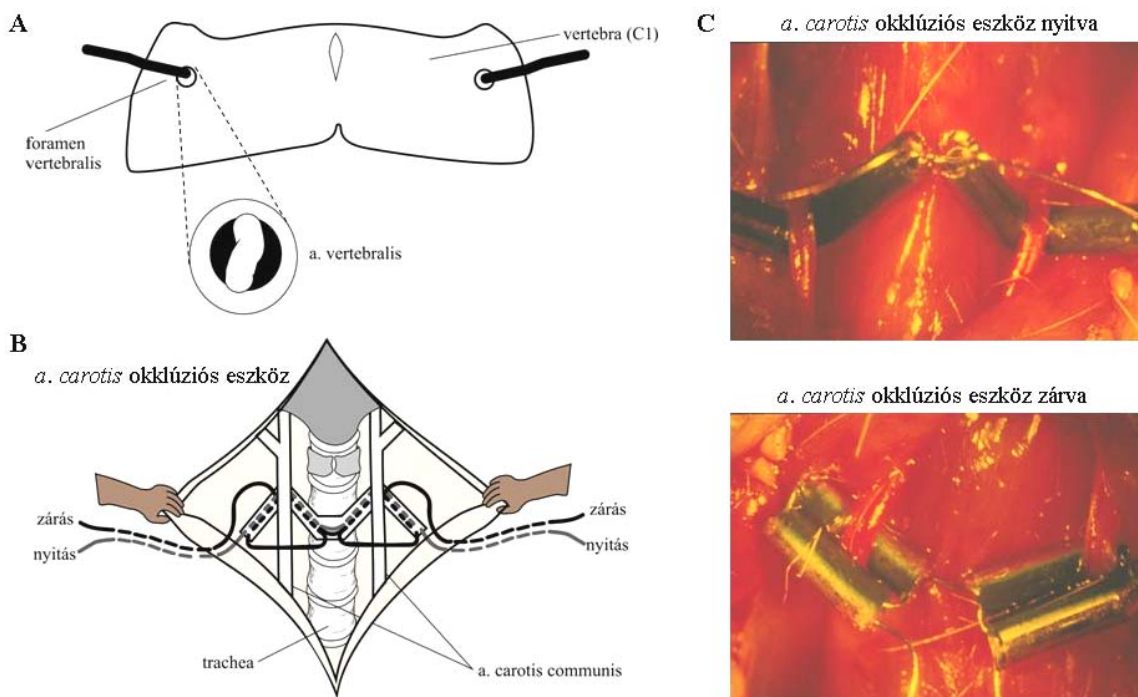
A morfológiai vizsgálat során feldolgozott újszülött sertések ugyanezt a kezelést kapták minden kísérleti csoportban. Az állatokat a fiziológiás sóoldattal történő perfúzió után Karnovsky-féle fixáló oldattal is perfundáltuk. Az egyes agyterületekről vett mintákat egy éjszakán át 20 %-os (m/V) szukróz-oldatban inkubáltuk. Kriosztáttal történő metszés után a mintákat Mowiol segítségével montíroztuk és a tárgylemezeket argon/kripton ion lézerrel működő Leica konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az SF 488 nm hullámhosszon történő excitációja zöld, míg az EB excitációja 564 nm hullámhosszon piros fluoreszcenciát adott.

3.5.3. DPPE hatása kontroll és 4 ér occlusión átesett hím patkányon [Németh és mtsai, 1998; Deli és mtsai, 2000c]

Az *N,N*-dietyl-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin HCl) (DPPE, más néven tezmilifén, molekulatömeg: 320) vér-agy gát permeabilitásra kifejtett *in vivo* hatását kontroll és agyi ischaemia-reperfusio hatásán átesett hím Wistar patkányokon (3 hó, 300-350 g) vizsgáltuk. A kísérletek az amerikai National Institute of Health állatkísérletes irányelvei szerint zajlottak és a kísérleti tervet a helyi Állatvédő Tudományetikai Bizottsága jóváhagyta.

Kontroll patkányokon meghatároztuk az agyi erek permeabilitását a DPPE 0, 1, 5, és 20 mg/kg dózisainak (vivőanyag: 0,5 ml fiziológiás sóoldat) lassú intravénás infúziója után 4 órával, valamint a a DPPE 5 mg/kg adagjának beadása után 2, 4, és 8 órával ($n=6$ minden csoportban). A kísérlet második részében agyi ischaemián átesett patkányoknak a reperfusio elején adtunk 5 mg/kg DPPE dózist lassú intravénás infúzióban, majd a vér-agy gát permeabilitását 2, 4, és 8 órával később meghatároztuk ($n=6$ minden csoportban). Kontrollként ischaemián át nem esett, 0,5 ml intravénás fiziológiás só oldatot kapó patkányok agyi permeabilitását mértük 2, 4, és 8 órával az infúzió után.

Az agyi ischaemia és reperfusio kivitelezésére a globális agyi ischaemia-reperfusio 4 ér occlusió modelljét [Pulsinelli és Brierley, 1979] használtuk, kisebb módosításokkal [Németh és mtsai, 1998]. Az állatok intraperitonealis pentobarbital (30 mg/kg) anesztéziát kaptak. Ezután hátsó középvonali metszésből feltártuk az első nyakcsigolyát (C1) és azonosítottuk mindkét oldalon a foramen alare-t (15.A ábra). Az *arteria vertebralis*-t tartalmazó neurovascularis ágat diathermiás készülékhez csatlakoztatott bipolaris csipesszel hőkoaguláltuk mindkét oldalon és a sebet zártuk. Ezután elülső középvonali metszésből izoláltuk mindkét oldalon az *arteria carotis communis*-t és az erek köré egy, Tomida és mtsai (1987) által leírt occlusió eszközt ültettünk be (15.B ábra). A következő napon a beültetett eszközzel az éber patkányok mindkét carotis artériáját 20 percig leszorítottuk (15.C ábra), majd az eszköz oldása utáni agyi reperfusio kezdete után 2, 4, vagy 8 órával határoztuk meg a vér-agy gát permeabilitását ($n=6$ minden csoportban).



15. ábra. A: Az arteria vertebralis feltárása a foramen vertebralisban hőkoaguláció előtt sematikus rajzon. B: Az arteria carotisra felhelyezett okklúziós eszköz sematikus rajzon. C: Altatott patkányon az arteria carotisra felhelyezett okklúziós eszköz nyitott és zárt állapotban [Németh és mtsai, 1998].

Az artériás vérnyomást, valamint a sav-bázis és vérgáz paramétereket az intravénás injekció előtt és az után 30 és 60 perccel határoztuk meg az állatok 4 alcsoportjában (vivőanyaggal vagy 5 mg/kg DPPE-vel kezelt kontroll és post-ischaemiás patkányok). Az artériás katétert a patkányok bal oldali *arteria femoralis* érbe ültettük be, és az artériás középnyomást Statham P230 nyomásátalakító fej segítségével mértük (Statham Instruments Inc., Los Angeles, CA, Amerikai Egyesült Államok). Az artériás vérkémiai adatokat (pH, parciális CO₂ nyomás, parciális O₂ nyomás) a standard Astrup módszer szerint ABL-330 eszközzel (Radiometer, Koppenhága, Dánia) mértük. A 60 perces artériás vérmintákból haematokrit meghatározás is történt.

A vazogén agyödéma mértékét az SF és az EBA extravasációjával határoztuk meg az újszülött sertésben már leírt módszerhez hasonlóan (Ábrahám és mtsai, 1996). A jelzőanyagok beadása után 30 perccel szérum mintát vettünk, majd a patkányokat 200 ml/kg fiziológiás sóoldattal perfundáltuk és agykéreg, hippocampus, striatum és kisagy szövetmintákat gyűjtöttünk. A jelzőanyagok koncentrációjának meghatározása teljesen megegyezett a fent említettel.

3.5.4. Vér-agy gát permeabilitás hatása előagyi ischaemián átesett magas vérnyomásos patkányon [Ábrahám és mtsai, 2002]

A kísérletek az amerikai National Institute of Health (Bethesda, MD, Amerikai Egyesült Államok) állatkísérletes irányelvei (Guidelines for the care and use of laboratory animals) szerint zajlottak és a Nagaszaki Egyetem (Japán) helyi etikai bizottsága jóváhagyta a beavatkozásokat.

A vizsgálathoz 16 hetes, magas konyhasó- (0,8 % NaCl) és alacsony fehérje- (20,8 %) tartalmú, stroke-ra hajlamosító étrenden (Funabashi Farm, Chiba, Japán) tenyésztett, stroke-ra hajlamos spontán magas vérnyomású SHRSP/Izm patkánytörzsből származó állatokat, valamint hasonló korú normotenzív Wistar-Kyoto patkányokat (WKY/Izm) használtunk. A szisztolés vérnyomást és a szívfrekvenciát komputerizált szfigmomanométer (TK-370A) segítségével mértük az állatok farokartériáján azután, hogy a patkányokat 10 percen keresztül 36°C hőmérsékletre melegítettük. Halotán (Fluothane; Takeda Chemical Industries, Osaka, Japán) anesztézia után az *arteria carotis communis* vérátfolyását mindkét oldalon aneurizma-csipeszek segítségével 10 percen keresztül lezártuk. A vér-agy gát permeabilitását SHRSP/Izm patkányokon 30 perccel; 6 órával; továbbá 1, 5, 7, és 28 nappal az előagyi ischaemia után, míg a normotenzív WKY/Izm állatokon 7 nappal az ischaemia után határoztuk meg ($n=5$ minden csoportban). Mindkét patkánytörzs esetén álműtött állatokat használtunk kontrollként.

Az SF és EBA jelzőanyagok vér-agy gát permeabilitását a patkányokon már leírt módon mértük [Deli et al., 2000c]. A kísérleti állatokból szérum- és agyszövet-mintákat (agykéreg frontális és parietális lebenyei, hippocampus, thalamus, nucleus caudatus/putamen, és kisagy) vettünk. A jelzőanyag koncentrációjának mérésére a SF esetén Shimadzu RF-5000 spektrofluorométert (Kyoto, Japan; excitáció: 440 nm, emission: 525 nm), míg az EBA abszorpció (620 nm) mérésére Labsystems Multiscan Biochromatic mérőeszközt (Helsinki, Finnország) használtunk.

3.5.5. A szaglőrendszer permeabilitása patkányokban [Wolburg és mtsai, 2008]

A kísérletekhez 3 hónapos, 315 ± 24 g tömegű, hím Wistar patkányokat használtunk, amelyeket az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont állatházában standard körülmények között tartottak. Az állatkísérletek során mindvégig betartottuk az érvényes hazai jogszabály (243/1998. korm. rendelet) által meghatározott etikai alapelveket, az Európai Unió *Council directive for the care and use of laboratory animals* testületének irányelveit. A vizsgálatokat az állategészségügyi hatóság jóváhagyta, az engedélyek száma XVI./03835/001/2006.

A patkányok intraperitonealis Avertin (1,25 %, 0,3 ml/kg) anesztéziát kaptak. A szaglőrendszer ereinek permeabilitását SF (376 Da) és EBA (67 kDa) jelzőanyagok segítségével vizsgáltuk makroszkóposan. A patkányok avertin-anesztéziában mindkét festékből 5 mg/kg 2%-os oldatot kaptak a farokvénába, majd 30 perc múlva az állatokat 50 ml PBS oldattal perfundáltuk 5 percen keresztül. Ezután a patkányfej nyílirányú metszeteiről fényképeket készítettünk.

A szaglőrendszer elektronmikroszkópos permeabilitás-vizsgálatai során a jelzőanyag a lantánitrát volt, ami a perfúziós folyadék 1% koncentrációban tartalmazott. A anesztetizált

patkányokat 0,1 M kakodilát puffert (pH 7,4) tartalmazó 2,5% glutáraldehiddel (Paesel-Lorei, Frankfurt, Németország) transzkardiálisan perfundáltuk, majd az eltávolított szaglógumót további 4 órán át utófixáltuk, ezt követően kakodilátban tároltuk. Az agykérget, szaglógumót, ornyálkahártyát 1% OsO₄-ot tartalmazó 0,1 M kakodilát pufferben utófixáltuk, azután etanol sorozattal víztelenítettük. A minták beágyazását, metszését és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatát Prof. Hartwig Wolburg és munkacsoportja végezte Tübingenben.

3.5.6. Nazális gyógyszerformulák vizsgálata patkányokon [Horvát és mtsai, 2009a]

A kísérletekhez 3 hónapos, 316 ± 48 g tömegű, hím Wistar patkányokat használtunk, az elemszám minden csoportban $n=4$ volt. A patkányokat intraperitoneálisan Avertin oldattal (1,25 %, 10 ml/kg) altattuk, és a hanyatt fekvő állatok jobb orrüregébe 40 μ l mintát injektáltunk. A mikropipettát 5 mm mélyen helyeztük az orrüregbe, hogy a lehető leghosszabb tartózkodási időt biztosítsuk a hordozónak. Intravénás kezelés esetén 500 μ l oldatot fecskendeztünk az altatott állatok farokvénájába. A kísérlet során öt különbözőképpen kezelt csoportot vizsgáltunk, öt időpontban (30, 60, 120, 240 és 480 perc).

Az abszorpciófokozó Cremophor RH40-et fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. A mukoadhezív nátrium-hialuronsavat kis mennyiségekben adtuk az oldathoz, majd a mintákat 24 óra múlva újra homogenizáltuk, azért hogy a polimer teljesen feloldódjon. A vivőanyagok összetétele az egyes csoportokban az alábbi volt (minden érték m/V): (i) fiziológiás sóoldat (PhS) 100 %, (ii) abszorpció fokozó oldat (AE) 10 % Cremophor RH40 és 90 % fiziológiás sóoldat, (iii) hialuronsav oldat (HA) 1,5 % nátrium-hialuronát és 98,5 t% fiziológiás sóoldat, (iv) mukoadhezív oldat (MA) 1,5 % nátrium-hialuronát, 10 % Cremophor RH40 és 88,5 % fiziológiás sóoldat.

A fluoreszcein izotiocianáttal jelölt 4 kDa dextrán (FD-4) tesztmolekulát az elkészített vivőanyagokban oldottuk fel, a jelzőanyag koncentrációja intranazális beadás esetén 1 mg/ml, míg intravénás beadásnál 8 mg/ml volt. A kezeléseket után, mély altatásban, heparinizált csövekbe az összes patkánytól vért vettünk, majd az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk. Ezt követően az agyukat eltávolítottuk és 10 agyrégiót különítettünk el. Ezek a jobb és bal oldali szaglógumó, a jobb és bal oldali frontális és parietális agykéreg, valamint a hippocampus, a középagy, a híd és a kisagy voltak. Az agyminták tömegét megmértük. A vérmintákat centrifugáltuk (10 perc, 3000 g) és a további vizsgálatokig a plazma és agymintákat lefagyasztottuk.

Az agymintákat 7,5 % (m/V) triklórecetsav oldattal Potter–Elvehjem szövetdarálóban homogenizáltuk, majd a mintákat centrifugáltuk. A felülúszók FD-4 tartalmát PTI (Photon Technology International Inc., South Brunswick, NJ, USA) spektrofluorométerrel határoztuk meg (excitáció: 492,5 nm; emisszió: 514,5 nm). A mérés érzékenysége a mintákban 1 ng/ml FD-4 volt. A mérés linearitása $r^2 \geq 0,9986$, a relatív standard deviáció pedig $RSD \leq 9,2$ % volt.

3.5.7. A β 1-42 peptid intranazális agyi bejuttatása patkányon [Sipos és mtsai, 2010]

A vizsgálatok során 7-amino-4-metil-3-kumarinilacetáttal (AMCA) jelölt A β 1-42 peptidet használtunk (Zarándi és mtsai, 2007). A farmakokinetikai kísérletek során, az egyszeri nazális kezelés (10 μ g/40 μ l AMCA-A β 1-42; $n = 4$ /csoport) után 30, 60, 120, 240, és 480 perccel agyszövetmintát vettünk. Az AMCA-A β 1-42 koncentrációjának meghatározása céljából a különböző időpontokban a mély anesztéziában lévő állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 50 ml fiziológiás sóoldattal, majd az agyukat eltávolítottuk és az alábbi agyterületekből vettünk mintát: jobb és bal oldali szaglógumó, jobb és bal oldali frontális és parietális agykéreg, hippocampus, középagy, kisagy, és híd. A mintákat Potter–Elvehjem szövetdarálóban 2 ml PBS-ben homogenizáltuk, majd 2 percig ultrahangos feltárást végeztünk jéghideg vízfürdőben. Ezután 6 ml folyadék kromatográfiára használt metanolt (LiChrosolv, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) adtunk a mintákhoz keverés közben. Az 50000 g-vel 10 percen át 4° C-on végzett centrifugálás után a felülúszók AMCA-A β 1-42 tartalmát PTI spektrofluorométerrel (Photon Technology International Inc., South Brunswick, NJ, USA) határoztuk meg (excitáció: 345 nm; emisszió: 445 nm). A mintákban a mérés érzékenysége 1 ng/ml AMCA-A β 1-42 volt. A mérés linearitása $r^2 \geq 0,985$, a relatív standard deviáció pedig $RSD \leq 9,08$ % volt a vizsgálat során alkalmazott koncentráció tartományában.

3.5.8. In vivo gyógyszer-permeabilitási vizsgálatok egéren [Nakagawa és mtsai, 2009]

A vegyületek agyszövetben történő eloszlását intravitálisan a szövet-eloszlási modell segítségével mértük egéren (Garberg és mtsai, 2005). A vizsgált vegyületek egy adagját az anesztetizált egér farokvénáján keresztül adtuk be ($n=3$), majd 5 perc múlva vérmintát vettünk a vena cavából és az állat teljes agyát eltávolítottuk. Az agyi és plazma mintákban a vegyületek koncentrációját kapcsolt tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) módszerrel mértük. Minden gyógyszer-molekula agyi és plazma koncentrációjának arányát (K_p) meghatároztuk.

3.6. Permeabilitási együtthatók számolása

Az endothelsejréteg permeabilitási együtthatója (P_e), egy felszíntől és koncentrációktól független mutató [Deli és mtsai, 2005], amelyet Fick törvénye alapján a vese clearance, azaz tisztulási hányados analógiájára határozzuk meg. A mért koncentrációk és az ismert adatok (térfogatok, lumenális koncentrációk) birtokában, először a clearance értékeket számoltuk ki (1. képlet), ami azt a felső térfogatot adja meg μl mértékegységben, amelyből a jelzőanyag az adott időegység alatt teljesen kiürül (C_A , abluminális koncentráció; V_A , abluminális térfogat; C_L , lumenális koncentráció).

$$\text{Clearance}(\mu l) = \frac{C_A \times V_A}{C_L} \quad \text{Eq.1.}$$

Ezután a kumulált tisztulási adatokat az idő függvényében ábrázoltuk, és megállapítottuk az egyenesek meredekségét, amely egyenlő az adott felszínre vonatkozó clearance sebességével (mértékegysége $\mu l/\text{min}$). Ezt az értéket felszínre számított permeabilitás (permeability surface area product) néven is említik, ezért a 2. képletben PS-nek jelöljük. Az endothelsejtekre jutó clearance sebességet (PS_e) úgy kapjuk meg, ha a teljes PS értékből (PS_t , teljes PS (filtermembrán + endothelsejtréteg) kivonjuk a filtermembránra vonatkozó PS értéket (PS_f , filtermembránra vonatkozó PS).

$$\frac{1}{PS_e} = \frac{1}{PS_t} - \frac{1}{PS_f} \quad \text{Eq.2.}$$

Az endothelsejtekre jutó permeabilitási együtthatót (P_e ; mértékegysége 10^{-3} cm/min , 10^{-6} cm/s) úgy kapjuk, hogy az endothelrétegre számolt PS értéket elosztjuk a filtermembrán felszínével (1 cm^2). Minél kisebb a P_e érték a paracelluláris jelzőanyagokra, annál szorosabbak sejtközi kapcsolatok, annál jobb az endothelsejtrétegek barrier funkciója [Deli és mtsai, 2005].

A farmakonok agyi felvételére mért állatkísérletes adatokból [Nakagawa és mtsai, 2009] *in vivo* permeabilitási együtthatót (P_{app} , mértékegysége cm/s) számoltunk, a beadás utáni 5 perces vérplazma és agyszövet koncentráció hányadosokból (3. képlet; t , idő; A , agyi kapillárisok felszíne) [Ohno és mtsai, 1978, Garberg és mtsai, 2005].

$$P_{app} \approx \frac{C_{agy}}{C_{plazma} \cdot t \cdot A} \quad \text{Eq.3.}$$

Számításaink során az egerek agyi kapillárisainak felszínét 240 cm^2 -nek, míg a vizsgált gyógyszer metabolizmusát, a vérbe történő visszaáramlását és a szöveti felhalmozódását elhanyagolhatónak tekintettük ebben az időpontban (Garberg és mtsai, 2005).

3.7. Statisztikai kiértékelés

Az adatokat átlag $\pm$ S.D. vagy S.E.M. értéként adtuk meg. A különböző adatsorokon varianciaanalízist követően Dunnett, Bonferroni, vagy Newman-Keuls post hoc tesztekkel végeztünk Graphpad Prism 5.0 program (GraphPad Software Inc., USA) segítségével. A $P < 0.05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A párhuzamos minták száma 3-12 volt kísérletenként. Minden kísérletet külön izolált primer tenyészetből legalább háromszor megismételtünk.

4. A VÉR-AGY GÁT MODELLEZÉSE SEJT TENYÉSZETEKSEL

A vér-agy gát tanulmányozására az endothelsejtek tenyésztési modelljeit az 1980-as évektől alkalmazzák, és azok jelentősen hozzájárultak az agyi endothelsejtek receptorainak, szállítófehérjéinek, enzimeinek és jelátviteli útjainak, valamint a vér-agy gát sejtjei közötti kölcsönhatás megismeréséhez [Deli és Joó, 1996; Deli és mtsai, 2005; Deli 2007; Veszélka és mtsai, 2011]. A Szegedi Biológiai Kutatóközpont Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumában 1971-ben Prof. Joó Ferenc indította el a vér-agy gát élettanával, kórtanával és farmakológiájával foglalkozó nemzetközi szintű kutatásokat. Az elmúlt 20 évben a munkacsoportban folytatott kutatásaimból összegyűlt tapasztalat felhasználásával sikerült az agyi endothelsejt-tenyésztés módszerén javítani, és az eddigieknél komplexebb, az *in vivo* vér-agy gát tulajdonságokhoz jobban közelítő, agyi endothel-, glia-, és pericyta sejtek primer tenyésztéseiből több sejtípusból álló *in vitro* modelleket készíteni és jellemezni.

I. Primer agyi endothelsejt-tenyészetek előállítása és jellemzése, a tenyésztési körülmények optimalizálása

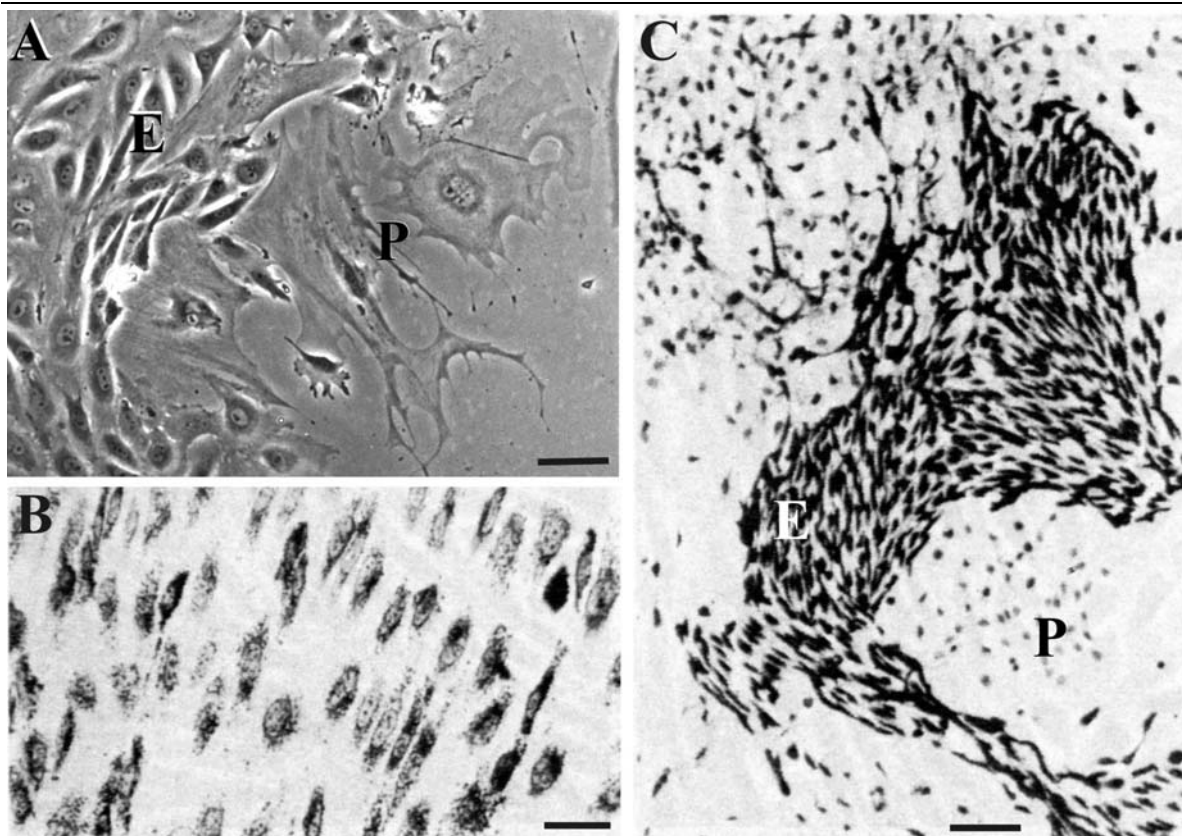
Joó Ferenc nem csak az agyi mikroerek izolálásában és alkalmazásában játszott úttörő szerepet [Joó és Karnushina, 1973], hanem finnországi tanulmányútja során Pertti Panulával sikerült alkalikus foszfátáz festéssel, fény- és elektronmikroszkópiával agyi endothelsejteket azonosítaniuk tenyésztési körülmények között patkány agy preparátumokban [Panula és mtsai, 1978]. A nyolcvanas években számos, egymástól nagyon különböző technikát fejlesztettek ki agyi endothelsejtek tenyésztésére. A módszerek alapvető lépései azonosak, mindegyik az agyszövet disszociálásával kezdődik, a mikroér frakció elválasztásával folytatódik, majd a sejtek tenyésztésével zárul. A disszociálás történhet mechanikusan [Dehouck és mtsai 1990], egyszeres vagy kétszeres enzimikus emésztéssel [Bowman és mtsai, 1981 és 1983], vagy a két technika ötvöztetésével [Tötsch és Bauer, 1989]. A mikroerek elválasztásához finomszövésű hálót, apró üveggyökökkel töltött oszlopot, albumin vagy perkoll grádienseket, vagy centrifugálási lépéseket lehet alkalmazni. A szegedi laboratóriumban általam bevezetett technika [Deli és mtsai, 1993] az enzimikus emésztést követő kétszeres gradiens centrifugálás módszerrel követi [Bowman és mtsai, 1981; Hughes és Lantos, 1986; Dux és mtsai, 1991].

Amíg az agyi mikroerek izolálása többféle módon is sikeresen megoldható, a belőlük kinövő endothelsejtek tenyésztése számos problémát vetett fel. A legnagyobb gondot a tenyészteteket szennyező egyéb sejtípusok, mint a fibroblasztok, simaizomsejtek, leptomeningeális sejtek, de főképpen a pericyták okozták [Abbott és mtsai, 1992; Szabó és mtsai, 1997]. Az agyi hajszálerekben az endothelsejtek osztoznak a bazális membránon a pericytákkal (7. ábra), így sem mechanikusan, sem enzimikus emésztéssel nem távolíthatók el teljesen.

Patkány és sertés agy mikroér endothelsejtek tenyésztési körülményeinek beállítása

Megállapítottuk, hogy a két-három hetes patkányok agyból izolált endothelsejt-tenyészetekben a pericyták jelentős számban megtalálhatóak, és az endothel-egysejtrétegek növekedését befolyásolják. A pericytákat fáziskontraszt mikroszkóppal is meg lehet különböztetni az agyi endothelsejtektől morfológiájuk alapján (16. ábra). Jellemző a nagyobb, sokszögletű sejttest, a több, elágazó nyúlvány, a sejt körvonala szabálytalan. A pericyták az endothelsejtekkel ellentétben nem alkotnak egybefüggő réteget, nincsenek szoros sejtközi kapcsolataik, azaz a sejtek nem kapcsolódnak egymással hosszabb szakaszokon, hanem folytonossági hiányok láthatóak közöttük. Amíg az endothelsejtekre jellemző a kontakt gátlás, vagyis ha az endothel-egysejtréteg benőtte a tenyésztő-felületet, a sejtek osztódása erősen lecsökken, a pericyták osztódása nem áll le, és a sejtek egymást átfedő módon több rétegben is nőnek.

Az agyi endothelsejtek egyik legjobb azonosítási módja a von Willebrand faktorra (vWF; a véralvadás VIII. faktorához kapcsolódó antigén) történő immunfestés, mivel a szervezetben az ér-endotheliumon és a csontvelői megakaryocytákon kívül más sejtek nem expresszálják. Agyi mikroerekből származó elsődleges tenyészetek a vWF pozitív sejtek mellett nagy számú, nem festődő sejtet, zömmel pericytákat tartalmaznak (16. ábra). Ezek a sejtek hosszabb tenyésztés során az endothel-sejtek rétegére ránőnek, passzálások után pedig akár túl is nőhetik az endothelsejteket.

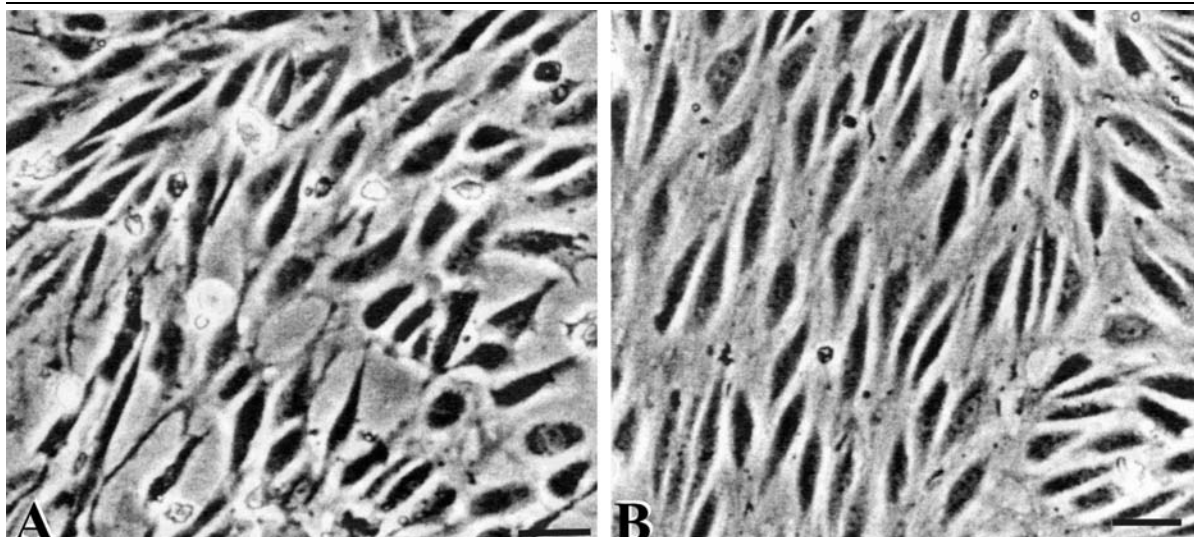


16. ábra. A: agyi endothelsejt-tenyészet részlete fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva; E endothelsejtek; P, pericyták. B: agyi endothelsejtek pozitív festődést mutatnak von Willebrand faktorra fénymikroszkópos felvételen. C: Egyhetes tenyészetben az immunfestődést mutató agyi endothelsejt sziget mellett sok, csak hematoxinil-eozinnal festődő sejtet, nagy valószínűséggel pericytákat lehet látni [Szabó és mtsai, 1997]. Mércse: A és B: 25 μm , C: 150 μm .

Az endothelsejtek és a tenyészetekben található egyéb sejtek növekedését és differenciálódását meghatározzák a különböző mitogének. A fibroblaszt növekedési faktorok, különösképpen az FGF-2 szükséges az endothelsejtek *in vitro* növekedéséhez és fenotípusának megtartásához [Murakami és mtsai, 2008], míg a PDGF a pericyták proliferációját serkenti [Distler és mtsai, 2003]. A tenyésztéshez használt állati szérumok igen sokféle növekedési faktort tartalmaznak. A standard FBS FGF-2-t és PDGF-t is tartalmaz, míg a vérlemezkében szegény borjú vérplazmából nyert savó (PDS) PDGF tartalma csekély [Heldin és mtsai, 1999].

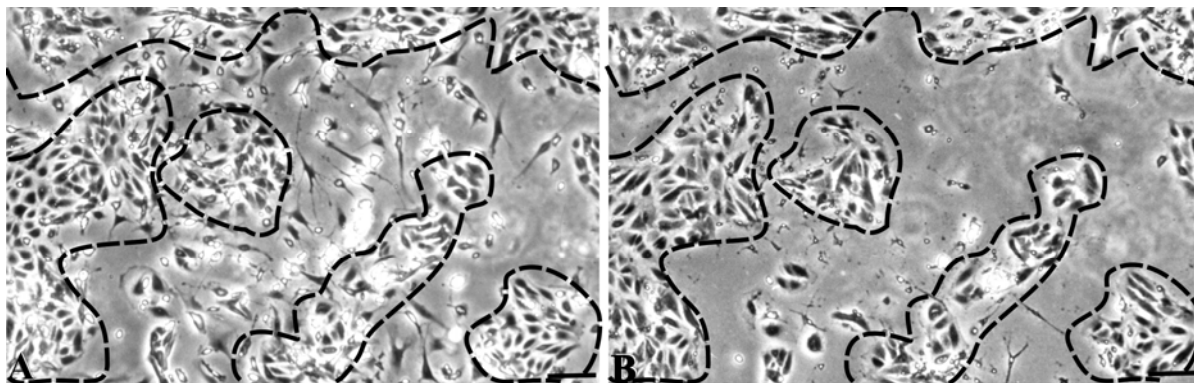
Összehasonlítottuk a kétféle szérumban növesztett agyi mikroerekből származó tenyészeteket, és kimutattuk, hogy az endothelsejtek tisztaságát növelni lehet PDS alkalmazásával (17. ábra). A sejtek egyenletesebb morfológiai képet, hosszúkás, orsószzerű alakot mutattak, szorosan, hézagmentesen simulnak egymáshoz, és a sejtsűrűség is nagyobb volt (PDS: 962 ± 65 sejt/ mm^2 , FBS: 807 ± 53 sejt/ mm^2 , $n=12$) [Szabó és mtsai, 1997].

Az endothelsejt-tenyészeteket szennyező egyéb sejtek eltávolítására számos technikát leírtak az szakirodalomban. Az izolált agyi mikroér fragmentumok kollagénnel bevont tenyésztőfelületre történő kirakása után egy órával a nem letapadó sejteket mosással lehet mechanikusan eltávolítani [Rupnick és mtsai, 1988], azonban így a gyengén letapadt endothelsejtek egy részét is elvesztettük. Mikroszkóp alatt steril pipettaheggyel a nem endothelsejtek egy részét le tudtuk kaparni a felszínről, de nagy számú, és nagy felszínű tenyészetben, ha sok a pericyta, vagy tenyésztőbetétben ez a módszer nem alkalmazható. D-valin adagolása a tápfolyadékhoz a tenyésztés első három napjában támogatja a D-valint metabolizálni képes endothelsejtek növekedését [Abbott és mtsai, 1992]. Egy másik módszer szerint *Griffonia simplicifolia* lektint adtak izolált egér agyi mikroér sejtekhez, és a pozitívan jelölődő agyi endothelsejteket fluoreszcencia aktivált sejtválogatással (FACS) dúsították a tenyésztéshez [Sahagun és mtsai, 1989].



17. ábra. Hatnapos agyi endothelsejt-tenyészetek részletei fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva. A: endothelsejtek 20 % borjúsavót tartalmazó tápfolyadékban növesztve. B: endothelsejtek 20 % vérplazmából készített borjúsavót tartalmazó tápfolyadékban növesztve. [Szabó és mtsai, 1997]. Mércé: 25 μm .

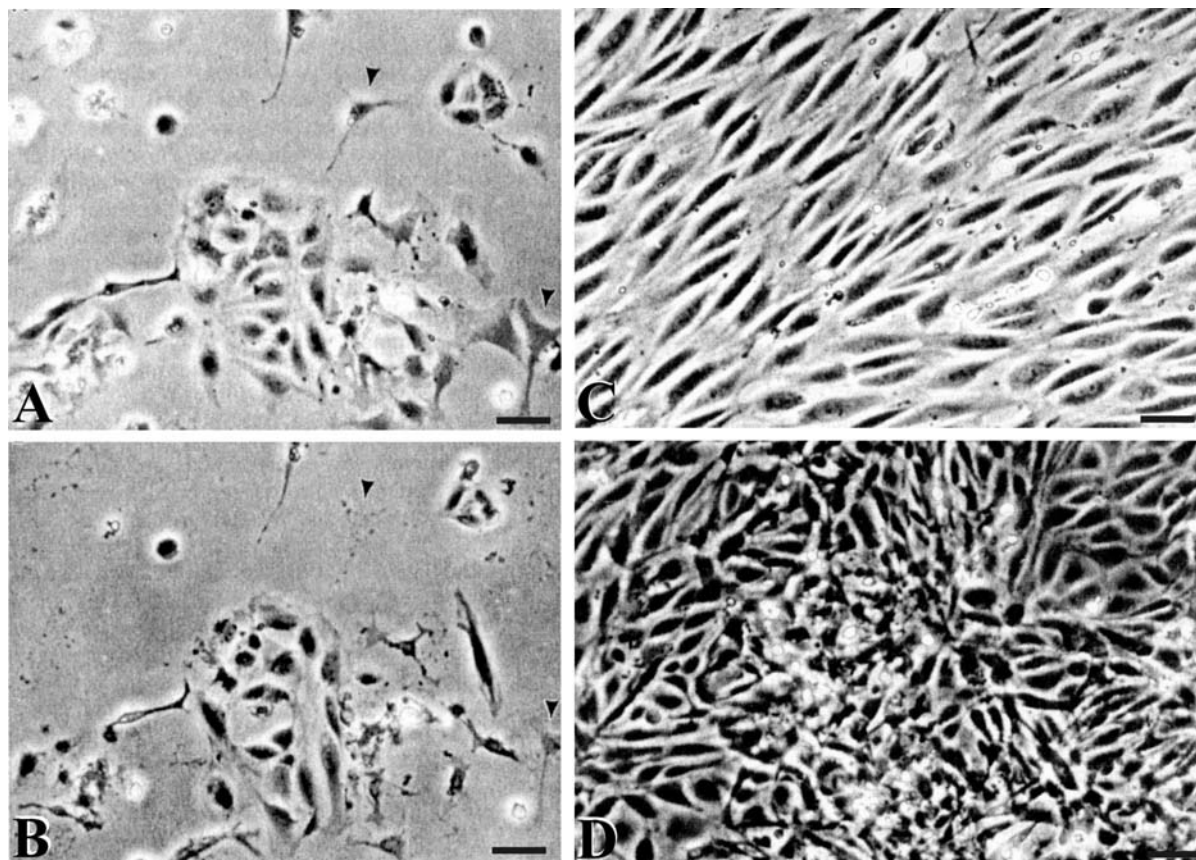
A T-lymphocyták, a mesangialis sejtek, az agyi mikroér pericyták és az astrocyták felszínén megtalálható a differenciációt jelző thymus antigén Thy 1.1, míg az endothelsejtekről hiányzik [Risau és mtsai, 1990]. Ezen alapulva a periciták eltávolítására agyi mikroér tenyészetekből komplement mediált sejtlyízist dolgoztak ki Thy 1.1 antigénre specifikus ellenanyag és nyúl komplement alkalmazásával [Risau és mtsai, 1990], amit mi is adaptáltunk (18. ábra) [Szabó és mtsai, 1997]. A módszerrel látványosan el lehetett távolítani a tenyészetet szennyező egyéb sejteket (18. és 19. ábra), és a kísérletekhez sokkal tisztább, 95 % fölötti arányban endothelsejteket tartalmazó kultúrákat kaptunk, ami a hosszabb tenyésztési időpontoknál még szembetűnőbb különbséget adott. Tizenkét-naposnál idősebb kultúrákban angiogenezist figyeltünk meg szakirodalmi adatokkal egybevágóan [Robinson és mtsai, 1990], amit pericyták jelenléte fokozott.



18. ábra. Anti-Thy 1.1 ellenanyag kötődést követő komplement-mediált sejtlyízis agyi endothelsejt-tenyészetekben fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva. A: sejtlyízis előtt. B: sejtlyízis után. Szaggatott vonallal jelöltük az endothelsejt szigetek körvonalát. [Szabó és mtsai, 1997]. Mércé: 150 μm .

A különböző technikák összevetésével az alábbi lépéseket találtuk kulcsfontosságúnak az agyi endothelsejt-tenyészetek optimalizálásában: (i) Az állatok kora 2-3 hét körül megfelelő, idősebb állatokból készített tenyészetekben megnő a pericyták száma. (ii) Az agyhártyák, a plexus chorioideusok és nagyobb erek gondos eltávolítása az agyszövetből növeli az endothel-tenyészetek tisztaságát. (iii) Az enzimes emésztések időtartamának 1,5 + 1 óra az ideális; a rövidebb emésztési időknél több a szennyező sejt, a hosszabb emésztésnél egyedi endothelsejteket nyerünk, amelyek nem tapadnak le és nem nőnek megfelelően. (iv) A komplement-mediált sejtlyízisre a legalkalmasabb időpont a sejtek izolálása után 2-3 nappal van, ha hamarabb kerül rá sor, a komplement az endothelsejteket is károsítja, míg későbbi időpontban a pericyták nem távolíthatóak el teljesen. (v) A

tápfolyadékban szérumként FBS helyett PDGF-mentes PDS, és kiegészítőként FGF-2 növekedési faktor használata segíti az endothelsejtek gyors növekedését [Szabó és mtsai, 1997].



19. ábra. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek agyi endothelsejt tenyészetekről. A: sejtlízis előtt. B: agyi közvetlenül sejtlízis után. C: a tenyészet 4 nappal a komplement-mediált sejtlízis után. D: Ugyanabból az izolálásból származó tenyészet kezelés nélkül azonos időpontban. Mércé: 40 μm . [Szabó és mtsai, 1997].

Az így nyert endothelsejt-tenyészetek a vWF immunpozitivitás mellett kötötték a D-galaktóz-specifikus *Griffonia simplicifolia* I-B₄ izolektint, és pozitív hisztokémiai jelölést adtak a vér-agy gátra jellemző alkalikus foszfatázra. Transzmissziós elektronmikroszkópiával a sejtekben sok mitochondriumot, kiterjedt endoplazmatikus hálózatot, a sejtek között réskapcsolatokat (gap junction) figyeltünk meg. Porózus membránú tenyésztőbetétekre (Falcon, BD Biosciences USA; 25 mm átmérő) passzálva az endothelsejtek 120 $\Omega \times \text{cm}^2$ rezisztencia értéket adtak [Deli és mtsai, 1997a].

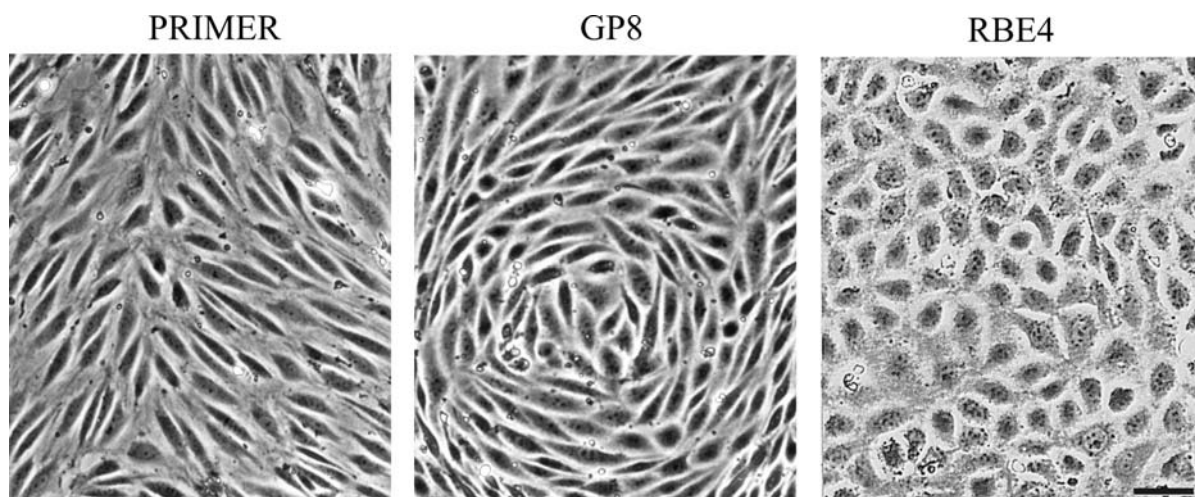
A patkány agyi endothelsejt tenyésztésére kidolgozott módszerrel sertés agyi endothelsejt-tenyészeteket is előállítottunk [Deli és mtsai, 1997b]. Ezek a sejtek is pozitív vWF immunfestődést, és GS-IB₄ izolektin kötést mutattak. A sertés agyi endothel-egysejtrétegek rezisztenciája átlagosan 136 $\Omega \times \text{cm}^2$ volt. Ezekben a tenyészetekben is megfigyelhető volt a pericyták jelenléte, és 10 naposnál hosszabb tenyésztési idő esetén az érképződés [Deli és mtsai, 1997b].

Patkány primer agyi endothelsejtek és immortalizált sejtvonalak összehasonlítása: vazoaktív molekulák termelése

A primer tenyészetek költsége, idő- és munkaigénye nagy, ezért az 1990-es években több patkány agyi endothel-sejtvonalat is előállítottak. A két legjobban jellemzett és vér-agy gát kutatásban legtöbbet használt sejtvonal az adenovírus E1A génnel immortalizált RBE4 [Roux és mtsai, 1994], és az SV40T antigénnel transzfektált GP8 sejtvonal [Greenwood és mtsai, 1996]. Ezek

a sejtek megtartották az endothelre jellemző fenotípust, és a vér-agy gát sajátosságok közül is számosat [Roux és Couraud, 2005].

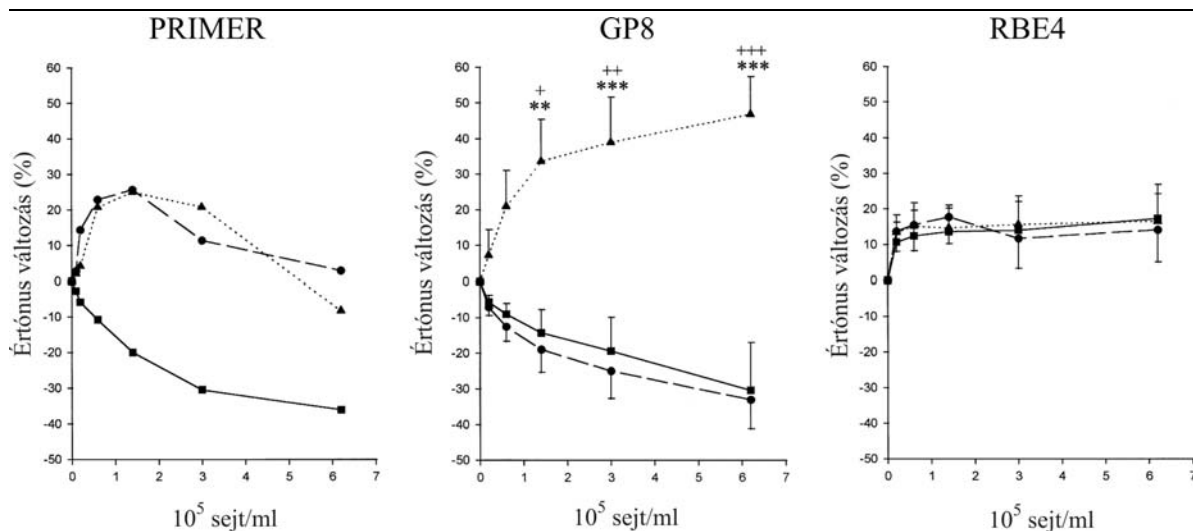
Tenyészetben a GP8 sejtek a primer kultúrákhoz hasonló nyúlt, orsószerű sejtalakot, és örvényes növekedési mintázatot mutattak. Az RBE4 sejtek alakja utcakőhöz hasonló, sokszögű, ami inkább makroerekre, vagy epithelsejtekre jellemző (20. ábra). Az RBE4 sejtvonal egysejtrétegeiről nincs publikált rezisztencia adat, de a magas szukróz permeabilitási adatok ($11\text{--}204 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) is tükrözik, hogy a rétegek passzív áteresztőképessége nagy [Deli és mtsai, 2005]. GP8 sejteken C6 glióma sejtekkel ko-kultúrában alacsony, $22\text{--}26 \Omega \times \text{cm}^2$ elektromos ellenállást mértünk, és magas $182 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ P_e értéket kaptunk fluoreszceinre [Deli és mtsai, 2005]. Az adatok alapján ezek a sejtvonalak permeabilitási tesztekre nem alkalmasak, mivel a paracelluláris barrier nem eléggé zárt.



20. ábra. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek primer, GP8 és RBE4 agyi endothelsejt-tenyészetekről. Mércé: 40 μM . [Kis és mtsai, 1999].

Az agyi erek endothelsejtjei, a perifériás erekéihez hasonlóan, számos értónust befolyásoló molekulát, mint a gáz halmazállapotú NO, a lipid prosztaciklin és a prosztaglandinok, és peptideket, mint az adrenomedullin, az angiotenzinek, az endotelinek termelnek [Kis és mtsai, 2006]. Megvizsgáltuk, hogy a primer és az immortalizált agyi endothelsejtek között van-e különbség a vazóaktív anyagok termelésében. Modellként belső endothel rétegétől megfosztott kutya bal arteria coronaria ágait használtuk, amelyeket 25 μM prosztaglandin $F_{2\alpha}$ -val kezeltünk, hogy maximális és tartós izometriás kontrakciót hozunk létre. Az endothelsejtek teljes eltávolítását 1 μM acetilkolin, egy endothel-függő értágító adásával teszteltük: csak azokat az érgyűrűket használtuk, amelyek acetilkolin adására összehúzódással válaszoltak. Primer agyi endothelsejtek sejttség-függő módon csökkentették az értónust, $6,2 \times 10^5$ sejt/ml esetében maximális 36 %-os relaxációt mértünk. GP8 sejtek hasonló változást (30 %-os maximális relaxáció a legnagyobb sejttszámnál) hoztak létre, míg RBE4 sejtek esetében nem mértünk szignifikáns változást (21. ábra). Átlagban 15-18 %-os kontrakciót hoztak létre a sejtek sejttszámtól függetlenül.

Annak érdekében, hogy az NO szerepét feltárjuk a folyamatban, az NO szintézisének gátló-szerével, N ω -nitro-L-argininnel történő előkezelést (100 μM , 30 perc) alkalmaztunk, ami primer sejtek esetében megszüntette az értágulást, sőt kontrakcióba vitte át az érgyűrűt. Ezzel a megfigyeléssel egybevágóan primer agyi endothelsejtekben mind a három NOS enzim kimutattuk mRNS szinten (Taqman gén-array), amelyek között a NOS-3 dominált [Deli és mtsai, új, nem közölt eredmény]. A két sejtvonal esetében nem tapasztaltunk ilyen változást, ami arra utalhat, hogy a konstitutív endotheliális nitrogén-monoxid szintáz, a NOS-3 által termelt bazális NO szint igen alacsony az immortalizált sejtekben. Ezt a feltételezést támogatja az a megfigyelés, hogy RBE4 sejtekben csak az indukálható NOS-2 jelenlétét tudták kimutatni, de a többi NO szintáz nem [Durieu-Trautmann és mtsai, 1993]. A GP8 esetében az NO szintézis gátlásának hatástalanságát az is magyarázhatja, hogy a sejtek által létrehozott értágításban inkább az eikozanoidok vehettek részt.



21. ábra. Tenyésztett primer ($n=1-3$), GP8 ($n=7$), és RBE4 ($n=6$) agyi endothelsejtek hatása endotheliumtól megfosztott kutya arteria coronaria értónusára prosztaciklin $F_{2\alpha}$ -val kiváltott tartós kontrakciót követően. ■ kontroll sejtek; ● 30 percig $100 \mu\text{M}$ $N\omega$ -nitro-L-argininnel előkezelte sejtek; ▲ 30 percig $10 \mu\text{M}$ indometacinnal előkezelte sejtek. Szignifikáns különbség a kontroll és az indometacinnal előkezelte sejtek között: ** $P<0,01$, *** $P<0,001$; az $N\omega$ -nitro-L-argininnel és az indometacinnal előkezelte sejtek között: * $P<0,05$, ++ $P<0,01$, +++ $P<0,001$. [Kis és mtsai, 1999].

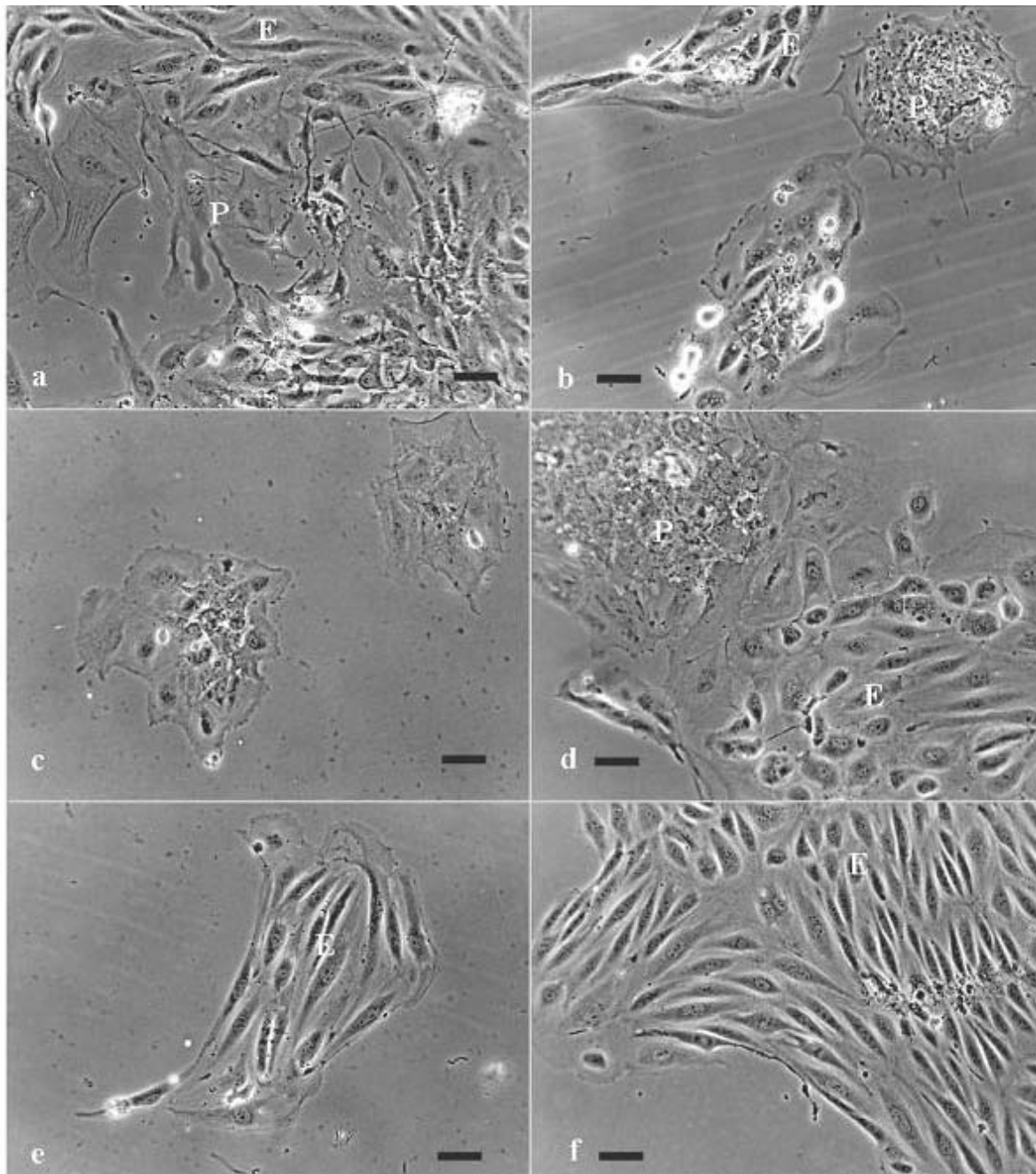
A primer sejtek ciklooxygenázt gátló indometacinnal ($10 \mu\text{M}$, 30 perc) történő előkezelése szintén gátolni tudtuk a vazorelaxációt. Ugyanezt a hatást mértük GP8 sejteken, míg az RBE4 sejteknél itt sem volt változás. Ez az eredmény primer és GP8 sejtekben magasabb ciklooxygenáz aktivitásra utalt, amit a sejtek eikozanoid termelésének meghatározásával igazolni tudtunk. Megvizsgáltuk az arachidonsav kaszkád ciklooxygenáz útvonalának termékeit, a vazodilatátor prosztaciklin E_2 és prosztaciklin (stabil metabolitjának a 6-keto-prosztaciklin $F_{1\alpha}$ meghatározásával), a vazokonstriktor prosztaciklin D_2 , prosztaciklin $F_{2\alpha}$, thromboxán A_2 (stabil metabolitjának a thromboxán B_2 meghatározásával), valamint a 12-L-hidroxi-5,8,10-heptadeka-2-triénsav termelődését a sejtenyészetek felülcszójából. Mind a primer, mind az immortalizált agyi endothelsejtek jelentős mértékű, de egymástól szignifikánsan eltérő össz mennyiségű eikozanoidot termeltek, a következő sorrendben: RBE4 < primer sejtek < GP8 sejtvonal.

A primer és GP8 sejtek legnagyobb mennyiségben vazodilatátor prosztaciklin E_2 -t termeltek (a teljes eikozanoid termelés 28 és 43 %-a), ami egybevág mind a szakirodalmi adatokkal [De Vries és mtsai, 1995], mind a biológiai kísérletünk eredményével. Ezzel szemben RBE4 sejtekben a prosztaciklin E_2 termelés alacsonyabb volt ($P < 0.05$) az össz mennyiségnek csak 9 %-át tette ki, és a felszabaduló két fő metabolit a vazokonstriktor prosztaciklin $F_{2\alpha}$ és a thromboxán A_2 (25 és 24%) volt. Amíg a primer és GP8 sejtekből háromszor több prosztaciklin E_2 mint prosztaciklin szabadult fel, az RBE4 sejtekben a prosztaciklin E_2 és prosztaciklin arányát csak kétszeresnek találtuk. A primer és GP8 sejtekben mért magasabb prosztaciklin E_2 : prosztaciklin arány a mikroerek endotheliumához hasonló [Renzi és Flynn, 1992]. A thromboxán A_2 és a 12-L-hidroxi-5,8,10-heptadeka-2-triénsav felszabadulás százalékos mennyisége mindhárom sejtenyészetben közel azonos volt. Az RBE4 sejtek alacsonyabb eikozanoid termelése és az értágító prosztaciklinok alacsony aránya, amit a sejtek immortalizálása és az ezzel összefüggő dedifferenciálódása magyarázhat, teljes összhangban van a coronaria méréseinkkel. Adataink alátámasztják, hogy a primer agyi endothelsejt tenyészetek sajátosságai közelebb állnak az *in vivo* endothelium tulajdonságaihoz, mint az immortalizált sejtvonalakéi.

Agyi endothelsejt-tenyészetek tisztaságának fokozása P-glikoprotein szubsztrátokkal történő kezeléssel, egy új módszer kidolgozása, és hatása a vér-agy gát sajátosságokra

Az agyi endothelsejt-tenyészetek tisztítására egy új módszert dolgoztunk ki, amelyre az ötletet az adta, hogy a vér-agy gát elsődleges efflux transzportere, a P-glikoprotein az agyi endothelsejtek

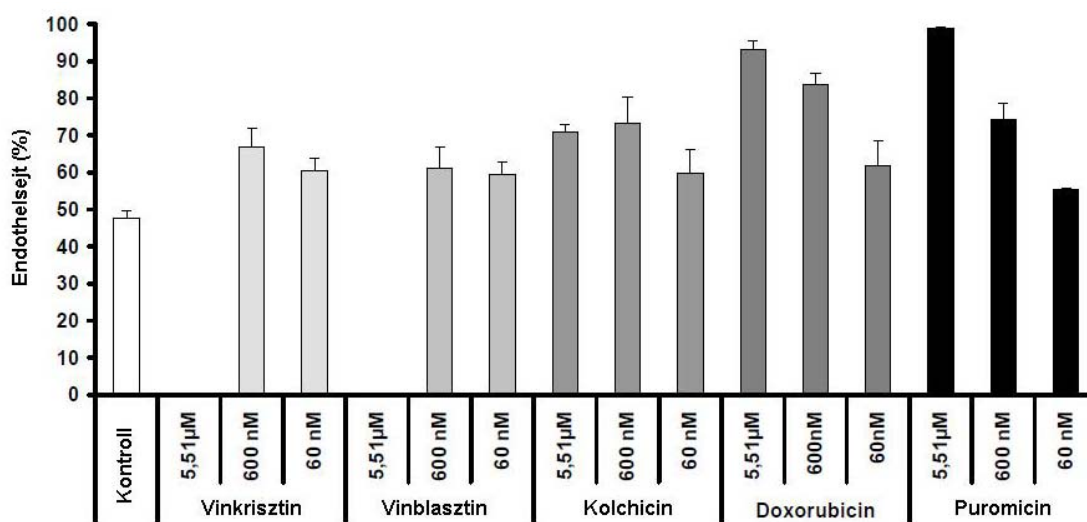
luminális membránjában *in situ* igen aktív [Beaulieu és mtsai, 1997], és a tenyésztett agyi endothelsejteket is megvédi az egyébként mérgező szubsztátjaitól, mint a vinkrisztintól [Chen és mtsai, 1998]. Elsőként teszteltünk szisztematikusan öt különböző P-glikoprotein szubsztátot, négy citosztatikumot, vinkrisztint, vinblasztint, kolhicint, doxorubicint és egy antibiotikumot, puromicint. Ezeknek a transzporter ligandoknak toxikus dózisaival kezeltük meg a tenyészeteket rögtön izolálás után.



22. ábra. Fáziskontraszt felvételek 6 napos agyi endothelsejt-tenyészetekről, amelyeket 3 napig P-glikoprotein szubsztátokkal kezeltünk. a: kezeletlen tenyészet. b: 5,51 µM kolhicin. c: 600 nM vinkrisztin. d: 600 nM vinblasztin. e: 5,51 µM doxorubicin. f: 5,51 µM (3 µg/ml) puromicin. E: endothelsejtek; P: pericyták. Mére: 50 µm. [Perrière és mtsai, 2005].

A kezeletlen tenyészetekben a pericyták gyorsan osztódtak, és a tenyésztőfelület nagy részét beölték (22. ábra) korábbi megfigyeléseinkkel összhangban. A tenyészetekben mindössze 47,6 % endothelsejtet számoltunk (23. ábra). A kolhicinnel, vinkrisztinnel, vagy vinblasztinnal kezelt tenyészetekben (22. ábra b-d) az endothelsejteken toxicitásra utaló morfológiai jeleket lehetett megfigyelni, mint apoptotikus, óriás, vagy többmagvú sejteket, ugyanakkor a pericyták nem pusztultak el teljesen.

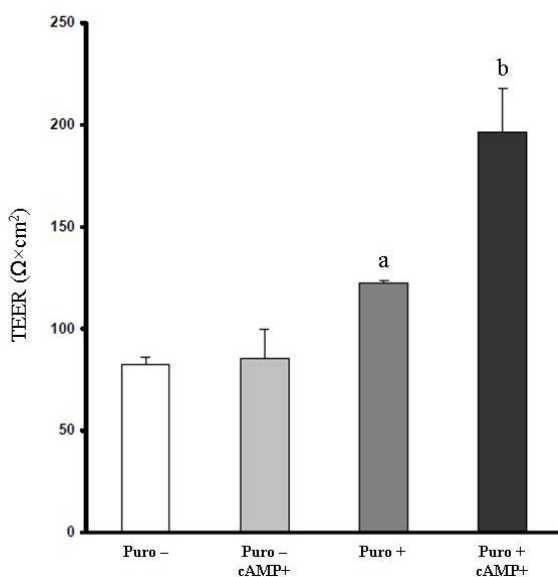
Az általunk tesztelt legnagyobb koncentrációjú kolchicin, vinkrisztin és vinblasztin esetében a túlélő sejtek 71, 67 és 61%-a volt endothelsejt. Az ennél kisebb koncentrációjú citosztatikumok toxicitása ugyan kisebb volt, de a kontamináló sejtek száma még több volt (23. ábra). A doxorubicin kezelés hatására eltűntek a szennyező sejtek, az endothelsejtek tisztasága nőtt (93 %), de a növekedésük lelassult (22. ábra e). A letesztelt hatóanyagok közül a puomicin bizonyult a leghatásosabbnak (22. ábra f), a pericytákat eltávolította, míg az endothelsejtek növekedését és fenotípusát nem befolyásolta. Háromnapos puomicin kezelés 3 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban (23. ábra), vagy 2 napos kezelés 4 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban tiszta tenyészetet eredményezett (99 %), a sejtek osztódásának és életképességének jelentős csökkentése nélkül. Alacsonyabb dózisban a puomicin nem bizonyult hatékonynak (23. ábra).



23. ábra. Agyi endothelsejtek aránya a tenyészetben számolt összes sejthez képest 6 napos tenyészetekben 3 napig tartó kezeléseket után. A sejszámolás 3 különböző tenyésztőedényben 4 random nem átfedő mezőn történt. Átlag $\pm$ SD. [Perrière és mtsai, 2005].

A számolást ellenőriztük vWF és Pgp immunfestéssel is kontroll és puomicinnal kezelt agyi endothelsejt-tenyészeteken [Perrière és mtsai, 2005]. A puomicinnal kezelt tenyészetekben az endothelsejtek pozitív jelölődést mutattak mindkét markerre: az endothelsejtek aránya 98,8 % volt a kezeletlen tenyészetekben számolt 56,8 %-kal szemben. Megvizsgáltuk a puomicin kezelés sejt-károsító hatását citotoxicitási teszttel is. Közvetlenül a puomicin kezelés után átmenetileg nőtt ugyan a tenyészetekből felszabadult membrán károsodásra utaló laktát-dehidrogenáz mennyisége (LDH; $42,7 \pm 4,8$ % (n=12) vs. $31,7 \pm 1,9$ % (n=11) a kezeletlen sejtekben), azonban két nappal a kezelés vége után az LDH szintje lecsökkent, és ez a kontroll tenyészetektől nem különbözött ($8,1 \pm 4,3$ % vs. $10,9 \pm 2,7$ % (n=9)).

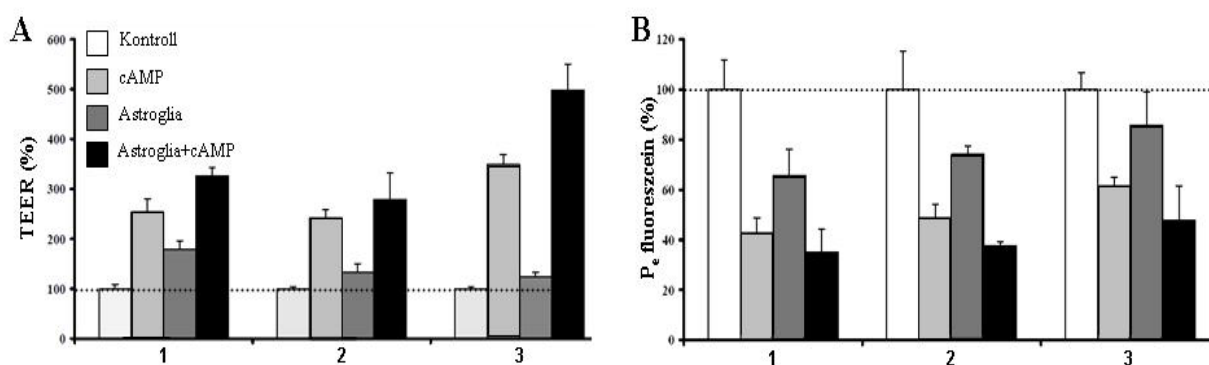
Az agyi endothelsejtek különleges tulajdonságait [Deli és Joó 1996] tenyészetben elvesztik, ezért sokféle módszerrel fejlesztettek ki a vér-agy gát tulajdonságok tenyészetben történő újbóli indukciójára [Deli és mtsai, 2005]. Mivel az endothelsejteket az agyban asztroglia végtalpak burkolják, különösen sokat vizsgálták az endothelsejtek és asztroglia sejtek közötti kapcsolatot a két sejt-típus együtt tenyésztésével [Deli és Kálmán, 2008]. Kimutattuk, hogy a puomicinnal kezelt agyi endothelsejt rétegek elektromos ellenállása magasabb (24. ábra), és az általunk korábban már leírt cAMP kezelésre [Deli és mtsai, 1995], valamint gliasejtek együttes tenyésztésének hatására nagyobb ellenállás növekedést mutattak (25. ábra). Négy napos tenyészeteket összehasonlítva az első két napon puomicinnal kezelt endothel-egysejtrétegek elektromos ellenállása szignifikánsan magasabb volt mint a kezeletlen tenyészeteké ($122,5 \pm 1,1 \Omega \times \text{cm}^2$ vs. $82,25 \pm 3,9 \Omega \times \text{cm}^2$, $p < 0,05$), amit 24 órás cAMP kezelés tovább növelt ($196,3 \pm 21,6 \Omega \times \text{cm}^2$), de csak a puomicinnal kezelt csoportban.



24. ábra. Agyi endothelsejt-rétegek elektromos ellenállása a tenyésztés 4. napján 2 napos puromicin kezelés után (Puro+), vagy anélkül (Puro-). A csoportok fele 24 órás cAMP kezelést (250 μ M CPT-cAMP és 17,5 μ M RO 201724) kapott (cAMP+). Átlag $\pm$ SD, három független kísérlet, kísérletenként 3-16 párhuzamos minta. a: szignifikáns különbség a kontroll és a puromicinnel kezelt sejtek között, $P < 0,05$. b: szignifikáns különbség a puromicin és cAMP kezelt sejtek és a többi csoport között, $P < 0,05$. [Perrière és mtsai, 2005].

Az endothelsejt-rétegek barrier funkcióját elektromos ellenállás mérésével, és fluoreszceinre, a paracelluláris permeabilitás egyik jelzőanyagára mért áteresztőképességgel határoztuk meg (25. ábra). A rezisztencia és fluoreszcein permeabilitási adatok abszolút értéke a különböző primer tenyészetek között jelentősen eltért: az astroglia sejtekkel együtt tenyésztett és cAMP kezelést kapott endothelsejt rétegek ellenállása 169 és 508 $\Omega \times \text{cm}^2$ között változott, míg a fluoreszceinre számolt permeabilitási együttható értékei 1,87 és $0,75 \times 10^{-6}$ cm/s közé estek. Ezek az alacsony P_e értékek jól tükrözik a modell szorosságát, és más vér-agy gát modellek barrier tulajdonságaival összehasonlítva nagyon jók [Deli és mtsai, 2005].

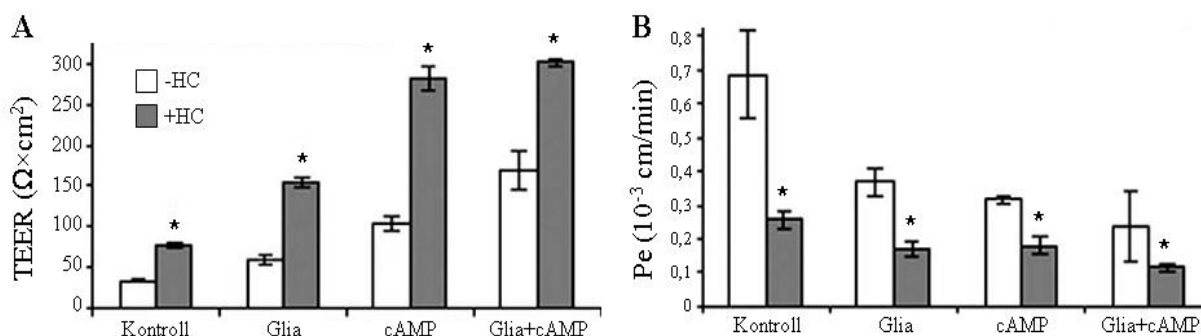
Patkány primer agyi endothelsejtek együtt tenyésztése gliasejtekkel, vagy a sejten belüli cAMP szint emelése szignifikánsan fokozta ($P < 0,05$) a sejtrétegek ellenállását (25.A ábra), és ezzel párhuzamosan csökkentette a paracelluláris áteresztőképességét (25.B ábra) a szakirodalmi adatokkal összhangban. A ko-kultúrák kezelése cAMP-vel tovább növelte a TEER értékeket (kontrollhoz képest 2,5-5 $\times$ emelkedés) és csökkentette a permeabilitást (kontrollhoz képest kevesebb mint felére).



25. ábra. Puromicinnel kezelt agyi endothelsejt-rétegek elektromos ellenállása (A) és permeabilitása fluoreszceinre (B) önállóan, illetve astroglia sejtekkel együtt tenyésztve. A csoportok fele 24 órás cAMP kezelést (250 μ M CPT-cAMP és 17,5 μ M RO 201724) kapott. Az adatokat a kontroll kezeltetlen csoport százalékában adtuk meg, átlag $\pm$ SD, három független kísérlet, kísérletenként 3 párhuzamos minta. Szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) találtunk a kontroll és az astrogliaval együtt tenyésztett, a kontroll és a cAMP kezelést kapott, valamint a cAMP kezelést kapott vagy nem kapott astrogliaval együtt tenyésztett csoportok között. [Perrière és mtsai, 2005].

Az agyi endothelsejtek tenyésztés során elveszthetik vér-agy gát sajátosságait [Rubin és mtsai, 1991], ezt nevezzük dedifferenciálódásnak. Ezzel összefüggésben a Pgp *mdr1a* gén szintjének csökkenését írták le tenyésztés során patkány agyi endothelsejtekben [Régina és mtsai, 1998]. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy passzáls után a patkány agyi endothelsejtekben a P-glikoproteint kódoló *mdr1b* gén szintje 4 napos puromicin kezelés (0,5 vagy 1 $\mu\text{g/ml}$) hatására megnőtt, míg az *mdr1a* szintje nem változott (Northern blot). Ezzel párhuzamosan háromszor passzált agyi endothelsejtekben puromicin kezelés (0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2 nap, 4 nap, 5 hét) időfüggő módon szignifikánsan megnövelte a sejtek vinkrisztin felvételét ciklosporin-A jelenlétében, ami a Pgp pumpa fokozott aktivitására utalt [Perrière és mtsai, 2005].

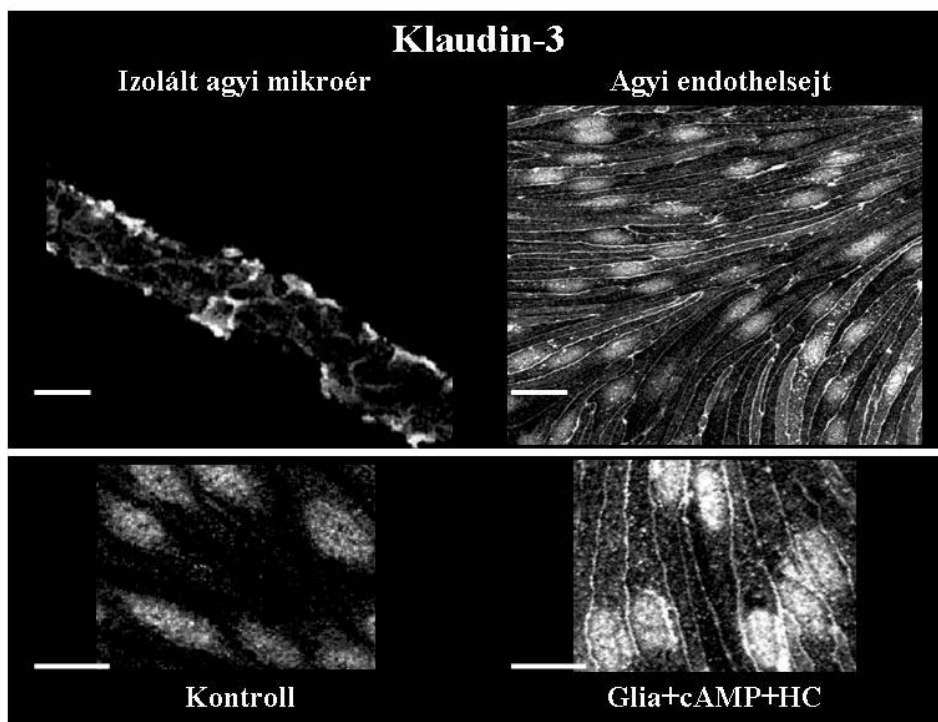
Mivel a primer tenyészetek barrier funkciója ko-kultúra és cAMP kezelés mellett is nagy variabilitást mutatott, további kezeléseket teszteltünk. Az endogén és szintetikus glükokortikoidok vér-agy gát tulajdonságokat fokozó hatását leírták sertés és humán agyi endothelsejteken, illetve sejtvonalakon, de egymástól igen eltérő koncentrációkat alkalmazva (550 nM – 10 μM) [Hoheisel és mtsai, 1998; Romero és mtsai, 2003; Cucullo és mtsai, 2004; Calabria és mtsai, 2006]. Elsőként mutattuk ki, hogy a hidrokortizon hormon, a gliasejtek hatása, és a cAMP kezelés egymástól függetlenül képes az agyi endothelsejt rétegek szorosságát fokozni, és a legjobb hatást a három kezelés együttes alkalmazásával lehet elérni (26. ábra) [Perrière és mtsai, 2007].



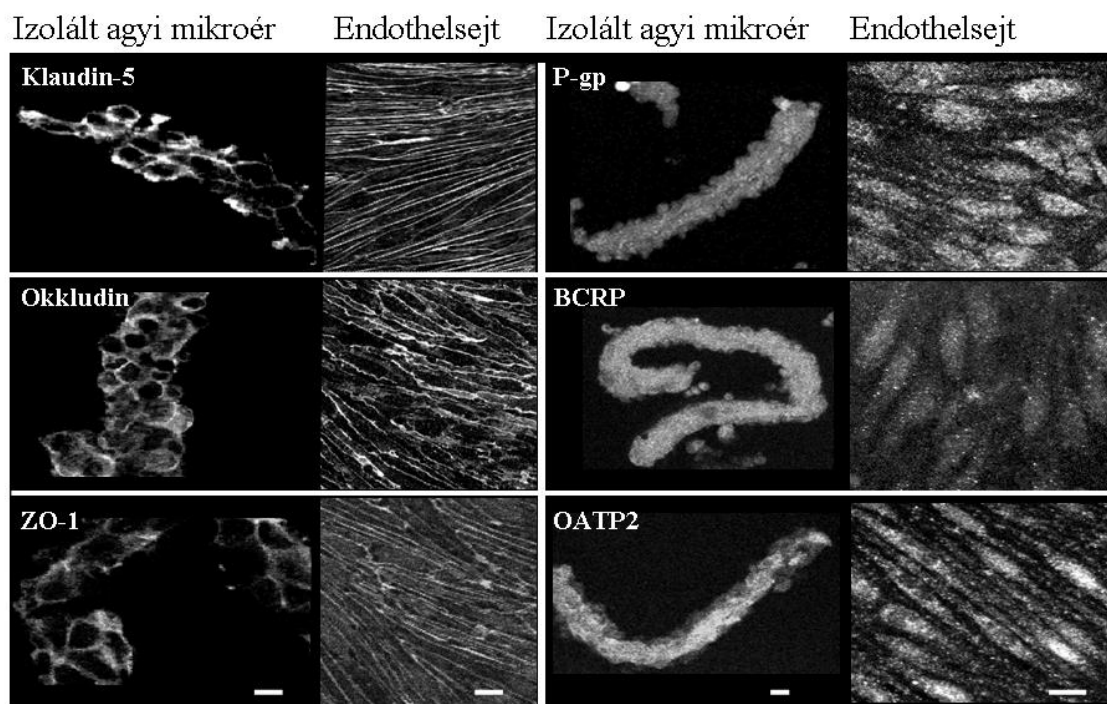
26. ábra. Puromicinnel tisztított agyi endothelsejt-rétegek elektromos ellenállása (A) és permeabilitása szukrózra (B). Csoportok: kontroll, egysejtréteg kezelés nélkül; glia: astroglia sejtekkel együtt tenyésztve; cAMP: 250 μM CPT-cAMP és 17,5 μM RO 201724 24 órán át; -HC: hidrokortizon nélkül; +HC: 1,4 μM hidrokortizon kezelés 10 napig. Átlag $\pm$ SD, * $P < 0,05$ [Perrière és mtsai, 2007].

Ezek a kezelések önmagukban is fokozták a sejtrétegek ellenállását, és csökkentették a paracelluláris permeabilitást. Az optimális tenyésztési körülménynek a puromicinnel tisztított agyi endothelsejtek gliasejtekkel történő együtt tenyésztését találtuk hidrokortizon adása mellett, az utolsó 24 órában a cAMP emelését az általunk korábban leírt sejten belüli cAMP-szintet növelő kezeléssel (250 μM CPT-cAMP és 17,5 μM RO 201724). Az így tenyésztett sejtrétegek ellenállása átlagban elérte a $270 \pm 119 \Omega \times \text{cm}^2$ -t ($n=28$, $p < 0.0001$), a szukrózzal mért P_e $1,43 \pm 0,80 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ($n=26$; $p < 0.0001$) volt (26. ábra), összhangban korábbi eredményeinkkel [Perrière és mtsai, 2005]. Fontos megjegyezni, hogy a hidrokortizon kiegészítés a tápfolyadékban sokkal egyenletesebb sejtrétegeket, és főként jobban reprodukálható rezisztencia és permeabilitási adatokat eredményezett, amit a korábbi vizsgálatunkhoz képest alacsonyabb S.D. értékek is mutatnak.

Az endothelsejt-rétegek gát működésének mérésével párhuzamosan morfológiai vizsgálatokat végeztünk. Az agyi endothelsejtek közötti kapcsolatokban erős jelölődést láttunk a kladin-5, kladin-3 és okkludin integrális membránfehérjék, és ZO-1 citoplazmatikus TJ fehérje immunfestése után mind az optimális körülmények között növesztett, magas rezisztenciát ($337 \Omega \times \text{cm}^2$) mutató tenyészetekben, mind a frissen izolált mikroerekben (27.-28. ábra). Nem kezelt kontroll tenyészetekben, ahol a rezisztencia is alacsony volt ($58 \Omega \times \text{cm}^2$), a kladin-3 festés nem adott a sejtháron jellegzetes mintázatot (27. ábra). Mind a mikroerek, mind a tenyésztett endothelsejtek plazmamembránja pozitívan festődött a P-glikoprotein, a mellrák rezisztencia fehérje (Bcrp), és az Oatp-2 szerves anion transzportfehérjékre (28. ábra). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy az agyi endothelsejtek megfelelő tenyésztési körülmények között az agyi mikroerekben láthatóhoz hasonló érett fenotípust mutatnak. [Perrière és mtsai, 2007].



27. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek frissen izolált agyi mikroerekről, és patkány agyi endothelsejtekről kladudin-3, a sejtkapcsolatok egyik integrális membránfehérjéjére történt immunfestés után. Kontroll: agyi endothelsejtek kezelés nélkül; Glia+cAMP+HC és agyi endothelsejt: astroglia sejtekkel együtt tenyésztve, 250 μ M CPT-cAMP és 17,5 μ M RO 201724 24 órán át, 1,4 μ M hidrokortizon (HC) kezelés 10 napig. Mércé: 10 μ m. [Perrière és mtsai, 2007].



28. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek frissen izolált agyi mikroerekről, és patkány agyi endothelsejtekről amelyeket gliasejtekkel együtt tenyésztettünk, és hidrokortizon és cAMP kezelést kaptak. Immunfestések TJ fehérjékre (kladudin-5, okkludin és ZO-1), és efflux pumpákra. Pgp: P-glikoprotein; BCRP: mellrák rezisztencia fehérje (Abcg2); OATP2: szerves aniont szállító polipeptid (Slc21a6). Mércé: 10 μ m. [Perrière és mtsai, 2007].

Az agyi endothelsejtekben kimutattuk a tenyésztési körülmények hatására létrejövő változásokat a sejtkapcsoló fehérjék (klaudin-5, -12, okkludin, ZO-1 és ZO-2), az efflux pumpák (Mdr1a és b, Mrp-1, -3, -4, -5, Bcrp, Oatp-2), valamint a glükóz-transzporter-1 (Glut-1) mRNS mennyiségében kvantitatív polimeráz-láncreakcióval (qPCR). Az optimális tenyésztési körülmények között az agyi endothelsejtekben szignifikánsan megnőtt a klaudin-5 és a ZO-1, az Mrp-3, és -4, a Bcrp, Oatp-2 és a Glut-1 szintje. Az Mdr1a szintje emelkedett ($1,9\times$, $P=0,09$) míg az Mdr1b szintje szignifikánsan csökkent ($0,8\times$, $P<0,027$), az Mdr1a Pgp izoforma agyi mikroerekben való *in vivo* szelektív expressziójával összhangban [Schinkel és mtsai, 1994]. Az efflux pumpák aktív működését tenyésztett agyi endothelsejteken a Pgp szubsztrát rodamin-123, és a Pgp, Bcrp és Mrp transzporterek által szállított daunorubicin sejtbe történő felvételével, és kétirányú átjutásával specifikus gátlószerek alkalmazásával sikeresen igazoltuk [Perrière és mtsai, 2007].

A modellen tíz molekula, két paracelluláris permeabilitási marker (szukróz, inulin), egy endogén ligand (D-glükóz) és hét farmakon (diazepam, imipramin, kolchicin, morfin-6-glükuronid, prazosin, vinblasztin, vinkrisztin) átjutását teszteltük és hasonlítottuk össze korábban leközölt agyi perfúzió technikával egereken mért *in vivo* permeabilitási adatokkal [Dagenais és mtsai, 2000]. A vízdékony paracelluláris markerekre a szakirodalmi, *in vivo*, és korábbi *in vitro* adatainkkal összhangban alacsony átjutást mértünk, akárcsak az efflux pumpa ligand lipofil kolchicinre, vinblasztinra, és vinkrisztinre. A D-glükóz nagyobb permeabilitási értéket adott a hidrophil molekuláknál, a szállítófehérjéje agyi endothelsejteken igazolt kifejeződésének megfelelően. A legmagasabb P_e értékeket a zsírdékony diazepam és imipramin esetében kaptuk, amelyek nem szubsztrátjai az efflux transzportereknek. A tenyészteteken mért P_e adatok szoros összefüggést ($R=0,94$) mutattak az állatkísérletekben mért K_{in} transzport együtthatóval [Perrière és mtsai, 2007].

Az általunk leírt új módszer — a primer agyi endothelsejtek tisztaságának növelése puromicines kezeléssel — széleskörű alkalmazást nyert a leírása óta, és hatásosságát több független laboratóriumban, és más fajokból izolált agyi endothelsejteken is sikerült igazolni [Weidenfeller és mtsai, 2005; Hartmann és mtsai, 2007].

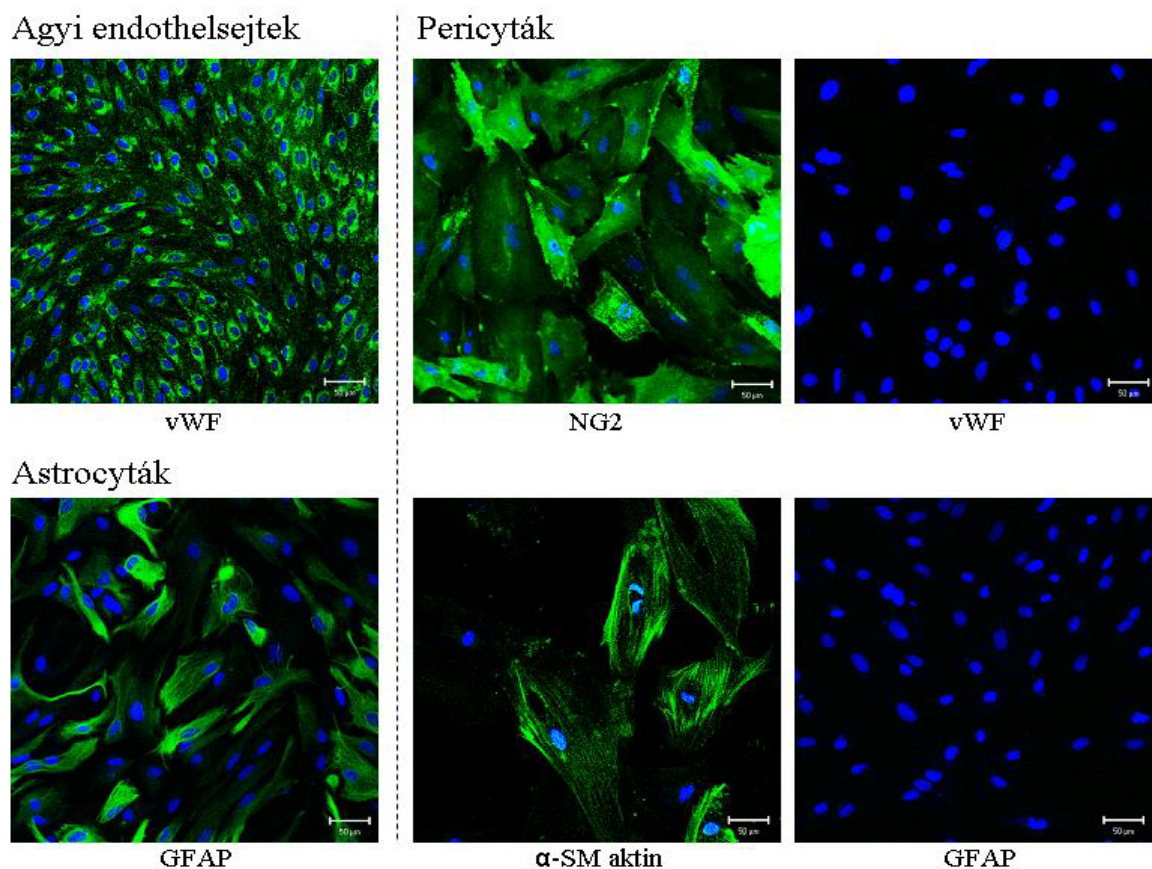
II. Agyi mikroér pericyták hatása tenyésztett agyi endothelsejtek vér-agy gát sajátosságaira, és felhasználásuk egy új, három sejttypusból álló tenyésztési vér-agy gát modellhez

Mivel az agyi endothelsejtekben a vér-agy gát sajátosságok kialakulása szervspecifikus, a neurovaszkuláris egység sejtjei közötti párbeszéd, a gliasejtek és pericyták szerepe ebben a folyamatban nagyon fontos. Leírták a pericyták alapvető jelentőségét az agyi hajszálerek szerkezetének stabilizálásában [Hellström és mtsai, 2001; Lai és Kuo, 2005], és feltételezték, hogy a vér-agy gát működés kialakulásában, fenntartásában és szabályozásában is részt vesznek [Lai és Kuo, 2005; Zlokovic 2008]. A pericyták és endothelsejtek számának aránya az érrendszerben a retinában (1:1-1:3) és az agyban a legnagyobb (1:2-1:5), szemben az izomzat vagy a mirigyek mikroereivel, ahol minden századik endothelsejtre jut csak pericyta [Shepro és Morel, 1993]. Ezzel párhuzamos az ér-endothelium fedettsége is pericytákkal, ami szintén a legmagasabb a retinában és az agyban. A teljes érrendszert vizsgálva mind a pericyták száma, mind az általuk borított endothelium felszín nagysága arányos az endothelsejtek közötti kapcsolatok szorosságával, és az erek gátműködésével. A pericyták képesek szabályozni az endothelsejtek osztódását és érését, valamint a véráramlást és az erek áteresztőképességét kontrakcióval, illetve vazóaktív mediátorok termelésével [Shepro és Morel, 1993; Armulik és mtsai, 2005]. A felnőtt idegrendszeri mikroér pericyták idegi őssejt aktivitást mutatnak [Dore-Duffy, 2008].

Amíg az astrogliasejtek vér-agy gát sajátosságokat indukáló hatását a tenyésztési modellek előállítása során kihasználták [lásd összefoglaló közleményeinket a témában: Deli és mtsai, 2005; Deli, 2007; Veszélka és mtsai, 2011; Tóth és mtsai 2011], és mi is alkalmaztuk [Perrière és mtsai, 2005 és 2007], a pericytákra sokkal kevesebb figyelem jutott. Ugyan nyilvánvaló volt, hogy a mesenchymális eredetű pericyták az agyi mikroerek fontos alkotói (1. és 7. ábra), azonban kísérleteink kezdetén kevés és ellentmondó adat volt arra, hogy milyen hatást fejtenek ki tenyésztett agyi endothelsejtekre. Egér pericytoma sejtek nem befolyásolták, retina pericytasejtek fokozták az

endothelsejtek permeabilitását [Raub és mtsai, 1992]. Ezzel szemben agyi mikroér pericyták növelték az endothelsejtrétegek zártóságát [Hayashi és mtsai, 2004; Dohgu és mtsai, 2005].

Patkány három sejttípusból álló tenyésztési vér-agy gát modell

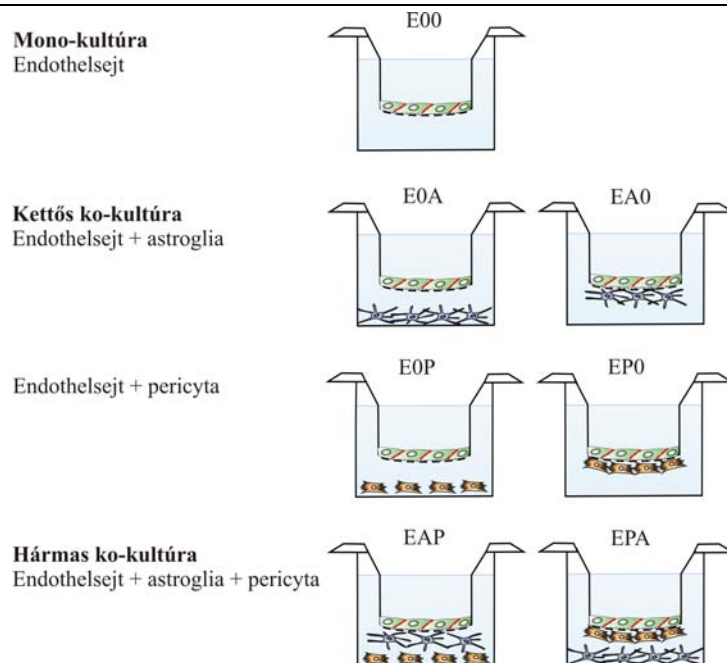


29. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek a modellhez felhasznált primer tenyészetekről immunfestés után. vWF: von Willebrand faktor. GFAP: gliális savas fibrilláris fehérje. NG2: kondroitin-szulfát proteoglikán. α -SM atin: α -simaizom aktin. [Nakagawa és mtsai, 2009].

Japán kutatási partnereinkkel, akikkel 16 éve folytatunk sikeres kétoldali együttműködést, agyi endothelsejtek, astrogliasejtek, és pericyták primer tenyészeit (29. ábra) felhasználva kettős és hármas *in vitro* tenyésztési modelleket hoztunk létre és vizsgáltunk meg szisztematikus módon (30. ábra) [Nakagawa és mtsai, 2007].

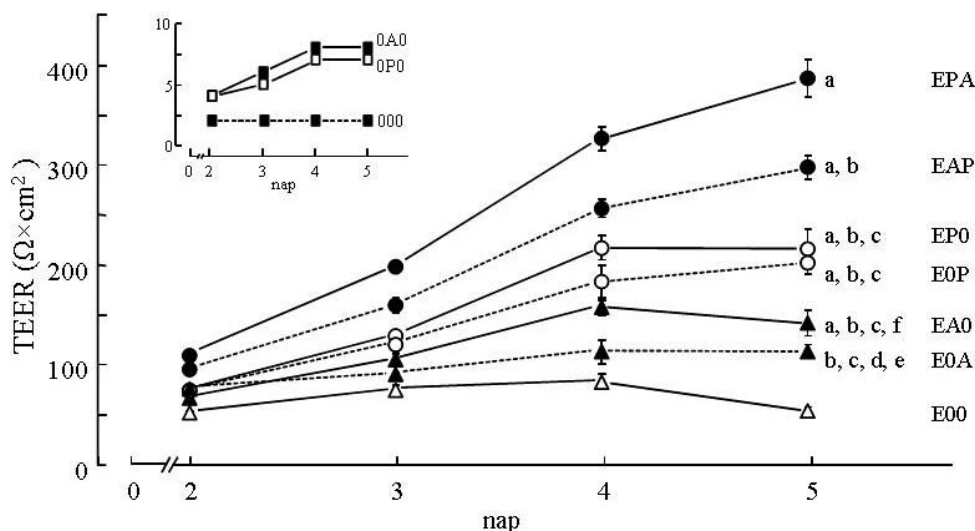
Az agyi endothelsejt tenyészeteket az általunk korábban leírt és alkalmazott [Perrière és mtsai, 2005 és 2007; Veszelka és mtsai, 2007] puomicines módszerrel állítottuk elő. A sejtek szorosan záródó, egybefüggő, nem átfedő egysejt-rétegben nőttek, jellegzetes megnyúlt, orsó alakú morfológiát, és vWF immunpozitivitást mutattak (29. ábra) akárcsak a korábbi munkáinkban. Tenyészetekben az astroglia sejtekben kimutattuk a GFAP jelenlétét, a sejtek alakja jellegzetesen sokszögű, hosszú, astrocyta végtalpához hasonló nyúlványokkal, ami érett fenotípusra utal. A pericyták alakja teljesen eltér a másik két neurovaszkuláris sejttípustól, szélesen elterülnek, nagy és szabálytalan nyúlványokat bocsátanak ki, és sűrű tenyészetben egymáson több rétegben is nőnek. Pozitívan jelölődnek az NG2 kondroitin-szulfát proteoglikánra, nesztinre, és α -simaizom aktinra ugyanakkor nem festődnek az endothelsejtek vWF, vagy a gliasejtek GFAP markereire (29. ábra) szakirodalmi eredményenek megfelelően [Dore-Duffy és mtsai, 2006].

Tenyésztőbetéteket használva (12. ábra), összesen hét modellt állítottunk össze a három sejttípusból (30. ábra). Az önállóan tenyésztett agyi endothel-egysejtrétegeken (E00) kívül, ami kontrollként szolgált, négy kettős (E0A, EA0, E0P, EP0) és két hármas modellt (EAP, EPA) vizsgáltunk, amelyek a glia és pericyta sejtek elhelyezkedésében különböztek.



30. ábra. Agyi endothel, glia és pericyta sejtek együttes tenyésztésével porózus membránú tenyésztőbetéteken létrehozott vér-agy gát modellek sémája. E: agyi endothelsejtek. A: astrogliasejtek. P: pericyták. 0: nincs sejt

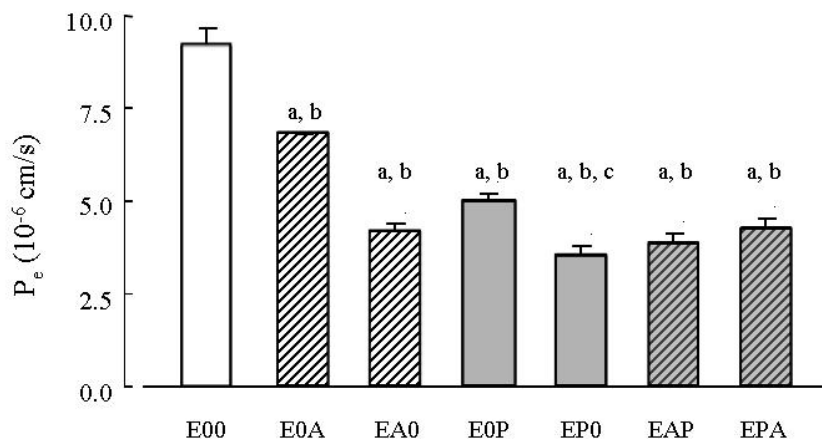
Igazolni tudtuk, hogy a szakirodalmi adatoknak és saját korábbi eredményeinknek megfelelően az astroglia sejtek fokozzák az agyi endothelsejtek kapcsolatainak szorosságát, akár a tenyésztőbetét membránjának másik oldalán (EA0, érintkező elrendezés), akár a tenyésztőedény alján (E0A, nem érintkező elrendezés) helyezkedtek el a sejtek együtt tenyésztése során (30. és 31. ábra). A két modell közül hatásosabb volt az EA0, érintkező elrendezés.



31. ábra. Glia és pericyta sejtek együttes tenyésztésének hatása agyi endothelsejtek elektromos ellenállására (TEER). E: agyi endothelsejtek. A: astrogliasejtek. P: pericyták. 0: nincs sejt. A bal felső kiegészítő grafikon a sejtmentes tenyésztőbetét (000), az astroglia (0A0) és pericyta sejtek (0P0) alacsony TEER értékeit mutatja. Átlag $\pm$ SEM, $n=4$. Szignifikáns különbségek a csoportok között: a: $P<0,01$ az E00-hoz képest. b: $P<0,01$ az EPA-hoz képest. c: $P<0,01$ az EAP-hoz képest. d: $P<0,01$ az EP0-hoz képest. e: $P<0,01$ az EOP-hoz képest. f: $P<0,05$ az EP0-hoz képest. [Nakagawa és mtsai, 2007].

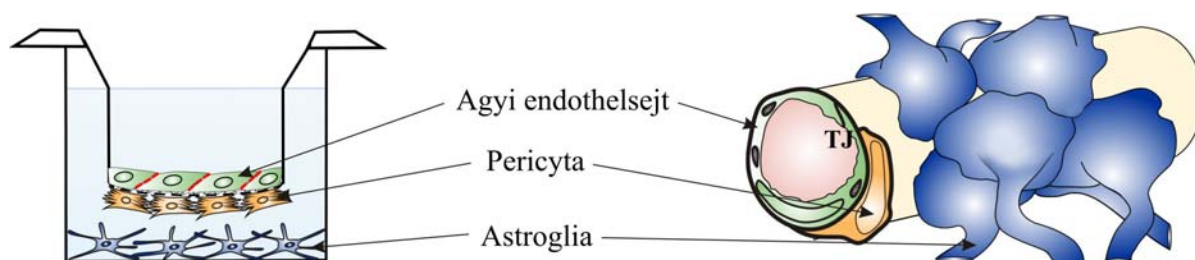
Megállapítottuk, hogy a pericyták (EP0 és EOP) is képesek fokozni az agyi endothelsejtek közötti kapcsolatok szorosságát, növelni a barrier funkciót, csökkenteni a sejtrétegek átteresztőképességét. Az endothelsejtek rezisztenciáját az 5. napon négyszeresre emelték, és ez a hatás nagyobb volt, mint a vér-agy gát modellekhez standard módon alkalmazott gliasejteké ($P<0,01$ és $P<0,05$). Sem a pericyták, sem a gliasejtek önmagukban nem alkotnak szorosan záródó barriert (31. ábra).

A hármas modellek ellenállása a kettős modellekénél még nagyobbak bizonyult. Az EPA elrendezésen mértük a hét letesztelt modell közül a legmagasabb $388 \pm 18,8 \Omega \times \text{cm}^2$ TEER értéket az 5. napon, ami szignifikánsan különbözött a többi modelltől (31. ábra). Magasabb ellenállást kaptunk a pericytát is tartalmazó modelleken, mint a pericyta nélkülieken, valamint az érintkező elrendezésnél (EP0, EPA) a nem érintkezővel (E0P, EAP) összehasonlítva.



32. ábra. Glia és pericyta sejtek együttes tenyésztésének hatása agyi endothelsejtek fluoreszceinre mért paracelluláris permeabilitására (P_e). E: agyi endothelsejtek. A: astrogliasejtek. P: pericyták. 0: nincs sejt. Átlag $\pm$ SEM, $n=4$. Szignifikáns különbségek a csoportok között: a: $P<0,01$ az E00-hoz képest. b: $P<0,01$ az E0A-hoz képest. c: $P<0,05$ az E0P-hoz képest. [Nakagawa és mtsai, 2007].

A fluoreszcein sejtek közötti átjutására a legmagasabb értéket az önmagában tenyésztett agyi endothelsejtek adták, ami azt jelzi, hogy ezek a sejtrétegek a legátengedőbbek (32. ábra). Mind a pericyta, mind az astroglia sejtek jelenléte, akár kettős, akár hármas kokultúrában szignifikánsan csökkentette a jelzőanyag permeabilitását. A kettős modelleken az érintkező elrendezés (EP0, EA0) alacsonyabb P_e értékeket eredményezett mint a nem érintkező (E0P, E0A). A pericyták vér-agy gát sajátosságokat indukáló hatásáról kapott eredményeink összhangban állnak szakirodalmi adatokkal, amelyek immortalizált agyi endothel-sejtvonalakon csökkent permeabilitást és fokozott okkludin génkifejeződést írtak le pericyták által termelt transzformáló növekedési faktor- β , illetve angio-pietin-1 hatására [Hori és mtsai, 2004; Dohgu és mtsai, 2005]. Ugyan hármas modellt endothelsejtek vagy sejtvonalak, glia- és idegsejtek együtt tenyésztésével már korábban létrehoztak [Schiera és mtsai, 2005], de az általunk vizsgált EPA modell az első anatómiai viszonyokat utánozó (33. ábra) szingén, azaz genetikailag azonos agyi endothel, pericyta és glia sejtek primer tenyészteteiből álló vér-agy gát modell.

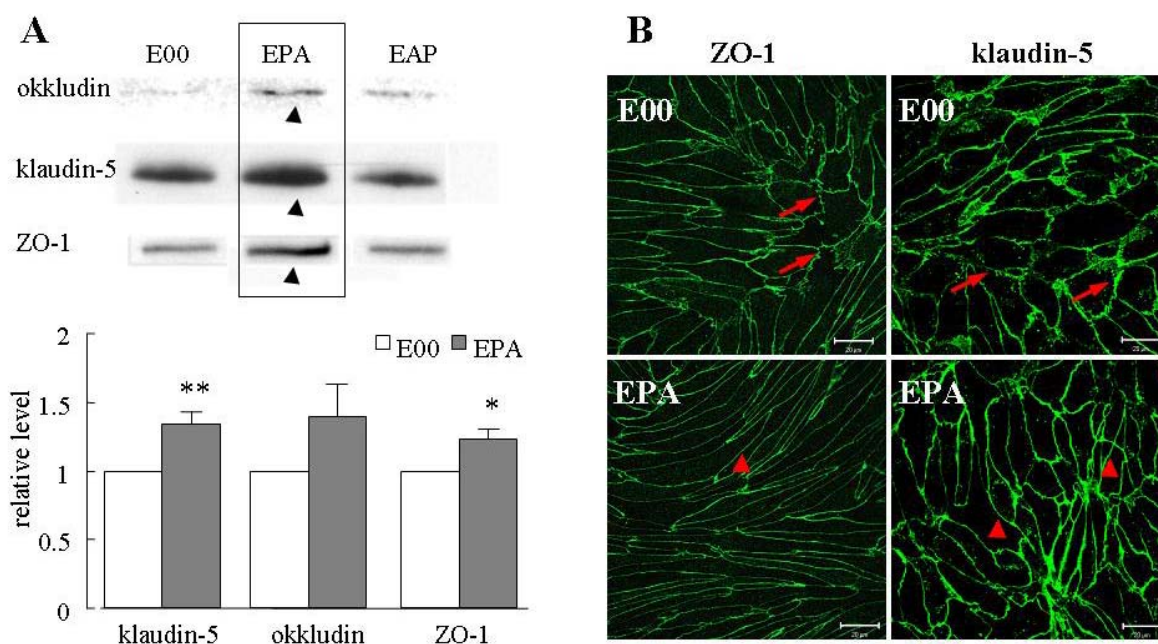


33. ábra. Agyi endothel, glia és pericyta sejtek együttes tenyésztésével porózus membránú tenyésztőbetéteken létrehozott vér-agy gát modell és agyi mikroér szerkezetének bemutatása.

Eredményeink azt is igazolják, hogy a sejtek közötti kölcsönhatás milyen alapvető fontosságú az agyi endothelsejtek vér-agy gát tulajdonságainak kiváltásában és fenntartásában. A glia és pericyta sejtek nélkül növesztett endothelsejtrétegek szorossága volt a legalacsonyabb, ami azt jelzi, hogy sejt kölcsönhatás nélkül tenyésztetben elvesznek a vér-agy gát sajátosságok [Nakagawa és mtsai, 2007].

A legjobbnak bizonyult EPA modellt a továbbiakban részletesen jellemeztük [Nakagawa és mtsai, 2009]. Az agyi endothelsejteket összekapcsoló TJ struktúrák a sejtek egyik legjellegzetesebb, polaritást és permeabilitást is meghatározó alkotói, amelyek a sejtek közötti, paracelluláris út szabad átjárhatóságát szabályozzák. Az endothelsejt-rétegek barrier működése a sejtközötti kapcsolatok szorosságát tükrözi, ezért megvizsgáltuk a hármas modellen a vér-agy gátra jellemző sejtközötti kapcsolófehérjéket. Az agyi endothelsejtek a pericyta és glia sejtek együttes hatására több kladin-5, okkludin és ZO-1 fehérjét termeltek amit Western blottal határoztunk meg (34. ábra). Immunfestéssel igazoltuk, hogy mind az önmagában, mind a pericyta és glia sejtekkel együtt tenyésztett endothelsejtekben a kladin-5 és ZO-1 fehérje a sejtek határán, a sejtek kapcsolódásánál volt megfigyelhető. Az E00 modellen szabálytalan, zipzárhoz hasonló, helyenként pedig citoplazmatikus, pontszerű TJ fehérje festődést lehetett látni (34. ábra, nyilak). Az EPA tenyészetben a sejtkapcsoló fehérjék simábban, pontosabban, övszerűen rajzolták ki a sejthatárokat (34. ábra, nyílhegyek), és csökkent a szabálytalan, zipzár-szerűen festődő szakaszok hossza.

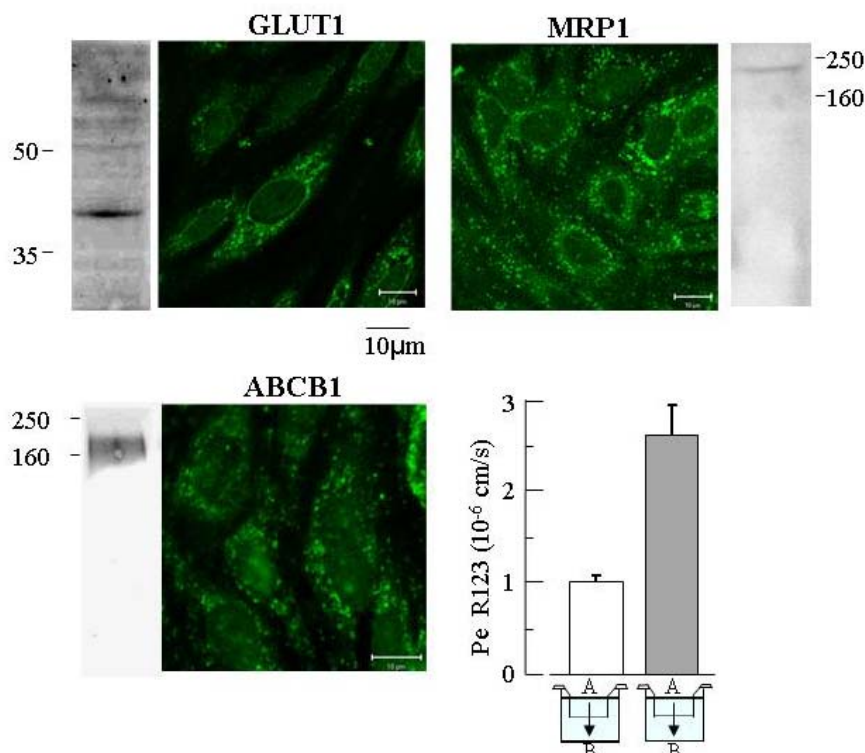
Az új hármas vér-agy gát modellen két éves időtartam alatt 40 független izolálásból több mint 600 tenyésztőbetétet 350 és 600 $\Omega \times \text{cm}^2$ közötti ellenállás értékeket mértünk standard, kereskedelmi forgalomban kapható mérőműszerrel. A modellre a TEER adatoknak megfelelően alacsony, $1,8 \times 10^{-6}$ és 4×10^{-6} cm/s közötti P_e értékeket kaptunk, ami az agyi endothel-sejtvonalakénál sokkal kisebb, és a szakirodalom legjobb vér-agy gát modelljeivel megegyező passzív paracelluláris permeabilitás [Deli és mtsai, 2005; Deli 2007; Veszeka és mtsai, 2011; Tóth és mtsai, 2011]. A funkcionális mérésekkel és a TJ immunfestésekkel összhangban transzmissziós elektron-mikroszkópiával is igazoltuk a hármas modell endothelsejtjeiben a szoros sejtközötti kapcsolatokat [Nakagawa és mtsai, 2009] (7. ábra).



34. ábra. A: A kladin-5 és okkludin sejtkapcsoló integrális membránfehérjék, és a *Zonula occludens-1* (ZO-1) citoplazmatikus fehérje expressziójának meghatározása Western blottal patkány agyi endothelsejtekben, amelyeket önmagukban (E00), illetve pericyta és glia sejtekkel együtt tenyésztettünk (EPA). A fehérjék relatív mennyiségét denzitometriával határoztuk meg. B: Fluoreszcens mikroszkópos felvételek patkány agyi endothelsejtekről egyedül (E00), és ko-kultúrában (EPA) kladin-5 és ZO-1 immunfestés után. Nyilak: szabálytalan, cipzárszerű sejtkörüli immunfestődés. Nyílhegyek: folytonos, övszerű sejtkörüli immunfestődés. Mércse: 20 μm . [Nakagawa és mtsai, 2009].

Az EPA modell agyi endothelsejtjeiben Western blottal kimutattuk a vér-agy gátra specifikus, hexózat szállító Glut-1 fehérjét (35. ábra). Szakirodalmi adatokkal egyezően egy 55 kDa nagyságú, erősebben, és egy 45 kDa nagyságú, gyengébben expresszáldó, agyban korábban kimutatott izoformát kaptunk [Yu és Ding, 1998]. Immunfestéssel erős és egyenletes sejten belüli eloszlású

jelölődést láttunk glükóz-transzporter-1 fehérjére. Az efflux pumpák közül a P-glikoproteint 170 kDa nagyságú, az MRP-1 fehérjét pedig 190 kDa nagyságú egyedi immunreaktív sávokként detektáltuk (35. ábra). Mindkét transzportert immunhisztokémiai jelöléssel is kimutattuk agyi endothelsejtekben.



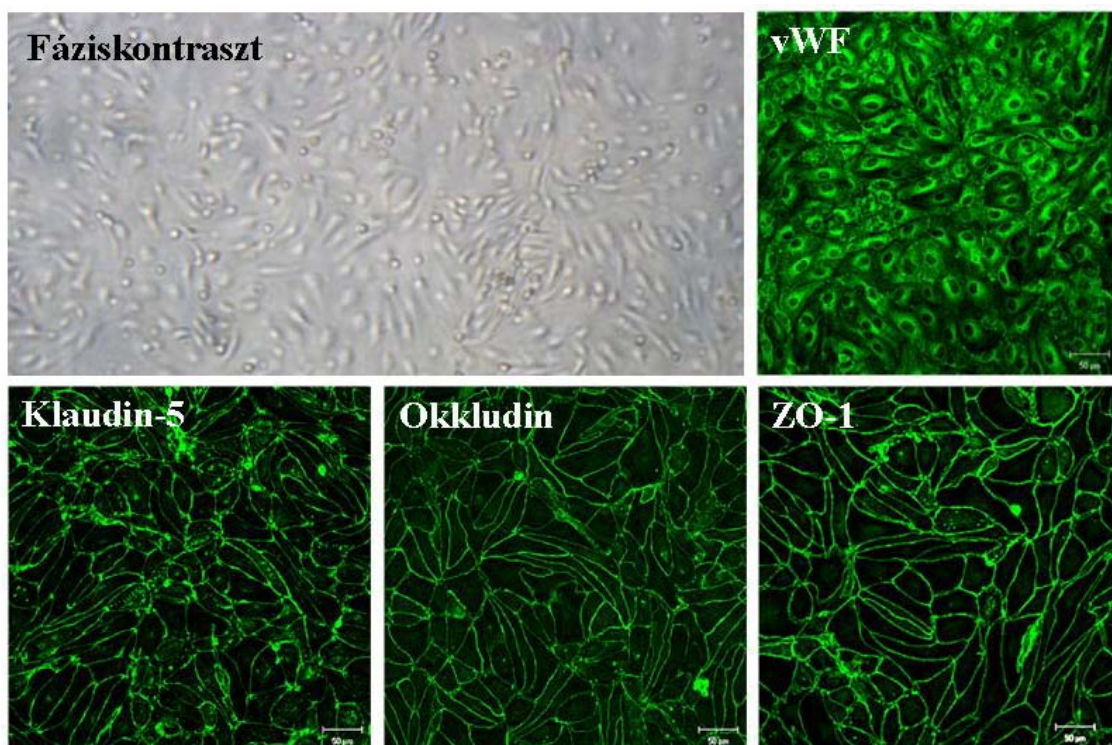
35. ábra. Vér-agy gátra jellemző szállítófehérjék kimutatása agyi endothelsejteken (EPA modell) Western blottal és immunhisztokémival, valamint a P-glikoprotein pumpa aktivitásának mérése kétirányú rodamin-123 transzporttal. GLUT1: glükóz-transzporter-1; MRP1: multidrog rezisztencia fehérje-1; ABCB1: P-glikoprotein; R123: rodamin-123; A: apikális (luminális) kompartment; B: bazális (abluminális) kompartment; P_e : endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Mércé: 10 μ M. [Nakagawa és mtsai, 2009].

A Pgp működését rodamin-123 szubsztrát kétirányú transzportjával igazoltuk: a fluoreszcens festék abluminális-luminális irányba (*in vivo* megfelelője az agyból a vérbe való pumpálás) történő szállítása 2,5-szer nagyobb volt, mint az ellenkező irányban, ami erős efflux aktivitást jelez. Az EPA modell permeabilitását 19 vegyülettel vizsgáltuk, és az adatainkat *in vivo* értékekkel korreláltatva validáltuk (6. fejezet).

Majom három sejtípusból álló tenyésztéses vér-agy gát modell

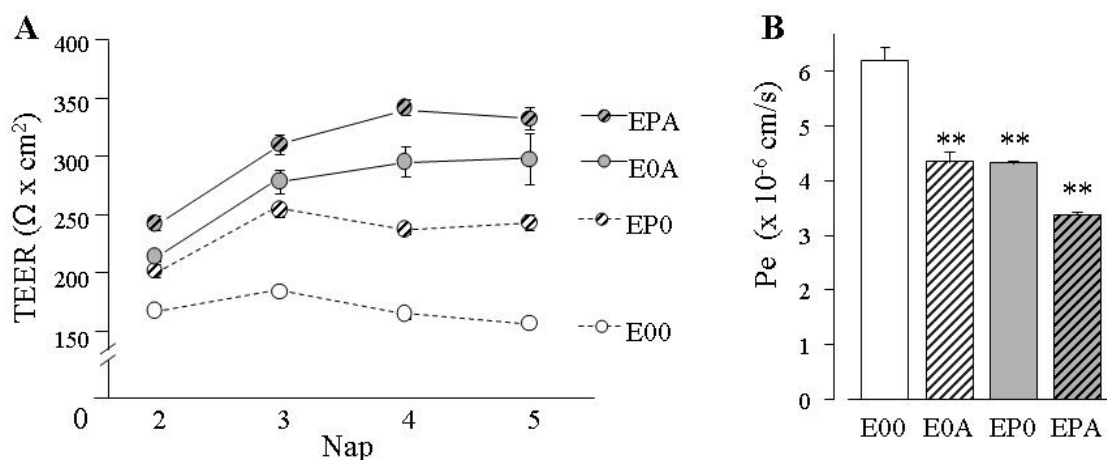
A patkány endothelsejt modell alkalmazását korlátozza, hogy fajok közti eltérések lehetnek egyes fehérjék, transzporterek kifejeződésében és működésében, így a kapott eredmények esetleges alkalmazása az emberi vér-agy gát permeabilitásának becslésére, vagy a humán betegségek kezelésében további megerősítést igényel. Ehhez a modellek továbbfejlesztése szükséges. Kísérletes lépéseket tettünk ebben az irányban, és sikerült majom (*Macaca irus*) és humán agyi endothelsejteken is igazolni a pericyták vér-agy gát sajátosságokat indukáló hatását. Ezeket az új eredményeket konferenciákon mutattuk be mind előadás, mind poszter formájában, a munkák közlése folyamatban van.

A patkány agyi endothelsejtekre kidolgozott módszerrel majom agyból mikroér frakciót izoláltunk, amiből puromicines tisztítással primer tenyészeteket nyertünk. A sejtek korábbi patkány, egér és sertés agyi endothelsejt-tenyészetekhez hasonló morfológiát mutattak (36. ábra). Az endothelsejtek markerére (vWF), hasonlóképpen a klaudin-5, okkludin és ZO-1 sejközötti kapcsolófehérjékre nagyon szép erős, és jellegzetes, a sejtek határát és kapcsolódási pontjait körberajzoló immunfestődést kaptunk.

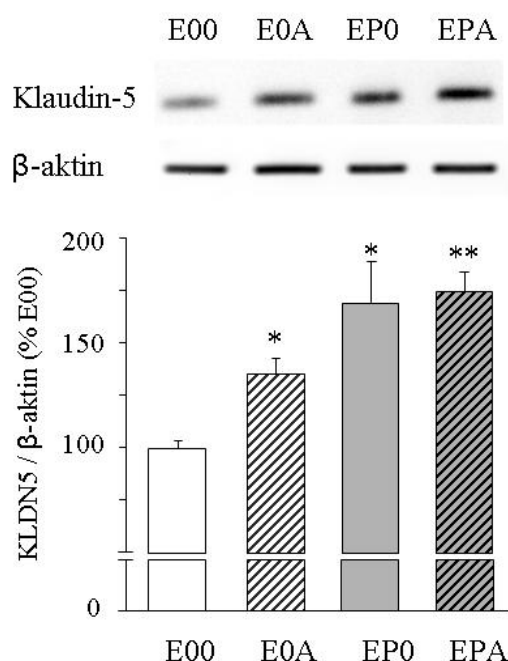


36. ábra. Fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkópos felvételek majom (*Macaca irus*) primer agyi endothel-sejt-tenyészetekről. Immunfestések endothelsejt markerre és TJ fehérjékre. vWF: von Willebrand faktor. Mércé: 50 μ M. [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve].

A majom agyi endothelsejteket patkány agyi pericytákkal és astroglia sejtekkel együtt tenyésztve igazoltuk a korábban más fajokban megfigyelt glia és pericyta hatást az endothelsejtek barrier működésére (37. ábra). A pericyta sejtek a gliához hasonlóan hatékonyan fokozták az endothelsejtek ellenállását, ami a hármas modellen volt a legmagasabb ($350 \Omega \times \text{cm}^2$). Ezzel párhuzamosan szignifikánsan csökkentették a fluoreszcein permeabilitást, ami szintén az EPA modellnél volt a legalacsonyabb.

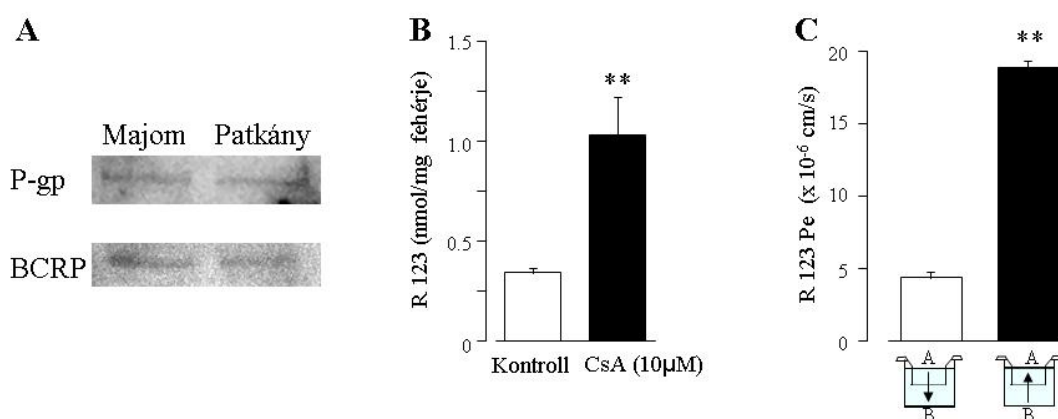


37. ábra. A: Patkány glia- és agyi mikroér pericyta sejtek együttes tenyésztésének hatása majom agyi endothel-sejtek elektromos ellenállására (TEER), valamint B: fluoreszceinre mért paracelluláris permeabilitására (Pe). E: agyi endothelsejtek. A: astrogliasejtek. P: pericyták. 0: nincs sejt. Átlag $\pm$ SEM, n=3. Szignifikáns különbségek a csoportok között: ** $P < 0,01$ az E00-hoz képest. [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve].



38. ábra. A: A klaudin-5 sejtkapcsoló integrális membránfehérje expressziójának meghatározása majom agyi endothelsejtekben Western blottal. E00: önmagukban tenyésztett endothelsejtek. E0A: astroglia sejtekkel együtt tenyésztett endothelréteg. EP0: pericytákkal azonos membrán két oldalán együtt tenyésztett endothelsejtek. EPA: glia és pericyta sejtekkel hármass modellben együtt növesztett endothelsejtek. KLDN5: klaudin-5. A fehérjék relatív mennyiségét denzitometriával határoztuk meg, és a klaudin-5 mennyiségét β -aktinra vonatkoztatva a kontroll (E00) százalékában adtuk meg. Átlag $\pm$ SEM, $n=3$. Szignifikáns különbségek a csoportok között: * $P<0,05$ és ** $P<0,01$ az E00-hoz képest. [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve].

A funkcionális mérésekkel egyezően magasabb klaudin-5 kifejeződést találtunk agyi endothelsejtekben, ha együtt tenyésztettük glia, vagy pericyta sejtekkel, illetve hármass modellben (38. ábra). Ez az eredmény megerősíti a szakirodalmi adatokat, hogy a klaudin-5 a vér-agy gát barrier működésének kialakításában alapvető jelentőségű kapcsolófehérje [Nitta és mtsai, 2003].

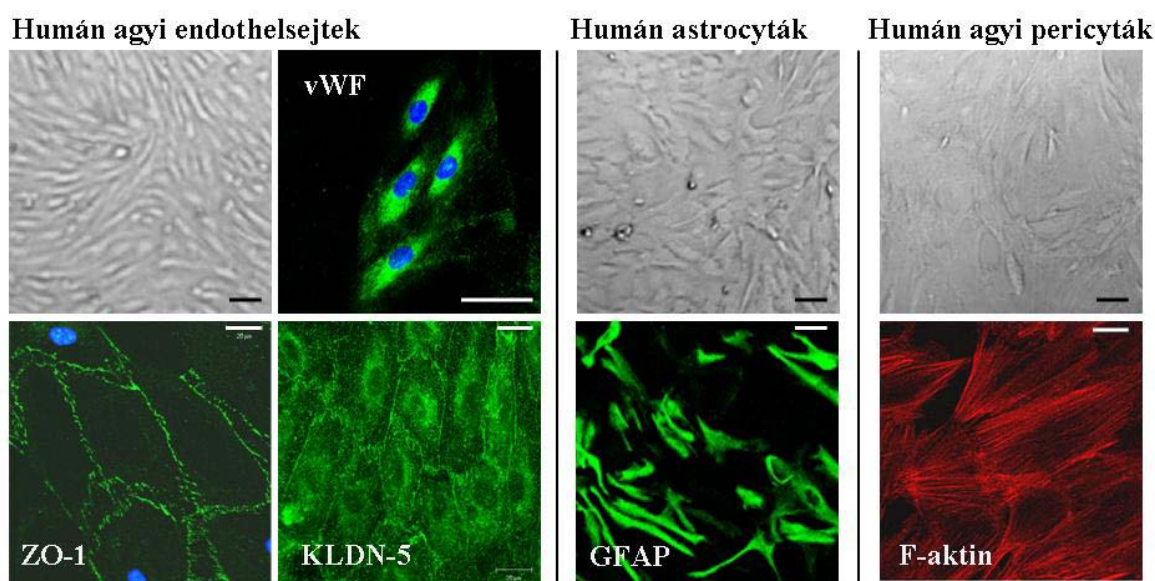


39. ábra. A: Vér-agy gátra jellemző efflux transzporterek kimutatása majom és patkány agyi endothelsejteken (EPA modell) Western blottal. B: A P-glikoprotein pumpa aktivitásának tesztelése rodamin-123 felhalmozódásának mérésével majom agyi endothelsejtekben kontroll állapotban és a pumpa gátlószerének jelenlétében. ** $P<0.01$ vs. kontroll ($n=4$). C: A P-glikoprotein pumpa aktivitásának mérése kétirányú rodamin-123 transzporttal majom agyi endothelsejteken. ** $P<0.01$ AB vs. BA irányú átjutás ($n=3$). Pgp: P-glikoprotein (Abcb1); BCRP: mellrák rezisztencia fehérje (Abcg2). R123: rodamin-123; CsA: ciklosporin-A. A: apikális (luminális) kompartment; B: bazális (abluminális) kompartment; Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve].

A glia és pericyta sejtekkel együtt tenyésztett (EPA modell) majom agyi endothelsejtekben kimutattuk a vér-agy gát két legfontosabb ABC transzporterének, a P-glikoproteinnek és a Bcrp-nek a jelenlétét a patkány agyi endothelsejtekkel összevethető, jelentős mennyiségben (39. ábra). A Pgp aktivitását két módon is teszteltük. Egyrészt a pumpa specifikus gátlószere, a ciklosporin-A jelenlétében mintegy háromszorosára nőtt az endothelsejtekben felhalmozódott rodamin-123 mennyisége (39. ábra). Másrészt négyszeres különbséget találtunk a kétirányú transzport vizsgálatban az agyból a vér felé mutató, abluminális-luminális (B-A) és az ellenkező irányú (A-B) irányú festékszállítás között (39. ábra), ami magasabb, mint a korábban patkány EPA modellen mért adatunk (35. ábra) [Nakagawa és mtsai, 2009]. A megfigyelések alapján a majom vér-agy gát modell tulajdonságai a korábbi patkány modell sajátosságaival jól összevethetők. A modellen farmakonok átjutását is teszteltük, amit a korábbi modellünk adataival vetettünk össze (6. fejezet).

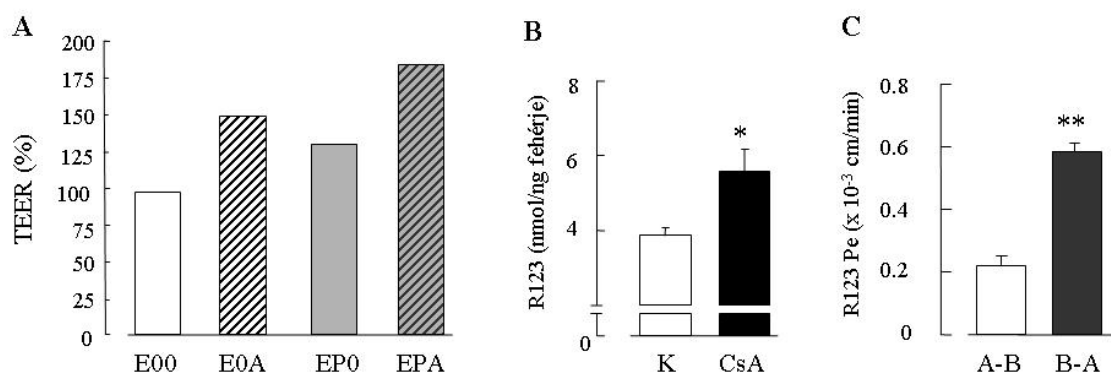
Humán három sejtípusból álló tenyésztési vér-agy gát modell

Az orvosi biológiai kutatások számára természetesen a legmegfelelőbb egy humán modell lenne a vér-agy gát tanulmányozására. A mi céljaink között is szerepel egy ilyen modell kidolgozása. Japán együttműködő partnereink és a francia Biopredic cég bevonásával humán alacsony passzálási számú (P1-3) agyi mikroér endothelsejt és pericyta, valamint astroglia sejteket vizsgáltunk, és azokból EPA modellt állítottunk elő. Az agyi endothelsejteken a mikroér endotheliumra jellemző orsó alakú morfológiát figyeltünk meg. A sejtek pozitívan jelölődtek az endothelsejt marker vWF-ra (40. ábra). A sejtközi kapcsolatok a kladin-5 és ZO-1 fehérjéire ugyan pozitív festődést kaptunk, de a sejthatárok a monokultúrákban kevésbé erősen és egyenletesen látszódtak, mint a primer patkány, vagy majom agyi endothelsejt kultúrákban. Az astroglia sejtekben a GFAP marker erősen expresszáldott, és a korábbihoz hasonló festődést mutatott. A humán agyi mikroér pericyták alakja és az F-aktin hálózat a sejtípus jellegzetességeinek megfelelőek (40. ábra).



40. ábra. Fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkópos felvételek alacsony passzálási számú humán agyi endothelsejt, pericyta és astroglia tenyészetekről. Immunfestések endothelsejt, glia és pericyta markerre, TJ fehérjékre. vWF: von Willebrand faktor. ZO-1: *Zonula occludens* fehérje-1. KLDN-5: kladin-5. GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje. F-aktin: citoskeletális aktin filamentumok. Mércék: ZO-1, KLDN-5, F-aktin képeken 20 μ M, az összes többi képen 50 μ M. [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve].

Igazoltuk humán sejtekkel is, hogy a pericyták fokozzák az agyi endothelsejtek szorosságát, és a glia sejtekkel együtt tenyésztve a hármass EPA kultúrában mértük a barrier funkciót tükröző legmagasabb rezisztenciát ($120 \Omega \times \text{cm}^2$) ami mintegy kétszerese a kontroll, önmagában növesztett sejtek ellenállásának (41A ábra). A humán sejtekből összerakott EPA modellen a ciklosporin-A gátlószert jelenlétében szignifikánsan magasabb R123 akkumulációt (41B ábra), és a rodamin efflux transzportját (41C ábra) mértük ki, ami a Pgp patkány modellen mért aktivitásával összevethető.



41. ábra. A: Humán glia- és agyi mikroér pericyta sejtek együttes tenyésztésének hatása humán agyi endothel-sejtek elektromos ellenállására (TEER). E00: önmagukban tenyésztett endothelsejtek. E0A: astroglia sejtekkel együtt tenyésztett endothelréteg. EP0: pericytákkal azonos membrán két oldalán együtt tenyésztett endothel-sejtek. EPA: glia és pericyta sejtekkel hármas modellben együtt növesztett endothelsejtek. B: A P-glikoprotein pumpa aktivitásának tesztelése rodamin-123 felhalmozódásának mérésével humán agyi endothelsejtekben (EPA modell) kontroll állapotban és a pumpa gátlószereinek jelenlétében. * $P < 0.05$ vs. kontroll ($n=4$). C: A P-glikoprotein pumpa aktivitásának mérése kétirányú rodamin-123 transzporttal humán agyi endothelsejteken. ** $P < 0.01$ A-B vs. B-A irányú átjutás ($n=3$). Pgp: P-glikoprotein (Abcb1); BCRP: mellrák rezisztencia fehérje (Abcg2). R123: rodamin-123; CsA: ciklosporin-A. A-B: apikális-bazális irány; B-A: bazális-apikális irány; Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. [Nakagawa és mtsai, közlésre előkészítve].

Az új hármas patkány, majom és humán vér-agy gát (EPA) modellek előállításánál három olyan technikát ötvöztünk, amelyek hozzájárultak az agyi endothelsejtek tenyésztésének fejlődéséhez.

(i) A puromicines agyi endothelsejt tisztítási módszerünk nem csak homogénebb tenyészetek előállítását teszi lehetővé, de valószínű, hogy a vér-agy gát tulajdonságokat leginkább mutató agyi hajszálerek endothelsejtjeinek a nagyobb erek endothelsejtjeivel szemben való szelektálását, ezzel a szorosabb és jobb vér-agy gát modell létrehozását is segíti [Ge és mtsai, 2005].

(ii) A glükokortikoid receptor agonisták, mint a kortikoszteron és hidrokortizon hormonok, vagy a farmakon dexametazon fokozzák az agyi endothelsejtek szorosságát, ezért alkalmazásuk vér-agy modellekben elterjedt [összefoglaló közleményeink: *Deli és mtsai, 2005; Deli 2007*]. Mi is sikerrel használtuk a hidrokortizont korábbi munkáinkban [Perrière és mtsai, 2005 és 2007]. Ezeknél a modelleknél élettani mennyiségben (500 nM) adtuk a tenyészetekhez a modell tenyésztőbetétten történő összeállítását követő naptól kezdődően (13. ábra). A glükokortikoidok közvetlen hatást fejtenek ki az endothelsejtekre, a nagy, utcahöz hasonló sejtalakot kisebb, elnyúlt, orsószzerű alakra változtatják, és megnövelik a tenyészetek sejtjeinek sűrűségét az apoptózis gátlásával [Calabria és mtsai, 2006]. Emellett indirekt módon, az agyi astrocytákon és pericytákon keresztül az angiopoietin-1 termelésének serkentésével és az érendotheliális növekedési faktor (VEGF) képződésének gátlásával a vér-agy gát barrier tulajdonságait erősítik [Kim és mtsai, 2008]. A VEGF termelésének csökkentése különösen fontos, mert a VEGF emelkedett szintje stroke-ban a vér-agy gát permeabilitásának fokozódásához, agyödema képződéshez és a neurovaszkuláris egység sejtjein az akvaporin-4 emelkedett kifejeződéséhez vezet [Rite és mtsai, 2008].

(iii) Az *in vivo* anatómiai helyzetnek megfelelően pericytákat is tartalmazó hármas modelleket alkalmaztunk elsőként a szakterületen, aminek ipari célú felhasználását nemzetközi szabadalommal védjük [Niwa és mtsai, 2007]. A pericyták fokozták a gliasejtek vér-agy gát tulajdonságokat indukáló hatását hidrokortizon jelenlétében. Ez a hatás specifikus, mivel megfigyelésünk szerint a szintén mesenchymális eredetű fibroblastsejtek nem befolyásolják az agyi endothelsejtek működését. Az endothelsejtek szorosságának, és a TJ fehérjék expressziójának fokozódását a pericyták az angiopoietin-1 molekula közvetítésével válthatják ki. Ezt alátámasztja, hogy glükokortikoidok hatására megemelkedik pericytákból az angiopoietin-1 szintje [Kim és mtsai, 2008], és hogy a pericyták termelte angiopoietin-1 növelte az okkludin gén expresszióját agyi endothel-sejtvonalon [Hori és mtsai, 2004]. Megfigyeléseink jelentőségét növelik a közelmúltban igen rangos szakmai folyóiratokban megjelent közlemények, amelyek az agyi mikroér pericyták vér-agy gát működést szabályozó, permeabilitást csökkentő *in vivo* szerepét tárták fel [Armulik és mtsai, 2010 és 2011; Daneman és mtsai, 2010].

5. A VÉR-AGY GÁT KÁROSODÁSÁNAK ÉS VÉDELMEK VIZSGÁLATA MODELLEK SEGÍTSÉGÉVEL

A tenyésztési modellek lehetőséget nyújtanak betegségek pathomechanizmusában szerepet játszó kóroki tényezők elkülönült vizsgálatára, a molekuláris háttér felderítésére, az egyes sejttípusokon közvetlen károsító- és védőhatások, vagy sejtes kölcsönhatások mérésére. Korábbi kutatásaink igazolták, hogy az agyi endothelsejtek működését számos pathogenetikus faktor, mint a vazoaktív mediátor hisztamin és a gyulladásos citokin tumor nekrosis faktor- α képes károsítani [Deli, Ph.D. értekezés, 1996]. További kísérleteinkben mikrobiális patogéneket, és azok alkotóit, a Gram-negatív baktériumok sejtfalának lipopoliszacharidjait (LPS), vírusok burokfehérjéit és a toxoplazmát tanulmányoztuk vér-agy gát modelleken. Megvizsgáltuk az agyi ischemia néhány kiválasztott kóroki tényezőjének, valamint az Alzheimer-kór és a prion betegség kialakulásában szerepet játszó amiloid peptidek és a tau fehérje vér-agy gátra kifejtett hatását. A károsodások kivédésére a növényi eredetű, negatív töltésű poliszacharid pentozán poliszulfátot (PPS), a többszörösen telítetlen ω -3 zsírsav dokozaheksaénsavat (DHA), a vérfehérje szérum amiloid P komponens (SAP), egyes glutamát-receptor antagonistákat és szerinproteáz-gátlókat, valamint a sejtek prekondicionálását teszteltük.

5.1 Mikrobiális patogének

III. A bakteriális lipopoliszacharidok hatása a vér-agy gát permeabilitására *in vivo* és *in vitro*

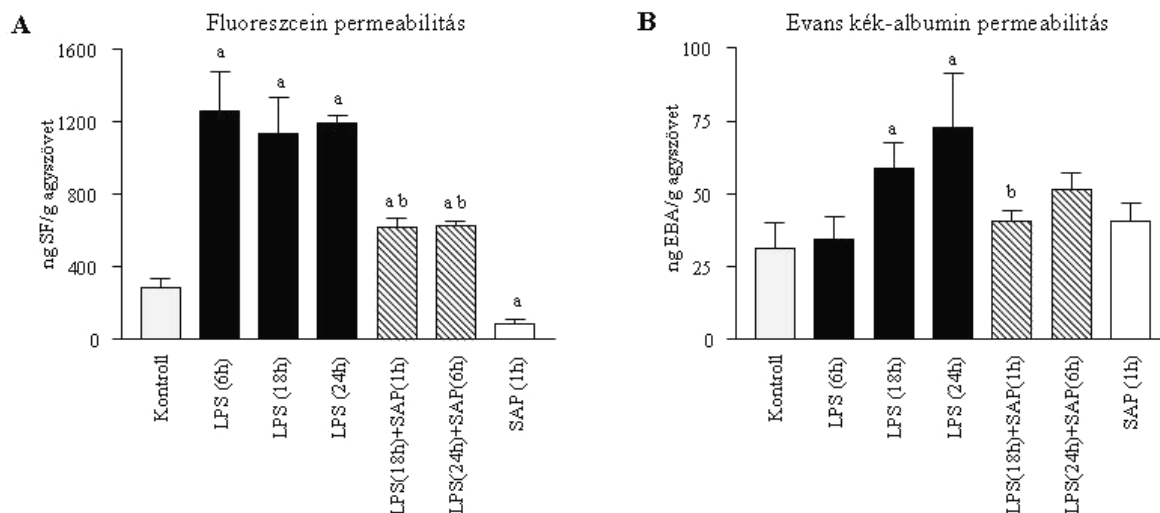
In vivo kísérlet

A Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzéseket gyulladásos és immunreakciók kísérik, mint a láz, a szöveti károsodás és az idegrendszeri működési zavarok. Ezekért a patológiás változásokért elsősorban a bakteriális endotoxin LPS a felelős, amely az immun- és endothelsejteket aktiválva gyulladásos citokinek felszabadulását, és sepsis során magas mortalitással járó sokszervi elégtelenséget vált ki [Karima és mtsai, 1999]. Állatkísérletekben igazolták, hogy az LPS gyulladásos citokineken, a NOS-2 és COX-2 enzimeken és metalloproteinázokon keresztül fokozza a vér-agy gát permeabilitását [Temesvári és mtsai, 1993; Mayhan 2001; Xaio és mtsai, 2001].

A szérum amiloid P-komponens (SAP) a pentraxinok családjába tartozó, májban termelődő és lebomló vérfehérje amely két pentamer gyűrűből áll [de Haas, 1999]. A SAP akut fázis fehérje, vérszintje duplájára nő sepsis során betegekben, egerekben pedig endotoxin kezelés után 24 órával vérben mért mennyisége megtízszereződik [Taktak és Stenning, 1992]. A SAP élettani szerepei közé tartozik, hogy a gyulladás helyén megköti és eltávolítja az elpusztult sejtek törmelékét — akár a szervezet saját sejtjeiből, akár patogénekből képződött — így nagy affinitással köti a bakteriális LPS különböző formáit, és az LPS-t expresszáló Gram-negatív baktériumokat [de Haas, 1999]. A SAP hatása az LPS *in vivo* toxicitásában ellentmondásos: a SAP gátolja az LPS által kiváltott klasszikus komplement aktiválási utat, és semlegesíti az LPS toxicitását *in vitro* [de Haas, 1999]; ugyanakkor a baktériumok megkötése gátolja az opszonizációt, ezáltal fokozza a patogén virulenciáját és a mortalitást egerekben [Noursadeghi és mtsai, 2000]. SAP-deficiens egerekben egyaránt leírtak enyén fokozott érzékenységet, de rezisztenciát is LPS lethális dózisaira [Noursadeghi és mtsai, 2000; Soma és mtsai, 2001]. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a humán SAP hatását a vér-agy gát permeabilitására és a betegség tünetekre LPS-sel kezelt egereken.

Mivel a rágsálók érzékenysége az LPS-re nem túl magas, ismételt nagy dózisu *S. enterica* serovar. *typhimurium* LPS kezelést alkalmaztunk (*intraperitonealisan* 3×3 mg/kg) szakirodalmi adatok alapján [Xaio és mtsai, 2001]. A kezelés harmadik dózisa után az egerekben a gyulladásos citokinek által kiváltott tipikus „betegség viselkedés” (sickness behaviour) alakult ki, az állatok nem mozogtak, alig ettek vagy ittak, a szőrük felborzolódott, a szemük váladékozott, és diarrhoea, valamint a testsúly csökkenése volt megfigyelhető. A SAP (1×8 mg/kg *iv.*) ezeket a tüneteket megszüntette, illetve szignifikánsan javította. Az LPS kezelés nagy mértékben fokozta a

permeabilitási marker fluoreszcein és az albumin extravazációt jelző Evans kék agyba való bejutását, amit már makroszkóposan is lehetett látni, akárcsak a kisagy és középagy területén a bevérvéseket, petechiákat [Veszélka és mtsai, 2003].



42. ábra. Bakteriális lipopoliszacharid (LPS) és humán szérum amiloid P komponens (SAP) hatása a vér-agy gát permeabilitására egerek agykérgében. Kontroll csoport: fiziológiás sóoldat ip.; LPS (6h): kezelés (*S. enterica* serovar. *typhimurium* LPS ip. 3×3 mg/kg [Xaio és mtsai, 2001]) utolsó dózisa után 6 órával; LPS (18h): kezelés után 18 órával; LPS (24h): kezelés után 24 órával; LPS és SAP (kezelt csoportok 18 és 1, illetve 24 és 6 órával az utolsó injekciók után; SAP (1h): SAP kezelt csoport 1 órával az injekció után. SF: fluoreszcein. EBA: Evans kék-albumin komplex. Átlag $\pm$ SEM, $n=5-12$. Szignifikáns különbségek ($P<0,05$) a csoportok között: a: kontrollhoz képest. b: az LPS kezelt csoporthoz képest ugyanabban az időpontban. [Veszélka és mtsai, 2003].

Az LPS kezelés négyszeresére fokozta az agykérgben a fluoreszcein bejutását már 6 órával az utolsó injekció után ami 24 órával később is ugyanilyen szinten maradt. A kisagy és középagy területén ötszörös és hétszeres volt a jelzőanyag átjutás. Ez a fokozott permeabilitás SAP *intravénás* beadása után 1 és 6 órával vizsgálva szignifikánsan csökkent (42. ábra). Az albumin átjutás is megemelkedett 18 és 24 órával az utolsó LPS injekció után mind az agykérgben (42. ábra), mind a kis- és középagyban, amit szintén mérséklődött SAP hatására.

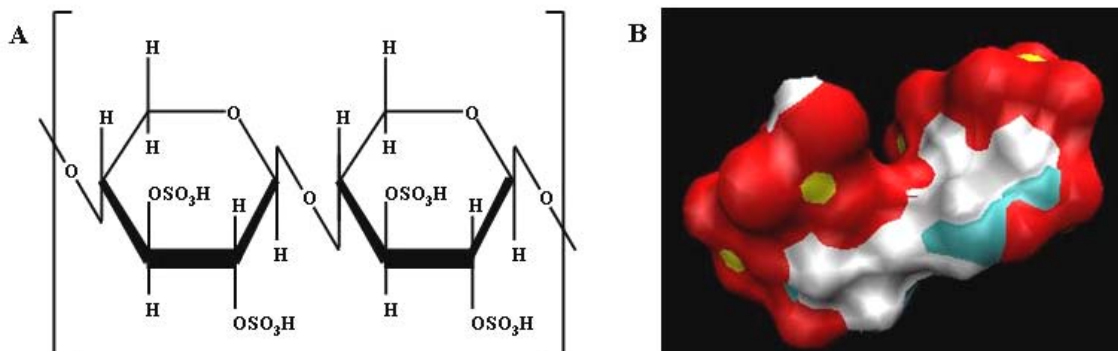
Előként mutattuk ki, hogy a SAP kezelés szignifikánsan csökkentette a fluoreszcein és az albumin átjutását a vér-agy gáton, valamint az endotoxaemia tüneteit LPS kezelt egerekben. A védőhatáshoz hozzájárulhatott a keringő LPS megkötése, illetve a SAP komplement kaskádra, vagy az agyi endothelsejtekre kifejtett hatása.

In vitro kísérletek

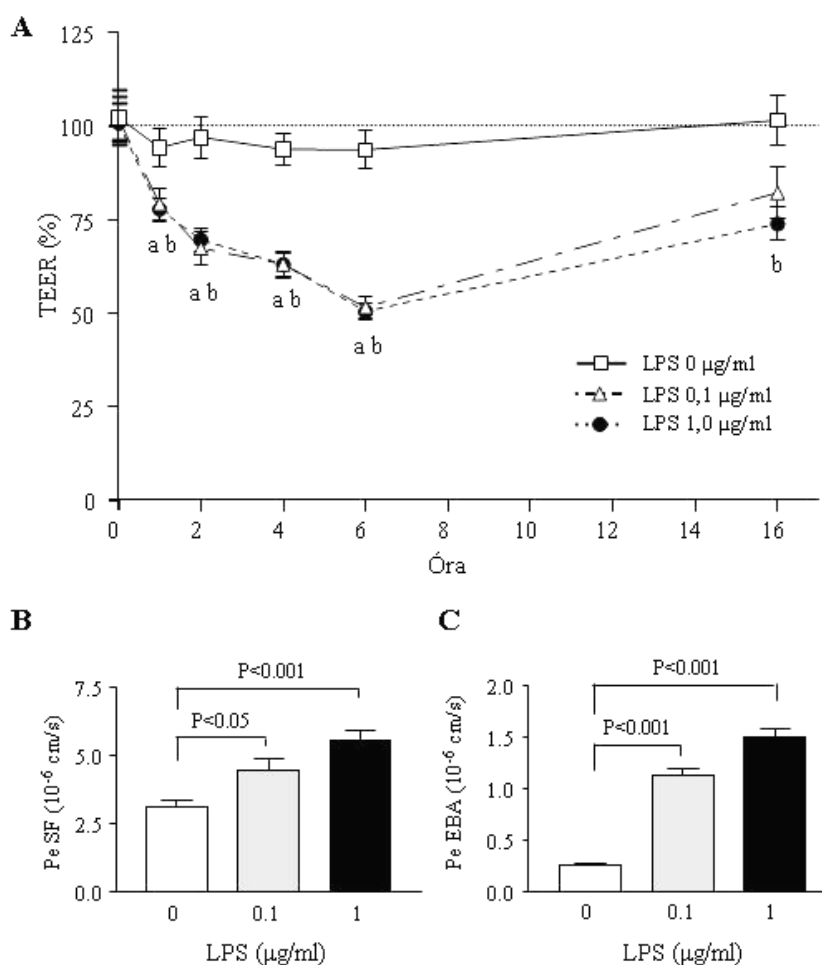
Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az LPS közvetlen hatását, és annak lehetséges mechanizmusát agyi endothelsejteken különböző vér-agy gát funkciókra, valamint a korábbi munkáinkban [Deli és mtsai, 2000] agyi endothelsejtekre protektívnek bizonyuló pentozánt teszteljük.

A pentozán (PPS) a heparinhoz hasonló szerzetű növényi, félszintetikus polianion, ami makromolekulák elegyéből áll [Pubchem adatbázis]. A D-xilóz egységek $\beta(1-4)$ kötással kapcsolódva ismétlődnek benne, és minden tizedik D-xilózhoz egy 4-O-metil-D-glükuronsav kapcsolódik kettes pozíciójú oxigénen keresztül (43. ábra). A szacharidhoz viszonyított szulfát csoportok átlagos száma 1,9, így a heparinnál magasabb a vegyület negatív töltéssűrűsége. A vegyület átlagos molekula-tömege 4700 Da körül mozog [Maffrand és mtsai, 1991]. A PPS szerkezete hasonlít a sejtek endogén glükózaminoglikánjaihoz; és ez a molekula a szulfátcsoportok nagy száma, a nagy töltéssűrűség és pálca alakú szerkezete (43. ábra) miatt hatásosabb kompetitora az endogén glükózaminoglikánoknak, mint a többi polianion, például a heparin, a heparánszulfát, vagy a dermatánszulfát. Ebből adódóan a PPS számtalan élettani és gyógyszer-tani hatását írták le [Maffrand és mtsai, 1991; Ghosh 1999]. A PPS-t a klinikumban véralvadásgátlóként (SP54, bene-Arzneimittel GmbH) és interstitiális vérzéses

cystitis kezelésére használják. Emellett kísérletes és klinikai eredmények alapján terápiás hatását mutatták ki az alábbi betegségekben: osteoarthritis, retrovírus fertőzések, szívinfarktus, és agyvérzés [Maffrand és mtsai, 1991; Ghosh 1999; Szirmai és mtsai, 1993]. A PPS hatékonynak bizonyult prion betegségek állatmodelljeiben is.

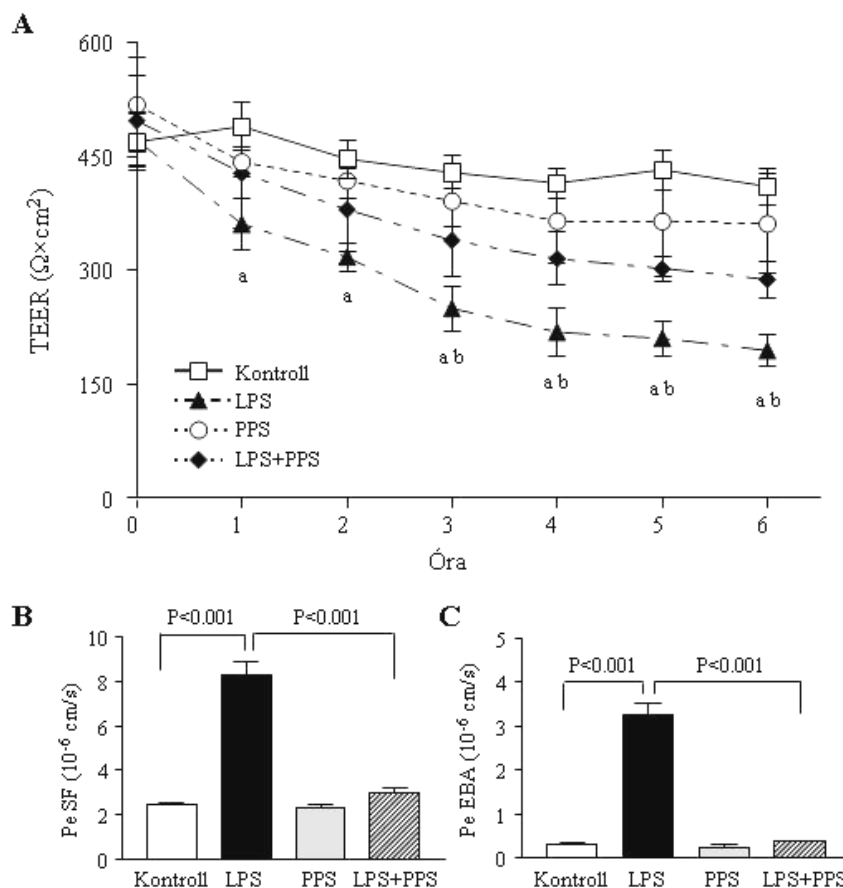


43. ábra. A pentozán kémiai (A) és háromdimenziós (B) szerkezete. [Ghosh 1999].



44. ábra. Elektromos ellenállás (A), és permeabilitás fluoreszceinre (B) és albuminra (C) patkány agyi endothelsejtekben 16 órás *S. typhimurium* lipopoliszacharid (LPS) kezelés után. TEER: elektromos ellenállás; Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SEM, $n=4-8$. Szignifikáns különbségek ($P<0,05$) az LPS kezelt csoportok a: 0,1 µg/ml, b: 1 µg/ml és a kontroll között. [Veszélka és mtsai, 2007].

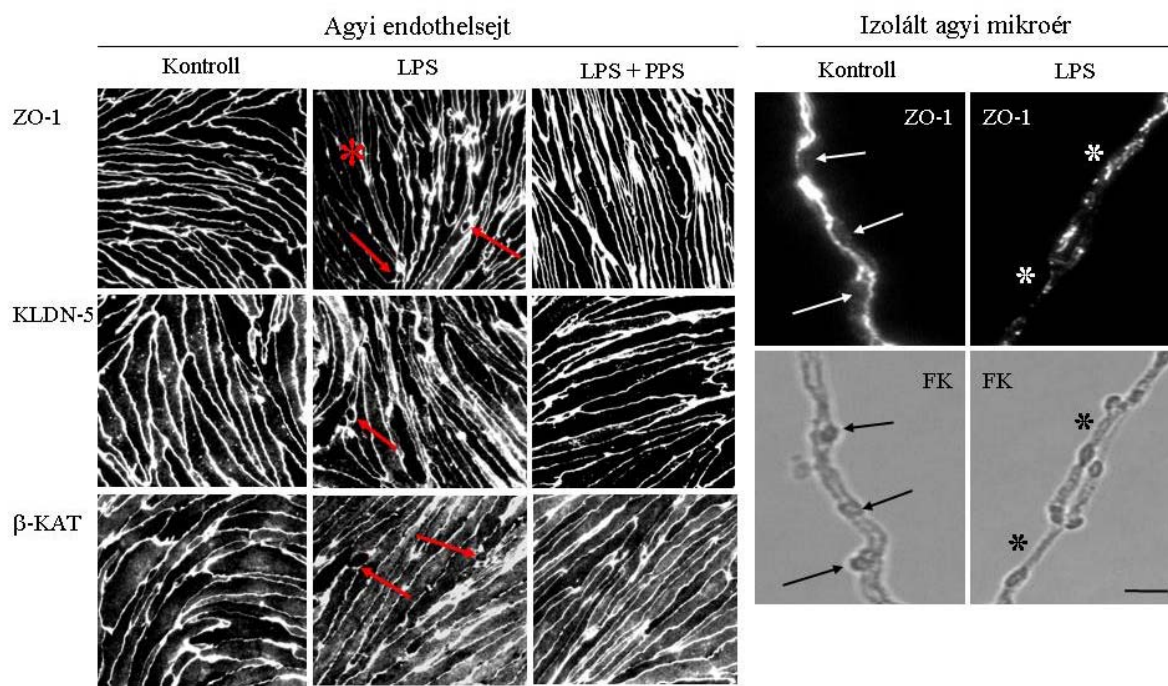
Az agyi endothelsejteket gliasejtekkel tenyésztettük együtt, hidrokortizonnal és cAMP-vel kezeltük [Perrière és mtsai, 2005]. Az endothel-egysejtrétegek barrier funkcióját az LPS kezelés dózis- és időfüggő módon rontotta (44. ábra). A rezisztencia már az első órában csökkent, és ez a tendencia a 6. óráig folytatódott, azonban a 16. órában a minimumhoz képest részleges javulást mértünk. A kontroll sejtrétegek ellenállása nem tért el az ellenállás kiindulási értékeitől ($302,6 \pm 10,9 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=16$). Ezzel párhuzamosan a fluoreszcein átjutás az 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nagyobbik LPS koncentrációnál mintegy kétszeresére, az albumin átjutás pedig ötszörösére, illetve hatszorosára nőtt a két LPS koncentráció hatására (44. ábra).



45. ábra. Elektromos ellenállás (A), és permeabilitás fluoreszceinre (B) és albuminra (C) patkány agyi endothelsejteken 6 óráig *E. coli* O111:B4 lipopoliszacharid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; LPS) és pentozán (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; PPS) kezelés után. TEER: elektromos ellenállás; Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SEM, $n=6$. Szignifikáns különbségek ($P<0,05$) az LPS kezelt valamint a: kontroll, b: LPS+PPS csoportok között. [Veszélka és mtsai, 2007].

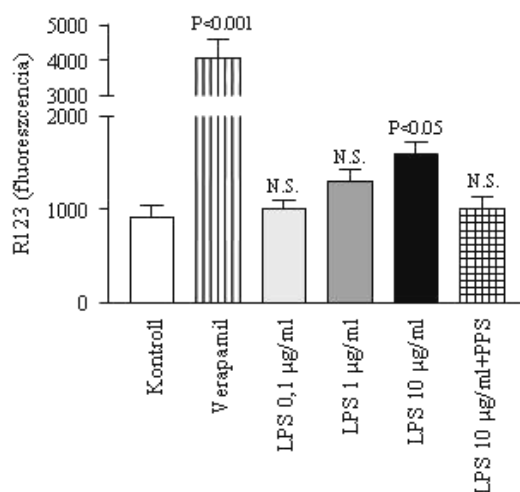
A pentozán (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) önmagában nem befolyásolta az agyi endothelsejteket sem az ellenállását, sem a permeabilitását (45. ábra), ugyanakkor LPS-sel együtt adva csökkentette az LPS által okozott rezisztencia esést és kivédte a fokozott paracelluláris fluoreszcein permeabilitást és transzcellulárisan az albumin átjutását.

A paracelluláris permeabilitás fokozódása a sejtek közötti kapcsolatok gyengülésével járt, amit immunfestéssel igazoltunk (46. ábra). A ZO-1, kladin-5 és β -katenin festődés intenzitása és mintázata is megváltozott hatórás LPS kezelés után, amikor a legalacsonyabb rezisztenciát mértük. A kontroll sejtekben látható egyenletes, sejthatárra lokalizálódó, övszerű jelölődés felszakadozott, helyenként eltűnt, és a sejtek között lyukak jelentek meg. A pentozán együttes adása megvédte az endothelsejteket, és a kontrollhoz hasonló festődést lehetett megfigyelni. Az LPS hatását frissen izolált patány agyi hajszálereken is igazoltuk (46. ábra). A ZO-1 festődés az endothelsejteken folyamatos és erős jelet adott. LPS kezelés után a jelölődés intenzitása gyengült, és fragmentálódást lehetett megfigyelni.



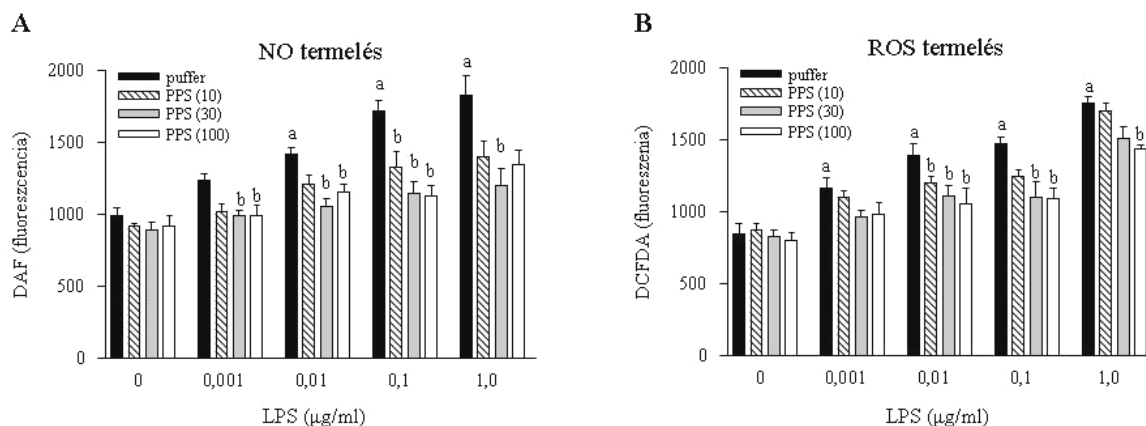
46. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek patkány agyi endothelsejtekről és frissen izolált agyi hajszálerekről kontroll állapotban és 6 órás lipopoliszacharid (1 µg/ml; LPS) és pentozán (100 µg/ml; PPS) kezelés után. Immunfestések junctionális fehérjékre. ZO-1: *Zonula occludens* fehérje-1; KLDN-5: kladin-5; β-KAT: β-katenin. A piros színű csillag az endothelsejteken a festődés gyengülését és felszakadozását, a piros nyilak a sejtek közötti lyukakat jelzik. A fehér és fekete nyilak a pericytákat, a fehér és fekete csillagok a csak agyi endothelsejteket tartalmazó érszakaszokat jelzik. Mércse sejteknél: 50 µm, hajszálereknél: 10 µm. [Veszélka és mtsai, 2007].

A barrier működés mellett az efflux pumpa aktivitást is megvizsgáltuk. Az LPS kezelés a legnagyobb 10 µg/ml koncentrációnál szignifikáns módon, 50%-kal fokozta a rodamin-123 szubsztát sejten belüli felhalmozódását, ami a P-glikoprotein pumpa aktivitásának gátlását jelenti (47. ábra). A kalciumcsatorna-blokkoló verapamil, a Pgp ismert gátlószere, amit referenciaként használtunk, négyszeresére fokozta a rodamin dúsulását, a tenyésztéses vér-agy gát modellünk más kísérletekben mért jó funkcióival összhangban [Perrière és mtsai, 2007].



47. ábra. A P-glikoprotein pumpa aktivitásának tesztelése rodamin-123 felhalmozódásának mérésével agyi endothelsejteken kontroll állapotban, 16 órás lipopoliszacharid (LPS) és pentozán (30 µg/ml; PPS) kezelés után. Pozitív kontroll: verapamil (2 µM), a pumpa gátlószere. Átlag ± SEM, n=5-6. R123: rodamin-123. N.S.: nincs szignifikáns különbség. [Veszélka és mtsai, 2007].

Az LPS hatásának további feltárásához megmértük agyi endothelsejteken a szabadgyökök termelődését (48. ábra). Dózis-függő hatást találtunk: amíg a legkisebb, 1 ng/ml LPS koncentrációnál nem volt szignifikáns változás, nagyobb dózisoknál fokozatos emelkedést láttunk a nitrogén-monoxid mennyiségben, amit a pentozán együttes adása csökkentett. A legnagyobb, 1 µg/ml endotoxin koncentráció duplájára növelte a szabad oxigéngyökök termelődését, amit a pentozán szignifikáns módon csökkentett. Mindkét mérésben a pentozán két magasabb koncentrációja bizonyult hatékonynak.



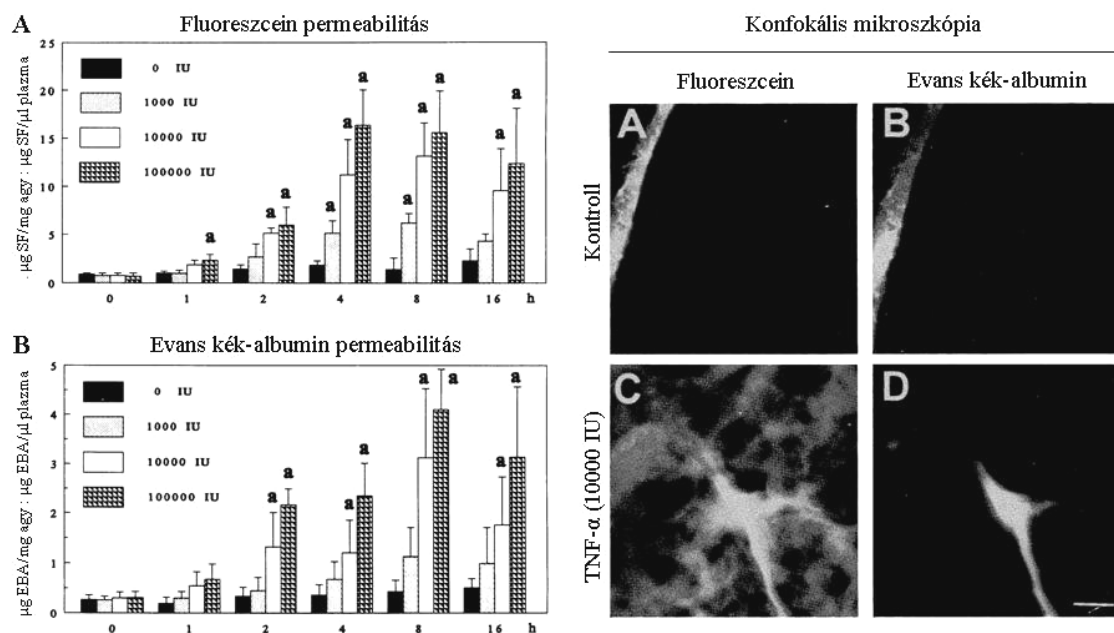
48. ábra. A: Nitrogén-monoxid (NO) és B: reaktív szabad oxigéngyökök (ROS) termelődése agyi endothelsejteken kontroll állapotban, 16 órás lipopoliszacharid (LPS) és pentozán (PPS) kezelés után. DAF: 4-amino-5-metil-amino-2,7-difluoro-fluoreszcein-diacetát. DCFDA: klorometil-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát. Átlag ± SEM, n=4-6. Szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) az LPS kezelt valamint a: kontroll, LPS-sel nem kezelt (első oszlopcsoport), b: LPS+PPS csoportok között. [Veszélka és mtsai, 2007].

Vér-agy gát modellünkön kimutattuk, hogy az agyi endothel-egysejtrétegek integritását az LPS kezelés közvetlenül károsítja; a sejtrétegek elektromos ellenállását csökkenti, áteresztőképességét növeli. Ezzel párhuzamosan az endothelsejtek kapcsoló fehérjéinek immunfestése is megváltozott. Elsőként írtuk le, hogy (i) a barrier funkció romása mellett az elsődleges efflux pumpa P-glikoprotein aktivitása is csökkent. (ii) Az agyi endothelsejtek LPS hatására fokozott mértékben termeltek nitrogén-monoxidot és szabadgyököket, ami hozzájárulhat az endotoxin pathomechanizmusához. (iii) A pentozán kivédte az LPS károsító hatásait mind a sejtek morfológiájára, mind működésére nézve.

IV. A tumor nekrosis faktor- α hatása a vér-agy gát permeabilitására

A tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) számos különböző, a központi idegrendszert érintő, és szisztémás fertőző betegség, mint a HIV-1 encephalopathia, az agyi malária, az újszülöttkori bakteriális meningitisek, és a sepsis pathogenetikus faktora [Beutler és Grau, 1993; Feuerstein és mtsai, 1994]. Megyeri és mtsai elsőként igazolták nyitott koponyaablak technikát alkalmazva, hogy az *intracisternálisan* adott TNF- α újszülött sertésekben vér-agy gát megnyílást hoz létre fluoreszceinre [Megyeri és mtsai, 1992]. Ezzel egyezően a közvetlenül agyba injektált citokin fokozta különböző makromolekulák agyba jutását [Kim és mtsai, 1992; Wright és Merchant, 1994]. Amíg klinikai vizsgálatok összefüggést tárt fel sclerosis multiplexben szenvedő betegek szérumban TNF- α szintje és a vér-agy gát károsodás között [Sharief és Thompson, 1992], a szisztémásan adott TNF- α hatásairól állatkísérletekben ellentmondásos adatok jelentek meg.

Újszülött sertéseken megvizsgáltuk az *a. carotis internába* adott TNF- α hatását a vér-agy gát permeabilitására olyan dózisokban, ami megfelel a sepsis során újszülöttekben mért szérumszinteknek. Az egyszerre beadott két jelzőanyag, a kis molekula fluoreszcein, és az Evans kék, ami a szérumban albuminnal komplexet alkot, mennyiségét spektrofotometriával határoztuk meg különböző agyterületeken a beadás után 5 időpontban (49. ábra). Ezzel párhuzamosan agykéreg minták metszetein az extravazációt konfokális mikroszkópiával tettük láthatóvá, amire az adott lehetőséget, hogy az Evans kék festék lézerekkel történő gerjesztés után vörös fluoreszcens fényt ad.



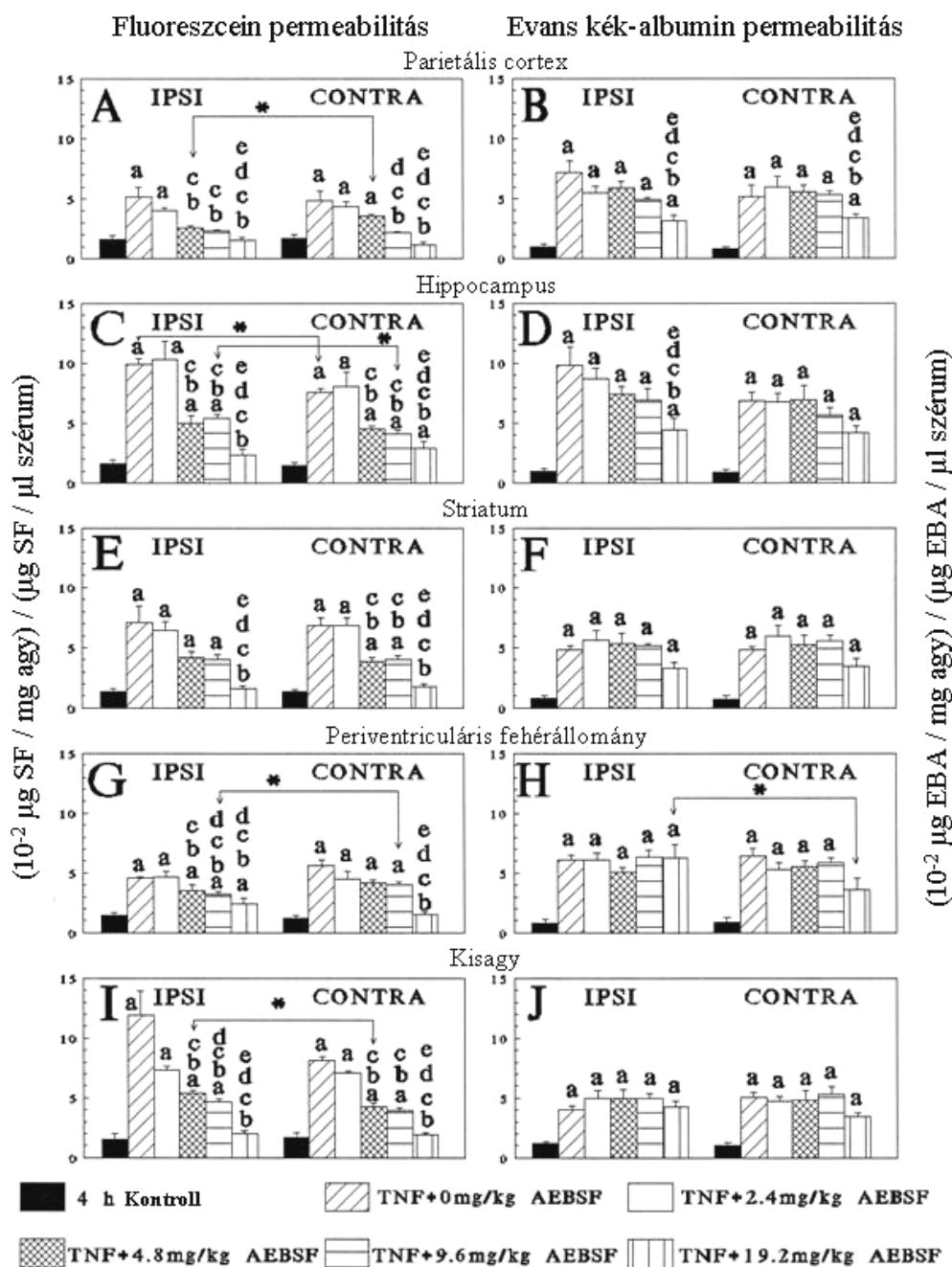
49. ábra. Tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) hatása a vér-agy gát permeabilitására újszülött sertésekben. Bal oldalon A és B: a fluoreszcein és az Evans-kék albumin extravazációjának mérése a bal parietális cortexben 0, 1000, 10000, és 100000 IU TNF- α bal *a. carotis*ba történő beadása előtt, illetve után 1, 2, 4, 8 és 16 órával. SF: fluoreszcein, EBA: Evans kék-albumin. Átlag $\pm$ SEM, a: szignifikáns különbség ($P < 0,05$) azonos időpontban a kontroll csoporthoz képest. Konfokális mikroszkópos képpárok kontroll (A és B) és TNF- α kezelt (10000 IU, 4 óra; C és D) állatok bal parietális cortexéből készült metszetekről amelyeket fluoreszceinre, és a gerjesztésre vörös fluoreszcens jelet adó EBA-ra pásztáztunk. Mércse: 25 μ m. [Ábrahám és mtsai, 1996].

Az *a. carotis internába* adott TNF- α hatására koncentráció- és idő-függő vér-agy gát megnyílást mértünk a baloldali parietális cortex mintákban mind a két markerre (49. ábra). A paracelluláris permeabilitást mutató fluoreszcein szintje szignifikánsan magasabb volt az agyban minden időpontban, míg a transzendotheliálisan átjutó EBA mennyisége a citokin beadása utáni második órától növekedett a 8. órában mintegy tízszeresére a legnagyobb koncentrációknál [Ábrahám és mtsai, 1996]. A metszeteken a kontroll csoportban egyik markerre sem láttunk intraparenchymális festődést, csak az agyhártyákban kaptunk a fluoreszceinre erős, az EBA-ra gyengébb jelet (49. ábra, A és B képpár). A TNF- α diffúz fluoreszcein beáramlást, és perivascularis EBA extravazációt eredményezett (49. ábra, C és D kép-pár). [Ábrahám és mtsai, 1996].

A fehérvérsejtek, endothelsejtek és az agy sejtjeinek szabad oxigéngyök termelése részt vesz a TNF- α által létrehozott agyi károsodásokban [Feuerstein és mtsai, 1994]. Feltételezhető, hogy az akut vér-agy gát megnyíláshoz, ami TNF- α cisternába vagy carotisba injektálása után jön létre [Megyeri és mtsai, 1992; Ábrahám és mtsai, 1996], a fehérvérsejtek is hozzájárulnak, mivel a citokin közvetlen hatása agyi endothelsejteken sokkal elnyújtottabb kinetikát mutat [Deli és mtsai 1995; Deli, Ph.D. értekezés, 1996]. A TNF- α fenntartja humán monocyták magas szuperoxid termelését amit a vízoldékony, nem toxikus, irreverzibilis szerin proteáz gátló 4-(2-aminoetil)benzénszulfonil-fluorid (AEBSF; Pefabloc) hatékonyan gátolt [Megyeri és mtsai, 1995]. Ezek alapján szeretnénk volna a korábban használt újszülött sertés modellen megvizsgálni, hogy a szerin proteáz gátlás befolyásolja-e a TNF- α kiváltotta vér-agy gát permeabilitás fokozódást.

Az előző kísérletünkhöz hasonlóan a bal carotisba injektált 10000 IU TNF- α -val váltottuk ki a vér-agy gát megnyílást. Az állatokat egy órával a TNF- α beadása előtt előkezeljük az AEBSF különböző dózisaival (0; 2,4; 4,8; 9,6 és 19,2 mg/kg). A permeabilitást a TNF- α kezelés után 4 órával fluoreszcein és Evans kék jelzőanyagokkal mértük öt agyterületen (parietális cortex, hippocampus, striatum, periventricularis fehér állomány, kisagy). Az AEBSF előkezelés dózis-függő módon, a 4,8 – 19,2 mg/kg koncentrációknál szignifikánsan gátolta a TNF- α által okozott vér-agy gát permeabilitás fokozódást fluoreszceinre mind az öt agyterületen. [Megyeri és mtsai, 1999]. A legnagyobb koncentráció teljesen kivédte a vér-agy gát megnyílást. Ezzel szemben az albumin

átjutást csak a legnagyobb koncentráció tudta csökkenteni két agyterületen, a parietális cortexben és a hippocampusban (50. ábra).

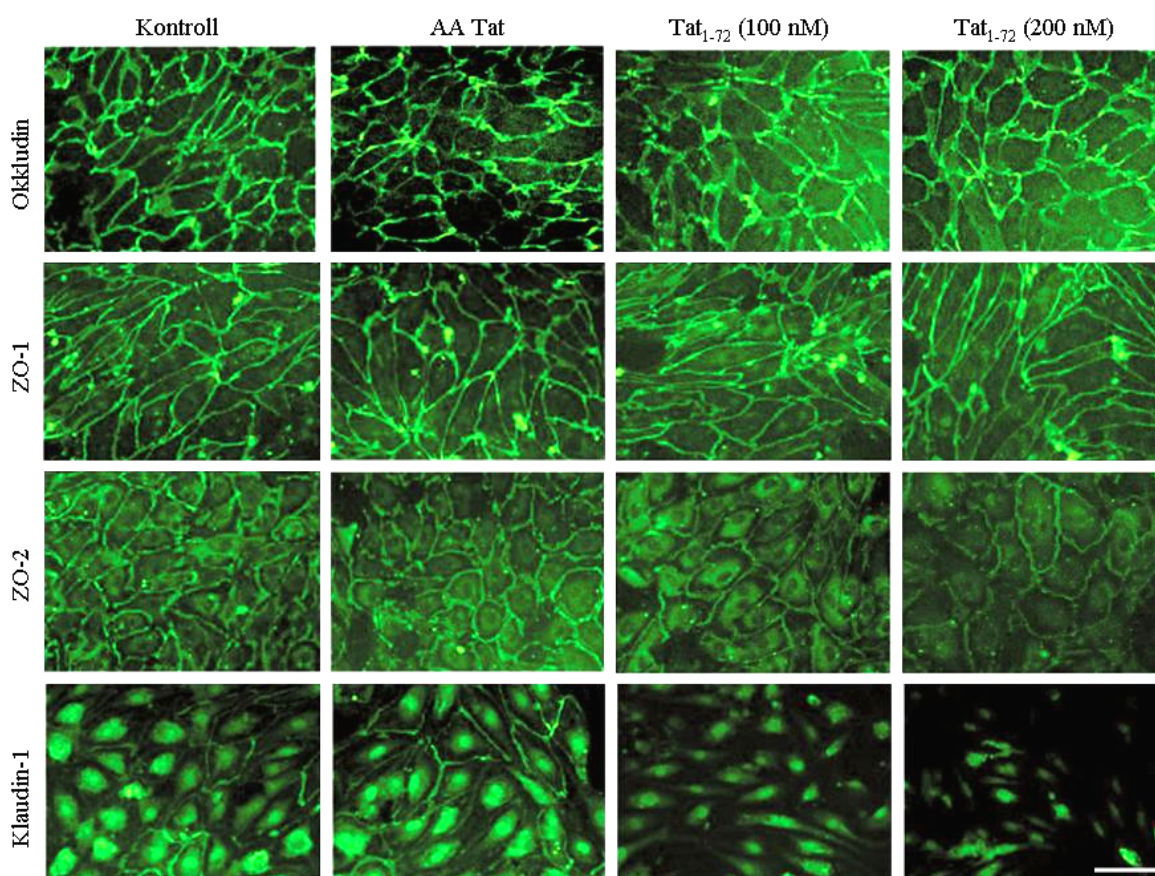


50. ábra. AEBSF szerin proteáz gátló előkezelés hatása a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α ; 10000 IU, bal *a. carotis*ba történő beadás, 4 óra) kiváltotta vér-agy gát permeabilitás fokozódásra újszülött sertésekben. SF: fluorescein, EBA: Evans kék-albumin, IPSI: a TNF beadással azonos, ipsilaterális oldal, CONTRA: azonos agyterület, contralaterális oldal. Átlag $\pm$ SEM, $n=6$ csoportonként. Szignifikáns különbség ($P<0,05$) a: kontroll csoporthoz képest, illetve TNF-kezelt csoportokhoz képest, amelyek a következő dózisu AEBSF előkezelést kapták b: 0 mg/kg; c: 2,4 mg/kg; d: 4,8 mg/kg; e: 9,6 mg/kg. *: azonos agyterület ipsi- és contralaterális oldala közti szignifikáns különbség [Megyeri és mtsai, 1999].

Adataink alapján feltételezhető, hogy (i) az újszülöttkori súlyos infekciókban vér-agy gát megnyílás és következményes vazogén agyödéma alakulhat ki, aminek egyik mediátora a TNF- α , (ii) a szerin proteázok, mint például a matrix metalloproteinázok, szerepet játszanak a vér-agy gát pathológiás megnyílásában és gátlásuk terápiás hatású lehet.

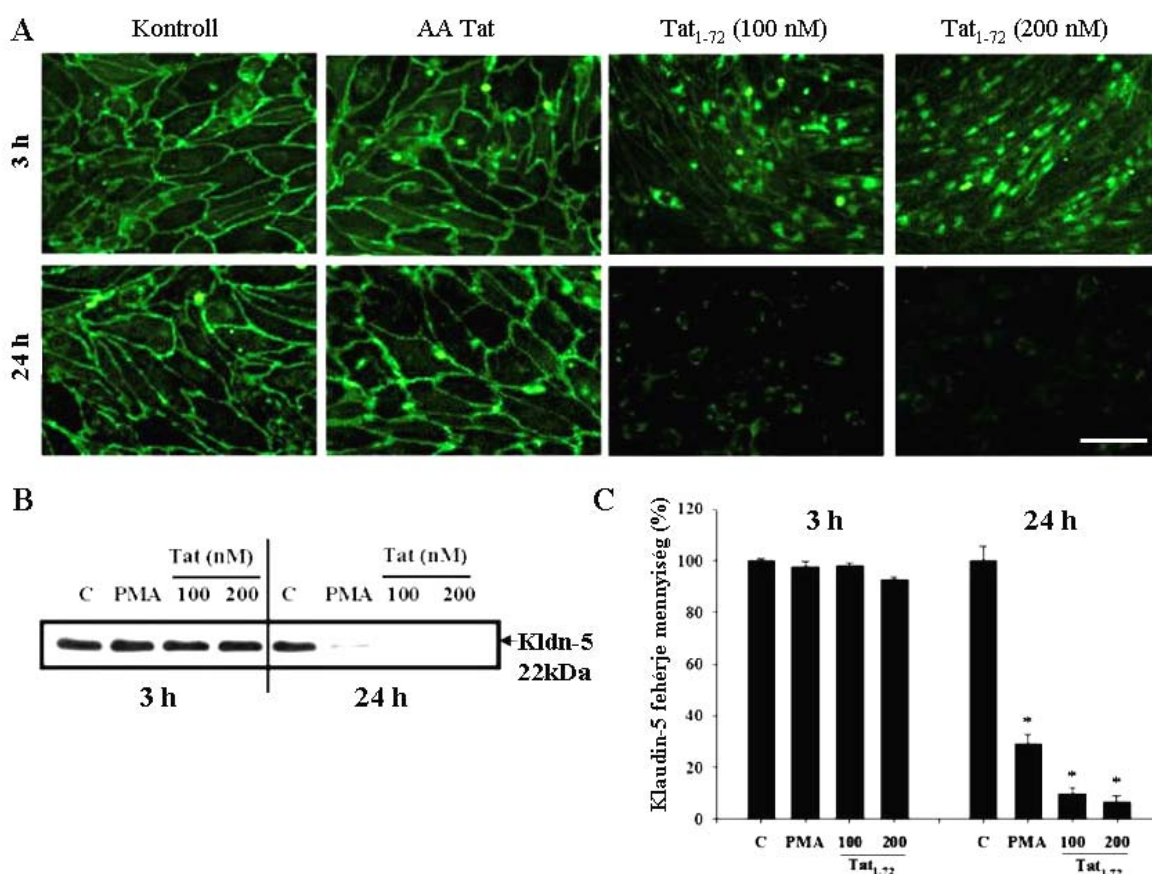
V. HIV-1 Tat burokfehérje hatása agyi endothelsejtek kapcsolófehérjéire

A vér-agy gát megnyílását tartják a HIV-1 vírus idegrendszerbe való bejutása fő útjának. Ennek során az agyi endothelsejtekkel való kölcsönhatásában a vírus burokfehérjei is részt vesznek. Mivel az agyi endothelsejtek közötti szoros kapcsolatok fő alkotói az integrális TJ membránfehérjék, és az azokhoz citoplazmatikusan kapcsolódó fehérjék, feltételeztük, hogy ezeknek a fehérjéknek a megváltozott kifejeződése és sejten belüli eloszlása hozzájárulhat a folyamathoz. A Tat fehérje egy olyan szolubilis virális faktor, amely a fertőzött sejtekből kiszabadulva a HIV-1 fertőzés számos tünetét okozza. Részt vesz a vírus replikációjában, erősen pozitív töltésű szakaszai segítségével áthatol a sejtek membránján. Magas Tat szintet mértek AIDS betegek agyszövet mintáiban [Hudson és mtsai, 2000]. Az ideg- és gliasejtekre citotoxikus Tat fehérjét [Haughey és Mattson, 2002] teszik felelőssé a HIV fertőzés során létrejövő neuropathológiai változásokért [Li és mtsai, 2009]. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a Tat fehérje milyen hatást fejt ki az agyi endothelsejtek barrier funkcióját szabályozó szoros kapcsolatok fehérjéire.



51. ábra. HIV-1 Tat₁₋₇₂ kezelés hatása patkány agyi endothelsejt tenyészeteken. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek kontroll állapotban, 24 órás Tat₁₋₇₂ (100 és 200 nM) és antitesttel immunadszorbeált peptid (AATat, specificitás kontroll) kezelés, okkludin, ZO-1, ZO-2 és klaudin-1 immunfestések után. Mércé: 25 µm. [András és mtsai, 2003].

Huszonnégy órás Tat₁₋₇₂ kezelés hatására szelektív módon változott agyi endothelsejtekben a TJ fehérjék immunfestődése (51. ábra). Az okkludin és ZO-1 fehérjék sejthatáron látható festődése nem változott Tat hatására, amit a Western blot kísérletekben a fehérjék változatlan mennyisége is alátámasztott [András és mtsai, 2003]. Ezzel szemben a klaudin-1 és a ZO-2 fehérjéknek a kezelés után a sejthatáron csökkent a mennyisége, ez a klaudin-1 esetében teljesen eltűnt. A ZO-2 esetében is lecsökkent az expresszálandó fehérje mennyisége, és a fehérje megoszlása is megváltozott, csökkent festődést láttunk membránban, és fokozott jelölődést a citoplazmában, amit a Western blot eredmények megerősítettek [András és mtsai, 2003]. A ZO-2 fehérje festődési mintázatának megváltozása összefüggében áll biológiai szerepével, hiszen a sejtszerkezet stabilizálása mellett a sejtmagba bejutva átíróadási faktorként szabályozni tudja a génkifejeződést [Islas és mtsai, 2002].

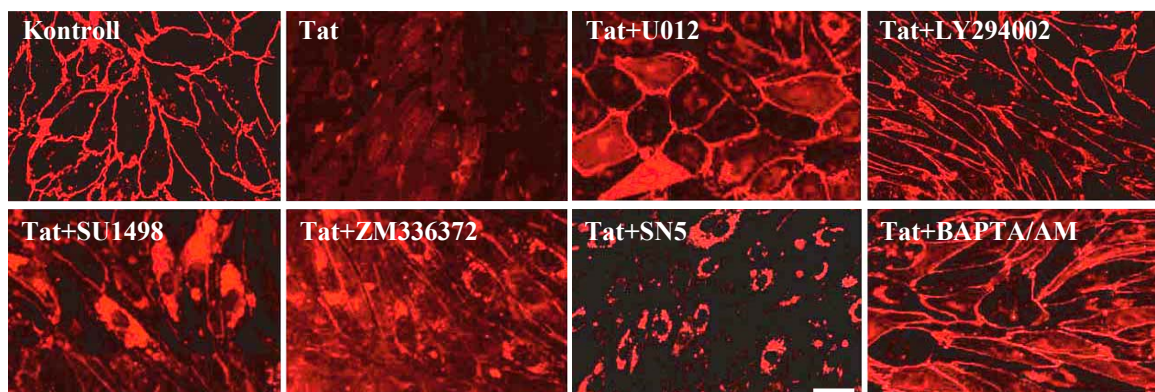


52. ábra. HIV-1 Tat₁₋₇₂ kezelés hatása patkány agyi endothelsejt tenyészeteken. A: Fluoreszcens mikroszkópos felvételek kontroll állapotban, 3 és 24 órás Tat₁₋₇₂ (100 és 200 nM) és antitesttel immunadszorbeált peptid (AATat, specificitás kontroll) kezelés, majd klaudin-5 (Kldn-5) immunfestés után. Mércse: 25 μ m. B: Klaudin-5 fehérje mennyiség meghatározása Western blottal. PMA: 50 ng/ml forbolészter kezelés. C: a fehérjesávok denzitometriás analízise a kontrollhoz viszonyítva [András és mtsai, 2003].

A legszembetűnőbb változás a klaudin-5 festődésben mutatkozott (52. ábra). A klaudin-1 TJ fehérjéhez hasonlóan eltűnt az endothelsejtek közötti kapcsolatokról. A rövidebb, 3 órás Tat kezelés csak a fehérje sejten belüli eloszlásának megváltozását, a mag körüli elhelyezkedését serkentette, a hosszabb kezelés hatására a fehérje mennyisége egytizedére csökkent (52. ábra, Western blot). Ez a hatás Tat-specifikus, idő- és koncentrációfüggő volt. A protein kináz C agonista forbolészter kezelés utánosztta ezt a hatást. A Tat hatását állatkísérletben is bizonyítottuk. Hippocampusba adott Tat₁₋₇₂ az agyi endothelsejtek klaudin-5 festődésének felszakadozását, és integrin α M immunpozitív sejtek, feltehetően aktivált monocyták infiltrációját hozta létre. Kontroll állatokban (Tat helyett szérumban albumin injektálás történt a hippocampusba) a klaudin-5 festődés nem változott, és integrin α M immunpozitív sejt sem volt megfigyelhető [András és mtsai, 2003].

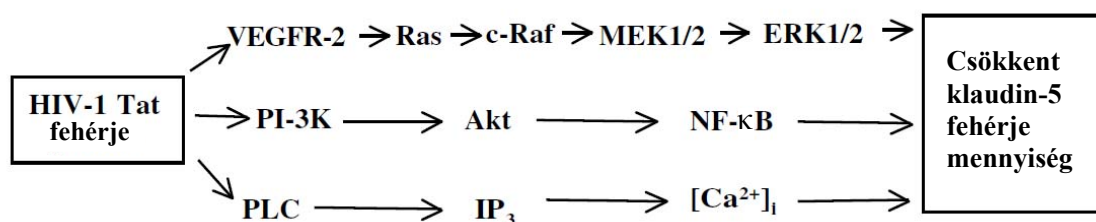
A Tat hatás mechanizmusának feltárásához különböző szignálutak gátlószereivel kezeltük elő az agyi endothelsejteket a 24 órás peptidkezelés előtt [András és mtsai, 2005]. A mitogén-aktivált protein kináz kináz 1/2 (MEK1/2) antagonistája U0126 (20 mM) kivédte a Tat hatását, a sejtek határán megmaradt a klaudin-5 immunfestődés (53. ábra), és a fehérje szintje sem csökkent a sejtekben [András és mtsai, 2005].

Részleges védelmet nyújtott a Tat által kiváltott klaudin-5 expresszió csökkenés és sejten belüli átrendeződés ellen a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI-3K) inhibitora, az LY294002 (100 nM), az ér-endothel növekedési faktor receptor 2 (VEGFR-2) antagonistája SU1498 (1 mM), a c-Raf protein kinázt gátló ZM336372 (0.5 mM), a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) transzlokációját gátló SN50 peptid (2 mM), és a sejten belüli szabad kalcium mennyiségét csökkentő kelátor, a BAPTA/AM (5 mM). (53. ábra) [András és mtsai, 2005].



32. ábra. HIV-1 Tat₁₋₇₂ kezelés hatása patkány agyi endothelsejt tenyészeteken. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek kontroll állapotban, jelátviteli utak gátlószereivel történő előkezelés (15 perc), 24 órás Tat₁₋₇₂ (100 nM) kezelés, végül klaudin-5 immunfestés után. U0126: mitogén-aktivált protein kináz 1/2 (MEK1/2) antagonistája (20 mM); LY294002: foszfatidilinozitol-3-kináz (PI-3K) inhibitora (100 nM); SU1498: érendothel növekedési faktor receptor 2 (VEGFR-2) antagonistája (1 mM); ZM336372: c-Raf protein kináz gátlószere (0.5 mM); SN50: a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) transzlokációját gátló peptid (2 mM); BAPTA/AM: intracelluláris kalcium kelátor (5 mM). Mérete: 25 μ m. [András és mtsai, 2005].

Ezek az adatok arra utalnak, hogy legalább három olyan jelátviteli út aktiválódik a Tat hatására agyi endothelsejtben, amely a sejtközötti kapcsoló fehérje klaudin-5 kifejeződését befolyásolja (54. ábra). A VEGFR-2 stimulációja aktiválja a Ras/c-Raf/ERK1/2 utat. Emellett a PI-3K/Akt/NF- κ B útvonal, és a kalcium-függő jelátvitel is részt vesz a klaudin-5 szabályozásában.



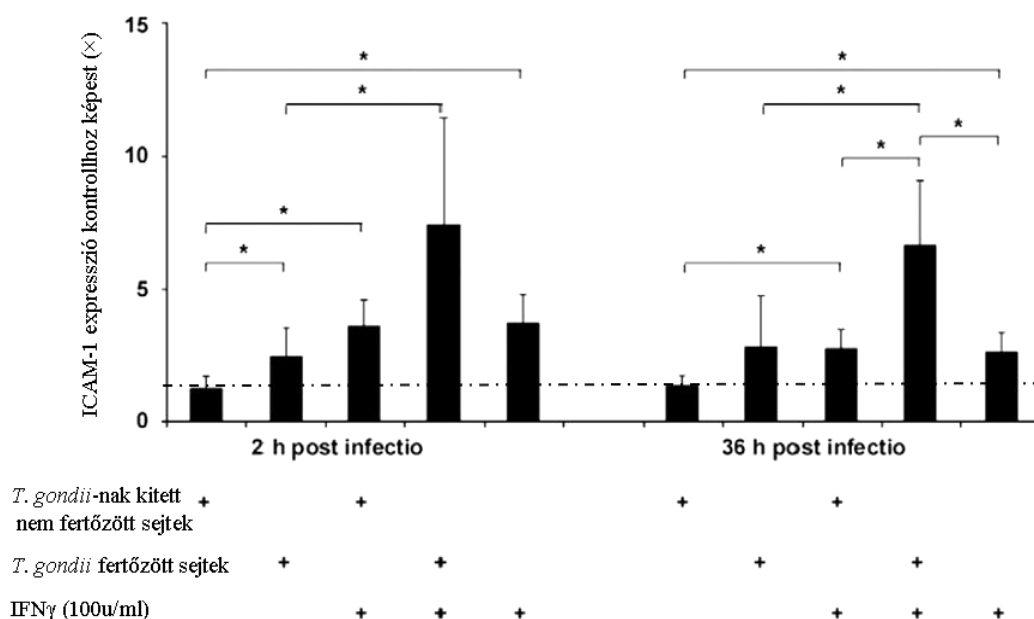
54. ábra. Jelátviteli utak, amelyek részt vesznek a HIV-1 Tat hatására létrejövő klaudin-5 expresszió változásában agyi mikroér endothelsejtben [András és mtsai, 2005].

Sikerült elsőként igazolnunk, hogy a HIV-1 vírus Tat fehérjéje specifikusan hat agyi endothelsejtben a klaudin-1, klaudin-5 és ZO-2 fehérjék kifejeződésére és megoszlására. Feltártuk, hogy a VEGFR-2 aktiválás, és legalább három jelátviteli út vesz részt a klaudin-5, az agyi endothelsejtek legfontosabb kapcsolófehérjéjének csökkenésében. Ezek a változások hozzájárulhatnak a vér-agy gát permeabilitásának megnövekedéséhez, és a HIV vírus bejutásához a központi idegrendszerbe.

VI. *Toxoplasma gondii* átjutásának vizsgálata *in vitro* vér-agy gát modellen

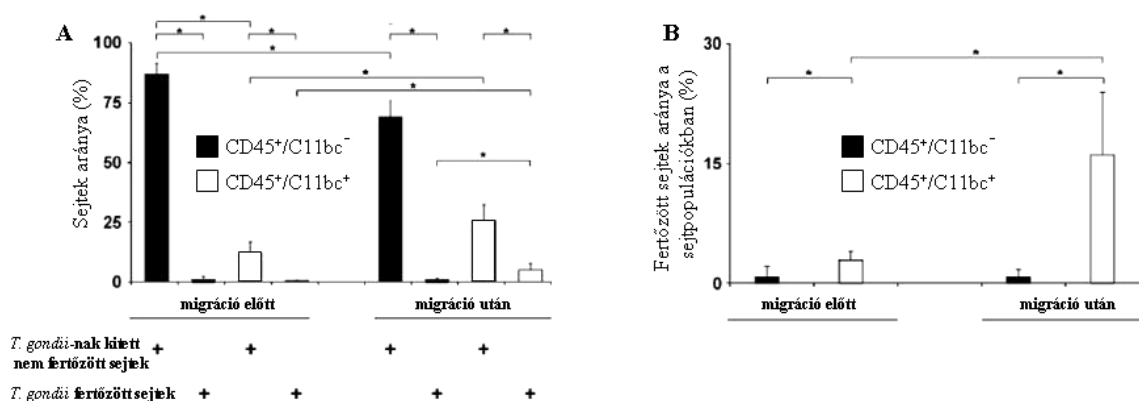
A protozoa parazita *Toxoplasma gondii* lappangó idegrendszeri fertőzést okoz immunkompetens gazdaszervezetben, de immundeficiens állapotokban, így különösképpen AIDS-ben reaktiválódik, ami kezelés nélkül fatális kimenetelű encephalitist eredményez [Dellacasa-Lindberg és mtsai, 2007]. A *T. gondii* vér-agy gáton való átjutásának mechanizmusa nem ismert, az utóbbi évek vizsgálatai feltételezik, hogy ebben a gazdaszervezet fehérvérsejtjei vesznek részt [Unno et al., 2008].

Primer patkány agyi endothelsejteken megvizsgáltuk a *T. gondii* két különböző törzsével történő fertőzés hatására az adhézios molekulák és citokinek expressziójának változását. Ko-kultúra modellen teszteltük, hogy milyen a naiv, illetve fertőzött, perifériás vérből szeparált mononukleáris sejt alcsoportok migrációs kapacitása, mely sejtípusok vehetnek részt a *T. gondii* vér-agy gáton való átjutásában [Lachenmaier és mtsai, 2011].



55. ábra. A sejt-közötti adhéziónak molekulá-1 (ICAM-1) expressziójának változása *T. gondii* fertőzés után primer agyi mikroér endothelsejtekben. Az endothelsejtek 48h IFN γ (100 IU/ml) előkezelés után (+) vagy nélkül *T. gondii* RH törzs zöld fluoreszcens fehérjével (GFP+) láthatóvá tett tachyzoitáival inkubáltuk. Az infekció után 2 és 36 órával a fertőzött (zöld fluoreszcenciát adó) és nem fertőzött sejteken az ICAM-1 expressziójának mérése áramlási citometriával történt. Az átlagos fluoreszcencia intenzitás szintje többszöröse a kontrollhoz képest. Három független kísérlet adatainak összevonása. * $P < 0,05$ [Lachenmaier és mtsai, 2011].

A sejt-közötti adhéziónak molekulá-1 (ICAM-1) a fehérvérsejtek felszíni ligandjaihoz kötődve elősegíti az aktivált leukocyták bejutását a központi idegrendszerbe [Dietrich, 2002]. A *T. gondii* RH törzs tachyzoitáival történt együttes inkubálás (parazita:sejt=1:1; 2 és 36 óra) után az agyi endothelsejtek 1 %-a fertőződik meg a parazitával. A tachyzoitáknak kitett, de nem fertőződött sejtekhez képest a fertőzött sejtekben szignifikánsan megemelkedett az ICAM-1 expressziója, amit IFN γ előkezelés tovább fokozott (55. ábra). Ez összhangban áll az epithelsejteken leírt szakirodalmi adatokkal [Barragan és mtsai, 2005]. Az IFN γ előkezelés a nem fertőződött sejteken is mintegy kétszeresére emelte az adhéziónak molekulá kifejeződését, de ez nem különbözött az IFN γ önálló hatásától.



56. ábra. Patkány perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) migrációja *in vitro* vér-agy gát modellen keresztül. Az agyi endothelsejtek fölé, a felső kompartmentbe helyezett PBMC sejtekből 3 óra alatt a sejteken keresztül az alsó kompartmentbe vándorolt sejtek mennyiségének meghatározása áramlási citometriával történt. A: PBMC sejtek migrációja agyi endothelsejteken keresztül 2 órával a *T. gondii* RH törzs tachyzoitáival (MOI 1) történő inkubálás után. A CD45⁺/C11bc⁻ (lymphocyták) és CD45⁺/C11bc⁺ (antigén-prezentáló) sejtek arányának meghatározása áramlási citometriával történt, és az összes PBMC százalékában lett megadva. B: az „A” grafikonon szereplő két sejtcsoportból a fertőzött sejtek aránya migráció előtt és után. Hét független kísérlet adatainak összevonása. * $P < 0,05$ [Lachenmaier és mtsai, 2011].

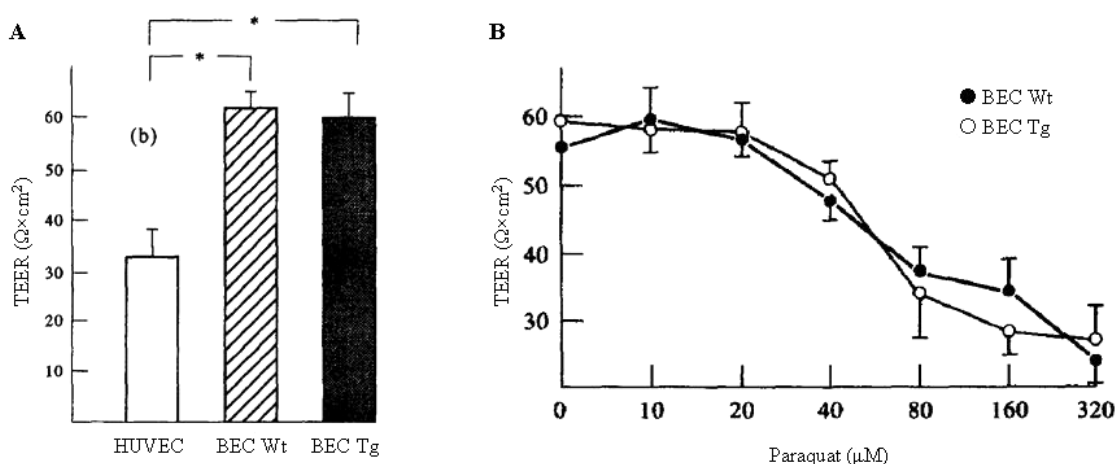
A sejtmigrációs kísérletekhez agyi endothel- és gliasejtek együttes tenyésztésével létrehozott *in vitro* vér-agy gát modellt használtunk, amely a barrier működés fokozása érdekében hidrokortizon és cAMP kezelést kapott (TEER: $200-250 \Omega \times \text{cm}^2$). Patkány perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) közül a lymphocita $\text{CD45}^+/\text{C11bc}^-$ sejtek $0,75 \pm 1,14\%$ -a, az antigén-prezentáló $\text{CD45}^+/\text{C11bc}^+$ sejtek $0,36 \pm 0,17\%$ -a fertőződött meg a *T. gondii* RH törzs tachyzoitáival (fertőzés multiplicitása, MOI 1) történő 2 órás inkubálás után (56A ábra). A fertőzött $\text{CD45}^+/\text{C11bc}^-$ sejtek aránya az összes mononukleáris sejthez viszonyítva nem változott a migráció előtt és után. Ezzel szemben a fertőzött $\text{CD45}^+/\text{C11bc}^+$ sejtek aránya 13-szorosára nőtt migráció után, és nyolcszor több fertőzött $\text{CD45}^+/\text{C11bc}^+$ sejt jutott át az agyi endothelsejt rétegen mint $\text{CD45}^+/\text{C11bc}^-$ sejt ($4,63\%$ vs. $0,6\%$). Ha a *T. gondii* fertőzés arányát nézzük a két sejtpopulációban (56B ábra) az agyi endothelsejteken átjutó fertőzött antigén-prezentáló sejtek arányának emelkedése (16%) még szembetűnőbb. Egér PBMC sejteket, valamint *T. gondii* II típusú ME49 törzsének tachyzoitáit alkalmazva ezt az eredményt megerősítettük.

Az adatok alapján igazoltuk, hogy a CD11b expresszáló antigén-prezentáló monocyták és dendritikus sejtek vehetnek részt a *T. gondii* parazita vér-agy gáton keresztüli intracelluláris, Trójai faló típusú átjutásában és neuroinváziójában [Lachenmaier és mtsai, 2011].

5.2. Agyi ischaemia kóroki tényezőinek vizsgálata

VII. Szabad oxigéngyökök hatása tenyésztett agyi endothel-egysejtrétegek ellenállására

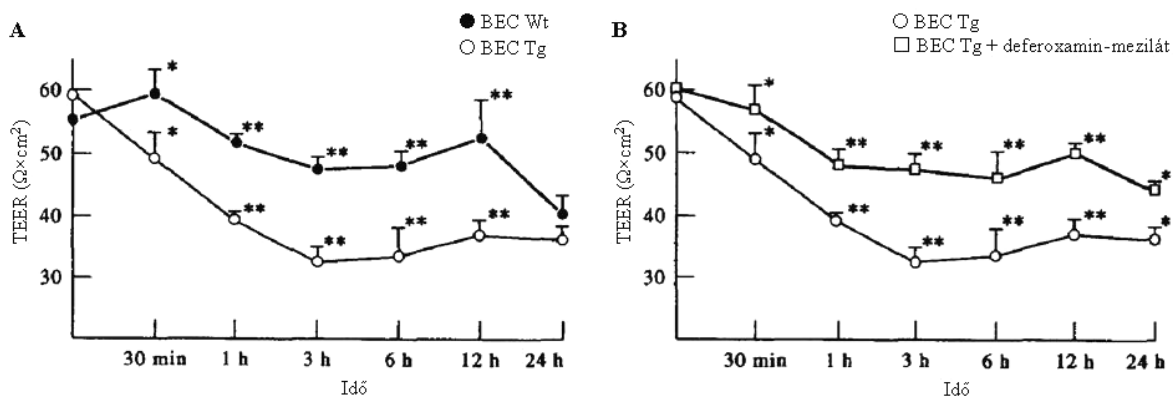
A szabad oxigéngyökök (ROS) oki tényezői az agyi sérülések létrejöttének számos központi idegrendszeri betegségben és ebben a folyamatban az agyi érhálózat is részt vesz (Chrissobolis és mtsai, 2011). A Cu-Zn szuperoxid-dizmutáz enzim (SOD-1) túlexpresszáló transzgen egerekből ezeknek a károsodásoknak a tanulmányozására hozták létre [Epstein és mtsai, 1987]. A transzgen állatokban csökkent agyi károsodást és agyödémát mutattak ki különböző patológiás behatásokra [Chan és mtsai, 1995]. Feltételezve, hogy a SOD-1 enzim magasabb szintje védőhatást fejt ki oxidatív stresszben, vad típusú és SOD-1 transzgent expresszáló egerekből tenyésztett agyi endothelsejteken teszteltük a szuperoxid hatását a sejtrétegek elektromos ellenállására.



57. ábra. A: Humán köldökvéna endothelsejtek (HUVEC), vad típusú egerekből (BEC Wt) és a humán Cu-Zn szuperoxid-dizmutáz enzim túlexpresszáló transzgen egerekből (BEC Tg) izolált agyi endothel-egysejtrétegek elektromos ellenállásának (TEER) összehasonlítása. B: Parakvat hatása vad típusú egerekből és a humán Cu-Zn szuperoxid-dizmutáz enzim túlexpresszáló transzgen egerekből izolált agyi endothel-egysejtrétegek elektromos ellenállására a kezelés után 1 órával. Átlag $\pm$ SD, $n=5$. $*P<0,05$ [Imaizumi és mtsai, 1996].

Mind a vad típusú, mind a transzgen egerekből származó tenyésztett agyi endothel-egysejtrétegek azonos sejtsűrűséget, vWF immunfestődést, hasonló morfológiát mutattak [Imaizumi és

mtsai, 1996]. A SOD aktivitás a transzgén állatok endothelsejtjeiben szignifikánsan magasabb, a kontroll sejtek szintjének 1,7-szerese volt. Az agyi endothelsejtek elektromos ellenállás mérésével meghatározott barrier funkciója mintegy kétszerese volt a perifériás endothelsejtekének. A sejten belül szuperoxid termelést serkentő parakvat [Bus és Gibson, 1984] kezelés hatására az agyi endothelsejt-rétegek ellenállása dózis-függő módon egy óra alatt lecsökkent, azonban nem volt különbség a két csoport között (57. ábra). Az eredeti hipotézissel szemben, az ugyancsak ROS, főképpen szuperoxid termelődést kiváltó K vitamin menadion kezelés hatására nem a vad típusú, hanem a transzgén állatokból származó agyi endothelsejt-rétegek ellenállása csökkent szignifikánsan, idő-függő módon (58. ábra). Deferoxamin-mezilát, egy gyógyszerként is használatos Fe^{2+} kelátor önmagában nem változtatta az agyi endothelsejtek ellenállását, de a sejteket előkezelve szignifikánsan enyhítette a menadion rezisztenciát csökkentő hatását SOD-1 transzgén állatok agyi endothelsejtjein. A meglepő jelenség egyik lehetséges magyarázata a szuperoxid anionból a transzgén sejtekben található nagyobb mennyiségű SOD-1 enzim által termelt magasabb, önmagában is toxikus hidrogén-peroxid mennyiség, amit a rendelkezésre álló kataláz enzim nem tud ártalmatlanítani. A Haber-Weiss reakción át Fe^{2+} jelenlétében hidrogén-peroxidból további reaktív és toxikus gyökök, mint a hidroxilgyökök keletkeznek, amelyek károsítják a sejteket.



58. ábra. A: Menadion kezelés (60 µg/ml) hatása vad típusú egerekből (BEC Wt) és a humán Cu-Zn szuperoxid-dizmutáz enzimét túlexpresszázó transzgén egerekből (BEC Tg) izolált agyi endothel-egysejtrétegek elektromos ellenállására (TEER). B: Deferoxamin-mezilát előkezelés (17,5 µg/ml, 24 óra) hatása a menadion (60 µg/ml) által kiváltott elektromos ellenállás változásra vad típusú egerekből és a humán Cu-Zn szuperoxid-dizmutáz enzimét túlexpresszázó transzgén egerekből izolált agyi endothel-egysejtrétegeken. Átlag ± SD, n=7. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ [Imaizumi és mtsai, 1996].

A deferoxamin-mezilát a vas megkötésével csökkentheti a Haber-Weiss reakciót, és a hidroxilgyökök termelődést. Ez a védőhatás alátámasztja azt a feltételezést is, hogy a túlzott mennyiségű SOD-1 megemelkedett hidrogén-peroxid és hidroxilgyökök mennyiséget eredményez. A megemelkedett ROS szint egyaránt károsíthatja a sejtek közötti szoros kapcsolatokat, és a sejtek letapadását a bazális membránhoz, ezáltal ionok és molekulák fokozott sejtközi átjutását eredményezi.

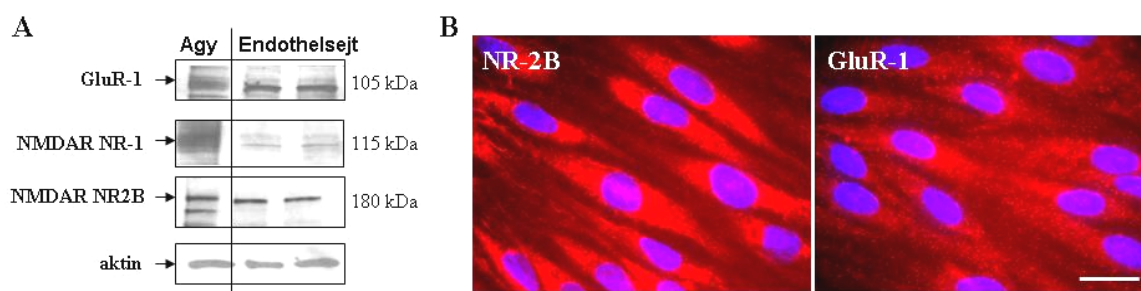
Elsőként írtuk le, hogy agyi endothelsejteken a szabad oxigéngyökök károsítják a vér-agy gát barrier funkciót. Adataink alapján a vér-agy gátat a hidroxil és peroxinitrit gyökök a szuperoxidnál nagyobb hatást fejthetnek ki. Ezt a megfigyelést saját későbbi eredményeink is megerősítették; a ROS termelődés emelkedését és ezzel párhuzamosan az agyi endothelsejtek fokozott permeabilitását mértük más patológiás behatásokra is [Veszélka és mtsai, 2007].

VIII. Glutaminsav hatása agyi endothelsejtek okkludin fehérje szintjére és barrier funkciójára

Agyi ischaemia és stroke során drámaian megnő a serkentő idegi átvivő anyag glutaminsav szintje a sejtközi térben, ami az ischaemiás agyi károsodás egyik kóroki tényezője [Rothman és Olney, 1986]. A magas extracelluláris glutaminsav szint vér-agy gát megnyílást [Mayhan és Didion, 1996], és következményes vazogén agyödémát okoz, ami az ischaemiás stroke-ot követően 24-72 órás időszakban tovább fokozódhat [Preston és Webster, 2004]. Ischaemia és hypoxia hatására a sejtek közötti szoros kapcsolatokat is érintő vér-agy gát változásokat figyeltek meg mind *in vivo*, mind

in vitro modelleken, és a tenyésztett agyi endothelsejtek alkalmas modelljei a pathomechanizmus feltárásának [Nagy és mtsai, 2005]. Jóllehet a glutamát hatása a vér-agy gátra és a tenyésztett endothelsejtekre ellentmondásos, a megjelent szakcikknek túlnyomó többsége, közte saját korábbi munkánk is támogatta a glutaminsav-receptorok jelenlétét és a glutamát hatását ezeken a sejteken [Krizbai és mtsai, 1998]. A glutamát hatását közvetítő receptorok közül az ioncsatornát formáló N-metil-D-aszparaginsav (NMDA; alegységei: NR1, NR2A-D, NR3A-B), és 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav (AMPA; alegységei: GluR1-4) és kainát (alegységei: GluR5-7, KA1-2) receptorok különösen fontosak agyi ischaemiában, és a vazogén agyödéma mediálásában [Dempsey és mtsai, 2000]. Az agyi endothelsejtek közötti szoros kapcsolatok, és az azokat alkotó integrális membránfehérjék, mint az okkludin a vér-agy gát integritásának kulcselemei. Célunk az volt, hogy elsőként vizsgáljuk a glutamát hatását agyi endothelsejtek okkludin fehérje kifejeződésére és sejten belüli megoszlására, valamint ezzel összefüggésben az endothelsejt-rétegek paracelluláris áteresztőképességére, és felderítsük, hogy a változásokat befolyásolják-e a glutaminsav-receptorok gátlószerei.

A glutaminsav receptorok génexpresszióját leíró korábbi megfigyeléseinkkel [Krizbai és mtsai, 1998] összhangban igazoltuk, hogy a tenyésztett agyi endothelsejtek fehérje szinten is expresszálják az ionotróp AMPA receptor Glu-R1, valamint az NMDA receptor NR-1 és NR-2B alegységeit (59. ábra). Immunfestés után egyenletes finom szemcsés megoszlás volt látható a sejtek citoplazmájában és a sejtmag körül.

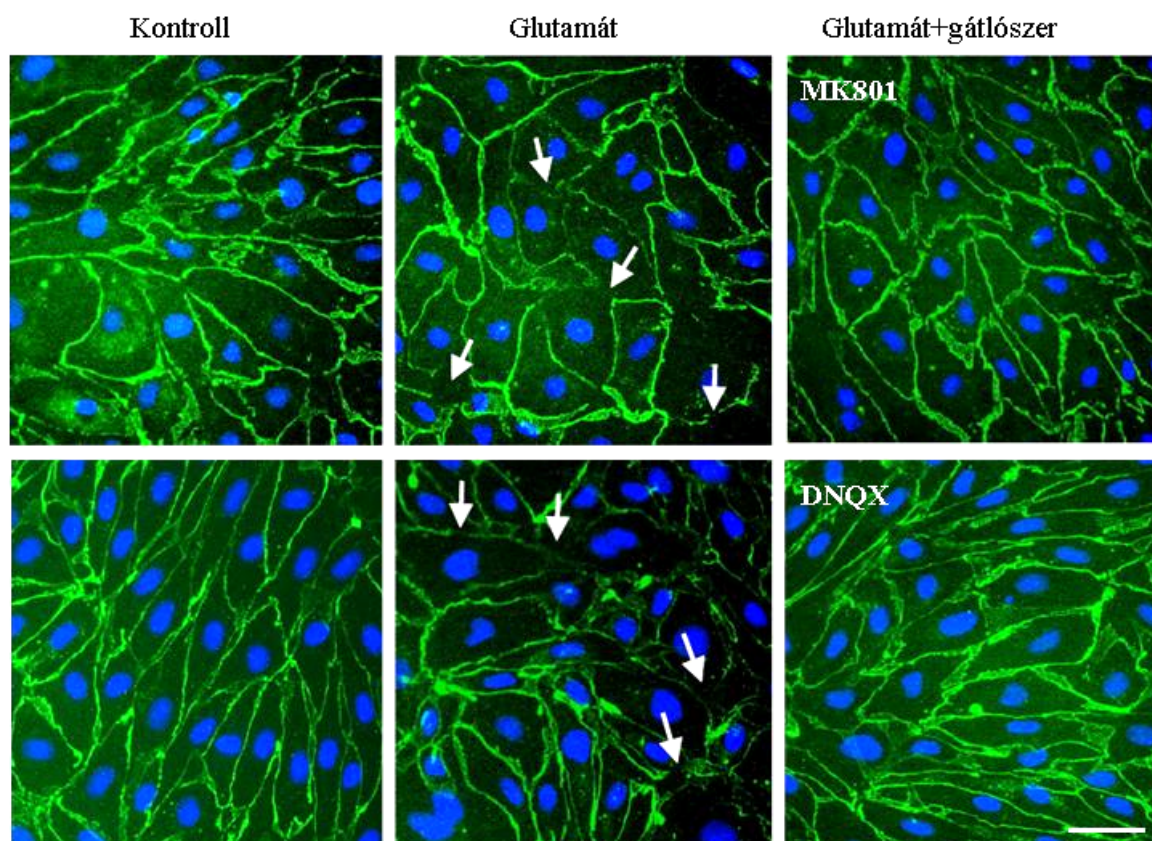


59. ábra. Ionotróp glutaminsav-receptorok patkány agyi endothelsejteken. A: AMPA receptor Glu-R1, NMDA receptor NR-1 és NR-2B alegységek kimutatása Western blottal agyszövet mintán és két független kísérletből származó tenyésztett agyi endothelsejteken. B: Fluoreszcens mikroszkópos felvételek agyi endothelsejtekéről NR-2B és Glu-R1 glutaminsav-receptor alegységekre történt immunfestés után. Mércé: 20 μ m. [András és mtsai, 2007].

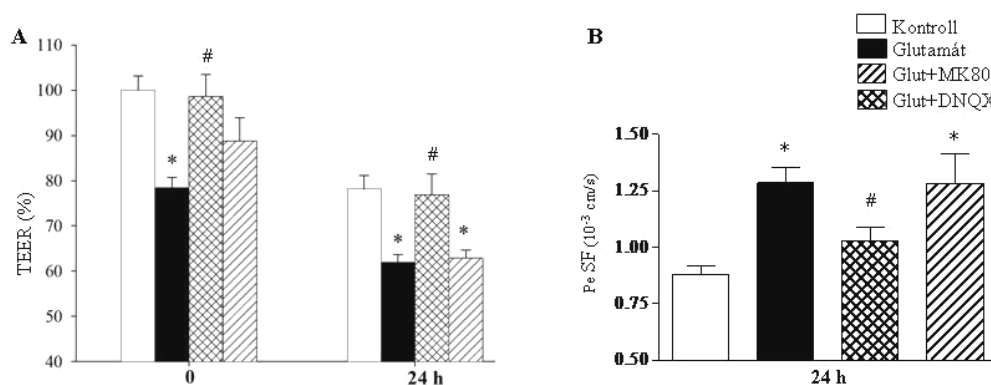
Harminc perces glutamát kezelés hatására közvetlenül nem változott meg az okkludin mennyisége, a festődés pedig erősebbé, de diffúzabbá vált a sejthatárok mellett a klasszikus övszerű elhelyezkedéssel szemben [András és mtsai, 2007]. A megkezelt sejteket 24 óra múlva vizsgálva a fehérje mennyiségének erőteljes csökkenését, a festődési mintázat felszakadozását, és gyengülését lehetett megfigyelni (60. ábra). Az NMDA receptor szelektív gátlása MK801 kezeléssel (10 μ M), valamint az AMPA/kainát receptor gátlása 6,7-di-nitro-kvinoxalin-2,3-dionnal (DNQX; 5 μ M) védőhatást fejtett ki az endothelsejtekre a glutaminsav hatásával szemben. Szignifikánsan gátolták a fehérje mennyiségének csökkenését és az immunfestődési mintázat megváltozását. Az MK801 gátló hatást fejtett ki az okkludin glutaminsav által háromszorosára fokozott tirozin foszforilációjára is.

A barrier funkció tanulmányozására gliasejtekkel együtt tenyésztett, hidrokortizonnal és cAMP-vel kezelt patkány primer agyi endothelsejt rétegeket használtunk. Glutamát kezelés hatására szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest a sejtrétegek ellenállása mind a 30 perces, mind a 24 órás időpontban (61. ábra). Ezt a hatást csak az NMDA receptor blokkoló MK801 gátolta, az AMPA/kainát antagonistá DNQX nem [András és mtsai, 2007].

Eredményeink alapján a glutaminsav a szoros kapcsolatokban található okkludin fehérje gyors redistribúcióját, majd expressziójának markáns csökkenését hozza létre az ioncsatorna formáló glutamát receptorokon keresztül. Az NMDA receptor az okkludin hiperfoszforilációját és az endothelsejtek barrier funkciójának csökkenését mediálja.



60. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek agyi endothelsejtek okkludin immunfestődéséről (zöld) glutamát kezelés (1 mM, 30 perc) után 24 órával. MK801: szelektív NMDA receptor gátlószer (10 μ M, 15 perc előkezelés, 30 perc együttes kezelés glutamáttal); DNQX: 6,7-dinitrokvinoxalin-2,3-dion, AMPA/kainát receptor gátlószer (5 μ M, 15 perc előkezelés, 30 perc együttes kezelés glutamáttal). Mércé: 25 μ m. Nyílak: gyengébb vagy hiányzó immunfestés, a festési mintázat felszakadozottsága. [András és mtsai, 2007].



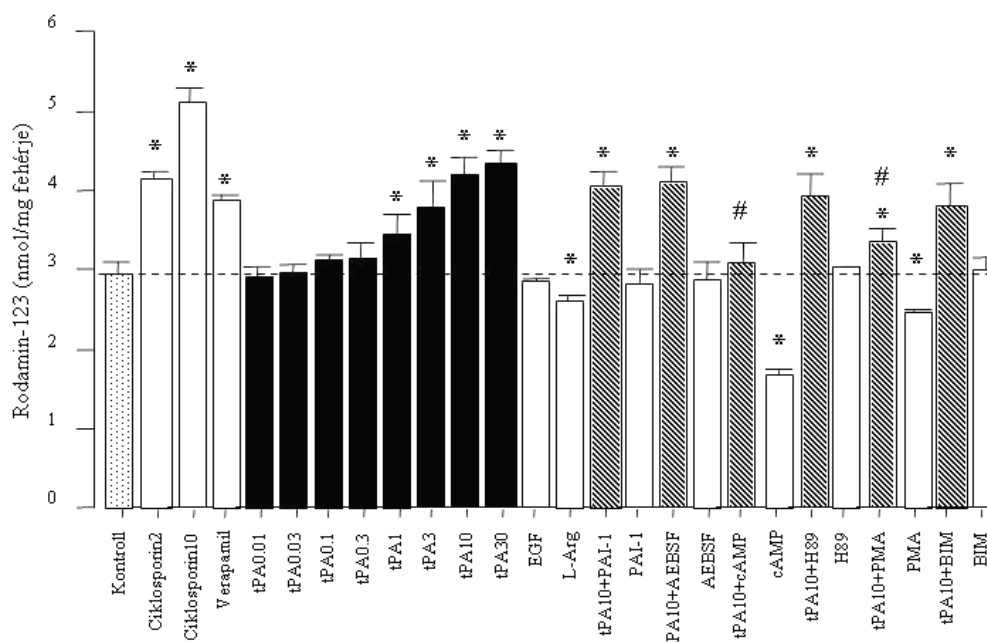
61. ábra. Glutamát kezelés hatása gliasejtekkel együtt tenyésztett patkány primer agyi endothelsejt rétegek ellenállására (A) és permeabilitására (B). 0: közvetlenül a 30 perces glutamát kezelés után történő mérés. 24h: 30 perces kezelés után 24 órával történő mérés. MK801: szelektív NMDA receptor gátlószer (10 μ M, 15 perc előkezelés, 30 perc együttes kezelés glutamáttal); DNQX: 6,7-dinitrokvinoxalin-2,3-dion, AMPA/kainát receptor gátlószer (5 μ M, 15 perc előkezelés, 30 perc együttes kezelés glutamáttal). Átlag $\pm$ SD, n=5. * P <0,05 kontrollhoz képest, # P <0,05 glutamáthoz képest [András és mtsai, 2007].

Eredményeinket megerősítették későbbi tanulmányok Kuhlmann munkacsoportjából, amelyekben többek között hypoxia hatására vér-agy gát modellen a glutamát felszabadulását, az endothelsejt rétegek ellenállásának csökkenését, és az MK801 védőhatását írták le [Kuhlmann és mtsai, 2009], ezzel is alátámasztva megfigyeléseink jelentőségét agyi ischaemiában.

IX. Szöveti plazminogén aktivátor hatása agyi endothelsejtek P-glikoprotein efflux pumpájának működésére

A szöveti plazminogén aktivátor (tPA), a stroke terápiájában alkalmazott szerin proteáz aktivitással rendelkező glikoprotein, a vérrögöket a plazminogén plazminná történő hasításával oldja. Az intravénás tPA hatékony az akut stroke kezelésében egy szűk, maximum 4,5 órás terápiás ablakban alkalmazva [Hatcher és Starr, 2011], ugyanakkor magas az intracraniális haemorrhagiák előfordulása ennél a kezelési módnál [Rosell és mtsai, 2008; Bereczki és mtsai., 2009]. Az extravasculáris tPA idegrendszeri toxicitása vagy protektív hatása vitatott, de a nem proteolitikus hatásmód is részt vesz benne [Kim és mtsai, 1999]. Az agyi mikroerekben a plazminogén aktivátorok és endogén inhibitoraik termelődése és felszabadulása szabályozott folyamat, de az extracelluláris tPA vér-agy gát morfológiájára és működésére kifejtett hatásáról kevés adat áll rendelkezésre [del Zoppo 2010]. Az efflux pumpák működése fontos védelmi mechanizmus az agyi endothelsejtekben. Tenyésztett agyi endothelsejteken megvizsgáltuk, hogy az exogén tPA befolyásolja-e a P-glikoprotein efflux pumpa működését.

GP8 sejtekben specifikus blokkolókkal gátolható funkcionális P-glikoprotein aktivitást mértünk a sejten belüli rodamin-123 felhalmozódással. Ez az aktivitás 40 %-kal volt alacsonyabb, mint a primer tenyészetekben mért pumpa működés. Rekombináns tPA 0.01–30 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció sávbán dózisfüggő módon emelte a rodamin felhalmozódást agyi endothelsejtekben, azaz gátolta a pumpa működését, akárcsak a pozitív kontrollként alkalmazott ciklosporin és verapamil, a pumpa gátlószerei (62. ábra). Ezt a hatást a plazminogén aktivátor inhibitor-1 hexapeptid, a tPA proteolitikus aktivitásának gátlója nem befolyásolta. Sem az arginin, a tPA készítmények egyik alkotója, sem az epidermális növekedési faktor nem gátolta a pumpa működését. A sejten belüli cAMP szint emelése és a protein kináz C aktiválása forbolészter kezeléssel (PMA) fokozta a P-glikoprotein működését, és a tPA gátló hatását szignifikáns módon kivédte, míg a protein kináz A gátlószert H89, vagy a szerin proteáz gátló AEBSF nem változtatta meg a tPA hatását.



62. ábra. Szöveti plazminogén aktivátor (tPA; 0,01-30 $\mu\text{g/ml}$) hatásának mérése patkány GP8 agyi endothelsejtek 1 μM dexametazonnal indukált P-glikoprotein pumpa aktivitására rodamin-123 sejten belüli felhalmozódásának (2 óra) mérésével. Pozitív kontroll: ciklosporin-A (2 és 10 μM) és verapamil (2 μM), a pumpa gátlószerei. A szereket önállóan, vagy 10 $\mu\text{g/ml}$ tPA-val együtt alkalmaztuk. EGF: epidermális növekedési faktor, 1 $\mu\text{g/ml}$; L-Arg: L-arginin, 2 mM; PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1 hexapeptid, 10 μM ; AEBSF: 4-(2-aminoetil)benzénszulfonil-fluorid, 200 μM ; cAMP: 8-(4-klorofeniltio)-ciklikus adozin-monofoszfát, 250 μM + RO 20-1724; 17.5 μM ; H-89: bromocinnamil-aminoetil-5-izokvinolin-szulfonamid, 5 μM ; PMA: 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát, 160 nM; BIM: bis-indolil-maleimid; 0.1 μM . Átlag $\pm$ SD, n=5-6. * $P < 0,05$ kontrollhoz képest, # $P < 0,05$ 10 $\mu\text{g/ml}$ tPA-hoz képest. [Deli és mtsai, 2001].

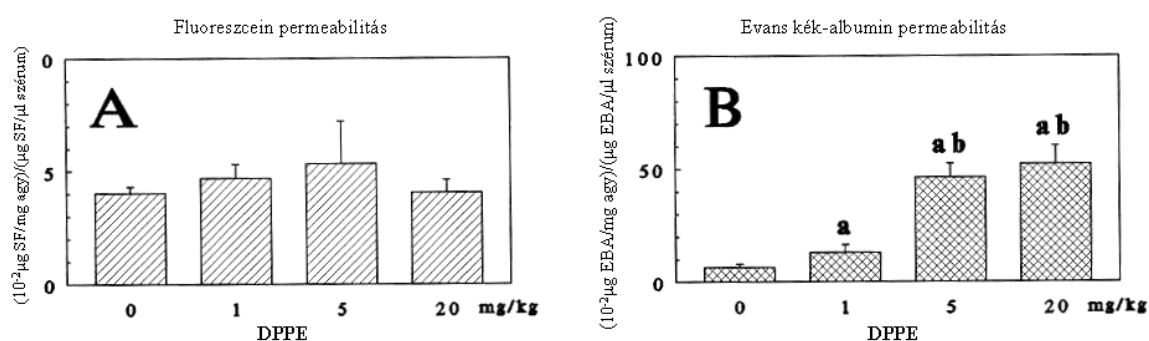
A közelmúltban *in vitro* vér-agy gát modellen a tPA hatását önmagában, valamint hypoxiát és reoxigenációt követően is vizsgálták, és súlyosította az endothelsejt-rétegek barrier funkciójának romlását [Hiu és mtsai, 2008].

Elsőként figyeltük meg a tPA P-glikoprotein működést befolyásoló hatását a vér-agy gátat alkotó agyi endothelsejteken. Ezek az eredmények felvetik a tPA nem enzimátikus hatását a vér-agy gát működésére, ami az ischaemiás stroke haemorrhagiás konverziójának kialakulásához hozzájárulhat.

X. Agyi ischaemia és reperfusio vér-agy gátra kifejtett hatása, és annak befolyásolása 4 ér lekötéses modellen patkányokban

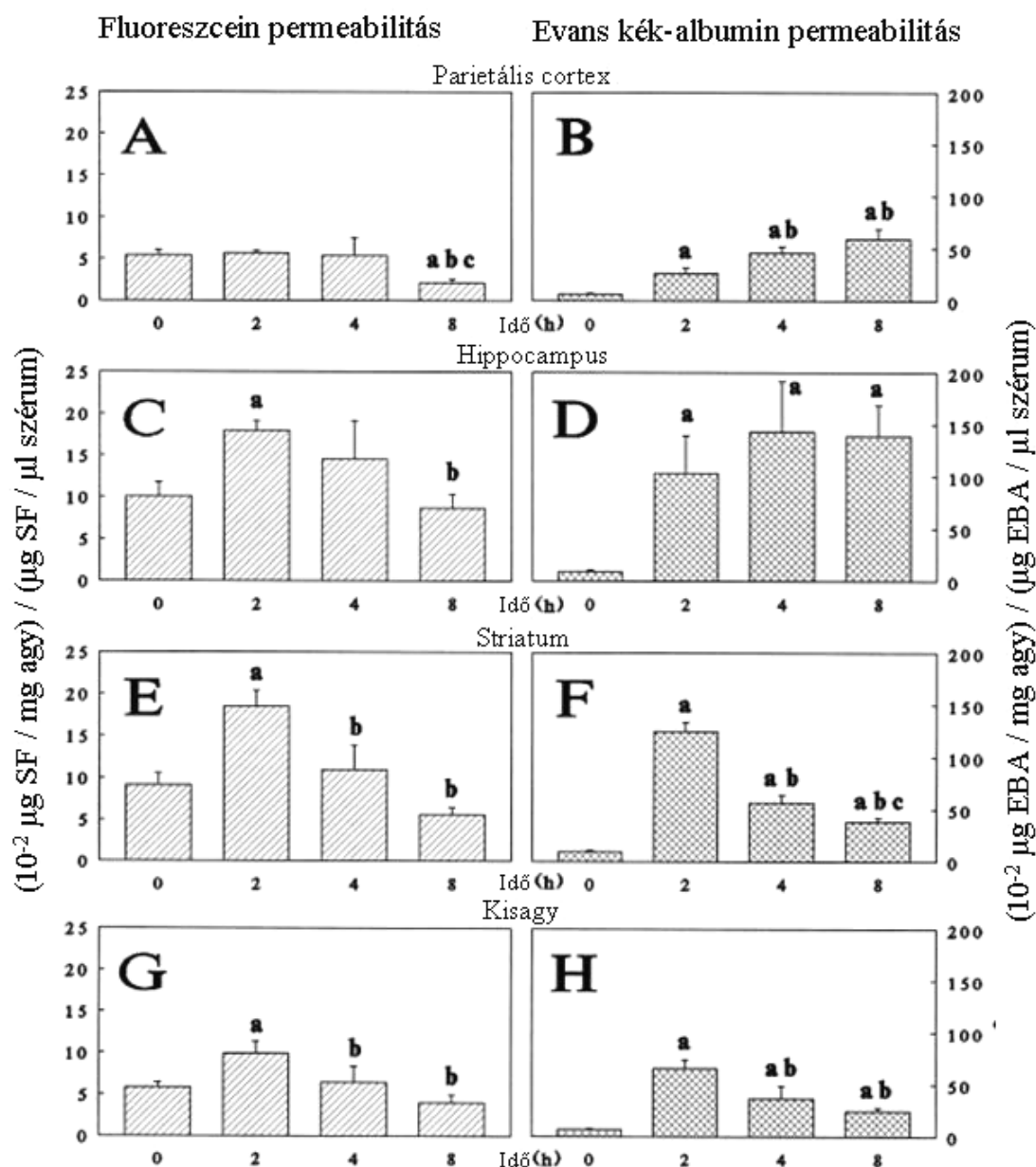
A hisztamin az agyoedema egyik mediátora, és hisztamin H₂ receptor gátlókkal az agyi ischaemiát követő agyoedema állatkísérletes modellen sikeresen kivédhető [Tósaki és mtsai, 1994; Deli és Ábrahám, 2004]. A tamoxifén-származék *N,N*-dietil-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin (DPPE, tezmilifén), klinikai vizsgálatokban ígéretes kemopotenciózó szer [Brandes, 2008] gátolni tudja a hisztamin intracelluláris hatásait [Brandes és mtsai, 1990], és fokális agyi ischaemiában csökkentette a neuronális károsodást egerekben [Cramer és Toorop, 1998].

Az volt a feltevésünk, hogy a DPPE a hisztamin receptor blokkolókhöz hasonlóan csökkenteni tudja az agyi ischaemia-reperfusio vér-agy gátra kifejtett hatását patkányokban 4 ér lekötéses modellen [Németh és mtsai, 1998].



63. ábra. Különböző dózisú intravénás *N,N*-dietil-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin (DPPE; 0, 1, 5, 20 mg/kg) kezelés hatása a vér-agy gát permeabilitására patkányok parietális cortex mintáiban 4 órával beadás után. SF: fluorescein, EBA: Evans kék-albumin. Átlag ± SEM, n=5-6 csoportonként. Szignifikáns különbség ($P < 0,05$) a: kontroll csoporthoz képest (0 mg/kg); b: 1 mg/kg DPPE-vel kezelt csoporthoz képest. [Deli és mtsai, 2000].

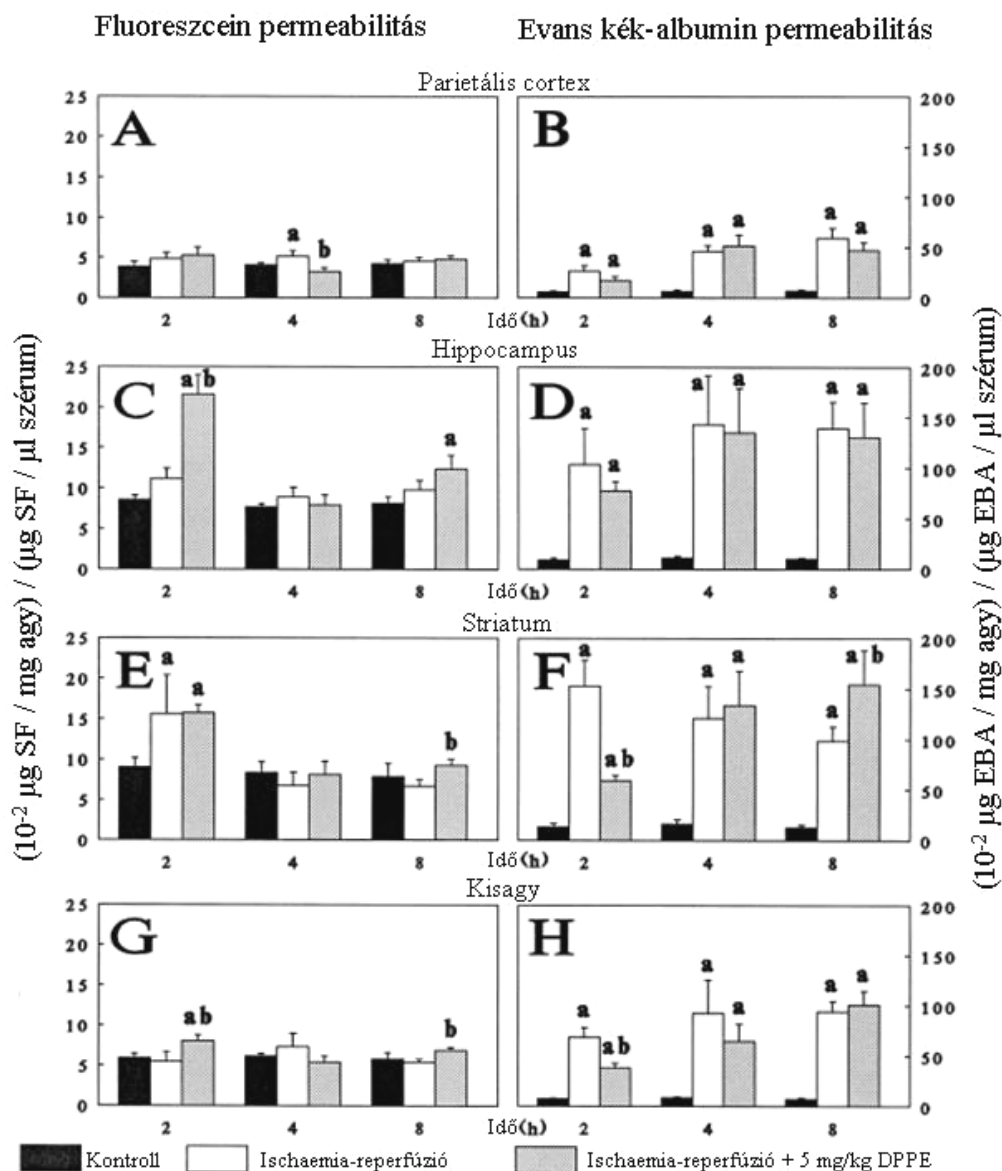
Az intravénásan 1-5 mg/kg koncentrációban beadott DPPE az állatok klinikai paramétereit nem befolyásolta, azonban 20 mg/kg dózisban toxikusnak bizonyult. A DPPE 4 órával a beadás után a vér-agy gát permeabilitását a paracelluláris marker fluoreszceinre a parietális cortex területén nem befolyásolta, míg az albumin transzendotheliális átjutását dózis-függő módon 5-12-szeresére emelte (63. ábra). Az 5 mg/kg koncentrációban beadott DPPE az agykérgen kívül a másik három vizsgált agyterületen (hippocampus, striatum és cerebellum) csak a beadás utáni 2. órában fokozta a fluoreszcein extravazációját, míg az albumin átjutást minden agyterületen, minden vizsgált időpontban (2, 4 és 8 óra) szignifikánsan megemelte (64. ábra).



64. ábra. Az intravénás *N,N*-dietil-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin (DPPE; 5 mg/kg) kezelés hatása a vér-agy gát permeabilitására him Wistar patkányok különböző agyterületein 0, 2, 4, és 8 órával a beadás után. A és B: parietális cortex; C és D: hippocampus; E és F: striatum; G és H: kisagy; SF: fluoreszcein, EBA: Evans kék-albumin. Átlag $\pm$ SEM, $n=6$ csoportonként. Szignifikáns különbség ugyanazon agyterületen különböző időpontokhoz viszonyítva ($P<0,05$) a: 0 óra; b: 2 óra; c: 4 óra. [Deli és mtsai, 2000].

A négy fő agyi ér okklúziójával előidézett húsz perces teljes agyi ischaemiát követő reperfusio 2., 4., 8. órájában mind a négy agyrégióban szignifikáns módon emelkedett, többszörösére növekedett albumin extravazációt mértünk (65. ábra). A fluoreszcein átjutás nem változott, csak a 2. órában a striatumban és a 4. órában a cortexben volt magasabb.

A reperfusio kezdetén beadott intravénás DPPE a hippocampus, a striatum és a kisagy területén a 2. és 8. órában fokozta a fluoreszcein átjutását, egyedül a cortexben csökkentette azt a 4. órában, a többi időpontban nem befolyásolta. Az ischaemia-reperfusióban rendkívül megemelkedett albumin extravazációt nem befolyásolta a DPPE, kivéve a striatum és a kisagy területén, ahol a 2. órában csökkentette, és a striatumot, ahol a 8. órában fokozta a permeabilitást.



65. ábra. Agyi ischaemia-reperfúzió és 5 mg/kg intravénás *N,N*-diethyl-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin (DPPE) kezelés hatása önállóan és együtt a vér-agy gát permeabilitására patkányok különböző agyterületein 2, 4, és 8 órával a reperfüzió kezdete után. A és B: parietális cortex; C és D: hippocampus; E és F: striatum; G és H: kisagy; SF: fluorescein, EBA: Evans kék-albumin. Átlag $\pm$ SEM, $n=6$ csoportonként. Szignifikáns különbség ugyanazon agyterületen különböző időpontokhoz viszonyítva ($P<0,05$) a: 0 óra; b: 2 óra; c: 4 óra. [Deli és mtsai, 2000].

Megállapítottuk, hogy - hipotézisünkkel ellentétben – *a sejten belüli hisztamin kötőhely antagonistá DPPE nem védte ki az ischaemia-reperfúzió vér-agy gát permeabilitást fokozó hatását, sőt, önállóan is dózis- és időfüggő módon, a hisztaminhoz hasonlóan fokozta a jelzőanyagok átjutását az agyi ereken patkányokban.* A DPPE hisztamin-szerű vér-agy gát permeabilitást fokozó hatásának számos mechanizmusa lehet, a sejten belüli hisztamin kötőhelyek, antiösztrogén kötőhelyek, szigma receptorok, vagy az arachidonsav kaszkád befolyásolásán keresztül [Deli és mtsai, 2000; Deli és Ábrahám, 2004].

A mechanizmus feltárására a DPPE agyi endothelsejtek barrier funkciójára kifejtett hatását tenyésztetes vér-agy gát modellen is megvizsgáltuk [Deli és mtsai, 2003]. A gliasejtekkel együtt tenyésztett primer agyi endothelsejtrétegek ellenállását a DPPE dózis-függő módon csökkentette, a fluorescein átjutását nem változtatta, míg az albumin átjutást a legnagyobb, 200 μ M kon-

centrációban fokozta, összhangban az állatkísérletes eredményeinkkel. Korábbi vizsgálatainkban hasonló hatást figyeltünk meg agyi endothelsejteken hisztaminra [Deli és mtsai, 1995]. A DPPE hatását jelenleg is tanulmányozzuk agyi endothelsejt tenyészeteken, és előzetes morfológiai, funkcionális, és génexpressziós eredményeink alapján befolyásolja a szoros kapcsolatok fehérjéinek kifejeződését, az agyi endothelsejtek transzportereinek működését, a nitrogén-monoxid termelődést.

XI. Átmeneti előagyi ischaemia hatása a vér-agy gát permeabilitására stroke-ra hajlamos spontán magasvérnyomású patkányokon

A magasvérnyomás-betegség hajlamosító tényező mind a stroke, mind a vascularis dementia kialakulásában, és hatékony vérnyomáscsökkentő kezelés megelőzi a kognitív működés romlását [Kilander és mtsai, 1998; Rönnemaa és mtsai, 2011]. A stroke-ra hajlamos spontán magas vérnyomású (SHRSP) patkánytörzs, amelyben hipertenzív encephalopathia és haemorrhagiás stroke alakul ki, alkalmas modell a krónikus magasvérnyomás betegség pathomechanizmusának vizsgálatára [Okamoto és mtsai, 1974].

Szerkezeti változásokat az agyi endothelsejtek szoros kapcsolatainak morfológiájában már tünetmentes 13 hetes állatokban megfigyelték [Lippoldt és mtsai, 2000]. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk (i) 16 hetes normál Wistar-Kyoto és magasvérnyomású SHRSP patkányokon a vér-agy gát permeabilitását különböző agyterületeken a korábbi vizsgálatainkban alkalmazott két jelzőanyagra, a fluoreszceinre és az Evans kék festékhez kötődő albuminra, (ii) milyen időbeli és regionális változás jön létre tranziens előagyi ischaemiát követően a vér-agy gát permeabilitásban SHRSP patkányokon.

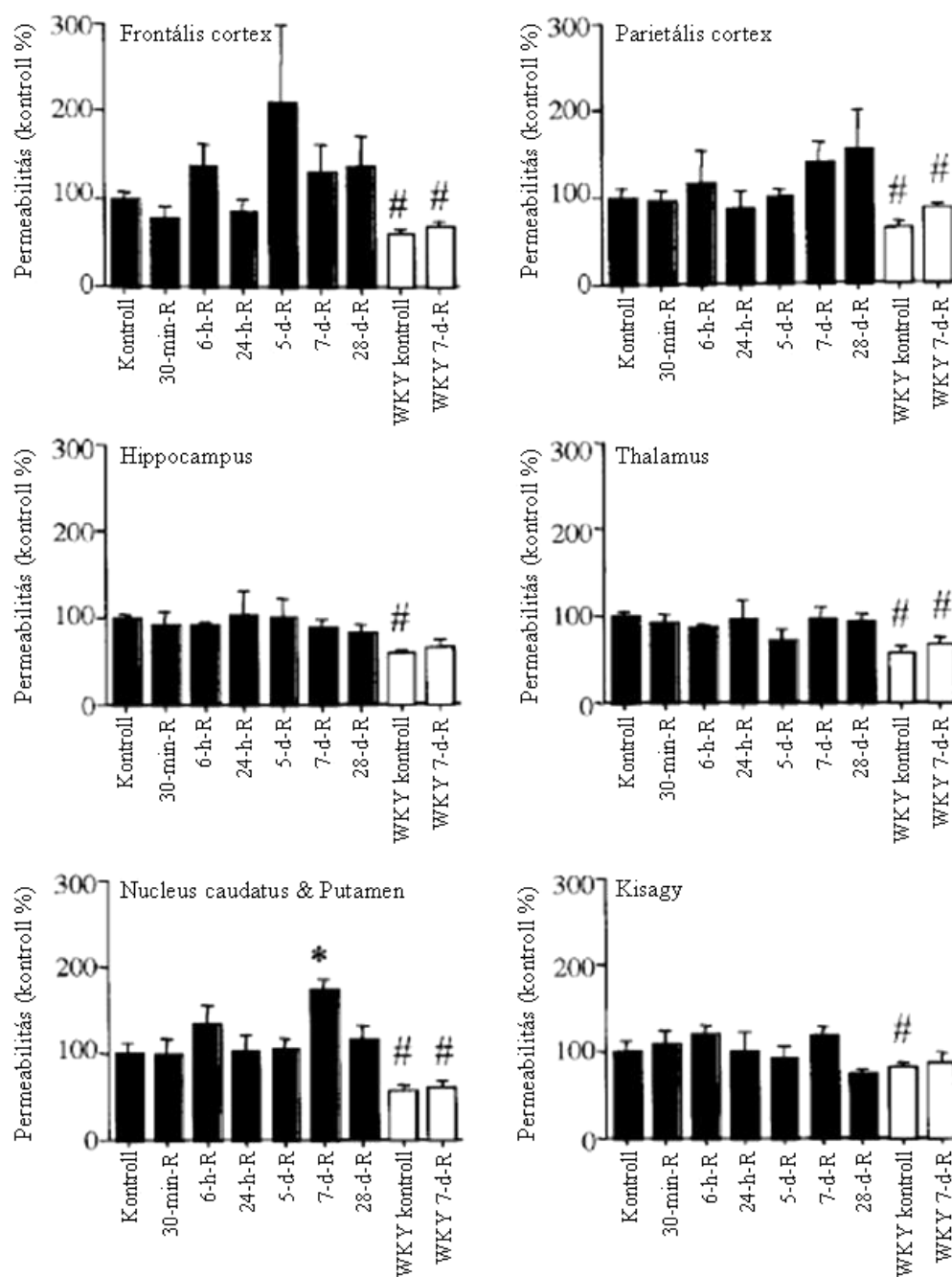
A fluoreszcein átjutása fokozott volt a vér-agy gáton magas vérnyomású SHRSP patkányokban a normotenzív Wistar-Kyoto patkányokhoz képest mind a hat vizsgált agyterületen (frontális és parietális cortex, hippocampus, thalamus, nucleus caudatus és putamen, cerebellum) (66. ábra). Az albumin permeabilitás a hatból három agyterületen, frontális és parietális cortex, nucleus caudatus és putamen régiójában emelkedett meg szignifikánsan (67. ábra).

A 10 perces kétoldali arteria carotis communis lezorításával előidézett előagyi ischaemiát követően hat időpontban (30 perc, 6 és 24 óra, 5, 7, 28 nap) mértük a vér-agy gát változást. A fluoreszcein agyba való bejutása nem változott SHRSP állatokban, kivéve a 7. napon a nucleus caudatus és putamen területén (66. ábra). A normotenzív Wistar patkányokhoz képest a reperfusio 7. napján a frontális és parietális cortex, valamint a thalamus területén fokozódott a fluoreszcein permeabilitás SHRSP patkányokban. Az albumin átjutás szignifikánsan emelkedett már a tranziens ischaemia hatására is a 6 órás időpontban hatból öt agyterületen, és mind a hat régióban többszörösére (1,8-3,5×) nőtt a 24 órás időpontban (67. ábra). A reperfusio 28. napján a hippocampusban, valamint a nucleus caudatus és putamen területén találtunk emelkedett albumin extravazációt. A Wistar csoporthoz hasonlítva a reperfusio 7. napján négy agyterületen is magasabb volt az albumin agyi bejutása [Ábrahám és mtsai, 2002].

Ugyan morfológiai és funkcionális adatok utaltak az albumin megnövekedett átjutására a vér-agy gáton SHRSP állatokban, a mi megfigyelésünk az első igazolása annak, hogy ez a változás már 16 hetes állatokban bekövetkezik. Figyelemre méltó, hogy mind a fluoreszcein, mind az albumin esetében fokozott permeabilitást találtunk SHRSP állatokban a normotenzív csoporthoz képest, sőt a fluoreszceinnél a reperfusio után is, és ez összhangban áll a betegekben leírt cerebrovaszkuláris permeabilitás fokozódással a parieto-occipitális régióban akut hipertenzív encephalopathiában [Schwartz és mtsai, 1998; Sheth és mtsai, 1996].

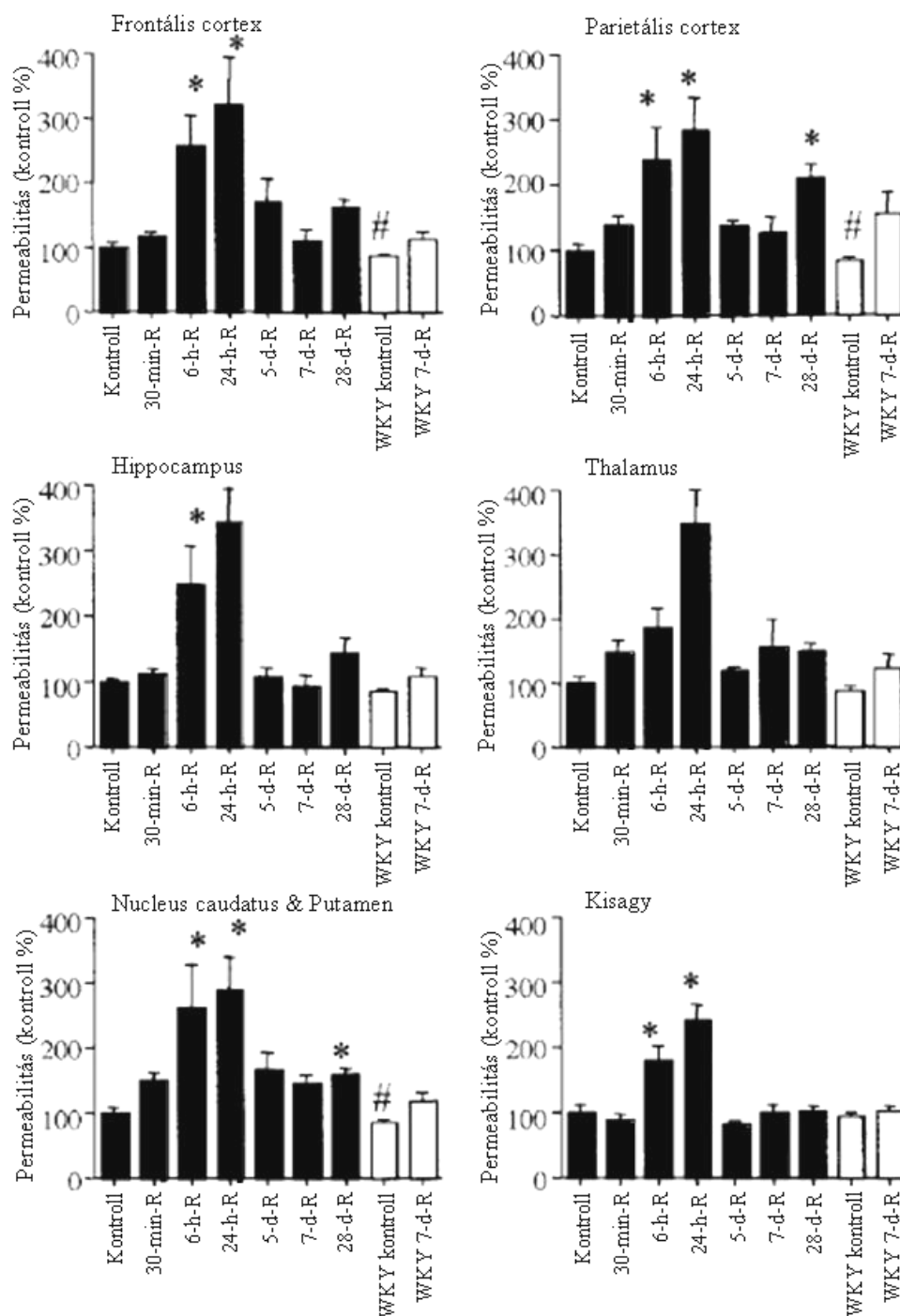
Eredményeink alapján a korai és fokozott vér-agy gát permeabilitás, a szérumfehérjék extravazációja hozzájárulhat az idegsejtpusztuláshoz és a hipertenzív encephalopathia kialakulásához SHRSP állatokban.

Fluoreszcein permeabilitás



66. ábra. Vér-agy gát permeabilitás fluoreszceinre különböző agyrégiókban 16 hetes stroke-ra hajlamos spontán magas vérnyomású (SHRSP) és normotenzív Wistar/Kyoto (WKY) patkányokban beavatkozás nélkül (fehér oszlopok), valamint 10 perces kétoldali arteria carotis communis leszorításával előidézett előagyi ischaemiát követően (fekete oszlopok), hat időpontban (30 perc, 6 és 24 óra, 5, 7, 28 nap). R: reperfüzió. Szignifikáns különbség ($P < 0,05$): * kontroll és postischaemiás SHRSP csoportok között; # SHRSP és WKY csoportok között [Ábrahám és mtsai, 2002].

Albumin permeabilitás

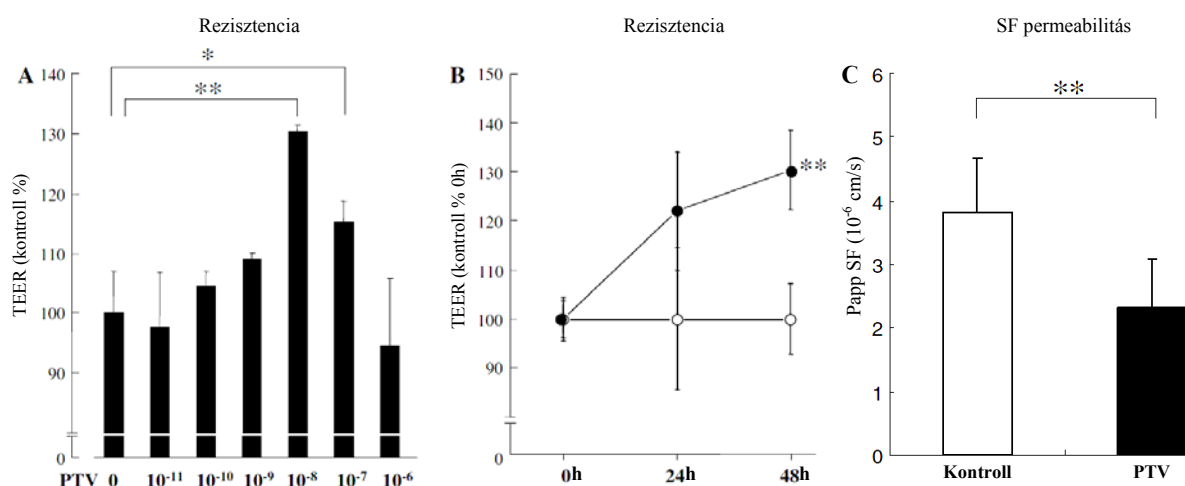


67. ábra. Vér-agy gát permeabilitás Evans kék-albuminra különböző agyrégiókban 16 hetes stroke-ra hajlamos spontán magas vérnyomású (SHRS) és normotenzív Wistar/Kyoto (WKY) patkányokban beavatkozás nélkül (fehér oszlopok), valamint 10 perces kétoldali arteria carotis communis leszorításával előidézett előagyi ischaemiát követően (fekete oszlopok), hat időpontban (30 perc, 6 és 24 óra, 5, 7, 28 nap). R: reperfüzió. Szignifikáns különbség ($P < 0,05$): *; kontroll és postischaemiás SHRS csoportok között; #: SHRS és WKY csoportok között [Ábrahám és mtsai, 2002].

XII. A pitavasztatin hatása primer agyi endothelsejtek vér-agy gát működésére

A sztatínok a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim (HMG-CoA) reduktáz gátlásán keresztül hatékonyan csökkentik a szérum LDL koleszterin szintjét. Ugyanakkor a nem hiperkoleszterinémias betegekben is mérséklék az ischaemiás stroke, a kardio- és cerebrovaszkuláris történések előfordulásának gyakoriságát [Crouse és mtsai, 1998]. Klinikai vizsgálatok alapján a sztatínok alkalmazását javasolták a stroke megelőzésére kardio- és cerebrovaszkuláris betegségekben [Nassief és Marsh, 2008]. A sztatínoknak ez a terápiás hatékonysága az érendothelsejtekre kifejtett stabilizáló hatáson alapul, ami a koleszterin szintjének csökkentésén túlmutató, sokrétű hatást feltételez [Sandoval és Witt, 2008]. A pitavasztatin, egy hosszú hatású, alig metabolizálódó, erős koleszterincsökkentő gyógyszer, ami kedvező farmakokinetikai tulajdonságokkal és viszonylag kevés gyógyszerinterakcióval rendelkezik [Corsini és Ceska, 2011]. A sztatínok kiváltotta neuroprotektiót összefüggésbe hozták a vér-agy gát működésének befolyásolásával, azonban kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a sztatínok agyi mikroér endothelium szoros kapcsolataira, és a vér-agy gát barrier funkciójára kifejtett hatásáról. Célunk az volt, hogy leteszteljük a pitavasztatin hogyan befolyásolja az agyi endothelsejtek gát működését.

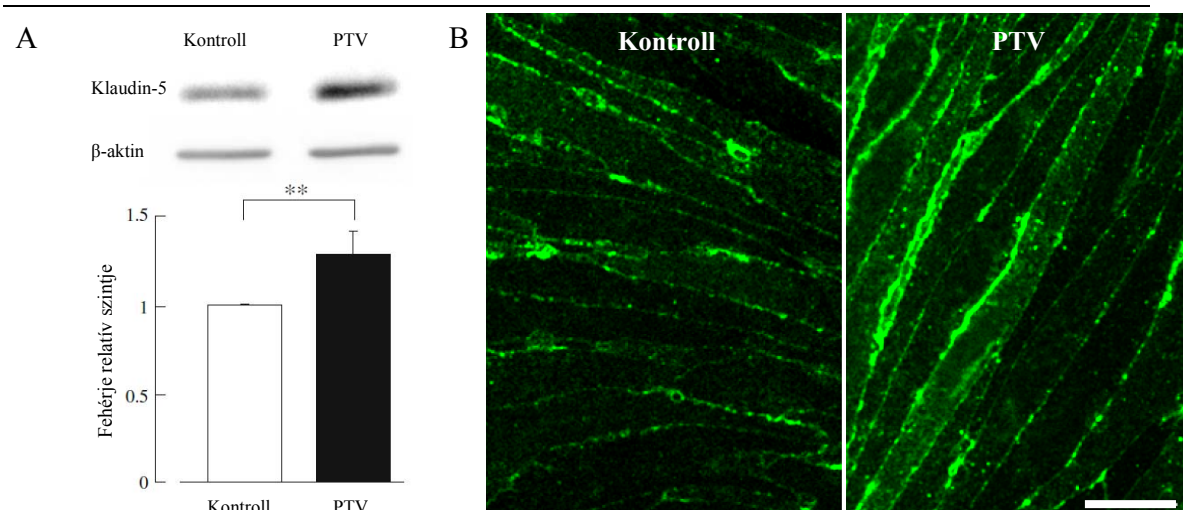
Kísérleteinkben primer patkány agyi endothelsejt tenyészeteket használtunk, amelyek tisztaságát puromicinnel, a szoros kapcsolatok működését pedig hidrokortizon kezeléssel fokoztuk korábban leírt és beállított módszerünk alapján [Nakagawa és mtsai, 2009].



68. ábra. A: Pitavasztatin (PTV; 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , és 10^{-6} M, 48 óra) kezelés hatása patkány agyi endothelsejtek elektromos ellenállására (TEER). A kontroll TEER érték (100 %), $n=4$. B: 10^{-8} M pitavasztatin kezelés hatásának időfüggése (0-48 óra, $n=4$). C: 10^{-8} M pitavasztatin kezelés (48 óra, $n=4$) hatása a sejtek fluoreszcein permeabilitására. SF: fluoreszcein; P_{app} : permeabilitási együttható (10^{-6} cm/s). Átlag $\pm$ SD, Szignifikáns különbségek: * $P<0,05$ és ** $P<0,01$ a kontroll csoporthoz képest. [Morofuji és mtsai, 2010].

A pitavasztatin agyi endothelsejtek elektromos ellenállását koncentráció és idő-függő módon fokozta (68. ábra). A leghatékonyabb koncentrációnak a 10 nM bizonyult, ezt a koncentrációt, és 48 óra kezelési időt használtunk a további kísérletekben. A sztatín kezelés a fluoreszcein permeabilitást a rezisztencia emelésével párhuzamosan szignifikánsan csökkentette (68. ábra), azonban az albumin átjutás a sejtrétegeken nem változott, ami a sztatín specifikusan a paracelluláris anyagátjutásra kifejtett hatására utal.

Mivel a paracelluláris permeabilitást az agyi endothelsejtek közötti szoros kapcsolatok, és az azokat alkotó transzmembrán fehérjék, a vér-agy gáton főképpen a kladin-5 határozza meg, feltételeztük, hogy a pitavasztatin befolyásolja ennek a fehérjének a kifejeződését.



69. ábra. A: Pitavasztatin (PTV; 10^{-8} , 48 óra) kezelés hatása patkány agyi endothelsejtek klaudin-5 fehérje expressziójára Western blot módszerrel. $^{**}P < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest. B: Fluoreszcens mikroszkópos felvételek patkány agyi endothelsejtekről klaudin-5 immunfestés után. Mércé 20 μm . [Morofuji és mtsai, 2010].

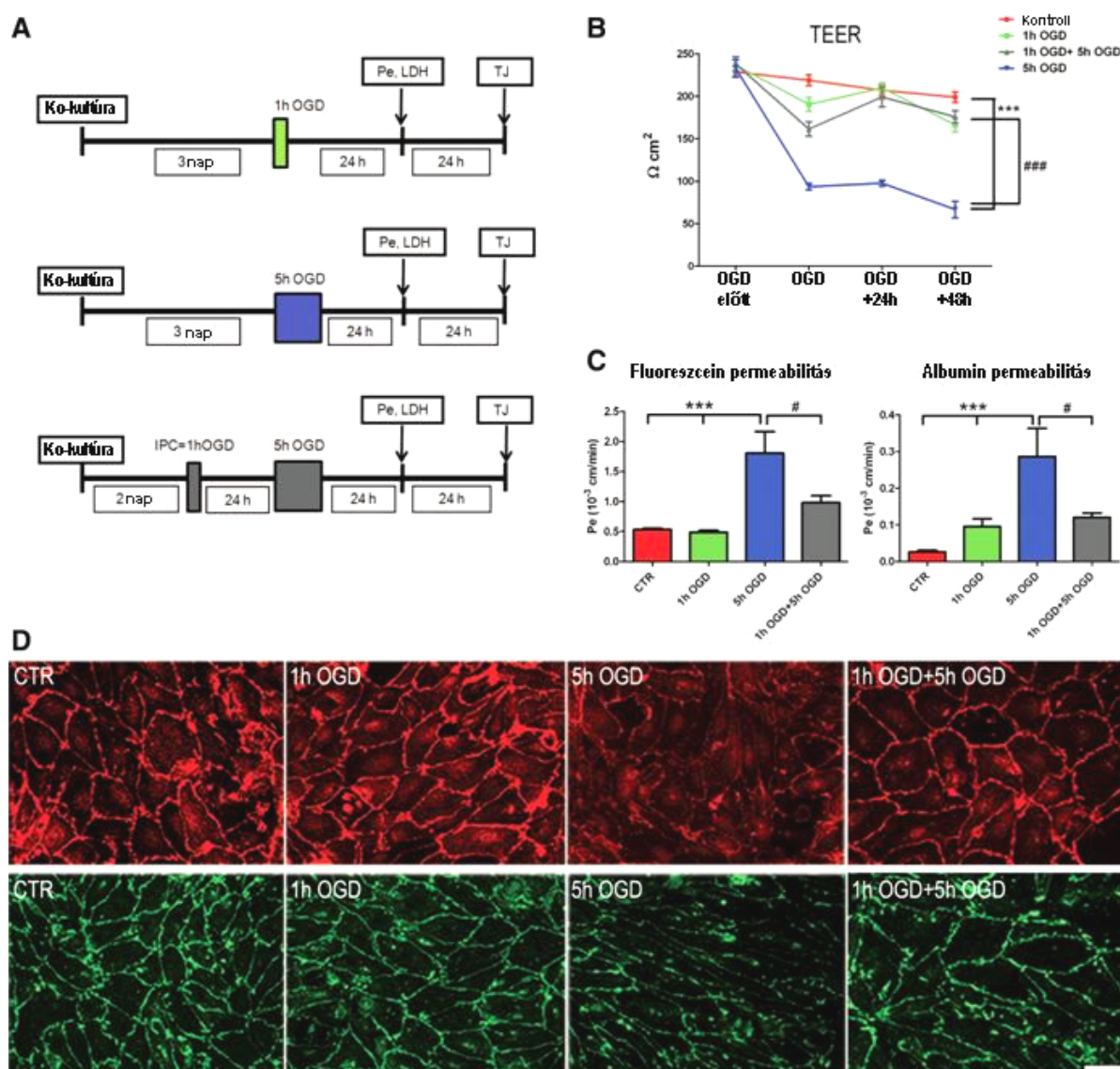
Az optimálisnak talált pitavasztatin kezelés (10 nM, 48 óra) szignifikánsan megnövelte a klaudin-5 fehérje kifejeződését agyi endothelsejtekben (69. ábra), azonban a kvantitatív polimeráz láncreakcióval meghatározott klaudin-5 mRNS szinteket nem befolyásolta [Morofuji és mtsai, 2010]. A klaudin-5 immunfestés intenzitása és sejten belüli megoszlása is megváltozott (69. ábra), erősebb, a sejthátárokat jobban kirajzoló mintázat volt megfigyelhető pitavasztatinnal kezelt tenyészetekben. A pitavasztatin rezisztenciára kifejtett hatását az izoprenoid geranil-geranil-pirofoszfát gátolta, míg a farnezil-pirofoszfát nem befolyásolta [Morofuji és mtsai, 2010].

Eredményeink alapján a pitavasztatin a klinikailag releváns szérumkoncentrációval egyező dózisban a vér-agy gát tenyésztéssel modelljén fokozza a paracelluláris gát szorosságát. Ez a hatás részben a mevalonát útvonal gátlásán keresztül történik, az endothelsejtek közötti kapcsolatokban található klaudin-5 fehérje expressziójának fokozásával.

XIII. A gliasejtek szerepe a vér-agy gát prekondicionálás által létrehozott védelmében

Az idegsejtek védelmét fokozó ischaemiás prekondicionálás (IPC) azon a megfigyelésen alapszik, hogy egy rövid, sérülést nem okozó stimulus megvédi az agyat egy azt követő súlyos károsodástól [Dirnagl és mtsai, 2009]. A kísérletes prekondicionálás klinikai megfelelője, a tranziens ischaemiás attack előfordulása javítja a későbbi stroke prognózisát [Wegener és mtsai, 2004; Zsuga és mtsai, 2008]. Az állatkísérletes és *in vitro* IPC modellek főként az idegsejteket vizsgálták, mint az agyi prekondicionálás sejt-célpontját, és eddig kevés figyelmet fordítottak a cerebrovaszkuláris sejtekre, jóllehet kulcsfontosságú az ischaemiás agyi károsodás létrejöttében [del Zoppo 2010]. Állatkísérletekben az IPC csökkenti a vér-agy gát megnyílást és az azt követő agyödémát [Masada és mtsai, 2001], valamint tenyésztett endothelsejteken a prekondicionálás a sejtközi kapcsolatok fehérjeit stabilizálja [Andjelkovic és mtsai, 2003]. A gliasejtek döntően befolyásolják az agyi endothelsejtek vér-agy gát működésének kialakulását és fenntartását, ezáltal a neurovaszkuláris egység működését mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között [Abbott és mtsai, 2006], azonban ennek a sejttypusnak az IPC-hez történő hozzájárulásáról nem állt rendelkezésre eddig adat.

Célunk az volt, hogy primer egér agyi endothel- és gliasejtek együtt tenyésztésével létrehozott *in vitro* vér-agy gát modellen feltárjuk a prekondicionálás hatását, és az egyes sejttypusok szerepét a védőhatás kialakulásában. Az egér ko-kultúra modell jó barrier funkciót mutatott, magas rezisztenciát ($228 \pm 6 \Omega \times \text{cm}^2$), alacsony endothelsejtekre számolt permeabilitási együtthatót fluoreszcenre ($8,83 \pm 0,33 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$), és albuminra ($0,33 \pm 0,08 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) összhangban saját korábbi eredményeinkkel és szakirodalmi adatokkal [Veszélka és mtsai, 2011].



70. ábra. *In vitro* ischaemiás preconditionálás (IPC) vér-agy gát modellen. A: A kísérleti elrendezés vázlata. B: Agyi endothelsejtek elektromos ellenállása (TEER), valamint C: fluoreszceinre és albuminra mért permeabilitása. D: Fluoreszcens mikroszkópos felvételek egér agyi endothelsejtekről a Zonula occludens-1 (felső képsor) és klauidin-5 (alsó képsor) kapcsolófehérjék immunfestése után. OGD: oxigén és glükóz megvonás; 1h OGD: preconditionálás károsodást nem okozó 1 órás oxigén és glükóz megvonással; 5h OGD: 5 órás oxigén és glükóz megvonás, károsodást okozó, ischaemiát utánozó stimulus; Pe: endothelsejtek permeabilitásának meghatározása; LDH: toxicitás mérése laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásával; TJ: Zonula occludens-1 és klauidin-5 kapcsolófehérjék immunfestése; CTR: kontroll endothelsejtek. Átlag ± SEM, n=12. Szignifikáns különbségek: *** $P < 0,001$ az 5h OGD; # $P < 0,05$ és ## $P < 0,01$ az 1h OGD+5h OGD csoportokhoz képest. Mércse 50 μm. [Gesuete és mtsai, 2011].

Egy órás oxigén és glükóz megvonás (OGD) önmagában nem befolyásolta a gliasejtekkel együtt tenyésztett és kezelt egér primer agyi endothelsejtek rétegeinek paracelluláris permeabilitását, amit az elektromos ellenállás, és a fluoreszcein átjutásának adatai tükröznek (70. ábra). Ezzel összhangban nem változott a ZO-1 és klauidin-5 sejtkapcsolófehérjék immunfestése. A transzendotheliális albumin átjutás volt az egyetlen paraméter, ami szignifikánsan megemelkedett a kontroll tenyészetekhez képest. Az 5 óráig tartó OGD drasztikus károsító, paracelluláris permeabilitást fokozó hatást fejtett ki: 24 órával az ischaemiát utánozó stimulus után a kontroll sejtekhez képest az endothelsejtek ellenállása a felére csökkent, a fluoreszcein permeabilitás megháromszorozódott, a ZO-1 és klauidin-5 fehérjék festődése meggyengült, és a sejtek határan felszakadozott mintázat volt megfigyelhető. A transzendotheliális albumin átjutás mintegy tízszeres emelkedést mutatott, összhangban korábbi

globális és fokális agyi ischaemiában kapott állatkísérletes eredményeinkkel [Deli és mtsai, 2000; Ábrahám és mtsai, 2002], ami megerősíti az *in vitro* modell alkalmazhatóságát patológias folyamatok vizsgálatában. Az *in vitro* vér-agy gát modell prekondicionálása 1 órás oxigén és glükóz megvonással 24 órával a károsító hatás előtt, hatékonyan megvédte az endothelsejteket az összes vizsgált vér-agy gát paraméterre (70. ábra).

A következő kísérletsorozatban a glia- és az agyi endothelsejtek külön kaptak prekondicionálást, majd az IPC-t nem kapott sejtekkel összerakva együtt érte a modellt az 5 órás OGD kezelés. A glia sejtek prekondicionálása védőhatást fejtett ki az endothelsejt-barrier integritására, szemben a csak endothelsejteket érintő IPC kezeléssel, ami nem volt hatékony [Gesuete és mtsai, 2011]. Az astrogliasejtek anyagcseréjének gátlása fluorocitráttal a sejtekre nem toxikus dózisban (0,48 mM, 3 óra) a védőhatás kialakulását meggátolta, ami az astrogliasejtek döntő szerepére utal a prekondicionálásban [Gesuete és mtsai, 2011]. Az IPC szignifikánsan megemelte a GFAP, az interleukin-6 és a VEGF szintjét astroglia sejtekben OGD kezelés után. Ezek alapján feltételezhető, hogy a gliasejtek hozzájárulása a prekondicionáláshoz több útvonalon keresztül történik. Az *in vitro* vér-agy gát modellen kapott eredményeket megerősítették az IPC állatkísérletes modelljén kapott adatok. Az *in vivo* ischaemiás prekondicionálás (a jobb oldali *a. cerebri media* hét perces okklúziója) 4 nappal a permanens érelzárás előtt szignifikánsan csökkentette az agyi infarktus nagyságát és kivédte a vér-agy gát megnyílását albuminra egerekben. Ugyanezen a modellen az IPC szelektíven fokozta a GFAP mRNS szintjét, teljes összhangban a tenyésztéses modellen kapott eredményekkel [Gesuete és mtsai, 2011].

Ezek az állatkísérletes és tenyésztéses modelleken nyert adatok megerősítik, hogy a vér-agy gát közvetlenül célpontja lehet az ischaemiás prekondicionálásnak, és elsőként tárták fel, hogy az astrocyták az IPC által kiváltott védőhatásában döntő szerepet játszanak.

5.3. Neurodegeneratív betegségekben szerepet játszó kóros fehérjék vizsgálata

A fehérjekonformációs betegségek közé tartozó súlyos, gyógyíthatatlan neurodegeneratív kórfolyamatokban, mint amilyen az Alzheimer-kór vagy a prion betegségek, az agyi endothelsejtek is károsodnak, sőt a betegségek pathomechanizmusát is befolyásolják [Zlokovic 2008]. Ezekben a betegségekben az endothelsejtek célpontjai a kórfolyamat során termelt, s az agyi erek körül felhalmozódott patológias amiloid típusú fehérjéknek és azok peptid fragmenseinek, ennek következtében a vér-agy gát működése zavart szenved, ami hosszabb távon nemcsak magukat az agyi endothelsejteket, hanem az általuk védett központi idegrendszert is károsítja [Deli 2005].

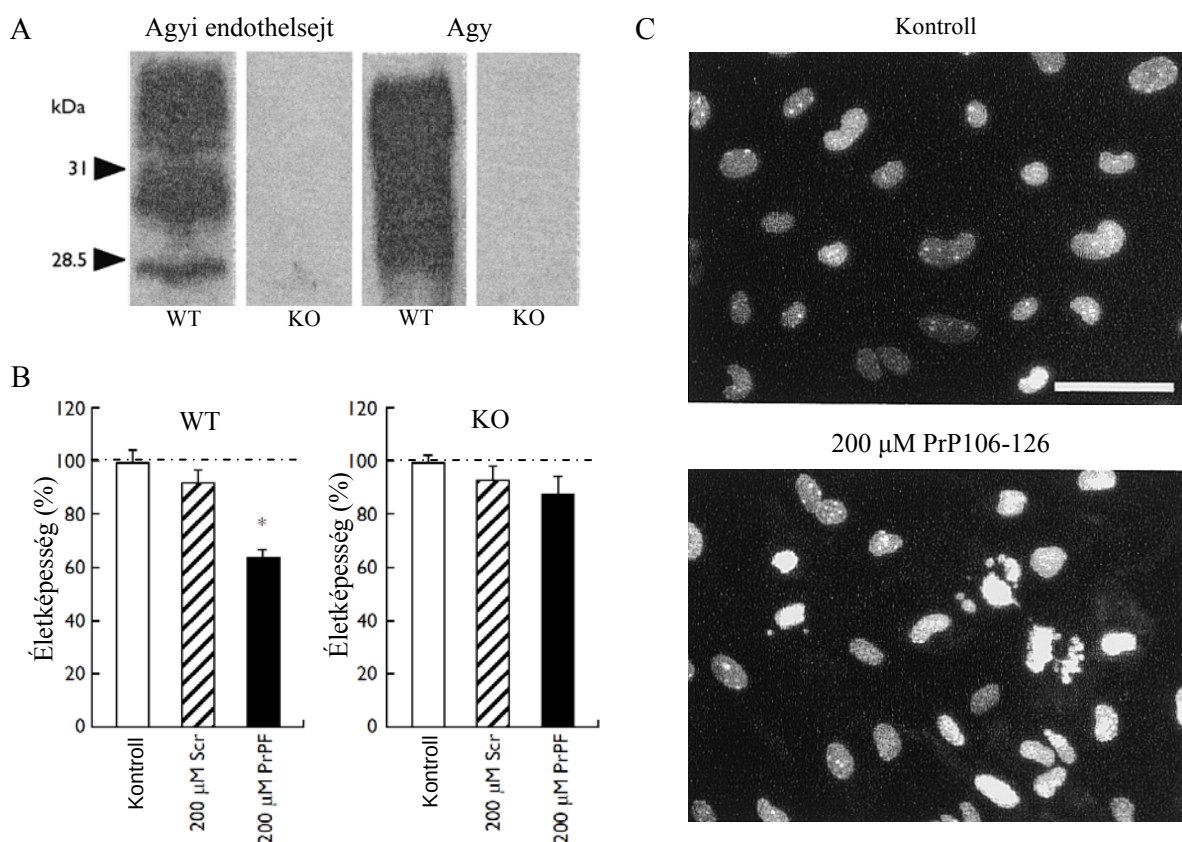
XIV. A prion peptid hatása agyi endothelsejtekre

A prion betegségek progresszív, fatális, igen ritka neurodegeneratív kórformák, amelyek öröklött, fertőző vagy sporadikus eredetűek lehetnek. A prion betegségek csoportjába soroljuk többek között a juhok és rágcsálók súrlókóráját, a szarvasmarhák szivacsos agyvelőgyulladását, és a humán Creutzfeldt-Jakob-kórt, illetve a fatális familiáris insomniát [Prusiner, 1998]. A betegségek lefolyásában szerepet tulajdonítanak a prionfehérje (PrP) kóros konformációjának (PrP^{Sc}), ugyanakkor intenzív kutatás ellenére sem ismert ennek a sejtes glikoproteinnak (PrP^C) az élettani szerepe, de annak mechanizmusa sem tudott részleteiben, hogyan okoz a kóros konformációjú PrP^{Sc} idegsejtpusztulást [Prusiner, 1998; Aguzzi és mtsai, 2008].

A prion betegségek neuropathológiai képében dominál az idegsejtek pusztulása, amihez tau hiperfoszforiláció, vakuolizáció, astrogliosis, és microglia aktiváció társul [Reiniger és mtsai, 2010]. A vér-agy gát károsodásáról a prion betegség lefolyása során alig van szakirodalmi adat, ezeket egy összefoglaló közleményünkben tárgyaltuk [Deli, 2005]. Humán PrP^{Sc} mutáció, és súrlókór (juh, egér, hörcsög) esetében is megfigyeltek cerebrovaszkuláris amiloid lerakódást, valamint a prion betegség állatmodelljeiben fokozott vér-agy gát permeabilitást írtak le tormaperoxidázra és endogén albuminra.

A prion betegségek vizsgálatára a PrP hidrofób, fibrillogén 106-126-os peptid szakaszát (PrP106-126) széles körben alkalmazzák. A PrP106-126 is oldhatatlan, proteináz rezisztens, β -redő konformációjú fibrillumokat képez, és toxikus az idegsejtekre [Forloni és mtsai, 1993]. Ezt a peptidet gliasejtek vizsgálatára is alkalmazták, de vér-agy gát vizsgálatokat előzőleg nem végeztek vele. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, van-e közvetlen hatása a PrP106-126 peptidnek agyi endothelsejtek életképességére, és ez a hatás függ-e a PrP gén kifejeződésétől.

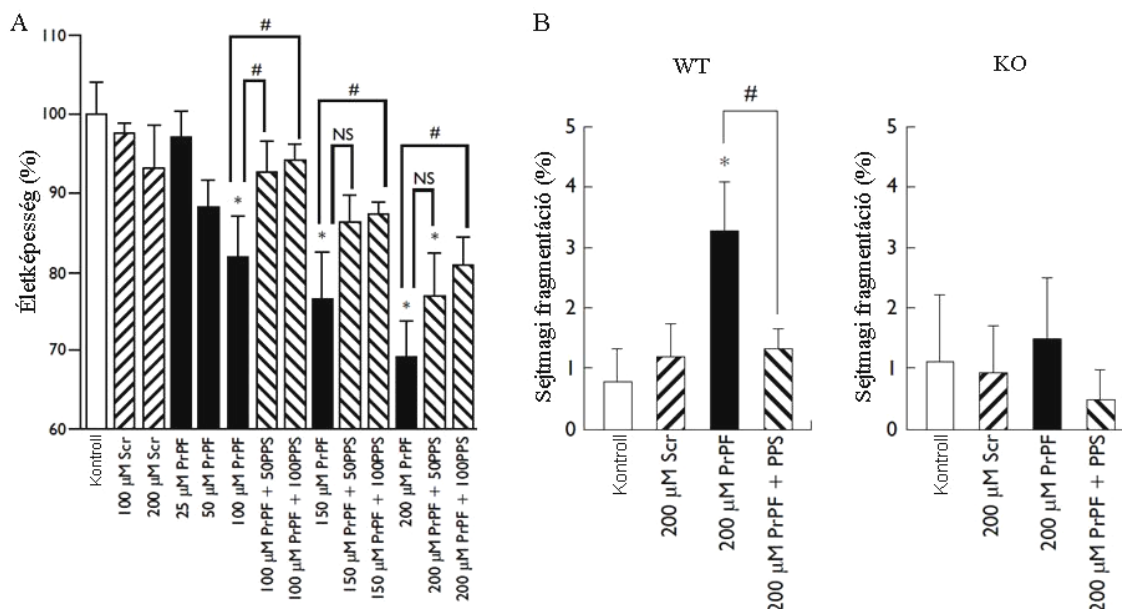
Mivel korábbi adatok utaltak arra, hogy az erősen negatív töltésű, heparinhoz hasonló szerkezetű, a sűrűlőkor profilaxisában hatásos [Farquhar és mtsai, 1999], és a Creutzfeldt-Jakob-kór terápiájában is alkalmazott pentozán [Rainov és mtsai, 2007] nem megy át mérhető mennyiségben agyi endothelsejtekre [Leveugle és mtsai, 1998], feltételeztük, hogy a molekula a vér-agy gáton fejtheti ki védőhatását [Deli és mtsai, 1999]. Ezt a hipotézisünket is leteszteltük a vér-agy gát tenyészetes modelljén.



73. ábra. A prionfehérje 106-126-os peptid szakaszának (PrPF vagy PrP106-126) hatása vad típusú egerekből (WT) és a prionfehérjét nem expresszáló *Ngsk Prnp0/0* egerekből (KO) izolált agyi endothelsejtekre. A: sejtes prionfehérje PrP^C kimutatása Western blottal WT és KO egerek agyhomogenátumából, és agyi endothelsejteiből. B: PrP106-126 (200 μ M, 2 nap) hatása WT és KO egér agyi endothelsejtek MTT festékredukció teszttel meghatározott életképességére. Scr: összekevert aminosav sorrendű peptid. Átlag $\pm$ SD, $n=5$. * $P<0,05$ a kontrollhoz képest. C: Fluoreszcens mikroszkópos felvétel vad típusú egér kontroll és PrP106-126 peptiddel kezelt agyi endothelsejtekről bis-benzimiddel végzett magfestés után. Mércse: 50 μ m. [Deli és mtsai, 2000a].

Vad típusú agyi endothelsejtekben, akárcsak agyszövetben kimutattuk a sejtes prionfehérje jelenlétét, ami a *Ngsk Prnp0/0* (KO) egerekből hiányzott (73. ábra). A PrP106-126 jelentősen csökkentette a prionfehérjét expresszáló vad típusú egér agyi endothelsejtek életképességét, míg az ugyanolyan aminosavakból álló, de kevert sorrendű peptid (Scr) nem hatott (73. ábra). A hatás a prionfehérje expressziójától függött, KO egerekből izolált agyi endothelsejtek nem voltak érzékenyek a PrP106-126 hatására. A peptid 50 μ M koncentrációja fölött szignifikáns, dózis-függő sejtpusztulást mértünk agyi endothelsejtekben több módszerrel is (74. ábra). A PrP106-126 a legnagyobb koncentrációban (200 μ M, 2 nap) a sejtek életképességét mintegy 40 %-kal csökkentette a sejtek

metabolikus aktivitását kimutató MTT tesztben. Ugyanennél a dózisonál 23 %-os LDH felszabadulást mértünk, ami a kontroll sejtekhez képest tízszeres emelkedést mutatott, és a plazmamembrán károsodását, és nekrozist jelzett [Deli és mtsai, 2000a]. Morfológiai módszerekkel is igazoltuk a PrP106-126 toxikus hatását agyi endothelsejteken a sejtmembrán integritását mérő tripánkék kizárásos módszerrel, valamint az apoptózis jelenlétének a sejtmagok fluoreszcens festékekkel való vizsgálatával (73. és 74. ábra) [Deli és mtsai, 2000a].

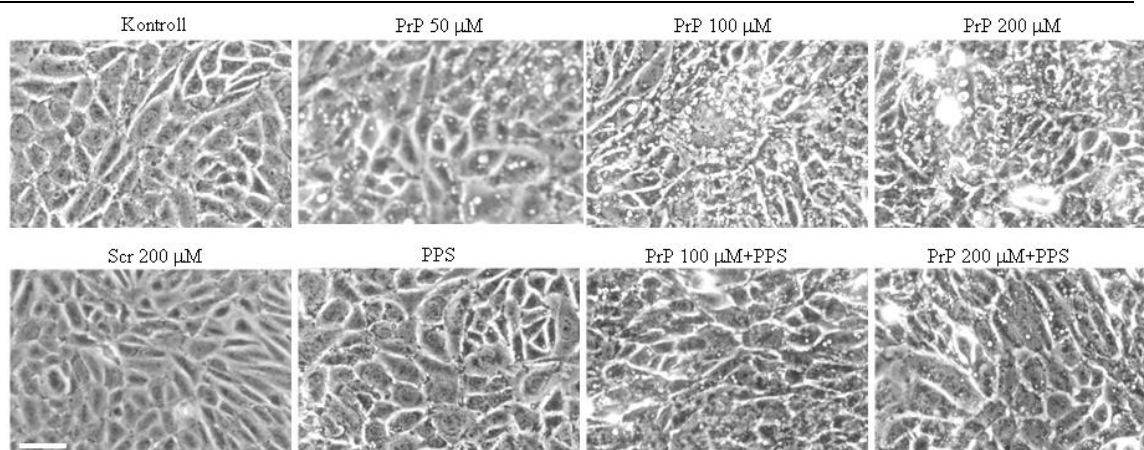


74. ábra. A: PrP106-126 (25-200 μ M, 48 óra) és pentozán együttes hatása WT egér agyi endothelsejtek MTT festékredukció tesztel meghatározott életképességére. Scr: összekevert aminosav sorrendű peptid (100-200 μ M); PPS: pentozán (50-100 μ g/ml). Átlag $\pm$ SD, három független kísérlet, $n=5-6$. Szignifikáns különbség: * $P<0,05$ a kontrollhoz képest; # $P<0,05$ a PrP csoporthoz képest. B: Sejtmagok apoptózisának aránya PrP106-126 vagy kevert (Scr) peptiddel (200 μ M, 48 óra) vagy egyidejűleg pentozánnal (100 μ g/ml) is kezelt agyi endothelsejt tenyészetekben bis-benzimiddel végzett magfestés után. Szignifikáns különbség * $P<0,05$ a kontrollhoz képest; # $P<0,05$ a PrP csoporthoz képest. [Deli és mtsai, 2000].

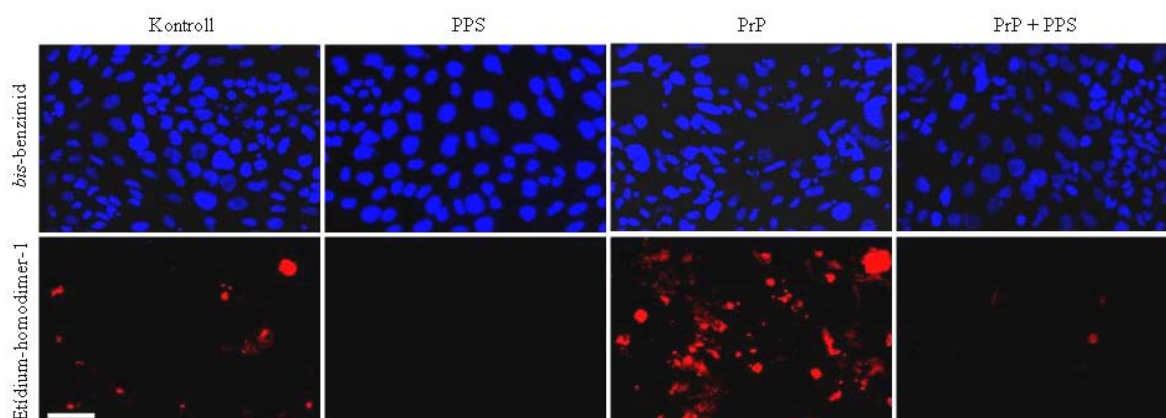
A PrP106-126 toxicitást pentozánnal dózis-függő módon csökkenteni lehetett, 50 és 100 μ g/ml koncentrációban minden toxicitási tesztben szignifikáns védőhatást mértünk az endothelsejteken. A védőhatás mechanizmusa komplex lehet. A PPS egyrészt közvetlenül befolyásolhatja a PrP106-126 aggregációját és fibrillumok kialakulását, amit a kísérleteink során fénymikroszkóppal is megfigyeltünk. Másrészt a PPS pleiotróp sejtes hatást mutat: különböző modellrendszerekben leírták, hogy gátolja a protein kináz C és A, valamint a tirozin protein kinázok működését, akár csak a szerin proteázokat, mátrix metalloproteinázokat, liposzómális enzimeket, koagulációs faktorokat, komplement faktorokat, és citokineket, ugyanakkor fokozza a szöveti plazminogén aktivátor, a szuperoxid dizmutáz, és a lipáz perifériás erek endotheliumából történő felszabadulását [Ghosh, 1999]. Leírtuk, hogy a pentozán agyi endothelsejteken befolyásolja a receptor-mediálta transzport folyamatokat is [Deli és mtsai, 2000b]. A PPS hatásmódjának feltárásához további vizsgálatokat terveztünk.

Elsőként mutattuk ki primer egér agyi endothelsejteken, a sejtes prionfehérje expresszióját és a PrP106-126 peptid dózis-függő, közvetlen toxikus hatását, amit pentozánnal gátolni lehetett. Adataink alapján az agyi endothelium a prion betegségekben közvetlenül is károsodhat.

Az egér agyi endothelsejteken nyert eredményeket megerősítettük primer patkány agyi endothelsejteken, sejtvonalon, és ko-kultúra modellen is [Deli és mtsai, új, nem közölt eredmény]. A PrP106-126 peptid dózis-függő toxikus hatását ezeken a sejteken is megfigyeltük, amit pentozán kezelés szignifikáns módon kivédett. A prion peptid kezelés okozta vakuolizációt, és sejtpusztulást, és a pentozán védőhatását a standard toxicitási tesztek mellett a sejtek morfológiáján is megfigyeltük fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva (75. ábra).

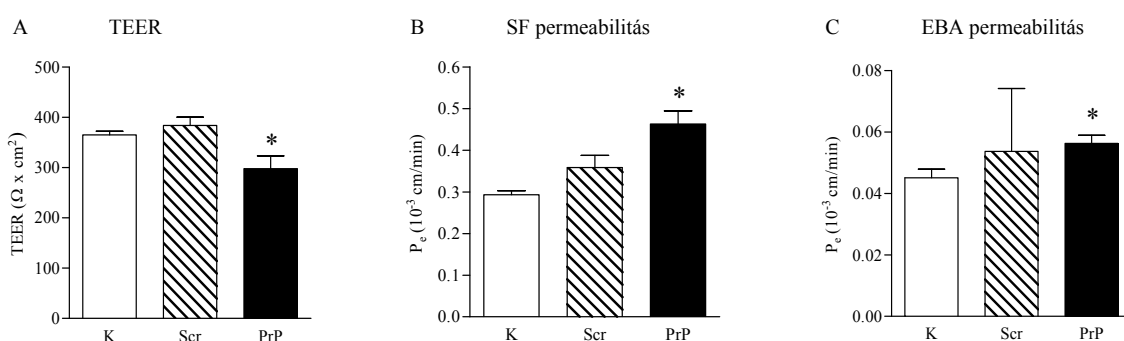


75. ábra. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek GP8 patkány agyi endothelsejt tenyészetekről 2 napos peptid és pentozán kezelés után. PrP: PrP106-126 (50-200 μM); PPS: pentozán (100 $\mu\text{g/ml}$); Scr: összekevert aminosav sorrendű peptid (200 μM). Mércé: 25 μm .

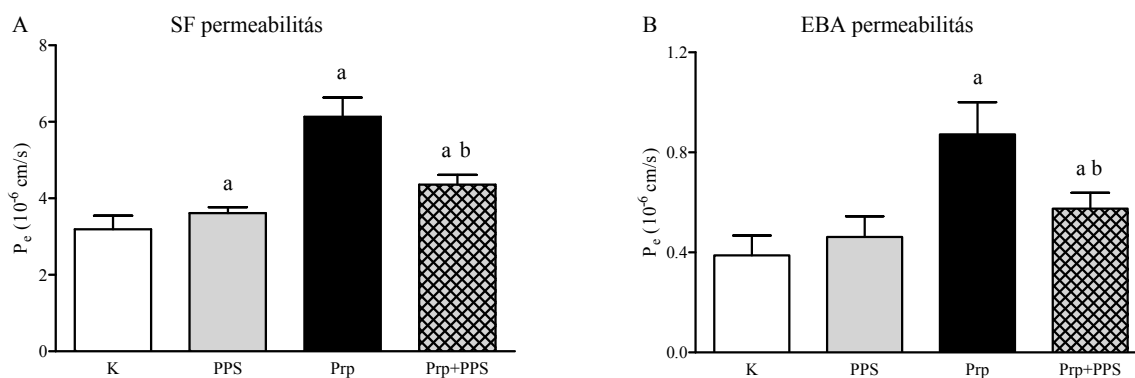


76. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek GP8 patkány agyi endothelsejt tenyészetekről 2 napos PrP106-126 peptid (200 μM) és pentozán (PPS, 100 $\mu\text{g/ml}$) kezelés után. Az összes sejt magja kékre festődik bis-benzimidazole festékkel. Az etidium-homodimer-1 csak az elpusztult sejtek magját festi pirosra. Mércé: 25 μm .

Kettős fluoreszcens sejtmag jelöléssel is igazoltuk a prion peptid agyi endothelsejteket károsító, és a pentozán védőhatását (76. ábra). Az agyi endothelsejtek barrier működését glia sejtekkel létrehozott ko-kultúra modellen vizsgáltuk. A PrP106-126 peptid csökkentette az endothelsejtek ellenállását, és fokozta a paracelluláris és transzcelluláris markerek átjutását (77. ábra).



77. ábra. Elektromos ellenállás (A), és permeabilitás fluoreszceinre (B) és albuminra (C) patkány agyi endothelsejtekben 2 napos PrP106-126 (PrP, 200 μM) és kontroll peptid (Scr, 200 μM) kezelés után. TEER: elektromos ellenállás; P_e : endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SD, $n=6$, $*P<0,05$: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest.



78. ábra. Patkány agyi endothelsejtek permeabilitása fluoreszceinre (A) és albuminra (B) 2 napos PrP106-126 peptid (PrP, 200 μ M) és pentozán (PPS, 100 μ g/ml) kezelés után. Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SD, n=4. Szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) a: a kontrollhoz, b: a Prp-hez képest.

A pentozán jelentősen csökkentette a prion peptid kezelés által okozott permeabilitás fokozódást agyi endothelsejteken (78. ábra). A PrP106-126 a vér-agy gát két fontos efflux pumpájának, a P-glikoproteinnek és multidrog rezisztencia asszociált fehérjének (MRP-1) aktivitását is gátolta *in vitro* kísérletekben. Pentozán kezelés ebben az esetben is kivédte a peptid károsító hatását. Ezek az új kísérletes adatok arra utalnak, hogy a vér-agy gát funkcióinak romlása szerepet játszhat prion betegségek körlefolýása során.

A megfigyeléseinket, hogy (i) agyi endothelsejtekben megtalálható a sejtes prionfehérje, és (ii) a prion peptid közvetlen károsító hatást fejt ki agyi endothelsejtekre [Deli és mtsai, 2000a], a közelmúltban más kutatócsoportok is megerősítették tenyésztetes vér-agy gát modelleken [Viegas és mtsai, 2006; Cooper és mtsai, 2011].

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a PrP106-126 peptid a vér-agy gát működéseket is károsítja agyi endothelsejteken és a pentozán a permeabilitás fokozódást és az efflux transzportereket gátló hatást is kivédte.

XV. Az amiloid- β peptidek és a csonkolt tau fehérje hatása agyi endothelsejtekre

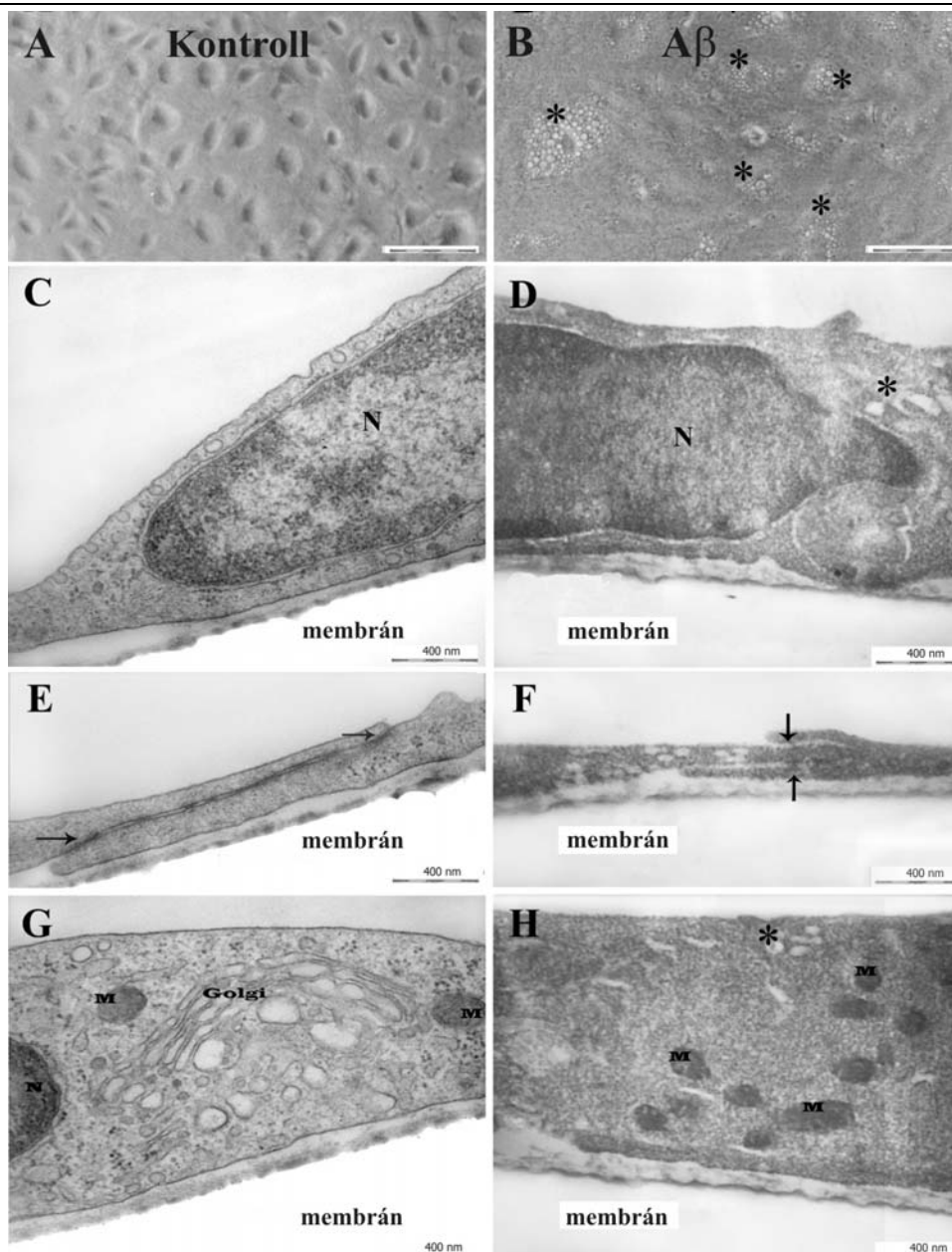
Újabb szakirodalmi adatok alapján a neurovaszkuláris mechanizmusok hozzájárulnak Alzheimer-kórban a neurodegeneráció és a dementia létrejöttéhez [Zlokovic 2008]. Az Alzheimer-kór kialakulásában mind az amiloid- β peptidek (A β), mind a csonkolt tau fehérje pathogenetikus szerepét feltételezik. A vér-agy gát endothelsejtjei hozzájárulnak az A β termelődéséhez és metabolizmusához, ezen felül pedig az A β vér-agy gáton keresztüli transzportja kulcsfontosságú az agyi A β szint szabályozásában. A vér-agy gát A β clearance mechanizmusának elősegítése, és az agyi endothelium védelme fontos új terápiás célpontok lehetnek Alzheimer-kórban. Célunk az volt, hogy (i) megvizsgáljuk az A β peptidek és a patológias tau fehérje közvetlen károsító hatását agyi endothelsejtek életképességére, barrier funkciójára és egyéb működésére, és (ii) védő hatású molekulákat találjunk az *in vitro* modellünk segítségével.

Védőhatású molekulák tesztelése A β peptidek okozta károsodásra *in vitro* vér-agy gát modellen

Pentozán

Korábbi kísérletes adatok az A β közvetlen toxikus hatását írták le agyi endothelsejt-tenyészeteken [Deli, 2005], azonban alig találtak eddig protektív molekulát, ami a vér-agy gát működését hatékonyan védeni tudná. A pentozán gátolni tudta az endogén glükózaminoglikánok kötődését az A β -hoz, ezért feltételezték, hogy potenciálisan terápiás hatása lehet Alzheimer-kórban [Leveugle és mtsai, 1998], azonban vér-agy gát modellen nem tesztelték. Célunk az volt, hogy a pentozán, és legújabb kísérleteinkben az antioxidáns hatású, többszörösen telítetlen ω -3 lipid, a dokozahexaénsav (DHA) protektív hatását tanulmányozzuk A β peptiddel kezelt agyi endothelsejteken.

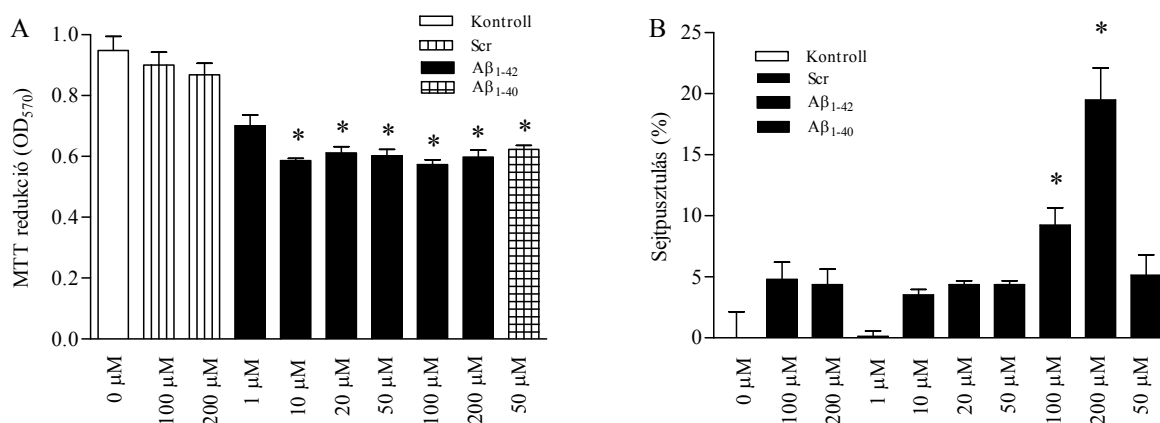
Kimutattuk, hogy az A β 1-42 peptid közvetlen módon toxikus patkány agyi endothelsejtek primer tenyészteteire, amit a sejtek morfológiai változásai is igazoltak: jellegzetes citoplazmatikus vakuolizáció jött létre, és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal a citoplazmatikus organelumok és a sejtek szoros kapcsolatainak károsodását figyeltük meg (79. ábra).



79. ábra. Aβ1-42 peptid (25 μM, 48 óra) hatása patkány primer agyi endothelsejtek morfológiájára. Fáziskontraszt (A-B) és transzmissziós elektronmikroszkópos (C-H) felvételek tenyésztőbetétén növesztett és kezelt agyi endothelsejtekről kontroll körülmények között (A,C,E,G) és Aβ1-42 peptid kezelés után (B,D,F,H). Mércé: fáziskontraszt mikroszkóp (A-B): 30 μm; elektronmikroszkóp (C-H): 400 nm. A nyilak a sejtközi kapcsolatokat, a csillagok a citoplazmatikus vakuólumokat jelzik. N: sejtmag, M: mitokondriumok. [Deli és mtsai, 2010].

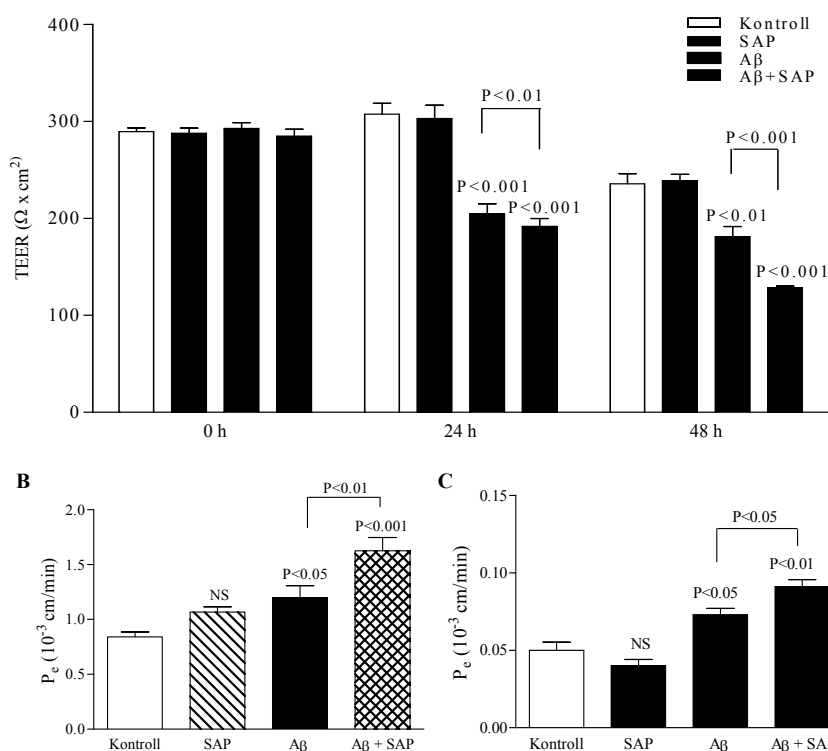
Az Aβ1-42 peptiddel kezelt sejtekben sötétebb cytoplazmát, kevesebb Golgi-készüléket és kaveolát, és több vakuólumot lehetett látni. Amíg a kontroll sejtekben az egymást átfedő sejtnyúlványok között szabályos és hosszú szoros kapcsolatokat találtunk, a peptid kezelés után szabálytalan, egymástól eltávolodott, és rövidebb kapcsolatok alakultak ki a sejtek nyúlványai között (79. ábra). A PPS védte az endothelsejteket a károsító hatással szemben, de önmagában nem okozott változást a sejtek morfológiájában [Deli és mtsai, 2010].

MTT tesztel mérve az Aβ1-42 peptid 10 μM koncentráció fölött szignifikáns módon csökkentette az agyi endothelsejtek életképességét (80. ábra). Hasonló hatást fejtett ki az Aβ1-40 peptid is 50 μM dózisban. Laktát dehidrogenáz felszabadulással mért nekrotikus sejtpusztulást csak a két legnagyobb, 100 és 200 μM koncentrációnál találtunk. A hatás specifikus volt, mivel a random aminosav sorrendű peptid nem bizonyult toxikusnak a sejtekre (80. ábra).



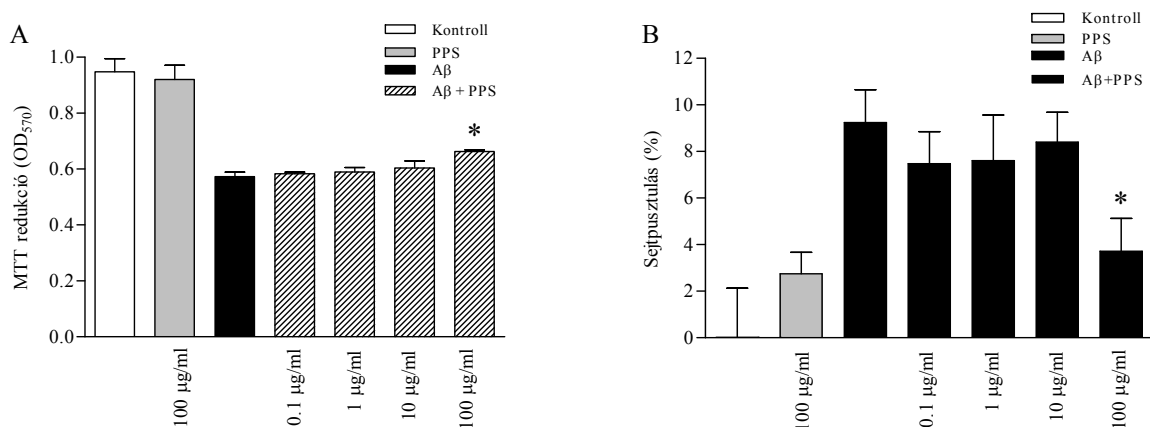
80. ábra. Két napos amiloid β 1-40 (A β 1-40) és amiloid β 1-42 (A β 1-42) peptidekkel végzett kezelés hatása agyi endothelsejtek életképességére. A: MTT festékredukció teszt; B: laktát-dehidrogenáz felszabadulás. Scr: összekevert aminosav sorrendű peptid. Átlag $\pm$ SEM, n=8, * P <0,05: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest. [Deli és mtsai, 2010].

A SAP erősen kötődik az amiloid peptidekhez, és alkotóeleme az agyi plakkoknak, valamint az erek körül elhelyezkedő amiloidnak is. Az A β 1-42 a SAP fiziológiás koncentrációjával (40 μ g/ml), együtt adva az A β önálló hatásánál jobban csökkentette az endothelsejt rétegek ellenállását (81. ábra), ugyanakkor a csak SAP kezelt sejtrétegek ellenállása nem különbözött a kontroll sejtektől.



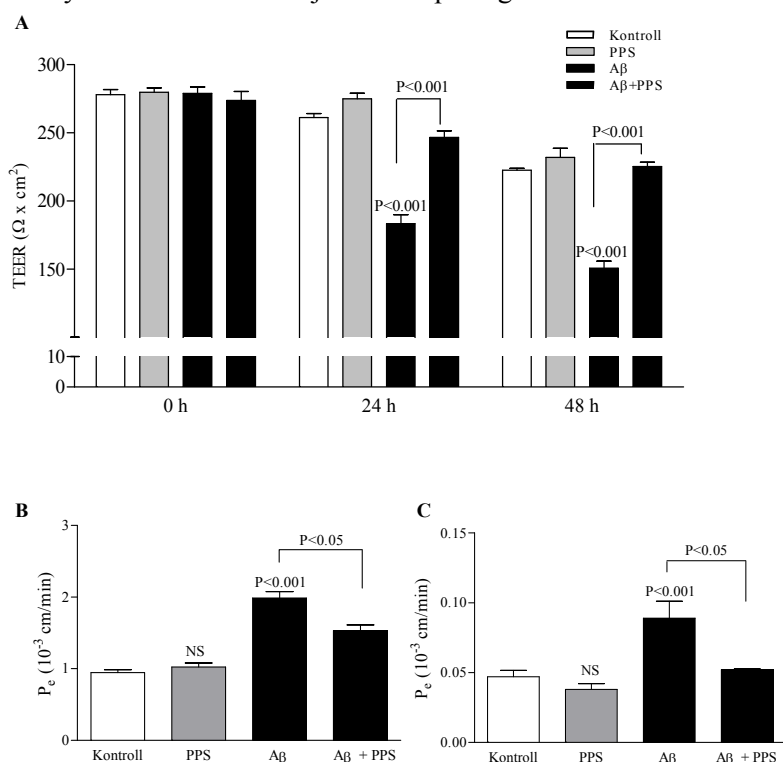
81. ábra. Patkány agyi endothelsejtek elektromos ellenállása (A), permeabilitása fluoreszceinre (B), és albuminra (C) 2 napos A β 1-42 peptid (25 μ M) és szérum amiloid P komponens (SAP, 40 μ g/ml) kezelés után. TEER: elektromos ellenállás; Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SEM, n=6, NS: nincs szignifikáns különbség a kontrollhoz képest. [Deli és mtsai, 2010].

A SAP fokozta az A β 1-42 peptid permeabilitást növelő hatását fluoreszceinre és albuminra is (81. ábra), azonban önmagában a SAP kezelés nem változtatta meg a sejtrétegek permeabilitását szignifikáns módon.



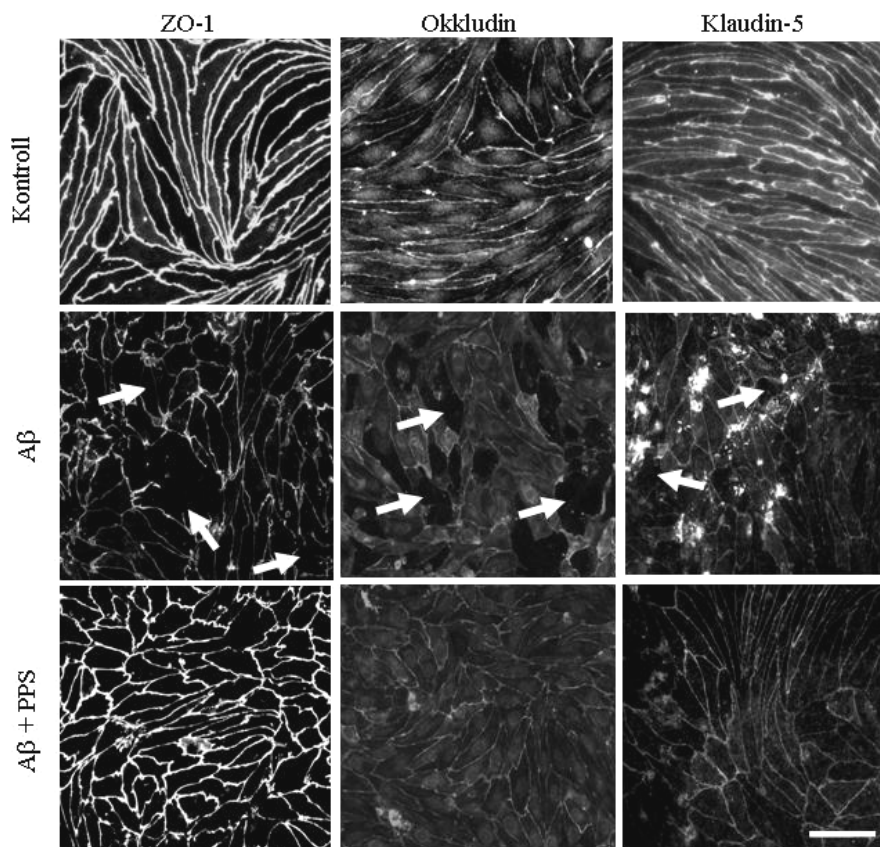
82. ábra. Pentozán hatása A β 1-42 peptiddel (25 μ M, 48 óra) kezelt agyi endothelsejtek életképességére. A: MTT festékredukció teszt; B: laktát-dehidrogenáz felszabadulás. Átlag $\pm$ SEM, n=8, * P <0,05: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest. [Deli és mtsai, 2010].

Az A β 1-42 endothelsejtekre kifejtett toxikus hatását a legnagyobb koncentrációjú, 100 μ g/ml dózisban adott pentozán szignifikánsan csökkentette mind az MTT, mind az LDH tesztben (82. ábra). Ennél kisebb koncentráció tartományban (0.1-10 μ g/ml) a PPS nem bizonyult hatékonyának. A PPS önmagában nem befolyásolta az endothelsejtek életképességét.



83. ábra. Pentozán (PPS, 100 μ g/ml) és A β 1-42 peptid (25 μ M, 48 óra) hatása patkány agyi endothelsejtek elektromos ellenállására (A), valamint fluoreszceinre (B), és albuminra (C) mért permeabilitására. TEER: elektromos ellenállás; P_e : endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SEM, n=8, NS: nincs szignifikáns különbség a kontrollhoz képest. [Deli és mtsai, 2010].

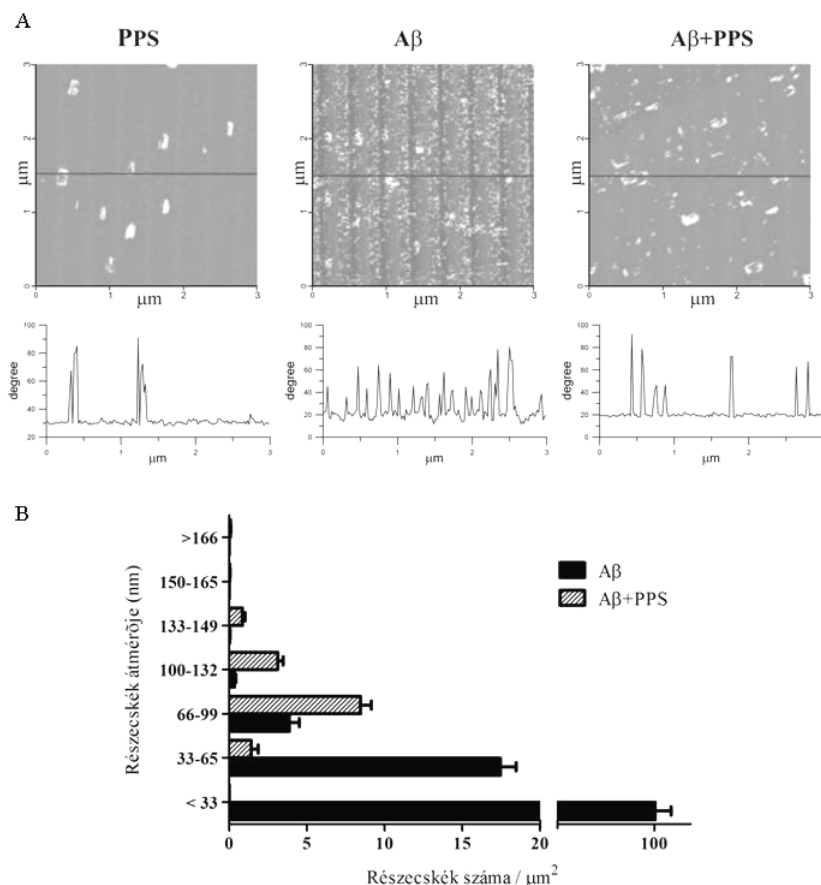
Az A β 1-42 peptid kezelés jelentősen csökkentette az agyi endothelsejt-rétegek elektromos ellenállását, és duplájára fokozta a fluoreszcein és az albumin átjutását (83. ábra). A PPS (100 μ g/ml) mind a 24 órás, mind a 48 órás kezelési időpontban kivédte ezeket a hatásokat. PPS kezelésnek önmagában nem volt hatása a barrier integritására.



84. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek patkány agyi endothelsejtekről A β 1-42 peptid (25 μ M, 48 óra) és pentozán (PPS, 100 μ g/ml) kezelés és sejtközi kapcsolófehérje immunfestés után. A nyilak az immunfestődés gyengülését, felszakadozását, és a sejtek közötti lyukakat jelzik. Mércse: 25 μ m. [Deli és mtsai, 2010].

A permeabilitási adatokkal összhangban A β 1-42 peptid kezelés az agyi endothelsejteket összekötő szoros kapcsolatok fehérjéinek immunfestődési mintázatát is megváltoztatta (84. ábra). Kontroll körülmények között a sejtréteg egybefüggő, a sejtek alakja a korábbi ábrákhoz hasonlóan orsó alakú. Az endothelsejtek határán egyenletes, tipikus övszerű festődés látható mind a ZO-1, mind az okkludin, mind pedig a klaudin-5 kapcsolófehérje esetében. A β 1-42 peptid kezelés (25 μ M, 48 h) hatására a festés drámai módon megváltozott. Az endothelsejtréteg felszakadozott, a sejtek között lyukak jelentek meg (84. ábra, nyilak). Ezzel egyidőben a junkcionális fehérjék immunfluoreszcens festődésének intenzitása a sejthatárokon lecsökkent. Pentozán kezelés ezeket a hatásokat látványosan kivédte, akár csak a funkcionális tesztek esetében.

Mivel a pentozán módosítja a glükózaminoglikánok kötődését az A β -hoz, atomerő-mikroszkópiával vizsgáltuk a pentozán és az A β 1-42 peptid közvetlen kölcsönhatását (85. ábra). A PPS módosította az A β 1-42 peptid aggregátumainak méretét, és a részecskék nagyság szerinti eloszlását lézerrel strukturált polikarbonát felszínén. A pentozán szignifikánsan csökkentette a felszínre kitapadt partikulumok számát főképpen a leginkább toxikusnak tartott, legkisebb oligomer méret-tartományban. Ezt a hatást plazmon rezonancia kísérleteink is megerősítették [Csete és mtsai, 2007].

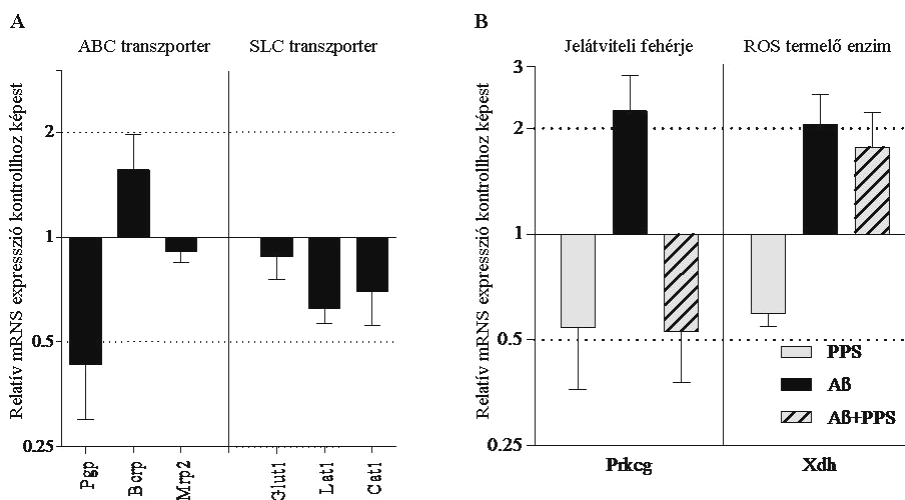


85. ábra. A: atomerő-mikroszkópos felvételek biomolekula aggregátumokról lézerrel lineárisan strukturált polikarbonát felszínen (A). Pentozán (PPS, 100 $\mu\text{g/ml}$), A β 1-42 peptid (10 $\mu\text{g/ml}$), és a két biomolekula aggregátumainak együttes kitapadásának detektálása tapping módban. B: az A β 1-42 peptid lézerrel lineárisan strukturált polikarbonát felszínre kitapadt és atomerő-mikroszkópiával detektált aggregátumainak méreteloszlása pentozán hiányában és jelenlétében. Átlag $\pm$ SEM, *** $P < 0.001$ (Deli és mtsai, 2010).

Patkány agyi endothelsejteken megerősítettük az A β 1-42 peptid közvetlen károsító hatását. Elsőként írtuk le, hogy az A β aggregátumokat stabilizáló SAP fokozza, a pentozán pedig kivédi az A β peptid barrier integritást csökkentő hatását. Atomerő mikroszkópiás vizsgálatokkal igazoltuk a pentozán közvetlen hatását az A β aggregátumok méretére, számára és kitapadására

Adataink alátámasztják azt a hipotézist, hogy neurodegeneratív betegségekben az endothelsejtek közvetlen célpontjai a kórfolyamatban szerepet játszó faktoroknak, mint az amiloid típusú peptidek. Sikeresen elsőként kimutattunk, hogy a pentozán a peptidek agyi endothelsejtekre kifejtett károsító hatását kivédte. A perifériásan beadott pentozán nem jut át a vér-agy gáton, így a prion betegségekben megfigyelt hatása az agyi endothelsejtekken keresztül valósulhat meg. A pentozán a klinikumban is használt gyógyszer (SP54) heveny érelzáródás, szubakut vagy ismétlődő visszérgyulladás kezelésére. Megfigyeléseink felvetik a hatóanyag új indikációban történő alkalmazását.

Folyamatban levő kutatásainkban az A β 1-42 peptid és a pentozán hatásmódját szeretnénk jobban megismerni, ennek céljából a peptiddel és a poliszachariddal kezelt agyi endothelsejt-tenyészetek génexpressziós mintázatát egyedi TaqMan arrayk segítségével vizsgáljuk a vér-agy gát működésében fontos kapcsoló- és szállítófehérjékre, valamint jelátvivő utak egyes kulcsenzimeire. Előzetes eredményeink alapján az A β 1-42 peptid az efflux pumpák közül felére csökkentette a P-glikoprotein mRNS szintjét, míg a BCRP és az MRP-2 transzporterekre nem volt hatással (86. ábra). Az A β 1-42 duplájára emelte a protein kináz C γ -alegységének, és a szabadgyök termelésben részt vevő xantindehidrogenáz enzim génkifejeződését. A pentozán gátolni tudta a PKC- γ expressziójának változását (86. ábra).

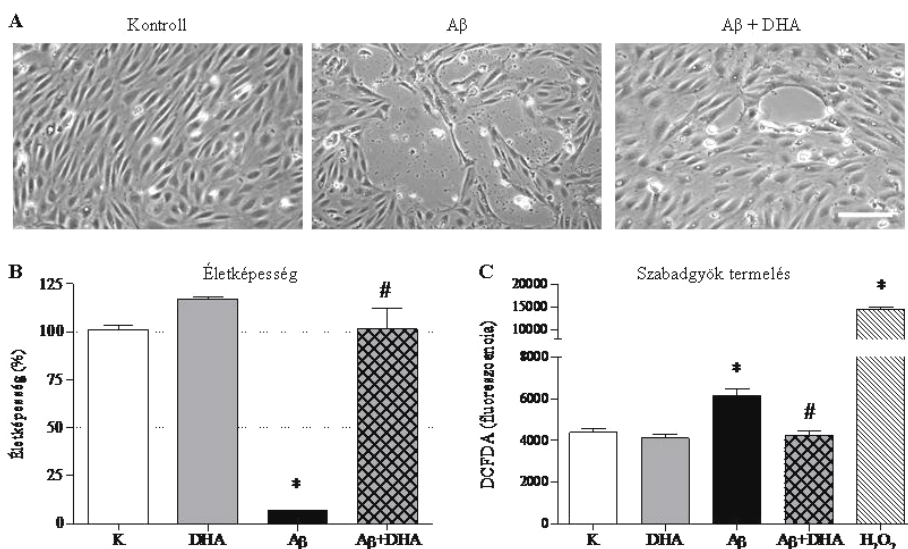


86. ábra. Aβ1-42 peptid (25 μM, 48 óra) és pentozán (PPS, 100 μg/ml) kezelés hatása ko-kultúrában növesztett patkány primer agyi endothelsejtek génkifejeződésére. Pgp: P-glikoprotein; Bcrp: mellrák rezisztencia fehérje; Mrp-2: multidrog rezisztencia fehérje-2; Glut1: glükóz-transzporter-1; Lat-1: nagy neutrális aminosavakat szállító fehérje 1-es típusa; Cat-1: kationos aminosav transzporter-1; Prkcg: protein kináz C γ-alegysége; Xdh: xantin-dehidrogenáz.

Ezek az adatok egybecsengenek a Joó Ferenc és munkatársai által leírt állatkísérletes és izolált mikroereken tett megfigyelésekkel a PKC szerepéről a vazogén agyödema kialakulásában [Oláh és mtsai, 1988; Joó és mtsai, 1989], és felvetik, hogy a PKC-γ, valamint a szabadgyökök fokozott termelődése részt vehet az Aβ1-42 peptid által kiváltott vér-agy gát hatások mediálásában.

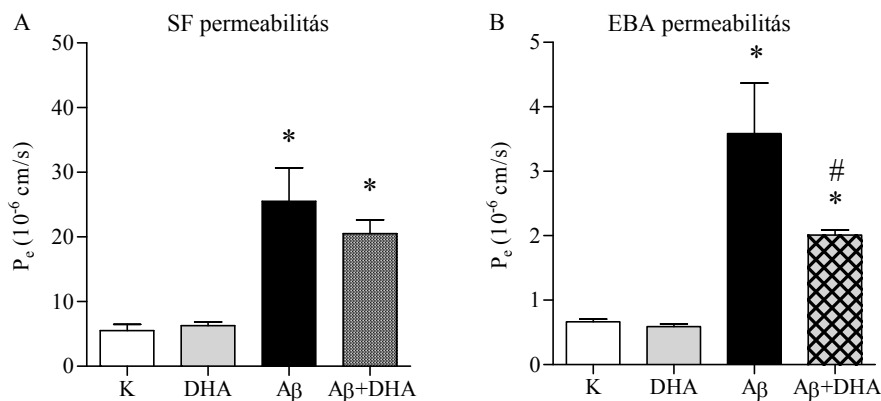
Dokozahexaénsav

A DHA bevitt epidemiológiai vizsgálatokban összefüggésbe hozták az Alzheimer-kór kialakulásának csökkenésével, azonban a pontos hatásmód nem ismert. Idegsejteken és állatkísérletekben hatékonyan bizonyult az amiloid toxicitás kivédésében. Agyi endothelsejteken azonban nem vizsgálták. Új adataink arra utalnak, hogy a DHA kivédi agyi endothelsejteken az Aβ1-42 peptid kezelés által létrehozott károsodást, amit morfológiai vizsgálatokkal és impedancián alapuló, valós idejű mikroelektronikus sejtérzékeléssel mértünk (87. ábra).



87. ábra. Dokozahexaénsav (DHA, 30 μg/ml) és Aβ1-42 peptid (15 μM, 48 óra) hatása patkány agyi endothelsejtek fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgált morfológiájára (A), a sejtek valós idejű sejtanalízissel mért életképességére (B), és az endothelsejtek szabadgyökök termelésére (C). H₂O₂: hidrogén-peroxid; DCFDA: klorometil-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát; ROS: szabad oxigéngyökök. Átlag ± SEM, n=8, Szignifikáns különbség: *P<0,05 a kontrollhoz képest; #P<0,05 az Aβ csoporthoz képest.

Az A β 1-42 hatását az újabb kísérletsorozatunkban a három sejttípus együttes tenyésztésével előállított vér-agy gát modellen vizsgáltuk. Az izopeptid prekurból frissen termelődött, kontrollált aggregációs fokú A β 1-42 peptid [Bozso és mtsai, 2010] többszörösére fokozta az agyi endothelsejtek permeabilitását fluoreszceinre és albuminra (88. ábra), amit a DHA szignifikáns módon csökkentett.

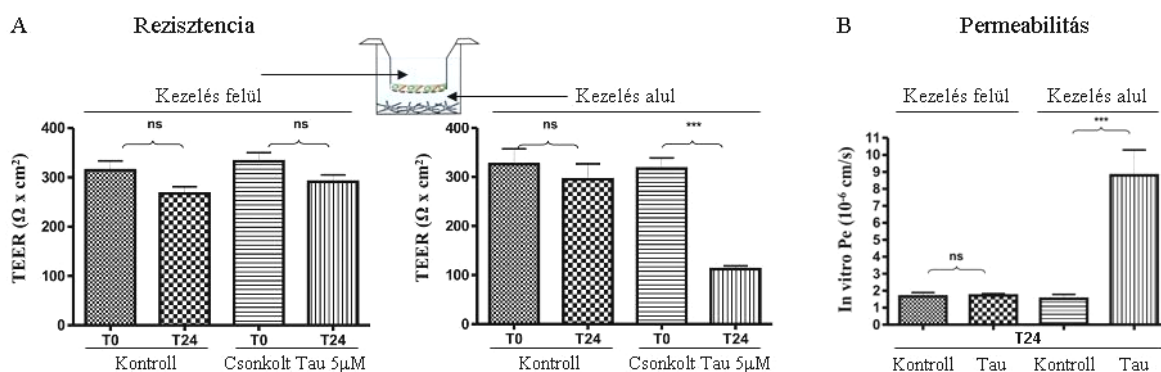


88. ábra: Dokozaheksaénsav (DHA, 30 μ g/ml) és A β 1-42 peptid (20 μ M, 48 óra) hatása patkány agyi endothelsejtek fluoreszceinre (A), és albuminra (B) mért permeabilitására. Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SEM, n=4, Szignifikáns különbség: *P<0,05 a kontrollhoz képest; #P<0,05 az A β csoporthoz képest.

Elsőként mutattuk ki a dokozaheksaénsav védőhatását A β 1-42 peptid kezelés által létrehozott sejtes toxicitásra és a barrier működés károsodására glia és pericyta sejtekkel együtt tenyésztett agyi endothelsejteken. Kísérletes adataink alapján a dokozaheksaénsav Alzheimer-kór állatkísérletes modelljein megfigyelt idegrendszeri protektív hatásához a vér-agy gátra kifejtett védőhatása is hozzájárulhat.

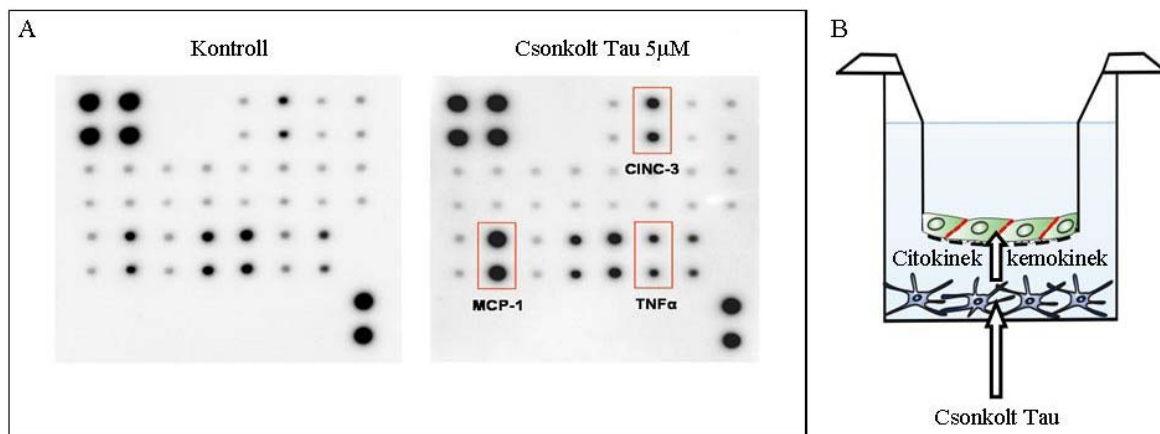
Csonkolt tau fehérje

Együtműködésben végzett kísérleink mozgatórugója az volt, hogy amíg a vaszkuláris működési zavarok Alzheimer-kórban játszott szerepéről, és ebben a folyamatban az amiloid peptidek hatásáról egyre több szakirodalmi adat áll rendelkezésre [Zlokovic 2008], a kóros tau fehérje, a neuropathológiai változások másik kulcsmolekulája [Zilka és mtsai, 2009] és a vér-agy gát működésének változása közötti kapcsolatot eddig nem vizsgálták.



89. ábra. Csonkolt tau fehérje (5 μ M) kezelés hatása patkány agyi endothel- és gliasejtek együttes tenyésztésével előállított és vizsgált vér-agy gát modell ellenállására (A) és mannitolra mért permeabilitására (B). T0: a kezelés kezdete; T24: a kezelés 24. órája; TEER: elektromos ellenállás; Pe: endothelsejtekre számolt permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SEM, n=4, ns: nincs szignifikáns különbség; ***P<0,001. [Kovac és mtsai, 2009].

A tenyésztőbetétek alkalmazása lehetővé tette a patkány primer agyi endothel- és astroglia (85-90 %) és mikroglia sejteket (10-15 %) tartalmazó vegyes gliasejt tenyészet együttes növesztésével létrehozott vér-agy gát modellen a csonkolt humán tau fehérje kezelés vizsgálatát mind a felső kompartmentben, azaz a lumenális („vér felőli”) oldalon, mind a gliasejtekkel közös alsó kompartmentben, ami az abluminális („agy felőli”) oldalnak felel meg. Kimutattuk, hogy a hibásan tekeredett tau fehérje agyi endothelsejtekre nem, azonban gliasejtekre toxikus [Kovac és mtsai, 2009]. Az endothelsejtekhez a lumenális oldalon adva a tau fehérje nem változtatja meg sem a sejtrétegek ellenállását, sem a fluoreszcenre mért permeabilitását (89. ábra). Ezzel szemben az „agy-felőli” oldalon, a gliasejtek jelenlétében adott kóros tau fehérje drasztikusan csökkentette az endothelsejt-rétegek rezisztenciáját, és fokozta a paracelluláris permeabilitását.



90. ábra. Csonkolt tau fehérje (5 μ M, 24 óra) kezelés hatása citokin és kemokin felszabadulásra patkány mikroglia tenyészeteken. CINC-3: citokin-indukált neutrophil kemoattraktáns fehérje; MCP-1: monocyta kemoattraktáns fehérje; TNF- α : tumor nekrosis faktor- α . A fehérjék meghatározása RayBio patkány citokin array kit segítségével történt. [Kovac és mtsai, 2009].

A hatásmód felderítésére mikroglia-sejt tenyészetén is megvizsgáltuk a tau fehérje hatását, ami a gyulladásos citokin tumor nekrosis faktor- α , valamint két kemokin, a citokin-indukált neutrophil kemoattraktáns-3 (CINC-3), és a monocyta kemoattraktáns fehérje-1 (MCP-1) fokozott felszabadulását eredményezte. Az adatok alapján feltételezzük, hogy az agyi endothelsejt tenyészetek működésének a kóros tau fehérje által kiváltott változásához a TNF- α hozzájárulhat. Ez az eredmény számunkra azért is fontos, mert a szakirodalomban elsőként írtuk le a TNF- α hatását agyi endothelsejt tenyészeteken [Deli és mtsai, 1995; Deli Ph.D. értekezés, 1996], és állatkísérletes modelleken is megerősítettük ennek a gyulladásos citokinnek a vér-agy gát permeabilitást fokozó tulajdonságát [Ábrahám és mtsai, 1996; Megyeri és mtsai, 1999].

Elsőként mutattuk ki, hogy a humán csonkolt tau fehérje közvetlenül nem toxikus agyi endothelsejtekre, azonban a glia- és agyi endothelsejtek ko-kultúra modelljén, az in vivo patológiai helyzetnek megfelelő abluminális kezelés hatására szignifikánsan fokozza az endothelsejt-rétegek paracelluláris permeabilitását. Feltártuk, hogy a hatáshoz a mikroglia sejtekből felszabaduló gyulladásos citokin TNF- α is hozzájárul. Adataink alapján az amiloid peptidek és a hibásan tekeredett tau fehérjék eltérő módon fejtik ki hatásukat a vér-agy gátra, és feltételezhető, hogy a taupathiákban a kóros tau fehérje is részt vesz az agyi mikroerek károsodásában.

6. ÚJ MÓDSZEREK AGYBA VALÓ GYÓGYSZERBEJUTTATÁS ELŐSEGÍTÉSÉRE

Az agyi endothelsejteket összekötő szoros kapcsolatok és a szállítófehérjék vér-felé irányuló működése a két legfontosabb tényező, ami megakadályozza hatóanyagok agyba való bejutását és az idegrendszeri betegségek, különösképpen az agytumorkok hatékony kezelését [Pardridge, 2002; Deli, 2011]. A probléma megoldására számos új kísérletes eljárás kifejlesztésén dolgoznak világszerte. Az egyik ilyen új és ígéretes terápiás eszköz a szoros kapcsolatok időleges és reverzibilis megnyitása lehet mind hámsejt barriereken, mind a vér-agy gáton [Deli, 2009]. Emellett alternatív beviteli kapuk, mint az ornyálkahártya szaglóhám régiója is segíthetnek hatóanyagok bejuttatásában a központi idegrendszerbe [Horvát és mtsai, 2009b; Deli, 2011]. Mindezeknek a módszereknek a kidolgozása során alapvető az agyi bejuttatás hatékonyságának tesztelése megbízható, reprodukálható és validált modellrendszereken.

XVI. Gyógyszervizsgálatok *in vitro* vér-agy gát modelleken

Az új központi idegrendszeri célpontú hatóanyagok fejlesztése során az agyi penetráció megbízható becslése már a korai fázisban döntő fontosságú [Vastag és Keserű, 2009]. Az *in vitro* vér-agy gát modellek alkalmazásának az eszköz és időigényes állatmodellekkel szemben előnye a nagyobb áteresztőképesség, és a transzportmechanizmusok feltárásának egyszerűbb lehetősége. Ez a modell köztes komplexitási fokot képvisel az *in silico* és az *in vivo* rendszerek között, és úgy nevezett hozzáadott értékű tesztrendszer a gyógyszerek fejlesztése során.

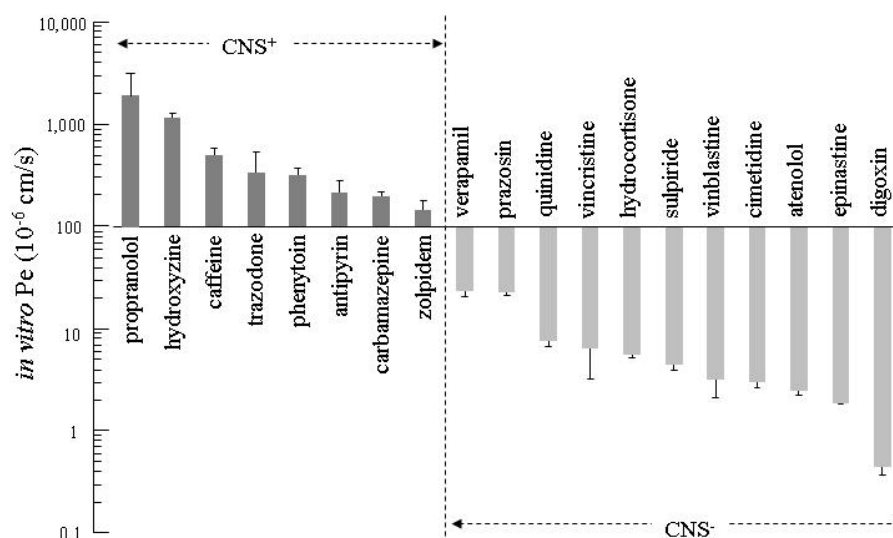
A három sejt *in vitro* vér-agy gát modell validálása ismert központi idegrendszeri bejutású gyógyszerekkel

4. táblázat. A hármas modellen végzett transzportvizsgálatok során felhasznált gyógyszerek és főbb tulajdonságaik listája. A központi idegrendszerbe bejutó (KIR+) szerek jellemzően lipofilek és lipid-mediált diffúzióval jutnak keresztül a sejtmembránon, míg a központi hatás nélküli (KIR-) alacsony permeabilitású hatóanyagokat az agyi endothelsejtek efflux pumpái választják ki. BCRP, mellrák rezisztencia fehérje (ABCG2); MRP-1, multidrog rezisztencia fehérje-1 (ABCC1); MRP-2, multidrog rezisztencia fehérje-2 (ABCC2); OATP2, szerves anion transzporter polipeptid-2 (SLCO1B1); OCT, szerves kation transzporter (SLC22); Pgp, P-glikoprotein (ABCB1); P_e, endotheliális permeabilitási együttható.

Hatóanyag neve	mólsúly	KIR hatás	Transzport jellemzői	P _e (10 ⁻⁶ cm/s)
antipyrin	188	+	passzív lipofil	222,51
atenolol	226	-	passzív hidrofíl	2,49
cimetidin	252	-	efflux: Pgp, BCRP, OCT1-3, OCTN-1	2,99
digoxin	781	-	efflux: Pgp, Oatp2	0,44
epinasztin	286	-	efflux: Pgp	1,87
fenitoin	252	+	passzív lipofil	326,73
hidrokortizon	362	-	efflux: Pgp	5,67
hidroxizin	448	+	passzív lipofil	1174,04
koffein	212	+	passzív lipofil	496,67
karbamazepin	236	+	passzív lipofil	198,53
kinidin	783	-	efflux: Pgp, OCT-1	7,54
prazosin	420	-	efflux: Pgp, BCRP	22,91
propranolol	296	+	passzív lipofil	1987,16
szulpirid	341	-	efflux: Pgp; influx: OCTN-1,-2, PEPT1	4,39
trazodon	408	+	passzív lipofil	333,61
verapamil	491	-	efflux: Pgp, OCT1-3, OCTN-1	23,51
vinblasztin	909	-	efflux: Pgp, MRP-1, -2	3,20
vinkrisztin	923	-	efflux: Pgp, MRP-1, -2	6,32
zolpidem	382	+	passzív lipofil	147,36

Egy permeabilitási szűrésre felhasználható, jó *in vitro* modell esetén az endothelsejteket szoros sejtközi kapcsolatok kötik össze, amit magas rezisztencia és alacsony paracelluláris permeabilitás értékek tükröznek; és döntő a farmakonok transzportjában részt vevő efflux és influx transzporterek jelenléte és működése is [Veszélka és mtsai, 2011; Tóth és mtsai, 2011]. Új hármass *in vitro* modellünk ezeknek a követelményeknek teljesen megfelel [Nakagawa és mtsai, 2009], és további előnye, hogy mindhárom felhasznált sejtípus patkánysejt, így a modellen szerzett eredmények az *in vivo* kísérletes adatokkal (lásd 3. táblázat) nagyon jól összevethetők. A validálás során 19 jól ismert, széles körben használt gyógyszermolekula átjutását vizsgáltuk. Ezek között különböző sajátosságú, központi idegrendszeri hatással rendelkező és nem rendelkező vegyületek, passzívan és aktív transzporttal bejutó anyagok, központi idegrendszeri hatással rendelkező illetve oda elenyésző mértékben bejutó molekulák, efflux transzporterek ligandjai egyaránt szerepeltek (4. táblázat).

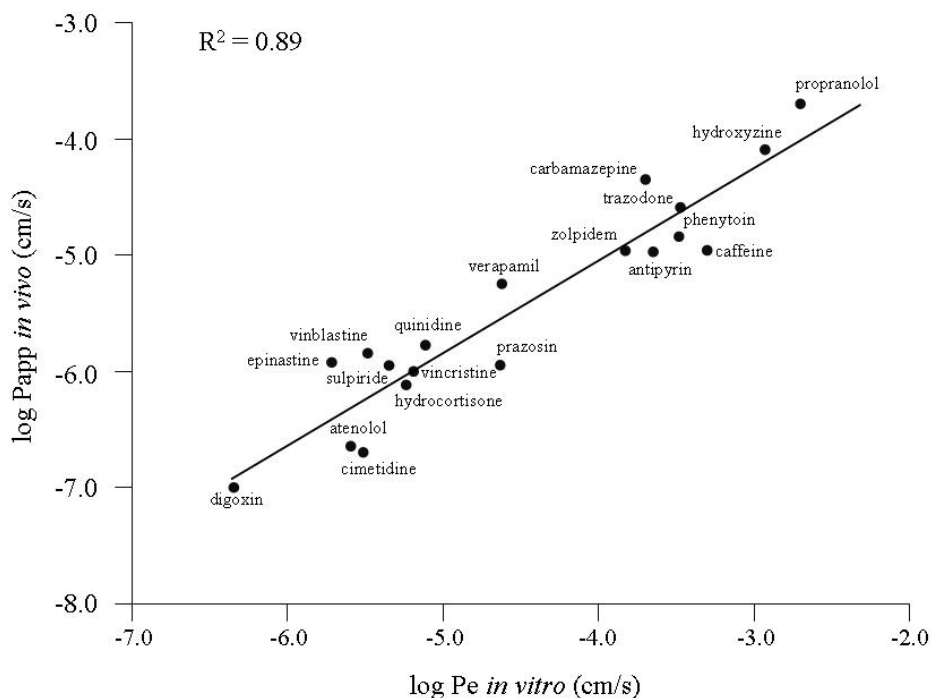
A lipid-mediálta szabad diffúzióval átjutó, és központi hatással rendelkező molekulákra, mint a koffein, a karbamazepin vagy a fenitoin a modellen tesztelve magas permeabilitási együtthatót kaptunk (91. ábra). A vízdékony, passzív paracelluláris diffúzióval átjutó vegyület, az atenolol és az efflux pumpák szubsztátjai, mint például a cimetidin, a digoxin, a verapamil, vinblasztin és vinkrisztin kis mértékben jutottak át a modellen, akárcsak *in vivo* a vér-agy gáton, amit az idegrendszeri hatásuk hiánya (CNS⁻) is jelez (91. ábra).



91. ábra. A hármass *in vitro* tenyészetes vér-agy gát modellen tesztelt 19 központi idegrendszeri hatással rendelkező (CNS⁺) és nem rendelkező vegyület (CNS⁻) endothelsejtekre számolt permeabilitási együtthatója (P_e). [Nakagawa és mtsai, 2009]

A tenyészetes modellen nyert eredményeket ugyanezeknek a vegyületeknek intravénás bolus injekciót követő szöveti megoszlásának egereken végzett mérésével hasonlítottuk össze [Nakagawa és mtsai, 2009]. Az általunk kifejlesztett három sejtípusból álló tenyészetes patkány vér-agy gát modellen nyert és az állatkísérletben meghatározott permeabilitási együtthatókat összevetve jó korrelációt ($R^2=0,89$) kaptunk (92. ábra) [Nakagawa és mtsai, 2009]. Ezek az adatok összhangban állnak a glia- és endothelsejteket együttes tenyésztésével előállított modellen szerzett permeabilitási tapasztalatainkkal [Perrière és mtsai, 2007], és a modell a szakirodalomban leírt más rendszerekkel összehasonlítva is jó paraméterekkel rendelkezik [Garberg és mtsai, 2005; Deli 2007; Tóth és mtsai, 2011; Veszélka és mtsai, 2011].

Az új, általunk kifejlesztett három sejtípusból álló tenyészetes patkány vér-agy gát modellt 19 vegyülettel validáltuk, és *in vivo* eredményekkel összehasonlítva jó korrelációt kaptunk. Adataink alapján ez a vér-agy gát modell megfelelő rendszer hatóanyagok, új farmakonok tesztelésére, és agyba való bejutásuk becslésére.



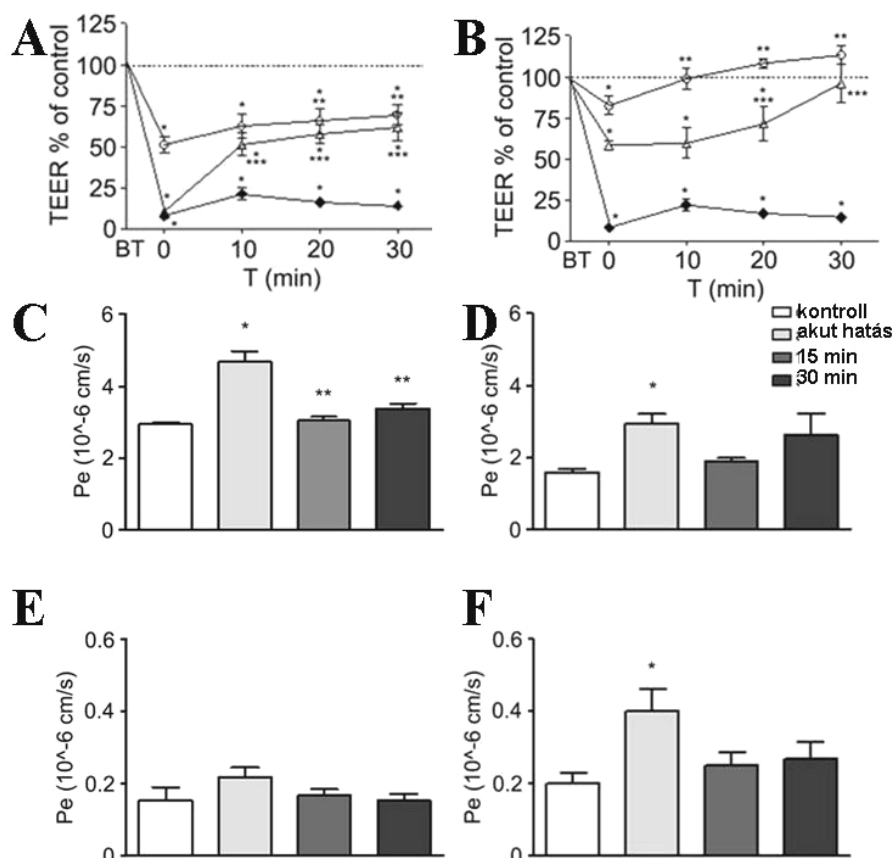
92. ábra. Korreláció a hármastenyészetes vér-agy gát modellen (*in vitro* Pe) és állatkísérletben (*in vivo* Papp) 19 hatóanyagra kapott permeabilitási együtthatók között. [Nakagawa és mtsai, 2009]

A három sejtes vér-agy gát modellre japán együttműködő partnereinkkel 2005-ben szabadalmat nyújtottunk be [Niwa és mtsai, 2007]. A modell gyakorlati alkalmazhatóságát bizonyítja, hogy több hazai és külföldi gyógyszergyár számára végeztünk rajta teszteléseket. Egy jelenleg futó pályázatunkban a vér-agy gát modellt részletesen összehasonlítjuk a gyógyszerkutatásban használatos különböző epithelsejt modellekkel. A vizsgálatokkal célunk egy új, egyedülálló tesztelési panelrendszer létrehozása, amely lehetővé teszi a tesztrendszerek új, szelektívebb alkalmazását ezáltal a gyógyszerjelölt vegyületek agyba való bejutásának eddigénél pontosabb predikcióját.

Az endothelsejtek közötti szoros kapcsolatok átmeneti, reverzibilis megnyitásának vizsgálata *in vitro* vér-agy gát modellen

Az agyi endothelsejtek közötti szoros kapcsolatok gyors és átmeneti megnyitása segíthet gyógyszermolekulák, például az agyi tumorok kezelésére alkalmazott citosztatikus szerek központi idegrendszerbe történő bejutásában [Deli, 2009]. Sikeres állatkísérletek után klinikai vizsgálatokban is használják a hiperozmoláris mannitol-oldat (1,37 M) *intraarterialis* infúzióját erre a célra [Neuwelt és mtsai, 2008; 2011]. Ismeretes, hogy a mannitol a sejtközi adherens kapcsolatokban a β -katenin Src kináz-mediált foszforilációján keresztül nyitja meg a paracelluláris barriert [Farkas és mtsai, 2005].

A rövid-láncú alkilglicerolok (AG) átmeneti vér-agy gát nyitó hatása szintén ismert, állatkísérletekben kimutatták, hogy az AG *intraarterialis* injekciója után az egyidejűleg beadott citosztatikus szerek vagy antibiotikumok feldúsultak az ipsilaterális féltekében [Erdlenbruch és mtsai, 2000]. A tesztelt AG származékok közül az 1-O-pentilglicerol (PG) és a 2-O-hexildiglicerol (HG) bizonyult a terápiás tartományt és hatékonyságot illetően a legígéretesebb [Erdlenbruch és mtsai, 2003]. Ugyanakkor igazolták, hogy a radioaktív módon jelölt PG nem jut be a központi idegrendszerbe vagy más szervekbe [Erdlenbruch és mtsai, 2005]. Az alkilglicerolok hatásmódjának feltárására megvizsgáltuk a PG és HG kezeléseket endothelsejtek szoros kapcsolataira kifejtett hatását kettős *in vitro* vér-agy gát modellünkön (93. ábra).



93. ábra. Alkilglicerol-kezelés okozta permeabilitás-változások a glia- és agyi endothelsejtek együttes tenyésztésével előállított *in vitro* vér-agy gát modellen [Hülper és mtsai, új eredmény]. A rezisztencia (TEER) változások 10 mM és 30 mM 1-O-Pentylglycerol (PG) (A), 10 és 30 mM 2-O-Hexyldiglycerol (HG) (B), valamint mannitol (1.4 M) oldattal történt 5 perces kezelés és az azt követő 30 perc alatt (átlag $\pm$ SEM, $n=3$, statisztikailag szignifikáns ($P < 0.05$) különbségek a (*) kiindulási kontroll értékhez; (**) a 10 mM dózis 0 perces értékéhez; és (***) a 10 mM dózis 0 perces értékéhez képest. Az endothel-egysejtrétegek permeabilitási együtthatójának (P_e) változása 5 perces 30 mM PG kezelés (C: fluoreszcein, E: albumin permeabilitás) és 30 mM PG kezelés (D: fluoreszcein, F: albumin permeabilitás), majd az alkilglicerolok eltávolítása után 15 és 30 perccel (átlag $\pm$ SEM, $n=3$, ANOVA és Bonferroni post hoc, szignifikáns különbség ($P < 0.05$) a kontroll értékhez (*) és az akut hatáshoz képest (**).

Az alkilglicerolok a vizsgált koncentrációkban nem voltak toxikusak agyi endothelsejtekre többféle teszttel mérve. Az alkilglicerol-mediált vér-agy gát megnyitás hatékony és reverzibilis volt, és elsősorban a paracelluláris utat érintette, amit a rezisztencia csökkenés, és a fluoreszcein fokozott átjutása jelzett (93. ábra). Adataink alapján a PG jobban fokozta paracelluláris út megnyílását, és kevésbé változtatta az albumin átjutását, mint az OG. A szoros kapcsolatok fehérjéinek immunfestése is tükrözte a funkcionális megfigyeléseket. Ezzel párhuzamosan az endothel-egysejtrétegeken végzett fagyasztva töréses elektronmikroszkópos vizsgálatok nem mutatták ki a TJ fonatok komplexitásának tartós megváltozását (Prof. Hartwig Wolburg, Tübingen).

Az in vitro modellen az alkilglicerolok tanulmányozásával nyert megfigyeléseink a vér-agy gát akut, ideiglenes, paracelluláris megnyílására utalnak az endothelsejtek tartós károsodása nélkül. A jelen eredményeink megerősítik a patkányokon és egereken végzett in vivo vizsgálatokat az alkilglicerolok előnyös vér-agy gát nyitó hatásáról.

XVII. Bioaktív anyagok agyba történő bejuttatása a nazális úton keresztül

A hatóanyagok agyszövetbe juttatásához alternatív utak, mint például a nazális útvonal is kiaknázhatóak. A szaglórégió egyedülálló anatómiai és élettani tulajdonságai lehetővé teszik farmakonok központi idegrendszerbe jutását a vér-agy gát megkerülésével. Állatkísérletes adatok és

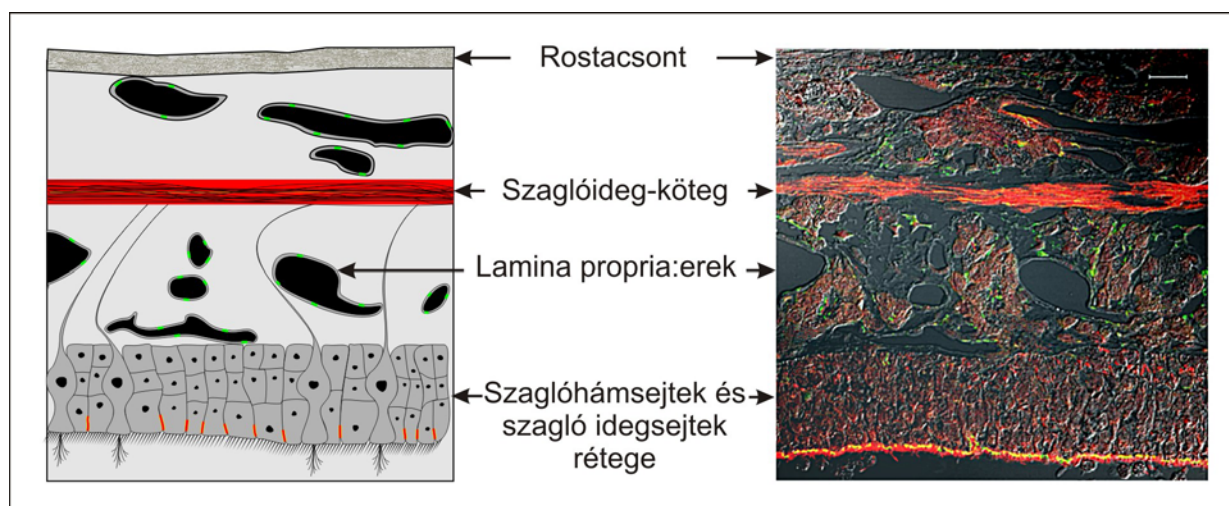
humán vizsgálatok is igazolták, hogy a nazális úton a zsírdékony, kis molekulák mellett peptidek és fehérjék is bevihetők az idegrendszerbe [Illum 2003; Horvát 2009b].

A gyógyszerek intranazális bejuttatásának számos előnye van. Ez a módszer nem invazív, könnyen elvégezhető a beteg, vagy az orvos által, gyors felszívódás érhető el, valamint elkerülhető a máj és a vese first-pass metabolizmusa és nem szükséges a gyógyszert sterilen elkészíteni. Azonban a nazális bevitelnél is rendkívül fontos a gyógyszerhordozók megfelelő formulálása. Nazálisan beadott hatóanyagok a mukociliáris tisztulás miatt általában gyorsan távoznak az orrüregből az emésztő traktusba. Az alacsony membránpermeabilitás és az epithelsejtek közötti szoros kapcsolatok, amelyek megakadályozzák a molekulák transz-, ill. paracelluláris transzportját, további lényeges korlátozó tényezőt jelentenek a nagy molekulatömegű vagy poláros hatóanyagok számára. A mukózus nyálkahártya metabolikus kapacitása is hozzájárul a peptidek és fehérjék alacsony ornyálkahártyán keresztüli transzportjához. Emiatt a nazális vivőanyagok készítése során különösen lényeges mukoadhezív komponensek felhasználása az ornyálkahártyán való tartózkodás fokozására, valamint abszorpciófokozó segédanyagok alkalmazása az ornyálkahártyán keresztüli hatóanyag transzport növelése céljából.

Noha számos újfajta, szisztémás hatóanyag bejuttatására kifejlesztett nazális termék már forgalomban van, központi idegrendszeri betegségek kezelésére szánt, a nazális utat kihasználó gyógyszer még nincs a piacon. Ezért a gyors és hatékony agyi farmakon koncentrációt biztosító nazális hordozórendszerek fejlesztése egy új és mindezidáig kiaknázatlan kutatási terület.

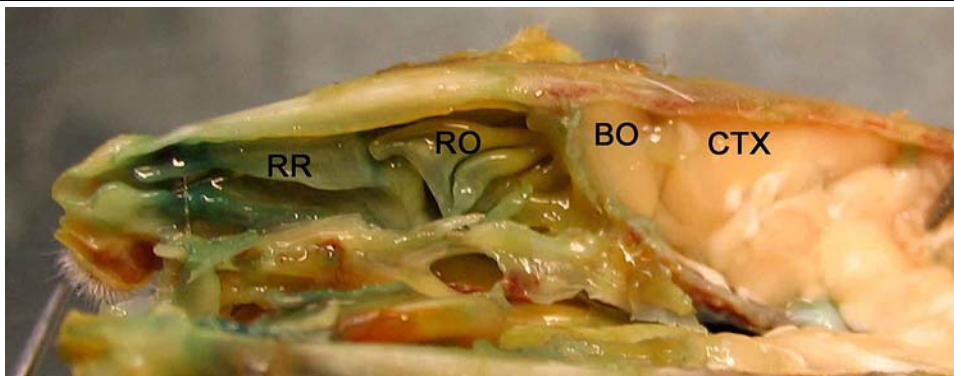
A nazális út morfológiai alapjai

Kutatásaink során immunhisztokémiás vizsgálatokkal tanulmányoztuk a nazális beviteli útvonal fő barrierjeit (94. ábra): a szaglóhám epitelsejt rétegeit, a lamina propria vérereinek endothelsejtjeit, valamint a szaglőneuronokat burkoló és védő gliaszerű OEC (*olfactory ensheathing cells*) és a perineurális sejtek közötti szoros kapcsolatokat.



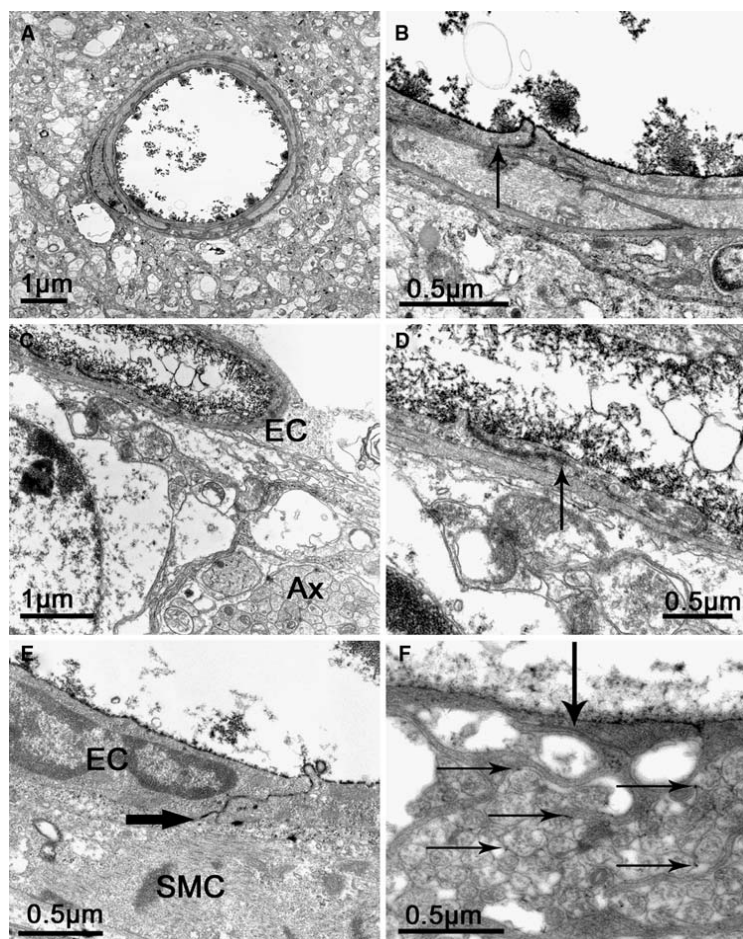
94. ábra. A szaglőhám felépítése. A sejt-közötti szoros kapcsolatokat kettős immunfestés teszi láthatóvá (klaudin-5: piros, ZO-1 fehérje: zöld). A két fehérje immunfestésének egybeesését sárga szín jelzi. [Horvát és mtsai, 2009b].

A ZO-1, ZO-2, okkludin, klauudin-1, -3, -5 és -19 kapcsolófehérjék festésével megállapítottuk, hogy a szaglőrégió epithelsejtjei az összes vizsgált fehérjét erősen expresszálják, és a gyógyszerbejuttatás szempontjából a nazális útvonalon ez a barrier a legösszetettebb és a legszorosabb [Wolburg és mtsai, 2008]. Az OEC sejtek sejt-közötti kapcsolatainak fehérjeösszetétele az endothelsejtekéhez volt hasonló, és klauudin-5, okkludin és ZO-1 fehérjéket tartalmazott (94. ábra). A lamina propria vérereinek endothelsejtjeiben találtuk a leggyengébb festődés klauudin-5 és okkludin fehérjékre.



95. ábra. Az ornyálkahártya és az agyszövet ereinek permeabilitása 30 perccel az Evans kék és fluoreszcein festékek intravénás beadása után. Mind a szaglólóhám (RO), mind a légzőhám (RR) zöldeskék színű, ami az erek nagy áteresztőképességére utal. Ezzel szemben a szaglógumó (BO) és az agykéreg (CTX) nem festődik [Wolburg és mtsai, 2008].

A szaglólóhám ereinek áteresztőképességét a vér-agy gát permeabilitás meghatározásánál használt Evans kék és fluoreszcein festékekkel végeztük (95. ábra). Mind a légző-, mind a szaglólóhám területe erős zöldeskék festődést mutatott a markerek intravénás beadása után, vagyis a lamina propria erei ezekben a régiókban áteresztőek mind fluoreszceinre, mind albuminra.



96. ábra. Lantán jelölés detektálása elektronmikroszkópiával transzkardiális perfúzió után. A: Agykérmi mikroerek kis (A) és (B) nagy nagyítású felvételeken. A B ábrán a nyíl azt mutatja, hogy a lantán megáll az endothelsejt közötti résnél és nem jut be a subendothelialis térbe. C, D: a szaglógumó; a szaglólóideg axononok (Ax) egy szoros sejtközi kapcsolattal rendelkező ér közelében futnak, a lantán penetrációja megáll a résnél. E: A szaglólóhám lamina propriájában az interendothelialis rés nyitott, lantán szemcsék láthatóak a sub-endothelialis térben (nyíl). EC: endothelsejt, SMC: simaizomsejt. F: A szaglóróstkban a lamina basalis körül számos lantán szemcséje látható. A nagy nyíl egy szoros sejtközi kapcsolatot, a kis nyilak az interstitialis és periaxonalis térben a lantán szemcséket mutatják [Wolburg és mtsai, 2008].

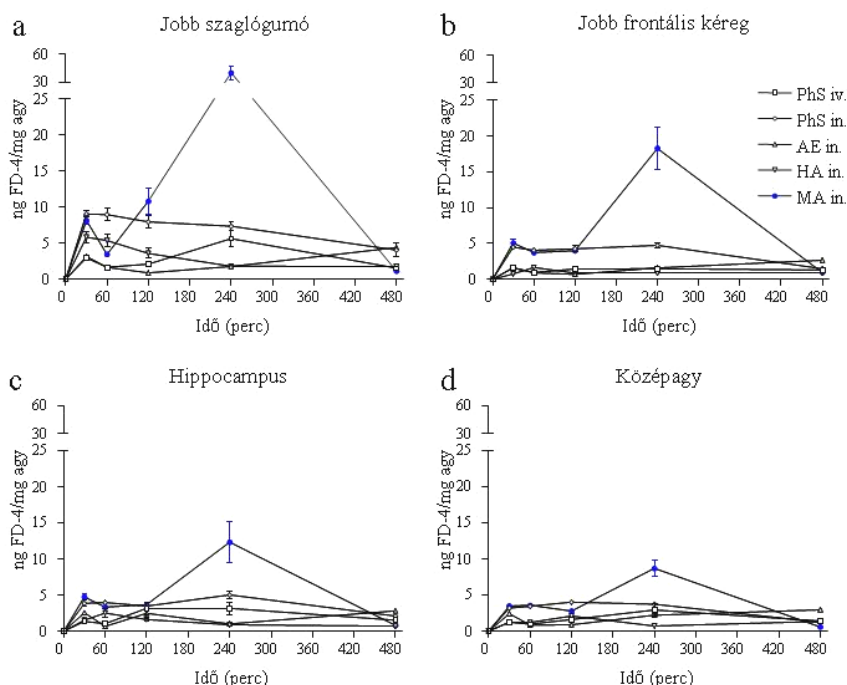
A jól ismert módon az agyszövet erei nem engedik át a festékeket. Ezek az eredmények összhangban állnak a szaglóhám és az agyi hajszálerek sejtközi kapcsolófehérjéinek vizsgálata során kapott adatokkal.

Elsőként igazoltuk, hogy a szaglórégió erei áteresztik az elektronmikroszkópiában jelölőanyagként használt kis molekulatömegű lantánt (96. ábra). Az OEC sejtek közötti kapcsolatok nem képeznek szoros barriert, így a sejtközi térből a periaxonális térbe szivárgott a jelzőanyag (96F ábra). Ez a megfigyelés igazolja a szaglóidegen keresztüli transzportút morfológiai alapjait. Egyben azt is alátámasztja, hogy amennyiben egy hatóanyag megfelelő nazális hordozó segítségével átjut a szaglóhám epithelsejt rétegén, a nazális úton elérheti a központi idegrendszert [Wolburg és mtsai, 2008].

Vizsgálatainkban feltérképeztük az orrnyálkahártya szerkezetét és a sejtközi kapcsolatokat immunfestéssel és elektronmikroszkópiával patkányokban. A szaglóhám három fő barrierjét az epithelsejtek, a lamina propria ereinek endothelsejtjei, és a szaglóidegeket burkoló OEC sejtek alkotják. Igazoltuk az orrnyálkahártya ereinek fokozott áteresztőképességét az agyi erekkel szemben. Elsőként sikerült leírunk, hogy a szaglóideget burkoló sejtek áteresztik a jelzőanyag lantánt, és az bejut a szaglóideg rostok közé. Ez az út képezheti az orrból az agyba történő anyagbejutás anatómiai alapját.

Dextrán tesztmolekula bejuttatása az agyba a nazális útvonalon: a hialuronsav, mint mukoadhezív komponens vizsgálata

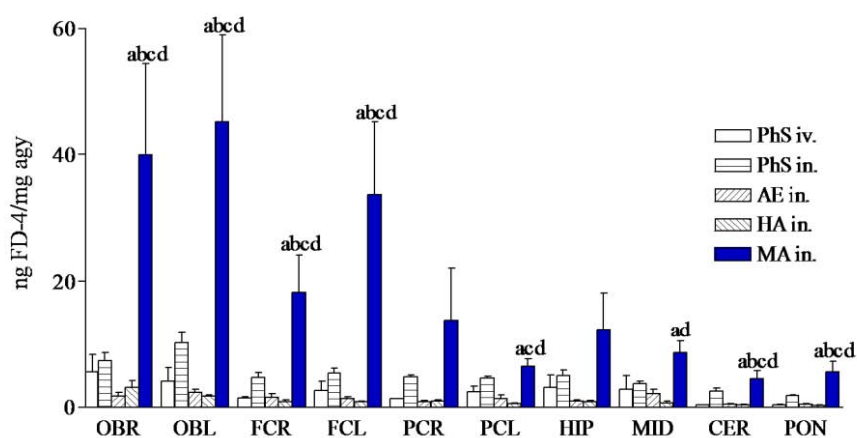
Az SZTE Gyógyszertechnológiai Intézetével együttműködésben olyan új mukoadhezív formulálásokat állítottunk elő, jellemeztünk és teszteltünk, amelyekkel a nazális úton fokozni lehet a vízoldékony, peptid nagyságú (M=4 kDa) fluoreszcensen jelzett dextrán tesztanyag (FD-4), egy a vér-agy gáton mérhető mennyiségben át nem jutó vegyület bevitelét az idegrendszerbe [Horvát és mtsai, 2009a].



97. ábra. Nazálisan beadott fluoreszcensen jelzett 4 kDa dextrán (FD-4) bejutásának idő-függése különböző agyrégiókban patkányokban. Az FD-4 jelzőmolekula vivőanyagai: PhS iv □: intravénásan beadott fiziológiás sóoldat, PhS in ■: nazálisan beadott fiziológiás sóoldat, AE in △: Cremophor RH 40 tartalmú nazális vivőanyag, HA in ○: hialuronát tartalmú nazális vivőanyag, MA in ●: hialuronát és Cremophor RH 40 tartalmú nazális vivőanyag. (a) jobb oldali szaglógumó, (b) jobb oldali frontális cortex, (c) hippocampus, (d) középagy. Átlag ± SEM, n=4. [Horvát és mtsai, 2009a].

Kísérleteink legfontosabb eredménye, hogy a felületaktív Cremophor, mint abszorpciófokozó és a hialuronsav, mint viszkózus bioadhezív polimer kombinációja szignifikánsan növelni tudta a dextrán modellanyag orrüregből agyba való jutását. Ez leginkább a szaglógumóban és a frontális agykérgi régióban érvényesült 4 órával a beadás után (97. és 98. ábra), összhangban más megfigyelésekkel nazálisan beadott biomolekulák agyi megoszlásáról (6. ábra) [Thorne és mtsai, 2004].

Noha a nazális gyógyszerbejuttatás szempontjából a viszkozitás és a mukoadhézió kulcsfontosságú jellemző, és a hialuronsav kiváló mukoadhezív tulajdonságokkal, természetes biokompatibilitással rendelkezik, valamint nem vált ki immunválaszt, eddig csupán egyetlen, farmakokinetikát nem tartalmazó tanulmány vizsgálta a nátrium-hialuronsavat nazális abszorpció során. Kísérleteinkben a hialuronát önmagában (HA hordozó) nem növelte az FD-4 agyba jutását, ezzel szemben Cremophor RH40-nel alkalmazva (MA) jelentős bejutást detektáltunk (97. és 98. ábra). A HA és az MA hordozók hatékonysága közötti különbség azt jelezheti, hogy az optimális viszkozitás, a feltételezett mukoadhezívítás, a hosszabb tartózkodási idő és a felületaktív anyag általi abszorpciófokozás egyaránt hozzájárul a tesztmolekula fokozott agyi bejutásához.



98. ábra. Nazálisan beadott fluoreszcensen jelzett 4kDa dextrán bejutása különböző agyrégiókba 240 perccel a kezelés után patkányokban. Agyterületek: OBR: jobb oldali szaglógumó, OBL: bal oldali szaglógumó, FCR: jobb oldali homloklebeny, FCL: bal oldali homloklebeny, PCR: jobb oldali fali lebeny, PCL: bal oldali fali lebeny, HIP: hippocampus, MID: középagy, CER: kisagy, PON: híd; az FD-4 jelzőmolekula vivőanyagai: PhS iv: intravénásan beadott fiziológiás sóoldat, PhS in: nazálisan beadott fiziológiás sóoldat, AE in: Cremophor RH 40 tartalmú nazális vivőanyag, HA in: hialuronát tartalmú nazális vivőanyag, MA in: hialuronát és Cremophor RH 40 tartalmú nazális vivőanyag. Statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0.05$) detektáltunk az MA csoport esetén a többi csoporthoz képest [Horvát és mtsai, 2009a]

Az MA hordozó hatása nincs összefüggésben a vérplazma FD-4 szintjével [Horvát és mtsai, 2009a]. Az intravénásan beadott FD-4 nagy koncentrációt eredményezett a plazmában, míg a vér-agy gát szelektív és szigorúan szabályozott transzportfolyamatai miatt csak alacsony koncentrációt eredményezett az agyban. Ezzel szemben a nazális vivőanyagok elhanyagolható plazmakoncentrációhoz vezettek, ugyanakkor az MA csoportnál az agyi FD-4 koncentráció jelentősen meghaladta az intravénás csoport agyi FD-4 mennyiségét. Ezek az eredmények világosan jelzik nazális beadás esetén a közvetlen utat a központi idegrendszerbe a vér-agy gát megkerülésével.

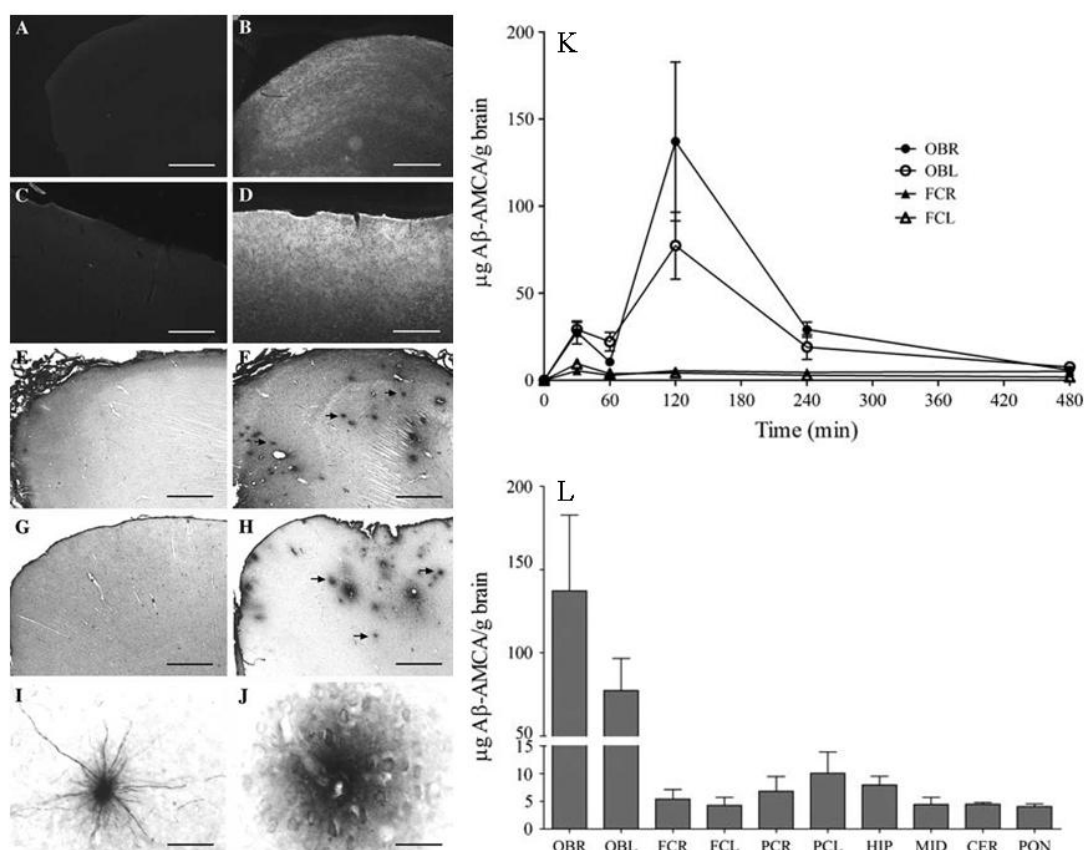
A nazális formulálások fejlesztésénél fontos szempont azok toxicitása. Elektronmikroszkópiával kimutattuk, hogy a kísérleteink során használt, hialuronsavat és Cremophor RH 40-et tartalmazó hordozó nem indukált szövetkárosodást, epiteliális vagy szubepiteliális toxicitást, valamint csillókárosodást vagy elhalást.

A felületaktív abszorpciófokozót és a mukoadhezív hialuronsavat tartalmazó vivőanyag szignifikánsan növelte a dextrán tesztmolekula agyba kerülését a nazális útvonalon keresztül patkányokban. Kimutattuk, hogy a kísérletben használt hordozórendszerek nem károsítják a szaglőrendszer szövetét, biztonságosan alkalmazhatóak. A nazális út ígéretes lehet idegrendszeri támadáspontú, a vér-agy gáton át nem jutó molekulák terápiás alkalmazására.

Bioaktív amiloid- β 1-42 peptid intranazális bejuttatása az agyba

Előző kísérleteink alapján a hialuronsav-tartalmú vivőanyag alkalmasnak tűnt farmakonok, biológiailag aktív peptidek bejuttatására a központi idegrendszerbe a nazális úton a vér-agy gát megkerülésével [Horvát és mtsai, 2009a]. Ennek a kísérletnek során kifejlesztett mukoadhezív formulálásokat felhasználva a bioaktív humán A β 1-42 peptid nazális úton való agyba juttatását vizsgáltuk patkányokban [Sipos és mtsai, 2010].

Az intranazálisan beadott AMCA-A β 1-42 különböző agyi régiókba való bejutásának időbeli kinetikáját a 99.K ábra mutatja, a legnagyobb koncentrációt a beadás után 120 perccel mértük. A szaglógyümök mellett a jelölt peptid visszamérhető volt más agyterületekről különböző mennyiségben. A bejutott peptid regionális eloszlása hasonló volt az inzulinszerű növekedési faktor-1 nazális beadása után patkányokban leírt, és a korábbi kísérletünkben dextránra megfigyelt eloszláshoz (6. ábra) [Thorne és mtsai, 2004; Horvát és mtsai, 2009a]



99. ábra. Patkányok szaglógyümójának és homloklebenyének nem fixált, fagyasztott metszeteiről készült reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek vivőanyaggal (kontroll; A, C) vagy amino-metil-kumarinnal jelölt A β 1-42 (AMCA-A β 1-42) beadása után 2 órával (B, D). Fluoreszcenciát csak az AMCA-A β 1-42 kezelés után láttunk (B, D). A β 1-42 immunhisztokémiai festése 4G8 ellenanyaggal a vivőanyaggal (kontroll; E, G) vagy A β 1-42 oldattal (F, H) 28 napon át kezelt patkányok szaglógyümójának és homloklebenyének reprezentatív metszetein. Az amiloid-kezelt csoportban az immunopozitív depozitok nagyobb nagytásban is láthatók (I), míg a (J) ábra egy ér körüli diffúz festődési képet mutat. Mércse: 500 μ m (A–H), 50 μ m (I–J). A (K) ábrán az AMCA-A β 1-42 agyi koncentrációjának kinetikája látható 4 agyterületen, míg az (L) ábra a különböző agyterületek AMCA-A β 1-42 koncentrációját mutatja 120 perccel a jelölőanyag intranazális beadása után (átlag $\pm$ SD, n=4). OBR, jobb szaglógyümő; OBL, bal szaglógyümő; FCR, jobb homloklebeny; FCL, bal homloklebeny; PCR, jobb fali lebeny; PCL, bal fali lebeny; HIP, hippocampus; MID, középagy; CER, kisagy; PON, híd. [Sipos és mtsai, 2010].

Magatartás-vizsgálatok során azt találtuk, hogy a nazális A β kezelés a Morris vízilabirintus teszttel mért hosszútávú térbeli memóriát rontja, jóllehet a szorongási tesztben és a rövid távú memóriában 28 napos kezelés nem hozott változást [Sipos és mtsai, 2010].

Sikeresen juttattunk be bioaktív peptidet a központi idegrendszerbe nazális úton. A nazálisan beadott AMCA fluoreszcens festékkel jelölt A β 1-42 kimutatható, és mennyisége mérhető volt fluoreszcens mikroszkópia és spektroszkópia technikákkal a szaglógyűrű és frontális lebeny területén patkányokban. Az A β bejutását ezeken a területeken immunhisztokémiával is igazoltuk. A peptid agyi bejutását, és hatékonyságát magatartás-vizsgálatok is alátámasztották. Kísérleteink alapján hialuronát tartalmú vivőanyagok alkalmasak lehetnek hatóanyagok, biológiailag aktív peptidok bejuttatására a központi idegrendszerbe a nazális úton a vér-agy gát megkerülésével.

7. A KUTATÁS EREDMÉNYEINEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az alábbiakban összefoglalom a kitűzött kutatási célok megvalósítása során a témakörökben bemutatott új eredményeket:

7.1. A vér-agy gát modellezése sejtenyészetekkel

Attól a törekvéstől vezérelve, hogy az élő szervezet folyamatait egyre mélyebben és jobban megértsük, az 1970-es évektől kezdve, mikor izolált agyi mikroerekből kinövő endothelsejtekről az első megfigyelések megszülettek, a tenyészetes modellek egyre összetettebbé válnak. Ezelőtt 21 évvel, amikor a primer agyi mikroér endothelsejtek növesztését és vizsgálatát elkezdtem, endothel-egysejtrétegeken történt a legtöbb kísérlet. Az évek során számos fajtából, elsősorban kísérleti patkány, vad típusú, transzgén és knock-out egér és újszülött sertés agyból izoláltunk sikeresen mikroér frakciót, és készítettünk primer endothelsejt tenyészeteket. Ennek során a legnagyobb problémát és feladatot a tenyészetek tisztaságának biztosítása okozta. A szennyező, főképpen pericyta sejtek számának csökkentésére számos módszert kipróbáltunk és összehasonlítottunk, hogy a tenyésztési körülményeket az endothelsejtekre optimalizáljuk. A Thy1.1 antigént expresszáló pericyták specifikus, ellenanyaggal és komplementtel történő sejtlyízise kombinálva a tápfolyadék összetételének változtatásával, az endothelsejtek proliferációját serkentő növekedési faktorok használatával, míg a pericyták osztódását támogató faktorokban szegény szérumok alkalmazásával lényegesen javítottuk a tenyészetek minőségét.

Az igazi ugrást azonban az agyi endothelsejt tenyészetek minőségének javulásában a P-glikoprotein szubsztrát puromicin antibiotikummal történő kezelés bevezetése jelentette. Az általunk kidolgozott és elsőként leírt módszer nem csak tisztább tenyészeteket eredményezett, de a magas P-glikoprotein expressziójú hajszál- és mikroér endothelsejtek szelekciójának kedvezett, ezáltal jobb vér-agy gát tulajdonságokat eredményezett. A módszer elterjedését és elfogadottságát jelzi, hogy különböző vér-agy gát modelleken számos laboratóriumban sikerrel alkalmazták.

Már a kezdetektől megfigyeltük, hogy a hosszú ideig tartó tenyésztés, de különösen szubkultúrák készítése passzálassal az agyi endothelsejtek vér-agy gát tulajdonságainak jelentős romlásához vezet. Ennek legfőbb oka, hogy a vér-agy gátra jellemző sajátosságok szerv-specifikusak, megszakad az önmagukban tenyésztett endothelsejtek kommunikációja az őket körülvevő többi sejttypussal, hiányoznak az endothelsejtek számára nélkülözhetetlen trofikus és stabilizáló faktorok. Először az astroglia sejtek vér-agy gát tulajdonságokat indukáló hatását ismerték fel, így ezt a sejttypust alkalmazták elsőként endothelsejtekkel együtt tenyésztve második generációs *in vitro* vér-agy gát modellként. Az a megfigyelésünk, hogy a gliasejtek hatása, a hidrokortizon hormon és a cAMP kezelés egymástól függetlenül képes az agyi endothelsejt-rétegek szorosságát fokozni, és a legjobb hatást a három tényező együttes alkalmazásával lehet elérni jelentősen növelte a vér-agy gát modellek barrier tulajdonságait, az agyi mikroerekből található érett fenotípust eredményezett a tenyésztett sejtekben, és szintén széleskörű alkalmazást nyert.

A modellrendszer komplexitása tovább nőtt az *in situ* anatómiai helyzetet jobban utánozó három sejttypusból álló vér-agy gát modellek létrehozásával. Agyi mikroér endothelsejtek, pericyták és gliasejtek primer tenyészeiteiből szisztematikusan létrehozott kettős és hármas modellek vizsgálatával elsőként sikerült igazolnunk, hogy a pericyták astroglia sejtekhez hasonlóan képesek az agyi endothelsejtek vér-agy gát sajátosságait fokozni. Az általunk előállított, új, az anatómiai viszonyokat az eddigi modellek közül leghűbben közelítő vér-agy gát modell tulajdonságai a nemzetközi szinten jelenleg elérhető és előállítható legjobb rendszerekével vetekszik. Fontos bizonyítéka a modell jóságának, hogy nem csak patkány, de majom és humán sejteken is igazolni tudtuk a pericyták endothelsejtekre kifejtett hatását. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a sejt kölcsönhatásnak milyen alapvető jelentősége van a vér-agy gát sajátosságok kialakulásában. A legfrissebb szakirodalmi adatok is megerősítik a pericyták szerepét a vér-agy gát működésének *in vivo* létrejöttében és fenntartásában. Szakmai konszenzus alakult ki, hogy a kiterjesztett neurovaszkuláris egység sejtjei közötti kölcsönhatás tanulmányozása a kulcsa az idegrendszer élettani és patológiás folyamatainak a jobb megértésének, ami az idegrendszeri betegségek jobb gyógyításához vezethet.

7.2. A vér-agy gát károsodásának és védelmének vizsgálata modellek segítségével

A tenyészetes modelleket az orvosbiológiai kutatásban alkalmazzuk. Idegrendszeri, de szisztémás betegségekben is előtérbe került a vér-agy gát, az agyi endothelsejtek védelme, mint új lehetséges terápiás célpont. Kísérleteink során az idegrendszeri kórállapotokban szerepet játszó tényezők károsító hatását, és az endothelsejtekre védő hatást kifejtő farmakonokat vizsgálatuk az agyi mikroerek sejtjein.

A mikrobiális pathogének vizsgálata során mind állatkísérletekben, mind agyi endothelsejt tenyészeteken megerősítettük a bakteriális lipopoliszacharidok vér-agy gát permeabilitást fokozó hatását. Elsőként mutattuk ki a szérum amiloid P komponens védőhatását endotoxaemiában a vér-agy gát megnyílására, és klinikai tüneteinek enyhítésére, a heparinoid pentozán protektív hatását pedig *in vitro* vér-agy gát modellünkön az LPS okozta változásokra. A hatásmód megértése szempontjából fontos lehet, hogy elsőként tártuk fel, hogy LPS hatására az endothelsejtek fokozott mértékben termelnek nitrogén-monoxidot és szabadgyököket. Ezzel összefüggésben azt is megfigyeltük, hogy az intravaszkulárisan adott tumor nekrozis faktor- α , a sepsisben és meningitisekben felszabaduló gyulladásos citokin vér-agy gát megnyílást hoz létre, és ez a hatás szerin proteáz gátlóval hatékonyan kivédhető volt újszülött sertéseken. Az adatok alapján a szerin proteázok, így mátrix metalloproteinázok gátlása újszülöttkori súlyos fertőzésekben megakadályozhatja a vazogén agyödema kialakulását.

Két mikrobiális pathogén neuroinváziójának mechanizmusát is tanulmányoztuk vér-agy gát modellünk segítségével. Vizsgálataink alapján a HIV-1 vírus Tat burokfehérjéje az agyi endothelsejtek kapcsolófehérjéinek expresszióját nagymértékben és specifikusan csökkenti, ezzel fokozza a vér-agy gát permeabilitását, elősegíti a vírus neuroinvázióját. Ez a permeabilitás fokozódás egyben a neuroAIDS során fellépő dementia kialakulásához is hozzájárul. Elsőként azonosítottuk az ebben a változásban részt vevő jeltovábbító utakat, amelyek megismerése előfeltétele a HIV során fellépő vér-agy gát változások kivédésének. A másik pathogén, a protozoon *Toxoplasma gondii* a vér-agy gáton keresztüli intracelluláris átjutásáról is fontos új adatokat nyertünk az *in vitro* vér-agy gát modell alkalmazásával. A fertőzött immunsejtek agyi endothelsejt-rétegeken keresztüli migrációjának vizsgálatával elsőként megállapítottuk, hogy antigén prezentáló monocyták és dendritikus sejtek szolgálhatnak Trójai falóként a *Toxoplasma* bejutásához az idegrendszerbe.

A modell alkalmasnak bizonyult arra is, hogy feltárjuk a sejtes kölcsönhatásokat és a lehetséges hatásmechanizmusokat az agyi ischemia kórosi tényezői által okozott vér-agy gát változásokban. Így például elsőként mutattuk ki szuperoxid-dizmutáz transzgenikus állatokból tenyésztett endothelsejteken, hogy a szabad oxigéngyökök az endothelsejtek barrier működését közvetlenül károsítják, és ebben a hidroxil és peroxinitrit gyökök szerepe a szuperoxidnál nagyobb lehet. A stroke pathomechanizmusában másik fontos tényezőről a glutaminsavról is megállapítottuk, hogy közvetlenül fokozza agyi endothelsejtek áteresztőképességét, mégpedig a sejtek közötti kapcsolófehérjék szintjének és eloszlásának csökkenésén keresztül. Adataink alapján az NMDA receptor blokkolók gátolták a permeabilitás fokozódást, ami felveti azt lehetőséget, hogy az NMDA receptorok gátlásának stroke-ban több célpontja is lehet: nem csak a neuronokra fejthet ki protektív hatást, hanem az agyi endothelsejtekre is. Emellett elsőként figyeltük meg az exogén tPA nem proteolitikus hatását agyi endothelsejteken, mégpedig a P-glikoprotein efflux pumpa működését csökkentette.

Mind globális, mind fokális agyi ischaemia előidézése fokozta a vér-agy gát permeabilitását állatkísérleteinkben, amelyekben a transzendotheliális albumin átjutás dominált. Az intracelluláris hisztamin kötőhely antagonistá tamoxifén-származék DPPE, klinikai vizsgálatokban tezmilifén néven használt kemopotenciózó farmakon hipotézisünkkel szemben nem csökkentette az agyi ischaemia-reperfusio vér-agy gátra kifejtett hatását patkányokban a 4 ér lekötéses modellen, sőt, önállóan is fokozta a vér-agy gát áteresztőképességét a hisztamin hatásához hasonlóan. A DPPE hatását tenyésztett endothelsejteken is igazoltuk. Eredményeink alapján a tezmilifén inkább potenciális vér-agy gát nyitó vegyület lehet. A fokális tranzienis ischaemia modellen elsőként tártuk fel a korai és fokozott szérumfehérje extravazációt stroke-ra hajlamos spontán magasvérnyomású

patkányokon. Az eredmények felvetik a megnövekedett vér-agy gát permeabilitás szerepét a hipertenzív encephalopathia kialakulásában.

Az *in vitro* vér-agy gát modellen a sztatinok egy új lehetséges hatásmódját vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a pitavasztatin agyi endothelsejteken a vér-agy gát barrier működését fokozza, ami felveti a sztatinok vér-agy gát protekcióra történő esetleges alkalmazását. Egy másik fontos protektív mechanizmus az endothelsejtek prekondicionálása lehet. A tenyészetes modell segítségével megerősítettük, hogy a vér-agy gátis célpontja az ischaemiás prekondicionálásnak, amiben nem az endothel, hanem a gliasejtek szerepe döntő.

A modellünk segítségével a neurodegeneratív betegségek több pathogenetikus faktorát is megvizsgáltuk agyi endothelsejteken. Megállapítottuk, hogy a prion és az amiloid- β peptidek közvetlenül, a kóros tau fehérje közvetett módon fejt ki károsító hatást a vér-agy gát működésére. Elsőként igazoltuk a pentozán, valamint az antioxidáns dokozahexaénsav protektív hatását a prion és az amiloid- β peptidek okozta károsodásokkal szemben.

7.3. Új módszerek agyba való gyógyszerbejuttatás elősegítésére

Az általunk kifejlesztett, és szabadalmaztatott három sejttípusból álló vér-agy gát modellt sikeresen validáltuk farmakonok tesztelésével és *in vivo* mérésekkel. Az *in vitro* vér-agy gát modell alkalmasnak bizonyult olyan új szerek vizsgálatára is, amelyek reverzibilisen megnyitják az agyi endothelsejtek szoros kapcsolatait és így elősegíthetik terápiás szerek bejutását a központi idegrendszerbe. Folyamatban lévő munkáinkban célzott nanohordozók átjutását vizsgáljuk a modellen, és tervezzük a szoros sejtközi kapcsolatokkal specifikus kölcsönhatásba lépő peptidek tanulmányozását is.

A vér-agy gát vizsgálata mellett, a vér-agy gátat megkerülő, alternatív beviteli módokat is tanulmányoztunk, és sikeresen juttattunk be a nazális útvonalon bioaktív molekulát az agyba állatkísérletekben.

Mindezek az eredmények hozzájárulnak a vér-agy gát működésének jobb megértéséhez, és reményeink szerint a jövőben az idegrendszeri betegségek hatékonyabb kezeléséhez is elvezethetnek.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

8.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

A VÉR-AGY GÁT MODELLEZÉSE SEJTTENYÉSZETEKSEL

Eredeti közlemények

- Szabó CA, **Deli MA**, Dung NTK, Joó F. Production of pure primary rat cerebral endothelial cell culture: a comparison of different methods. *Neurobiology* 1997;5(1):1-16. (IF₁₉₉₇: -; 14 független idéző)
- Kis B, Szabó CA, Pataricza J, Krizbai I, Mezei Zs, Gecse Á, Telegdy Gy, Papp JGy, **Deli MA**. Vasoactive substances produced by cultured rat brain endothelial cells: a comparison of primary cells and immortalized cell lines. *Eur J Pharmacol* 1999 Feb 26;368(1):35-42. (IF₁₉₉₉: 2,047; 12 független idéző)
- Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Schermann JM, Tamsamani J, Couraud PO, **Deli MA**, Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier specific properties. *J Neurochem* 2005 Apr;93(2):279-289. (IF₂₀₀₅: 4,604; 65 független idéző)
- Perrière N, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, Decleves X, Hori S, Terasaki T, **Deli M**, Schermann JM, Tamsamani J, Couraud PO, Roux F. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res* 2007 May 30;1150: 1-13. (IF₂₀₀₇: 2,218; 40 független idéző)
- Nakagawa S, **Deli MA**, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 2007 Sep;27(6):687-694. (IF₂₀₀₇: 2,483; 41 független idéző)
- Nakagawa S, **Deli MA**, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel Á, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 2009 Mar-Apr;54(3-4):253-263. (IF₂₀₀₉: 3,541; 33 független idéző)

Összefoglaló közlemények

- Deli MA**, Joó F. Cultured vascular endothelial cells of the brain. *Keio J Med* 1996 Sep;45(3):183-199. (IF₁₉₉₆: -; 34 független idéző)
- Deli MA**, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb;25(1):59-127. (IF₂₀₀₅: 2,022; 116 független idéző)
- Tóth A, Veszelka S, Nakagawa S, Niwa M, **Deli MA**. Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2011 May 1;6(2):107-118. (IF₂₀₁₁: -; 0 független idéző)

Könyvfejezetek

- Deli MA**, Szabó CA, Dung NTK, Joó F. Immunohistochemical and electron microscopy detections on primary cultures of rat cerebral endothelial cells. In: de Boer ABG, Sutanto W (szerk.) *Drug Transport Across the Blood-Brain Barrier: In Vivo and In Vitro Techniques*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. pp. 23-28. (IF₁₉₉₇: -; 6 független idéző; *Deli és mtsai, 1997a*)
- Deli MA**, Ábrahám CS, Dung NTK, Joó F. Preparation of primary cultures of cerebral endothelial cells from newborn pigs. In: de Boer ABG, Sutanto W (szerk.) *Drug Transport Across the Blood-Brain Barrier: In Vivo and In Vitro Techniques*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. pp. 85-89. (IF₁₉₉₇: -; 0 független idéző; *Deli és mtsai, 1997b*)
- Deli MA**. Blood-brain barrier models. In: Lajtha A (szerk.) *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Neural Membranes and Transport*, Vol. 11. Berlin: Springer, 2007. pp. 29-56. (IF₂₀₀₇: -; 0 független idéző)
- Deli MA**, Kálmán M. Vér-agy gát: kölcsönhatás gliasejtek és az agyi endothelsejtek között. In: Huszti Zs, Kálmán M (szerk.) *Glia*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2008. pp. 345-368. (IF₂₀₀₈: -; 0 független idéző)

Veszelka S, Kittel Á, **Deli MA**. Tools of modelling blood-brain barrier penetrability. Chapter 9. In: Tihanyi K, Vastag M (szerk.) Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates. Washington: Bentham Science Publishers Ltd, 2011. pp. 166-188. (IF₂₀₁₁: -; 0 független idéző)

Szabadalom

Niwa M, Nakagawa S, **Deli MA**. Blood-brain barrier in vitro model, pathologic blood-brain barrier in vitro model, drug screening method using the same, pathologic blood-brain barrier function analysis method and pathogenesis analysis method. Lajstromszám: WO/2007/072953. Benyújtás éve: 2006. Benyújtás száma: PCT/JP2006/325671. Közzététel éve: 2007 Benyújtás helye: Japán. (IF₂₀₀₇: -; 0 független idéző)

A VÉR-AGY GÁT KÁROSODÁSÁNAK ÉS VÉDELME NEK VIZSGÁLATA MODELLEK SEGÍTSÉGÉVEL

MIKROBIÁLIS PATHOGÉNEK VIZSGÁLATA

Eredeti közlemények

Ábrahám CS, **Deli MA**, Joó F, Megyeri P, Torpier G. Intracarotid tumor necrosis factor- α administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. *Neurosci Lett* 1996 Apr 19;208(2):85-88. (IF₁₉₉₆: 2,090; 43 független idéző)

Megyeri P, Németh L, Pabst KM, Pabst MJ, **Deli MA**, Ábrahám CS. 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, protects against tumor necrosis factor α -induced vasogenic brain edema formation in newborn pigs. *Eur J Pharmacol* 1999 Jun 18;374(2):207-211. (IF₁₉₉₉: 2,047; 10 független idéző)

András IE, Pu H, **Deli MA**, Nath A, Hennig B, Toborek M. HIV-1 Tat protein alters tight junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells. *J Neurosci Res* 2003 Oct 15;74(2):255-265. (IF₂₀₀₃: 3,374; 51 független idéző)

Veszelka S, Urbányi Z, Pázmány T, Németh L, Obál I, Dung NTK, Ábrahám CS, Szabó G, **Deli MA**. Human serum amyloid P component attenuates the bacterial lipopolysaccharide-induced increase in blood-brain barrier permeability in mice. *Neurosci Lett* 2003 Nov 27;352(1):57-60. (IF₂₀₀₃: 1,967; 19 független idéző)

András IE, Pu H, Tian J, **Deli MA**, Nath A, Hennig B, Toborek M. Signaling mechanisms of HIV-1 Tat-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005 Sep;25(9):1159-1170. (IF₂₀₀₅: 4,786; 27 független idéző)

Veszelka S, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Dung NTK, Niwa, M, Ábrahám CS, **Deli MA**. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int* 2007 Jan; 50(1):219-228. (IF₂₀₀₇: 2,975; 16 független idéző)

Lachenmaier SM, **Deli MA**, Meissner M, Liesenfeld O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 2011 Mar;232(1-2):119-130. (*IF₂₀₁₀: 2,901; 1 független idéző)

Kézirat közlés alatt

Cardoso FL, Kittel Á, Veszelka S, Palmela I, Tóth A, Brites D, **Deli MA**, Brito MA. Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells. *PLoS ONE* 2011; revízió alatt.

AGYI ISCHEMIA KÓROKI TÉNYEZŐINEK VIZSGÁLATA

Eredeti közlemények

Imaizumi S, Kondo T, **Deli MA**, Gobbel G, Joó F, Epstein CJ, Yoshimoto T, Chan PH. The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. *Neurochem Int* 1996 Aug;29(2):205-211. (IF₁₉₉₆: 1,988; 44 független idéző)

- Németh L, **Deli MA**, Falus A, Szabó CA, Ábrahám CS. Cerebral ischemia-reperfusion induced vasogenic brain edema formation in rats: effect of an intracellular histamine receptor antagonist. *Eur J Pediatr Surg* 1998 Aug;8(4):216-219. (IF₁₉₉₈: 0,355; 3 független idéző)
- Deli MA**, Németh L, Falus A, Ábrahám CS. Effect of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine on the blood-brain barrier permeability in the rat. *Eur J Pharmacol* 2000 Jan 3;387(1):63-72. (IF₂₀₀₀: 2,236; 7 független idéző; *Deli és mtsai, 2000c*)
- Deli MA**, Ábrahám CS, Takahata H, Niwa M. Tissue plasminogen activator inhibits P-glycoprotein activity in brain endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2001 Jan 5;411(1):R3-R5. (IF₂₀₀₁: 2,164; 5 független idéző)
- Ábrahám CS, Harada N, **Deli MA**, Niwa M. Transient forebrain ischemia increases the blood-brain barrier permeability for albumin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 2002 Aug;22(4):455-462. (IF₂₀₀₂: 2,029; 32 független idéző)
- András I, **Deli MA**, Veszélka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007 Aug;27(8):1431-1443. (IF₂₀₀₇: 5,147; 34 független idéző)
- Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, **Deli MA**, Nagata I, Niwa M. Pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 2010 Jul;30(5):727-735. (IF₂₀₁₀: 2,423; 1 független idéző)
- Gesuite R, Orsini F, Zanier ER, Albani D, **Deli MA**, Bazzoni G, De Simoni MG. Glial cells drive preconditioning-induced blood-brain barrier protection. *Stroke* 2011 May;42(5):1445-1453. (*IF₂₀₁₀: 5,756; 0 független idéző)

Könyvfejezet

- Deli MA**, Ábrahám CS. Histamine and the blood-brain barrier. In: Falus A, Grosman N, Darvas Z (szerk.) *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Basel: Karger, 2004. pp. 264-271. (IF₂₀₀₄: -; 0 független idéző)

Konferenciakiadvány, előadás megjelent szövege

- Deli MA**, Ábrahám CS, Niwa M, Falus A. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm Res* 2003 Apr;52(Suppl 1):S39-S40. (IF₂₀₀₃: -; 17 független idéző)
- Deli MA**, Kis B. Vasoactive peptides and the blood-brain barrier. In: Kastin A, Pan W (szerk.) *The Blood-Brain Barrier: Understanding the Regulatory Gatekeeper Between Brain and Body: The Biomedical & Life Sciences Collection*. London: Henry Stewart Talks Ltd., 2008. pp. 1-52. (IF₂₀₀₈: -; 0 független idéző)

NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEKBEN SZEREPEK JÁTSZÓ KÓROS FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA

Eredeti közlemények

- Deli MA**, Sakaguchi S, Nakaoke R, Ábrahám CS, Takahata H, Kopáček J, Shigematsu K, Katamine S, Niwa M. PrP fragment 106-126 is toxic to cerebral endothelial cells expressing PrP^C. *Neuroreport* 2000 Nov 27;11(17):3931-3936. (IF₂₀₀₀: 2,696; 28 független idéző; *Deli és mtsai, 2000a*)
- Deli MA**, Ábrahám CS, Takahata H, Katamine S, Niwa M. Pentosan polysulfate regulates scavenger receptor-mediated, but not fluid-phase, endocytosis in immortalized cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 2000 Dec;20(6):731-745. (IF₂₀₀₀: 2,093; 4 független idéző; *Deli és mtsai, 2000b*)
- Kovac A, Zilkova M, **Deli MA**, Zilka N, Novak M. Human truncated tau is using different mechanism from beta-amyloid to damage blood-brain barrier. *J Alzheimers Disease* 2009;18(4):897-906. (IF₂₀₀₉: 3,832; 3 független idéző)
- Deli MA**, Veszélka S, Csiszár B, Tóth A, Kittel Á, Csete M, Sipos Á, Szalai A, Fülöp L, Penke B, Ábrahám CS, Niwa M. Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid β -induced toxicity. *J Alzheimers Disease* 2010;22(3):777-794. (IF₂₀₁₀: 4,261; 0 független idéző)

Könyvfejezet

Deli MA. The role of blood-brain barrier in neurodegenerative diseases. In: Di Liegro I, Savettieri G (szerk.) *Molecular Bases of Neurodegeneration*. Kerala: Research Signpost, 2005. pp. 137-161. (IF₂₀₀₅: -; 5 független idéző)

Hozzászólás

Deli MA, Niwa M, Katamine S, Ábrahám CS. Pentosan in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 1999 Apr 10;353(9160):1272. (IF₁₉₉₉: -; 2 független idéző)

Kéziratok közlés alatt

Veszélka S, Walter F, Tóth A, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Penke B, **Deli MA.** Docosahexaenoic acid reduces amyloid β -induced toxicity in neurons, brain endothelial cells, glial cells, and pericytes. Kézirat.

Deli MA, Veszélka S, Kopáček J, Ábrahám CS, Nakaoke R, Katamine S, Niwa M. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells from PrP 106-126 peptide-induced toxicity and blood-brain barrier dysfunction. Kézirat.

ÚJ MÓDSZEREK AGYBA VALÓ GYÓGYSZERBEJUTTATÁS ELŐSEGÍTÉSÉRE**Eredeti közlemények**

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Sam H, Horvát S, **Deli MA,** Mack AF. Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochem Cell Biol* 2008 Jul;130(1):127-140. (IF₂₀₀₈: 2,320; 8 független idéző)

Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, Veszélka S, Tóth A, Kis L, Kurunczi A, Balogh G, Kürti L, Erős I, Szabó-Révész P, **Deli MA.** Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue. *Eur J Pharm Biopharm* 2009 May;72(1):252-259. (IF₂₀₀₉: 3,151; 7 független idéző; *Horvát és mtsai, 2009a*)

Sipos E, Kurunczi A, Fehér A, Penke Z, Fülöp L, Kasza Á, Horváth J, Horvát S, Veszélka S, Balogh G, Kürti L, Erős I, Szabó-Révész P, Párducz Á, Penke B, **Deli MA.** Intranasal delivery of human β -amyloid peptide in rats: effective brain targeting. *Cell Mol Neurobiol* 2010 Apr;30(3):405-413. (IF₂₀₁₀: 2,423; 2 független idéző)

Összefoglaló közlemények

Fehér A, Erős I, **Deli M,** Szabó-Révész P. A vér-agy gát szerepe, felépítése és gyógyszerészeti vonatkozásai. *Gyógyszerészet* 2007 Feb;51(2):85-91. (IF₂₀₀₇: -; 1 független idéző)

Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 2009 Apr;1788(4):892-910. (IF₂₀₀₉: 3,998; 31 független idéző)

Kürti L, **Deli M,** Szabó-Révész P. Intranasális gyógyszerbevitel újabb lehetőségei szisztémás hatás elérése céljából. *Gyógyszerészet* 2009 Feb;53(2):67-73. (IF₂₀₀₉: -; 0 független idéző)

Horvát S, Kiss L, Révész P, Erős I, **Deli M.** Hatóanyagok agyba juttatása a nazális útvonalon keresztül. *Gyógyszerészet* 2009 May;53(5):259-266. (IF₂₀₀₉: -; 0 független idéző; *Horvát és mtsai, 2009b*)

Könyvfejezet

Deli MA. Drug transport and the blood-brain barrier. Chapter 8. In: Tihanyi K, Vastag M (szerk.) *Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates*. Washington: Bentham Science Publishers Ltd, 2011. pp. 144-165. (IF₂₀₁₁: -; 0 független idéző)

Kézirat közlés alatt

Hülper P, Veszélka S, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Lakomek M, Kugler W, **Deli MA.** Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties. Kézirat.

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora 83,927 (ebből az eredeti közleményeké 77,907). Ezekre a közleményekre az MTMT adatbázisának 2010. július 13-i lezárásáig összesen 762 független hivatkozás történt (ebből az eredeti közleményekre 550).

8.2. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK**Eredeti közlemények**

- Huszt Z, Madarász E, Schlett K, Joó F, Szabó CA, **Deli MA**. Mercury-stimulated histamine uptake and binding in cultured astroglial and cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 1997 Apr 1;48(1):71-81. (IF₁₉₉₇: 2,442; 3 független idéző)
- Fábián G, Szabó CA, Bozó B, Greenwood J, Adamson P, **Deli MA**, Joó F, Krizbai I, Szücs M. Expression of G-protein subtypes in cultured cerebral endothelial cells. *Neurochem Int* 1998 Aug;33(2):179-185. (IF₁₉₉₈: 1,781; 12 független idéző)
- Farkas G, Márton J, Nagy Z, Mándi Y, Takács T, **Deli MA**, Ábrahám CS. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin 6. *Neurosci Lett* 1998 Feb 20;242(3):147-150. (IF₁₉₉₈: 1,934; 31 független idéző)
- Krizbai IA, **Deli MA**, Pestenác A, Siklós L, Szabó CA, András I, Joó F. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 1998 Dec 15;54(6):814-819. (IF₁₉₉₈: 2,874; 77 független idéző)
- Ábrahám CS, **Deli MA**, Temesvári P, Kovács J, Szerdahelyi P, Joó F, Torpier G. Asphyxia- and reperfusion-induced regional differences in cytotoxic and vasogenic brain edema formation in newborn pigs. *Neurosci Res Commun* 1999 Nov-Dec;25(3):173-182. (IF₁₉₉₉: 0,989; 0 független idéző)
- Németh L, Szabó CA, **Deli MA**, Kovács J, Krizbai IA, Ábrahám CS. Cerebral microvascular acid phosphatase isoenzymes may contribute to the histamine-induced changes in the blood-brain barrier permeability in newborn pigs. *Neurosci Res Commun* 1999 May-Jun;24(3): 125-133. (IF₁₉₉₉: 0,989; 0 független idéző)
- Huszt Z, Horváth-Sziklai A, Noszál B, Madarász E, **Deli MA**. Enhancing effect of zinc on astroglial and cerebral endothelial histamine uptake. *Biochem Pharmacol* 2001 Dec 1;62(11):1491-1500. (IF₂₀₀₁: 3,340; 7 független idéző)
- Kis B, **Deli MA**, Kobayashi H, Ábrahám CS, Yanagita T, Kaiya H, Isse T, Nishi R, Gotoh S, Kangawa K, Wada A, Greenwood J, Niwa M, Yamashita H, Ueta Y. Adrenomedullin regulates blood-brain barrier functions in vitro. *Neuroreport* 2001 Dec 21;12(18):4139-4142. (IF₂₀₀₁: 2,374; 26 független idéző)
- Kis B, Kaiya H, Nishi R, **Deli MA**, Ábrahám CS, Yanagita T, Isse T, Gotoh S, Kobayashi H, Wada A, Niwa M, Kangawa K, Greenwood J, Yamashita H, Ueta Y. Cerebral endothelial cells are a major source of adrenomedullin. *J Neuroendocrinol* 2002 Apr;14(4):283-293. (IF₂₀₀₁: 2,691; 21 független idéző)
- Kobayashi H, Yanagita T, Yokoo H, Sugano T, Satoh S, Kis B, **Deli M**, Niwa M, Wada A. Induction of aquaporin 1 by dexamethasone in lipid rafts in immortalized brain microvascular endothelial cells. *Brain Res* 2006 Dec 6;1123(1):12-19. (IF₂₀₀₆: 2,341; 12 független idéző)
- Palkovits M, **Deli MA**, Gallatz K, Tóth ZE, Buzás E, Falus A. Highly activated *c-fos* expression in specific brain regions (ependyma, circumventricular organs, choroid plexus) of histidine decarboxylase deficient mice in response to formalin-induced acute pain. *Neuropharmacology* 2007 Jul;53(1):101-112. (IF₂₀₀₇: 3,215; 4 független idéző)
- Hutamekalin P, Farkas AE, Orbók A, Wilhelm I, Nagyórsi P, Veszélka S, **Deli MA**, Buzás K, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradszky K, Meksuriyen D, Krizbai IA. Effect of nicotine and polycyclic aromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol Int* 1998 Feb;32(2):198-209. (IF₂₀₀₈: 1,619; 5 független idéző)
- Ceruti S, Colombo L, Magni G, Viganò F, Boccazzi M, **Deli MA**, Sperlágh B, Abbracchio MP, Kittel Á. Oxygen-glucose deprivation increases the enzymatic activity and the microvesicle-mediated release of ectonucleotidases in the cells composing the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 2011 Aug;59(2):259-271. (*IF₂₀₁₀: 3,601; 0 független idéző)

Összefoglaló közlemények

- Kis B, Ábrahám CS, **Deli MA**, Kobayashi H, Wada A, Niwa M, Yamashita H, Ueta Y. Adrenomedullin in the cerebral circulation. *Peptides* 2001 Nov;22(11):1825-1834. (IF₂₀₀₁: 2,137; 14 független idéző)

- Kis B, Ábrahám CS, **Deli MA**, Kobayashi H, Yamashita H, Busija DW, Ueta Y. Adrenomedullin, an autocrine mediator of the blood-brain barrier function. *Hypertens Res* 2003 Feb;26(Suppl):S61-S70. (IF₂₀₀₃: 2,013; 10 független idéző)
- Krizbai IA, **Deli MA**. Signalling pathways regulating tight junction permeability in the blood-brain barrier. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003 Feb;49(1):23-32. (IF₂₀₀₃: 1,153; 23 független idéző)

Konferenciakiadvány, előadás megjelent szövege

- Szabó CA, Krizbai I, **Deli MA**, Ábrahám CS, Joó F. Receptor-mediated regulation by histamine of the acid phosphatase activity in cultured cerebral endothelial cells. *Inflamm Res* 1996 Mar;45(Suppl 1):S60-S61. (IF₁₉₉₆: -; 0 független idéző)
- Németh L, Szabó CA, **Deli MA**, Kovács J, Krizbai IA, Ábrahám CS, Joó F. Intra-carotid histamine administration results in a dose-dependent vasogenic brain oedema formation in new-born pigs. *Inflamm Res* 1997 Mar;46(Suppl 1):S45-S46. (IF₁₉₉₇: -; 0 független idéző)
- Szabó CA, **Deli MA**, Németh L, Krizbai I, Kovács J, Ábrahám CS, Joó F. Histamine-induced vasogenic brain oedema formation in newborn pigs: a role for endothelial acid phosphatase? In: Telkeen AW, Korf J (szerk.) *Neurochemistry: Cellular, Molecular and Clinical Aspects: European Society for Neurochemistry. 11. Meeting. Groningen, Hollandia, 1996.06.15-1996.06.20.* New York: Plenum Publishing Corporation, 1997. pp. 479-483. (IF₁₉₉₆: -; 0 független idéző)
- Kis B, Snipes JA, **Deli MA**, Ábrahám CS, Yamashita H, Ueta Y, Busija DW. Chronic adrenomedullin treatment improves blood-brain barrier function but has no effects on expression of tight junction proteins. In: Kuroiwa T (szerk.) *Acta Neurochirurgica Supplement 86, Brain Edema XII: Proceedings of the 12th International Symposium, Hakone, Japan Nov 10-13. 2002.* Wien: Springer, 2003. pp. 565-570. (IF₂₀₀₃: -; 12 független idéző)

Hozzászólás

- Megyeri P, **Deli MA**, Ábrahám CS. Mannose-binding lectin and meningococcal disease. *Lancet* 1999 Jul 24;354(9175):338. (IF₁₉₉₉: -; 0 független idéző)
- Kis B, Ábrahám CS, **Deli MA**, Ueta Y. Adrenomedullin and migraine. *Headache* 2002 Nov;42(10):1064-1065. (IF₂₀₀₂: -; 0 független idéző)

8.3. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ, A PH.D. FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Eredeti közlemények

- Kovács J, Julesz J, Mogyoróssy MV, **Deli MA**, Ábrahám CS, Vecsernyés M. Asphyxia-induced release of α -melanocyte-stimulating hormone in newborn pigs. *Peptides* 2001 Jul;22(7):1049-1053. (IF₂₀₀₁: 2,137; 0 független idéző)
- Gellén B, Kovács J, Németh L, Németh P, Vágvolgyi J, Bari F, Megyeri P, Pintér S, Temesvári P, **Deli MA**, Vecsernyés M, Szilvássy Z, Koltai M, Ábrahám CS. Vascular changes playing a role in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis in asphyxiated newborn pigs. *Pediatr Surg Int* 2003 Jul;19(5):380-384. (IF₂₀₀₃: 0,562; 10 független idéző)
- Csete M, Kresz N, Vass C, Kurdi G, Hainer Z, **Deli M**, Bor Z, Marti O. Sub-micrometer adhesion modulation on polymer surfaces containing gratings produced by two-beam interference. *Materials Science Engineering: C* 2005 Dec;25(5-8):813-819. (IF₂₀₀₅: 1,599; 5 független idéző)
- Csete M, Kohazi-Kis A, Vass C, Sipos A, Szekeres G, **Deli M**, Osvay K, Bor Z. Atomic force microscopical and surface plasmon resonance spectroscopical investigation of submicrometer metal gratings generated by UV laser-based two-beam interference in Au-Ag bimetallic layers. *Appl Surf Science* 2007 Jul 31;253(19):7662-7671. (IF₂₀₀₇: 1,406; 6 független idéző)
- Csete M, Sipos A, Köházi-Kis A, Szalai A, Szekeres G, Matesz A, Csákó T, Osvay K, Bor Z, Penke B, **Deli MA**, Veszélka S, Marti O. Comparative study of sub-micrometer polymeric structures: dot-arrays, linear and crossed gratings generated by UV laser based two-beam interference, as surfaces for SPR and AFM based bio-sensing. *Appl Surf Science* 2007 Dec 15;254(4):1194-1205. (IF₂₀₀₇: 1,406; 0 független idéző)

- Sipos Á, Tóháti H, Mathesz A, Szalai A, Budai J, **Deli MA**, Fülöp L, Kőházi-Kis A, Csete M, Bor Zs. Effect of nanogold particles on coupled plasmon resonance on biomolecule covered prepatterned multilayers. *Sensor Lett* 2010 Jun;8(3):515-520. (IF₂₀₁₀: 0,602; 0 független idéző)
- György B, Módos K, Pállinger É, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, **Deli MA**, Sipos Á, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel Á, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 2011 Jan 27;117(4):e39-e48. (*IF₂₀₁₀: 10,558; 2 független idéző)
- Szűts A, Láng P, Ambrus R, Kiss L, **Deli MA**, Szabó-Révész P. Applicability of sucrose laurate as surfactant in solid dispersion prepared by melt technology. *Int J Pharm* 2011 May 30;410(1-2):107-110. (*IF₂₀₁₀: 3,607; 0 független idéző)
- Kürti L, Kukovecz Á, Kozma G, Ambrus R, **Deli MA**, Szabó-Révész P. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. *Powder Technol* 2011 Sep 15;212(1):210-217. (*IF₂₀₁₀: 1,887; 0 független idéző)
- Fenyvesi F, Kiss T, Fenyvesi É, Szenté L, Veszélka S, **Deli MA**, Váradi J, Fehér P, Ujhelyi Z, Tósaki Á, Vecsernyés M, Bácskay I. Randomly methylated β -cyclodextrin derivatives enhance taxol permeability through human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayer. *J Pharm Sci* 2011 Nov;100(11):4734-4744. (*IF₂₀₁₀: 3,031; 0 független idéző)

Konferenciakiadvány, előadás megjelent szövege

- Csete M, Sipos Á, Szalai A, Mathesz A, **Deli M**, Veszélka SZ, Schmatulla A, Kohazi-Kis A, Osvay K, Marti O, Bor ZS. Bio-sensing based on plasmon-coupling caused by rotated sub-micrometer gratings in metal-dielectric interfacial layers. In: Tuan Vo-Dinh, Robert A Lieberman, Günter Gauglitz (szerk.) *Advanced environmental, chemical and biological sensing technologies V: SPIE Optics East 2007*. Boston, Amerikai Egyesült Államok, 2007.09.09-2007.09.12. Bellingham: SPIE, Paper 67550X. (IF₂₀₀₇: -; 0 független idéző)

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott N. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 2002 May;200(5):629-638.
- Abbott NJ, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J Cell Sci.* 1992 Sep;103 (Pt 1):23-37.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010 Jan;37(1):13-25.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev Neurosci* 2006 Jan;7(1):41-53.
- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:439-477.
- Alfieri A, Srivastava S, Siow RC, Modo M, Fraser PA, Mann GE. Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke. *J Physiol* 2011 Sep 1;589(Pt 17):4125-4136.
- Andjelkovic AV, Stamatovic SM, Keep RF. The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003 Nov;23(11):1348-1355.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005 Sep 16;97(6):512-523.
- Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010 Nov 25;468(7323):557-561.
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011 Aug 16;21(2):193-215.
- Banks WA, Ercal N, Price TO. The blood-brain barrier in neuroAIDS. *Curr HIV Res* 2006 Jul;4(3):259-266.
- Barragan A, Brossier F, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* 2005 Apr;7(4):561-568.
- Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, Béliveau R. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* 1997 Sep 1;326 (Pt 2):539-544.
- Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2009 Jul;118(1):103-113.
- Berezki D, Fekete I, Loof I, Köbberling W, Valikovics A, Németh G, Fülesdi B, Csiba L. Cations of cisternal cerebrospinal fluid in humans and the effect of different doses of nimodipine on CSF calcium after stroke. *Clin Neuropharmacol* 2000 Nov-Dec;23(6):318-323.
- Berezki D, Mihálka L, Fekete I, Valikovics A, Csépany T, Fülesdi B, Bajkó Z, Szekeres C, Fekete K, Csiba L. The Debrecen Stroke Database: demographic characteristics, risk factors, stroke severity and outcome in 8088 consecutive hospitalised patients with acute cerebrovascular disease. *Int J Stroke* 2009 Oct;4(5):335-339.
- Betz AL, Goldstein GW. Specialized properties and solute transport in brain capillaries. *Annu Rev Physiol* 1986;48:241-250.
- Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 1993 Oct;21(10 Suppl):S423-S435.
- Bickel U. How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx* 2005 Jan;2(1):15-26.
- Bowman, P. D., Betz, A. L., Wolinsky, J. S., Penny, J. B., Shivers, R. R., and Goldstein, G. W. 1981. Primary cultures of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* 17: 353-362.
- Bowman, P. D., Ennis, S. R., Rarey, K. E., Betz, A. L., and Goldstein, G. W. 1983. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann. Neurol.* 14: 396-402.

- Bozso Z, Penke B, Simon D, Laczkó I, Juhász G, Szegedi V, Kasza A, Soós K, Hetényi A, Wéber E, Tóháti H, Csete M, Zarándi M, Fülöp L. Controlled in situ preparation of A beta(1-42) oligomers from the isopeptide "iso-A beta(1-42)", physicochemical and biological characterization. *Peptides* 2010 Feb;31(2):248-256.
- Brandes LJ, LaBella FS, Glavin GB, Paraskevas F, Saxena SP, McNicol A, Gerrard JM. Histamine as an intracellular messenger. *Biochem Pharmacol* 1990 Oct 15;40(8):1677-1681.
- Brandes LJ. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy] ethanamine (DPPE; tesmilifene), a chemopotentiating agent with hormetic effects on DNA synthesis in vitro, may improve survival in patients with metastatic breast cancer. *Hum Exp Toxicol* 2008 Feb;27(2):143-147.
- Bus JS, Gibson JE. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* 1984 Apr;55:37-46.
- Busija DW, Bari F, Domoki F, Horiguchi T, Shimizu K. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. *Prog Neurobiol* 2008 Dec 11;86(4):379-395.
- Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, de Vries HE, Shusta EV. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem* 2006 May;97(4):922-933.
- Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 2009 Jul;10(7):644-654.
- Chan PH, Epstein CJ, Li Y, Huang TT, Carlson E, Kinouchi H, Yang G, Kamii H, Mikawa S, Kondo T, Copin J-C, Chen SF, Chan T, Gafni J, Göbbel G, Reola E. Transgenic mice and knockout mutants in the study of oxidative stress in brain injury. *J Neurotrauma* 1995 Oct;12(5):815-824.
- Chen JL, Wei L, Bereczki D, Hans FJ, Otsuka T, Acuff V, Ghersi-Egea JF, Patlak C, Fenstermacher JD. Nicotine raises the influx of permeable solutes across the rat blood-brain barrier with little or no capillary recruitment. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995 Jul;15(4):687-698.
- Chen Z, Zandonatti M, Jakubowski D, Fox HS. Brain capillary endothelial cells express MBEC1, a protein that is related to the *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors. *Lab Invest.* 1998 Mar;78(3):353-63.
- Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci* 2011 Jan 1;16:1733-1745.
- Coisne C, Mao W, Engelhardt B. Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2009 May 15;182(10):5909-5913.
- Cooper I, Cohen-Kashi Malina K, Cagnotto A, Bazzoni G, Salmona M, Teichberg VI. Interactions of the prion peptide (PrP 106-126) with brain capillary endothelial cells: coordinated cell killing and remodeling of intercellular junctions. *J Neurochem* 2011 Feb;116(4):467-475.
- Corsini A, Ceska R. Drug-drug interactions with statins: will pitavastatin overcome the statins' Achilles' heel? *Curr Med Res Opin* 2011 Aug;27(8):1551-1562.
- Cramer WC, Toorop GP. Focal cerebral ischemia in the mouse: hypothermia and rapid screening of drugs. *Gen Pharmacol* 1998 Feb;30(2):195-200.
- Crouse JR 3rd, Byington RP, Furberg CD. HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis* 1998 May;138(1):11-24.
- Cucullo L, Hallene K, Dini G, Dal Toso R, Janigro D. Glycerophosphoinositol and dexamethasone improve transendothelial electrical resistance in an in vitro study of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2004 Feb 6;997(2):147-151.
- Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM. Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to *mdr1a* P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 Feb;20(2):381-386.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010 Nov 25;468(7323):562-566.
- Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009 Mar;8(1):16-30.

- Dehouck M-P, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 1990 May;54(5):1798-1801.
- de Haas CJ. New insights into the role of serum amyloid P component, a novel lipopolysaccharide-binding protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999 Dec;26(3-4):197-202.
- Dellacasa-Lindberg I, Hitziger N, Barragan A. Localized recrudescence of Toxoplasma infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Microbes Infect* 2007 Sep;9(11):1291-1298.
- de Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res Rev* 1997 Sep 30;25(1):27-49.
- del Zoppo GJ. The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med* 2010 Feb;267(2):156-171.
- Dempsey RJ, Başkaya MK, Doğan A. Attenuation of brain edema, blood-brain barrier breakdown, and injury volume by ifenprodil, a polyamine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, after experimental traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 2000 Aug;47(2):399-404.
- de Vries HE, Hoogendoorn KH, van Dijk J, Zijlstra FJ, van Dam AM, Breimer DD, van Berkel TJ, de Boer AG, Kuiper J. Eicosanoid production by rat cerebral endothelial cells: stimulation by lipopolysaccharide, interleukin-1 and interleukin-6. *J Neuroimmunol.* 1995 Jun;59(1-2):1-8.
- Dietrich J-B. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 2002 Jul;128(1-2):58-68.
- Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 2009 Apr;8(4):398-412.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003 Sep;47(3):149-61.
- Dóczi T. The pathogenetic and prognostic significance of blood-brain barrier damage at the acute stage of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. Clinical and experimental studies. *Acta Neurochir (Wien)* 1985;77(3-4):110-132.
- Dóczi T, Schwarcz A, Gallyas F, Bogner P, Pál J, Sulyok E, Gömöri E, Vajda Z. Az agyi víztranszport szabályozása agyoedemában. *Ideggyógy Sz* 2005 Sep 20;58(9-10):298-304.
- Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res* 2005 Mar 21;1038(2):208-215.
- Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 2008;14(16):1581-1593.
- Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 May;26(5):613-624.
- Durieu-Trautmann O, Fédérici C, Crémignon C, Foignant-Chaverot N, Roux F, Claire M, Strosberg AD, Couraud PO. Nitric oxide and endothelin secretion by brain microvessel endothelial cells: regulation by cyclic nucleotides. *J Cell Physiol.* 1993 Apr;155(1):104-111.
- Dux E, Noble L, Chan PH. Glutamine stimulates growth in rat cerebral endothelial cell culture. *J Neurosci Res* Jul;29(3):355-361.
- Enerson BE, Drewes LR. The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 Jul;26(7):959-973.
- Elsheikha HM, Khan NA. Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev* 2010 Jul;34(4):532-553.
- Epstein CJ, Avraham KB, Lovett M, Smith S, Elroy-Stein O, Rotman G, Bry C, Groner Y. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 Nov;84(22):8044-8048.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Eibl H, Lakomek M. Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. *Exp Brain Res* 2000 Dec; 135(3):417-422.
- Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H, Lakomek M. Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6

- glioma bearing rats and isolated capillaries using intracarotid short chain alkylglycerols. *Br J Pharmacol* 2003 Dec;140(7):1201-1210.
- Erdlenbruch B, Kugler W, Schinkhof C, Neurath H, Eibl H, Lakomek M. Blood-brain barrier opening with alkylglycerols: Biodistribution of 1-O-pentylglycerol after intravenous and intracarotid administration in rats. *J Drug Target* 2005 Apr;13(3):143-150.
- Farkas A, Szatmári E, Orbók A, Wilhelm I, Wejksza K, Nagyősi P, Hutamekalin P, Bauer H, Bauer H-C, Traweger A, Krizbai IA. Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 2005 Jun 15;80(6):855-861.
- Farquhar C, Dickinson A, Bruce M. Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 1999 Jan 9;353(9147):117.
- Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury:role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994 Winter;6(4):341-360.
- Fontaine M, Elmquist WF, Miller DW. Use of rhodamine 123 to examine the functional activity of P-glycoprotein in primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers. *Life Sci* 1996;59(18):1520-1431.
- Forloni G, Angeretti N, Chiese R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1993 Apr 8;362(6420):543-546.
- Friedman A, Dingledine R. Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. *Epilepsia*. 2011 May;52(Suppl 3):33-39.
- Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, Lindmark T, Mabondzo A, Nilsson JE, Raub TJ, Stanimirovic D, Terasaki T, Oberg JO, Osterberg T. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro* 2005 Apr;19(3):299-334.
- Ge S, Song L, Pachter JS. Where is the blood-brain barrier ... really? *J Neurosci Res* 2005 Feb 15;79(4):421-427.
- Ghosh P. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment. *Semin Arthritis Rheum* 1999 Feb;28(4):211-267.
- Greenwood J, Pryce G, Devine L, et al. SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *J Neuroimmunol* 1996 Dec;71(1-2):51-63.
- Guillot F, Audus KL, Raub TJ. Fluid-phase endocytosis by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Microvasc Res* 1990 Jan;39(1):1-14.
- Hartmann C, Zozulya A, Wegener J, Galla HJ. The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study. *Exp Cell Res* 2007 Apr 15;313(7):1318-1325.
- Haseloff RF, Blasig IE, Bauer H-C, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb;25(1):25-39.
- Hatcher MA, Starr JA. Role of tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. *Ann Pharmacother* 2011 Mar;45(3):364-371.
- Haughey NJ, Mattson MP. Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002 Oct 1;31 Suppl 2:S55-S61.
- Hayashi K, Nakao S, Nakaoke R, Nakagawa S, Kitagawa N, Niwa M. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept* 2004 Dec 15;123(1-3):77-83.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999 Oct;79(4):1283-1316.
- Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*. 2001 Apr 30;153(3):543-553.
- Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J* 2008 Sep;10(3):455-472.
- Hiu T, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Tsutsumi K, Kawakubo J, Honda M, Suyama K, Nagata I, Niwa M. Tissue plasminogen activator enhances the hypoxia/reoxygenation-induced

- impairment of the blood-brain barrier in a primary culture of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 2008 Dec;28(8):1139-1146.
- Hoheisel D, Nitz T, Franke H, et al. Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jun 18;247(2):312-315.
- Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K, Nakashima E, Terasaki T. A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occluding gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* 2004 Apr;89(2):503-512.
- Hudson L, Liu J, Nath A, Jones M, Raghavan R, Narayan O, Male D, Everall I. Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol* 2000 Apr;6(2):145-155.
- Hughes CC, Lantos PL. Brain capillary endothelial cells in vitro lack surface IgG Fc receptors. *Neurosci Lett* 1986 Jul 11;68(1):100-106.
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 2007 Nov;10(11):1369-1376.
- Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jul 22;261(1):108-12.
- Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol* 2004 Jan;56(1):3-17.
- Illum L. Nasal drug delivery - possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 2003 Feb 21; 87(1-3): 187-198.
- Islas S, Vega J, Ponce L, González-Mariscal L. Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* 2002 Mar 10;274(1):138-148.
- Joó F. The blood-brain barrier in vitro: ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem Int* 1985;7(1):1-25.
- Joó F. The blood-brain barrier in vitro: the second decade. *Neurochem Int* 1993 Dec;23(6):499-521.
- Joó F, Karnushina I. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios* 1973 Sep-Oct;8(29):41-48.
- Joó F, Kovács J, Szerdahelyi P, Temesvári P, Tósaki A. The role of histamine in brain oedema formation. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994;60:76-78.
- Joó F, Tósaki A, Oláh Z, Koltai M. Inhibition by H-7 of the protein kinase C prevents formation of brain edema in Sprague-Dawley CFY rats. *Brain Res*. 1989 Jun 19;490(1):141-3.
- Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999 Mar;5(3):123-132.
- Karkan D, Pfeifer C, Vitalis TZ, et al. A unique carrier for delivery of therapeutic compounds beyond the blood-brain barrier. *PLoS One* 2008; 3(6): e2469.
- Kása P, Pákáski M, Joó F, Lajtha A. Endothelial cells from human fetal brain microvessels may be nociceptive, but do not synthesize acetylcholine. *J Neurochem* 1991 Jun;56(6):2143-2146.
- Kilander L, Nyman H, Boberg M, Hansson L, Lithell H. Hypertension is related to cognitive impairment: a 20-year follow-up of 999 men. *Hypertension* 1998 Mar;31(3):780-786.
- Kim KS, Wass CA, Cross AS, Opal SM. Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat. *Lymphokine Cytokine Res* 1992 Dec;11(6):293-298.
- Kim KS. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* 2008 Aug;6(8):625-634.
- Kim H, Lee JM, Park JS, Jo SA, Kim YO, Kim CW, Jo I. Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 18;372(1):243-248.
- Kim YH, Park JH, Hong SH, Koh JY. Nonproteolytic neuroprotection by human recombinant tissue plasminogen activator. *Science* 1999 Apr 23;284(5414):647-650.
- Kis B, Chen L, Ueta Y, Busija DW. Autocrine peptide mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier. *Peptides*. 2006 Jan;27(1):211-222.

- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 1998 Jul 1;70(13):2446-2453.
- Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM. Bimane fluorescent labels: labelling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 Jul;76(7):3382-3386.
- Krizbai IA, Deli MA, Pestencz A, Siklós L, Szabó CA, András I, Joó F. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 1998 Dec 15;54(6):814-819.
- Kuhlmann CR, Zehendner CM, Gerigk M, Closhen D, Bender B, Friedl P, Luhmann HJ. MK801 blocks hypoxic blood-brain-barrier disruption and leukocyte adhesion. *Neurosci Lett* 2009 Jan 16;449(3):168-172.
- Kusuhara H, Terasaki T, Sugiyama Y. Brain efflux index method. Characterization of efflux transport across the blood-brain barrier. *Methods Mol Med* 2003;89:219-231.
- Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* 2005 Dec 15;50(2):258-265.
- Lemichez E, Lecuit M, Nassif X, Bourdoulous S. Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2010 Feb;8(2):93-104.
- Leveugle B, Ding W, Laurence F, Dehouck MP, Scanameo A, Cecchelli R, Fillit H. Heparin oligosaccharides that pass the blood-brain barrier inhibit beta-amyloid precursor protein secretion and heparin binding to beta-amyloid peptide. *J Neurochem* 1998 Feb;70(2):736-744.
- Li W, Li G, Steiner J, Nath A. Role of Tat protein in HIV neuropathogenesis. *Neurotox Res* 2009 Oct;16(3):205-220.
- Liddelow SA. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids and Barriers of the CNS* 2011, 8:2 (pp 1-16.)
- Lippoldt A, Kniesel U, Liebner S, Kalbacher H, Kirsch T, Wolburg H, Haller H. Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res* 2000 Dec 8;885(2):251-261.
- Loscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2005 Jan;2(1):86-98.
- Maffrand JP, Herbert JM, Bernat A, Defreyn G, Delebassee D, Savi P, Pinot JJ, Sampol J. Experimental and clinical pharmacology of pentosan polysulfate. *Semin Thromb Hemost* 1991;17 Suppl 2:186-198.
- Masada T, Hua Y, Xi G, Ennis SR, Keep RF. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001 Jan;21(1):22-33.
- Mayhan WG. Regulation of blood-brain barrier permeability. *Microcirculation* 2001 Apr;8(2):89-104.
- Mayhan WG, Didion SP. Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke* 1996 May;27(5):965-969.
- Megyeri P, Ábrahám CS, Temesvári P, Kovács J, Vas T, Speer CP. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. *Neurosci Lett* 1992 Dec 14;148(1-2):137-140.
- Megyeri P, Pabst KM, Pabst MJ. Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology* 1995 Dec;86(4):629-635.
- Murakami M, Elfenbein A, Simons M. Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008 May 1;78(2):223-231.
- Nagy Z, Martinez K. Astrocytic induction of endothelial tight junctions. *Ann NY Acad Sci* 1991;633:395-404.
- Nagy Z, Vastag M, Kolev K, Bori Z, Karadi I, Skopal J. Human cerebral microvessel endothelial cell culture as a model system to study the blood-brain interface in ischemic/hypoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb;25(1):201-210.
- Nassief A, Marsh JD. Statin therapy for stroke prevention. *Stroke* 2008 Mar;39(3):1042-1048.
- Németh H, Toldi J, Vecsei L. Role of kynurenines in the central and peripheral nervous system. *Curr Neurovasc Res* 2005 Jul;2(3):249-260.

- Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, Davis T, Engelhardt B, Grammas P, Nedergaard M, Nutt J, Pardridge W, Rosenberg GA, Smith Q, Drewes LR. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 2008 Jan;7(1):84-96.
- Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, Leybaert L, Molnár Z, O'Donnell ME, Povlishock JT, Saunders NR, Sharp F, Stanimirovic D, Watts RJ, Drewes LR. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci* 2011 Mar;12(3):169-182.
- Neveu PJ, Bluthé R-M, Liège S, Moya S, Dantzer R. Interleukin-1-induced sickness behavior depends on behavioral lateralization in mice. *Physiol Behav* 1998 Feb 15;63(4):587-590.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003 May 12;161(3):653-660.
- Noursadeghi M, Bickerstaff MC, Gallimore JR, Herbert J, Cohen J, Pepys MB. Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Dec 19;97(26):14584-14589.
- Ohno K, Pettigrew KD, Rapoport SI. Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat. *Am J Physiol* 1978 Sep;235(3):H299-H307.
- Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* 2007 Sep;24(9):1745-1758.
- Okamoto K, Hazama F, Yamori Y, Haebara H, Nagaoka A. Pathogenesis and prevention of stroke in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1975 Jun;2:161s-163s.
- O'Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA. Na⁺-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 1999 Nov 5;274(45):31891-31895.
- Oláh Z, Novák R, Lengyel I, Dux E, Joó F. Kinetics of protein phosphorylation in microvessels isolated from rat brain: modulation by second messengers. *J Neurochem* 1988 Jul;51(1):49-56.
- Oldendorf WH. Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res* 1970 Dec 1;24(2):372-376.
- Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics* 2011 Jul;8(3):319-329.
- Ózsvári B, Puskás GL, Nagy LI, Kanizsai I, Gyuris M, Madácsi R, Fehér LZ, Gerő D, Szabó C. A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. *Int J Mol Med* 2010 Apr;25(4):525-530.
- Panula P, Joó F, Rehardt L. Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. *Experientia* 1978 Jan 15;34(1):95-97.
- Pardridge WM. Drug and gene targeting to brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 2002 Feb;1(2):131-139.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006 Oct 12;443(7112):700-704.
- Potschka H. Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* 2010 Jan;125(1):118-127.
- Preston E, Webster J. A two-hour window for hypothermic modulation of early events that impact delayed opening of the rat blood-brain barrier after ischemia. *Acta Neuropathol* 2004 Nov;108(5):406-412.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Nov 10;95(23):13363-13383.
- Pubchem adatbázis: pentosan, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=37720>
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979 May-Jun;10(3):267-272.
- Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA. Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res* 1992 Apr;199(2):330-340.

- Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Vighetto A, Doh-Ura K. Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies: is there a role for pentosan polysulfate? *Expert Opin Biol Ther* 2007 May;7(5):713-726.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967 Jul;34(1):207-217.
- Régina A, Koman A, Piciotti M, El Hafny B, Center MS, Bergmann R, Couraud PO, Roux F. Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 1998 Aug;71(2):705-715.
- Reiniger L, Lukic A, Linehan J, Rudge P, Collinge J, Mead S, Brandner S. Tau, prions and A β : the triad of neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2011 Jan;121(1):5-20.
- Renzi PM, Flynn JT. Endotoxin enhances arachidonic acid metabolism by cultured rabbit microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1992 Oct;263(4 Pt 2):H1213-H1221.
- Risau W, Engelhardt B, Wekerle H. Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J Cell Biol* 1990 May;110(5):1757-1766.
- Rite I, Machado A, Cano J, Venero JL. Intracerebral VEGF injection highly upregulates AQP4 mRNA and protein in the perivascular space and glia limitans externa. *Neurochem Int* 2008 Mar-Apr;52(4-5):897-903.
- Robinson DH, Kang YH, Deschner SH, Nielsen TB. Morphologic plasticity and periodicity: porcine cerebral microvascular cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990 Feb;26(2):169-80.
- Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, Adamson P. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 2003 Jun 26;344(2):112-116.
- Rosell A, Foerch C, Murata Y, Lo EH. Mechanisms and markers for hemorrhagic transformation after stroke. *Acta Neurochir Suppl* 2008;105:173-178.
- Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic—ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986 Feb;19(2):105-111.
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1994 Apr;159(1):101-13.
- Roux F, Couraud P-O. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb;25(1):41-58.
- Rönnemaa E, Zethelius B, Lannfelt L, Kilander L. Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011;31(6):460-466.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 1991 Dec;115(6):1725-1735.
- Rupnick MA, Carey A, Williams SK. Phenotypic diversity in cultured cerebral microvascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1988 May;24(5):435-44.
- Sahagun G, Moore SA, Fabry Z, Schelper RL, Hart MN. Purification of murine endothelial cell cultures by flow cytometry using fluorescein-labeled griffonia simplicifolia agglutinin. *Am J Pathol*. 1989 Jun;134(6):1227-1232.
- Saito Y, Yamada N, Teramoto T, Itakura H, Hata Y, Nakaya N, Mabuchi H, Tushima M, Sasaki J, Ogawa N, Goto Y. A randomized, double-blind trial comparing the efficacy and safety of pitavastatin versus pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2002 Jun;162(2):373-9.
- Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 2008 Nov;32(2):200-219.
- Sangha N, Gonzales NR. Treatment targets in intracerebral hemorrhage. *Neurotherapeutics* 2011 Jul;8(3):374-387.
- Scherrmann JM. Expression and function of multidrug resistance transporters at the blood-brain barriers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005 Aug;1(2):233-246.
- Schilling L, Wahl M. Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol*. 1999;474:123-141.

- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJM, Borst P. Disruption of the mouse *mdrla* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994 May 20;77(4):491-502.
- Schwartz RB, Mulkern RV, Gudbjartsson H, Jolesz F. Diffusion-weighted MR imaging in hypertensive encephalopathy: clues to pathogenesis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998 May;19(5):859-862.
- Schiera G, Sala S, Gallo A, Raffa MP, Pitarresi GL, Savettieri G, Di Liegro I. *J Cell Mol Med* 2005 Apr-Jun;9(2):373-379.
- Sharief MK, Thompson EJ. In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992 May;38(1-2):27-33.
- Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J* 1993 Aug;7(11):1031-1038.
- Sheth RD, Riggs JE, Bodenstenier JB, Gutierrez AR, Ketonen LM, Ortiz OA. Parietal occipital edema in hypertensive encephalopathy: a pathogenic mechanism. *Eur Neurol*. 1996;36(1):25-8.
- Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J* 1993 Aug;7(11):1031-1038.
- Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2010 Jul;6(7):393-403.
- Singh AK, Jiang Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology*. 2004 Sep 1;201(1-3):197-207.
- Soma M, Tamaoki T, Kawano H, Ito S, Sakamoto M, Okada Y, Ozaki Y, Kanba S, Hamada Y, Ishihara T, Maeda S. Mice lacking serum amyloid P component do not necessarily develop severe autoimmune disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Aug 10;286(1):200-205.
- Smith QR. A review of blood-brain barrier transport techniques. In: Nag S, Ed. *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols*, Vol. 89, Methods Molecular Medicine, Totowa, NJ, Humana Press, 2003; pp. 193-208.
- Szakáll S, Boros I, Balkay L, Emri M, Fekete I, Kerényi L, Lehel S, Márián T, Molnár T, Varga J, Galuska L, Trón L, Bereczki D, Csiba L, Gulyás B. Cerebral effects of a single dose of intravenous vinpocetine in chronic stroke patients: a PET study. *J Neuroimaging* 1998 Oct;8(4):197-204.
- Szirmai I, Kamondi A, Magyar H, Juhász C. Untersuchungen von Patienten mit zerebraler Ischämie unter Pentosanpolysulfat (SP54). *Perfusion* 1993;6:314-320.
- Taktak YS, Stenning B. Solid phase enzyme immunoassays for the quantification of serum amyloid P (SAP) and complement component 3 (C3) proteins in acute-phase mouse sera. *Horm Metab Res* 1992 Aug;24(8):371-374.
- Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* 1987 Oct;7(10):3293-3299.
- Temesvári P, Ábrahám CS, Speer CP, Kovács J, Megyeri P. *Escherichia coli* 0111 B4 lipopolysaccharide given intracisternally induces blood-brain barrier opening during experimental neonatal meningitis in piglets. *Pediatr Res* 1993 Aug;34(2):182-186.
- Terasaki T, Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx* 2005 Jan;2(1):63-72.
- Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH 2nd. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004;127(2):481-96.
- Toborek M, Lee YW, Flora G, Pu H, András IE, Wylegala E, Hennig B, Nath A. Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb;25(1):181-199.
- Tomida S, Nowak TS Jr, Vass K, Lohr JM, Klatzo I. Experimental model for repetitive ischemic attacks in the gerbil: the cumulative effect of repeated ischemic insults. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987 Dec;7(6):773-782.
- Tontsch U, Bauer H-C. Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral endothelial cells. *Microvasc Res* 1989 Mar;37(2):148-161.
- Tósaki Á, Szerdahelyi P, Joó F. Treatment with ranitidine of ischemic brain edema. *Eur J Pharmacol* 1994 Nov 3;264(3):455-458.

- Unno A, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Kitoh K, Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int* 2008 Dec;57(4):515–518.
- Vastag M, Keserű GM. Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration: a practical view. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009 Jan;12(1):115-124
- Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res* 2005 Aug 16;1053(1-2):162-174.
- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehülsing GJ, Brunecker P, Müller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Röther J, Villringer A, Weih M; MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 2004 Mar;35(3):616-621.
- Viegas P, Chaverot N, Enslen H, Perrière N, Couraud PO, Cazaubon S. Junctional expression of the prion protein PrPC by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes. *J Cell Sci* 2006 Nov 15;119(Pt 22):4634-4643.
- Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vasc Pharmacol* 2002 Jun;38(6):323-337.
- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 2009 Jan;335(1):75-96.
- Wright JL, Merchant RE. Blood-brain barrier changes following intracerebral injection of human recombinant tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J Neurooncol* 1994;20(1):17-25.
- Xaio X, Banks WA, Niehoff ML, Morley JE. Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Brain Res* 2001 Mar 30;896(1-2):36–42.
- Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today*. 2003 Nov 1;8(21):997-1003.
- Yu S, Ding WG. The 45 kDa form of glucose transporter 1 (GLUT1) is localized in oligodendrocyte and astrocyte but not in microglia in the rat brain. *Brain Res* 1998 Jun 22;797(1):65-72.
- Zarándi M, Soós K, Fülöp L, Bozsó Z, Datki Z, Tóth GK, Penke B. Synthesis of Abeta[1–42] and its derivatives with improved efficiency. *J Pept Sci* 2007 Feb;13(2):94–99.
- Zilka N, Korenova M, Novak M. Misfolded tau protein and disease modifying pathways in transgenic rodent models of human tauopathies. *Acta Neuropathol* 2009 Jul;118(1):71-86.
- Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005 Apr;28(4):202-208.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008 Jan 24;57(2):178-201.
- Zsuga J, Gesztelyi R, Juhasz B, Kemeny-Beke A, Fekete I, Csiba L, Bereczki D. Prior transient ischemic attack is independently associated with lesser in-hospital case fatality in acute stroke. *Psychiatry Clin Neurosci* 2008 Dec;62(6):705-712.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném ezt az értekezést mentorom, Joó Ferenc professzor úr emlékének ajánlani. Hálával tartozom neki, hogy befogadott kutatócsoportjába, bevezetett a vér-agy gát kutatás témájába, és elindított szakmai pályámon.

Szeretném megköszönni mindazoknak a segítségét akik tudományos kutatómunkám során támogattak, és hozzájárultak ahhoz, hogy ez a pályázat elkészülhessen.

Köszönöm Dr. Ormos Pál akadémikusnak, az SZBK Biofizikai Intézet igazgatójának, valamint Dr. Párducz Árpád és Dr. Siklós László, tudományos tanácsadóknak, a Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium korábbi és jelenlegi vezetőinek támogatását.

Szeretném megköszönni munkatársaimnak és diákjaimnak, Dr. Veszélka Szilviának, Ngo Thi Khue Dungnak, Dr. Szabó Andrea Csillának, Dr. Pásztói Máriának, Dr. Horvát Sándornak, Dr. Kürti Leventének, Tóth Andreának, Csiszár Boglárkának, Dr. Nur Meltem Asiya Kablan-Kalnak, Kis Lórándnak, Walter Fruzsínának, Bocsik Alexandrának és Glässer Eriknek a lelkes és szorgalmas munkájukat a közös kísérletekben és közleményekben.

Köszönet illeti kollégáimat a Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumban és az SZBK Biofizikai Intézetben az együttműködésért és segítségükért. Kiemelném közülük Dr. Krizbai Istvánt, akivel annak idején együtt kezdtük vér-agy gát kutatásainkat. Az SZBK kutatói közül külön köszönöm Dr. Maderspach Katalin, Balogh Gábor, Dr. Puskás László és Dr. Ózsvári Béla segítségét.

Hálás vagyok hazai és külföldi együttműködő partnereimnek a közös kutatómunkáért. Külön szeretném megköszönni az SZTE Gyógyszertechnológiai Intézetben Prof. Révész Piroskának a támogatást és folyamatos bátorítást, Prof. Erős Istvánnak, Dr. Fehér Andrásnak és Dr. Sipos Péternek a segítséget. Megköszönöm a szakmai együttműködésünk során nyújtott támogatást Dr. Penke Botond akadémikusnak, Dr. Fülöp Líviának, Dr. Sipos Eszternek, Dr. Pákáski Magdolnának, Prof. Mándi Yvette-nek, Dr. Csete Máriának, néhai Dr. Megyeri Pálnak, Dr. Németh Lászlónak, Dr. Kovács Józsefnek, Dr. Ábrahám Csongornak, Dr. Lengyel Csabának és Dr. Rákhely Gábornak a szegedi egyetemi karokról; Dr. Falus András akadémikusnak, Prof. Buzás Editnek és Dr. Huszti Zsuzsának a budapesti Semmelweis Egyetemről; Dr. Kittel Ágnesnek és Dr. Szabó Gábornak az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetéből; Dr. Vastag Monikának, Dr. Urbányi Zoltánnak és Dr. Pázmány Tamásnak a Richter Gedeon NyRT részéről; és Dr. Vecsernyés Miklósnak a Debreceni Egyetemről.

Hálásan köszönöm Prof. Niwa Masami folyamatos támogatását és gondoskodását, valamint Prof. Katamine Shigeru, Dr. Nakagawa Shinsuke, Dr. Hayashi Kentaro, és Prof. Nishida Noriyuki segítségét a Nagaszaki Egyetemről. Köszönet illeti Dr. András Ibolyát és Prof. Michal Toboreket (Kentucky Egyetem, Lexington) valamint Dr. Kis Bélát (Harvard Egyetem, Boston) a hosszú távú sikeres tudományos együttműködésért, barátságukért. Megköszönöm Dr. Francoise Roux, Prof. Pierre-Olivier Couraud, Dr. Nicolas Perrière (Institut Cochin, Párizs), valamint Prof. Marie-Pierre Dehouck, Prof. Roméo Cecchelli és néhai Dr. Gérard Torpier (Institut Pasteur, Lille) segítségét és támogatását. Hálás vagyok Prof. Hartwig Wolburg (Tübingeni Egyetem), Dr. Petra Hülpér (Göttingeni Egyetem), Dr. Dunay Ildikó (Magdeburgi Egyetem), valamint Prof. Olivier Liesenfeld és Dr. Markus Heimesaat (Charité, Berlin) segítségével. Köszönöm Prof. Daniela Virgintino (Bari Egyetem), Prof. Italia di Liegro (Palermói Egyetem), Prof. Maria-Grazia De Simoni és Dr. Raffaella Gesuete (Mario Negri Intézet, Milánó), Dr. Stefania Ceruti (Milánói Egyetem), Dr. Maria Alexandra Brito és Filipa Cardoso (Lisszaboni Egyetem), valamint Prof. Michal Novak, Dr. Andrej Kovac, és Prof. Juraj Kopáček (Szlovák Tudományos Akadémia, Pozsony) tudományos együttműködését.

Végül szeretném megköszönni szüleimnek, fiamnak, férjemnek, testvéremnek és az egész családomnak a sok szeretetet, türelmet, támogatást és segítséget, a biztonságos hátteret és azt, hogy mindig mellettem álltak.