

Válasz

Prof. Dr. Antal Miklós, tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA Doktora bírálatára

Tisztelettel megköszönöm Antal Professzor Úr fáradozását, doktori értekezésem áttanulmányozását, gondos és részletes bírálatát, kérdéseit, megjegyzéseit és véleményalkotását, amellyel munkám nyilvános vitára bocsátását javasolta.

Az alábbiakban szeretnék válasszal szolgálni azokra a formai és tartalmi kérdésekre, amelyeket Tisztelt Bírálóm az értekezés bírálata során felvetett.

Teljes mértékben egyetértek azzal a megállapítással, hogy az értekezésemben összegzett tudományos eredmények többségét hazai és nemzetközi kutatócsoportok aktív tagjaként értem el; sok esetben a vizsgált probléma vagy modellfejlesztés összetettsége igényelte a széleskörű nemzetközi együttműködést.

Úgy vélem azonban, hogy kissé túlzottan szigorú Professzor Úr azon következtetésében, miszerint csak abban az 5 eredeti közleményben voltam a tudományos célkitűzések meghatározója, amelyekben utolsó szerzőként szerepelek. Megítélésem szerint további 5 olyan dolgozat található az értekezést megalapozó 27 eredeti közlemény között, amelynek első és egyben levelező szerzője voltam és a munka pályázati témavezetésemen alapult [Deli és mtsai 2000 Eur J Pharmacol 387:63-72; Deli és mtsai 2000 Neuroreport 11:3931-3936; Deli és mtsai 2000 Cell Mol Neurobiol 20:731-745; Deli és mtsai 2001 Eur J Pharmacol 411:R3-R5; Deli és mtsai 2010 J Alzheimers Dis 22:777-794]. Szeretném itt megemlíteni, hogy PhD értekezésem védésekor már hazai és nemzetközi kutatási pályázatok témavezetője voltam, és azóta is folyamatosan szakmailag önálló témacsoportot vezetek Szegeden és Nagaszakiban. Mentorom, néhai Joó Ferenc professzor 1996-ban sajnálatosan korán bekövetkezett halála után objektív szakmai és finanszírozási kényszerűség is volt számomra a széleskörű nemzetközi kollaboráció. Az eltelt évek során hosszabb-rövidebb külföldi tanulmányutakon vettem részt, valamint szegedi laboratóriumomban magyar, német, francia, japán, szlovák, olasz, portugál és mexikói kutatókat fogadtam, akik modern *in vitro* vér-agy gát módszereket tanultak itt és kísérleteket végeztek az együttműködések keretében. Mindezen kutatások eredményét büszkén vallom a magaménak is.

Hasonlóképpen sajátomnak érzem azt a 2 eredeti közleményt, amelyben a háromsejtes *in vitro* vér-agy gát modellt publikáltuk munkatársaimmal együtt [Nakagawa és mtsai 2007 Cell Mol Neurobiol 27:687-694; Nakagawa és mtsai 2009 Neurochem Int 54:253-263]. Ezeknek a dolgozatoknak – japán szokások szerint – második és egyben levelező szerzője voltam. A pericytákat is tartalmazó vér-agy gát modell a Nagaszaki Egyetemen 1998 és 2001 közötti ösztöndíjam alatt általam létrehozott, és azt követő rendszeres tanulmányutaim során szakmailag azóta is felügyelt *in vitro* vér-agy gát kutatásokkal foglalkozó laboratórium szellemi terméke és az *in vitro* modell az elmúlt évtizedek során összegyűjtött modellfejlesztési tapasztalataimat is magába foglalja. A létrehozott modellt több nemzetközi vér-agy gát kongresszuson mutattam be meghívott előadóként, egy szerzős előadásban. A háromsejtes vér-agy gát modell kizárólagos

ipari hasznosításáról szóló nemzetközi szabadalomban a modell egyik feltalálójaként szerepelek [Niwa, Nakagawa és Deli 2007 WO/2007/072953].

Megjegyezném továbbá, hogy a felsorolt eredeti közlemények mellett az értekezés alapját képező közlemények közül további 5 összefoglaló közleménynek és 8 könyvfejezetnek vagyok első, utolsó vagy egyetlen szerzője.

Hálásan köszönöm Opponensemnek az értekezés terjedelmére, szerkezetére, a fejezetek felépítésére vonatkozó megjegyzéseit. Egyetértek azzal, hogy a sokféle témát átölelő értekezés terjedelmi korlátai miatt szokatlan - talán nem mindig szerencsés - megoldásokra kényszerültem. Úgy vélem, hogy lehetőségeimet alapvetően meghatározta az a döntésem, hogy megpróbálom a vér-agy gáttal összefüggő *in vitro* és *in vivo* kutatásaim széles spektrumát belefoglalni doktori értekezésembé. Disszertációm vér-agy gát modell-fejlesztési munkákat, a vér-agy gát károsodását és védelmét bemutató kísérleteket, valamint a gyógyszermolekulák a vér-agy gáton és a nazális úton keresztül történő agyba juttatását vizsgáló eredményeket próbált meg egy kellőképpen részletes, mégis áttekinthető dolgozatba belesűriteni. Sajnálom, ha a rendhagyó megközelítés, amelynek során 17 célkitűzést és az ezekhez tartozó eredményeket azonos római számokkal jelöltem, esetleg megnehezítette értekezésem követését. A formabontó módszer kiválasztásakor szándékom ezzel ellentétes volt, segíteni szerettem volna az olvasót a szerteágazó kísérletek követésében.

Az összetett témaválasztás és a terjedelem ésszerű korlátai miatt kényszerültem az egyes alfejezetekben az eredmények ismertetésére és azok rövid diszkussziójára, majd a zárófejezetben a tudományos eredményeim összefoglalására és áttekintésére. Elismerem, hogy ennek a megközelítésnek számos hátránya van, amit a terjedelmes értekezés átdolgozásával és egy legalább 15-20 oldal hosszúságú általános diszkusszióval jelentősen javítani lehetne. Szeretném megköszönni Tisztelt Bírálómnak, hogy mindezen hiányosság ellenére az értekezést a jelenlegi formájában is elfogadásra javasolja.

Nagyon örülök, hogy Professzor Úr az értekezés nyelvezetét jónak, egyes szakkifejezések magyar változatát pedig nyelvújító megoldásoknak minősíti. Ez megerősít abban, hogy a továbbiakban is megpróbálkozom a magyar tudományos szövegekben előforduló, esetleg már megszokott, angol szakkifejezések helyett magyar kifejezések alkalmazásával.

Megköszönöm Tisztelt Bírálóm kritikai megjegyzéseit és kérdéseit az értekezésben 12 oldalt kitevő Bevezetés fejezetről, amelyben a vér-agy gát felépítését, a kutatások orvosi jelentőségét, és a modellezésre használt *in vivo* és *in vitro* módszereket próbáltam meg vázlatosan összefoglalni. Egyetértek azzal, hogy az ismertetés lehetett volna részletesebb, és alaposabb, de a dolgozat írása során az értekezés ésszerű arányait megtartva szerettem volna a szakterületre és ezen belül az általam vizsgált kérdéskörre felhívni a figyelmet. Az alábbiakban szeretném tételesen megválaszolni a bevezetés kapcsán feltett kérdéseket:

Hálásan köszönöm Professzor Úrnak, hogy rámutatott arra, hogy a pericyták és az endothelsejtek viszonylatát illetően félreérthetően fogalmaztam. Az értekezés 7. oldalán az alábbi megállapítást tettem:

“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. Mindkét sejtípus kölcsönhatásban áll az endothelsejtek bazális membránjába beágyazódott pericytákkal, valamint az erek körül elhelyezkedő mikrogliasejtekkel és a mikroereket beidegző neuronokkal.”

Valójában az agyi endothelsejtek, a pericyták és az astrocyták közös bazális membránon osztoznak. Ennek létrehozásához mindhárom sejtípus hozzájárul és az agyi mikroerek bazális membránja nemcsak az endothelsejteket öleli körbe, hanem a pericytákat is [Zlokovic 2008 Neuron 57:178-201; Bonkowski és mtsai 2011 Fluids Barriers CNS 8:8].

Egyetértek Tisztelt Bírálómmal abban, hogy a neurovaszkuláris egység fogalmát már első bevezetésekor, a fentebb már teljességében idézett 7. oldali bekezdés utáni mondatban meg kellett volna határozni és egyértelművé tenni, hogy azt a bekezdésben felsorolt endothelsejtek, astrocyták, pericyták, mikrogliasejtek és neuronok együttesen alkotják [Abbott és mtsai 2006 Nat Rev Neurosci 7:41-53; Zlokovic 2008 Neuron 57:178-201]. Sajnos ezt a számomra egyértelmű, de az olvasót nagyban segítő megállapítást nem tettem meg. Köszönöm, hogy erre felhívta a figyelmet. Kétségtelen, hogy az értekezésem 19. oldalán, a Kutatási célok fejezet első bekezdésében Neuwelt és munkatársai közelmúltban publikált dolgozatára [2011 Nat Rev Neurosci 12:169-182] hivatkozva ezt írtam:

“Jelentős nézetformáló felismerés volt az is, hogy a vér-agy gát része a neurovaszkuláris egységnek, a kiterjesztett neurovaszkuláris egység pedig magában foglalja a vér-agy gát endothelsejtjeivel kapcsolatba lépő keringő sejteket, a lymphocytákat, a monocytákat és a polymorphonuclearis leukocytákat is.”

A neurovaszkuláris egység kiterjesztett értelmezését Neuwelt és munkatársai a 2009. évi *Annual Blood-Brain Barrier Consortium Meeting* (Salishan Resort, Gleneden Beach, OR, USA) konszenzusa nyomán terjesztették elő és kezdték bevezetni a nemzetközi tudományos köztudatba; az erről szóló közlemény 2011. márciusában jelent meg. A kiterjesztett neurovaszkuláris egységet, mint a szűkebb szakterület új tudományos fogalmát, azért említettem meg az értekezésemben, hogy arra az új szemléletre hívjam fel a figyelmet, amely szerint a vér-agy gát szerepe az agyi betegségek kialakulása során csak az összes részvevő sejt elem kölcsönhatásának figyelembe vételével érthető meg. Ebbe a gondolatmenetbe jól illeszkedik a *Toxoplasma gondii* vér-agy gáton történő átjutását *in vitro* modellen leíró, az értekezés részét képező eredeti közleményünk, amelyben mononuclearis immunsejtek különböző altípusainak és agyi endothelsejteknek a kölcsönhatását vizsgáltuk [Lachenmeier és mtsai 2011 J Neuroimmunol 232:119-130]. Mindezek alapján a neurovaszkuláris egység [7. oldal] és a kiterjesztett neurovaszkuláris egység [19. oldal] ismertetését és használatát az értekezésben megalapozottnak érzem.

Sajnálom, hogy a “szétkapcsolódás” szó, amivel az angol “*uncoupling*” kifejezés jelentését próbáltam visszaadni nem írta le egyértelműen azt a folyamatot, amikor a neurovaszkuláris egység sejtjeinek összehangolt működése károsodik, illetve megszűnik. A neurovaszkuláris egység különféle sejtjei egymáshoz igen közel helyezkednek el, és egymás működését parakrin módon hatékonyan szabályozzák [Zlokovic 2008 Neuron 57:178-201]. Ez az összetett, funkcionális szabályozás, ami többek között a haemodinamikai neurovaszkuláris kapcsolódás, a mikroér-permeabilitás, a matrix kölcsönhatások, a neurotranszmitter inaktiválódás, valamint a neurotróp, az angiogén és neurogén folyamatok összekapcsolódását foglalja magában, fontos a

központi idegrendszer élettani működésében és megváltozik a betegségek kialakulása során. Ebben az értelemben beszél a szakterület irodalma az öregedő agy neurovaszkuláris egységében lezajló változásokról, amikor az idegműködés, az ehhez szükséges szöveti metabolikus igény és a megfelelő vérellátás összekapcsolódása megszűnik [Lo és mtsai 2003 Nat Rev Neurosci 4:399-415; Zlokovic 2008 Neuron 57:178-201]. A Professzor Úr kérdésében említett mondat második felében szerepel ennek a funkcionális szétkapcsolódásnak és következményeinek a leírása:

„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.”

A neurovaszkuláris egység sejtjeinek összekapcsolt működése és annak megszűnése során kulcsszerepe van az agyi endothelsejteknek és egyes vazoaktív mediátoroknak, így például a nitrogén monoxidnak is [D’Esposito és mtsai 2003 Nat Rev Neurosci 4:863-871; Andresen és mtsai 2006 J Appl Physiol 100:318-327; Badaut és mtsai 2012 J Neuroinflamm 9:132].

Nagyon köszönöm, hogy Tisztelt Bírálóm a Kutatási célok fejezet tagolódását és a megválasztott három modell-rendszert logikusnak minősítette. Elfogadom, hogy a vizsgált területeken belüli témák kiválasztása magyarázatra szorul, amire a továbbiakban kísérletet teszek.

Az értekezésben szereplő mikrobiális pathogének vizsgálata során az a cél vezetett, hogy olyan mediátoroknak a vér-agy gátra kifejtett hatását vizsgáljam, amelyeknek az agyi fertőzések és neuroimmunológiai folyamatok mellett a neurodegeneráció során is szerepe lehet. Azt hiszem, hogy ez a HIV-1 Tat burokfehérje esetében az idegrendszeri AIDS és a vírus okozta encephalitis és dementia kialakulásában játszott szerepe miatt nem igényel bővebb magyarázatot [King és mtsai 2006 Microbes Infect 8:1347-1357; Banks és mtsai 2006 Curr HIV Res 4:259-266]. A bakteriális lipopoliszacharidok (LPS) és más neurodegeneratív kóroki tényezők kölcsönhatását a vér-agy gát szintjén William Banks és munkacsoportja nyomán [Banks és mtsai 1999 Exp Neurol 156:165-171; Dohgu és Banks 2008 Exp Neurol 210:740-749; Jaeger és mtsai 2009 Brain Behav Immun 23:507-517; Erickson és mtsai 2012 J Neuroinflamm 9:150] számosan vizsgálták. Mi az LPS vér-agy gát hatásait az amiloid plakkok egyik elemével, a szérum amiloid P-komponenssel (SAP) együtt kezdtük vizsgálni első PhD hallgatómmal [Veszélka és mtsai 2003 Neurosci Lett 352:57-60; Veszélka és mtsai 2007 Neurochem Int 50:219-228]. Vizsgálataink egy részét SAP transzgén egereken, egy szélesebb magyar kollaboráció keretében gyógyszeripari partnerrel végeztük, ami végül nem volt publikálható szabadalmi okok miatt. Az LPS-hatást közvetítő egyik legfontosabb citokin, a tumor nekrosis factor- α (TNF- α) vér-agy gát hatásait *in vitro* modellen először munkacsoportunk írta le [Deli és mtsai 1995 J Neurosci Res 41:717-726], ezért ehhez a hozzám közel álló terület vizsgálatához a későbbiekben is hű maradtam. Ennek keretében publikáltuk az értekezés alapját képező egyik közleményt [Ábrahám és mtsai 1996 Neurosci Lett 208:85-88] valamint együttműködő partnerekkel egy, az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közleményt [Farkas és mtsai 1998 Neurosci Lett 242:147-150]. Ugyan a *Toxoplasma gondii* vér-agy gáton történő átjutásával foglalkozó *in vitro* vizsgálatok első látásra kilógnak a sorból - és valóban egy, a laboratóriumomban *in vitro* vér-agy gát modellt tanuló német kolléganő kutatási területéhez kapcsolódnak és az ő munkacsoportjuk kezdeményezésére indultak -, mostanra kísérletes bizonyítékok igazolják, hogy ehhez a protozoa fertőzéshez a neurodegenerációval szembeni védelem társul [Rozenberg és mtsai 2005 Am J Pathol 167:1021-1031; Jung és mtsai 2012 PLoS ONE 7:e33312].

Egyetértek Tisztelt Bírálómmal abban, hogy az agyi ischaemia témakörébe heterogén vizsgálatok kerültek, bár mindezen tényezőknek a témával összefüggésben történő kutatását megalapozottnak tartom. Úgy gondolom, hogy nem lehetett vitatott annak a kísérleti modellnek a szerepeltetése, amelyben a szabad oxigéngyököknek a felszabadulását parakvát és menadion kezeléssel váltottuk ki és azok károsító hatását kontroll és szuperoxid-dizmutáz enzim túltermelő transzgen egerek agyi endothelsejt egysejtrétegein vizsgáltuk [Imaizumi és mtsai 1996 Neurochem Int 29:205-211]. Ez a kísérleti elrendezés valós kóroki helyzetet modellez, hiszen a szabad oxigéngyökök az agyi ischaemia és reperfusio során nagy mennyiségben felszabaduló toxikus mediátorok. A pitavasztatint illetően elfogadom Professzor Úr véleményét, hogy ez a koleszterin-csökkentő szerrel végzett vizsgálatunk csak áttételesen köthető az agyi ischaemia témaköréhez [Morofuji és mtsai 2010 Cell Mol Neurobiol 30:727-735]. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy a sztatinok közvetlen védő hatást fejtenek ki a glutamát-okozta vér-agy gát károsodással szemben [Kuhlmann és mtsai 2008 Life Sci 82:1281-1287], továbbá kísérletes agyi ischaemiában [Kumagai és mtsai 2004 J Neural Transmiss 111:1103-1120; Zhang és mtsai 2007 Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:2470-2475], valamint neurodegeneratív betegségekben és más idegrendszeri kórképekben is [van der Most és mtsai 2009 Prog Neurobiol 88:64-75; Wang és mtsai 2011 Exp Neurol 230:27-34]. A hiperkoleszterinémia és dyslipidaemia a cerebrovascularis történések mellett az Alzheimer-kórnak is súlyos kockázati tényezője, ezért a világszerte több százmillió beteg által szedett koleszterin-csökkentő gyógyszerek közvetlen vér-agy gát hatásának feltárása hozzájárulhat a sztatinok terápiás és preventive hatásának megértéséhez [Nagaraja és mtsai 2006 Neurol Res 28:826-830; Pallegage-Gamarallage és mtsai 2012 Lipids Health Dis 11:117].

Tiszteletben tartom Opponensem azon véleményét, miszerint a disszertáció címe által meghatározott témához nem kapcsolódik szervesen a nazális úton való gyógyszerbevitel hatásosságának vizsgálata, mert ez éppen egy a vér-agy gátat elkerülő, alternatív útvonalat kínál föl a gyógyszerjelölt molekulák agyba történő bejuttatására. Gyakorlati gyógyszerkutatóként azért bátorodom mégis ezen kutatásainkat is az értekezés részének tekinteni, mert sikeres agyi gyógyszer célbajuttatás három fő stratégiával kivitelezhető, nevezetesen a gyógyszermolekula módosításával, a vér-agy gát működésének átmeneti megváltoztatásával, vagy a vér-agy gátat megkerülő beviteli út révén [Deli 2011 Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates, szerk: Vastag & Tihanyi, pp. 144-165]. Büszke vagyok arra, hogy tudományos pályafutásom során együttműködő partnereim segítségével mindhárom módszerrel sikerült már fokozni gyógyszerjelölt molekulák agyba történő kísérletes bejutását.

Megköszönöm, hogy Tisztelt Bírálóm rámutatott arra, hogy a “Kísérleti modellek és legfontosabb vizsgálati módszerek” fejezetcím arra utal, hogy más, az értekezés szempontjából kevésbé lényeges, vagy a terjedelemtől képest túlságosan összetett módszerek nem kerültek részletes ismertetésre. Ezek például - a teljesség igénye nélkül – az alábbiak voltak az eredeti közlemények megjelenési sorrendjében:

- Lektin-festés [Szabó és mtsai 1997 Neurobiology 5:1-16]
- Proszttaglandinok koncentrációjának mérése; izolált ereken vazoaktivitás mérése [Kis és mtsai 1999 Eur J Pharmacol 368:35-42]

- Az agyi endothelsejtek DiI-AcLDL (Di1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetrametil-indokarboxiamin perklorát-jelölt acetilált alacsony denzitású lipoprotein) felvételének vizsgálata [Deli és mtsai 2000 Cell Mol Neurobiol 20:731-745]
- Reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció; izotóppal jelzett liganddal végzett P-glikoprotein assay [Perrière és mtsai 2007 Brain Res 1150:1-13]
- Adenilát kináz, citokin és kemokin assay, csonkolt tau fehérje tisztítása [Kovac és mtsai 2009 J Alzheimers Dis 18:897-906]
- Lymphocyták izolálása; *Toxoplasma* tenyésztése [Lachenmaier és mtsai 2011 J Neuroimmunol 232:119-130]
- A vér-agy gát praekondicionálás részletes kísérleti módszere, és az ehhez kapcsolódó *in vivo* kísérletek metodikája [Gesuete és mtsai 2011 Stroke 42:1445-1453]

Őszintén sajnálom, hogy az általam kényszerűségből választott megoldás, az értekezés szerteágazó eredményeinek 3 fejezetben, 69 oldalon történő ismertetése és azoknak az alfejezetekben történő rövid diszkussziója nem nyerte el Tisztelt Bírálóm tetszését és az értekezés ezen fontos részét nehezen olvashatónak, és emiatt az eredmények érvényességének megítélését pedig nehezen kivitelezhetőnek tartja. Ezekbe a fejezetekbe, összesen kevesebb mint 8 oldal terjedelemben, öt olyan - az értekezés témáihoz szervesen kapcsolódó - eredményt is belefoglaltam, amelyek az értekezés benyújtásakor még nem voltak tudományos folyóiratban eredeti közlemény formájában publikálva. A felsorolt eredmények kapcsán négy közlés alatt álló kéziratot soroltam fel az értekezés alapját képező közlemények fejezetében. Ezek közül azóta egy dolgozat már közlésre került [Cardoso FL, Kittel Á, Veszelka S, Palmela I, Tóth A, Brites D, Deli MA, Brito MA 2012 Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells. PLoS ONE 7: (5) e35919], míg további két munka revízió után lett újra benyújtva nemzetközi szaklapokba és mindkettő esetében a dolgozatok mihamarabbi elfogadását és közlését remélem [Veszelka S, Datki Z, Tóth A, Walter F, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Penke B, Deli MA 2012 Docosahexaenoic acid reduces amyloid β -induced toxicity in cells of the neurovascular unit. J Alzheimers Dis; revízió után közlésre benyújtva; Hülper P, Veszelka S, Walter F, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA 2012 Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. Br J Pharmacol; revízió után közlésre benyújtva]. Azonban tudomásul veszem, ha Opponensem ezeknek a kéziratban szereplő eredményeknek a disszertációban történő ismertetésétől eltekintett volna, továbbá ha a kísérletes adatok kivonatos bemutatási formája miatt nem tartja lehetségesnek az eredmények érvényességének ellenőrzését és ezért ezeket a megfigyeléseket nem fogadja el az értekezés szerves részének.

Az *in vitro* vér-agy gát modellek összehasonlítása kapcsán Tisztelt Bírálóm idézte egy eredményünket, amelyben az adott kísérleti viszonyok között, a háromsejtes modell adatainak összehasonlítása kapcsán azt írom, hogy “az agyi endothelsejtek (ha azokat önmagukban tenyésztik) különleges tulajdonságaikat tenyészetben elvesztik”. Ezt Professzor Úr úgy értelmezte, hogy az egyrétegű endothelsejt tenyészetek nem tekinthetők megbízható vér-agy gát modellnek és mindezek alapján az összes, kizárólag endothelsejt kultúrán végzett adatot ki kellett volna hagyni az értekezésből. Minden tiszteletem kinyilvánítása mellett ezzel az értelmezéssel nem tudok egyetérteni. Legjobb szakmai meggyőződésem, hogy a helyzet ennél sokkal összetettebb és a primer endothelsejt egyrétegekkel végzett kísérleteknek igenis

változatlanul fontos szerepe van az *in vitro* vér-agy gát kutatásokban, mégha azok felhasználási lehetősége az elmúlt években jelentősen ártértékelődött, leszűkült is. Úgy gondolom, hogy a fent idézett sommás megállapításnál sokkal árnyaltabban fogalmaztam az értekezés Bevezetésének 17. oldalán:

„Hosszú ideig tartó tenyésztés alkalmával, főképpen többszöri passzálás esetén azonban a vér-agy gát tulajdonságok elvesztését, dedifferenciálódását figyelték meg primer tenyészetek esetében is.”

Hasonló megállapítást tettem az Összefoglalás 107. oldalán is:

„Már a kezdetektől megfigyeltük, hogy a hosszú ideig tartó tenyésztés, de különösen szubkultúrák készítése passzálással az agyi endothelsejtek vér-agy gát tulajdonságainak jelentős romlásához vezet. Ennek legfőbb oka, hogy a vér-agy gátra jellemző sajátságok szerv-specifikusak, megszakad az önmagukban tenyésztett endothelsejtek kommunikációja az őket körülvevő többi sejtípussal, hiányoznak az endothelsejtek számára nélkülözhetetlen trofikus és stabilizáló faktorok.”

Ugyanebben a szakaszban a gliasejtek hatását, a hidrokortizon hormon és a cAMP kezelést, majd pedig a pericytákkal történő együttes tenyésztést javasoltam, mint a vér-agy gát sajátosságokat tartósabban fenntartó *in vitro* módszereket.

A vér-agy gát *in vitro* több sejtípusból rekonstruált, szofisztikált modelljei nagyban hasonlítanak az *in vivo* viszonyokhoz, ezért ezek a költség- és munkaigényes modellek igen jól felhasználhatóak az alaptudományokban és az alkalmazott gyógyszerkutatások során is. Azonban a kutatók a vér-agy gát számos funkcióját (így az elektromos rezisztenciát, permeabilitást, efflux és influx transzporterek működését, metabolikus enzimek kifejeződését és szerepét, a vér-agy gátat alkotó sejtek által termelt és kibocsátott anyagokat, exogén anyagok toxicitását, stb.) és morfológiai jellemzőjét (az endothelsejt közötti szoros kapcsolatok, vezikulák, mitochondriumok, stb.) vizsgálhatják, és ezekhez kell megfelelő, költség-hatékony eszközt találni. Így változatlanul van és lesz létjogosultsága az elmúlt évtizedekben használt összes *ex vivo* és *in vitro* vér-agy gát modellnek: a frissen izolált agyi mikroereknek, a különféle egysejtrétegű modelleknek amelyeket primer agyi endothelsejtek vagy immortalizált agyi endothelsejtvonalak alkotnak (például transzporterek működését vizsgáló *uptake* kísérletekben), a különféle ko-kultúra modelleknek, így az általunk kifejlesztett háromsejtes *in vitro* vér-agy gát modellnek is. Nagyon fontos azonban, hogy a felhasznált modellek megválasztása kellő körültekintéssel történjen és szükség esetén az eredmények érvényességét más *in vitro* vagy akár *in vivo* modellen ellenőrizni lehessen.

A különböző vér-agy gát modelleken végzett kísérletek összevethetőségét kulcsfontosságúnak tartom. A szakirodalomban közölt *in vitro* vér-agy gát permeabilitási kísérletek első szisztematikus összefoglalását 2005. februárjában a *Cellular and Molecular Neurobiology* Joó Ferenc Professzor emlékének szentelt vér-agy gátas különszámában közöltem munkatársaimmal [Deli és mtsai 2005 Cell Mol Neurobiol 25:59-127], ami azóta széles körben idézett referencia lett. Összegyűjtöttük a különféle fajból származó, egyedül vagy más sejtekkel együtt tenyésztett agyi endothelsejt tenyészetek, továbbá agyi endothelsejtvonalak vagy modellezésre használt epithelsejtek felhasználásával nyert transzendothelialis elektromos rezisztencia adatokat és a különféle vér-agy gát permeabilitási markerek átjutására utaló permeabilitási együttható (P_e) értékeket. Összefoglaló tanulmányunk, más szerzők dolgozataival [Gaillard és mtsai 2000 Eur J Pharm Sci 12: 95-102; Reichel és mtsai 2003 The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols, szerk: Nag S, pp.324-337; Garberg és mtsai 2005 Toxicol In Vitro 19:299-334;

Cecchelli és mtsai 2007 Nat Rev Drug Deliv 6:650-661] hozzájárult ahhoz a vér-agy gát kutatók között létrejött szakmai konszenzushoz, amelyben a rekonstruált in vitro vér-agy gát modellek permeabilitási kísérletekhez szükséges minimum-feltételei (150-200 Ohm $\times$ cm² fölötti rezisztencia, alacsony P_e paracelluláris transzport markerekre) kialakultak. Természetesen sokkal bonyolultabb és drágább modellre van szükség egy a neurovaszkuláris egység sejtközi interakcióit kutató vizsgálat során, mint gyógyszerjelölt molekulák agyi permeabilitási előszűrésére, ahol egyszerűbb és olcsóbb, akár sejtvonalakra épülő modellek is megfelelnek. Gyógyszeripari együttműködő partnereinkkel együtt éppen most közöltünk egy olyan tanulmányt, amelyben a háromsejtes vér-agy gát modellt az ipari előtesztelésekben széles körben használt epitheliális sejtvonalakhoz hasonlítjuk, megállapítva felhasználhatóságukat permeabilitási és P-glikoprotein efflux pumpa vizsgálatokban (Hellinger és mtsai 2012 Eur J Pharm Biopharm 82:340-351). Ezen felül 2012. szeptemberében, a potsdami *Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers* évente megrendezett kongresszusán mutattuk be azt az összehasonlítást, amelyben a vér-agy gátra jellemző mintegy 90 gén, köztük sejtközi kapcsolat fehérjék, influx és efflux transzporterek, metabolikus enzimek kifejeződését vizsgáltuk meg különféle, egy-, két, és háromsejtes *in vitro* vér-agy gát, valamint epithelsejt modelleken. Ezeknek az eredményeknek a felhasználásával tehát minden egyes kísérlethez megválasztható olyan vér-agy gát modell, amely az adott tudományos kérdés megválaszolását lehetővé teszi, hiszen a szükséges génkifejezési és funkcionális paraméterek rendelkezésre állnak. Szó nincs tehát arról, hogy az agyi endothel egysejtrétegeken végzett vizsgálatok pusztán tudomány-történeti érdekességek lennének.

Tisztelt Bírálóm összegzésére azt a választ tudom adni, hogy a tematikus redukciót csak az értekezés benyújtásakor még közlésre nem került eredmények kihagyásával tudnám elképzelni, míg az egysejtrétegű endothelsejt kultúrákon végzett vizsgálatokat és a nazális úton történő gyógyszerbevitel vizsgálatokat feltétlenül megtartanám. Az értekezés felvetett átdolgozása során az így felszabaduló terjedelemben lehetséges volna a disszertáció általános diszkusszióval történő kiegészítése. Hálásan köszönöm Opponensemnek, hogy értekezésemet jelen formájában összességében mégis elfogadhatónak minősíti.

Végezetül még egyszer hálásan köszönöm Antal Professzor Úr bírálatát, megjegyzéseit, kérdéseit, és azt, hogy az értekezés elfogadását javasolja. Tisztelettel kérem, hogy opponensi véleményére és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Szeged, 2012. október 19.



Dr. Deli Mária Anna