

Dr. Wilhelm Imola MTA doktora pályázata

Válasz Prof. Dr. Illés Zsolt bírálatára

Tisztelt Professzor Úr!

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Professzor úrnak doktori dolgozatom gondos bírálatát, támogató szavait és különösképpen gondolatébresztő kérdéseit.

A formai szerkesztéssel kapcsolatban felmerült kritikai megjegyzéseire reagálva egyetértek, hogy az összefoglaló ábránál jeleznem kellett volna, hogy azok saját készítésűek. Szintén igazat adok a Professzor úrnak abban, hogy szerencsésebb lett volna a *sclerosis multiplex* rövidítését a magyar használatnak megfelelően SM-ként használni az angol MS helyett. Köszönöm az észrevételeket.

Kérdéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1, A szerző egy idézettel kezd. A tézis vonatkozásában hogyan értelmezné ezt a szép Weöres Sándor idézetet?

Bár nem szeretnék kitérni a válasz elől, mindenképp azzal kell kezdenem, hogy annál precízebben, mint ahogy a költő megfogalmazta, nem tudom leírni, hogy mit jelent az, hogy „A gondolat összetett és kimondható, az igazság egyszerű és kimondhatatlan.” Ha elkezdem boncolgatni, értelmezni vagy kifejtetni ezt a mondatot, nemcsak varázsát veszti, de jelentése is csorbul.

Azért megkísérlem kimondani a kimondhatatlant arra fókuszálva, hogy mit jelent számomra ez az idézet a doktori dolgozatom vonatkozásában. Először is a mondat szerkezete ragadott meg, tömör és lényegre törő, mint ahogyan én magam is szeretek fogalmazni, bár természetesen messze nem olyan tökéletesen és költőien, mint Weöres Sándor.

Tudományos szempontból pedig bennem is, mint sokakban, erősen él az az érzés, hogy minél többet tanulok, annál kevesebbet tudok. Hiába lesz egyre összetettebb a tudásom a neurovaszkuláris egységről, a mindent átfogó, teljes igazsághoz nem jutok sokkal közelebb. Ami persze nem jelenti azt, hogy ne tartanám alapvető fontosságúnak, hogy minél többet olvassunk és tanuljunk még akkor is, ha a rendszer sokkal inkább azt díjazza, ha minél többet írunk.

2, Tekintettel arra, hogy a tézis kiemelten foglalkozik a gyulladásal, hiányoltam az asztrociták gyulladásos szerepének ismertetését az Irodalmi áttekintésben. Mivel az oligodendrociták és OPC-k is említésre kerülnek, érdemes lett volna egy mondatban ezeknek a gyulladásban betöltött, újonnan – illetve újra – felismert jelentőségét is megemlíteni (inflammatory oligodendrocytes).

Az asztrociták gyulladásban betöltött szerepéről valóban méltánytalanul kevés szó esett a dolgozatban, noha alapvető jelentőséggel bír számos akut és krónikus patológiás folyamatban. Az asztrociták gyulladás során reaktív fenotípust vesznek fel, amely morfológiai és funkcionális változásokat okoz, és amely jellemzően hipertrófiával, citoszeletális átrendeződéssel és a GFAP expressziójának növekedésével, valamint a sejtek proliferációjával jár. A reaktív asztrociták sokfélék lehetnek, amely a korábbi felfogás szerint A1-neurotoxikus, illetve A2-neuroprotektív formában nyilvánulhat meg. A transzkriptomikai adatok alapján azonban egyértelművé vált a reaktív asztrociták nagyfokú variabilitása, amely a kiváltó folyamattól, annak stádiumától, illetve az agyi régiótól is függ, így az A1 és A2 fenotípus inkább egy kontinuum két végleteként értelmezhető.

Neuroinflammáció során az asztrociták számos gyulladásos jelet érzékelnek, amelyek hatására egy összetett jelátviteli hálózat kapcsol be a sejtekben. Ez elsősorban az NF- κ B, illetve a STAT3 transzkripció faktorok aktiválásához vezet. Előbbi gyulladásos citokinek termelését indukálja, mint amilyen a TNF- α , az IL-6 vagy az IL-1 β , amelyek közül az IL-1 β elsősorban inflammaszóma-függő módon termelődik. Ezek közül az asztrocitákban az NLRP2, az NLRP3, az NLRC4 és az AIM2 inflammaszómák aktivációját írták le. Az A1 asztrociták a komplement-kaszád fehérjéit is képesek szekretálni, amelyek hozzájárulhatnak a neurodegenerációhoz. Ennek megfelelően krónikus neurodegeneratív megbetegedésekben, mint az Alzheimer-kór, a *sclerosis multiplex*, a Parkinson-kór vagy a Huntington-kór, ez a jellemző asztrocita fenotípus.

Ezzel szemben a JAK-STAT3 útvonal inkább az A2-es (iszkémiás, hegeképződést indukáló) fenotípusú asztrocitákra jellemző. Azonban az iszkémiás *stroke* során is aktiválódnak gyulladásos mechanizmusok, amelyek a vér–agy gát megnyílásához, az ödéma fokozódásához vagy a szinaptikus regeneráció gátlásához vezetnek többek között az S1PR1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*) és az NF- κ B aktiválódásán keresztül.

Mindezek alapján megállapítható, hogy az asztrociták gyulladásos reakciói igen komplexek, és jelentősen befolyásolják az alapfolyamat kimenetelét.

Források:

Colombo E, Farina C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. Trends Immunol. 2016 Sep;37(9):608-620. doi: 10.1016/j.it.2016.06.006.

Escartin C, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci. 2021 Mar;24(3):312-325. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.

Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, Nonnemacher MR. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: A systematic review. Acta Neuropathol Commun. 2023 Mar 13;11(1):42. doi: 10.1186/s40478-023-01526-9.

Liu J, Guo Y, Zhang Y, Zhao X, Fu R, Hua S, Xu S. Astrocytes in ischemic stroke: Crosstalk in central nervous system and therapeutic potential. *Neuropathology*. 2024 Feb;44(1):3-20. doi: 10.1111/neup.12928.

López-Teros M, Alarcón-Aguilar A, Castillo-Aragón A, Königsberg M, Luna-López A. Cytokine profiling in senescent and reactive astrocytes: A systematic review. *Neurobiol Aging*. 2024 Jun;138:28-35. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2024.02.012.

Patani R, Hardingham GE, Liddelow SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*. 2023 Jul;19(7):395-409. doi: 10.1038/s41582-023-00822-1.

Ami az oligodendrociták és prekursoraik (OPC-k) gyulladásos szerepét illeti, ezeket a sejteket hosszú ideig csupán az immunreakciók passzív elszennvedőinek tekintették demielinizációs kórképek, például *sclerosis multiplex* során. Jelen tudásunk alapján azonban az OPC-k aktív immunmodulátorok, amelyek T-sejtek, illetve a részben általuk kibocsátott IFN- γ hatására megváltoztatják fenotípusukat, és – az MHC-I és MHC-II gének expressziójának fokozása révén – antigénprezentáló sejtekké válnak. Ehhez hozzájárul az LRP1 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) expressziójának fokozódása is, amely erősíti az OPC-k fagocitotikus aktivitását is. Mindez gyulladásos citokinek (például CCL2 és IL-1 β) termelésének emelkedésével jár együtt. Ilyen körülmények között az OPC-k nemcsak fokozzák az autoimmun folyamatot, hanem egy részük el is pusztul, illetve nem differenciálódik mielintermelő oligodendrocitává. Bár az NLRP3 inflammaszóma aktivációjának fontos szerepe van a folyamatban, ez – jelen tudásunk szerint – nem az OPC-kben, hanem elsősorban bevándorló immunsejtekben és mikroglia-sejtekben történik.

Az OPC-k fiziológias körülmények között is rendelkeznek immunológiai funkcióval, hiszen HGF-et (*hepatocyte growth factor*) és TGF- β 2-t szekretálnak, amellyel a mikroglia-sejtek nyugvó állapotát tartják fenn, így védve az idegsejteket a degenerációtól. Gyulladásos körülmények között, a TNFR2 vagy a TLR3 aktiválása után, viszont aktiválják a mikroglia-sejteket, ugyanakkor perifériás immunsejtek beáramlását is elősegíthetik az agyba. Így az OPC-knek meghatározó jelentősége lehet az immunválasz koordinálásában agyi gyulladásos folyamatokban.

Végül, bár a kérdésben nem szerepelt, de – mivel nagyon izgalmasnak találom, és szorosan kapcsolódik dolgozatom témájához – szeretném kiemelni, hogy az oligodendroglia-knak egyre inkább körvonalazódik a szürkeállományi erek szabályozásában betöltött szerepe is (Palhol és mtsai.).

Források:

Boccazzi M, Raffaele S, Fumagalli M. Not only myelination: the immune-inflammatory functions of oligodendrocytes. *Neural Regen Res*. 2022 Dec;17(12):2661-2663. doi: 10.4103/1673-5374.342678.

Fernández-Castañeda A, et al. The active contribution of OPCs to neuroinflammation is mediated by LRP1. *Acta Neuropathol*. 2020 Feb;139(2):365-382. doi: 10.1007/s00401-019-02073-1.

Haroon A, et al. Unlocking the Potential: immune functions of oligodendrocyte precursor cells. *Front Immunol*. 2024 Jul 9;15:1425706. doi: 10.3389/fimmu.2024.1425706.

Kirby L, et al. Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nat Commun*. 2019 Aug 29;10(1):3887. doi: 10.1038/s41467-019-11638-3.

Kirby L, Castelo-Branco G. Crossing boundaries: Interplay between the immune system and oligodendrocyte lineage cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2021 Aug;116:45-52. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.10.013.

Martin BN, et al. T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Immunol.* 2016 May;17(5):583-92. doi: 10.1038/ni.3389.

Olcum M, Tastan B, Kiser C, Genc S, Genc K. Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020;119:247-308. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.08.007.

Palhol JSC, et al. Direct association with the vascular basement membrane is a frequent feature of myelinating oligodendrocytes in the neocortex. *Fluids Barriers CNS.* 2023 Apr 3;20(1):24. doi: 10.1186/s12987-023-00425-4.

3, Van-e arra adat, hogy ugyanazon tumor áttétje más mintázatot mutat az áttétes szervtől függően? Azaz egy melanoma vagy emlőkarcinóma áttét miRNS mintázata más pl. a tüdőben mint az agyban? Ennek biomarker jelentősége is lehetne.

Számos tanulmány próbált választ találni arra a kérdésre, hogy melyek azok a tulajdonságok, molekuláris mintázatok, amelyek meghatározzák a tumorsejtek agyi metasztatikus képességét, és elkülönítik őket egyrészt a primér daganat sejtjeitől, másrészt azoktól a tumorsejtektől, amelyek más szervek iránt mutatnak affinitást. Ezeknek a különbségeknek diagnosztikus, de akár terápiás jelentősége is lehetne.

Ebben a tekintetben a különböző vizsgálatok számos sejtfelszíni és szekretált molekulát, valamint miRNS-t azonosítottak, azonban a különböző tanulmányok eredményei kevés átfedést mutatnak egymással, és klinikai relevanciájuk még nem nyert bizonyítást. Agyi metasztatikus sejtekre specifikusnak írták le például a ST6GALNAC5 (N-acetilgalaktozaminid α -2,6-szialiltranszferáz 5) vagy az S katepszin magas expresszióját emlőkarcinóma-sejtekben, illetve a PLEKHA5 (*pleckstrin homology domain containing A5*) jelenlétét melanómában. Az eredmények azonban nem kellően meggyőzőek. Emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztatizisokat vizsgálva például a ST6GALNAC5 az esetek csupán 23%-ában volt jelen (Bos és mtsai).

Források:

Bos PD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009 Jun 18;459(7249):1005-9. doi: 10.1038/nature08021.

Jilaveanu LB, et al. PLEKHA5 as a biomarker and potential mediator of melanoma brain metastasis. *Clin Cancer Res.* 2015 May 1;21(9):2138-47. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0861.

Sevenich L, et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat Cell Biol.* 2014 Sep;16(9):876-88. doi: 10.1038/ncb3011.

A miRNS-ek között is – amelyek akár a vérből is kimutathatók – számos olyan van, amelyet agyi metasztatizis kialakulásával hoztak összefüggésbe. A lista folyamatosan nő, azonban egyelőre még nem körvonalazódott egy olyan miRNS-profil, amely a klinikumban alkalmazható lenne diagnosztikus vagy prognosztikus markerként. Ennek több oka van, amelyek egyrészt technikai jellegűek, és az

alkalmazott modellek, módszerek és paradigmák különbözőségéből fakadnak. Másrészt a tumorsejtek heterogenitása és plaszticitása, valamint a metasztatikus folyamat komplexitása okozza azt, hogy az adatok nehezen összehasonlíthatók, hiszen a tumorsejtek folyamatosan alkalmazkodnak a változó környezeti körülményekhez.

Ennek megfelelően, noha számos összefoglaló tanulmány született az utóbbi időben az agyi metasztázisokban szerepet játszó miRNS-ekről (csak 2024-ben legalább négy), ezek csupán egymással többé-kevésbé átfedő listákat tartalmaznak anélkül, hogy egy egyértelmű irányt mutattának a klinikai fejlesztések számára.

Saját kísérleteinkben is teljesen eltérő miRNS változásokat tudtunk kimutatni az egerek véréből a különböző időpontokban az agyi áttétek kialakulása és növekedése során. Ezért részletes kutatásainkat elsősorban az agyi áttétképzés egy szűk időintervallumára fókuszáltuk, amikor még klinikai körülmények között más módszerrel nem lennének detektálhatók a tumorsejtek az agyban. Vizsgálatainkat azonban mi sem vittük el transzlációs irányba, aminek egyik oka az volt, hogy főleg olyan miRNS-eket azonosítottunk, amelyeknek szintje nem nőtt, hanem csökkent agyi áttétes tumorsejtekkel oltott egerek vérében.

Összességében tehát elmondható, hogy bár egyre több információ áll rendelkezésünkre a tumorsejtek szervspecifikus metasztatikus mintázatairól, az azonosított különbségek inkább statisztikai jellegűek, és az összegyűlt adatok egyelőre nem alkalmasak egy megfelelő érzékenységű és specificitású diagnosztikus teszt kifejlesztésére.

Források:

Beylerli O, et al. MiRNAs as new potential biomarkers and therapeutic targets in brain metastasis. *Noncoding RNA Res.* 2024 Feb 23;9(3):678-686. doi: 10.1016/j.ncrna.2024.02.014.

Guan C, Zhang X, Yu L. A review of recent advances in the molecular mechanisms underlying brain metastasis in lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2024 May 2;23(5):627-637. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-23-0416.

Hudson K, et al. The role of microRNAs in brain metastasis. *J Neurooncol.* 2024 Jan;166(2):231-241. doi: 10.1007/s11060-023-04541-x.

Khan MS, Wong GL, Zhuang C, Najjar MK, Lo HW. Crosstalk between breast cancer-derived microRNAs and brain microenvironmental cells in breast cancer brain metastasis. *Front Oncol.* 2024 Aug 8;14:1436942. doi: 10.3389/fonc.2024.1436942.

4, Említi, hogy az agyi metasztázisok kezelésében a következő években az immunterápiák jelentősége nőni fog. Pontosan milyen immunterápiákra gondol?

Irodalmi adatok alapján számos II. és III. fázisban levő klinikai tanulmány fejeződött be PD-1 (*programmed death 1*), annak ligandja, a PD-L1, valamint CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) gátlószerekkel. Ezek az ún. immunellenőrző-gátlószerek (*immune checkpoint inhibitors*) úgy fejtik ki hatásukat, hogy visszaállítják a hatékony tumorelles T-sejt-választ. Általánosságban

ezek a leggyakoribb immunonkológiai kezelések, bár léteznek egyéb immunterápiák is, mint a citokinterápia, a vakcinák, amelyek a daganatsejtekre specifikus antigénekkkel szembeni immunválaszt alakítanak ki, vagy az adoptív sejtttranszfer, amelynek során a beteg saját immunsejtjeit – genetikai módosítás után vagy anélkül – szaporítják fel és juttatják vissza.

Az immunellenőrző-gátlószerek közül megemlíthető az *Atezolizumab* PD-L1-inhibitor, a *Pembrolizumab*, *Camrelizumab* és *Nivolumab* PD-1-gátló, valamint az *Ipilimumab* CTLA-4-inhibitor, amelyek elsősorban tüdőkarcinóma és melanóma agyi metasztázisokban bizonyultak hatékonynak. Az eredmények azt mutatják, hogy ezek a gátlószerek nem jutnak át az intakt vér–agy gáton, azonban a vér–tumor barrieren keresztül megfelelő hatékonyságot tudnak elérni az agyi tumorban.

Források:

Ahmad A, Khan P, Rehman AU, Batra SK, Nasser MW. Immunotherapy: an emerging modality to checkmate brain metastasis. *Mol Cancer*. 2023 Jul 15;22(1):111. doi: 10.1186/s12943-023-01818-7.

Brozos-Vázquez EM, et al. Immunotherapy in patients with brain metastasis: advances and challenges for the treatment and the application of circulating biomarkers. *Front Immunol*. 2023 Nov 3;14:1221113. doi: 10.3389/fimmu.2023.1221113.

Horti-Oravecz K, Grolmusz VK. Az immunonkológiai kezelések bővülő lehetőségei. *Magyar Onkológia*. 2023 67:107-114.

Suay G, et al. Immune checkpoint inhibitors as first-line treatment for brain metastases in stage IV NSCLC patients without driver mutations. *Cancer Lett*. 2024 Dec 1;606:217317. doi: 10.1016/j.canlet.2024.217317.

5, Az *in vitro* vér-agy gát ko-kultúra modellben miért kell a tenyészetekhez hidrokortizont adni?

Az agyi endotélsejtek *in vitro* körülmények között könnyen elveszítik barrier tulajdonságaikat, elsősorban a szoros kapcsolataikat. Ezért szükséges őket együtt tenyészteni pericitákkal és asztrocitákkal, illetve olyan összetételű tápfolyadékot alkalmazni, amely segíti a *tight junction* fehérjék expresszióját, valamint a szoros kapcsolatok érését.

A hidrokortizonról már 1998-ban kimutatták, hogy stimulálja az agyi endotélsejt-tenyészetek barrier tulajdonságait (Hoheisel és mtsai.). A 2000-es évek közepén derült ki ennek mechanizmusa, vagyis hogy a hidrokortizon és más glukokortikoidok is növelik az okkludin és a klaudin-5 expresszióját és junkcionális lokalizációját agyi endotélsejtekben. A klaudin-5 promóterében azonosították a GRE (*glucocorticoid-responsive element*) régiókat (Burek és Förster), míg az okkludin promóterében egy 40 bp hosszúságú *occludin enhancer element* régió a felelős a glukokortikoid-indukálta génátírásért (Felinski és mtsai.).

A hidrokortizonon kívül a cAMP-szint fokozása járul jelentősen hozzá a transzendoteliális elektromos ellenállás növekedéséhez, amelyet egy sejtperméabilis cAMP-analóg és egy foszodiészteráz gátlószert adagolásával érjük el. Újabb kutatások azt igazolták, hogy a cAMP szignalizáció mellett a Wnt/ β -katenin jelátvitel erősítése, illetve a TGF- β útvonal gátlása szinergisztikus hatású a barrier

tulajdonságok indukálásában agyi endotélsejtek esetében. Ez tükröződik az Intézetünkben, a Deli Mária csoportjában leírt cARLA-kotél összetételében is, amely a cAMP és a Wnt/ β -katenin útvonalak aktivátorait és a TGF- β útvonal gátlószert tartalmazó kis molekulákat tartalmaz, és amely vér–agy gát tulajdonságokat indukál őssejt-eredetű endotélsejtekben (Porkoláb és mtsai.).

Források:

Burek M, Förster CY. Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Jan 27;298(1-2):19-24. doi: 10.1016/j.mce.2008.09.041.

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):922-33. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03793.x.

Hoheisel D, et al. Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 18;247(2):312-5.

Felinski EA, Cox AE, Phillips BE, Antonetti DA. Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element. *Exp Eye Res.* 2008 Jun;86(6):867-78. doi: 10.1016/j.exer.2008.01.002.

Förster C, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol.* 2005 Jun 1;565(Pt 2):475-86. doi: 10.1113/jphysiol.2005.084038.

Porkoláb G, et al. Synergistic induction of blood–brain barrier properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024 May 21;121(21):e2316006121. doi: 10.1073/pnas.2316006121.

6, Miért a perifériás idegsérülés modellt alkalmazták a neurovaszkuláris egység sejtjeinek inflammaszóma aktiváció vizsgálatára? Vajon más eredményt kaptak volna, ha a modell gyulladással kapcsolatos (pl. EAE)?

Modellválasztásunkat az indokolta, hogy perifériás idegsérülésben is van központi idegrendszeri gyulladás, amelynek fő sejtes elemei a mikroglia (Nógrádi és mtsai.), azonban épp a mi kísérleteink világítottak rá arra, hogy a mikroglia aktiváció csak az idegsejtekben kialakuló inflammaszóma aktiváció után, valószínűleg annak hatására következik be.

EAE egérmodellben, illetve *sclerosis multiplex*-ben, a gyulladásos folyamat – legalábbis részben – másképp zajlik le a nagyszámú beáramló limfocita miatt. Ebben a modellben már régebb óta ismert az NLRP3 inflammaszóma szerepe, amelyet T-sejtekben és mikroglia-sejtekben írtak le, és amelynek gátlása jelentősen csökkentheti a neuronok sérülését, a demielinációt, az oligodendrociták pusztulását és a kognitív zavarok kialakulását.

Ugyanakkor a perifériás idegsérülés vizsgálatára irányuló kísérletsorozat egy, a Biofizikai Intézetben belüli kollaboráció keretében valósult meg Siklós László csoportjával, így a modellválasztás másik oka az intézetben belüli szinergiák erősítése volt.

Források:

- Barclay W, Shinohara ML: Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Brain Pathol.* 2017 Mar;27(2):213-219. doi: 10.1111/bpa.12477.
- Hou B, et al. Inhibition of the NLRP3-inflammasome prevents cognitive deficits in experimental autoimmune encephalomyelitis mice via the alteration of astrocyte phenotype. *Cell Death Dis.* 2020 May 15;11(5):377. doi: 10.1038/s41419-020-2565-2.
- Hou B, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 alleviates neurological impairment in the brain of EAE mice. *Mol Neurobiol.* 2024 Mar;61(3):1318-1330. doi: 10.1007/s12035-023-03618-y.
- Inoue M, et al. Interferon- β therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal.* 2012 May 22;5(225):ra38. doi: 10.1126/scisignal.2002767.
- Martin BN, et al. T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Immunol.* 2016 May;17(5):583-92. doi: 10.1038/ni.3389.
- Nogradi B, et al. Diazoxide blocks or reduces microgliosis when applied prior or subsequent to motor neuron injury in mice. *Brain Res.* 2020 Aug 15;1741:146875. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146875.
- Olcum M, Tastan B, Kiser C, Genc S, Genc K. Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020;119:247-308. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.08.007.

7, Érdekes új adat, hogy a vér-agy gát molekuláris felépítése különbözik az agyi fehér- és szürkeállományban. Ezzel kapcsolatban lenne néhány kérdésem.

(i) Van-e arra adat, hogy hasonló eltérés észlelhető a gerincvelő-vér barrier vonatkozásában? Vajon a mély szürkeállományi magvak a fehérállományhoz vagy a kéreghez hasonlítanak ebben a vonatkozásban?

(ii) Továbbá, a szerző említi a sclerosis multiplexet. Jól ismertek az SM léziók predilekciós területei, melyet a diagnosztikában is alkalmazunk. Érdemes lenne e területeket pl. a periventricularis régiót megvizsgálni. Szintén érdekes lenne megvizsgálni azokat az SM léziókat, melyek érintik a fehér- és szürkeállományt is („leuko-kortikális léziók”) posztmortem mintákból QPCR-ral vagy szekvenálással e molekulák expressziójára vonatkozóan.

(iii) Lehetséges-e, hogy a metasztatizáció lokalizációjától függően (kéreg, fehérállomány) a neurovaszkuláris egység funkciója is differenciáltan változik.

(i) A vér–gerincvelő barriert 2012-ben vizsgálták részletesen, és megállapították, hogy kissé átjárhatóbb, mint a vér–agy gát, ami szoros összefüggésben áll az erek pericita lefedettségében tapasztalható regionális különbségekkel. Ennek megfelelően, a szürkeállományt tekintve, a lumbális és a cervikális gerincvelőben a legmagasabb az erek permeabilitása, ezt követi a háti gerincvelői szakasz, majd az agyi régiók, amelyek közül az agykérget, a *nucleus caudatus* és a hippokampuszt vizsgálták. Épp ennek megfelelően alakul az egyes régiókban az erek pericita lefedettsége, vagyis a lumbális gerincvelőben a legalacsonyabb, míg az agyban a legnagyobb. Ebben a tanulmányban nem hasonlították össze a gerincvelői fehér- és szürkeállományban az erek barrier tulajdonságait, azt azonban megfigyelték, hogy mindhárom gerincvelőszakaszon nagyobb az erek pericita lefedettsége a fehérállományban, mint a szürkeállományban. Ez arra utal, hogy valószínűleg a vér–gerincvelő

barrierre is igaz, hogy a fehérállományban kevésbé permeábilis, mint a szürkeállományban, ahogyan mi is tapasztaltuk az agy esetében.

Forrás:

Winkler EA, Sengillo JD, Bell RD, Wang J, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Oct;32(10):1841-52. doi: 10.1038/jcbfm.2012.113.

A szubkortikális szürkeállományi vér–agy gát sajátosságairól sajnos nem találtam irodalmi adatokat.

(ii) Fontos megjegyeznünk, hogy a fehérállomány sem egy egységes struktúra, és hogy kísérleteinkben csak a *corpus callosum*ot vizsgáltuk meg, míg más régiókat, mint a *capsula interna* és *externa*, valamint a periventrikuláris és szubkortikális fehérállomány, nem tanulmányoztuk. Ez azért is fontos, mert utóbbi például jelentősen különbözik az ember és az egér között relatív méreteit tekintve. Nem tudjuk, hogy a különböző fehérállományi régiók között van-e különbség a vér–agy gát áteresztőképességének tekintetében sem egészséges, sem patológiás körülmények között. A *sclerosis multiplex* léziók vizsgálata valóban érdekes lehet ebben a tekintetben úgy a fehérállományban, mint a szürkeállományban.

(iii) Ami az agyi metasztázisok heterogenitását illeti a vér–tumor gát áteresztőképességének tekintetében, bár jelentős eltérések tapasztalhatók az egyes léziók között egy agyon belül is, nem írtak le összefüggést a permeabilitás és a lézió lokalizációja között sem egérmodellben, sem radiológiai megfigyelésekben. Feltételezhetően a tumorsejtek hatása ebben az esetben jobban érvényesül, mint az eredeti mikrokörnyezeté. Azt viszont tudjuk, hogy az áttétek leggyakrabban a fehér- és a szürkeállomány határán alakulnak ki valószínűsíthetően azért, mert a szürkeállomány felől érkező egyenes lefutású erek a fehérállományt elérve kanyargósakká válnak (Nonaka és mtsai.)

Források:

Grand S, Pasteris C, Attie A, Le Bas JF, Krainik A. The different faces of central nervous system metastases. *Diagn Interv Imaging.* 2014 Oct;95(10):917-31. doi: 10.1016/j.diii.2014.06.014.

Lockman PR, et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Dec 1;16(23):5664-78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.

Nonaka H, et al. The microvasculature of the cerebral white matter: arteries of the subcortical white matter. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Feb;62(2):154-61. doi: 10.1093/jnen/62.2.154.

8, Vizsgálatok történtek a PACAP, EM-2 és KYNA analógok, vér-agygátra gyakorolt hatásáról részben glükóz megvonásos kísérletekben. Történtek-e vizsgálatok gyulladásos in vitro illetve in vivo modellekben?

Ilyen kísérleteket mi nem végeztünk, hiszen amikor ezek az eredmények születtek, még nem foglalkoztunk behatóan a gyulladásos folyamatokkal. A PACAP-ról azonban tudjuk, hogy egy potens gyulladáscsökkentő és neuroprotektív polipeptid, és ezt elsősorban a cAMP jelátvitel aktiválásán keresztül éri el, akárcsak a vér-agy gátra kifejtett protektív hatását. A kinurénsav is egy ismert neuroprotektív és immunmodulátor szer, míg az endomorfinek elsősorban fájdalomcsillapító hatásokról ismertek, de rendelkeznek gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal is. Az EM-2- és a KYNA-analógok esetén a vér-agy gátra kifejtett hatásokat kevésbé vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben arra fókuszáltunk, hogy olyan analógokat találjunk, amelyek jobban átjutnak a vér-agy gáton, mint az eredeti molekula anélkül, hogy a módosítás károsan befolyásolná eredeti hatásukat. A KYNA-analógokat tekintve ez a munka azóta is folyik, és kollaborációs partnereinkkel azon dolgozunk, hogy megtaláljuk azt az ideális molekulát, amely a legjobb vér-agy gáton való permeabilitással és magas bioaktivitással rendelkezik.

Források:

Jessop DS. Endomorphins as agents for the treatment of chronic inflammatory disease. *BioDrugs*. 2006;20(3):161-6. doi: 10.2165/00063030-200620030-00003.

Lee EH, Seo SR. Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB Rep*. 2014 Jul;47(7):369-75. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.7.086.

Vaudry D, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*. 2009 Sep;61(3):283-357. doi: 10.1124/pr.109.001370.

Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Jan;12(1):64-82. doi: 10.1038/nrd3793.

9, Van-e kísérletes adat a PACAP hatásáról agyi metasztázisban?

A PACAP hatásáról agyi metasztázisokban nem találtam adatokat, azonban érdekes megfigyeléseket tettek glioblasztómában – amely a primér agyi daganatok közül a leggyakoribb és legrosszabb prognózisú –, valamint az agyi metasztázisok kialakulásáért felelős primér daganatokban.

Általános szabályként elmondható, hogy a tumorsejtek nagy mennyiségben expresszálják a PACAP receptorait, azonban a PACAP, ill. a vele rokon VIP hatása nagyon eltérő lehet a különböző daganatsejteken. Tüdő-adenokarcinóma-, valamint emlőkarcinóma-sejtek esetében proliferációfokozódást írtak le PACAP/VIP hatására, míg kissejtes tüdőkarcinóma, melanóma, valamint glioblasztóma sejteken épp ellenkező hatást tapasztaltak.

Források:

D'Amico AG, et al. Multimodal role of PACAP in glioblastoma. *Brain Sci.* 2021 Jul 28;11(8):994. doi: 10.3390/brainsci11080994.

Hajdú T, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide has inhibitory effects on melanoma cell proliferation and migration in vitro. *Front Oncol.* 2021 Sep 20;11:681603. doi: 10.3389/fonc.2021.681603.

Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016 Feb;23(1):38-47. doi: 10.1097/MED.0000000000000218.

10, A szerző kimutatta, hogy az inflammaszóma aktiválódás hatására csökken a szoros kapcsolatok fehérjéinek mennyisége. Majd vizsgálta az inflammaszóma aktiválódást agyi áttétek környezetében. Azt is kimutatta, hogy az NLRP3 gátlása csökkenti a daganatok növekedését. Érdekes módon, arra nem találtam adatot a tézisben, hogy e két folyamat kapcsolatban lehet-e, és vajon az NLRP3 gátlás csökkenti-e a daganatsejtek transzmigrációját a vér-agy gát fehérjéinek protekciójával?

Az agyi metasztatikus tumorok kialakulása során az NLRP3 aktivációját az asztrocitákban láttuk. Ez a reakció akkor jelent meg, amikor a tumorsejtek már átjutottak a vér–agy gáton, és az agyszövetben kapcsolatba kerültek az agyi sejtekkel. Ezek alapján a transzmigráció folyamatát ez a jelenség valószínűleg nem befolyásolja. Ettől függetlenül, a gyulladásos reakciók – elsősorban az adhézións molekulák expressziójának növelése révén – valóban növelik a metasztatikus sejtek letapadását az agyi endotélsejtekhez, és ezáltal fokozzák a transzmigrációt is. Gyulladásos mediátorokat – például TNF- α -t vagy IL-1 β -t – maguk a tumorsejtek is termelhetnek, elősegítve átvándorlásukat az agyi endotéliumon. Azt is leírták, hogy metasztatikus emlőkarcinóma-sejtekben az NLRP3 inflammaszóma is aktiválódhat, amely növeli inváziós képességüket, azonban agyi áttétképzéssel ezt közvetlenül még nem hozták összefüggésbe.

Források:

Motallebnejad P, Rajesh VV, Azarin SM. Evaluating the role of IL-1 β in transmigration of triple negative breast cancer cells across the brain endothelium. *Cell Mol Bioeng.* 2021 Oct 26;15(1):99-114. doi: 10.1007/s12195-021-00710-y.

Rai S, Nejadhamzeeigilani Z, Gutowski NJ, Whatmore JL. Loss of the endothelial glycocalyx is associated with increased E-selectin mediated adhesion of lung tumour cells to the brain microvascular endothelium. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015 Sep 25;34:105. doi: 10.1186/s13046-015-0223-9.

Sikpa D, et al. Cerebrovascular inflammation promotes the formation of brain metastases. *Int J Cancer.* 2020 Jul 1;147(1):244-255. doi: 10.1002/ijc.32902.

Soto MS, Serres S, Anthony DC, Sibson NR. Functional role of endothelial adhesion molecules in the early stages of brain metastasis. *Neuro Oncol.* 2014 Apr;16(4):540-51. doi: 10.1093/neuonc/not222.

Wang K, et al. Inflammatory environment promotes the adhesion of tumor cells to brain microvascular endothelial cells. *Front Oncol.* 2021 Jun 16;11:691771. doi: 10.3389/fonc.2021.691771

Wang Y, et al. NLRP3 induces the autocrine secretion of IL-1 β to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 30;560:72-79. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.122.

11, Leírta az agyi endotélsejtek és periciták TLR és NLR mintázatát. Van-e adat nem agyi endotélsejtek és periciták hasonló feltérképezésére. Ha igen, különbözik-e ez az agyi erektől, és sugall-e mechanisztikus eltérést?

Hasonlóan átfogó jellemzést nem találtam sem perifériás endotélsejtek, sem perifériás periciták TLR- és NLR-mintázatának tekintetében. Jellemzően inkább egy-egy specifikus TLR vagy NLR expresszióját és annak funkcióját szokták megvizsgálni, így csak arról állnak rendelkezésünkre adatok, hogy mely receptorok vannak biztosan jelen egy-egy sejttípusban. Így például a TLR4 expressziója általánosan tűnik a különböző szervekben úgy endotélsejtekben, mint pericitákban. Hasonló mondható el a TLR2-ről is, míg az NLR-ek közül az NLRP3-at írták le a legtöbb vaszkuláris sejtben.

Ma már egyre nagyobb számban állnak rendelkezésünkre proteomikai és transzkriptomikai adatbázisok, így ezekben is próbáltam tájékozódni a kérdésről. A „The Human Protein Atlas” adatai alapján a TLR-ek közül szinte kizárólag TLR4 expresszálódik endotélsejtekben, legnagyobb mértékben a májban, a szívben és a tüdőben, azonban meg kell említenünk, hogy agyi endotélsejtekben egyik TLR-t sem jeleníti meg ez az adatbázis. Ennek valószínűleg az alacsony expresszió az oka, hiszen egy másik *online* adatbázisban, amely agyi vaszkuláris és gliasejtek transzkriptomikai adatait tartalmazza (<https://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>), ugyan hasonló TLR-mintázat látszik az agyi pericitákban és endotélsejtekben, mint a saját adatainkból, azonban ezen receptorok alacsony expressziója sok más gén kifejeződéséhez viszonyítva. Ugyanezen adatbázisban a tüdő vaszkuláris sejtjei nem mutatnak jelentős eltérést az agyi sejtekhez képest a TLR-expresszió tekintetében.

Gyulladásos körülmények között azonban – ahogy korábban mi is kimutattuk agyi endotélsejtekben – a TLR-ek és NLR-ek expressziója jelentősen fokozódik.

Mindezen adatok azt erősítik meg, hogy a gyulladásos receptorok fiziológiás körülmények között alacsony szinten expresszálódnak endotélsejtekben és pericitákban, és a rendelkezésünkre álló adatok nem alkalmasak szervek közötti összehasonlító elemzések elvégzésére.

Források:

Stierschneider A, Wiesner C. Shedding light on the molecular and regulatory mechanisms of TLR4 signaling in endothelial cells under physiological and inflamed conditions. *Front Immunol.* 2023 Nov 24;14:1264889. doi: 10.3389/fimmu.2023.1264889.

Saját publikációk:

Nagyoszi P, et al. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int.* 2010 Nov;57(5):556-64. doi: 10.1016/j.neuint.2010.07.002.

Nagyősi P, et al. Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. *J Neurochem.* 2015 Nov;135(3):551-64. doi: 10.1111/jnc.13197.

Nyúl-Tóth Á, et al. Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes. *Brain Behav Immun.* 2017 Aug;64:220-231. doi: 10.1016/j.bbi.2017.04.010.

12, Izgalmas része a tézisnek az endotélsejt-pericita kommunikáció, és a gyulladásos jelek közvetítése a pericita tápfolyadék kísérletekben. De milyen faktorok közvetítik ezeket a jeleket. Történtek-e vizsgálatok pl. citokin, omics (proteomika, metabolomika, EV, miRNS)?

Ilyen vizsgálatokat sajnos nem végeztünk. Annyit tudunk, hogy az aktiváló sejtekből (azaz az endotélsejtekből, amikor az endotél–pericita információátadást vizsgáltuk, illetve a pericitákból, amikor a pericitákról az endotélsejtek irányába történő kommunikációt néztük) az inflammaszóma aktiváció hatására IL-1 β szabadul fel, valamint más citokineket is szekretálnak az ily módon aktivált sejtek.

Egy korábbi vizsgálatban agyi endotél–pericita–asztrocita ko-kultúrákat stimuláltak LPS-sel, és hat citokin megjelenését vizsgálták a felülszórókból (Banks és mtsai.). Ezek az IL-6 és -8, az MCP, a TNF- α , a G-CSF és a GM-CSF voltak. Mivel egér endotélsejteket, valamint humán pericitákat és asztrocitákat használtak, el tudták különíteni, hogy mely sejtek milyen citokineket termelnek, illetve hogy azok az endotélréteg lumenális vagy ablumenális oldalán jelennek meg. Megállapították, hogy az endotélsejtek mindkét irányba szekretáltak citokineket, míg a pericita–asztrocita-eredetűek megjelentek a lumenális oldalon is.

Egy másik tanulmányban (Smyth és mtsai.) külön vizsgálták az agyi endotélsejtek és periciták gyulladásos mediátorokra adott válaszát a szekretált citokin array segítségével történő analízisével. A felszabaduló citokinek az adhézións molekulák expressziójának növekedését, a vér–agy gát megnyílását és az immunsejtek agyba való beáramlását okozhatják.

Gyulladásos körülmények között azonban a sejtek nemcsak szolubilis mediátorokat bocsáthatnak ki, hanem például extracelluláris vezikulákat is. Az inflammaszóma aktiválása nagy valószínűséggel elősegíti az exoszómák felszabadítását, ugyanakkor a más sejtekből származó exoszómák felvétele befolyásolhatja az inflammaszóma aktiváció folyamatát. Mindezekről azonban keveset tudunk a neurovaszkuláris egység sejtjeinek tekintetében.

Ami viszont viszonylag jól karakterizált, az az endotél–pericita jelátvitel fiziológiai körülmények között, bár saját megfigyeléseink arra utalnak, hogy ezen a területen is találhatunk még újdonságokat (például az IGF2–IGF-1R kapcsán). Ami közzismert, az az N-cadherin és a réskapcsolatokon keresztüli kapcsolódás, illetve a PDGF-B–PDGFR β , az Ang-1–Tie2, vitronektin–integrin, valamint a Notch jelátvitel. A TGF- β szignalizációról sokáig azt tartották, hogy javítja az endotélsejtek barrier

tulajdonságait, azonban saját adataink és az újabb szemlélet szerint a magas TGF- β koncentráció ellenkező hatással bír.

Összességében tehát pontos adatokkal nem rendelkezünk az endotélsejtek és a periciták közötti információátadás mediátorairól gyulladásos körülmények között, de számos citokin biztosan részt vesz a folyamatban. Ugyanakkor más szolubilis faktoroknak és valószínűleg az extracelluláris vezikuláknak is, valamint a közvetlen sejtkapcsolatokon keresztüli kommunikációnak is fontos szerepe lehet.

Források:

Ayloo S, et al. Pericyte-to-endothelial cell signaling via vitronectin-integrin regulates blood-CNS barrier. *Neuron*. 2022 May 18;110(10):1641-1655.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2022.02.017.

Banks WA, Kovac A, Morofuji Y. Neurovascular unit crosstalk: Pericytes and astrocytes modify cytokine secretion patterns of brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Jun;38(6):1104-1118. doi: 10.1177/0271678X17740793.

Li G, Gao J, Ding P, Gao Y. The role of endothelial cell-pericyte interactions in vascularization and diseases. *J Adv Res*. 2025 Jan;67:269-288. doi: 10.1016/j.jare.2024.01.016.

Noonin C, Thongboonkerd V. Exosome-inflammasome crosstalk and their roles in inflammatory responses. *Theranostics*. 2021 Mar 4;11(9):4436-4451. doi: 10.7150/thno.54004.

Smyth LCD, et al. Unique and shared inflammatory profiles of human brain endothelia and pericytes. *J Neuroinflammation*. 2018 May 11;15(1):138. doi: 10.1186/s12974-018-1167-8.

13, A tumorsejtek körül többszörös lumennel rendelkező erek alakulnak ki a migráció előtt. Vizsgálták-e illetve van-e adat arra, hogy a tumorsejteket termelnek-e ezt előidéző vaszkuláris faktorokat?

Azt, hogy milyen szekretált faktorok állhatnak a háttérben, nem tudjuk pontosan, de egyértelműen látszik a konfokális és az elektronmikroszkópos felvételeken is, hogy az endotélsejtek képesek nyúlványokat bocsátani az érlumenbe, körbefogni a tumorsejteket és ezáltal többszörös lumennel rendelkező ereket kialakítani. Ez a folyamat leginkább az intuszszuszeptív angiogenezis első lépéséhez hasonlít, azonban nem tudjuk, hogy a tumorsejtek átvándorlása után a teljes folyamat lezajlik-e, hiszen ilyet nem figyeltünk meg.

Az intuszszuszeptív angiogenezist a turbulens áramlás, számos növekedési faktorhoz kötött jelátvitel – mint például az Ang-1–Tie2, a PDGF-B–PDGFR β , az FGF–FGFR, az ephrin–Eph, valamint a VEGF–Flk-1 –, illetve mátrix metalloproteinázok indukálhatják. Az általunk megfigyelt jelenségben ezek bármelyike kulcsszerepet játszhat.

Források:

Du Cheyne C, Smeets M, De Spiegelaere W. Techniques used to assess intussusceptive angiogenesis: A systematic review. *Dev Dyn*. 2021 Dec;250(12):1704-1716. doi: 10.1002/dvdy.382.

Pandita A, et al. Intussusceptive angiogenesis in human metastatic malignant melanoma. Am J Pathol. 2021 Nov;191(11):2023-2038. doi: 10.1016/j.ajpath.2021.07.009.

Saravanan S, Vimalraj S, Pavani K, Nikarika R, Sumantran VN. Intussusceptive angiogenesis as a key therapeutic target for cancer therapy. Life Sci. 2020 Jul 1;252:117670. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117670.

14, Az endotélsejtek szoros kapcsolataira a melanóma és emlőkarcinóma sejtek másképp hatnak. Kapcsolatban lehet ez az eltérő miRNS profilal?

A pontos mechanizmust ebben az esetben sem ismerjük, de feltételezhetően az adhézións molekulák, a szekretált proteázok és akár a miRNS-ek eltérő profilja is meghatározó jelentőséggel bírhat abban, hogy a melanómasejtek hatékonyabban szakítják fel az endoteliális junkciókat, mint az emlőkarcinóma-sejtek. Saját kutatásaink az N-kadherinre fókuszáltak, amely elősegíti a melanómasejtek beintegrálódását az endotélsejtek közé, míg emlőkarcinóma-sejtek esetén nem játszik szerepet az érfalon való átvándorlásban (Herman és mtsai.).

Ami a proteolitikus enzimeket illeti, a mátrix metalloproteinázok (elsősorban az MMP-1, -2, 9, MT1-MMP, valamint az ADAM) fokozott aktivitását mindkét sejttypusban leírták, és ezek hasíthatják a junkcionális fehérjéket. A cathepsin S – amely a JAM-B tight junction fehérjét bontja – épp az emlőkarcinóma-sejtek agyi metasztatizálását segíti. Talán a szerin proteázok expressziójában lehet a legnagyobb különbség a különböző tumorsejtek között. Mi korábban a szepráz szerepét írtuk le, amely elősegíti a melanómasejtek átvándorlását az agyi endotélsejteken (Fazakas és mtsai.). Melanómában magas a plazminogén aktivátor aktivitás is (Perides és mtsai.), míg emlőkarcinómában épp ennek gátló molekulái, a szerpinek expresszálódnak nagyobb mennyiségben, amelyek ellensúlyozzák az asztrociták anti-metasztatikus hatásait az agyban (Valiente és mtsai.).

Hogy a konkrét kérdésre válaszoljak, a miRNS-ek egyrészt valóban tumorspecifikusak, másrészt szerepet játszanak a szoros kapcsolatok modulálásában. Ez utóbbiakat közvetlenül is szabályozhatják, másrészt közvetve, más sejt felszíni molekulák, proteolitikus enzimek vagy gyulladásos folyamatok befolyásolása révén. Példaként említhető a miR-509, amelynek expressziója csökken agyi metasztatikus emlőkarcinóma-sejtekben a primér tumor sejtjeihez viszonyítva, és amely gátolja a TNF- α , illetve a RhoC/MMP-9 útvonalat, így közvetve védő hatású a vér-agy gát megnyílása ellen (Xing és mtsai.). Ugyancsak agyi metasztatikus emlőkarcinóma-sejtekben írták le a miR-181c-t, amely a PDPK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) lebontásával befolyásolja a junkcionális fehérjéket (Tominaga és mtsai.). Érdekes módon, épp melanóma esetében nem találtam olyan miRNS-hez köthető mechanizmus, amely a szoros kapcsolatok megnyitását indukálná agyi áttétképzés során.

Ez is azt bizonyítja, hogy a miRNS-ek szerepe még nem kellően tisztázott ebben a folyamatban.

Források:

- Perides G, et al. The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis. *BMC Cancer*. 2006 Mar 9;6:56. doi: 10.1186/1471-2407-6-56.
- Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Sep;36(9):1481-507. doi: 10.1177/0271678X16655551.
- Sevenich L, et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat Cell Biol*. 2014 Sep;16(9):876-88. doi: 10.1038/ncb3011.
- Tominaga N, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood–brain barrier. *Nat Commun*. 2015 Apr 1;6:6716. doi: 10.1038/ncomms7716.
- Valiente M, et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*. 2014 Feb 27;156(5):1002-16. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.040.
- Wang J, et al. Targeting microRNAs to regulate the integrity of the blood-brain barrier. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Jun 11;9:673415. doi: 10.3389/fbioe.2021.673415.
- Xing F, et al. MiR-509 suppresses brain metastasis of breast cancer cells by modulating RhoC and TNF- α . *Oncogene*. 2015 Sep 10;34(37):4890-900. doi: 10.1038/nc.2014.412.

Saját publikációk:

- Fazakas C, et al. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: Role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One*. 2011;6(6):e20758. doi: 10.1371/journal.pone.0020758.
- Herman H, et al. Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium. *J Cell Mol Med*. 2019 Apr;23(4):2619-2631. doi: 10.1111/jcmm.14156.

15, A szerző kimutatta, hogy a tumorsejtek előszeretettel tapadnak a pericitákra, míg az endotélsejtekre nem, és az asztrociták vonatkozásában nincs preferencia. Mi lehet ennek a molekuláris háttere? Ez az endotélsejt-pericita eltérés csak az agyi környezetre jellemző? Kapcsolatban lehet ez az ismertetett nagyon érdekes IGF1, IGF2, IGF-1R eltérésekkel?

A tumorsejtek perifériás endotélsejtekre, illetve pericitákra való letapadásáról keveset tudunk. Utóbbiak szerepét inkább a tumor angiogenezisben vizsgálták. Ugyanakkor mindenképp figyelembe kell venni, hogy ebben az esetben úgy a gazdasejtek, mint a tumorsejtek számos tulajdonságukban eltérnek az agyi megfelelőiktől.

A tumorsejtek más sejtekhez való letapadását a sejtek felszínén expresszált adhéziós molekulák határozzák meg. Az agyi endotélsejtek egyik jellemzője, hogy – a perifériás endotélsejtektől eltérően – kevés E- és P-szelektint, valamint ICAM-1 és VCAM-1 molekulát expresszálnak egészséges körülmények között, és ezt épp a periciták szabályozzák. Így valószínűsíthető, hogy a tumorsejtek – a leukocitákhoz hasonlóan – könnyebben letapadnak a perifériás, mint az agyi endotélsejtek felszínére.

Az agyi periciták is kevés ICAM-1 és VCAM-1 molekulát expresszálnak, amelyeknek mennyisége megnő gyulladásban. Azonban kísérleteinkben az emlőkarinóma-sejtek nagyobb számban és nagyobb erővel tapadtak ezekhez a sejtekhez, mint az endotélsejtekhez. Ezeknek sem a pontos

molekuláris mechanizmusai, sem a szabályozása nem ismert. Eddig ugyan nem gondoltunk rá, de az IGF2-nek lehet szerepe ebben, és ezt meg is fogjuk vizsgálni, hiszen találtak összefüggést az IGF2 expresszió és az adhéziónak jelátvitel között (Lovett és mtsai.).

Források:

Lovett FA, et al. Convergence of Igf2 expression and adhesion signalling via RhoA and p38 MAPK enhances myogenic differentiation. J Cell Sci. 2006 Dec 1;119(Pt 23):4828-40. doi: 10.1242/jcs.03278.

Persidsky Y, et al. Dysfunction of brain pericytes in chronic neuroinflammation. J Cereb Blood Flow Metab. 2016 Apr;36(4):794-807. doi: 10.1177/0271678X15606149.

Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. J Exp Med. 2020 Apr 6;217(4):e20190062. doi: 10.1084/jem.20190062.

Török O, et al. Pericytes regulate vascular immune homeostasis in the CNS. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Mar 9;118(10):e2016587118. doi: 10.1073/pnas.2016587118.

16, Adatokkal támasztja alá, hogy a NLRP3 gátlás csökkenti az agyi metasztázisok számát, és ez kapcsolatban lehet az IL-1 β csökkenésével. Érdekes lett volna diszkutálni, hogy IL-1 β szignalizáció antagonizálása pl. Anakinra, hatékony-e a daganatok/metasztázisok kezelésében?

Köszönöm a jogos megjegyzést! Az *anakinra*, amely egy recombináns humán IL-1R antagonist, valóban nem kerül említésre a dolgozatban. *Kineret* márkanéven van forgalomban, és reumatoid arthritis, valamint néhány ritka örökletes autoimmun gyulladásos betegség kezelésére alkalmazzák szubkután injekció formájában. A Sars-CoV-2 által okozott súlyos tüdőgyulladás és szepszis terápiájában is engedélyezték.

Daganatok kezelésére egyelőre még nem vezették be. Azonban az állatkísérletek hatékonynak bizonyultak, és a klinikai tesztek is elindultak számos szolid és hematológiai rákos megbetegedés esetében. Az *anakinra* kezelést önmagában, illetve kemoterápiával vagy immunterápiával kombinációban tesztelik.

Ami az agyi metasztázisokat illeti, elsőként az a kérdés merül fel, hogy az *anakinra* átjut-e a vér-agy gáton. *In vitro* eredmények igazolták, hogy kis (17 kDa-os) méretéből adódóan 4-7-szer nagyobb mennyiségben jut át az agyi endotélsejtek rétegén, mint a sokkal nagyobb méretű IL-1 β vagy IL-1 α elleni monoklonális antitestek. Az *in vivo* adatok is arra utalnak, hogy hatásos koncentrációt tud elérni az agyban. Azt egyelőre nem tudjuk megjósolni, hogy agyi áttétes daganatok, illetve más patológiás folyamatok terápiájában az IL-1R vagy az inflammaszóma gátlása fog-e elterjedni.

Források:

Fang Z, Jiang J, Zheng X. Interleukin-1 receptor antagonist: An alternative therapy for cancer treatment. Life Sci. 2023 Dec 15;335:122276. doi: 10.1016/j.lfs.2023.122276.

Fox E, et al. The serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of anakinra after intravenous administration to non-human primates. J Neuroimmunol. 2010 Jun;223(1-2):138-40. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.022.

Mehta P, et al. Silencing the cytokine storm: the use of intravenous anakinra in haemophagocytic lymphohistiocytosis or macrophage activation syndrome. *Lancet Rheumatol.* 2020 Jun;2(6):e358-e367. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30096-5.

Sjöström EO et al., Transport study of interleukin-1 inhibitors using a human in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Behav Immun Health.* 2021 Jul 31;16:100307. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100307.

Yamanaka G, et al. Towards a treatment for neuroinflammation in epilepsy: Interleukin-1 Receptor antagonist, anakinra, as a potential treatment in intractable epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 11;22(12):6282. doi: 10.3390/ijms22126282.

17, A gyógyszer bejuttatás mechanizmusainál három potenciális lehetőséget említ. Egy további lehetőség a brain shuttle technológia.

Ami az agyi gyógyszerbejuttatást illeti, a kutatók számos stratégiát fejlesztenek, amelyek közül egyesek a klinikai gyakorlatban is megjelennek. Ezeket több nagy csoportba oszthatjuk: a vér–agy gát megkerülését alkalmazó stratégiák, a barrier mechanizmusok gátlása, a transzport mechanizmusok kihasználása, szállító sejtek alkalmazása, valamint a gyógyszermolekulák kémiai módosítása.

A vér–agy gát megkerülését alkalmazó stratégiák például az invazív technikák (intracerebrális vagy intratekális adminisztráció), illetve a nazális bevitel. A barriergátló stratégiák közül az ultrahanggal, illetve a hiperozmotikus mannitollal történő reverzibilis vér–agy gát megnyitást lehet. Utóbbi mechanizmusait korábban mi is kutattuk említeni (Farkas és mtsai., Wilhelm és mtsai.). Szállító sejtek közül laboratóriumunkban az endoteliális progenitor sejtekkel végeztek kollégáim kísérleteket (Thinard és mtsai.). A molekulák kémiai módosítására pedig a dolgozatban bemutatott KYNA- és EM-2-analógokat hoznám fel példaként, illetve szolgáltató laboratóriumként részt vettünk több, új fejlesztésű hatóanyag vér–agy gáton való átjutásának tesztelésben.

A legnagyobb és legváltozatosabb csoport a vér–agy gát transzport mechanizmusainak kihasználása. Ezek közé tartozik az internalizálódó receptorok (például a transferrin- vagy az inzulin-receptor, illetve az LRP-1, a *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) kihasználásának lehetősége. Ezek a receptorok a ligand megkötése után endocitózissal bejutnak a sejtbe a megkötött makromolekulával együtt, amely elkerüli a lizoszomális degradációt, és intakt formában transzportálódik a sejten keresztül. Ezt hívjuk receptor-mediált endo-/transzcitózisnak.

Ezt a mechanizmus lehet úgy kihasználni, hogy a receptor ligandjához kémiaiilag kapcsoljuk a terápiás molekulát, amelyet együttesen – mint egy molekuláris trójai lovat – juttatunk át az endotéliumon a vérből az agyba. Erre jó példa az *Angiochem Inc.* által kifejlesztett paclitaxel-Angiopep-2 (ANG1005) konjugátum. Az angiopep-2 egy, az aprotininből származó peptid, amely amely az LRP-1-en keresztül transzportálódik. ANG1005-tel fázis II vizsgálatokig jutottak emlőkarcinóma agyi metasztázissal rendelkező betegek kezelésében.

Egy másik példa a receptor-mediált transzcitózis kihasználására a Professor úr által felhozott *Brainshuttle* technológia, amely a Roche fejlesztése. Ebben az esetben a célreceptor a transzferrin-receptor, amelyhez ebben az esetben nem egy ligand, hanem egy specifikus ellenanyag Fab fragmense köt. Ez utóbbihoz kapcsolható a terápiás szerként használni és az agyba bejuttatni kívánt monoklonális ellenanyag. Ezzel a technológiával több klinikai tanulmány is folyamatban van Alzheimer-kórban, illetve *sclerosis multiplex*ben.

Források:

Grimm HP, et al. Delivery of the Brainshuttle™ amyloid-beta antibody fusion trontinemab to non-human primate brain and projected efficacious dose regimens in humans. *MAbs*. 2023 Jan-Dec;15(1):2261509. doi: 10.1080/19420862.2023.2261509.

Kumthekar P, et al. ANG1005, a brain-penetrating peptide-drug conjugate, shows activity in patients with breast cancer with leptomeningeal carcinomatosis and recurrent brain metastases. *Clin Cancer Res*. 2020 Jun 15;26(12):2789-2799. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3258.

Thinard R, et al. "Endothelial antibody factory" at the blood brain barrier: Novel approach to therapy of neurodegenerative diseases. *Pharmaceutics*. 2022 Jul 6;14(7):1418. doi: 10.3390/pharmaceutics14071418.

Saját publikációk (amelyek a doktori dolgozatban nem szerepelnek):

Farkas A, et al. Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res*. 2005 Jun 15;80(6):855-61. doi: 10.1002/jnr.20521.

Wilhelm I, et al. Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J Neurochem*. 2008 Oct;107(1):116-26. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05590.x.

18, Az utóbbi évek adatai egyes sejt vagy egyes nukleusz szekvenálással funkcionális alcsoportok (clusterek jelenlétét mutatta). Erre utalnak térbeli szekvenálás adatok is. Érdeemes lenne ezekben az irányokban is haladni, amennyiben lehetőség van rá.

Olyannyira egyetértünk, hogy ezeket a kísérleteket már korábban el is kezdtük. Azt szeretnénk megérteni, hogy milyen pericita *clusterek* vannak a fehér- és a szürkeállományban, illetve ezek hogyan változnak öregedésben. Az egysejt-szekvenálást hátráltatja, hogy az adatbázisokban elérhető adatok és saját tapasztalataink alapján is arányaiban sokkal kevesebb vaszkuláris sejt, és különösen pericita, detektálható ezzel a technikával, mint amennyi ilyen sejt a valóságban jelen van az agyszövetben.

Egy friss tanulmányban Shapson-Coe és mtsai. elektronmikroszkópos felvételekből rekonstruálták 1 mm³ emberi agyszövet sejtjeit a temporális lebenyből. Összesen 57 180 sejtből 8100 volt vaszkuláris sejt, ami 14%-nak felel meg. Ezzel szemben a transzkriptomikai adatokban 1% alatti a vaszkuláris sejtek aránya emberben (Chen és mtsai.) és egérben is (Yao és mtsai.).

Ezért mi első körben mikrodisszekcióval gyűjtöttünk pericitákat, és *bulk* szekvenálást végeztünk. Az adatokat kiértékeljük, és jelenleg a kiválasztott gének expressziós különbségeinek validálása zajlik *in*

situ hibridizációval, majd a mechanizmusok megértésével szeretnénk folytatni. Ezen túl, a továbbiakban a térbeli szekvenálás irányába szeretnénk továbbvinni vizsgálatainkat.

Források:

Chen X, et al. A brain cell atlas integrating single-cell transcriptomes across human brain regions. A brain cell atlas integrating single-cell transcriptomes across human brain regions. Nat Med. 2024 Sep;30(9):2679-2691. doi: 10.1038/s41591-024-03150-z.

Shapson-Coe A, et al. A petavoxel fragment of human cerebral cortex reconstructed at nanoscale resolution. Science. 2024 May 10;384(6696):eadk4858. doi: 10.1126/science.adk4858.

Yao Z, et al. A high-resolution transcriptomic and spatial atlas of cell types in the whole mouse brain. Nature. 2023 Dec;624(7991):317-332. doi: 10.1038/s41586-023-06812-z

Végezetül szeretném ismét megköszönni Professzor úrnak a kérdéseket és a pozitív bírálatot.

Szeged, 2025. április 1.



Dr. Wilhelm Imola