

### Válasz Dr. Laczka Csilla bírálataira

Hálásan köszönöm Dr. Laczka Csillának, hogy elfogadta az értekezésem bírálatát és véleményét, amellyel munkám nyilvános vitára bocsátását javasolta. Nagyra értékelem fáradságos munkáját, kritikai észrevételeit és részletes opponensi véleményét. Köszönöm a dolgozatommal kapcsolatos megjegyzéseit és kérdéseit, amelyekre az alábbiakban szeretnék válaszolni:

#### Válaszok a kritikai észrevételekre:

- A SLC karrierek efflux pumpák közé sorolásával kapcsolatban valóban a 19. ábrán az efflux pumpák között mutatom az SLC1A1, -1A2, -1A3 excitatórikus aminosav transzportereket, holott ezek nem elsődlegesen aktív, az ATP hidrolízis energiáját használó tipikus efflux pumpák, mint a P-glikoprotein. Ezek a transzporterek másodlagos aktív transzporterek, és az agyi kapilláris endotélsejtek abluminális, vagyis az agyszövet felé néző membránjában ülnek. Feladatuk, hogy Na/K iongrádiens segítségével felvegyék a glutamátot az agyi intersticiális folyadékból, és egy védelmi, méregtelenítő rendszerként működve, eltávolítsák az agyból a felesleges, potenciálisan excitotoxikus glutamátot, kipumpálva azt a vérbe (Helms és mtsai., 2012). A transzport iránya miatt szerepeltek ezért ezek az SLC transzporterek az efflux pumpák között az értekezés 19. ábráján.

Forrás:

Helms, H.C., Madelung, R., Waagepetersen, H.S., Nielsen, C.U. and Brodin, B. (2012), In vitro evidence for the brain glutamate efflux hypothesis: Brain endothelial cells cocultured with astrocytes display a polarized brain-to-blood transport of glutamate. *Glia*, 60: 882-893. <https://doi.org/10.1002/glia.22321>

- A kísérleteinkben alkalmazott magas, akár 100  $\mu\text{M}$ -os kezelési koncentrációkkal és azok fiziológiás/patológiás relevanciájával kapcsolatban tett észrevételére válaszolva szeretném megemlíteni, hogy a kezeléseink szérumos tápfolyadékban és többnyire hosszú, 24 órás időtartamig tartottak, ezért a szérumfehérjékhez való kikötődés okozta hatáscsökkenéssel is számolnunk kellett. A kísérleteinkben vizsgált fontos vér-agy gát védő vegyület, az edaravon esetében például ismert, hogy bár a kezelési dózisa 105 mg (*per os*), a klinikai szérumkoncentrációja csak 50-100  $\mu\text{M}$ -os, mert több mint 90%-ban kötődik a plazmafehérjékhez (Li és mtsai., 2012). A sejtenyészetes vizsgálatainkban alkalmazott szérumos kezelési körülmények miatt ezért magas kezelési koncentrációkat választottunk, melyek megállapításakor természetesen minden esetben végeztünk toxicitási vizsgálatokat is. A metilglioxál esetében a plazmakoncentráció cukorbetegekben 400  $\mu\text{M}$ -os, vagy e fölötti is lehet (Kong és mtsai., 2014), a mi kísérleteinkben ennél magasabb 600  $\mu\text{M}$ -os koncentrációkat használtunk, mert a 400  $\mu\text{M}$ -os kezelés csak enyhe károsodást okozott az agyi endotélsejtekben. A valproát kezeléseknél 300  $\mu\text{M}$ -os kezelést alkalmaztunk, mert epilepsziában kezelt betegek esetében a valproát szérumkoncentrációja a 350-700  $\mu\text{M}$ -os tartományba esik (Nasreddine és mtsai., 2018).

**Forrás:**

Kong X, Ma MZ, Huang K, Qin L, Zhang HM, Yang Z, Li XY, Su Q. Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2. *J Diabetes*. 2014 Nov;6(6):535-40. doi: 10.1111/1753-0407.12160.

Li H, Xu K, Wang Y, Zhang H, Li T, Meng L, Gong X, Zhang H, Ou N, Ruan J. Phase I clinical study of edaravone in healthy Chinese volunteers: safety and pharmacokinetics of single or multiple intravenous infusions. *Drugs R D*. 2012 Jun 1;12(2):65-70.

Nasreddine W, Dirani M, Atweh S, Makki A, Beydoun A. Determinants of free serum valproate concentration: A prospective study in patients on divalproex sodium monotherapy. *Seizure*. 2018 Jul;59:24-27. doi: 10.1016/j.seizure.2018.04.012.

A vegyületek „biztonságos” koncentrációjának meghatározására vonatkozó kérdéssel kapcsolatban valóban nem említettem a 3.4. Sejttenyészetek kezelése c. alfejezetben, hogy a kísérleteinkben alkalmazott dózisoknál minden alkalommal toxicitási tesztek előzték meg a kezelési koncentrációk kiválasztását. Az epitél- és endotélsejtes modell összehasonlítási munkákban MTT tesztet használtunk a tesztanyagok biztonságos koncentrációjának meghatározásához. A metilglioxál, a TJ modulátor peptidek, a tesmilifen és a nanorészecske kezeléseknél pedig a végpontos MTT kolorimetriás tesztek mellett minden alkalommal impedancia alapú kinetikai vizsgálatokat is elvégeztünk, amely jelzőanyag nélküli, folyamatos életképesség követést tesz lehetővé.

- Az értekezés 46-os ábráján bemutatott efflux pumpa aktivitás méréssel kapcsolatban köszönöm Bírálóm javítását, miszerint a rhodamine 123 a vad típusú BCRP fehérjének nem szubsztrátja, ezért az ott kapott eredményeink valóban csak a P-gp aktivitására vonatkozhatnak a BCRP-ére nem.
- Az értekezés 11. ábráján a Caco-2 sejtek P-gp mennyiségével kapcsolatban az immunfluoreszcens festések alapján tett szubjektív megfigyelés és a hiányzó Western blottal kapcsolatos észrevételre a következő választ szeretném adni. Az eredeti Hellinger Éva és mtsai., 2012-es közös publikáció 5. ábráján szerepel az a Western blott, amely egyértelműen mutatja, hogy a VB-Caco-2 sejtekben több P-gp van, mint a Caco-2 sejtekben. A közös publikációnak ezt az eredményét azért nem tettem bele az értekezésbe, mert ezt a Western Hellinger Éva végezte Budapesten, míg a többi, az értekezésben bemutatott kísérletet Évával együtt csináltuk itt a szegedi laborunkban, melyekből származó eredmények valóban ezt követően Éva PhD értekezésébe is bekerültek.

**Forrás:**

Hellinger E, Veszeka S, Tóth AE, Walter F, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Háda V, Nakagawa S, Duy TD, Niwa M, Deli MA, Vastag M. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012 Oct;82(2):340-51.

- Köszönöm Bírálóm kritikai észrevételét, hogy az értekezés 16-os és 17-es ábráinak ábraalírásában valóban pontatlan az SLC transzporterek megnevezés. Ezekon az ábrákon a vér-agy gát főbb tápanyagszállító transzportereinek génexpressziós különbségeit szerettem volna megmutatni az epitél- és az endotélsejtes modellekben. Az ábrákon összesen 25 különböző transzporter adatai szerepelnek, melyek közül 23 az SLC család tagja, kettő pedig valóban az ABCA transzporter

családhoz tartozik, melyek a koleszterin és lipid szállításában játszanak szerepet, és emiatt kerültek a többi tápanyagszállító fehérje mellé. Valóban szerencsésebb lett volna ezért az ábraalírásban az SLC helyett inkább a tápanyagszállító transzporterek megnevezést használni.

- Bírálónak az SLCO1C1 gén expressziójára vonatkozó megjegyzésére válaszolva, ez a gén valóban jelentős mértékben expresszálódik a choroid plexus sejtjeiben, de irodalmi adatok igazolják, hogy az agyi endotélsejtekben is kifejeződik (Schäfer és mtsai., 2021; <https://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>), ezért tüntettük fel az ábráinkon. Az SLCO1A2 génextpressziós eredmények hiányára vonatkozó kérdésével kapcsolatban pedig a válaszom, hogy a Veszélka és mtsai., 2018-as közleményünk kiegészítő információkat tartalmazó dokumentumának S1 táblázatában szerepel az SLCO1A2 gén expressziója is, ezt is megvizsgáltuk, de mivel csak patkány TaqMan próba volt elérhető, humán és kutya próba nem erre a génre vonatkozóan, ezért a hiányos adatok miatt ez a gén nem került bele a cikk fő ábrájába. A sztatinek sejtbeli felvételét illetően pedig valóban tévesen szerepelt az értekezésben az OATP1C1 fehérje, helyesen OATP1A2-t kellett volna írnom, köszönöm szépen Bírálónak a kritikai észrevételét és javítását. Az OATP1A2 fehérjét kódoló SLCO1A2 gén kifejeződését, ahogy fentebb említettem a patkány primer EPA modellben sikerült is kimutatnunk.

Forrás:

Schäfer AM, Meyer Zu Schwabedissen HE, Grube M. Expression and Function of Organic Anion Transporting Polypeptides in the Human Brain: Physiological and Pharmacological Implications. *Pharmaceutics*. 2021 Jun 4;13(6):834. doi: 10.3390/pharmaceutics13060834.

- A szűkszavú ábraalírásokkal kapcsolatos kritikai megjegyzésével egyetértek, sajnálom, valóban sokszor kimaradt az ábraalírások szövegéből az alkalmazott vér-agy-gát modell és a konkrét módszer megnevezése.
- A kísérleteinkben alkalmazott igen magas, nem fiziológiás, 100  $\mu$ M-os tezmilifen koncentrációt érintő kritikai megjegyzésre a következő választ szeretném adni. A tezmilifen kezelések esetében, a 100  $\mu$ M-os kezelés a klinikai fázis vizsgálatok szérumkoncentrációs adataival korrelált. Kemoterápiában a rákos sejtek érzékenységének fokozására használt kísérletekben 3  $\mu$ M - 350  $\mu$ M tartományban használták korábbi vizsgálatokban (Brandes és mtsai., 1995). Az értekezés 46. ábráján a tezmilifennek a multidrog transzporterek gátlásával kapcsolatban, pedig jogos Bírálóm észrevétele, hogy bár a 100  $\mu$ M-os tezmilifen valóban csökkentette az efflux pumpák működését, de csak 5-10%-ban, így inkább csak aktivitás csökkenésről beszélhetünk, nem pedig igazi gátlásról.

Forrás:

Brandes LJ, Bracken SP, Ramsey EW. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine in combination with cyclophosphamide: an active, low-toxicity regimen for metastatic hormonally unresponsive prostate cancer. *J Clin Oncol*. 1995 Jun;13(6):1398-403. doi: 10.1200/JCO.1995.13.6.1398.

- Bírálóm utolsó kritikai észrevétele a következő: „A szignifikáns szót nem mindig használja megfelelően. A 78. C ábrán, a 105. oldalon a 3-asan célzó nioszómák filipin általi felvételének gátlása nem szignifikáns, az erre hivatkozó szövegben mégis így fogalmaz “Az inhibitorokkal való előkezelés hatására az N-AGL nioszómák sejtfelvétele szignifikánsan csökkent.”

Egyetértek, valóban ezen az ábrán a négy különböző gátlás vizsgálata esetében, három kezelés hatására a 4 °C, az azid és a citokalazin D kezelést követően szignifikánsan csökkent a nanorészecske felvétele a sejtekbe, de egy gátlószer, a filipin esetében a csökkenés mértéke valóban nem volt szignifikáns, és ezt nem emeltem ki külön az értekezés szövegében. Köszönöm az észrevételt és a javítást.

### Válaszok az apróbb észrevételekre:

- A hCMEC/D3 sejt vonal eredetét illetően valóban nem jeleztem a dolgozatban, hogy ezeket a sejteket a kísérleteink elején francia együttműködő partnereinktől, Prof. Pierre-Olivier Couraud csoportjától kaptuk, majd később a Merck Magyarország Kft. is forgalmazni kezdte ezt a sejt vonalat (Blood-Brain Barrier hCMEC/D3 Cell Line, cat. no: SCC066), így ezt követően a Mercktől vásároltuk meg.
- A Bíráló által kiemelt apró pontatlanság, az alábbi mondatban „a vér-agy gáton nagy mennyiségben fejeződnek ki a karrierek közül az SLC-k”, illetve a „mihez képest fejeződnek ki az SLC-k nagy mennyiségben” kérdéssel kapcsolatban egyetértek Bírálómmal, valóban helyesebb lett volna azt írni, a karrierek helyett, hogy a vér-agy gáton nagy mennyiségben fejeződnek ki a transzporter fehérjék közül az SLC-k. A mennyiséget illetően pedig arra szerettem volna utalni, hogy az agyi kapillárisokat vizsgáló összehasonlító transzkriptomikai irodalmi eredmények (Enerson and Drewes, 2006) alapján a mikroerekben kifejeződő gének funkcionális klasztereit tekintve a transzporter fehérjék alkották a második legnagyobb csoportot (11%) a szignáltranszdukciós útvonalak fehérjéinek csoportja után (17%). Más, a humán agyi endotélsejtek teljes génkifejeződési mintázatát vizsgáló tanulmányok is igazolták, hogy a legdominánsabb funkcionális csoportok közé tartoznak az SLC-k, az ABC transzporterek mellett (Geier és mtsai., 2013).

Forrás:

Enerson BE, Drewes LR. The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Jul;26(7):959-73. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600249.

Geier EG, Chen EC, Webb A, Papp AC, Yee SW, Sadee W, Giacomini KM. Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Dec;94(6):636-9. doi: 10.1038/clpt.2013.175.

- A „gyenge farmakokinetika” megfogalmazás pontosítását illetően, értekezésemben arra szerettem volna felhívni a figyelmet, hogy a központi idegrendszerre ható gyógyszerek fejlesztése és alkalmazása során az egyik legnagyobb kihívást a farmakokinetikai problémák jelentik. Ezek a hatóanyagok ugyanis gyakran alacsony hatékonysággal érik el a célterületet az agyban, ami nem megfelelő terápiás válaszhoz vagy mellékhatásokhoz vezet. Egyrészt a hatóanyagok fiziko-kémiai tulajdonságai miatt, mint például az oldhatósági problémák. Sok CNS-hatóanyag vízben rosszul oldódik, ami csökkenti a szisztémás felszívódást. Illetve a vérben a magas plazmafehérje-kötődés miatt a hatóanyag nem tud bejutni az agyba, csak a szabad frakció. A máj gyorsan lebonthatja a hatóanyagot (first-pass metabolism), még mielőtt az eljutna az agyba, így csökkentve a biohasznosulást. Problémát jelent az is, hogy az agyba bejutott hatóanyagok nem egyenletesen oszlanak el, vagy a nem-

specifikus kötődés az agyszövethez csökkenti a receptorokhoz jutó szabad hatóanyag mennyiségét. Például a Parkinson-kór kezelésére használt Levodopa bár képes átjutni a vér-agy gáton, a *per os* beadott mennyiségnek mindössze 1-3%-a jut be a központi idegrendszerbe, a többi a periférián lebomlik. Másrésről pedig probléma természetesen maga a vér-agy gát, amely megvédi az agyat a káros anyagoktól, de egyben a gyógyszerek több mint 98%-ának a bejutását is megakadályozza az agyba.

- A nehézkes megfogalmazásokkal kapcsolatban valóban célszerűbb lett volna az alábbi összetett mondatot inkább két külön mondat formájában megfogalmazni:

Az eredeti mondat így hangzott: „Míg a vér-agy gát károsodása régóta ismert az idegrendszeri degeneratív betegségek kialakulásában, a stresszel összefüggésbe hozható vér-agy gát működési zavarok neuropszichiátriai betegségek esetében újabban felfedezett terület”.

Ehelyett talán szerencsésebb lett volna úgy fogalmazni, hogy “Az idegrendszeri degeneratív betegségek kialakulásában régóta ismert tény a vér-agy gát működésének károsodása. A neuropszichiátriai betegségek, illetve a stressz hatásainak kutatási területén azonban később azonosították a vér-agy gát sérülésének fontos szerepét.”

A “passzáltuk kísérleti felszínekre” kifejezés helyett pedig talán helyesebb lett volna a “sejteket a kísérleti felszínre szélesztettük” megfogalmazás.

- A 3. ábra címével kapcsolatban - „A vér-agy gát modellezésére használt három fő sejtípus” - azért használtam a sejtípus szót a modell helyett, mert az irodalomban leírt különböző vér-agy gát modellekben számos esetben használnak például összejt eredetű agyi endotélsejteket primer pericita sejtekkel ko-kultúrában tartva, vagy primer endotélsejteket tenyésztenek együtt sejtvonal eredetű asztrogliá sejtekkel stb. Így a vér-agy gát modellek nem tisztán immortalizált sejtes, primer sejtes, vagy összejtes modellek, hanem a legváltozatosabb kombinációban, különböző sejtípusokból épülhetnek föl. Így pontosabbnak éreztem a 3. összefoglaló ábra címében a sejtípus szót használni a modell szó helyett.
- Az értekezés 36. oldalán a hivatkozott cikkben Keserű helyett Kesserű szerepel. Köszönöm szépen az észrevételt, sajnálatos módon valóban véletlenül elírtam Keserű György nevét a hivatkozásban. Illetve az értekezésben található többi gépelési hiba miatt is elnézést kérek.
- Egyetértek Bírálóm észrevételével, hogy a transzportfehérje szó helyett a 13. oldalon pontosabb lett volna a transzporter fehérje kifejezés használata.
- A 40. és 41. ábra oszlopainak jelölése valóban nem teljesen egyértelmű, köszönöm az észrevételt. Az ábraalírásban jelzett fehér és szürke oszlopok magyarázata mellett azt is fel kellett volna tüntetnem, hogy a mintázatok az egyedi peptid kezelésekre vonatkoztak.
- Az ábrák feliratainak egységesítésével kapcsolatban igyekeztem mindenhol magyarosítani, illetve a magyar feliratokat megszerkeszteni az eredeti ábrákon, ahol ez mégis angol maradt, az a régi ábrák átjavításának minőségi romlása miatt történt. A néhol előforduló angol feliratok miatt ezért elnézést kérek.

- Az értekezés 71. oldalán található YFP konstrukció leírása valóban nem szerepel a metodikában, így valóban nem derült ki, hogy ezt a molekulát az együttműködő partnereink Prof. Ingolf Blasig és munkatársai készítették a részünkre a mi kifejezett kérésünkre a kísérleteink kivitelezéséhez. Ez a konstrukció tehát nem az én saját munkámból született, ezért nem tüntettem fel ezt a metodikai részben.

### Válaszok a feltett kérdésekre:

- A primer patkány agyi endotélsejtek szelektálásához használt puromycin kezeléssel kapcsolatos kérdésre, hogy az okozhat-e fokozott P-gp expressziót a tenyészetekben, a következő választ szeretném adni. Kutatócsoportunk a puromicines kezelést Prof. Pierre-Olivier Couraud laborjával együttműködésben Nicolas Perrière-rel közösen dolgozta ki. Az eljárás során a patkány agyból enzimes homogenizálási, szeparálási és centrifugálási folyamat végén kapott sejtes pelletet sejtenyészítő médiumban szélesztjük, amely 3 µg/ml (5,5 µM) puromycint is tartalmaz (Perrière és mtsai., 2005). Ebben a médiumban csak 3 napig tartjuk a sejteket, mely idő alatt a P-gp-t nem expresszáló pericita sejtek és más kontamináló sejtek elpusztulnak, így tiszta agyi endotélsejt tenyészeteket kapunk. Ahhoz, hogy az agyi endotélsejtek közül fokozott P-gp expressziójú sejtpopulációkat szelektáljunk ki jóval hosszabb, hetekig tartó puromicines kezelés és sokkal több passzálás szükséges, ami a primer agyi endotélsejtek esetében nem lehetséges, mert elveszítik osztódóképességüket (Fujimoto és mtsai., 2020). Sejtvonalak esetében azonban ilyen szelektálásra van lehetőség, mint ahogyan azt az értekezésben is szereplő epitélsejtes modell, a VB-Caco-2 modell leírásánál alkalmaztak együttműködő partnereink (Hellinger és mtsai., 2010). A VB-Caco-2 modellt a Caco-2 epitélsejtes modelltől úgy hozták létre, hogy a Caco-2 sejteket 10 nM vinblasztinnal kezelték 70 passzálon keresztül, ami hetekig tartott, így kaptak a P-gp-t tartósan magasan expresszáló VB-Caco-2 sejtenyészeteket, melyek sokkal nagyobb hatékonysággal azonosították a P-gp szubsztrát molekulákat, mint az eredeti Caco-2 sejtek (Hellinger és mtsai., 2010).

#### Forrás:

Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Scherrmann 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):279-89. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x.

Fujimoto T, Morofuji Y, Nakagawa S, Kovac A, Horie N, Izumo T, Niwa M, Matsuo T, Banks WA. Comparison of the rate of dedifferentiation with increasing passages among cell sources for an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Neural Transm (Vienna).* 2020 Aug;127(8):1117-1124. doi: 10.1007/s00702-020-02202-1. .

Hellinger E, Bakk ML, Pócsa P, Tihanyi K, Vastag M. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Sep 11;41(1):96-106. doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.015. Epub 2010 Jun 8.

- Arra a kérdésre, hogy az primer sejtek izolálását lehetett volna-e FACS módszerrel végezni azt a választ tudom adni, hogy a FACS méréshez egysejt-szuspenziókra van szükség, azonban az agyi endotélsejtek ilyen körülmények között nagyon nehezen, vagy egyáltalán nem nőnek. Amikor primer agyi endotélsejteket izolálunk agyból, a sejtlizátumból akkor kapunk szép tenyészeteket, ha a sejtek kis kapilláris fragmentumként egyben maradnak. Vigyáznunk kell ezért az izolálási folyamat során, hogy például a szövet enzimes emésztése ne legyen túl hosszú, és ne

eredményezzen egysejtes szuszpenziót, ami rontja a tenyészet minőségét. A FACS módszerét ezért nem alkalmazzuk primer agyi endotélsejtek izolálására.

- A toxicitási vizsgálatainkban alkalmazott impedancia mérési technika előnyét és a klasszikus módszerekkel történő összehasonlítását érintő kérdést illetően a válaszom az, hogy igen, végeztünk ilyen összehasonlító vizsgálatokat. A Cremophor EL és az RH40, hatóanyagok formulálásához használt segédanyagok toxicitásának tesztelésekor agyi endotélsejteken és Caco-2 epitélsejteken összehasonlítottuk az impedancia mérésen alapú, a tetrazolium bromid (MTT) festékkonverziós, a laktát dehidrogenáz enzim felszabaduláson alapuló (LDH) és a kettős sejtmagfestéses morfológiai módszereket (Kiss és mtsai., 2013). Az impedancia alapú mérésekkel jól korrelált a többi klasszikus toxicitási módszer, és igazolta, hogy a 0.1 mg/mL és az ennél magasabb koncentrációk az endotélsejtekre károsak voltak, míg az epitélsejtekre csak 5 mg/mL fölött voltak károsak az anyagok. Valamint az is konzekvensen igazolódott mindegyik toxicitási módszerrel, hogy a Cremophor EL az RH40-hez képest károsabb volt mindkét sejttípusra (Kiss és mtsai., 2013). Az impedancia alapú mérés nagy előnye azonban a többi klasszikus toxicitási teszttel szemben, hogy időben folyamatos monitorozást tesz lehetővé, és ezt jelzőanyag mentesen, míg a kolorimetriás toxicitási tesztek csak előre meghatározott végpontokban adnak eredményt.

Forrás:

Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszélka S, Ozsvári B, Puskás LG, Szabó-Révész P, Deli MA. Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J Pharm Sci.* 2013 Apr;102(4):1173-81.

- A Caco-2 sejtvonal változó P-gp expressziójára vonatkozó kérdéséről a következő választ szeretném adni. A Caco-2 sejtek morfológiája tenyészetben nagyon heterogén, nagy vakuólumokkal telt sejtek és kis kuboid sejtzigetek váltakoznak, amelyek aránya az eltérő passzázsszámokkal is változik. A sejtek P-gp expresziója alacsony, a heterogén tenyészetnek köszönhetően pedig eltérő. Éppen ezért hozták létre együttműködő partnereink, Dr. Vastag Mónika és csoportja a Richter Gedeon Gyógyszergyárban a VB-Caco-2 sejtvonalat vinblasztinos szelekcióval a Caco-2 sejtekből (Hellinger és mtsai., 2010). A szelekció eredményeként a VB-Caco-2 sejteknek nemcsak a P-gp expressziója lett magasabb és egyenletesebb, hanem a sejtek morfológiája is kisméretű kuboid sejtek formájában sokkal egységesebb lett (Hellinger és mtsai., 2010).

Forrás:

Hellinger E, Bakk ML, Pócsa P, Tihanyi K, Vastag M. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Sep 11;41(1):96-106. doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.015. Epub 2010 Jun 8.

- Azzal kapcsolatban, hogy az apikális villusok a Caco-2 és MDCK sejteken mennyiben befolyásolták a permeabilitási méréseinket, arra nem tudok pontos választ adni, ezt külön nem vizsgáltuk. A modellek megfelelő gáttulajdonosságát illetően viszont elmondhatom, hogy a transzport vizsgálatok előtt minden esetben rezisztenciaméréssel és paracelluláris, valamint transzcelluláris marker molekulák átjutásának mérésével ellenőriztük az epitélsejtes és az endotélsejtes modelljeink megbízható szorosságát. Vizsgálati eredményeink alapján ezek az

epiteliális modellek eltérő morfológiai tulajdonságaik ellenére is a paracelluláris permeabilitás mérésére alkalmasak, és hasonló eredményeket adnak e tekintetben, mint a primer sejtes EPA vér-agy gát modell. A különböző transzporterekhez köthető anyagok permeabilitását tekintve viszont már az epitelsejtes modellek sok esetben, mint például a sztatinok mérésénél is a vér-agy gáton mért eredményektől nagyon eltérő eredményeket adtak (Veszélka és mtsai., 2018). A különböző epitelsejtes és vér-agy gát modellek összehasonlítása alapján, valamint az EPA modell *in vivo* adatokkal kapott jó korrelációja alapján valóban elmondhatjuk, hogy a legmegfelelőbb az EPA modellezi a vér-agy gátat. A primer modellek azonban alacsony áteresztőképességű tesztrendszerek, ezért az ipari gyógyszerhatóanyag tesztelésben van létjogosultsága az epitelsejtes modelleknek is, de minden esetben mérlegelni kell a megfelelő modell kiválasztását, és lehetőség szerint a leghatékonyabb vagy legfontosabbnak ítélt anyagokat endotelsejtes vér-agy gát modellen is tesztelni.

- Az értekezés 24. ábráján a metilglioxál kezelésnél a sejtindex korai csökkenésének a következő a magyarázata. Az impedancia mérés során a 96 lyukú aranyelektrodás lemezekben tenyésztett agyi endotelsejtek végig az inkubátorban vannak, kivéve amikor megkezeljük őket. A kezelésekhöz a lemezeket néhány percre ki kell venni a 37 °C-os inkubátorból, ami hőmérséklet esést okoz és tápfolyadék cserével is jár. Az agyi endotelsejtek nagyon érzékeny sejtek, kis zavaró tényezőre, mint amilyen egy médiumcsere is már rezisztencia csökkenést mutatnak. A tenyésztőlemez visszahelyezésekor a sejtindex csökkenése is ezt a folyamatos mérésben bekövetkező, a kezelésekre miatti rövid idejű megszakítást jelzi.
- A APOB100 transzgen állatokban kapott hippocampusz permeabilitás növekedésével kapcsolatos kérdésre a válaszaim az alábbiak. Ebben a kísérletben a kéregállomány és a hippocampusz permeabilitását hasonlítottuk össze a transzgen és a vad típusú állatokban. A vizsgálataink alapján a hippocampuszban láttunk megnövekedett permeabilitást, ami ennek az agyi területnek a magasabb sérülékenységét mutatja. Eredményeink összhangban állnak más tanulmányokkal, ahol például Alzheimer betegségben, öregedésben vagy hypoxia esetén is a többi agyi területtel szemben a hippocampusz területét találták a legérzékenyebbnak, ahol a vér-agy gát sérülése és az agyi erek permeabilitásának fokozódása a betegségek vagy az öregedés korai jeleként igazolódtak (Davidson és mtsai., 2024; Mrdjen és mtsai., 2019; Montagne és mtsai., 2015).

Forrás:

Davidson TL, Stevenson RJ. Vulnerability of the Hippocampus to Insults: Links to Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 6;25(4):1991. doi: 10.3390/ijms25041991.

Mrdjen D, Fox EJ, Bukhari SA, Montine KS, Bendall SC, Montine TJ. The basis of cellular and regional vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2019 Nov;138(5):729-749. doi: 10.1007/s00401-019-02054-4.

Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, et al., Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron.* 2015 Jan 21;85(2):296-302.

- APOB-100 transzgen egerekben a P-gp-t kódoló *Abcb1a* gén szintje csökkent az *Abcb1b*-é pedig emelkedett, ahogy ez az értekezés 36.C ábráján látható. Bírálóm kérdése az volt, hogy mennyire tudja ez a két gén átvenni egymás szerepét, és ha igen, akkor milyen nettó hatás várható. Egerekben a vér-agy gát agyi endotelsejtjein az *Abcb1a* a domináns (Zang és mtsai., 2023),

amely magasan expresszálódik, szintje több mint százszorosa az Abcb1b-nek. Emiatt azt gondoljuk, hogy az Abcb1b nem veszi át a szerepét az Abcb1a-nak az APOB100 egerekben, annak ellenére sem, hogy a szintje kissé megemelkedik ezekben az állatokban. Eredményeink összhangban állnak más irodalmi adatokkal, mely szerint a P-gp Abcb1a gén szintje csökken hiperlipidémiában és a hiperlipidémiával gyakran összefüggő Alzheimer-kór egér modelljében (Tóth és mtsai., 2020; Sweeney és mtsai., 2018; Cirrito és mtsai., 2005).

Forrás:

Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Piwnica-Worms D, Holtzman DM. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3285-90. doi: 10.1172/JCI25247.

Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018 Mar;14(3):133-150. doi: 10.1038/nrneurol.2017.188.

Tóth ME, Dukay B, Hoyk Z, Sántha M. Cerebrovascular Changes and Neurodegeneration Related to Hyperlipidemia: Characteristics of the Human ApoB-100 Transgenic Mice. *Curr Pharm Des.* 2020;26(13):1486-1494. doi: 10.2174/1381612826666200218101818.

Zhang W, Liu QY, Haqqani AS, Liu Z, Sodja C, Leclerc S, Baumann E, Delaney CE, Brunette E, Stanimirovic DB. Differential Expression of ABC Transporter Genes in Brain Vessels vs. Peripheral Tissues and Vessels from Human, Mouse and Rat. *Pharmaceutics.* 2023 May 22;15(5):1563. doi: 10.3390/pharmaceutics15051563.

- A tezmilifen vér-agy gát permeabilitás változásra vonatkozó kérdésére a válaszom, hogy valóban a tezmilifen kis koncentrációban (1µM) fokozza az agyi endotélsejtek permeabilitását, míg nagy koncentrációban (50 és 100 µM) növeli. Ennek oka, hogy a tezmilifen alacsony koncentrációban cAMP növelő hatással bír, ahogy ezt az értekezés 45.D ábrája is mutatja, ami pedig növeli a vér-agy gát szorosságát, vagyis peremabilitás csökkenést okoz. A tezmilifen egy antihisztamin hatású tamoxifen, melynek hatékonyságát kemoterápiás adjuvánsként a perifériás daganatok számos típusában, mint például mellrák és prosztataraák is igazolták (Brandes, 2008; Reyno és mtsai.,2004). Ezek a vizsgálatok is kimutatták a tezmilifen bifázisos hatását, vagyis kis koncentrációban hatása ellenkező, mint nagy koncentrációban. Kis koncentrációban DNS szintézis stimuláló és nem citotoxikus, míg nagy koncentrációkban DNS szintézis gátló, gyulladásfokozó és citotoxikus hatással bír (Brandes, 2008). A tezmilifen hatását egyébként *in vivo* mi is teszteltük ugyanabban a munkában (Walter és mtsai., 2015), amiből származó *in vitro* eredményeket az értekezésben is bemutattam, és kimutattuk, hogy a tezmilifen patkányok agyában a glióma területén képes volt fokozni a vér-agy gát permeabilitását (Walter és mtsai., 2015).

Forrás:

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):143-7. doi: 10.1177/0960327108090751.

Reyno L, Seymour L, Tu D, Dent S, Gelmon K, Walley B, Pluzanska A, Gorbunova V, Garin A, Jassem J, Pienkowski T, Dancey J, Pearce L, MacNeil M, Marlin S, Lebwohl D, Voi M, Pritchard K; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA.19. Phase III study of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy]ethanamine (BMS-217380-01) combined with doxorubicin versus doxorubicin alone in metastatic/recurrent breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA.19. *J Clin Oncol.* 2004 Jan 15;22(2):269-76.

Walter FR, Veszeka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA. Tesimalifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. J Neurochem. 2015 Sep;134(6):1040-54. doi: 10.1111/jnc.13207. Epub 2015 Jul 23.

- Arra a kérdésre, hogy mennyire skálázhatóak a különböző vér-agy gát modellek, és alkalmasak lennének-e közepes esetleg nagy áteresztőképességű tesztelesekre, azt a választ tudom adni, hogy a primer sejten alapuló modellek érzékenységük és nem passzálható voltuk miatt nem alkalmasak nagy áteresztőképességű tesztelesekre. Ezzel szemben az összejt eredetű modellek már alkalmasak közepes áteresztőképességű tesztelesekre, éppen ezért vannak ezek a modellek a vér-agy gát kutatások fókuszában jelenleg.

Az automatizáció lehetőségével kapcsolatban, léteznek már 384 lyukú lemezek, úgynevezett organ-on-a chip mikrofluidikai modellek, ahol extracelluláris matrixban 3D sejt kultúrák tarthatók teljesen robotizált módon, de igen magas költséggel (MIMETAS, OrganoPlate® platform). Az organoidok reprodukálhatóságával kapcsolatban, megoszlanak a vélemények. Általánosságban elmondható, hogy reprodukálhatónak tekinthetők a transzkripciós eredmények tekintetében (Valesco és mtsai., 2019), azonban nagy kihívást jelent a morfológiai inkonzisztencia, az eltérő érettségi szintek használata, a batch-ről batch-re különbözőség és a laboratóriumok közötti nagyfokú variabilitás a felhasznált anyagok tekintetében (Sandoval és mtsai., 2024).

Forrás:

<https://www.mimetas.com/technology>

Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, Nash A, Rocha M, Quadrato G, Paulsen B, Nguyen L, Adiconis X, Regev A, Levin JZ, Arlotta P. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. Nature. 2019 Jun;570(7762):523-527. doi: 10.1038/s41586-019-1289-x.

Sandoval SO, Cappuccio G, Kruth K, Osenberg S, Khalil SM, Méndez-Albelo NM, Padmanabhan K, Wang D, Niciu MJ, Bhattacharyya A, Stein JL, Sousa AMM, Waxman EA, Buttermore ED, Whye D, Sirois CL; Cross-IDDRC Human Stem Cell Consortium; Williams A, Maletic-Savatic M, Zhao X. Rigor and reproducibility in human brain organoid research: Where we are and where we need to go. Stem Cell Reports. 2024 Jun 11;19(6):796-816. doi: 10.1016/j.stemcr.2024.04.008.

Végezetül még egyszer hálásan köszönöm Dr. Laczka Csillának bírálatát, megjegyzéseit, és kérdéseit, és azt, hogy az értekezést alapos, és átgondolt munkának tartotta, eredményeimet hiteles és új eredményeknek ismerte el, és az értekezésem nyilvános vitára bocsátását támogatta. Tisztelettel kérem, hogy opponensi véleményére és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Szeged, 2026. április 26.



Dr. Veszeka Szilvia