

veszelka.szilvia_307_25

**Vér-agy gát vizsgálatok sejtenyészetes modelleken:
gyógyszerátjuttatás és betegségek mechanizmusa**

Dr. Veszélka Szilvia

Értekezés

a Magyar Tudományos Akadémia doktora

cím elnyerésére

2025

*„A természet nem ért tréfát: mindig igaz, mindig komoly,
mindig szigorú, mindig igaza van; a hibák és tévedések mindig az emberéi.”*

Johann Wolfgang von Goethe

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1.Bevezetés	6
1.1. A vér-agy gát jelentősége és szerkezeti felépítése	6
1.2. A vér-agy gát modellezése sejttenyészetekkel.....	9
1.3. A vér-agy gát szerepe betegségekben	12
1.4. Az agyi gyógyszerbejuttatás hatékonyságának növelésére alkalmas módszerek	15
1.4.1. Nanorészecskék agyi gyógyszerbejuttatásra	17
2.Kutatási célok	20
2.1. A vér-agy gát vizsgálatára alkalmas sejttenyészetes modellek jellemzése és összehasonlítása	20
2.2. A vér-agy gát sérüléseinek vizsgálata különböző patológiás modellekben.....	20
2.3. A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata.....	21
3. Módszerek	23
3.1. Vegyszerek.....	23
3.2. Sejttenyészetek.....	23
3.3. Ko-kultúra vér-agy gát modellek	25
3.4. Sejttenyészetek kezelése	26
3.5. Toxicitás mérése impedancia kinetikával	26
3.6. TEER mérés vér-agy gát modelleken	27
3.7. Vér-agy gát permeabilitási vizsgálatok.....	27
3.8. Sejtmembrán fluiditás mérése	28
3.9. Efflux pumpa aktivitás mérése.....	28
3.10. Reaktív oxigéngyökök, nitrogén-monoxid és cAMP termelődés mérése.....	28
3.11. Génexpressziós vizsgálatok	29
3.13. Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok.....	29
3.14. Nanorészecskék előállítása	30
3.15. Nanorészecskék jellemzése.....	31
3.16. Sejtfelvételi vizsgálatok	32
3.17. Sejtfelvételi mechanizmusok vizsgálata	32
3.18. Mikroszkópos vizsgálatok (TEM, SEM, AFM)	33
3.19. Erőmérés optikai lézercsipesszel	34
3.20. <i>In vivo</i> kísérletek	34
3.21. Statisztikai kiértékelések.....	35
4. Eredmények.....	36
4.1. Az agyi gyógyszerbejuttatás vizsgálatára használt sejttenyészetes modellek összehasonlítása	36
4.1.1. Morfológia és vér-agy gát funkciós vizsgálatok (<i>Hellinger és mtsai., 2012</i>)	36

4.1.2. Morfológiai, génexpressziós és gyógyszerátjutás vizsgálatok (<i>Veszelka és mtsai., 2018</i>)	42
4.2. Vér-agy gát károsodások patológiás modellekben és védő anyagok vizsgálata	52
4.2.1. Karbonil stressz károsító hatása és kivédése agyi endotélsejtekben (<i>Tóth és mtsai., 2014a; Tóth és mtsai., 2014b</i>)	52
4.2.2. Krónikus immobilizációs stressz hatása a vér-agy gátra (<i>Sántha és mtsai., 2016</i>)	57
4.2.3. Hipertrigliceridémia hatása a vér-agy gátra (<i>Hoyk és mtsai., 2018</i>).....	64
4.3. A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata	68
4.3.1. A vér-agy gát permeabilitásának fokozása a paracelluláris transzportútvonal célzásával (<i>Bocsik és mtsai., 2016; Dithmer és mtsai., 2017; Walter és mtsai., 2015</i>)...	68
4.3.2. A vér-agy gát transzcelluláris útvonalának célzása nanorészecskékkel	76
4.3.2.1. Az agyi endotélsejtek receptor-mediált transzcitózis útvonalának célzása nanorészecskékkel (<i>Topal és mtsai., 2021</i>)	76
4.3.2.2. Az agyi endotélsejtek adszorptív-mediált transzcitózis útvonalának célzása nanorészecskékkel (<i>Szecskó és mtsai., 2025</i>)	79
4.3.2.3. Az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalának célzása egyszeresen jelölt nanorészecskékkel (<i>Veszelka és mtsai., 2017; Fekete és mtsai., 2021; Porkoláb és mtsai., 2024</i>)	84
4.3.2.4. Az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalának célzása kétszeresen jelölt nanorészecskékkel (<i>Mészáros és mtsai., 2018; Porkoláb és mtsai., 2020; Mészáros és mtsai., 2023</i>)	92
4.3.2.5. Az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalának célzása háromszorosan jelölt nanorészecskékkel (<i>Veszelka és mtsai., 2022</i>)	104
5. Kutatási eredmények összefoglalása	108
5.1. A vér-agy gát vizsgálatára alkalmas sejtenyésztes modellek összehasonlítása ...	108
5.2. A vér-agy gát sérülésének vizsgálata különböző betegségek modelljeiben	110
5.3. Új stratégiák vizsgálata a vér-agy gáton keresztüli hatóanyag bejuttatás növelésére	113
6. További kutatási irányok és tervek	121
7. Irodalomjegyzék	123
8. Saját közlemények jegyzéke.....	137
8.1. Az értekezés alapját képező válogatott közlemények.....	137
8.2. További, az értekezés alapját nem képező, de az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények a PhD fokozat megszerzése óta	140
9. Köszönetnyilvánítás	146

Rövidítések jegyzéke

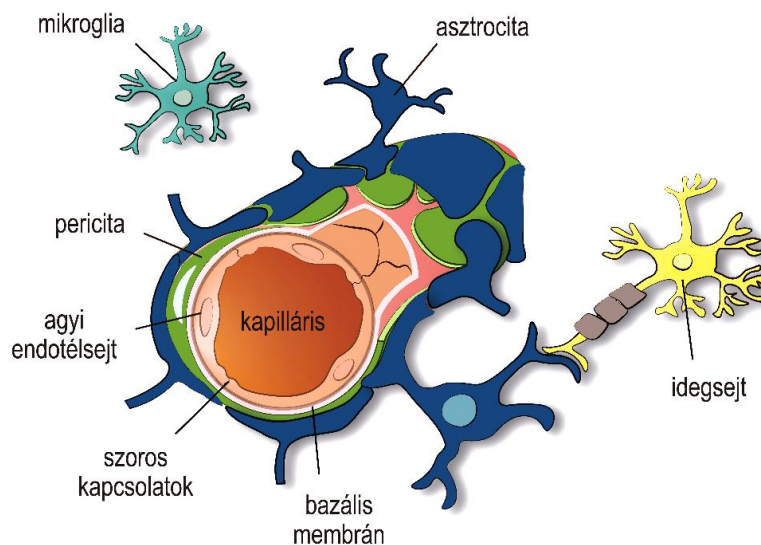
A	alanin
ABC	transzporter, ATP-kötő kazetta szállítófehérje
ADME	adszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkréció
AFM	atomerő-mikroszkópia
AGE	glikációs végtermék (advanced glycated end product)
ANOVA	varianciaanalízis
APOB-100	apolipoprotein B-100
ATP	adenozin trifoszfát
β-KAT	β-katenin adherens junkció fehérje
BCRP	emlőrák rezisztencia fehérje, ABCG2 pumpa
BSA	borjú szérum albumin
cPT-cAMP	8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát
Caco-2	humán bélepitél sejtvonala
CAT1	kationos aminosav transzporter
CI	sejtindex
CNS	központi idegrendszer
Da	dalton
DAF	4-amino-5-metil-amino-2',7'-difluoro-fluoreszcein-diacetát
DCFDA	klorometil-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék
Dnáz I	dezoxiribonukleáz I
DPPE	N,N-dietyl-2-(4-(fenilmetil)fenoxi)etánamin [generikus neve: tezmilifen]
EBA	albuminhoz kötött Evans kék festék
ECL	extracelluláris hurok
EM	elektronmikroszkópos
EPA	endotélsejtek, periciták és asztroglia sejtek hármas ko-kultúrája
ER	endoplazmás retikulum
ESAM	endoteliális sejtadhéziós molekula
FBS	foetalis borjú szérum
g	gyorsulás
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje
GLUT-1	glükóz-transzporter-1
GP	glükopiranóz
GP8	patkány agyi endotél sejtvonala
GSH	glutation
HC	hidrokortizon
hCMEC/D3	humán agyi endotél sejtvonala
hEC	humán agyi endotél sejtvonala
JAM	junkcionális adhéziós molekulák
KLDN-5	klaudin-5
L	leucin
LAT-1	nagy neutrális aminosavakat szállító fehérje 1-es típusa
LC-MS/MS	kapcsolt tandem tömegspektrometria
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
LRP	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanin
MCT	monokarbonsav transzporter

MDCK	kutya veseepítél sejtvonala
MDCK-MDR1	MDR1 transzfektált kutya veseepítél sejtvonala
MW	moláris tömeg (g/mol)
mM	millimólos koncentráció
μM	mikromólos koncentráció
m/V	vegyesszázalék
MRP	multidrog rezisztencia fehérje (ABCC transzporter család)
NFκB	nukleáris faktor-kappa B transzkripció faktor
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NP	nanopartikulum
Occl	okludin
OCT	szerves kation transzporter
PBS	foszfát puffer oldat
PDI	polidiszperzitási index
PDS	borjú vérplazmából készített szérum
P	valószínűség
P _{app}	látszólagos permeabilitási együttható
P-gp	P-glikoprotein (ABCB1 pumpa, MDR1)
qPCR	kvantitatív polimeráz-láncreakció
R123	rodamin 123
R _n	a sejtek és az elektród között mért impedancia
R _b	háttér impedancia
RAGE	glikációs végtermék receptor
RBEC	patkány primer agyi endothelsejt
RBE4	patkány agyi endotélsejt vonal
ROS	reaktív oxigéngyökök
RT-PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SH-SY5Y	humán neuroblasztóma sejtvonala
SLC	tápanyagszállító transzporterek (solute carriers)
SVCT	nátrium-aszkorbinsav ko-transzporter
SD	az átlag szórása (standard deviáció)
SEM	az átlag hibája (standard error of the mean)
SF	nátrium-fluoreszcein
SLC	tápanyagszállító fehérjék
TEER	transzendoteliális elektromos ellenállás
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
TJ	szoros sejtkapcsolatok (tight junctions)
TNF-α	tumor nekrosis faktor-α
TR-BSA	Texas-vörös festékkel jelölt borjú szérum albumin
V _A	abluminális térfogat
V _L	luminális térfogat
VB-Caco-2	vinblasztinnal szelektált humán Caco-2 bélepitél sejtvonala
VEGF	érendoteliális növekedési faktor
VE-kadherin	érendotélsejt-kadherin
ZO	zonula occludens fehérjék

1. BEVEZETÉS

1.1. A vér-agy gát jelentősége és szerkezeti felépítése

A vér-agy gát a vérkeringés és az agyszövet közötti dinamikus határfelület, melynek elsődleges feladata a neuronok működéséhez szükséges ionos homeosztázis megteremtése, az agy táplálása és káros anyagokkal szembeni védelme (Veszelka és mtsai., 2011; Campos-Bedolla és mtsai., 2014). A vér-agy gát anatómiai alapját az agyi hajszálerek falát alkotó endotélsejtek képezik, melyek a kapilláris bazális membránján a pericitákkal osztozkodnak (1. ábra). Az agyi mikroereket kívülről az asztroglia végtalpak teljes hosszukban beburkolják (1. ábra). Az agyi endotélsejtek az asztrogliákkal, pericitákkal, és más szomszédos sejtekkel, mint a perivaszkuláris mikrogliákkal és neuronokkal közösen egy funkcionális egységet alkotnak, melyet neurovaszkuláris egységnek nevezünk (Abbott és mtsai., 2006).

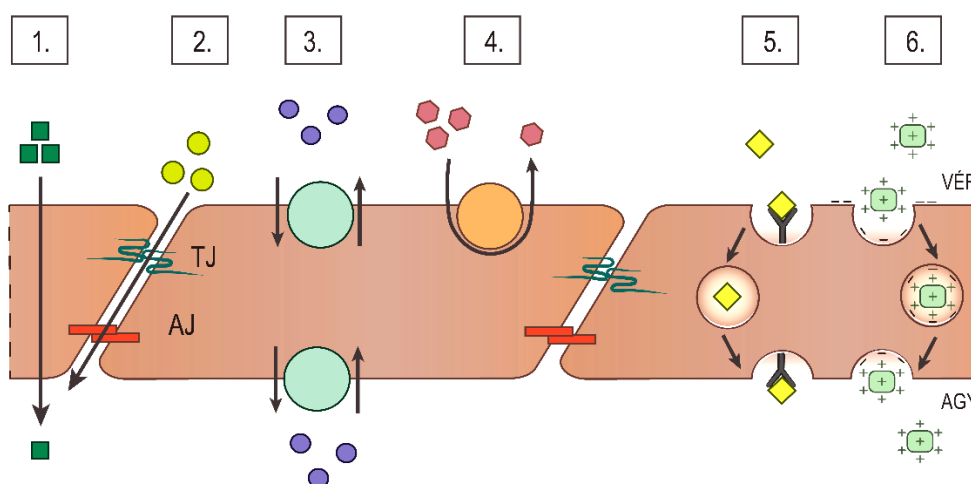


1. ábra. A vér-agy gát szerkezete (Abbott és mtsai., 2006 alapján).

A vér-agy gát morfológiai alapját az agyi endotélsejtek folytonos rétege képezi, amelyek a perifériás erekkel ellentétben nem fensztráltak, hanem szoros (tight junctions, TJ) és adherens (adherent junctions, AJ) sejtközötti zárókapcsolatokkal kapcsolódnak egymáshoz. Ezek a TJ-k jelentősen korlátozzák a sejtek közötti, azaz paracelluláris transzportot még a kis ionok, például a Na^+ és a Cl^- mozgását is, így a transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER), amely perifériás kapillárisokban jellemzően $2\text{--}20 \Omega \times \text{cm}^2$, az agyi endotéliumban *in vivo* $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$ is lehet (Profaci és mtsai., 2020; Veszelka és mtsai., 2011). A TJ-eket olyan integrális membránfehérjék építik fel, mint az okkludin, a klaudinok és a jukcionális adhíziós molekulák (JAM), amelyek perifériás membránfehérjékkel kapcsolódnak az aktin citoszkeletonhoz. E perifériás fehérjék tagjai a zonula occludens fehérjék (ZO-1, ZO-2, ZO-3), a cingulin és a kateninek (Deli és mtsai., 2005). Az adherens kapcsolatok transzmembrán fehérjéi, a cadherine, kalciumfüggő

sejtdhéziós molekulák, melyek citoplazmatikus részükkel más fehérjékhez, főleg kateninekhez kapcsolódnak.

Az agyi endotélsejtek számos, a perifériás endotélsejtekre is jellemző tulajdonsággal rendelkeznek. A vér és a szövetek között elhelyezkedve szabályozzák többek között a vérárvadást, az értónust és az agyi keringést vasoaktív anyagok (endotelinek, nitrogén-monoxid) termelésével, a lipoprotein metabolizmust és transzportot scavenger receptoraik segítségével. A vér-agy gát funkció betöltéséhez azonban az agyi endotélsejtek speciális tulajdonságokkal is rendelkeznek, melyek megkülönböztetik őket a többi endotélsejtől (Deli és Joó, 1996). A sejtek közötti szoros zárókapcsolatok nem csak a restriktív paracelluláris transzportnak, hanem az agyi endotélsejtek polaritásának alapját is megteremtik. Ezért eltérő az agyszövet, illetve a vér felőli sejtmembránokon a transzporterek, ioncsatornák, receptorok kifejeződése (Abbott és mtsai., 2006). Az idegrendszer sejteinek működéséhez szükséges anyagok (glükóz, aminosavak, purinok, vas, lipidek, vitaminok stb.) átvittatását a vér-agy gáton át az agyi endotélsejtek speciális transzportrendszerei végzik szigorúan szabályozott módon (Abbott és mtsai., 2006; Veszelka és mtsai., 2011; Veszelka és mtsai., 2015) (2. ábra). Ugyanezek a transzportrendszerek felelősek azonban azért is, hogy a vér-agy gáton át számos gyógyszerhatóanyag egyáltalán nem, vagy csak korlátozott mennyiségben jut be az agyba, ami terápiás szempontból nem elég hatékony.



2. ábra. Transzportútvonalak a vér-agy gáton. 1: lipid-mediált diffúzió, 2: paracelluláris útvonal, 3: karrier-mediált transzcitózis, 4: efflux pumpák, 5: receptor-mediált transzcitózis, 6: adszorbtív-mediált transzcitózis. TJ: szoros sejtkapcsoló struktúrák; AJ: adherens sejtkapcsoló struktúrák (Abbott, 2006 alapján).

A vér-agy gáton keresztüli anyagtranszport számos különböző transzportútvonalon valósul meg: paracelluláris transzport, lipid-mediált diffúzió, adszorptív-mediált transzcitózis, receptor-mediált transzcitózis, efflux pumpák és karrier-mediált transzport (2. ábra) (Veszelka és mtsai., 2015).

A 400-500 Da-nál kisebb molekulatömegű anyagok, melyek lipofilek, poláris felszínük nem haladja meg a $80 \text{ \AA}^2$ -öt, 6-nál kevesebb hidrogénkötéssel rendelkeznek, mint például a nikotin vagy az etanol lipid-mediált szabad diffúzióval (2. ábra, 1. útvonal) jutnak át a vér-agy gáton (Pardridge és mtsai., 2012). Az agyi endotélsejtek közötti TJ-k megakadályozzák a vízdoldékony molekulák sejtek közötti (paracelluláris) áramlását (2. ábra, 2. útvonal). A TJ-eket alkotó transzmembrán fehérjék (okkludin, klaudinok, junkcionális adhéziós molekulák) közül a vér-agy gát szempontjából domináns szerepe van a klaudin-5 fehérjének (Hashimoto

és mtsai., 2023). Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a klaudin-5 fehérje szintje csökken és a sejtmembránban való megfelelő elhelyezkedése is megváltozik számos központi idegrendszeri betegségben (Sweeney és mtsai., 2019).

Az agy fiziológiás működéséhez nélkülözhetetlen tápanyagok (cukrok, ketontestek, aminosavak, zsírsavak, vitaminok, monokarbonsavak, nukleozidok, purinok és pirimidin bázisok, szervetlen ionok, szerves anionokat és kationok) bejutását az agyba a vér-agy gáton át specifikus szállítófehérjék, karrierek (2. ábra, 3. útvonal) végzik (*Campos-Bedolla és mtsai., 2014*). Ezek közül a vér-agy gáton nagy mennyiségben fejeződnek ki a solute carrier (SLC) fehérjecsalád tagjai, melynek több mint 400 tagja van (Enerson and Drewers, 2006). Az SLC-k koncentrációgrádiénstól függő, facilitált vagy ion-cserélt transzporterek, melyek működésükhöz ATP-t nem igényelnek (*Campos-Bedolla és mtsai., 2014*). Ezek között az SLC transzporterek között találhatjuk például a glükózt szállító hexóz transzporter GLUT1 (SLC2A1), a monokarbonsav transzporter MCT1 (SLC16A1), a bázikus aminosavakat szállító CAT1 (SLC7A1), vagy a nagy neutrális aminosavakat szállító LAT1 (SLC7A5 heterodimer) szállítófehérjéket. Egyes vitaminok (pantoténsav, biotin, liponsav) szállításáért a Na⁺-függő multivitamin transzporter SMVT (SLC5A6) felelős, míg a C-vitamin szállítását részben a nátrium-aszkorbát ko-transzporter SVCT (SLC23A2) végzi, oxidált formáját pedig a GLUT1 szállítja a vér-agy gáton át (*Campos-Bedolla és mtsai., 2014*). Egyes kismolekulájú gyógyszerek, mint például a Parkinson-kór kezelésében használt dopamin prekursor L-DOPA, az antiepileptikum gabapentin, az izomrelaxáns baclofen, a bipoláris zavarban alkalmazott valproát is a LAT1 transzporter segítségével képesek átjutni a vér-agy gáton és bejutni az agyszövetbe (Banks, 2009; *Veszelka és mtsai., 2018*).

A központi idegrendszerre potenciálisan káros idegen anyagok (xenobiotikumok) agyi bejutásának megakadályozása, illetve a különböző anyagcseretermékek szintjének szabályozása az agyi endotélsejtek membránjában üllő efflux pumpák (2. ábra, 4. útvonal) segítségével valósul meg (Abbott, 2006). Az efflux pumpák többsége az ATP-kötő kazetta (ABC)-transzporterek családjába tartozik, működésük ATP hidrolíziséből származó energia segítségével valósul meg. Ezek a fehérjék képesek szubsztátjaikat az agyi endotélsejtekből a vérbe visszampumpálni, vagy az agyból a vérbe kipumpálni (Terasaki és Ohtsuki, 2005). A különböző neurotranszmitterek, aminosavak és más szerves anionok kipumpálásával a vér-agy gát efflux pumpái az agy számára fontos méregtelenítő szerepet töltenek be. A legfontosabb efflux pumpák közé tartozik a P-glikoprotein (P-gp vagy ABCB1 vagy MDR1), a multidrog rezisztencia-asszociált fehérjék (MRP-k vagy ABCC család), illetve az emlőrák-rezisztencia fehérje (BCRP vagy ABCG2) (Löschner és Potschka, 2005). Számos lipofil gyógyszerhatóanyag ligandja a vér-agy gát efflux pumpáinak, mint például a loperamid, verapamil vagy a vinblasztin, így ezek nem képesek hatékony koncentrációban az agyba jutni (Deli, 2011).

Az idegrendszer számára fontos peptidek és fehérjék az agyi endotélsejtek membránjába kötött specifikus receptorok segítségével jutnak be az agyba (Abbott, 2006). Receptor-mediált transzcitózissal (2. ábra, 5. útvonal) jut át a vér-agy gáton az agyba például az inzulin, a transferrin, a ghrelin, leptin, lipoproteinek, egyes hormonok és a citokinek (Deli, 2011).

Az agyi endotélsejtekben alacsony az endocitotikus vezikulák száma, ezáltal a nem-specifikus vezikuláris transzcitózis mértéke is kisebb, mint a perifériás endotélsejtekben (Pardridge, 2002). A nagy méretű, töltéssel rendelkező anyagok, mint például a szérumfehérjék közül az albumin agyi bejutása adszorptív-mediált transzcitózissal (2. ábra, 6. útvonal) élettani körülmények között igen alacsony, fokozott agyi bejutása a vér-agy gát sérülésére utalhat (Abbott, 2006).

Az agyi kapillárisok endotélsejtjeinek lumenális, vér felőli felszínén a membránban található glikolipidek, glikoproteinek, illetve heparánszulfát-proteoglikánok oldalláncai

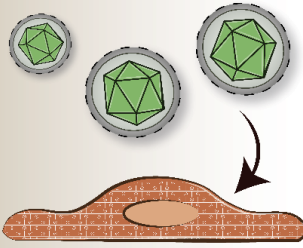
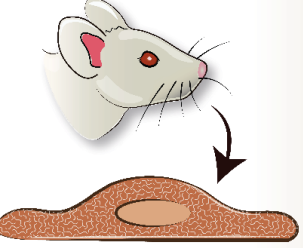
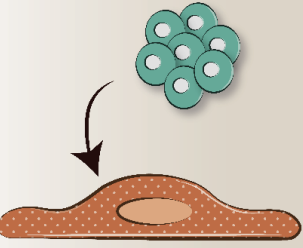
negatív felszíni töltésű glikokalix réteget hoznak létre, amely, mint egy elektrosztatikus gát, megakadályozza az erősen anionos molekulák vér-agy gáton való átjutását (Hervé és mtsai, 2008; Walter és mtsai, 2021).

Az agyi endotélsejtek számos enzimet is termelnek (fázis I, II enzimek, γ -glutamil-transzpeptidáz, butirilkolin- és acetilkolin- észteráz, monoamin-oxidázok, glutamát-dekarboxiláz), ezáltal fontos transzport folyamatokban, illetve a metabolikus vér-agy gát kialakításában is szerepet játszanak (Deli, 2011).

1.2. A vér-agy gát modellezése sejtenyészetekkel

A klinikai alkalmazásban lévő központi idegrendszeri (CNS) hatóanyagok alacsony számának egyik meghatározó oka a gyenge farmakokinetika (Banks, 2016), másik fő oka pedig, hogy a legtöbb gyógyszer vér-agy gáton való penetrációja korlátozott (Pardridge, 2015). Ezért az új neurofarmakonok kifejlesztése és bevezetése elmarad más gyógyszerceportokétól. A gyógyszerfejlesztés során megbízható módszerekre és modellekre van szükség a gyógyszerjelöltek vér-agy gát penetrációjának szűrésére, annak megállapítására, hogy egy periférián ható anyag nem lépi-e át a vér-agy gátat, mellyel központi idegrendszeri mellékhatásokat okozhat, illetve egy CNS célpontú hatóanyag valóban bejut-e az agyba (Veszelka és mtsai., 2018).

A vér-agy gát modellek számos típusa létezik az *in silico* megközelítésektől az *in vivo* vizsgálatokig (Vastag és Keseru, 2009; Veszelka és mtsai., 2011; Avdeef és mtsai., 2015, Deli és mtsai., 2024). A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban 1971-ben csoportunk alapítója, Prof. Joó Ferenc indította el a vér-agy gát vizsgálatával és modellezésével foglalkozó nemzetközi szintű kutatásokat, melyeket kutatócsoportunk azóta is folytat. Az ő nevéhez fűződik az első agyi endotélsejtes tenyészetek megalkotása is (Panula és mtsai., 1978). Az azóta eltelt 50 év alatt a továbbfejlesztett *in vitro* vér-agy gát modellek széles körben használt és értékes eszközeivé váltak a központi idegrendszert érintő preklinikai vizsgálatoknak (3. ábra).

IMMORTALIZÁLT SEJTVONALAK	PRIMER SEJTEK	ÖSSEJT EREDETŰEK
		
ELŐNYÖK	ELŐNYÖK	ELŐNYÖK
- Egyszerű tenyésztés - Költséghatékonyság - Skálázható	- Erős és komplex gáttulajdonságok - Endotél tulajdonságok	- Skálázható humán alternativa - Személyreszabott terápia lehetősége
HÁTRÁNYOK	HÁTRÁNYOK	HÁTRÁNYOK
- Gyenge gáttulajdonságok az immortalizáció miatt - Faji különbségek - Vér-agy gát funkciók elvesztése	- Költséges - Magas szakértelmet kíván - Faji különbségek és beszerzési nehézségek	- Költséges - Magas szakértelmet kíván - Epitél és endotélsejtes tulajdonságok keveredése - Gyengébb gáttulajdonságok (differenciáció protokolltól függően)

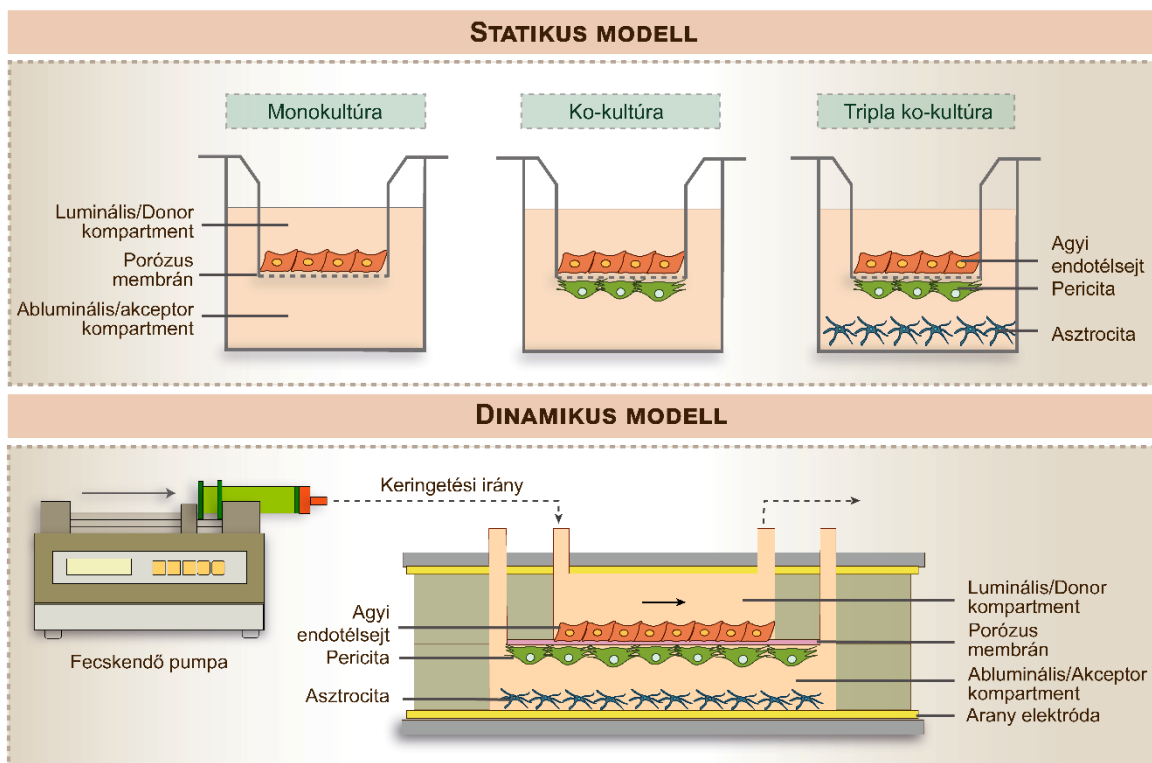
3. ábra. A vér-agy gát modellezésére használt három fő sejtípus (Deli és mtsai., 2024 alapján)

A különböző *in vitro* modellek eltérő fajokból származó sejtvonalakat vagy állatokból izolált primer sejteket vagy összejt eredetű sejteket használnak (3. ábra).

Az immortalizációval előállított agyi endotélsejtvonalak közül eleinte a patkány GP8 (Greenwood és mtsai., 1996) és az RBE4 (Roux és mtsai., 1994), majd a humán hCMEC/D3 sejtek (Weksler és mtsai., 2005) voltak a legszélesebb körben elterjedt vér-agy gát modellek. Bár a paracelluláris gát nem erős ezekben a modellekben, a hCMEC/D3 sejtek esetében, lítium klorid kezeléssel, amely a Wnt/ β -katenin útvonalat aktiválja, növelni lehet a TJ fehérjék expresszióját és a vér-agy gát funkciókat (Weksler és mtsai., 2013). Az immortalizált agyi endotélsejtek előnye, hogy a sejtek gyorsan, egyszerűen és alacsony költségek mellett tenyésztethetők, a modellek könnyen felskálázhatóak. Hátrányuk viszont, hogy a sejtek számos fontos, az agyi endotélsejtekre jellemző élettani tulajdonságaikat elveszítik, így gyenge gáttulajdonságokkal rendelkeznek (3. ábra) (Veszelka és mtsai., 2011).

A primer sejt modellek számos fajból, leggyakrabban egér, patkány, sertés vagy borjú agyból izolált sejtek tenyésztésén alapulnak. A primer sejtek tenyésztésében fontos mérföldkő volt a porózus membránokat tartalmazó tenyésztőbetétek bevezetése, melyen először csak monokultúrában tenyésztették a sejteket (4. ábra) (Bowman és mtsai., 1883).

A két folyadékkompartment segítségével lehetővé vált az érrendszer (luminális) és az agy felőli oldal (abluminális) modellezése, ezáltal permeabilitási vizsgálatok, majd később pedig megfelelő elektródok alkalmazásával TEER mérések elvégzése (Deli és mtsai., 2024). Mivel a primer agyi endotélsejtek könnyen elveszítik az egyedi fenotípusukat, különösen, ha monokultúrában tartják őket, a vér-agy gát modellek következő generációjában az agyi endotélsejteket asztroglia sejtekkel együtt növesztették ko-kultúrában (Dehouck és mtsai., 1990), majd később agyi pericitákkal is együtt tenyésztették (Nakagawa és mtsai., 2009), ami jelentősen szorosabb és jobb gátfunkciókkal rendelkező megbízhatóbb vér-agy gát modellt eredményezett (4. ábra) (Avdeef és mtsai., 2015).



4. ábra. A vér-agy gát modellezésére alkalmas statikus és dinamikus modellek.

A primer agyi kapilláris sejtek erős gáttulajdonságokkal rendelkeznek, azonban nehezen beszerezhetők, rosszul skálázhatók, izolálásuk és tenyésztésük pedig költséges és magas szakértelemet igényel (3. ábra) (Veszelka és mtsai., 2011; Avdeef és mtsai., 2015; Helms et al., 2016). Mivel a költségek és az *in vitro* modell kapacitása fontos tényező az ipari gyógyszeresztelések során, ezért epitelsejteken alapuló monokultúras modelleket is használnak a gyógyszeriparban a CNS gyógyszerjelöltek permeabilitásának előrejelzésére, mely modellek gyorsan és nagy mennyiségben előállíthatók (Vastag és Keseru, 2009).

Az egyik legelterjedtebb epitelsejtes modell a Caco-2 humán bélhámsejtvonal, amely vastagbél adenokarcinómából származik és elsősorban a vékonybélben történő felszívódás modellezésére használják. A Caco-2 modell szoros gátat képez, ezért a passzív diffúzióval felszívódó vegyületek vizsgálatára alkalmas, mint vér-agy gátat helyettesítő modell (Hellinger és mtsai., 2012). A Caco-2 modell hátránya, hogy alacsony P-gp kifejeződést mutat, ezért együttműködő partnereink vinblasztin szelekciós kezeléssel kifejlesztettek egy magas P-gp expressziót mutató VB-Caco-2 modellt (Hellinger és mtsai., 2010). A gyógyszeriparban és a kutatásokban a gyógyszerpenetráció vizsgálatára használatos még a Madin-Darby kutyavese (MDCK) sejtvonal és ennek a humán *MDR1* génnel transzfektált szubklónja, az MDCK-MDR1 sejtvonal. Passzív diffúziós gyógyszerek tesztelésében az MDCK és az MDCK-MDR1 megfelelő modelleknek bizonyultak gyógyszerjelöltek permeabilitásának előrejelzésére (Garberg és mtsai., 2005).

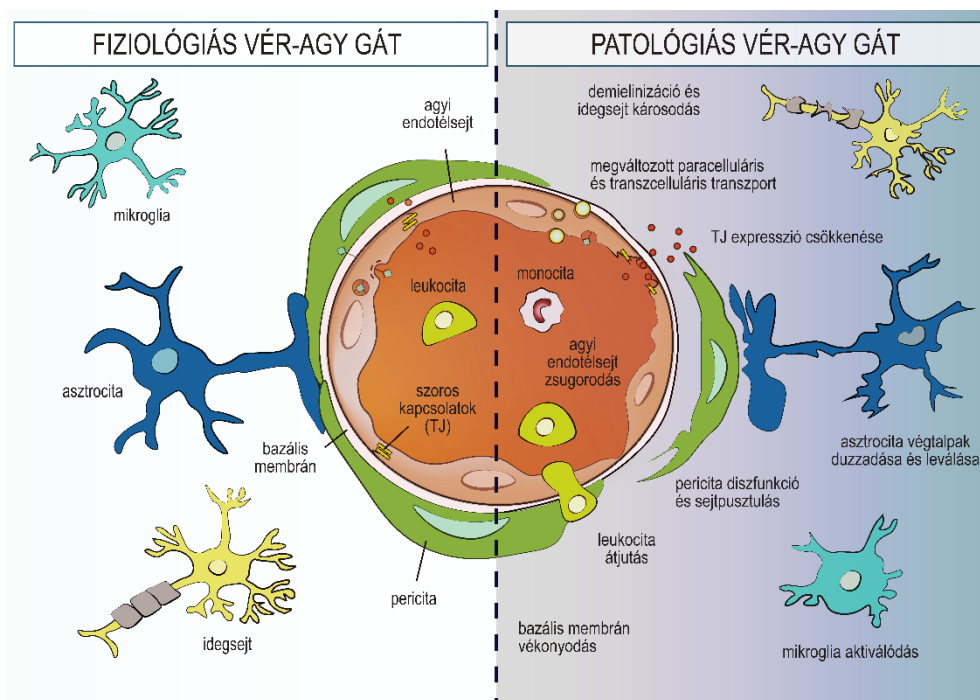
Jelentős előrelépés a vér-agy gát kutatások területén a humán modellek kifejlesztése olyan agyi endotelsejtek felhasználásával, amelyeket indukált pluripotens őssejtekből (Lippmann és mtsai., 2012), vagy köldökszinórvérből származó, CD34⁺ hematopoietikus őssejtekből differenciáltatnak (Cecchelli és mtsai., 2014; Porkoláb és mtsai., 2024). Az őssejtmodellek hátránya, hogy a tenyésztésükhöz magas szakértelem szükséges, illetve a jelenlegi differenciációs protokollok mellett eddig még nem sikerült ötvözni a valódi endotelsejt tulajdonságokat az erős gáttulajdonságokkal (Porkoláb és mtsai., 2024). Ugyanakkor a betegekből kinyert őssejtekből alkotott modellek lehetőséget adhatnak a személyre szabott orvoslásnak is (3. ábra) (Deli és mtsai., 2024).

Bár jelen értekezésben a vér-agy gát modellek chip típusait nem érintem, mégis fontosnak tartom röviden megemlíteni a sejtenyészetes modellek ezen típusát is, mely területen kutatócsoportunk is évek óta dolgozik (Walter és mtsai., 2016). A vér-agy gát kutatás egyik fontos területe a mikrofluidikai eszközök, chip modellek használata (Deli és mtsai., 2024). Ezek a chip eszközök a folyadékáramlás lehetőségével a fiziológiához hasonló körülményeket biztosítanak. A statikus kultúrával ellentétben ezekben a dinamikus *in vitro* vér-agy gát modellekben (4. ábra) az endotelsejtek a folyadék áramlása által kiváltott nyírófeszültségnek vannak kitéve, ami a gátfunkciók egyik fontos szabályozója (Walter és mtsai., 2016). A dinamikus modellekben magasabb TEER és alacsonyabb permeabilitás érhető el, bár az egyes modellek nehezen összehasonlíthatóak (Deli és mtsai., 2024). Ezen előnyök ellenére, a dinamikus *in vitro* modelleket még nem fogadták el széles körben CNS gyógyszerjelöltek permeabilitásának előrejelzésére a gyógyszeriparban.

A preklinikai kutatások korai szakaszában használt és fentebb részletezett *in vitro* modellek csak részben képesek tükrözni a humán vér-agy gát működését. A különböző fajokból származó modellek jelentős különbségeket mutatnak a terápiás célpontként szolgáló sejtfelszíni receptorok és traszporterek, valamint a hatóanyagok agyi bejutását gátló efflux pumpák expressziójában, illetve az anionos gyógyszer-molekulák számára elektrosztatikus gátat alkotó glikokalix réteg esetében (Uchida és mtsai., 2020, Veszelka és mtsai., 2018). Ezért nagy szükség van az emberi vér-agy gát komplexitását a lehető legjobban megközelítő sejtenyészetes modellek kidolgozására, melyek a kutatások korai fázisában megbízható módon jelezik előre egy hatóanyag lehetséges terápiás sikerét a klinikumban.

1.3. A vér-agy gát szerepe betegségekben

Egyre több preklinikai és klinikai bizonyíték van arra, hogy az agyi mikropillárisok sejtjeiben és a környező idegszövet sejtjeiben, vagyis a neurovaszkuláris egység szintjén történő kóros elváltozások másodlagos neuronális sérülések és neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezethetnek (Zhao és mtsai., 2015, Profaci és mtsai., 2020). A vér-agy gát működési zavarait ismerték fel többek között neurodegenerációs kórképekben (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór), szklerózis multiplexben, agyi traumákban, epilepsziában és sztrókban is. A központi idegrendszeri betegségek patológiájának központi eleme a vér-agy gát működési zavara, mely hipoperfúzió-hypoxia kialakulásához, a transzcitózis megváltozásához és az endotélsejtek metabolikus diszfunkciójához vezet (Zhao és mtsai., 2015; Knox és mtsai., 2022) (5. ábra). Az idegsejtek energiaellátása csökken, a szoros sejtkapcsoló struktúrák sérülnek, a neurotoxikus anyagok bejutása megemelkedik az agyba, és a káros metabolitok kifelé irányuló transzportja csökken (Zhao és mtsai., 2015; Sweeney és mtsai., 2019). A vér-agy gát GLUT1 szállítófehérjén keresztüli glükóztanszport megváltozása görcsrohamok kialakulásához vezethet (Seidner és mtsai., 1998), a LAT1-en keresztüli aminosavtranszport megváltozását autizmus spektrumbetegségben igazolták (Tarlungeanu és mtsai., 2016), az MCT8 pajzsmirigyhormon transzportjának a vér-agy gáton keresztüli diszfunkciója pszichomotoros retardációs szindrómához vezethet (Vatine és mtsai., 2017), de a transzporterek diszfunkciójához köthető rendellenességek sora még hosszan folytatható. Az agyi endotélsejttekkel közös bazális membránon osztozkodó periciták károsodása megnöveli a vér-agy gáton keresztüli nem specifikus transzcitózis mértékét és a leukocita adhézións molekulák expressziójának növekedéséhez vezet, mely gyulladásos folyamatokat indít be, glia aktiválódáshoz és pro-inflammatorikus citokinek szekrécióját eredményezi (Armulik és mtsai., 2010). A vér-agy gát károsodása ionszabályozási zavarokat okozhat, amely ödéma kialakulásához, megnövekedett intrakraniális nyomáshoz és neuronális degenerációhoz, sejtpusztuláshoz vezethet (Zhao és mtsai., 2015; Profaci és mtsai., 2020).



5. ábra. A vér-agy gát károsodása patológiás körülmények között (Knox és mtsai., 2022 alapján).

A vér-agy gát károsodása jelentős iszkémiás sztrók patológiájában is, amelynek következménye a TJ-komplexek megváltozása, a transzportfehérjék és az endocitotikus transzport mechanizmusok módosulása következtében létrejövő permeabilitás növekedés, ami súlyos klinikai következményeknek, például a hemorrágiás transzformációnak az előfutára is lehet (Abdullahi és mtsai., 2018).

A vér-agy gát károsodása során mátrix metalloproteináz enzimek szabadulnak fel, melyek a TJ-fehérjék lebontásáért közvetlenül felelősek (Yang és mtsai., 2011). Számos TJ fehérje, mint a kladin-5, okkludin és ZO-1 fehérjék expressziós szintje csökken, és/vagy lokalizációja megváltozik, ami a gátfunkció károsodásával jár. Ezzel párhuzamosan az adherens junkciók is sérülnek a VE-kadherineknemennyiségének csökkenése miatt (Abdullahi és mtsai., 2018). Az integrinek szintén jelentős szerepet játszanak a vér-agy gát degradációjában. Fiziológias körülmények között az integrinek kölcsönhatásba lépnek a bazális membrán alkotóelemeivel (pl. kollagén IV, fibronectin, laminin, perlekán), ezáltal szabályozzák a vér-agy gát permeabilitását. A vér-agy gát károsodásakor az integrinek gyorsan degradálódnak, ami ödémához, gyulladásához ezáltal a károsodások súlyosbodásához vezet (Abdullahi és mtsai., 2018). A felszabaduló gyulladásos faktorok (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6) hatására enzimek aktiválódnak, melyek számos vér-agy gát fehérje foszforilációját okozva jelentős károsodást okoznak. Az intercelluláris (ICAM-1) és a vaszkuláris sejtadhéziós molekulák (VCAM-1) kifejeződése is jelentős mértékben megnő, melyek a fehérvérsejtek felszíni ligandjaihoz kötődve elősegítik az aktivált leukociták átjutását a vér-agy gáton és bejutását a központi idegrendszerbe fokozva ezzel a neuroinflammációt (Abdullahi és mtsai., 2018). Mivel számos központi idegrendszeri betegség patológiájának egyik kulcstényezője a vér-agy gát sérülése, ezért az agyi endotélsejtek és a gátfunkciók megóvása kiemelt fontosságú cél a terápiás kezelésekben (Sweeney és mtsai., 2016).

A vér-agy gát működési zavarait azonban nemcsak központi idegrendszeri kórképekben, hanem más betegségekben, mint például cukorbetegségben is kimutatták már (Prasad és mtsai., 2014). Dibéteszben nemcsak a perifériás mikroerek károsodnak, hanem az agyi hajszálerekben a vér-agy gát is zavart szenved. A cukorbetegség volt az első olyan kórállapot, amely esetében igazolódott, hogy a reaktív karbonilgyökök, mint például a metilglioxál felhalmozódása sejtkárosodást okoz (Lapolla és mtsai., 2012). A metilglioxál károsító hatását számos más kórképben is kimutatták, mint például szív- és érrendszeri betegségek (Rabbani és mtsai., 2011), érelmeszesedés (Moheimani és mtsai., 2010), magas vérnyomás (Chang és mtsai., 2006), metabolikus szindróma (Liu és mtsai., 2011), pikkelysömör (Kaur és mtsai., 2013), öregedés (Beeri és mtsai., 2011), és Alzheimer-kór esetében (Angeloni és mtsai., 2014) is.

A metilglioxál egy erősen reaktív endogén metabolit, a glikolízis egyik végterméke, mely képes fehérjékkel és más biomolekulákkal reakcióba lépni. A reakció eredményeképpen glikációs végtermékek (AGE) képződnek, melyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a mikrovaszkuláris szövődmények kialakulásában (Rabbani és mtsai., 2011). Egyre több tanulmány mutatja ki a neurológiai rendellenességek és a kognitív funkciók, valamint az AGE-k közötti összefüggést (Spauwen és mtsai., 2015). A plazma emelkedett dikarbonilszintje és a hiperglikémia, összefüggésbe hozható kardiovaszkuláris megbetegedésekkel, sztrók esetében pedig előre jelzi annak rosszabb kimenetelét (Lamprea-Montealegre és mtsai., 2022; Rhein és mtsai., 2023). Ezenkívül az AGE-k mennyisége az agyban és a liquorban az életkor előrehaladtával növekszik, az Alzheimer-kórban (Ahmed és mtsai., 2005) és a szklerózis multiplexben (Wetzels és mtsai., 2017) szenvedőknél pedig még magasabb. A metilglioxál részt vesz a vér-agy gát integritásának károsodásában az 1-es típusú cukorbetegség modelljében patkányokban (Alomar és mtsai., 2016), és a

metilglioxál szint csökkentés mérsékli az infarktus méretét iszkémiás sztrók indukcióját követően egerekben (Lu és mtsai., 2023). Az egészséges szervezet fiziológiás körülmények között az erősen citotoxikus metilglioxált a glioxaláz rendszer és glutation segítségével igyekszik hatástalanítani (Berends és mtsai., 2023).

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. Habár a stressz az élet részét képezi és megfelelő mennyiségben pozitívan hathat a motivációra és a teljesítőképességre, az intenzív vagy hosszan tartó stresszhatás közismerten hozzájárul mind az idegrendszeri, mind a neuropszichiátriai rendellenesség kialakulásához (Chrousos, 2009). Számos epidemiológiai tanulmány igazolja, hogy a stressz összefüggésben áll a demencia és az idegrendszeri betegségek kialakulásának fokozott kockázatával, mint például az Alzheimer-kórral vagy pszichiátriai rendellenességek, mint skizofrénia, illetve depresszió kialakulásával (Najjar és mtsai., 2013).

Egyre több vizsgálat igazolja, hogy a krónikus stressz neurovaszkuláris diszfunkciót idéz elő, a szoros és az adherens sejtkapcsolatok fehérjéinek downregulációját okozza a vér-agy gáton, ami permeabilitás fokozódáshoz vezet, ezáltal elősegítve az agyi neuroinflammációt, neurodegenerációt, kognitív, affektív és viselkedési zavarokat, amelyek a stresszel kapcsolatos rendellenességeket jellemzik (Welcome és mtsai., 2020). A vér-agy gát károsodását írták le súlyos depressziós rendellenesség esetében (Dion-Albert és mtsai., 2022), szisztémás lupus erythematosus neuropszichiátriai tüneteiben (Mészáros és mtsai., 2012) és skizofréniában is (De Klerk és mtsai., 2011; Bechter, 2013). A vér-agy gát károsodása sokszor megelőzi ezeknek a betegségeknek a diagnózisát, ami arra utal, hogy a különböző stresszorok (pszichológiai, érzelmi, környezeti) vér-agy gátra gyakorolt hatásainak további vizsgálata fontos támpontokat adhat a stresszel összefüggő központi idegrendszeri betegségek prognosztikai markereinek azonosításához és a korai diagnózishoz (Welcome és mtsai., 2020).

Számos tanulmány vizsgálja, hogy a vaszkuláris demencia és az Alzheimer-kór közvetlen kapcsolatban áll az ateroszklerózissal, bár az összefüggés pontos részletei még kutatás tárgyát képezik (Li és mtsai., 2003). Az időskori kognitív hanyatlás gyakori kiváltó oka a kóros zsíryanycsere elváltozások (diszlipidémia) és ennek következményeként kialakuló ateroszklerózis (Huang és mtsai., 2021). Az ateroszklerózis, vagy érlemezésedés krónikus gyulladás, mely során a vérerek belső falán lerakódások, vagy plakkok alakulnak ki. A plakkokban alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL), oxidált lipoproteinek és koleszterin halmozódik fel (Huang és mtsai., 2021). A szérum-LDL-koleszterinszint megemelkedése érlemezésedés kialakulásához, hosszútávon pedig kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris rendellenességekhez vezethet.

Az apolipoprotein B-100 (APOB-100) egy nagyméretű glikoprotein (512 kDa), amely a plazmában kering, mint az LDL és a nagyon alacsony sűrűségű lipoproteinek (VLDL) fő fehérjekomponense. Az APOB-100 indukálta hiperlipidémia és ateroszklerózis nemcsak a szív és érrendszeri, hanem a cerebrovaszkuláris rendszert is érinti (Süle és mtsai., 2009; Martins és mtsai., 2009), ezáltal hozzájárul a neurodegeneratív betegségek kialakulásához (Martins és mtsai. 2009).

Számos vizsgálat kimutatta, hogy az APOB-100 koncentrációja emelkedett az Alzheimer-kóros betegek szérumában (Caramelli és mtsai., 1999; Sabbagh és mtsai., 2004), ami korrelál az amiloid- β lerakódással a betegek agyában (Kuo és mtsai., 1998). A koleszterin és az apolipoprotein felhalmozódást az érett amiloid plakkokban igazolták mind az Alzheimer-kóros betegek agyában, mind pedig állatmodellekben (Puglielli és mtsai.,

2003). Mivel az ateroszklerózis gyakran az agyi keringést ellátó artériákat is érinti, az általa okozott érrendszeri diszfunkció a vér-agy gát működési zavarához, gyulladásához, és az amiloid- β peptidek károsodott agyi kiürüléséhez vezet, majd végül neurovaszkuláris diszfunkcióval végződik (Stahr és Valkina, 2022).

A hiperkoleszterinémia és a hipertrigliceridémia hatására kialakuló ateroszklerózis okozta vér-agy gát károsodások vizsgálatára olyan transzgenikus egereket használtunk, amelyek a humán APOB-100 fehérjét túlermelik a különböző szövetekben, például a májban, a szívben és az agyban (Lénárt és mtsai., 2015; Hoyk és mtsai., 2018). Az LDL- és VLDL-frakciók HDL-hez viszonyított magasabb aránya e transzgenikus állatok vérében hasonló a humán plazma lipoprotein profiljához, ezért ez az egértörzs megfelelő modell a hiperkoleszterinémia és hipertrigliceridémia okozta cerebrovaszkuláris sérülések tanulmányozására (Csont és mtsai., 2007; Hohk és mtsai., 2018).

A fentebb említett példák is jól szemléltetik, hogy a vér-agy gát működési zavarai és annak hátterében álló pontos mechanizmusok az egyes betegségek kialakulásában és progressziójában, valamint a neurovaszkuláris egység sejtjeinek gyógyulásban betöltött szerepe kulcsfontosságú, intenzíven kutatott terület, amely még számos megválaszolatlan kérdést tartogat.

1.4. Az agyi gyógyszerbejuttatás hatékonyságának növelésére alkalmas módszerek

A vér-agy gát az agy egyik legfontosabb védelmi rendszere az idegen anyagokkal, (xenobiotikumokkal), patogén mikroorganizmusokkal és egyéb, a szisztémás keringésből származó inzultusokkal szemben. Azonban ugyanazok a mechanizmusok, amelyek a központi idegrendszert védik, a gyógyszerek agyba jutását is korlátozzák így a gyógyszerhatóanyagok jelentős része nem képes megfelelő mértékben átjutni a vér-agy gáton, ezért új gyógyszerbeviteli módszerek kidolgozására van szükség (Banks, 2016). A hatóanyagok agyi bejuttatására három főbb stratégia áll rendelkezésre (6. ábra): (1) a vér-agy gát megkerülése, (2) a vér-agy gát működésének megváltoztatása és (3) a vér-agy gát transzportútvonalaik kihasználása (Veszelka és mtsai., 2015).



6. ábra. Az agyi gyógyszerbejuttatás fokozásának lehetőségei (Veszelka és mtsai., 2015).

A vér-agy gát megkerülésének egyik lehetséges módja a hatóanyagok közvetlenül az agyi parenchímába vagy agyi folyadékterbe juttatása invazív eljárásokkal (6. ábra). Bár ez a közvetlen módszer viszonylag pontos dózis beadását teszi lehetővé és minimális szisztémás toxicitást okoz, a fertőzések magas kockázatával jár, speciális orvosi centrumokat és magas

szakértelmet igényel és nem praktikus olyan gyógyszerek esetében, amelyeket krónikusan kell adni. Ezenkívül a gyógyszerek rosszul szállítódnak a liquorból az agyba és az agyszöveten belüli lassú diffúzió is korlátozza az alkalmazott gyógyszerek hatékonyságát (Veszélka és mtsai., 2015; Deli., 2011).

A vér-agy gát megkerülésének másik, nem invazív lehetséges módja a hatóanyagok agyi bejuttatására a nazális útvonal, mely során az orrüreg hámrétegén át a hatóanyagok a szaglóhám idegsejtjeinek nyúlványai mentén képesek az agyba jutni (Illum, 2012). A nazális gyógyszerbevitel előnye, hogy könnyen kivitelezhető, gyors felszívódást biztosít és elkerülheti a máj és a vese úgynevezett „first pass” metabolizmusát, mely a gyógyszerek gyors eliminálásáért felelős (Veszélka és mtsai., 2015; Deli., 2011). Hátránya azonban, hogy az ornyálkahártya mukociliáris mechanizmusa akadályozza a hatóanyagok megfelelő felszívódását (Wolburg és mtsai., 2008), ezért ennek kivédésére mukoadhezív gyógyszerformulák fejlesztésére van szükség (Horvát és mtsai., 2009). Bár a nazális gyógyszerbevitel kapcsán végzett kísérleteim nem témája jelen értekezésemnek, mégis meg kell említenem, hogy együttműködő partnereinkkel számos eredményt közöltünk ezen a területen, mely során beállítottuk a nazális barrier epitelsejtes modelljét, mukoadhezív anyagokat vizsgáltunk, gyógyszerhatóanyagot (meloxicam) és nanopartikulumokat (NP) teszteltünk *in vitro* és *in vivo* modellekben (Katona és mtsai., 2021; Akel és mtsai., 2021; Horváth és mtsai., 2016; Kürti és mtsai., 2013; Kürti és mtsai., 2012; Sipos és mtsai., 2010; Horváth és mtsai., 2009).

Mivel az agyi endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsoló stuktúrák és az efflux pumpák a két fő vér-agy gát funkció, amelyek korlátozzák a gyógyszerek agyba jutását, a vér-agy gát megkerülése mellett a másik lehetséges agyi gyógyszerbeviteli stratégia ezen fehérjék módosítása (6. ábra) (Deli, 2011; Veszélka és mtsai., 2015; Deli, 2009). A TJ-k megnyitása fókuszált ultrahang segítségével (Carpentier és mtsai., 2016) és hiperozmotikus mannitollal (Neuwelt és mtsai., 2008) agydaganatos betegeknél a vér-agy gát átteresztőképességének átmeneti és reverzibilis növekedését és a kemoterápiás szerek agyba való jobb bejutását eredményezi. Saját kísérletes eredményeinkben mi is igazolni tudtuk, hogy rövid szénláncú alkilglicerolok (Hülper és mtsai., 2013) és specifikus TJ modulátor peptidek (Bocsik és mtsai., 2016) szintén képesek a vér-agy gát interendoteliális sejtkapcsolatainak reverzibilis megnyitását előidézni.

A vér-agy gát efflux pumpáinak köszönhetően, melyek a káros és idegen anyagokat az agyból a vérbe pumpálják ki, az idegrendszeri betegségek, köztük az agydaganatok és a farmakorezisztens epilepszia gyógyszeres kezelése komoly terápiás kihívást jelent (Deli, 2011). Az effluxpumpa-gátlók, mint például P-gp expresszióját gátló szerek potenciálisan növelhetnék az antiepileptikumok vagy kemoterápiás szerek központi idegrendszeri bejutását, de a szisztémás és idegrendszeri mellékhatásokkal kapcsolatos problémák miatt ez a megközelítés jelenleg nem reális a klinikai kezelésben (Potschka, 2010).

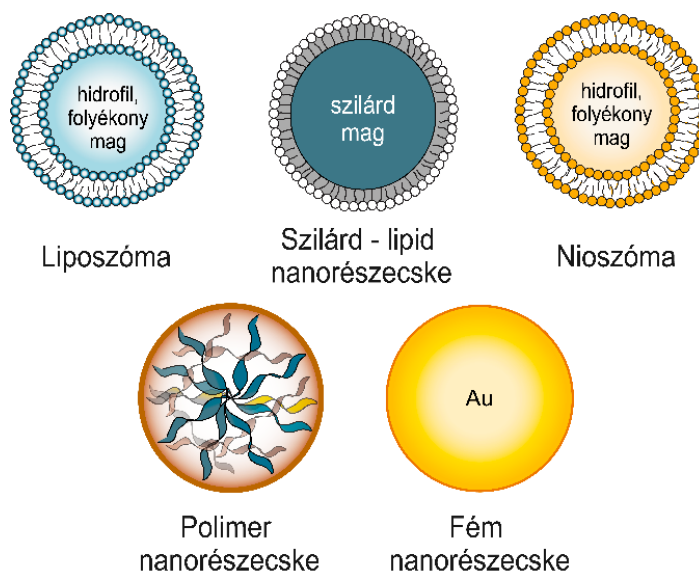
A legintenzívebben kutatott agyi gyógyszerbeviteli stratégia a vér-agy gát fiziológiás transzportútvonalainak kiaknázása (6. ábra) (Veszélka és mtsai., 2015; Deli, 2011, Pardridge, 2015) A hatóanyagok fiziko-kémiai tulajdonságainak változtatása, például kationizálása fokozhatja az agyi bejutást. Az agyi endotélsejtek lumenális felszínén a glikokalyx által létrehozott erős negatív felületi töltés csökkenti a negatív töltésű gyógyszermolekulák vagy nanorészecskék sejtfelvételét, és kedvez a kationos molekulák bejutásának az adszorptív-mediált transzcitózis révén (Hervé és mtsai., 2008, Walter és mtsai., 2021). A lipidoldékonyság fokozásával szintén növelhető a vér-agy gáton való átjutás, de ezzel együtt a hatóanyagok perifériás szervekben való felvétele is megnő, ami végső soron csökkent agyi bejutáshoz vezet (Banks, 2009).

Ígéretes, és az utóbbi években igen aktívan kutatott lehetőség a hatóanyagok agyi bevitelének növelésére a vér-agy gát receptor-mediált, illetve karrier-mediált transzcitózis

transzportútvonalaik kihasználása. A vér-agy gáton áthaladó biomolekulák, mint például az inzulin, a transferrin vagy az alacsony sűrűségű lipoprotein receptora, az alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1 (LRP1,-2), a leptin receptorok nagymértékben expresszálódnak a vér-agy gáton, és széles körben jellemezték és tesztelték őket nagy biomolekulák vagy nanorészecskék célzott agyi bejuttatására (Pardridge, 2015, Mahringer és mtsai., 2021). A transzporterek egyik legnagyobb családja, a korábban már említett tápanyagokat szállító SLC fehérjéké, melyeken keresztül klinikailag használt gyógyszerek is képesek átjutni a vér-agy gáton (Deli, 2011). A gyógyszer-molekulák közvetlenül is kötődhetnek a vér-agy gát transzportereihez és receptoraihoz, vagy ígéretes módszer a hatóanyagok agyi bejuttatására, ha hordozóhoz, például nanorészecskékhez kötjük őket. A nanohordozók felszínére a vér-agy gát különböző szállítófehérjéit célolni képes ligandokat kötve pedig megnövelhetjük az agyi bejutás specificitását (Rask-Andersen és mtsai., 2013; Mahringer és mtsai., 2021, Wu és mtsai., 2023).

1.4.1. Nanorészecskék agyi gyógyszerbejuttatásra

A nanoméretű hatóanyag hordozórendszerek, a nanorészecskék alkalmazása, mint potenciális lehetőség a vér-agy gáton keresztüli hatékony gyógyszerátjuttatásra rendkívül intenzíven kutatott terület (Rask-Andersen és mtsai., 2013; Kreuter, 2014; Mahringer és mtsai., 2021, Wu és mtsai., 2023). Az orvosbiológiai kutatásokban széles körben vizsgált nanohordozók a lipid, polimer és fém nanorészecskék (7. ábra), melyek legfontosabb tulajdonságait a 1. táblázat foglalja össze.



7. ábra. Nanohordozók típusai (Gessner és mtsai., 2020 alapján).

A liposzómák olyan vezikuláris nanorészecskék, amelyek falát a sejtmembránokéhoz hasonló egy vagy több foszfolipid kettősréteg alkotja, amelyek szfingomielinből, foszfatidilkolinból vagy glicerofoszfolipidekből állnak (Mc Carthy és mtsai., 2015). A liposzómák előnye, hogy biokompatibilisek és nem immunogének. A hidrophil gyógyszerek a vizes magi régióba, míg a lipofil gyógyszerek a liposzómák foszfolipid kettős rétegébe zárhatók be. A hagyományos liposzómák alkalmazását korlátozza a hatóanyag-felszabadulás gyenge szabályozhatósága, az alacsony tárolási stabilitás és a keringésből való gyors eliminálódás (Wu és mtsai., 2023). A részecskeméret csökkentése (<100 nm) vagy a felület

polietilén-glikollal (PEG) történő módosítása a keringési idő meghosszabbodását eredményezi.

1. táblázat. Az orvsiobiológiai kutatásokban leggyakrabban vizsgált nanorészecskék típusai és tulajdonságai (Veszelka és mtsai., 2015 alapján).

NP	Összetétel	Méret	Előny	Hátrány
Liposzóma	Hidrofil magi rész foszfolipid membránnal körülvéve	Kicsi unilamelláris <100 nm Nagy unilamelláris >100 nm Multilamelláris >500 nm	Mind zsíroldékony, mind vízoldékony hatóanyag becsomagolására alkalmas	Nem kontrollált hatóanyagleadás, alacsony tárolási stabilitás
Szilárd lipid	Hidrofób magi rész trigliceridekkel, viszokkal és zsírsavakkal körülvéve	10-500 nm	Alacsony toxicitás, magas hatóanyag szállítási kapacitás, kontrollált hatóanyagleadás	Csak zsíroldékony, hatóanyag becsomagolására alkalmas
Nioszóma	Nem-ionos felületaktív anyagok és koleszterin	100-300 nm	Kevésbé oxidálódik, stabilabb, hosszabb eltarthatóság, olcsóbb	Nem kontrollált hatóanyagleadás
Polimer	Természetes vagy szintetikus polimerek	10-1000 nm	Magas stabilitás az enzimatis lebontással szemben	Toxikus hidrolitikus bomlástermékek
Fém	Arany, titánium vagy vas-oxidok	1-100 nm	Arany és titánium NP-k: inert, ultra kis méret, elnyeli és szórja a közeli infravörös fényt Vas NP-k: paramágnesesek	Arany és titánium NP-k: karcinogenitás felmerül Vas NP-k: oxidatív stressz kiváltása

A szilárd lipid nanorészecskék általában trigliceridekből, zsírsavakból és viaszokból állnak. Más nanorészecskékkel szemben előnyük az alacsonyabb toxicitás, a nagy hatóanyag-töltő kapacitás és a kontrollált hatóanyagfelszabadulás (Veszelka és mtsai., 2015). A liposzómákkal ellentétben azonban csak hidrofób hatóanyagokat képesek kapszulálni, ami korlátozza alkalmazhatóságukat (Mc Carthy és mtsai., 2015). A szolid lipid nanorészecskék külső felszínének poliszorbát 80-nal történő bevonata elősegíti az apolipoprotein-E (ApoE) adszorpcióját, amely az agyi endotélsejtek LDL receptorához kötődve így elősegíti a szilárd lipid nanorészecskék agyba történő felvételét (Goppert és mtsai., 2005).

A nem-ionos felületaktív anyagokból és koleszterinből felépülő vezikuláris nanorészecskék, vagy nioszómák a liposzómákkal ellentétben kevésbé oxidálódnak, stabilabbak, hosszabb ideig tárolhatók, illetve költségkímélőbbek az előállításuk (Abdelkader és mtsai., 2014). A nioszómák pozitívuma továbbá, hogy felületaktív anyagaiknak köszönhetően, fokozhatják a sejtmembrán fluiditását, ami elősegítheti a sejtfelvételüket (Mészáros és mtsai., 2018; Veszelka és mtsai., 2022), valamint felszínük könnyen funkcionálizálható célzó-molekulákkal.

A különböző biopolimerek közül a poli-(tej-ko-glikolsav) (PLGA), a poli-tejsav (PLA), a poli-ε-kaprolakton (PCL), a poli-L-glutaminsav (PLG), a kitozán, a zselatin és a poli-butilcinaoakrilátok (PBCA) néhány a biológiailag lebomló biopolimer közül, amelyeket nanohordozók anyagaként használnak gyógyszerek agyba juttatására (Kreuter, 2014). A polimer nanorészecskék stabilabbak, mint a vezikuláris nanohordozók, és hatékonyabban képesek megvédeni a töltetüket az enzimatis degradációtól (Mc Carthy és

mtsai., 2015). Ezeket a polimer nanorészecskéket széles körben tanulmányozták, hogy megállapítsák a nanorészecskék mérete, felületi bevonata, töltése, célzóligandjai és vér-agy gáton való átjutási képessége közötti kapcsolatot (Kreuter, 2014). A szintetikus polimer nanorészecskékkel elért eredmények azt mutatják, hogy sikeresen célozhatók a vér-agy gáton való átjutásra és az agyba való bejutásra (Kreuter, 2014). A PBCA nanorészecskék hidrolízis útján történő lebomlása toxikus metabolitok keletkezéséhez vezet, ezért agyi bejuttatásra előnyösebb a PLA, PLGA (Akel és mtsai., 2021), PLG (Mészáros és mtsai., 2023) nanorészecskék használata, mely utóbbiakat kísérleteinkben mi is teszteltünk.

A fém NP-k közül a központi idegrendszerbe történő bevitelhez az arany, a titán és a vas-oxid részecskéket használják a leggyakrabban (Mc Carthy és mtsai., 2015). Az arany nanorészecskék inerte, és extrém kis méretben (1-10 nm) is előállíthatók. Jó fényelnyelési és elektrondenz tulajdonságaiknak köszönhetően a diagnosztikában előszeretettel használják (Veszelka és mtsai., 2015). A vas-oxid nanorészecskéket számos az agyat célzó biomedicinális alkalmazásban vizsgálják, mint a képalkotás vagy a tumorterápia (Ito és mtsai., 2005). Szuperparamágneses tulajdonságaik lehetővé teszik a nanorészecskék mágneses rezonanciás képalkotó eljárással történő nyomon követését, valamint a célzott agyi bejuttatást mágneses tér segítségével. Bár a fém nanorészecskék általában biztonságosnak tekinthetők, az arany és a titán nanorészecskék rákkeltő hatása vitatott, a vas és ezüst nanorészecskék pedig oxidatív stresszt okozhatnak (Ito és mtsai., 2005).

Az agyi gyógyszerbejuttatásra tervezett ideális nanohordozó tulajdonságai, hogy szelektív célzás révén hatékonyan jusson át a vér-agy gáton, megvédje a hordozott hatóanyagot az enzimatis degradációtól, féléletideje a keringésben hosszú legyen, szabályozott hatóanyagfelszabadulást mutasson, ne kötődjön efflux pumpákhoz, alacsony immunogenitású, biokompatibilis és biodegradabilis legyen (Mc Carthy és mtsai., 2015). Bár nincs olyan hordozó, amelyik minden fenti követelményeknek maradéktalanul megfelelné egyre több nanorészecske kerül a klinikai kipróbálások fázisába, mint például a célzott liposzómák is (Gaillard és mtsai. 2014; Mc Carthy és mtsai. 2015). A perifériás tumorok kezelésére kifejlesztett liposzómális doxorubicin (Barenholz, 2012) FDA engedélyeztetése óta pedig rohamosan nő a különböző nanohordozókat tesztelő klinikai vizsgálatoknak száma a központi idegrendszeri betegségek esetében is (Anselmo és Mitragotri, 2019).

A keringésbe juttatott nanorészecskék több szervben, a májban, vesében, lépben is csapdázódhatnak, ezért megfelelő agyi bejutásukhoz specifikus célzásra van szükség (Saraiva és mtsai., 2016). A nanorészecskék felszínéhez kötött célzó molekulák rendkívül sokfélék lehetnek, melyek leggyakrabban az agyi endotélsejtek lumenális membránjában elhelyezkedő transzporterekhez vagy receptorokhoz képesek kötődni, ezáltal molekuláris trójai falovakként juttatják át a szállított hatóanyagot a vér-agy gáton (Pardridge, 2002). Preklinikai vizsgálatokban a liposzómák felszínéhez kötött célzó molekulák közül az egyik legsikeresebbnek az antioxidáns tripeptid glutation (GSH) bizonyult (Gaillard, 2016). Noha molekulárisan azonosított transzportereit agyi endotélsejtekben még nem írták le, a glutationnal célzott PEGilált liposzóma hatékonyságát számos vizsgálatban már bizonyították, mint például metilprednizolon agyba juttatására a szklerózis multiplex patkánymodelljében (Gaillard és mtsai., 2012) vagy doxorubicin bevitelére agydaganatos egerekben (Gaillard és mtsai., 2014).

A nanorészecskékkel kapcsolatos kutatások egyik fő iránya a központi idegrendszeri betegségek terápiájában alkalmazható, célzott nanohordozóval formulált gyógyszerek kifejlesztése.

2. KUTATÁSI CÉLOK

A PhD megszerzése után kutatómunkám fókusza a következő három nagy terület vizsgálatára irányult:

2.1. A vér-agy gát vizsgálatára alkalmas sejtenyészeti modellek jellemzése és összehasonlítása

(1) Célul tűztük ki, hogy részletesen összehasonlítsuk az *in situ* anatómiai helyzetet jól modellező, nagy komplexitású, az agyi mikrovaskuláris endotélsejtek, periciták, valamint gliasejtek primer tenyészetéből létrehozott, három sejtípusból álló vér-agy gát modellt (EPA) és a vér-agy gátat helyettesítő epitélisejt alapú modellek (Caco-2 humán bélepitélisejt, P-glikoproteint expresszáló vinblasztin kezelt VB-Caco-2, és kutya veseepitélisejt MDCK és MDCK-MDR1) morfológiáját és funkcionális tulajdonságait, kiemelve az egyes modellek előnyeit és hátrányait gyógyszerek agyi bejutásának vizsgálatában (Hellinger és mtsai., 2012).

(2) Az agyi endotélsejtes vér-agy gát és a helyettesítő epitélisejtes modellek összehasonlítását kibővítettük, és a korábban vizsgált EPA és epitélisejtes modellek (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK-MDR1) mellett a patkány GP8, RBE4 és a humán agyi endotél D3 és D3L sejt vonalakat is bevontuk vizsgálatainkba, így összesen 9 sejtenyészeti modellt hasonlítottunk össze. A sejtenyészeti morfológiai tulajdonságai mellett a vér-agy gát működése szempontjából kulcsfontosságú TJ fehérjék, SLC és ABC transzporterek és gyógyszereket metabolizáló enzimek génjeinek expressziós mintázatát is összehasonlítottuk, valamint megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a különböző gyógyszerhatóanyagok átjutásában az egyes modelleken (Veszelka és mtsai., 2018).

2.2. A vér-agy gát sérüléseinek vizsgálata különböző patológiás modellekben

A vér-agy gát számos betegségben sérül, gát funkciója meggyengül, áteresztőképessége megnő, az agyat védő és tápláló mechanizmusai romlanak, ami hozzájárul az idegsejtek károsodásához és sejtpusztulásához, ezért a központi idegrendszer működése is zavart szenved. A vér-agy gát működésének megértése és a különböző betegségmodellekben a gátműködés sérüléseinek vizsgálata ezért kulcsfontosságú, hiszen a vér-agy gát sejtjei terápiás célpontként szolgálhatnak ezeknek a betegségeknek a gyógyításában. Eddigi kutatómunkám során számos betegségmodellben vizsgáltam a vér-agy gát működésének változásait és kerestem az agyi endotélsejteken védőhatást kifejtő molekulákat, hatóanyagokat.

Jelen értekezésemben ezen munkáink közül részletesen bemutatom, hogy:

(3) milyen károsodást okoz a karbonil stresszt kiváltó metilglioxál agyi endotélsejteken (Tóth és mtsai., 2014a);

(4) a neuroprotektív hatású edaravon kezelés képes-e megvédeni a vér-agy gát sejtjeit a metilglioxál okozta károsodással szemben (Tóth és mtsai., 2014b);

(5) a krónikus stressz milyen sérülést vált ki a vér-agy gát sejtjeiben (*Sántha és mtsai., 2016*);

(6) a hipertrigliceridémia milyen cerebrovaszkuláris elváltozásokat hoz létre APOB-100 transzgenikus egerekben, a humán ateroszklerózis modelljében (*Hoyk és mtsai., 2018*).

2.3. A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata

A vér-agy gát védő mechanizmusainak köszönhetően az agyi gyógyszerbejuttatás hatékonyságának fokozása nagy kihívást jelent. Mivel a gyógyszerek jelentős része nem képes megfelelő mértékben átjutni a vér-agy gáton, új stratégiák kifejlesztésére van szükség (*Veszelka és mtsai., 2015*). Kutatómunkám során számos gyógyszerbeviteli módszert vizsgáltam, ezek közül ebben az értekezésben az agyi endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsolatok módosítását és reverzibilis megnyitását (7-9), valamint a vér-agy gátat célzó nanoméretű hordozórendszerek hatékonyságának vizsgálatát (10-18) mutatom be.

(7) Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a TJ modulátor peptidek képesek-e a vér-agy gát modell áteresztőképességét fokozni és ezzel az agyi gyógyszerbejutatást növelni (*Bocsik és mtsai., 2016*).

(8) Megvizsgáltuk, hogy a szoros sejtkapcsolatok fehérjéi közül a klaudin-5-re tervezett módosító peptid segítségével lehetséges-e reverzibilis módon növelni a vér-agy gát permeabilitását (*Dithmer és mtsai., 2017*);

(9) Megvizsgáltuk, hogy a kismolekula kemoterápia adjuváns tezmilifen kezeléssel lehetséges-e vér-agy gát megnyílást előidézni (*Walter és mtsai., 2015*);

(10) Megvizsgáltuk, hogy az agyi endotélsejtek LDL receptorához kötődő ApoE-vel funkcionizált donepezil hatóanyagot szállító szilárd lipid nanorészecskék képesek-e az agyi endotélsejtek receptor-mediált transzportútvtonalát kihasználva átjutni a vér-agy gáton (*Topal és mtsai., 2021*);

(11) Megvizsgáltuk, hogy az agyi endotélsejtek adszorptív-mediált transzportútvtonalát célzó, PepH3 peptiddel funkcionizált, amiloid- β ellenes ellenanyagot szállító nanorészecskék képesek-e a vér-agy gáton átjutni és ha igen, milyen mechanizmusokkal (*Szecsó és mtsai., 2025*);

(12) Tanulmányoztuk, hogy az agyi endotélsejtek transzportereihez kötődni képes biotinnal valamint glutationnal funkcionizált nanorészecskék képesek-e a vér-agy gáton átjutni (*Veszelka és mtsai., 2017*);

(13) Célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk a glutationnal célzott nanorészecskék átjutását a hematopoetikus őssejtekből differenciáltatott, gyenge gáttulajdonságokkal rendelkező humán vér-agy gát sejttenyészetes modellen, valamint ennek a modellnek a cARLA molekula kombináció kezeléssel erősített változatán (*Porkoláb és mtsai., 2024*);

(14) Megvizsgáltuk optikai lézercsipesz módszerrel, hogy a célzóligand glutation milyen erősséggel képes az élő agyi endotélsejtek felszínéhez kötődni (*Fekete és mtsai., 2021*);

(15) Kerestük a választ arra vonatkozóan, hogy az agyi endotélsejtek SLC transzportereihez kötődni képes, alaninnal, glutationnal, valamint glükózanalóggal, mint célzóliganddal funkcionizált vezikuláris nanorészecskék képesek-e átjuttatni a

biomolekula modellanyagot a vér-agy gáton, valamint hatékonyabbak-e a kétszeres ligandkombinációkkal célzott nanorészecskék az egyszeres ligandokkal jelölt nanorészecskékhez képest a sejt felvétel és vér-agy gát átjutás szempontjából (*Mészáros és mtsai., 2018*);

(16) Megvizsgáltuk, hogy az általunk előállított, alanin-glutation kettős ligandkombinációval célzott vezikuláris nanopartikulumok a vér-agy gáton átjutva vajon képesek-e bejutni a glia és neuron sejtekbe is (*Porkoláb és mtsai., 2020*);

(17) Arra kerestük a választ, hogy az általunk legjobbnak talált alanin-glutation vér-agy gátat célzó kettős molekulakombináció képes-e elősegíteni a hatékonyabb vér-agy gát átjutást és az agyi organoidokba való bejutást a nanorészecskék anyagától függetlenül, nemcsak vezikuláris, hanem más típusú, például polipeptid nanohordozók esetében is (*Mészáros és mtsai., 2023*);

(18) Tanulmányoztuk, hogy a glutation, leucin és aszkorbinsav hármas kombinációjával célzott nanopartikulumok képesek-e hatékonyabban átjutni a vér-agy gáton és ha igen, milyen mechanizmussal, valamint a vér-agy gáton átjutott részecskék képesek-e bejutni agyi organoidokba (*Veszelka és mtsai., 2022*).

3. MÓDSZEREK

Az értekezés alapját képező közleményekben használt módszerek közül csak a legfontosabbakat foglalom össze röviden. Az alkalmazott módszerek részletes leírása megtalálható a hivatkozott cikkeinkben.

3.1. Vegyszerek

Minden vegyszer és reagens beszerzési forrása, hacsak másképpen nem jelöltük, a Merck Magyarország Kft.

3.2. Sejtenyésztetek

Patkány primer agyi endotélsejtek, periciták és gliasejtek tenyésztése

Primer endotél és pericita sejt kultúrák tenyésztéséhez agyi mikroereket izoláltunk négy hetes Wistar patkányokból (Veszelka és mtsai., 2018, Mészáros és mtsai., 2018). Az állatokat túlaltatást követően dekapitáltuk, majd az agyakat kivettük és jéghideg foszfát puffert (PBS) tartalmazó Petri-csészébe helyeztük. Szűrőpapír segítségével eltávolítottuk a fehérállomány egy részét, az agyhártyákat és a *plexus choroideus*t. Az összegyűjtött agyszövetet szikével összevágtuk és pipettával mechanikailag disszociáltuk, majd 1 mg/ml kollagenáz II és 15 µg/ml DNáz I (Roche, Svájc) enzimeket tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco, Amerikai Egyesült Államok) tápfolyadékban 55 percen keresztül 37 °C -on emésztettük. Az inkubáció végén a mikroereket 20% borjú szérum (FBS)/DMEM/F-12 grádiensen háromszori centrifugálással (1000 g, 20 perc, 4 °C) elválasztottuk a mielines felülúszótól. Az összegyűjtött pelletekben található mikroereket további 1 mg/ml kollagenáz-diszpáz (Roche, Svájc) és 15 µg/ml DNáz I enzimes kezeléssel 37 °C-on 35 percen keresztül emésztettük. A mikroereket ezután 33%-os Percoll-grádiensen történő centrifugálással (1000g, 10 perc, 4 °C) választottuk el a vörösvértesteket a fennmaradó mielintől, ezután tápfolyadékban kétszer mostuk és szélesztettük.

Az agyi endotélsejtek és periciták tenyésztésére eltérő körülményeket alkalmaztunk. A primer agyi endotélsejt tenyésztetekhez a mikroereket IV. típusú kollagén (100 µg/ml) és fibronectin (25 µg/ml) elegyével bevont steril Petri-csészékbe (Corning Costar, Amerikai Egyesült Államok) szélesztettük. A sejteket DMEM/F-12-t, 15% borjú plazmából készített szérumot (PDS, First Link, Egyesült Királyság), 10 mM HEPES-t, 100 µg/ml heparint, 5 µg/ml inzulint, 5 µg/ml transferrint, 5 ng/ml nátrium-szelenitet (ITS, Pan-Biotech GmbH, Németország), 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktort (bFGF, Roche, Svájc) és 50 µg/mL gentamicint tartalmazó tápfolyadékban növesztettük (37 °C, 5% CO₂). Az első három napban a tápfolyadékhoz 3 µg/ml puromicint adtunk, hogy tiszta endotélsejt tenyészeteket hozzunk létre. A tenyésztés harmadik napjától a tápfolyadék szérumtartalmát a kezdeti 15%-ról 10%-ra csökkentettük. A sejteket 90%-os konfluencia szint elérése után passzáltuk kísérleti felszínre.

A primer agyi periciták tenyésztéséhez a mikroereket IV típusú kollagénnel (100 µg/ml) bevont Petri-csészékbe (VWR International, Amerikai Egyesült Államok) szélesztettük, és alacsony (1 g/L) glükóz tartalmú DMEM-t, 10% FBS (Pan-Biotech GmbH, Németország) és 50 µg/mL gentamicint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A tisztaságuk növelése érdekében az izolálás után kétszer passzáltuk őket IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) bevont felszínre.

Az asztroglia tenyésztet létrehozásához egynapos Wistar patkányokat használtunk, melyeket túlaltatás után dekapitáltunk. Az agyak kiemelése után PBS-sel megnedvesített

szűrőpapír segítségével eltávolítottuk az agyhártyákat. Az agyszövetet 21G átmérőjű fecskendőtüvel mechanikailag disszociáltuk. A kapott szuszpenziót 40 µm-es nylonszűrőn átszűrtük, centrifugáltuk (700 g, 7 perc), majd a felülúszó leöntése után a keletkezett pelletet DMEM-et és 10% FBS-t tartalmazó tápfolyadékban bevonatlan 75 cm² felületű műanyag tenyésztőflaskákba (TPP Techno Plastic Products AG, Svájc) szélesztettük. A konfluens állapot elérése után az asztrocitákat további 2 hétig tartottuk fenn mielőtt felhasználtuk őket a kísérleteinkhez.

Agyi endotél sejtvonalak és borjú pericita sejtvonala tenyésztése

A GP8 egy SV40 large T immortalizált patkány agyi endotélsejtvonala, melyet Dr. John Greenwoodtól (University College London, UK) kaptunk ajándékba. Ezeket a sejteket 15% PDS-t, 100 ng/ml heparint, 1 ng/ml bFGF-t és 50 µg/ml genecint tartalmazó DMEM/F-12 tápfolyadékban tenyésztettük (*Veszelka és mtsai., 2018*).

Az RBE4 pE1A-neo plazmával immortalizált patkány agyi endotélsejtvonala, melyet Dr. Pierre-Olivier Couraud-tól (Institut Cochin, Paris, France) kaptunk ajándékba. A sejteket DMEM/F-12 tápfolyadékban 10% FBS-t, 1 ng/ml bFGF-t és 50 µg/ml genecint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A sejteket patkányfarok kollagénnel bevont tenyésztőedényekben, 30 és 50 passzási szám között használtuk (*Veszelka és mtsai., 2018*).

A humán agyi endotél hCMEC/D3 sejtvonala sejtjeit MCDB 131 tápfolyadékban (Pan Biotech) tenyésztettük, amelyet kiegészítettünk 5% FBS-sel, GlutaMAX-szal (100×, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), lipidkiegészítővel (100×, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 µg/ml aszkorbinsavval, 550 nM hidrokortizonnal, 100 µg/ml heparinnal, ITS-sel (100×) és 50 µg/ml gentamicinnel (*Veszelka és mtsai., 2018*). E sejtvonala differenciálathoz (D3L) a tápfolyadékot 10 mM lítium-kloriddal (LiCl) egészítettük ki az első tápfolyadékcseréjéig.

A humán köldökzsinórvérből izolált őssejtekből differenciáltatott hEC endotélsejteket és a borjú pericita sejteket (bPC) francia együttműködő partnereinktől (Dr. Fabien Gosselet; Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique, University of Artois, Lens) kaptunk ajándékba. A hEC sejteket a ko-kultúra létrehozása előtt (P7 passzázs számig) IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronectinnel (25 µg/ml) bevont steril Petri-csészékben növesztettük és 5% FBS (Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok), 1% endotélsejt növekedést segítő anyaggal (endothelial cell growth supplement, Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) és 0,5% gentamicinnel kiegészített endotél tápfolyadékban (ECM, Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) tenyésztettük (*Mészáros és mtsai., 2023*).

A bPC sejteket P12 passzázs számig használtuk, és IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) bevont steril Petri-csészékbe szélesztettük, és 20% FBS-sel, 1% GlutaMAX-szal és 1% gentamicinnel kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük (*Mészáros és mtsai., 2023*).

Epítél sejtvonala tenyésztése

A humán Caco-2 bélhám építélsejtvonala (ATCC HTB-37) 10% FBS-sel és 50 µg/ml gentamicinnel kiegészített DMEM/F-12 táptalajban tenyésztettük. A VB-Caco-2 kultúrákat Caco-2 tenyészetekből hoztuk létre 10 nM vinblasztin kezeléssel legalább hat passzázsos keresztül történő szelektálással (*Hellinger és mtsai., 2012; Veszelka és mtsai., 2018*). A kezelés homogénebb sejtmorfológiát és az efflux pumpa magasabb expressziós szintjét eredményezi.

A szülői és MDR1 transzfektált Madin-Darby kutyavese építélsejtek (MDCK és MDCK-MDR1) az amszterdami Netherlands Cancer Institute-től származnak. A sejtenyésztő tápfolyadék 4,5 g/l glükózt tartalmazó DMEM-et, 10% FBS-t, 50 µg/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint tartalmazott (*Hellinger és mtsai., 2012; Veszelka és*

mtsai., 2018). Az sejteket 0,05% patkányfarok kollagénnel bevont sejttenyésztő lemezekben tenyésztettük.

SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek tenyésztése

Az SH-SY5Y sejteket (ATCC CRL-2266) 10% FBS-sel kiegészített DMEM/F12 tápfolyadékban (Gibco, Waltham, MA, USA) növesztettük a konfluencia eléréséig. A sejtek differenciálódását 10 μ M retinsavat, 0,5% dimetil-szulfoxidot és 2% FBS-t tartalmazó tápfolyadékban differenciáltattuk öt napig. A kísérletekhez csak az SH-SY5Y differenciált tenyésztősejteit használtuk fel (Topál és mtsai., 2021, Porkoláb és mtsai., 2020).

Agyi organoidok

A középagyi organoidokat luxemburgi együttműködő partnereinktől Prof. Jens C. Schwamborn-tól kaptuk. Az organoidok egészséges (azonosítószám: #232) és Parkinson-kórban szenvedő betegekből származó (azonosítószám: #317) őssejtek felhasználásával készültek, amelyek az α -szinuklein gén triplikációját hordozzák. A progenitor sejtekből kilenc napi differenciációt követően (Nickels és mtsai., 2020) kialakuló organoidokat DMEM/F-12 médiumban mostuk, majd óvatosan beültettük őket DMEM/F-12 és Neurobasal tápfolyadék (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1:1 arányú keverékén alapuló érési médiumba. Ezt kiegészítettük gentamicinnel (50 μ g/mL), L-glutaminnal (2 mM, Thermo Fisher Scientific), B27-tel (100 $\times$, Thermo Fisher Scientific), N2-vel (200 $\times$, Thermo Fisher Scientific), dibutyryl-cAMP-vel (500 μ M), agyból származó neurotrofikus faktorról (BDNF, 10 ng/mL, Peprotech, Cranbury, NJ, USA), gliasejtekből származó neurotrofikus faktorról (GDNF, 10 ng/mL, Peprotech), transzformáló növekedési faktor-3-mal (TGF-3, 1 ng/mL, Peprotech), Activin A-val (2,5 ng/mL, Peprotech), L-aszkorbinsav (200 μ M) és kettős trombocitaellenes terápia molekulával (DAPT, 10 μ M, Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság). A vér-agy gát-organoid ko-kultúra modell összeállítása előtt az organoidokat először beágyasztuk 10 μ L növekedési faktor-csökkentett Matrigelbe (Corning) amit egy 12-lyukú lemez (Corning Costar) aljára cseppentettünk (Veszelka és mtsai., 2022).

3.3. Ko-kultúra vér-agy gát modellek

A kísérletek egy részét (Hellinger és mtsai., 2012; Veszelka és mtsai., 2018; Bocsik és mtsai., 2016; Walter és mtsai., 2015; Dithmer és mtsai., 2017; Mészáros és mtsai., 2018; Fekete és mtsai., 2021; Veszelka és mtsai., 2022; Szecskó és mtsai., 2025) primer patkány agyi endotélsejtek, periciták és asztroglia sejtek együtt tenyésztésével létrehozott három sejttypusból álló ko-kultúra vér-agy gát modellen (EPA) végeztük. A modell összeállításához elsőként az asztroglia sejteket IV. típusú kollagénnel (100 μ g/ml) bevont tenyésztőlemezekbe passzáltuk. A tenyésztőlemezekbe illeszkedő tenyésztőbetétek (Transwell, Corning Costar, Amerikai Egyesült Államok) alsó (abluminális) oldalát IV. típusú kollagénnel (100 μ g/ml), a belső (luminális) felszínét kollagén-fibronektin keverékével vagy Matrigel oldattal vontuk be. Száradás után a tenyésztőbetétek aljára pericitákat passzáltunk, majd három óra elteltével a tenyésztőbetéteket az asztrocitákat tartalmazó tenyésztőlemezbe fordítottuk, valamint a belső felszínére primer endotélsejteket szélesztettünk. A kísérleteket megelőzően a három sejttypust négy napig együtt tenyésztettük, melynek során az alsó és a felső kompartment tápfolyadékát egyaránt 550 nM hidrokortizonnal egészítettük ki. A kísérlet kezdete előtt 24 óráig 250 μ M 8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfáttal (cPT-cAMP) és 17,5 μ M Ro-20-1724-gyel, a cAMP-specifikus foszfodiészteráz szelektív inhibitorával kezeltük a sejteket a modell szorosságának növelése érdekében (Deli és mtsai., 2005).

A kísérletek másik részét humán agyi endotélsejtek és borjú pericita sejtek ko-kultúra vér-agy gát modelljén (hEC/bPC) végeztük (Mészáros és mtsai., 2023, Porkoláb és mtsai., 2024). A kísérletekhez a hEC sejteket és a bPC sejteket a tenyésztőbetétek két oldalán tenyésztettük. A bPC sejteket IV. típusú kollagénnel (100 g/ml) bevont tenyésztőbetétek alsó oldalára passzáltuk, majd a hEC sejteket a Matrigellel bevont tenyésztőbetétek belső oldalára. Ezután a hEC és bPC sejteket tartalmazó tenyésztőbetéteket hEC tápfolyadékot tartalmazó 24 vagy 12 lyukú lemezekbe helyeztük. A két sejtípust a vér-agy gát permeabilitási kísérletek előtt hat napig tenyésztettük együtt.

3.4. Sejttenyészetek kezelése

Minden kísérlet típusnál előkísérletben ellenőriztük az adott anyag toxicitását és csak a biztonságos és hatékony koncentrációkat használtuk a további kísérletekben.

Az EPA- és epitélisejtes modelleken végzett permeabilitási vizsgálatokhoz (Veszelka és mtsai., 2018) a különböző SLC-ligandokat 10 μM koncentrációban teszteltük, a valplorát kivételével, amit 300 μM koncentrációban teszteltünk. A két antikolinerg hatóanyagot, a takrint és a donepezilt 0,5 μM koncentrációban használtuk.

A hCMEC/D3 agyi endotélsejteket 100-1000 μM koncentráció tartományban kezeltük metilglioxállal, míg az edaravont 600-3000 μM koncentráció tartományban használtuk. Az aminoguanidint, az ismert antiglikációs szert, 600-2000 μM koncentrációban vizsgáltuk (Tóth és mtsai., 2014a,b). A Triton X-100 detergenst 10 mg/ml koncentrációban használtuk az életképességi vizsgálatokban sejthalált okozó referencia vegyületként.

A TJ modulátor peptid kezelése során az ADT-6, a HAV-6 és az AT-1002 peptideket 2 mM, a C-CPE peptidet 1 mM, a 7-mer peptidet 100 μM míg a PN-159/KLAL peptidet 10 μM koncentrációban teszteltük patkány primer agyi endotélsejteken (Bocsik és mtsai., 2016).

A peptidomimetikumok esetében a patkány primer endotélsejteket 300 μM klaudin-5 eredetű (C5C2) vagy klaudin-2 eredetű kontroll peptiddel (C2C2) kezeltük (Dithmer és mtsai., 2017).

A tezmilifenes kísérletekben a patkány primer agyi endotélsejteken legfeljebb 24 órás kezelési időszakon keresztül a hatóanyagokat a következő koncentrációkban használtuk: tezmilifen (0-200 μM), LY294002 (0,1-1 μM), U0126 (0,01-1 μM), β -ösztadiol (0,1-1 μM). A toxicitási vizsgálatban 1 mg/ml Triton X-100-at, a permeabilitási vizsgálatban 25 μM klórfenil-tio-cAMP-t és 1 μM 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) foszfodiészteráz inhibitor, az efflux pumpa aktivitás mérési vizsgálatban probenecidet (100 nM), ciklosporin A-t (1,6 μM), verapamilt (100 μM) és az NF κ B korai nukleáris transzlokációjának vizsgálatában bakteriális lipopoliszacharidot (LPS) (1 $\mu\text{g/ml}$) alkalmaztunk (Walter és mtsai., 2015).

A szilárd polisztrén nanopartikulumokat (SNP) 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ koncentráció tartományban (Veszelka és mtsai., 2017), a nioszómákat 0,3-10 mg/ml (Mészáros és mtsai., 2018, Porkoláb és mtsai., 2020; Fekete és mtsai., 2021; Veszelka és mtsai., 2022; Szecskó és mtsai., 2025) a szolid lipid nanorészecskéket (SLN) 1-10 $\mu\text{g/mL}$ (Topal és mtsai., 2021), a polipeptid nanohordozókat (PLG) 1-100 $\mu\text{g/mL}$ koncentráció tartományban teszteltük (Mészáros és mtsai., 2023; Porkoláb és mtsai., 2024).

3.5. Toxicitás mérése impedancia kinetikával

Az agyi endotélsejtek életképességét valós időben, impedanciaméréseken alapuló sejtanálízissal (RTCA-SP készülék, Agilent Technologies, Amerikai Egyesült Államok) követtük. A valós idejű impedanciamérés előnye, hogy nem invazív eljárás, nincs szükség

hozza jelölőanyagra, könnyen követhető vele a sejtek letapadása, növekedése és pusztulása is (Walter és mtsai., 2015). Ehhez az endotélsejteket egy speciális, integrált aranyelektrodákat tartalmazó 96-lyukú tenyésztőlemezbe (E-plate 96, ACEA Biosciences, Amerikai Egyesült Államok) passzáltuk, amit előzetesen IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronektinnel (25 µg/ml) vontunk be. A sejtek életképességét valós időben követtük 5 percenként, 24 órán keresztül. A sejtek életképesség változásait a kezelés kezdési pontjára normalizált sejtindex értékeként adtuk meg, az $[R_n - R_b]$ számítás eredményeként, ahol R_n az adott lyukban a sejtek és az elektrodák közti impedancia értékét, míg az R_b a sejtmentes tápfolyadék háttérimpedanciáját adja meg (Walter és mtsai., 2015).

3.6. TEER mérés vér-agy gát modelleken

A vér-agy gát modellben a sejtek növekedését és az endotélsejtek közötti szorosság mértékét transzendoteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérésekkel követtük nyomon. A mért TEER értékek a szoros kapcsolatok ionokkal szembeni áteresztőképességére reflektálnak (Deli és mtsai., 2005). Az ellenállás mérésekhez EVOM rezisztenciamérő műszert használtunk és a 24-lyukú lemezekben összeállított modellen kamra elektrodákkal, míg a 12-lyukban növesztett tenyészetekben STX-2 botelektrodák (World Precision Instruments Inc., Amerikai Egyesült Államok) segítségével mértük az ellenállást. A mért értékekből minden alkalommal levontuk a sejtmentes tenyésztőbetéteken mért háttér értéket és az adatokat a tenyésztőbetét felszínére vonatkoztatva $\Omega \times \text{cm}^2$ -ben adtuk meg.

3.7. Vér-agy gát permeabilitási vizsgálatok

A vér-agy gát ko-kultúra modellek zártságát a TEER mérések mellett a fluoreszcens permeabilitási marker molekulák mérésével határoztuk meg. A modell felső, vér felőli luminális kompartmentjét nátrium-fluoreszceinnel (376 Da, 10 µg/mL) és Evans kék-albumin komplexel (67 kDa, 10 mg/mL borjú szérum albumin (BSA) + 167.5 µg/mL Evans kék festék) inkubáltuk 37 °C-on, síkrázón tartva 1 órán keresztül. Ezután mindkét kompartmentből mintákat gyűjtöttünk, és a jelzőanyagok fluoreszcenciáját Fluorolog 3 spektrofluorométerrel (Horiba Jobin Yvon) mértük 485/515 nm gerjesztési/emissziós hullámhosszon a nátrium fluoreszcein, és 584/663 nm-en az Evans kék-albumin komplex esetében. A jelzőanyagok koncentrációját standard kalibrációs görbék segítségével határoztuk meg. A látszólagos permeabilitási együtthatókat (P_{app}) a korábban leírtak szerint számoltuk ki (Veszelka és mtsai., 2018) a következő egyenlet segítségével:

$$P_{app} = \frac{\Delta C_A \times V_A}{C_D \times A \times \Delta t}$$

ahol $[C]_A$ a jelzőanyag abluminális koncentrációja, V_A az abluminális kompartment térfogata, $[C]_L$ a jelzőanyag luminális koncentrációja a kezelés kezdetén, A permeabilitáshoz rendelkezésre álló felszín és Δt : a mérés során eltelt idő (1 h).

A tesztanyagok vagy nanopartikulumok töltetének vér-agy gáton való permeabilitásának méréséhez az adott anyaggal megkezeltük a luminális kompartmentet, majd az inkubációs idő letelte után az abluminális kompartmentből meghatároztuk a tesztanyag koncentrációját HPLC-vel, vagy NP-k esetében a fluoreszcens töltet mennyiségét spektrofluorométerrel és meghatároztuk a fenti egyenlet segítségével a P_{app} értékeket.

3.8. Sejtmembrán fluiditás mérése

A Petri-csészékben növesztett agyi endotélsejteket 4 órán keresztül nem célzott és célzott nanorészecskékkel kezeltük. Az inkubáció végén a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd tripszinizéssel összegyűjtöttük, és Ringer-Hepes pufferben reszuszpendáltuk. A sejtek sűrűségét abszorbanciaméréssel $OD_{360} = 0,1$ -re állítottuk be (Helios Epsilon spektrofotométer, Thermo Fischer Scientific, USA). A sejteket $0,2 \mu\text{M}$ fluoreszcens TMA-DPH-val jelöltük 5 percig, majd a fluoreszcencia anizotrópiát spektrofluorométerrel (Fluorolog 3, Horiba Jobin Yvon) megmértük. Az anizotrópia adatokat 5 percig másodpercenként vettük fel, a gerjesztési és emissziós hullámhossz 360 , illetve 430 nm volt. Pozitív kontrollként benzil-alkoholt (50 mM), egy erős membránfluidizáló szert használtunk. Az egyes kezelések esetében 50 anizotrópiamérés átlagát számoltuk ki és hasonlítottuk össze (Mészáros és mtsai., 2018; Veszélka és mtsai., 2022).

3.9. Efflux pumpa aktivitás mérése

Az agyi endotélsejtekben az efflux pumpa aktivitásának meghatározásához a rodamin 123 (R123) sejtbeli felhalmozódását mértük meg. Az R123 mind a P-gp, mind a Bcrp efflux pumpa ligandja, sejten belüli magas akkumulációja csökkent efflux pumpa aktivitásra utal. A sejteket Ringer-Hepes pufferben oldott $10 \mu\text{M}$ R123-mal 24 órán keresztül 37°C -on kezeltük. Az inkubáció végén a felülúszókat összegyűjtöttük, a sejtrétegeket háromszor mostuk jéghideg PBS-sel, majd $0,1 \text{ N}$ NaOH-ban szolubilizáltuk és a fluoreszcencia intenzitását spektrofluorométerrel (Fluostar Optima; gerjesztés: 485 nm , emisszió: 520 nm) megmértük. Két efflux pumpa inhibitor is teszteltünk, mely során a sejteket 30 percig előkezeltük ciklosporin A-val ($1,6 \mu\text{M}$), a P-gp és a Bcrp inhibitorával és verapamillal ($100 \mu\text{M}$), a P-gp pumpa inhibitorával (Walter és mtsai., 2015).

Az MRP1 efflux pumpa aktivitását az előzőekhez hasonlóan végeztük, csak itt a glutation-bimán (GS-B) kiáramlását mértük, miután 20 percig kezeltük a sejteket $20 \mu\text{M}$ monoklórbimánnal (Molecular Probes, USA). Gátlószerként pedig probeneciddel ($100 \mu\text{M}$) kezeltük elő a sejteket. Az inkubációt követően a sejtek szolubilizálása után a GS-B koncentrációját spektrofluorométerrel (Fluostar Optima; gerjesztés: 386 nm , emisszió 476 nm) mértük meg (Walter és mtsai., 2015).

3.10. Reaktív oxigéngyökök, nitrogén-monoxid és cAMP termelődés mérése

A reaktív oxigéngyökök (ROS) fluorometriás kimutatására a klór-metil-diklór-dihidrofluoreszcein-diacetátot (DCFDA) használtuk (Molecular Probes, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA). Ez az indikátor a sejtekbe jutva az intracelluláris észterázok által deacetilálódik. A DCFDA reaktív oxigéngyökök általi oxidációja fluoreszcens jelet eredményez. A 96 -lyukú lemezekben tenyésztett agyi endotélsejteket a kezeléseket követően $2 \mu\text{M}$ DCFDA-val és $1,5 \mu\text{M}$ pluronsavat tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel inkubáltuk 1 órán keresztül 37°C -on. Pozitív kontrollként hidrogén-peroxid előkezelést ($100 \mu\text{M}$, 30 perc) alkalmaztunk, majd az inkubációs idő leteltével a fluoreszcens jelet spektrofluorométerrel (Fluostar Optima; gerjesztés: 485 nm , emisszió 520 nm) megmértük. A fluoreszcens értékeket a kontroll csoport százalékában adtuk meg (Tóth és mtsai., 2014b).

Az intracelluláris nitrogén-monoxid (NO) termelés fluorometriás kimutatására 4 -amino- 5 -metilamino- $20,70$ -difluorofluoreszcein-diacetátot (DAF-FM-diacetát, Molecular Probes, Life Technologies) használtunk. A 96 -lyukú, fekete, átlátszó aljú lemezekben lévő agyi endotélsejteket a kezeléseket követően 2 mM DAF-FM-diacetátot tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel inkubáltuk 1 órán keresztül 37°C -on. NO donor pozitív kontrollként $100 \mu\text{M}$

nátrium-nitroprusszidot használtunk. Az inkubáció után a fluoreszcens jelet spektrofluorométerrel (Fluostar Optima; gerjesztés: 485 nm, emisszió 520 nm) megmértük. A fluoreszcens értékeket a kontrollcsoport százalékában adtuk meg (Walter és mtsai., 2015).

A cAMP termelés kimutatására egy ELISA kitet (Biotrak, GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) használtunk a gyártó leírása szerint. Az 5 perces IBMX előkezelést, és az 5 perces 25 μ M cAMP-mal történő kezelést követően a sejteket lizáltuk. A felülúszókat az ELISA-lemezre vittük át, és szubsztrátként tetrametilbenzidint adtunk hozzá. Az abszorbanciát 450 nm-es hullámhosszon mértük (Fluostar Optima) (Walter és mtsai., 2015).

3.11. Génexpressziós vizsgálatok

Az endotélsejteket (primer agyi endotélsejtek, GP8, RBE4, D3, D3L) és epitélsejteket (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1) 5 napig tenyésztettük 10 cm-es Petri-csészében. A teljes konfluencia elérését követően a sejteket felkapartuk, összegyűjtöttük és a sejtpelleteket teljes RNS izolálására használtuk fel RNAqueous-4PCR kit segítségével (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA) RNáz-mentes DNáz I kezeléssel a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS-minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel vizsgáltuk (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA). Az izolált RNS-ek integritását Bioanalyzer 2100-zal (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) jellemeztük. Az RNS integritása (RIN) 9,2 és 10 között volt minden vizsgált RNS-mintánál (Veszelka és mtsai., 2018).

A cDNS-szintézist minden esetben 1 μ g RNS-mintán végeztük el a High Capacity cDNS Reverse Transcription Kit (Life Technologies) segítségével, random hexamerekkel, primerek és MultiScribe Reverse Transcriptase segítségével RNáz-inhibitor jelenlétében a gyártó protokollja szerint. A kiválasztott vér-agy gát gének expresszióját kvantitatív PCR segítségével elemeztük TaqMan Low Density Array 384 well segítségével. A kvantitatív valós idejű PCR-eket (qPCR) ABI TaqMan Universal Master Mix (Life Technologies) segítségével végeztük az ABI Prism 7900 rendszerrel (Applied Biosystems, Life Technologies). A qPCR-adatokat az ABI SDS 2.0 szoftver segítségével elemeztük (Applied Biosystems, Life Technologies). Minden mintában a gének expresszióját a 18S rRNS-hez normalizáltuk, amelyet endogén kontrollként használtunk ($\Delta C_t = C_{t\text{gene}} - C_{t18S\text{rRNS}}$). A vizsgált gének expressziós értékeit a $2^{-\Delta C_t}$ képlet segítségével kiszámított normalizált expresszió alapján határoztuk meg, amelyet az alkalmazott qPCR-módszerrel mért legalacsonyabb normalizált expresszióhoz viszonyítottunk. A gének relatív expressziós szintjének számszerűsítéséhez a $\Delta\Delta C_t$ módszert használtuk (Veszelka és mtsai., 2018).

3.13. Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

A sejtenyészetek esetében az agyi endotélsejtek szoros sejtkapcsoló fehérjéi közül az okkludin, zonula occludens-1 (ZO-1) és a klaudin-5 fehérjét, az adherens sejtkapcsoló struktúrák fehérjéi közül a β -katenint (β -kat), míg az epitélsejtekben a klaudin-1, és a klaudin-4 fehérjét mutattuk ki immuncitológiai módszerekkel. A sejtenyészeteket acetometanol 1:1 arányú elegyével -20 °C-on 10 percre fixáltuk, P-gp esetében 4% paraformaldehiddel 30 percre 4 °C-on. Ezt követően háromszor mostuk a mintákat PBS-sel, és a sejteket 3 %-os BSA-PBS blokkoló oldattal szobahőmérsékleten 60 percre, majd az elsődleges antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Az elsődleges antitestek, az anti-ZO-1 (nyúl), anti- β -katenin (nyúl), az anti-klaudin-1, -4, -5 (egér) és anti-okkludin (nyúl) a Life Technologiéstól (Invitrogen), az anti-P-gp (egér) a Calbiochemtől származott. A primer ellenanyaggal történő inkubálás után és PBS mosást követően a Cy3-kapcsolt anti-nyúl, illetve az anti-egér-Alexa 488 szekunder ellenanyagok és a Hoechst 33342 magfestékekkel 60

percig inkubáltuk a mintákat. Végül háromszori PBS mosást követően a mintákat lefedtük (Gel/Mount, Biomeda, USA), és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse TE 2000 U, Nikon, Japan) és SPOT RT digitális kamerával (Spot Diagnostic Instruments, USA) képeket készítettünk (Hellinger és mtsai., 2012; Bocsik és mtsai., 2016; Veszelka és mtsai., 2018).

Az NF κ B festéshez a sejteket hideg aceton-metanol 1:1 arányú oldattal 10 percig 21°C-on fixáltuk, majd 1%-os FBS-PBS-ben tároltuk egy éjszakán át. Ezután a sejteket anti-NF κ B antitesttel (nyúl, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) inkubáltuk TRIS pufferben 90 percig. Másodlagos ellenanyagként anti-nyúl Alexa 568 (Molecular Probes, Life Technologies) festéket használtunk 90 percig Hoechst 33342 sejtmagfestéssel kombinálva. A festések között a sejteket háromszor mostuk TRIS pufferrel. A mintákat glicerín és 10 mM 1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktánt tartalmazó puffer 1:1 arányú keverékével lefedtük (Walter és mtsai., 2015).

Az ApoB100 egerek agyi kapillárisainak immunfestéséhez (Hoyk és mtsai., 2018) a pentobarbitállal túlaltatott állatokat transzkardiálisan perfundáltuk fiziológiás sóoldattal, majd 3 % paraformaldehidet tartalmazó PBS-sel. Az agyakat ugyanebben az oldatban utórögzítettük 4 órán át, majd 30%-os cukoroldatban tartottuk 4 °C-on, hogy az ezt követő fagyasztás szövetet roncsoló hatását kivédjük. A hippocampusból és a frontális kéreg mintákból 30 μ m-es koronális metszeteket vágunk kriosztáttal. Az antigén feltáráshoz a mintákat 10 percig 0,5 % Triton X-100-zal kezeltük. Az elsődleges anti-GFAP (egér) ellenanyag az Abcamtól, az anti-P-gp (egér) a Merck Millipore-től származott, míg a másodlagos ellenanyagok DyLightTM-488 és Alexa FluorTM-594 a Jackson Immuno Researchtől (Europe Ltd., Cambridgeshire, United Kingdom), a minták magfestése DAPI-val történt. A kész mintákat lefedtük (Confocal MatrixR; Micro Tech Lab, Graz, Austria) és konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk (Olympus Fluoview FV1000, Olympus Life Science) és fotóztuk (Hoyk és mtsai., 2018).

A stressz kezelt patkányok agyi kapillárisainak immunfestéséhez az agyminták előkészítése a 15 μ m-es kriosztátos metszetek készítéséig a fentiekhez hasonlóan történt (Sántha és mtsai., 2016). Az antigén feltáráshoz a GLUT1 és a GFAP esetében 10 mM citrát puffert használtunk (20 perc, 70 °C), majd a metszeteket 0,5%-os TritonX-100-PBS-ben 30 percig inkubáltuk. A klauudin-5 és az okkludin festések esetében 0,5%-os TritonX-100-PBS-ben 30 percig inkubáltuk a mintákat, amit 7 perc, 10 μ g/ml pronázos (Proteáz Type XIV), kezelés követett. A nem specifikus kötőhelyeket 1% BSA-val blokkoltuk, majd a metszeteket egy éjszakán át a következő elsődleges ellenanyagokkal 4 °C-on inkubáltuk: anti-GFAP (egér), anti-GLUT1 (nyúl), anti-klauudin-5 (nyúl), anti-occludin (nyúl), melyek a Thermo Fisher Scientifictől (Waltham, MA, USA) származtak. PBS mosást követően a metszeteket 60 percig inkubáltuk a másodlagos ellenanyagokkal Alexa Fluor-488 anti-egér (Thermo Fisher Scientific) és Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyaggal. Az inkubálást követően Hoechst magfestéssel 5 percig kezeltük a mintákat majd lefedtük Fluoromount-G oldattal (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) és Leica SP5 konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk (Sántha és mtsai., 2016).

3.14. Nanorészecskék előállítása

Szolid lipid nanorészecskék előállítása (SLN)

Az SLN nanorészecskéket török együttműködő partnereinkkel (Dr. Rüya Topal, Prof. Asuman Bozkir, Ankarai Egyetem) együtt készítettük. Az SLN-et víz/lipid emulzió – homogenizálás – szonikálás módszer szerint készítettük. A lipid fázist alkotó dynasan 116 (IOI Oleo GmbH, Németország) tripalmitint 75-80 °C-ra melegítettük, hozzáadtuk a hatóanyagot (2 mg donepezil HCl) és a fluoreszcensen festéket (rodamin B; RhB, 1mg/100 mg lipid). A vizes fázist alkotó PBS-t 75-80 °C-ra melegítettük és Tween 80 (0,1 mg/100

mg lipid) felületaktív anyagot adtunk hozzá majd ezután a lipid fázishoz adagoltuk, és homogenizátorral (Ultra Turrax T 25, IKA Labortechnik, Németország) megkevertük (8000 rpm, 5 perc). Az így keletkezett emulziót 2 percig szonikáltuk (Sonoplus, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Németország), majd a lehűlt emulzióból nanoemulziót nyertünk. Az SLN részecskéket végül centrifugálással (4000 rpm, 20 perc, 4 °C) választottuk el a bezáratlan hatóanyagtól és festéktől. Az összegyűjtött pillethez 100 µg/ml gentamicint adtunk, a mintákat felhasználásig 4 °C-on, fénytől elzárva tároltuk. Az SNP-k ApoE funkcionálizáláshoz biotinilált ApoE-t (rekombináns humán ApoE3; Peprtech) használtunk, melyet DSPE-PEG-avidin segítségével kötöttünk a részecskék felszínére (Topal és mtsai., 2021)

Nioszómák előállítása

A nioszómák előállításához Span 60 (szorbitán-monosztearát) és a Solulan C24 (koleszterin-poli-24-oxietilén-éter; Chemron Co., Amerikai Egyesült Államok) nem-ions felületaktív anyagokat, valamint a vezikulák szerkezetét stabilizáló koleszterint használtunk fel (Mészáros és mtsai., 2018). A fenti alapanyagokhoz további 4% (teljes lipid tömegszázalék) dodekanoil-alanint (A), vagy 4% glükopiranózt és 4% DSPE-PEG(2000)-GSH-t adtunk a célzott, kettős ligandkombinációval funkcionizált nanopartikulumok készítése során. A három liganddal jelölt nioszómák esetében pedig 4% 6-O-palmitoyl-L-aszkorbinsavat, 4% DSPE-PEG(2000)-GSH-t és 4% dodekanoil-leucint alkalmaztunk (Veszelka és mtsai., 2022) Az anyagokat forró kloroform és etanol 1:2 arányú elegyében feloldottuk, majd a szerves oldószereket nitrogén gáz segítségével elpárologtattuk és a mintákat vákuum alatt szárítottuk 12 óráig. Az oldószerek elpárologtatását követően létrejött vékony lipidfilm réteget Evans kék jelölt szérumból albumint (EBA; 67kDa; 0,167 mg/ml Evans-kék, 10 mg/ml BSA) tartalmazó PBS-sel hidratáltuk. A hidratálással során a lipidfilm réteg feloldódását 25 perces szonikálással segítettük elő 45 °C-os vízfürdőben. Az így előállított nanovezikulákat ultracentrifugálással (123 249 g, 6 óra, 4 °C) választottuk el a bezáratlan EBA-tól. A centrifugálás után a pelletet fenolvörös mentes DMEM/F-12 médiumban felfuszpendáltuk, majd 0,45 µm-es fecskendőszűrővel sterilre szűrtük és felhasználásig 4 °C-on, fénytől elzárva tároltuk.

Polipeptid nanorészecskék előállítása

A kísérleteinkhez a 3-PLG nanohordozókat tajvani együttműködő partnerünk (Prof. Jeng-Shiung Jan, National Cheng Kung University, Tainan) állította elő (Mészáros és mtsai., 2023). A 3-PLG alapváz szintetizálásához tri-(2-aminoetil)-aminból (7 mM) és glutaminsav-γ-benzil-észter-N-karboxianhidridből (262 mM) tetrahydrofurános oldatot készítettek. Az elegy háromnapos nitrogén alatti kevertetése, etil-éteres kicsapása és az oldószer eltávolítása után háromkarú poli(γ-benzil-L-glutaminsav) keletkezett. A benzil-csoportok eltávolítása a jodotrimetil-szilán (1:5 mol arányban) hozzáadásával és kevertetéssel (24 óra) történt. Az így előállított 3-PLG összegyűjtése hexános kicsapás, centrifugálás és szárítás lépéseivel valósult meg. A célzott nanohordozók (3-PLG-A-GSH) elkészítéséhez a 3-PLG alapvázhoz az A és GSH hozzákapcsolása a karboxil csoportok aktiválásával EDC-HCl/NHS reakcióval történt, végül a nanohordozókhoz 1:20 tömegarányban rodamin 6G (R6G) fluoreszcens molekulát kötöttek EDC-HCl/NHS reakcióval.

3.15. Nanorészecskék jellemzése

Az előállított nanorészecskék fiziko-kémiai tulajdonságát, mint a partikulumok átmérőjét, polidiszperzitási indexét (PDI), felszíni töltését (zéta potenciál) He-Ne lézerrel

felszerelt a dinamikus fényszórás (DLS) elvén alapuló módszerrel, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Egyesült Királyság) műszer segítségével határoztuk meg. A nioszómákba csomagolt fluoreszcens modellanyag bezárási hatékonyságát a részecskék 50 %-os etanolos feltárása után spektrofluorométerrel (Fluorolog 3, Horiba Jobin Yvon, Japán) határoztuk meg az alábbi egyenlet segítségével (Mészáros és mtsai., 2018):

$$\text{Bezárási hatékonyság (\%)} = \frac{\text{Nioszóma minta fluoreszcens töltet tartalma}}{\text{Összes fluoreszcens töltet}} \times 100$$

3.16. Sejtfelvételi vizsgálatok

Megvizsgáltuk a nem célzott és célzott nanorészecskék töltetének agyi endotélsejtekbe jutását. A kísérletekhez a sejteket IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronektinnel (25 µg/ml) bevont, 24-lyukú tenyésztőlemezekben növesztettük. A sejteket konfluens állapotban 15 perc-24 óra közötti intervallumban kezeltük meg a fenolvörös mentes tápfolyadékban hígított nanorészecskékkel. Az inkubációs idő leteltével a kezelő oldatokat eltávolítottuk, majd a sejtek felszínéhez tapadt, de sejtbe be nem jutott nanorészecskéket 0,1% BSA-t tartalmazó jéghideg PBS-sel, valamint egyszeri savas pufferrel (50 mM glicin, 100 mM NaCl; pH 3) mostuk le. A savas puffer eltávolítása érdekében további PBS-es mosást alkalmaztunk. A kísérlet végén a sejteket 1% Triton X-100 tartalmú desztillált vízzel tártuk fel. A sejtekbe bejutott fluoreszcens töltet fluoreszcencia intenzitásait spektrofluorométerrel mértük meg, majd a sejtek összfehérje tartalmához viszonyítottuk, amelyet BCA-val (BCA Protein Assay, Thermo Fischer Scientific, Amerikai Egyesült Államok) határoztunk meg (Szecskó és mtsai., 2025).

3.17. Sejtfelvételi mechanizmusok vizsgálata

Annak igazolására, hogy a nanorészecskék kölcsönhatása a neurovaszkuláris egység sejteivel aktív, energiaigényes sejtfelvételi folyamatokhoz kötődik, megvizsgáltuk a fluoreszcens töltet meghatározása alapján a részecskék sejtfelvételének hőmérséklet függését és a metabolikus inhibítor ATP szintézist gátló nátrium-azid kezelés hatását a sejtfelvételre. Ehhez a 3.16. fejezetben leírtakkal megegyezően jártunk el, azzal a módosítással, hogy a sejtek egy részét 4 °C-on inkubáltuk, illetve 1 mg/ml nátrium- aziddal kezeltük.

Az endocitotikus útvonalakhoz köthető sejtfelvételi mechanizmusok felderítésére a sejteket filipin (5 µg/ml, 15 perc) és citokalazin D (0,125 µg/ml, 1 óra) endocitózis gátlószerekkel előkezeltük, majd megkezeltük a nanorészecskékkel. Ezt követően a mosási és NP feltérési lépéseket a 3.16. fejezetben leírtakkal megegyező módon hajtottuk végre.

A felületi töltésnek az NP-k sejtfelvételében betöltött szerepének tanulmányozására az sejtek felületi glikokalixát neuraminidázzal (1 U/ml, 1 órás előkezelés) emésztettük, vagy a sejteket 54 µM kationos lipid 1-(4-trimetil-ammonium-fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatriénnel (TMA-DPH; Molecular Probes, Life Technologies) kezeltük a sejtfelvétel előtt 30 perccel. Ezt követően a mosási és NP feltérési lépéseket az előző fejezetben leírtakkal megegyező módon hajtottuk végre.

Az NP-k endoplazmatikus retikulumban (ER), Golgi apparátusban vagy lizoszómákban való elhelyezkedésének nyomon követése érdekében (Szecskó és mtsai., 2025) az agyi endotélsejteket üvegaljú Petri-csészékbe (Greiner Bio-One, Németország) ültettük. A sejteket 24 órán át nanopartikulumokkal kezeltük. A kolokalizáció megfigyeléséhez az élő sejteket az ER, a Golgi vagy a lizoszómák szelektív festékével inkubáltuk a gyártó utasításai szerint (ER Staining Kit-Green Fluorescence-Cytopainter

Abcam, Cambrige, MA, USA, ab139481, 15 perc, 1: 1000; Golgi Staining Kit-Green Fluorescence-Cytopainter, Abcam, ab139483, 15 perc, 1:100; lizoszóma festő készlet-zöld fluoreszcencia-cytopainter, Abcam, ab176826, 30 perc, 1:500) és Hoechst 33342 festékekkel (15 perc, 1 µg/mL) 37°C-on, CO₂ inkubátorban. Az inkubációk után az élő sejteket kétszer mostuk 1% PDS-sel kiegészített fenolvörös-mentes tápfolyadékkal, majd Leica TCS SP5 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Németország) felvételeket készítettünk. A kolokalizációs eredményeket objektumfelismerésen alapuló kolokalizációs elemzéssel számoltuk ki pixel-intenzitás korrelációval (objektum-korrigált Pearson-együttható) (Szecskó és mtsai., 2025).

3.18. Mikroszkópos vizsgálatok (TEM, SEM, AFM)

A transzmissziós elektron mikroszkópos (TEM) vizsgálatokhoz a tenyésztőbetétek membránján növesztett agyi endotélsejteket 0,5% glutáraldehidet tartalmazó 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk PBS-ben 30 percig 4 °C-on. A pufferrel történő többszöri mosás után a membránon lévő sejteket 1%-os OsO₄-ban posztfixáltuk 30 percig. A desztillált vízzel történő öblítést követően a sejteket fokozatos etanolban dehidratáltuk, majd 1%-os uranil-acetáttal 50%-os etanolban 1 órán át inkubáltuk. A dehidratálás utolsó lépése után a tenyésztőbetéteket abszolút alkohol és Taab 812 (Taab; Aldermaston, Berks, UK) 1:1 arányú keverékébe helyeztük 30 percre 30 °C-on. Végül a sejteket tartalmazó tenyésztőbetétek membránjait eltávolítottuk a hordozóról, és Taab 812-be beágyasztuk. A polimerizációt egy éjszakán át 60 °C-on végeztük. A membránra merőlegesen ultravékony metszeteket vágunk Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems, Milton Keynes, Egyesült Királyság), és Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi Ltd., Tokió, Japán) vizsgáltuk (Hellinger és mtsai., 2012).

Az ApoB100 egerek esetében a pentobarbitállal túlaltatott állatokat transzkardiálisan fiziológiás sóoldattal, majd 4% paraformaldehidet és 2,5% glutáraldehidet tartalmazó PBS-sel perfundáltuk. Az agyakat 4% paraformaldehiddel posztfixáltuk, majd 40 µm-es koronális metszeteket vágunk vibratómmal. A továbbiakban a metszeteket a sejtenyészetekkel megegyező módon kezeltük (Hoyk és mtsai., 2018).

Az SNP nanorészecskék morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk (SEM; JEOL, JSM-7100F-LV, Akishima, Tokió, Japán), amihez a nanorészecske oldatából 50 µL-t 10⁵-re hígítottuk, és 1 µL oldatot pipettáztunk egy tiszta mica felületre, majd levegőn száradni hagytuk. Miután 8 nm-es arany réteget porlasztottunk a részecskékre nagyvákuumos üzemmódban, 5 kV-on vizsgáltuk az SNP-ket (Veszelka és mtsai., 2017).

A GSH kötődési erőméréseket atomerő mikroszkóppal (AFM) is végeztük, melyhez az agyi endotélsejteket kerek, Matrigéllal bevont 24 mm-es fedőlemezekten tenyésztettük. A sejtekre tápfolyadékot cseppentettünk, melybe 10 µm átmérőjű boroszilikát, 10 pN/nm névleges rugóállandójú kolloid tűket merítettünk. Az AFM tűket 2% APTES ((3-aminopropil)triethoxiszilán) (Molar Chemicals Ltd.) oldattal inkubáltuk 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten, hogy szabad primer amincsoportokat hozzunk létre a felületükön. Ezt követte a glutáraldehid inkubálás (1% Milli-Q vízben, 5 perc), ami lehetővé teszi a PEG-linker aminjának kötését az APTES amincsoportjához. Ezt követően az amino-PEG-maleimid linkert az AFM-csúcs felületéhez csatoltuk inkubálással 10 mg/ml etanololdatban 20 percig. Az így készült PEGilált AFM hegyeket negatív kontrollként használtuk. Végül a konzolokat 100 mM GSH-PBS oldatba merítettük 20 percre, hogy GSH-val bevont AFM-tűket kapjunk. Minden AFM mérést egy Asylum Research MFP-3D fejjel és vezérlővel végeztük kontakt üzemmódban (Oxford Instruments Asylum Research) (Fekete és mtsai., 2021).

3.19. Erőmérés optikai lézercsipesszel

Az SZBK Biofizikai Intézetének Biofotonika és Biomikrofluidikai Kutatócsoportjával együttműködésben Dr. Kelemen Lóránddal és Fekete Tamással egy új, innovatív optikai lézercsipesz technikát dolgoztunk ki, mellyel elsőként sikerült kimérnünk a GSH célzóligand közvetlen kötődési erősségét élő agyi endotélsejtek sejt felszínéhez (61. ábra) (Fekete és mtsai., 2021). Ehhez az agyi endotélsejteket UV-maszk-litográfiával SU-8 fotopolimerből készített 100 μm magas, 100 μm széles, és 5 mm hosszú merőleges falra növesztettük Petri-csészében. A lézerfényrel mozgatható, 15 μm -es, GSH-val funkcionizált érintkezési felülettel rendelkező mikroeszközöket SU8 fotopolimerből két foton polimerizációs technikával készítettük. A mikroeszközök mozgatásához az optikai csipesszel lézerfényre és négy csapdafókuszra volt szükség. Ha a mikroeszköz csapdába esett, bárhová mozgatható a sejteket tartalmazó mintatérben, és az érintkezési felülete az SU-8 falon tenyésztett sejtek felé irányítható. Az SU-8 ideális optikai manipulációhoz, mivel viszonylag magas törésmutatóval rendelkezik, ami erős csapdázást biztosít, ezen túl biokompatibilis és oxidatív eljárásokkal funkcionizálható, így felülete kovalens kötésű ligandumokkal bevonható. A kísérlet menetét a 61. ábra szemlélteti. Először a mikroeszközöket helyeztük a Petri-csészébe, amely már tartalmazta a sejteket, majd lokalizáltuk a célsejtet. Ezután optikai csapdázással megfogtuk a mikroeszközt és a kiválasztott sejthez vittük, majd az optikai csapdák mozgatásával a helyére fordítottuk: az érintkező felületét a sejt membránjához közelítettük és fókuszba állítottuk. Ezután a mikroeszköz az optikai lézercsipesszel való lassú mozgatásával megközelítette a sejtet, amíg az érintkezési felülete hozzá nem ért a sejthez; ezt az eseményt vizuálisan határoztuk meg a csapdázó fókuszpontok megfigyelésével. Ezután a mikroszerszámot a sejthez nyomtuk kb. 10- 20 pN erővel a négy csapdázó sugár előrehaladásával. Ez volt az a pont, ahol a 61. C. ábrán bemutatott tapadási erő mérési eljárás ténylegesen megkezdődött. Amikor a mikroeszközöket a kiválasztott sejt felületéhez toltuk, a csapdába esett gömb elmozdulását az egyensúlyi helyzetéből (ΔX) negatívnak tekintettük. Miután 10 másodpercet vártunk ebben a pozícióban, az optikai csipesszel 50 nm-es vagy 250 nm-es lépésekkel 5 μm -rel visszahúztuk a szerkezetet. E visszahúzás során minden lépés után képet készítettünk a mikroeszközzel, így 100, illetve 20 képet kaptunk a 50, illetve 250 nm-es lépésméret esetén. A visszahúzás kezdetén a mikroeszköz nem mozdult el, de a még mindig negatív ΔX lassan nőtt. Ha a mikroeszköz és a sejt között nem volt tapadás, a ΔX először nulla lett, majd a mikroeszköz levált a sejtről és követte a csapdázó fókuszokat (a ΔX már nem nőtt tovább). Ha volt tapadás, ΔX pozitív lett, és az optikai csapda jelentős húzóerőt gyakorolt a mikroeszközre. Végül, amikor az optikai erő meghaladta az adhézión erő, a mikroeszköz elvált a cellától, és a gömbök középpontjai visszatértek a csapdahelyzetbe (ΔX nullává válik). Ezután vagy ugyanazt a mikroeszközt használtuk egy másik sejt vizsgálatára (legfeljebb 3 sejt/mikroeszköz), vagy egy másik mikroeszközt fogtunk be, és a következő sejten használtuk. Minden kísérletet legalább 2-szer megismételtünk különböző napokon, a párhuzamos mérések száma minden kísérletben 6-10 volt (Fekete és mtsai., 2021).

3.20. In vivo kísérletek

Az állatkísérletek során mindvégig betartottuk az Európai Unió testületének (2010/63/EU) irányelveit és a magyar jogszabályokat (1998. XXVIII) az állatvédelemről és állattólólóról és a vizsgálatokat a helyi állategészségügyi hatóság jóváhagyásával végeztük (engedélyszámok: XVI./03835/001/2006, XVI./834/2012, XVI/4136/2014).

Az immobilizációs stressz kezelésekhöz felnőtt Wistar patkányokat használtunk a korábban leírtak szerint (Sántha és mtsai., 2012). Az eljárás során az állatokat

véletlenszerűen négy kísérleti csoportra osztottuk. Az 1. csoport ($n = 4$) tartalmazott olyan kontroll állatokat, amelyeket teljesen háborítatlanul hagytunk, míg a 2. csoport ($n = 4$), 3. csoport ($n = 4$), és a 4. csoport ($n = 4$) olyan patkányokat tartalmazott, amelyek 1, 3, illetve 21 napig tartó immobilizációs stresszben részesültek, amely során napi 5 órát töltöttek az állatokat egy műanyag csőbe húzva (Sántha és mtsai., 2016).

A 7, 9 és 12 hónapos APOB-100 transzgénikus ($n = 5$) és vad típusú egerek ($n = 5$) esetében a szérum trigliceridszintek meghatározásához vért gyűjtöttünk, majd a mintákat $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 1000 g-n centrifugáltuk 10 percig, és a szérumot eltávolítottuk. A szérum triglicerid szintjét egy enzimatikus kolorimetriás teszttel (Diagnosticum Kft., Budapest, Magyarország) mértük a gyártó utasításai szerint. A teszt pontosságát ellenőriztük standard lipidkontrollokkal (Diagnosticum Kft., Budapest, Magyarország). A lila színű termék abszorbanciáját 560 nm-en mértük mikrolemez olvasóval (Multiskan FC, Thermo Scientific, Egyesült Államok). Az értékeket mmol/literben adtuk meg.

A hat hónapos vad típusú és transzgénikus ApoB100 egerek ($n = 10$) állatok/csoport) a vér-agy gát permeabilitás méréséhez nátrium fluoreszcein és EBA oldatot kaptak (2%, 5 ml/kg) iv. injekcióban a farokvénába 1 órán keresztül, majd a kísérletek végén az állatokat perfundáltuk, az agyakat kiemeltük és az agykéregből és a hippocampusból mintákat gyűjtöttük. A szövetdarabokat 650 ml PBS-ben homogenizáltuk, majd 650 ml hideg, 50%-os (m/V), frissen készített triklór-ecetsavat adtunk hozzá, és a mintákat 10 000 g-vel 12 percig centrifugáltuk $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A festékkoncentrációkat a felülúszóban PTI spektrofлуоримéterrel (T-formátum, QuantaMaster QM-1; Photon Technology International) mértük meg. A vér-agy gát permeabilitást ng nyomjelző anyag/g agyban fejeztük ki (Hoyk és mtsai., 2018).

A nioszómák *in vivo* agyi bejutásának vizsgálatához tíz hetes hím CD1-Foxn1nu szőrtelen egereket (Winkelmann, Borchon, Németország) használtunk kisállat fluoreszcens képalkotó Optix™ műszer (ART, Montreal, Kanada) segítségével. A műszer alkalmas volt a nioszómák fluoreszcens EBA töltetének nyomon követésére valós időben és több időpontban ugyanazon az állaton. Az anesztéziát a fluoreszcencia detektálás alatt oxigén-izoflurán gázkeverékkel biztosítottuk egy kis maszkon keresztül. A különböző nioszómákat (N, N-A, N-GP, N-A-GP) intravénásan (100 μl , farokvénába) adtuk be, és fluoreszcencia méréseket végeztünk 24 óráig meghatározott időpontokban (0, 10 és 30 perc, 3, 6 és 24 óra). Az állatokat a hosszabb mérési pontok között visszavittük a ketrecükbe, és biztosítottuk az élelemhez és vízhez jutást. Az EBA vörös fluoreszcens jelét élő, altatott egerek egész testén 0,5 mm-es lépésekben detektáltuk. A fluoreszcencia detektálásához időkorrelált egyfotonszámláló rendszert (TCSPC-130) használtunk. Az intenzitási egységeket raszterpontonként (integrációs idő) azonos gerjesztési teljesítmény és gerjesztési idő mellett normalizáltuk (Mészáros és mtsai., 2018).

3.21. Statisztikai kiértékelések

Az adatokat átlag $\pm$ SD (szórás) vagy SEM (az átlag standard hibája) formában adtuk meg. Az adatsorokon statisztikai tesztként egymintás *t*-próbát, egyutas vagy kétutas variancia-analízist (ANOVA) és azt követően Dunnett és Bonferroni-poszttesztet végeztünk GraphPad Prism 5.0 program segítségével (GraphPad Software Inc., Amerikai Egyesült Államok). Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,05$ értékeket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az agyi gyógyszerbejuttatás vizsgálatára használt sejtenyészeti modellek összehasonlítása

A vér-agy gát kutatásokban alkalmazott, eltérő eredetű és komplexitású *in vitro* modellek csak részben képesek modellezni a humán vér-agy gát működését, és jelentős különbségeket mutatnak a hatóanyagok célpontjaként szolgáló receptorok, transzporterek valamint efflux pumpák kifejeződésében (Uchida és mtsai., 2020). Ezért kutatásainkban célul tűztük ki, hogy összehasonlítsunk kilenc, a preklinikai kutatásokban és gyógyszeripari tesztekben leggyakrabban használt vér-agy gát és vér-agy gátat helyettesítő modell morfológiai és funkcionális tulajdonságait, kiemelve az egyes modellek előnyeit és hátrányait gyógyszerek agyi penetrációjának tesztelésében. Nagy szükség van a vér-agy gát komplexitását a lehető legjobban megközelítő sejtenyészeti modellek alkalmazására, melyek megbízható módon jelzik előre a kutatások e korai fázisában egy hatóanyag lehetséges terápiás sikerét a klinikumban.

4.1.1. Morfológia és vér-agy gát funkciók vizsgálatok (Hellinger és mtsai., 2012)

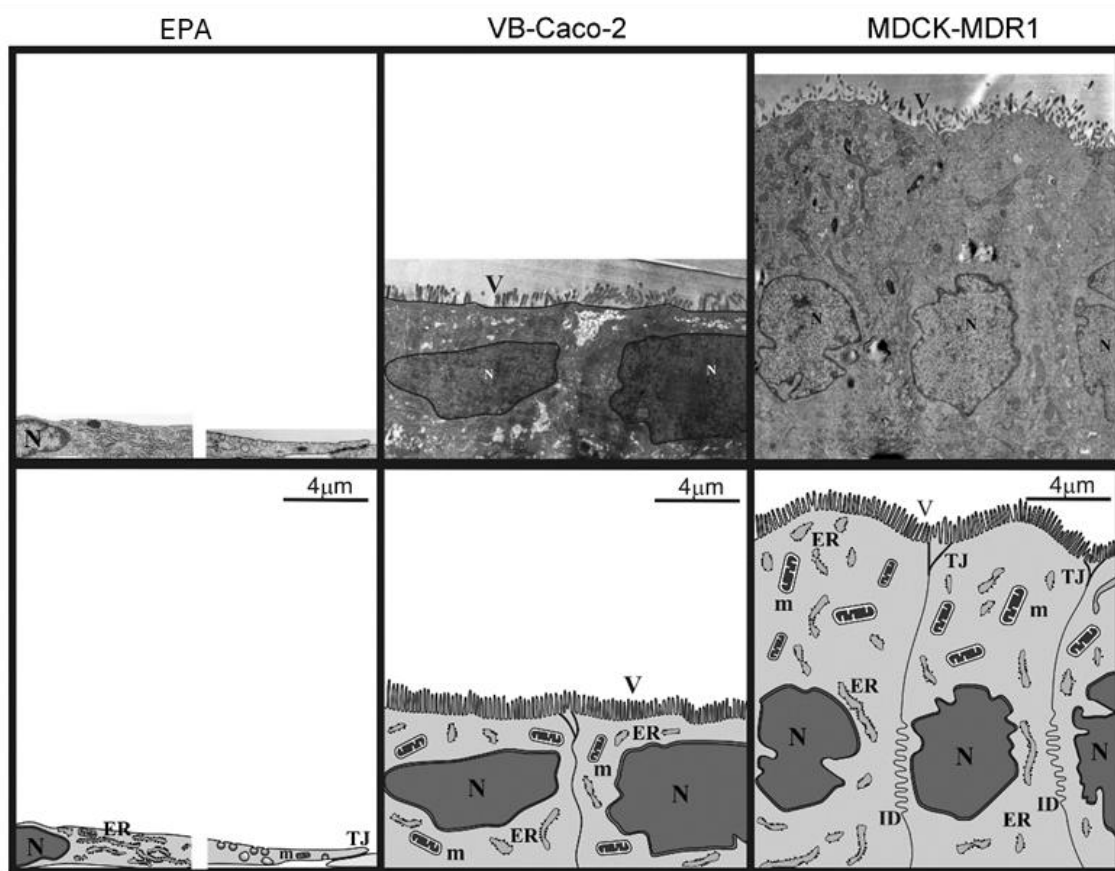
A központi idegrendszert célzó gyógyszerek sikertelenségének gyakori oka, hogy az agyi kapilláris endotélsejtek barrierfunkciója miatt a gyógyszerek nem jutnak el az agyi célpontokhoz. A vér-agy gát transzporterek, mint például a P-gp, (MDR1), és a gyógyszerek plazmafehérjékhez vagy agyszövethez való kötődése drasztikusan módosíthatják a gyógyszerek agyi penetrációját és az agyszövetben való eloszlás mértékét, amelyek mind befolyásolják a gyógyszeres terápia sikerét (Vastag és Kesserű, 2009). A komplex, mind a passzív penetrációs mind pedig az aktív transzportfolyamatokat is modellező sejt kultúrák az ipari gyógyszerpenetrációs kutatások kedvelt eszközei (Vastag és Kesserű, 2009; Veszelka és mtsai., 2011; Veszelka és mtsai., 2015). A preklinikai gyógyszerkutatásokban az agyi penetráció előrejelzésére számos sejtenyészeti modellrendszert alkalmaznak. Általános elvárás az *in vitro* vér-agy gát modellekkel szemben, hogy kis molekulaméretű marker molekulákra, mint például fluoreszcenre alacsony penetrációt mutasson, valamint a sejtrétegek transzendentális elektromos ellenállása nagyobb, vagy minimum $150\text{-}200\ \Omega \times \text{cm}^2$ legyen (Deli, 2005).

Az endotélsejt alapú vér-agy gát modellek primer agyi endotélsejtek, immortalizált sejtvonalak (GP8, RBE4, hCMEC/D3, stb) vagy összejtől differenciáltatott endotélsejtek tenyésztésén alapulnak. A patkány primer agyi endotélsejtek, valamint patkány primer periciták és asztrociták hármas tenyészetéből álló vér-agy gát modellt kutatócsoportunk japán partnereinkkel közösen szabadalmaztatta (Nakagawa és mtsai., 2009). A primer endotélsejtes modellek agyi kapilláris eredetüknek köszönhetően a megfelelő genetikai háttérrel rendelkeznek és általában a vér-agy gát modellekkel szemben támasztott minimum követelményeknek messze eleget tesznek. Nagy áteresztőképességű, rutinszerű ipari használatra azonban kevésbé alkalmasak, mivel munkaigényesek, magas szakértelmet követelnek és előállításuk igen költséges (Hellinger és mtsai., 2012). A különböző tenyésztési körülmények hatására gyakran csökken a transzporterek és efflux pumpák expressziója is, ami problémát okoz a gyógyszerpenetrációs vizsgálatokban.

A sejtenyészeti modellek másik típusa az epitélsejtalapú, úgynevezett vér-agy gát helyettesítő modellek, mint például az MDCK kutyavese epitélsejtek, amelyeket a humán MDR1 génjével transzfektáltak, valamint a Caco-2 humán bélepitélsejtvonal. Ezen sejtvonalak genetikai háttere epitélsejt eredetüknek köszönhetően eltér a vér-agy gát

sejtékétől. A transzfektálásnak köszönhetően a magas P-gp efflux pumpa aktivitást mutató MDCK-MDR1-et, mint vér-agy gát helyettesítő modellt használják a gyógyszeriparban (Wang és mtsai., 2005). A natív Caco-2 az iparban elsősorban a bélrendszeri felszívódás előrejelzéséhez elsődlegesen használt modell, de szoros paracelluláris tulajdonsága miatt gyakran a vér-agy gát átteresztőképességének előrejelzésére is alkalmazzák (Veszelka és mtsai., 2011). Komoly hátránya, hogy a Caco-2 P-gp aktivitása a natív tenyészetben alacsony és nagyon változó. Együttműködő partnereink ezért kifejlesztették a vinblasztinnal szelektált Caco-2 sejt vonalat (VB-Caco-2), amely magas P-gp expressziója miatt így mind a passzív mechanizmusok, mind a P-gp szubsztrát gyógyszerek szűrésére is alkalmassá vált (Hellinger és mtsai., 2010).

Kutatómunkánk során célul tűztük ki, hogy részletesen összehasonlítsuk a magas integritású patkány primer agyi kapilláris endotélsejtes vér-agy gát modellt és az epitélsejt-alapú, Caco-2, VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 vér-agy gát helyettesítő modelleket mind morfológiai vizsgálatokban, mind pedig funkcionális tesztekben (Hellinger és mtsai., 2012).

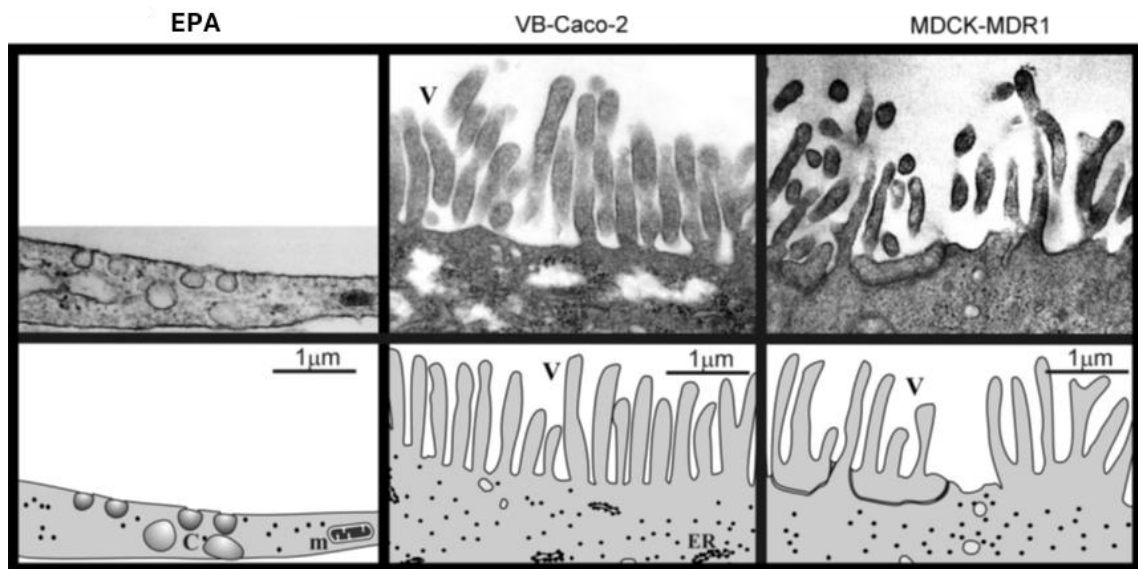


8. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a patkány primer vér-agy gát modell (EPA), VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 sejtek citoarchitektúrájáról. ER, endoplazmatikus retikulum; ID, interdigitáció; m, mitokondrium; N, sejtmag; TJ, intercelluláris szoros kapcsolatok; V, mikrovillusok (Hellinger és mtsai., 2012).

Az elektronmikroszkópos felvételeken jól látható volt, hogy az agyi endotélsejtek, nem átfedő, egysejtrétegben nőttek, magasságuk a perinukleáris régióban körülbelül 1,5-2 μm volt, a sejtek széle felé haladva a sejtek még laposabbak, 0,2-0,4 μm magasak voltak (8, 9. ábra). A szomszédos endotélsejtek közötti átfedő plazmamembránok között jól kivehetők a szoros sejtkapcsoló struktúrák hosszú sorai (10. ábra). Az endotélsejtek felszíne jellemzően sima, de gyakran megszakítják kisebb kaveolák, vagy kaveola szerű invaginációk (8, 9. ábra).

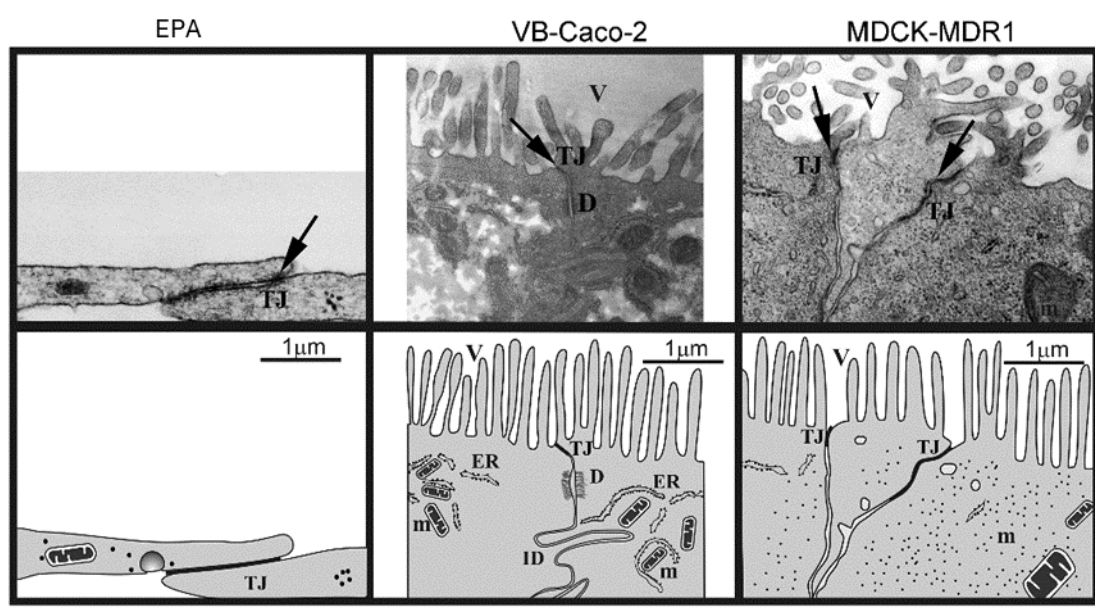
Az agyi endotélsejtek pozitívan festődtek az endotél-specifikus kladin-5 fehérjére, de nem festődtek az epiteliális típusú kladin-4-re, valamint pozitív immunfestődést mutattak ZO-1 és β -katenin fehérjékre (11. ábra, 2. táblázat). Az agyi kapilláris endotélsejtek vékony, megnyúlt, örvénylő mintázatot mutatnak a fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatban, kis nagyítás mellett.

A natív Caco-2, VB-Caco-2 és kutyavese epitélsejt tenyészetek (MDCK, MDCK-MDR1) nem átfedő, egysejtrétegben nőttek, alakjuk jellegzetesen kuboid (8, 9. ábra). Szembeötlő morfológiai különbség, hogy a vese epitélsejtek magasabbak (MDCK-MDR1: 10-20 μm), mint a bélepitélsejtek (VB-Caco-2: 8-15 μm). Mindkét sejtípus apikális felszínét mikrovillusok borítják (8, 9. ábra).



9. ábra. A patkány primer vér-agy gát modell (EPA), a VB-Caco-2 és az MDCK-MDR1 modellek sejtfelszíneinek elektronmikroszkópos felvételei. C: kaveola; ER: endoplazmatikus retikulum; m: mitokondrium; V: mikrovillusok. (Hellinger és *mtsai*, 2012).

Az epitélsejtekénél a szomszédos sejtek között a TJ struktúrák viszonylag rövidek (0,3-1 μm), a sejtek között apikálisan helyezkednek el, és jól elkülönülnek más sejtkapcsoló struktúráktól, mint például a dezmoszómáktól. A bazolaterális régióban interdigitációk voltak megfigyelhetők a szomszédos sejtek között (10. ábra).



10. ábra. Patkány primer vér-agy gát modell (EPA), VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 intercelluláris kapcsolatok elektronmikroszkópos felvételei. D, dezmoszóma; ER, endoplazmatikus retikulum; ID, interdigitációk; m, mitokondrium; N, sejtmag; TJ, sejtközi szoros kapcsolatok; V, mikrovillusok. A nyilak a szoros intercelluláris kapcsolatokra mutatnak (Hellinger és mtsai., 2012).

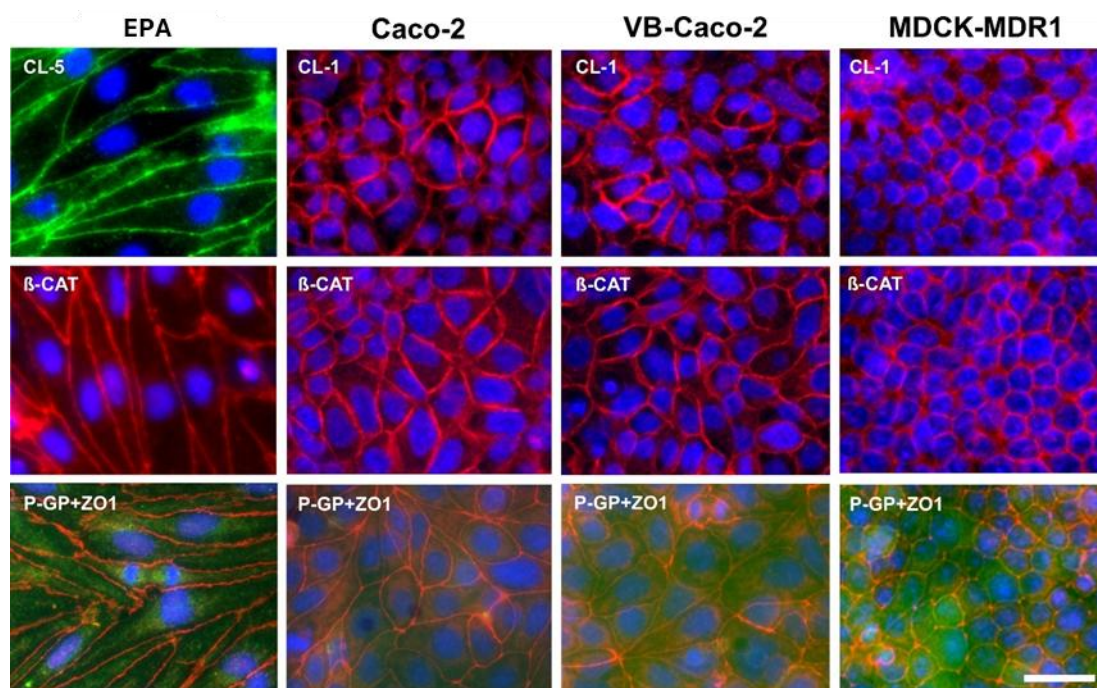
A Caco-2, VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 sejtek pozitív festődést mutattak az epiteliális TJ fehérjékre, úgymint a klaudin-1 és klaudin-4-re, valamint a citoplazmatikus, TJ-hez kapcsolódó ZO-1-re és az adherens sejtkapcsolatok β -katenin fehérjéire (10. ábra, 2. táblázat). A festődések minden esetben a sejtmembránra korlátozódtak. Az epitelsejtek nem festődtek a vér-agy gát specifikus klaudin-5 TJ fehérjére (2. táblázat), és jellemzően kuboid alakúak voltak mind a bél- mind a veseepitelsejt tenyészetekben, de az MDCK-MDR1 kultúrák nagyobb sűrűségben növekedtek (11. ábra).

2. táblázat. Összefoglaló táblázat a szoros és az adherens sejtkapcsoló struktúrák fehérjéinek immunfestődéséről a primer patkány vér-agy gát (EPA) és az epitelsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK-MDR1). Immunfestési képek: lásd 11. ábra (Hellinger és mtsai., 2012).

Modell	β -catenin	ZO-1	klaudin-1	klaudin-4	klaudin-5
EPA	+	+	+/-	-	+
Caco-2	+	+	+	+	-
VB-Caco-2	+	+	+	+	-
MDCK-MDR1	+	+	+	+	-

+: pozitív festődés, -: negatív festődés

A P-gp immunfestés a Caco-2 esetében viszonylag gyengébb jelet mutatott, míg a többi sejtkultúra esetében a P-gp festődés nem különbözött jelentősen (11. ábra).



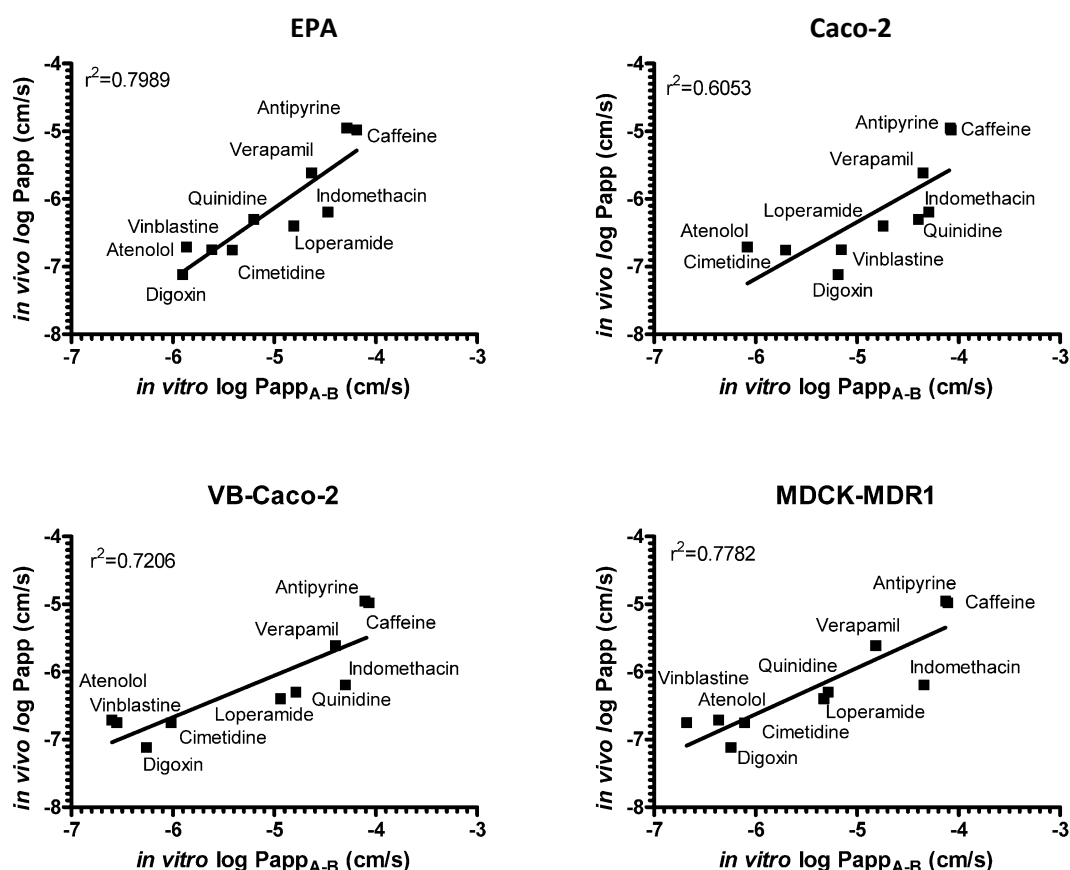
11. ábra. Patkány primer agyi endotélsejtek és epitélsejtek immunfestése szoros és adherens sejtkapcsolatok fehérjéjére, valamint P-gp-re. A sejtmagok kék, a P-gp zöld festődésként látható, míg a ZO-1 TJ asszociált fehérje a sejtek közötti határokat jelöli (piros). EPA: vér-agy gát modell; β -CAT: β -katenin (piros); CL-1: kladin-1 (piros); CL-5: kladin-5 (zöld); P-GP: P-glikoprotein (zöld); ZO-1: zonula occludens protein-1 (piros). Mérce: 20 μ m (Hellinger és mtsai., 2012).

3. táblázat. Permeabilitási, efflux arány és TEER értékek a primer patkány vér-agy gát (EPA) és az epitélsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK-MDR1) (Hellinger és mtsai., 2012).

Anyag	Transzport mech.	Fő efflux transzporter	EPA		Caco-2		VB-Caco-2		MDCK-MDR1						
			Papp _{A-B}		efflux arány	Papp _{A-B}		efflux arány	Papp _{A-B}		efflux arány	Papp _{A-B}		efflux arány	efflux arány korrigált
			x10 ⁻⁶ cm/s			x10 ⁻⁶ cm/s			x10 ⁻⁶ cm/s			x10 ⁻⁶ cm/s			
			átlag	S.D.		átlag	S.D.		átlag	S.D.		átlag	S.D.		
Antipyrine	PT		51.8	1.5	0.88	82.3	3.5	0.80	78.1	2.5	0.97	74.6	3.1	0.96	0.98
Caffeine	PT		64.9	1.9	0.92	84.7	1.0	0.94	85.7	3.0	0.84	78.5	5.6	0.98	1.00
Verapamil	PT/E	P-gp	23.4	2.2	1.36	44.6	8.9	1.33	40.0	7.9	1.60	15.2	0.3	2.78	1.75
Indomethacin	PT		33.6	1.3	1.31	50.9	1.4	1.08	50.3	0.5	1.10	45.5	4.3	1.16	1.05
Quinidine	PT/E	P-gp	6.28	0.04	1.93	40.2	3.7	1.06	16.3	3.6	4.90	5.19	1.51	16.4	13.5
Loperamide	PT/E	P-gp	15.6	2.3	1.40	18.1	1.2	1.46	11.5	0.7	3.13	4.70	2.67	17.8	9.79
Atenolol	PP/E	P-gp	1.36	0.20	1.66	0.83	0.19	1.21	0.25	0.09	1.95	0.43	0.14	2.33	1.64
Vinblastine	E	P-gp., MRP2	2.42	0.97	0.57	6.97	0.95	10.5	0.28	0.07	270.2	0.21	0.12	369.5	50.5
Cimetidine	E	P-gp, BCRP	3.86	0.73	0.72	1.97	0.24	2.23	0.96	0.56	3.90	0.78	0.10	4.54	3.45
Digoxin	E	P-gp	1.25	0.27	2.46	6.50	0.42	4.72	0.55	0.17	65.5	0.57	0.09	53.1	7.56
Fluorescein-Na	PP		2.72	0.03		1.34	0.29		0.47	0.17		0.59	0.06		
TEER (Ωcm²), mean ±S.D.															
			548	125		1024	184		2012	347		84	8		

A sejtrétegek paracelluláris szorosságát mutató TEER értékek patkány vér-agy gát modellben ($548 \pm 125 \Omega \times \text{cm}^2$), a natív Caco-2 ($1024 \pm 184 \Omega \times \text{cm}^2$) és a VB Caco-2 ($2012 \pm 347 \Omega \times \text{cm}^2$) modellben magasan a kritikus követelmény ($150\text{--}200 \Omega \times \text{cm}^2$) feletti értékeket mutattak, ami igen szoros integritást jelent (3. táblázat). A MDCK és az MDCK-MDR1 sejt kultúrák TEER-je jellemzően $100 \Omega \times \text{cm}^2$ alatt volt.

A VB Caco-2 ($0,47 \pm 0,17 \times 10^{-6}$ cm/s), és az MDCK-MDR1 modell ($0,59 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ cm/s) mutatta a legalacsonyabb permeabilitást a kismolekulájú paracelluláris marker molekula fluoreszceinre, míg a natív Caco-2 ($1,34 \pm 0,29 \times 10^{-6}$ cm/s) és a patkány primer vér-agy gát modellen ($2,72 \pm 0,03 \times 10^{-6}$ cm/s) kicsivel magasabb, de még mindig megfelelő átjutást mértünk (3. táblázat). A veseepítél MDCK sejtek esetében, ahol az ionreabszorpció fiziológiai funkció, a látszólagos ellentmondás a modell gyenge TEER értékei és az alacsony paracelluláris áteresztőképesség között azzal magyarázható, hogy a TEER értékek az egysejttrégen keresztüli ionmozgás mértékét tükrözik, ami nemcsak a paracelluláris útvonalon keresztül történhet, hanem az ioncsatornák, transzporterek és ionpórusokon keresztül is, melyek fehérjéi (klaudin-2, -7, -15, -17) nagy számban expresszálódnak az MDCK sejtekben.



12. ábra. Patkány primer vér-agy gát modell (EPA), natív Caco-2, VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 modellekben meghatározott referencia gyógyszerek *in vitro* permeabilitásának (P_{app}) ábrái szöveti kötődésükkel korrigálva. P_{app} *in vivo* adatok egér agyi eloszlási modellből (Nakagawa és mtsai., 2009) származó teljes agyi és teljes plazmakoncentrációkon alapulnak (Hellinger és mtsai., 2012).

Az egyes modelleken kétirányú permeabilitási vizsgálatokban tízféle hatóanyagot teszteltünk, melyek a vér-agy gáton különböző mechanizmusokkal (passzív transzport, efflux pumpa ligandok) képesek átjutni. A két irányban meghatározott permeabilitási együttartó (P_{app}) értékek arányából efflux arányt számoltunk (3. táblázat). A különböző modellek közül nem meglepő módon, a P-gp efflux pumpát magasan expresszáló MDCK-MDR1 és a VB-Caco-2 azonosította a legnagyobb számú efflux transzporter szubsztrátot, amelyet a 2-nél magasabb efflux arány mutatott (3. táblázat, félkövérrel szedett értékek), míg a patkány primer modell csak a digoxint azonosította P-gp szubsztrátként.

Az *in vitro* permeabilitási értékeket korábbi *in vivo* adatokkal (Nakagawa és mtsai., 2009) korreláltatva, a legjobb korrelációt ($r^2=0,7989$) a patkány primer vér-agy gát modell esetében kaptuk (12. ábra).

4.1.2. Morfológiai, génexpressziós és gyógyszerátjutás vizsgálatok (Veszelka és mtsai., 2018)

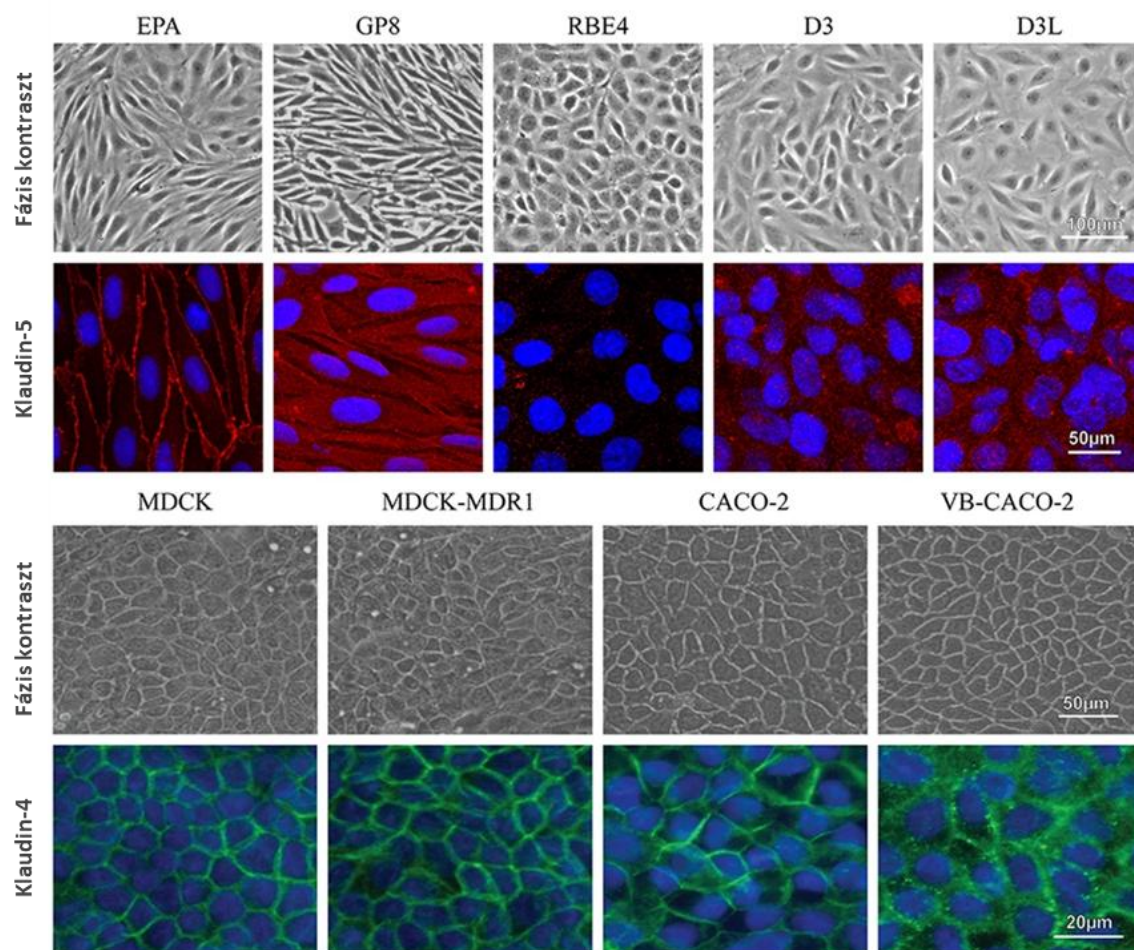
Összehasonlító vizsgálatainkat a korábban már elemzett (Hellinger és mtsai., 2012) patkány primer vér-agy gát (EPA) és az epitelsejtes modellek (natív Caco-2, vinblasztinnal kezelt VB-Caco-2, natív MDCK, P-gp transzfektált MDCK-MDR1) mellett kiterjesztettük a patkány GP8 és RBE4 sejtvonalakra és a humán hCMEC/D3 (D3) modellre, valamint ennek lítium-kloriddal erősített változatára (D3L) is (Veszelka és mtsai., 2018).

Így összesen 9 sejtenyészetes modellen (13. ábra) a morfológiai és funkcionális vizsgálataink mellett feltártuk, hogy milyen génexpressziós mintázatot mutatnak az egyes modellek a TJ fehérjékre nézve, valamint a gyógyszer hatóanyagok ADME (Abszorpció-felszívódás, Disztribúció-eloszlás, Metabolizmus-átalakulás, Exkréció-kiválasztás) tulajdonságait befolyásoló transzporterek, efflux pumpák és metabolikus enzimek tekintetében. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az eltérő fehérjeexpressziók hogyan befolyásolják az egyes gyógyszerek átjutását a modelleken (Veszelka és mtsai., 2018).

A vér-agy gát funkcionális vizsgálatokban az endotelsejtes modellek közül az EPA esetében mértük a legmagasabb TEER értéket (4. táblázat), az epitelsejtes modellek közül pedig a korábbi eredményeinkkel összhangban (Hellinger és mtsai., 2012) a Caco-2 és a VB-Caco-2 modellek mutatták a legmagasabb rezisztencia értékeket, ami szoros paracelluláris gátra utal. Az MDCK, az MDCK-MDR1, illetve az RBE4, D3 és D3L tenyészetek TEER értéke igen alacsony, $100 \Omega \times \text{cm}^2$ alatti volt. Bár a lítium-kloriddal történő kezelés a D3L modellben jelentősen megemelte a TEER-t az irodalmi adatokkal megegyezően (Weksler és mtsai., 2013), az még így is gyenge gátfunkciókat mutatott. A legalacsonyabb rezisztencia értékeket a GP8 sejtvonal esetében mértük (4. táblázat).

4. táblázat. Az endotél- és epitelsejtes modellek funkcionális összehasonlító vizsgálata: rezisztencia (TEER) és permeabilitás értékek (P_{app}) (Veszelka és mtsai., 2018).

Modell	TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)	Fluoreszcein P_{app} (10^{-6} cm/s)	Albumin P_{app} (10^{-6} cm/s)
EPA	475 ± 48	2.1 ± 0.25	0.2 ± 0.03
CaCo2	854 ± 24	1.5 ± 0.28	0.8 ± 0.09
VB-CaCo2	1186 ± 71	0.3 ± 0.06	0.2 ± 0.08
MDCK	72 ± 9	2.8 ± 0.23	0.6 ± 0.05
MDCK-MDR1	81 ± 7	2.7 ± 0.31	-
GP8	28 ± 13	39.8 ± 3.51	16.5 ± 7.51
RBE4	64 ± 5	27.4 ± 1.63	3.9 ± 0.23
D3	45 ± 2	22.2 ± 3.71	2.1 ± 0.31
D3L	86 ± 6	19.3 ± 1.22	1.7 ± 0.12

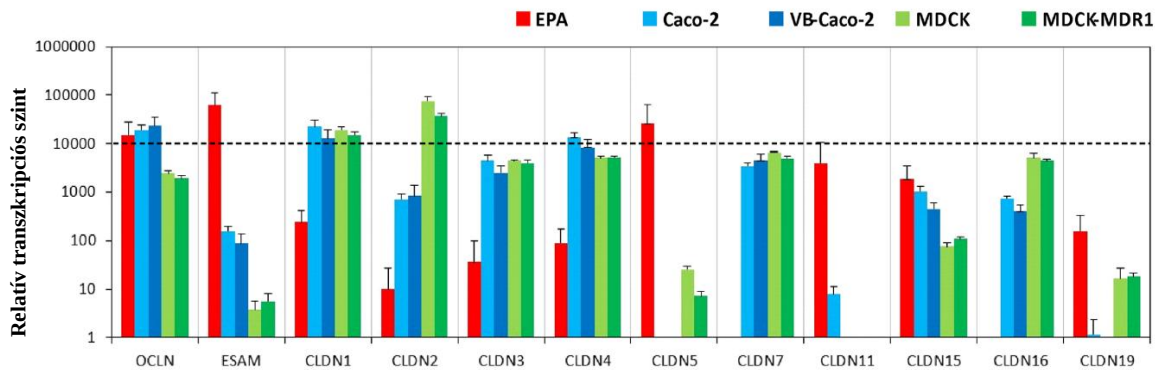


13. ábra. Az endotélsejtes (EPA, GP8, RBE4, D3, D3L) és az epitélsejtes modellek (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1) fáziskontraszt mikroszkópos képei és klaudin-5 (piros) valamint klaudin-4 (zöld) immunfestett képei. Sejtmag (kék). Mérce: 50 és 100 μm (fáziskontraszt képek); 20 és 50 μm (immunfestett képek) (Veszelka és mtsai., 2018).

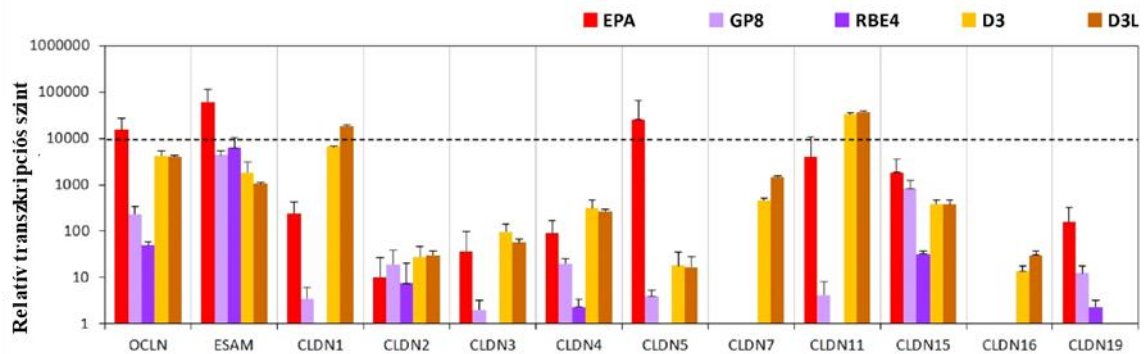
A mért TEER értékekkel összhangban álltak a permeabilitási méréseink is. Az EPA és az epitélsejtes modellek voltak a legkevésbé áteresztőek mind a kismólsúlyú paracelluláris marker molekula fluoreszceinre, mind pedig a transzcelluláris permeabilitási marker Evans kékkel jelölt albuminra nézve (4. táblázat). Az alacsony TEER értékeket mutató mind a négy agyi endotélsejtvonal (GP8, RBE4, D3, D3L) egy nagyságrenddel magasabb P_{app} -értékeket mutatott, mint az EPA modell mindkét marker esetében, ami jelentősen áteresztőbb vér-agy gát modellre utal (4. táblázat).

Génexpressziós méréseink eredményei megerősítik, hogy a TJ-fehérjék RNS-mintázata az EPA modellben különbözik az epitélsejtes modellekben látható mintázattól (14. ábra). A Caco-2 és a MDCK sejtekben a legmagasabb génexpressziót a következő klaudinok esetében mértük: *CLDN1*, *CLDN3*, *CLDN4* és *CLDN7*.

Az agyi kapilláris adatokkal megegyezően (Ohtsuki és mtsai., 2008) sikerült kimutatni RNS szinten a vér-agy gát szorosságában szerepet játszó *CLDN19* génjét az EPA modellben, míg a Caco-2 modellben ez alig volt kimutatható (14, 15. ábra). Az irodalmi adatokkal összhangban (Enerson és Drewes, 2006; Ohtsuki és mtsai., 2008) és a várakozásainknak megfelelően az endotélsejt specifikus *ESAM* az EPA-ban volt a legmagasabb génexpressziós szinten (14, 15. ábra). Az *ESAM* az endoteliális sejtszelektív adhézis molekula, amely az interendoteliális sejtkapcsolatok fontos képviselője, minden érrendszeri endotéliumban kifejeződik.



14. ábra. TJ fehérjék génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és epitélsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1) (Veszelka és mtsai., 2018).

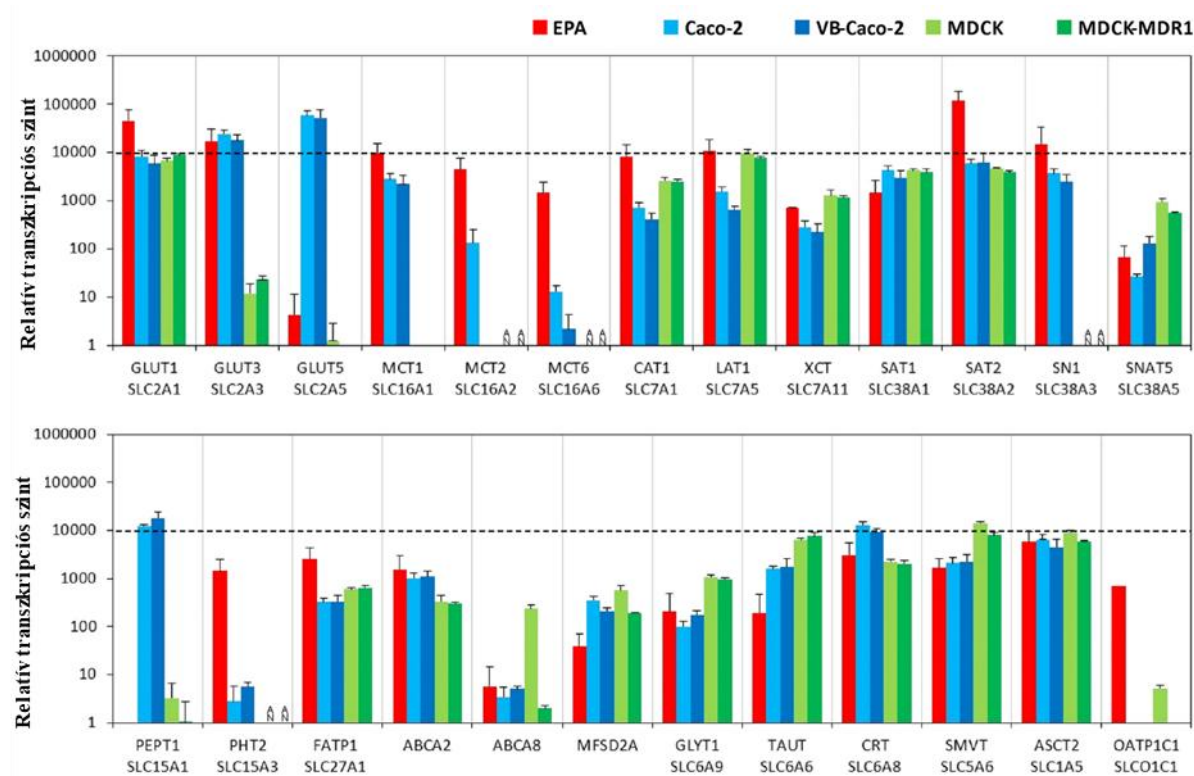


15. ábra. TJ fehérjék génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és endotél sejt vonalas modellekben (GP8, RBE4, D3, D3L) (Veszelka és mtsai., 2018).

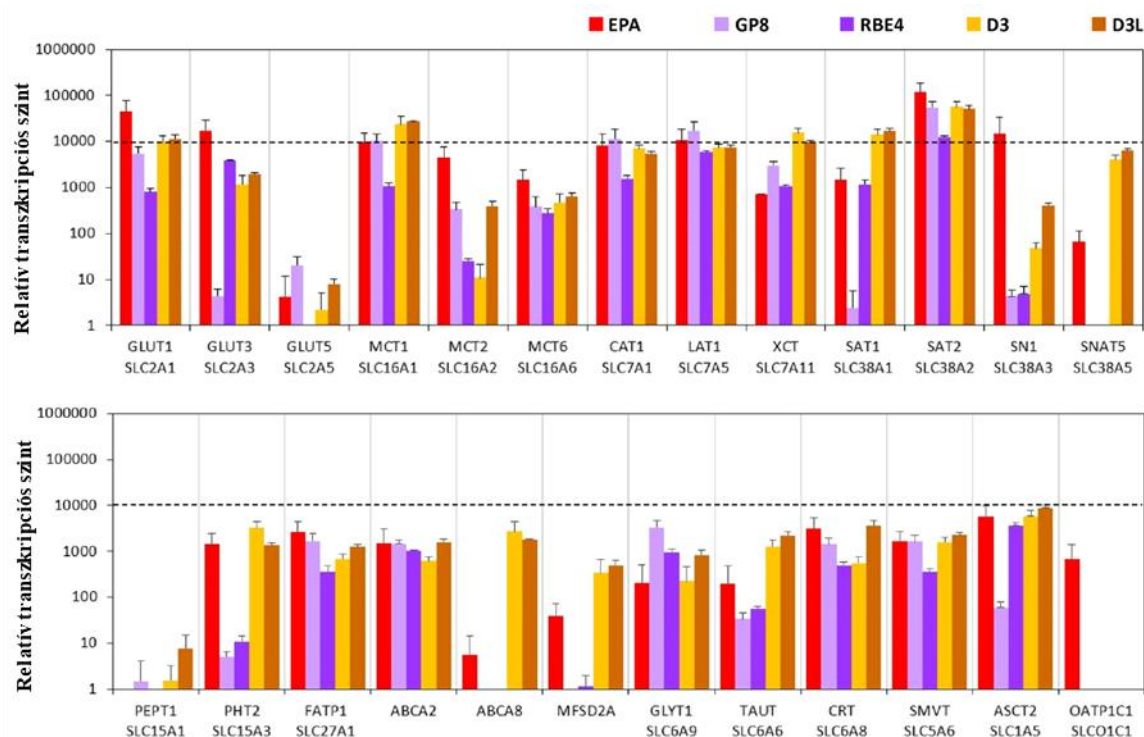
Morfológiai vizsgálatainkban a konfluens, nem átfedő, egysejtréteg minden modellben jól megfigyelhető volt mind a fáziskontraszt mikroszkópos képeken mind pedig a szoros sejtkapcsolatok immunfestett képein (13. ábra). A legszembetűnőbb különbség az endotélsejtek és az epitélsejtek között a sejtek alakjában volt. Az endotélsejtek megnyúltak voltak, és a 13. ábrán jól megfigyelhető örvénylő mintázatot alkottak. Az EPA-modellben az primer agyi endotélsejtek erős pericelluláris festődést mutattak a kladin-5 fehérjére, amely a legnagyobb mennyiségben előforduló kladin típus a vér-agy gáton. A kladin-5 festődés a sejthatarra és az interendoteliális csomópontokra koncentrált. Az endotél sejt vonalas tenyészetekben azonban a kladin-5 festődés csak citoplazmatikus volt, nem volt látható a sejthatáron (13. ábra). Az epitélsejtek az elnyúlt endotélsejtekkel szemben

jellegzetes kuboid morfológiát mutattak, és a klaudin-4 fehérjére intenzív festődést mutattak, ami a TJ génexpressziós adatokkal összhangban (14. ábra) az epitelsejtek tipikus TJ fehérjéje.

A 25 vizsgált SLC transzporter közül az EPA modell expresszálta a legnagyobb mennyiségben a vér-agy gát elsődleges glükóz transzporterét a GLUT1 gént (16, 17. ábra). A másodlagos glükóztranszporter *GLUT3* mRNS-e szintén kimutatható volt, de alacsonyabb expressziós szinten, az irodalmi adatokkal egybecsengő módon (Enerson és Drewes, 2006). Az EPA adatokkal ellentétben azt találtuk, hogy a Caco-2 sejtekben a *GLUT3* és a *GLUT5* gének expresszálódnak domináns módon, mint hexóz transzporterek a *GLUT1* helyett. Az MDCK sejtek pedig főként *GLUT1* gént expresszálták (16, 17. ábra). A domináns glükóz transzporter a D3 sejtekben is a *GLUT1* volt, hasonlóan az EPA modellhez és összhangban az irodalmi adatokkal (Urich és mtsai., 2012). A GP8 sejtekben a glükóztranszporterek közül a *GLUT1* gén expressziója volt a legmagasabb, míg az RBE4 sejtekben a *GLUT3* (17. ábra).



16. ábra. SLC transzporterek génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és epitelsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1) (Veszélka és mtsai., 2018).



17. ábra. SLC transzporterek génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és endotél sejt vonal modellekben (GP8, RBE4, D3, D3L) (Veszélka és mtsai., 2018).

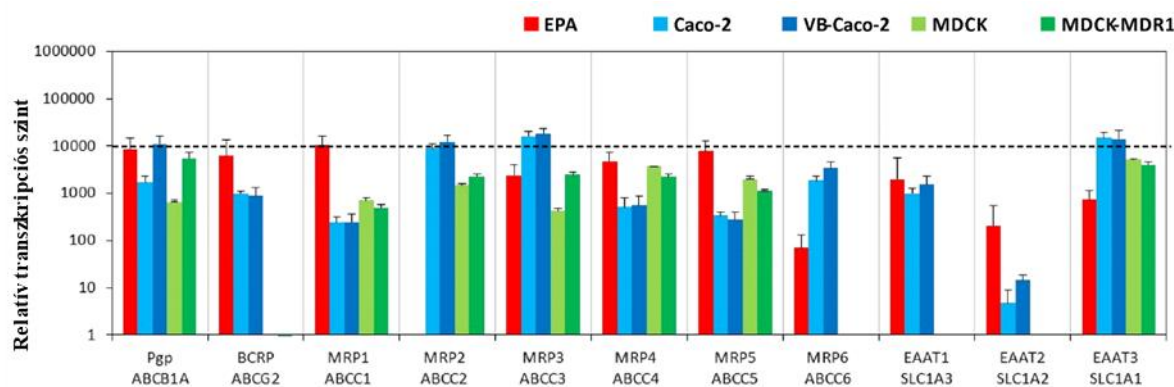
Az MCT-transzporter család szállítja a központi idegrendszerbe a másodlagos energiaforrásként szolgáló ketontesteket, és a laktátot, valamint a pajzsmirigyhormonokat. A laktátot az emberi agy a fejlődés korai szakaszában, valamint felnőttkorban az éhezés, cukorbetegség és iszkémiás események során használja fel az energia fenntartására (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). A laktátot kétirányúan szállítják az MCT-k, amelyek közül a fő transzporter a vér-agy gáton az MCT1 mind rágcsálókban, mind pedig emberben (Enerson és Drewes, 2006). Az EPA-modell mindhárom vizsgált MCT gént magas szinten expresszálta (16, 17. ábra). A Caco-2 sejtekben alacsonyabb szinten fejeződött ki az MCT1 és sokkal kevesebb MCT8 és MCT6 volt. Az MDCK sejtek nem expresszálták az MCT1 génjét. Ezzel szemben az RBE4 kivételével az összes agyi endotélsejt kifejezte ezt a transzportert (16, 17. ábra).

Az aminosavakat szállító SLC fehérjék génjeire, különösen a nagy aminosav transzporterek a CAT1 és LAT1 esetében, valamint a kis aminosav-transzporterekre a SAT2, és az SN1 esetében az EPA modellben jelentősen magasabb génexpressziós szinteket mértünk az epitélsejtes modellekhez képest (16, 17. ábra).

A két vizsgált peptid transzporter génexpressziója szembevetően különbözött a modellek között. A PEPT1 mRNS szintje magas volt a Caco-2 modellekben, és nem volt expresszió az EPA és MDCK modellekben, ezzel szemben a PHT2 magas expressziós szintet mutatott az EPA modellben, míg a Caco-2 modellben nem volt expresszió (16, 17. ábra). Eredményeink ezzel arra utalnak, hogy a peptidek transzportja nagyon eltérő lehet ezekben a modellekben. Irodalmi adatok a PHT2-t azonosították a vér-agy gátra jellemző SLC transzporterként (Enerson és Drewes, 2006), megerősítve ezzel eredményeinket. Az MFSD2A fehérje szelektíven expresszálódik az agyi kapillárisokban és a DHA-t lizofoszfátidil-kolin formájában szállítja az agyba. Az MFSD2A gén minden modellben expresszálódott, kivéve a GP8 és az RBE4 sejt vonalakat, és magasabb mRNS-expressziót

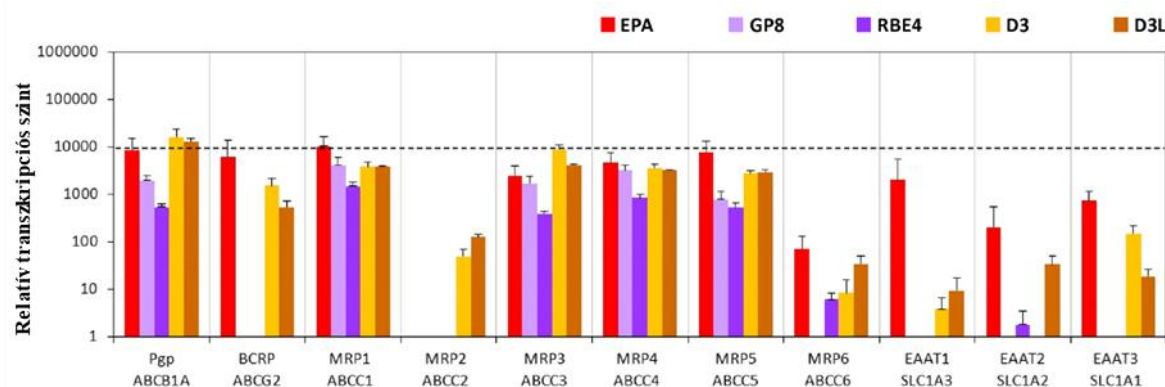
mutatott az epitelsejtes modellekben és a D3 sejtekben, mint az EPA modellben. Minden modell magas vagy mérsékelt szinten expresszáta a zsírsavak, a glicin, a taurin, a kreatinin és a C-vitamin szállításáért felelős SLC transzportereket (16, 17. ábra). Nem volt szignifikáns különbség az SLC-transzporterek génexpressziójában a Caco-2 és a VB-Caco-2 sejtek között. A D3 sejtvonalban a legmagasabb génexpressziója az SLC-transzporterek közül a *SAT2* génnek volt, ezt követte a *GLUT1*, a *LAT1* és az *MCT1* összhangban az irodalomban találhatóakkal (Carl és mtsai., 2010; Urich és mtsai., 2012). A lítium-kloridos kezelés a D3 sejtekben a Wnt útvonal aktiválásával (Weksler és mtsai., 2013), megemelte számos SLC transzporter génexpresszióját, úgymint a *GLUT3*, *MCT8*, *SN1*, *SNAT5*, *PEPT1*, *FATP1*, *ABCA2*, *GLYT1*, *TAUT*, *CRT*, *ASCT2* (17. ábra).

A *P-gp*-t és a *BCRP* fehérjét azonosították a két elsődleges efflux transzporternek a vér-agy gáton mind humán (Shawahna és mtsai., 2011; Uchida és mtsai., 2011) mind patkány agyi mikroerekben (Enerson és Drewes, 2006). A patkány EPA vér-agy gát modell hasonlóan nagy mennyiségben expresszáta a *P-gp* és a *BCRP* géneket is (18, 19. ábra). A natív Caco-2 sejtekben a *P-gp* és *BCRP* gének expressziója alacsonyabb volt, mint az EPA modellben (18. ábra). A vinblasztin kezelés jelentősen megemelte a *P-gp* gén expresszióját a VB-Caco-2 sejtekben, összhangban a szakirodalmi adatokkal (Hellinger és mtsai., 2010).



18. ábra. Efflux pumpák génjeinek relatív transzkripciós szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és epitelsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1) (Veszélka és mtsai., 2018).

Az MDCK-MDR1 sejtek szintén magas szinten expresszálták a *P-gp* génjét, ami hozzájárulhat a sejtvonal magas efflux potenciáljához, összhangban korábbi eredményeinkkel (Hellinger és mtsai., 2012). Azonban nem expresszálták a *BCRP* gént, ahogy ezt más független vizsgálatban is kimutatták (Quan et al., 2012), amit figyelembe kell venni a hatóanyag teszteléseknél. Az epitelsejtes modelleken a domináns efflux transzporterek az *MRP2* és az *MRP3* voltak génexpressziós szinten, míg az EPA modellben az *MRP1* és *MRP5* (18. ábra).

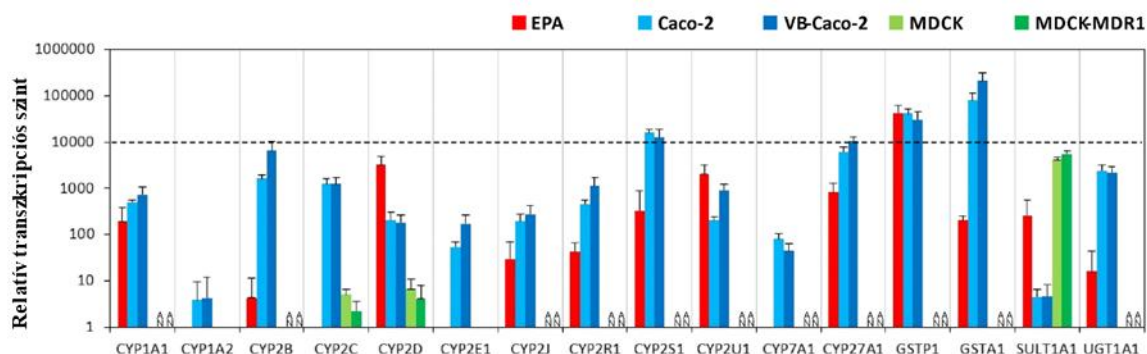


19. ábra. Efflux pumpák génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és endotél sejtvasonlas modellekben (GP8, RBE4, D3, D3L) (Veszelka és mtsai., 2018).

Az RBE4 sejtekben a *P-gp* mRNS expressziója volt a legalacsonyabb az agyi endotél sejtvasonlasok közül, a *BCRP* gén expressziója a kimutatási határ alatt volt, és a többi ABC-transzporterek transzkripciója is alacsony volt (19. ábra). A GP8 sejtekben szintén alacsonyabb *P-gp* mRNS-szintet mértünk, míg a *BCRP* és az *MRP6* gének nem fejeződtek ki. Ezen adatok alapján a patkány RBE4 vagy GP8 sejtvasonlasok felhasználása (efflux) gyógyszerek szűrésére nem javasolt. A *P-gp* gén magas expresszióját mértük a humán D3 sejtekben, melyek a *BCRP* gént is expresszálták az irodalmi adatokkal összhangban (Ohtsuki és mtsai., 2013).

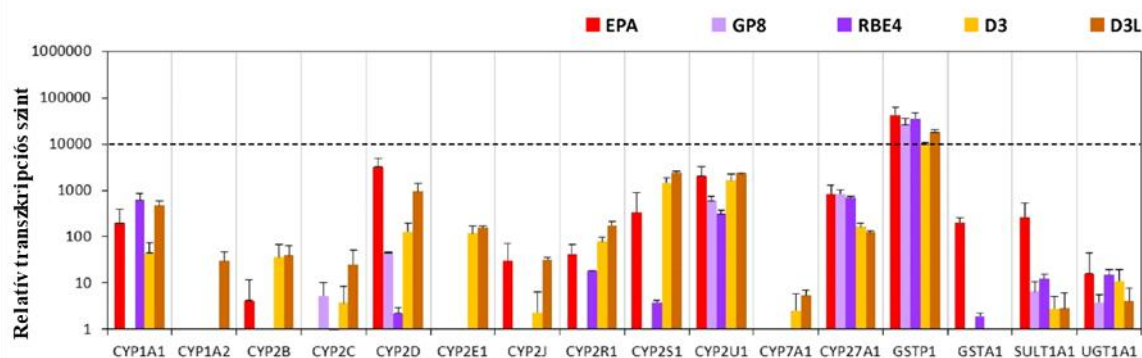
Az EAAT transzporterek részt vesznek a glutamát szállításában a vér-agy gáton keresztül és felelősek az alacsony glutamát szintjéért az agy intersticiális folyadékában (Helms et al., 2016). Az L-glutamát az agyi endotélsejtek abluminális membránjában található EAAT1-en keresztül jut be, és a luminális membránon keresztül egy alacsony affinitású glutamát/aszpartát transzporterén keresztül jut ki. Az EAAT transzporter gének közül az EAAT1 gén fejeződött ki a legmagasabb szinten az EPA modellben, míg a Caco-2 és MDCK sejtekben az EAAT3 gén expressziója volt a legmagasabb (19. ábra). Az EAAT2 mRNS-szintje nagyon alacsony volt a Caco-2 sejtekben és nem fejeződött ki az MDCK sejtekben. Az EAAT gének expressziója elhanyagolható volt az agyi endotél sejtvasonlasokban, kivéve a D3 sejteket, amelyekben az EAAT gének alacsony szinten fejeződtek ki (19. ábra).

Az agyi kapillárisok endotélsejtjei olyan metabolikus enzimeket fejeznek ki, amelyek képesek az agyi endotélsejtekbe bejutott gyógyszerek és xenobiotikumok módosítására, ezáltal védik a központi idegrendszert a potenciálisan káros molekulák hatásaitól (Deli, 2011). A specifikus fázis I. és fázis II. enzimek részt vesznek a vér-agy gát metabolikus gátfunkciójának kialakításában, és jelentős szerepet játszanak a gyógyszerek lebontásában. Adataink megerősítik, hogy a tenyésztett agyi endotélsejtek a fázis I. és fázis II. enzimek génjeit is expresszálják az epitélsejtekhez hasonló mértékben (20, 21. ábra).



20. ábra. Metabolikus enzimek génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és epitelsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1) (Veszelka és mtsai., 2018).

A citokróm P450 enzimek közül a *CYP2D6* és a *CYP2U1* gén expressziója volt a legmagasabb az EPA vér-agy gát modellben (20. ábra). A *CYP2D6* részt vesz a hepatikus lebontásában számos klinikailag használt gyógyszernek, míg a *CYP2U1* egy extrahepatikus izoforma, amely a thymusban és az agyban expresszálódik, és metabolizálja az arachidonsavakat és más hosszú láncú zsírsavakat (Dauchy és mtsai., 2009). A Caco-2 sejtekben az extrahepatikus *CYP2S1* enzim génje, amely a retinsavat is metabolizálja, a legmagasabb mértékben fejeződött ki (21. ábra). Csak két enzim génje, a *CYP2C* és a *CYP2D* fejeződött ki MDCK kutyasejtekben, a többi gén vagy nem fejeződött ki, vagy nem állt rendelkezésre megfelelő próba (20. ábra). A fázis I. enzimek közül a D3 sejtekben a *CYP2S1* és a *CYP2U1* gének voltak a leginkább dominánsan expresszálódóak (21. ábra), összhangban az irodalmi adatokkal (Dauchy és mtsai., 2009).

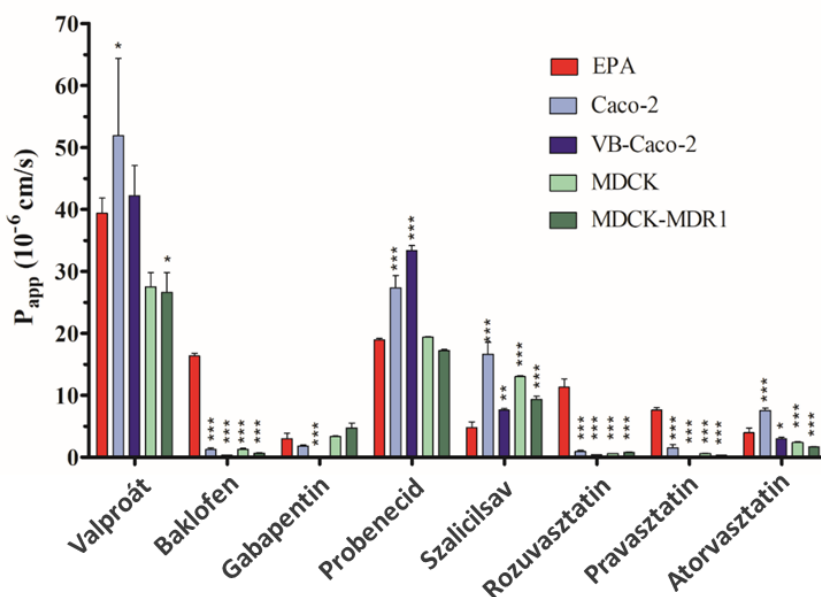


21. ábra. Metabolikus enzimek génjeinek relatív transzkripció szintjei, TaqMan Gene Expression Assay módszerrel mérve, a patkány primer vér-agy gát (EPA) és endotél sejt vonalas modellekben (GP8, RBE4, D3, D3L) (Veszelka és mtsai., 2018).

A vizsgált fázis II. metabolikus enzimek közül, amelyek részt vesznek a sejtek méregtelenítési folyamataiban a glutation-S-transzferáz $\mu 1$ (*GSTP1*) gén fejeződött ki a legmagasabb szinten a EPA-modellben (21. ábra). A *GSTP1* gén expressziója magas volt a többi agyi endotélben sejt vonalban is. A *GSTP1* enzim az agyi kapillárisokban fejeződik ki, ahol nagymértékben kolokalizálódik az MRP2 efflux transzporterrel a luminális agyi endotélsejtek plazmamembránjában (Bauer és mtsai., 2008), amely a két fehérje funkcionális egységére utal. A Caco-2 sejtekben a vizsgált fázis II. metabolikus enzimek

mind magas szinten fejeződtek ki, kivéve a *SULT1A1* enzim génjét, amely az MDCK sejtekben volt magasabb (20. ábra). A *GSTA1*, *SULT1A1* és *UGT1A1* gének kifejeződtek az EPA-ban, és hiányoztak vagy nagyon alacsony szinten voltak kimutathatóak az agyi endotél sejtvonalakban.

A génexpressziós eredményeink tükrében kíváncsiak voltunk arra, hogy a megfigyelt különbségek vajon a gyógyszertranszport vizsgálatokban is megmutatkoznak-e. Ezért összehasonlítottuk nyolc hatóanyag átjutását az ipari gyógyszeresztelésben leggyakrabban használt Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1 epitelsejtes modelleken, valamint a jóval komplexebb és költségesebben előállítható endotélsejtes EPA vér-agy gát modellen (22. ábra).



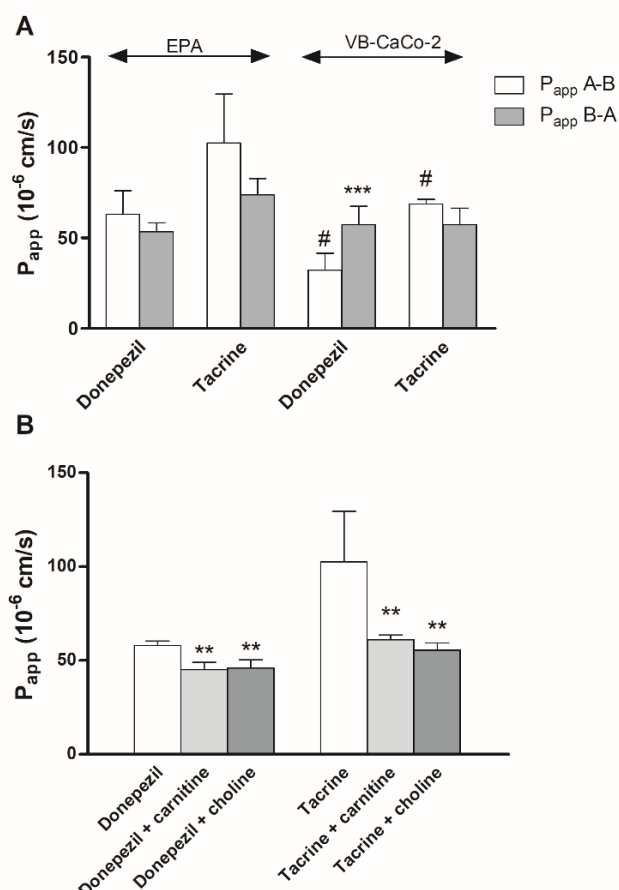
22. ábra. Gyógyszerhatóanyagok agyi kompartment felé irányuló permeabilitási vizsgálata patkány primer vér-agy gát modellben (EPA) és epitelsejtes modellekben (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1). Átlag $\pm$ SD, n=4. Statisztika: egyutas ANOVA, Dunnett-teszt; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ az EPA csoporthoz képest (Veszelka és mtsai., 2018).

A valproát, a baklofen, és a gabapentin jól ismert a LAT1 transzporter ligandjai (Ohtsuki és Terasaki, 2007), melyek magasan expresszálódnak az EPA és az epitelsejtes modellen. A valproát esetében a Caco-2 sejteken szignifikánsan magasabb, míg az MDCK modelleken alacsonyabb átjutást mértünk, mint az EPA modellen (22. ábra). A baklofen átjutása magas volt az EPA modellen, míg az epitelsejtes modelleken alig jutott át. A LAT1 ligandok közül a gabapentin permeabilitása mind az öt modellen nagyon alacsony volt, amit az magyaráz, hogy a gabapentin az efflux transzporterek ligandja is (Nakanishi és mtsai., 2013). A gabapentin permeabilitása a méréshatár alatt volt a VB-Caco-2 modellen, a sejtek magas efflux tulajdonságainak köszönhetően (Hellinger és mtsai., 2012).

A funkcionálisan is működő MCT transzporterek jelenlétét a modellekben a probenecid mérsékelt permeabilitási értékei is bizonyították (22. ábra), amely az MCT-k, valamint a szerves aniontranszporter (OAT, SLC22) ligandja. A szalicilsav, az MCT1, az OATP2 és az MRP4 ligandja. Az EPA-modellen a szalicilsav mérsékelt permeabilitása magyarázható a SLC-transzporter MCT1 és OATP2, és az MRP4 efflux pumpa ellentétes irányú működésével. Szignifikánsan nagyobb permeabilitás volt mérhető a probenecid esetében a Caco-2 sejtvonalakon, valamint a szalicilsavra az összes epitelsejtes modellen, mint az EPA modellen (22. ábra), ami az SLC és az ABC transzporterek eltérő expressziós mintázatával magyarázható.

Az OATP transzporter ligand sztatínok egyre nagyobb figyelmet kapnak, mint lehetséges terápiás szerek idegrendszeri betegségben (Malfitano és mtsai., 2014), ezért megfelelő agyi penetrációjuk kulcsfontosságú terápiás hatékonyságuk tekintetében. A három tesztelt sztatín esetében kettőnél, a rozuvasztatin és a pravasztatin esetében is az EPA modellen szignifikánsan nagyobb penetrációt mértünk, mint az epitelsejtes modelleken, ami az agyi endotelsejtekben az OATP1C1 influx SLC transzporter magasabb expressziójával, valamint az epitelsejtekben erősebb efflux mechanizmusokkal, különösen az MRP2-vel magyarázható.

A takrin és a donepezil antikolinerg gyógyszerek Alzheimer-kór kezelésében, melyek hatékonyan képesek bejutni az agyba a szerves kationtranszporter-2 (OCT2, SLC22A2), a szerves kation/karnitin transzporter OCTN2 (SLC22A5), és a CHT1 (SLC5A7) kolin transzporterek ligandjaiként (Kang és mtsai., 2005; Lee és mtsai., 2012). Permeabilitási kísérleteink során magas átjutást mértünk mindkét gyógyszer esetében az EPA modellen (23A. ábra). Az endogén kationos metabolitok, a kolin és a karnitin jelentősen gátolni tudták a takrin és a donepezil penetrációját, ami azt jelzi, hogy a gyógyszerek és az endogén ligandok közös transzporterek segítségével jutnak be (23B. ábra). A VB-Caco-2 sejteken szignifikánsan alacsonyabb átjutást mértünk mindkét hatóanyag esetében, sőt a donepezil esetében még a transzport irányok sem egyeztek meg: a VB-Caco-2 modell a bazális irányú permeabilitást mérte magasabbnak, míg az EPA modell az apikális irányú transzportot jelezte erősebbnek (23A. ábra).



23. ábra. (A) Takrin és a donepezil kétirányú permeabilitási vizsgálata patkány primer vér-agy gát modellben (EPA) és VB-Caco-2 epitelsejtes modellen. (B) Takrin és donepezil vér-agy gát permeabilitási vizsgálata gátlószerek (karnitin és kolin) mellett. Átlag ± SD, n=4. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-teszt; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest; # $P < 0,05$ az EPA csoporthoz képest (Veszelka és mtsai., 2018).

4.2. Vér-agy gát károsodások patológiás modellekben és védő anyagok vizsgálata

A vér-agy gát működése számos betegségben károsodik, ami a központi idegrendszer működési zavarát okozhatja. A vér-agy gát működésének megértése és a különböző betegségmodellekben a gátműködés sérüléseinek vizsgálata ezért kulcsfontosságú, mert a vér-agy gát sejtjei terápiás célpontok lehetnek ezen betegségek gyógyításában. Az állatmodellek mellett az *in vitro* vér-agy gát modellek is alkalmasak a különböző betegségek patomechanizmusának tanulmányozására, a károsodások és a különböző védőanyagok vizsgálatára is.

Eddigi kutatómunkám során számos betegségmodellben vizsgáltam a vér-agy gát működésének változásait és kerestem az agyi endotélsejtekre védő hatású molekulákat, hatóanyagokat. Jelen értekezésemben ezen munkáink közül azokat válogattam ki, ahol kevésbé ismert és nyilvánvaló a vér-agy gát érintettsége, úgymint a diabétesz, a krónikus stressz vagy az ateroszklerózis esetében.

4.2.1. Karbonil stressz károsító hatása és kivédése agyi endotélsejtekben (Tóth és mtsai., 2014a; Tóth és mtsai., 2014b)

A metilglioxál egy endogén metabolit (α -oxoaldehid) amely minden emlőssejtben képződik, igen reaktív, erős oxidáló és glikációs tulajdonságokkal rendelkezik, ezért azonnali eltávolítása a glioxaláz rendszer által döntő fontosságú (Phillips és Thornalley, 1993). A sejtekben túlzottan felhalmozó metilglioxál karbonil stresszt okoz, mivel reakcióba lép fehérjékkel és nukleinsavakkal, ami visszafordíthatatlan szerkezeti károsodást és funkcióvesztést okoz. E reakciók melléktermékei oldhatatlan proteáz-ellenálló polimerek, glikációs végtermékek (advanced glycated end products, AGE) (Rabbani és mtsai., 2011).

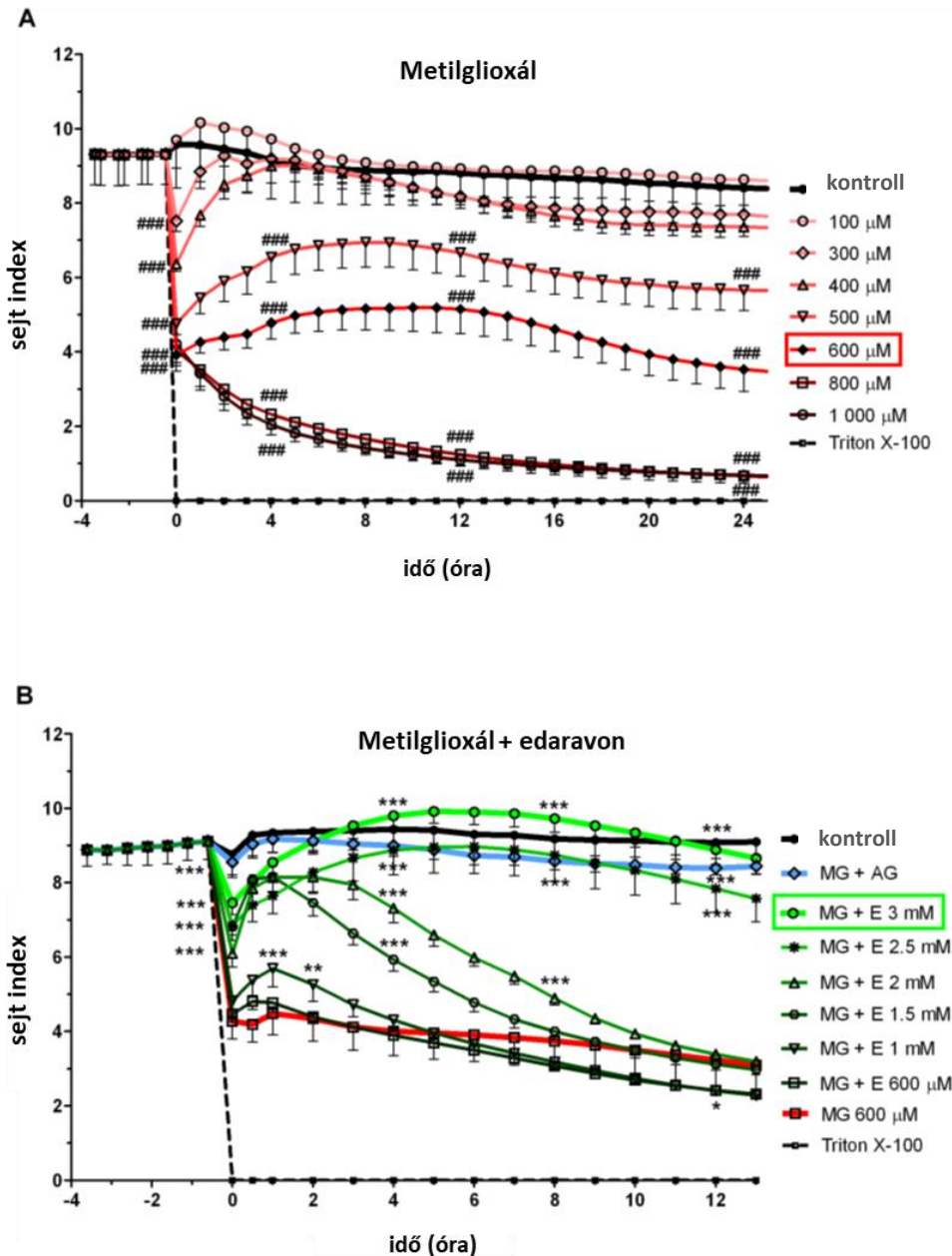
A metilglioxál megnövekedett szintjét kiváltó tényezők többek között a gyulladás, hiperglikémia és az oxidatív stressz (Ramasamy és mtsai., 2006). A metilglioxál emelkedett szintje számos betegségben (metabolikus szindróma, diabetes mellitus, szív- és érrendszeri betegségek, neurológiai betegségek) megfigyelhető, valamint öregedés során is (Beeri és mtsai., 2011). Ezekben a betegségekben szenvedő betegek szív- és érrendszeri, valamint cerebrovaszkuláris rendszere is fokozottan ki van téve a glikáció kockázatának. Igazolták, hogy cukorbetegségben a sztrók, a demencia és az Alzheimer-kór gyakrabban fordul elő, és a magas metilglioxálszint által kiváltott karbonil stressz felelős a cukorbetegséggel összefüggő érrendszeri szövődményekért (Mukohda és mtsai., 2012).

A metilglioxál toxikus az agyi endotélsejtekre is, oxidatív stresszt indukál, vér-agy gát diszfunkciókat okoz, csökkenti a mitokondriális membránpotenciált, aktiválja a kaszpáz rendszert és károsítja a sejtek glutation-redox rendszerét (Okouchi és mtsai., 2009). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a metilglioxál által kiváltott karbonil és oxidatív stressz fontos szerepet játszhat a neurovaszkuláris betegségek patológiájában, és az agyi endotélsejtek a metilglioxál korai és jelentős célpontjai lehetnek. A metilglioxál okozta károsodás megelőzése ezért a kutatások középpontjában áll.

Az aminoguanidin volt az első széles körben vizsgált gyógyszer, amely mind *in vitro*, mind *in vivo* mérsékelte a diabétesz vaszkuláris szövődményeinek kialakulását, de toxikus mellékhatásai miatt a klinikai vizsgálatokban megbukott. Ezt a vegyületet azóta a glikációellenes szerek prototípusának tekintik, és referencia molekulaként használják preklinikai kísérletekben (Thornalley és mtsai., 2003).

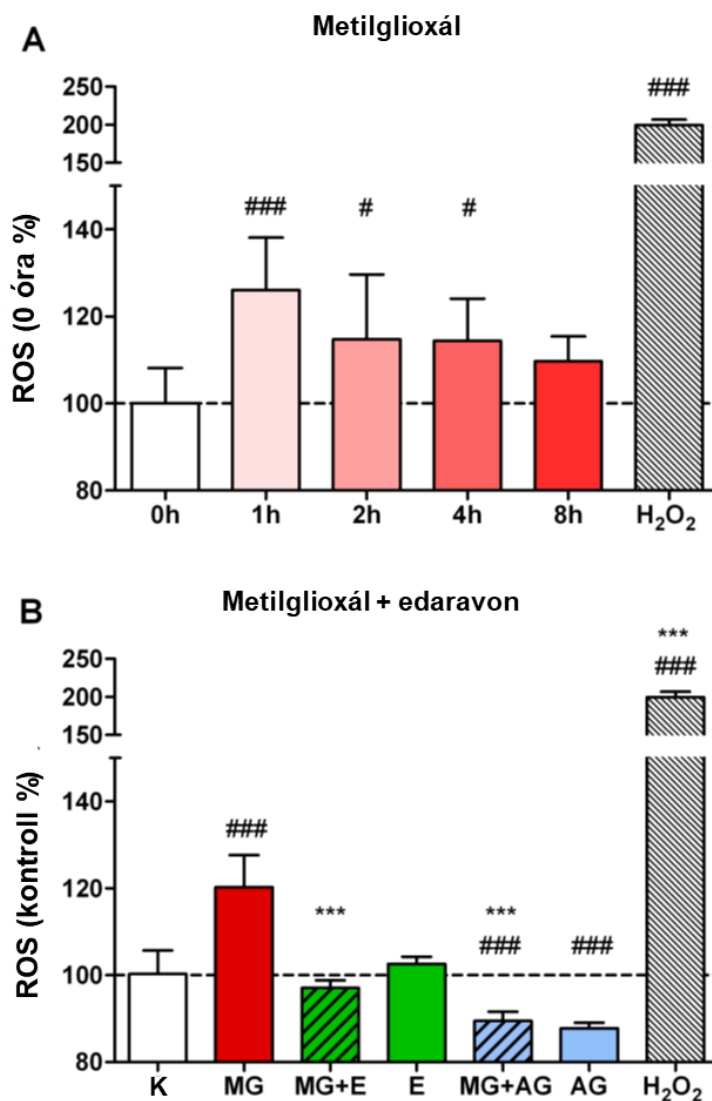
Az edaravon egy a klinikumban is használt japán gyógyszer hatóanyaga, szabadgyökfogó és neuroprotektív hatású, amely segíti a neurológiai felépülést agyi infarktus után (Kono és mtsai., 2013). Habár az edaravon önálló hatását agyi endotélsejtek

szoros sejtkapcsolatainak erősítésére már leírták (Omori és mtsai., 2007), és a metilglioxál által kiváltott sejtelképesség-csökkenéssel szemben is védő hatásának bizonyult (Li és mtsai., 2013), megválaszolandó kérdés maradt, hogy vajon az edaravon a metilglioxál által indukált vér-agy gát diszfunkciók ellen is képes-e védelmet nyújtani. Kísérleteinkben mi ennek vizsgálatát tűztük ki célul.



24. ábra. (A) Metilglioxál önálló (100–1000 µM) hatása a humán hCMEC/D3 endotélsejtek életképességére impedancia alapú sejtanálízissal vizsgálva. (B) Metilglioxál (600 µM) és edaravon (MG + E; 600–3000 µM), illetve aminoguanidin (MG + AG; 2 mM) együttes kezelések hatása hCMEC/D3 endotélsejtek életképességére. Átlag ± SD, n=10. A Triton X-100-at 10 mg/ml koncentrációban használtuk. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt; $P < 0,05$ a kontroll csoporthoz (#) és az MG kezelt csoporthoz (*) képest (Tóth és mtsai., 2014b).

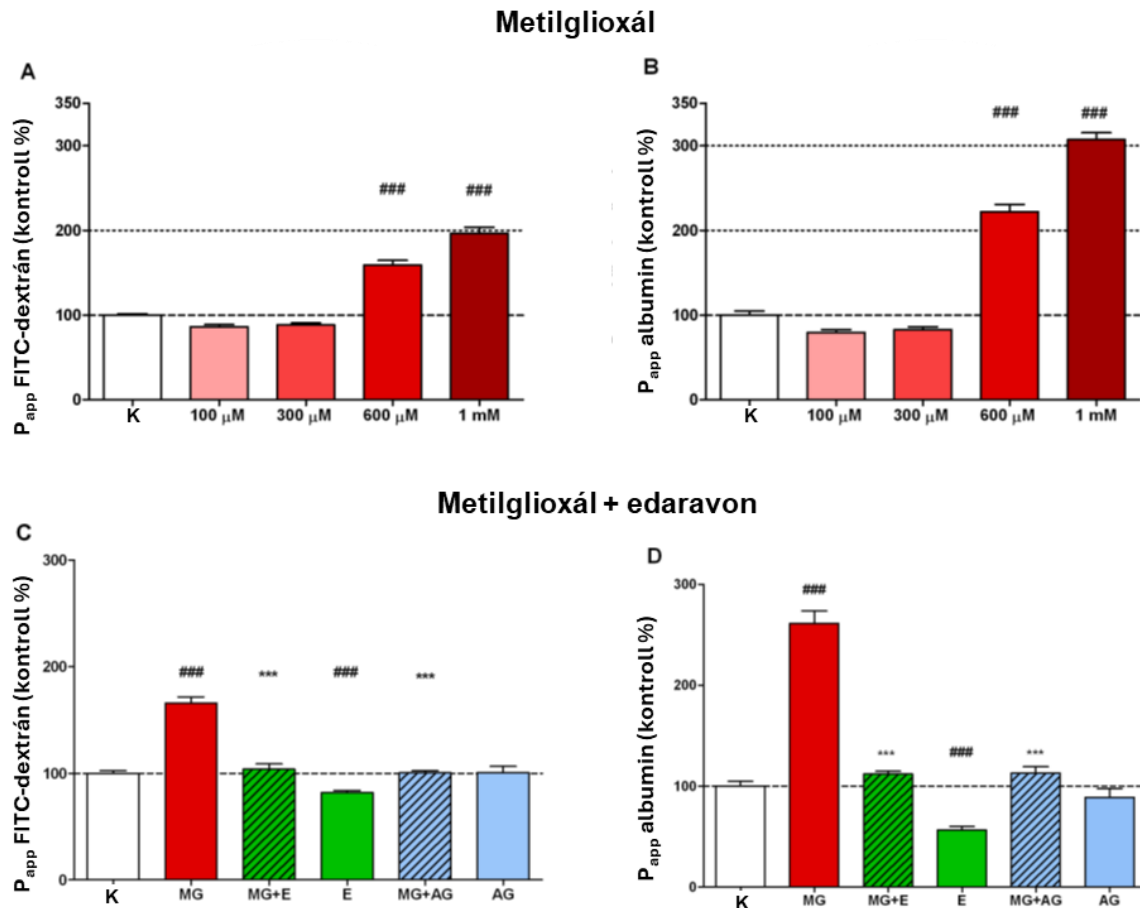
Eredményeinkben a metilgloxál kezelés idő és dóziszfüggő módon csökkentette a hCMEC/D3 humán agyi endotélsejtek életképességét, a 600 μM kezelésnél 50%-os viabilitás csökkenést tapasztaltunk (24A. ábra). A metilgloxál mellett adott edaravon 3 mM koncentrációban szignifikáns módon és tartósan kivédte a metilgloxál okozta toxicitást, sőt még adott idő intervallumban a referencia molekula aminoguanidin (2 mM) kezelésnél is jobb védőhatást mutatott (24B. ábra).



25. ábra. (A) Metilgloxál (600 μM) időfüggő hatása a humán hCMEC/D3 endotélsejtek ROS termelésére. (B) Metilgloxál (600 μM) és edaravon (3 mM), illetve aminoguanidin (2 mM) együttes kezelése hCMEC/D3 endotélsejtek ROS termelésére 4 óra kezelést követően. K: kontroll csoport. Átlag $\pm$ SD, $n=9$. Statisztika: kétutas ANOVA, Dunnett-posztteszt; $P < 0,05$ a kontroll csoporthoz (#) és az MG kezelt csoporthoz (*) képest (Tóth és mtsai., 2014b).

Kimutattuk, hogy a metilgloxál kezelés szignifikáns módon megnövelte az agyi endotélsejtek reaktív oxigéngyök termelését, ami oxidatív stressz indukcióra utal, és amelyet az edaravon és az aminoguanidin kezelés is a kontroll szintje alá tudott csökkenteni (25A, B. ábra).

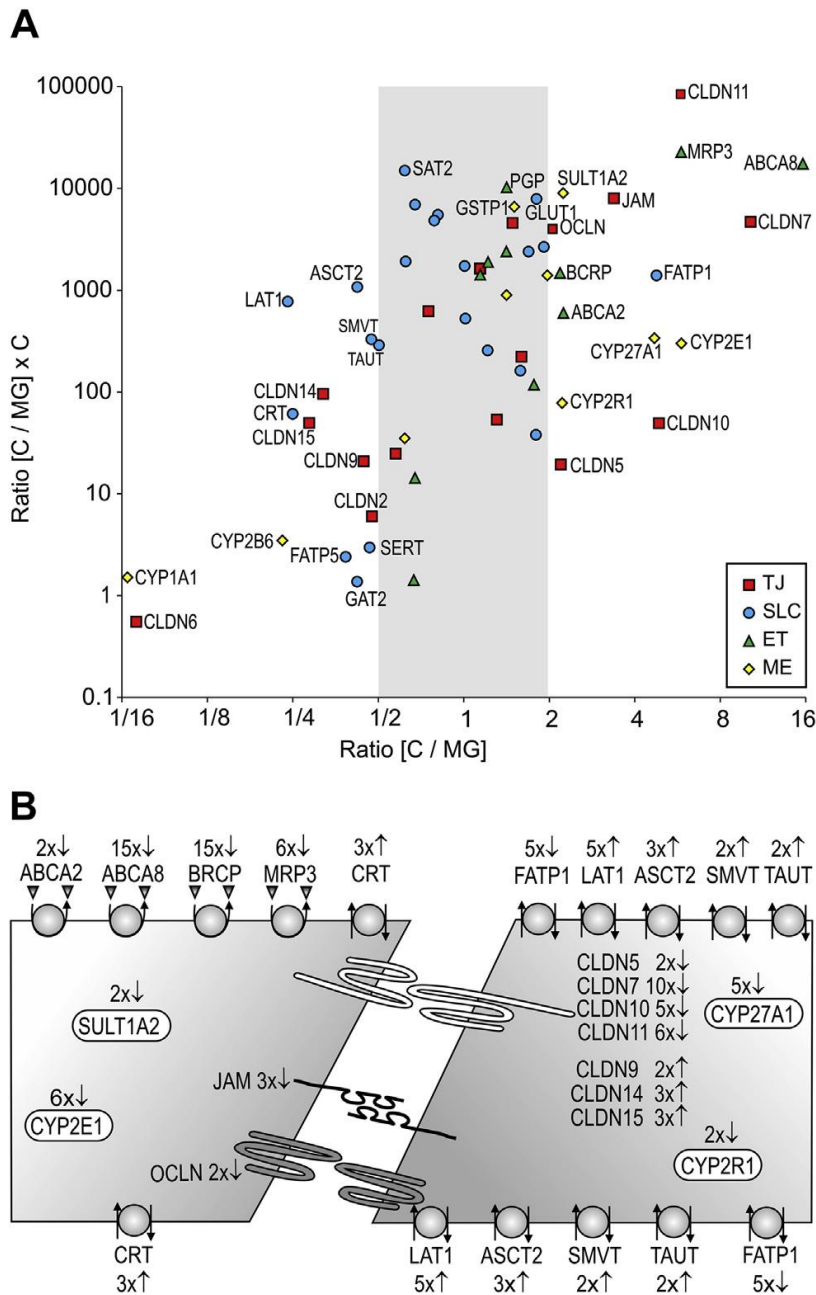
A metilglioxál kezelés jelentősen megnövelte a vér-agy gát modell permeabilitását is, amit a marker molekulák a fluoreszcein és az albumin magas penetrációs értékei is mutattak (26A, B. ábra). Az edaravon kezelés látványosan javította és a kezeletlen kontroll sejtek szintjére hozta vissza a metilglioxál okozta vér-agy gát permeabilitás fokozódást (26C, D. ábra). Sőt az edaravon kezelés önmagában szorosabbá tette a vér-agy gátat, mivel ennél a csoportnál a permeabilitási értékek még a kontroll csoportnál is alacsonyabbak voltak (26C, D. ábra).



26. ábra. (A) Metilglioxál kezelés (100-1000 μ M) dózisfüggő hatása a humán hCMEC/D3 endotélsejtek (A) FITC-dextrán (4,4 kDa) és (B) Evans kék-albumin permeabilitására. Metilglioxál (600 μ M) és edaravon (3 mM), illetve aminoguanidin (2 mM) együttes kezelések hatása (C) FITC-dextrán (4,4 kDa) és (D) Evans kék-albumin permeabilitására hCMEC/D3 sejteken. K: kontroll csoport. P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SD, n=4. Statisztika: kétutas ANOVA, Dunnett-posztteszt; $P < 0,05$ a kontroll csoporthoz (#) és az MG kezelt csoporthoz (*) képest (Tóth és mtsai., 2014b).

A metilglioxál hatásmechanizmusát kutatva megvizsgáltuk 60 vér-agy gát specifikus gén mRNS expresszióját agyi endotélsejtekben a kezelést követően (27. ábra). A génexpresszióban bekövetkező minimum kétszeres változást mutató géneket a 27. B ábrán külön is feltüntettük. A metilglioxál kezelés a TJ fehérjék közül az okkludin, a junkcionális adhéziós fehérje (JAM) és a klaudin-5, -7, -10 és -11 gén szintjét is jelentősen csökkentette, mely fehérjéknek kulcsszerepe van a vér-agy gát permeabilitásában. Az SLC transzporterek közül a nagy aminosav transzporter-1 (LAT1), a multivitamin (SMVT), a taurin (TAUT) és

a kreatinin (CRT) transzporterek szintjét megemelte, a zsírsav transzporter-1 (FATP1) szintjét pedig csökkentette.



27. ábra. Vér-agy gát fehérjék génexpressziója metilglioxál (MG) kezelt humán hCMEC/D3 agyi endotélsejtekben. (A) Az ábra a tight junction fehérjék (TJ, piros négyzet), SLC transzporterek (SLC, kék pont), efflux transzporterek (ET, zöld háromszög) és kiválasztott metabolikus enzimek (ME, sárga rombusz) génexpressziós szintjének arányát mutatja a kezeletlen (C) és MG-val kezelt hCMEC/D3 sejtekben. A grafikon a kontroll és a kezelt hCMEC/D3 sejtek közötti arányt is megjeleníti, megszorozva az y tengelyen a kontroll mintában mért expressziós értékekkel, a vizsgált gének expressziós szintjének bemutatására. (B) A főbb génexpressziós változások sematikus ábrázolása MG-val kezelt hCMEC/D3 sejtekben. Az ábra a génexpresszióban bekövetkezett fold change változás mértékét is mutatja a kezeletlen sejtekhez képest (Tóth és mtsai., 2014a).

Az ABC transzporterek közül a lipid transzporterek (ABCA2, ABCA8), valamint az efflux transzporter emlőrák rezisztencia fehérje (BCRP, ABCG2) és multidrog rezisztens fehérje-3 (MRP3, ABCC3) génexpresszióját jelentősen csökkentette (27. ábra) az agyi endotélsejtekben, ami hozzájárulhat például az amiloid peptidek csökkent vérbe irányuló transzportjához és ezáltal felhalmozódásához az agyszövetben. A metabolikus enzimek közül a citokróm P450 enzimek családjából a CYP1A1 és a CYP2B6 enzimek génjeinek expresszióját növelte, és a szulfotranszferáz-1A2 (SULT1A2) és a glutation-s-transzferáz P1 (GSTP1) szintjét csökkentette (27. ábra), ami a detoxifikáló glioxaláz rendszer egyik fő enzime.

4.2.2. Krónikus immobilizációs stressz hatása a vér-agy gátra (Sántha és mtsai., 2016)

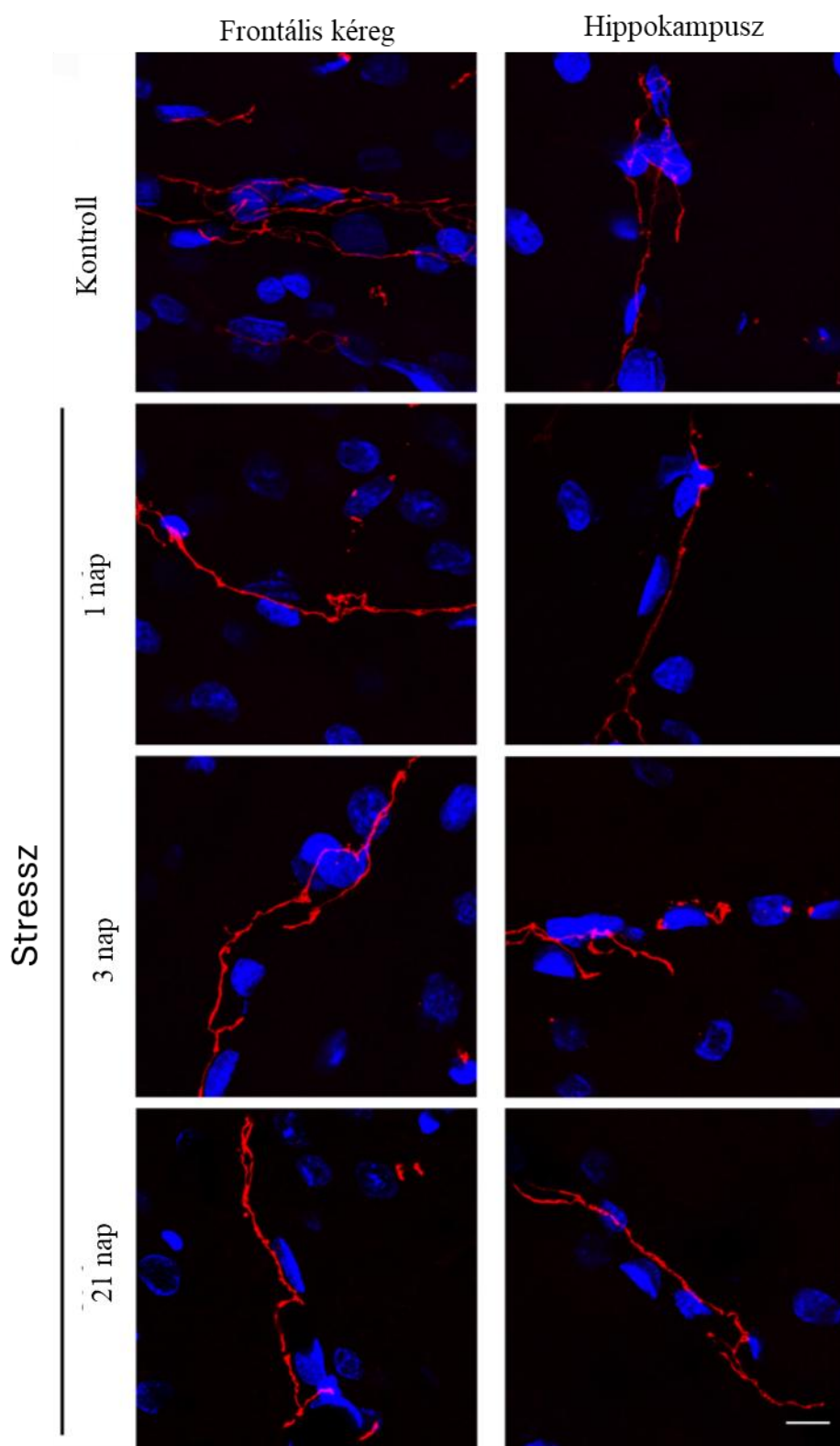
A vér-agy gát sérülését számos pszichiátriai betegségben is leírták, mint például depresszióban (Najjar és mtsai., 2013) vagy skizofréniában (De Klerk és mtsai., 2011). A pszichiátriai betegségek többségében közvetlenül a stressz az a patológiai faktor, aminek központi szerepe van a betegségek progressziójában. A környezetből származó stressz stimulusok hatását számos tényező befolyásolja, beleértve az egyéni érzékenységet, az érintett agyi régiót és a stressz típusát (Chen és mtsai., 2012).

A stressz hatások kutatására alkalmas kísérleti állatmodelleknek az emberi stressz patofiziológiai jellemzőit kell reprodukálniuk. Az egyik leggyakrabban használt állatmodell az úgynevezett korlátozó stressz-modell (restraint stress), amely a mozgáskorlátozás stresszének módosított formája. Az eljárás során az állatokat adott időre egy plasztik csőbe helyezik, ami akadályozza a mozgásukat és ezzel egy elkerülhetetlen fizikai és pszichikai stresszt okoz (Jaggi és mtsai., 2011). Irodalmi adatok igazolták, hogy krónikus (8 hetes) korlátozó stressz a tanulás és a memória károsodásához, valamint a frontális agykéreg és a hippocampusz CA1 régiójában neuronális károsodáshoz vezetett patkányoknál (Huang és mtsai., 2015). Korábbi tanulmányok bizonyítják, hogy a stressz növeli a vér-agy gát áteresztőképességét rágcsálókban (Sharma és mtsai., 1991; Foti Cuzzola és mtsai., 2013) és emberekben (Hanin, 1996), ami a központi idegrendszer homeosztázisának felborulásához vezet.

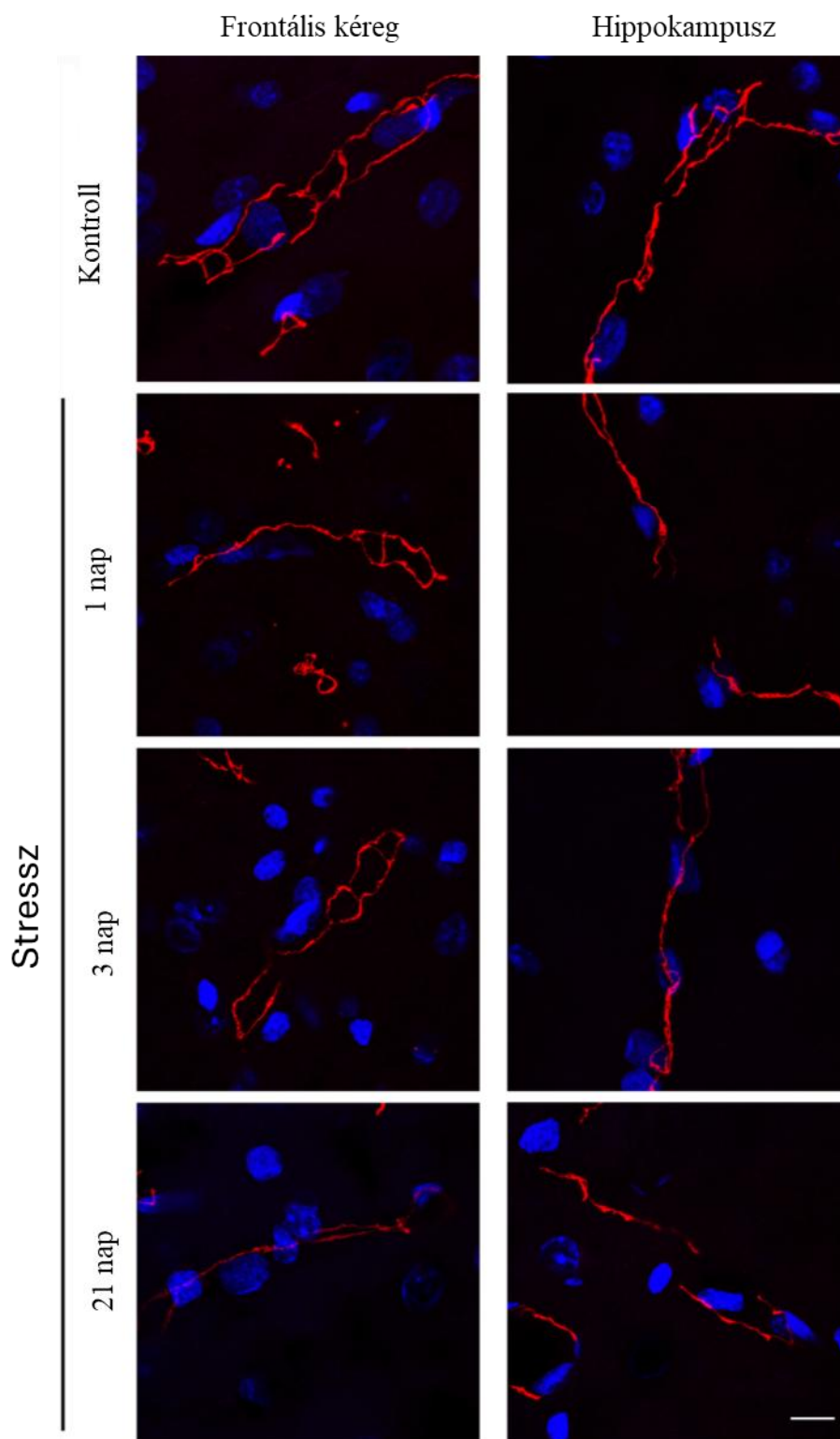
A mi kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk az akut és krónikus stressz hatására bekövetkező vér-agy gát morfológiai változásokat patkányokban a két leginkább stresszérzékeny területen az agyban, a hippocampuszban és a frontális agykéregben (Sántha és mtsai., 2016).

Az állatokat akut egynapos, és 3, illetve 21 napos krónikus immobilizációs stressznek tettük ki, naponta öt órára behelyezve őket egy műanyag csőbe. A kísérlet végén a frontális kortex területéről és a hippocampuszból származó agyszeletek immunhisztokémiai festésével és a mikroszkópos képek elemzésével feltártuk a stressz hatására bekövetkező változásokat az agyi endotélsejtekben és pericitákban.

Az agyi mikrokapillárisok immunfestésének elemzésével megállapítottuk, hogy az agyi endotélsejtekben a klaudin-5 fehérje fluoreszcencia intenzitása szignifikánsan csökkent a patkányok hippocampuszában 1 napos akut stresszt követően (28, 30. ábra). A festési mintázat komplexitása pedig a frontális kéregben és a hippocampuszban is csökkent minden stressz csoportban, ami azt jelenti, hogy a kapillárisok lefutásában kevesebb elágazódási pontot figyelhettünk meg (30. ábra).

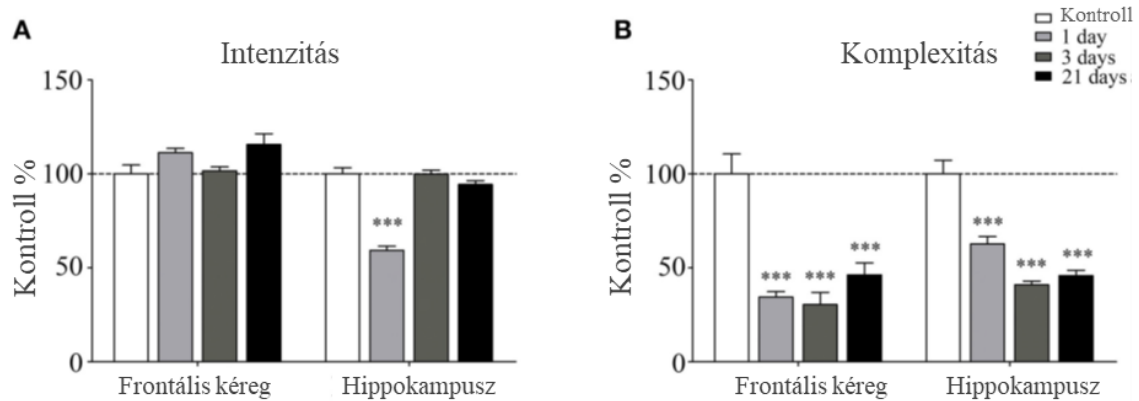


28. ábra. A kladuin-5 expressziója a frontális agykéreg és a hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszes patkányokban. Piros: kladuin-5. Kék: sejtmagok. Mércé: 15 μ m (Sántha és mtsai., 2016).



29. ábra. Az okkludin expressziója a frontális agykéreg és a hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszes patkányokban. Piros: okkludin. Kék: sejtmagok. Mérce: 15 μ m (Sántha és mtsai., 2016).

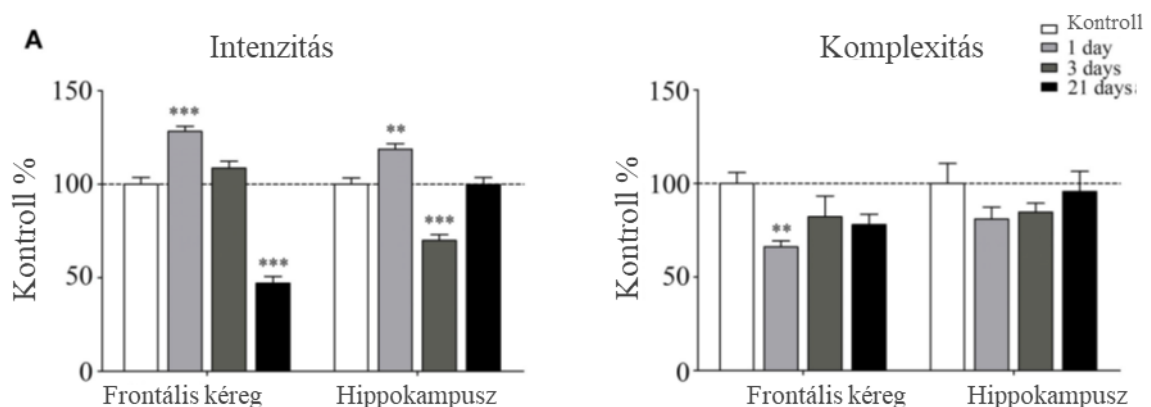
Klaudin-5 immunhisztokémia



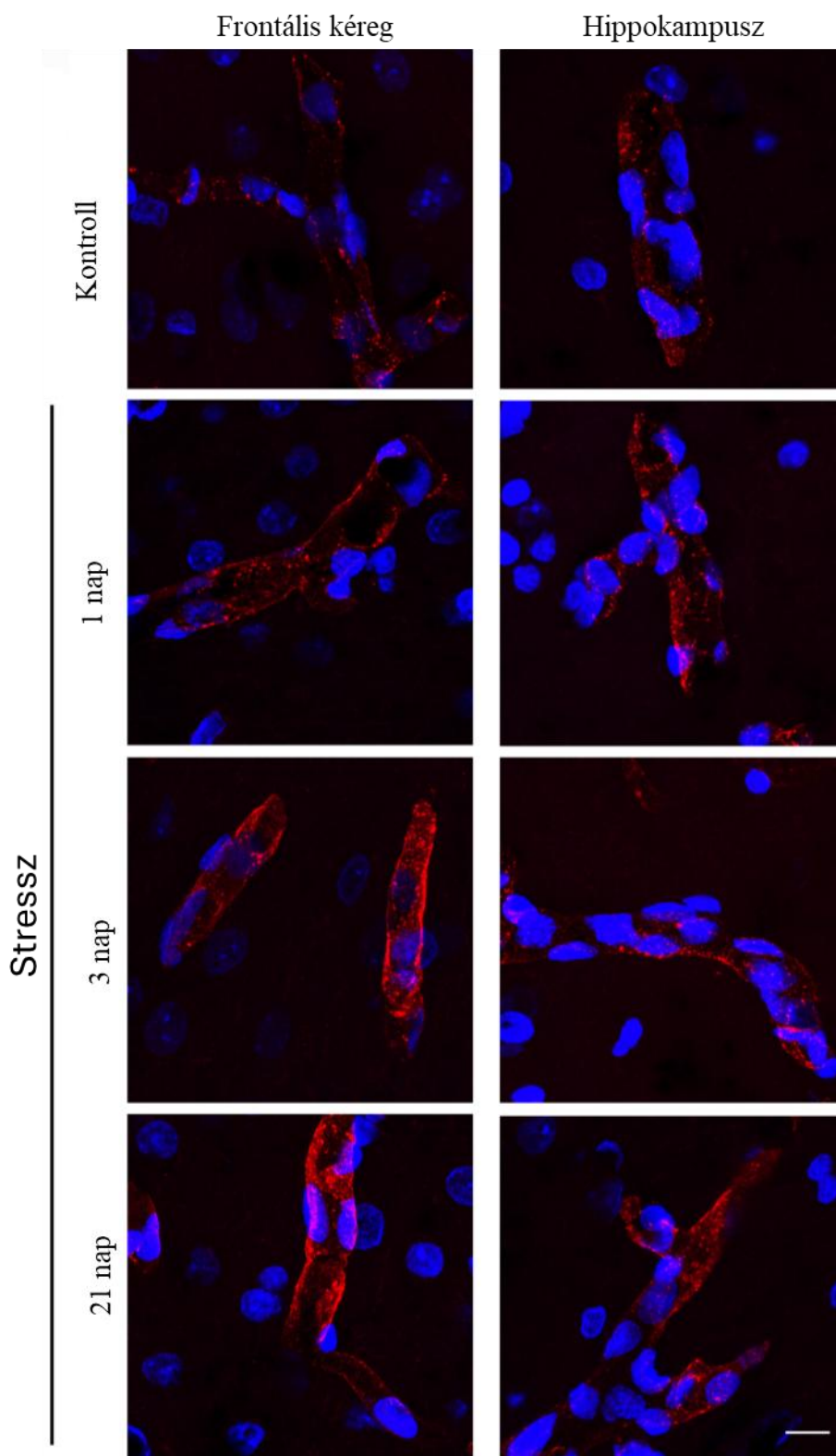
30. ábra. A klaudin-5 immunfestési mintázatának kiértékelése a (A) fluoreszcencia intenzitás és (B) komplexitás tekintetében a frontális agykéreg és a hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszelt patkányokban. Statisztika: ANOVA, Bonferroni-posztteszt, *** $P < 0,001$, a kontroll csoporthoz viszonyítva (Sántha és mtsai., 2016).

Az okkludin, a másik vizsgált membrán TJ fehérje szignifikáns növekedést mutatott a fluoreszcencia intenzitásában az 1 napos akut stresszt követően minden vizsgált agyi régióban a kontroll csoporthoz képest (29, 31. ábra). Ezzel a kezdeti növekedéssel ellentétben a krónikus stresszhatás 21. napján az okkludin fluoreszcencia-intenzitása jelentősen csökkent a frontális kortextben (29, 31. ábra). A hippocampuszban az okkludin fluoreszcencia intenzitásának csökkenését figyeltük meg három napos stresszt követően (29, 31. ábra). Szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az okkludin festődés komplexitásában, vagyis a kapillárisok lefutásában kevesebb elágazódási pont volt azonosítható a frontális kéregben akut stressz után (29, 31. ábra). Az okkludin festődés felszakadozottsága megfigyelhető volt a stressz kezelt csoportokban mind a két vizsgált agyterületen (29, 31. ábra).

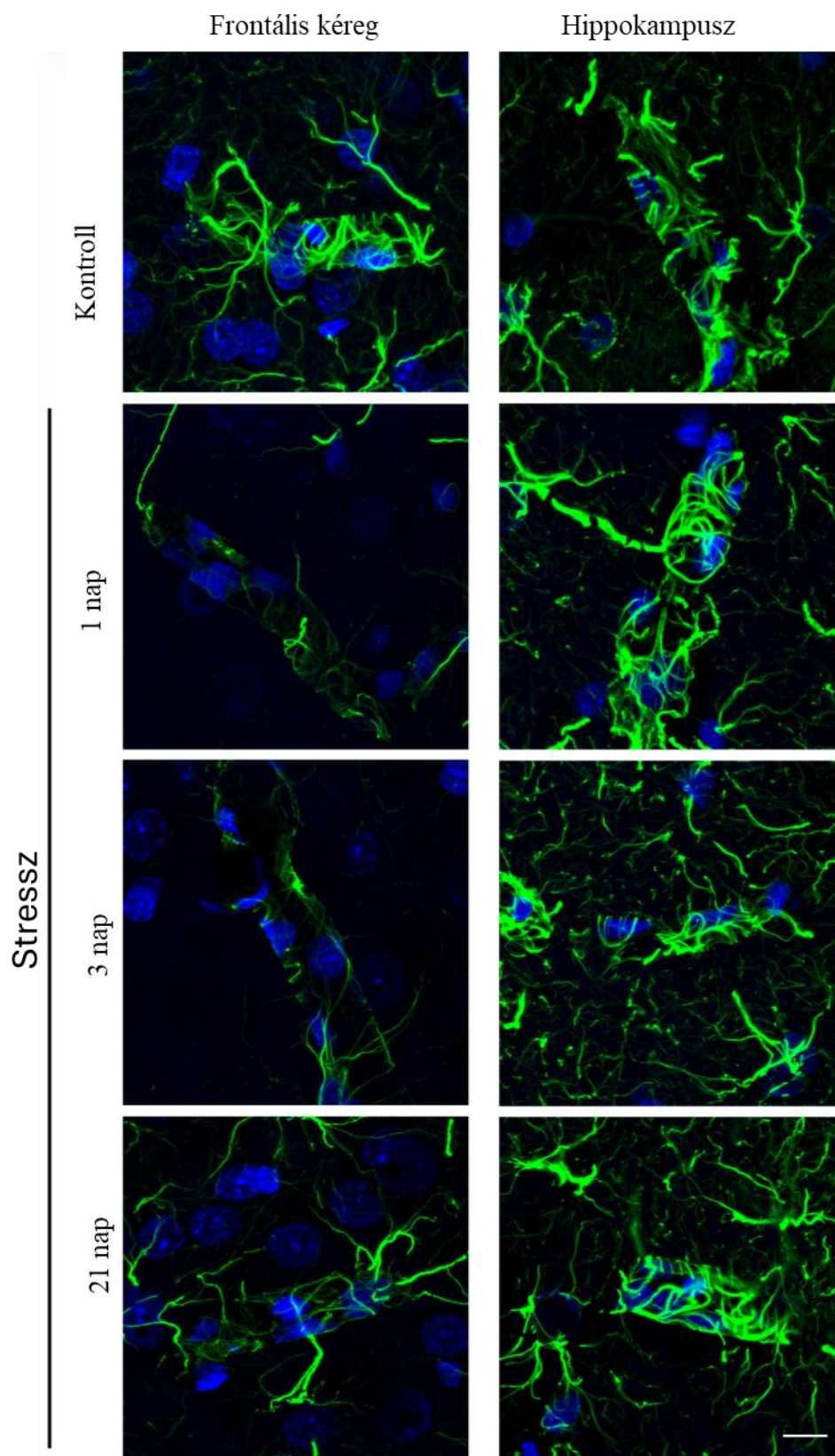
Okkludin immunhisztokémia



31. ábra. Az okkludin immunfestési mintázatának kiértékelése a (A) fluoreszcencia intenzitás és (B) komplexitás tekintetében a frontális agykéreg és a hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszelt patkányokban. Statisztika: ANOVA, Bonferroni-posztteszt, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, a kontroll csoporthoz viszonyítva (Sántha és mtsai., 2016).



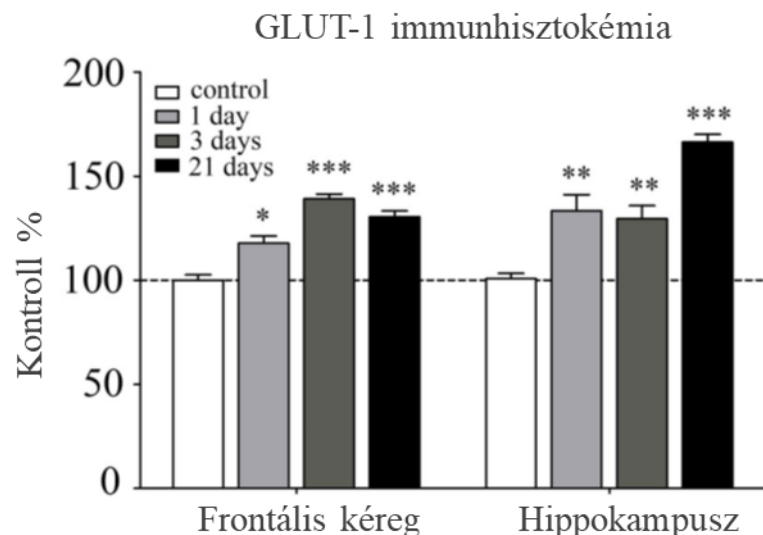
32. ábra. A GLUT1 transzporter expressziója a frontális agykéreg és a hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszes patkányokban. Piros: GLUT1. Kék: sejtmagok. Mércé: 15 μm (Sántha és mtsai., 2016).



33. ábra. A GFAP expressziója a frontális agykéreg és a hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszes patkányokban. Zöld: GFAP. Kék: sejtmagok. Mérce: 15 μ m (Sántha és mtsai., 2016).

A vér-agy gát szoros zárókapcsolataiban fontos két fehérje, a klaudin-5 és az okkludin festődési mintázatában tapasztalt változások a stressz hatására nem egyforma módon változtak. Ez a megfigyelésünk összhangban áll mások eredményével, ahol stressz kezelést követően csak a klaudin-5 szintje csökkent szignifikáns módon izolált agyi kapillárisokban az okkludiné nem (Northrop és Yamamoto, 2012). Az agyi endotélsejtek szoros gátfunkciójának fenntartásában a klaudin-5 fehérjének van a legnagyobb szerepe, csökkenése a vér-agy gát megnyílását okozza (Deli, 2005).

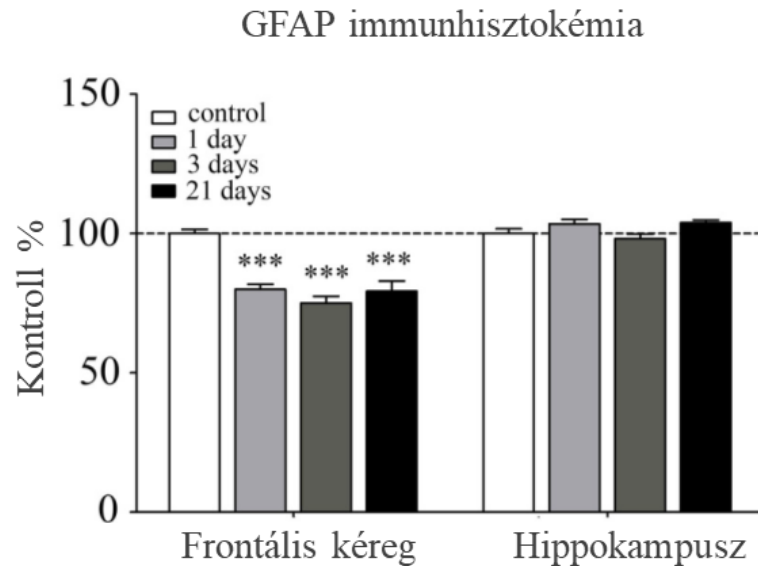
A vér-agy gát agyi endotélsejtjeinek elsődleges glükóz transzportere a GLUT1 fehérje, aminek festődési intenzitása mind a frontális cortex, mind a hippocampusban megemelkedett akut és krónikus stresszt követően is (32, 34. ábra). Eredményeink összhangban állnak mások megfigyelésével, melyben 11 napos krónikus és immobilizációs stresszben a GLUT1 transzporter expressziójának növekedését írták le felnőtt patkányok hippocampusában (Kelly és mtsai., 2014). Ezek az adatok arra utalnak, hogy stresszingerek hatására megnő az agy glükózigénye, ami rövid távú kompenzációs mechanizmusként megemeli a GLUT1 expresszióját (Kelly és mtsai., 2014).



34. ábra. A GLUT1 immunfestés fluoreszcencia intenzitása a frontális agykéreg és hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszelt patkányokban. Statisztika: ANOVA, Kruskal–Wallis és Dunn-posztteszt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$, a kontroll csoporthoz viszonyítva (Sántha és mtsai., 2016).

Az agyi kapillárisokat körülvevő asztroglia végtalpakat a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) immunhisztokémiájával vizualizáltuk, amely az asztroglia sejtek egyik markere (33. ábra). Az immobilizációs stresszt követően a GFAP fluoreszcencia intenzitásának jelentős csökkenése volt megfigyelhető a frontális kéregben, míg a hippocampusban nem eredményezett szignifikáns változást (35. ábra). A GFAP pozitív asztrociták száma jelentősen magasabb, míg a proliferációs ráta alacsonyabb a hippocampusban, mint a felnőtt egerek kéregállományában (Emsley és Macklis, 2006), ami magyarázatot adhat arra, hogy a GFAP festődés csökkenése a frontális kéregben kimutatható volt, a hippocampusban viszont nem.

Az agyi endotélsejteket kívülről beburkoló asztrocita végtalpak jelentős szerepet játszanak a vér-agy gát fiziológiás működésének fenntartásában (Deli, 2005). Ismert, hogy az asztrocita végtalpak GFAP expressziós szintjének változása, akár növekedése akár a lecsökkenése is vér-agy gát károsodáshoz vezet *in vivo* (Willis és mtsai., 2012).



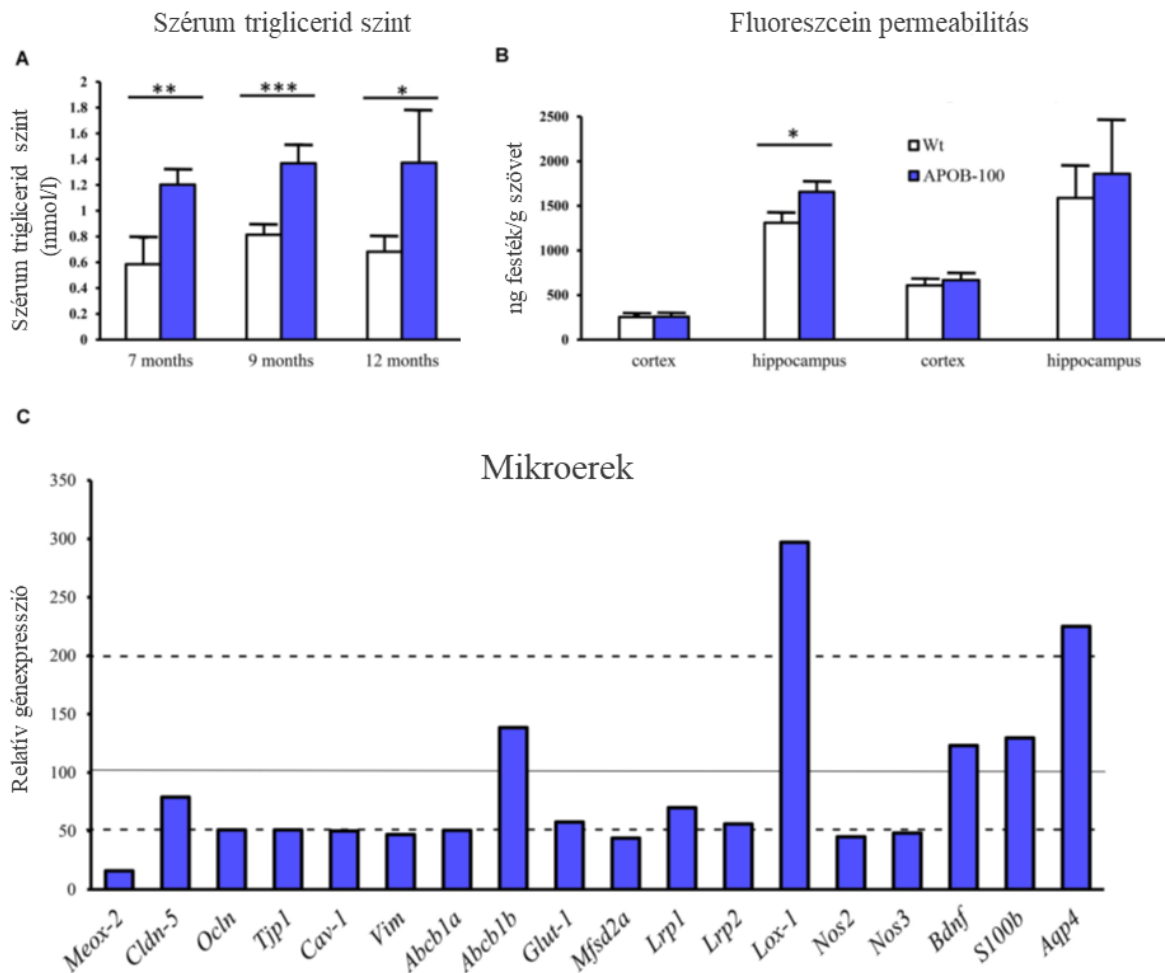
35. ábra. A GFAP immunfestés fluoreszcencia intenzitása a frontális agykéreg és hippocampusz szagittális metszeteiben kontroll és stresszelt patkányokban. Statisztika: ANOVA, Kruskal–Wallis és Dunn-posztteszt. *** $P < 0,001$, a kontroll csoporthoz viszonyítva (Sántha és mtsai., 2016).

A mi eredményeinkben a jelentősen lecsökkent GFAP intenzitás arra utal, hogy az immobilizációs stressz az asztrocita végtalpak duzzadásához vezet, amely már 1 napos akut stressz után jelentkezik, és legalább a stressz 21. napjáig fennáll, melyet később elektronmikroszkópos vizsgálataink is megerősítettek (Sántha és mtsai., 2016, 12. ábra). Az asztrociták szerkezeti változásai a vér-agy gát diszfunkciójának morfológiai jelei lehetnek.

4.2.3. Hipertrigliceridémia hatása a vér-agy gátra (Hoyk és mtsai., 2018)

A magas szérumszintű triglicerid érelmeszesedéshez vezethet, ami nemcsak a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának komoly kockázati tényezője, hanem a neurodegenerációval is összefüggésbe hozható (Nelson és mtsai., 2016; Hoyk és mtsai., 2018). A humán ateroszklerózis tanulmányozására együttműködő partnereink a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetében, Dr. Sántha Miklós és csoportja létrehozott egy a humán apolipoprotein B-100 (APOB-100) fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset (Csont és mtsai., 2007; Lénárt és mtsai., 2012). Az APOB-100 egy szérumszintű glikoprotein, ami az LDL és a VLDL lipoproteinek fő komponense. Az APOB-100 indukálta hiperlipidémia és ateroszklerózis a szív és érrendszer mellett a cerebrovaszkuláris rendszert is érinti (Süle és mtsai., 2009; Martins és mtsai., 2009), hozzájárulva ezzel a neurodegeneratív betegségek kialakulásához is (Martins és mtsai., 2009). Irodalmi adatok igazolják az APOB-100 emelkedett szérumszintjét Alzheimer-kóros betegekben (Caramelli és mtsai., 1999; Sabbagh és mtsai., 2004), ami korrelál az amiloid- β lerakódással a betegek agyában (Kuo és mtsai., 1998).

Az APOB-100 egerekben partnereink korábban magas szérumszintet, oxidatív stresszt, tau-hiperfoszforilációt, szinaptikus diszfunkciót, kognitív károsodást, fokozott neuronális apoptózist és neurodegenerációt is megfigyeltek (Süle és mtsai. 2009, Martins és mtsai. 2009). A neurodegeneratív betegségek kialakulásában kulcsfontosságú tényezőként ismert cerebrovaszkuláris patológia azonban még nem volt vizsgálva, ezért a mi célkitűzésünk az volt, hogy az APOB-100 transzgenikus egerekben tanulmányozzuk az agyi kapillárisokat és a vér-agy gát változásokat (Hoyk és mtsai., 2018).

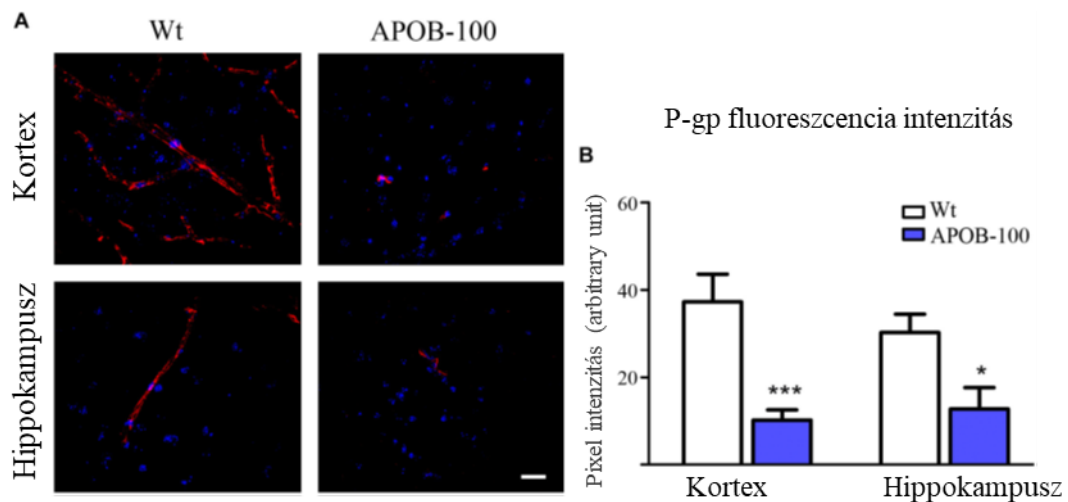


36. ábra. Szérumszint (A) és vér-agy gát permeabilitás vizsgálat fluorescein és albumin markerekre APOB-100 transzgen (APOB-100) és vad típusú (Wt) egerekben (B). Gén expressziós vizsgálatok APOB-100 transzgen egerek mikroereiben (C). A folyamatos vonal a megfelelő gén kifejeződési szintjét jelzi vad típusú egerekben (100%). A szaggatott vonalak jelzik a szignifikáns változások szintjét: kétszeres (200%-os) növekedést vagy feleakkora (50%-os) csökkenést a génexpresszióban. $P < 0,001$, $P < 0,01$, $P < 0,05$, a Wt egerekhez hasonlítva. (Hoyk és mtsai., 2018).

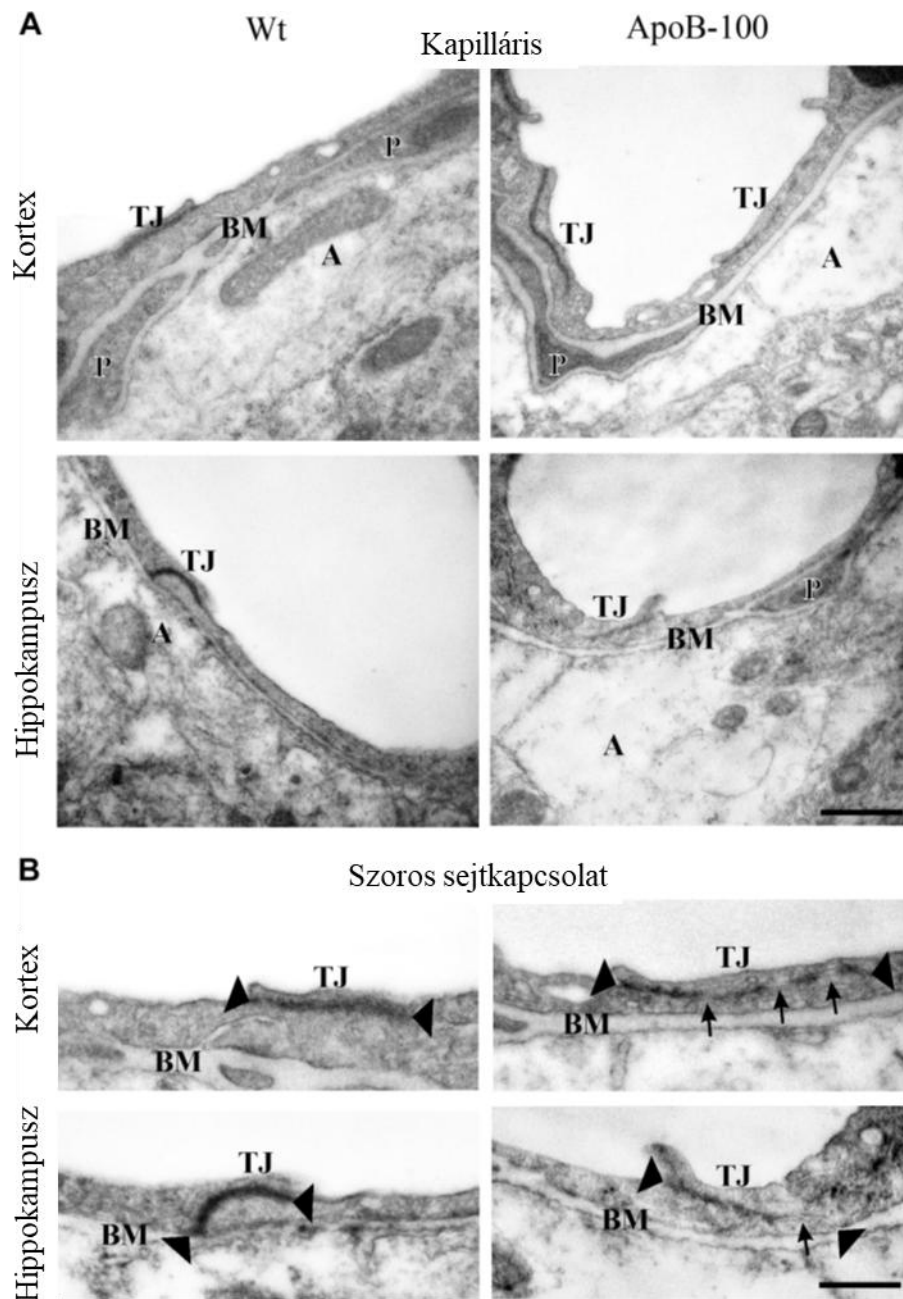
Eredményeink alapján szignifikánsan magasabb triglicerid szintet mutattunk ki a transzgenikus egerekben a vad típusú állatokhoz képest minden vizsgált időpontban (7, 9, és 12 hónapos korban), ami az APOB-100 egerek krónikus hipertrigliceridémiájára utal (36.A ábra). Ezen túl a vér-agy gát jelentős permeabilitás növekedését mutattuk ki a kis molekulatömegű fluoreszcein marker esetében a hat hónapos transzgenikus egerek hippocampus régiójában a vad típusú állatokéhoz képest, ami a paracelluláris

áteresztőképesség megnövekedésére utal (36.B ábra). A nagy szérumfehérje, az albumin extravazációjában nem láttunk szignifikáns növekedést (36.B ábra). A kéreg területén a vér-agy gát permeabilitásában nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú és a transzgenikus egerek között (36.B ábra).

Az APOB-100 transzgenikus állatokban sikerült kimutatnunk az endoteliális diszfunkcióra utaló génexpressziós változásokat: a mezenchimális homeobox gén 2 (*Meox2*), mely a vér-agy gát fontos szabályozója, valamint a vér-agy gát transzporterek közül a telítetlen zsírsavakat (pl.: docoxahexaénsav, DHA) szállító *Mfsd2a*, a glükóz transzporter *Glut1*, az *Lrp2*, és a *P-gp* (*Abcb1a*) géneknek jelentősen csökkent az expressziója az agyi mikroerekben (36. C ábra). Az oxidált LDL receptora a *Lox1* gén expressziós szintje pedig jelentősen megemelkedett (36. C ábra). Eredményeinkkel egybeesik, hogy mások a *MEOX2* alacsony expresszióját mutatták ki a súlyosan érintett Alzheimer-kóros betegekből izolált, tenyésztett agyi endotélsejtekben (Wu és mtsai., 2005). Az *MFSD2A* gén mutációi csökkent DHA-transzportoz és súlyos neurológiai tünetekhez vezettek (Betsholtz, 2015), és korábban mi is kimutattuk, hogy a DHA megvédi a neurovaszkuláris egység sejtjeit az amiloid- β toxicitással szemben (Veszelka és mtsai., 2013). A *GLUT1* gén expressziójának csökkenése az agy elsődleges energiaforrásának a glükózfelvételnek a csökkenését jelenti, ami súlyos neurológiai problémákhoz és Alzheimer-kór kialakulásához vezet egerekben (Winkler és mtsai., 2015). Alzheimer modellben az amiloid- β transzportjért is felelős LRP2 receptor és a *P-gp* efflux pumpa szintjének csökkenését mutatták ki (Marques és mtsai., 2013). A génexpressziós adatok csökkenésével összhangban a *P-gp* immunfestődése is jelentősen lecsökkent az APOB-100 transzgenikus állatokban mind a frontális kéreg, mind pedig a hippocampus területén (37. ábra). Mindezek alapján az APOB-100 állatokban kapott eredményeink egybeesnek más, az irodalomban Alzheimer modellben leírt eredményekkel.



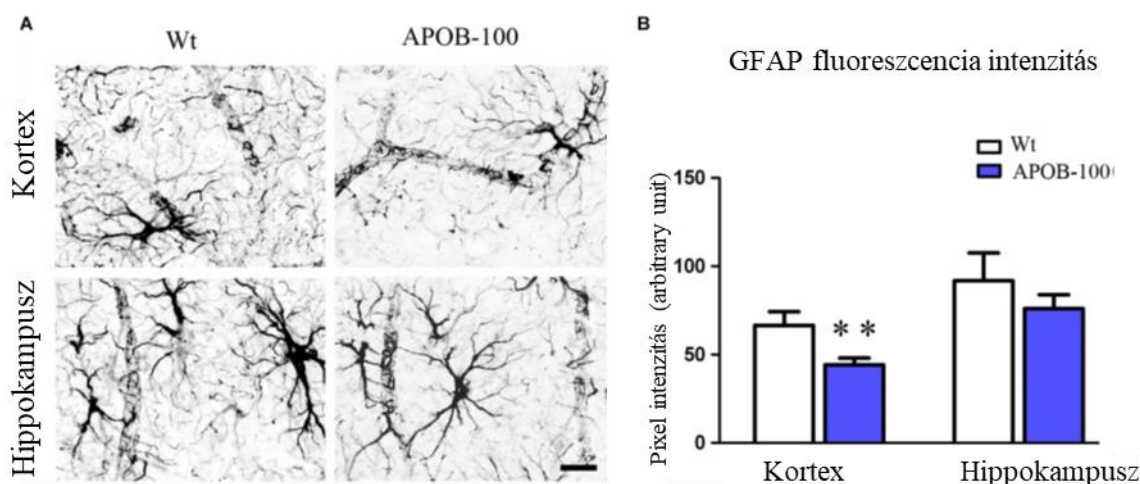
37. ábra. P-gp (ABCB1) efflux pumpa immunfestése a kortex és a hippocampus területén vad típusú (Wt) és APOB-100 transzgenikus egerekben. Piros: P-gp; kék: sejtmag (A). Mérce: 20 μ m. A P-gp immunfestés fluoreszcencia intenzitása vad típusú és APOB-100 transzgenikus egerekben (B). $P < 0,001$, $P < 0,05$, a Wt csoporthoz hasonlítva. (Hoyk és mtsai., 2018).



38. ábra. Agyi mikroerek (A) és szoros sejtkapcsolatok elektronmikroszkópos felvételei a kortex és a hippocampusz területén vad típusú (Wt) és APOB-100 transzgenikus (APOB-100) egerekben. A szoros sejtkapcsolatok nagyobb nagyításban (B). A: asztrocita; BM: bazális membrán; P: pericita; TJ: szoros sejtkapcsolatok. Mércé: 500 nm (A) és 800 nm (B) (Hoyk és mtsai., 2018).

Az agyi kapillárisok ultrastruktúrájának elektronmikroszkópos elemzése során számos elváltozást mutattunk ki az APOB-100 transzgenikus egerek neurovaszkuláris egységében a vad típusú állatokhoz képest (38. ábra). A legjelentősebb változásokat a TJ morfológiában és az asztrocita végtalpak változásában figyeltük meg. A transzgén egerek mintáiban a kapillárisok körül megduzzadt gliavégtalpakokat, a TJ elektrondenz szakaszaiban felszakadozottságot és megvastagodott bazális membránt láttunk mind a frontális kéreg, mind pedig a hippocampusz területén, amelyek az agyi kapillárisok sérülésére utalnak (38. ábra). Az asztrociták végtagjainak rendellenességei összefüggésbe hozhatók a víz és

elektrolit szabályozásért felelős aquaporin-4 fehérje (Aqp4) megemelkedett expressziójával (36.C ábra) az APOB-100 transzgenikus állatokból izolált agyi mikroerekben. Ismert, hogy az Aqp4 polarizált expressziójának elvesztése az asztrocita végtalpokban vér-agy gát diszfunkció és a perivaszkuláris ödéma kialakulásához vezet különböző kórképekben (Wolburg és mtsai., 2009). Megfigyeltük azt is, hogy az asztrogliá marker GFAP immunjelölés intenzitása jelentősen csökkent az APOB-100 transzgenikus egerek kéregállományában a vad típusú állatokhoz képest (39. ábra).



39. ábra. GFAP immunfestődési mintázat a vad típusú (Wt) és az APOB-100 transzgenikus (APOB-100) egerek kéregállományában és hipokampuszában (A). Mérce: 25 μ m. A GFAP immunfestés fluoreszcencia intenzitása a Wt és az APOB-100 transzgenikus egerek frontális kérgében és hipokampuszában (B). ** $P < 0,01$, a Wt egerekhez képest (Hoyk és mtsai., 2018).

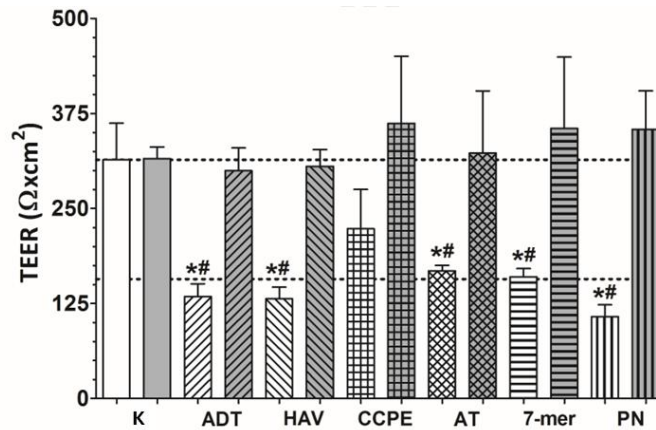
4.3. A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata

A központi idegrendszeri betegségek terápiájának egyik nagy kihívása a gyógyszerhatóanyagok átjuttatása a vér-agy gáton (Veszelka és mtsai., 2015). Kutatómunkám során több gyógyszerbeviteli módszert is vizsgáltam, amelyek közül értekezésemben az agyi endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsolatok megnyitását, és a vér-agy gátat célzó nanoméretű hordozórendszerekkel kapott eredményeinket mutatom be.

4.3.1. A vér-agy gát permeabilitásának fokozása a paracelluláris transzportútvonallal (Bocsik és mtsai., 2016; Dithmer és mtsai., 2017; Walter és mtsai., 2015)

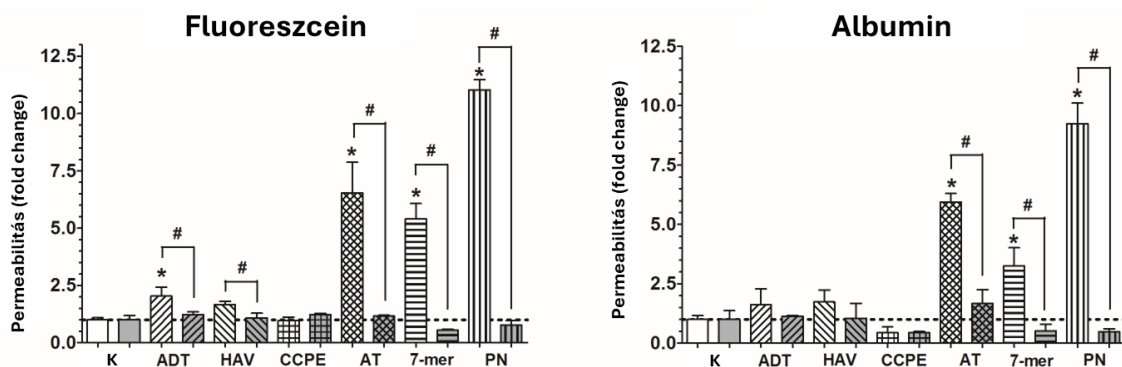
Az agyi endotélsejtek közötti paracelluláris transzportfolyamatok szabályozásáért a szoros zárókapcsolatok fehérjéi a felelősek. A TJ struktúrák a vér-agy gát működésének alapvető elemei, amelyek korlátozzák a gyógyszerek agyba jutását. Az egyik lehetséges agyi gyógyszerbeviteli stratégia a szoros kapcsolatok módosítása TJ modulátor peptidekkel vagy fehérjékkel (Deli, 2011; Veszelka és mtsai., 2015; Deli, 2009). A TJ-k megnyitása a vér-agy gát áteresztőképességének átmeneti és reverzibilis növekedését eredményezi, ami elősegíti a hatóanyagok agyba való jobb bejutását. A TJ fehérjék aminosav szekvenciája és szerkezete alapján olyan új peptidek tervezhetők, melyek TJ modulátorokként képesek közvetlenül és specifikusan kölcsönhatásba lépni TJ fehérjék extracelluláris doménjével, és megnövelni a vér-agy gát permeabilitását. Kísérleteinkben hat különböző TJ modulátor peptidet

teszteltünk (Bocsik és mtsai., 2016): az ADT-6 és a HAV-6 hexamer peptideket, melyek epitélsejteken permeabilitás fokozóknak bizonyultak és az E-kadherinhez kapcsolódnak, a *Clostridium perfringens* enterotoxinból származó C-CPE peptidet, ami a klaudin fehérjéken hat, az AT-1002 peptidet, ami a *Vibrio cholerae* enterotoxin egy részlete, és a 7-mer/PN-78 valamint a PN-159/KLAL peptideket, ez utóbbiak fehérje célpontja kutatásaink kezdetekor nem volt ismert.



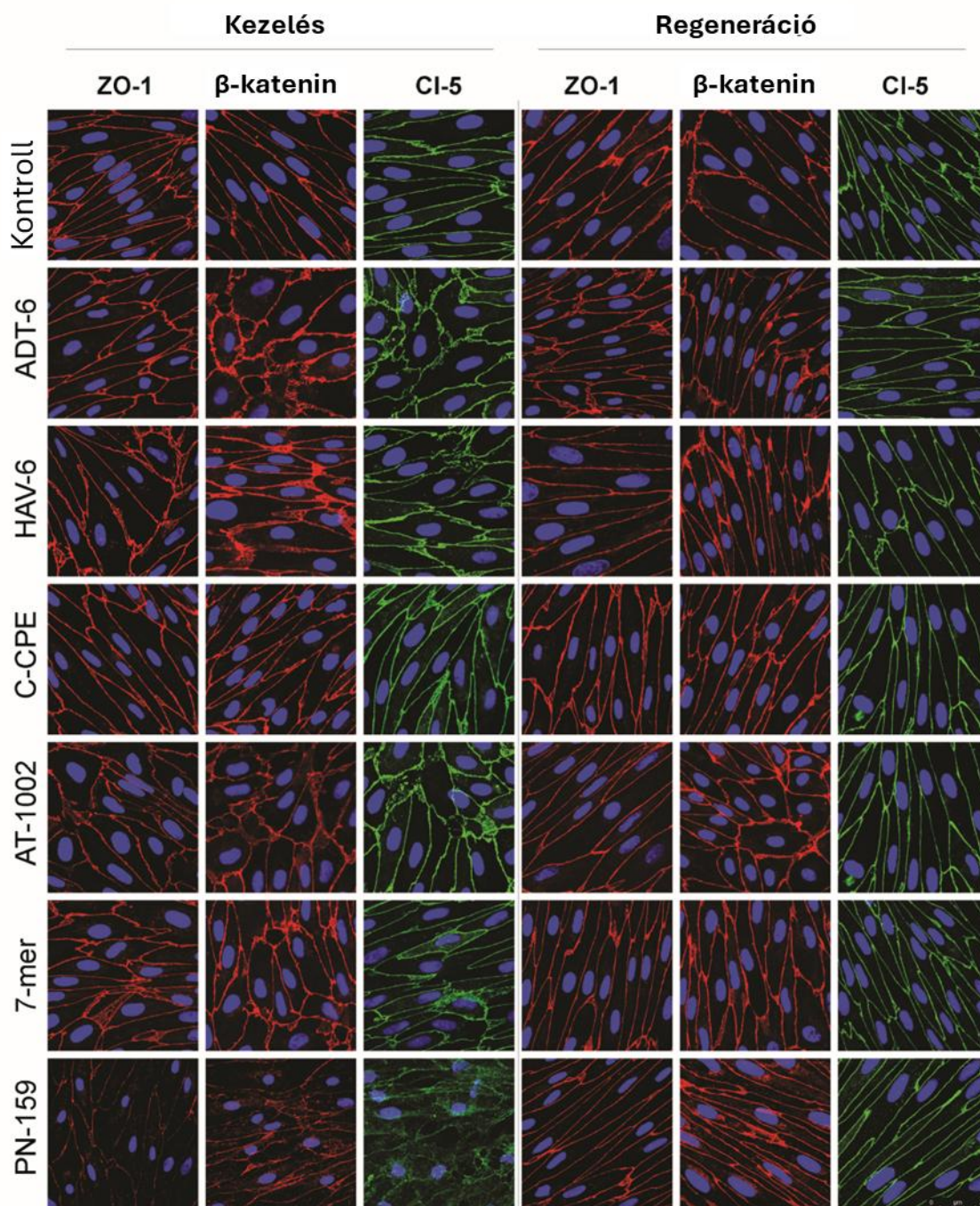
40. ábra. TJ modulátor peptidek hatása az agyi endotélsejt rétegek rezisztenciájára. A fehér oszlopok az 1 órás peptid kezelés hatását mutatják, a szürke oszlopok pedig a 24 órás regenerálódás utáni rezisztenciát. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt. * $P < 0,05$, a kontroll (K) csoporthoz képest ($314 \pm 48 \Omega \times \text{cm}^2$); # $P < 0,05$ a 24 órás kontroll csoporthoz képest ($350 \pm 60 \Omega \times \text{cm}^2$) (Bocsik és mtsai., 2016).

A peptidekkel egy óráig kezeltük az agyi endotélsejteket, majd 24 óra elteltével megvizsgáltuk, hogy mennyire regenerálódtak a sejtek. A C-CPE peptid kivételével mindegyik vizsgált TJ modulátor peptid szignifikáns módon csökkentette az endotélsejt rétegek rezisztenciáját. A leghatékonyabb a PN-159/KLAL peptid volt. A vér-agy gát integritása pedig minden peptid kezelést követően visszaállt 24 óra regenerációt követően (40. ábra).



41. ábra. TJ modulátor peptidek hatása a vér-agy gát fluoreszcein (A) és albumin (B) permeabilitására. A fehér oszlopok az 1 órás peptid kezelést követő permeabilitást mutatják, a szürke oszlopok pedig a 24 órás regenerálódás utáni. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt és t-próba. * $P < 0,05$, a kontroll csoporthoz képest; # $P < 0,05$ a peptideknél a 24 órás recovery csoporthoz viszonyítva (Bocsik és mtsai., 2016).

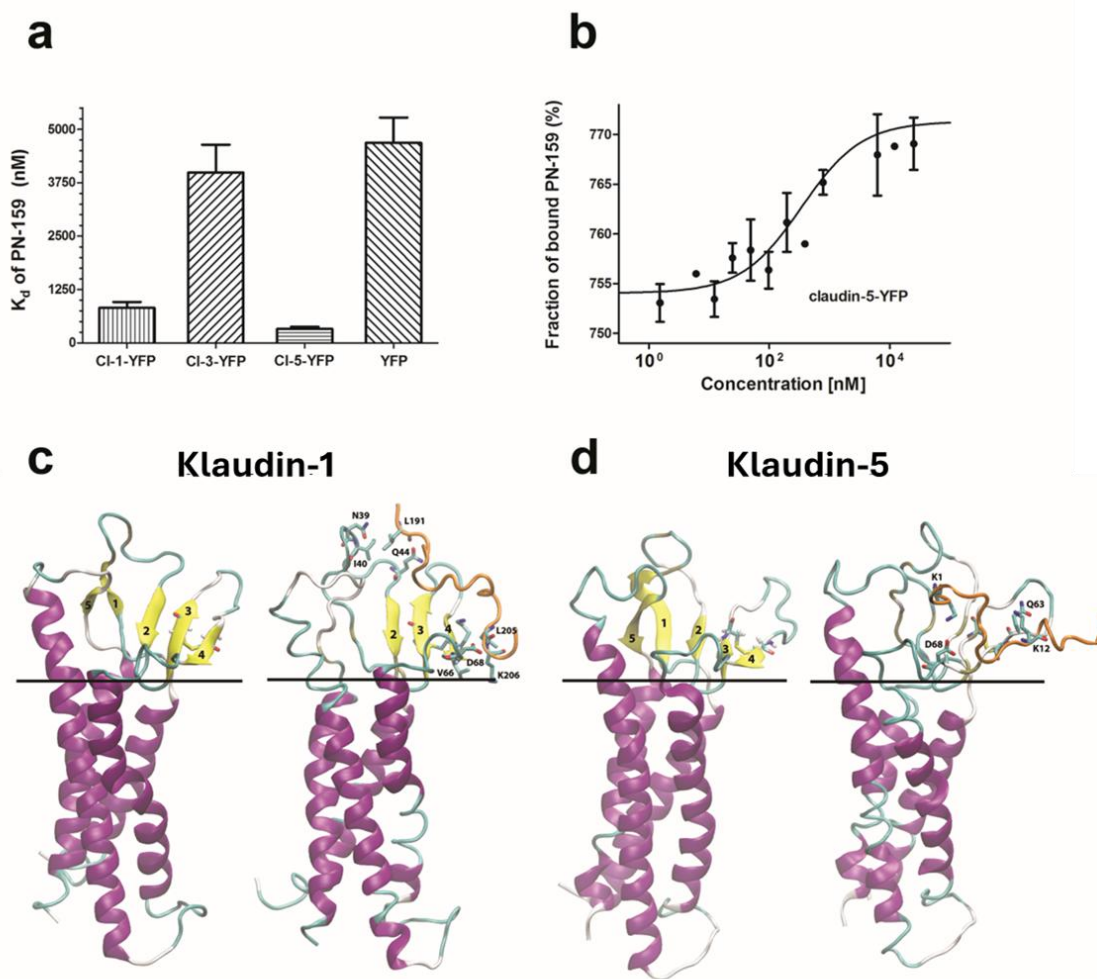
A vér-agy gát penetrációs vizsgálatokban az AT-1002, 7-mer és PN-159/KLAL peptidek jelentősen fokozták a fluoreszcein és az albumin markerek permeabilitását (41. ábra). Az AT-1002 és a 7-mer peptidek 3,5-6-szorosára növelték a markerek permeabilitását, míg a PN-159/KLAL körülbelül 10-szeresére növelte azokat. A HAV-6 és az ADT peptidek kis mértékben hatottak a fluoreszcein permeabilitására, de az albuminéra nem, míg a C-CPE-nek nem volt vér-agy gát permeabilitást fokozó hatása (41. ábra).



42. ábra. A modulátor peptidek hatása az agyi endotélsejtek TJ festődésére. Immunfestés a kladudin-5 és ZO-1 szoros sejtkapcsoló fehérjékre és a β -katenin adherens sejtkapcsoló fehérjére, 1 órási peptidkezelést és 24 órás regenerálódást követően. Piros: ZO-1 és β -katenin. Zöld: kladudin-5. Kék: sejtmagok. Mérce: 25 μ m. (Bocsik és mtsai., 2016).

A C-CPE kivételével minden peptid kezelés hatással volt a szoros (klaudin-5, ZO-1) és adherens (β -katenin) sejtkapcsolatok fehérjéinek immunfestésére (42. ábra). Az ADT-6 és HAV-6, az AT-1002 és a 7-mer peptidek hasonló hatással voltak a ZO-1, a β -katenin, és a klaudin-5 fehérjék morfológiájára: az immunfestődés kevésbé volt éles a sejthatárokon, és a sejtek között rések és lyukak jelentek meg. A legdrasztikusabb változást mindhárom fehérje immunfestésében a PN-159/KLAL peptid okozta az agyi endothel sejteken (42. ábra). A peptidek által okozott morfológiai változások minden esetben reverzibilisek voltak a 24 óras regenerálódást követően (42. ábra).

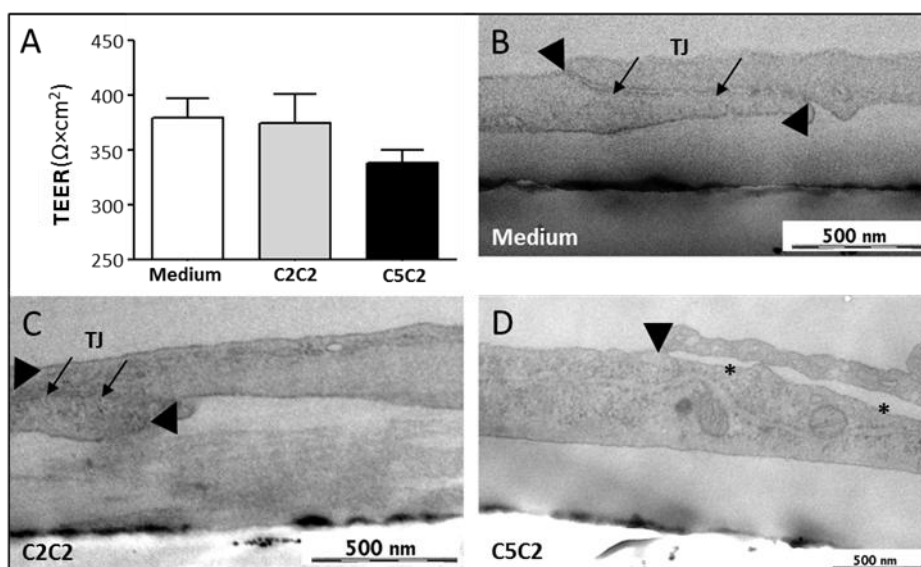
A PN-159/KLAL kötőpartnere az irodalmi adatok alapján nem volt ismert, ezért kötővizsgálatokkal és molekula modellezés segítségével kiderítettük, hogy a klaudin-1 és az agyi endothel sejtekben nagy mennyiségben jelen levő klaudin-5 a legvalószínűbb kötőpartnerei (43. ábra).



43. ábra. (A) A PN-159/KLAL peptid klaudinokhoz való affinitásának mérése (B) és a klaudin-5-YFP kötési görbéje. A PN-159 peptid dokkolása a humán klaudin-1-hez (C) és a humán klaudin-5-höz (D). Narancssárga: PN-159 peptid; sárga szín: β -lemez; lila szín: α -hélix. A membránfelszínt egybefüggő fekete vonal jelöli. K_d , disszociációs állandó; YFP, sárga fluoreszcens fehérje.

A klaudinok négy transzmembrán hélixet, két extracelluláris hurkot (ECL1 és ECL2), egy intracelluláris hurkot, valamint citoszolikus N- és C-terminálisokat tartalmaznak. Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatokban a szomszédos klaudinok extracelluláris hurkai közötti paracelluláris záró funkciót az ECL1 és az ECL2 közvetíti közvetlen intercelluláris asszociáción keresztül, amelyet transzinterakciónak neveznek (Tscheik és mtsai., 2013). Következésképpen a klaudin-5 oligomerizációjának módosítása ígéretes stratégia lehet a vér-agy gát megnyitására és a kisméretű hidrophil gyógyszerek paracelluláris bejuttatására a központi idegrendszerbe (Tscheik és mtsai., 2013).

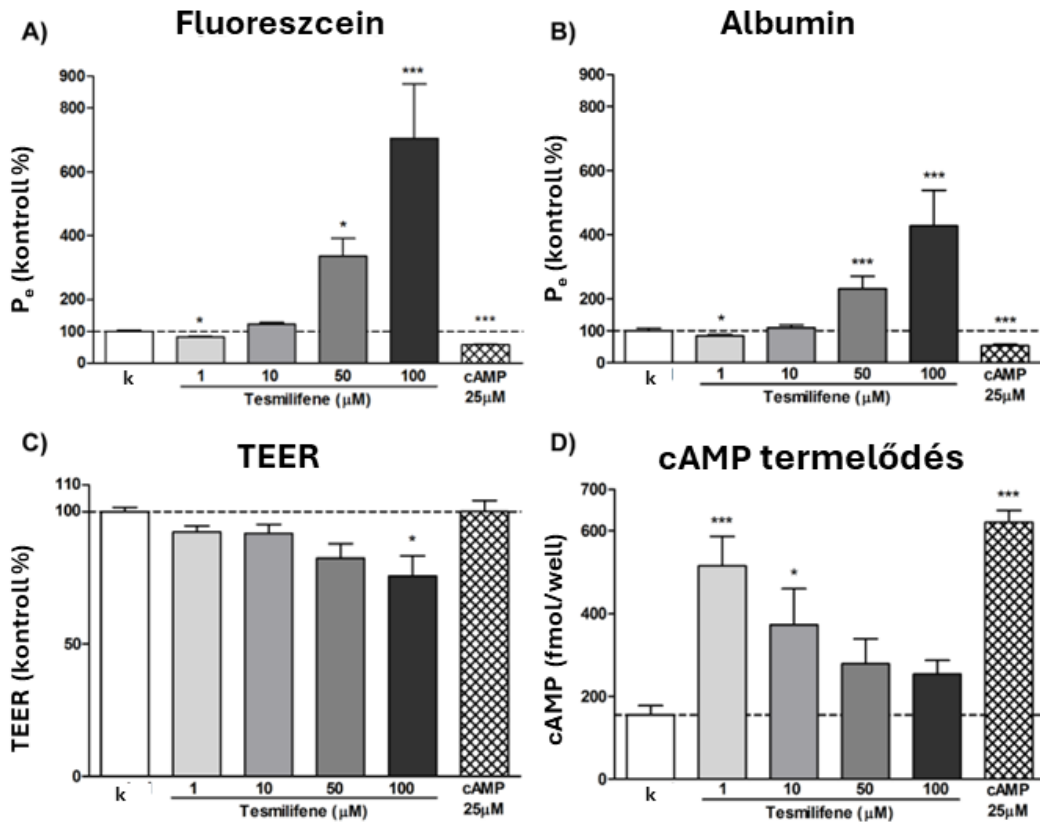
A kutatás célja az volt, hogy a klaudin-5 fehérje ECL1 hurkának 28 aminosavat tartalmazó szekvenciárészletét, a C5C2 peptidet vizsgáljuk a vér-agy gát *in vitro* modelljén annak igazolására, hogy a peptid képes a paracelluláris útvonal megnyitásával a vér-agy gát permeabilitás átmeneti fokozására (Dithmer és mtsai., 2017). Német együttműködő partnereink kimérték, hogy a C5C2 a peptidomimetikum nanomoláris affinitással kötődik a klaudin-5 fehérjéhez (Dithmer és mtsai., 2017). Kísérleteinkben a C5C2 peptidomimetikum hatásosnak bizonyult, csökkentette az agyi endotélsejt rétegek transzendoteliális elektromos ellenállását és megnyitotta az interendoteliális szoros sejtkapcsolatokat, melyet TEER méréseink és elektronmikroszkópos vizsgálataink igazoltak (44. ábra). A C2C2 klaudin-2 TJ fehérje peptidomimetikum nem volt hatásos (Dithmer és mtsai., 2017).



44. ábra. A C2C2 és C5C2 klaudin peptidomimetikumok hatása (A) primer patkány agyi endotélsejt rétegek transzendoteliális elektromos ellenállására. (B) Az interendoteliális szoros sejtkapcsolatok transzmissziós elektronmikroszkópos képe csak sejtenyészítő médium kezelt kontroll sejtekben. (C) A C2C2 és (D) a C5C2 peptid kezelések hatása a szoros sejtkapcsolatokra TEM felvételeken. TJ: szoros sejtkapcsolatok, nyílak: szoros sejtkapcsolatok, nyílhegy: „kissing points”, *: szoros sejtkapcsolatok megnyílása (Dithmer és mtsai., 2017).

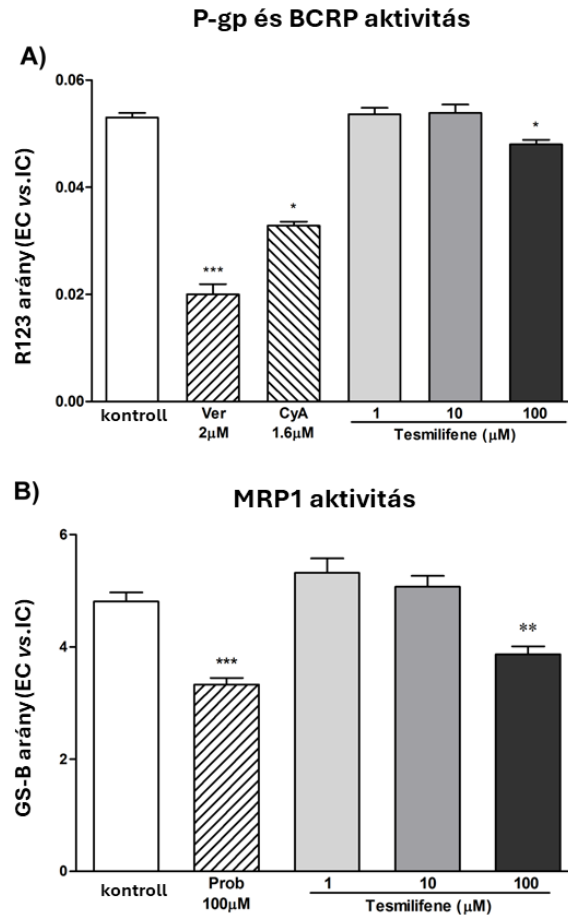
Kutatómunkánk során nemcsak peptidek, hanem kis gyógyszermolekulák vér-agy gát permeabilitás fokozó hatását is megvizsgáltuk. A tezmilifen (N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)-fenoxi]etánamin HCl), egy antihisztamin hatású tamoxifen analóg, melynek tumorelles hatását kísérleti és klinikai vizsgálatok igazolták tüdő-, prosztata- és mellrákban (Reyno és mtsai., 2004). A tezmilifen kezelése hatására kialakuló neurológiai mellékhatások (szédülés, hányinger, hányás, ataxia) vér-agy gát megnyílásra utaltak. Kutatócsoportunk korábbi munkáiban a tezmilifen növelte a vér-agy gát áteresztőképességét

in vivo (Deli és mtsai., 2000) és *in vitro* (Deli és mtsai., 2003) körülmények között is. Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a tezmilifen közvetlen hatását az agyi endotélsejtek átteresztőképességére és feltárjuk a lehetséges hatásmechanizmust (Walter és mtsai., 2015).



45. ábra. (A) Az agyi endotélsejtek átteresztőképessége nátrium-fluoreszceinre (SF) és (B) albuminra (EBA) 1 órás tezmilifen, illetve cAMP (25 μ M) kezelés után. (C) A TEER változása 1 órás tezmilifen, illetve cAMP (25 μ M) kezelés után. (D) cAMP-termelés rövid távú, 5 perces tezmilifen kezelést követően. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, a kezeletlen kontrollhoz képest, $n = 3-6$ (Walter és mtsai., 2015).

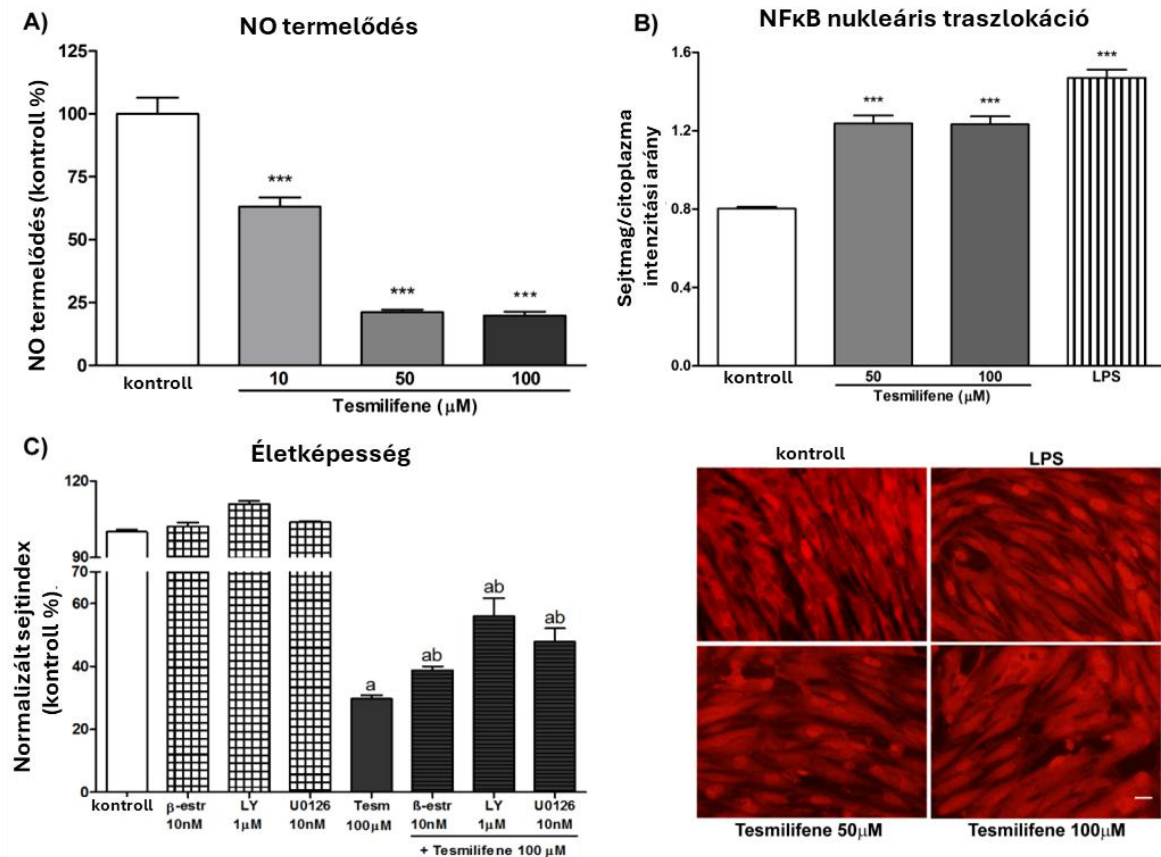
Az 50 μ M és a 100 μ M-os tezmilifen kezelés hatására szignifikáns módon megemelkedett a sejtenyészetes vér-agy gát modell permeabilitása mind a paracelluláris fluoreszcein, mind pedig a transzcelluláris permeabilitási marker molekula albuminra nézve (45. A, B ábra) és ezzel párhuzamosan csökkent a sejtrétegek TEER értéke is (45.C ábra). A legkisebb 1 μ M-os kezelés hatására ugyanakkor szorosabbá vált a modell, ami a tezmilifen hormetikus hatására utal, amit a cAMP termelődést fokozó hatása is megerősít (45.D ábra).



46. ábra. A tazmilifen hatása az agyi endotélsejtek efflux pumpa aktivitására rodamin 123 akkumuláció mérésével. (A) Az efflux pumpák működése 24 órás tazmilifen vagy P-gp és BCRP pumpa gátló ciklosporin A (1,6 µM), illetve P-gp gátló verapamil (2 µM) kezelés után. (B) Az MRP-1 efflux pumpa aktivitása 24 órás tazmilifen vagy MRP pumpa gátló probenecid (100 µM) kezelést követően. Prob: probenecid, CyA: ciklosporin A, Ver: verapamil, EC: extracelluláris, IC: rodamin 123 intracelluláris mennyisége. Átlag ± SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt, ahol * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, a kezeletlen kontrollhoz képest, $n = 4$ (Walter és mtsai., 2015).

Kísérleti eredményeink igazolták, hogy a 100 µM tazmilifennel történő kezelés gátolta az agyi endotélsejtek fontos efflux pumpáinak, a P-gp, a Bcrp és az Mrp-1-nek működését (46. A, B ábra).

A tazmilifen koncentráció-függően csökkentette a bazális NO-termelését az agyi endotélsejtekben, összehasonlítva a kezeletlen kontrollhoz képest (7a. ábra). Ezen kívül a tazmilifen kezelés 50 és 100 µM koncentrációban az agyi endotélsejtek nitrogén monoxid (NO) termelését a kontroll szint 20%-ára csökkentette (47. A ábra). A tazmilifen potenciális hatásainak további elemzése érdekében megvizsgáltuk a stresszhatásokban és sejt túlélésben szerepet játszó korai NFκB transzkripciós faktor nukleáris transzlokációját az agyi endotélsejtekben rövid, 1 órás tazmilifen kezelést követően. Eredményeink alapján a tazmilifen kezelés (50 és 100 µM) megemelte a NFκB nukleáris transzlokációját az agyi endotélsejtekben, melyet a magas sejtmag/citoplazma intenzitási arány is mutat (47. B. ábra). A megnövekedett nukleáris transzlokáció szintén mérhető volt a pozitív kontrollként szolgáló bakteriális LPS-kezelést követően (1 mg/ml).



47. ábra. (A) A tezmilifen (24 óra) hatása az agyi endotélsejtek nitrogén monoxid termelésére. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt, *** $P < 0,001$, a kezeletlen kontrollhoz képest, $n = 4$. (B) A tezmilifen hatása az agyi endotélsejtek NFκB nukleáris transzlokációjára a sejtmag/citoplazma festődési intenzitás arányában (1 h) tezmilifen kezelést követően. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt, *** $P < 0,001$, a kezeletlen kontrollhoz képest, $n = 40$. (C) A β-ösztrogén (β-estr), az LY294002 (LY) és az U0126 jelútvonal-gátlók önálló hatása és tezmilifen (1 h) kezelés mellett valós idejű sejtanálízis mérés. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt, ^a $P < 0,05$, a kezeletlen kontrollsejtekhez képest, és ^b $P < 0,05$, a tezmilifennel kezelt csoporthoz képest, $n = 3-8$. (D) Az agyi endotélsejtek NFκB immunfestése. LPS: lipopoliszacharid (1 mg/ml). Mércse: 25 μM (Walter és mtsai., 2015).

Annak érdekében, hogy kiderítsük mely szignalizációs útvonalak aktiválódnak, két, a vér-agy gát működése szempontjából fontos szignalizációs jelátviteli útvonal gátlószerét és egy receptor agonista szer hatását is megvizsgáltuk a tezmilifen kezelés mellett (100 μM) agyi endotélsejteken (47.C. ábra). Az 1 órás kezelést követően a LY294002 (1 μM), mely a PI3K/Akt útvonal gátlószere, és az U0126 (10 nM), amely a MAPK/ERK-kináz útvonal gátlója, valamint a β-ösztrodiol (10 nM) részlegesen blokkolták a tezmilifen hatását az agyi endotélre (47.C. ábra).

4.3.2. A vér-agy gát transzcelluláris útvonalának célzása nanorészecskékkel

Intenzíven kutatott módszer a gyógyszermolekulák agyi bejuttatására a hatóanyagok nanoméretű hordozórendszerhez kötése. A szisztémásan beadott nanorészecskék jelentős része a periférikus szervekbe kerül, ezért a központi idegrendszeri célpontú nanohordozók hatékony agyi bejuttatásához megfelelő célzó molekulákra van szükség (Saraiva és mtsai., 2016). A részecskék felszínére kötött célzó molekulák a vér-agy gát receptoraihoz vagy transzportereikhez kötődnek, és a vér-agy gát transzcelluláris útvonalait kihasználva képesek lehetnek ezáltal az agyba gyógyszereket bejuttatni (Pardridge, 2002; Rask-Andersen és mtsai., 2013; Mahringer és mtsai., 2021; Wu és mtsai., 2023).

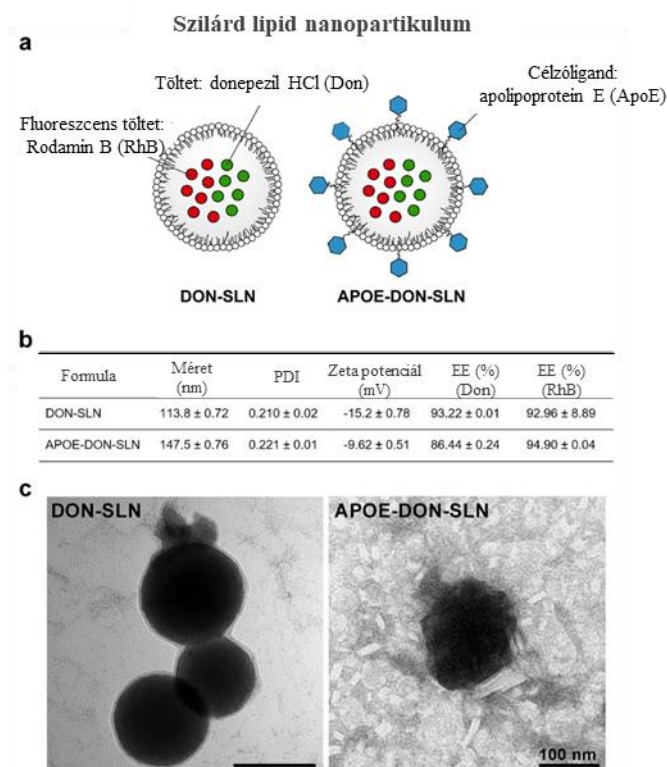
Nanopartikulumokkal végzett kísérleteinkben több különböző anyagú nanohordozót, eltérő vér-agy gát transzportútvonalakat (receptor-mediált, adszorptív-mediált, karrier-mediált transzportútvonal), és célzó molekulát vagy molekulakombinációkat is megvizsgáltunk.

4.3.2.1. Az agyi endotélsejtek receptor-mediált transzcitózis útvonalának célzása nanorészecskékkel (*Topal és mtsai., 2021*)

Az agyi endotélsejteken kifejeződő receptorok, mint például az inzulin, a transferrin, az LDL, az LRP vagy a leptin receptorok fontos kutatási célpontok a nanorészecskék célzott agyi bejuttatására (Pardridge, 2015; Mahringer és mtsai., 2021). A célzó molekulák kötődése az agyi endotélsejtek receptoraihoz a receptor - NP komplexek internalizációját váltja ki, ami az NP-k egy részének transzcitózisát eredményezi a vér-agy gáton keresztül.

Az apolipoprotein E (ApoE) kulcsszerepet játszik a koleszterin agyi transzportjában és felvételében (Kreuter és mtsai., 2007). Az ApoE3, az ApoE egyik izoformája nagy affinitással képes kötődni az LDL és az LRP receptorokhoz. Mivel ezeket a receptorokat mind az agyi endotélsejtek, mind az idegsejtek nagymértékben expresszálják, az ApoE3 ideális jelöltté vált nanopartikulumok célzó molekulájaként az agyba történő hatóanyagszállításra (Kreuter és mtsai., 2007).

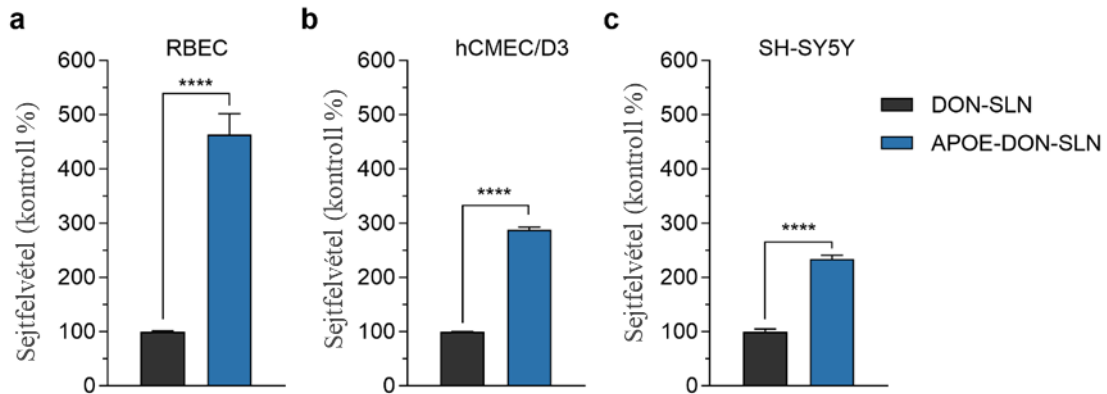
Török együttműködő partnereinkkel közösen kísérleteink célja az volt, az Alzheimer-kór terápiájában használt donepezil vér-agy gáton való hatékonyabb és biztonságosabb átjuttatására fluoreszcens, szilárd lipid nanopartikulumokat (SLN) állítsunk elő és tetszteljünk agyi endotélsejteken és neuronokon, melyeket specifikus ApoE célzó molekulákkal látunk el (*Topal és mtsai., 2021*). A donepezil ugyan képes átjutni a vér-agy gáton (*Veszelka és mtsai., 2018*), de káros perifériás mellékhatásai miatt a nanopartikulumba csomagolás egyrészt biztonságosabb alkalmazhatóságot jelenthet, másrészt a célzott agyi bejuttatás által a dózisa csökkenthető (*Topal és mtsai., 2021*).



48. ábra. A nem célzott (DON-SLN) és az ApoE célzott (APOE-DON-SLN) nanopartikulumok sematikus ábrája (A). A részecskék főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (B). A bemutatott értékek átlagok $\pm$ SD értékek. EE%: bezárási hatékonyság. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek a DON-SLN és az APOE-DON-SLN részecskékről. Mércé: 100 nm, mindkét részecske esetében (Topal és mtsai., 2021).

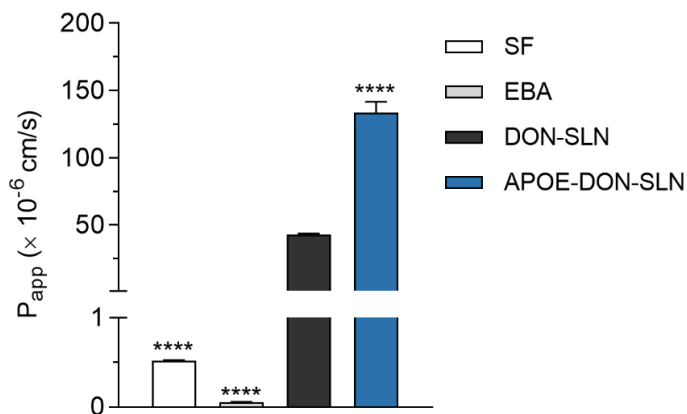
Az előállított nanorészecskék fiziko-kémiai tulajdonságait meghatároztuk: a nem célzott nanorészecskék (DON-SLN) átlagos átmérője 104 nm volt, míg a célzott SLN-ek az ApoE-funkcionalizációnak köszönhetően nagyobbak voltak (140 nm) (48. ábra). Ezek a méretek ideálisak nanopartikulumok agyi bejuttatására (Kreuter és mtsai., 2007 és 2014). Dinamikus fényszórás méréssel viszonylag szűk méreteloszlást mértünk, amit az alacsony polidiszperziós index (PDI) értékeket is jeleztek ($\sim 0,2$ mindkét csoportban, 48. ábra), ami igazolja, hogy a nanorészecskék nem aggregálódtak. A célzott részecskék enyhén negatív felületi töltéssel rendelkeztek, míg a nem célzott SLN-ek ennél kissé negatívabb zeta-potenciált mutattak (48. ábra). A nanorészecske felületi töltése fontos tényező a sejtbevétel szempontjából, amely meghatározza az NP-k és az agyi endotélsejtek közötti sejt-kölcsönhatást (Walter és mtsai., 2021). Az agyi endotélsejtek erősen negatív glikokalixának köszönhetően a semleges vagy az enyhén pozitív, illetve negatív töltésű nanopartikulumok sejtbejutása kedvezőbb, míg az erősen kationos vagy anionos töltésű részecskék sejtkárosító hatásúak (Walter és mtsai., 2021; Veszelka és mtsai., 2015).

A donepezil töltet bezárási hatékonysága 93% és 86% volt a DON-SLN és az APOE-DON-SLN részecskék esetében, míg a fluoreszcens rodamin B esetében ez 92-94% között volt, mely értékek megfelelően magasak voltak. A nanorészecskék morfológiája az elektronmikroszkópos felvételeken gömb alakú volt (48. ábra).



49. ábra. A nem célzott (DON-SLN) és az APOE célzott (APOE-DON-SLN) nanorészecskék sejtfelvétele (a) tenyésztett primer patkány agyi endotélsejtekben (RBEC), (b) humán agyi endotélsejtekben (hCMEC/D3) és (c) differenciáltatott SH-SY5Y neuronális sejtekben 2 órás inkubáció után. Statisztika: t-próba; **** $P < 0,0001$; $n = 6$ (Topal és mtsai., 2021).

A nanorészecskék sejtfelvételét patkány (RBEC) és humán agyi endotélsejteken (hCMEC/D3) és humán SH-SY5Y neuronsejteken is teszteltük (45. ábra). Hipotézisünkkel összhangban, az ApoE célzó molekula jelenléte az SLN-ek felszínén megnövelte nanorészecskék felvételét minden vizsgált sejt típusban (49. ábra). A legjelentősebb sejtfelvételt a primer patkány agyi endotélsejtek (RBEC) esetében mértünk ki, ahol a célzott NP-k felvétele négyszer több volt (463%), mint a nem célzott részecskék esetében 2 órás kezelést követően (49. ábra).



50. ábra. A nem célzott (DON-SLN) és az ApoE célzott (APOE-DON-SLN) nanorészecskék permeabilitás vizsgálata vér-agy gát modellen (10 g/mL koncentráció, 2 óra). Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt, **** $P < 0,0001$, a DON-SLN csoporthoz képest; $n = 4$. P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható, SF: nátrium fluoreszcein (376 Da), EBA: Evans kékkel jelölt albumin (67 kDa) (Topal és mtsai., 2021).

Megvizsgáltuk azt is, hogy az ApoE célzott és nem célzott nanorészecskék milyen hatékonysággal képesek átjutni a vér-agy gát modellen (50. ábra). Eredményeink bizonyították, hogy a célzó molekula jelenlétében a részecskék szignifikánsan jobb átjutást mutattak a vér-agy gáton át, szemben a nem célzott részecskékkel, illetve a vér-agy gát marker molekulákkal, a fluoreszcein és az albumin átjutásával összehasonlítva. (50. ábra).

4.3.2.2. Az agyi endotélsejtek adszorptív-mediált transzcitózis útvonalának célzása nanorészecskékkel (Szecskó és mtsai., 2025)

A nagy biomolekulák, mint a fehérjék, peptidek illetve a nanorészecskék átjutása a vér-agy gáton az endo- és transzcitózist magában foglaló transzcelluláris útvonalakra korlátozódik. A receptor-mediált transzcitózisban a ligandok kötődése a sejt felszínén lévő specifikus receptorokhoz indítja el az endocitikus eseményt. Ezzel szemben az adszorptív-mediált transzcitózis során a molekula vagy a nanorészecske pozitív töltése segíti elő a kölcsönhatást a negatív töltésű agyi endotélsejt felülettel, ami elektrosztatikusan kiváltja a transzcitózist (Abbott és mtsai., 2010; Hervé és mtsai., 2008).

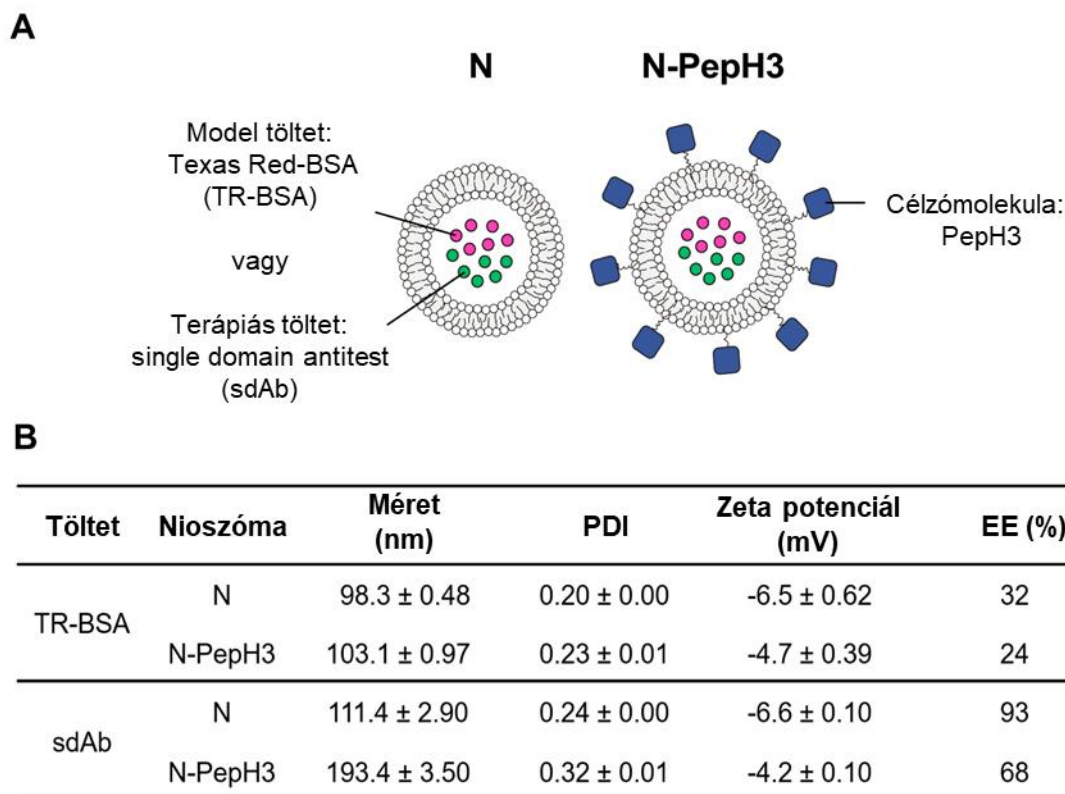
Az adszorptív-mediált transzcitózis alacsony kötődési affinitást, de nagy kötési kapacitást mutat (Hervé és mtsai., 2008). Az adszorptív-mediált transzcitózis a receptor-mediált transzcitózissal szemben nem függ a specifikus receptorok overexpressziójától a vér-agy gáton, és nem korlátozza az endogén ligandok kötődése sem (Hervé és mtsai., 2008). Az adszorpciós-mediált transzcitózis koncentráció-, idő- és energiafüggő folyamat, és magasabb koncentrációnál telítődik, mint a receptor-mediált, ami elvileg nagyobb mennyiségű hatóanyag bejutását teszi lehetővé az agyba (Hervé és mtsai., 2008).

Portugál együttműködő partnereink korábbi eredményeikben kimutatták, hogy a Dengue vírus kapszid fehérjéből tisztított kationos PepH3 peptid jelentős mennyiségben képes átjutni a vér-agy gáton adszorptív-mediált endocitózissal, és képes *in vivo* bejutni az agyba is (Neves és mtsai., 2017).

A mi célunk az volt, hogy ezen eredményekre alapozva megvizsgáljuk, hogy vajon a PepH3 peptid alkalmas-e nanorészecskék célzó molekulájaként elősegíteni az NP-k vér-agy gáton való jobb átjutását. Ezért PepH3 peptiddel célzott, nem-ionos felületaktív anyagokból és koleszterinből felépülő vezikuláris nanorészecskéket, úgynevezett nioszómákat állítottunk elő. A nem-ionos felületaktív anyagokból felépülő nioszómák előnyei a lipid nanorészecskékkel szemben, hogy kevésbé hajlamosak oxidációra, ezért tovább tárolhatók és könnyebben kezelhetők, valamint olcsóbb az előállításuk is (Abdelkader és mtsai., 2014). A nioszómákba fluoreszcens Texas-vörössel jelölt szérum albumin (TR-BSA) modell anyagot, illetve terápiás hatóanyagként amiloid- β peptid ellenes ellenanyagot (single-domain antibody, sdAb) csomagoltunk (Szecskó és mtsai., 2025).

Az előállított NP-ket méretük, töltésük és hatóanyag bezárásuk alapján jellemeztük, valamint megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben és milyen mechanizmussal képesek bejutni az agyi endotélsejtekbe, a sejteken belül milyen sejtorganellekbe lokalizálódnak és képesek-e a PepH3-peptid funkcionálisnak köszönhetően jobban átjutni a vér-agy gáton, mint a nem célzott, kontroll nanorészecskék.

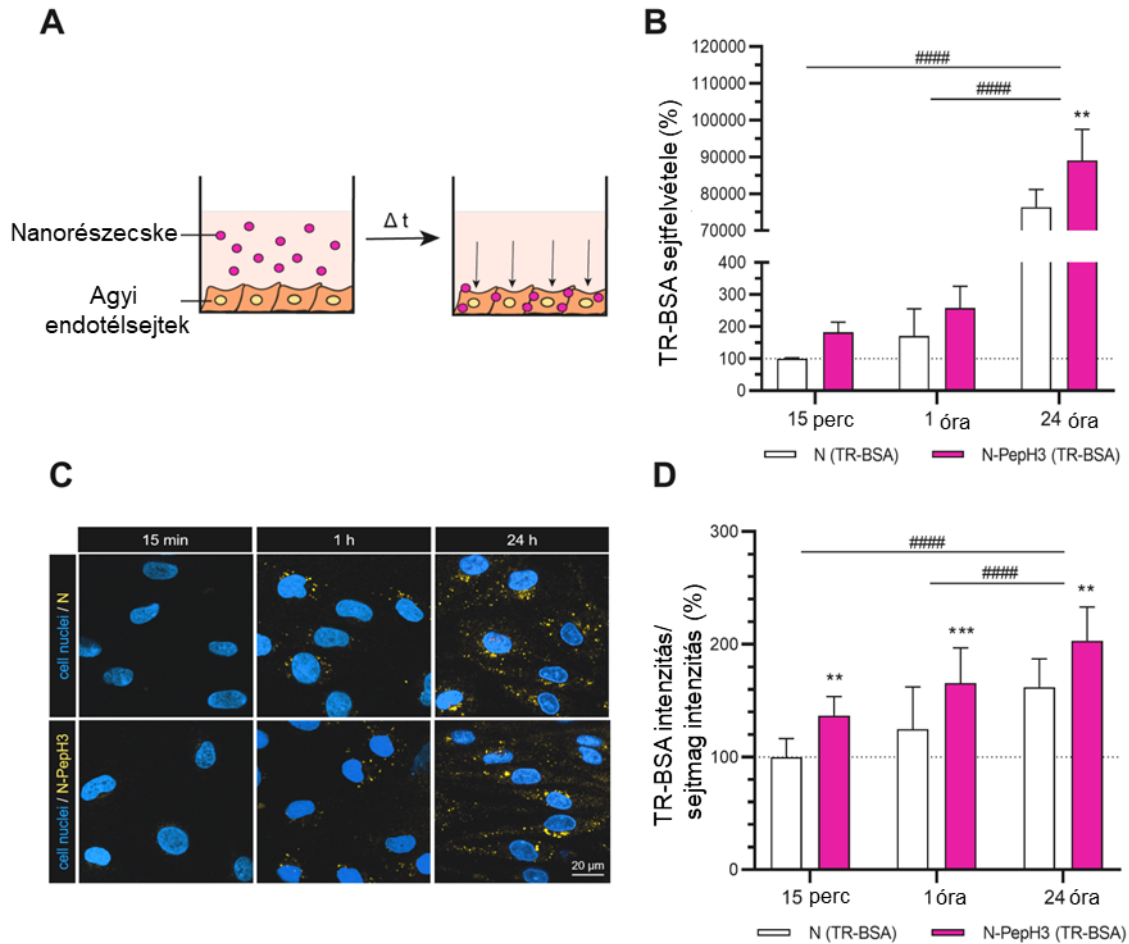
A TR-BSA töltetet tartalmazó NP-k átlagos átmérője nagyon hasonló volt, 98 és 103 nm az N és N-PepH3 csoport esetében (51. ábra). Az sdAb töltetet tartalmazó NP-k esetében a nem jelölt nanohordozók átmérője 111 nm volt, míg a PepH3 peptiddel jelölt NP-k mérete 193 nm-re nőtt. Minden csoportban viszonylag szűk méreteloszlást mértünk, amit a 0,32 alatti PDI értékek jeleztek (51. ábra).



51. ábra. A nem célzott (N) és a PepH3-mal célzott (N-PepH3) nanorészecskék sematikus ábrája (A). A részecskék főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (B). A bemutatott értékek átlagok ± SD értékek. sdAb: amiloid-β elleni single-domain antitest; TR-BSA: Texas red-jelölt borjú szérum albumin; PDI: polidiszperzitási index; EE: bezárási hatékonyság (Szecskó és mtsai., 2025).

A zéta-potenciál mérések alapján minden NP enyhén negatív felületi töltéssel rendelkezett. Várakozásainknak megfelelően a pozitív töltésű PepH3 peptid jelenléte a nanorészecskék felületi töltését szignifikáns módon kevésbé negatívvá tette. A nagyobb molekulaméretű TR-BSA (67 kDa) bezárási hatékonysága 32% volt az N és 24% az N-PepH3-csoportban. A kisebb méretű sdAb-val (14,03 kDa) töltött NP-k esetében a bezárási hatékonyság értékek magasabbak voltak, 93 és 68% az N és N-PepH3 csoportok esetében (51. ábra).

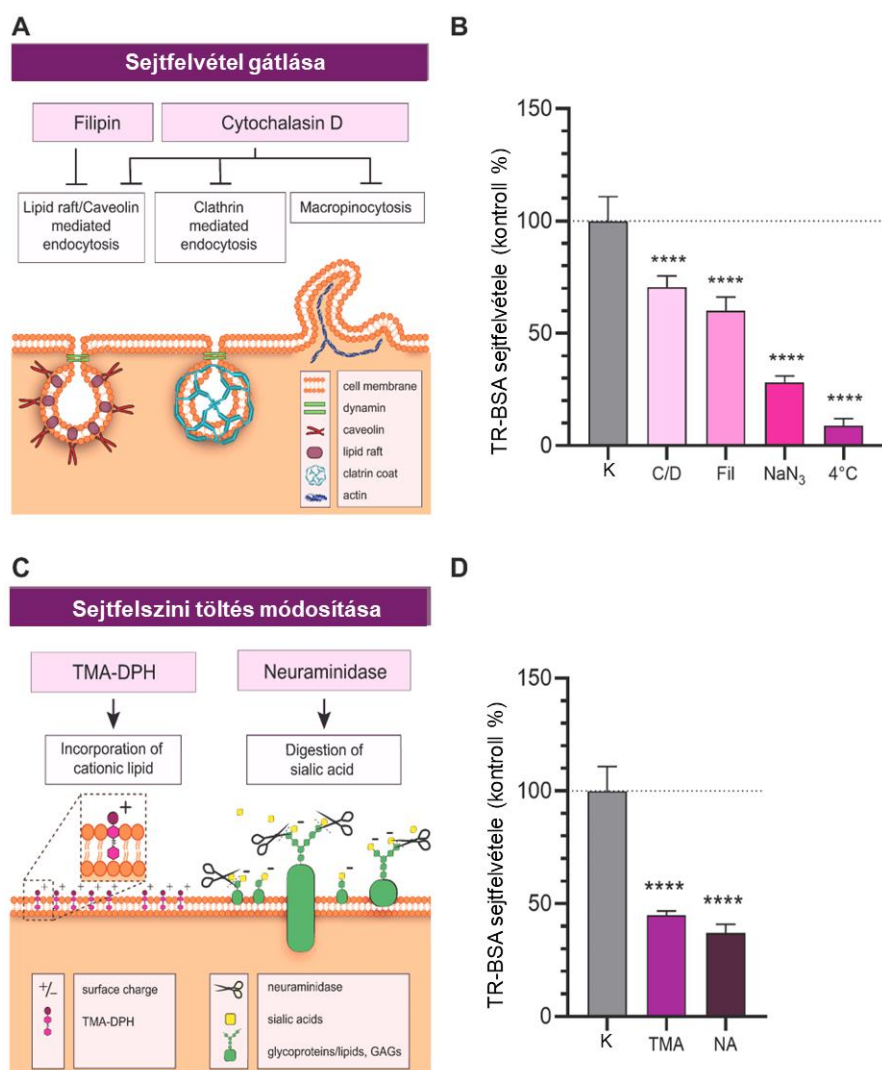
A sejtfelvételi kísérletekben sikerült kimutatni, hogy a fluoreszcens TR-BSA töltet bejutása az élő patkány primer agyi endotélsejtekbe időfüggő módon növekedett (52. ábra), és a PepH3 peptid, a nanorészecskék felületén sikeresen növelte a TR-BSA modell anyag sejtes internalizációját minden egyes időpontban, a nem jelölt NP-vel kezelt csoporthoz képest (52. ábra).



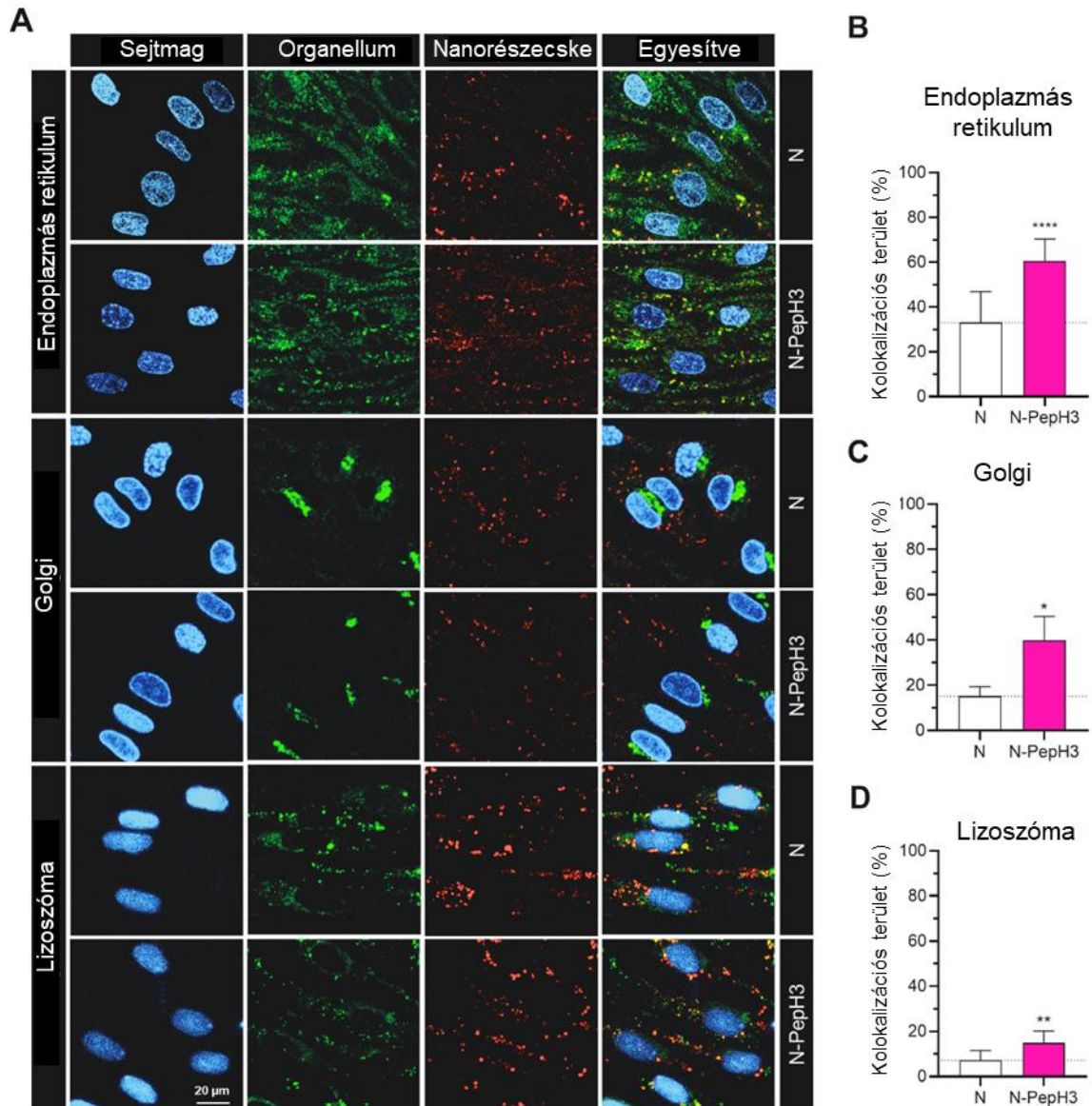
52. ábra. (A) Az NP-k sejtes felvételének sematikus rajza. (B) A patkány agyi endotélsejtek által felvett Texas-Red BSA kvantitatív meghatározása spektrofluoriméterrel 15 perc, 1 és 24 órás NP-kezelést (1 mg/ml) követően. A bemutatott értékek átlagok $\pm$ SD, a kontroll csoport százalékában megadva. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-poszttest; $**P < 0,01$ az N csoporthoz képest; $####P < 0,0001$ a 24 órás csoporthoz képest; $n=3-4$. (C) Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek az NP-k sejtfelvételéről. Sárga: NP-k; kék: sejtmagok. Mércé: 20 μ m. (D) A mikroszkópos képek TR-BSA fluoreszcencia intenzitás alapú kiértékelése sejtmagszámra normalizálva. A bemutatott értékek átlagok $\pm$ SD. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-poszttest; $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ az N csoporthoz képest; $####P < 0,0001$ a 15 perces csoporthoz képest; $n=10-15$ (Szecskó és mtsai., 2025).

A nanorészecskék töltetének sejtfelvételi mechanizmusát vizsgálva, az agyi endotélsejteket előkezeltük a lipid raft/kaveolin-függő endocitózis inhibitor filipinnel (5 μ g/ml, 15 perc), illetve az aktin-polimerizációt gátló citokalazin D-vel (0,125 μ g/ml, 1 óra), amely minden fontosabb endocitotikus útvonalat gátol (53B. ábra). A TR-BSA felvétele jelentősen csökkent, amikor a sejteket filipinnel vagy citokalazin D-vel kezeltük a kontroll csoporthoz képest, ami arra utal, hogy az N-PepH3 sejtfelvétele részben endocitózissal történik. Annak vizsgálatára, hogy az NP sejtfelvétel nem passzív folyamat, hanem aktív ATP-szintézist igénylő transzportfolyamattal zajlik, a metabolikus inhibitor nátrium-azidot használtunk, illetve 4 °C-on is megvizsgáltuk az NP-k felvételét. A nátrium-azid és a 4 °C-on történő inkubáció a TR-BSA töltet szignifikánsan kisebb mértékű felvételét eredményezte a sejtekbe a kontroll csoporthoz képest, ami az N-PepH3 jelölt NP-k energiafüggő sejtes internalizációjára utal (53B. ábra).

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a negatív töltésű glikokalix hogyan befolyásolja a kationos peptiddel célzott NP-k sejtfelvételét. Ennek vizsgálatára módosítottuk az agyi endotélsejtek felületi töltését, és a glikokalix negatív szíalsav oldalláncainak neuraminidáz enzimmel történő leemésztésével, illetve a sejtek TMA-DPH kationos lipiddel történő kezelésével pozitívabbá tettük a sejtek felszíni töltését (53D. ábra). Ezeknek a kezeléseknak köszönhetően a kationos PepH3-célzott NP-k sejtfelvétele jelentősen csökkent a kontroll csoportokhoz képest (53D. ábra). Ezek az adatok is bizonyították, hogy az agyi endotélsejtek felszíni elektrosztatikus gátja, a glikokalix jelentősen befolyásolja a kationos PepH3-jelölt NP-k sejtfelvételét.



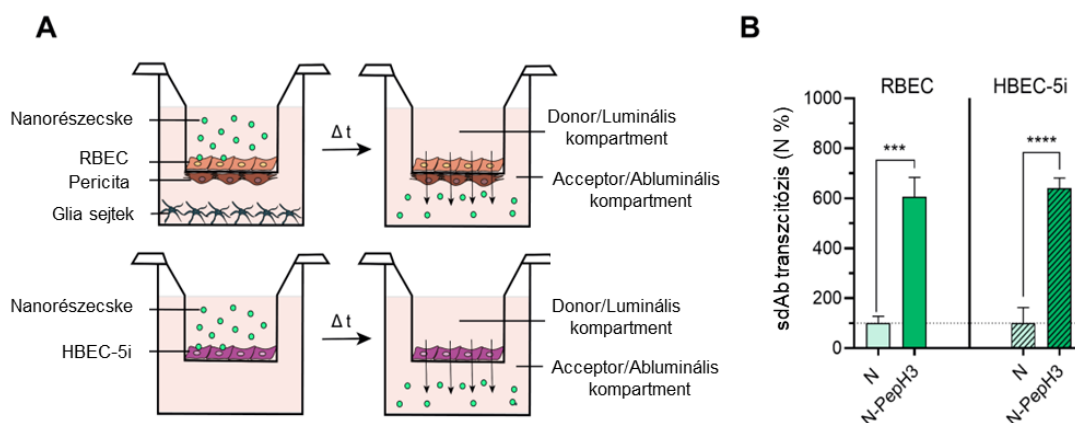
53. ábra. (A, C) A sejtfelvételi mechanizmusok gátlásának sematikus ábrázolása. (B) Az endocitotikus inhibitor citokalazin D (C/D; 0,125 µg/mL) és filippin (Fil; 5 µg/mL) vagy metabolikus inhibitor nátrium-azid (NaN₃; 1 mg/mL) kezelés, valamint a 4°C-on történő inkubáció hatása a TR-BSA-val töltött N-PepH3 nanorészecskék sejtfelvételére. Kontroll (K): csak N-PepH3-kezelés 37 °C-on, inhibitorok nélkül. A bemutatott értékek átlagok ± SD, a kontroll csoport százalékában megadva. Statisztika: ANOVA, Bonferroni-poszttest; **** $P < 0,0001$ a kontroll csoporthoz képest; $n=6$. (D) A glikokalix neuraminidázal (NA; 1 U/ml) és TMA-DPH-val (TMA; 30 mM) történő módosításának hatása a TR-BSA-val töltött N-PepH3 sejtfelvételére (37°C, 24 óra). Kontroll (K): csak N-PepH3-kezelés 37 °C-on, töltésmódosító reagensek nélkül. A bemutatott értékek átlagok ± SD, a kontroll csoport százalékában megadva. Statisztika: ANOVA, Bonferroni-poszttest; **** $P < 0,0001$ a kontroll csoporthoz képest (Szeckó és mtsai., 2025).



54. ábra. A nanorészcsek kolokalizációs vizsgálata az intracelluláris sejtorganelumokkal. (A) A TR-BSA NP-k kolokalizációja az endoplazmatikus retikulummal, a Golgival vagy a lizoszómákkal RBEC sejt kultúrákban 24 órás NP kezelés (1 mg/ml) után. Kék: sejtmagok; zöld: endoplazmatikus retikulum, Golgi apparátus vagy lizoszómák; piros: TR-BSA töltet a nem jelölt (N) vagy PepH3 jelölt (N-PepH3) nanorészcsekben; Mérés: 20 μm. A konfokális mikroszkópos képek analízise: az NP-k TR-BSA töltetének (B) endoplazmatikus retikulummal, (C) Golgi apparátussal vagy (D) lizoszómákkal való kolokalizációs területének meghatározása. A bemutatott értékek átlagok ± SD, és a kolokalizációs terület százalékában vannak megadva. Statisztika: t-próba; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ a nem jelölt csoporthoz képest; $n=4-10$ (Szecskó és mtsai., 2025).

Megvizsgáltuk a sejtekbe bejutott NP-k TR-BSA fluoreszcens töltetének intracelluláris lokalizációját is a főbb endo-lizoszómális kompartmentekkel, úgymint az endoplazmatikus retikulummal, a Golgi apparátussal és a lizoszómákkal (54. ábra). A legnagyobb kolokalizációt az endoplazmatikus retikulummal láttunk, kevesebb akkumulációt detektáltunk a Golgiban, és csak korlátozott mennyiségű TR-BSA intracelluláris lokalizációt láttunk a lizoszómákban, ami azt jelzi, hogy az NP-k töltetének nagy része elkerülte a lizoszómális celluláris degradációt. Az agyi endotélsejtekben a

vezikuláris transzportnak számos elemét azonosították, beleértve a klatrin, a kaveola vagy a makropinocitikus vezikulákat (Tóth és mtsai., 2020). Az agyi endotélsejtekben is igen aktív kaveola-mediált sejtfelevétel esetében igazolták, hogy a sejten belüli vezikulák a lizoszómák elkerülésével retrográd transzport útján a Golgi apparátusba és az endoplazmás retikulumba jutnak (Tóth és mtsai., 2020).



55. ábra. (A) Az NP-k permeabilitási vizsgálatának sematikus rajza primer patkány és humán vér-agy gát tenyésztéses modelleken. (B) A nem célzott (N, 1 és 0,1 mg/ml) és a PepH3 peptiddel célzott nanorészecskékbe (N-PepH3, 1 és 0,1 mg/ml) csomagolt sdAb transzcitózisa patkány (RBEC) és humán (HBEC-5i) vér-agy gát modellen 24 órás NP inkubációt követően. A bemutatott értékek átlagok $\pm$ SD. Statisztika: t-próba; *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ az N csoportokhoz képest; $n = 4-6$. RBEC: patkány agyi endotélsejtek; HBEC-5i: humán agyi endotélsejt vonal (Szecskó és mtsai., 2025).

A sejtfelevéti és mechanizmus vizsgálatokat követően megvizsgáltuk az NP-k sdAb töltetének transzlokációját mind patkány (RBEC) mind pedig humán (HBEC-5i) vér-agy gát modellen (55. ábra). A vér-agy gáton átjutott sdAb mennyiségét Western blot segítségével 24 órás kezelést követően mutattuk ki, és azt találtuk, hogy a PepH3 peptiddel célzott nanorészecskék hasonló módon és szignifikáns mértékben megnövelték az sdAb transzlokációját mindkét vér-agy gát modellen (55. ábra). A kationos PepH3 peptid jelenléte az NP-k felületén tehát fokozta az sdAb töltet penetrációját a vér-agy gáton keresztül a nem célzott nanorészecskékkel összehasonlítva.

4.3.2.3. Az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalának célzása egyszerűen jelölt nanorészecskékkel (Veszélka és mtsai., 2017; Fekete és mtsai., 2021; Porkoláb és mtsai., 2024)

A receptorok mellett a tápanyagszállító transzporter fehérjék, az SLC-k a másik nagy fehérjecs család, melynek tagjai nagy számban és az agyi endotélsejtekre jellemző génexpressziós mintázatban fejeződnek ki (Veszélka és mtsai., 2018), ezért alkalmas célpontok lehetnek a vér-agy gáton keresztüli célzott hatóanyag bejuttatásra. A klinikumban használt számos gyógyszer esetében már tudjuk, hogy SLC transporterekhez kötődve a vér-agy gát karrier-mediált transzcitózis útvonalának kihasználásával képes átjutni a vér-agy gáton (Deli, 2011). Bár az SLC transzporterek élettani és farmakológiai szempontból is

nagyon fontosak, agyi gyógyszerbeviteli szempontból kevésbé kiaknázottak (César-Razquin és mtsai., 2015).

Az agyi gyógyszerbejuttatás fokozására tervezett, célzott nanopartikulumokkal végzett kísérletünk többsége a vér-agy gát karrier-mediált transzcitózis útvonalának és az SLC transzporterek célzására irányult. Kísérleteinkben számos SLC transzporter ligandot (biotin, alanin, glükopiranoz, leucin, aszkorbinsav) és ligandkombinációt (alanin-glutation; leucin-glutation-aszkorbinsav) teszteltünk nanorészecskék célzómolekulájaként és hasonlítottuk össze sejtfelvételi és vér-agy gát penetrációs hatékonyságukat a nem célzott nanorészecskékkel szemben.

Kísérleteinkben referencia ligandként az irodalmi adatok alapján egyik leghatékonyabb célzómolekulát, a glutationt választottuk. A glutation (GSH) egy antioxidáns hatású tripeptid, mely központi szerepet játszik az intracelluláris méregtelenítésben. A GSH aktívan transzportálódik a vér-agy gáton keresztül, bár transzportere molekuláris szinten még nem ismert (Veszelka és mtsai., 2017). A GSH, mint célzómolekula hatékonyságát számos preklinikai kutatásban igazolták. *In vivo* glióma modellben a GSH-val célzott PLGA nanorészecskébe zárt paklitaxel sejtfelvétele jelentősen megnőtt (Geldenhuys és mtsai., 2011). Rágcsáló modellben a GSH-val célzott liposzómába csomagolt doxorubicin (Gaillard és mtsai., 2014), metilprednizolon (Gaillard és mtsai., 2012), illetve a ribavirin (Maussang és mtsai., 2016) is szignifikánsan jobb agyi bejutást mutatott a szabad hatóanyagokkal összehasonlítva. A pegilált-glutation liposzóma, mint agyi gyógyszerbeviteli platform a klinikai vizsgálatok I/IIa fázisáig is eljutott (Gaillard és mtsai., 2016).

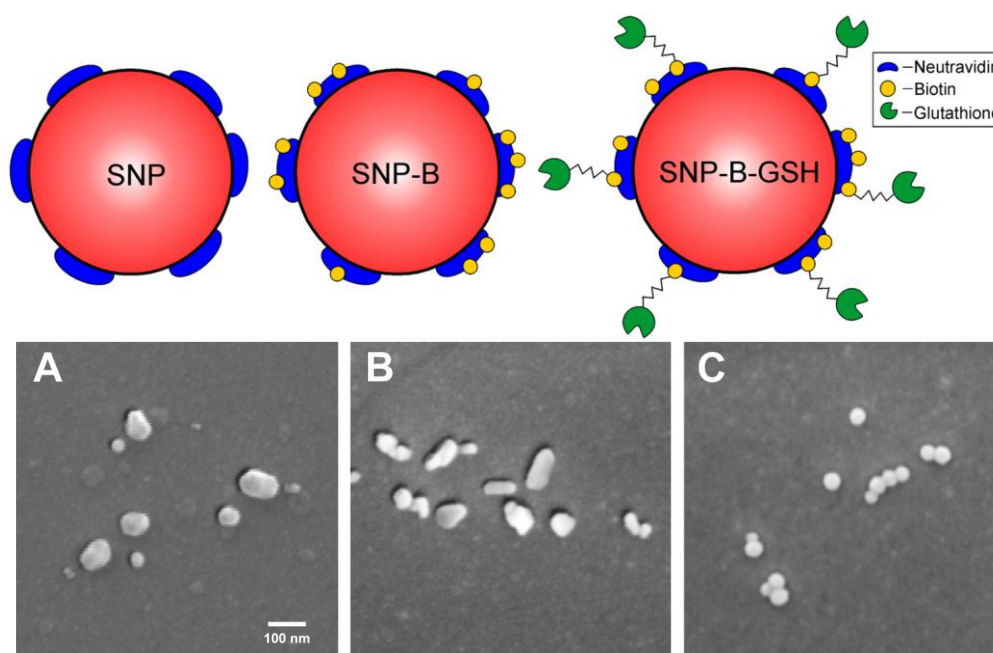
A mi kísérleteinkben az elsőként megvizsgált, SLC transzportereket célzó ligand a biotin volt (Veszelka és mtsai., 2017). A biotin (B7-vitamin) az agyi endotélsejtek Na^+ -függő multivitamin transzporterének ligandja (SMVT/SLC5A6). Ez a transzporter nagy mennyiségben fejeződik ki a vér-agy gáton (Campos-Bedolla és mtsai., 2014; Uchida és mtsai., 2015; Veszelka és mtsai., 2018), ezért alkalmas lehet célzott nanopartikulumok targetmolekulájaként. A biotint régóta használják ligációs technikákhoz, képalkotáshoz és diagnosztikához a biotin és az avidin közötti erős kölcsönhatás miatt (Lesch és mtsai., 2010). Kísérleteink megkezdéséig azonban a biotint, mint nanorészecskék célzóligandját még nem használták agyi gyógyszerbejuttatásra.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a biotint, mint célzó ligandot szilárd, fluoreszcensen jelölt poliszitirén nanorészecskékhez kötve, és összehasonlítottuk a biotin-célzás hatékonyságát a glutationnal, mint referencia célzómolekulával jelölt NP-kkel humán *in vitro* vér-agy gát modellen hCMEC/D3 sejteken. A fluoreszcensen jelölt, eredetileg neutravidinnel bevont nanorészecskék felszínére együttműködő partnereink segítségével kötöttünk biotint és biotinilált glutationt. A részecskék paramétereit az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat. Az SNP nanorészecskék fiziko-kémiai tulajdonságai (Veszelka és mtsai., 2017).

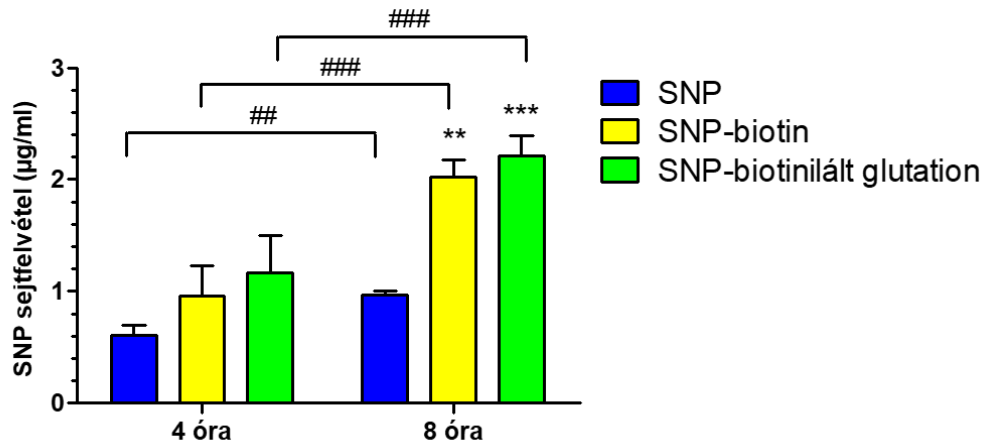
Nanorészecske	Méret (nm)	Polidiszperzitási index	Zéta potenciál (mV)
nem jelölt (SNP)	$93 \pm 0,59$	$0,131 \pm 0,02$	$-14 \pm 0,87$
biotin-jelölt (SNP-B)	$118,1 \pm 2,9$	$0,251 \pm 0,001$	$-23,1 \pm 0,62$
biotinilált glutation-jelölt (SNP-B-GSH)	$120,5 \pm 2,86$	$0,261 \pm 0,01$	$-23,8 \pm 1,33$

A nem célzott nanorészecskék mérete 93 nm volt, a biotin és a glutation célzó molekulák jelenléte a részecskék felszínén pedig ~ 20%-os méretnövekedést eredményezett (5. táblázat). Az alacsony polidiszperzitási index értékek az SNP-k szűk méreteloszlását mutatták. A jelölt részecskék felszíni töltése kissé negatívabb volt, mint a nem jelölt SNP-ké (5. táblázat). A nanorészecskék morfológiája pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken többnyire gömb alakú volt, aggregáció nem volt megfigyelhető (56. ábra).



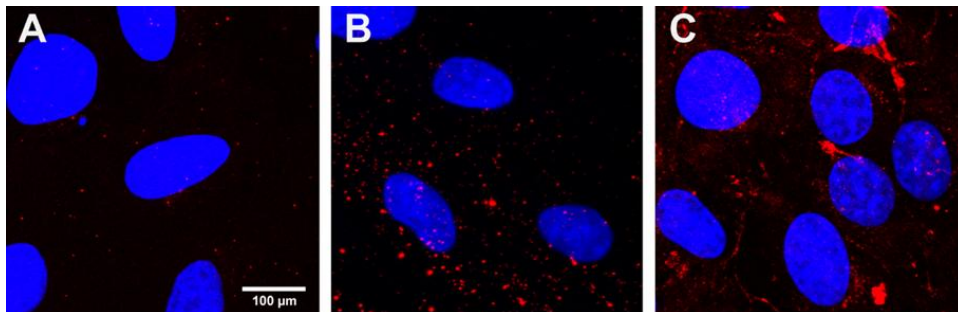
56. ábra. Sematikus ábra a nem célzott (SNP), a biotin-jelölt (SNP-B) és a biotinilált glutation-jelölt szilárd nanorészecskékről (SNP-B-GSH). Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek a nem célzott (A), a biotin célzott (B) és a biotinilált glutation célzott (C) nanorészecskékről. Mércé: 100 nm (Veszelka és mtsai., 2017).

Az SNP-k sejtfelvételét agyi endotélsejtekbe két időpontban vizsgáltuk, mely időpontokat a GSH-jelölt liposzómák irodalmi vizsgálati eredményei alapján választottuk ki (Gaillard és mtsai., 2012). A 4 órás inkubáció után nem volt szignifikáns különbség a kezelések között, míg a 8 órás kezelést követően az összes vizsgált nanorészecske felvétele szignifikánsan magasabb volt a 4 órás csoporthoz képest, és a biotin- és glutation-célzott SNP-k felvétele jelentősen megnövekedett, kétszer nagyobb volt, mint a nem célzott részecskék sejtfelvétele (57. ábra).



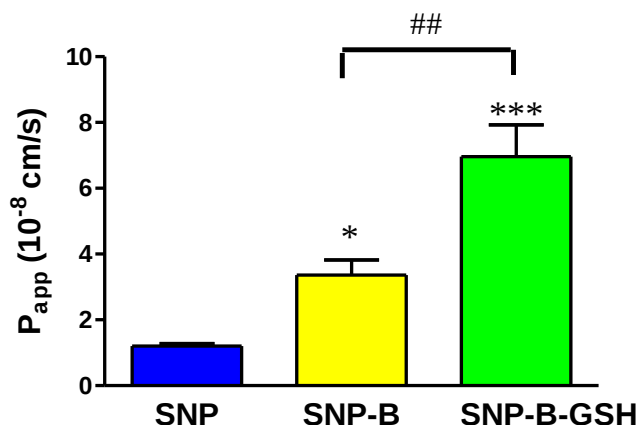
57. ábra. A nem célzott (SNP), biotin-jelölt (SNP-B) és glutation-jelölt (SNP-B-GSH) szilárd nanorészecskék sejtfelvételéje agyi endothelisejtekbe 4 vagy 8 órás inkubációt követően. Az SNP-k koncentrációja minden csoportban 150 µg/ml. A bemutatott értékek átlagok ± SEM. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt, $**P < 0,01$; $***P < 0,001$, az SNP-vel kezelt csoporthoz képest, $##P < 0,01$; $###P < 0,001$, a 4 órás kezeléshez képest; $n = 4-6$ (Veszelka és mtsai., 2017).

A piros fluoreszcenciát mutató SNP-k sejtfelvételét élő sejteken konfokális mikroszkóppal is vizualizáltuk a 8 órás kezeléseket követően a biotin és a glutation-jelölt nanorészecskék piros fluoreszcens jele jól látható volt a sejtek citoplazmájában (58. ábra).



58. ábra. Konfokális mikroszkópiás felvételek tenyésztett humán agyi endothelisejtekről, amelyeket nem jelölt (A), biotin-jelölt (B) és glutation-jelölt (C) szilárd nanorészecskékkel (piros) kezeltünk (150 µg/ml) 8 órán keresztül. Piros: nanorészecskék; kék: sejtmagok. Mércé: 20 µm (Veszelka és mtsai., 2017).

Megvizsgáltuk a hCMEC/D3 agyi endothelisejtek rétegén az SNP-k átjutását is (59. ábra). Mindhárom kezelési csoport esetében az SNP-k átjutottak az agyi endothelisejtek rétegén a permeabilitási vizsgálatok során, de eltérő mértékben (59. ábra). A 8 órás inkubáció után a biotin célzott SNP P_{app} értéke 2,8-szor magasabb volt, mint a nem célzott SNP-é. A penetráció a GSH-célzott nanorészecskék esetében volt a legjelentősebb, 5,8-szoros növekedést mértünk a nem jelölt SNP csoporthoz képest (59. ábra). A biotin és a GSH-jelölés is szignifikánsan megnövelte tehát a részecskék átjutását a vér-agy gáton, de a GSH célzó molekula hatékonyabbnak bizonyult.



59. ábra. Vér-agy gát permeabilitás vizsgálat SNP kezelések (150 μ g/ml, 8 óra) után. Az ábrázolt értékek átlagok $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Bonferroni-posztteszt. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, a nem jelölt SNP-vel kezelt csoporthoz képest; ## $P < 0,01$, a biotinnal jelölt SNP-B-vel kezelt csoporthoz képest, $n = 6$ (Veszelka és mtsai., 2017).

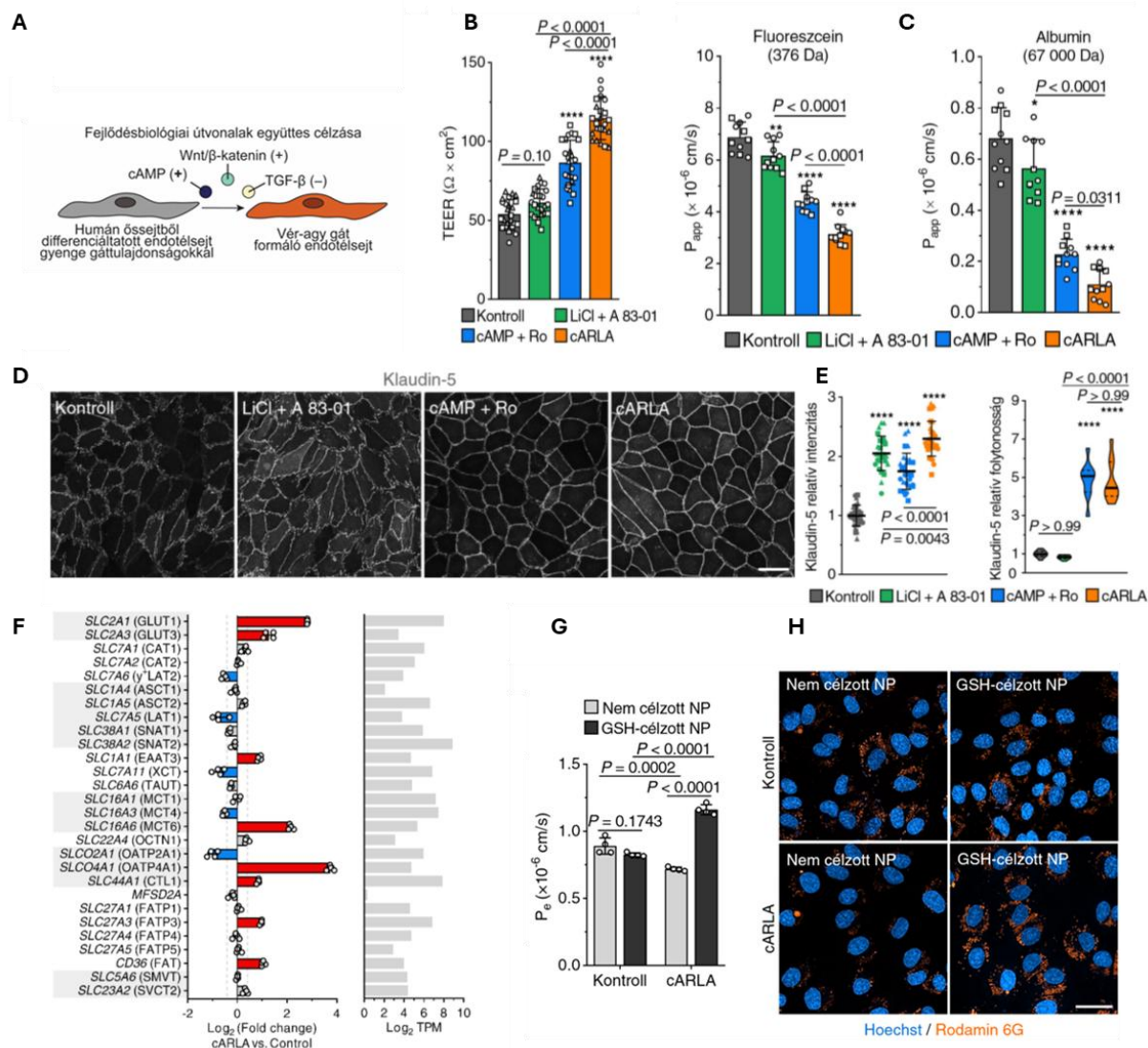
A GSH, mint nanorészecskék felszínéhez kötött célzó molekula hatékonyságát ezért tovább vizsgáltuk. Célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk a köldökzsinór vér összejektből differenciáltatott gyenge gáttulajdonságokkal rendelkező humán agyi endotélsejtek és agyi periciták ko-kultúra modellén, valamint ennek a modellnek a cARLA molekula kombináció kezeléssel erősített változatán a GSH-val célzott nanorészecskék átjutását (Porkoláb és mtsai., 2024).

A csoportunk által nemrégiben szabadalmaztatott cARLA koktél kismolekulák kombinációját tartalmazza: pCPT-cAMP, Ro-20-1724, lítium-klorid és A83-01. Ezek a molekulák három különböző, a vér-agy gát szempontjából jelentős jelátviteli útra fejtenek ki hatást (60A. ábra). A cAMP útvonalat a sejtpenetráló pCPT-cAMP-vel aktiváltuk, melyet a cAMP-specifikus foszfodiészteráz inhibitor Ro-20-1724 molekulával egészítettünk ki, a Wnt/ β -katenin útvonal aktiválására a lítium-kloridot (LiCl) alkalmaztuk, és a TGF- β jelátvitel gátlására az A83-01 molekulát használtuk. A cARLA molekulakombináció e három jelátviteli útra kifejtett szinergista hatása szignifikánsan megnövelte a vér-agy gát funkciókat a kontroll csoporthoz és a többi molekulakombinációs kezeléshez hasonlítva (60A-E. ábra) (Porkoláb és mtsai., 2024).

A cARLA kezelés hatására szorosabbá vált a vér-agy gát modell: megemelkedett az agyi endotélsejtek elektromos ellenállása (60B. ábra), csökkent a paracelluláris marker molekula fluoreszcein és a transzcelluláris marker albumin penetrációja a vér-agy gáton keresztül (60C. ábra), valamint a kladin-5 TJ fehérje expressziója is megemelkedett (60D, E. ábra). Számos vér-agy gát specifikus SLC transzporter génexpresszióját is megnövelte, úgymint a hexózokat (*GLUT1*, *GLUT3*), a monokarbonsavat (*MCT6*), az organikus anionokat (*OATP4A1*) és a zsírsavakat (*FATP3*) szállító transzportereket (60F. ábra) (Porkoláb és mtsai., 2024).

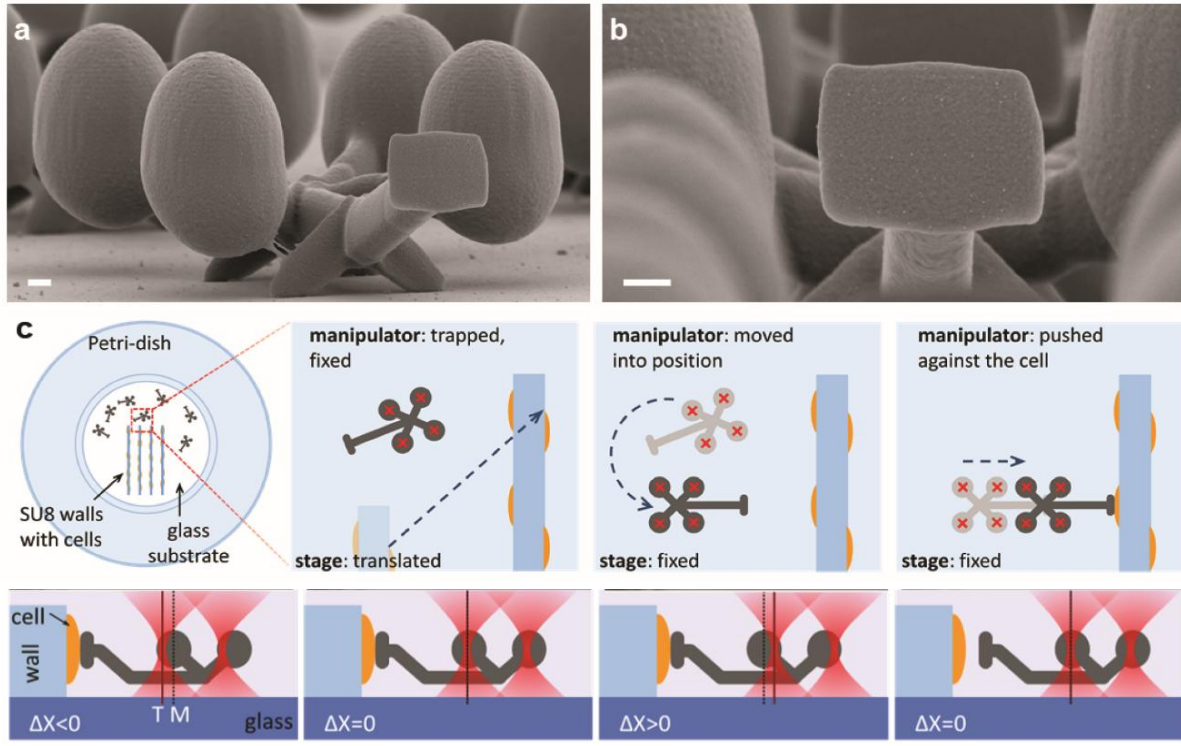
cARLA-kezelés hatására nemcsak a vér-agy gát modell vált szorosabbá, hanem a nem célzott NP-k permeabilitása is alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest (60G. ábra), ami a cARLA hatására bekövetkező alacsonyabb alapszintű endocitózissal magyarázható. A kontroll sejtenyészetek esetében a nem jelölt és a GSH jelölt NP-k penetrációjának mértékében nem láttunk különbséget és a mikroszkópos sejtfelvételi vizsgálatok sem mutattak eltérést a két kezelési csoport között (60G, H. ábra).

Ugyanakkor a nem célzott és GSH-célzott nanorészecskék vér-agy gát permeabilitása és sejtfelvétele közötti szignifikáns különbség a GSH célzott NP-k javára a cARLA kezelt csoportban kimutatható volt (60G, H. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a cARLA a vér-agy gát specifikus fehérjék és transzporterek expressziójának emelésével a GSH transzporterek kifejeződését is növeli, ezáltal elősegíti a nanorészecskék felszínéhez kötött GSH vér-agy gát specifikus célzó hatását. (Porkoláb és mtsai., 2024).



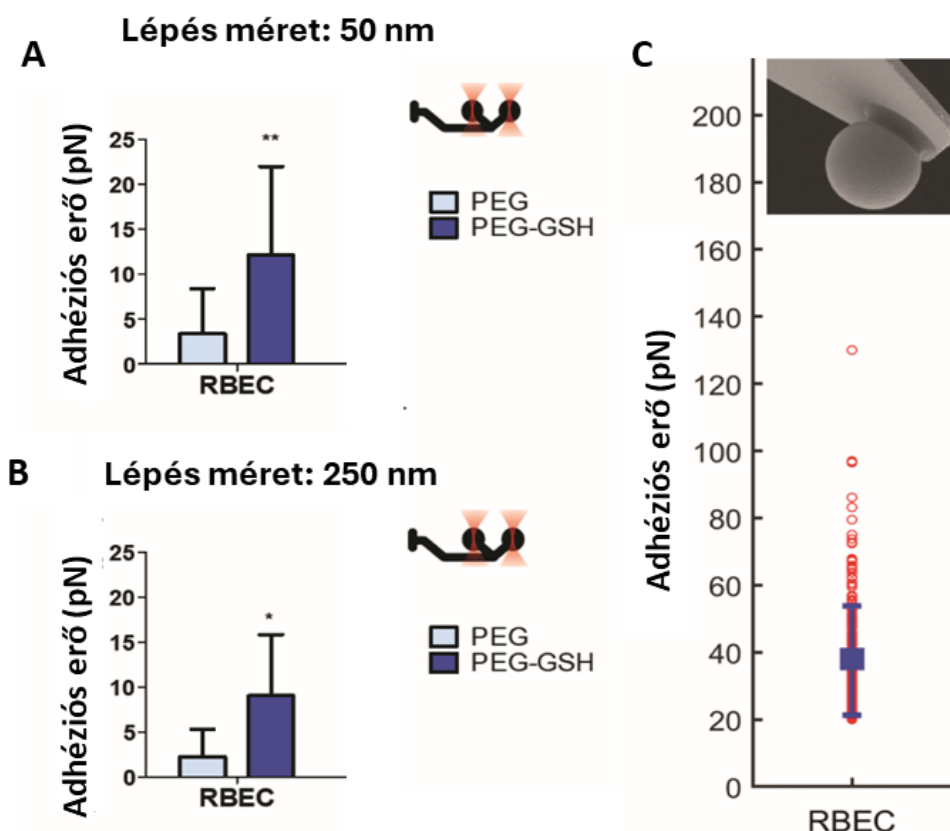
60. ábra. (A) A cARLA kombináció szinergista hatása a vér-agy gát szignalizációs útvonalaira. (B) Transzendoteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérés a kokultúra modellen 48 h kezelést követően. Statisztika: átlag $\pm$ SD, ANOVA, Bonferroni teszt, **** $P < 0,0001$ a kontroll csoporthoz, $n = 24$. (C) Fluoreszcein és Evans kék-albumin komplex permeabilitása a vér-agy gáton át 48 h kezelést követően. Átlag $\pm$ SD, ANOVA, Bonferroni teszt, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ a kontroll csoporthoz, $n = 11$. (D) Klaudin-5 immunfestés endothélsejteken 48 h kezelést követően. Mércé: 50 μm . (E) Intenzitás: Átlag $\pm$ SD, és festési folytonosság: medián $\pm$ kvartilisek, ANOVA és Bonferroni teszt, **** $P < 0,0001$ a kontroll csoporthoz, $n = 27-30$. (F) A vér-agy gát SLC transzportereinek génexpressziója cARLA kezelés hatására. (G) A nem célzott és a GSH célzott polipeptid NP-k vér-agy gát permeabilitása ko-kultúra modellen cARLA-kezeléssel vagy anélkül. Átlag $\pm$ SD, kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt, $n = 4$. (H) A nem célzott és GSH célzott, rodamin 6G töltetet hordozó NP-k sejtfelvétele élő agyi endothélsejtekbe konfokális mikroszkópiával vizualizálva. Narancssárga: NP töltet; kék: sejtmag. Mércé: 50 μm (Porkoláb és mtsai., 2024).

A nanorészecskék dokkolása a célzó ligandok segítségével az agyi endotélsejtek membránjához az első és egyben kulcs lépés az NP-k endocitózisának elindításában. Az SZBK Biofizikai Intézetének Biofotonika és Biomikrofluidikai Kutatócsoportjával együttműködésben egy új, innovatív optikai lézercsipesz technikát kidolgozva elsőként sikerült kimérnünk a GSH célzóligand közvetlen kötődési erősségét élő agyi endotélsejtek sejtfelszínéhez (61. ábra) (Fekete és mtsai., 2021).



61. ábra. (A) Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) kép a kísérletekhez használt mikromanipulátorról. Mércé: 1 μm . (B) SEM-kép a a mikromanipulátor érintkező felületéről. Mércé: 1 μm . (C) A kísérletekben használt minta és a mikromanipulátor igazításának sorrendje az adhézíós mérésekhez. A piros keresztek a lézernyalábbal történő csapdázási pozíciókat jelölik. Minden kép alatt, a megfelelő sematikus oldalnézeti rajz mutatja a csapdázó lézersugár és a mikromanipulátor relatív helyzetét. A sötétpiros vonal mutatja a csapda helyzetét (T), a fekete szaggatott vonal pedig a mikromanipulátor gömb középpontjának helyzetét (M) (Fekete és mtsai., 2021).

Két foton polimerizációs technikával SU-8 fotopolimerből lézertűvel irányítható mikroeszközt, úgynevezett mikromanipulátort készítettünk (61A. ábra). A mikromanipulátor sejtekhez érintkező felszínét PEG-gel, illetve PEG-GSH-val funkcionizáltuk (61B. ábra). A kísérlethez az agyi endotélsejteket egy függőleges SU-8 falon növesztettük egy Petri-csészében, és a mikromanipulátort a funkcionizált felszínével óvatosan az élő sejtek membránjához nyomtuk, majd elhúztuk (61C. ábra), ezáltal meg tudtuk mérni a manipulátor felszíne és a sejtek membránja közötti kötődési erőt (62. ábra).



62. ábra. Adhéziós erő mérések (AFM) a mikromanipulátorok PEG vagy PEG-glutation-funkcionalizált (PEG-GSH) felülete és az élő agyi endotélsejtek (RBEC) sejtfelület között (A) 50 nm-es és (B) 250 nm-es lépés mérettel mérve. Átlag $\pm$ SD. Statisztika: páros t-próba; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ a PEG-csoportokhoz képest; $n=14-18$. (C) Atomerő mikroszkópos tapadási erő mérések a PEG-GSH-funkcionalizált gömbös végű tű és az RBEC sejtek felület között. A piros körök egyedi méréseket jelölnek ($n = 247$), a kék négyzetek az átlagokat, a kék vonalak pedig az SD -t mutatják (Fekete és mtsai., 2021).

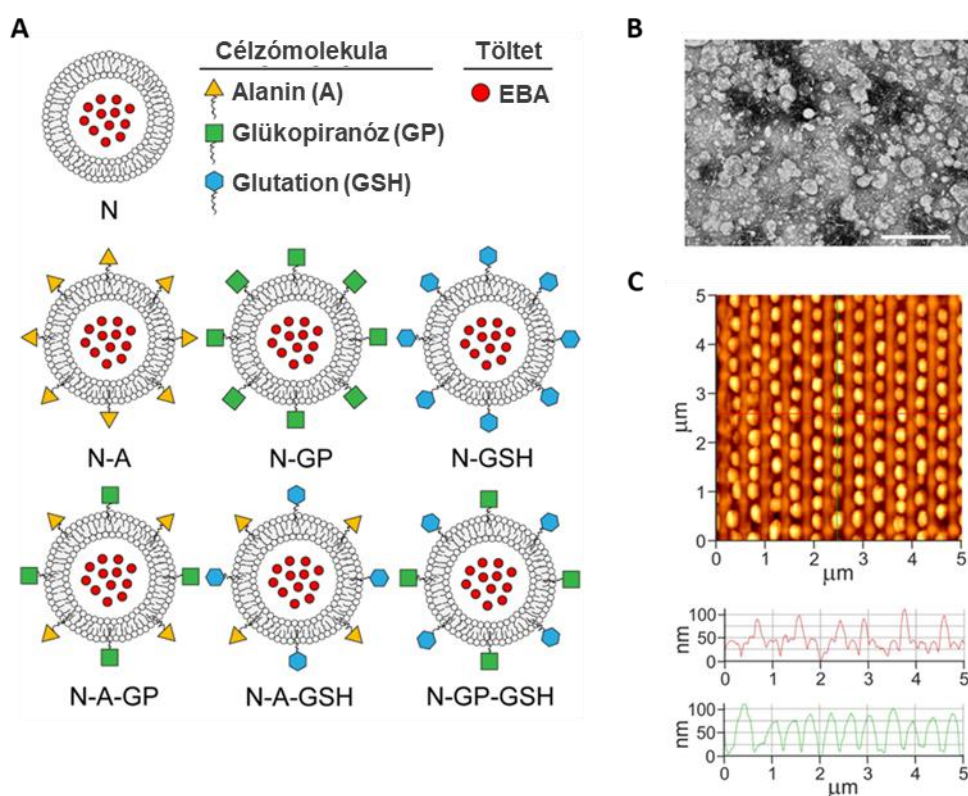
GSH jelenlétében szignifikánsan magasabb kötődési erőt mértünk az élő agyi endotélsejtek membránja és a mikromanipulátor felület között a csak PEG funkcionalizált mikroeszközökkel összehasonlítva (62A, B. ábra). Míg a PEG felület esetében 2-4 pN tartományba esett a kötődési erő a mikromanipulátor és a sejtek membránja között, addig GSH jelenlétében szignifikánsan magasabb 10-15 pN kötődési erőt mértünk (62A, B. ábra).

Az optikai lézercsipesz technikával mért kötődési erőméréseket AFM mérésekkel is megismételtük éles AFM tű helyett gömbös végű, GSH funkcionalizált tűt használva (62C. ábra). Az AFM mérések során az optikai lézercsipeszes méréseknél magasabb 38 ± 18 pN adhéziós erőt mértünk (62 C. ábra), melynek okai, hogy az AFM mérési határa 10 pN, ezért csak az e fölötti értékeket tudtuk meghatározni, illetve AFM során a tű a sejtekhez egy nagyságrenddel magasabb erővel nyomódik, mint az optikai méréseknél.

4.3.2.4. Az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalának célzása kétszeresen jelölt nanorészecskékkel (Mészáros és mtsai., 2018; Porkoláb és mtsai., 2020; Mészáros és mtsai., 2023)

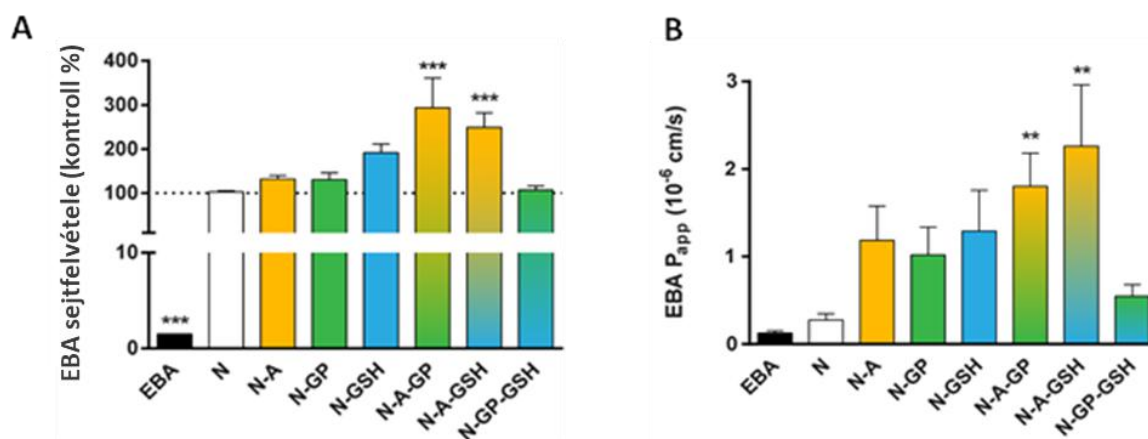
Korábbi génexpressziós vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az SLC transzporterek közül a legnagyobb mennyiségben a glükóz transzporter GLUT1 (SLC2A1) fejeződik ki a vér-agy gáton, valamint a nátrium kapcsolt SLC38A és a neutrális aminosavakat szállító transzporter SLC1A család tagjai (Veszélka és mtsai., 2018). Ezért felmerült bennünk, hogy a glükózanalógok és aminosavak hatékony és szelektív célzó ligandok lehetnek nanohordozók számára a vér-agy gáton való átjutáshoz.

Következő kísérleteink célja tehát az volt, hogy teszteljük *in vitro* és *in vivo* is a glükózt, a kis neutrális aminosav alanint és a referencia ligand GSH-t, mint önálló ligandokat, valamint ezek kombinációit is kettős ligand jelölésként NP-k felszínéhez kötve (Mészáros és mtsai., 2018). Hipotézisünk az volt, hogy a csak egy célzóligandot tartalmazó NP-khez képest a két különböző liganddal ellátott részecskék specifikusabb kötődést mutatnak majd az agyi endotélsejtek membránjához, és ezáltal hatékonyabb sejtfelvételt és vér-agy gáton való átjutást eredményeznek.



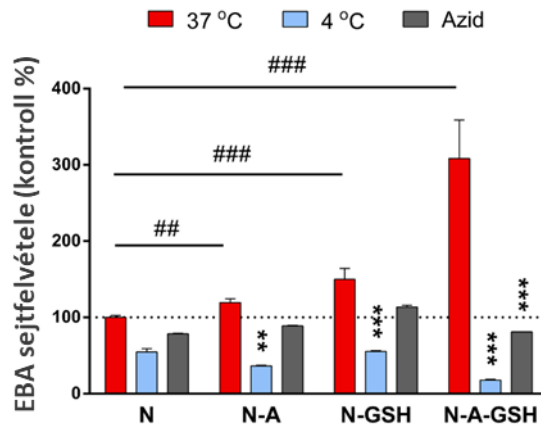
63. ábra. (A) SLC transzporter ligandokkal funkcionizált nioszómák sematikus képe. (B) A nioszómák transzmissziós elektron mikroszkópos felvétele. Mércse: 500 nm. (C) A nioszómák atomerő mikroszkópos felvétele. A: alanin; GP: glükopiranoz; GSH: glutation; EBA: Evans kék kötött szérum albumin (Mészáros és mtsai., 2018).

Kísérleteink során koleszterinből és nem-ionos felületaktív anyagokból lipid hidratációs eljárással vezikuláris nanorészecskéket, nioszómákat állítottunk elő. Az egyszeresen jelölt nioszómák felszínéhez alanint (A), glükopiranózt (GP) vagy GSH-t kötöttünk, míg a kétszeresen célzott részecskék esetében ezek kombinációit alkalmaztuk: alanin-glükopiranóz, alanin-GSH, glükopiranóz-GSH (63A. ábra). A vezikulák belsejébe töltésként fluoreszcens modell anyagot Evans kék kötött szérum albumint (EBA, 67 kDa) csomagoltunk. A részecskék átlag mérete 92-107 nm között volt, felszíni töltésük semleges, illetve a GSH-s részecskék esetében enyhén negatív (-7 mV) volt. Az EBA bezárási hatékonysága 4,6-10,4% közötti volt. Az NP-k morfológiája pedig gömb alakú volt (63B-C. ábra).



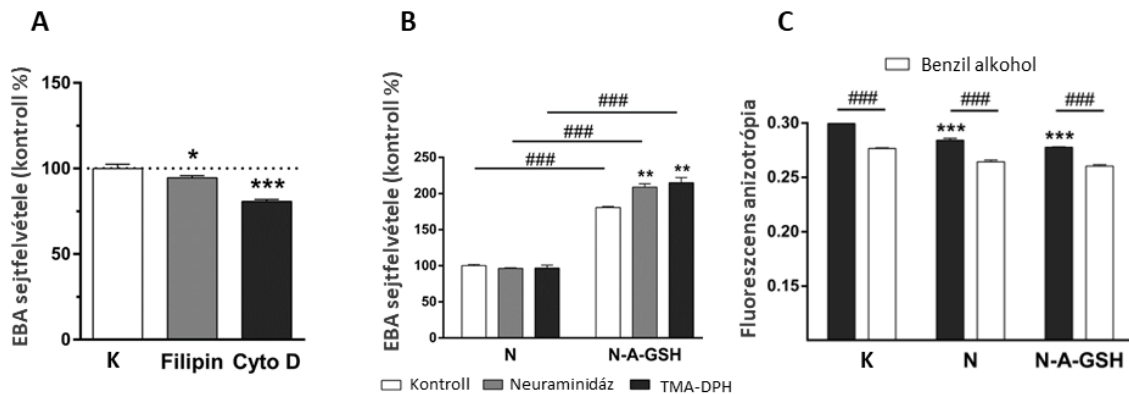
64. ábra. A nem célzott (N), az egyszeresen (N-A, N-GP, N-GSH) és a kétszeresen célzott (N-A-GP, N-A-GSH, N-GP-GSH) nioszómák (10 mg/ml) sejt felvétele (A) agyi endotélsejtekbe és vér-agy gát permeabilitása (B) 4 órás inkubációt követően. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, a nem célzott N-csoporthoz képest; $n=10$. A: alanin; GP: glükopiranóz; GSH: glutation; EBA: Evans kék kötött szérum albumin (Mészáros és mtsai., 2018).

Megvizsgáltuk az előállított nioszómák sejt felvételét patkány primer agyi endotélsejteken. A sejt felvételi vizsgálatok során a sejtekbe bejutott fluoreszcens EBA töltet mennyiségét határoztuk meg (64A. ábra). Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az egyszeresen jelölt NP-k sejt felvétele nem különbözött szignifikáns módon a nem célzott részecskék (N) töltetének felvételétől, viszont a kétszeresen célzott N-A-GP (293%) és az N-A-GSH (249%) részecskék jelentősen magasabb sejt felvételt mutattak, míg az EBA, ami nem volt nioszómába töltve szinte alig (1,5%) jutott be a sejtekbe (64A. ábra). A nioszómák *in vitro* vér-agy gát modellen való átjutásának vizsgálatakor ugyancsak az A-GP és az A-GSH kétszeresen célzott nioszóma bizonyult a leghatékonyabbnak, ezek töltete jutott át a legnagyobb mennyiségben az agyi endotélsejteken (64B. ábra). A GP-GSH ligandkombináció nem volt hatékony az EBA penetrációjának növelésében a vér-agy gáton keresztül, ezért eredményeink alapján a további *in vitro* vizsgálatokba már csak az N-A, N-GSH és N-A-GSH csoportokat vontuk be.



65. ábra. A hőmérséklet és a metabolikus inhibitor nátrium-azid (0,1%) hatása a nem célzott (N), alanin célzott (N-A), glutation célzott (N-GSH) és alanin-glutacion kettősen célzott (N-A-GSH) nioszómák EBA töltetének felvételére agyi endotélsejtekben (4 óra). Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt. $*P < 0,5$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$, az egyes csoportok első oszlopához képest, $###P < 0,001$, az N kezelt csoporthoz képest; $n=4-6$. (Mészáros és mtsai., 2018).

A sejtfelvétel hőmérsékletfüggésének vizsgálatához 4 és 37 °C-on is megkezeltek a sejteket a kiválasztott nioszómákkal (N, N-A, N-GSH, N-A-GSH; 65. ábra). A 37 °C-on az EBA töltet sejtfelvétele szignifikánsan nagyobb volt minden célzott nanorészecske csoportban (N-A: 119%, N-GSH: 150%, N-A-GSH: 308%) a nem célzott nioszómákhoz képest (N: 100%). Alacsony hőmérsékleten, 4 °C-on a célzott nioszómák esetében szignifikáns módon lecsökkent a sejtfelvétel (N-A: 36%, N-GSH: 55%, N-A-GSH: 17%) a 37 °C-on mérthez képest, míg a nem célzott csoport esetében a csökkenés nem volt szignifikáns. A sejtek metabolikus inhibitor nátrium-aziddal történő kezelése szintén gátolta a sejtfelvételt (N-A: 88%, N-GSH: 113%, N-A-GSH: 81%) (65. ábra).



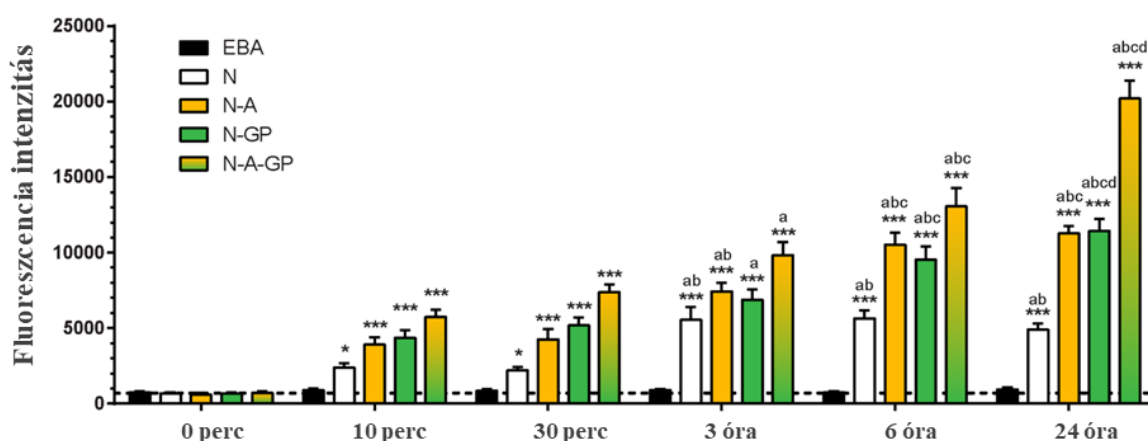
66. ábra. (A) Az endocitózist gátló filipin (6 μ M) és citokalazin D (20 μ M) hatása az alanin-glutacion célzott nioszóma (N-A-GSH) EBA töltetének sejtfelvételére agyi endotélsejtekben (4 óra). Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt. $*P < 0,5$; $***P < 0,001$, a kontroll csoporthoz képest; $n=6$. (B) Neuraminidáz (1 U/ml) és a TMA-DPH (30 mM) hatása az EBA sejtfelvételére nem célzott (N) és N-A-GSH célzott nioszóma kezelést követően. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt, $**P < 0,01$ az kontrollhoz képest; $###P < 0,001$, az N csoportokhoz képest; $n=6$. (C) A nem célzott N, a kettős célzott N-A-GSH nioszóma és a benzil-alkohol (30 mM) kezelés hatása élő agyi endotélsejtek plazmamembrán fluiditására fluoreszcens anizotrópiával mérve. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt, $***P < 0,001$, minden csoportot a kezeletlen kontrollhoz (C) hasonlítottunk; $###P < 0,001$, az egyes csoportok első oszlopához képest; $n=3$. (Mészáros és mtsai., 2018).

Azért, hogy kiderítsük az N-A-GSH nioszómák sejtfelvétele endocitózissal történik-e, gátlószerek segítségével is megismételtük a sejtfelvételi vizsgálatokat (66A. ábra). A filipin, amely gátolja a lipid raft/kaveolák által közvetített endocitózist, kismértékben, de statisztikailag szignifikáns módon csökkentette az EBA töltet sejtfelvételét az agyi endotélsejtekben. A citokalazin-D, mely az F-aktin depolimerizáció révén gátolja az endocitotikus folyamatokat, részlegesen, de szintén szignifikáns módon gátolta az EBA felvételét (66A. ábra).

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az agyi endotélsejtek felszíni negatív töltésű glikokalixa milyen hatással van a nanorészecskék sejtfelvételére. Ezért módosítottuk a tenyésztett sejtek felületi töltését a glikokalix neuraminidáz enzimmel történő emésztésével és egy kationos lipid, TMA-DPH kezeléssel (66B. ábra). A sejtek felületi töltésváltozásai nem befolyásolták az EBA töltet felvételét a nem célzott NP-kkel történő kezelési csoportokban, ezzel szemben mindkét töltésmódosítás jelentősen megnövelte az EBA felvételét az agyi endotélsejtekben az N-A-GSH kezelési csoportokban (66B. ábra).

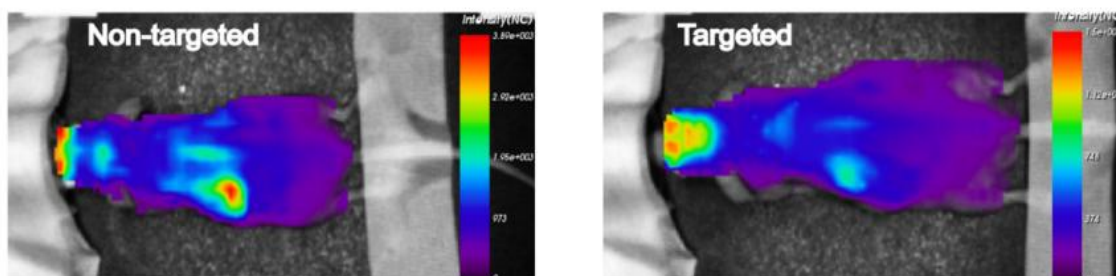
A nioszómák nem-ionos felületaktív anyagokból épülnek fel, melyek korábbi eredményeink alapján befolyásolhatják a membránfolyamatokat a membránfluiditás megváltoztatásával (Kiss és mtsai., 2014), ezért fluoreszcens anizotrópia mérésekkel megvizsgáltuk a nioszóma kezelések hatását a membránfluiditásra (66C. ábra). Az agyi endotélsejtek membránfluiditása a kezeletlen kontroll (C) sejtekhez képest az N és még kifejezettebben az N-A-GSH kezelési csoportokban szignifikáns mértékben csökkent (66C. ábra), ami a sejtmembrán fluiditásának növekedésére és membránfúziós folyamatokra utal az agyi endotélsejtek membránja és a nioszómák között. A pozitív kontroll membránfluidizáló benzil-alkohol (30 mM) gyorsan és nagymértékben csökkentette a fluoreszcencia anizotrópiát 3 perc után a kontroll és a nioszómával kezelt csoportokban egyaránt (66C. ábra).

A nioszómák fluoreszcens EBA töltetének agyi penetrációját *in vivo* is megvizsgáltuk élő szőrtelen egerekben optikai képalkotó módszerrel (67, 68. ábra).



67. ábra. Az EBA fluoreszcens intenzitása az egerek agyi régiójában a szabad EBA, a nem célzott (N), az egyszerűen (N-A, N-GP) és a kettősen célzott (N-A-GP) nioszómák beadása után, kisállat optikai képalkotó módszerrel (eXplore Optix) mérve. Átlag $\pm$ SD. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt. * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, az EBA kezelt csoporthoz képest az egyes időpontokon belül; a: a 10 perces, b: a 30 perces, c: a 3 órás, d: a 6 órás időpontokhoz képest az egyes csoportokon belül; $n=3-4$ (Mészáros és mtsai., 2018).

A szabad EBA-t és a kettősen célzott N-A-GP és a nem célzott nioszómákat intravénásan adtuk be az állatoknak és adott időpontokban regisztráltuk az agy területén mérhető fluoreszcencia intenzitást. Nem volt jelentős fluoreszcens jelfelhalmozódás az agy területén a szabad EBA esetében egyik vizsgált időpontban sem (67. ábra).

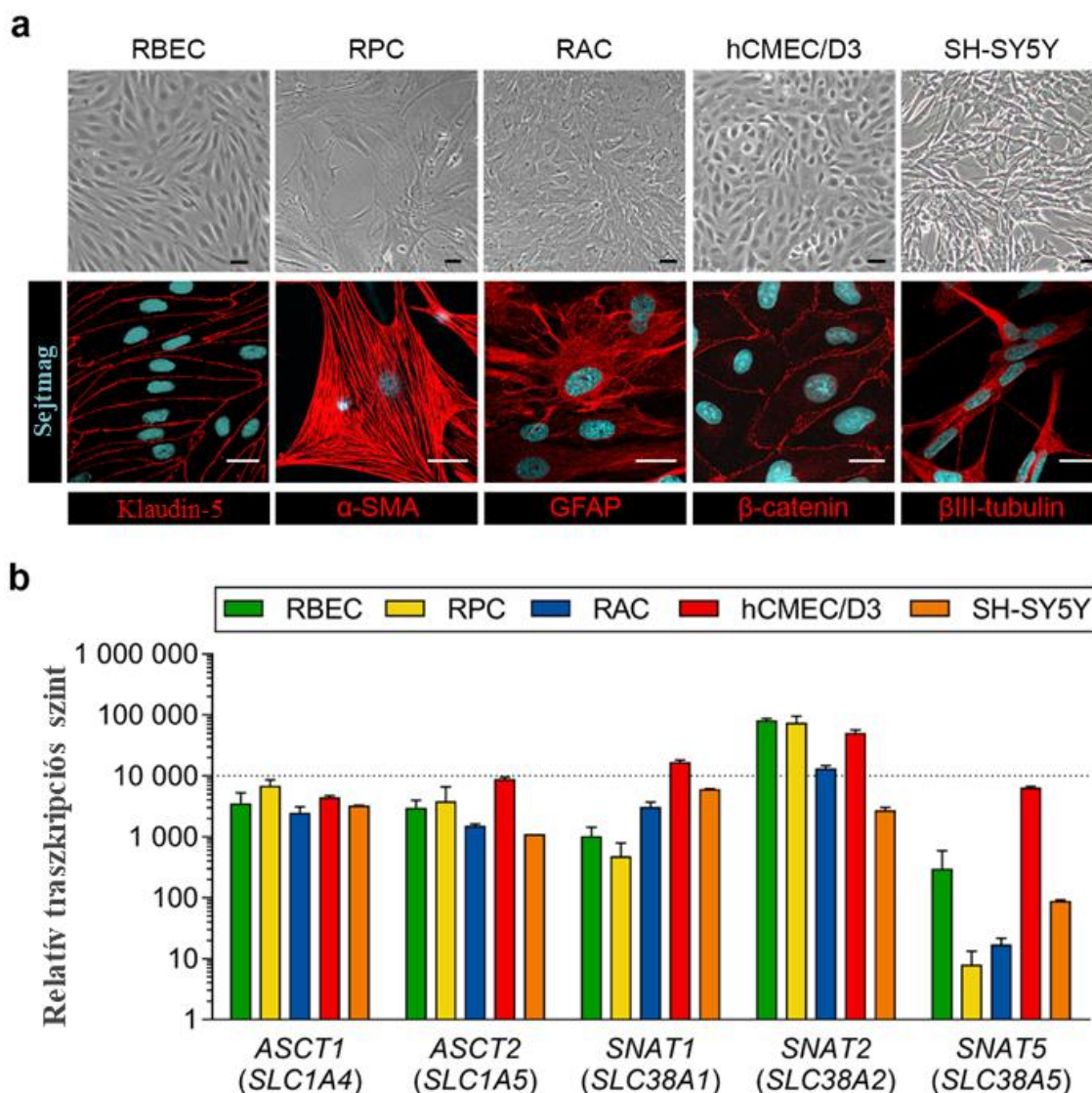


68. ábra. Optikai képalkotó módszerrel (eXplore Optix) készült felvételek a fluoreszcens EBA-val töltött nem célzott (non-targeted), és a kettősen célzott (targeted), N-A-GP 24 órás nanorészecske kezelést kapott egerekről.

Az nem célzott nioszómákkal (N) kezelt állatok esetében fokozott fluoreszcencia intenzitást láttunk az agy, illetve a máj területén (68. ábra), mely fluoreszcens jel tovább növekedett az egyszeresen célzott (N-A, N-GP) NP kezelt csoportokban. Az EBA töltet bejutásából származó fluoreszcens jel az agy területén a kettős ligandummal célzott N-A-GP csoportban volt a legmagasabb az összes csoporthoz képest minden időpontban (67. ábra). A legnagyobb különbség a kettősen célzott, N-A-GP csoportok és a nem célzott, valamint az egyszeresen célzott NP kezelt csoportok között 24 órás kezelés után volt látható az N-A-GP kezelt csoport javára (67. ábra).

Az agyi endotél sejtenyészetekben végzett kísérleteinkben az eddigi legjobb SLC célzó molekula kombinációnak az alanin-glutation páros bizonyult (Mészáros és mtsai., 2018). A további kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy vajon ezek a kettősen célzott nanorészecskék képesek-e az agyi endotélsejtek rétegén átjutva a neurovaszkuláris egység többi sejtípusába is bejutni a pericitákba, az asztrogliaákba, illetve a központi idegrendszeri gyógyszerhatóanyagok célsejtjeibe a neuronokba (Porkoláb és mtsai., 2020).

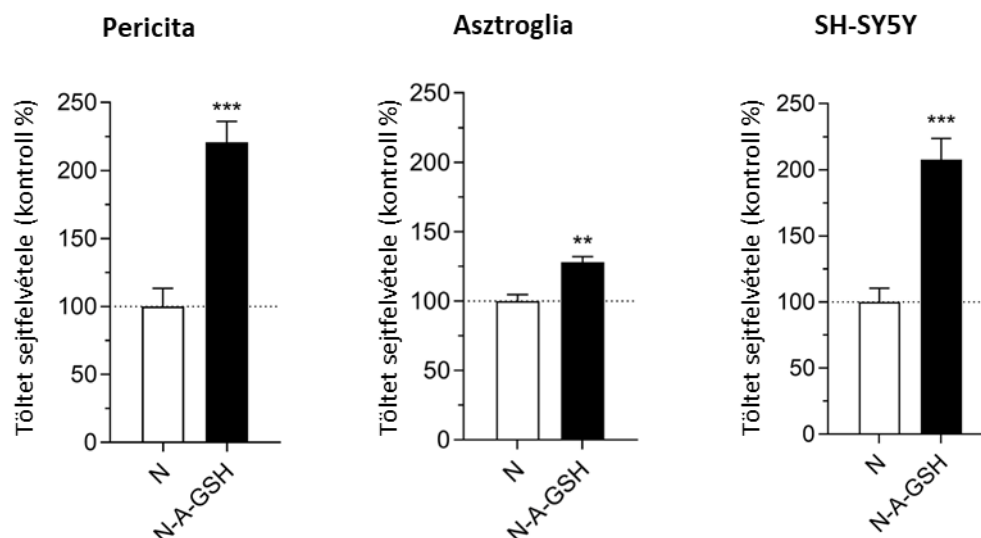
A vizsgálatban használt primer patkány agyi endotélsejtek, periciták, asztrociták, hCMEC/D3 humán agyi endotélsejtek és differenciált SH-SY5Y humán neuron sejtenyészetek eltérő morfológiáját fázis-kontraszt mikroszkópiás és immuncitokémiai festési képeken a 69.A ábra mutatja be.



69. ábra. (A) Fáziskontraszt mikroszkópos képek és immunfestések tenyésztett primer patkány agyi endotélsejtekről (RBEC), primer patkány pericitákról (RPC), primer patkány asztrocitákról (RAC), humán agyi endotélsejtekről (hCMEC/D3) és humán neuronokról (SH-SY5Y). α -SMA: α -simaizomaktin; GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje. Mércse: 25 μ m. (B) Az alanin transzportereket kódoló gének expressziója a különböző sejtípusokban. A bemutatott értékek átlagok $\pm$ SEM (Porkoláb és mtsai., 2020).

Ezekben a tenyészetekben igazoltuk öt olyan gén expresszióját, amelyek az alanin aminosavat szállító SLC transzportereket kódolják (69B. ábra). Az alanin transzporter gének közül a kis semleges aminosav transzporter SNAT2 (SLC38A2) minden sejtípusban, magasan expresszáldott, kivéve az SH-SY5Y neuronokban. A semleges aminosav transzporter gének az ASCT1 (SLC1A4) és ASCT2 (SLC1A5), valamint a SNAT1 (SLC38A1) mérsékelt szinten fejeződtek ki, míg az SNAT5 (SLC38A5) expressziója alacsony vagy mérsékelt volt minden vizsgált sejtípusban (69B. ábra).

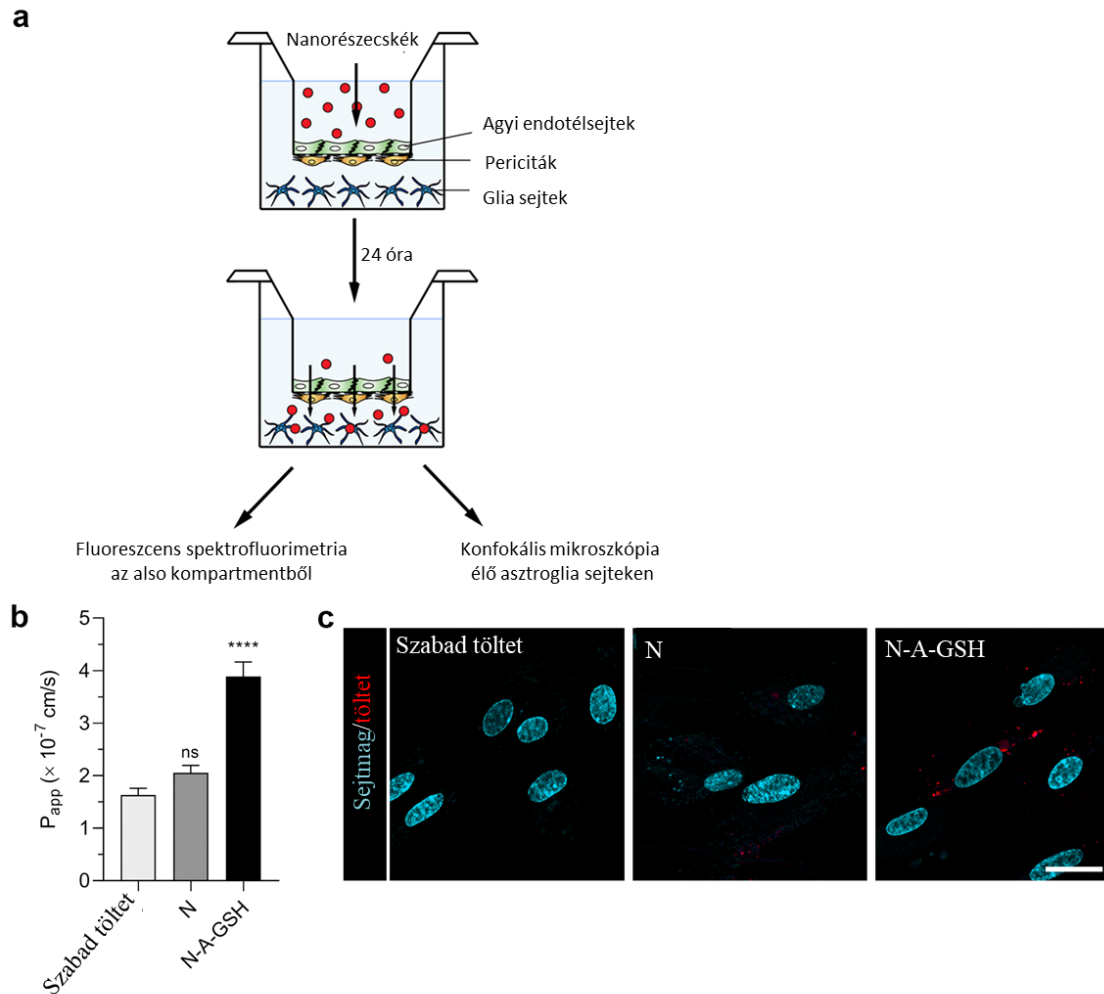
Ezt követően megvizsgáltuk, az alanin-glutation kettősen célzott nanorészecskék sejtfelvételét a periciták, asztroglia és neuronok esetében is (70. ábra). Mindhárom sejtípus esetében megállapítottuk, hogy szignifikánsan több volt a célzott nanorészecskék fluoreszcens töltetének (EBA) a bejutása a sejtekbe, mint a nem célzott NP-ké. A periciták és a neuronok esetében ez az különbség több mint kétszeres volt (70. ábra).



70. ábra. A nem célzott (N, 10 mg/mL) és az alanin-glutation kettősen célzott nioszómák (N-A-GSH, 10 mg/mL) töltetének sejtfelvételi vizsgálata tenyésztett primer patkány agyi pericitákban, primer patkány asztrogliaiban és differenciáltatott neuronokban (SH-SY5Y) 4 órás kezelést követően. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: t-próba; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; $n = 4-6$ (módosított ábra, Porkoláb és mtsai., 2020).

Munkánk során azt is megvizsgáltuk, hogy az N-A-GSH nioszómák képesek-e a fluoreszcens töltetüket, ami ebben az esetben mCherry volt az asztroglia sejtekbe juttatni, miután átjutottak a vér-agy gát sejttenyészetes modelljén (71. A. ábra). Az mCherry N-A-GSH nioszómákba csomagolása körülbelül 2-szeresére emelte a vér-agy gáton keresztüli penetrációját a szabad mCherry-hez és a nem célzott nanorészecskékkel kezelt (N) csoportokhoz képest (71. B. ábra). A 24 órás kezelési idő elteltével az N-A-GSH csoportban a fluoreszcens mCherry töltet élő asztroglia sejtekben is tudtuk vizualizálni (71C. ábra). Ez azt jelzi, hogy az mCherry töltet hordozó, alaninnal és glutationnal kettős célzott nioszómák nemcsak átjutottak a vér-agy gáton, hanem ezt követően az asztroglia is képesek voltak felvenni őket.

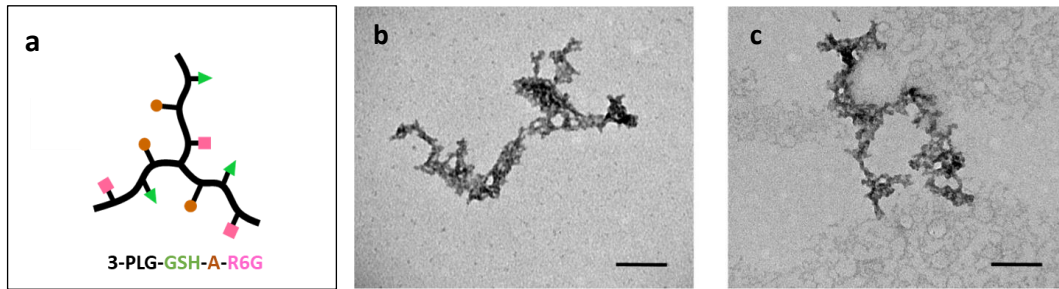
Érdekes módon az N-A-GSH és az N csoport között a sejtfelvételben jelentősebb különbség volt megfigyelhető az asztrocitákban a permeabilitási kísérlet után (71. ábra), mint az asztrocita sejtfelvételi kísérlet után (70. ábra). Ennek magyarázata az lehet, hogy a permeabilitási kísérletben először az agyi endotélsejtek érintkeznek a nioszómákkal, melyek jóval hatékonyabb és nagyobb mennyiségű sejtfelvételre képesek, majd ez jut tovább először a periciták rétegébe majd végül az asztroglia sejtekbe.



71. ábra. (A) A vér-agy gát ko-kultúra modelljének sématis rajza és a kísérlet munkafolyamata. (B) Az mCherry vér-agy gát permeabilitása. P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható; szabad töltet: mCherry; N: nem célzott nioszómába töltött mCherry; N-A-GSH: alanin-glutation kettős célzott nioszómába töltött mCherry. Átlag $\pm$ SEM. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt; **** $P < 0,0001$, ns: nem szignifikáns ($p > 0,05$) a szabad töltet csoporthoz képest; $n = 3-8$. (C) Élő asztrociták által felvett mCherry töltet (piros) vizualizációja a vér-agy gát modellen való áthaladás után. Mércé: 25 μm (Porkoláb és mtsai., 2020).

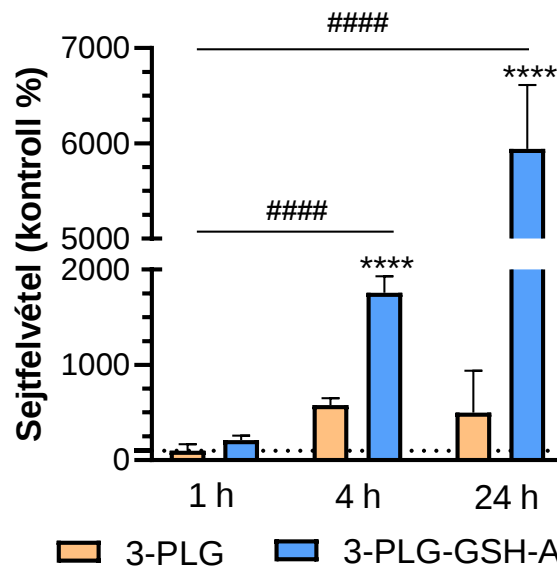
Annak igazolására, hogy az SLC ligandok közül az általunk legjobbnak talált alanin és glutation vér-agy gátat célzó kettős molekulakombináció a nanorészecskék anyagától függetlenül, nemcsak vezikuláris, hanem más típusú, például polipeptid nanohordozók esetében is hatékony célzóligand kombináció lehet további vizsgálatokat végeztünk (Mészáros és mtsai., 2023).

Tajvani együttműködő partnereink segítségével elágazó, háromkarú, fluoreszcens rodaminnal jelölt poliglutaminsav nanorészecskéket terveztünk és állítottunk elő, melyekhez alanint és glutationt kötöttünk célzó molekulaként (Mészáros és mtsai., 2023). A nanorészecskék elágazó, többkarú formája jól megfigyelhető volt a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken (72. ábra).



72. ábra. (A) A glutationnal (GSH) és alaninnal (A) célzott, rodamminnal jelölt (R6G) háromkarú polipeptid nanorészecske (3-PLG) sematikus rajza. A nem célzott NP-k (B) és a célzott NP-k (C) transzmissziós elektronmikroszkópos képe. Mércé: 100 nm (Mészáros és mtsai., 2023).

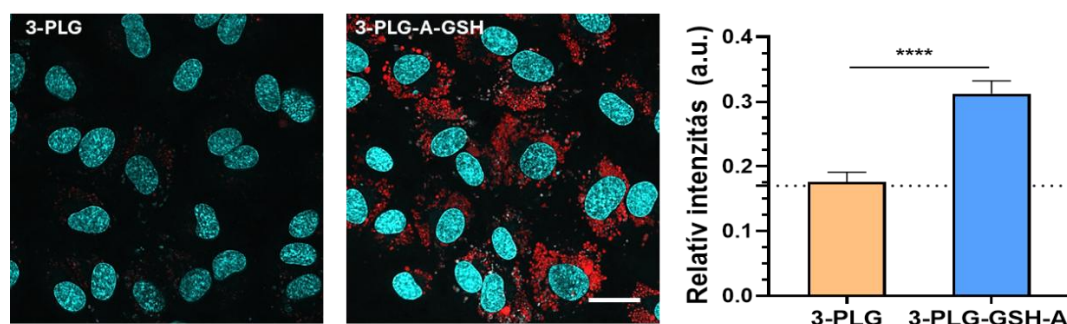
Megvizsgáltuk a nem célzott és az alaninnal és glutationnal kettősen célzott polipeptid nanorészecskék sejtfelvételét humán, köldökszinórvér őssejtekből differenciáltatott agyi endotélsejtek tenyészetén. A 3-PLG és a 3-PLG-A-GSH nanorészecskék sejtbe jutását 1, 4 és 24 órás kezelést követően vizsgáltuk meg (73. ábra). A 3-PLG-A-GSH sejtekbe jutása időfüggő módon nőtt, és 4 óra elteltével jelentős, 8-szoros emelkedést mutatott az 1 órás csoporthoz képest, és 3-szor nagyobb volt, mint a nem célzott 3-PLG csoporté a 4 órás időpontban (73. ábra). A kettősen célzott 3-PLG-A-GSH nanorészecskék sejtfelvétele további 3-szoros növekedést mutatott 24 óra elteltével a 4 órás időponthoz képest (73. ábra).



73. ábra. A nem célzott (3-PLG) és az alanin-glutathion célzott polipeptid nanohordozók (3-PLG-A-GSH) sejtes felvétele tenyésztett humán agyi endotélsejtekben 1, 4 és 24 óra inkubáció után (100 µg/ml; 37 °C). Átlag ± SD, százalékban kifejezve az 1 órás csoporthoz viszonyítva. Statisztika: kétutas ANOVA; **** $P < 0,0001$ a 3-PLG csoporthoz hasonlítva minden időpontban; ##### $P < 0,0001$ az 1 órás 3-PLG-A-GSH csoporthoz viszonyítva; $n = 6$ (Mészáros és mtsai., 2023).

A sejtfelvételi kísérletek eredményeivel összhangban a 3-PLG-A-GSH nanorészecskék magas szintű internalizációját humán agyi endotélsejtekben konfokális mikroszkóppal is igazoltuk (74. ábra). A nem célzott 3-PLG-vel történő 24 órás inkubációt követően a sejtek citoplazmájában alacsony vörös fluoreszcencia jelet lehetett kimutatni (74. ábra), szemben a kettősen célzott 3-PLG-A-GSH kezeléseket követően, ahol intenzív jelet kaptunk (74. ábra). A képek fluoreszcencia intenzitás analízise is igazolta, hogy a kettősen

célzott nanohordozók sejtbe jutása jelentősen nagyobb volt (1,7-szeres), mint a nem célzott 3-PLG részecskék sejtfelvétele (74. ábra).



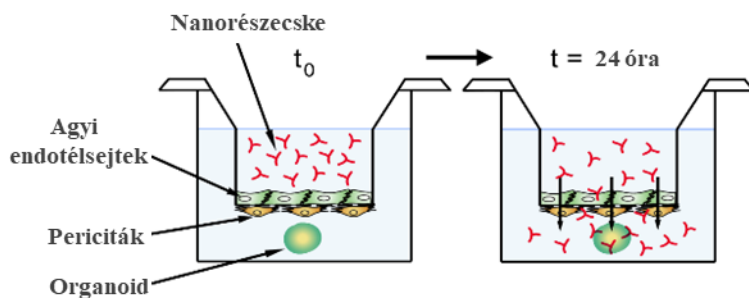
74. ábra. Konfokális mikroszkópos felvételek, a nem célzott (3-PLG) és az alanin-glutation célzott (3-PLG-A-GSH) rodamin 6G-vel (piros) jelölt nanohordozók sejtfelvételéről élő agyi endothelisejtekbe (100 g/ml; 24 órás inkubáció). Kék: sejtmag. Mércse: 20 μ m. Fluoreszcencia intenzitások kiértékelése 24 órás NP kezelést követően. Átlag $\pm$ SD. Statisztika: t-próba, **** $P < 0,0001$, a 3-PLG csoporthoz képest; $n = 4$ (Mészáros és mtsai., 2023).

A nanorészecskék sejtfelvételének tanulmányozását követően, megvizsgáltuk, hogy képesek-e átjutni a vér-agy gáton és ezt követően be tudnak-e jutni az agyi organoidokba (75. ábra). Ennek meghatározásához egy módosított ko-kultúra vér-agy gát modellt használtunk (75. A. ábra). Az egészséges (kontroll) vagy Parkinson-kóros (PD) betegek sejtjeiből származó közepagy-specifikus organoidokat a sejtenyésztő lemezek alá, a tenyésztőbetétek alá helyeztük (75. A. ábra).

A vér-agy gát modell szorosságának ellenőrzésére permeabilitási markermolekulákat használtunk, a transzcelluláris marker Evans kék-albumint (EBA, 67 kDa; P_{app} : $0,04 \times 10^{-6}$ cm/s) és a paracelluláris marker nátrium-fluoreszceint (SF, 376 Da; P_{app} : $2,22 \times 10^{-6}$ cm/s). Mindkét marker penetrációjára (P_{app}) megfelelően alacsony értékeket mértünk, mely igazolja, hogy a vér-agy gát modellünk szorossága alkalmas volt nanorészecskék permeabilitási vizsgálatához (75. B. ábra).

A nem célzott nanorészecskék P_{app} permeabilitási értékei ugyanabban a tartományban voltak, és nem különböztek jelentősen akár kontroll akár PD organoidok voltak jelen (75. B. ábra). A kettős célzott nanohordozók esetében mindkét csoportban szignifikánsan magasabb permeabilitást mértünk a nem célzott részecskékhez képest (75. B. ábra), és szignifikánsan több 3-PLG-A-GSH jutott át a vér-agy gáton a PD organoid jelenlétében (75. B. ábra). A permeabilitási vizsgálatok eredményeivel összhangban a vér-agy gát modellen átjutott célzott nanohordozók felvétele szignifikánsan magasabb volt mind a kontroll (150,49 ng/ μ g fehérje), mind a PD (87,01 ng/ μ g fehérje) organoidokban, mint a nem célzott nanohordozóké a kontrollban (41,14 ng/ μ g fehérje) vagy a PD organoidokban (30,31 ng/ μ g fehérje) (75. B. ábra).

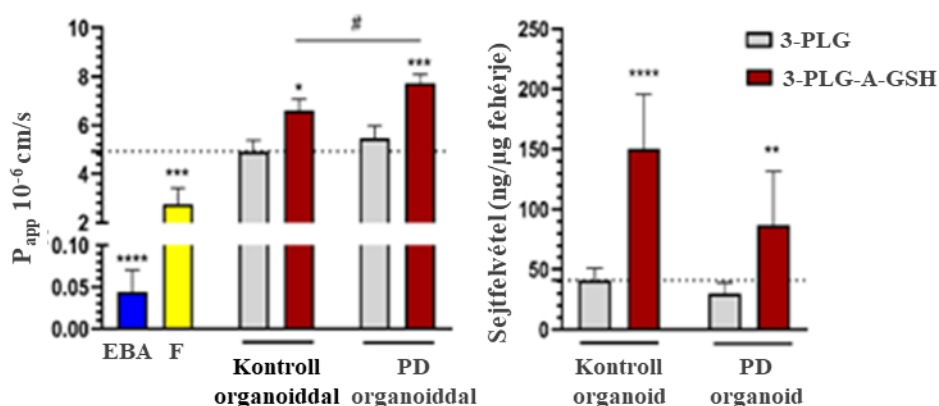
A



B

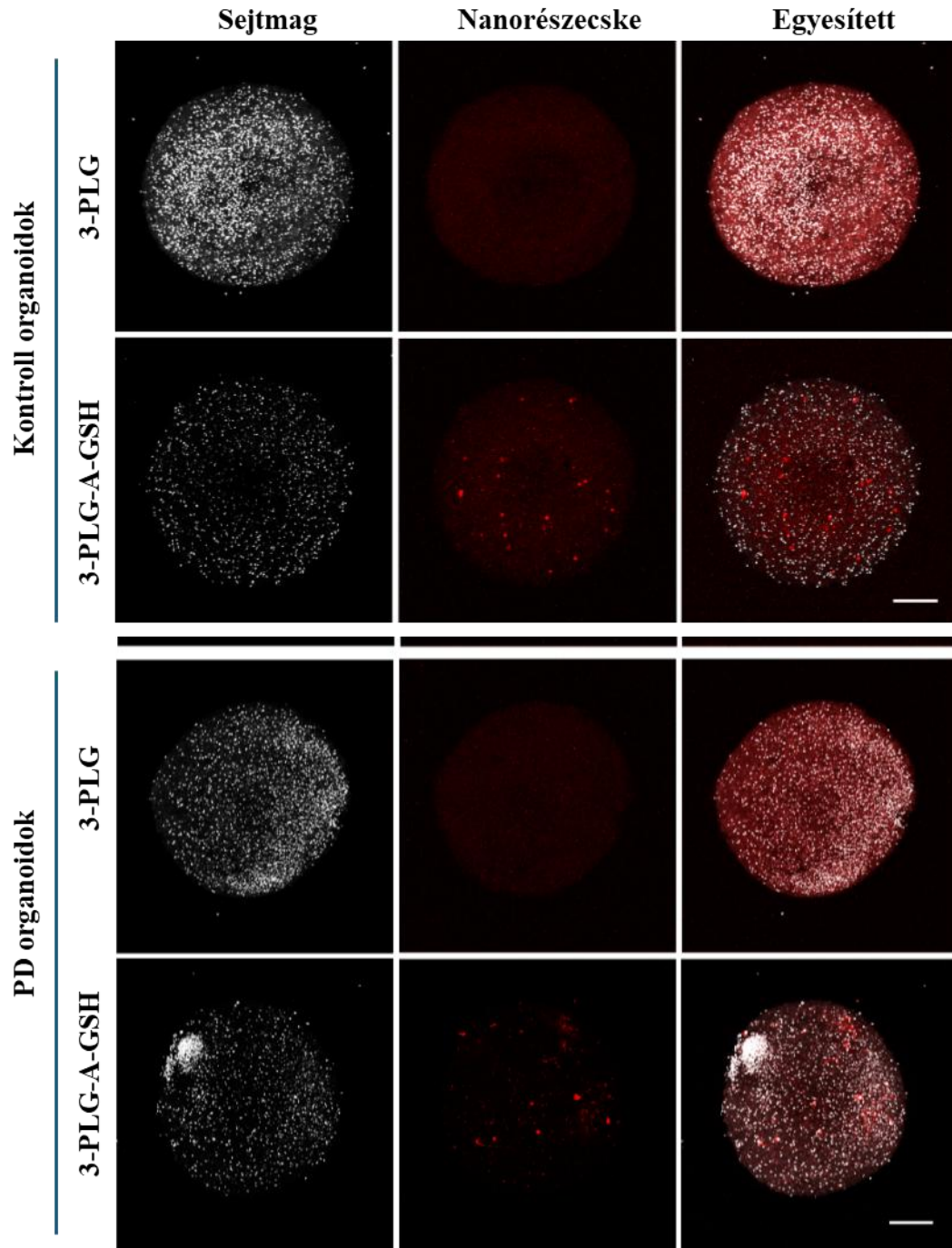
Permeabilitás

Sejtfelvétel organoidokba



75. ábra. A nem célzott (3-PLG) és az alanin-glutation célzott (3-PLG-A-GSH) nanohordozók vér-agy gát permeabilitása és közepagy organoidokba való bejutása (24 óra, 100 g/ml, 37 C). (A) Kísérleti elrendezés sematikus rajza. (B) Evans-kék-albumin (EBA) és nátrium-fluoreszcein (SF) markermolekulák permeabilitása vér-agy gát modellen. A 3-PLG és a 3-PLG-A-GSH nanorészecskék vér-agy gát permeabilitása kontroll és Parkinson-kóros betegekből származó sejtekből előállított közepagy organoidok jelenlétében. (C) A 3-PLG és a 3-PLG-A-GSH sejtes felvétele az organoidokba miután a vér-agy gáton átjutottak. Átlag ± SD, n = 6. Statisztika: kétutas ANOVA, Dunnett-posztteszt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ a 3-PLG csoporthoz viszonyítva; # $P < 0,05$ a 3-PLG-A-GSH csoportok összehasonlítása a kontroll és a PD organoidok jelenlétében. Az EBA és az fluoreszcein (F) permeabilitása a 3-PLG kontroll organoidos csoporthoz hasonlítva (*** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; one-way ANOVA, Dunnett posztteszt). P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható (Mészáros és mtsai., 2023).

A polimer nanohordozók közepagy organoidokba való bejutását a vér-agy gáton való áthaladás után konfokális mikroszkóppal is szemléltettük (76. ábra). A 75. B. ábrán bemutatott adatokkal összhangban, a képeken a kettős célzott 3-PLG-A-GSH kezeléseket követően intenzívebb vörös fluoreszcens jel látható mind a kontroll mind pedig a PD organoidok esetében a nem célzott 3-PLG csoportokhoz képest (76. ábra).

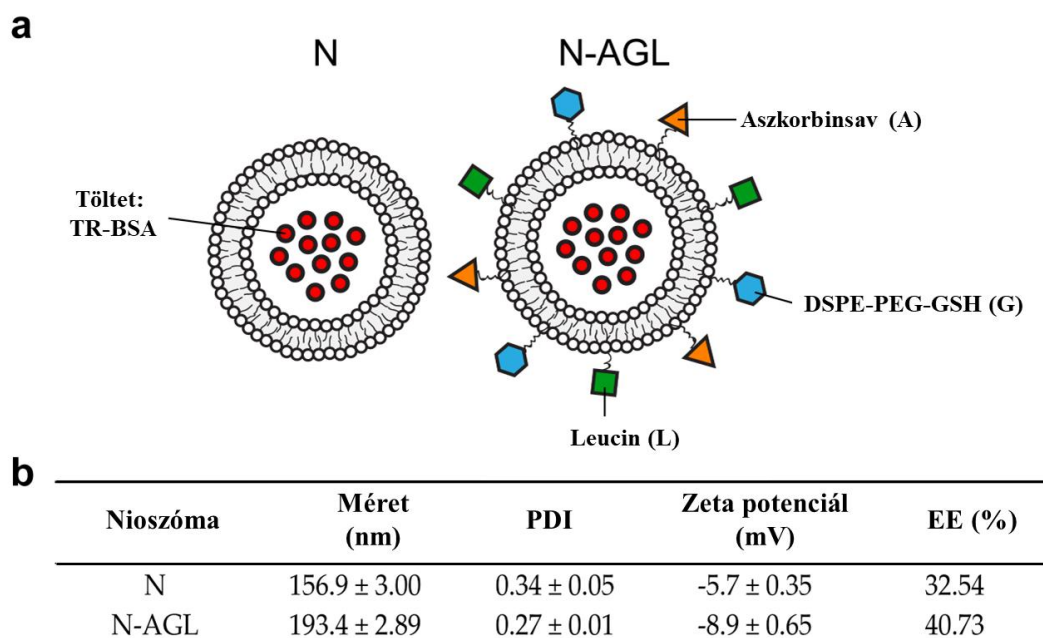


76. ábra. Reprezentatív konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételek, amelyek a nem célzott (3-PLG) és az alanin-glutation célzott (3-PLG-A-GSH) polimer nanohordozók felvételét mutatják egészséges (kontroll) betegekből és Parkinson-kóros (PD) betegek sejteiből származó közepagyi organoidokba a vér-agy gáton való áthaladás után (24 óra, 37 °C). Fehér: sejtmagok; Piros: nanorészecskék. Mércé: 200 μ m (Mészáros és mtsai., 2023).

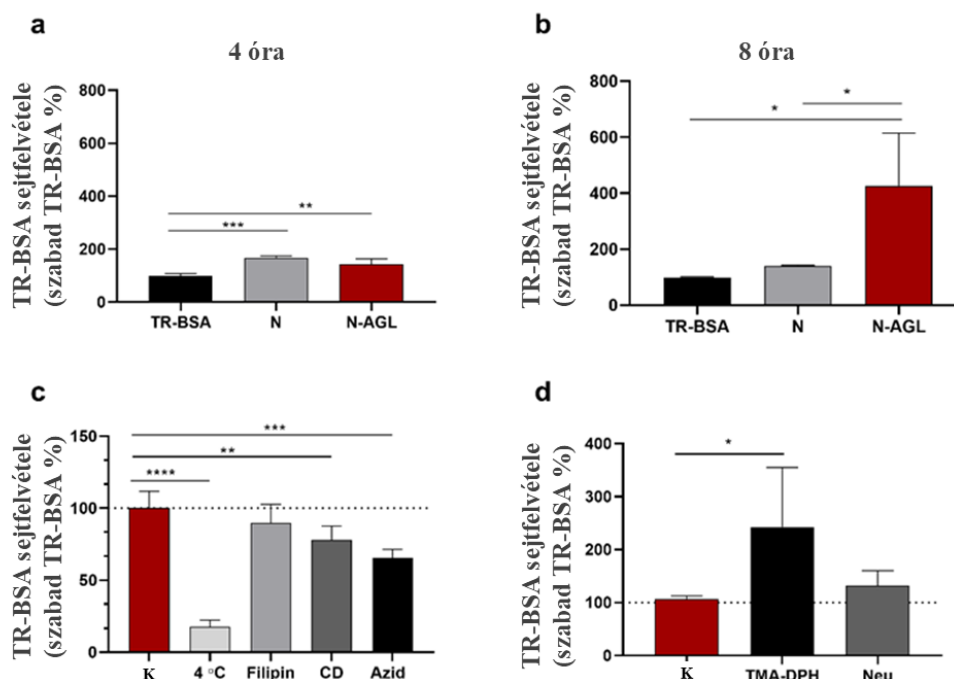
4.3.2.5. Az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalának célzása háromszorosan jelölt nanorészecskékkel (Veszelka és mtsai., 2022)

Az előző fejezetekben leírt eredményeink alapján feltételezzük, hogy a különböző SLC célzó molekulák megfelelő kombinációja a nanorészecskék jobb dokkolását eredményezi az agyi endotélsejtek felszínéhez, ami elősegíti a nanohordozók és töltetük sejtfelvételét és vér-agy gáton való átjutását, mely fokozott agyi bejutást eredményezhet. Kísérleteinkben ezért a kettős ligandok után újabb, hármas célzóligand kombinációval ellátott nioszómákat terveztünk. Az NP-k felszínére az alanin helyett most leucint kötöttünk, mert a leucin transzportere a LAT1 nagyobb mértékben expresszálódik az agyi endotélsejtekben, mint az alanin transzporterei. Ezen kívül a leucin mellé a nátrium-aszkorbát kotranszporter (SVCT2/SLC23A2) ligandját, a C-vitamint választottuk, melyet oxidált formájában a GLUT1 transzporter is szállít. A kombináció harmadik tagjaként pedig a már jól bevált glutationt választottuk. A nanorészecskék töltetének az EBA-nál erősebb fluoreszcenciát mutató Texas-vörössel jelölt BSA-t (TR-BSA) használtuk (77. ábra). Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az ily módon hármas ligand kombinációval célzott nioszómák primer agyi endotélsejtekbe történő sejtfelvételét, vér-agy gáton való átjutását és agyi organoidokba bejutását (Veszelka és mtsai., 2022).

Az előállított nioszómák 150-200 nm közötti méretűek és enyhén negatív felületi töltésűek voltak (77. ábra). A sejtfelvételi vizsgálatokban az nem célzott (N) és az aszkorbinsav-glutation-leucin célzott (N-AGL) nioszómák TR-BSA töltete 4 órás kezelést követően szignifikánsan megnövekedett a szabad TR-BSA-hoz képest (78. A ábra). 8 óra elteltével a TR-BSA felvétel az N-AGL csoportban jelentősen megemelkedett (N-AGL: 426%): több mint négyszeres különbséget mutatott a csak TR-BSA-val kezelt csoporthoz képest, és háromszoros növekedést a nem célzott NP csoporthoz képest (N: 140%, 78. B. ábra).

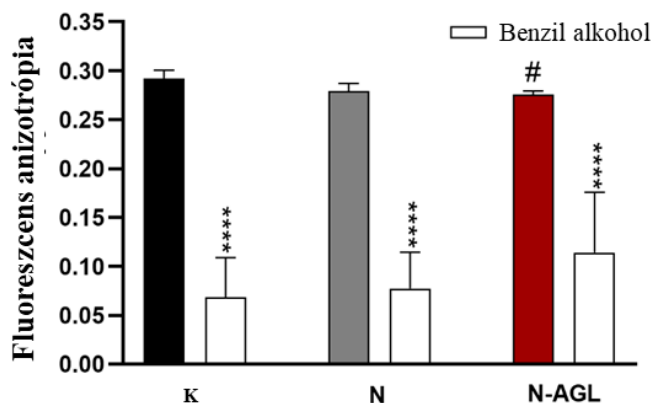


77. ábra. (A) A nem célzott (N) és az aszkorbinsav-glutation-leucin célzott (N-AGL) nanorészecskék sematikus rajza. TR-BSA: texas - vörössel jelölt szérumban albumin. (B) A nanorészecskék főbb fizikai-kémiai tulajdonságai. EE: bezárási hatékonyság; PDI: polidiszperzitási index. Átlag ± SD (Veszelka és mtsai., 2022).



78. ábra. Texas vörössel jelölt albumin (TR-BSA), valamint nem célzott (N) és aszkorbinsav-glutation-leucin célzott (N-AGL) nanorészecske sejtfelvétele primer patkány agyi endotélsejtekben a) 4 órás és b) 8 órás NP kezelés után. Átlag $\pm$ SD, mindkét időpontban a TR-BSA csoport százalékában megadva. Statisztika: t-próba; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ a TR-BSA csoporthoz viszonyítva; $n = 6$. (C) A hőmérséklet, az endocitikus inhibitorok filipin (5 g/mL) és citokalazin D (CD; 0,125 g/mL) illetve a metabolikus inhibitor nátrium-azid (1 mg/mL) kezelés hatása a TR-BSA-val töltött N-AGL NP-k sejtfelvételére (4 óra, 37 °C). Átlag $\pm$ SD, a kontroll csoport (C; 37 °C-on, kezelés nélküli) százalékában megadva. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ a kontroll csoporthoz képest; $n = 6$. (D) A neuraminidáz (Neu, 1 U/mL) és a TMA-DPH (30 mM) hatása a TR-BSA-val töltött N-AGL NP-k sejtfelvételére. Átlag $\pm$ SD, a kontroll csoport százalékában megadva. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt; * $P < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest; $n = 6$ (Veszelka és mtsai., 2022).

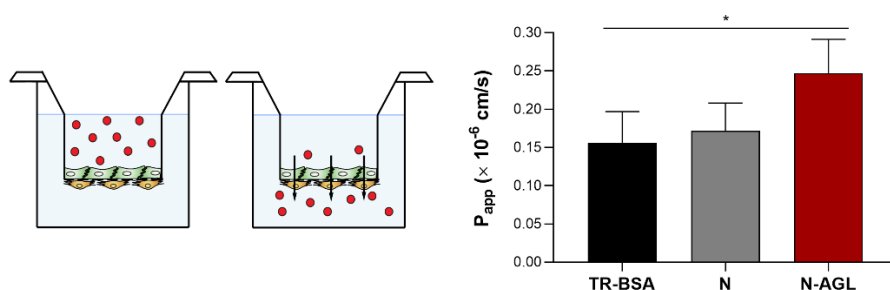
Az nioszómák sejtfelvételének mechanizmusát kutatva, hogy aktív vagy passzív folyamatról van-e szó a sejteket 37 °C-on és 4 °C-on is kezeltük a célzott nanorészecskével (78. C ábra). A 37 °C-on kezelt kontroll csoporthoz képest a 4 °C-os N-AGL kezelés 18%-ra csökkentette a sejtfelvételt (78. C ábra). Annak vizsgálatára, hogy endocitózissal történik-e az NP-k sejtfelvétele a gátlószer filipinnel kezeltük meg a sejteket, mely a lipid raft/kaveolák által közvetített endocitózis inhibitora, valamint citokalazin D-t is adtunk a sejtekhez, amely minden endocitikus útvonalat akadályoz az aktin polimerizáció gátlásával. Az inhibitorokkal való előkezelés hatására az N-AGL nioszómák sejtfelvétele szignifikánsan csökkent. A filipin kezelés után 89%, míg a citokalazin D kezelést követően 78% volt sejtfelvétel a kontroll csoporthoz képest (78. C ábra), ami arra utal, hogy a célzott nioszómák sejtbe jutása részben endocitózissal zajlik. Az ATP-szintézist gátló nátrium-azid metabolikus inhibitor kezelés hatására a N-AGL nanorészecskék töltetének sejtfelvétele szignifikánsan alacsonyabb (66%) volt a kontroll csoporthoz képest (78. C ábra), ami arra utal, hogy az NP-k felvétele nem passzív, hanem aktív energiaigényes sejtfelvételi folyamat.



79. ábra. Plazmamembrán fluiditás fluoreszcens anizotrópiával mérve élő agyi endotélsejtekben, nem célzott (N) vagy aszkorbinsav-glutation-leucin célzott (N-AGL) nanorészecskék és benzil-alkohol (30 mM) kezelést követően. Átlag $\pm$ SD. Statisztika: kétutas ANOVA, Bonferroni-posztteszt. $^{\#}P < 0,05$, a kezeletlen kontrollhoz (C) viszonyítva; $**** P < 0,0001$, minden csoport első oszlopához képest, $n = 3$ (Veszélka és mtsai., 2022).

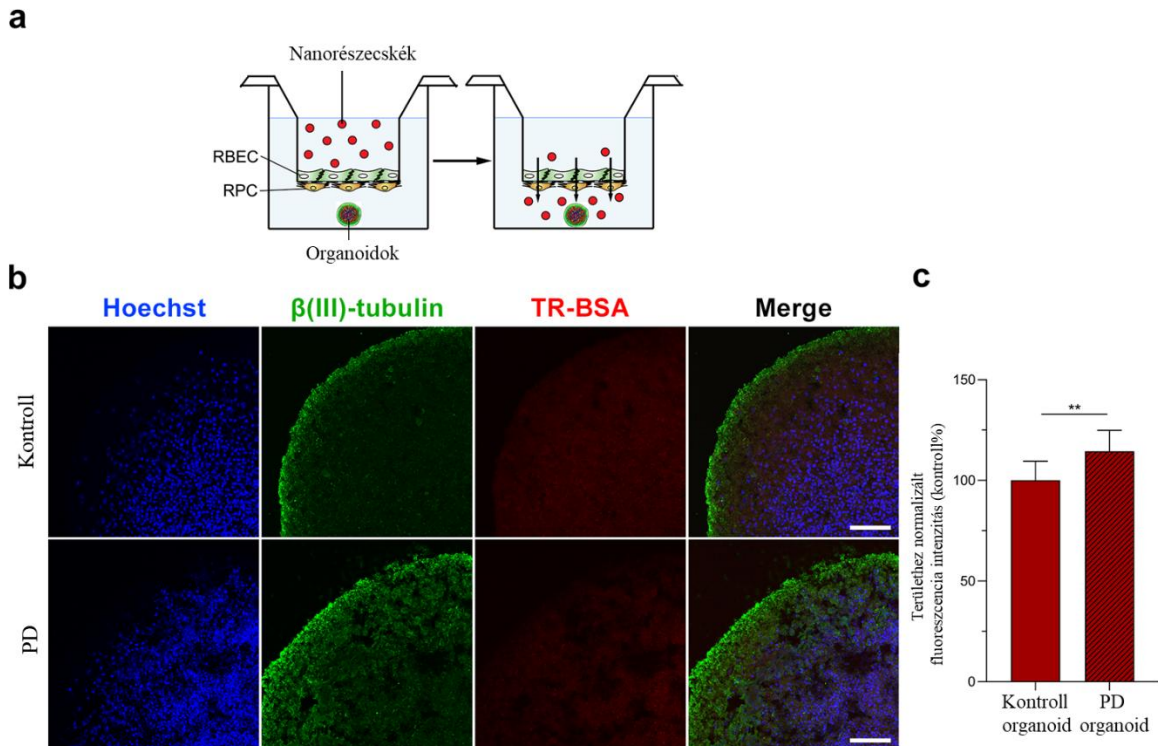
Az agyi endotélsejtek felületi töltésének a nioszómák sejtfelvételi folyamatában játszott szerepének feltárása érdekében módosítottuk az agyi endotélsejtek felületi zéta-potenciálját. A negatív töltésű szialsavmaradványokat neuraminidáz enzimmal történő emésztéssel eltávolítottuk a glikokalixról, illetve a sejtrégeket kationos lipiddel, TMA-DPH-val kezeltük (78. D ábra). A sejtek felületi töltésváltozása a TMA-DPH kezelés hatására jelentősen növelte (142%) a nioszómák felvételét a kontroll csoporthoz képest (78. D ábra).

Az agyi endotélsejtek plazmamembránjának fluiditása, amelyet fluoreszcens anizotrópiával határoztunk meg, jelentősen csökkent 4 órás N-AGL nioszómákkal történő kezelés után (79. ábra). Ez a sejtmembrán fluiditásának növekedésére utal, és a sejtmembrán, valamint a nanorészecskék közötti lehetséges fúziós folyamatnak köszönhető. A maximális membránfluiditást kiváltó referencia molekulaként benzil-alkoholt (30 mM, 3 perc) használtunk, amely minden csoportban csökkentette a fluoreszcencia anizotrópia értékeit (79. ábra).



80. ábra. A Texas vörös -BSA (TR-BSA) vér-agy gát permeabilitás vizsgálata önmagában, illetve nem célzott (N) és aszkorbinsav-glutation-leucin célzott (N-AGL) nanorészecskékbe kapszulázva. P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható. Átlag $\pm$ SD. Statisztika: ANOVA, Dunnett-posztteszt; $* P < 0,05$ a TR-BSA csoporthoz képest; $n = 4$ (Veszélka és mtsai., 2022).

A vér-agy gát permeabilitási vizsgálatok során az önálló TR-BSA átjutása a vér-agy gáton nem különbözött a nem célzott nanorészecskékbe becsomagolt TR-BSA átjutásától, azonban a három különböző típusú célzó molekulával ellátott N-AGL nioszómák töltete szignifikánsan jobban jutott át az agyi endotélsejtek rétegén (80. ábra)



81. ábra. Aszkorbinsav-glutation-leucin célzott, Texas-vörös jelölt BSA (TR-BSA; piros) töltött nanorészecskék (N-AGL) bejutása középagyi organoidokba a vér-agy gát modellen való áthaladás után. (A) Sematikus rajz a kísérletről. RBEC: agyi endotélsejtek; RPC: periciták. (B) Parkinson-kóros betegekből (PD) és egészséges kontrollokból származó sejtekből generált középagyi organoidok reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételei. A neuronokat β III-tubulinnal (zöld), a sejtmagokat pedig bis-benzimiddel festettük (Hoechst, kék). Mére: 100 μ m. (C) A kontroll és a Parkinson-kóros középagyi organoidokról készült képek fluoreszcencia intenzitás kiértékelése. Átlag $\pm$ SD. Statisztika: Student t-próba; ** $P < 0,01$, $n = 8-10$.

Nemcsak azt vizsgáltuk meg, hogy a célzott nioszómák hogyan jutnak át a vér-agy gáton, hanem arra is kíváncsiak voltunk, hogy az agyi endotél sejtrétegeken való áthaladás után képesek-e bejutni agyi organoidokba, ezért konfokális mikroszkópiával megvizsgáltuk a TR-BSA töltet bejutását középagyi organoidokba (81. ábra). Az egészséges kontroll és a Parkinson-kóros betegekből (PD) származó sejtekből generált középagyi organoidokban is kimutattuk a hármas célzott N-AGL nioszómák töltetének vörös fluoreszcens jelét (81B. ábra). A konfokális képek fluoreszcencia intenzitásának elemzése azt mutatta, hogy a PD organoidokba a kontroll organoidokhoz képest nagyobb volt az NP-k töltetének bejutása (81C. ábra).

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Eddigi kutatómunkám a vér-agy gát működésének tanulmányozására és jobb megértésére irányult. A disszertációmban bemutatott vizsgálataim eredményei ennek mentén három nagy témakör köré csoportosulnak:

- (1) A vér-agy gát főképpen farmakológiai és patológiai vizsgálatára alkalmas sejtenyészetes modellek jellemzése és összehasonlítása. Összehasonlító kísérleteink célja mindvégig az adott kutatási célkitűzéshez legmegfelelőbb vér-agy gát kísérleti modell megtalálása volt.
- (2) A vér-agy gát sérülésének vizsgálata különböző betegségekben és egy klinikailag alkalmazott antioxidáns hatóanyag védőhatásának igazolása agyi endotélsejteken.
- (3) A vér-agy gáton keresztüli hatóanyag bejuttatás növelésére új stratégiák kidolgozása és igazolása.

5.1 A vér-agy gát vizsgálatára alkalmas sejtenyészetes modellek összehasonlítása

A gyógyszerfejlesztés korai, de meghatározó fázisában megbízható *in vitro* modellekre van szükség a gyógyszerjelöltek vér-agy gát penetrációjának vizsgálatára, annak igazolására, hogy egy központi idegrendszeri célpontú hatóanyag valóban bejut-e az agyba, és ha igen terápiásan hatékony mennyiségben-e, illetve fordítva, egy perifériás szervek gyógyítására tervezett hatóanyag átjutva a vér-agy gáton nem okoz-e központi idegrendszeri mellékhatásokat (Veszelka és mtsai., 2018). A gyógyszerfejlesztés e korai szakaszában kulcsfontosságú a megfelelő vér-agy gát modell kiválasztása. A Richter Gedeon gyógyszeripari vállalattal együttműködésben, Dr. Vastag Mónika csoportjával közösen, szisztematikus módon összehasonlítottunk 5, illetve 9 tenyészetes modellt, amit két egymást követő tanulmányban közöltünk (Hellinger és mtsai., 2012; Veszelka és mtsai., 2018). Ezek közé a modellek közé tartoztak a könnyen tenyészthető, közepes szűrő kapacitással rendelkező, szoros gáttulajdonságokat mutató és az iparban mindezek miatt előnyt élvező vér-agy gátat helyettesítő epitélisejtes modellek. Ezek mellett agyi endotélsejt alapú vér-agy gát modelleket tanulmányoztunk, elsősorban a primer sejtekből összeállított EPA modellt, illetve humán és patkány agyi immortalizált sejtvonalakat.

Eredményeinket összefoglalva megállapítottuk, hogy a humán bélepitélisejt eredetű VB-Caco-2 és a kutya vese epitélisejtes MDCK-MDR1 modellek a permeabilitási marker molekulákra nézve hasonló P_{app} értékeket mutatnak, mint a primer sejtes patkány EPA vér-agy gát modell. Ennek alapján a paracelluláris transzportútvonaltesztelésének tekintetében a vér-agy gát modell méltó versenytársa a szoros gátnak tartott epitélisejtes modelleknek (Hellinger és mtsai., 2012).

Az egyik legfontosabb vér-agy gát efflux transzporter, a P-gp esetében, a VB-Caco-2 és a MDCK-MDR1 modellek, melyek a P-gp-t nagy mennyiségben expresszálják az alap Caco-2 és MDCK sejtvonalakhoz képest, szignifikánsan nagyobb számban azonosították az ismert P-gp szubsztrát gyógyszerhatóanyagokat, mint az EPA modell. A natív Caco-2 modellhez képest a VB-Caco-2 modell minden vizsgált efflux pumpa ligandnál jobb eredményeket hozott. A VB-Caco-2 és az MDCK-MDR1 modellek ezért egyszerű és olcsó alternatívát jelenthetnek a gyógyszeriparban és a kutatásokban egyaránt az efflux pumpa ligand esélyes gyógyszerjelöltek kiszűrésére. Ezzel szemben, amikor a különböző gyógyszerhatóanyagok *in vitro* permeabilitási adatait a szöveti kötődéssel korrigált P_{app} in

vivo adatokkal ábrázoltuk, a korreláció mértéke és az illeszkedés jósága hasonló volt a modellekben ($r^2 = 0,7989-0,6053$), de a legjobb korrelációt, a legmagasabb r^2 értéket az EPA vér-agy gát modell esetében figyeltük meg.

Az elektronmikroszkópos eredményeink által alátámasztott alapvetően eltérő sejtszerkezet, valamint a genetikailag programozott különbségek a TJ fehérjék és a vér-agy gát specifikus transzporterek kifejeződésében szükségessé teszi a vér-agy gátat helyettesítő epitelsejtes modellek körültekintő használatát, és az általuk kapott teszteredmények validálását endotelsejtes vér-agy gát modelleken is (Hellinger és mtsai., 2012).

A Richterrel közösen végzett munkánk és a kapott értékes eredmények arra sarkalltak bennünket, hogy a vér-agy modellek összehasonlítását tovább folytassuk és kiterjesszük az agyi endotelsejtvonalas modellek körére is (Veszelka és mtsai., 2018). A patkány primer sejtes EPA vér-agy gát modell és a korábban vizsgált epitelsejtes modellek — Caco-2, VB-Caco-2, MDCK, MDCK-MDR1 — mellett vizsgálatainkat kiterjesztettük a patkány GP8 és RBE4 sejtvonalakra és a humán hCMEC/D3 modellre, valamint ennek D3L változatára is, amelynél a vér-agy gát tulajdonságokat a Wnt jelátviteli útra ható lítium-klorid kezeléssel fokoztuk (Veszelka és mtsai., 2018).

Az összesen immár kilenc különböző tenyészetes modellen kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy jelentős különbségeket tártunk fel morfológiai, funkcionális és génexpressziós szinten is a primer sejt alapú EPA vér-agy gát modell és az epitelsejtes, illetve agyi endotelsejtes sejtvonalak között. A TJ fehérje gének mintázata az epitelsejtes modellekben, bár megfelelő paracelluláris szorosságot mutattak, jelentősen különbözött az agyi endotelsejtektől. A Caco-2 és a MDCK sejtekben a legmagasabb génexpressziót a klaudin-1, -3, -4, -7 esetében láttunk, ami tipikusan jellemző *in vivo* mintázat az intesztinális epitélium esetében (Chiba és mtsai., 2008). Génexpressziós méréseink igazolták, hogy az MDCK és MDCK-MDR modellek esetében mért alacsony TEER értékekért az ioncsatornákat és pórusokat képező klaudin-2 és klaudin-16 magas expressziója felelős, ezek a vese epitelsejtek fiziológiás működéséhez szükségesek. A klaudin-5, amely az egyik legfontosabb vér-agy gát szorosságot növelő TJ fehérje (Veszelka és mtsai., 2011; Deli, 2005), az agyi endotelsejtes modellek esetében messze az EPA-ban volt a legmagasabb génexpressziós és immunfestési szinten, míg a GP8, RBE4, D3, D3L endotelsejtes modellek esetében a szintje rendkívül alacsony volt, ami magyarázza az ezekben a modellekben mért igen alacsony TEER értékeket.

A vér-agy gát elsődleges glükóz transzportere a *GLUT1* gén (Campos-Bedolla és mtsai., 2014) expressziója az EPA modellben volt a legkifejezettebb, míg az epitelsejtes modellekben a *GLUT3* és *GLUT5* volt a jelentős. Hasonló mRNS expressziós adatokat kaptak a Caco-2 sejteken más csoportok is (Hayeshi és mtsai., 2008). A *LAT1* gén kifejeződése is magasabb volt az EPA modellben, mint a Caco-2 és VB-Caco-2 modellekben. A magas *LAT1* fehérje szint az EPA modellen különösen fontos a gyógyszerek transzportja szempontjából, mivel számos hatóanyag, mint az L-DOPA, a gabapentin, a baklofen ezen keresztül jut be az agyba (Veszelka és mtsai., 2011; Veszelka és mtsai., 2015).

A két fő vér-agy gáton azonosított efflux pumpa a P-gp és a BCRP (Deli és mtsai., 2005). A VB-Caco-2 és az MDCK-MDR1 sejtek magas szinten expresszálták a P-gp génjét, ami hozzájárulhat ezeknek a sejtvonalaknak a magas efflux potenciáljához összhangban korábbi eredményeinkkel (Hellinger és mtsai., 2012). Azonban fontos kiemelni, hogy az MDCK-MDR1 sejtek nem expresszálták a *BCRP* gént, ahogy ezt más független vizsgálatban is megerősítették (Quan és mtsai., 2012).

Az SLC transzporterek génexpressziójának eltérései az EPA és az epitelsejtes modellek között tükröződött a kiválasztott gyógyszerhatóanyagok permeabilitási vizsgálatainak eredményében is. A neurológiai betegségekben is potenciális terápiás szerként azonosított

sztatinok esetében jelentősen jobb vér-agy gát penetrációt mértünk az EPA modellen, mint az epitelsejtes tenyészeteken. Ennek oka nagy valószínűséggel az OATP influx transzporterek magasabb szintje az EPA modellen, melyeknek a sztatinok is a ligandjai. Megfigyeléseink összhangban állnak az irodalmi adatokkal, ahol a rozuvasztatin és az atorvasztatin esetében is alacsony kétirányú P_{app} értékeket mértek Caco-2 sejtekben (Li és mtsai., 2011). Az Alzheimer-kór kezelésében használt takrin és a donepezil antikolinerg gyógyszerek a szerves kationtranszporter-2 (OCT2/SLC22A2), a szerves kation/karnitin transzporter OCTN2/SLC22A5, és a CHT1/SLC5A7 kolin transzporterek ligandjaiként juthatnak be az agyba (Kang és mtsai., 2005; Lee és mtsai., 2012). Ez a két hatóanyag a VB-Caco-2 sejteken szignifikánsan alacsonyabban jutott át az EPA modellhez képest. Sőt, a donepezil esetében még a transzport irányok is különböztek, a VB-Caco-2 modell a bazális-apikális irányú permeabilitást mérte magasabbnak, míg az EPA modell az apikális-bazális irányú transzportot jelezte erősebbnek, összhangban a vér-agy gát SLC karrierek szerepével. Ezek az eredmények hangsúlyozzák az SLC transzporterek vizsgálatának, valamint az agyba irányuló gyógyszerhatóanyagok vizsgálatokor a megfelelő tenyésztési modell kiválasztásának fontosságát.

A tenyészetes agyi endotelsejtes modellek a gyógyszerek metabolizmusában részt vevő fázis I és fázis II enzimek génjeit az epitelsejtekhez hasonló szinten fejezték ki. Az EPA modellben a fázis I *CYP2D6* és a *CYP2U1* gének mRNS szintje volt a legmagasabb a citokróm P450 enzimek közül. A *CYP2D6* enzimről ismert, hogy sok klinikailag alkalmazott gyógyszer konjugálásában vesz részt a májban (Dauchy et al., 2009), míg a *CYP2U1* az arachidonsav és a hosszú láncú zsírsavak agyi metabolizmusához járul hozzá. Ezzel szemben Caco-2 sejtekben a retinsavat metabolizáló extrahepatikus *CYP2S1* enzim génjének expressziós szintje volt a legmagasabb. A kutya vese MDCK sejtekben vagy nem expresszáldtak a tesztelt *CYP* gének, vagy nem állt rendelkezésre fajspecifikus próba. Az adatok alapján az EPA modell expresszálja a fázis I és fázis II metabolikus enzimek génjeit, ami arra utal, hogy az enzimatis vér-agy gát részt vehet a gyógyszerek transzportjának helyi szabályozásában.

Összefoglalva a két közlemény eredményeit elmondható, hogy jelentős különbségeket mutattunk ki a szoros gátfunkcióért felelős, valamint a gyógyszertranszportban és a lokális gyógyszer metabolizmusban szerepet játszó fehérjék génkifejeződésében az epitelsejtes és az agyi endotél sejtes vér-agy gát modellekben. Az eltérő TJ expresszió ellenére az epitelsejtes és EPA modellek megfelelő paracelluláris szorosságot mutattak. Az SLC transzporterek génexpressziójának eltérései a vér-agy gát és az epitelsejtes modellek között a kiválasztott gyógyszerhatóanyagok permeabilitásában is tükröződtek. Eredményeinket összevetve megállapítottuk, hogy a vizsgált kilenc sejtenyészeti modell közül a primer sejt alapú EPA modell tükrözi a legpontosabban a vér-agy gát morfológiai és funkcionális tulajdonságait. (Hellinger és mtsai., 2012; Veszelka és mtsai., 2018).

5.2. A vér-agy gát sérülésének vizsgálata különböző betegségek modelljeiben

Kutatások és klinikai vizsgálat igazolják, hogy a vér-agy gát sérülései másodlagos neuronális károsodáshoz és idegrendszeri betegségek kialakulásához vezethetnek (Zhao és mtsai., 2015; Profaci és mtsai., 2020). A vér-agy gát működése számos neurológiai betegségben károsodik, mint például az Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór, szklerózis multiplex, agyi traumák, epilepszia, vagy a sztrók. Ezekben a kórállapotokban a vér-agy gát barrier működése meggyengül, permeabilitása megnő, sérül az agy tápanyagellátása és káros anyagoktól való védelme, ami hozzájárul az idegsejtek károsodásához és sejtpusztulásához vezet (Deli és mtsai., 2005; Zhao és mtsai., 2015; Knox és mtsai., 2022). A vér-agy gát sérüléseinek vizsgálata ezért kiemelt kutatási terület a

központi idegrendszeri betegségek esetében, és a vér-agy gát sejtjei fontos terápiás célpontokká váltak.

A különböző betegségek patomechanizmusának tanulmányozására és a lehetséges védőanyagok vizsgálatára az állatmodellek mellett az *in vitro* vér-agy gát modellek is alkalmasak. Kutatómunkám során számos betegségben vizsgáltam a vér-agy gát működésének változásait és kerestem az agyi endotélsejtekre protektív molekulákat, hatóanyagokat. Értekezésemben három szisztémás betegséggel kapcsolatos munkánk eredményeit mutattam be. Ezekben a diabétesz *in vitro*, a krónikus stressz és az ateroszklerózis *in vivo* modelljeiben vizsgáltuk a vér-agy gát, és azon belül elsősorban az agyi kapilláris endotélsejtek károsodásait.

A vér-agy gát nemcsak központi idegrendszeri betegségekben sérülhet, hanem szisztémás betegségekben, mint például diabéteszben is, ahol nemcsak a perifériás mikroeerek károsodnak, hanem az agyi hajszálerek is (Prasad és mtsai., 2014). A cukorbetegség esetében igazolták először a karbonil stresszt, vagyis a reaktív karbonilgyökök metilglioxál felhalmozódását a sejtekben, ami a cukorbetegséggel összefüggő érrendszeri szövődményekért felelős (Mukohda és mtsai., 2012). Diabéteszes betegek esetében ezért a sztrók, a demencia és az Alzheimer-kór kialakulásának kockázata is magasabb.

Igazoltuk, hogy a metilglioxál kezelés csökkentette az agyi endotélsejtek életképességét, megnövelte a vér-agy gát permeabilitását, fokozta az endotélsejtekben a reaktív oxigénradikálok termelődését és többek között csökkentette a klaudin-5 génexpresszióját (Tóth és mtsai., 2014a, 2014b). Eredményeinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy a klinikumban sztrók terápiájában már sikeresen alkalmazott szabadgyökfogó és neuroprotektív hatású edaravon (Kono és mtsai., 2013) képes nem csak az agyi endotélsejtek életképességét megővni a karbonil stresszt okozó metilglioxállal szemben, hanem a vér-agy gát megnövekedett permeabilitását és működését is képes visszaállítani a károsodást követően (Tóth és mtsai., 2014a, 2014b). Mivel a metilglioxál felhalmozódása során kialakuló karbonil stressz megfigyelhető más betegségekben, így metabolikus szindrómában (Liu és mtsai., 2011), szív- és érrendszeri betegségekben (Uchida és mtsai., 2000) vagy Alzheimer-kórban (Kuhla és mtsai., 2005) is, ezért az edaravon alkalmas lehet ezen betegségek cerebrovaszkuláris szövődményeinek kezelésére.

A vér-agy gát károsodása régóta ismert az idegrendszeri degeneratív betegségek kialakulásában, azonban a stresszel összefüggésbe hozható vér-agy gát működési zavarok kutatása egy újabban felfedezett terület volt munkánk kezdetén. Korábbi irodalmi adatok igazolták, hogy a krónikus stressz összefüggésben áll a demencia és az idegrendszeri betegségek kialakulásának fokozott kockázatával, mint például az Alzheimer-kórral vagy pszichiátriai betegségek, mint skizofrénia vagy a depresszió kialakulásával (Najjar és mtsai., 2013).

Krónikus immobilizációs stressznek kitett patkányokon végzett kísérleteink feltárták, hogy a stressz hatására az agyi mikropillárisok morfológiája megváltozik, melyet a vér-agy gát kulcsfontosságú fehérjéinek expressziójában bekövetkező változások is igazoltak (Sántha és mtsai., 2016). Immunhisztokémiai vizsgálatainkban kimutattuk, hogy krónikus stressz hatására a klaudin-5 festődés komplexitása csökken, amely a kapillárisok elágazódási pontjainak csökkenésében mutatkozott meg. Csökkent az okkludin TJ fehérje fluoreszcencia intenzitása is, míg a vér-agy gát elsődleges glükóz transzporterének, a GLUT1-nek az expressziója megemelkedett. Az utóbbi változás arra utal, hogy stresszingerek hatására megnő az agy glükózigénye, ami rövid távú kompenzációs mechanizmusként megnöveli a GLUT1 expresszióját (Kelly és mtsai., 2014). A frontális kéregben kimutattuk a GFAP fluoreszcencia intenzitásának szignifikáns csökkenését stressz hatására. Elektronmikrosz-

kópos vizsgálataink ultrastrukturális változásokat és morfológiai elváltozásokat tártak fel az agyi kapillárisok endotélsejtjeiben és az asztroglia végtalpakban, beleértve a szoros sejtkapcsolatok felszakadozottságát és a gliavégtalpak megduzzadását, ami ödémára utalt (Sántha és mtsai., 2016).

Morfológiai eredményeink segíthetnek megmagyarázni a stressz által kiváltott vér-agy gát permeabilitási és funkcionális változásokat, amelyek szerepet játszanak a stresszel kapcsolatos neurológiai és pszichiátriai betegségek patogenezisében. Ez a széles körben idézett munkánk is hozzájárult annak a folyamatnak a leírásához, hogy krónikus stressz hatására a vér-agy gát szoros és az adherens sejtkapcsoló fehérjéinek expressziója csökken, ami permeabilitás fokozódáshoz vezet, ami pedig neuroinflammációt, neurodegenerációt, a kognitív funkciók romlását és viselkedési zavarokat okoz (Welcome és mtsai., 2020).

A vaszkuláris demencia és az Alzheimer-kór kialakulásának közvetlen kapcsolata az ateroszklerózissal intenzíven kutatott terület, de az összefüggés számos részlete még feltárára vár (Li és mtsai., 2003). A diszlipidémia, és az ennek hatására kialakuló érlemeszesedés kapcsolatba hozható az időskori kognitív hanyatlás kialakulásával (Huang és mtsai., 2021). A krónikus hiperkoleszterinémia és a hipertrigliceridémia miatt létrejövő érlemeszesedés okozta vér-agy gát károsodások vizsgálatára a humán ateroszklerózis egér modelljét, az APOB-100 transzgenikus egér modellt használtuk (Hoyk és mtsai., 2018). A modellben a humán APOB-100 apolipoprotein fehérje túlermelődését mutatták ki a különböző szövetekben, például a májban (Bjelik és mtsai., 2006), a szívben (Csont és mtsai., 2007) és az agyban (Lénárt és mtsai., 2012). Az APOB koncentrációjának megemelkedését igazolták Alzheimer-kóros betegek szérumban (Caramelli és mtsai., 1999; Sabbagh és mtsai., 2004), ami korrelált az amiloid- β lerakódással a betegek agyában (Kuo és mtsai., 1998).

A transzgenikus egereken végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy a szérumban trigliceridszint megnőtt, a vér-agy gát permeabilitása a hippocampusban megemelkedett, a P-gp eflux pumpa és a frontális kéreg GFAP festődési intenzitása lecsökkent (Hoyk és mtsai., 2018). Ez összhangban áll a korábbi, stressz modellben megfigyelt eredményeinkkel, ahol stressz hatására szintén az agykéregben láttunk GFAP csökkenést, ami a vér-agy gát károsodására utalt (Sántha és mtsai., 2016). A vér-agy gát működési zavarát jelző funkcionális és morfológiai változások mellett génexpressziós változásokat is kimutattunk. Számos, a vér-agy gát működésében fontos gén, például *Meox2*, *Mfsd2a*, *Glut-1*, *Lrp2*, *Abcb1a*, *Nos2*, *Nos3* kifejeződése csökkent. Ezzel szemben a víz és elektrolit szabályozásért felelős *Aqp4* expressziója megnőtt, ami magyarázhatja a morfológiai vizsgálatainkban megfigyelt ödémás asztroglia végtalpak kialakulását az APOB-100 transzgenikus állatokban (Hoyk és mtsai., 2018). Ismert, hogy az *Aqp4* polarizált expressziójának elvesztése az asztrocita végtalpakban jelzi a vér-agy gát károsodását és perivaszkuláris ödéma kialakulásához vezet különböző kórképekben (Wolburg és mtsai., 2009).

A kísérleteinkben használt APOB-100 transzgenikus egér modell hasznos eszköze lehet a vaszkuláris eredetű neurodegeneratív betegségek patomechanizmusának további tanulmányozására, ami segíthet a hatékony terápiák kifejlesztéséhez.

5.3. Új stratégiák vizsgálata a vér-agy gáton keresztüli hatóanyag bejuttatás növelésére

A vér-agy gát paracelluláris útvonalának célzása peptidekkel és kismolekulával

A vér-agy gát legfontosabb feladata az agy táplálása mellett a központi idegrendszer védelme a szisztémás keringésből származó idegen és károsító anyagokkal szemben. Ugyanakkor azok a vér-agy gát mechanizmusok, amelyek az idegrendszert védik, egyben gátolják, hogy a különböző neurofarmakonok terápiásan hatékony mennyiségben tudjanak bejutni az agyba, ezért új gyógyszerbeviteli módszerek kifejlesztésére van szükség (Banks, 2016). A hatóanyagok agyi bejuttatására több lehetőség is rendelkezésre áll, például a vér-agy gát megkerülése, a vér-agy gát működésének módosítása, vagy a vér-agy gát élettani transzportútvonalainak kihasználása (Veszelka és mtsai., 2015). Kutatómunkám során számos gyógyszerbeviteli módszert vizsgáltam, melyek közül disszertációmban az agyi endotélsejtek közötti paracelluláris útvonal reverzibilis megnyitását TJ modulátor peptidekkel és a kismolekula tezmilifennel, valamint az általunk előállított, a vér-agy gát transzportereit célzó nanoméretű hordozórendszerek vizsgálatával kapcsolatos eredményeimet mutattam be.

A vér-agy gát szoros sejtkapcsolatainak megnyitása a vér-agy gát áteresztőképességének átmeneti növekedését eredményezi, ami elősegíti a hatóanyagok agyba való jobb bejutását (Deli, 2009). A TJ modulátor peptidek képesek közvetlenül és specifikusan kölcsönhatásba lépni a szoros sejtkapcsoló fehérjék extracelluláris doménjeivel, és ezáltal fokozni a vér-agy gát permeabilitását. Kísérleteinkben hat különböző TJ modulátor peptid hatását hasonlítottuk össze a permeabilitás fokozására *in vitro* vér-agy gát modellen (Bocsik és mtsai., 2016): az epiteliális E-kadherinhez kapcsolódó ADT-6 és a HAV-6 peptidet, az enterotoxin eredetű C-CPE-t és AT-1002 peptidet, valamint a 7-mer/PN-78 és a PN-159/KLAL peptideket, mely utóbbiak fehérje célpontja nem volt ismert.

A HAV-6 és ADT-6 peptideknek csak gyenge hatása volt a tenyésztetes vér-agy gát modell permeabilitására, ami azzal magyarázható, hogy ezek a peptidek elsősorban a hámsejtekre specifikus E-kadherin EC1 doménjéhez képesek kötődni (Bazzoni és mtsai., 2004). Ez a kadherinkötő motívum hiányzik az agyi endotélsejtekben jelenlevő vaszkuláris endotél VE-kadherin esetében. A mikrobiális toxinokból származó peptidek közül elsőként írtuk le a ZO-1 fehérjén ható AT-1002 peptid permeabilitást fokozó hatását agyi endotélsejteken. A C-CPE peptid, a *Clostridium* toxin aktív fragmense, amelyet mi teszteltünk először vér-agy gát modellen, nem hatott az agyi endotélsejtekre. Ez a peptid elsősorban a klaudin-3 és -4 TJ fehérjékkel interakcióba lépve növeli a bélepitélisejtek permeabilitását, és szerkezetéből adódóan valószínűleg nem tud kötődni a vér-agy gát TJ fehérjéjéhez, a klaudin-5-höz. A klaudin-3 és -4 expressziós szintje magas az epitélisejtekben, de alacsony az agyi endotélsejtekben, ami megmagyarázza eredményeinket (Saitoh és mtsai., 2015). A 7-mer/PN-78 peptid kötőpartnerre ugyan ismeretlen, de hatása epitélisejteken már ismert volt (Herman és mtsai., 2007), azonban a peptidnek a vér-agy gát permeabilitást fokozó hatását mi írtuk le először. A vér-agy gát áteresztőképességének fokozásában messze a PN-159/KLAL peptid bizonyult a leghatékonyabbnak az összes tesztelt TJ modulátor közül. Mivel kötőpartnerre az irodalmi adatok alapján nem volt ismert, mikroméretű termoforézis mérésekkel és molekula modellezési vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a peptid legvalószínűbb kötőpartnerre a klaudin-1 és az agyi endotélsejtekben nagy mennyiségben jelen levő klaudin-5 (Bocsik és mtsai., 2016).

A TJ modulátor peptidekkel kapcsolatos eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy elsőként mértük meg agyi endotélsejteken a mikrobiális toxin eredetű AT-1002 és C-CPE peptidek vér-agy gát permeabilitásra gyakorolt hatását. A hat különböző TJ modulátor

közül agyi endotélsejteken a leghatékonyabbnak a PN-159/KLAL peptid bizonyult, aminek kötőpartnereit is sikerült azonosítani, mégpedig a klaudin-1 és a klaudin-5 TJ fehérjét.

In vitro vér-agy gát modellen végzett mérésekkel igazoltuk az új C5C2 klaudin-5 peptidomimetikum paracelluláris utat megnyitó hatását, valamint azt, hogy képes megnyitni az agyi endotélsejtek szoros sejtkapcsolatait (*Dithmer és mtsai., 2017*). Adataink azt mutatják, hogy a klaudin-5 fehérjéből származó C5C2 peptid ígéretes megközelítést jelenthet a gyógyszerek vér-agy gáton keresztüli átjutásának javítására a paracelluláris útvonal átmeneti megnyitásával (*Dithmer és mtsai., 2017*). Ezek a kísérleti eredmények megerősítik a korábban klaudin-1 peptidekkel végzett epitélsejtes irodalmi adatokat (Staat és mtsai., 2015; Dabrowski és mtsai., 2015), és igazolják, hogy a klaudin fehérjékből származó, ECL1 alapú peptidek potenciálisan alkalmasak lehetnek a biológiai barrierék áteresztőképességének fokozására a szoros sejtkapcsolatok módosításán keresztül, és ezzel hozzájárulhatnak új agyi gyógyszer szállítási stratégiák kidolgozásához.

Kutatómunkánk során nemcsak peptidek, hanem egy kisméretű gyógyszer molekula vér-agy gát permeabilitást fokozó hatását is megvizsgáltuk. A tezmilifen egy antihisztamin hatású tamoxifen, melynek hatékonyságát kemoterápiás adjuvánsként a perifériás daganatok számos típusában igazolták (Reyno és mtsai., 2004). Kutatócsoportunk korábbi munkáiban a tezmilifen növelte a vér-agy gát áteresztőképességét *in vivo* (Deli és mtsai., 2000). Agyi endotélsejteken végzett kísérleteinkben a tezmilifen közvetlen hatásmechanizmusát kutatva mi is kimutattuk, hogy a tezmilifen fokozta a paracelluláris markermolekula fluoreszcein és a transzcelluláris marker EBA penetrációját a vér-agy gát modellen keresztül (*Walter és mtsai., 2015*).

A multidrogo rezisztencia az egyik legfőbb oka, hogy a központi idegrendszeri tumorok kezelése a mai napig nem megfelelő hatékonyságú. Ebben a vér-agy gát BCRP, P-gp és MRP efflux pumpáinak kulcsszerepe van (Deli és mtsai., 2005; Veszelka és mtsai., 2011). Mivel a tezmilifen gátolta az agyi endotélsejtek efflux pumpa aktivitását is, a permeabilitásfokozó hatással együttesen potenciálisan hozzájárulhat az antineoplasztikus gyógyszerek fokozott bejutásához a központi idegrendszeri tumorokba is. A tezmilifen hatása több párhuzamos jelátviteli útvonalon keresztül is közvetíthető, amelyekről ismert, hogy szabályozzák a vér-agy gát permeabilitását. Eredményeink a MAPK szignalizáció lehetséges részvételére utalnak, mivel az U0126, egy MAPK/ERK-kináz inhibitor részben gátolta a tezmilifen hatását (*Walter és mtsai., 2015*). Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a MAPK jelátviteli útvonal aktiválódásakor az agyi endotélsejtekben a permeabilitás emelkedése figyelhető meg (Fischer és mtsai., 2005), amely visszafordítható az U0126 hozzáadásával. Kimutattuk azt is, hogy a PI3K/AKT jelátviteli útvonal gátlószere, a LY294002 szintén csökkentette a tezmilifen hatását (*Walter és mtsai., 2015*). A PI3K jelátviteli út befolyásolja a vér-agy gát integritását a sejtkapcsoló komplexeken keresztül (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 2008). Ismert, hogy a VEGF érendoteliális növekedési faktor, amely megnyitja a vér-agy gátat, szintén a PI3K/AKT útvonalon keresztül hat (Kilic és mtsai., 2006), és a LY294002 gátolja a permeabilitás növekedését az agyi endotélsejt rétegekben (Camire és mtsai., 2014). A gátlószerekkel kapott eredményeink alapján feltételezzük, hogy a tezmilifen vér-agy gát permeabilitást fokozó hatása a MAPK/ERK és a PI3K/AKT útvonalakon keresztül közvetíthető (*Walter és mtsai., 2015*).

A bemutatott eredményeink rámutatnak, hogy az eddig csak perifériás tumorok esetében alkalmazott tezmilifen alkalmas lehet adjuvánsként kemoterápiás gyógyszerek agyi bejutásának fokozására központi idegrendszeri tumoros megbetegedésekben (*Walter és mtsai., 2015*).

A vér-agy gát transzcelluláris útvonalának célzása nanorészecskékkel

A gyógyszermolekulák agyi bejuttatásának egyik aktívan kutatott területe a nanoméretű hordozórendszerek alkalmazása. A nanohordozók számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, ilyen többek között a biokompatibilitás, a biológiai lebomlás, a nagy fajlagos felület, a szabályozott hatóanyag felszabadulás, és hogy hidrophil és hidrophób hatóanyagokat egyaránt képesek szállítani. Mivel a keringésbe juttatott nanorészecskék könnyen csapdázódhatnak perifériás szervekben, főképpen a májban és a lépben, ezért a megfelelő agyi bejuttatáshoz célzó molekulákra van szükség (Saraiva és mtsai., 2016). A nanorészecskék felszínére kötött célzó molekulák segítségével, amelyek a vér-agy gát receptoraihoz vagy transzportereikhez kötődnek, a célzott nanorészecskék mint „molekuláris trójai falovak” képesek lehetnek az agyba gyógyszereket bejuttatni a vér-agy gát transzcelluláris útvonalait kihasználva (Pardridge, 2002; Rask-Andersen és mtsai., 2013; Mahringer és mtsai., 2021; Wu és mtsai., 2023). A nanopartikulumokkal végzett kísérleteinkben több különböző anyagú nanohordozót is előállítottunk, és a vér-agy gát mindhárom aktív transzcelluláris útvonalának, a receptor-mediált, az adszorptív-mediált, illetve a karrier-mediált transzcitózis útvonalának kihasználására is terveztünk és vizsgáltunk nanorészecskéket.

A vér-agy gát receptor-mediált transzcitózis útvonalának célzására elsőként állítottunk elő donepezil hatóanyaggal töltött és az agyi endotélsejtek LRP és LDLR receptoraihoz kötődni képes ApoE-célzó liganddal ellátott szilárd lipid nanopartikulumokat (*Topal és mtsai., 2021*). A donepezil széles körben alkalmazott gyógyszer az enyhe és közepes tünetekkel járó Alzheimer-kór kezelésére. Reverzibilis acetilkolin-észteráz gátlóként hat, növeli az acetilkolin koncentrációját a kolinerg szinapszisokban, melyek fontos szerepet játszanak a memóriaképződés folyamatában (Pardridge, 2020). A donepezillel kapcsolatban azonban a fő probléma, hogy bár képes átjutni a vér-agy gáton, amit mi is kimutattunk korábban (*Veszelka és mtsai., 2018*), de számos nemkívánatos mellékhatást okoz, mint a hányinger, hasmenés, izomgörcsök, májtoxicitás, álmatlanság és szívritmuszavar (Pardridge, 2020). A donepezil agyi penetrációjának növelésére és a perifériás mellékhatások csökkentésére ezért jó stratégia lehet a nanorészecskékbe történő kapszulázása.

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a vér-agy gát receptor-mediált transzcitózis útvonalát célzó ApoE a nanorészecske felszínéhez kötve elősegítette a donepezillel töltött lipid nanohordozók felvételét az agyi endotélsejtekbe és átjutását a vér-agy gáton. Emellett megnövelte a neuronokba való bejutásukat is, ami előnyös lehet központi idegrendszeri betegségek, például Alzheimer-kór terápiájában, ahol a terápia célpontok az idegsejtek.

Az adszorptív-mediált transzcitózis, szemben a receptor-mediált transzcitózissal, nem függ a specifikus receptorok expressziójától a vér-agy gáton, és nem korlátozza az endogén ligandok kötődése sem (Hervé és mtsai., 2008). Az adszorptív-mediált transzcitózis koncentráció-, idő- és energiafüggő folyamat, mely magasabb koncentrációnál telítődik, mint a receptor-mediált, ami elméletileg nagyobb mennyiségű hatóanyag bejutását teszi lehetővé az agyba (Hervé és mtsai., 2008). Portugál együttműködő partnereink kimutatták, hogy a Dengue vírus kapszid fehérjéjéből előállított kationos PepH3 peptid jelentős mennyiségben képes átjutni a vér-agy gáton adszorptív-mediált endocitózissal, és képes *in vivo* bejutni az agyba is (Neves és mtsai., 2017). Ezért megvizsgáltuk, hogy a PepH3 peptid nanorészecskék célzó molekulájaként elősegíti-e az NP-k vér-agy gáton való jobb átjutását. PepH3-mal célzott nioszómákat állítottunk elő, amelyekbe fluoreszcens modell anyagot, illetve terápiás hatóanyagként amiloid- β peptidet felismerő ellenanyagot csomagoltunk

(Szecskó és mtsai., 2025). Kimutattuk, hogy a PepH3 mint célzó molekula nanohordozók felszínéhez kötve szignifikánsan jobb sejtfelvételt és vér-agy gáton való átjutást eredményezett a fluoreszcens fehérjével és az ellenanyaggal töltött NP-k esetében is. Igazoltuk azt is, hogy a PepH3-célzott nanorészecskék töltete aktív, energiaigényes módon jut be a sejtekbe. A folyamat részben endocitózissal történik és csak az NP-k kis része csapdázódik a lizoszómákban (Szecskó és mtsai., 2025).

Eredményeink alátámasztják, hogy a kationos PepH3 peptid ígéretes lehet nanohordozók célzó molekulájaként, mivel hatékonyan növeli a hatóanyagok, például antitestek vagy más terápiás biomolekulák vér-agy gáton való átjutását, és elősegítheti azok bejutását az agyszövetbe is.

A vér-agy gát karrier-mediált transzportútvonalának célzására az SLC transzporter családot választottuk, melyekről mi is kimutattuk, hogy tagjai nagy mennyiségben és jellegzetes génexpressziós mintázatban fejeződnek ki az agyi endotélsejtek membránjában (Veszélka és mtsai., 2018). Ismert az is, hogy több gyógyszerhatóanyag az SLC transzporterekhez kötődve az agyi endotélsejtek karrier-mediált transzcitózis útvonalán keresztül képes átjutni a vér-agy gáton (Deli, 2011). Kutatási hipotézisünk az volt, hogy az SLC fehérjék alkalmas célpontok lehetnek célzott hatóanyag bejuttatásra az agyba nanorészecskékkel, főképpen ligandok kombinálásával. Bár az SLC transzporterek élettani és farmakológiai szempontból is nagyon fontosak, agyi gyógyszerbeviteli szempontból eddig még kevésbé kiaknázottak (César-Razquin és mtsai., 2015).

Kísérleteinkben több SLC transzporter ligandot vizsgáltunk: biotint, alanint, glükopiranózt, leucint, aszkorbinsavat, és az irodalmi adatok alapján az egyik leghatékonyabb célzó molekulát, az antioxidáns hatású tripeptid GSH-t. Kutatási hipotézisünknek megfelelően, a hangsúlyt ezek kombinációira fektettük (alanin-GSH, alanin-glükopiranóz, GSH-glükopiranóz, leucin-GSH-aszkorbinsav). A ligandokat önmagukban és kombinációkban alkalmaztuk a nanorészecskék funkcionálisítására, majd összehasonlítottuk a sejtfelvételi és vér-agy gát penetrációs képességüket a nem célzott nanorészecskékkel. A GSH-val célzott nanorészecskék hatékonyságát több kutatócsoport is igazolta *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokban egyaránt (Geldenhuis és mtsai., 2011; Gaillard és mtsai., 2014; Gaillard és mtsai., 2012; Maussang és mtsai., 2016). A PEG-GSH liposzóma, mint agyi gyógyszerbeviteli platform a klinikai vizsgálatok I/IIa fázisáig is eljutott (Gaillard és mtsai., 2016). Azonban az SLC ligandok közül a biotint, az alanint vagy a leucint előttünk még nem tesztelték nanorészecskék célzó molekulájaként a vér-agy gáton való átjutás elősegítésére.

Kísérleteinkben először biotin, illetve GSH liganddal célzott nanorészecskéket vizsgáltunk agyi endotélsejteken (Veszélka és mtsai., 2017). Eredményeink igazolták, hogy a biotin-jelölés szignifikánsan megnöveli a szilárd nanorészecskék sejtfelvételét és átjutását humán agyi endotélsejtek rétegén a nem jelölt részecskékhez képest. Irodalmi adatok ugyan leírták már, hogy a biotinilált NP-k képesek bejutni az agyba, mivel intravénásan beadott biotinilált albumin NP-ket kimutattak autoimmun encephalomyelitisben szenvedő patkányok több agyi régiójában is sztreptavidin-FITC jelöléssel (Merodio és mtsai., 2000). Ez a megfigyelés azonban csak közvetett bizonyíték, mivel az említett vizsgálat célja nem a biotin hatásának kimutatása volt, hanem az albumin NP-k láthatóvá tétele a CNS-ben a sztreptavidin-biotin kötésnek köszönhetően.

Elsőként igazoltuk, hogy a biotin, amit eddig csak alapvetően az erős avidin-biotin kötésen alapuló ligációs technikákra használtak (Lesch és mtsai., 2010), potenciálisan felhasználható lehet mint nanorészecskék célzó ligandja gyógyszerek hatékonyabb agyi

bejuttatására (Veszelka és mtsai., 2017). Ugyanakkor kísérleteinkben a biotin és a GSH hatékonyságát összehasonlítva mind a sejt felvételi, mind a vér-agy gát penetrációs vizsgálatokban jobb eredményeket kaptunk a GSH esetében, ezzel humán vér-agy gát modellen mi is megerősítettük a GSH, mint célzó molekula hatékonyságát és további kísérleteinkben is vizsgáltuk a GSH-t, mint célzó molekulát.

A nanorészecskék dokkolása a célzó ligandok segítségével az agyi endotélsejtek membránjához a nanohordozók endocitózisának első és egyben kulcs lépése. A GSH-val kapott ígéretes eredmények után az SZBK Biofotonika és Biomikrofluidikai Kutatócsoportjával együttműködésben egy új, innovatív optikai lézercsipesz technikát dolgoztunk ki, ennek az első lépésnek a mérésére. Elsőként sikerült kimérnünk a lézertérrel mozgatott mikroeszközhöz kötött GSH, mint célzó ligand közvetlen kötődési erősségét élő agyi endotélsejtek sejt felszínéhez (Fekete és mtsai., 2021). Az általunk kidolgozott új lézercsipesz technikával az AFM méréseknél érzékenyebben, és nagyon alacsony pN mérettartományba eső kötődési erőket is képesek voltunk kimérni. Kimutattuk a GSH, mint célzó ligand kötődési erősségét élő agyi endotélsejtekhez, mely szignifikánsan magasabb volt, mint a csak PEG funkcionizált mikroeszközök esetében (Fekete és mtsai., 2021). Az általunk kidolgozott innovatív optikai lézercsipesz módszer egyben alkalmas új vér-agy gát célzó ligandok vizsgálatára és kiválasztására a kötődési erők mérése alapján.

A nanorészecskék felszínéhez kötött GSH, mint célzó molekula hatékonyságát tovább vizsgáltuk köldökszinórvér őssejtekből differenciáltatott humán vér-agy gát modellen is, valamint ennek a modellnek a cARLA kezelt változatán, ami szorosabb gátat alkot és jobb vér-agy gát funkciókat mutat (Porkoláb és mtsai., 2024). A csoportunk által szabadalmaztatott cARLA kis molekulák kombinációja, mely a vér-agy gát érésében jelentős három különböző szignalizációs útvonal, a cAMP és a Wnt/ β -katenin jelátvitel fokozásával, illetve a TGF- β útvonal gátlásával erősíti a vér-agy gát funkciókat többek között a kladin-5 expressziójának emelésével, a nemspecifikus endocitózis csökkentésével és a vér-agy gát specifikus SLC transzporterek expressziójának növelésével (Porkoláb és mtsai., 2024). Kimutattuk, hogy a cARLA-kezelés hatására a nem célzott NP-k vér-agy gát átjutása alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, ami összhangban áll a cARLA hatására bekövetkező csökkent endocitózissal. Igazoltuk, hogy a nem célzott és GSH-célzott nanorészecskék vér-agy gát permeabilitása és sejt felvétele közötti szignifikáns különbség a GSH célzott NP-k javára csak a cARLA kezelt csoportban volt kimutatható (Porkoláb és mtsai., 2024). Mindez arra utal, hogy a cARLA a vér-agy gát specifikus fehérjék expressziójának növelésével a GSH transzporterek kifejeződését is növeli, ezáltal elősegíti a nanorészecskék felszínéhez kötött GSH vér-agy gát specifikus célzó hatását.

Az agyi endotélsejtek SLC génjeinek részletes feltérképezésével (Veszelka és mtsai., 2018) számos olyan új szállítófehérje merült fel, amelynek ligandja alkalmas lehet nanorészecskébe zárt hatóanyagok célzott agyi bejuttatására. Kimutattunk, hogy az SLC transzporterek közül a legnagyobb mennyiségben a vér-agy gát elsődleges glükóz transzportere a GLUT1 fejeződik ki, valamint az aminosavakat szállító transzporterek közül az SLC38A és SLC1A család tagjai, és a SLC7A5/LAT1 (Veszelka és mtsai., 2018). Az expressziós mintázat alapján hipotézisünk az volt, hogy a glükózanalógok és aminosavak, illetve ezek kombinációja hatékony és szelektív módszer lehet nanohordozók funkcionizálására, és jobb vér-agy gát átjutást eredményezhet. A glükózt és analógjait, mint targetáló ligandot nioszómákhoz (Dufes és mtsai., 2004) polimer NP-khez (Meng és mtsai., 2025) és arany nanorészecskékhez (Gromnicova és mtsai., 2013) kötve már tesztelték korábban agyi gyógyszerbejutatás fokozására. Azonban az aminosavak közül az alanint és

a leucint NP-k célzóligandjaként, illetve olyan kettős ligand kombinációkat, melyek egyszerre két SLC transzportert is céloznak a vér-agy gáton kísérleteink előtt még nem alkalmaztak.

Elsőként hasonlítottuk össze az egyszeres ligandokkal – glükopiranozzal, alaninnal és GSH-val – funkcionalizált, valamint ezek kettős ligandkombinációjával – alanin-GSH, alanin-glükopiranoz, glükopiranoz-GSH – ellátott nem-ionos felületaktív anyagokból és koleszterinből felépülő nioszómák sejtfelvételét és vér-agy gát átjutását (Mészáros és mtsai., 2018). A nioszómák töltetének a nagy molekulású EBA-t választottuk, amelynek nagyon alacsony a vér-agy gát penetrációja *in vivo* és *in vitro* is (Deli és mtsai., 2005). A célzó molekulák jelenléte a nioszómák felszínén megnövelte az EBA töltet sejtfelvételét a tenyésztett agyi endotélsejtekbe, de szignifikáns növekedést csak az alanin-GSH és az alanin-glükopiranoz kombinációk esetében kaptunk. Igazoltuk, hogy az alanin-GSH kettősen célzott nioszómák sejtfelvétele hőmérsékletfüggő volt, és metabolikus, illetve endocitotikus inhibitorok gátolták. Ez arra utal, hogy aktív energiaigényes folyamatról van szó, nem pedig passzív sejtbejutásról. Kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek glikokalixának negatív felületi töltése szerepet játszik a nioszómák sejtfelvételében, mert a töltés megváltoztatása kationos lipid kezeléssel, vagy a glikokalix neuraminidázzal történő leemésztésével, megnövelte a célzott nanohordozók töltetének sejtfelvételét. Igazoltuk azt is, hogy a nem-ionos felületaktív anyagból felépülő nioszómák megnövelték az agyi endotélsejtek membránfluiditását, ami a nanorészecskék és az endotélsejtek membránfúziójára utal. Ez a hatás a kettősen célzott nioszómáknál még kifejezettebb volt. Méréseink összhangban állnak csoportunk korábbi vizsgálatával, amiben igazoltuk a nem-ionos felületaktív anyagok membrán fluidizáló hatását agyi endotélsejteken (Kiss és mtsai., 2014).

Eredményeink alátámasztották, hogy az egyszeres liganddal célzott NP-khez képest a kettős ligand kombinációval célzott nioszómák szignifikánsan megemelték az EBA töltet permeabilitását az *in vitro* vér-agy gát modellen keresztül, amit *in vivo* is igazolni tudtunk (Mészáros és mtsai., 2018). Adataink elsőként igazolják, hogy azok a nanorészecskék, melyek egyszerre két SLC transzporter ligandjával is jelölve vannak szignifikánsan jobb vér-agy gát penetrációt mutatnak, mint az egyszeresen jelölt részecskék ezért alkalmasak lehetnek agyi gyógyszerbejuttatásra. Kimutattuk azt is, hogy az alkalmazott ligand kombinációk közül az alanin-GSH bizonyult a leghatékonyabbnak (Mészáros és mtsai., 2018).

A nanohordozóba bezárt idegrendszeri gyógyszerhatóanyagoknak azonban nem elegendő csak az agyi endotélsejtek rétegén átjutni, a perivaszkuláris pericitákon és gliasejteken túl el kell érniük a terápiás célpontjaikat, az idegsejteket. Ezért megvizsgáltuk az eddigi kísérleteinkben sikeresen alkalmazott alanin-GSH kettős ligandkombinációval célzott nioszómák bejutását nemcsak az agyi endotélsejtekbe, hanem a neurovaszkuláris egység többi sejtípusába, a pericitákba, asztroglia sejtekbe és a neuronokba is (Porkoláb és mtsai., 2020). Eredményeink igazolták, hogy a neurovaszkuláris egység összes vizsgált sejtípusában lényegesen több EBA-t vettek fel a sejtek, ha az az alanin-GSH célzott nioszómákba volt töltve, mint ha nem célzott nanorészecskékbe. Ez a növekedés több mint kétszeres volt a pericitákban, ami az endocitózis és az NP-k plazmamembránnal való fúziója mellett azzal is összefügghet, hogy a periciták képesek a fagocitózisra is (Daneman és mtsai., 2010). Bár ezek a sejtek számos fontos, idegrendszeri folyamatot szabályoznak, az agyi pericitákat a célzott gyógyszerbejuttatás szempontjából eddig kevésbé vizsgálták. Ezzel szemben a perifériás erek pericitáinak esetében preklinikai vizsgálatok kimutatták, hogy TH10 peptiddel célzott, docetaxellel töltött polimer NP-k melanoma tüdőmetasztázisában

periciták apoptózisát váltották ki egerekben, ami a tumorban antiangiogén hatást eredményezett és ezzel megnyújtotta a túlélési időt (Guan és mtsai., 2014).

Az asztroglia sejtek és tumoraik viszont széles körben elismert gyógyszer-célpontok. Eredményeinkben kimutattuk, hogy a primer patkány asztrociták szignifikánsan jobban vették fel az alanin-GSH célzott nioszómák töltetét, mint a nem célzott NP-eket (*Porkoláb és mtsai., 2020*). Eredményeinket más irodalmi adatok is megerősítik, ahol polimer NP-k GSH jelölése például növelte a kemoterápiás hatású paclitaxel és docetaxel hatóanyagok bejutását C6 és RG2 patkány glióma sejtekbe (Geldenhuys és mtsai., 2011).

Érdekes módon a legnagyobb különbséget az alanin-GSH és a nem célzott nioszómák felvétele között a differenciáltatott humán SH-SY5Y neuronális sejtekben mértük (*Porkoláb és mtsai., 2020*). Ez a 2,2-szeres sejtfelvétel növekedés összhangban van az irodalmi adatokkal, ahol a GSH-funkcionalizált polimer NP-k hasonló hatékonysággal tudtak kurkumint juttatni SK-N-SH neuronális sejtekbe, melyből az SH-SY5Y sejtvonal származik (Paka és mtsai., 2017). Továbbá fluoreszcenciával töltött albumin NP-k felvételének növekedését is leírták vegyes neuron-glia ko-kultúrában, ha a részecskéket GSH-val funkcionalizálták (Patel és mtsai., 2013).

Következő lépésként a 24 órás vér-agy gát permeabilitási vizsgálat után sikeresen kimutattuk a fluoreszcens töltet az élő asztroglia sejtekben is a célzott NP csoportban, ami azt jelzi, hogy az általunk előállított, alanin-GSH kettős ligandkombinációval célzott vezikuláris nanorészecskék nem csak átjutottak a patkány vér-agy gát modellen, de ezt követően képesek voltak bejutni az asztrocitákba is (*Porkoláb és mtsai., 2020*).

Eredményeink arra utalnak, hogy a nanorészecskék alanin-GSH kettős jelölése, mely kombinációt mi alkalmaztuk először, potenciálisan kihasználható gyógyszerek, akár biofarmakonok vér-agy gáton keresztüli átjuttatására és az agy más, terápiás szempontból releváns sejttypusaiba történő bejuttatására.

Annak igazolására, hogy az alanin-GSH vér-agy gátat célzó ligandkombináció a nanorészecskék anyagától függetlenül fokozhatja a vér-agy gát átjutást, más típusú, elágazó, polipeptid nanohordozókat is megvizsgáltunk (*Mészáros és mtsai., 2023*). Ezekben a vizsgálatokban háromkarú, poliglutaminsav anyagú, fluoreszcens rodaminnal jelölt alanin-GSH célzott nanorészecskéket tanulmányoztunk. Fontos továbblépésként nem csak a humán vér-agy gáton való átjutásukat elemeztük, hanem agyi organoidokba való bejutásukat is (*Mészáros és mtsai., 2023*). Konfokális mikroszkópos és spektrofluorometriás vizsgálataink igazolták, hogy a polimer nanorészecskék sejtfelvétele a humán agyi endotélsejtekbe időfüggő módon és szignifikánsan magasabb volt a kettősen célzott nanorészecskék esetében a nem célzott NP csoporttal összehasonlítva. A nanorészecskék sejtbejutása itt is aktív, energiaigényes folyamat volt, amit az endocitózis gátlószerei csökkentettek (*Mészáros és mtsai., 2023*).

Ebben a kísérletsorozatban azt is megvizsgáltuk, hogy a polimer nanorészecskék képesek-e átjutni a vér-agy gáton és azt követően be tudnak-e jutni agyi organoidokba. Ennek méréséhez egy módosított humán ko-kultúra vér-agy gát modellt hoztunk létre, ahol a tenyésztőbetéteken növesztett agyi endotélsejtek és periciták alá a sejttenyésztő lemezek alá egészséges donorok, illetve Parkinson-kóros betegek őssejtjeiből származó középagy-specifikus organoidokat helyeztünk. Megállapítottuk, hogy az alanin-GSH kettős ligandkombinációval ellátott polipeptid nanohordozók nem csak szignifikánsan jobban jutnak át a vér-agy gát modellen a nem célzott részecskékkel összehasonlítva, hanem képesek az agyi organoidokba is hatékonyabban bejutni (*Mészáros és mtsai., 2023*).

Ezzel igazoltuk azt a hipotézisünket, hogy a nanorészecskékhez kötött alanin-GSH, mint célzóligand kombináció jelenléte kulcsfontosságú, és a részecskék anyagától függetlenül mind vezikuláris nanohordozók (*Mészáros és mtsai., 2018, Porkoláb és mtsai.,*

2020), mind elágazó polipeptid NP-k (Mészáros és mtsai., 2023) esetében hatékonyabb sejtbefutást, vér-agy gáton való átjutást, és asztroglia, illetve agyi organoidokba való bejutást eredményez. Legújabb, 2025. februárjában megjelent közleményünkben pedig azt is igazoltuk, hogy a háromkarú alanin-GSH célzott polipeptid nanorészecskék az ibuprofén és a dopamin aktív hatóanyagok jobb átjutását eredményezik a vér-agy gáton át, és elősegítik agyi organoidokba való bejutásukat (Mészáros és mtsai., 2025). Kimutattuk, azt is, hogy a szabad célzóligandok gátolták a célzott nanohordozók felvételét, ami a ligandok döntő szerepére utal a sejt felvételi folyamatban (Mészáros és mtsai., 2025). Bebizonyítottuk, hogy a citokinekkal kiváltott vér-agy gát sérülést az ibuprofén tartalmú, alanin-GSH célzott polipeptid nanorészecskék jelentősen mérsékeltek a szabad ibuprofénhez vagy a nem célzott nanorészecskékhez képest. Ez a hatás azzal magyarázható, hogy az általunk megtervezett kettősen célzott nanohordozók elősegítik az ibuprofén internalizációját és ezzel a gyulladáscsökkentő hatását az agyi endotélsejtekben (Mészáros és mtsai., 2025).

A nanorészecskéink tervezésekor hipotézisünk mindvégig az volt, hogy az agyi endotélsejtek felszíni SLC transzporter mintázatának leginkább megfelelő, többszörös, kettős vagy akár hármas ligandkombinációval jelölt nanohordozók hatékonyabban fognak átjutni a vér-agy gáton, jelentősen növelve ezzel a gyógyszerek agyi bejuttatását. A kettős célzás mellett ezért hármas ligandkombinációt is terveztünk. A GSH mellé az alanin helyett egy másik aminosavat, a vér-agy gát LAT1 transzporének ligandját, a leucint, és harmadik célzó molekulaként az aszkorbinsavat választottuk ki, amely a nátrium-aszkorbinsav kotranszporter SVCT, illetve oxidált állapotban a GLUT1 ligandja (Veszelka és mtsai., 2022). Az így előállított aszkorbinsav-GSH-leucin hármas ligandkombinációval előállított nioszómákkal végzett kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a célzott nanorészecskék jóval hatékonyabban jutnak be az agyi endotélsejtekbe, jutnak át a vér-agy gáton és internalizálódnak agyi organoidokba (Veszelka és mtsai., 2022). Más irodalmi adatok is alátámasztják az aszkorbinsav, mint célzóligand hatékonyságát nanorészecskék felszínéhez kötve. Aszkorbinsavval funkcionális galantamint tartalmazó polimer NP-k fokozták az NP-k sejt szintű felvételét SVCT2 transzportert expresszáló egér fibroblasztokban (Gajbhiye és mtsai., 2017). Ugyanebben a vizsgálatban az aszkorbinsavval konjugált NP-kbe töltött galantamin nagyobb terápiás hatását mutatták ki patkányokon viselkedési tesztekben, valamint biodisztribúciós vizsgálatokban a célzott NP-vel kezelt csoportban látták a peptid legmagasabb agyi koncentrációját (Gajbhiye és mtsai., 2017).

Ugyan az irodalomban az aszkorbinsav és a GSH, mint egyszeres célzóligand hatékonyságát is igazolták már nanorészecske felszínéhez kötve agyi gyógyszerbejuttatás fokozására, a leucint mint lehetséges nanorészecske célzó molekulát, mi írtuk le először. Hasonlóképpen mi állítottunk elő sikeresen elsőként és vizsgáltunk különböző SLC transzportereket egyszerre célzó, aszkorbinsav-GSH-leucin hármas ligand kombinációval ellátott nanorészecskéket és igazoltuk hatékony átjutásukat a vér-agy gáton és bejutásukat agyi organoidokba.

Nanorészecskékkel kapott eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a részecskék célzása kulcsfontosságú a sikeres agyi gyógyszerbejuttatáshoz, és a részecskék felszínének egynél többféle, a vér-agy gát transzportereihez kötődni képes célzó molekulával történő jelölése szignifikánsan megnövelheti az agyi célzás specificitását, és erősebb dokkolást eredményezhet az agyi endotélsejtek felszínéhez, elősegítve ezzel a nanorészecskék endocitózist az agyi endotélsejtekbe, átjutását a vér-agy gáton, valamint bejutását a gliasejtekbe és neuronokba, melyek a gyógyszerhatóanyagok terápiás célpontjai.

Az értekezésemben bemutatott eredmények felhívják a figyelmet a különböző sejtenyészetes vér-agy gát modellek különbözőségére, az egyes modellek előnyeire és

hátrányaira és a megfelelő modell körültekintő kiválasztásának fontosságára. A kollégáimmal, lelkes diákjaimmal és együttműködő partnereink segítségével tett megfigyeléseink hozzájárulnak a vér-agy gát működésének jobb megértéséhez mind fiziológiás mind pedig patológias körülmények esetében. Reményeink szerint az általunk leírt, az agyi gyógyszerbejuttatás fokozására irányuló módszerek hozzájárulhatnak a jövőben új terápiás lehetőségek kidolgozásához és az idegrendszeri betegségek hatékonyabb kezeléséhez.

6. TOVÁBBI KUTATÁSI IRÁNYOK ÉS TERVEK

Jelenleg folyó kutatásaink egyik fő iránya az agyi endotélsejtek működésének javítása kis molekulák és módosított mRNS tartalmú lipid nanopartikulumok segítségével az iszkémiás sztrók sejtenyészetes modelljében. A sztrók kutatások fókuszában még ma is elsősorban a neuroprotekción és a neuroregeneráció vizsgálata áll, ugyanakkor tudjuk, hogy a vér-agy gát sérülése központi probléma sztrók esetében is, ezért a vér-agy gát védelme fontos terápiás célpont (Sweeney és mtsai., 2019).

Előzetes kutatási eredményeink és perifériás endotélsejteken nyert irodalmi adatok alapján az a hipotézisünk, hogy a KLF2 útvonal aktiválásával, mely a vaszkuláris endotélsejtek tulajdonságainak és a glikolízisnek közös szabályozója, nemcsak a vér-agy gát tulajdonságok fokozhatóak, hanem a vér-agy gát működése is javítható az agyi iszkémia modelljében. A véráramlás érzékelésében kulcsfontosságú KLF2 transzkripciós faktornak a perifériás erek endotélsejtjeiben értágító, gyulladáscsökkentő és anti-trombotikus hatása van, növeli a metabolikus aktivitást és gátolja a glikolízis enzimeit (Wu and Birukov, 2019). A KLF2 szerepe azonban még nem teljesen ismert az agyi endotélsejtek metabolizmusában és a vér-agy gát funkciók szabályozásában.

Két fontos és újszerű megközelítés áll a jelenlegi kutatómunkánk középpontjában. Az első az agyi endotélsejtek metabolomikai vizsgálata, amit eddig alig tanulmányoztak a vér-agy gáton. Az agyi endotélsejtek metabolikus állapota ugyanis szoros kapcsolatban áll a vér-agy gát működésével, ilyen jellegű metabolomikai adat azonban még kevés áll a rendelkezésünkre (Huang és mtsai., 2020). Jelenleg az agyi endotélsejtekben a glikolízis és az oxidatív metabolizmus közötti váltás molekuláris szabályozóit vizsgáljuk élettani körülmények között és oxigén és glükóz megvonás után *in vitro* sztrók modellben.

A másik újszerű megközelítés a legkorszerűbb, lipid nanopartikulumba csomagolt, módosított mRNS alkalmazása, mellyel terveink szerint javíthatjuk a vér-agy gát működését és kivédhetjük a sztrók okozta károsodásokat humán agyi endotélsejtekben. A rendelkezésre álló génbeviteli technikák rossz hatásfokúak az agyi endotélsejtek esetében, melyre megoldást jelenthet ez az innovatív módszer (Burkhart és mtsai., 2015; Burkhart és mtsai., 2017; Zhang és mtsai., 2021; Karikó, 2021). Jelenleg folyik a módosított mRNS tartalmú nanorészecskék előállítása.

A KLF2 útvonal aktiválása kis molekulákkal, mint például a cARLA molekula-kombinációval, vagy módosított mRNS-t tartalmazó lipid nanopartikulumok segítségével, új terápiás célpont lehet az agyi erek és a vér-agy gát védelmében. Ez a koncepció nemcsak sztrókban, hanem más, a vér-agy gát működés zavarával járó betegség esetében is hasznosnak bizonyulhat. A sikeres génbevitel agyi endotélsejtekbe pedig új távlatokat nyithat meg az mRNS-t tartalmazó szilárd lipid nanorészecskék gyakorlati alkalmazhatóságában.

Az agyi endotélsejtek védelme mellett a kutatómunkánk másik fontos iránya egy új humán őssejt alapú vér-agy gát modell kidolgozása. Jelenlegi kísérleteinkhez köldökszinórvérből származó, hematopoietikus őssejtekből differenciáltatott humán endotélsejtek és agyi pericita sejtek ko-kultúra modelljét használjuk, melynek vér-agy gát tulajdonságait a cARLA kezelés segítségével fokozzuk (*Porkoláb és mtsai., 2024*). Célunk azonban, hogy humán indukált pluripotens őssejtek differenciáltatásával új, akár betegség specifikus vér-agy gát modellt hozzunk létre.

Az elmúlt években a szakirodalomban több humán őssejteken alapuló vér-agy gát modellt is leírtak. A jelenlegi humán őssejtes vér-agy gát modellek alapvető problémája, hogy nagyon sok szoros paracelluláris barrier tulajdonsággal rendelkező modell neuroepitélsejt tulajdonságokkal rendelkezik (Lippmann és mtsai., 2012), míg az érendotél sajátosságokkal rendelkező modellek paracelluláris gátműködése nem megfelelő kismolekulák átjutásának vizsgálatára (Cecchelli és mtsai., 2014). Jelenlegi kutatásaink során együttműködő partnerek segítségével humán pluripotens őssejteket állítunk elő, melyeket differenciáltatva valódi endotélsejtes, szoros gáttulajdonságokkal rendelkező vér-agy gát modellt szeretnénk létrehozni. Ez a technológia lehetővé teszi a jövőben, hogy akár betegekből származó őssejtek felhasználásával a vér-agy gát működési zavaraival járó kórállapotokat vizsgáljunk, utat nyitva ezzel a személyre szabott orvoslás felé. A humán őssejt alapú vér-agy gát modellek lehetőséget adhatnak az agyi gyógyszerbevitel pontosabb becslésére és gyógyszeripari szűrővizsgálatokra is, valamint fontos szempont, hogy a humán őssejt alapú modellek használatával eleget tehetünk az állatkísérletek csökkentését, helyettesítését és tökéletesítését célzó 3R – replacement, reduction, refinement – alapelvnek.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006, 7(1):41-53.
- Abdelkader H, Alani AW, Alany RG. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Deliv.* 2014; 21(2): 87-100.
- Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):C343-C356.
- Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Münch G. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem.* 2005 Jan;92(2):255-63.
- Akel H, Csóka I, Ambrus R, Bocsik A, Gróf I, Mészáros M, Szecskó A, Kozma G, Veszelka S, Deli MA, Kónya Z, Katona G. In Vitro Comparative Study of Solid Lipid and PLGA Nanoparticles Designed to Facilitate Nose-to-Brain Delivery of Insulin. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 9;22(24):13258.
- Alomar F, Singh J, Jang HS, Rozanzki GJ, Shao CH, Padanilam BJ, Mayhan WG, Bidasee KR. Smooth muscle-generated methylglyoxal impairs endothelial cell-mediated vasodilation of cerebral microvessels in type 1 diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2016 Dec;173(23):3307-3326.
- Angeloni C, Zamboni L, Hrelia S. Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:238485.
- Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med.* 2019 Sep 5;4(3):e10143.
- Armulik, A., G. Genov'e, M.M'ae, M.H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, et al. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 468:557–561.
- Avdeef, A., Deli, M. A., and Neuhaus, W. "In vitro assays for assessing BBB permeability: artificial membrane and cell culture models," in *Blood- Brain Barrier in Drug Discovery: optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*, eds L. Di and E. H. Kerns (New Jersey, NJ: John Wiley & Sons), 2015, 188–237.
- Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.* 2009, 9(Suppl 1):S3.
- Banks, W. A. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016, 15, 275–292.
- Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release.* 2012 Jun 10;160(2):117-34.
- Bauer B, Hartz AM, Lucking JR, Yang X, Pollack GM, Miller DS. Coordinated nuclear receptor regulation of the efflux transporter, Mrp2, and the phase-II metabolizing enzyme, GSTpi, at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Jun;28(6):1222-34.
- Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):869-901.
- Bechter K. Updating the mild encephalitis hypothesis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Apr 5;42:71-91.

- Beerl MS, Moshier E, Schmeidler J, Godbold J, Uribarri J, Reddy S, Sano M, Grossman HT, Cai W, Vlassara H, Silverman JM. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mech Ageing Dev.* 2011 Nov-Dec;132(11-12):583-7.
- Berends E, van Oostenbrugge RJ, Foulquier S, Schalkwijk CG. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, as a threat for blood brain barrier integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2023 Oct 24;20(1):75.
- Bjelik A, Bereczki E, Gonda S, Juhász A, Rimanóczy A, Zana M, Csont T, Pákási M, Boda K, Ferdinandy P, Dux L, Janka Z, Sántha M, Kálmán J. Human apoB overexpression and a high-cholesterol diet differently modify the brain APP metabolism in the transgenic mouse model of atherosclerosis. *Neurochem Int.* 2006 Sep;49(4):393-400.
- Bocsik A, Walter FR, Gyebrovski A, Fülöp L, Blasig I, Dabrowski S, Ötvös F, Tóth A, Rákhely G, Veszelka S, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA. Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides. *J Pharm Sci.* 2016 Feb ;105(2):754-765.
- Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, Betz AL, Goldstein GW. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol.* 1983 Oct;14(4):396-402.
- Burkhart A, Andresen TL, Aigner A, Thomsen LB, Moos T. Transfection of primary brain capillary endothelial cells for protein synthesis and secretion of recombinant erythropoietin: a strategy to enable protein delivery to the brain. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Jul;74(13):2467-2485.
- Burkhart A, Thomsen LB, Thomsen MS, Lichota J, Fazakas C, Krizbai I, Moos T. Transfection of brain capillary endothelial cells in primary culture with defined blood-brain barrier properties. *Fluids Barriers CNS.* 2015 Aug 7;12:19.
- Camire RB, Beaulac HJ, Brule SA, McGregor AI, Lauria EE, Willis CL. Biphasic modulation of paracellular claudin-5 expression in mouse brain endothelial cells is mediated through the phosphoinositide-3-kinase/AKT pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Dec;351(3):654-62.
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszelka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 2014; 45:610-638.
- Caramelli P, Nitrini R, Maranhão R, Lourenço AC, Damasceno MC, Vinagre C, Caramelli B. Increased apolipoprotein B serum concentration in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 1999 Jul;100(1):61-3.
- Carl SM, Lindley DJ, Das D, Couraud PO, Weksler BB, Romero I, Mowery SA, Knipp GT. ABC and SLC transporter expression and proton oligopeptide transporter (POT) mediated permeation across the human blood--brain barrier cell line, hCMEC/D3 [corrected]. *Mol Pharm.* 2010 Aug 2;7(4):1057-68.
- Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, Karachi C, Leclercq D, Lafon C, Chapelon JY, Capelle L, Cornu P, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Idhah A. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 15;8(343):343re2.
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck MP, Ferreira L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 2014 Jun 17;9(6):e99733.
- César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, Reithmeier RA, Hepworth D, Hediger MA, Edwards AM, Superti-Furga G. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell.* 2015 Jul 30;162(3):478-87.
- Chang T, Wu L. Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Dec;84(12):1229-38.

- Chen Y, Andres AL, Frotscher M, Baram TZ. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front Cell Neurosci.* 2012 Apr 3;6:13.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):588-600.
- Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009 Jul;5(7):374-81.
- Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, Csonka C, Puskás LG, Sántha M, Ferdinandy P. Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2007 Oct 1;76(1):100-9.
- Dabrowski S, Staat C, Zwanziger D, Sauer RS, Bellmann C, Günther R, Krause E, Haseloff RF, Rittner H, Blasig IE. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Jan 1;22(1):1-14.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010 Nov 25;468(7323):562-6.
- Dauchy S, Miller F, Couraud PO, Weaver RJ, Weksler B, Romero IA, Scherrmann JM, De Waziers I, Declèves X. Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 1;77(5):897-909.
- De Klerk OL, Bosker FJ, Luurtsema G, Nolte IM, Dierckx R, Den Boer JA, Potschka H. The role of p-glycoprotein in psychiatric disorders: a reliable guard of the brain? *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2011 Sep 1;11(3):197-209.
- Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem.* 1990 May;54(5):1798-801.
- Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem.* 1990 May;54(5):1798-801.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005; 25:59-127.
- Deli MA, Abrahám CS, Niwa M, Falus A. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm Res.* 2003 Apr;52 Suppl 1:S39-40.
- Deli MA, Joó F. Cultured vascular endothelial cells of the brain. *Keio J Med.* 45:183-199, 1996
- Deli MA, Németh L, Falus A, Abrahám CS. Effects of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine on the blood-brain barrier permeability in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2000 Jan 3;387(1):63-72.
- Deli MA, Porkoláb G, Kincses A, Mészáros M, Szecskó A, Kocsis AE, Vigh JP, Valkai S, Veszelka S, Walter FR, Dér A. Lab-on-a-chip models of the blood-brain barrier: evolution, problems, perspectives. *Lab Chip.* 2024 Feb 27;24(5):1030-1063.
- Deli MA. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates*, editors: Tihanyi K and Vastag M., Bentham E-books, 2011, pp. 144-165.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1788: 892-910.
- Dion-Albert L, Cadoret A, Doney E, Kaufmann FN, Dudek KA, Daigle B, Parise LF, Cathomas F, Samba N, Hudson N, Lebel M; Signature Consortium; Campbell M,

- Turecki G, Mechawar N, Menard C. Vascular and blood-brain barrier-related changes underlie stress responses and resilience in female mice and depression in human tissue. *Nat Commun.* 2022 Jan 10;13(1):164.
- Dithmer S, Staat C, Müller C, Ku MC, Pohlmann A, Niendorf T, Gehne N, Fallier-Becker P, Kittel Á, Walter FR, Veszelka S, Deli MA, Blasig R, Haseloff RF, Blasig IE, Winkler L. Claudin peptidomimetics modulate tissue barriers for enhanced drug delivery. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Jun;1397(1):169-184.
- Dufes C, Gaillard F, Uchegbu IF, Schätzlein AG, Olivier JC, Muller JM. Glucose-targeted niosomes deliver vasoactive intestinal peptide (VIP) to the brain. *Int J Pharm.* 2004 Nov 5;285(1-2):77-85.
- Emsley JG, Macklis JD. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2006 Aug;2(3):175-86.
- Enerson BE and Drewes LR. The rat blood-brain barrier transcriptome. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006, 26: 959-973.
- Fekete T, Mészáros M, Szegletes Z, Vizsnyiczai G, Zimányi L, Deli MA, Veszelka* S, Kelemen L*. Optically Manipulated Microtools to Measure Adhesion of the Nanoparticle-Targeting Ligand Glutathione to Brain Endothelial Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021 Aug 25;13(33):39018-39029.
- Fischer S, Wiesnet M, Renz D, Schaper W. H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur J Cell Biol.* 2005 Jul;84(7):687-97.
- Foti Cuzzola V, Galuppo M, Iori R, De Nicola GR, Cassata G, Giacoppo S, Bramanti P, Mazzon E. Beneficial effects of (RS)-glucoraphanin on the tight junction dysfunction in a mouse model of restraint stress. *Life Sci.* 2013 Aug 28;93(7):288-305.
- Gaillard PJ, Appeldoorn CC, Dorland R, van Kregten J, Manca F, Vugts DJ, Windhorst B, van Dongen GA, de Vries HE, Maussang D, van Tellingen O. Pharmacokinetics, brain delivery, and efficacy in brain tumor-bearing mice of glutathione pegylated liposomal doxorubicin (2B3-101). *PLoS One.* 2014 Jan 8;9(1):e82331.
- Gaillard PJ, Appeldoorn CC, Rip J, Dorland R, van der Pol SM, Kooij G, de Vries HE, Reijerkerk A. Enhanced brain delivery of liposomal methylprednisolone improved therapeutic efficacy in a model of neuroinflammation. *J Control Release* 2012, 164:364-369.
- Gaillard PJ. BBB crossing assessment and BBB crossing technologies in CNS Drug Discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2016 Jun;20:1-3.
- Gajbhiye KR, Gajbhiye V, Siddiqui IA, Pilla S, Soni V. Ascorbic acid tethered polymeric nanoparticles enable efficient brain delivery of galantamine: An in vitro-in vivo study. *Sci Rep.* 2017 Sep 11;7(1):11086.
- Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, Lindmark T, Mabondzo A, Nilsson JE, Raub TJ, Stanimirovic D, Terasaki T, Oberg JO, Osterberg T. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro.* 2005 Apr;19(3):299-334.
- Geldenhuys W, Mbimba T, Bui T, Harrison K, Sutariya V. Brain-targeted delivery of paclitaxel using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *J Drug Target.* 2011 Nov;19(9):837-45.
- Gessner I, Neundorff I. Nanoparticles Modified with Cell-Penetrating Peptides: Conjugation Mechanisms, Physicochemical Properties, and Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 6;21(7):2536.
- González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):729-56.

- Goppert TM, Muller RH. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target*. 2005; 13:179-187.
- Greenwood J, Pryce G, Devine L, Male DK, dos Santos WL, Calder VL, Adamson P. SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *J Neuroimmunol*. 1996 Dec;71(1-2):51-63.
- Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, Romero IA, Lund T, Roitt IM, Phillips JB, Male DK. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. *PLoS One*. 2013 Dec 5;8(12):e81043.
- Guan YY, Luan X, Xu JR, Liu YR, Lu Q, Wang C, Liu HJ, Gao YG, Chen HZ, Fang C. Selective eradication of tumor vascular pericytes by peptide-conjugated nanoparticles for antiangiogenic therapy of melanoma lung metastasis. *Biomaterials*. 2014 Mar;35(9):3060-70.
- Hanin I. The Gulf War, stress and a leaky blood-brain barrier. *Nat Med*. 1996 Dec;2(12):1307-8.
- Hashimoto Y, Greene C, Munnich A, Campbell M. The CLDN5 gene at the blood-brain barrier in health and disease. *Fluids Barriers CNS*. 2023 Mar 28;20(1):22.
- Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, Dehertogh P, Fisher K, Fossati L, Hovenkamp E, Korjamo T, Masungi C, Maubon N, Mols R, Müllertz A, Mönkkönen J, O'Driscoll C, Oppers-Tiemissen HM, Ragnarsson EG, Rooseboom M, Ungell AL. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur J Pharm Sci*. 2008 Dec 18;35(5):383-96.
- 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.
- Hellinger E, Veszelka 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.
- Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, Förster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, Stebbins MJ, Vandenhaute E, Weksler B, Brodin B. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 May;36(5):862-90.
- Herman RE, Makienko EG, Prieve MG, Fuller M, Houston ME Jr, Johnson PH. Phage display screening of epithelial cell monolayers treated with EGTA: identification of peptide FDFWTP that modulates tight junction activity. *J Biomol Screen*. 2007 Dec;12(8):1092-101.
- Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J*. 2008 Sep;10(3):455-72.
- Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, Veszelka S, Tóth A, Kis L, Kurunczi A, Balogh G, Kürti L, Eros I, Szabó-Révész P, Deli MA. Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 May;72(1):252-9.
- Horváth T, Bartos C, Bocsik A, Kiss L, Veszelka S, Deli MA, Újhelyi G, Szabó-Révész P, Ambrus R. Cytotoxicity of Different Excipients on RPMI 2650 Human Nasal Epithelial Cells. *Molecules*. 2016 May 18;21(5):658.
- Hoyk Z, Tóth ME, Lénárt N, Nagy D, Dukay B, Csefová A, Zvara Á, Seprényi G, Kincses A, Walter FR, Veszelka S, Vigh J, Barabási B, Harazin A, Kittel Á, Puskás LG, Penke

- B, Vigh L, Deli MA, Sántha M. Cerebrovascular Pathology in Hypertriglyceridemic APOB-100 Transgenic Mice. *Front Cell Neurosci.* 2018 Oct 25; 12:380.
- Huang RR, Hu W, Yin YY, Wang YC, Li WP, Li WZ. Chronic restraint stress promotes learning and memory impairment due to enhanced neuronal endoplasmic reticulum stress in the frontal cortex and hippocampus in male mice. *Int J Mol Med.* 2015 Feb;35(2):553-9.
- Huang SF, Fischer S, Koshkin A, Laczko E, Fischer D, Ogunshola OO. Cell-specific metabolomic responses to injury: novel insights into blood-brain barrier modulation. *Sci Rep.* 2020 May 8;10(1):7760
- Huang YT, Hong FF, Yang SL. Atherosclerosis: The Culprit and Co-victim of Vascular Dementia. *Front Neurosci.* 2021 Aug 6; 15:673440.
- Hülper P, Veszelka S, Walter FR, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2013 Aug;169(7):1561-73.
- Illum L. Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. *J Control Release.* 2012 Jul 20;161(2):254-63.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* 2005, 100:1-11.
- Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci.* 2011 Dec;32(6):993-1005.
- Kang YS, Lee KE, Lee NY, Terasaki T. Donepezil, tacrine and alpha-phenyl-n-tert-butyl nitron (PBN) inhibit choline transport by conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines (TR-BBB). *Arch Pharm Res.* 2005 Apr;28(4):443-50.
- Karikó K. Modified uridines are the key to a successful message. *Nat Rev Immunol.* 2021 Oct;21(10):619.
- Katona G, Sipos B, Budai-Szűcs M, Balogh GT, Veszelka S, Gróf I, Deli MA, Volk B, Szabó-Révész P, Csóka I. Development of In Situ Gelling Meloxicam-Human Serum Albumin Nanoparticle Formulation for Nose-to-Brain Application. *Pharmaceutics.* 2021 May 1;13(5):646.
- Kaur S, Zilmer K, Leping V, Zilmer M. Serum methylglyoxal level and its association with oxidative stress and disease severity in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2013 aug;305(6):489-94.
- Kelly SD, Harrell CS, Neigh GN. Chronic stress modulates regional cerebral glucose transporter expression in an age-specific and sexually-dimorphic manner. *Physiol Behav.* 2014 Mar 14; 126:39-49.
- Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* 2006 Jun;20(8):1185-7.
- Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Füredi A, Szakács G, Veszelka S, Sipos P, Ózsvári B, Puskás LG, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA. Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit p-glycoprotein in caco-2 intestinal epithelial cells. *J Pharm Sci.* 2014 Oct;103(10):3107-19.
- Knox EG, Aburto MR, Clarke G, Cryan JF, O'Driscoll CM. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry.* 2022 Jun;27(6):2659-2673.
- Kono S, Deguchi K, Morimoto N, Kurata T, Yamashita T, Ikeda Y, Narai H, Manabe Y, Takao Y, Kawada S, Kashihara K, Takehisa Y, Inoue S, Kiriya H, Abe K. Intravenous thrombolysis with neuroprotective therapy by edaravone for ischemic

- stroke patients older than 80 years of age. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013 Oct;22(7):1175-83.
- Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 May; 71:2-14.
- Kuhla B, Lüth HJ, Haferburg D, Boeck K, Arendt T, Münch G. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun; 1043:211-6.
- Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Nov 27;252(3):711-5.
- Kürti L, Gáspár R, Márki Á, Kápolna E, Bocsik A, Veszelka S, Bartos C, Ambrus R, Vastag M, Deli MA, Szabó-Révész P. In vitro and in vivo characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Sep 27;50(1):86-92.
- Kürti L, Veszelka S, Bocsik A, Dung NT, Ozsvári B, Puskás LG, Kittel A, Szabó-Révész P, Deli MA. The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier. *Toxicol In Vitro.* 2012 Apr;26(3):445-54.
- Lamprea-Montealegre JA, Arnold AM, McClelland RL, Mukamal KJ, Djousse L, Biggs ML, Siscovick DS, Tracy RP, Beisswenger PJ, Psaty BM, Ix JH, Kizer JR. Plasma Levels of Advanced Glycation Endproducts and Risk of Cardiovascular Events: Findings From 2 Prospective Cohorts. *J Am Heart Assoc.* 2022 Aug 2;11(15):e024012.
- Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Sep;41(9):1166-73.
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnology.* 2012 Aug;30(8):783-91.
- Lee NY, Choi HO, Kang YS. The acetylcholinesterase inhibitors competitively inhibited an acetyl L-carnitine transport through the blood-brain barrier. *Neurochem Res.* 2012 Jul;37(7):1499-507.
- Lénárt N, Szegedi V, Juhász G, Kasztner A, Horváth J, Bereczki E, Tóth ME, Penke B, Sántha M. Increased tau phosphorylation and impaired presynaptic function in hypertriglyceridemic ApoB-100 transgenic mice. *PLoS One.* 2012;7(9): e46007.
- Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vigh L, Puskás LG, Sántha M, Deli MA. Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS.* 2015 Jul 17; 12:17.
- Lesch HP, Kaikkonen MU, Pikkarainen JT, Ylä-Herttuala S. Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 May;7(5):551-64.
- Li J, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, Hidalgo IJ. Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the in vitro efflux of statin drugs. *Drug Metab Dispos.* 2011 Jul;39(7):1196-202.
- Li L, Cao D, Garber DW, Kim H, Fukuchi K. Association of aortic atherosclerosis with cerebral beta-amyloidosis and learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2155-64.
- Li W, Maloney RE, Circu ML, Alexander JS, Aw TY. Acute carbonyl stress induces occludin glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction: role for glutathione-dependent metabolism of methylglyoxal. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jan; 54:51-61.

- Li W, Xu H, Hu Y, He P, Ni Z, Xu H, Zhang Z, Dai H. Edaravone protected human brain microvascular endothelial cells from methylglyoxal-induced injury by inhibiting AGEs/RAGE/oxidative stress. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9): e76025.
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2012 Aug;30(8):783-91.
- Liu J, Wang R, Desai K, Wu L. Upregulation of aldolase B and overproduction of methylglyoxal in vascular tissues from rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Res*. 2011 Dec 1;92(3):494-503.
- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2005 Jan;2(1):86-98.
- Lu KJ, Yang CH, Sheu JR, Chung CL, Jayakumar T, Chen CM, Hsieh CY. Overexpressing glyoxalase 1 attenuates acute hyperglycemia-exacerbated neurological deficits of ischemic stroke in mice. *Transl Res*. 2023 Nov; 261:57-68.
- Mahringer A, Puris E, Fricker G. Crossing the blood-brain barrier: A review on drug delivery strategies using colloidal carrier systems. *Neurochem Int*. 2021 Jul;147: 105017.
- Malfitano AM, Marasco G, Proto MC, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. Statins in neurological disorders: an overview and update. *Pharmacol Res*. 2014 Oct; 88:74-83.
- Marques F, Sousa JC, Sousa N, Palha JA. Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2013 Oct 22; 8:38.
- Martins IJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2009 Dec;111(6):1275-308.
- Matsuno H, Tsuchimine S, O'Hashi K, Sakai K, Hattori K, Hidese S, Nakajima S, Chiba S, Yoshimura A, Fukuzato N, Kando M, Tatsumi M, Ogawa S, Ichinohe N, Kunugi H, Sohya K. Association between vascular endothelial growth factor-mediated blood-brain barrier dysfunction and stress-induced depression. *Mol Psychiatry*. 2022 Sep;27(9):3822-3832.
- Maussang D, Rip J, van Kregten J, van den Heuvel A, van der Pol S, van der Boom B, Reijerkerk A, Chen L, de Boer M, Gaillard P, de Vries H. Glutathione conjugation dose-dependently increases brain-specific liposomal drug delivery in vitro and in vivo. *Drug Discov Today Technol*. 2016 Jun;20:59-69.
- McCarthy DJ, Malhotra M, O'Mahony AM, Cryan JF, O'Driscoll CM. Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharm Res*. 2015 Apr;32(4):1161-85.
- Meng Q, Zhang X, Chen Y, Yang H, Liu J, Yang Z, Lei J, Lu F, Hao D, Feng L, Wang Y. Nanoparticles modified with glucose analogs to enhance the permeability of the blood-brain barrier and their accumulation in the epileptic brain. *J Mater Chem B*. 2025 Feb 19;13(8):2810-2819.
- Merodio M, Irache JM, Eclancher F, Mirshahi M, Villarroya H. Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis. *J Drug Target*. 2000;8(5):289-303.
- Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Páli EK, Polgár TF, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, Veszelka S. Targeting Human Endothelial Cells with Glutathione and Alanine Increases the Crossing of a Polypeptide Nanocarrier through a Blood-Brain Barrier Model and Entry to Human Brain Organoids. *Cells*. 2023 Feb 3;12(3):503.
- Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Szecskó A, Páli EK, Cser NM, Polgár TF, Kecskeméti G, Walter FR, Schwamborn JC, Janáky T, Jan JS, Veszelka S,

- Deli MA. Alanine and glutathione targeting of dopamine- or ibuprofen-coupled polypeptide nanocarriers increases both crossing and protective effects on a blood-brain barrier model. *Fluids Barriers CNS*. 2025 Feb 19;22(1):18.
- Mészáros M, Porkoláb G, Kiss L, Pilbat AM, Kóta Z, Kupihár Z, Kéri A, Galbács G, Siklós L, Tóth A, Fülöp L, Csete M, Sipos Á, Hülper P, Sipos P, Páli T, Rákhely G, Szabó-Révész P, Deli MA, Veszelka S. Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier. *Eur J Pharm Sci*. 2018 Oct 15; 123:228-240.
- Meszaros ZS, Perl A, Faraone SV. Psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *J Clin Psychiatry*. 2012 Jul;73(7):993-1001.
- Moheimani F, Morgan PE, van Reyk DM, Davies MJ. Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: possible links between diabetes and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun;1802(6):561-71.
- Mukohda M, Okada M, Hara Y, Yamawaki H. Exploring mechanisms of diabetes-related macrovascular complications: role of methylglyoxal, a metabolite of glucose on regulation of vascular contractility. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(3):303-10.
- Münch G, Westcott B, Menini T, Gugliucci A. Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids*. 2012 Apr;42(4):1221-36.
- Najjar S, Pearlman DM, Devinsky O, Najjar A, Zagzag D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. *J Neuroinflammation*. 2013 Dec 1;10:142.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*. 2009 Mar-Apr;54(3-4):253-63.
- Nakanishi H, Yonezawa A, Matsubara K, Yano I. Impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain distribution of antiepileptic drugs in knockout mouse models. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jun 15;710(1-3):20-8.
- Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016 May;1862(5):887-900.
- Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, Davis T, Engelhardt B, Grammas P, Nedergaard M, Nutt J, Pardridge W, Rosenberg GA, Smith Q, Drewes LR. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 2008 Jan;7(1):84-96
- Neves V, Aires-da-Silva F, Morais M, Gano L, Ribeiro E, Pinto A, Aguiar S, Gaspar D, Fernandes C, Correia JDG, Castanho MARB. Novel Peptides Derived from Dengue Virus Capsid Protein Translocate Reversibly the Blood-Brain Barrier through a Receptor-Free Mechanism. *ACS Chem Biol*. 2017; 12(5):1257-1268.
- Nickels SL, Modamio J, Mendes-Pinheiro B, Monzel AS, Betsou F, Schwamborn JC. Reproducible generation of human midbrain organoids for in vitro modeling of Parkinson's disease. *Stem Cell Res*. 2020 Jul; 46:101870.
- Northrop NA, Yamamoto BK. Persistent neuroinflammatory effects of serial exposure to stress and methamphetamine on the blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Dec;7(4):951-68.
- Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res*. 2007 Sep;24(9):1745-58.

- Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem*. 2008 Jan;104(1):147-54.
- Okouchi M, Okayama N, Aw TY. Preservation of cellular glutathione status and mitochondrial membrane potential by N-acetylcysteine and insulin sensitizers prevent carbonyl stress-induced human brain endothelial cell apoptosis. *Curr Neurovasc Res*. 2009 Nov;6(4):267-78.
- Omori K, Shikata Y, Sarai K, Watanabe N, Wada J, Goda N, Kataoka N, Shikata K, Makino H. Edaravone mimics sphingosine-1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement in human microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Nov;293(5):C1523-31.
- Paka GD, Ramassamy C. Optimization of Curcumin-Loaded PEG-PLGA Nanoparticles by GSH Functionalization: Investigation of the Internalization Pathway in Neuronal Cells. *Mol Pharm*. 2017 Jan 3;14(1):93-106.
- Panula P, Joó F, Rechart L. Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. *Experientia*. 1978 Jan 15;34(1):95-7.
- Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32:1959-1972.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19(8):1059-72.
- Pardridge WM. Drug and gene targeting to brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 2002 Feb;1(2):131-139.
- Pardridge WM. Treatment of Alzheimer's Disease and Blood-Brain Barrier Drug Delivery. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Nov 16;13(11):394.
- Patel PJ, Acharya NS, Acharya SR. Development and characterization of glutathione-conjugated albumin nanoparticles for improved brain delivery of hydrophilic fluorescent marker. *Drug Deliv*. 2013 Apr-May;20(3-4):143-55.
- Phillips SA, Thornalley PJ. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem*. 1993 Feb 15;212(1):101-5.
- Porkoláb G, Mészáros M, Szecskó A, Vigh JP, Walter FR, Figueiredo R, Kálomista I, Hoyk Z, Vizsnyiczai G, Gróf I, Jan JS, Gosselet F, Pirity MK, Vastag M, Hudson N, Campbell M, Veszelka S, Deli MA. Synergistic induction of blood-brain barrier properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 May 21;121(21):e2316006121.
- Porkoláb G, Mészáros M, Tóth A, Szecskó A, Harazin A, Szegletes Z, Ferenc G, Blastyák A, Mátés L, Rákhely G, Deli MA, Veszelka S. Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit. *Pharmaceutics*. 2020 Jul 7;12(7):635
- Potschka H. Role of CNS efflux drug transporters in antiepileptic drug delivery: overcoming CNS efflux drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 Jul;64(10):943-52.
- Prasad S, Sajja RK, Naik P, Cucullo L. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigil*. 2014 Jun;2(2):125.
- 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.
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci*. 2003 Apr;6(4):345-51.
- Quan Y, Jin Y, Faria TN, Tilford CA, He A, Wall DA, Smith RL, Vig BS. Expression Profile of Drug and Nutrient Absorption Related Genes in Madin-Darby Canine Kidney

- (MDCK) Cells Grown under Differentiation Conditions. *Pharmaceutics*. 2012 Jun 18;4(2):314-33.
- Rabbani N, Godfrey L, Xue M, Shaheen F, Geoffrion M, Milne R, Thornalley PJ. Glycation of LDL by methylglyoxal increases arterial atherogenicity: a possible contributor to increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *Diabetes*. 2011 Jul;60(7):1973-80.
- Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Methylglyoxal comes of AGE. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):258-60.
- Rask-Andersen M, Masuram S, Fredriksson R, Schiöth HB. Solute carriers as drug targets: current use, clinical trials and prospective. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):702-10.
- 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, Lebowitz 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.
- Rhein S, Inderhees J, Herrmann O, Othman A, Begemann K, Fleming T, Nawroth PP, Klika KD, Isa R, König IR, Royle G, Schwaninger M. Glyoxal in hyperglycaemic ischemic stroke - a cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2023 Jul 12;22(1):173.
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1994 Apr;159(1):101-13.
- Sabbagh M, Zahiri HR, Ceimo J, Cooper K, Gaul W, Connor D, Sparks DL. Is there a characteristic lipid profile in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 2004 Dec;6(6):585-9; discussion 673-81.
- Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, Nishikawa K, Irie K, Ogura Y, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science*. 2015 Feb 13;347(6223):775-8.
- Sántha P, Pákáski M, Fazekas OC, Fodor EK, Kálmán S, Kálmán J Jr, Janka Z, Szabó G, Kálmán J. Restraint stress in rats alters gene transcription and protein translation in the hippocampus. *Neurochem Res*. 2012 May;37(5):958-64.
- Sántha P, Veszelka S, Hoyk Z, Mészáros M, Walter FR, Tóth AE, Kiss L, Kincses A, Oláh Z, Seprényi G, Rákhely G, Dér A, Pákáski M, Kálmán J, Kittel Á, Deli MA. Restraint Stress-Induced Morphological Changes at the Blood-Brain Barrier in Adult Rats. *Front Mol Neurosci*. 2016 Jan 14; 8:88.
- Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release*. 2016 Aug 10;235:34-47.
- Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet*. 1998 Feb;18(2):188-91.
- Sharma HS, Cervós-Navarro J, Dey PK. Increased blood-brain barrier permeability following acute short-term swimming exercise in conscious normotensive young rats. *Neurosci Res*. 1991 Apr;10(3):211-21.
- Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, Jacob A, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud PO, Terasaki T, Scherrmann JM. Transcriptomic and

- quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm.* 2011 Aug 1;8(4):1332-41.
- Sipos E, Kurunczi A, Fehér A, Penke Z, Fülöp L, Kasza A, Horváth J, Horvát S, Veszelka S, Balogh G, Kürti L, Eros I, Szabó-Révész P, Párducz A, Penke B, Deli MA. Intranasal delivery of human beta-amyloid peptide in rats: effective brain targeting. *Cell Mol Neurobiol.* 2010 Apr;30(3):405-13.
- Spauwen PJ, van Eupen MG, Köhler S, Stehouwer CD, Verhey FR, van der Kallen CJ, Sep SJ, Koster A, Schaper NC, Dagnelie PC, Schalkwijk CG, Schram MT, van Boxtel MP. Associations of advanced glycation end-products with cognitive functions in individuals with and without type 2 diabetes: the maastricht study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Mar;100(3):951-60.
- Staat C, Coisne C, Dabrowski S, Stamatovic SM, Andjelkovic AV, Wolburg H, Engelhardt B, Blasig IE. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials.* 2015 Jun; 54:9-20.
- Stahr N, Galkina EV. Immune Response at the Crossroads of Atherosclerosis and Alzheimer's Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Jul 6;9: 870144.
- Süle Z, Mracsó E, Bereczki E, Sántha M, Csont T, Ferdinandy P, Bari F, Farkas E. Capillary injury in the ischemic brain of hyperlipidemic, apolipoprotein B-100 transgenic mice. *Life Sci.* 2009 Jun 19;84(25-26):935-9. Stahr N, Galkina EV. Immune Response at the Crossroads of Atherosclerosis and Alzheimer's Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Jul 6;9: 870144.
- Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):21-78.
- Tárlungeanu DC, Deliu E, Dotter CP, Kara M, Janiesch PC, Scalise M, Galluccio M, Tesulov M, Morelli E, Sonmez FM, Bilguvar K, Ohgaki R, Kanai Y, Johansen A, Esharif S, Ben-Omran T, Topcu M, Schlessinger A, Indiveri C, Duncan KE, Caglayan AO, Gunel M, Gleeson JG, Novarino G. Impaired Amino Acid Transport at the Blood Brain Barrier Is a Cause of Autism Spectrum Disorder. *Cell.* 2016 Dec 1;167(6):1481-1494.e18.
- Terasaki T, Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx* 2005 Jan;2(1):63-72.
- Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Nov 1;419(1):31-40.
- Topal GR, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Polgár TF, Siklós L, Deli MA, Veszelka S, Bozskir A. ApoE-Targeting Increases the Transfer of Solid Lipid Nanoparticles with Donepezil Cargo across a Culture Model of the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics.* 2020 Dec 29;13(1):38
- Tóth AE, Tóth A, Walter FR, Kiss L, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA. Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. *Arch Med Res.* 2014a Nov ;45(8):753-64.
- Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud PO, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One.* 2014b Jul 17;9(7): e100152.
- Tscheik C, Blasig IE, Winkler L. Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers.* 2013 Apr 1;1(2): e24565.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2000 Jun 15;28(12):1685-96.

- Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*. 2011 Apr;117(2):333-45.
- Urich E, Lazic SE, Molnos J, Wells I, Freskgård PO. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One*. 2012;7(5):e38149.
- Vastag, M., and Keseru, G. M. Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration: a practical view. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel*. 2009, 12, 115–124.
- Vatine GD, Al-Ahmad A, Barriga BK, Svendsen S, Salim A, Garcia L, Garcia VJ, Ho R, Yucer N, Qian T, Lim RG, Wu J, Thompson LM, Spivia WR, Chen Z, Van Eyk J, Palecek SP, Refetoff S, Shusta EV, Svendsen CN. Modeling Psychomotor Retardation using iPSCs from MCT8-Deficient Patients Indicates a Prominent Role for the Blood-Brain Barrier. *Cell Stem Cell*. 2017 Jun 1;20(6):831-843.e5.
- Veszelka S, Kittel Á, Deli MA. Tools of modelling blood-brain barrier penetrability: Chapter 9. In Tihanyi K, Vastag M, eds., *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates*. Bentham Science Publishers, Washington, 2011, 166-188.
- Veszelka S, Meszaros M, Kiss L, Kota Z, Pali T, Hoyk Z, Bozso Z, Fulop L, Toth A, Rakhely G, Deli MA. Biotin and Glutathione Targeting of Solid Nanoparticles to Cross Human Brain Endothelial Cells. *Curr Pharm Des*. 2017;23(28):4198-4205.
- Veszelka S, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Kondor N, Ferenc G, Polgár TF, Katona G, Kóta Z, Kelemen L, Páli T, Vigh JP, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA. A Triple Combination of Targeting Ligands Increases the Penetration of Nanoparticles across a Blood-Brain Barrier Culture Model. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 30;14(1):86.
- Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model with Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci*. 2018 May 22; 11:166.
- Veszelka, S, Bocsik, A, Walter, F, Hantosi, D, Deli, MA. Blood-brain barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: focus on co-culture systems *Acta Biologica Szegediensis* 2015, 59: Suppl. 2. pp. 157-168., 12 p.
- Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszelka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers*. 2021 Jul 3;9(3):1904773.
- Walter FR, Veszelka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA. Tesmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *J Neurochem*. 2015 Sep;134(6):1040-54.
- Walter, FR; Valkai, S; Kincses, A; Petneházi, A; Czeller, T; Veszelka, S; Ormos, P; Deli, MA; Dér, A. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2016 222 pp. 1209-1219.
- Wang Q, Rager JD, Weinstein K, Kardos PS, Dobson GL, Li J, Hidalgo IJ. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm*. 2005 Jan 20;288(2):349-59.
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 2013 Mar 26;10(1):16.
- Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005 Nov; 19(13):1872-4.

- Welcome MO, Mastorakis NE. Stress-induced blood brain barrier disruption: Molecular mechanisms and signaling pathways. *Pharmacol Res.* 2020 Jul; 157:104769.
- Wetzels S, Wouters K, Schalkwijk CG, Vanmierlo T, Hendriks JJ. Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation Endproducts in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 15;18(2):421.
- Willis CL. Imaging in vivo astrocyte/endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol.* 2012; 814:515-29.
- Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP, Rege SV, Bell RD, Perlmutter D, Sengillo JD, Hillman S, Kong P, Nelson AR, Sullivan JS, Zhao Z, Meiselman HJ, Wendy RB, Soto J, Abel ED, Makshanoff J, Zuniga E, De Vivo DC, Zlokovic BV. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat Neurosci.* 2015 Apr;18(4):521-530.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Sam H, Horvát S, Deli MA, Mack AF. Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jul;130(1):127-40.
- Wu D, Birukov K. Endothelial Cell Mechano-Metabolomic Coupling to Disease States in the Lung Microvasculature. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Jul 19;7:172.
- Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 May 25;8(1):217.
- Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2011 Nov;42(11):3323-8.
- Zhang X, Jin H, Huang X, Chaurasiya B, Dong D, Shanley TP, Zhao YY. Robust genome editing in adult vascular endothelium by nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 plasmid DNA. *Cell Rep.* 2022 Jan 4;38(1):110196.
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell.* 2015 Nov 19;163(5):1064-1078.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

8.1. Az értekezés alapját képező válogatott közlemények

A vér-agy gát vizsgálatára alkalmas sejttenyészetes modellek jellemzése és összehasonlítása:

1. Hellinger E, **Veszelka 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.
IF: 3,826 Független idézetek száma: 169
2. **Veszelka S**, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA.
Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. Front Mol Neurosci. 2018 May 22; 11:166.
IF: 3,72 Független idézetek száma: 66

A vér-agy gát sérüléseinek vizsgálata különböző patológiás modellekben:

3. Tóth AE, Tóth A, Walter FR, Kiss L, **Veszelka S**, Ózsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA.
Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. Arch Med Res. 2014a Nov ;45(8):753-64.
IF: 2,645 Független idézetek száma: 28
4. Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, **Veszelka S**, Nagy L, Puskás LG, Couraud PO, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA.
Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. PLoS One. 2014b Jul 17;9(7): e100152.
IF: 3,234 Független idézetek száma: 45
5. Sántha P, **Veszelka S**, Hoyk Z, Mészáros M, Walter FR, Tóth AE, Kiss L, Kincses A, Oláh Z, Seprényi G, Rákhely G, Dér A, Pákási M, Kálmán J, Kittel Á, Deli MA.
Restraint Stress-Induced Morphological Changes at the Blood-Brain Barrier in Adult Rats. Front Mol Neurosci. 2016 Jan 14; 8:88.
IF: 5,076 Független idézetek száma: 109
6. Hoyk Z, Tóth ME, Lénárt N, Nagy D, Dukay B, Csefová A, Zvara Á, Seprényi G, Kincses A, Walter FR, **Veszelka S**, Vigh J, Barabási B, Harazin A, Kittel Á, Puskás LG, Penke B, Vigh L, Deli MA, Sántha M.

Cerebrovascular Pathology in Hypertriglyceridemic APOB-100 Transgenic Mice.
Front Cell Neurosci. 2018 Oct 25; 12:380.

IF: 3,9 Független idézetek száma: 10

A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata

7. Bocsik A, Walter FR, Gyebrovski A, Fülöp L, Blasig I, Dabrowski S, Ötvös F, Tóth A, Rákhely G, **Veszelka S**, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA.
Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides.
J Pharm Sci. 2016 Feb ;105(2):754-765.
IF: 2,713 Független idézetek száma: 64
8. Dithmer S, Staat C, Müller C, Ku MC, Pohlmann A, Niendorf T, Gehne N, Fallier-Becker P, Kittel Á, Walter FR, **Veszelka S**, Deli MA, Blasig R, Haseloff RF, Blasig IE, Winkler L.
Claudin peptidomimetics modulate tissue barriers for enhanced drug delivery.
Ann N Y Acad Sci. 2017 Jun;1397(1):169-184.
IF: 4,277 Független idézetek száma: 52
9. Walter FR, **Veszelka S**, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA.
Tesmifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier.
J Neurochem. 2015 Sep;134(6):1040-54.
IF: 3,842 Független idézetek száma: 18
10. Topal GR, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Polgár TF, Siklós L, Deli MA, **Veszelka S***, Bozskir A*.
ApoE-Targeting Increases the Transfer of Solid Lipid Nanoparticles with Donepezil Cargo across a Culture Model of the Blood-Brain Barrier.
Pharmaceutics. 2020 Dec 29;13(1):38.
IF: 6,525 Független idézetek száma: 85
11. Szecskó A, Mészáros M, Simões B, Cavaco M, Chaparro C, Porkoláb G, Castanho MARB, Deli MA, Neves V, **Veszelka S**.
PepH3-modified nanocarriers for delivery of therapeutics across the blood-brain barrier.
Fluids Barriers CNS. 2025 Apr 1;22(1):31.
IF: 5,9 Független idézetek száma: 0
12. **Veszelka S**, Meszaros M, Kiss L, Kota Z, Pali T, Hoyk Z, Bozso Z, Fulop L, Toth A, Rakhely G, Deli MA.
Biotin and Glutathione Targeting of Solid Nanoparticles to Cross Human Brain Endothelial Cells.
Curr Pharm Des. 2017;23(28):4198-4205.
IF: 2,757 Független idézetek száma: 17

13. Fekete T, Mészáros M, Szegletes Z, Vizsnyiczai G, Zimányi L, Deli MA, **Veszelka* S**, Kelemen L*.
Optically Manipulated Microtools to Measure Adhesion of the Nanoparticle-Targeting Ligand Glutathione to Brain Endothelial Cells.
ACS Appl Mater Interfaces. 2021 Aug 25;13(33):39018-39029.
IF: 10,383 Független idézetek száma: 6

14. Porkoláb G, Mészáros M, Szecskó A, Vigh JP, Walter FR, Figueiredo R, Kálomista I, Hoyk Z, Vizsnyiczai G, Gróf I, Jan JS, Gosselet F, Pirity MK, Vastag M, Hudson N, Campbell M, **Veszelka S**, Deli MA.
Synergistic induction of blood-brain barrier properties.
Proc Natl Acad Sci USA. 2024 May 21;121(21): e2316006121.
IF: 9,4 Független idézetek száma: 2

15. Mészáros M, Porkoláb G, Kiss L, Pilbat AM, Kóta Z, Kupihár Z, Kéri A, Galbács G, Siklós L, Tóth A, Fülöp L, Csete M, Sipos Á, Hülper P, Sipos P, Páli T, Rákhely G, Szabó-Révész P, Deli MA, **Veszelka S**.
Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier.
Eur J Pharm Sci. 2018 Oct 15; 123:228-240.
IF: 3,532 Független idézetek száma: 37

16. Porkoláb G, Mészáros M, Tóth A, Szecskó A, Harazin A, Szegletes Z, Ferenc G, Blastyák A, Mátés L, Rákhely G, Deli MA, **Veszelka S**.
Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit.
Pharmaceutics. 2020 Jul 7;12(7):635
IF: 6,321 Független idézetek száma: 11

17. Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Páli EK, Polgár TF, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, **Veszelka S**.
Targeting Human Endothelial Cells with Glutathione and Alanine Increases the Crossing of a Polypeptide Nanocarrier through a Blood-Brain Barrier Model and Entry to Human Brain Organoids.
Cells. 2023 Feb 3;12(3):503.
IF: 5,1 Független idézetek száma: 7

18. **Veszelka S**, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Kondor N, Ferenc G, Polgár TF, Katona G, Kóta Z, Kelemen L, Páli T, Vigh JP, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA.
A Triple Combination of Targeting Ligands Increases the Penetration of Nanoparticles across a Blood-Brain Barrier Culture Model.
Pharmaceutics. 2021 Dec 30;14(1):86.
IF: 5,4 Független idézetek száma: 14

Az értekezés témájához kapcsolódó összefoglaló közlemények:

19. Campos-Bedolla P, Walter FR, **Veszelka S**, Deli MA.
Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system.

Arch Med Res. 2014 Nov 45(8):610-38.

IF: 2,645

Független idézetek száma: 152

20. **Veszelka, S**, Bocsik, A, Walter, F, Hantosi, D, Deli, MA
Blood-brain barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: focus on co-culture systems
Acta Biologica Szegediensis 2015 59: Suppl. 2. pp. 157-168., 12 p.
IF: - Független idézetek száma: 13
21. Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, **Veszelka S**, Dér A, Deli MA.
Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function.
Tissue Barriers. 2021 Jul 3;9(3):1904773.
IF: - Független idézetek száma: 47
22. Deli MA, Porkoláb G, Kincses A, Mészáros M, Szecskó A, Kocsis AE, Vigh JP, Valkai S, **Veszelka S**, Walter FR, Dér A.
Lab-on-a-chip models of the blood-brain barrier: evolution, problems, perspectives.
Lab Chip. 2024 Feb 27;24(5):1030-1063.
IF: 6,1 Független idézetek száma: 9

(*megosztott utolsó/levelező szerzők)

Az értekezésben szereplő közlemények

összesített impakt faktora: 103,196

ezekre kapott független idézetek száma (MTMT, 2025.03.10.): 961

Az értekezés témájához tartozó szabadalom: 1

„Cocktail for induction of blood-brain barrier properties” - cARLA,

Hungarian Patent Application: P2300053;

International Patent Application: PCT/HU2023/050070

8.2. További, az értekezés alapját nem képező, de az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények a PhD fokozat megszerzése óta

1. Zandona A, Szecskó A, Žunec S, Jovanović IN, Bušić V, Sokač DG, Deli MA, Katalinić M, **Veszelka S**.
Nicotinamide derivatives protect the blood-brain barrier against oxidative stress.
Biomed Pharmacother. 2025 Apr 1; 186:118018.
IF:6,9 Független idézetek száma: 0
2. Mária Mészáros, Thi Ha My Phan, Judit P. Vigh, Gergő Porkoláb, Anna Kocsis, Anikó Szecskó, Emese K. Páli, Nárcisz M. Cser, Tamás F. Polgár, Gábor Kecskeméti, Fruzsina R. Walter, Jens C. Schwamborn, Tamás Janáky, Jeng-Shiung Jan, **Szilvia Veszelka*** and Mária A. Deli*
Alanine and glutathione targeting of dopamine- or ibuprofen-coupled polypeptide nanocarriers increases both crossing and protective effects on a blood–brain barrier model.
Fluids and Barriers of the CNS 22: 1 Paper: 18, 2 (2025)

IF:5,9

Független idézetek száma: 0 (*megosztott utolsó/levelező szerzők)

3. **Veszelka, Szilvia**; Burek, Malgorzata; Thomas, Sarah Ann
 Editorial: Women in CNS drug delivery: 2022–2024
 FRONTIERS IN DRUG DELIVERY 4 Paper: fddev.2024.1400937 (2024)
 IF: - Független idézetek száma: -

4. Sipos B, Bella Z, Gróf I, **Veszelka S**, Deli MA, Szűcs KF, Sztojkov-Ivanov A, Ducza E, Gáspár R, Kecskeméti G, Janáky T, Volk B, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Szabó-Révész P, Csóka I, Katona G.
 Soluplus® promotes efficient transport of meloxicam to the central nervous system via nasal administration.
 Int J Pharm. 2023 Feb 5; 632:122594.
 IF: 5,3 Független idézetek száma: 10

5. Walter FR, Harazin A, Tóth AE, **Veszelka S**, Santa-Maria AR, Barna L, Kincses A, Biczó G, Balla Z, Kui B, Maléth J, Cervenak L, Tubak V, Kittel Á, Rakonczay Z Jr, Deli MA.
 Blood-brain barrier dysfunction in L-ornithine induced acute pancreatitis in rats and the direct effect of L-ornithine on cultured brain endothelial cells.
 Fluids Barriers CNS. 2022 Feb 17;19(1):16.
 IF: 7,3 Független idézetek száma: 11

6. Lee MH, Jan JS, Thomas JL, Shih YP, Li JA, Lin CY, Ooya T, Barna L, Mészáros M, Harazin A, Porkoláb G, **Veszelka S**, Deli MA, Lin HY.
 Cellular Therapy Using Epitope-Imprinted Composite Nanoparticles to Remove α -Synuclein from an In Vitro Model.
 Cells. 2022 Aug 19;11(16):2584.
 IF: 6 Független idézetek száma: 4

7. **Veszelka S**, Mészáros M, Porkoláb G, Rusznyák Á, Réti-Nagy KS, Deli MA, Vecsernyés M, Bácskay I, Váradi J, Fenyvesi F.
 Effects of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on Cultured Brain Endothelial Cells.
 Molecules. 2022 Nov 10;27(22):7738.
 IF: 4,6 Független idézetek száma: 2

8. Katona G, Sipos B, Budai-Szűcs M, Balogh GT, **Veszelka S**, Gróf I, Deli MA, Volk B, Szabó-Révész P, Csóka I.
 Development of In Situ Gelling Meloxicam-Human Serum Albumin Nanoparticle Formulation for Nose-to-Brain Application.
 Pharmaceutics. 2021 May 1;13(5):646.
 IF:6,525 Független idézetek száma: 10

9. Akel H, Csóka I, Ambrus R, Bocsik A, Gróf I, Mészáros M, Szecskó A, Kozma G, **Veszelka S**, Deli MA, Kónya Z, Katona G.
 In Vitro Comparative Study of Solid Lipid and PLGA Nanoparticles Designed to Facilitate Nose-to-Brain Delivery of Insulin.
 Int J Mol Sci. 2021 Dec 9;22(24):13258.
 IF:6,208 Független idézetek száma: 41

10. Bartus É, Olajos G, Schuster I, Bozsó Z, Deli MA, **Veszelka S**, Walter FR, Datki Z, Szakonyi Z, Martinek TA, Fülöp L.
Structural Optimization of Foldamer-Dendrimer Conjugates as Multivalent Agents against the Toxic Effects of Amyloid Beta Oligomers.
Molecules. 2018 Oct 2;23(10):2523.
IF:3,06 Független idézetek száma: 9

11. Kovács T, Billes V, Komlós M, Hotzi B, Manzóger A, Tarnóci A, Papp D, Szikszai F, Szinyákovics J, Rácz Á, Noszál B, **Veszelka S**, Walter FR, Deli MA, Hackler L Jr, Alfoldi R, Huzian O, Puskas LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Welker E, Kovács AL, Pádár Z, Erdős A, Legradi A, Bjelik A, Gulya K, Gulyás B, Vellai T.
The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms.
Sci Rep. 2017 Feb 16; 7:42014.
IF:4,122 Független idézetek száma: 33

12. Walter, FR; Valkai, S; Kincses, A; Petneházi, A; Czeller, T; **Veszelka, S**; Ormos, P; Deli, MA; Dér, A.
A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers
SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL 222 pp. 1209-1219. 11 p. (2016)
IF:5,401 Független idézetek száma: 135

13. **Veszelka, S**; Toth, A; Walter, FR; Toth, AE; Meszaros, M; Vastag, M; Rakhely, G; Deli, MA
Comparison of the expression of selected blood-brain barrier function related genes in a rat primary cell-based blood-brain barrier model versus epithelial and endothelial cell lines
In: Birger, Brodin (szerk.) 19th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, University of Copenhagen (2016) Paper: P-25
Közlemény:3120196 Egyéb konferenciaközlemény (Absztrakt/Kivonat)
IF:- Független idézetek száma: -

14. Horváth T, Bartos C, Bocsik A, Kiss L, **Veszelka S**, Deli MA, Újhelyi G, Szabó-Révész P, Ambrus R.
Cytotoxicity of Different Excipients on RPMI 2650 Human Nasal Epithelial Cells.
Molecules. 2016 May 18;21(5):658.
IF:2,861 Független idézetek száma: 16

15. Meszaros, M; Kiss, L; Hantosi, D; Bozso, Z; Fulop, L; Szalontai, B; Kota, Z; Sipos, P; Szabo-Revesz, P; Deli, MA, **Veszelka S**
Targeted nanoparticles for brain delivery using nutrient transporters of the blood-brain barrier
In: Birger, Brodin (szerk.) 19th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers University of Copenhagen (2016) Paper: P-6
Közlemény:3120200 Egyéb konferenciaközlemény
IF: - Független idézetek száma: -

16. Bogar, F; Simon, D; Bozso, Z; Janaky, T; **Veszelka, S**; Toth, AE; Deli, MA; Borics, A; Nasztor, Z; Gyebrovski, A et al.

Opposite effect of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ions on the aggregation of native and precursor-derived $\text{A}\beta_{42}$

Structural Chemistry 26: 5-6 pp. 1389-1403. 15 p. (2015)

IF:1,854

Független idézetek száma: 2

17. Tóth, AE; Walter, FR; Bocsik, A; **Veszelka, S**; Nagy, L; Puskás, LG; Dohgu, S; Watanabe, T; Kataoka, Y; Deli, MA

Az edaravon megvédi az agyi hajszálerek endothelsejtjeit a cukorbetegség egyik patogenetikus faktora, a metilglioxál okozta károsodástól: [Edaravone protects cerebral microvascular endothelial cells against damage caused by methylglyoxal, a pathogenic factor in diabetes mellitus]

DIABETOLOGIA HUNGARICA 22 pp. 138-139. 2 p. (2014)

IF:-

Független idézetek száma: -

18. Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Füredi A, Szakács G, **Veszelka S**, Sipos P, Ózsvári B, Puskás LG, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA.

Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit p-glycoprotein in caco-2 intestinal epithelial cells.

J Pharm Sci. 2014 Oct;103(10):3107-19.

IF:2,59

Független idézetek száma: 34

19. Farkas, Csaba; **Veszelka, Szilvia** (Az interjút adta)

"Trójai falóval" a vér-agy gáton át. Veszelka Szilviával beszélget Farkas Csaba

TERMÉSZET VILÁGA 145: 5 pp. 217-218. 2 p. (2014)

IF:-

Független idézetek száma: -

20. Hülper P, **Veszelka S**, Walter FR, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA.

Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells.

Br J Pharmacol. 2013 aug;169(7):1561-73.

IF:4,99

Független idézetek száma: 29

21. **Veszelka S**, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA.

Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit.

J Alzheimers Dis. 2013;36(3):487-501.

IF:3,612

Független idézetek száma: 29

22. **Veszelka S**, Laszy J, Pázmány T, Németh L, Obál I, Fábián L, Szabó G, Abrahám CS, Deli MA, Urbányi Z.

Efflux transport of serum amyloid P component at the blood-brain barrier. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2013 Dec;3(4):281-9.

IF: -

Független idézetek száma: 8

23. Kürti L, Gáspár R, Márki Á, Kápolna E, Bocsik A, **Veszelka S**, Bartos C, Ambrus R, Vastag M, Deli MA, Szabó-Révész P.

In vitro and in vivo characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration.

Eur J Pharm Sci. 2013 Sep 27;50(1):86-92.
IF:3,005 Független idézetek száma: 31

24. Kiss L, Walter FR, Bocsik A, **Veszelka 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.
IF:3,007 Független idézetek száma: 82
25. Kürti L, **Veszelka S**, Bocsik A, Ozsvári B, Puskás LG, Kittel A, Szabó-Révész P, Deli MA.
Retinoic acid and hydrocortisone strengthen the barrier function of human RPMI 2650 cells, a model for nasal epithelial permeability.
Cytotechnology. 2013 May;65(3):395-406.
IF:1,449 Független idézetek száma: 29
26. Ujhelyi, Z; Fenyvesi, F; Váradi, J; Fehér, P; Kiss, T; **Veszelka, S**; Deli, MA; Vecsernyés, M; Bácskay, I
Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer
European Journal of Pharmaceutical Sciences 47: 3 pp. 564-573. 10 p. (2012)
IF:2,987 Független idézetek száma: 155
27. Cardoso FL, Kittel A, **Veszelka S**, Palmela I, Tóth A, Brites D, Deli MA, Brito MA.
Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells.
PLoS One. 2012;7(5): e35919.
IF:3,73 Független idézetek száma: 90
28. Kürti L, **Veszelka S**, Bocsik A, Dung NT, Ozsvári B, Puskás LG, Kittel A, Szabó-Révész P, Deli MA.
The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier.
Toxicol In Vitro. 2012 Apr;26(3):445-54.
IF:2,65 Független idézetek száma: 27
29. Tóth A, **Veszelka S**, Nakagawa S, Niwa M, Deli MA.
Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery.
Recent Pat CNS Drug Discov. 2011 May 1;6(2):107-18.
IF: - Független idézetek száma: 54
30. Fenyvesi F, Kiss T, Fenyvesi E, Sente L, **Veszelka S**, Deli MA, Váradi J, Fehér P, Ujhelyi Z, Tótsaki A, Vecsernyés M, Bácskay I.
Randomly methylated β -cyclodextrin derivatives enhance taxol permeability through human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayer.
J Pharm Sci. 2011 nov;100(11):4734-44.
IF: 3,055 Független idézetek száma: 30
31. **Veszelka, S**; Kittel, Á; Deli, MA
Tools of Modelling Blood-Brain Barrier Penetrability

In: Tihanyi, K; Vastag, M (szerk.) Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates Washington DC, Amerikai Egyesült Államok: Bentham Science Publishers Ltd. (2011) 232 p. pp. 166-188., 23 p.

IF: 0 Független idézetek száma: 12

32. Sipos E, Kurunczi A, Fehér A, Penke Z, Fülöp L, Kasza A, Horváth J, Horvát S, **Veszelka S**, Balogh G, Kürti L, Eros I, Szabó-Révész P, Párducz A, Penke B, Deli MA. Intranasal delivery of human beta-amyloid peptide in rats: effective brain targeting. Cell Mol Neurobiol. 2010 Apr;30(3):405-13.

IF: 2,423 Független idézetek száma: 27

33. Deli MA, **Veszelka S**, Csiszár B, Tóth A, Kittel A, Csete M, Sipos A, Szalai A, Fülöp L, Penke B, Abrahám CS, Niwa M. Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid- β -induced toxicity. J Alzheimers Dis. 2010;22(3):777-94.

IF: 4,261 Független idézetek száma: 24

34. Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, **Veszelka S**, Tóth A, Kis L, Kurunczi A, Balogh G, Kürti L, Eros I, Szabó-Révész P, Deli MA. Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue.

Eur J Pharm Biopharm. 2009 May;72(1):252-9.

IF: 3,151 Független idézetek száma: 79

35. Hutamekalin P, Farkas AE, Orbók A, Wilhelm I, Nagyoszi P, **Veszelka S**, Deli MA, Buzás K, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradsky KF, Meksuriyen D, Krizbai IA. Effect of nicotine and polycyclic aromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. Cell Biol Int. 2008 Feb;32(2):198-209.

IF: 1,619 Független idézetek száma: 37

Az értekezés alapját nem képező, de az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények a PhD fokozat megszerzése óta:

összesített impakt faktor: 97,166

ezekre kapott független idézetek száma (MTMT, 2025.03.10.): 1050

Tudományos mutatók a teljes életműre vonatkoztatva (MTMT, 2025.04.16.):

Összes közlemények száma: 65 (ebből könyvfejezet: 1)

Első szerzős folyóiratcikk: 9

Utolsó/levelező szerzős folyóiratcikk: 8

Összes hivatkozások száma: 3012

Független hivatkozások száma: 2466

Összesített impakt faktor: 213,751

Hirsch index: 31

Szabadalom: 1

Scientometrics.org/mtmt/: D1

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel és hálával tartozom mindennek előtt Mentoromnak és jelenlegi intézeti igazgatónak, Prof. Deli Mária akadémikusnak, aki szakdolgozati témát kereső egyetemi hallgatóként lehetőséget adott nekem csoportjában a kutatói munkám megkezdésére, és lelkesedésével és motiváló erejével a mai napig támogatja szakmai pályámat.

Hálával tartozom a néhai Ngo Thi Khue Dungnak, aki végtelen türelemmel és odafigyeléssel megtanított a steril sejtenyészítés és a laboratóriumi munka alapjaira.

Köszönettel tartozom az együtt elért szakmai sikerekért és az alkotómunkát segítő baráti és családi légkörért a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, kollégáimnak, külön kiemelve Dr. Sántha Petrát, Dr. Walter Fruzsínát, Dr. Kiss Lórándot, Dr. Bocsik Alexandrát, Dr. Mészáros Máriát, Dr. Porkoláb Gergőt, Dr. Gróf Ilonát, Dr. Barna Lillát, Dr. Harazin Andrást, Dr. Hoyk Zsófiát és Vigh Juditot.

Szeretném megköszönni a mindennapi közös és motiváló munkát jelenlegi diákjaimnak is különös tekintettel Szecsó Anikónak, valamint Cser Nárcisznak, Párdi Koppánynak, Cui Zuhaonak, Páli Emese Kincsőnek és Fodor Virágnak.

Köszönöm Dr. Ormos Pál és Dr. Nagy Ferenc akadémikusoknak, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont volt és jelenlegi főigazgatóinak, valamint Dr. Párducz Árpád és Dr. Siklós László, tudományos tanácsadóknak, a Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium korábbi vezetőinek és Dr. Zimányi Lászlónak a Biofizikai Intézet korábbi igazgatójának a támogatását.

Köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetéből kollégáimnak a szakmai támogatását, külön kiemelve a néhai Dr. Rákhely Gábort, valamint Dr. Tóth Andrást, Dr. Farkas Attilát, Dr. Kóta Zoltánt, Dr. Fekete Tamást, Dr. Kelemen Lórándot, Dr. Végh Attila Gergelyt, Dr. Dér Andrást, Dr. Nagy Krisztinát, és Polgár Tamást. Az SZBK kutatói közül köszönöm Dr. Tóth Melinda, Dr. Lénárt Nikolett, Dr. Pilbat Ana Mária, Dr. Tengölics Roland és Dr. Ferencz Györgyi segítségét.

Hazai és külföldi együttműködő partnereink közül hálával tartozom Prof. Daniela Virgintinonak, az olaszországi Bari Egyetemről, Dr. Petra Hülpérnek a Göttingeni Egyetemről, Dr. Kittel Ágnesnek a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetéből; Dr. Vastag Monikának és Dr. Hellinger Évának a Richter Gedeon NyRT részéről, Dr. Penke Botondnak, Dr. Szabó-Révész Piroskának, Dr. Katona Gábornak a Szegedi Tudományegyetemről, Dr. András Ibolyának a Miami Egyetemről, Dr. Gizem Rüya Topalnak az Ankarai Egyetemről és Dr. Antonio Zandonának Zágrábból a közös kutatómunkánk során nyújtott támogatásáért. Köszönöm Prof. Jeng-Shiung Jannak (National Cheng Kung University, Tajvan), Prof. Jens Schwambornnak (University of Luxembourg, Luxemburg), Prof. Fabien Gosseletnek (Université d'Artois, Franciaország), a kutatómunkánkhoz nyújtott szakmai segítségét és együttműködését.

Köszönettel tartozom a pályázati támogatásokért a Magyar Tudományos Akadémiának, amely a Prémium Posztdoktori Kutatói Támogatással, a két Bolyai János Kutatási Ösztöndíjjal és a gyermeket nevelő kutatókat támogató KGYNK-ösztöndíjjal végig kísérte szakmai karrieremet és segítette munkámat, valamint köszönöm a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak is a támogatását a posztdoktori és a fiatal kutatói OTKA pályázatok által. Nagyon köszönöm a támogatását a Nemzeti Tudós Akadémiának is, akikkel a megalakulásuk óta együtt dolgozom.

Végezetül hálával és köszönettel tartozom férjemnek Lórándnak és a gyermekeinknek, Zalánnak és Rozinának, akik szeretetükkel biztos családi háttérrel nyújtottak a dolgos mindennapok nehézségei mellett.