

Vélemény Dr. Veszelka Szilvia “Vér-agy gát vizsgálatok sejtenyészetes modelleken: gyógyszerátjuttatás és betegségek mechanizmusa” című MTA doktori értekezéséről

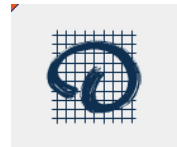
Az értekezés témája a központi idegrendszer működése szempontjából alapvető vér-agy gát funkcionális vizsgálata. A dolgozat kiemelt figyelmet fordít az in vitro vér-agy gát modellek alkalmazásának korszerű lehetőségeire, a barrier funkciók változásaira patológiás körülmények között és a hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek feltárására.

A dolgozat formai szempontból megfelel a doktori művel kapcsolatos elvárásoknak, felépítése logikus, nyelvezete érthető. Az értekezés alapját 18 megjelent eredeti közlemény képezi és 4 további, összefoglaló közlemény anyaga is feldolgozásra került, amelyekre a jelölt a dolgozat benyújtásáig összesen 961 független idézetet kapott. Az eredeti közlemények között 3 első szerzős, és összesen 6 utolsó- megosztott utolsó / levelező szerzős munka található.

A bevezetés jól felépített, olvasmányos összefoglalót ad a vér-agy gát szerkezetéről és működéséről. A jelölt elsőként tárgyalja a vér-agy gát sejt felépítését, barrier funkcióit és transzport mechanizmusait, majd bemutatja a vér-agy gát modellezésére használt sejtenyészeteket, beleértve a különböző modellek előnyeit és hátrányait. Ezt követően kerül sor a vér-agy gát szerepének bemutatására különböző betegségekben. Külön alfejezetet szentel az agyi gyógyszerbejuttatás hatékonyságának növelésére alkalmas módszerek és a nanorészecskék segítségével kivitelezett agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek bemutatására. A fejezet gondolatmenete jól követhető, és a legtöbb helyen a releváns irodalom áttekintése megfelelő mélységű. Érdekes lett volna még a vér-agy gát patológiás folyamatait tárgyaló alfejezet és a gyógyszerbejuttatás hatékonyságának növelésére alkalmas módszerekről szóló alfejezet közötti kapcsolódási pontok mélyebb kifejtése, hiszen alapjában véve összefüggő, de eltérő problémaköröket érintenek. A bevezetés ábraanyaga megfelelő módon támogatja a leírtakat és örömmel láttam, hogy a kutatócsoport saját összefoglaló közleményeinek ábráit és ismeretanyagát is jól használta fel a jelölt a téma bemutatására.

A célkitűzések megfogalmazása világos. A jelölt három nagyobb témára fókuszál a dolgozatban: a vér-agy gát vizsgálatára alkalmas sejtenyészetes modellek jellemzésére, a vér-agy gát sérülésével kapcsolatos mechanizmusok azonosítására és a hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálatára. Jól látható, hogy a jelölt vezető szerzős cikkei zömmel a gyógyszerbejuttatás témakörében születtek, amely publikációk egyrészt kijelölik az önálló kutatási terület irányát, másrészt eredményesen építenek a kiváló hazai vér-agy gát iskola eredményeire, beleértve a jelölt korábbi saját eredményeit. Az építkezés folyamata szintén jól nyomon követhető a módszertani fejezetben, ahol az olvasónak egyértelművé válik a jelölt metodikai jártassága az alkalmazott ex vivo vér-agy gát modellek területén és a vér-agy gát működést vizsgáló módszertani repertoár átfogó ismerete, beleértve a sejt- és molekuláris biológiai metodikákat, mikroszkópos módszereket és a nanorészecskék előállításának lehetőségeit.

Az eredményeket bemutató fejezet nyelvezete precíz, érthető, az egyes kutatási projektek leírása jól követhető. A preklinikai kutatásokban és gyógyszeripari tesztekben leggyakrabban használt összesen kilenc, a vér-agy gát

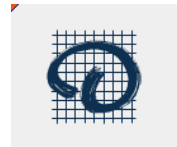


és vér-agy gátat helyettesítő modell morfológiai és funkcionális tulajdonságainak bemutatása önmagában is hiánypótló, hiszen mind az *in vitro* technikák terén, mind a modellek alapját képező sejtek előállításának és fenntartásának módszertanában nagymértékű fejlődés történt az elmúlt két évtizedben és kevés ilyen témájú, modern összefoglaló munka elérhető. Jól látható, hogy a jelölt ezekben a vizsgálatokban képes volt a saját módszertani tapasztalataira támaszkodni és ezeket kiegészíti a releváns irodalom átfogó ismerete. Fontosnak érzem a kísérletes biológiai tudás lehetséges ipari alkalmazásának többszöri említését is: ez a nézőpont láthatóan megalapozta a pályázó későbbi, önálló kutatóként végzett vizsgálatait. A jelölt munkásságának fókuszát tekintve talán a második bemutatott tématerület (Vér-agy gát károsodások patológiás modellekben és védő anyagok vizsgálata) jelentősége a legkisebb. Miközben nem kérdéses a pályázó jártassága és érdemi munkája ezen a területen, a fejezet alapjául szolgáló cikkek egyikében sem vezető szerző, és a munkák tematikai szempontból is heterogének, valamint távolabb esnek a saját kutatási irány fő sodorvonalától. Ezért lehetett volna tömörebbre fogni a kísérleteket bemutató ábraanyagot, vagy a teljes fejezetet integrálni más fejezetek anyagába. Ez a megjegyzés ugyanakkor nem hivatott csökkenteni a leírtak tudományos értékét vagy a jelölt szakmai munkájának szerepét az elvégzett vizsgálatok során. A harmadik tématerület különböző gyógyszerbeviteli módszerekre fókuszál, építve az agyi endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsolatok megnyitásának, valamint a vér-agy gátat célzó nanoméretű hordozórendszerek alkalmazásának lehetőségeire. Véleményem szerint a pályázó önálló munkásságának szempontjából nézve a nanorészecskék alkalmazása révén megvalósított gyógyszerbeviteli lehetőségek vizsgálata a legérdekesebb, előre mutató, ipari alkalmazásokat is ígérő kutatási terület. Ebben részletesen vizsgálja az agyi endotélsejtek receptor-mediált transzcitózis útvonalát, adszorptív-mediált transzcitózis útvonalát és karrier-mediált transzcitózis útvonalát célzó módszerek alkalmazását. Itt került sor kollaborációban megvalósított, multidiszciplináris eszköztárat felvonultató vizsgálatokra is, mint például a glutation (GSH) célzóligand élő agyi endotélsejtek sejtfelszínéhez történő kötődési erősségének vizsgálata optikai lézercsipesz technika segítségével, a nioszóma kezelések membránfluiditásra gyakorolt hatásainak vizsgálata fluoreszcens anizotrópia mérésekkel, vagy a nioszómák fluoreszcens szérumban albumin töltetének agyi penetrációját mérő *in vivo* képalkotó vizsgálatok. Az eredményeket a pályázó átlátható módon, irodalmi adatokkal összevetve, megfelelő mélységben diszkutálja a dolgozatban.

Összefoglalva megállapítható, hogy a dolgozat igényes leírást ad a jelölt által nagy figyelemmel végzett, sok éves kutatómunka főbb állomásairól, eredményeiről, és ez a kutatómunka mind hazai, mind nemzetközi összehasonlításban értékes. A pályázó izgalmas megfigyelésekkel gazdagította a vér-agy gát *in vitro* és *in vivo* vizsgálatának tudományterületét, amely kiemelten fontos lehet új terápiás módszerek kidolgozása szempontjából az idegrendszeri betegségek terén. Részére sikeres védelem esetén az MTA Doktora cím megítélését támogatom.

Az értekezésben leírt legfontosabb tudományos eredmények összefoglalása:

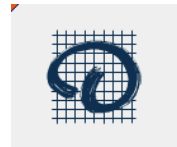
1. Elvégezte a szoros gátfunkciókért felelős, valamint a gyógyszerek transzportjában és metabolizmusában szerepet játszó fehérjék kifejeződésének karakterizálását gyógyszerhatóanyag-permeabilitás vizsgálatokkal kombinálva különböző vér-agy gát modellekben és megállapította a primer sejtalapú (endotélsejt, pericita és asztrogliá hármas kultúra) EPA modell relevanciáját.



2. Közreműködött a vér-agy gát patológiás változásait kiváltó mechanizmusok megértésében és új molekuláris mechanizmusok azonosításában.
3. Új módszereket azonosított gyógyszerek agyi bejutásának növelésére a vér-agy gát reverzibilis módon történő megnyitása révén.
4. Új módszereket dolgozott ki a nanorészecskék alkalmazásával megvalósított agyi gyógyszerbevitel területén. Ennek során átfogóan vizsgálta az agyi endotélsejtek receptor-mediált transzcitózis útvonalát, adszorptív-mediált transzcitózis útvonalát és karrier-mediált transzcitózis útvonalát célzó módszerek alkalmazásának lehetőségeit mind in vitro, mind in vivo modellekben. Igazolták, hogy a nanorészecskék célzása kulcsfontosságú a sikeres agyi gyógyszerbejuttatáshoz, és a részecskék felszínének egynél többféle, a vér-agy gát transzportereihez kötődni képes célzómolekulával történő jelölése szignifikánsan megnöveli az agyi célzás specificitását, és erősebb dokkolást eredményez az agyi endotélsejtek felszínéhez, elősegítve ezzel a nanorészecskék endocitózisát az agyi endotélsejtekbe, átjutását a vér-agy gáton valamint bejutását a gliasejtekbe és neuronokba, melyek a gyógyszerhatóanyagok terápiás célpontjai.
5. Kidolgoztak egy új, innovatív optikai lézercsipesz technikát amely képes a célzóligand közvetlen kötődési erősségét mérni élő agyi endotélsejtek sejt felszínéhez és alkalmas új vér-agy gátat célzó ligandok tesztelésére és kiválasztására a kötődési erők mérése alapján.
6. Számos, orvosi biológiai szempontból is releváns új megfigyelést tettek a nanorészecskék alkalmazásának tekintetében. Többek között igazolták az általuk szabadalmaztatott cARLA molekulakombináció hatását a vér-agy gát specifikus fehérjék expressziójának növelésére és a nanorészecskék felszínéhez kötött GSH molekula transzportjára, feltárták a nanorészecskékhez kötött alanin-GSH, mint célzóligand kombináció jelenlétének fontosságát és azonosították a leucint, mint célzó molekulát nanorészecskék felszínéhez kötve a hatékonyabb vér-agy gáton való átjutás és agyi organoidokba való bejutás tekintetében.

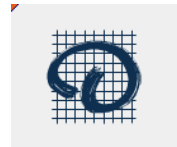
Kérdések, megjegyzések:

1. A jelölt a bevezetőben nagyon jó összefoglalót ad a vér-agy gáton keresztül megvalósuló anyagtranszport mechanizmusairól és az ebben kulcsszerepet játszó fehérjékről. Ugyanakkor a kutatási téma hátterének bemutatása szerintem igényelt volna picit több információt a barrier funkciók fiziológiájáról, különös tekintettel arra, milyen szerepet játszanak az asztrociták, periciták, perivaszkuláris makrofágok, simaizom sejtek, fibroblasztok és egyéb sejt típusok a barrier funkciók fenntartásában kismolekulák és a keringésben található immunsejtek tekintetében. A téma nagy és szerteágazó, ezért kíváncsi lennék a jelölt véleményére a fenti



celluláris interakciók funkcionális szerepét illetően a közelmúlt irodalmi adatainak tükrében. Mely sejttípusok esetén várható leginkább, hogy célzott modulációjuk segíthet a sérült vér-agy gát funkciók regenerálásában?

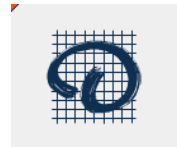
2. A jelölt ír arról, hogy az agyi kapillárisok endotélsejtjeinek lumen felőli felszínén a membránban található glikolipidek, glikoproteinek, illetve heparánszulfát-proteoglikánok oldalláncai negatív felszíni töltésű glikokalix réteget hoznak létre, amely, mint egy elektrosztatikus gát, megakadályozza az erősen anionos molekulák vér-agy gáton való átjutását. A jelölt a dolgozatban saját kísérleteket is bemutat, amelyek során vizsgálták, hogy a negatív töltésű glikokalix hogyan befolyásolja a kationos peptiddel célzott nanopartikulumok sejtfelvételét. Van adatuk esetleg arra nézve, hogy az in vitro vér-agy gát modellben kialakuló glikokalix mennyire hasonló összetételében és komplexitásában az in vivo, endothelium lumen felőli felszínén kialakuló glikokalix-hoz képest? Vannak komolyabb különbségek a glikokalix réteg elektrosztatikus gát funkciójában? Szövetek preparálásakor már a transzkardiális perfúzió is nagymértékben károsítja a glikokalix szerkezetét, ezért vélhetően ex vivo is számos különbséggel kell számolni az in vivo állapothoz képest.
3. A közelmúltban számos tanulmány vizsgálta az agyi perivaszkuláris transzportfolyamatokat, gyakran a „glimfatikus rendszer” kifejezés ernyője alatt. Miközben itt az endotélsejtek ablumenális része és a neurovaszkuláris egység számos sejttípusa is érintett, jelenleg nem világos, milyen összefüggés van az agyi parenchyma irányába, az asztrocita AQP4 vízcsatornákon és egyéb transzporterekkel át megvalósuló anyagtranszport szabályozása és az endotélsejtek barrier funkciói, valamint a transzcitózis mértéke között. A kapillárisok szintjén az endoteliális és gliális bazális membránok összesimulnak, ezért feltételezhető, hogy itt az endoteliális barrier funkciók és transzcitózis is eltérő lehetnek a nagyobb erekhez képest, ahol jelentős a perivaszkuláris tér mértéke. Van az in vitro vér-agy gát modellekben lehetőség arra, hogy az asztrocita végtalpak direkt kapcsolatainak hatását el lehessen különíteni a szolubilis mediátorok hatásaitól, végeztek esetleg ilyen jellegű vizsgálatokat?
4. A vizsgált vér-agy gát modellek esetén várható módon a TEER értékek jól korrelálnak a sejtek paracelluláris gát funkcióival (fordított arányban az adott modell permeabilitási tulajdonságaival). Ugyanakkor az SLC transzporterek és efflux pumpák expressziós szintje a kétirányú anyagtranszportot szelektíven képes befolyásolni. Megállapíthatók általános, molekuláris szintű összefüggések a gát-funkciókat alapvetően meghatározó TJ-fehérjék és a különböző típusú transzporterek mRNS- és fehérje szintű expressziójának tekintetében? Vizsgálták, hogy a patológiás körülmények (pl. hipoxia, iszkémia) során kialakuló TJ-fehérjék degradációja milyen specifikus transzporterek expressziójának változásaival jár együtt, és mennyiben követi vér-agy gát sérülés vagy regeneráció során a barrier funkciók változásait adott SLC transzporterek és efflux pumpák megváltozott expressziója? Ezek az információk nagyon hasznosak lennének annak megértésében, miért ütközik nehézségekbe gyógyszer-molekulák agyba történő hatékony



bejuttatása olyan patológiás körülmények között is, amikor akut vér-agy gát sérülés figyelhető meg. Magyarázható ez minden esetben az efflux pumpák fennmaradó működésével, mint az vízdékony molekulák eltávolításakor ismert?

5. A dolgozatban bemutatásra kerülnek olyan, mechanisztikus szempontból rendkívül érdekes kísérletek, amelyek során különböző hatóanyagok agyba történő bejutását a TJ-k megnyitása révén próbálják elérni, amely a vér-agy gát áteresztőképességének átmeneti és reverzibilis növekedését eredményezi. Hasonló próbálkozások ismertek mechanikus módszerek terén is, mint a fókuszált ultrang impulzusok alkalmazása a vér-agy gát funkciók átmeneti felfüggesztésére. Kíváncsi lennék a pályázó véleményére, milyen idegrendszeri betegségekben, vagy ezek in vivo experimentális modelljeiben vannak arra nézve a legerősebb bizonyítékok, hogy a gyógyszerbejuttatás pozitív hatásai meghaladják a várható mellékhatások kockázatát, amelyet a vér-agy gát megnyitása okoz. Ismert például, hogy a vérplazmában számos olyan metabolit és fehérje található, amelyek az intakt agyba bejutva neuronális károsodást vagy gyulladást okozhatnak, mint a glutamát, vagy egyes szérum fehérjék (albumin, fibrinogén, különböző proteázok, stb). Ebből a szempontból biztonságosabb módszernek tűnik a vér-agy gát transzport funkcióinak kihasználása gyógyszermolekulák bejuttatására. Ezen belül valóban ígéretes lehet a vér-agy gát transzcelluláris útvonalának célzása nanorészecskékkel a jelölt adatai alapján.
6. Az endothelsejteken átjutó anyagok előtt az agyi parenchymába történő bejutásig az asztroglia végtalpak bazális membránja, számos egyéb NVU sejt és a kapillárisok kivételével perivaszkuláris tér is áll. Miközben a fő barrier funkciót emlősökben az endothelium biztosítja, a periciták, asztrociták szerepe a vér-agy gát integritásának fenntartásában jelentős. Van a pályázónak adata, megfigyelése arra nézve, hogy a nanorészecskékkel megvalósított anyagbejuttatás esetén az endotheliumon túl számolni kell-e olyan barrierekkel, amelyek korlátozhatják a gyógyszermolekulák hatékony bekerülését az agyi parenchymába? Léteznek erre vonatkozó vizsgálatok komplex, többsejtes vér-agy gát modellekkel? Az 55. ábrán bemutatnak többsejtes modelleket, de a rövid leírásból nem világos, hogy vizsgálták-e, milyen mértékű a periciták, glia sejtek funkcionális szerepe összehasonlítva az endotheliális monolayer permeabilitási tulajdonságaival.
7. A nanorészecskék felhasználásával megvalósított gyógyszerbeviteli lehetőségek vizsgálata jól láthatóan a pályázó önálló munkásságának egyik fő területe, amelyen belül hangsúlyosan vizsgálta a karrier-mediált transzcitózis útvonalak célzásának lehetőségeit egyszeresen, kétszeresen és háromszorosan jelölt nanorészecskékkel is. Összegezve az eddigi tapasztalatokat, milyen rutinszerűen alkalmazható módszert javasolna vízdékony gyógyszermolekulák hatékony bejuttatására az agyszövetbe in vivo körülmények között anélkül, hogy szükséges lenne a vér-agy gát permeabilitásának átmeneti növelése? Vannak adatok arra vonatkozólag, hogy adott hatóanyagok esetén hányszoros koncentráció növekmény érhető el a parenchymában nanorészecskék alkalmazásával? Kutatásaik érthető módon elsősorban az agyi

Ádám Dénes
Laboratory of Neuroimmunology
HUN-REN Institute of Experimental Medicine
1083 Budapest, Szigony u. 43.
Hungary



gyógyszerbejutattás hatékonyságára fókuszáltak, de vizsgálták a nanorészecskék okozta esetleges gyulladás kialakulását in vivo? Ennek karakterizálása alapvető fontosságú lehet a technológia alkalmazhatósága szempontjából idegrendszeri betegségek terápiája során.

Dr. Dénes Ádám

Budapest, 2025.12.10.