

Opponensi vélemény

Dr. Veszélka Szilvia „**Vér-agy gát vizsgálatok sejttenyészetes modelleken: gyógyszerátjuttatás és betegségek mechanizmusa**” címen benyújtott MTA doktori értekezéséről

Dr. Veszélka Szilvia MTA doktori értekezése a vér-agy-gát alaposabb megértésére irányuló kutatómunkáját foglalja össze.

A téma abszolút időszerű, a vér-agy-gát védő funkciója elengedhetetlen a központi idegrendszer védelmében, sérülése pedig neurodegeneratív betegségekhez vezethet. Ugyanakkor a vér-agy-gát akadályt jelent a központi idegrendszert célzó gyógyszerek célba juttatásában, így intenzíven kutatott terület a vér-agy-gát kiaknázása a gyógyszerek célzott agyi bejuttatásában. Mindezek vizsgálatának pedig fontos eleme a gyógyszerek vér-agy-gáton történő átjutásának *in vitro* modellezése és a vér-agy-gát épségének, intaktságának vizsgálata.

A Jelölt kutatómunkája során

1. Kilenc, különböző a vér-agy-gát modellezésére alkalmazott *in vitro* sejtrendszert jellemzett és hasonlított össze.
2. Három betegségtípusban: diabetes, krónikus stressz és atherosclerosis, vizsgálta a vér-agy-gát sérülését, utóbbi két betegségmodellben *in vivo* modelleket (is) használt.
3. Vizsgálta egy klinikailag is alkalmazott antioxidáns vér-agy-gátat védő hatását.
4. A vér-agy-gát szoros sejtkapcsolatait (tight junction) potenciálisan megbontó peptideket és egy kismolekulát vizsgált annak érdekében, hogy jellemezze ezek hatékonyságát a vér-agy-gáton keresztül történő gyógyszerpermeabilitás fokozásában.
5. Változatos, egy-, két- és háromszoros célzómolekulákkal ellátott nanopartikulumokat jellemzett annak érdekében, hogy a vér-agy gát specifikus

sejtfelszíni fehérjéinek kihasználásával a gyógyszerek agyi célba juttatása hatékonyabbá váljon.

A kutatómunka a Deli Mária professzor által vezetett iskola magas színvonalú hagyományait folytatja. Kiemelendő a Jelölt által alkalmazott módszertani sokszínűség, amely az *in vitro* rendszerektől az organoidokon át az *in vivo* modellekig, valamint biofizikai mérésekig terjed.

Mindezen eredményeket tizenkilenc eredeti és négy összefoglaló közleményben publikálták, amelyek közül tízet jegyez a Jelölt első vagy utolsó szerzőként (két esetben megosztott levelező szerzőként).

Az értekezéssel kapcsolatos formai és tartalmi észrevételeim:

Az értekezés a „klasszikus” felépítést követi. Az Irodalmi áttekintés/Bevezetés tizennégy oldal terjedelmű, amely megfelelő áttekintést ad a rendelkezésre álló háttér ismeretekről, jól bevezeti a megoldandó problémákat, mint a megfelelő vár-agy-gát modellek, a vér-agy-gát sérülésének összefüggéseit betegségekkel és a gyógyszerek agyba történő bejuttatásának módjait. A kutatási célok ismertetése lényegre törő. A Módszerek fejezet kellő részletességgel ismerteti az alkalmazott módszereket. A kísérleti eredmények taglalása kissé terjedelmes, 77 oldalt tesz ki, de ezt indokolja az adott problémakör rendkívül sokrétű körbejárása. A dolgozat összesen 81 ábrát tartalmaz, a magyarázó ábrák kiemelkedően színvonalasak.

A Kutatási eredmények összefoglalása fejezet alapos áttekintése a Jelölt sokrétű tudományos eredményének, azok jelentőségének és mások eredményeivel való összevetésének. A Kitekintés fejezet új, ígéretes kutatási irányokat vetít előre. Egy Összefoglaló fejezetet ugyanakkor hiányoltam.

A dolgozatot alapos, átgondolt munkának tartom, a fogalmazás azonban nem sikerült mindenütt gördülékenyre, illetve a transzporterek elnevezésében találtam pontatlanságokat. Ilyen pontatlanság, hogy az SLC karriereket néha efflux pumpák közé sorolja (például a 19. ábránál), holott ezek nem elsődlegesen aktív transzporterek, mint például a tipikus efflux pumpa, ATP hidrolízis energiáját használó P-glikoprotein, amellyel a Jelölt is részletesen foglalkozott kutatómunkája során.

A **Jelölt** tizennyolc új célkitűzést tárgyal, amelyek három nagy témakörhöz kapcsolódnak:

- 1) Sejttenyészetes vér-agy-gát modellek összehasonlítása, 2) Vér-agy-gát károsodások patológiás modellekben történő és azt védő anyagok vizsgálata, és
- 3) A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata

A Jelölt dolgozatában felsorolt eredményeket itt nem részletezem, azokat új eredményként elfogadom.

Főbb kritikai észrevételeim:

- A 3.2. fejezetben leírja, hogy milyen koncentrációkban tesztelték a vegyületek/gyógyszerek toxicitását. Az alkalmazott koncentrációk igen magasak: sok esetben több 100 mikro mólosak. A bírálóban felmerül, hogy ilyen magas koncentrációknak van-e fiziológiás/patológiás relevanciája? Hasznos lett volna továbbá azt is megemlíteni, hogy a toxicitást és a vegyületek „biztonságos” koncentrációját milyen módszerrel határozták meg.
- A rhodamine 123 festéket használták a P-gp és a Bcrp fehérje aktivitásának méréséhez. A rhodamine 123 viszont csak a mutáns, nem a vad típusra jellemző 482-es Arg-t tartalmazó ABCG2 fehérje szubsztrátja. Ez alapján a 46. ábrán bemutatott mérésben „csak” a P-gp aktivitás érhető tetten.
- Az Eredmények fejezetben, amikor a különböző sejtes modelleket hasonlítja össze, jellemzi többek között azok P-gp expresszióját immunfluoreszcens festést követő konfokális mikroszkópia segítségével, és megállapítja, hogy az eredeti, nem módosított Caco2 sejtben alacsonyabb a P-gp expresszió. A hivatkozott 11-es ábrán viszont nem látható külön a P-gp festés és ugyanolyan színezést alkalmaz, mint a klaudinokra. Ráadásul kvantitatív adattal, esetleg Western blottal nem számszerűsíti a P-gp expressziót, így a megfigyelés véleményem szerint szubjektív. A 4.1.1. fejezet ábráinak egy része azonos Hellinger Éva PhD dolgozatának ábráival, ezért célszerű lett volna kiemelni, a közös publikációból származó mely eredmények a Jelölt sajátjai.
- A génexpressziós vizsgálatokban, pl. 17. ábra és 47. oldal, ABCA fehérjéket is az SLC-k között sorol fel, holott az ABC család, szerkezetét és működését tekintve, teljesen elkülönül az SLC fehérjéktől.
- A vér-agy-gát modell sejtek összehasonlításánál meghatározta az SLCO1C1 gén expresszióját, amely azonban inkább a choroid plexus sejtjeire jellemző. Ugyanakkor nem vizsgálta a vér-agy-gátra jellemző SLCO1A2 gén

expresszióját, amely ráadásul egy multipsecifikus, gyógyszereket is szállító karrier fehérjét, OATP1A2 kódol, szemben az SLCO1C1 által kódolt, szűkebb szubsztrát felismerésű tiroid hormon transzporterrel. A sztatinok sejtbeli felvételében az OATP1A2 és OATP1B1/3 és OATP2B1 fehérjék jellemzőek, tudomásom szerint az OATP1C1 fehérjénél még nem írtak le sztatin transzportot.

- A 4.3.1. „A hatékonyabb agyi gyógyszerbejuttatás lehetőségeinek vizsgálata” c. fejezetében és az azt követőekben (egészen a célzott nanopartikulumokról szóló fejezetig) hiányoltam az alkalmazott vér-agy-gát modell megnevezését, amely a vonatkozó ábrákból sokszor nem derül ki. Sőt, általános észrevételem, hogy az ábrák leírásai elég szűkszavúra sikeredtek. Nagyban megkönnyítette volna az olvasó dolgát, ha az ábrákon az alkalmazott módszer, sejt modell, egyéb releváns információ rajta van.
- A tesmilifent a kísérletekben igen magas, 1-100 μM -os koncentrációban alkalmazza. Nem tartom valószínűnek, hogy fiziológiásan ilyen magas koncentrációk előfordulnak, ráadásul azt a megállapítást teszi, hogy a multidrog transzportereket gátolta, holott csak a 100 μM -os koncentráció okozott 5-10%-os gátlást a próba szubsztrát felvételében.
- A szignifikáns szót nem mindig használja megfelelően, pl. a 78. C ábrán, a 105. oldalon a 3-asan célzó nioszómák filipin általi felvételének gátlása nem szignifikáns, az erre hivatkozó szövegben mégis így fogalmaz “Az inhibitorokkal való előkezelés hatására az N-AGL nioszómák sejtfelvétele szignifikánsan csökkent. A filipin kezelés után 89%, míg a citokalazin D kezelést követően 78% volt sejtfelvétel a kontroll csoporthoz képest (78. C ábra)”

Apróbb észrevételeim:

- A hCMEC/D3 sejtvonala eredetét nem tüntette fel a dolgozatban.
- Apró pontatlanság: a Bevezető, 8. oldalán azt írja, hogy a vér-agy gáton nagy mennyiségben fejeződnek ki a karrierok közül az SLC-k. Szerintem minden karrier SLC fehérje, illetve mihez képest fejeződnek ki nagy mennyiségben?
- „Gyenge farmakokinetika” szerepel a 9. oldalon, amely megfogalmazás pontosításra szorul.

- Fogalmazása néhol nehézkes, pl. „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” 14. oldal, “passzáltuk kísérleti felszínekre.” 23. oldal.
- 3.ábra címében én inkább modellt használtam volna a sejtek helyett.
- 36.oldalon a hivatkozott cikkben Keserű helyett Kesserű szerepel.
- A dolgozat számos elütést tartalmaz.
- Transzportfehérje helyett transzporter fehérje lett volna szerencsésebb kifejezés a transzporter fehérjék leírására.
- A 40 és 41. ábra oszlopainak jelölése nem teljesen egyértelmű, mivel az ábraalírásban jelzett fehér és szürke színen kívül a legváltozatosabb mintázatok szerepelnek az ábrákon.
- Tudom, nagy és nem feltétlenül szeretem munka, de az ábrák feliratait lehetett volna egységesíteni, azok váltakozva vannak magyarul és angolul.
- YFP konstrukció (71. oldal) leírását nem találtam a metodikában, nem derül ki egyértelműen, hogy az a Jelölt saját munkájából született-e.

Szakmai kíváncsiságból eredő kérdéseim a Jelölthöz:

- Az endotélsejtek izolálásához puromycint használtak, ami bevett gyakorlat. A módszer elve, hogy a magas P-gp tartalmú endotélsejtek rezisztensek a puromycinre, így azok szelektív előnyt élveznek a nem P-gp vagy alacsony P-gp tartalmú sejtekkel szemben. Kérdésem, hogy okozhat-e ez a mesterséges körülmény fokozott P-gp expressziót, ezzel rontva az *in vitro* modell képességét, hogy az a fiziológiás állapotot tükrözze.
- A Módszerek fejezetben ismerteti a különböző sejtípusok izolálását, ami patkány agyból történt. Kérdésem, hogy lehetséges lenne-e valamilyen felszíni marker alapján kiválogatni a sejteket pl. FACS-val?
- A toxicitás mérésekhez impedancia mérést alkalmaztak. Kérdésem, hogy miért erre esett a választásuk, össze tudná foglalni e módszer előnyeit a „klasszikus” módszerekkel összevetve, mint például ATP- vagy NADPH-szint mérés? Végeztek-e összehasonlító vizsgálatokat a különböző módszerek megbízhatóságáról?

- Írja, hogy a Caco-2 sejtvonalakban a P-gp expressziója változó. Ki tudná ezt bővebben fejteni? Mi okozza ezt a változékonyságot, passzázsszám, konfluencia, egyebek?
- A polarizáltatott Caco és MDCKII modellek apikális felszínükön villusokat fejlesztenek, ami nem jellemző a vér-agy gátra. Ez mennyiben befolyásolta méréseiket? Szintén érdekelne, hogy a konfluencia állapotának megfigyelésén kívül minden esetben mérték-e a sejtek sejtek közötti permeabilitást, annak érdekében, hogy megbizonyosodjanak arról, hogy a sejtek valóban a vér-agy gáthoz hasonló barriert hoztak-e létre. Ehhez kapcsolódik, hogy „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).” További kérdésem, hogy eredményeik alapján kimondható-e, hogy a (patkány) primer endotelsejtekből származó vér-agy gát modell jobb, mint a bél vagy vese eredetűek?
- A 24. ábrával kapcsolatos kérdésem: hogyan történt a metilglioxál és a védő anyagok adagolása? Az impedancia mérés minden esetben a sejtindex korai csökkenését mutatja, majd ez után kezd ez emelkedni. A védő „anyag” adása késleltetve történt, vagy ez esetleg vissza tudja fordítani a kezdeti sejtkárosodást?
- Az APOB-100 OE (overexpresszáló) egerekben a hippocampusban mutatták ki a fluoreszcein megnövekedett permeabilitását (36. B ábra). Kérdésem, hogy mi az oka, hogy más vizsgált agyi régiókban a vér-agy gát permeabilitása nem változott?
- Az APOB-100 OE egerekben a P-gp-t kódoló Abcb1a szintje csökkent az Abcb1b-é pedig emelkedett. Kérdésem, hogy mennyire tudja ez a 2 gén átvenni egymás szerepét, és ha igen, akkor milyen nettó hatást vár?
- Kimérték, hogy a tezmilifen (tamoxifen analóg) koncentrációfüggő módon növeli a vér-agy-gát modell permeabilitását, viszont alacsony koncentrációban enyhe permeabilitás növekedést tapasztaltak. Mi ennek az *in vivo* jelentősége, lehet-e a gyógyszert „pontosan” kititralni, hogy a kívánt hatást ériék el?
- Változatos, igen komplex modelleket dolgoztak ki a vér-agy-gáton történő átjutás vizsgálatokhoz, beleértve agyi organoidok „növesztését” és vér-agy-gát modellekkel történő együtt tenyésztését. Kérdésem, hogy mennyire skálázható a

rendszer, alkalmas lenne-e közepes esetleg nagy áteresztőképességű
tesztelésekre? Automatizáció elképzelhető-e? Az organoidok mennyire
reprodukálhatók, mekkora variancia van közöttük?

Összességében megállapítom, hogy a Jelölt MTA doktori értekezése hiteles és új
eredményeket tartalmaz. A doktori értekezés nyilvános vitára bocsátását
messzemenően támogatom.

Budapest, 2025. december 1.



dr. Laczka Csilla