

**Dr. Deli Mária Anna: VÉR-AGY GÁT MODELLEK LÉTREHOZÁSA, JELLEMZÉSE
ÉS ALKALMAZÁSA ORVOSBIOLÓGIAI KUTATÁSOKBAN című MTA doktori
értekezés bírálata.**

(Prof. Dr. Nagy Zoltán MTA doktora)

Az összesen 127 oldal terjedelmű értekezés összefoglalja azt a szerteágazó kutató munkát és annak eredményeit, amit a jelölt a szegedi kutató laboratóriumban, illetve széleskörű tudományos együttműködések keretében végzett. A néhai Joó Ferenc professzor által fémjelzett hazai vér-agy gát kutatás méltó folytatója Deli Mária. A bíráló abban a szerencsés helyzetben van, hogy alkalma volt a jelölt PhD munkáját is megismerni és értékelni, majd az ezt követő tudományos pályát is követni a jelen disszertáció eredményei alapján.

Elsősorban az *ex vivo* módszerek fejlesztése és annak alkalmazása különböző agy patológiai állapotokban jelenti munkássága gerincét. A vér-agy gát kutatás klasszikus korszakát követően, amelyet az ultrastrukturális, jelzőanyag vizsgálatok, szerkezetkutatás jelentette, az új korszakot az agyi mikro-erek, illetve endothel sejtek izolálásának, tenyésztésének módszertani kidolgozása fémjelzi. Ez a módszer tette lehetővé az új technológiára épülő farmakológiai barrier vizsgálatokat, illetve a sejtbiológia, molekuláris biológia fejlődése a vér-agy gát jelenségeinek jobb megértését.

A disszertáció megfelel a formai követelményeknek. A bevezetés, kutatási célok, vizsgáló módszerek, a vér-agy gát modellezés után a modell alkalmazását mutatja be 2 nagy fejezetben. Az eredményeket részben a kísérletek ismertetésénél foglalja össze a szerző, részben a disszertáció végén összegezi ismét a kutatási eredményeket. A 99 ábra, mely részben mikro fotó, részben grafikon, illetve ezek kombinációi jól szerkesztettek, informatívak, minőségük jó. Néhány betű kihagyáson kívül formai hibát nem találtam a dolgozatban. A mondat szerkezetek helyenként az angolról visszafordításról árulkodnak. Formai szempontból a dolgozat megfelel az MTA előírásainak.

A bemutatott eredmények rangos folyóiratokban jelentek meg eredeti közlemények, összefoglaló közlemények, illetve könyv fejezetek formájában. A **28 eredeti közleményből 5-ben** a jelölt az első szerző. Az **összesített IF 83.927**, ebből az eredeti közlemények IF-a 77.907. Az MTMT adatbázis szerint (2010.07.13) 762 független hivatkozás történt a munkákra, ebből az eredeti közleményekre 550.

A **bevezetésben** a vér-agy gát anatómiáját, jelentőségét foglalta össze a jelölt. A vér-agy gát kutatás elmúlt 150 évének eredményeiből óhatatlan, hogy az irodalmi válogatás jelentős önkorlátozással kellett, hogy járjon. Ezzel a problémával szembesült a bíráló is, amikor több, mint 20 évvel ezelőtt hasonló témában nyújtotta be doktori értekezését. Mégis talán a vér-agy gát megnyílásának alapmechanizmusát vitató *vesicular transport versus junctional opening* vita megemlítése, az első jelzőanyag elektronmikroszkópos feldolgozások, a TJ leírása, vagy *freeze fracture* EM morfológia leírása megérdemelte volna az említést, továbbá az első ko-kultúra modell leírása és értékelése, hiszen részben ez jelentette a jelölt további munkájának is a koncepcionális alapját.

A **kutatási célok fejezetben** a következő fejezetek tartalomjegyzékét találjuk. A kutató-fejlesztő munka céljainak markánsabb megfogalmazása érdekesebbé tette volna ezt a fejezetet. A neurovascularis egység szemlélete a múlt század első harmadából a klasszikus neuropathológia endothel-glioneuralis egység koncepciójából származik. Klinikum közeli problémalátásról tanúskodik a szerző azon törekvése, hogy a neurológia meghatározó

kórképeinek modelljeiben, (pl. gyulladás, agyi ischaemia, neuro-degeneratív állapotok) az általa fejlesztett és sikeresen alkalmazott vér-agy gát modell felhasználásával adatokat nyerjen, vagy a gyógyszerek agyszövetbe juttatásának problémájával foglalkozzon.

A **módszertani fejezet** a disszertáció egyik erőssége. Munkatársaival sikeresen alkalmazta a perkoll gradiens centrifugálásos módszert, valamint az agyi endothel sejt izolálás mellett a gliasejt és pericyta izolálást fiatal egerekből, patkányokból, majomokból. Puromicines kezelés, a komplement-mediált sejtlízises módszer alkalmazása az endothel kultúra tisztasági fokának növelésére, továbbá a hydrocortizon kezelés, a különböző kutatócsoportok próbálkozásainak sikeres összegezése. A két, illetve 3 komponensű együttes kultúrák alkalmazása lényegében a mesterséges vér-agy gát kialakítását eredményezte, amely módszert japán munkatársaival szabadalmaztatta. A poliészter membrán két oldalára tenyésztett sejtek, endothel, illetve pericyta, valamint az inzerteket tartalmazó 12 lyukú tenyésztőedény aljára tenyésztett astroglia sejtek az agyi kapilláris minden sejt komponensét tartalmazta. A kettős és hármas modellt minden variációban kipróbálták és a módszert standardizálták. Nem csupán kísérleti állatok agyából származó sejtekkel dolgoztak munkatársaival, de humán eredetű hármas kombinációjú rendszert is sikeresen létrehoztak.

- **A mikroér endothel sejtek izolálásánál mennyiben kontaminálódik a preparátum kisartéria, illetve venula endothel sejtekkel?**

Az agyi endothel mikroér tenyészet barrier tulajdonságát különböző módszerekkel mérték. Így transz-endothelialis elektromos ellenállás (TEER) méréssel (EVOM). Az ellenállásként a mért érték és a filter különbségét tekintették valósnak. A permeabilitás vizsgálatokat Na-fluoreszeinrel, Evans-kék albuminnal (EBA), illetve Lucifer sárgával végezték.

- **Saját tapasztalatunk szerint az endothel-monolayerben gyakran előforduló lyukak, folytonosság hiány mennyiben befolyásolta a mért, illetve számított értékeket?**
- **A mért értékek jelentősen kisebbek az agyi capillariskok ohmikus ellenállásánál, ez mennyiben befolyásolta a barrier vizsgálatokat?**
- **A megnyílt TJ átengedi az albumin nagyságú jelzőanyagokat. Szabad-e az EBA extravazációt kizárólag transendothelialis barrier károsodás eredményének tekinteni ?**
- **Miért nem alkalmaztak más jelzőanyagokat pl. HRP-t, ami fény és EM szinten is jól alkalmazható ?**

A gyógyszer permeabilitási vizsgálatokhoz szöveti eloszlási modellt számoltak bólus perfúziót követően. Ugyancsak a gyógyszer vizsgálatokhoz a két kompartmenes eloszlásban elemezték az endothel monolayer permeabilitási tulajdonságait a Fick elv alapján. A clearance értéket számolták és a kumulatív tisztulási adatokat azt az idő függvényében elemezték. A permeability surface area product (PS) endothelre vonatkozó értékét a teljes permeabilitás és a membrán permeabilitás különbségéből számolták.

- **Mennyiben befolyásolta a számolt értékeket a monolayeren gyakran előforduló lyuk, (lásd a kérdést az előzőekben is), illetve a többrétegű, egymásra növevő endothel sejtek előfordulása ?**
- **Volt-e differencia a primer kultúra, és a passzált szubkultúrák között, illetve milyen PS értékei voltak az immortalizált endothel sejtekből kialakított kultúráknak?**

A módszertanban a továbbiakban felsorolt technikák a sejtbiológia gazdag tárházát vonultatta fel, amelyben a jelölt nagy tapasztalatát és jártasságát bizonyította. Az *in vivo* állatkísérleti

részben egerekkel (CBAxBL/6) patkányokkal (Wistar-Kyoto) és újszülött sertésekkel dolgoztak. A kísérletek tervezésénél figyelembe vették az EU ide vonatkozó direktíváit.

Az eredmények (4) fejezetben, az első alfejezetben (4/I) az agyi endothel sejt tenyészetek előállításával szerzett tapasztalatait, a tenyészetek minőségének javítására tett módszertani fejlesztés eredményeit foglalta össze a jelölt. A módszerre vonatkozó történeti visszatekintéssel indított fejezet a szerkesztés logikáját megtöri.

Két-három hetes patkányok agyából izolált endothel sejt tenyészetekben jól elkülönülnek a pericyta kolóniák. A sejtek karakterizálását, *prostaglandin*, *prostacyclin* termelését NO termelést hasonlították össze két immortalizált sejtvonallal (GP8, RBE4). A tenyészetek tisztaságát különböző P-glikoprotein szubsztráttal, cytostatikummal és antibiotikummal igyekeztek fokozni és ezek közül a puromycin bizonyult sikeresnek.

A puromycin mellett a cAMP emelte meg legjobban a tenyészetek TEER értékét. Az astroglya ko-kultúrában tovább nőtt az ohmikus ellenállás. A tenyészetek minőségét hidrokortizon kezeléssel tovább javították.

- **A szubkultúrákban az endo-pericyta arány változott-e? A mechanikus klónozás mellett használtak-e D-valin kezelést, vagy lectin jelölés után (*Griffonia simplicifolia*) FACS-szal sejtválogatást ?**
- **A tapasztalt 120-136-330 Ω/cm^2 ellenállás meglehetősen alacsony az 1800-2000 Ω/cm^2 agyi capillaris ellenálláshoz képest. A különböző, a szerző által kidolgozott módosításokkal mi volt a legnagyobb ohmikus ellenállása a kettős, hármas kultúrákban?**
- **A különböző indítású ko-kultúra rendszerek között milyen különbségek voltak?**

Az endothel sejt tenyészeteket a sejtkapcsoló fehérjék (klaudin-5,12,okkludin, ZO-1, ZO-2) az efflux pumpák (Mdr1a, Mdr1b, Mrp1,3,4, 5, Berp, Oatp-2) glükóz transporter-1, mRNS meghatározásával monitorozták. Az optimális tenyésztési körülmények az endothel sejtek kapcsoló fehérjéinek fokozottabb kifejeződését eredményezte. Ezzel párhuzamosan tesztelték különböző molekulák transzportját, paracellularis markerteket (szukróz, inulin) egy endogén ligandot és 7 gyógyszer molekulát monitoroztak.

4/II fejezetben a pericytákkal bővített 3 sejt rendszer leírásánál ismét irodalmi utalásokkal kezdte a szerző a fejezetet. Sajnálatos, hogy az első, két sejtípust felhasználó modellre vonatkozó első közlemények nem kerültek említésre (Tao Cheng J.H et al. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* 1987, 7:3293, Tao Cheng J.H., et al.: Astrocytic orthogonal arrays of intramembranous particle assemblies are modulated by brain endothelial cells in vitro. *J. Neurocytol* 1991, 19:143)

- **A pericyta indukciós hatását a TJ kialakulására, komplexitására milyen adatok bizonyítják? A pericyta feltételezett TGF β 1 expressziójának van-e ismert hatása a záró kapcsolat fehérjék expressziójára?**
- **A három sejt-típus kölcsönhatásai az endothel sejtréteg jobb barrier tulajdonságainak kimutatásán túl mit jelent?**
- **Patkány, majom (*Macaca irus*), illetve humán eredetű hármas kultúra rendszer összehasonlításánál melyik rendszert találták a legígéretesebbnek a barrier, illetve transzport vizsgálatokhoz?**

5/1 fejezetben az agyi gyulladással modellekben folytatott vizsgálatok eredményeit összegezi a szerző. Az LPS hatását, a gyulladással jelenségeket tesztelték sejt-kultúra rendszerben. Az LPS csökkenti az ohmikus ellenállást, csökken a sejtkapcsoló fehérjék immunfestése, a barrier funkció, az efflux pumpa funkció romlik. Az akut fázis proteinekhez

tartozó *amiloid P-komponens (SAP)* ebben a rendszerben védő hatású hasonlóan a *pentozánhoz*.

A *pentozán* felszintetikus polianion keverék, erős negatív töltésű heparinoid. (A klinikai gyakorlatban az SP54 néven forgalmazott szer alkalmazását különböző területeken kísérelték meg. Mint véralvadás gátló evidencia szintű hatása nem igazolt pl. ischaemiás stroke-ban.)

- **Milyen mechanizmus állhat az SP54 hatása mögött? Az ismert, hogy a töltés viszonyok meghatározzák az endothel sejtek barrier működését, az erősen pozitív töltésű *protamin szulfát* megnyitja a vér-agy gátat, a heparin ezzel ellentétes hatású.** (Nagy et al.: Charge -related alteration of the cerebral endothelium. Lab. Invest. 1983, 49:662) **Az SP54 negatív töltése játszik itt szerepet?**

A gyulladáshoz citokin *TNF α* újszülött sertések intra-carotikus bevitelével a vér-agy gát károsodását okozza, amelyet szerin proteáz gátló előkezeléssel ki lehetett védeni.

- **A mechanizmus kifejtésével adós marad a disszertáció.**

A fejezet legértékesebb vizsgálatának értékelem a HIV-1 vírus Tat fehérjéjével folytatott vizsgálatokat. Három lehetséges jelátviteli út vonal, 3 mechanizmus bemutatásával igazolták a kladin-5 fehérje expresszió csökkenését, ehhez kapcsolódó endothel sejtek barrier funkciójának károsodását ami a vírus fertőzés egyik lehetséges útját igazolja. (*ábra helyesen 52. a 32. helyett / 68.oldalt/*) Ugyancsak igazolták a az immunkompromittált állapotokban kialakuló *Toxoplasma gondii* fertőzés lehetséges agyi manifesztációjának módját a károsított vér-agy gáton keresztül. Az ICAM-1 expresszió jelentős emelkedését igazolták. A CD 11b antigént prezentáló monocyták ennek révén kerülnek a központi idegrendszerbe. Ezt nevezték „trójai faló” mechanizmusnak.

- **A toxoplasma neuro-inváziójában milyen dendritikus sejtek vesznek részt?**

V/2 Fejezetben az agyi ischaemiás állapotok kialakulásának néhány tényezőjét elemezték . A SOD-1-et „túl-expresszáló” transzgen egértörzs agyi endothel kultúráját hasonlították össze normál egerek hasonló sejtjeivel. A SOD-1 védő hatású oxidatív stresszben. SOD termelést csökkentő *parakvat* dózis függően csökkentette az endothel sejtek ohmikus ellenállását. A ROS termelődést fokozó *menadion* ugyancsak a SOD-1-et expresszáló sejtreteg ellenállását csökkentette szemben a vad endothellel. Ezt azonban Fe kelátorral ki lehetett védeni. Ebből az összefüggésből a szerzők arra következtettek, hogy az emelkedett SOD-1 magasabb szintű peroxidok jelenlétével jár a sejtekben.

- **A peroxidok, hidroxil, peroxinitrit milyen hatással van a záró sejt kapcsolatokra? Közvetlen endothel sejt pusztulást nem eredményeznek a peroxidok?**
- **Mennyire reverzibilis a menadion hatás?**

A glutamát hatását vizsgálták az okkludin fehérjék expresszálódására. A hipotézis szerint ischaemiás stroke-ban a károsodott vér-agy gát megnyílás közvetlen kapcsolatban van az endothel sejtek glutaminsav receptorainak aktiválásával. A feltételezést az okkludin festődés elegánsan igazolta.

- **Mi a feltételezett mechanizmus?**
- **Más laterál-membrán fehérje változott-e?**
- **Van-e a glutamát receptoroknak polaritása, a parenchima oldalon kialakuló glutamát toxicitás hogyan hat az erek lumenét bélelő endothel sejtekre?**

Az agyi endothel sejtekben a P-glikoprotein efflux pumpa működésére hatással van a tPA , amit rodamin-123 felhalmozódással mérték. Érdekes megfigyelés volt, hogy a PAI-1 ezt a

hatást nem védte ki, ugyanakkor az efflux pumpa működésének fokozásával, forbolészter (PMA) kezeléssel ez a hatás kivédhető volt.

- **Az efflux pumpa gátlás és a vér-agy gát károsodás összefüggése nem világos.**
- **Érdekes lett volna a tPA már bizonyított barriert károsító mechanizmusait is ezzel párhuzamosan vizsgálni, így az MMP-9 aktivációt, vagy a VEGF expresszió változását és a G-protein NK-1 tachykinin receptor aktivációt mérni.**

Tamoxifen származékkal (DPPE) végzett vizsgálatokban az endothel sejtekben a hisztamin hatás gátlásával igyekeztek kivédeni a 4 ér lekötéses stroke modellben a vér-agy gát károsodást. Ez nem sikerült, sőt maga a DPPE is barrier károsodást okozott.

- **A két jelzőanyaggal végzett barrier zavar lokalizációs és időbeli alakulása nehezen értelmezhető.**
- **Az eredmények magyarázatával adós maradt a tanulmány.**

A magas vérnyomás és a vér-agy gát károsodás összefüggése jól ismert. A spontán hipertóniás patkánytörzsekkel számos vizsgálat történt. Az SHRSP patkányokon végzett transiens kétoldali arteria carotis interna lekötés kiterjedtebb barrier zavart okozott a vizsgált 6 agyi területen, mint a normál patkányoknál. A barrier zavar időbeli lefolyása is különböző volt. Az észlelt barrierei zavart a két jelzőanyag, az EBA és Na-fluorescein az átmeneti lekötést követően különböző lokalizációban és időben igazolta .

- **A vérnyomásértékek közlése nélkül nehéz értelmezni a kapott eredményeket.**
- **A hullámzó vérnyomás értékeknél a hirtelen vérnyomás emelkedés, az autoregulációs küszöb gyors meghaladásával okoz károsodást. Erre vonatkozóan történt-e mérés ?**
- **Az inter-endotheliális záró kapcsolatok „szétszakadását” tenzió kiugrásakor HRP jelzőanyaggal már dokumentálták (Nagy és mts. Acta Neuropathol. 1983). A mechanizmusra vonatkozóan milyen új információt jelentett az adott kísérlet ?**

A sztatinok endothel sejt-protéktív pleotróp hatása a molekulacsalád egyik sikerének forrása a gyógyszerpiacon. A *pitavasztatin* vér-agy gátra kifejtett protektív hatását az ellenállás emelkedésével, illetve a fluorescein permeabilitás csökkenésével igazolták, amit a klaudin 5 kifejeződés emelkedésével hoztak összefüggésbe, ugyanakkor a klaudin-5 mRNS szint nem változott a sejtekben.

- **Hogyan magyarázható a klaudin-5 expresszió fokozódása ebben a vizsgálatban?**

Az astroglia-endothel sejt szoros kölcsönhatása, melyet ko-kultúrában igazolni lehetett, már a korai tenyésztési vizsgálatokból ismeretté vált (Tao Cheng J.H et al. 1987, 1991). Az ischaemiás perkondicionálásban játszott szerepre a szerző hívta fel a figyelmet. Ebben a gliasejteknek van meghatározó szerepük. Oxigén és glükóz megvonás a gliában a GFAP, interleukin-6 és VEGF szint emelkedését eredményezte.

- **A szerző adós maradt annak magyarázatával, hogy ezek a változások miképpen befolyásolják az endothel sejtek kapcsoló fehérjéinek expresszióját.**

A prion okozta neuropathológiai elváltozások modellezéséhez is alkalmazott PrP 106-126 proteináz rezisztens peptidjét alkalmazták az endothel sejt kultúra rendszerben és bemutatták annak dózis függő közvetlen toxikus hatását, amit *pentozánnal* gátolni lehetett. Ennek alapján a prion eredetű idegrendszeri kórállapotokban az agyi endotheliumot elsődleges támadáspontnak tekintik. A PrP 106-126 két fontos efflux pumpa aktivitását is gátolta (MRP-1, P-glikoprotein)

Ugyancsak elegáns kísérletekben igazolták az amiloid β -peptid1-42 közvetlen endothel károsító szerepét, amelyet *pentozánnal*, többszörösen telítetlen ω -3 lipiddel, illetve dokozahexaénsavval (DHA) mérsékelni lehetett. A csonkolt tau protein a glia sejteken keresztül fejt ki hatását a TNF- α , CINC-3 és MCP-1 felszabaduláson keresztül. Az atomerő mikroszkópia, mint módszer bővebb ismertetése-ha már alkalmazásra került a bemutatott munkákban –a módszertani fejezetben hiányzott

- **A pentozán „védő” hatásának magyarázatával adós marad a disszertáció.**

A kísérleteket és azok eredményeit bemutató utolsó fejezet a vér-agy gát kutatás azon törekvéseihez tartozik amelyekben a barrier megkerülésével igyekeztek juttatni az agyszövetbe. Az osmotikus shock-tól kezdve (Rapoport, Nagy, Neuwelt) az izombeültetésig (Wakai) sok próbálkozás történt. A hiperozmotikus alkilglicerolok alkalmazhatóságát a jelölt többkomponensű sejt kultúra modelljében mutatta ki.

Elegáns vizsgálatokban igazolta a lehetséges nazális gyógyszerbevitel útjának morfológiáját. A szaglóhám sejt kapcsoló struktúrái, hasonlóan az agyi endothel sejtekhez, ZO-1, ZO-2, okkludin, klaudin 1,3,5 illetve 19 kapcsolófehérjéket tartalmaz. Az epithel sejteken kívül a lamina propria erei, valamint a szaglóideget burkoló sejtek képezik a barrier főbb részeit. Bioaktív A β nazális bevitelével a sikerült az említett polipeptidet a szaglógumóban és az agy különböző területein kimutatni az idő függvényében.

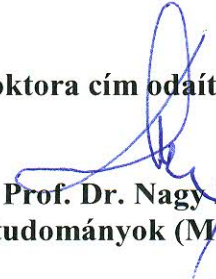
Összefoglalva a kérdések megjegyzések nem kisebbítik a nagy-ívű dolgozat érdemeit. Deli tanárnő a hazai vér-agy gát kutatás nemzetközi szinten is ismert és elismert reprezentánsa. Igényes *in vivo* és *ex vivo* kísérleti munkája, módszertani, technikai jártassága kiemelkedő. Iskolateremtő személyiség. Nemzetközi megmérettetését és elismerését eredményei, dolgozatainak száma igazolja vissza.

Eredményeit a következőekben kívánom összefoglalni:

- **Tovább fejlesztette az endothel-sejt monokultúra tenyésztési technikáját (Thy1.1 ellenanyaggal és komplement kezeléssel), a kettős kultúra sikeres alkalmazása mellett, munkatársaival kidolgozta a hármas kultúra (endothel-pericyta-astroglia) technikáját. Ezt a módszert japán munkatársaival szabadalmaztatta.**
- **Különböző, a klinikai gyakorlatban fontos problémához új adatokat szolgáltatott a hármas ko-kultúra alkalmazásával. Ezek közül kiemelkedik a HIV fertőzéssel, a prion betegségekkel és az Alzheimer kórral kapcsolatos modellek vizsgálata.**
- **Sikeresen alkalmazta a nazális A β 1–42 bevitelt, így a neurodegeneratív kór állapotok modellezéséhez szolgáltatott új megközelítési lehetőséget.**
- **Az átmeneti vér-agy gát megnyitás módszereinek tesztelésére alkalmassá tette a ko-kultúra rendszert.**

Az értekezés nyilvános vitára bocsájtását és az MTA doktora cím odaítélését javasolom.

2012. augusztus 20.


Prof. Dr. Nagy Zoltán
Orvostudományok (MTA) doktora