

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ELMÉLETI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
ÉS
MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

A VÉR-AGY GÁT VÉDELME PATOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Ph.D. értekezés

Tóth Andrea

Témavezető: Dr. Deli Mária

SZEGED

2014

1. BEVEZETÉS

1.1. A vér-agy gát áttekintése és modellezése

A vér-agy gát az agyi hajszálerek funkcionális egysége. Anatómiai alapját az endotélsejtek képezik, melyek dinamikus kölcsönhatásban állnak a környező sejtekkel: az asztrocitákkal, a pericitákkal, a perivaszkuláris mikrogliaikkal és a neuronokkal. A sejtek közötti kölcsönhatás felelős az endotélsejtek egyedi fenotípusának kialakulásáért, beleértve a morfológiai, a metabolikus és az enzimikus gátakat, valamint a receptorok, transzporterek, és efflux pumpák egyedi mintázatát. A vér-agy gát legfontosabb feladata az idegi működéshez szükséges homeosztázis megteremtése, az agy tápanyagokkal való ellátása, és a káros anyagoktól való védelme.

A vér-agy gát alapvető tulajdonsága a szoros paracelluláris gát, melyet az adherens (adherens junction; AJ) és szoros kapcsolatok (tight junction; TJ) szabályoznak. A TJ-ök megakadályozzák, hogy a hidrofíl molekulák, ionok és a víz szabadon beáramoljon a központi idegrendszerbe. A TJ-öket multiprotein komplexek alkotják, melyek a lipidraftokban integráns és velük kapcsolódó citoplazmatikus fehérjékből épülnek fel. Ilyen kapcsolódó fehérjék a zonula okkludens (ZO) és a β -katenin. A ZO fehérjék az okkludinokkal, a kladudinokkal és egyéb juncionális adhéziós molekulákkal állnak kapcsolatban. A β -katenin felelős a kadherinek citoskeletális fehérjéhez, az aktinhoz való kapcsolódásáért. A fiziológiai gát további fontos eleme az endotéliális fenesztráció hiánya, valamint a pinocitotikus vezikulák alacsony száma. Az agy hajszálereinek transzendotéliális elektromos ellenállása a sejtek közötti kapcsolatok szorosságát mutatja, amely *in vivo* meghaladja az $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ -t.

Az agyi endotélsejteken a receptorok, a transzporterek és enzimek polarizáltan helyezkednek el. Az endotélsejtek a neuronok táplálékkal való ellátásához számos transzportert expresszálnak a glükóz, az aminosavak és a nukleozidok számára. A központi idegrendszer védelmére olyan xenobiotikum efflux pumpákkal rendelkeznek, mint a P-glikoprotein vagy a multidrog rezisztencia proteinek.

A vér-agy gát sejtjes modelljei igen hasznosnak bizonyulnak az alap kutatásban valamint a központi idegrendszerre ható gyógyszerek átjutásának tesztelésében. Ezeknek a sejtjes modelleknek rendelkezniük kell az általános endotéliális és a specifikus vér-agy gát tulajdonságokkal. Ezen túlmenően egy ideális *in vitro* modellnek könnyen használhatónak, reprodukálhatónak, költséghatékonynak és kutatási valamint gyógyszerfejlesztési célokra is alkalmazhatónak kell lennie.

1.2. A vér-agy gát patológiás körülmények között

Az agyi endotélsejtek patológiás körülmények közötti védő szerepét a szakirodalom egyre inkább hangsúlyozza. A legfrissebb klinikai adatok rámutattak, hogy a vaszkuláris változásoknak fontos szerepe van az Alzheimer-kór korai patogenezisében. Az Alzheimer-

kör jellemzője a perivaszkuláris és parenchimális amiloid- β peptid lerakódások. A kapillárisokban az A β nem megfelelő eltávolítása a hajszálerek degenerációját okozza, amely a bazális membránfehérjék és az A β perivaszkuláris lerakódásához valamint csökkent vérellátáshoz vezet. A hipoperfúzió következtében az efflux pumpák működési zavara, metabolikus anyagcseretermékek felhalmozódása és megváltozott pH és elektrolit háztartás figyelhető meg, amely neuronális diszfunkcióhoz vezet.

Kísérleteink során az Alzheimer kórral összefüggésben álló két patológiás faktor a metilglioxál és az amyloid- β 1-42 peptidet (A β_{42}) vizsgáltuk. A metilglioxál mellett, hogy a sejtekben oxidatív és karbonil stresszt indukál, elősegíti az A β -aggregációját.

1.3. A vér-agy gát, mint terápiás célpont

A vér-agy gát szerepét az agy védelmében, mind fiziológias, mind pedig patológiás körülmények között számos tanulmány igazolja. Ennek következtében megsokszorozódott azoknak a kutatásoknak a száma, melyek középpontjában a vér-agy gát védelme áll. A potenciálisan agyi endotélsejteket védő molekuláknak népes csoportja ismert. Kísérleteink során, olyan gyulladáscsökkentő molekulákat teszteltünk, melyek hatékonyságát más sejttípusokon klinikai kutatások igazolják. A három tesztelt molekula közül kettőt, a pentozán poliszulfátot (PPS) és az edaravont más betegségek gyógyításában már sikeresen alkalmazzák, míg a dokozahexaén sav (DHA) táplálék-kiegészítőként közismert.

1.4. Célkitűzések

Kutatásaink során a A β_{42} és metilglioxál káros hatásainak kivédése céljából vizsgáltunk védőanyagokat *in vitro* vér-agy gát modelljeink segítségével. A tesztelt anyagok, a PPS, a DHA és az edaravon kiválasztása a csoport korábbi eredményein valamint irodalmi adatokon alapult.

Kísérleteink során a következő célokat tűztük ki:

1. az A β_{42} a vér-agy gát tulajdonságaira és morfológiájára gyakorolt hatásainak, valamint ezek mechanizmusainak felderítése *in vitro* sejtes ko-kultúra modellek segítségével
2. a PPS az A β_{42} -vel szembeni védőhatásának tesztelése vér-agy gát modellen
3. a DHA A β_{42} -vel szembeni védőhatásának felderítése agyi endotélsejteken
4. a metilglioxál vér-agy gátra gyakorolt hatásának vizsgálata humán agyi endotélsejt-rétegen
5. az edaravon metilglioxállal szembeni védőhatásának vér-agy gát specifikus felderítése

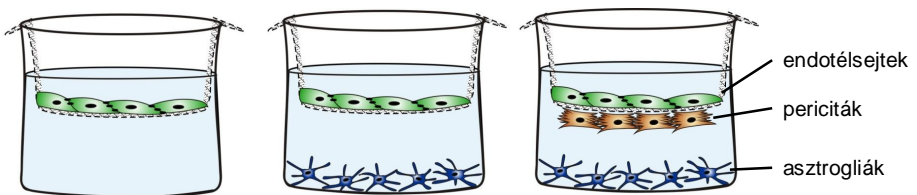
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Peptidek

Az $A\beta_{42}$ -t, az $izoA\beta_{42}$ -t és az azonos aminosavakból random szintetizált peptideket a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében szintetizálta Prof. Penke Botond munkacsoportja. A feloldott $A\beta_{42}$ peptid mintában globulomereket, láncszerű és gyűrűs, de sosem klasszikus protofibrillumokat figyeltünk meg. Az $izoA\beta_{42}$, fiziológias körülmények (37 °C, pH 7.4) között *in situ* oligomereket formált. A 15 μ M koncentrációban alkalmazott oligomerek *in vitro* 24 órás inkubáció alatt lassan aggregálódtak.

2.2. Sejttenyészetek

Kísérleteinkhez primer patkány agyi endotélsejtek kettős és hármas sejt kultúráit valamint humán agyi endotél sejt vonalat hCMEC/D3 (passzáz szám < 35) használtunk (1. ábra). A primer sejt kultúrák készítése több közleményünkben is leírt protokoll szerint történt. Az endotélsejt tenyészetek előállításához agyi kapillárisokat izoláltunk két hetes Wistar patkány agykból, melyeket IV-es típusú kollagénnel és fibrinektinnel bevont sejttenyésztő inzertekre szélesztettünk. A szintén agyi hajszálerekből nyert periciták izolálását más sejttenyésztési körülmények alkalmazása tette lehetővé. A gliasejteket újszülött patkány agykból nyertük. A vér-agy gát specifikus tulajdonságok indukálása céljából, az endotélsejtek a gliasejtekkel és pericitákkal tartottuk ko-kultúrában. A modellek összeállításánál az endotélsejteket a sejttenyésztő inzertek felső, a modell lumen felületére helyeztük. A gliasejteket a 12-lyukú tenyésztő edényekben növesztettük. A pericitákat a membránok alsó, a modell abluminális felületére helyeztük. Az endotélsejt tenyészetek egy hét alatt konfluenssé, azaz kísérleteinkre alkalmassá váltak.



1. ábra. *In vitro* vér-agy gát modellek: monokultúrák, kettős és hármas sejt kultúrák

2.3. A sejttenyészetek kezelése

Az $A\beta_{42}$ peptideket 0-200 μ g/ml (0-45 μ M), az $izoA\beta_{42}$ -t 0-30 μ M (0-135 μ g/ml) koncentrációban teszteltük. A metilglioxállal való kezelés 100-1000 μ M koncentráció tartományban történt. A PPS vizsgált koncentrációja 1.6 és 166.6 μ M (1 - 100 μ g/ml) között volt. A DHA törzsoldatát (300 mM) etanolban készítettük, míg a további hígítások (1-300 μ M)

sejttenyésztő médiumban történtek. Az edaravont 600-3000 μM között alkalmaztuk. Az aminoguanidin, közismert antiglikációs szer 600-2000 μM koncentrációban pozitív kontrollként szolgált a metilglioxállal szemben.

2.4. Életképességi és toxicitási vizsgálatok

Különböző módszereket alkalmaztunk párhuzamosan a kezelések toxikusságának meghatározására, úgymint az MTT festék konverziós tesztet, a laktát dehidrogenáz (LDH) felszabadulási tesztet, valamint az impedancia méréssel történő valós idejű sejtanalízist (RTCA-SP). Az elősejtek a sárga 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidot (MTT) lila oldhatatlan kristályokká képesek alakítani. A kezelések következtében a festék átalakításában látható csökkenés sejtkárosodásra utal. A kontroll csoportot 100%-os életképességűnek tekintettük. A sejtmembrán károsodás indikátora az LDH felszabadulása, melyet a sejt kultúrák tápfolyadékából előre gyártott kit (Cytotoxicity detection kit LDH) segítségével határoztunk meg. A sejtpusztulás mértékét a Triton X-100 (10 mg/ml) detergensennel kezelt minta alapján százalékban fejeztük ki. Az RTCA-SP (ACEA Biosciences) különböző sejtenyészetek biológiai állapotának jelzőanyag nélküli, valós idejű nyomon követésére alkalmas műszer. A módszer nagy előnye, hogy nem invazív. A sejtek monitorozása fiziológias körülmények között, elektromos impedancia mérés segítségével történik. A sejtindex ebből az impedanciából - az $(R_n - R_b)/15$ képlettel - meghatározott mérőszám. R_b a sejteket még nem tartalmazó, az R_n pedig a sejtekkel benövesztett minta impedanciája. A módszert hatékonyan alkalmazzák a sejtek letapadásának, növekedésének, életképességének és a kezelések toxicitásának meghatározására.

2.5. A sejt morfológia vizsgálata

A sejtek morfológiájában és a sejt-sejt kapcsolatokban bekövetkezett változásokat fáziskontraszt, elektron és holografikus fáziskontraszt mikroszkópok segítségével vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a sejteket a kezelést követően mostuk, fixáltuk, majd OsO_4 -el posztfixáltuk és dehidratáltuk. Végül a sejtenyésztő inzertek membránját eltávolítottuk és Taab 812-be ágyaztuk. A polimerizációt követően ultratinnmikrotómmal metsztük, és Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A digitális holografikus képeket Holo-Monitor M3 műszer (Phiab) segítségével készítettük. Ehhez a vizsgálathoz az endotélsejteket kollagénnel bevont boroszilikát üveg aljú edényekben tenyésztettük. A sejt morfológiát Holostudio 2.4 szoftverrel vizsgáltuk.

2.6. A permeabilitás vizsgálata

A transzendentáliális elektromos ellenállás (TEER) a sejtek közötti TJ-ök szorosságát mutatja, melyet EVOM ellenállásmérővel mértünk. Az endotélsejt-réteg felszínének tükrében,

$\Omega \times \text{cm}^2$ -ben adtuk meg. A sejtek közötti áteresztőképesség mértékének meghatározására fluoresceint (376 Da) illetve fluoresceinnel jelölt dextrans (4.4 kDa) használtunk. A sejteken keresztüli transzcéluláris átjutást albuminhoz kötött Evans kék festékkel (EBA, 67kDa) mértük. A sejtrétegen átjutott festékanyagok koncentrációját a filterek alatt, a tenyésztőedény lyukaiban (abluminális kompartment) lévő oldatokból határoztuk meg, melyekből transzendentáliális permeabilitási együtthatót (P_e), vagy permeabilitási együtthatót (P_{app}) számoltunk.

2.7. Immunohisztokémia

A primer patkány agyi endotéltenyészetek sejtek közötti kapcsolatait és morfológiáját ZO-1, okkludin és klaudin-5 TJ fehérjékre festettük. A human hCMEC/D3 sejt vonal β -katenin és klaudin-5 fehérjéit vizsgáltuk. A festéseket Nikon Eclipse TE2000 fluoreszcens mikroszkóppal, Olympus Fluoview FV1000 vagy Leica SP5 konfokális pásztázó lézer mikroszkópokkal tettük láthatóvá.

2.8. A reaktív szabad oxigéngyökök mérése

A szabadgyökök (ROS) fluorometriás detektálására klorometil-dikloro-dihidrofluorescein-diacetát (DCFDA) próbát alkalmaztunk. Az indikátor diffúzióval a sejtekbe jut, és a sejten belüli észterázok segítségével deacetylálódik. A reaktív oxigéngyökök hatására a DCFDA oxidálódik és fluoreszcenssé válik. A fluoreszcenciát Fluostar Optima fluorescent plate readerrel 485 nm gerjesztési és 520 nm elnyelési hullámhosszon mértük. A fluoreszcencia mértékét a kontroll csoport százalékában fejeztük ki az 1 órás DCFDA indikátorral való inkubáció után.

2.9. A P-glikoprotein aktivitásának meghatározása

A P-glikoprotein (P-gp) aktivitását a rhodamine 123 ligand akkumulációján keresztül határoztuk meg. A kezelések után az endotélréteget $10 \mu\text{M}$ rhodamine 123-mal inkubáltuk 1 órán keresztül 37°C -on. A rhodamine 123 mennyiségét fluoreszcens plate readerrel (excitáció: 485 nm, emisszió: 538 nm) határoztuk meg.

2.10. A fehérje módosítás meghatározása

A borjú szérum albumint (BSA; 50 mg/ml) foszfát pufferben oldva metilglioxál (2 mM) és a védőanyagok jelenlétében inkubáltuk steril körülmények között 7 napig sötétben 37°C -on, pH 7.4-en. Az inkubációs idő letelte után a módosított aminosavak mennyiségét fluoreszcencia méréssel határoztuk meg (gerjesztés: 360 nm, emisszió: 460 nm).

2.11. Statisztikai analízis

Minden adatot átlag \pm SD vagy SEM értéként adtuk meg. Az adatsorokon variancia analízist (ANOVA) követően Dunnett illetve Bonferonni posthoc statisztikai tesztek végeztünk a Graphpad Prism 5.0 program (GraphPad Software) segítségével. A $p < 0.05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk és a párhuzamos minták száma 3-16 volt kísérletenként.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

3.1 A patológias faktorok hatása az agyi endotélsejtekre

3.1.1. Az amiloid- β 1-42 peptidek hatása a vér-agy gátra

Kísérleteinkben az A β ₄₂ (25 μ M, 24h) drasztikusan megváltoztatta a patkány primer agyi endotélsejtek ultrastruktúráját. Az elektron- és fáziskontraszt mikroszkópos képeken citoplazmatikus vakuolizációt, a mitokondriumok és a sejteket összekötő TJ-ök károsodását figyeltük meg. Ezeket a változásokat előttünk az irodalomban még nem írták le. A toxikus hatást az életképességi vizsgálatokban is megfigyelhettük: csökkent az MTT festék redukciója és megemelkedett az LDH felszabadulása, ami metabolikus változásokra, valamint a plazmamembrán károsodására utal. Ezzel párhuzamosan a kezelés hatására nőtt a ROS termelődés és csökkent az P-gp efflux pumpa aktivitás az endotélsejtekben (2A. ábra).

Az A β ₄₂ agyi endotélsejtek gát tulajdonságaira gyakorolt hatását több szempontból is vizsgáltuk. A peptid-kezelés csökkentette a rezisztenciát, és fokozta mind a fluorescein, mind az albumin átjutását az agyi endotélsejt-rétegeken. Továbbá az A β ₄₂ hatására a korábban egyenletes festődés a sejthatárokon megtört vagy teljesen el is tűnt az okkludin, a klaudin-5 és a ZO-1 esetében (2A. ábra).

Aggregációs valamint idegsejteken végzett kísérletek arra engednek következtetni, hogy a metilglioxál hozzájárul az A β káros hatásához. A metilglioxál (600 μ M) és az A β (10 μ M, 24h) kezelés hatását, azonban még nem vizsgálták endotélsejteken. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a két anyaggal való együttes kezelés hatására az izoA β ₄₂ toxikussága még kifejezettebbé válik. Ezek az eredmények tovább erősítik a metilglioxál és az Alzheimer-kór közötti kapcsolatot.

3.1.2. A metilglioxál hatása humán agyi endotélsejteken

Eredményeink alátámasztják, hogy a metilglioxál önmagában is közvetlen káros hatással van az agyi endotélsejtekre (3A. ábra). A metilglioxál idő- és koncentráció-függő módon csökkentette a humán endotélsejtek életképességét, szignifikánsan megnövelte a sejtréteg permeabilitását és drámai módon megváltoztatta a sejtek alakját. A jelen tanulmány az egyetlen, amely a metilglioxál toxicitásának kinetikáját vizsgálja valós idejű impedancia mérés

segítségével. A metilglioxál káros hatását nem csak karbonil, hanem oxidatív stresszen keresztül is kifejti. Kísérleteinkkel megerősítettük, hogy a metilglioxál (600 μM) oxidatív stresszt indukál az agyi endotélsejteken. A ROS felszabadulás kinetikája segítségünkre volt a protekciós kísérletek optimális időpontjának meghatározásában: a 4 órás kezelési időtartamot ennek megfelelően választottuk ki.

A toxicitási vizsgálatokkal összhangban a metilglioxállal való kezelés jelentősen csökkentette az agyi endotélsejt-réteg gát tulajdonságait, megnövelte a FITC-dextrán és az albumin átjutását. A hatás koncentráció-függő volt, melynek során a metilglioxál magasabb koncentrációi okozták a legjelentősebb károsodást. A funkcionális permeabilitási adatok mellett immunhisztokémia segítségével megvizsgáltuk a metilglioxál hatását a sejteket összekötő kapcsolatok fehéréjire, a β -kateninre és a klaudin-5-re. A kezelés hatására a festés drámai módon megváltozott: az endotélsejtek egybefüggő rétege felszakadozott, a sejtek között lyukak jelentek meg. A fehérjék immunfestődésének intenzitása a sejthatárokon lecsökkent. A β -katenin és a klaudin-5 mintázatának megváltozása számos betegségben köthető a megnövekedett permeabilitáshoz. Elsőként írtuk le a β -katenin festődés változását metilglioxál kezelés hatására, ezzel is erősítve a β -katenin szerepét a vér-agy gát permeabilitásának szabályozásában. Továbbá a metilglioxál drasztikusan megváltoztatta az endotélsejtek alakját: a sejtek területe csökkent, míg a sejtek optikai vastagsága nőtt, ami sejtek egymás és a bazális membrán közötti kapcsolatainak lazulására utal. Ezeknek a kapcsolatoknak a szorossága nélkülözhetetlen a vér-agy gát integritásának és alacsony permeabilitásának fenntartása szempontjából.

3.2. A vér-agy gát védelme

Az agyi endotélsejtek elégtelen működése hozzájárul, az Alzheimer-kór lefolyásához. Ennek következtében a neuronok mellett az endotélsejtek is terápiás célpontnak számítanak a központi idegrendszeri és szisztémás elváltozásokban. A metilglioxál okozta endotéliális károsodás kivédése a legújabb tanulmányok középpontjában áll.

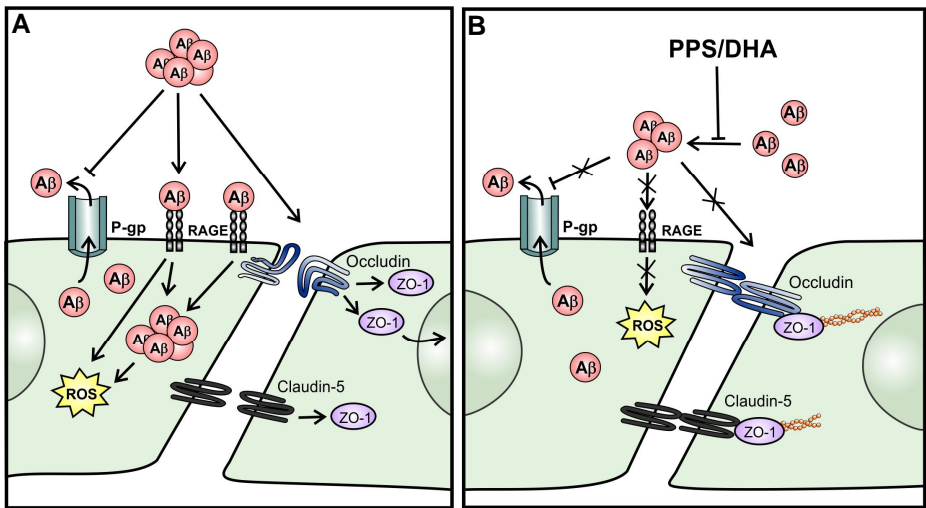
3.2.1. A pentozán polisulfát védő hatása

A PPS (100 $\mu\text{g/ml}$, 24h) sikeresen csökkentette az $\text{A}\beta_{42}$ (25 μM) toxikus hatását az agyi endotélsejteken, emellett az endotéliális gát integritást károsító hatással szemben is szignifikáns módon védett. A PPS önmagában nem befolyásolta az endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságait: sem a TEER-re, sem a permeabilitásra, sem pedig a sejtmorfológiára nem volt hatással. Mivel a PPS nem jut át a vér-agy gáton, így védő hatását feltételezhetően az endotélsejteken fejti ki. Atomerő mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a pentozán közvetlen módon megváltoztatja az $\text{A}\beta$ -aggregátumok méretét, számát és kitapadását. A PPS védő hatása valószínűsíthetően különböző mechanizmusokon keresztül érvényesül: ezek némelyike

celluláris, míg mások az A β -val való kölcsönhatáson alapulnak (2B. ábra). Eredményeink alátámasztják a pentozán kettős hatását valamint endotélt védő tulajdonságát.

3.2.2. A dokozahexaén sav védő hatása

Eredményeinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy a DHA nem csak neuronokat, de a vér-agy gát endotélsejtjeit is képes megvédeni az A β_{42} peptidek káros hatásaival szemben (2B. ábra). A DHA (30 μ M, 24h) kezelés szignifikánsan csökkentette az izoA β_{42} (15 μ M) toxicitását, emellett a vér-agy gát integritását károsító hatással szemben is szignifikáns módon védett. A DHA sikeresen gátolta az izoA β_{42} hatására bekövetkezett P-gp aktivitás csökkenését. Mivel a P-gp működése érintett az Alzheimer-kórban, ezért eredményeink alátámasztják a DHA terápiás felhasználásának lehetőségét.



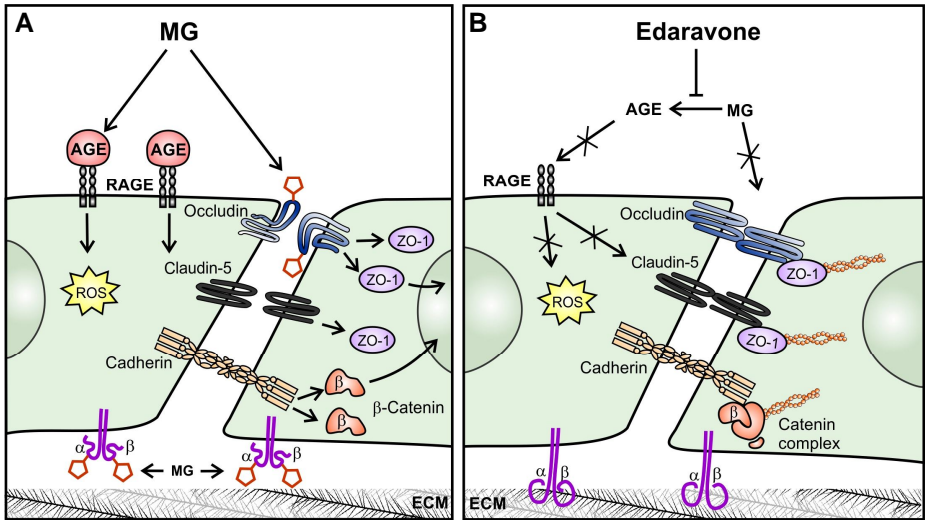
2. ábra Az amiloid- β 1-42 és a pentozán, illetve a dokozahexaén sav hatása az agyi endotélsejtekre. Rövidítések: A β : amyloid- β 1-42 fehérje; DHA: dokozahexaén sav; P-gp: P-glikoprotein; PPS: pentozán poliszulfát; RAGE: AGE receptora; ROS: reaktív szabadgyökök; ZO-1: zonula okkludens fehérje-1.

Az Alzheimer-kórban az A β_{42} felhalmozódása ROS termelődését indukálja, ami a lipid raftok peroxidációjához vezet. A citotoxicitáshoz és a vér-agy gát diszfunkciókhoz hasonlóan a DHA a ROS-felszabadulást is meg tudta gátolni, valamint csökkentette A β_{42} és a metilglioxál kombinált hatását. Teljes védelmet azonban nem nyújtott. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a DHA hozzájárul az agy antioxidáns védelméhez, ebbe beleértve a vér-agy gátat is. Az antioxidáns védelem történhet közvetlenül a ROS gátlásán keresztül, vagy az antioxidáns enzimek indukciójának segítségével. Eredményeink alapján a DHA ígéretes

molekula lehet a vér-agy gát elégtelen működésének kivédésére, habár a karbonil stressz kivédéséhez más anyagokra, mint például az edaravonra is szükség lehet.

3.2.3. Az edaravon védő hatása

Az edaravon teljes védelmet nyújtott a metilglioxál toxikus hatása ellen (Fig. 3B). Az impedancia mérés eredményei alapján koncentráció és időfüggő hatást tudtunk megállapítani. A sejtek egyidejű kezelése edaravonnal (3 mM, 4h) és metilglioxállal (600 µM) visszaállította az életképességet és a gát szorosságát. Elsőként bizonyítottuk, hogy az edaravon nem csak a vér-agy gát endotélsejtjeinek életképességét, hanem a sejtréteg alacsony permeabilitását és működését is képes megvédeni a metilglioxál károsító hatásával szemben. A metilglioxállal való kezelés nem csak az endotélsejt-réteg permeabilitását, hanem a sejtkapcsoló fehérjék elrendeződését is megváltoztatta. Edaravon jelenlétében azonban a mind a kladudin-5 , mind pedig a β-katenin festődése visszarendeződött a sejthatárokra. Az edaravon-kezelés önmagában is növelte az endotélialis gát szorosságát, impedanciáját és a sejtek metabolikus aktivitását.



3. ábra A metilglioxál és az edaravone hatása az agyi endotélsejtekre. Rövidítések: AGE: glikációs végtermékek; ECM: extracelluláris mátrix; MG: metilglioxál; RAGE: AGE receptora; ROS: reaktív szabadgyökök; ZO-1: zonula okkludens fehérje-1.

Az edaravont Japánban már sikeresen alkalmazzák, az ischemiás stroke utáni neurorehabilitációban antioxidáns szerként. Antioxidáns hatását kísérleteink során is megmutatkozott. Emellett az edaravon megakadályozta BSA fehérjéinek módosítását is, így a

fehérje módosítás során képződő ROS mennyiségét is hatékonyan csökkentette. Eredményeink megerősítik az edaravon vér-agy gátat védő hatását.

3.3. Következtetések

A idegrendszeri betegségek növekvő száma következtében egyre több központi idegrendszeri hatású gyógyszerjelölt molekula, különösen biomolekula, áll fejlesztés alatt. A gyógyszerek teszteléséhez megbízható vér-agy gát modellre van szükség, amely a fiziológiának megfelelő felépítésű és az *in vivo* vér-agy gát tulajdonságokkal is rendelkezik. A kísérleteink során alkalmazott primer vér-agy gát modellek szintén tartalmazzák a neurovaszkuláris egység elemeit, a gliasejteket és pericitákat. Mivel a vér-agy gát transzporterei és farmakokinetikai tulajdonságai fajoként különbözhetnek, ezért a humán modellek értékes és fontos kutatási eszköznek tekinthetők. Ezért kísérleteink során mi is alkalmaztunk human agyi endotélsejt-vonalat (hCMEC/D3). A modell megbízhatóságát primer sejtenyészeteken végzett vizsgálatokkal támasztottuk alá, melyen hasonló eredményeket kaptunk.

A vér-agy gát modell lehetővé tette számunkra, hogy olyan patológiás faktorok hatását teszteljük, mint az $A\beta_{42}$ és a metilglioxál, melyek szerepet játszanak az Alzheimer-kórban. Eredményeink alátámasztják az amiloid peptidek és a metilglioxál agyi endotélsejtekre gyakorolt káros hatását, valamint tovább erősítik a kapcsolatot az Alzheimer-kór és a karbonil stressz között. A két toxikus anyag tesztelése során, az agyi endotélsejtekben az oxidatív stressz volt a közös útvonal, hasonlóan más sejt kultúrákon tett megfigyelésekhez. A vér-agy gát terápiás célpontnak minősül az Alzheimer-kórban, aminek következtében a gyulladásgátló molekulák lehetséges védőanyagként szerepelnek. Az Alzheimer-kór megelőzése preventív stratégiákkal, mint a diéta és az életmód, egyre elfogadottabb. A DHA potenciális védőanyag lehet az $A\beta_{42}$ okozta károsodások kivédésére a neurovaszkuláris egység sejtjein. Eredményeink alapján a DHA védőhatását nem csak neuronokon, hanem a vér-agy gáton és annak működésén is kifejti. Ez a hatás jótékony lehet az Alzheimer-kór megelőzésére. A pentozán és az edaravon két új típusú gyógyszer lehet, melyek megvédik az agyi endotélsejteket olyan patológiás faktoroktól, mint az $A\beta$ vagy a karbonil stressz. A gyógyszereknek indikációjának a kiterjesztése hozzájárulhat a vér-agy gát funkciók, az agyi homeosztázis és az idegsejtek pusztulásának kivédéséhez az Alzheimer-kórban.

Eredmények igazolták a DHA, a PPS és az edaravon endotéliális gát-védő hatását tenyésztett agyi endotélsejteken. Adataink hozzájárulhatnak olyan betegségek és rendellenességek terápiájának kifejlesztéséhez, melyek kapcsolatban állnak a karbonil stresszel és az Alzheimer-kórral.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A vér-agy gát endotélsejtjeinek védelmi funkcióját patológias körülmények között egyre inkább hangsúlyozza az irodalom. Kísérleteink során az amiloid- β 1-42 ($A\beta_{42}$) és a metilglioxál hatását vizsgáltuk. Ezek a faktorok kiemelkedő fontosságúak az Alzheimer-kór és a karbonil stressz patogenezisében. Az Alzheimer-kór jellemzője a perivaszkuláris és a parenchimális $A\beta$ -lerakódások. Az $A\beta$ -aggregátumok képződését olyan karbonil komponensek segítik elő, mint a metilglioxál. A potenciális védőanyagok tanulmányozására primer patkány és humán (hCMEC/D3) vér-agy gát modelleket használtunk. A kezelések hatását a sejtek életképességeire és gát-funkcióira vizsgáltuk. Az $A\beta_{42}$ és a metilglioxál koncentráció és időfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét, valamint drasztikusan megváltoztatta a sejtek alakját. Az $A\beta_{42}$ -vel kezelt endotélsejtben citoplazmatikus vakuolizációkat, a sejtorganelumok és a szoros kapcsolatok szerkezetének megváltozását figyeltük meg. A metilglioxál-kezelés az endotélsejtek felválását váltotta ki. További elégtelen gát-működés volt megfigyelhető a csökkent rezisztenciában, valamint a megemelkedett para- és transzcelluláris permeabilitásban. A reaktív szabadgyökök felszabadulása is megemelkedett a patológias faktorok hatására. A pentozán poliszulfát és a dokozahexaén sav mérsékelte az $A\beta_{42}$ káros hatását. A védőanyagokkal és az $A\beta_{42}$ -vel való együttkezelés során a sejtek alakja és a sejt kultúra integritása a kontrolhoz hasonlóvá vált, valamint az endotélsejt-réteg gát tulajdonsága is megmaradt. Molekuláris szinten a pentozán csökkentette az amiloid aggregátumok méretét és számát. A dokozahexaén savnak egyéb hatása is volt: amellett, hogy csökkentette a megemelkedett szabad gyökök mennyiségét, visszaállította a P-glikoprotein efflux pumpa aktivitását. Eredményeink elsőként mutattak rá, hogy a pentozán és a dokozahexaén sav megvédi a vér-agy gátat az $A\beta_{42}$ toxikus hatásától, és ez a hatás terápiás jelentőségű lehet az Alzheimer-kórban. A japán gyógyszer hatóanyaga, az edaravon, sikeresnek bizonyult a metilglioxál okozta károsodások kivédésében. Az edaravonnal és metilglioxállal való együttkezelés megőrizte a sejtek életképességét, az endotélialis gát integritását és funkcióját. Továbbá, az edaravon megakadályozta a metilglioxál-ozokta sejt felválást, a reaktív szabadgyökök felszabadulását, valamint a fehérjék módosítását is. Elsőként mutattunk rá, hogy az edaravon megvédi az endotélsejtek gát-tulajdonságát nem csak oxidatív, hanem karbonil stresszben is.

Eredményeinkkel alátámasztottuk az amiloid peptidek és a metilglioxál káros hatását. Elsőként írtuk le a pentozán, a dokozahexaén sav és az edaravon agyi endotélsejtekre kifejtett védő hatását. A jelen adatok hozzájárulhatnak olyan vér-agy gátra ható anyagok kifejlesztéséhez, melyek védelmet nyújtanak olyan karbonil stresszel kapcsolatos betegségek, mint az Alzheimer-kór, kezelésében.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Deli Máriának szeretném megköszönni, a tudományos útmutatást valamint a támogatást, melyet munkám és tanulmányaim során tőle kaptam.

Köszönöm Dr. Ormos Pál akadémikusnak, az SZBK főigazgatójának, valamint Dr. Siklós László, tudományos tanácsadónak, a Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység vezetőjének támogatását.

Hálás vagyok hazai és külföldi együttműködő partnereinknek a közös kutatómunkáért: Prof. Masami Niwának, Prof. Yasufumi Kataokának, Dr. Shinya Dohgunak, Dr. Fuyuko Takatanak, Dr. Ábrahám Csongornak és Dr. Rákhely Gábornak a segítségükért; Dr. Vastag Mónikának és Dr. Hellinger Évának a western blot kísérletekért; Dr. Puskás Lászlónak és Nagy Lajosnak a holografikus fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatokért; Dr. Kittel Ágnesnek a mikroszkópos vizsgálatokért; Dr. Csete Máriának, Dr. Sipos Áronnak és Szalai Anikónak az atomerő mikroszkópos vizsgálatokért; Prof. Penke Botondnak, Dr. Fülöp Líviának, Dr. Datki Zsoltnak és Dr. Bozsó Zsoltnak az amiloid peptidek szintéziséért és a hippocampusz mintákon végzett kísérletekért; Dr. Pierre-Olivier Couraudnak a humán agyi endotél sejtvonalért.

Köszönet illeti kollégáimat, Dr. Veszelka Szilviát, Walter Fruzsínát, Bocsik Alexandrát, Sántha Petrát, Harazin Andrást, Kiss Lórándot, Ngo Thi Khue Dungot, Boglárka Csiszárát és Gróf Ilonát a kísérletek során nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak a sok szeretetet, türelmet, támogatást és segítséget, a biztonságos háttérrel és azt, hogy mindig mellettem álltak.

Végül megköszönöm a Richter Gedeon a Centenárium Alapítványnak és a Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj programnak (TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001) az anyagi támogatást. Továbbás a OTKA T37834, M36252, RET 08/2004, GVOP-KMA-52 TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001, TÁMOP-4.2.2-08/1/2008-0002; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052 kutatási programoknak, hogy a kutatást lehetővé tették.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. Deli MA, Veszelka S, Csiszár B, **Tóth A**, Kittel A, Csete M, Sipos A, Szalai A, Fülöp L, Penke B, Ábrahám CS, Niwa M
Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid-beta-induced toxicity
Journal of Alzheimer's Disease 22: 777-794 (2010)
IF: 4.261, Citáció: 9 (6/3)
- II. **Tóth A**, Veszelka S, Nakagawa S, Niwa M, Deli MA
Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery
Recent Patents on CNS Drug Discovery 6: 107-118 (2011)
IF:-, Citáció: 21 (18/3)
- III. Veszelka S, **Tóth AE**, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger É, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA
Docosahexaenoic acid reduces amyloid β -induced toxicity in cells of the neurovascular unit
Journal of Alzheimer's Disease 36: 487-501 (2013)
IF: 4.174 (2012), Citáció: 7 (5/2)
- IV. **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 (On-line publikálás dátuma: 2014. július 17.)
IF: 3.730 (2012), Citáció:-

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, Veszelka S, **Tóth A**, Kis L, Kurunczi A, Balogh G, Kürti L, Erős I, Szabó-Révész P, Deli MA
Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 72: 252-259 (2009)
IF: 3.151, Citáció: 29 (20/9)
- II. Hellinger E, Veszelka S, **Tóth AE**, Walter F, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Hada V, Nakagawa S, Thuy DHD, 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
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 82: 340-351, (2012)
IF: 3.826, Citáció: 10 (10/0)
- III. 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 7: 1-14 (2012)
IF: 4.092, Citáció: 19 (17/2)