Új lehetőség a vér-agy gát megnyitására: a tezmilifen és a rövidláncú alkilglicerolok hatása agyi endotélsejteken

Doktori (Ph. D.) értekezés

Walter Fruzsina

Témavezetők: Dr. Deli Mária, tudományos tanácsadó

Dr. Veszélka Szilvia, tudományos munkatárs

Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierék Kutatócsoport

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

2015

Szeged

Tartalomjegyzék	(i)
Publikációs lista.....	(iii)
Rövidítések jegyzéke.....	(v)
1. Bevezetés.....	1
1.1. A vér-agy gát fogalma és felépítése	1
1.2. A vér-agy gát legfőbb sajátosságai, transzportfolyamatok	2
1.3. Vér-agy gát változások kórállapotokban: a glióma.....	4
1.4. A vér-agy gát és a gyógyszerbejutás	7
1.5. A rövidláncú alkilglicerolok szerkezete, hatásai és alkalmazása.....	9
1.6. A tezmilifen szerkezete, hatásai és alkalmazása	10
2. Célkitűzések	13
3. Anyag és módszer.....	14
3.1. Kísérleti állatok	14
3.2. Vegyszerek.....	14
3.3. Glióma beültetés és az agyba való festékbejutás vizsgálata tezmilifen kezelés után.....	14
3.4. Sejttenyésztés	15
3.4.1. RG2 glioblasztóma sejtvonal.....	15
3.4.2. A vér-agy gát <i>in vitro</i> modellezése.....	15
3.4.2.1. Agyi endotélsejt tenyésztés	16
3.4.2.2. Periciták tenyésztése	17
3.4.2.3. Gliasejt tenyésztés.....	18
3.4.2.4. A ko-kultúra modellek	18
3.5. Tenyészetek kezelése	19
3.6. Életképességi vizsgálatok.....	20
3.6.1. MTT és WST teszt.....	20
3.6.2. Apoptózis.....	21
3.6.3. Valósídejű sejtanalízis	21
3.6.4. Kettős magfestés	22
3.6.5. Adenozin trifoszfát felszabadulás mérés	22
3.7. Az agyi endotélsejtek gát funkciójának vizsgálata	22
3.7.1. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése.....	22
3.7.2. Permeabilitás vizsgálat	23
3.8. Immunhisztokémia.....	24
3.9. Fagyasztva tört minták elektronmikroszkópos vizsgálata.....	25
3.10. Ciklikus AMP termelés	25
3.11. Efflux pumpa vizsgálatok: P-glikoprotein, emlőrák rezisztencia fehérje és multidrog rezisztencia asszociált protein-1 aktivitásának mérése.....	26
3.12. Nitrogén monoxid termelés.....	26
3.13. NFκB sejtmagba történő bejutásának vizsgálata	27
3.14. Kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció.....	27
3.15. Statisztikai kiértékelés.....	28

4. Eredmények	29
4.1. Az alkilglicerolok hatása agyi endotélsejt tenyészeteken	29
4.1.1. Életképességi vizsgálatok: WST teszt és apoptózis ELISA	29
4.1.2. Barrier integritási vizsgálatok: transzendenteliális elektromos ellenállás és permeabilitási tesztek	30
4.1.3. Agyi endotélsejtek kapcsoló fehérjéinek immunfestése.....	32
4.1.4. Agyi endotélsejtek közötti kapcsolatok finomszerkezetének vizsgálata	33
4.2. A tezmilifen hatása a vér-glióma gátra patkányokban és agyi endotélsejt tenyészeteken.....	34
4.2.1. Festékbejutás vizsgálata glióma- és agyszövetbe	34
4.2.2. Toxicitási tesztek	36
4.2.3. Barrier integritás és cAMP termelés vizsgálata agyi endotélsejtekben ..	38
4.2.4. Agyi endotélsejtek sejtközi kapcsolatai morfológiájának vizsgálata .	40
4.2.5. A vér-agy és a vér-glióma gát barrier tulajdonságainak vizsgálata kettős ko-kultúra modelleken	40
4.2.6. Efflux pumpa aktivitás vizsgálata agyi endotélsejtekben.....	42
4.2.7. Agyi endotélsejtek génexpressziójának vizsgálata.....	43
4.2.8. Agyi endotélsejtek nitrogén monoxid termelésének vizsgálata.....	44
4.2.9. Az agyi endotélsejtek magjába történő NFκB bejutás vizsgálata.....	44
4.2.10. Agyi endotélsejtek jelátviteli útvonalainak vizsgálata	45
5. Diskusszió.....	46
5.1. Új lehetőségek agytumорок kezelésére	46
5.2. Alkilglicerolok hatása agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak megnyitására: lehetséges mechanizmus	47
5.3. Tezmilifen hatása agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak megnyitására: lehetséges mechanizmus	51
5.4. Összegzés	54
6. Köszönetnyilvánítás	56
7. Irodalomjegyzék	57
8. Összefoglaló	64
9. Summary.....	67
10. Függelék	70

Publikációs lista:

MTMT azonosító: 10032624

Kumulatív hatástényező (IF): 39.242; Összes hivatkozások száma: 87; Hirsch index: 4

*, a szerzők egyforma mértékben járultak hozzá a kéziratához

A tézis tárgyához tartozó publikációk

- I. 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.
British Journal of Pharmacology, 169: 1561-73 (2013)
IF: 4,99
- II. **Walter FR**, Veszelka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA.
Tesmiflifen modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier.
Journal of Neurochemistry, közlés alatt, (2015)
IF: 4,281

A tézis tárgyához közvetlenül nem tartozó publikációk

- I. 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.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 82: 340-51 (2012)
IF: 3,826
- II. 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.
Journal of Pharmaceutical Sciences. 102: 1173-81 (2013)
IF: 3,007
- III. 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.
Journal of Alzheimer's Disease. 36: 487-501 (2013)
IF: 3,612
- IV. Jähne EA, Eigenmann DE, Culot M, Cecchelli R, **Walter FR**, Deli MA, Tremmel R, Fricker G, Smiesko M, Hamburger M, Oufir M.
Development and validation of a LC-MS/MS method for assessment of an anti-inflammatory indolinone derivative by in vitro blood-brain barrier models.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 98: 235-46 (2014)
IF: 2,979

- V. 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. 9:e100152 (2014)
IF: 3,234

- VI. Schilling-Tóth B, Sándor N, **Walter FR**, Bocsik A, Sáfrány G, Hegyesi H.
Role of GDF15 in radiosensitivity of breast cancer cells.
Central European Journal of Biology. 9: 982-992 (2014)
IF: 0,710

- VII. Sándor N*, **Walter FR***, Bocsik A, Sántha P, Schilling-Tóth B, Léner V, Varga Z, Kahán Z, Deli MA, Sáfrány G, Hegyesi H.
Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice.
PLoS One. 9:e112397 (2014)
IF: 3,234

- VIII. Tóth AE, Tóth A, **Walter FR**, Kiss L, Veszelka S, Ozsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA.
Compounds Blocking Methylglyoxal-induced Protein Modification and Brain Endothelial Injury.
Archives of Medical Research. 45(8):753-64 (2014)
IF: 2,645

- IX. Campos-Bedolla P, **Walter FR**, Veszelka S, Deli MA.
Role of the Blood-Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System.
Archives of Medical Research. 45:610-38 (2014)
IF: 2,645

- X. Lénárt N*, **Walter FR***, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vígh 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 and Barriers of the CNS. 12:17 (2015)
IF: 0

- XI. Veszelka S, Bocsik A, **Walter FR**, Hantosi D, Deli MA.
Blood-brain- barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: focus on co-culture systems.
Acta Biologica Szegediensis, közlés alatt (2015)
IF: 0

- XII. **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, közlés alatt (2015)
IF: 4,097

Rövidítések jegyzéke

ABC transzporterek – ATP kötő kazetta transzporterek (ATP binding cassette proteins)

Bcrp – emlőrák rezisztencia fehérje (breast cancer resistant protein)

BSA – borjú szérumb albumin

CPT – cAMP – 8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát

CI – sejtinдекс (cell index)

CLS2 – 2-es típusú kollagenáz

DAF-FM diacetát – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein diacetát

DME médium – Dulbecco's modified Eagle's médium

Eaat – serkentő aminosav transzporter (excitatory amino acid transporter)

EB – Evans kék festék

EBA – albuminhoz kötött Evans kék festék

EC – extracelluláris

ELISA - enzimkötött immunoszorbens módszer

Esam – endoteliális sejtadhéziós molekula

FBS – főtális borjú szérumb

bFGF-2 – bázikus fibroblaszt növekedési faktor-2

GFAP – gliális fibrilláris savas fehérje

GS-B – glutation-bimán

HG – 2-O-hexildiglicerol

IBMX – 3-izobutil-1-metilxantin

IC – intracelluláris

LDH – laktát dehidrogenáz

LPS – bakteriális lipopoliszacharid

MAPK – mitogén aktivált protein kináz

Mrp – multidrog rezisztencia asszociált fehérje

MTT– 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium-bromid

MTX – metotrexát

NFκB – nukleáris faktor kappa B

NO – nitrogén-monoxid

Oatp – szerves anion transzporter (organic anion transporter protein)

PBS – foszfát puffer oldat

P_e – permeabilitási együttható

PG – 1-O-pentilglicerol

PKA – protein kináz-A

Pgp – P-glikoprotein

R123 – rodamin 123

S.E.M. – az átlag standard hibája

SF – nátrium fluoreszcein

SLC – tápanyagszállító fehérjék (solute carrier proteins)

TEER – transzendenteliális elektromos rezisztencia

TJ – szoros kapcsolat (tight junction)

VEGF – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

WST – 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazólium festék

ZO – zonula occludens fehérjék

1. Bevezetés

1.1. A vér-agy gát fogalma és felépítése

A vér-agy gát egy dinamikus határfelület a központi idegrendszer és a vér között, amely több sejt funkcionális egysége, és amelynek anatómiai alapját az agyi endotélsejtek képezik (1. ábra; Deli és Kálmán, 2008). Az első kísérletsorozatot, amely a vér-agy gáttal kapcsolatba hozható, az 1900-as évek végén Paul Ehrlich német kutató és munkatársai végezték. Az állatok vérkeringésébe savanyú anilinfestéket juttattak, ami intenzíven festette a szervezet szöveteit, kivéve a központi idegrendszert (Ehrlich, 1885). Ehrlich ezt a jelenséget az idegszövet festékhez való eltérő affinitásával magyarázta, azonban elméletét Edwin Goldmann kísérlete megcáfolta: tripánkék festéket juttatott az agy-gerincvelői folyadékba, ami azonnal megfestette a központi idegrendszert, viszont a többi szerv megfestetlen maradt (Goldmann, 1909; 1913). Ezek a megfigyelések más eredményekkel együtt a vér és a központi idegrendszer között egy gátrendszer jelenlétét igazolták (Saunders és mtsai, 2014).

1. ábra. A vér-agy gát és a neurovaszkuláris egység szerkezetének sematikus rajza. 1-6: transportutak a vér-agy gáton keresztül: 1. passzív, lipid-mediált diffúzió, 2. aktív efflux transzporterek, 3. tápanyagszállító fehérjék (kétirányú transzport), 4. sejtek közötti, paracelluláris transzportút, 5. receptor-mediált transzcitózis, 6. adszorptív transzcitózis. Szoros sejtközi kapcsolatok (7.), sejtfelszíni glikokalix (8.), fázis I és II metabolikus enzimek (9.). (Campos és mtsai, 2014 alapján módosítva.)

Az emberi agy hajszálereinek becsült hossza 600 kilométer, és az általuk létrehozott vér-agy gát felszíne mintegy 15-20 m² (Pardridge, 2002). Az agyi hajszálereket

az asztroglia sejtek végtalpai teljes hosszukban beburkolják (1. ábra; Abbott, 2002). Mindkét sejtípus kölcsönhatásban áll a kapillárisok bazális membránjába beágyazódott pericitákkal, valamint az erek körül elhelyezkedő mikroglia sejtekkel és a mikroereket beidegző idegsejtekkel, amelyek így együtt a neurovaszkuláris egységet alkotják. Ebben az egységben a sejtek közötti kölcsönhatás kulcsfontosságú a vér-agy gát működésének létrejöttében és fenntartásában (Neuwelt és mtsai, 2011). Kórállapotokban, mint a neurodegeneratív betegségek, agyvérzés, epilepszia vagy agytumörök, a sejtek közötti kommunikáció megváltozásával a vér-agy gát integritása és fiziológiás szerepe megsérül (Neuwelt és mtsai, 2008; Zlokovic, 2008).

1.2. A vér-agy gát legfőbb sajátosságai, transzportfolyamatok

A vér-agy gáton keresztül zajlik a vér és a központi idegrendszer között a molekulák és sejtek szabályozott cseréje. A vér-agy gát elsődleges feladata az idegsejtek szinapszisainak működéséhez szükséges ionos homeosztázis megteremtése, emellett részt vesz az agy tápanyagokkal való ellátásában, az aktív pumparendszere révén a káros anyagok és metabolitok eltávolításában, továbbá lehetővé teszi az idegrendszer és periféria között az információ-átadást (1. ábra; Zlokovic, 2008). Az agyi endotélsejtek szabályozzák a vérárvadást, és vazóaktív anyagok, mint nitrogén-monoxid (NO) által befolyásolják az értónust és ezáltal az agyi keringést is (Busija és mtsai, 2008). Az agyi endotélsejtek számos, csak az agyi mikroerekre jellemző tulajdonsággal rendelkeznek (1. táblázat).

1. táblázat. A vér-agy gát sajátosságainak főbb csoportjai (Deli, 2011, módosítva); számozás: 1. ábrán szereplő transzportutak és funkciók.

	Alkotóelemek	Szerep
Anatómiai gát	Szoros sejt-közötti kapcsolatok (7.) Kevés pinocitotikus vezikula Fenesztrációk hiánya Sejtfelsőzíni glikokalix (8.)	Szabad sejt- és anyagáramlás szabályozása a vér és a központi idegrendszer között
Transzportutak	Lipid mediálta passzív diffúzió (1.) Efflux pumpák (2.) Tápanyagszállító fehérjék (3.) Paracelluláris, sejt-közötti transzport (4.) Adszorptív- és receptor-mediált transzendenteliális transzport (5., 6.)	Tápanyagtranszport; Xenobiotikumokkal szembeni védelem; Metabolitok mennyiségének szabályozása
Metabolikus gát	Fázis I és II metabolikus enzimek (9.)	Védelem bioaktív molekulákkal szemben

Az agyi endotélsejtekben kevés pinocitotikus vezikula található, valamint hiányoznak a perifériás ereken megtalálható fenestrációk. Az anyagok transzportja szabályozottan zajlik (1. ábra, 1. táblázat). Az agyi hajszálerekben metabolikus enzimek is kifejeződnek, amelyek részt vesznek a káros anyagok agyba való bejutásának meggátolásában és agyból való eltávolításában. Az agyi endotélsejtek lumenális felszínén glikokalix található, ami negatív töltésű barriert képez és része a vér-agy gát védelmi rendszerének (Hervé és mtsai, 2008). Amíg a kis molekulájú, zsíroldékony vegyületek, mint például a nikotin és az alkohol, könnyen bejutnak az agyba (1. ábra, 1. transzportút), a vízoldékony tápanyagok és biomolekulák, mint a peptidek és fehérjék bejutását szállítófehérjék és receptorok segítik (Abbott, 2002). A tápanyagszállító fehérjék (SLC transzporter család, 1. ábra, 3. transzportút) kulcsfontosságúak a cukrok, aminosavak, lipidek, vitaminok, ásványi sók, metabolikus prekursorok idegrendszerbe való bejuttatásában (Campos és mtsai, 2014).

A vér-agy gát számos funkciója védi az idegrendszert a káros anyagoktól, ezek közé tartoznak az agyi endotélsejtek aktív efflux pumpái (1. ábra, 2. transzportút), valamint a szoros kapcsolatok által korlátozott paracelluláris, sejtek közötti transzportút (1. ábra, 4. transzportút). Az efflux pumpák egyirányú, az agyból a vér felé pumpáló fehérjék, amelyek megakadályozzák mérgező növényi vagy mikrobiális vegyületek és egyéb xenobiotikumok idegrendszerbe való bejutását (1. ábra, 2. transzportút). A vér-agy gáton előforduló legismertebb efflux transzporterek, mint a P-glikoprotein (Pgp), az emlőrák rezisztencia fehérje (Bcrp) vagy a multidrog rezisztencia asszociált fehérjék (Mrp1,4,5 és 6) aktivitása ATP-függő (ABC transzporterek; Terasaki és Ohtsuki, 2005).

Az agyi endotélsejteket összekötő sejtközötti kapcsolatokat szoros kapcsolatoknak (tight junction, TJ) nevezzük (2. ábra). Ezt tükrözi az agyi kapillárisokon *in vivo* mért igen magas, mintegy 2000 Ω elektromos ellenállás, ami a többi érhez képest, mintegy százszor kisebb ionos átjárhatóságot biztosít (Pardridge, 2002). A szoros kapcsolatokat alkotó fehérjék közül az integráns membrán fehérjék közé az okkludin, a tricellulin, az endoteliális sejtadhéziós molekula (ESAM), a klaudin család tagjai (klaudin-5) és a junkcionális adhéziós molekulák tartoznak (Deli, 2009; Abbott és mtsai, 2010). A membránon átívelő fehérjék a citoplazmában további junkció asszociált fehérjéhez, mint a zonula occludens (ZO-1), és a sejtvezetékhez kapcsolódnak. A TJ-ok közvetetten jelátviteli útvonalakhoz is kapcsolódnak, amelyen át komplex sejten belüli folyamatok szabályozói is lehetnek. A TJ-ok nemcsak a sejtek közötti kapuként, hanem kerítésként is viselkednek,

mivel jelenlétük miatt a sejtek felső (luminális) és alsó (abluminális) részén eltérő a transzporter és receptor kifejeződés, tehát a sejtek polarizáltak.

2. ábra. Agyi endotélsejtek sejtközi kapcsolatai: a szoros kapcsolatok (TJ) egyszerűsített ábrázolása. AJ fehérjék: adherens junkció fehérjék. (Deli, 2011, módosítva)

A TJ-ok mellett az agyi endotélsejtek közötti kapcsolatokban adherens junkciós fehérjék, mint a kadherineket és citoplazmás linkerjük a katenineket is megtalálhatók, azonban az epitél sejtekkel ellentétben anatómiailag elkülönülő adherens junkciók nincsenek.

1.3. Vér-agy gát változások kórállapotokban: a glióma

Számos keringési, fertőző és neurológiai betegség van, ahol a vér-agy gát működése károsodik, és ez a működési zavar hozzájárul a betegségek pathomechanizmusához (Neuwelt és mtsai, 2008; Zlokovic, 2008). Munkánk során a primer agytumороkra fókuszáltunk, amelyek között igen nagy különbség lehet a tumorsejtek eredete (glia, neuron, choroid plexus epitél, ependyma), elhelyezkedése vagy agresszivitása szempontjából (Louis és mtsai, 2007; Mason és mtsai, 2012). Fontos kiemelni, hogy az agytumороk 90 %-a perifériás primer tumороk idegrendszeri metasztázisa, és mindösszes 10 % primer agytumor, amely idegrendszeri sejtekből alakul ki. A legtöbb agyi metasztázis a tüdő (50-60 %), mell (15-20 %), melanóma (5-10 %) és a gasztrointesztinális (4-6 %) eredetű tumороkból képződik (Weidle és mtsai, 2015). A rosszindulatú metasztatikus és primer agydaganatok közös tulajdonsága, hogy jelenleg egy

sem gyógyítható hatékonyan (Frosina, 2015). A glióma a felnőtt korosztályban leggyakrabban előforduló primer agytumor, amelynek legsúlyosabb fajtája az asztrocitából vagy annak prekursoraiból kialakuló glioblasztóma multiforme (Louis és mtsai, 2007). Az elmúlt évtizedekben kiterjedt kutatások folytak a betegség megállítására és gyógyítására, azonban napjainkban még mindig ez a forma a legsúlyosabb, leggyorsabban terjedő, gyógyíthatatlan agydaganat (Mason és Cairncross, 2008). A gliómákat súlyosság szerint szöveti tulajdonságaik alapján, mint a sejtek alakja, mitotikus aktivitása, sejtmagi deformációk, angiogenezis, vaszkuláris hálózat és nekrosis, lehet osztályozni. A betegek általában radioterápiában részesülnek gyógyszeres kezeléssel (temozolomid) kombinálva, műtéttel vagy műtét nélkül, majd később csak kemoterápiát kapnak havi rendszerességgel.

3. ábra. Egészséges vér-agy gát morfológia ép sejtközi szoros kapcsolattal (TJ), transzporterekkel és fiziológiás kapcsolat a neurovaszkuláris egység tagjaival (A és C). A vér-agy gát gliómában (B és D). Elektronmikroszkópos képek: Wolburg és mtsai, 2012. A: asztrogliá; BL: bazális lamina; EC: endotélsejt; ECM: extracelluláris mátrix; ET: efflux transzport; GC: glikolízis; hGB: humán glioblasztóma; N: idegsejt; TJ: szoros kapcsolat; SLC: tápanyag szállító fehérje.

A glioblasztóma nagyon rossz prognózisú betegség, megfelelő terápia alkalmazása esetén is gyakori a visszaesés vagy a tumor tovább növekedése, ötéves teljes túlélése mindössze 3 % (Kiss E és mtsai, 2013). Mivel a glioblasztómák nagymértékben vaszkularizált

tumorer, ezért a terápia egy része az angiogenezis gátlását célozza meg a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) hatásának valamilyen szintű közvetlen, vagy közvetett gátlásával (McNamara és Mason, 2012). Az érzékelést visszaszorító, rekombináns monoklonális antitest, a bevacizumab a jelenleg alkalmazott terápia (Kiss E és mtsai, 2013; Taphoorn és mtsai, 2015), azonban hatásossága ellentmondásos (Thompson és mtsai, 2011; Frosina, 2015). A terápiás hatástalanság fő okának a gliómák esetében a vér-agy gát tulajdonságait és transzportfolyamatait tartják (Mason, 2015), ezért a gliómák mikroereinek tanulmányozása régóta a kutatás előterében áll (3. ábra).

A vér-agy gáton történő legfőbb változások gliómában az alábbiak: (i) megnő a sejtszám, (ii) funkció nélküli eldotélsejtek alakulnak ki (hiperplázia), (iii) az endotélsejtek sejttér fogata lecsökken, (iv) a sejtek alakja megváltozik, (v) az endotélsejtek közötti szoros zárókapcsolatok felbomlanak, (vi) endoteliális vezikulák, fenesztrációk jelennek meg, (vii) a bazális membrán megvastagodik, szabálytalanná válik, (viii) a perivaszkuláris tér kitágul, (ix) sejtnekrózis lép fel a mikroér sejtekben, (x) a glióma sejtek kiszorítják az egészséges glia végtalpakat (3. ábra). Mindezek a morfológiai változások befolyásolják a vér-agy gát működését (Wolburg és mtsai, 2012).

4. ábra. A vér-agy / vér-glióma gát morfológiája a glióma szövet központjában és attól távolodva (van Tellingen és mtsai, 2015).

A glióma sejtekből felszabaduló faktorok miatt az érzékelő folyamatok nagymértékben beindulnak és hipervaszkuarizáció figyelhető meg (Wolburg és mtsai, 2012), sőt legújabb kutatások szerint a gliómában lévő erek tumor össejtekből is

kialakulhatnak (Ricci-Vitiani és mtsai, 2010). A heterogén genetikai háttérrel és eredettel rendelkező gliómák egy jellemzője mindenképp azonos: a tumorsejtek extrém, vándorlásra való hajlama (4. ábra; van Tellingen és mtsai, 2015).

A glióma sejtek aktívan képesek helyet változtatni az agyi extracelluláris téren keresztül, a fehérállományban az idegkötegek mentén vagy az agyi erek bazális membránja mentén, ami által könnyen képeznek az agy más területén is újabb gócot (Cuddapah és mtsai, 2014), szemben a perifériás tumorokkal, ahol az áttétképzés főképp a vérereken és a nyirokereken keresztül zajlik. A glióma sejtek befurakodnak az egészséges glia végtalpak és az endotélsejtek közé, tönkreteszik és felbontják a bazális membránt (4. ábra). Ennek következtében a glia végtalpak eltávolodnak a mikroerektől, reaktív glia fenotípus jelenik meg, ami a vér-agy gát funkciózavarához vezet, valamint megbontja a neurovaszkuláris egységet. A glióma sejtek több tápanyaghoz jutnak és a környező sejtek metabolizmusának megzavarásával nekrotikus folyamatokat indítanak be az agyszövetben (Cuddapah és mtsai, 2014). Habár igaz, hogy a vér-glióma gát a glióma góc középpontjában igen áteresztő, fontos megállapítani, hogy a tumor szélei felé a vér-glióma gát felépítése és funkciói továbbra is nagymértékben hasonlítanak az intakt vér-agy gátéhoz, tehát gyógyszerek bejutása továbbra is akadályozott a szoros kapcsolatok és az efflux transzporterek jelenléte miatt (Mason, 2015; van Tellingen és mtsai, 2015, Parrish és mtsai, 2015). Nem feledkezhetünk meg arról a tényről sem, hogy nemcsak az agyi endotélsejteken emelkedik meg az efflux pumpák kifejeződése, hanem a glióma sejtek is expresszálják az ABC transzportereket, ezzel mintegy második védvonalat képezve a kemoterápia ellen (van Tellingen és mtsai, 2015). Mindezek alapján a kemoterapeutikumok vér-agy gáton keresztüli átjuttatása továbbra is a gliómagyógyítás központi problémája.

1.4. A vér-agy gát és a gyógyszerbejutás

Ahogy korábban tárgyaltuk, az efflux pumpák és a szoros kapcsolatok a két legfőbb eleme a vér-agy gát védelmi rendszerének, amelyek szerepet játszanak a xenobiotikumok távol tartásában. Ugyanezek a mechanizmusok felelősek azért, hogy különböző gyógyszereket és számos neuroterápiás gyógyszerjelöltet, például agydaganat, epilepszia vagy neurodegeneratív betegségek kezelésére nem, vagy csak nagyon alacsony hatékonysággal lehet bejuttatni a központi idegrendszerbe (2. táblázat; Deli, 2011).

2. táblázat. A vér-agy gáton való gyógyszerbejuttatás legfontosabb gátló mechanizmusai és ezek feloldását célzó módosító eljárások. (Deli 2011, módosítva)

	Mely útvonalat gátolja?	Mely molekulák átjutását gátolja?	Megoldás?
Szoros kapcsolatok	Sejtek közötti diffúzió	Hidrofil molekulák Gyógyszer hatóanyagok	TJ megnyitás Abszorpciófokozók
Efflux transzporterek	Lipid-mediálta diffúzió	Lipofil molekulák Xenobiotikumok	Efflux transzporter gátlás
Enzimek	Sejten keresztüli transzport	Peptidek Neurotranszmitterek	Gyógyszer-előanyag (prodrug)

A gyógyszerbejutást gátló további tényező az úgynevezett metabolikus gát, amelyet az agyi endotélsejtekben lezajló enzimatikus folyamatok hoznak létre (Deli, 2011). Ez azt jelenti, hogy számos hatóanyag bejut a sejtbe, azonban sejtben belül átalakul, illetve lebomlik és már nem hatékony formában, vagy egyáltalán nem jut be az agyszövetbe (Strazielle és Ghersi-Egea, 2013). Ilyen enzimek a gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó monoamin oxidáz, amely a dopamint alakítja át, a citokróm P450 és izoformái. Például a glutathion-S-transzferáz, az agyi endotélsejtekben kifejeződő fázis II enzim glutathionnal konjugálja a vegyületeket, amelyeket így az ABC transzporterek kipumpálnak a sejtekből. Az agyba való gyógyszerbejuttatás tehát komoly kihívás mind klinikai, mind a gyógyszerfejlesztés során a hatóanyag kiválasztása és formulálása szempontjából.

A központi idegrendszerbe való gyógyszerbejuttatás elősegítésére három alapvető stratégia áll rendelkezésre: (i) a vér-agy gát transzport útvonalainak felhasználása célzott gyógyszerbejuttatásra, például a farmakon kémiai módosításával vagy nanorészecskékkal, (ii) a vér-agy gát megkerülése: bevitel a nazális útvonalon vagy közvetlen invazív bejuttatás, és (iii) a vér-agy gát működésének megváltoztatása: TJ megnyitás vagy efflux pumpa gátlás (Deli, 2011). Munkánk során ezt a harmadik stratégiát céloztuk meg. Az efflux pumpák aktivitásának gátlása ígéretesnek tűnt a daganatok terápiájában, azonban toxikus mellékhatások miatt a klinikai vizsgálatokat ezekkel a vegyületekkel leállították (Binkhathlan és Lavasanifar, 2013) és jelenleg a vér-agy gáton sem tűnik ígéretes terápiás célpontnak. A vér-agy gát működésének módosítása közé tartozik a paracelluláris, agyi endotélsejtek közötti transzportút megnyitása, amelyet nemcsak preklinikai vizsgálatokban tanulmányoznak, hanem gyógyításra is alkalmaznak (3. táblázat). A vér-agy gát megnyitásával nem csak a gyógyszervegyületek, hanem az agy számára potenciálisan káros anyagok, gyulladást előidéző faktorok is bejuthatnak az agyszövetbe, ezért a terápiás

megnyitás rövid idejű, hatékony, biztonságos és visszafordítható kell legyen, a szisztémás és központi idegrendszeri mellékhatások megelőzésére.

A 3. táblázatban olyan anyagokat és módszereket gyűjtöttünk össze, amelyek a vér-agy gát működésének, a sejtek közötti kapcsolatok megnyitásával történő módosítását célozták és célozzák meg. Ezek közül egyedül a vér-agy gát hiperozmotikus mannitollal való megnyitását alkalmazzák agydaganatok kezelése során a kemoterápiás szerek bejuttatására (Doolittle és mtsai, 2014). Ezen az invazív klinikai eljáráson kívül igen kevés kísérletes eljárás volt hatékony, és mind a mai napig folynak preklinikai vizsgálatok több anyaggal kapcsolatban. Ezek közül kísérleteim során az rövidláncú alkilglicerolokkal és a tezmilifennel foglalkoztam.

3. táblázat. A vér-agy gát működésének módosítása a sejtek közötti kapcsolatokat célzó megnyitással gyógyszerbejuttatás elősegítésére. (Deli, 2011, módosítva)

Módszer	Gyógyszermolekula, bejutatott anyag	Gyógyszerfejlesztési fázis	Ref.
Ozmotikus vér-agy gát megnyitás mannitollal	Kemoterapeutikumok (intraarteriális alkalmazás agytumорок kezelésére)	Klinikai alkalmazás	Doolittle, 2014
Rövidláncú alkilglicerolok és oligoglicerolipidek	Fluoreszcein, albumin, kemoterapeutikumok, antibiotikumok, antitestek	Preklinikai fázis, állatkísérletek	Erdlenbruch, 2003a,b Genzyme, 2010
Cereport (bradikinin analóg)	Kemoterapeutikumok: carboplatin	Fázis I-II. vizsgálat után leállítva	Packer, 2005
Zonula occludens toxin	Kemoterapeutikumok: metotrexát, paclitaxel (intrakarotid alkalmazás)	Állatkísérletek	Menon, 2005
Nitrogén monoxid donor	Szukróz, γ -amino vajsav (intrakarotid alkalmazás és <i>in situ</i> agyi perfúzió)	Állatkísérletek	Weyerbrock, 2012
Magas frekvenciájú ultrahang (célzott)	Antitestek, doxorubicin	Állatkísérletek	Burgess, 2014
Tezmilifen	Kis molekulájú anyagok, paracelluláris átjutás	preklinikai fázis, állatkísérletek	Deli, 2000, 2003 Walter, 2015

1.5. A rövidláncú alkilglicerolok szerkezete, hatásai és alkalmazása

A rövidláncú alkilglicerolok vér-agy gát megnyitó hatása régóta ismert (Unger és mtsai, 1985). Állatkísérletekben kimutatták, hogy alkilglicerolok intraarteriális bólusz injekciója után dóziszfüggő módon az egyidejűleg beadott citosztatikumok vagy antibiotikumok feldúsultak az azonos oldali agyféltekében (Erdlenbruch és mtsai, 2000). Glióma beültetésén átesett patkányokban az alkilglicerolok megnövelték a tumorszövet és a környező agyszövet mikroereinek permeabilitását (Erdlenbruch és mtsai, 2003b). A tesztelt alkilglicerol származékok közül az 1-*O*-pentilglicerol (PG) és a 2-*O*-hexildiglicerol (HG) bizonyult a terápiás koncentráció tartományt és hatékonyságot illetően a legígéretesebbnek (5. ábra, Erdlenbruch és mtsai, 2003a).

5. ábra. Alkilglicerolok szerkezeti képlete. A) 1-*O*-pentilglicerol, B) 2-*O*-hexildiglicerol.

A PG intraarteriálisan történő beadása egyszeri, bólusz injekció formájában (800 µl, 50 mM) metotrexáttal (MTX, 5 mg/ml) kombinációban, a MTX agyi feldúsulását eredményezte (1,2 pmol / mg agyszövet). Az ellenkező agyféltekén, a kontralaterális oldalon csak negyedennyi MTX koncentrációt mértek (Erdlenbruch és mtsai, 2003b). Ugyanakkor igazolták, hogy a radioaktív módon jelölt PG nem jut be a központi idegrendszerbe vagy más szervekbe (Erdlenbruch és mtsai, 2005). Nagyméretű molekulák és hatóanyagok, mint az albumin vagy antitestek bejutása is megnőtt alkilglicerol kezelés hatására (Erdlenbruch és mtsai, 2003b; Hülper és mtsai, 2011). A vér-agy gát *in vivo*, alkilglicerolokkal történt megnyitása visszafordítható volt. A megnyílás hossza az alkalmazott koncentrációtól függött (Erdlenbruch és mtsai, 2000; 2002), amely tulajdonság klinikai alkalmazásban igen előnyös lehet. Az alkilglicerolok nem toxikusak és nem dúsulnak fel a szervezetben, kiválasztásuk a vesén keresztül történik (Erdlenbruch és mtsai, 2003a). Frissen izolált mikroerekben a paracelluláris permeabilitás jelzőanyag, a fluoreszcein átjutása alkilglicerol hatására megemelkedett, ami a sejtek közötti transzportút megnyílására utalt (Erdlenbruch és mtsai, 2003b). Azonban az alkilglicerolok közvetlenül, az agyi endotélsejtekre kifejtett hatását korábban még senki sem vizsgálta.

1.6. A tezmilifen szerkezete, hatásai és alkalmazása

A tamoxifent és származékait az 1970-es évektől sikeresen alkalmazták mellrák gyógyításában (Jordan, 2014). Brandes és munkatársai az 1980-as évek elején új terápiás szerek után kutatva találták meg a tezmilifen (N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)-fenoxi]-etánamin HCl, 6. ábra) vegyületet.

6. ábra. A tezmilifen szerkezeti képlete.

A tezmilifen egy tamoxifen származék, mikroszomális antiösztrogén kötőhely ligand, azonban az ösztrogén receptorhoz nem kapcsolódik (Brandes és Hermonat, 1984). A tezmilifen hatását számos receptoron és szignálúton igazolták. Az ösztrogén receptorhoz való viszonyát állatokban bizonyították (Brandes és Hogg, 1990). A tezmilifen hisztamin antagonist (Kroeger és Brandes 1985; László és mtsai, 2001), gátolja a forbol-észter és a protein kináz-C indukálta vérlemezke aggregációt (Brandes és mtsai, 1988), citotoxikus hatása van tumorsejtekre *in vitro* (Brandes és Hermonat, 1984), és fokozza a kemoterápiás szerek daganatellenes hatását, ugyanakkor védi az ép szöveteket mind kísérletes, mint klinikai vizsgálatokban (Brandes és mtsai, 1991). Tezmilifen kezelés kemoterapeutikumokkal kombinációban előnyösnek bizonyult; kanadai betegekben segítette a túlélést különböző eredetű, visszatérő, súlyosbodó tumor (Brandes és mtsai, 1994), prosztaták (Raghavan és mtsai, 2005) és metasztatikus emlőrák (Reyno és mtsai, 2004) esetén. Habár rövidtávon mellékhatások jelentkeztek, a kombinációs tezmilifen kezelés az általános túlélési arány emelkedése miatt pozitív megítélésben részesült (Reyno és mtsai, 2004; Liu és mtsai, 2006).

Klinikai vizsgálatok során a tezmilifen maximálisan tolerált dózisa 6 mg/testsúly kg volt. Intravénás adagolása antraciklinekkel kombinációban akut, átmeneti mellékhatásokkal járt, mint hányinger, hányás, álmoság, koordinációs zavarok, mozgászavarok (ataxia), enyhe vizuális és auditív hallucinációk, valamint későbbi fáradékonyság (Reyno és mtsai, 2004; Raghavan és mtsai, 2005; Liu és mtsai, 2006). Ezek az átmeneti, akut, reverzibilis központi idegrendszeri mellékhatások akkor léptek fel, amikor a tesmilifene szérum koncentrációja a legmagasabb volt. Mivel korábban

hiperozmotikus mannitolal történő vér-agy gát megnyitás esetén is ugyanilyen központi idegrendszeri mellékhatásokat figyeltek meg (Neuwelt és mtsai, 1991; Doolittle és mtsai, 2000), felmerült, hogy a tezmilifen megnyithatja a vér-agy gátat.

Csoportunk korábbi *in vivo* kísérleteiben ezért megvizsgálta a tezmilifen hatását a vér-agy gát permeabilitására. A klinikai adatokkal összhangban a tezmilifen patkányokban időfüggő módon növelte a vér-agy gát permeabilitását (7. ábra, Deli és mtsai, 2000). Több agyterületen, így a hippocampusz, striátum és kisagy területén is fokozódott a kis molekulású tesztmolekula, a fluorescein bejutása a tezmilifen intravénás beadása után (Deli és mtsai, 2000). A nagy molekulású albumin extravazációja minden vizsgált agyterületen nagymértékben fokozódott 2, 4 és 8 órával a tezmilifen kezelést követően (7. ábra).

7. ábra: Tezmilifen kezelés (5 mg/kg iv.) hatása különböző agyterületek mikroereinek permeabilitására (Deli és mtsai, 2000).

Hasonlóképpen permeabilitás növekedést mértünk albuminra *in vitro*, a vér-agy gát tenyészetes ko-kultúra modelljén (Deli és mtsai, 2003). Mindezek a megfigyelések megerősítették azt a feltételezést, hogy a tezmilifen megnyithatja a vér-agy gátat, azonban nem álltak rendelkezésre adatok a molekula agyi endotélsejtekre kifejtett komplex hatásáról és ennek lehetséges mechanizmusairól.

2. Célkitűzések

Az agytumороk hatékony kezelésének megoldatlansága miatt új módszerek kifejlesztése és új vegyületek vizsgálata kulcsfontosságú. Az agytumороk elleni küzdelemben további kiegészítő lehetőségek feltárására van szükség a kemoterapeutikumok terápiás hatékonyságának növelésére (Frosina, 2015; Parrish és mtsai, 2015).

Célunk tehát az volt, hogy megvizsgáljuk az alkilglicerolok és a tezmilifen közvetlen hatását agyi endotélsejteken. Munkánk során ezért az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen közvetlen hatása van az alkilglicerol és a tezmilifen kezelésnek agyi endotélsejtekre, van-e direkt toxikus hatásuk?
2. Hogyan befolyásolja alkilglicerol és tezmilifen kezelés a vér-agy gát sejttenyészetes modelljén az endotél sejtrétegek permeabilitását?
3. Megváltoztatja-e az alkilglicerol és a tezmilifen az endotélsejteket összekötő TJ fehérjék morfológiáját és finomszerkezetét?
4. Befolyásolja-e a tezmilifen a sejtek metabolizmusában kulcsszerepet játszó ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) termelését?
5. Van-e hatása a tezmilifennek az agyi endotélsejtek efflux pumpáinak aktivitására?
6. Hogyan változtatja meg a tezmilifen az endotélsejtek által termelt legfontosabb vazóaktív mediátor, az NO bazális termelődését?
7. Hogyan befolyásolja a tezmilifen a szoros kapcsolatokat alkotó TJ fehérjék, a főbb vér-agy gát transzporterek és metabolikus enzimek génexpresszióját?
8. Milyen jelátviteli utak játszhatnak szerepet a tezmilifen hatásában?

A tezmilifen hatását az agyi hajszálerek permeabilitására RG2 glioblasztóma modellen is megvizsgáltuk patkányokban.

Az alkilglicerolokkal végzett kísérleteinket Dr. Petra Hülperrel (Göttingeni Egyetem) együttműködésben végeztük.

3. Anyag és módszer

3.1. Kísérleti állatok

Az állatokon végzett vizsgálatok a magyarországi (1998. XXVIII.) és az Európai Unió által (2010/63/EU) alkotott az állati jólétről szóló és az állatvédelem alapelveit meghatározó törvényeknek és direktíváknak megfelelően történtek. Az állatkísérletes engedélyt a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Csongrád megyei kirendeltsége bocsájtotta ki (engedélyek száma: XVI./03835/001/2006 és XVI./834/2012). A tezmilifennel végzett *in vivo*, tumorbeültetéssel járó kísérleteket 3 hónapos kültenyésztett Wistar patkányokon végeztük (hímek és nőstények vegyesen, testsúly: $361,3 \pm 10,7$ g; $n=24$, Harlan Laboratories, Egyesült Királyság). Primer agyi endotélsejt és pericitá izolálásokhoz 3 hetes, asztroglia tenyésztéshez újszülött Wistar patkányokat használtunk, hímeiket és nőstényeket egyaránt. Kísérleteink előtt és alatt az állatokat állandó, megfigyelt, szabályozott körülmények között tartottuk (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 21 °C tartási hőmérséklet, igény szerinti hozzáféréssel ivóvízhez és rágcsálótáphoz) a Szegedi Biológiai Kutatóközpont konvencionális állatházában. A kísérletek elvégzése közben törekedtünk a stresszmentes körülmények megteremtésére és az állatok szenvedésének csökkentésére.

3.2. Vegyszerek

Minden reagenst a Sigma Aldrich Magyarország Kft.-től rendeltük, hacsak másképp nem jelöltük. A tezmilifent (HCl só, Mw: 319,9 g/mol) por formájában Dr. Lorne J. Brandestől, a kanadai Winnipegi Egyetem professzorától kaptuk. A rövidláncú alkilglicerolokat a Genzyme (Boston, MA, USA) cégtől szereztük be, amelytől engedélyt kaptunk ezen anyagok használatára.

3.3. Glióma beültetés és az agyba való festékbejutás vizsgálata tezmilifen kezelés után

A tezmilifen hatását a vér-agy gát és a vér-glióma gát jelzőanyagokra való átjárhatóságára 3 hónapos álműtött ($n=12$) és glióma beültetett ($n=12$) Wistar patkányokon vizsgáltuk. Az RG2 patkány glioblasztóma sejtek agyba való beültetése egy korábban leírt és hatékony kísérleti protokoll alapján történt (Aas és mtsai, 1995). A patkányokat altatás után (100 mg/kg ketamin and 8 mg/kg xilazin, ip.) sztereotaxiás készülékbe helyeztük (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). A műtéti terület fertőtlenítését követően a koponya jobb oldalán kisebb lyukat fűrtünk a bregmától 3 mm-re laterális és 1 mm-re anterior irányban (Erdlenbruch és mtsai, 2003b). Az álműtött patkányoknál 5 μ l fiziológias sóoldatot ($n=12$), a glióma beültetésnél pedig 10^5 RG2 sejtet 5 μ l sóoldatban ($n=12$)

injektáltunk Hamilton fecskendővel (Hamilton, Reno, NV, USA) a durától számítva 5 mm mélyen, nagyon lassan az agyszövetbe. A műtét után a patkányok jólétét, súlyát és egészségi állapotát folyamatosan követtük. Két héttel a beültetést követően a vér-agy gát és a vér-glióma gát átjárhatóságát két festékanyag, a nátrium fluoreszcein (SF, 376 Da) és az Evans késsel jelölt albumin (EBA, 67 kDa), agyba való bejutásával vizsgáltuk (Deli és mtsai, 2000). A permeabilitási kísérlet kezdete előtt az álműtött és az agytumoros patkány csoportok fele (n=6) tezmilifen kezelésben részesült (5 mg/kg, iv.), míg az állatcsoportok másik fele fiziológiás sóoldatot kapott (n=6). Két órával később minden állatnak festékkoldatot adtunk be intravénásan, amely mindkét permeabilitási jelzőanyagot egyszerre tartalmazta (2 % SF és 2 % EBA). Fél órával később, a kísérlet végén az állatokat mélyaltatásban (nátrium pentobarbitál, 50 mg/kg) perfundáltuk és szövetmintákat gyűjtöttünk az agy alábbi részeiből: kisagy, középagy, jobb és bal agykéreg, és glióma szövet. A szövetminták súlyát lemértük, majd a mintákat lefagyasztottuk és -20 °C-on tároltuk. A festékkoncentráció meghatározásához a szöveteket 15 % triklórecetsavban homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (10000 × g, 10 min, 4°C). A jelzőanyagok mennyiségét a felülúszóból spektrofotométerrel (Photon Technology International Inc., Edison, NJ, USA) határoztuk meg. Az EBA abszorbanciáját 620 nm-en, az SF emisszióját pedig 525 nm-en 440 nm-en történt gerjesztést követően mértük. A kiértékelés során az agyba való festékbejutás mértékét ng festék / mg agyszövet formában adtuk meg.

3.4. Sejttenyésztés

3.4.1. RG2 glioblasztóma sejtvonala

Az RG2 glioblasztóma sejtvonala az ATCC cégtől (American Tissue Culture Collection, Manassas, VA, USA) vásároltuk. Az RG2 sejteket tápfolyadékban (Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM) tartottuk, amelyet 10 % borjúsavóval (FBS) és gentamicinnel (50 µg/ml) egészítettünk ki. Az *in vitro* ko-kultúra modellen végzett barrier integritási tesztekhez az RG2 sejteket 12-lyukú műanyag tenyésztőedényekben konfluenciáig növesztettük. Minden tenyésztési felületet patkány farok ínból kinyert kollagénnel vontunk be a sejt kirakást megelőzően, elősegítve a sejtek jobb letapadását és növekedését.

3.4.2. A vér-agy gát *in vitro* modellezése

A kísérleteinket primer patkány agyi endotél egysejtrétegeken, valamint kettő és három sejtípusból álló ko-kultúra modelleken végeztük, amelyekhez primer patkány agyi

endotél-, glia- és pericita sejteket használtunk. A sejtek izolálásának és a modellek összeállításának lépéseit több közleményünkben is leírtuk (Nakagawa és mtsai, 2009; Veszélka és mtsai, 2013; Hülper és mtsai, 2013; Jaehne és mtsai, 2014; Walter és mtsai, 2015).

3.4.2.1. Agyi endotélsejt tenyésztés

A primer agyi endotélsejteket háromhetes Wistar patkányokból izoláltuk szén-dioxiddal történő eutanáziát követően (8. ábra). Az állatokat dekapitáltuk, az agyakat eltávolítottuk és 4 °C-os foszfát puffer oldatba (PBS) helyeztük. Steril szűrőpapír segítségével eltávolítottuk a lágy agyhártyát, a fehérállomány egy részét, valamint a *plexus choroideus*t. A megmaradó szürkeállományt szikével apró, 1-2 mm³-es darabokra vágtuk, és kollagenázzal (CLS2 1 mg/ml) emésztettük 50 percen keresztül, 37 °C-on tápfolyadékban. A sejtek aggregálódását dezoxiribonukleázzal (DNáz I, 15 µg/ml, Roche, Basel, Svájc) akadályoztuk meg.

8. ábra: Primer agyi endotélsejt, pericita és asztroglia izolálás folyamata.

Az enzimes emésztés után 20 %-os borjú szérumból albumin (BSA) grádiens segítségével háromszori centrifugálással (1000 g, 20 perc, 4 °C) elválasztottuk a nagyobb sűrűségű mikroereket a mielin tartalmú rétegtől, amely ideg-, és gliasejteket tartalmazott. A három centrifugálásból származó, összegyűjtött sejttöredékben lévő mikroereket tovább emésztettük kollagenáz-diszpáz (1 mg/ml, Roche) és DNáz (15 µg/ml) oldatban 35 percen keresztül, 37 °C-on. Az emésztés során a mikroerek bazális membránjából kiszabadulnak

az endotélsejteket körülölelő periciták. Az inkubálást követően a mikroér darabokat 33 %-os Percoll grádiens segítségével választottuk el a pericitáktól és a vörösvértestektől (8. ábra). Az endotélsejteket kétszeri DMEM tápfolyadékban történt mosást követően az izolálás végén tápfolyadékban vettük fel. Az endotélsejtek tenyésztő médiuma a következő összetevőkből állt: DMEM/F12, borjúplazmából készített savó (15 %, PDS, First Link Ltd., Birmingham, Egyesült Királyság), bázikus fibroblaszt növekedési faktor (1 ng/ml, bFGF, Roche), heparin (100 µg/ml), inzulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), nátrium-szelenit (5 ng/ml) és gentamicin (50 µg/ml). Az izolált sejteket IV. típusú kollagénnel és fibronectinnel bevont steril, 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészékbe (Corning Costar, Tewksbury, MA, USA) szélesztettük, és ezt követően CO₂ inkubátorban tartottuk. A tenyésztés első négy napján 4 µg/ml puromicint adtunk a tápfolyadékhoz, hogy növeljük az endotélsejt tenyészet tisztaságát (Perrière és mtsai, 2005). A puromicin antibiotikum a P-glikoprotein (Pgp) efflux pumpa ligandja, így az alkalmazott koncentrációban nem károsítja a Pgp-t nagymértékben expresszáló agyi endotélsejteket, azonban elpusztítja a Pgp pumpával nem rendelkező sejteket, például a pericitákat. A tenyésztés 5. napján, amikor a tenyészet elérte a 80 %-os konfluenciát, a sejteket tenyésztőbetétek porózus membránjára, valamint 24- és 96-lyukú lemezekre passzáltuk tripszin (0,05 % m/V) – EDTA (0,02 % m/V) oldat segítségével, és CO₂ inkubátorba tettük. Minden tenyésztő felszínt IV. típusú kollagénnel és fibronectinnel vontunk be. A sejtek növekedésétől függően a passzálás utáni 3-5. napon az endotélsejtek egybefüggő réteget alkottak. A tenyészeteket ekkor kísérletekben használtuk fel. Az agyi endotélsejt kultúrák tisztaságát immunhisztokémiával ellenőriztük, periciták (α -simaizom aktin, CD11b) és gliasejtek (gliális fibrilláris savas fehérje, GFAP) jelenlétét nem mutattuk ki (Perrière és mtsai, 2005; Nakagawa és mtsai, 2009). Az agyi endotélsejtek barrier funkciójának növeléséhez 500 nM hidrokortizon (tezmilifen kísérletek, Nakagawa és mtsai, 2009) vagy cAMP kezelést alkalmaztunk (alkilglicerol kísérletek, 250 µM CPT-cAMP + 17,5 µM foszfodiészteráz gátló RO 201724, Roche) 24 vagy 48 órával a kísérlet kezdete előtt (Deli és mtsai, 2005; Perrière és mtsai, 2005).

3.4.2.2. Periciták tenyésztése

Primer agyi pericita sejtek tenyésztésekor ugyanabból a mikroér frakcióból indultunk ki, mint a primer agyi endotélsejtek esetén (8. ábra; Nakagawa és mtsai, 2007, 2009). A legfőbb különbség az endotélsejt és a pericita tenyésztés között, hogy a periciták esetén puromicin kezelést nem alkalmaztunk és a pericitasejtek növekedésének kedvező

körülményeket biztosítottunk. A sejteket közvetlenül izolálás után 6 cm-es átmérőjű, kollagénnel bevont csészékbe (Orange, Braine-l'Alleud, Belgium) szélesztettük. A periciták növekedését 10 % FBS-t tartalmazó DMEM tápfolyadék, hosszú, legalább kéthetes tenyésztési idő, és a további passzálásoknál bevonás nélküli tenyésztőedények használata támogatta. A pericitákat háromszori passzálást követően vagy azonnal felhasználtuk kísérletekhez, vagy a gliasejtekhez hasonlóan lefagyasztva tároltuk. A pericitákra jellemző a sejtek nagy mérete és sokszögletű alakja, amelyből számos nyúlvány ágazik ki. A periciták festődnek α -simaizom aktin és NG2 proteoglikán markerekre, míg nem jelölődnek a gliális GFAP és az endoteliális von Willebrand faktor fehérjékre (Nakagawa és mtsai, 2009).

3.4.2.3. Gliasejt tenyésztés

A vegyes glia tenyészet létrehozásához kétnapos Wistar patkányokat használtunk (Deli és mtsai, 1995a; Veszeka és mtsai, 2007). Az újszülött patkányokat dekapitáltuk, a kivett agyagról steril, nedves szűrőpapíron való görgetéssel eltávolítottuk az agyhártyát. A szürkeállományt 10 ml tápfolyadékba (90 % DMEM + 10 % FBS) tettük, majd a szövetet mechanikusan disszociáltuk steril fecskendőre csatlakoztatott hosszú tűvel (20 G). Az egyes homogenizálási lépések között a sejtsuszpenzióban levő nagyobb aggregátumok leülepedtek, és a szuszpenzió felső 3/4-ét steril 40 μ m nylonszűrőn engedték át. Ezt a lépést többször megismételtük, majd az így kapott sejtsuszpenziót előzetesen poli-L-lizinnel bevont 12-lyukú tenyésztőedényekbe osztottuk szét. A gliasejtek általában 2 hét alatt nőttek be a tenyésztőfelszínre és 3 hét múlva használtuk ko-kultúrákhoz. Az így nyert gliasejtek több mint 90 %-a GFAP immunopozitivitást mutatott. Az asztrogliaikon kívül mikroglia sejtek nőttek a tenyészetben, amelyek CD11b immunopozitivitást mutattak.

3.4.2.4. A ko-kultúra modellek

Az agyi endotélsejt tenyészetek transzendenteliális elektromos ellenállásának (TEER) és permeabilitásának mérése műanyag tenyésztőbetétek használatával lehetséges (Deli és mtsai, 2005).

A tezmilifen barrier integritásra kifejtett hatásának vizsgálatokor primer agyi endotélsejteket, agyi pericitákat és gliasejteket tenyésztettünk együtt (9. ábra, Nakagawa és mtsai, 2007, 2009). A pericitákat a permeábilis poliészter filterek (0,4 μ m pórusméret, 1,12 cm² felszín; Transwell clear, Corning, USA) alsó részére szélesztettük, és 3 órán keresztül hagytuk őket letapadni. Ezután a filtereket visszafordítottuk és az endotélsejteket

az inzert felső részébe helyeztük, majd a tenyésztőbetéteket a sejtekkel a 12-lyukú lemezekben tartott gliasejtekhez tettük, és a három sejttípust további 3-5 napig tartottuk együtt (9. ábra). Az agyi endotélsejtek a glia és pericita sejtekkel együtt tenyésztve megőrzik *in vivo* tulajdonságaikat, a monokultúrákhoz képest a sejtek közötti zárókapcsolatok szorosabbá válnak, a paracelluláris barrier erősödik és jobban kifejeződnek a vér-agy gát funkció szempontjából fontos transzporterek (Nakagawa és mtsai, 2009).

9. ábra: A vér-agy gát ko-kultúra modell összeállításának lépései: 1. gliasejtek tenyésztése, 2 hét növesztés; 2. periciták passzálása a sejtenyésztő membrán alsó oldalára; 3. agyi endotélsejtek szélesztése a membrán felső oldalára; 4. a kész ko-kultúra modell.

A tezmilifen hatását további, kettős ko-kultúra modelleken is vizsgáltuk: agyi endotélsejteket patkányokból izolált gliasejtekkel vagy RG2 glioblasztóma sejtekkel tenyésztettük együtt. Az alkilglicerolokkal történő vizsgálatokban a primer agyi endotélsejteket kettős ko-kultúrában tartottuk gliasejtekkel. Ezekben a kísérletekben is a fent leírt típusú Transwell sejtenyésztő betéteket használtuk.

3.5. Tenyészetek kezelése

A kísérleteink során a rövidláncú alkilglicerolokat 15 - 60 mM koncentrációban, 5 perces kezelési idővel használtuk. Az alkilglicerol kezelést követően akut hatást, valamint a rezisztenciamérés, a permeabilitási vizsgálatok és az immunhisztokémia esetén 10 - 30 perc hosszú visszaállási időszakot is teszteltünk a tápfolyadék visszaadásával. A szoros kapcsolatok megnyitására referencia kezelésként hiperozmotikus mannitolt (1,4 M) alkalmaztunk a klinikai értékeknek megfelelően (Neuwelt és mtsai, 1985). A tezmilifen hatását az 1 - 200 μ M koncentráció tartományban és az 1, 16 és 24 órás kezelési időpontokban vizsgáltuk agyi endotélsejteken. Mindkét kísérletsorozatban a kontroll csoportba a nem kezelt, azonban minden más körülményben azonosan tenyésztett és

vizsgált sejtek tartoztak. A kezelések sejtenyészítő médiumban történtek. Az alkilglicerollal végzett kísérletek esetén az életképességi vizsgálatokban izotóniás sóoldatot használtunk a korábbi patkány kísérletekhez hasonlóan (Erdlenbuch és mtsai, 2003a, 2003b, 2005). A tezmilifen vizsgálata során az alábbi vegyületekkel történő kezeléseket alkalmaztunk különböző kísérletekben: az életképességi tesztekben detergensként Triton X-100 (1 mg/ml); a barrier integritási és metabolikus kísérleteknél cAMP (25 μ M) és 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX, 1 μ M); az efflux pumpa aktivitás meghatározásakor ciklosporin A (1,6 μ M), verapamil (2 μ M), probenecid (100 μ M); az NF κ B korai sejtmagba történő bejutásának vizsgálatokor bakteriális lipopoliszacharid (LPS, 1 μ g/ml); a hatásmechanizmus felderítésénél pedig az LY294002 (0,1-1 μ M), az U0126 (0,01-1 μ M) és a β -ösztadiol (0,1 nM-1 μ M) szerepeltek. Az alábbi anyagokat desztillált vízben oldottuk fel: tezmilifen, cAMP, LPS. Az LY294002, az U0126, a β -ösztadiol és az IBMX feloldása dimetil-szulfoxidban történt. A probenecid törzsoldatot 1 M nátrium hidroxid oldatban készítettük, míg a verapamilt és a ciklosporin A-t abszolút etanolban oldottuk fel. A tápfolyadékot minden kísérletben a legnagyobb óvatossággal szívtuk le és adtuk hozzá a sejtekhez, hogy a sejtréteget ne sértsük.

3.6. Életképességi vizsgálatok

3.6.1. MTT és WST teszt

Az agyi endotélsejtek életképességének megállapítására festékredukciós teszteket használtunk. Az élő, metabolikusan aktív sejtek a tetrazólium festékeket kék színű formazán kristályokká alakítják át, ahol a toxikus, illetve károsító hatás mértékével arányosan csökken a festék redukciója.

A tezmilifen vizsgálatokor 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromidot (MTT) használtunk (Kiss L és mtsai, 2013). Az MTT teszthez az agyi endotélsejteket (5×10^3 /lyuk kiindulási sejtszám) 96-lyukú lemezekben tenyésztettük 4 napig, a konfluencia eléréséig, majd a sejteket 24 órán át tezmilifennel kezeltük. Az MTT oldatot (0,5 mg/ml) a sejtekhez adtuk, majd 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A sejteket és az MTT-ből képződött formazán kristályokat dimetilszulfoxiddal oldottuk fel. A festék mennyiségét abszorbancia méréssel (595 nm) többlyukú lemezt leolvasó készüléken határoztuk meg (BMG Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország).

Az alkilglicerolok esetén az életképességben bekövetkezett változásokat a WST-1 festékkel (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazólium) vizsgáltuk. Az alkilglicerol kezelés során pufferként használt izotóniás sóoldattal és a humán glióma

gyógyításban a vér-agy gát megnyitására alkalmazott mannitollal is kezeltük a sejteket akutan 5 percig, majd a kezelő oldatot eltávolítottuk, a tápfolyadékot visszaadtuk a sejtekhez és követtük az életképesség változását. A WST-1 reagens hozzáadása után 2 órával 450 nm-en, 690 nm-es referencia filterrel mértük az abszorbanciát (TECAN, Crailsheim, Németország). Mindkét tesztben a maximális toxikus hatás meghatározásához Triton X-100 detergenst használtunk.

3.6.2. Apoptózis

A sejthalál mértékének meghatározásához alkilglicerol kezelést követően egy enzim kötött immunoszorbens (ELISA) apoptózis kitet használtunk, a gyártó által megadott kísérleti protokollt követve (Roche). Az agyi endotélsejteket 96 lyukú lemezekben tenyésztettük. A konfluens sejtrétegeken 5 perces PG és HG kezelést alkalmaztunk. Kísérletes apoptózis kiváltásához referencia vegyületként sztaurosporint (85 μ M, 1 h) adtunk a sejtekhez. A kísérlet végén az antigén-antitest reakcióban a sejtek citoszol frakcióját használtuk fel. A folyamat során képződött jelet soklyukú lemez leolvasóval (TECAN) 405 nm-en 492 nm-es referencia filterrel mértük.

3.6.3. Valós idejű sejtanalízis

Az RTCA-SP rendszer (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) sejtenyészetek biológiai állapotának nyomon követésére alkalmas jelzőanyag használata nélkül (Kiss L és mtsai, 2013). A műszer a sejtek növekedéséről, életképességéről, letapadásának mértékéről valós időben ad információt. A rendszer nagy előnye, hogy a sejtek monitorozása folyamatos, a sejtek és az érzékelő elektródák között az impedanciát tenyészetes körülmények között, zavarásmentesen mérhetjük. Az agyi endotélsejteket 96-lyukú steril, az alján arany mikroelektródákat tartalmazó lemezen (E-plate, ACEA) tenyésztettük. Az E-plate-et a mérőegységgel együtt a 37 °C-os CO₂ inkubátorba helyeztük. A mérés előtt a háttér impedancia meghatározásához sejtmentes tápfolyadékot használtunk. A sejtek növekedésével és letapadásával arányosan nő a mért impedancia, amit a sejtindex (CI) értékével fejezünk ki. A sejtindexet a rendszer programja számolja ki az $(R_n - R_b)/15$ formula segítségével, ahol R_n a sejtek és az elektród között mért impedancia, az R_b pedig a háttér impedancia, amit a tápfolyadék esetében mérünk.

A háttér impedancia méréséhez a lemezek lyukaiba 50 μ l tápfolyadékot pipettáztunk. Ezt követően a lemezekbe 50 μ l sejtszuszpenziót (5×10^3 sejt / lyuk) adtunk és az agyi endotélsejteket a statikus növekedési fázis eléréséig tenyésztettük. Ekkor a

sejteket tezmilifennel (1 - 200 μ M) vagy tezmilifennel (100 μ M) és LY294002 (0,1-1 μ M), U0126 (0,01 – 1 μ M) jelátviteli út inhibitorokkal és β -ösztradiollal (0,1 nM – 1 μ M) kombinációban kezeltük. A mérési adatokat 24 órán át rögzítettük. Az impedancia értékeket a kezelés előtti utolsó időpont értékeihez normalizáltuk, és így határoztuk meg a tezmilifen sejtekre kifejtett hatását.

3.6.4. Kettős magfestés

A tezmilifen kezelést követően a közvetlen toxicitást jelző, az élő és elpusztult sejtek arányát kettős fluoreszcens sejtmagi jelöléssel végeztük (Kiss L és mtsai, 2013). A bisz-benzimid (Hoechst dye 33342) kékre festi a sejtmagi DNS-t minden sejtben, míg az ethidium homodimer-1 (Life Technologies, Molecular Probes, Waltham, MA, USA) csak az elpusztult sejtek magját jelöli vörös fluoreszcenciával. A 24 órás tezmilifen kezelés utolsó 30 percében bisz-benzimid és etidium homodimer fluoreszcens festékeket adtunk a sejtekhez 10 μ M végső koncentrációban Ringer Hepes pufferben (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgSO_4 , 5,5 mM D-glükóz, 20 mM Hepes, pH 7,4). Háromszori gyors PBS mosást követően az agyi endotélsejteket 4 %-os paraformaldehydet tartalmazó PBS pufferben 30 percig fixáltuk. A fixált sejteket PBS-sel mostuk, beágyazó médiummal (Gel/Mount, Biomed, Foster City, CA, USA) fedtük és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse TE2000, Tokió, Japán) vizsgáltuk.

3.6.5. Adenozin trifoszfát felszabadulás mérés

A tezmilifen kezelés után a metabolikus aktivitásban bekövetkezett további változások vizsgálatára meghatároztuk a sejtekben az adenozin trifoszfát (ATP) termelődését. Méréseinkhez a CellTiter-Glo lumineszcencia kitet használtuk (Promega, Madison, WI, USA) a gyártó leírásának megfelelően. Egy órával a kezelés kezdete után a sejtekhez hozzáadtuk a lízis reagenst, majd a képződő lumineszcens jelet soklyukú lemez leolvasó (BMG Fluostar Optima) segítségével regisztráltuk. A képződött ATP mennyiségét kalibrációs egyenessel határoztuk meg.

3.7. Az agyi endotélsejtek gát funkciójának vizsgálata

3.7.1. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok a paracelluláris út szabad átjárhatóságát korlátozzák. A sejtrétegeken keresztül mérhető elektromos ellenállás a TJ szorosságát tükrözi (Deli és mtsai, 2005). A tenyészetekben mért transzendoteliális

elektromos rezisztencia (TEER) a TJ nátrium-ionnal szembeni áteresztőképességét mutatja, mivel a fiziológiás testnedvekhez hasonlóan, a tápfolyadékokban és a puffer oldatokban is a nátrium-ion van jelen a legnagyobb koncentrációban (150 mM). Az ellenállást EVOM rezisztencia-mérővel (WPI, Sarasota, FL, USA) és STX-2 elektródákkal mértük a kettős és hármas ko-kultúra modelleken. A TEER értékekből ($\Omega \times \text{cm}^2$) levontuk a sejtmentes tenyésztő betéteken mért értékek átlagát ($120 \Omega \times \text{cm}^2$).

3.7.2. Permeabilitás vizsgálat

Az agyi endotélsejt rétegek permeabilitásának meghatározására két olyan jelzőanyagot használtunk, amelyekre a vér-agy gát áteresztőképessége élettani körülmények között alacsony. A paracelluláris útvonalon való átjutás mértékének meghatározására fluoreszceint használtunk, míg a sejteken keresztüli átjutást albuminnal mértük az *in vivo* kísérletekhez hasonlóan (Deli és mtsai, 2000; Erdlenbruch és mtsai, 2003b; Walter és mtsai, 2015).

Az agyi endotélsejt rétegeket alkilglicerolokkal és mannitollal 5 percen keresztül kezeltük, majd a kezelőoldat eltávolítása és a tápfolyadék visszaadását követően a 15. és a 30. percben teszteltük a gátműködés helyreállítását. A tezmilifennel végzett kísérletsorozatban egy órán át kezeltük a sejteket. A rezisztenciamérések után a tenyésztő betéteket új 12-lyukú lemezekbe helyeztük, amelyek lyukanként 1,5 ml 37 °C-os Ringer-Hepes oldatot tartalmaztak. A felső kompartmentben a tápfolyadékot kicseréltük 500 μl Ringer-Hepes oldatra, amely fluoreszceint (10 $\mu\text{g/ml}$) és EBA-t (167,5 ng/ml EB + 1 mg/ml BSA) tartalmazott. Kezeléseket követően a permeabilitás mérés 20., 40. és 60. percében áthelyeztük az inzerteket a lemez következő Ringer-Hepes tartalmazó lyukába. A permeabilitás-mérés alatt a lemezeket 37 °C-on CO_2 inkubátorban, síkrázókészüléken (100 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Riga, Lettország) tartottuk. Ezzel biztosítottuk az oldatok folyamatos, nagyon enyhe mozgását, ami a permeabilitás-méréshez szükséges. Megmértük a sejtek nélküli, kollagénnel borított tenyésztő betétek áteresztő képességét is.

A jelzőanyagok koncentrációját az alsó kompartmentből, a tenyésztőedény lyukaiban maradt oldatokból határoztuk meg többlyukú lemez leolvasóval (Campos és mtsai, 2014). Az EBA abszorbanciáját 620 nm-en mértük (BMG Fluostar Optima), míg a fluoreszcein emisszióját 440 nm-en történt gerjesztés után 525 nm-en határoztuk meg (BMG Fluostar Optima).

Az endotélsejtréteg permeabilitási együtthatója (P_e), egy felszíntől és koncentrációktól független érték (Deli és mtsai, 2005), amelyet Fick törvénye alapján a vese clearance analógiájára határoztunk meg (10. ábra, 1. képlet). A clearance adatokat az idő függvényében ábrázoltuk, és meghatároztuk az egyenesek meredekségét, amely az adott felszínre vonatkozó clearance sebességével ($\mu\text{l}/\text{min}$) egyenlő. Ezt az értéket "permeability surface area product" néven is említik, ezért a 10. ábra 2. képletében PS-nek jelöljük. Az endotélsejtekre jutó clearance sebességet úgy kapjuk meg, ha a teljes PS értékből (tenyésztő betét + sejtréteg) kivonjuk az üres tenyésztő betétre vonatkozó PS értéket (10. ábra, 2. képlet). Az endotélsejtekre jutó permeabilitási együtthatót, a P_e -t úgy kaptuk, hogy az endotélrétegre számolt PS értéket elosztottuk a filter felszínével, ami kísérleteinkben $1,12 \text{ cm}^2$ volt. Minél kisebb a P_e érték a permeabilitási markerekre, annál szorosabbak a TJ struktúrák és annál jobb a barrier funkció (Deli és mtsai, 2005).

1
$$\text{clearance } (\mu\text{l}) = \frac{[C]_A \times V_A}{[C]_L}$$

2
$$\frac{1}{P_{Se}} = \frac{1}{P_{St}} - \frac{1}{P_{Sf}}$$

3
$$P_e \text{ (cm/s)} = \frac{P_{Se}}{A}$$

10. ábra. Az endotélsejt réteg permeabilitási koefficiensének számolásához használt matematikai képletek (Deli és mtsai, 2005) $[C]_A$, abluminális koncentráció; V_A , abluminális térfogat; $[C]_L$, luminális koncentráció; PS, adott felszínre vonatkozó clearance sebessége; P_{St} , teljes PS (tenyésztő betét + sejtréteg); P_{Sf} , üres tenyésztő betétre vonatkozó PS; P_e , permeabilitási együttható; A, felszín.

3.8. Immunhisztokémia

A kísérletek során az agyi endotélsejtek integráns membrán TJ fehérjéi közül a kladin-5 fehérjét, a citoplazmatikus linker molekulák közül pedig a β -katenint és a zonula occludens-1 (ZO-1) fehérjét mutattuk ki immunfestéssel alkilglicerol, valamint tezmilifen kezelés után. Primer antitestként anti-kladin-5 (egér monoklonális, Zymed/Invitrogen, Life Technologies), anti-ZO-1 és anti- β -katenin (nyúl polikonális, Invitrogen) ellenanyagokat használtuk. Másodlagos ellenanyagként Alexa Fluor-488-jelölt anti-egér (Life Technologies) és Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot használtuk bisz-benzimid magfestéssel kombinálva.

A permeabilitás vizsgálat után az agyi endotélsejt tenyészeteket a tenyésztő betéteken röviden és gyorsan mostuk Ringer-Hepes pufferrel, majd az alkilglicerolok esetén etanol-ecetsav 95:5 arányú elegyével (-20°C) 20 percig, tezmilifen esetén metanol-aceton 1:1 arányú elegyével (-20°C) 10 percig fixáltuk. Ezt követően a sejteket háromszor

mostuk PBS-sel, majd 3 %-os BSA-val blokkoltuk a nemspecifikus kötőhelyeket 30 percig szobahőmérsékleten. A primer antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on, míg a szekunder antitesttel és a magfestéssel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltunk. A két ellenanyaggal való kezelés között és után háromszor mostuk a sejteket PBS-sel. Az utolsó lépés után a mintákat lefedtük (Gel/Mount, Biomeda), és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse TE 2000).

3.9. Fagyasztva tört minták elektronmikroszkópos vizsgálata

A szoros kapcsolatok finomszerkezetének vizsgálatához a mintákon fagyasztva töréses kísérletet végeztünk a korábban leírt módszer szerint (Wolburg és mtsai, 1994). Akut PG és HG kezelés, valamint 30 perces helyreállítás után a sejteket elektronmikroszkópiára fixáltuk. A fixált és folyékony nitrogénnel lefagyasztott minták törési felszínéről platina-szén replikák készültek, amelyek vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal történt. A mintában a törésvonal a strukturális szempontból leggyengébb pontokon fut, ami sejtek esetén a biológiai membránok központi síkját, a két lipidréteg közötti részt jelenti. Ha a membrán citoszolhoz fagyott lemeze marad a minta felszínén, akkor a membrán plazmaállomány felőli lemezének a törési felszínét látjuk, amit P-felszínnek nevezünk. Ha a membrán az extracelluláris térhez fagyott lemeze marad a minta felszínén, akkor E-felszínről beszélünk. Fagyasztva törést követően a TJ-k gyöngysorszerűen láthatók fagyasztva töréses mintákon, és vagy a P, vagy az E-oldalon helyezkednek el. A P- és E-oldalon megjelenő TJ fonatok aránya a gát funkció működésének fontos indikátora (Wolburg és mtsai, 1994).

3.10. Ciklikus AMP termelés

Az agyi endotélsejtek intracelluláris cAMP szintjének meghatározásához ELISA kitet használtunk (cAMP Biotrak EIA assay kit, GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) a gyártó leírásának megfelelően. A mérés során a lemezhez kötött elsődleges cAMP antitesthez cAMP-peroxidáz komplex illetve az endotélsejtekből a feltárás során felszabaduló cAMP kötődhet. Minél kevesebb a sejtekben termelődő cAMP, annál több cAMP-peroxidáz komplex kötődik az anti-cAMP antitesthez és annál erősebb lesz a színreakció. A kísérlethez az agyi endotélsejteket 96-lyukú lemezben tenyésztettük, majd tezmilifennel (1-200 μ M) és cAMP-vel (25 μ M) való 5 perces kezelést követően feltártuk a sejteket és elvégeztük az ELISA tesztet. A színreakciót 450 nm-en többlyukú lemez leolvasó készüléken mértük meg (BMG Fluostar Optima).

3.11. Efflux pumpa vizsgálatok: P-glikoprotein, emlőrák rezisztencia fehérje és multidrog rezisztencia asszociált protein-1 aktivitásának mérése

Kísérleteinkben a két legfontosabb vér-agy gát efflux pumpa, a Pgp és a Bcrp aktivitását határoztuk meg a rodamin 123 fluoreszcens ligand sejtekben való felhalmozódásával (Nakagawa és mtsai, 2009). A 24-lyukú lemezekben tenyésztett agyi endotélsejteken a tezmilifen (1-100 μ M, 24 h), a Pgp és Bcrp gátló ciklosporin A (1,6 μ M, 1 h) és a Pgp gátló verapamil (100 μ M, 1 h) hatását vizsgáltuk. A kezelés végén a sejteket 10 μ M rodamin tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel 1 órán át inkubáltuk és a rodamin sejtekben való felhalmozódását vizsgáltuk. Az inkubációs idő letelte után a felülúszókat összegyűjtöttük, a sejteket háromszor mostuk jéghideg PBS-sel és 0,1 N nátrium-hidroxid oldattal tártuk fel őket. A rodamin mennyiségét minden mintában soklyukú lemez leolvasóval határoztuk meg (BMG Fluostar Optima, ex. 485 nm; em. 520 nm).

Sejtekben a bimánhoz enzimek glutationt kapcsolnak, ami így fluoreszcens vegyületté, glutation-S-bimánná alakul (GS-B; Kosower és mtsai, 1979). A GS-B a multidrog rezisztencia asszociált protein-1 (Mrp-1) szubsztrátja és segítségével vizsgálható a transzporter aktivitása. A mérés a rodamin 123 teszthez hasonlóan zajlott. Mrp-1 gátlószerként probenecidet (100 μ M) használtunk. A kezeléseket követően a sejteket 20 percig 20 μ M bimánt tartalmazó Ringer-Hepes pufferrel inkubáltuk, a felülúszót összegyűjtöttük és a sejtréteget háromszor mostuk jéghideg PBS-sel. A feltárt sejtekből és a felülúszóból a GS-B mennyiségét fluoriméterrel (BMG Fluostar Optima, ex. 386 nm, em. 476 nm) határoztuk meg.

3.12. Nitrogén monoxid termelés

Az agyi endotélsejtek nitrogén monoxid (NO) termelésének meghatározására 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein diacetátot (DAF-FM) használtunk (Kojima és mtsai, 1998). A DAF-FM olyan indikátor, amely diffúzióval a sejtekbe jut, a sejten belüli észterázok segítségével deacetilálódik, majd a sejten belül a nitrozónium kationnal reagálva egy heterociklikus, fluoreszcens vegyületet hoz létre, amely csapdázódik a citoplazmában. Primer agyi endotélsejteket tezmilifennel kezeltünk 96-lyukú lemezekben 24 órán át. Ezt követően a tenyészetet 2 μ M DAF-FM reagenst tartalmazó Ringer-Hepes oldattal inkubáltuk 1 órán keresztül, 37 °C-on. Az inkubációs idő alatt a lemezeket folyamatosan vizsgáltuk fluoreszcens leolvasó készülékkel (BMG Fluostar Optima), és

ezzel követtük a sejtekben keletkező NO mennyiségét (gerjesztés 485 nm, emisszió 525 nm). NO donorként nátrium nitroprusszidot (100 μ M) használtunk.

3.13. NF κ B sejtmagba történő bejutásának vizsgálata

Az NF κ B sejtmagba történő bejutását 96-lyukú lemezben tenyésztett agyi endotélsejteken vizsgáltuk rövid idejű tezmilifen (50-100 μ M) és LPS (1 μ g/ml) kezelést követően. A kezelés végén a sejteket hideg aceton-metanol 1:1 arányú elegyével 10 percig fixáltuk szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át 1 % FBS-PBS pufferben tartottuk a mintákat. Másnap mind anti-NF κ B (nyúl poliklonális, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) elsődleges antitesttel TRIS pufferben (10 mM TRIS, 0,9 % NaCl, 1 % FBS, pH 7,4), mind a másodlagos, Alexa 658 jelölt anti-nyúl antitesttel 90 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. A másodlagos antitest mellé bisz-benzimid magfestéket is adtunk. A festési lépések 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 elegyével fedtük le. Az NF κ B jelölődésének intenzitását a citoplazmában és sejtmagban Olympus IX-81 fluoreszcens mikroszkóp segítségével és alysis szoftverrel (Olympus, Tokió, Japán) elemeztük.

3.14. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

A génexpresszió vizsgálatához az agyi endotélsejteket 10 cm-es csészékben tenyésztettük. A tenyésztés során a sejtek 50 % gliasejt-kondicionált tápfolyadékot kaptak. A konfluens endotélsejt rétegeket 100 μ M tezmilifennel 1 órán keresztül kezeltük, majd a kezelő oldatot eltávolítva, gyors jéghideg PBS-es mosás után a sejteket steril sejtkaparókkal összegyűjtöttük és 13000 g-n, 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A sejt üledékről a puffert eltávolítottuk és a mintákat -70 °C-on tároltuk a ribonukleinsav (RNS) izolálásig. A génexpressziós vizsgálatot korábban leírt módszerünk szerint hajtottuk végre (Tóth és mtsai, 2014). Az össz-RNS extrakció a guanídium izotiocianát-alapon működő RNeasy-4PCR Kit (Ambion, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) segítségével történt, majd 30 perces DNáz kezelést követően Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) rendszerrel mértük az RNS koncentrációját. Az RNS épségét agaróz gélen történt gél elektroforézissel, a DNS-mentességét pedig valós idejű polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) mértük.

Az össz-RNS mintán cDNS szintézishez reverz transzkripciót hajtottunk végre random hexamerekkel, High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

felhasználásával. A vér-agy gát szempontjából fontos gének expressziós szintjének analízisét kvantitatív PCR-rel (qPCR) végeztük, TaqMan Low Density Array 384-lyukú mikrofluidikai rendszerben, amely alkalmas az általunk meghatározni kívánt gének RT-PCR analízisére (Applied Biosystems). A vizsgált gének listája és a használt TaqMan tesztek felsorolása a Függelékben (F1. táblázat) található. Minden gén kifejeződését a 18 S rRNS-hez, mint belső kontrollhoz normalizáltuk, mivel ez a gén minden eukarióta sejtben nagymértékben expresszálódik. A vizsgált gének expressziós értékének meghatározása a gének $2^{-\Delta Ct}$ formula segítségével kiszámított normalizált expressziójának a legkisebb, a módszer által még detektálható expresszióához való viszonyításával történt.

3.15. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai kiértékelésekhez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) programot használtuk. A képanalízisek ImageJ, Adobe Photoshop és Illustrator (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) segítségével történtek. A kísérletekben kapott eredményeket átlag $\pm$ S.E.M. (az átlag standard hibája) formában adtuk meg, kivéve a tezmilifen *in vivo* adatsorát. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük. Minden *in vitro* kísérletet külön izolált primer tenyészetből legalább háromszor megismételtünk és az egyes kísérletekben alkalmazott párhuzamos minták száma legalább három volt.

Az alkilglicerolokkal végzett életképességi tesztekben egyutas variancia analízist hajtottunk végre Dunnett teszttel. A rezisztencia méréseknél és a permeabilitási vizsgálatokban kétutas ANOVA-t követően Bonferroni és Newman-Keuls tesztet alkalmaztunk.

A tezmilifen kísérletekben az adatsorok eloszlását D'Agostino-Pearson normalitási teszttel állapítottuk meg. Mivel az *in vivo* permeabilitási értékek nem mutattak normál eloszlást, az eredményeket egyutas variancia analízist követően Kruskal-Wallis és Dunn tesztekkel elemeztük. A csoportok közti különbségeket kétutas ANOVA vizsgálattal és Bonferroni teszttel állapítottuk meg. Az *in vivo* eredményeket medián és interkvartilis tartományként ábrázoltuk. Minden más kísérletben az adatok megfeleltek a normál eloszlásnak, ezért az analízisek során páratlan t-tesztet (kettős ko-kultúra modellek), vagy egyutas variancia analízist Dunnett teszttel és kétutas ANOVA analízist Bonferroni teszttel alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1. Az alkilglicerolok hatása agyi endotélsejt tenyészeteken

4.1.1. Életképességi vizsgálatok: WST teszt és apoptózis ELISA

Az alkilglicerolok agyi endotélsejtek WST teszttel mért metabolikus aktivitására kifejtett hatását több időpontban is teszteltük (11. ábra). Kísérletünkben 5 perces akut kezelés után 45 perces, 24, 48 és 72 órás visszaállást követően vizsgáltuk a változásokat. A kontroll, tápfolyadékot kapott csoporthoz képest az izotóniás sóoldattal vagy mannitollal kezelt sejtek életképességében nem következett be jelentős változás. A Triton X-100 detergens 100 %-os sejtpusztulást okozott. A PG és HG 15 és 30 mM kezelési koncentrációinál nem tapasztaltunk toxikus hatást, ellenben a 60 mM koncentráció esetén 45 perc után mindkét anyagnál jelentős metabolikus aktivitás csökkenést mértünk. PG kezelést követően a 24. órában a sejtek regenerálódtak, míg a HG esetén a különbség még mindig szignifikáns volt. Két és három nappal később is megmértük a WST átalakulást, de a kontrollhoz képest nem volt különbség.

11. ábra. WST-1 teszt: alkilglicerolok hatása agyi endotélsejtek életképességére. PG: pentilglicerol, HG: hexildiglicerol, TX: Triton X-100 detergens, NaCl 0,9 %: izotóniás sóoldat, OD: optikai denzitás. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a kontrollhoz képest, statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=4$.

Az agyi endotélsejtek apoptotikus folyamatait 5 perces alkilglicerol kezelés után ELISA kittel vizsgáltuk. Egyik kezelési koncentráció esetén sem tapasztaltunk sejthalált, ellentétben a kísérletes apoptózis kiváltására használt sztaurosporinnal (12. ábra).

Az életképességi vizsgálatokból nyert adatok alapján a barrier integritási kísérletekben 15 és 30 mM alkilglicerol koncentrációkkal dolgoztunk.

12. ábra. Apoptózis kimutatása alkilglicerolokkal kezelt (5 perc) agyi endotélsejteken. PG: pentilglicerol, HG: hexildiglicerol, NaCl 0,9 %: izotóniás sóoldat, OD: optikai denzitás. ***, $p < 0,001$ a kontrollhoz képest, statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=4-6$.

4.1.2. Barrier integritási vizsgálatok: transzendoteliális elektromos ellenállás és permeabilitási tesztek

A barrier vizsgálatokban együttműködő partnereink *in vivo* patkánykísérleteinek protokolljához hasonló kísérletes körülményeket alkalmaztunk, így az alkilglicerolok akut hatását rövid idejű visszaállási periódussal kombinációban vizsgáltuk. Agyi endotélsejtek és gliasejtek kettős ko-kultúra modelljén az egybefüggő endotél egysejtrétegek ellenállása az 5. tenyésztési napon $305 \pm 4 \Omega \times \text{cm}^2$ ($n = 72$) volt, amely megfelelően magas a kísérletek elvégzéséhez (Deli és mtsai, 2005; Nakagawa és mtsai, 2009). Az agyi endotélsejteket 5 percig kezeltük 15 és 30 mM PG és HG oldatokkal, majd közvetlenül a kezelés után, illetve 10, 20, 30 perces visszaállási időpontban rezisztenciát (13. ábra), 15 és 30 perces időpontban pedig permeabilitást mértünk (14. ábra). Pozitív kontrollként a vér-agy gátat bizonyítottan megnyitó mannitolt (1,4 M) használtuk (Deli és mtsai, 1995a).

Akut PG és HG kezelést követően szignifikáns rezisztencia csökkenést mértünk a kontrollhoz képest. A legnagyobb mértékű, 90 %-os rezisztenciaesést 30 mM PG kezelést követően láttuk, amely a tápfolyadék cseréjét követően már az első 10 perc után 40%-os visszaállást mutatott. Habár a réteg ellenállásának a helyreállása nem volt teljes, az akut kezelés utáni, mintegy 60%-os emelkedés a PG kezelés visszafordíthatóságát mutatja (13. ábra). Ugyancsak TEER csökkenést okozott a 10 mM PG sejtekhez adása és a visszaállás kinetikája a magasabb koncentrációhoz hasonló volt.

13. ábra. Transzendoteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérés: alkilglicerolok hatása agyi endotélsejt rétegek ellenállására. A) PG: pentilglicerol, B) HG: hexildiglicerol. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest. Statisztikai próba: kétutas ANOVA és Bonferroni teszt. A kontroll sejtek értékeit tekintettük 100 %-nak. $n=3$.

A HG hatása hasonló volt a PG-hez, rezisztenciaesést tapasztaltunk mindkét koncentrációnál a kontrollhoz képest, de az ellenállás csökkenése enyhébb volt, és a réteg rezisztenciája teljes mértékben visszaállt a kontroll szintjére (13. B ábra). A mannitol (1,4 M) nagymértékű, a PG 30 mM-os koncentrációjával megegyező rezisztenciaesést okozott 5 perces kezelés után, azonban a sejtrétegek ellenállása 30 perc alatt egyáltalán nem állt helyre, tehát hatása ilyen rövid idő alatt nem volt visszafordítható.

A rezisztencia adatok kiegészítésére és a barrier tulajdonságokban bekövetkezett változások további jellemzésére a kettős ko-kultúra modellen fluoreszcein és albumin jelzőanyagok átjutását vizsgáltuk (14. ábra). Rövid idejű PG és HG kezelést (5 perc, 30 mM) követően jelentősen megnövekedett a fluoreszcein (14. A és B ábra) átjutása a sejtrétegen, míg az albumin transzcitózis mértéke nem változott szignifikánsan (14. C és D ábra). A visszaállási fázisban 15 perc után mindkét hatóanyag esetén a fluoreszcein átjutás a kontroll szintjére csökkent vissza, és ez a visszaállás a PG kezelést 30 perccel követően is mérhető volt. Ezek az eredmények alátámasztják a TEER mérési adatainkat és valószínűsítik, hogy az alkilglicerolok a paracelluláris út megnyitásával növelik a vér-agy gát átjárhatóságát.

14. ábra. Permeabilitási vizsgálat: alkilglicerolok hatása agyi endotélsejtek nátrium fluoreszcein (SF) és Evans kékkel jelölt albumin (EBA) permeabilitására. PG: pentilglicerol, HG: hexildiglicerol. a, $p < 0,05$ a kezeletlen kontrollhoz képest; b, $p < 0,05$ az akut hatáshoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=3$.

4.1.3. Agyi endotélsejtek kapcsoló fehérjéinek immunfestése

Az agyi endotélsejt rétegeken mért rezisztencia és a permeabilitási adatokat a szoros kapcsolatokban található klaudin-5, és az adherens junkció asszociált β -katenin fehérjék immunhisztokémiai festése is alátámasztotta (15. ábra). Az alkilglicerol kezelést követően jelentős változást tapasztaltunk a sejtek közötti kapcsolatok morfológiájában is.

Akut alkilglicerol kezelés (PG és HG, 30 mM) után a festődések sejthatárokon való feltöredezése és megszűnése, illetve citoplazmatikus átrendeződése, valamint a sejtek alakjának megváltozása volt megfigyelhető (15. A és B ábra). Mannitol kezelés esetén ezek a változások még kifejezettebbek voltak, a sejtrétegen felszakadozásokat láttunk és a β -katenin festődés a mag körül is megjelent. Az akut fázist követő visszaállási időszakban már 15 percnél helyreálltak a sejtek közötti kapcsolatok, a kapcsoló fehérjék festődése élesebben rajzolódott ki és a junkciók szerkezete a kontroll csoportéhoz hasonlóvá vált. A sejtek alakja is hosszúkássá alakult vissza 30 perc elteltével. PG kezelés esetén ez a visszaállítás a HG-hoz képest gyorsabbnak bizonyult.

Klaudin-5

β -katenin

15. ábra. Alkilglicerolok hatása agyi endothelisejtek klaudin-5 és β -katenin immunfestésére. PG: pentilglicerol, HG: hexildiglicerol, M: mannitol. Nyilak: junkcionális fragmentáció, sejtek alakjának megváltozása. *: az agyi endothél sejtrétegek felszakadozása. Mérce: 25 μ m.

4.1.4. Agyi endothelisejtek közötti kapcsolatok finomszerkezetének vizsgálata

A szoros kapcsolatok finomszerkezetének részletesebb tanulmányozására fagyasztva tört mintákon elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk (16. ábra). A vizsgálat során a szoros kapcsolatok fonatainak P- illetve E-oldalhoz való kapcsolódásának arányát elemeztük (Wolburg és mtsai, 1994). Kezeletlen kontroll sejtek fagyasztva törése esetén a szoros kapcsolatok fonatai az E-oldalon jelennek meg gyöngysorszerű struktúráként. Amíg a P-oldalon töredezetten állapítható meg a TJ fonatok lefutása, addig az E-oldalon a fehérjék láncja egyértelműen kirajzolódik. Kísérletünkben akut PG és HG

kezelés (30 mM) után és 30 perces visszaállást követően is jól látható maradt a szoros kapcsolatok szerkezete mindkét törési felületen (16. ábra).

16. ábra. Alkilglicerolok hatása agyi endotélsejtek közötti kapcsolatok finomszerkezetére: elektronmikroszkópos felvételek fagyasztva tört mintákon. PG: pentilglicerol, HG: hexildiglicerol, EF: Exoplazmatikus-oldal, PF: Plazmamembrán-oldal. Mércé: 0,2 μ m.

A kontroll esetén megfigyelhető E/P-oldal arány nem változott meg sem PG, sem HG kezelés hatására és a visszaállási fázisban sem. Emellett a TJ fonatok gyöngyszerű lefutása sem módosult, így elmondható, hogy a szoros kapcsolatok finomszerkezetében és komplexitásában nem következett be változás.

4.2. A tezmilifen hatása a vér-glióma gátra patkányokban és agyi endotélsejt tenyészeteken

4.2.1. Festékbejutás vizsgálata glióma- és agyszövetbe

Az RG2 glioblasztóma sejtek beültetése után az állatok jólétét minden nap követtük a tumor növekedéséhez szükséges 2 hetes periódus alatt. Minden patkány túlélte a műtétet és 2 hét alatt csekély, 5 %-nál kisebb súlyvesztést szenvedtek. A kialakult glióma mérete átlagosan $3,78 \times 2,88 \times 4,0$ mm (2 keresztmetszet $\times$ mélység) volt (17. ábra).

17. ábra. Vér-agy/vér-glióma gát permeabilitási kísérlet patkányokban. A) A glióma a jobb agyféltekében látható. A lambda pont magasságában a tobozmirigy található. Mércé: 5 mm. B) A glióma méretének és anatómiai helyzetének bemutatása agyszeleten. Mércé: 1 mm.

A paracelluláris úton átjutó, kisméretű fluoreszcein és a sejteken keresztül átjutó nagy molekulatömegű albumin agyba való bejutását, az erek permeabilitásának mértékét kétlépéses analízissel elemeztük. Először a bal és a jobb agyfélteke agykéreg, kisagy és középagy mintáit hasonlítottuk össze 5 mg/kg tezmilifen kezeléssel és anélkül, RG2 glioblasztóma beültetett és álműtött állatokban. Ebben az összevetésben a glióma szövetbe bejutott festék mennyiségét nem vettük figyelembe. A második analízisben a festékek extravazációját csak a jobb agyféltekében hasonlítottuk össze: a tumorbeültetésen átesett állatokban a jobb agyfélteke kortex és glióma szövet adatait, az álműtött patkányok esetén pedig a jobb agyfélteke kortex és a szürcsatorna helyén található szövet adatait elemeztük tezmilifen kezeléssel és anélkül.

Tezmilifen nem változtatta meg a jelzőanyagok agyszövetbe való bejutását az álműtött patkányokban, egyik agyféltekében sem (18. és 19. ábra). A kisagyból és a középagyból származó minták esetén szignifikáns albumin átjutást tapasztalhattunk a tezmilifen kezelt állatokban (18. ábra). A fluoreszcein átjutása mindkét agyféltekében tezmilifen kezeléstől függetlenül megemelkedett az glióma beültetett patkányoknál, míg az albumin átjutása nem változott (19. ábra). Ugyanezt a hatást láttuk fluoreszcein esetén a kisagyban és a középagyban (18. ábra).

18. ábra. Vér-agy gát permeabilitási kísérlet patkányokban. Fluoreszcein és albumin agyba való bejutásának vizsgálata álműtött és RG2 glioblasztóma implantált állatokban, tezmilifen kezeléssel és anélkül. A) Kisagyba való festékbejutás a jobb (J) és a bal (B) féltekében. a, $p < 0,05$ az álműtött, bal agyféltekéhez képest; b, $p < 0,05$ az álműtött, jobb agyféltekéhez képest; és *, $p < 0,05$ a tezmilifennel nem kezelt állathoz képest B) Középagyba való festékbejutás a jobb (J) és a bal (B) féltekében. a, $p < 0,05$ az álműtött, bal agyféltekéhez képest; b, $p < 0,05$ az álműtött, jobb agyféltekéhez képest; és **, $p < 0,01$ a tezmilifennel nem kezelt állathoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA Dunn és Kruskal-Wallis tesztekkel és kétutas ANOVA Bonferroni teszttel. $n=6-21$.

Az RG2 beültetésen átesett állatokban a jobb agyféltekében a jelzőanyagok átjutása szinte minden esetben nagyobb volt, mint a bal agyféltekében (19. A ábra). A

tumorszövetbe és a szűrcsatorna helyén lévő szövetbe bejutott festék mennyisége nem különbözött a jobb agyféltekében fiziológias sóoldattal kezelt állatokban (19. B ábra). Azonban a tezmilifen nagymértékben mintegy 2,7-szeresére emelte meg a fluoreszcein tumorszövetbe való bejutását (19. B ábra). A glióma erek permeabilitása fluoreszceinre tezmilifen kezelés nélkül is nagyobb volt, mint a gliómát körülvevő agyszövet ereinek áteresztő képessége, azonban a tezmilifen ezt a különbséget jelentősen megnövelte. Az albumin átjutása egyedül az álműtött állatokban, a szűrcsatorna helyén található szövetben emelkedett meg tezmilifennel való kezelést követően, amely átjutás a szűrcsatornát körülvevő agyszövethez képest is szignifikánsnak bizonyult (19. B ábra).

19. ábra. Vér-agy/vér-glióma gát permeabilitási kísérlet patkányokban. Fluoreszcein és albumin agyba való bejutásának vizsgálata álműtött és RG2 glioblastóma implantált állatokban, tezmilifen kezeléssel és anélkül. A) Agykéregbe való festékbejutás a glióma szövet nélkül a jobb (J) és a bal (B) agyféltekében. a, $p < 0,05$ az álműtött, bal agyféltekéhez képest; b, $p < 0,05$ az álműtött, jobb agyféltekéhez képest; #, $p < 0,05$ az bal a jobb agyféltekéhez képest. B) Agykéregbe való festékbejutás a jobb agyféltekében glióma és a nem tumoros szövetekben. A: agyszövet; SC: a szűrcsatorna helye az álműtött állatokban; NT: nem tumoros, azaz a tumort körülvevő agyszövet a glióma implantált állatokban; T: tumor (glióma) szövet. a, $p < 0,05$ az álműtött, jobb agyféltekéhez képest; b, $p < 0,05$ az álműtött, jobb agyféltekében lévő szűrcsatornához képest; #, $p < 0,05$ az agyszövet a szűrcsatornához képest és a nem tumoros szövet a tumoroshoz képest; **, $p < 0,01$ és ***, $p < 0,001$ a tezmilifennel nem kezelt állathoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA, Dunn és Kruskal-Wallis tesztekkel és kétutas ANOVA Bonferroni tesztel. $n=6-21$.

4.2.2. Toxicitási tesztek

A tezmilifen közvetlen, agyi endotélsejtek életképességre kifejtett hatásának vizsgálatára négy különböző tesztet végeztünk: impedanciamérésen alapuló valós idejű sejtanalízist, a sejtek metabolikus aktivitását tükröző MTT festékredukciót és ATP termelődést, valamint a sejtpusztulás morfológiai ellenőrzésére kettős fluoreszcens sejtmagi festést (20. ábra).

20. ábra. Tezmilifen agyi endotélsejtek életképességére és metabolikus aktivitására kifejtett hatása. A) Impedancia mérés, n=5-8; B) MTT teszt, n=4; C) Kettős magfestés; Mércse: 50 μm; D) ATP termelés, n=3-6. **, p < 0,01; ***, p < 0,001 a kontrollhoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. K: kontroll, T: tezmilifen, TX: Triton X-100 detergens.

A tezmilifen hatását először aranyelektrodás lemezekon 24 órán keresztül követéssel teszteltük (20. A ábra). Alacsony koncentrációjú (1 és 10 μM) tezmilifen kezelés nem változtatta meg a sejtréteg impedanciáját, a kontrollhoz hasonló kinetikát kaptunk. A tezmilifen legnagyobb, 200 μM koncentrációja nagymértékű sejtkárosodást okozott, az impedanciacsökkenés 24 óra múlva sem állt helyre, mértéke a minden sejtet elpusztító 1 %-os Triton X-100 detergenséhez volt hasonló. A tezmilifen 100 μM-os koncentrációja 1 óra után drasztikus rezisztencia csökkenést idézett elő, azonban ez a csökkenés átmenetinek bizonyult és 18 óra után a sejtszám a kontroll értékének 75%-a volt. Az előzőeknél kisebb, szintén visszafordítható hatást tapasztaltunk az 50 μM koncentráció esetén.

A kontroll csoport sejtjei a sárga MTT festéket enzimeik segítségével hatékonyan alakították át kék színű formazánná. A tezmilifen 1-50 μM tartományban 24 órás kezelés esetén nem változtatta meg jelentősen a kontrollhoz képest a festékredukciót (20. B ábra).

A 100 μM -os kezelési koncentráció szignifikánsan csökkentette a metabolikus aktivitást, míg a legmagasabb 200 μM -os koncentrációnál a detergenshez hasonló toxicitást mértünk.

A funkcionális toxicitási tesztek mellett fluoreszcens kettős magfestéssel vizsgáltuk a tezmilifen hatását (20. C ábra). Szignifikáns sejtkárosodást csak a 200 μM kezelési koncentráció esetén kaptunk, ahol a sejtmagok bisz-benzimid festődése mellett az etídium homodimer-1 jelölődés is láthatóvá vált. Itt a sejtmagok alakja is megváltozott, a magok egyenetlen eloszlása pedig a sejtréteg felszakadozását mutatja. Kisebb koncentrációban etídium homodimer magfestődést és sejtmagi deformációt nem láttunk.

A tezmilifen rövid idejű hatását (1 óra) az agyi endotélsejtek metabolikus aktivitására az ATP termelődés mérésével tanulmányoztuk (20. D ábra). Szignifikáns ATP csökkenést csak a 200 μM koncentráció esetén tapasztaltunk. Az 50 és 100 μM tezmilifen koncentrációk nem voltak hatással a sejtekre. Alacsony koncentrációknál (1 és 10 μM) azonban megemelkedett az ATP termelés a kontroll csoporthoz képest.

A négyféle életképességi tesztben kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a 200 μM kezelési koncentráció nagymértékben károsítja a tenyésztett agyi endotélsejteket, ezért a további kísérleteinkben a 100 μM -os és az ez alatti koncentráció tartománnyal dolgoztunk.

4.2.3. Barrier integritás és cAMP termelés vizsgálata agyi endotélsejtekben

A hármas ko-kultúra modellen az egybefüggő agyi endotél egysejtrétegek ellenállása elérte a $621 \pm 8 \Omega \times \text{cm}^2$ értéket ($n = 32$). A rezisztenciamérés mellett a modell permeabilitását fluoreszcein és albumin átjutásra teszteltük (21. A és B ábra). A kontroll csoportban a P_e értéke fluoreszcein esetén $1,66 \times 10^{-6}$ cm/s, albumin esetén pedig $0,31 \times 10^{-6}$ cm/s volt. Ezek az értékek a rezisztencia adatokkal együtt egyeznek a korábbi tanulmányainkban leírt barrier integritást jellemző paraméterekkel és azt mutatják, hogy a modellünk alkalmas volt a kísérletek elvégzésére (Nakagawa és mtsai, 2009; Veszélka és mtsai, 2013). A tezmilifen (50 és 100 μM) megnövelte mind a fluoreszcein, mind az albumin átjutását a sejtrétegeken, azonban az 1 μM -os kezelés csökkentette a jelzőanyagok permeabilitását. Az 1 órás tezmilifen kezelést követően szignifikáns elektromos ellenállás csökkenést csak a 100 μM kezelési koncentráció esetén mértünk (21. C ábra). Mindkét jelzőanyag agyi endotél sejtrétegen való átjutása csökkent cAMP (25 μM) hatására (21. A és B ábra), de ez a kezelés a rezisztenciára nem volt hatással.

21. ábra. Barrier integritási tesztek a vér-agy gát hármas ko-kultúra modelljén. A) és B) tezmilifen hatása agyi endotélsejtek nátrium fluoreszcein (SF) és Evans késsel jelölt albumin (EBA) permeabilitására, $n=3$. C) Transzendoteliális elektromos rezisztenciamérés, $n=3$. D) Agyi endotélsejtek cAMP termelése, $n=3$. K: kontroll. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt.

A tezmilifen hatásmechanizmusának feltárása érdekében megmértük agyi endotélsejtekben a cAMP mennyiségének változását rövid idejű (5 perc) kezelés hatására (21. D ábra). Alacsony tezmilifen koncentrációk (1 és 10 μM) esetén jelentős cAMP termelődést figyeltünk meg a kontrollhoz képest. Az 1 μM tezmilifen kezelést követő cAMP emelkedés megközelítette a CPT-cAMP (25 μM) kezelés hatását. A tezmilifen többi koncentrációja nem változtatta meg a cAMP szintet. A kis dózísú tezmilifen nagyobb mértékű cAMP termelődést indukált a sejtekben, míg a magasabb koncentrációk nem változtatták meg a cAMP szintet. A tezmilifennek ez a hormetikus hatása agyi endotélsejtekben az ATP termelődésben (20. D ábra) és a permeabilitási adatokban is megfigyelhető volt (21. A és B ábra).

4.2.4. Agyi endotélsejtek sejtközötti kapcsolatai morfológiájának vizsgálata

Az életképességi és barrier integritási tesztek mellett megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van a tezmilifen kezelésnek (1 óra) a sejtkapcsoló fehérjék immunfestésére (22. ábra).

22. ábra: A tezmilifen hatása agyi endotélsejtek klaudin-5, β -katenin és ZO-1 immunfestésére. Nyilak: a sejtkapcsoló fehérjék festésének felszakadozása, megváltozása. Mércé: 25 μ m.

A kontroll sejtrétegeknél és 10 μ M tezmilifen kezelésnél egyenletes, a sejthatárok mentén futó, folyamatos membránfestődést láttunk mind a klaudin-5, mind a β -katenin és a ZO-1 esetén (22. ábra). A sejtréteg egybefüggő volt, a mikroerek endotélsejtjeire jellemzően a sejtek orsó alakúak voltak. Azonban már 50 μ M-os koncentrációnál megfigyeltük a junctionális fehérjék festődésének gyengülését (klaudin-5, ZO-1), illetve felszakadozottságát (β -katenin). Ez a tendencia 100 μ M-os kezelés esetén még kifejezettebb volt mindhárom TJ fehérje esetén. Ezek a megfigyelések összhangban állnak a mért rezisztencia csökkenéssel és a permeabilitás 50 μ M-os tezmilifen kezelés felett történő emelkedésével.

4.2.5. A vér-agy és a vér-glióma gát barrier tulajdonságainak vizsgálata kettős kultúra modelleken

A tezmilifen hatását olyan agyi endotélsejt rétegeken is megvizsgáltuk, amelyeket primer glia vagy RG2 glioblasztóma sejtekkel tartottunk ko-kultúrában (23. ábra). Glia sejtekkel való együtt tenyésztés esetén a rezisztencia $171 \pm 3 \Omega \times \text{cm}^2$ volt, ami a hármas

elrendezéshez képest alacsonyabb ellenállást mutatott (23. B ábra). Ebben a modellben a fluoreszceinre vonatkoztatott permeabilitási együttható $7,41 \times 10^{-6}$ cm/s, az albuminra pedig $0,57 \times 10^{-6}$ cm/s volt (23. C és D ábra). Glioblasztóma sejtekkel ko-kultúrában tartott endotélsejt rétegek ellenállása mindössze a $90 \pm 4 \Omega \times \text{cm}^2$ -t érte el (23. B ábra), a permeabilitás pedig a glia kettős modellhez képest 10-15 $\times$ magasabb volt (fluoreszcein: $72,15 \times 10^{-6}$ cm/s; albumin: $8,62 \times 10^{-6}$ cm/s; 23. C és D ábra). Tezmilifen kezelés hatására (100 μM) szignifikáns rezisztencia csökkenést és permeabilitás emelkedést mértünk mindkét jelzőanyagra mindkét modellen.

23. ábra. A tezmilifen hatása a vér-agy és a vér-glióma gátat modellező a ko-kultúrák barrier integritására. A) A kétféle elrendezés bemutatása: az agyi endotélsejteket primer glia vagy RG2 glioblasztóma sejtekkel tenyésztettük együtt. Mércse: 50 μm . B) Transzendotheliális elektromos rezisztenciamérés. C) és D) tezmilifen hatása az agyi endotélsejtek nátrium fluoreszcein (SF) és Evans késsel jelölt albumin (EBA) permeabilitására. a, $p < 0,05$, a glia ko-kultúrához képest; b, $p < 0,05$, az RG2 ko-kultúrához képest, statisztikai próba: kétutas ANOVA és Bonferroni teszt. ***, $p < 0,001$ a glia ko-kultúrához képest, statisztikai próba: páratlan t-teszt. $n=4$.

4.2.6. Efflux pumpa aktivitás vizsgálata agyi endotélsejtekben

A Pgp és Bcrp efflux pumpák ligandja a rodamin 123, amely ha a transzport nem megfelelően működik, felhalmozódik a sejten belül. Vizsgálatunk során a rodaminnal feltöltött sejtekből a pumpa aktivitását mértük a ligand kiáramlásával a sejteken belüli (intracelluláris, IC) és a sejteken kívüli (extracelluláris, EC) rodamin koncentráció hányadosának meghatározásával (24. A ábra). A tezmilifen kezelésein kívül a jól ismert Pgp és Bcrp aktivitást gátló vegyületek, a ciklosporin A ($1,6\text{ }\mu\text{M}$) és a verapamil ($2\text{ }\mu\text{M}$) hatását is vizsgáltuk az agyi endotélsejteken. A Pgp és Bcrp pumpa inhibitorai szignifikánsan csökkentették a rodamin agyi endotélsejtekből való kiáramlását, amit a lecsökkent extracelluláris/intracelluláris hányados mutat (24. A ábra). A tezmilifen kezelés ($100\text{ }\mu\text{M}$) szignifikánsan csökkentette a rodamin effluxot a gátlószerekhez hasonlóan (24. B ábra). Alacsony tezmilifen kezelési koncentrációk (1 és $10\text{ }\mu\text{M}$) nem voltak hatással a pumpaműködésre.

24. ábra. A tezmilifen hatása agyi endotélsejtek efflux pumpáinak aktivitására. A) A P-glikoprotein (Pgp) és az emlőrák rezisztencia fehérje (Bcrp) aktivitásának mérése rodamin 123 (R123) fluoreszcens liganddal. B) A multidrog rezisztencia asszociált fehérje-1 (Mrp-1) aktivitásának mérése glutation konjugált bimánnal (GS-B). EC: extracelluláris; IC: intracelluláris; K: kontroll; V: verapamil; CyA: ciklosporin-A; P: probenecid. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=4$.

Tezmilifen az előző méréshez hasonlóan ugyancsak $100\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációban csökkentette a sejtekből való GS-B effluxot a kontrollhoz képest. Ez a hatás az Mrp-1 inhibitor probenecid ($100\text{ }\mu\text{M}$) gátló hatásával megegyező (24. B ábra). Alacsonyabb kezelési koncentrációk nem befolyásolták az Mrp-1 aktivitását.

4.2.7. Agyi endotélsejtek génexpressziójának vizsgálata

A tezmilifen (100 μ M kezelés, 1 óra) csökkentette számos, a vér-agy gát szempontjából fontos gén expresszióját agyi endotélsejtekben a kontroll, kezelést nem kapott csoporthoz képest (25. ábra). Mind a négy fehérjecsalád több tagjánál is downregulációt figyeltünk meg, az alábbiakban a jelentősebb változásokat emeljük ki. A junkciós fehérjék közül az Esam és klaudin-1, -3, -5, -11, -19 mRNS szintje, az efflux pumpák közül főképpen a Bcrp, Mrp-4, szerves anion transzporter polipeptid-1 (Oatp1) és serkentő aminosav transzporter-2, -3 (Eaat-2,-3) szintje csökkent. Az SLC fehérjék közül az aminosavakat (Sat-1, Snat-5), a kreatint (Crt), az aszkorbinsavat (Asct2), a glicint (Glyt1), a taurint (Taut), a pajzsmirigy hormonokat (Mct8) szállító karrierek downregulálódtak. A vér-agy gát metabolikus enzimek közül a szulfotranszferáz (Sult1A1), a Cyp2D4 és a γ -glutamil transzferázok (Ggt-1, -5, -7) esetében mértünk mRNS csökkenést.

25. ábra: Tezmilifen hatása az agyi endotélsejtek génexpressziójára. TJ: szoros kapcsolatok fehérjéi; TSzF: Tápanyagszállító (SLC) transzporterek; ET: efflux transzporterek; ME: metabolikus enzimek; Tezm: tezmilifen; K: kontroll csoport. Az ábrán a kétszeresnél nagyobb mértékű mRNS expresszió csökkenést az X-tengelyen a 2 feletti értékek jelölik. n=3

A tezmilifen néhány gén kifejeződését teljesen blokkolta, ezek közé a klaudin-2, a glükóz transzporter-5, a dopamin, a noradrenalin és a gamma-amino-vajsav transzporterek, az Mrp-8 és az Eaate-4 tartozott. Egyedül egy gén, a Cyp3a23 expressziója emelkedett meg tezmilifen hatására, amely viszont a kontroll sejtekben nem volt kimutatható. Sem az Abcc1 (Mrp-1) sem az Abcb1a (Pgp) gének kifejeződésében nem történt változás tezmilifen kezelés hatására.

4.2.8. Agyi endotélsejtek nitrogén monoxid termelésének vizsgálata

A tezmilifen kezelés szignifikánsan csökkentette az agyi endotélsejtek NO termelését a kezeletlen kontroll csoporthoz képest (26. ábra). A tezmilifen 10 μ M-nál mintegy 63 %-ra, míg a két magasabb koncentrációban, 50 és 100 μ M esetén a kontroll szintjének 20 %-ára csökkentette a bazális NO termelést.

26. ábra: Tezmilifen hatása az agyi endotélsejtek nitrogén monoxid (NO) termelésére. K: kontroll. ***, $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=4$.

4.2.9. Az agyi endotélsejtek magjába történő NF κ B bejutás vizsgálata

Annak érdekében, hogy a tezmilifen kezelés hatásmechanizmusát jobban megértsük, az NF κ B sejten belüli elhelyezkedését is megvizsgáltuk 1 órás tezmilifen kezelést követően (27. ábra). A tezmilifen 50 és 100 μ M koncentrációban megemelte az NF κ B jelölődés intenzitását a sejtmagokban (27. B ábra). Ehhez hasonló magba való korai bevándorlást tapasztaltunk bakteriális LPS kezelés (1 mg/ml) hatására is. Az NF κ B sejtmagi jelenlétét sejtmag/citoplazma intenzitás aránnyal is kifejeztük és a tezmilifen hatása mindkét koncentrációban szignifikánsnak bizonyult (27. A ábra).

27. ábra: A) NFκB immunhisztokémiai festése agyi endotélsejteken. Mércé: 25 μm. B) Tezmilifen hatása agyi endotélsejtek NFκB korai sejtmagba történő bejutására. K: kontroll; LPS: lipopoliszacharid, 1 mg/ml. ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=3$.

4.2.10. Agyi endotélsejtek jelátviteli útvonalainak vizsgálata

A tezmilifen hatásmechanizmusának felderítésére megvizsgáltuk az agyi endotélsejtek működésének szabályozásában fontos MAPK/ERK és PI3K/Akt szignalizációs útvonalak gátlószereit (U0126 és LY294002), valamint a β-ösztradiolt, az endotélsejtek ösztrogén receptorainak ligandját. Ennek a három anyagnak a hatását önállóan és 100 μM tezmilifen kezeléssel kombinációban is teszteltük (28. ábra).

28. ábra: Tezmilifen hatása agyi endotélsejtek impedanciájára jelátviteli út inhibitorokkal (U: U0126 és LY: LY294002) és β-ösztradiollal (β-estr) kombinációban. K: kontroll; E: β-ösztadiol; Tezm: tezmilifen. a, $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest; b, $p < 0,05$ a tezmilifenhez képest. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett teszt. $n=3-8$.

Rövid idejű, 1 óra kezelést követően mind a gátlószerek, az LY294002 (1 μM) és az U0126 (10 nM), mind a β-ösztadiol (10 nM) részlegesen kivédte a tezmilifen kezelés okozta impedancia csökkenést agyi endotélsejtekben.

5. Diszkusszió

5.1. Új lehetőségek agytumorsek kezelésére

A központi idegrendszeri tumorok kezelése mind a mai napig nem megoldott (Muldoon és mtsai, 2007; Parrish és mtsai, 2015). A vér-agy gáton való gyógyszerbejuttatás két legfőbb limitáló tényezője az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok és az efflux pumpák, ezért számos vizsgálat irányul ezeknek a módosítására (Parrish és mtsai, 2015). Az efflux pumpák működésének megváltoztatása és gátlása az erre felhasználható szerek komoly mellékhatásai miatt nem megoldott (Deli és mtsai, 2011; Binkhathlan és Lavasanifar, 2013). A kemoterapeutikumok agyba való bejuttatására a másik legrészletesebben, *in vitro*, *in vivo* és klinikai vizsgálatokban is tanulmányozott módszer a vér-agy gát megnyitása az endotélsejtek közötti TJ struktúrák módosításával vagy szétkapcsolásával (3. táblázat; Deli, 2009; Deli és mtsai, 2011). Magas frekvenciájú, fókuszált ultrahang használatával nem-invazív módon nyitható meg a vér-agy gát (Burgess és Hynynen, 2014), azonban ez az eljárás még a preklinikai kutatások fázisában tart, és nem állnak rendelkezésre adatok a hosszútávú biztonságosságáról. A vér-agy gát szelektív megnyitása volt megfigyelhető NO donor használata esetén is gliómában állatkísérletekben (Weyerbrock és mtsai, 2012).

Egy másik, a vér-agy gát rövid, átmeneti, reverzibilis megnyitására használt anyag a Cereport, ami egy szintetikus bradikinin analóg (RMP-7, labradimil). A Cereport megemeli a sejten belüli kalcium és ciklikus guanozin monofoszfát szintet a bradikinin B2-es receptorokon keresztül agyi endotélsejtekben (Doctrow és mtsai, 1994; Mackic és mtsai, 1999) és gyors, átmeneti permeabilitás növekedést indukált agyi endotélsejt tenyészetekben és állatkísérletekben egereken (Sanovich és mtsai, 1995; Mackic és mtsai, 1999). A Cereport megnövelte több farmakon, köztük egy kemoterapeutikum agyba való bejutását is (Borlongan és Emerich, 2003) és elősegítette a túlélést glióma és metasztatikus agytumor modelleken patkányokban (Emerich és mtsai, 2001). Azonban klinikai vizsgálatokban gyermekkori glióma kezelésre hatástalannak bizonyult (Packer és mtsai, 2005). A bradikinin analóggal való kezelés során az is felmerült, hogy a szer önmagában a tumor méretét a várt hatással ellentétben megnövelheti, és elősegítheti a metasztázis képzést (Seifert és Sondheimer, 2014).

A nagy koncentrációjú mannitol és arabinóz agyi endotélsejt tenyészeteken és állatkísérletekben gyors és visszafordítható vér-agy gát permeabilitás növekedést okozott (Deli és mtsai, 1995a; Rapoport, 2001). Közvetlenül *arteria carotis*ba történő

hiperozmotikus mannitol injektálása után a sejtek közötti kapcsolatok fellazultak, a TJ fehérjék elhelyezkedése a sejtmembránban megváltozott patkányokban (Dobrogowska és Vorbrodt, 2004). Sejttenyészeteken végzett kísérletekben igazolták, hogy az src-kináz mediálta β -katenin foszforiláció is szerepet játszhat a mannitol-által kiváltott vér-agy gát megnyílásban (Farkas és mtsai, 2005). Klinikai vizsgálatokban a vér-agy gát mannitollal való rövid idejű, átmeneti, visszafordítható megnyitása bizonyult a legeredményesebbnek az agytumороk kezelésében az elmúlt 20 évben: megnövelte a tumorelles szereк agyba való bejutását és a rosszindulatú agytumorban szenvedő betegek túlélését (Doolittle és mtsai, 2014). Ezt a gyógymódot azonban csak néhány tengerentúli klinikai központban alkalmazzák, mivel a kezelés speciális szakértelmet igényel, optimalizálása a beteg személyére bonyolult, a beavatkozás invazív és mellékhatásokkal járhat (Doolittle és mtsai, 2014). Ilyen mellékhatások például a megnövekedett koponyaúri nyomás, nem kívánt anyagok bejutása az agyba és a kezelést követő neuro- illetve ototoxicitás.

A két említett vegyület, a mannitol és a Cereport mellett, az alkilglicerolok és a tezmilifen jelenthetnek új lehetőséget a vér-agy gát rövid idejű, reverzibilis megnyitására.

5.2. Alkilglicerolok hatása agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak megnyitására: lehetséges mechanizmus

Együttműködő partnereink korábbi állatkísérletes adatai igazolták, hogy rövidláncú alkilglicerolok vér-agy gát megnyílást, és az egyidejűleg adott gyógyszerek bejutását eredményezi glióma modelleken patkányokban és egerekben (Erdlenbruch és mtsai, 2000; 2002; 2003a; 2003b; 2005). Minden esetben gyors és visszafordítható volt a megnyitás, azonban az alkilglicerolok hatásának sejtes mechanizmusa nem volt ismert. Ezért a vér-agy gát tenyészetes modelljén megvizsgáltuk a két leghatékonyabb alkilglicerolt. Kísérleteinket igyekeztünk az *in vivo* vizsgálatok körülményeihez igazítani.

Az 50 és 200 mM közötti koncentrációjú PG és HG kezelőoldatokat állatkísérletekben egyszeri, gyors (12-18 másodperc) bolusz injekcióként juttatták az *arteria carotis interna*-ba, míg a közös fejverőeret (*arteria carotis communis*) ennyi időre elzárták. Az *in vivo* kísérletek során a vér-agy gát megnyitás mértéke függött az alkilglicerol koncentrációtól (Erdlenbruch és mtsai, 2000; 2003a), de az alkilglicerolok pontos vérbeli koncentrációját és vesén keresztüli kiürülésének mértékét nem sikerült pontosan meghatározni. A kettős vér-agy gát ko-kultúra modellen, pontos, mérhető körülmények között tudtuk vizsgálni a PG és a HG közvetlen, agyi endotélsejtekre kifejtett hatását adott alkilglicerol koncentrációval, adott ideig. Az *in vivo* alkalmazott

koncentrációkhoz képest a sejttenyészeteken alacsonyabb, 10-30 mM koncentráció tartományra szűkítettük a kezeléseket az életképességi tesztekben kapott eredmények alapján. Emellett az állatkísérletekben becsült 18 másodperces bolusz injekciókhoz képest a kezelési időket 5 percre emeltük.

Az *in vitro* modellen kapott eredmények összhangban állnak az *in vivo* adatokkal (Erdlenbruch és mtsai, 2005), és a vér-agy gát megnyílására utalnak. Sejttenyészeteken az endotélsejtek rezisztenciájának csökkenése érzékenyen mutatja a vér-agy gát megnyílását, ami a szoros kapcsolatok megnyílását tükrözi (Deli és mtsai, 2005). A tenyészetes modellen akut, rövid alkilglicerol kezelést követően lecsökkent az agyi endotélsejt rétegek ellenállása. Patkányokban az agyi erek permeabilitása 15 perc után visszaállt az eredeti, kontroll értékekre (Erdlenbruch és mtsai, 2003a), amelyhez hasonló visszaállást tapasztaltunk a tenyészetes modellen is. A rezisztencia csökkentésében agyi endotélsejteken a PG hatékonyabbnak bizonyult a HG-hoz képest ugyanabban a koncentrációban. Kísérleteinkben a TEER mannitol kezelés hatására is lecsökkent korábbi vizsgálatoknak megfelelően (Deli és mtsai, 1995a; Farkas és mtsai, 2005).

A sejttenyészetes kísérleteinkben mindkét alkilglicerol kezelés hatására megnőtt a fluoreszcein permeabilitása, ami a TEER változásokhoz hasonlóan a paracelluláris transzportút megnyílására utal. Erdlenbruch és munkatársai (2003b) frissen izolált kapillárisokon tanulmányozták a fluoreszcein permeabilitást és azt tapasztalták, hogy alkilglicerol kezelés hatására a fluoreszcein bejutott a kapillárisok lumenébe. A rezisztenciaváltozáshoz hasonlóan a megnövekedett permeabilitás is visszafordíthatónak bizonyult. Agyi endotélsejteken a PG és a HG hatása enyhébb volt, mint a mannitolé. Állatkísérletekben az alkilglicerolok csak a beadás oldalán lévő, tehát az ipszilaterális agyfélteke permeabilitását növelték meg, az agytörzset vagy a kisagyét nem, szemben a mannitollal (Erdlenbruch és mtsai, 2003b), ami a mannitol drasztikusabb hatását jelzi.

A fluoreszceinnel ellentétben az albumin átjutása nem változott szignifikánsan az agyi endotélsejt rétegeken keresztül. Az albumin vér-agy gáton kersztüli átjutása fiziológiás körülmények között igen alacsony (Abbott és mtsai, 2006), azonban patológias körülmények között ez sokszorosára emelkedhet a paracelluláris permeabilitás változásától függetlenül. Hipoxiában szelektív vezikuláris albumin és transzferrin transzport volt megfigyelhető tenyésztett agyi endotélsejteken keresztül, míg a kis molekula szukróz permeabilitása nem változott (Plateel és mtsai, 1997). Összefoglalva a rezisztencia, a fluoreszcein és albumin permeabilitási eredményeket arra következtethetünk, hogy az alkilglicerolok agyi endotélsejtekben szelektíven a paracelluláris utat, a szoros kapcsolatok

megnyitását célozzák. A sejtek közötti transzportutat főként a transzmembrán TJ fehérjék korlátozzák, mint például a klaudin család tagjai (Krause és mtsai, 2008). Agyi endotélsejtekben a legnagyobb mértékben a klaudin-5 expresszálódik (Ohtsuki és mtsai, 2008), és kulcsszerepet játszik a vér-agy gát működésében (Nitta és mtsai, 2003). A β -katenin nem csak az adherens junkció fehérjékhez citoplazmatikus linkerként kapcsolódó molekula, hanem központi eleme a Wnt jelátviteli útnak, amely részt vesz a vér-agy gát működések kialakításában és fenntartásában (Engelhardt és Liebner, 2014). Az alkilglicerolok hatására megváltozott agyi endotélsejtekben a klaudin-5 és a β -katenin fehérjék immunfestésének intenzitása és mintázata, ami ugyancsak a sejtközi kapcsolatok szerkezetének változására hívja fel a figyelmet. A tenyészeteken kapott adataink összhangban állnak az állatkísérletes eredmények után felállított hipotézissel, miszerint az alkilglicerolok főként a paracelluláris transzportútra vannak befolyással (Erdlenbruch és mtsai, 2003b). A paracelluláris útvonal átjárhatóságának megnövekedése citoszkeletális átrendeződéssel is magyarázható, és a TJ-ok szorossága is nagymértékben összefügg a citoszkeleton szerkezetének változásaival (Hartsock és Nelson, 2008). A β -katenin a sejtvázat létrehozó fehérjékhez kapcsolja a sejtközi kapcsolatot alkotó adherens junkció transzmembrán fehérjét (Liebner és Plate, 2010). Az alkilglicerolok hatására bekövetkezett sejthalak változás az aktin citoszkeleton és a junkciók közötti kapcsolatok átalakulására utalhat (29. ábra).

A rezisztenciában, permeabilitásban és morfológiai vizsgálatokban megfigyelt változások alapján feltételeztük, hogy az alkilglicerolok a junkciók finomszerkezetére gyakorolt hatással fokozzák a paracelluláris útvonal átjárhatóságát. A szoros kapcsolatok transzmembrán fehérjei egymás mellett fonatszerűen helyezkednek el, amelyek folyamatossága elengedhetetlen a szoros sejtközi kapcsolatok fenntartásához (Wolburg és mtsai, 1994). Wolburg és munkatársai leírták, hogy agyi endotélsejtek fagyasztva tört mintáiban a TJ fonatok E/P-oldali elhelyezkedésének aránya a TJ-k komplexitását tükrözi és a szoros kapcsolatok átjárhatóságával áll összefüggésben (Wolburg és mtsai, 1994). Kísérleteinkben alkilglicerol kezelés nem változtatta meg a TJ fonatok E/P-oldal arányát agyi endotélsejtek fagyasztva tört mintáiban. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a funkcionális és morfológiai változások tenyésztett agyi endotélsejteken nem jártak együtt a TJ szerkezeti változásaival elektronmikroszkópos szinten. Piehl és munkatársai (2010) ugyancsak megfigyelték, hogy a vér-agy gát permeabilitásának szabályozása nemcsak a TJ-k szerkezeti átrendeződésével lehetséges, hanem morfológiai változás megjelenése nélkül is végbe mehet. A TJ-k működése gyorsan megváltozhat foszforiláció vagy

defoszforiláció hatására (Bauer és mtsai, 2014). Agyi endotélsejt rétegek permeabilitásának csökkenése már 10 perc cAMP kezelés után megfigyelhető (Deli és mtsai, 1995b). Továbbá a TJ-k féléletideje is nagyon rövid lehet, például a klaudin-5-re számítva ez 33 másodperc (Piontek és mtsai, 2011).

Biológiaiailag aktív lipidek, mint az arachidonsav metabolit prosztanoidok és leukotriének nagymértékben befolyásolhatják a vér-agy gát permeabilitást. Kísérletes adatok kimutatták, hogy egy prosztanoid receptor antagonista képes volt megakadályozni a vér-agy gát permeabilitásának megnövekedését agyi iszkémiát követően (Fukumoto és mtsai, 2010). Az alkilglicerolok lipid receptorokon keresztüli hatását sem tudjuk kizárni (29. ábra). Előkísérleteinkben az alkilglicerolok megváltoztatták az agyi endotélsejtek membrán-fluiditását, ami az integráns membránfehérjéket tartalmazó raftok (Dodelet-Devillers és mtsai, 2009) átrendeződését és a paracelluláris transzportút megváltoztatását vonhatja maga után (29. ábra). Az agyi endotélsejt membránok lipid összetételének vizsgálata további információt adhat alkilglicerolok hatásmechanizmusáról.

29. ábra: Az alkilglicerolok lehetséges hatásai agyi endotélsejteken. A paracelluláris transzportút megnyitásának potenciális mechanizmusai: receptorokon keresztüli hatás, a sejtek citoszeletális hálózatának átrendezése a sejthalak megváltoztatásával, a lipid raftok módosítása, a membrán-fluiditás növelése.

Kísérletes adataink alapján az alkilglicerolok sejttenyészetes modellen is gyorsan és visszafordítható módon növelik az agyi endotélsejt rétegek áteresztőképességét, ami a korábbi preklinikai adatokkal együtt felveti az alkilglicerolok terápiás alkalmazását agyi tumorok kezelésében.

5.3. Tezmilifen hatása agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak megnyitására: lehetséges mechanizmus

A tezmilifen használata először kemoterápiás szerek melletti adjuvánsként merült fel perifériás tumorok kezelése során. A tezmilifennel való kezelés során központi idegrendszeri mellékhatások léptek fel a betegekben, amelyek a vér-agy gát megnyílására utaltak. Csoportunk 15 évvel ezelőtt a tezmilifen hatásának ezt az aspektusát kezdte el feltárni: állatkísérletekben és sejttenyészeteken a tezmilifen növelte a vér-agy gát permeabilitását (Deli és mtsai, 2000; 2003). Kísérleteim során a tezmilifennek a glióma erek átjárhatóságára kifejtett hatását vizsgáltam elsőként, valamint fel szerettem volna tárni a lehetséges hatásmechanizmusokat.

Egyik legfontosabb eredményünk, hogy a tezmilifen szignifikánsan jobban növelte a fluoreszcein bejutását agyba beültetett glióma szövetbe, mint a környező egészséges agyi régiókba. Ez a permeabilitás növekedés sokkal kifejezettebb volt fluoreszcein esetén, mint albuminra. A glióma beültetett állatoknál azonban alapvetően mindkét agyféltekében extravazáció emelkedést figyelhettünk meg, ami a tumoros oldalon, a jobb agyféltekében még kifejezettebb volt. A gliómában és a gliómát körülvevő agyszövetekben található erek fokozott permeabilitása jól ismert jelenség (Neuwelt és mtsai, 2008), adataink ezzel összhangban állnak.

A tezmilifen hatásmechanizmusát agyi endotélsejt tenyészeteken vizsgáltuk meg. A tezmilifen sejtek életképességére kifejtett hatását számos teszttel ellenőriztük, köztük az impedancia és a metabolikus aktivitás mérésével és a sejtmagi morfológia vizsgálatával. Mind a négy tesztben a tezmilifen idő- és koncentrációfüggő módon csökkentette az agyi endotélsejtek viabilitását. A tezmilifen 200 μ M kezelési koncentrációja toxikus volt agyi endotélsejtekre az MCF-7 mellrák sejtvonalon végzett kísérletekhez hasonlóan (Brandes és Hermonat, 1984), ezért ezt a koncentrációt a későbbi vizsgálataink során nem használtuk. A tezmilifen kisebb koncentrációi esetén sejtpusztulást és membránkárosodást nem észleltünk, a korai hatásként megfigyelt csökkent impedancia pedig reverzibilisnek bizonyult és a kontroll szintjére állt vissza.

A tezmilifen mind a hármás vér-agy gát ko-kultúra modellen, mind a kettős vér-agy és vér-glióma gát ko-kultúra modelleken megemelte a paracelluláris jelzőanyag fluoreszcein és a transzcelluláris marker albumin sejtrégeteken való átjutását (30. ábra), amely eredmények a korábbi kísérletes megfigyeléseinkkel párhuzamba állíthatók (Deli és mtsai, 2000; 2003). A permeabilitás növekedésével együtt a rezisztencia csökkenését és a sejtkapcsolatok morfológiai változását figyeltük meg. Az agyi endotélsejtek együtt tenyésztése RG2 glioblasztóma sejtekkel gyengítette a barrier tulajdonságokat a primer glia ko-kultúrához képest. Irodalmi adatok alapján a vér-agy gát funkciói a glióma központi gózában és a környező glióma szövetekben károsodnak (Dubois és mtsai, 2014). Eredményeink összhangban állnak ezekkel a megfigyelésekkel.

A tezmilifen nagyobb koncentrációban növelte az agyi endotélsejt rétegek permeabilitását, míg a legkisebb koncentráció csökkentette azt, ami hormetikus hatásra utal. Kis koncentrációjú tezmilifen kezelés emelte az agyi endotélsejtek cAMP termelését is, amely megmagyarázhatja az alacsony koncentráció barrier integritást növelő hatását (Deli és mtsai, 1995b; Perrière és mtsai, 2005). A nagyobb koncentrációjú tezmilifen kezelés (100 μ M) nem változtatta sem a cAMP termelést, sem egy protein kináz A alegység mRNS expresszióját (Függelék, F1. táblázat), ezért arra következtettünk, hogy a tezmilifen nagyobb koncentrációban nem a cAMP-PKA jelátviteli útvonalon keresztül hat.

A glióma kezelés során a legnagyobb problémát a tumorok multidrog rezisztenciája adja, ami az efflux pumpák jelenlétének köszönhető (Parrish és mtsai, 2015). A tezmilifen kezelés gátolta a Pgp, Bcrp és Mrp-1 efflux pumpák aktivitását (30. ábra). A tezmilifen korábbi vizsgálatokban csökkentette a Pgp aktivitását (Xu és mtsai, 2007; Georges és mtsai, 2014), de ennek a mechanizmusa nem teljesen tisztázott (Brandes, 2008). Mivel a Pgp mellett a tezmilifen a másik két fontos, a vér-agy gáton nagymértékben expresszáldó efflux pumpa, a Bcrp és az Mrp-1 aktivitását is gátolta, ezért az efflux pumpákon keresztül kifejtett terápiás hatékonysága nem kizárható.

Vizsgálataink során elsőként elemeztük a tezmilifen génexpresszióra kifejtett hatását agyi endotélsejtekben. Számos, a klaudin családba tartozó és egyéb szoros kapcsolatot alkotó transzmembrán fehérje génexpressziója csökkent mRNS szinten, amelyek összefüggésben állhatnak a megfigyelt permeabilitás növekedéssel, rezisztencia csökkenéssel és a sejtkapcsolatok morfológiájának megváltozásával (30. ábra). Emellett más, a vér-agy gát működéséhez szükséges gének szintje is megváltozott. A tezmilifen szignifikánsan csökkentette a Bcrp, az Mrp-4, az Eaat-k és az Oatp-1 efflux pumpák mRNS expresszióját, de a Pgp és az Mrp-1 transzkripciót nem változtatta meg. A Bcrp az

emberi agy hajszálereiben legnagyobb mértékben kifejeződő efflux transzporter (Uchida és mtsai, 2011). A Bcrp és a Pgp szubsztrát specificitása átfed, ezért a tezmilifen adjuváns szerepét az efflux pumpa gátlás is magyarázhatja. Számos, az agy számára fontos tápanyagszállító fehérje expressziója is csökkent tezmilifen kezelésre (30. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a génarray vizsgálatok agyi endotélsejt monokultúrákon történtek, amelyek a tenyésztés során glia kondicionált médiumot kaptak. Azonban adatainkat ezen limitáció ellenére relevánsnak tartjuk, mivel előkísérleteinkben a mono-, kettős és hármas ko-kultúrákban összehasonlított Pgp (Abcb1a) és Mrp-1 (Abcc1) transzporterek kifejeződése nem változott meg az együtt tenyésztés hatására (kézirat előkészületben). A kísérleteink során használt primer izolált agyi endotélsejtek a tenyésztés első napjaiban puromicin kezelésben részesültek. A puromicin azonban nem csak az agyi endotélsejt tenyésztés tisztaságát fokozza, hanem hozzájárulhat az efflux pumpák, mint a Pgp vagy az Mrp-1 magas szinten való kifejeződéséhez is. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy puromicin kezelés szelektíven megnövelte az Abcb1a expressziót egy agyi endotélsejtvonalban is (Demeuse és mtsai, 2004).

30. ábra: A tezmilifen hatásai agyi endotélsejteken: 1. az efflux pumpák aktivitásának gátlása; 2. a tápanyagok transzportjának módosítása; 3. a paracelluláris transzportút megnyitása, a szoros kapcsolatot alkotó fehérjék génexpressziójának csökkentése; 4. a jelátviteli utak aktiválása; 5. az albumin transzport növelése; 6. a metabolikus enzimek aktivitásának csökkentése.

A tezmilifen számos jelátviteli útvonalon és receptoron keresztül hat (Brandes, 2008). Kísérleteinkben a tezmilifen hatását olyan útvonalakra vizsgáltuk, amelyek a vér-agy gát permeabilitását befolyásolják. Vizsgálatainkban a tezmilifen csökkentette az agyi endotélsejtek NO termelését. Az NO fontos vasoaktív mediátor, amelynek túl magas vagy

túl alacsony szintje csökkenti a vér-agy gát integritását (Deli és mtsai, 2005). Ezért elképzelhető, hogy a tezmilifen által csökkentett NO termelés módosíthatja az agyi endotélsejtek permeabilitását. Tezmilifen kezelés után az NF κ B sejtmagba történő korai bejutását figyeltük meg. Az NF κ B, mint transzkripciós faktor számos sejten belüli jelátviteli hálózatban vesz részt (Brasier, 2006) és egy újabb tanulmány szerint a vér-agy gát permeabilitásának növekedésével is kapcsolatban állhat (Stone és mtsai, 2011).

Az agyi endotélsejteken megtalálható az ösztrogén receptor (Duckles és Krause, 2007), és ezen keresztül a β -ösztradiol védő hatást fejt ki az érrendszerre. Kísérleteinkben a β -ösztradiol kezelés mérsékelte a tezmilifen impedanciacsökkentő hatását. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a tezmilifen nem köt az ösztrogén receptorhoz, de specifikusan kapcsolódik az antiösztrogén kötőhelyekhez (Brandes és Hermonat, 1984). Egy másik tanulmányban a tezmilifen az ösztrogén hatását részben ellensúlyozta, de nem az ösztrogén receptoron keresztül (Brandes és Hogg, 1990), ami a két molekula közti interakcióra utal. A mi eredményeink is alátámasztják, hogy a tezmilifen és a β -ösztradiol között interakció léphet fel.

A tezmilifen hatását agyi endotélsejtekben a MAPK/ERK kináz gátlószere, az U0126 részben kivédte, ami a MAPK útvonal részvételét valószínűsíti a tezmilifen hatásmechanizmusában. Eredményeink összhangban állnak irodalmi adatokkal: a MAPK szignálút aktivációja fokozza az agyi endotélsejtek a permeabilitását (Fischer és mtsai, 2005), amit a jelátviteli út inhibitora, az U0126 gátol. Kísérleteinkben a PI3K/Akt szignalizációs útvonal gátlószere, az LY294002 is csökkentette a tezmilifen hatását. Korábban leírták, hogy több szignál molekula, köztük a PI3K befolyásolja a barrier integritást, főként a sejtek közötti TJ fehérjék össze- és szétkapcsolódását (González-Mariscal és mtsai, 2008). A vér-agy gátat megnyitó VEGF is a PI3K/Akt útvonalon keresztül fejt ki hatását agyi endotélsejteken (Kilic és mtsai, 2006), amit gátlószere, az LY294002 megakadályoz (Camire és mtsai, 2014). Eredményeink alapján a tezmilifen számos jelátviteli úton keresztül fejtheti ki a hatását, köztük a MAPK/ERK és PI3K/Akt útvonalakon át (30. ábra).

5.4. Új eredményeink összefoglalása

Mivel a rosszindulatú primer agytumороk és agyi metasztázisok kezelése a mai napig nem megoldott, ezért kiegészítő kezelések, új módszerek és adjuvánsok feltárása fontos és aktuális kutatási terület. Vizsgálataink során két új, a vér-agy gátat megnyitó vegyület agyi endotélsejtekre kifejtett hatását tanulmányoztuk.

Kísérleteinkkel először mutattuk ki, hogy

- tenyésztett agyi endotélsejtek rövidláncú alkilglicerolokkal történt akut kezelése reverzibilisen növeli a vér-agy gát permeabilitását a paracelluláris útvonalon keresztül, hosszabb távú károsító hatás nélkül
- a sejtek közötti kapcsolatok megnyílása nem jár együtt a sejtkapcsoló struktúrák finomszerkezeti átrendeződésével
- az alkilglicerol által létrehozott megnyílást követően az agyi endotél egysejtrétegek működése helyreáll, a vér-agy gát morfológiája és funkciói nem sérülnek.

Adataink mindenben alátámasztják a korábbi állatkísérletes eredményeket. Az alkilglicerolok agyi endotélsejtekre kifejtett hatásának teljes feltárásához a membránfluiditás mérését és a lipidomika irányába mutató további kísérleteket tervezünk. A mechanizmus megértéséhez pedig az alkilglicerolok lipid kettősrétegekkel való kölcsönhatásának modellezését kezdtük el együttműködő partnerrel.

Kísérleteinkben elsőként tártuk fel, hogy

- a kemoterápiás adjuváns tezmilifen sokkal jobban növelte a kis molekulatömegű jelzőanyag glióma szövetbe való bejutását az agyszövethez képest patkányokban
- a tezmilifen számos olyan jelátviteli úton keresztül fejtheti ki a hatását agyi endotélsejteken, amelyek a vér-agy gát permeabilitását befolyásolják
- emellett a tezmilifen az agyi endotélsejtek efflux pumpáinak az aktivitását is csökkentette, ezért potenciálisan hatékony lehet kemoterapeutikumok agytumorkba való bejuttatásában.

További kísérletekkel lehetne igazolni a tezmilifen terápiás potenciálját: glióma állatmodellen vizsgálható lenne kemoterápiás szerek agyi bejutásának és glióma elleni hatékonyságának tanulmányozása, valamint fontos lehet a génexpresszió vizsgálata izolált agyi és glióma mikroereken tezmilifennel kezelt állatokból.

Következtetés

Az alkilglicerolokkal és a tezmilifennel kapott eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy ez a két vegyület a vér-agy gát megnyitásán keresztül alkalmas lehet gyógyszerbevitel fokozására agytumork kezelésében.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Deli Máriának a munkám során nyújtott szakmai irányításért, a szüntelen támogatásért és a türelméért. Hálás vagyok, hogy hét évvel ezelőtt lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportjában kiemelkedő szakmai körülmények között és baráti környezetben dolgozhassak.

Ezúton szeretném megköszönni a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának - Dr. Veszeka Szilvia, Bocsik Alexandra, Harazin András, Dr. Sántha Petra, Dr. Tóth Andrea, Dr. Kiss Lóránd, Dr. Horvát Sándor, Dr. Kürti Levente és tudományos diákkörös hallgatóink - a mindennapi nyitott, baráti légkört és a rengeteg szakmai támogatást, segítséget. Külön köszönöm Dr. Veszeka Szilviának és Dr. Tóth Andreának, hogy diákkoromban megtanították nekem a kutatáshoz szükséges alapvető kísérletes technikákat.

Köszönöm Prof. Ormos Pálnak, az MTA SZBK Igazgatójának és Dr. Siklós Lászlónak, a Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegysége vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat. A Kutatóegység és a Biofizika Intézet tagjait is köszönet illeti a munkámban nyújtott segítségért. Tóthné Marikának köszönöm a dolgozatomban és cikkeinkben található illusztrációk elkészítésében nyújtott türelmes segítségét.

Hálával tartozom együttműködő partnereinknek, akik lehetővé tették a közös cikkek létrejöttét. Köszönet illeti Dr. Petra Hülpert (Göttingeni Egyetem, Németország), akivel az alkilglicerolokkal végzett kísérletekben együtt dolgoztunk. Az elektronmikroszkópos felvételeket Prof. Hartwig Wolburg (Tübingeni Egyetem, Németország) készítette. A tezmilifennel végzett kísérleteimben segítségemre voltak Dr. Pásztói Mária és Dr. Péterfi Zoltán (glióma beültetés), Dr. Cervenak László (NF κ B festés), Dr. Rákhely Gábor és Dr. Tóth András (génexpressziós analízis). Külön kiemelném Dr. Ábrahám Csongort, aki a kísérletek mellett számos munkám lektorálását is elvégezte, amiért hálával tartozom.

Köszönöm barátaimnak, hogy az egyetemi és a doktori évek alatt támogattak, erőt adtak és biztattak.

Végül pedig a hálával tartozom Édesapámnak, Édesanyámnak és családomnak, hogy mindvégig minden lehetséges módon támogatták és támogatják, hogy megvalósítsam az álmaimat. Vőlegényemet, Zsombort külön köszönet illeti, hogy ezen a sokszor rögös úton is mindig kiállt mellettem.

7. Irodalomjegyzék

- Aas AT, Brun A, Blennow C, Strömblad S, Salford LG (1995). The RG2 rat glioma model. *J Neurooncol.* 23(3):175-83.
- Abbott NJ (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 200(6):629-38.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev. Neurosci.* 7:41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37(1):13-25.
- Bauer HC, Krizbai IA, Bauer H, Traweger A (2014). "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. *Front Neurosci.* 8:392.
- Binkhathlan Z, Lavasanifar A (2013). P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 13(3):326-46.
- Borlongan CV, Emerich DF (2003). Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood-brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull.* 60(3):297-306.
- Brandes LJ, Hermonat MW (1984). A diphenylmethane derivative specific for the antiestrogen binding site found in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 123(2):724-8.
- Brandes LJ, Gerrard JM, Bogdanovic RP, Lint DW, Reid RE, LaBella FS (1988). Correlation of the antiproliferative action of diphenylmethane-derivative antiestrogen binding site ligands with antagonism of histamine binding but not of protein kinase C-mediated phosphorylation. *Cancer Res.* 48(14):3954-8.
- Brandes LJ, Hogg GR (1990). Study of the in-vivo antioestrogenic action of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine HCl (DPPE), a novel intracellular histamine antagonist and antioestrogen binding site ligand. *J Reprod Fertil.* 89(1):59-67.
- Brandes LJ, LaBella FS, Warrington RC (1991). Increased therapeutic index of antineoplastic drugs in combination with intracellular histamine antagonists. *J Natl Cancer Inst.* 83(18):1329-1336.
- Brandes LJ, Simons KJ, Bracken SP, Warrington RC (1994). Results of a clinical trial in humans with refractory cancer of the intracellular histamine antagonist, N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine-HCl, in combination with various single antineoplastic agents. *J. Clin. Oncol.* 12(6):1281-1290.
- Brandes LJ (2008). N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy] ethanamine (DPPE; tesmilifene), a chemopotentiating agent with hormetic effects on DNA synthesis *in vitro*, may improve survival in patients with metastatic breast cancer. *Hum Exp Toxicol.* 27(2):143-147.
- Brasier AR (2006). The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol.* 6(2):111-130.
- Burgess A, Hynynen K (2014). Drug delivery across the blood-brain barrier using focused ultrasound. *Expert Opin Drug Deliv.* 11(5):711-21.
- Busija DW, Bari F, Domoki F, Horiguchi T, Shimizu K (2008). Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. *Prog Neurobiol.* 86(4):379-395.
- Camire RB, Beaulac HJ, Brule SA, McGregor AI, Lauria EE and Willis CL (2014). 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.* 351(3):654-662.

- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszélka S, Deli MA (2014). Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 45(8):610-38.
- Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci.* 15(7):455-65.
- Deli MA, Dehouck M-P, Cecchelli R, Ábrahám CS, Joó F (1995a). Histamine induces a selective albumin permeation through the blood-brain barrier *in vitro*. *Inflamm Res.* 44 S1: S56-S57, 1995.
- Deli MA, Dehouck MP, Ábrahám CS, Cecchelli R, Joó F (1995b). Penetration of small molecular weight substances through cultured bovine brain capillary endothelial cell monolayers: the early effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Exp Physiol.* 80:675–678.
- Deli MA, Németh L, Falus A, Ábrahám CS (2000). Effect of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine on the blood-brain barrier permeability in the rat. *Eur J Pharmacol.* 387(1): 63-72.
- Deli MA, Ábrahám CS, Niwa M, Falus A (2003). N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm Res.* 52 Suppl 1:S39-40.
- Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M (2005). Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 25(1):59-127.
- Deli MA, Kálmán M (2008). Vér-agy gát: kölcsönhatás gliasejtek és az agyi endothelsejtek között. In: Glia, Huszti Zs, Kálmán M (szerkesztők), Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 345-368.
- Deli MA (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta.* 1788(4):892-910.
- Deli MA (2011). Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates, Tihanyi K and Vastag M. (szerkesztők), Bentham E-books, pp. 144-165.
- Demeuse P, Fragner P, Leroy-Noury C, Mercier C, Payen L, Fardel O, Couraud PO, Roux F (2004). Puromycin selectively increases mdrla expression in immortalized rat brain endothelial cell lines. *J Neurochem.* 88(1):23-31.
- Dobrogowska DH, Vorbrodt AW (2004). Immunogold localization of tight junctional proteins in normal and osmotically-affected rat blood-brain barrier. *J Mol Histol.* 35(5):529-39.
- Doctrow SR, Abelleira SM, Heller-Harrison R, Kozarich JW, Malfroy B, McCarroll LA, Morgan KG, Morrow AR, Musso GF, et al (1994). The bradykinin analog RMP-7 increases intracellular free calcium levels in rat brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 271(1): 229-237.
- Dodelet-Devillers A, Cayrol R, van Horssen J, Haqqani AS, de Vries HE, Engelhardt B, Greenwood J, Prat A (2009). Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J Mol Med (Berl).* 87(8):765-74.
- Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, Siegal T, Jerome E, Osztie E, McAllister LD, Bubalo JS, Kraemer DF, Fortin D, Nixon R, Muldoon LL, Neuwelt EA (2000). Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer.* 88(3):637-47.
- Doolittle ND, Muldoon LL, Culp AY, Neuwelt EA (2014). Delivery of chemotherapeutics across the blood-brain barrier: challenges and advances. *Adv Pharmacol.* 71:203-43.

- Dubois LG, Campanati L, Righy C, D'Andrea-Meira I, Spohr TC, Porto-Carreiro I, Pereira CM, Balça-Silva J, Kahn SA, DosSantos MF, Oliveira Mde A, Ximenes-da-Silva A, Lopes MC, Faveret E, Gasparetto EL, Moura-Neto V (2014). Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front Cell Neurosci.* 8:418.
- Duckles SP, Krause DN (2007). Cerebrovascular effects of oestrogen: multiplicity of action. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(8):801-8.
- Ehrlich P (1885). *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: Eine farbenanalytische Studie.* August Hirschwald, Berlin, 167 S. (die Habilitationsschrift von Paul Ehrlich)
- Goldmann EE (1909). Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. In: *Beitr Klin Chirurg* 64, 1909, S. 192–265. Hochspringen.
- Goldmann EE (1913). Vitalfärbung am Zentralnervensystem. In: *Abh. K. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Med.* 1, S. 1–60.
- Emerich DF, Dean RL, Osborn C, Bartus RT (2001). The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet.* 40(2):105-123
- Engelhardt B, Liebner S (2014). Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* 355(3):687-99.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Eibl H, Lakomek M (2000). Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. *Exp Brain Res.* 135(3):417-22.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Kugler W, Eibl H, Lakomek M (2002). Increased delivery of erucylphosphocholine to C6 gliomas by chemical opening of the blood-brain barrier using intracarotid pentylglycerol in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 50(4):299-304.
- Erdlenbruch B, Schinkhof C, Kugler W, Heinemann DE, Herms J, Eibl H, Lakomek M (2003a). Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the brain. *Br J Pharmacol.* 139(4):685-694.
- Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H, Lakomek M (2003b). Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br J Pharmacol.* 140(7):1201-1210.
- Erdlenbruch B, Kugler W, Schinkhof C, Neurath H, Eibl H, Lakomek M (2005). Blood-brain barrier opening with alkylglycerols: Biodistribution of 1-O-pentylglycerol after intravenous and intracarotid administration in rats. *J Drug Target.* 13(3):143-50.
- Farkas A, Szatmári E, Orbók A, Wilhelm I, Wejksza K, Nagyoszi P, Hutamekalin P, Bauer H, Bauer HC, Traweger A, Krizbai IA (2005). Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of β -catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res.* 80(6):855-861.
- Fischer S, Wiesnet M, Renz D, Schaper W (2005). H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur J Cell Biol.* 84(7):687–697.
- Frosina G (2015). Limited advances in therapy of glioblastoma trigger re-consideration of research policy. *Crit Rev Oncol Hematol.* pii: S1040-8428(15)00111-0.
- Fukumoto K, Takagi N, Yamamoto R, Moriyama Y, Takeo S, Tanonaka K (2010). Prostanoid EP1 receptor antagonist reduces blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 640(1-3): 82–86.

- Genzyme Pharmaceuticals (2010). LipoBridgeR. Facilitate transport of drugs across the blood brain barrier. Retrieved January 29, 2010, from http://www.genzyme-pharmaceuticals.com/pdf/LipoBridge_Final.pdf
- Georges E, Lian J, Laberge R (2014). A tamoxifen derivative, N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy] ethanamine, selectively targets P-glycoprotein-positive multidrug resistant Chinese hamster cells. *Biochem Pharmacol.* 90(2):107-14.
- González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):729–756.
- Hartsock A, Nelson WJ (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778: 660–669.
- Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* 10(3):455-72.
- Hülper P, Dullin C, Kugler W, Lakomek M, Erdlenbruch B (2011). Monitoring proteins using *in vivo* near-infrared time-domain optical imaging after 2-O-hexyldiglycerol-mediated transfer to the brain. *Mol Imaging Biol.* 13(2):275-83.
- Hülper P, Veszelka S, Walter FR, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA (2013). Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 169(7):1561-73.
- Jähne EA, Eigenmann DE, Culot M, Cecchelli R, Walter FR, Deli MA, Tremmel R, Fricker G, Smiesko M, Hamburger M, Oufir M (2014). Development and validation of a LC-MS/MS method for assessment of an anti-inflammatory indolinone derivative by *in vitro* blood-brain barrier models. *J Pharm Biomed Anal.* 98:235-46.
- Jordan VC (2014). Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 21(3):R235–R246.
- Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM (2006). The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* 20(8):1185-7.
- Kiss E, Lahm E, Vachaja J, Nagy P, Bazsó P, Fekete Z, Takácsi-Nagy Z, Pápai Z (2013) Glioblastoma multiformében szenvedő betegek célzott terápiás kezelésével szerzett tapasztalataink. *Magyar Onkológia.* 4:264-268.
- Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszelka S, Ozsvári B, Puskás LG, Szabó-Révész P, Deli MA (2013). Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J Pharm Sci.* 102(4):1173-81.
- Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998). Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull.* 46(2):373-375.
- Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM (1979). Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(7):3382-3386.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 1778(3):631–645.
- Kroeger EA, Brandes LJ (1985). Evidence that tamoxifen is a histamine antagonist. *Biochem Biophys Res Commun.* 131(2):750-5.
- László V, Rothe G, Hegyesi H, Szeberényi JB, Orsó E, Schmitz G, Falus A (2001). Increased histidine decarboxylase expression during *in vitro* monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflamm Res.* 50(8):428-34.

- Liebner S, Plate KH (2010). Differentiation of the brain vasculature: the answer came blowing by the Wnt. *J Angiogenes Res.* 2010 Jan 14;2:1.
- Liu J, Tu D, Dancey J, Reyno L, Pritchard KI, Pater J, Seymour LK (2006). Quality of life analyses in a clinical trial of DPPE (tesmilifene) plus doxorubicin versus doxorubicin in patients with advanced or metastatic breast cancer: NCIC CTG Trial MA.19. *Breast Cancer Res Treat.* 100(3):263–271.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114(2):97–109.
- Mackic JB, Stins M, Jovanovic S, Kim KS, Bartus RT, Zlokovic BV (1999). Cereport (RMP-7) increases the permeability of human brain microvascular endothelial cell monolayers. *Pharm Res.* 16(9):1360-1365.
- Mason WP, Cairncross JG (2008). Invited article: the expanding impact of molecular biology on the diagnosis and treatment of gliomas. *Neurology.* 71(5):365-73.
- Mason WP (2015). Blood-brain barrier-associated efflux transporters: a significant but underappreciated obstacle to drug development in glioblastoma. *Neuro Oncol.* pii: nov122.
- McNamara MG, Mason WP (2012). Antiangiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther.* 12(5):643-54.
- Menon D, Karyekar CS, Fasano A, Lu R, Eddington ND (2005). Enhancement of brain distribution of anticancer agents using ΔG , the 12 kDa active fragment of ZOT. *Int J Pharm.* 306(1-2):122-131.
- Muldoon LL, Soussain C, Jahnke K, Johanson C, Siegal T, Smith QR, Hall WA, Hynynen K, Senter PD, Peereboom DM, Neuwelt EA (2007). Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J Clin Oncol.* 25(16):2295-2305.
- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, Kataoka Y, Niwa M (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 27(6):687-94.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 54(3-4):253-63.
- Neuwelt EA, Barnett PA, McCormick CI, Frenkel EP, Minna JD (1985). Osmotic blood-brain barrier modification: monoclonal antibody, albumin, and methotrexate delivery to cerebrospinal fluid and brain. *Neurosurgery.* 17(3):419-23.
- Neuwelt EA, Goldman DL, Dahlborg SA, Crossen J, Ramsey F, Roman-Goldstein S, Brazier R, Dana B (1991). Primary CNS lymphoma treated with osmotic blood-brain barrier disruption: prolonged survival and preservation of cognitive function. *J Clin Oncol.* 9(9):1580-90.
- 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 (2008). Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol.* 7(1):84-96.
- Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, Leybaert L, Molnár Z, O'Donnell ME, Povlishock JT, Saunders NR, Sharp F, Stanimirovic D, Watts RJ, Drewes LR (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci.* 12(3):169-182.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161(3):653-60.

- Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem.* 104(1):147-54.
- Packer RJ, Krailo M, Mehta M, Warren K, Allen J, Jakacki R, Villablanca JG, Chiba A, Reaman G (2005). A Phase I study of concurrent RMP-7 and carboplatin with radiation therapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas. *Cancer.* 104(9):1968-74.
- Pardridge WM (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov.* 1(2):131-9.
- Parrish KE, Sarkaria JN, Elmquist WF (2015). Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: strategies to overcome the blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther.* 97(4):336–346.
- Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Schermann JM, Temsamani J, Couraud PO, Deli MA, Roux F (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier specific properties. *J. Neurochem.* 93(2):279-289.
- Piehl C, Piontek J, Cording J, Wolburg H, Blasig IE (2010). Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell Mol Life Sci.* 67(12):2131–2140.
- Piontek J, Fritzsche S, Cording JD, Richter S, Hartwig J, Walter M, Yu D, Turner JR, Gehring C, Rahn HP, Wolburg H, Blasig I (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci.* 68:3903–3918.
- Plateel M, Teissier E, Cecchelli R (1997). Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem.* 68(2):874-7.
- Raghavan D, Brandes LJ, Klapp K, Snyder T, Styles E, Tsao-Wei D, Lieskovsky G, Quinn DI, Ramsey EW (2005). Phase II trial of tesmilifene plus mitoxantrone and prednisone for hormone refractory prostate cancer: high subjective and objective response in patients with symptomatic metastases. *J Urol.* 174(5):1808-13; discussion 1813.
- Rapoport SI (2001). Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 10(10):1809-1818.
- Reyno L, Seymour L, Tu D és mtsai, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA.19. (2004) 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.* 22(2):269–76.
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 468(7325):824-8.
- Sanovich E, Bartus RT, Friden PM, Dean RL, Lea HQ, Brightman MW (1995). Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7. *Brain Res.* 705(1-2): 125-135.
- Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K, Bauer HC (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci.* 8:404.
- Seifert S, Sontheimer H (2014). Bradykinin enhances invasion of malignant glioma into the brain parenchyma by inducing cells to undergo amoeboid migration. *J Physiol.* 592(Pt 22):5109-27.
- Stone KP, Kastin AJ and Pan W (2011). NFκB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell. Physiol. Biochem.* 28(1):115–124.

- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2013). Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol Pharm.* 10(5):1473-91.
- Taphoorn MJ, Henriksson R, Bottomley A, Cloughesy T, Wick W, Mason WP, Saran F, Nishikawa R, Hilton M, Theodore-Oklota C, Ravelo A, Chinot OL (2015). Health-Related Quality of Life in a Randomized Phase III Study of Bevacizumab, Temozolomide, and Radiotherapy in Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 33(19):2166-75.
- Thompson EM, Frenkel EP, Neuwelt EA (2011). The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. *Neurology.* 76(1):87-93.
- Terasaki T, Ohtsuki S (2005). Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx.* 2(1):63-72.
- Tóth AE, Tóth A, Walter FR, Kiss L, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA (2014). Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. *Arch Med Res.* 45(8):753-64.
- Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem.* 117(2):333-45.
- Unger C, Eibl H, von Heyden HW, Krisch B, Nagel GA (1985). Blood-brain barrier and the penetration of cytostatic drugs. *Klin Wochenschr.* 63(12):565-71.
- Veszelka S, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Dung NTK, Niwa, M, Ábrahám CS, Deli MA (2007). Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem. Int.* 50(1):219-228.
- 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 (2013). Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J Alzheimers Dis.* 36(3):487-501.
- Walter FR, Veszelka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA (2015). Tasmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *J Neurochem.* 2015 Jun 26. doi: 10.1111/jnc.13207.
- Weidle UH, Niewöhner J, Tiefenthaler G (2015). The Blood-Brain Barrier Challenge for the Treatment of Brain Cancer, Secondary Brain Metastases, and Neurological Diseases. *Cancer Genomics Proteomics.* 12(4):167-177.
- Weyerbrock A, Osterberg N, Psarras N, Baumer B, Kogias E, Werres A, Bette S, Saavedra JE, Keefer LK, Papazoglou A (2012). JS-K, a glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor with antineoplastic activity in malignant gliomas. *Neurosurgery.* 70(2):497-510; discussion 510.
- Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, Mack AF, Wolburg-Buchholz K (2012). The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med.* 33(5-6):579-89.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci.* 107(Pt 5):1347-57.
- Xu FY, Queen G, Brandes L, Hatch GM (2007). The phospholipidosis-inducing potential of the chemopotentiating drug, N,N-Diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine (DPPE, tasmilifene) correlates with its stimulation of phosphatidylserine synthesis and exposure on the plasma membrane in MCF-7 breast cancer cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 50:61-3.
- Zlokovic BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 57(2):178-201.

8. Összefoglaló

Új lehetőség a vér-agy gát megnyitására: a tezmilifen és a rövidláncú alkilglicerolok hatása agyi endotélsejteken

A vér-agy gát a központi idegrendszer és a vér között dinamikus határfelületet képező sejtek funkcionális egysége. Az agyi endotélsejtek közti szoros kapcsolatok és a sejteken kifejeződő számos efflux pumpa elsődleges szerepe az idegrendszer védelme, többek között a káros vegyületek agyszövetbe jutásának megakadályozása. Ugyanakkor ez a két mechanizmus gátolja a gyógyszerek és gyógyszerjelöltek agyba való bekerülését is, és ezzel megnehezíti a központi idegrendszeri betegségek, például az agytumороk kezelését. Az agytumороk, főként a glioblasztóma hatékony gyógyítása a mai napig nem megoldott, ezért továbbra is fennáll az igény új, lehetséges terápiás szerek és adjuvánsok felkutatására. Több lehetőség áll rendelkezésre a gyógyszerek vér-agy gáton való átjuttatására, köztük az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok megnyitása vagy az efflux pumpák gátlása. Kísérleteinkben a rövidláncú alkilglicerolokat és a tezmilifent vizsgáltuk, mint két új potenciális, a vér-agy gátat megnyitó vegyületet.

Állatkísérletekben a rövidláncú alkilglicerolok, az 1-*O*-pentilglicerol vagy a 2-*O*-hexildiglicerol közvetlenül artériába adva koncentrációfüggő módon, visszafordíthatóan nyitják meg a vér-agy gátat és növelik hatóanyagok bejutását az agyszövetbe. Azonban kísérleteink kezdetén az alkilglicerolok közvetlen hatása agyi endotélsejtekre, illetve lehetséges hatásmechanizmusa nem volt ismert. A tezmilifen, egy tamoxifen származék, ami fokozza a kemoterápiás szerek daganatellenes hatását, ugyanakkor védi az ép szöveteket mind kísérletes, mind klinikai vizsgálatokban. Betegek tezmilifen kezelése során átmeneti központi idegrendszeri mellékhatásokat figyeltek meg, amelyek a vér-agy gát megnyílására utaltak. A csoportunk korábbi kísérleteiben a tezmilifen fokozta a vér-agy gát áteresztőképességét patkányokban és agyi endotélsejt tenyészeteken is. Célunk ezért az volt, hogy megvizsgáljuk az alkilglicerolok és a tezmilifen közvetlen hatását agyi endotélsejt tenyészeteken, és hogy tanulmányozzuk, hogy a tezmilifen hogyan befolyásolja a vér-glióma gát áteresztőképességét.

A tezmilifen a glióma ereinek permeabilitására gyakorolt hatását RG2 glióma modellen vizsgáltuk patkányokban. A sejtenyészeti kísérletekben a vér-agy gát kettős vagy hármas ko-kultúra modelljeit használtuk, melyben primer patkány agyi endotélsejteket asztroglia sejtekkel, glioblasztóma sejtekkel vagy asztroglia sejtekkel és

pericitákkal tartottunk kokultúrában. Az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatait által korlátozott paracelluláris út átjárhatóságát és a sejtkapcsoló fehérjék mintázatában bekövetkezett változásokat rezisztencia- és permeabilitási mérésekkel, valamint immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk. Az alkilglicerolok hatását a szoros kapcsolatok finomszerkezetére fagyasztva tört mintákon elektronmikroszkópiával tanulmányoztuk. A tezmilifen hatásmechanizmusának feltárása során megvizsgáltuk az efflux pumpák, mint a P-glikoprotein, a mellrák rezisztencia fehérje (Bcrp) és a multidrog rezisztencia asszociált fehérje-1 (Mrp-1) aktivitására, az agyi endotélsejtek nitrogén-monoxid termelésére, az NFκB sejtmagba történő bejutására, a vér-agy gát szempontjából fontos gének mRNS expressziójára gyakorolt befolyását és olyan jelátviteli útvonalakat igyekeztünk azonosítani, amelyek a vér-agy gát átjárhatóságának szabályozásában vesznek részt és a tezmilifen hatását közvetítik.

A tezmilifen kezelés sokkal nagyobb mértékben, szelektíven növelte a kis molekulájú jelzőanyag bejutását a glióma szövetbe, mint a gliómát körülvevő agyszövetbe. Tenyészetes vizsgálatokban a nagy koncentrációjú alkilglicerol (60 mM) és tezmilifen (200 μM) kezelés csökkentette az agyi endotélsejtek életképességét, ezért ezeket a koncentrációkat későbbi kísérletekben nem használtuk. A rövid idejű alkilglicerol és a tezmilifen kezelés csökkentette az agyi endotélsejt rétegek ellenállását és fokozta a jelzőanyagok sejtrétegeken keresztüli átjutását. Mindkét kezelés esetén a csökkent barrier integritás visszafordítható volt. A permeabilitásban bekövetkezett változásokat a sejtkapcsoló fehérjék immunhisztokémiai festése is megerősítette. A sejtközi kapcsolatok újrendeződése és az endotélsejtek alakjában bekövetkezett változások arra utalnak, hogy a citoskeletonnak szerepe lehet az alkilglicerolok hatásában. Az alkilglicerol kezelés nem változtatta meg az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok finomszerkezetét elektronmikroszkópiával végzett vizsgálatainkban. Előzetes eredményeink alapján az alkilglicerolok megváltoztatják az agyi endotélsejtek plazmamembránjának fluiditását.

Az agyi endotélsejtek gát funkciójának megváltoztatásán túl a tezmilifen kezelés csökkentette a vizsgált efflux pumpák aktivitását és a nitrogén-monoxid felszabadulását is. Emellett a tezmilifen csökkentette számos sejtkapcsoló fehérje, metabolikus enzim és tápanyag transzporter mRNS szintű expresszióját. A tezmilifen a bakteriális lipopoliszacharidhoz hasonlóan növelte az NFκB sejtmagba történő bejutását agyi endotélsejtekben. A tezmilifen impedanciacsökkentő hatását a MAPK/ERK jelátviteli út

gátlószerével (U0126) és a PI3K/Akt szignálút gátlószerével (LY294002), valamint a β -ösztradiollal részben ellensúlyozni lehetett.

Fontos és aktuális kutatási terület olyan új molekulák, módszerek és eljárások kifejlesztése, amelyekkel hatékonyabbá tehető a központi idegrendszeri gyógyszerbejuttatás a rosszindulatú primer agytumороk és agyi metasztázisok kezelésére. Mivel a vér-agy gát kulcsszerepet játszik a vér és az agy közötti anyagtranszportban, vizsgálataink során két új, a vér-agy gátat megnyitó vegyület agyi endotélsejtekre kifejtett hatását tanulmányoztuk.

Kísérleteinkkel először mutattuk ki, hogy tenyésztett agyi endotélsejtek rövidláncú alkilglicerolokkal történt akut kezelése reverzibilisen növeli a vér-agy gát permeabilitását a paracelluláris útvonalon keresztül, hosszabb távú károsító hatás nélkül. A sejtek közötti kapcsolatok megnyílása nem járt együtt a sejtkapcsoló struktúrák finomszerkezeti átrendeződésével. A tenyészeteken kapott eredményeink azt mutatják, hogy az alkilglicerol által létrehozott megnyílast követően az agyi endotél egysejtrétegek működése helyreáll, a vér-agy gát morfológiája és funkciói nem sérülnek. Adataink mindenben alátámasztják a korábbi állatkísérletes eredményeket. Az alkilglicerolok hatásmechanizmusának teljes feltárásához a lipidomika irányába mutató további kísérleteket tervezünk.

Kísérleteinkben elsőként tártuk fel, hogy a kemoterápiás adjuváns tezmilifen sokkal jobban növelte a kis molekulatömegű jelzőanyag glióma szövetbe való bejutását az agyszövethez képest patkányokban. A tezmilifen számos olyan jelátviteli úton keresztül fejtheti ki a hatását agyi endotélsejteken, amelyek a vér-agy gát permeabilitását befolyásolják. Mivel emellett a tezmilifen az agyi endotélsejtek efflux pumpáinak az aktivitását is csökkentette, potenciálisan hatékony lehet kemoterapeutikumok agytumороkba való bejuttatásában.

Az alkilglicerolokkal és a tezmilifennel kapott eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy ez a két vegyület a vér-agy gát megnyitásán keresztül alkalmas lehet gyógyszerbevitel fokozására agytumороk kezelésében.

9. Summary

New agents to open the blood-brain barrier: the effects of tesmilifene and short-chain alkylglycerols on brain endothelial cells

The blood-brain barrier (BBB) forms a dynamic interface between the blood and the brain. Brain capillary endothelial cells constitute the anatomical and functional basis of the BBB, which selectively regulates the transcellular and paracellular transport of molecules and passage of cells between the blood and the central nervous system. The BBB restricts drug penetration to the brain and prevents effective treatment of several neurological diseases, among them gliomas. Since the current therapy of malignant gliomas or brain metastases is far from satisfactory, there is a need to find new ways to improve drug delivery to the brain. One of the strategies to increase the penetration of drugs to the brain is changing the functions of cerebral endothelial cells either by opening interendothelial tight junctions or by inhibiting the activity of drug efflux pumps. In this study two agents, tesmilifene and short-chain alkylglycerols (AGs) were selected for detailed examination to open the BBB.

In animal studies intraarterial injection of short-chain AGs 1-*O*-pentylglycerol and 2-*O*-hexyldiglycerol open the BBB transiently and increase the delivery of small or large molecules to brain parenchyma of rodents in a concentration dependent way. Tesmilifene, a tamoxifen-related compound, has chemopotentiating properties in both experimental and clinical cancer studies. Treatment with tesmilifene caused temporary, acute CNS side-effects in patients when used as a chemotherapeutic adjuvant, indicating the opening of the BBB. Previous studies from our laboratory demonstrated that tesmilifene increased the permeability of the BBB in rats and it also decreased the tightness of endothelial monolayers in culture. The direct effect of AG or tesmilifene on brain endothelial cells and the underlying mechanism of the modification of BBB permeability were unknown until the start of our experiments. The aim of our studies was to test the direct effects of AGs and tesmilifene on cultured brain microvascular endothelial cells, and to investigate the effects of tesmilifene on the permeability of the glioma vasculature.

For the glioma permeation studies RG2 glioblastoma cells were implanted into rat brains and the extravasation of two marker molecules was investigated in four brain regions with or without tesmilifene treatment. Studies on cultured brain endothelial cells were performed using primary isolated rat cells. For the barrier integrity tests brain

endothelial cells were kept in double culture with primary glial cells or RG2 glioblastoma cells, or endothelial cells were co-cultured with rat pericytes and glial cells (triple culture BBB model). The barrier integrity of the endothelial monolayers was followed by transendothelial electrical resistance and permeability measurements. In addition to functional assays, toxicity tests and immunostainings for junctional proteins were performed. Freeze fracture electron microscopy was used to reveal the effects of AGs on the ultrastructure of brain endothelial tight junctions. The effect of tesmilifene was also tested on the activity of P-glycoprotein, breast cancer resistant protein (Bcrp) and multidrug resistance associated protein-1 (Mrp-1) efflux pumps, on the production of nitric oxide, on gene expression measured by a custom Taqman gene array and on potential signalling pathways regulating BBB tightness.

In the glioma study treatment with tesmilifene induced a highly and selectively elevated increase in the permeability of fluorescein to the tumor as compared to the surrounding brain tissue. High concentrations of AG (60 mM) and tesmilifene (200 μ M) exerted significant toxicity on cultured brain endothelial cells, therefore these concentrations were excluded from the study. Short-term AG and tesmilifene treatments decreased the resistance of endothelial monolayers, and increased the permeability for fluorescein, a marker of paracellular flux. Tesmilifene also enhanced the transcellular transport of albumin. These short-term changes were accompanied by alterations in cell morphology, like cell shape, and loss or fragmentation of immunolabeling for junctional proteins. Both AG and tesmilifene-mediated increase in brain endothelial permeability was reversible, but the recovery for AGs was faster. In freeze fracture samples tight junction strand complexity of brain endothelial cells was not altered by AG treatment. Our preliminary studies show that treatments with AGs modify the plasma membrane fluidity of brain endothelial cells.

Tesmilifene decreased the activity of the investigated efflux pumps P-glycoprotein, Bcrp and Mrp-1, and the production of nitric oxide in brain endothelial cells. Tesmilifene downregulated the mRNA expression of several key BBB proteins, such as junctional proteins, drug efflux transporters, solute carriers and metabolic phase I and phase II enzymes. Tesmilifene increased the early nuclear localization of NF κ B similarly to a bacterial lipopolysaccharide. Its early effect on brain endothelial cell impedance could be partially blocked by inhibitors of two signal pathways MAPK/ERK (U0126) and PI3K/Akt (LY294002), which are involved in the regulation of BBB permeability, and by β -estradiol, which is well-known for its beneficial effect on brain endothelial cells.

The discovery of new molecules and techniques to increase the efficiency of drug delivery to the nervous system for the treatment of malignant brain tumors is an important and relevant research area. Because the BBB is a key interface regulating the transport of molecules between the systemic circulation and the central nervous system, two new potential agents to open the BBB were tested in our studies.

It was demonstrated for the first time, that acute treatment of cultured brain endothelial cells with short-chain alkylglycerols increased the permeability of the monolayers via the paracellular route, which effect was reversible with no viability changes on endothelial cells. The opening of the paracellular pathway was not accompanied by the reorganization of tight junction strands. Our experiments show that the recovery of brain endothelial cells after treatment with AGs is complete and neither the functions, nor the morphology of the BBB model is affected. Our data fully support the previous findings of animal experiments. To better understand the mode of action of AGs on brain endothelial cells further experiments including lipidomics are planned.

We are the first to describe that the chemotherapeutic adjuvant tesmilifene increased the penetration of a small molecule tracer to the glioma more significantly, than to the surrounding brain tissue. Tesmilifene acts via multiple signalling pathways in brain endothelial cells, which regulate the permeability of the BBB. Since tesmilifene also inhibits the activity of efflux pumps, it could be potentially used for the delivery of chemotherapeutics to brain tumors.

Our data support previous clinical observations and the results of animal experiments, and indicate that AGs and tesmilifene increase the permeability of the BBB by directly acting on brain endothelial cells. Based on the presented findings, it would be of interest to test the effect of AGs and tesmilifene on brain delivery of chemotherapeutic drugs and their efficacy as adjuvants in the treatment of brain tumors.

10. Függelék

F1. táblázat. Génexpressziós változások a kiválasztott vér-agy gát génekre kontroll és tezmilifen kezelt agyi endotélsejtekben. n.d.: nem detektált.

Fehérje		TaqMan gén-expressziós próba	Kontroll	Tezmilifen
Ocln		Rn00580064_m1	6465 ± 5533	7031 ± 111
Esam		Rn01531509_g1	45412 ± 46342	11995 ± 930
Cldn1		Rn00581740_m1	493 ± 532	53 ± 7
Cldn2		Rn02063575_s1	75 ± 116	n.d.
Cldn3		Rn00581751_s1	12 ± 8	1 ± 1
Cldn4		Rn01196224_s1	16 ± 14	11 ± 13
Cldn5		Rn01753146_s1	9299 ± 9886	4158 ± 1497
Cldn7		Rn01496517_g1	n.d.	n.d.
Cldn8		Rn01767199_s1	n.d.	3 ± 4
Cldn9		Rn01460292_s1	4 ± 3	3 ± 0
Cldn11		Rn01293260_m1	409 ± 609	6 ± 3
Cldn14		Rn01407193_m1	n.d.	n.d.
Cldn15		Rn02108734_s1	939 ± 573	457 ± 24
Cldn16		Rn00590884_m1	1 ± 1	n.d.
Cldn18		Rn01447445_m1	n.d.	n.d.
Cldn19		Rn01416539_m1	218 ± 346	6 ± 4
Glut1	SLC2A1	Rn01417099_m1	9253 ± 4580	11176 ± 258
Glut3	SLC2A3	Rn00567331_m1	5447 ± 3565	3455 ± 511
Glut5	SLC2A5	Rn00582000_m1	11 ± 11	n.d.
SglT2	SLC5A2	Rn00574917_m1	n.d.	n.d.
Mct1	SLC16A1	Rn00562332_m1	2059 ± 1156	1175 ± 222
Mct2	SLC16A2	Rn00596041_m1	1182 ± 772	362 ± 18
Mct6	SLC16A6	Rn01460167_m1	404 ± 88	338 ± 25
Cat1	SLC7A1	Rn00565399_m1	2614 ± 1856	2320 ± 34
Lat1	SLC7A5	Rn00569313_m1	2803 ± 1859	2037 ± 300
Slc7a11	Slc7a11	Rn01495123_m1	169 ± 96	273 ± 101
Sat1	SLC38A1	Rn00593696_m1	683 ± 607	216 ± 19
Sat2	SLC38A2	Rn00710421_m1	31690 ± 21764	31253 ± 2053
Sn1	SLC38A3	Rn00595678_m1	3645 ± 2023	1767 ± 123
Snat5	SLC38A5	Rn00593859_m1	14 ± 14	5 ± 2
Fatp1	SLC27A1	Rn00585821_m1	721 ± 542	418 ± 38
Fatp5	SLC27A5	Rn00577177_m1	n.d.	n.d.
Glyt1	SLC6A9	Rn01416529_m1	102 ± 148	13 ± 2
Glyt2	SLC6A5	Rn01475607_m1	n.d.	n.d.
Taut	SLC6A6	Rn00567962_m1	114 ± 61	11 ± 0
Crt	SLC6A8	Rn00506029_m1	1011 ± 533	290 ± 3
Smtt	SLC5A6	Rn00590633_m1	493 ± 205	276 ± 10
Asct1	SLC1A4	Rn01786205_m1	1295 ± 830	850 ± 96
Asct2	SLC1A5	Rn00598400_m1	1872 ± 1138	511 ± 48

Pept1	SLC15A1	Rn00589098_m1	n.d.	n.d.
Pept2	SLC5A2	Rn00574917_m1	n.d.	n.d.
PhT2	SLC15A3	Rn00595146_m1	689 ± 458	385 ± 5
Dat	SLC6A3	Rn00562224_m1	0 ± 1	n.d.
Net	SLC6A2	Rn00580207_m1	4 ± 7	n.d.
Sert	SLC6A4	Rn00564737_m1	2 ± 4	1 ± 1
Gat1	SLC6A1	Rn00577652_m1	5 ± 7	n.d.
Gat2	SLC6A13	Rn00592456_m1	52 ± 90	n.d.
Gat3	SLC6A11	Rn00577664_m1	n.d.	n.d.
Ct1	SLC6A8	Rn00506029_m1	1011 ± 533	290 ± 3
Abca2	Abca2	Rn00577821_m1	231 ± 90	169 ± 38
Abca8	Abca8	Rn01460836_m1	2 ± 1	n.d.
Pgp	Abcb1a	Rn01639253_m1	3035 ± 1535	2137 ± 667
Bcrp	ABCG2	Rn00710585_m1	3406 ± 3900	1064 ± 15
Mrp1	ABCC1	Rn00574093_m1	2986 ± 1970	2131 ± 233
Mrp2	ABCC2	Rn00563231_m1	n.d.	n.d.
Mrp3	ABCC3	Rn01452854_m1	489 ± 349	246 ± 59
Mrp4	ABCC4	Rn01465702_m1	2015 ± 1670	850 ± 59
Mrp5	ABCC5	Rn00588341_m1	1971 ± 1410	1257 ± 62
Mrp6	ABCC6	Rn00578778_m1	23 ± 10	12 ± 3
Mrp8	ABCC8	Rn00564778_m1	11 ± 19	n.d.
Mrp9	ABCC12	Rn01640157_gH	5 ± 3	8 ± 0
Eaat1	SLC1A3	Rn00570130_m1	107 ± 64	1 ± 1
Eaat2	SLC1A2	Rn00568080_m1	10 ± 3	1 ± 1
Eaat3	SLC1A1	Rn00564705_m1	515 ± 212	85 ± 5
Eaat4	SLC1A6	Rn00583283_m1	1 ± 2	n.d.
Oatp1	SLCO1C1	Rn00584891_m1	543 ± 334	119 ± 38
Oatp2	SLCO1A4	Rn00756233_m1	288 ± 130	499 ± 33
Cyp1A1		Rn00487218_m1	1907 ± 3052	298 ± 91
Cyp1A2		Rn00561082_m1	n.d.	n.d.
Cyp2B1		Rn01457875_m1	n.d.	n.d.
Cyp2C11		Rn00569868_m1	n.d.	n.d.
Cyp2D4		Rn01504629_m1	1222 ± 864	369 ± 16
Cyp2E1		Rn01759587_m1	n.d.	n.d.
Cyp2J4		Rn00576482_m1	9 ± 3	5 ± 1
Cyp2R1		Rn01754616_m1	19 ± 9	16 ± 2
Cyp2S1		Rn01475871_m1	10 ± 7	7 ± 9
Cyp2U1		Rn01522408_m1	833 ± 551	410 ± 12
Cyp3A62		Rn01409583_m1	n.d.	n.d.
Cyp3A23		Rn01412959_g1	n.d.	3 ± 5
Cyp7A1		Rn00564065_m1	n.d.	n.d.
Cyp27A1		Rn00710297_m1	312 ± 197	220 ± 8
Gstp1		Rn00561378_gH	18296 ± 11048	14156 ± 2279
Gsta2		Rn04222952_m1	n.d.	n.d.
Gsta3		Rn00580416_m1	149 ± 117	21 ± 1
LOC501110		Rn01757146_m1	57 ± 24	57 ± 15

Sult1A1	Rn01510633_m1	77 ± 39	11 ± 1
Sult1c3	Rn00581955_m1	73 ± 126	n.d.
Ugt1A1	Rn00754947_m1	4 ± 5	4 ± 3
Ggt1	Rn00587709_m1	12 ± 12	1 ± 2
Ggt5	Rn00570305_m1	524 ± 507	51 ± 4
Ggt7	Rn00522627_m1	167 ± 130	18 ± 0
Nos1	Rn00583793_m1	n.d.	n.d.
Nos2	Rn00561646_m1	n.d.	n.d.
Nos3	Rn02132634_s1	14818 ± 12289	10975 ± 131
Prkcg	Rn00440861_m1	23 ± 20	19 ± 7
Prkaca	Rn01432302_m1	2898 ± 1076	2320 ± 357
Prkar1a	Rn00566036_m1	4737 ± 1275	3754 ± 619
Prkar2a	Rn00709403_m1	3150 ± 1262	2968 ± 285
Xdh	Rn00567654_m1	5287 ± 2893	1076 ± 53
Cat	Rn00560930_m1	3539 ± 1870	2095 ± 309
Sod1	Rn01477289_m1	2067 ± 729	2124 ± 207
Gtpbp10	Rn01755457_m1	109 ± 22	155 ± 23

I. Publikáció

RESEARCH PAPER

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

P Hülper¹, S Veszelka², F R Walter², H Wolburg³, P Fallier-Becker³, J Piontek^{4*}, I E Blasig⁴, M Lakomek¹, W Kugler¹ and M A Deli²

¹Department of Pediatrics I, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany,

²Laboratory of Molecular Neurobiology, Institute of Biophysics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary, ³Institute of Pathology and Neuropathology, Department of General Pathology, University of Tübingen, Tübingen, Germany, and ⁴Institute of Molecular Pharmacology, Berlin, Germany

Correspondence

Dr Petra Hülper, Department of Pediatrics I, University Medical Center Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Germany. E-mail: huelper@med.uni-goettingen.de

*Present address: Institute of Clinical Physiology, Charité, Berlin, Germany.

Keywords

blood-brain barrier; brain endothelial cells; short-chain alkylglycerols; tight junctions; transendothelial electrical resistance; permeability; claudin-5; electron microscopy

Received

11 June 2012

Revised

7 January 2013

Accepted

5 April 2013

BACKGROUND AND PURPOSE

The blood-brain barrier (BBB) restricts drug penetration to the brain preventing effective treatment of patients suffering from brain tumours. Intra-arterial injection of short-chain alkylglycerols (AGs) opens the BBB and increases delivery of molecules to rodent brain parenchyma *in vivo*. The mechanism underlying AG-mediated modification of BBB permeability is still unknown. Here, we have tested the effects of AGs on barrier properties of cultured brain microvascular endothelial cells.

EXPERIMENTAL APPROACH

The effects of two AGs, 1-O-pentylglycerol and 2-O-hexyldiglycerol were examined using an *in vitro* BBB model consisting of primary cultures of rat brain endothelial cells, co-cultured with rat cerebral glial cells. Integrity of the paracellular, tight junction-based, permeation route was analysed by functional assays, immunostaining for junctional proteins, freeze-fracture electron microscopy, and analysis of claudin-claudin *trans*-interactions.

KEY RESULTS

AG treatment (5 min) reversibly reduced transendothelial electrical resistance and increased BBB permeability for fluorescein accompanied by changes in cell morphology and immunostaining for claudin-5 and β -catenin. These short-term changes were not accompanied by alterations of inter-endothelial tight junction strand complexity or the *trans*-interaction of claudin-5.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS

AG-mediated increase in brain endothelial paracellular permeability was short, reversible and did not affect tight junction strand complexity. Redistribution of junctional proteins and alterations in the cell shape indicate the involvement of the cytoskeleton in the action of AGs. These data confirm the results from *in vivo* studies in rodents characterizing AGs as adjuvants that transiently open the BBB.

Abbreviations

AG, alkylglycerol; BBB, blood-brain barrier; BECs, brain endothelial cells; CPT-cAMP, 8-(4-chlorophenylthio)adenosine-3',5'-cyclic monophosphate; EBA, Evans blue-labelled albumin; HG, 2-O-hexyldiglycerol; MTX, methotrexate; P_e , transendothelial permeability coefficient; PG, 1-O-pentylglycerol; PS_e , permeability surface area for endothelial monolayers; Ro 20-1724, 4-(3-butoxy-4-methoxyphenyl)methyl-2-imidazolidone; SF, sodium fluorescein; TEER, transendothelial electrical resistance; Tx-100, Triton X-100 detergent; YFP, yellow fluorescent protein; ZO-1, zonula occludens protein-1

Introduction

The blood-brain barrier (BBB) selectively regulates both transcellular and paracellular passage of molecules and cells between the blood and the CNS, thus impeding the treatment of brain disorders such as malignant brain tumours. In these closely associated areas between brain endothelial cells (BECs), specific structures called *zonulae occludentes* or tight junctions are expressed, whose membranes attach each other to form a virtually impermeable barrier, thus greatly hindering paracellular diffusion of hydrophilic substances through the vessel wall (Reese and Karnovsky, 1967).

Tight junctions are transmembrane complexes composed of protein polymers which form a branching network of sealing strands. Each strand is formed by a row of transmembrane proteins embedded in both plasma membranes, with extracellular domains interacting with tight junction proteins of the neighbouring cell by claudin-claudin *trans*-interactions (Blasig *et al.*, 2006). Claudin-claudin interactions are responsible for strand building of the tight junction complexes (Furuse *et al.*, 1998) and paracellular tightening (Piehl *et al.*, 2010). *Zonulae adherentes* or adherens junctions form a weaker barrier (Rubin and Staddon, 1999). The primary component of adherens junctions is the Ca^{2+} -regulated vascular endothelial protein, cadherin, which mediates cell-cell adhesion (Dejana *et al.*, 2008). Another set of proteins, the catenins, link the cadherins to the cytoskeleton. Proper establishment of adherens junctions is required for the expression of claudin-5 and thus they may be regulators of vascular permeability (Taddei *et al.*, 2008).

In addition to the restricted paracellular transport, transcellular transport of substances and cells into and out of the brain compartment is also very limited at the BBB because there are only a few pinocytotic vesicles. The barrier functions lead to a very high transendothelial electrical resistance (TEER). In general, passage across the BBB is inversely related to the size, i.e., molecular weight, and the aqueous solubility of the compound (Pardridge, 2002). Therefore, increasing the lipophilicity of drugs has been used as one way of improving transcellular passage through the endothelial cells (Reardon *et al.*, 2006). However, many compounds that are able to penetrate the BEC membrane are very effectively transported back into the capillary lumen by efflux transporters, such as P-glycoprotein and multidrug resistance proteins, that are localized primarily at the luminal side of BECs (Golden and Pollack, 2003; Kemper *et al.*, 2004). This efflux system has generated another possibility of increasing the passage of drugs into the brain, by inhibiting the efflux transporters. Thus, inhibition of P-glycoprotein results in increased brain penetration and slower brain elimination of those drugs which are substrates for P-glycoprotein (Fellner *et al.*, 2002; van Vliet *et al.*, 2010; O'Brien *et al.*, 2012). Other options for improved drug delivery to the CNS are to couple drugs to endogenous ligands of receptor- and carrier-mediated transport pathways, such as angiopep-2 (Demeule *et al.*, 2008) or glucosamine (Dhanikula *et al.*, 2008; see Deli, 2011). Despite intensive research, no optimal solution has yet been found for the treatment of CNS cancers, either primary tumours or metastases. The currently available cytostatic drugs are either too large (high MW) or too water-soluble to enter the brain through the blood vessel wall in

sufficient concentrations or they are substrates for P-glycoprotein (Deli, 2011).

Thus, a potential approach to enhance drug delivery across biological barriers is the use of tight junction modulators to open the epithelial or endothelial paracellular route (see Deli, 2009). One previously described method of increasing the paracellular diffusion rates of molecules across brain capillaries into the brain parenchyma is the i.a. infusion of a hyperosmolar (1.37 M) mannitol solution (Neuwelt *et al.*, 1985) which opens the inter-endothelial tight junctions, via Src kinase-mediated phosphorylation of the adherens junction protein, β -catenin (Rapoport, 2000; Farkas *et al.*, 2005). Osmotic BBB disruption has already been employed in animal models and in patients with malignant brain tumours, in order to improve the effectiveness of chemotherapy (Doolittle *et al.*, 2000). However, in clinical practice, osmotic BBB opening was poorly reproducible, as it required a mannitol threshold concentration with a low therapeutic window and the opening persisted for about 6 h (Siegal *et al.*, 2000). This duration of effect may induce toxic effects of the increased BBB permeability. Moreover, this method needs interventional radiology and, up to now, its application has been restricted to a few clinics.

The ability of short-chain alkylglycerols (AGs) to increase BBB permeability have been known for more than 25 years (Unger *et al.*, 1985). In rodents, i.a. injection of AGs led to a concentration-dependent enrichment of co-administered cytostatic drugs and antibiotics in the ipsilateral hemisphere (Erdlenbruch *et al.*, 2000). In glioma-bearing rats, AGs opened the BBB in the tumour tissue and the surrounding brain (Erdlenbruch *et al.*, 2003a). Two AG derivatives, 1-O-pentylglycerol (PG) and 2-O-hexyldiglycerol (HG), have demonstrated good therapeutic range and effectiveness. After a bolus injection of PG (800 μL , 50 mM) simultaneously given with 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ methotrexate (MTX) into the right internal carotid artery of rats about 1.2 pmol MTX per mg brain was found in the ipsilateral hemisphere. In the contralateral, i.e., untreated hemisphere, with normal BBB, only 0.3 pmol MTX per mg brain was detected (Erdlenbruch *et al.*, 2003b). Even the penetration of high MW materials, such as albumin and antibodies, into the brain could be significantly increased (Erdlenbruch *et al.*, 2003a; Hülper *et al.*, 2011). The opening of the BBB *in vivo* was reversible and lasted for only a few minutes to about 1 h, depending on the AG concentration used (Erdlenbruch *et al.*, 2000; 2002). These properties would be advantageous in a clinical setting.

Results from *in vitro* and *in vivo* assays showed that AGs were non-toxic and that they were eliminated from the body through the kidneys (Erdlenbruch *et al.*, 2003b). Studies with radioactively labelled PG showed no enrichment in the brain or other organs (Erdlenbruch *et al.*, 2005). In freshly isolated brain capillaries, the marker dye fluorescein could diffuse into the capillary lumen after addition of AG. Using confocal microscopy, fluorescein could be found in the paracellular cleft, indicating an opening of the paracellular diffusion barrier (Erdlenbruch *et al.*, 2003a). However, the mode of action of AGs and their influence on BECs have not yet been elucidated.

The aim of the present work was to examine the direct short-term effects of AGs on cell viability and barrier properties in an *in vitro* model of the BBB, using cultures of BECs.

The integrity of the paracellular barrier of BECs was monitored following an acute treatment by AGs by the measurement of TEER and permeability for marker molecules (fluorescein and albumin), immunostaining for claudin-5 and β -catenin junctional proteins, and by the analysis of inter-endothelial tight junction strand complexity using freeze-fracture electron microscopy. The *trans*-interaction of claudin-5 was also examined to reveal the possible mode of action of AGs. Our *in vitro* data show for the first time that AGs reversibly enhanced the flux of molecules through brain endothelial cell monolayers, without causing fundamental alterations of the tight junction structure.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures complied with the recommendations of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (Council Directive 86/609/EEC) and Hungarian National Law XXVIII./1998 and CLVIII./2011. on the protection of animals or the German National Law on the protection of animals (§ 4 Abs. 3) and were approved by the Animal Experimentation Committee of the Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences (Hungary), and from the local Hungarian authorities (Permit numbers: XVI./03835/001/2006; XVI./834/2012) or the Animal Experimentation Committee of the Georg-August University Göttingen (reference no. T11/17). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010). A total of 70 animals were used in the experiments described here. Rats were kept in a controlled environment (22°C, 55% humidity, 12 h day-night rhythm) and had free access to standard diet and tap water.

Cell culture

Primary cultures of BECs were prepared from 2 week old outbred Wistar rats (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) as described in detail by Veszelka *et al.*, (2007). Fore-brains were collected in ice-cold sterile PBS; meninges were removed, grey matter was minced by scalpel into 1 mm³ pieces and digested with 1 mg·mL⁻¹ collagenase CLS2 (Worthington Biochem., Lakewood, NJ, USA) in DMEM for 1.5 h at 37°C. Microvessels were separated by centrifugation (1000× *g*, 20 min) in 20% BSA-DMEM from myelin containing elements and further digested with 1 mg·mL⁻¹ collagenase-dispase (Roche, Basel, Switzerland) in DMEM for 1 h. Microvascular endothelial cell clusters were separated on a 33% continuous Percoll gradient (1000× *g*, 10 min), collected, and washed twice in DMEM before plating on collagen type IV and fibronectin-coated dishes, multiwell plates (Falcon, Becton Dickinson; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or cell culture inserts (Transwell clear, 1 cm²; pore size of 0.4 μ m; Corning Costar Co., Lowell, MA, USA). Cultures were maintained in DMEM supplemented with 5 μ g·mL⁻¹ gentamicin, 20% plasma-derived bovine serum (First Link, Wolverhampton, UK), 1 ng·mL⁻¹ basic fibroblast growth factor (Roche) and 100 μ g·mL⁻¹ heparin. During the first 2 days, culture medium

contained puromycin (4 μ g·mL⁻¹) to selectively remove P-glycoprotein-negative contaminating cells (Perrière *et al.*, 2005). Cultures reached confluency within a week and were used for experiments. To induce BBB characteristics, BECs were co-cultured with rat cerebral glial cells (Deli *et al.*, 2005; Veszelka *et al.*, 2007).

Primary cultures of glial cells were prepared from 14 day old Wistar rats (Harlan Laboratories, Rossdorf, Germany or Charles River, Sulzfeld, Germany). Meninges were removed, and cortical pieces were mechanically dissociated in DMEM containing 5 μ g·mL⁻¹ gentamicin and 10% FBS and plated in poly-L-lysine-coated 12-well dishes and kept for a minimum of 3 weeks before use. In confluent glia cultures, 90% of cells were immunopositive for the astroglial cell marker glial fibrillary acidic protein, while the remaining 10% were immunopositive for CD11b, a marker of microglia.

For co-culture with BECs grown in cell culture, inserts were placed into multiwells containing astroglia at the bottom of the wells with endothelial culture medium in both compartments. When BECs became almost confluent, 550 nM hydrocortisone was added to the culture medium (Deli *et al.*, 2005). Before starting experiments, cells were treated with 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP (CPT-cAMP; 250 μ M) and Ro 20-1724 (17.5 μ M; Roche) for 24 h to tighten junctions and elevate resistance (Deli *et al.*, 2005; Perrière *et al.*, 2005). All the experiments were performed with primary rat BEC cultures, except the claudin-claudin *trans*-interaction analyses which used HEK293 cells, as described below.

Treatments

AGs were tested on BECs at concentrations of 0–100 mM, with exposure for 5 min. The cells were incubated with AGs dissolved in DMEM culture medium to provide physiological conditions for the sensitive BEC monolayers. For viability studies, isotonic NaCl was used as in previous *in vivo* studies (Erdlenbruch *et al.*, 2003a,b; 2005). In all experiments, treatment solutions were added and removed from the cells very slowly and carefully not to disturb cell monolayers by the change of the medium.

Cell cytotoxicity assays for cell viability and apoptosis

Cell viability was determined by the WST-1 test which is based on the cleavage of a tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenases. About 5×10^3 BECs were seeded in flat-bottom, 96-well microtiter plates (100 μ L per well), allowed to adhere for 24 h and then treated with increasing amounts of PG or HG for 5 min, then re-fed with culture medium. Cell viability was measured by adding 10 μ L WST-1 reagent per well 45 min, 24 h, 48 h and 72 h after treatment. Two hours after addition of the WST-1 reagent, absorbance was determined by a SUNRISE microplate reader (TECAN, Crailsheim, Germany) at 450 nm with a reference filter at 690 nm. Cells treated with 1% Triton X-100 detergent (Tx-100) in serum-free medium for 6 h served as positive control, and untreated cells were used as reference.

Apoptosis was measured using a cell death detection ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Cells were seeded in 96-well microtiter plates (200 μ L per well). After 48 h, cells were treated with increasing amounts

of PG or HG for 5 min. As a positive control, cells were treated with 85 μM staurosporin for 1 h to induce apoptosis. DNA-histone complex provided with the kit also served as a technical control for the ELISA. The cytosolic fraction of treated or untreated cells was used as an antigen source in the sandwich ELISA. Incubation of the streptavidin-coated microplate with samples and the mixture of anti-histone-biotin and anti-DNA-peroxidase antibodies were performed according to the manufacturer's instructions. Absorption was measured by a SUNRISE microplate reader (TECAN) at 405 nm, with a reference filter at 492 nm.

Evaluation of the barrier integrity

TEER representing the permeability of tight junctions for sodium ions in culture conditions was measured by an EVOM resistance meter (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA) using STX-2 electrodes, and expressed relative to the surface area of the endothelial monolayer ($\Omega \times \text{cm}^2$). The TEER of cell-free inserts ($90\text{--}100 \Omega \times \text{cm}^2$) was subtracted from the experimental values. The TEER of rat primary BEC monolayers in co-culture varied between 250 and $400 \Omega \times \text{cm}^2$, with a mean of $305 (\pm 4) \Omega \times \text{cm}^2$ ($\pm\text{SEM}$; $n = 72$ experiments from three separate isolations).

The flux of sodium fluorescein (SF) and Evans blue-labelled albumin (EBA) across endothelial cell monolayers was determined as previously described (Veszeka *et al.*, 2007). Cell culture inserts, following treatment and measurement of TEER, were transferred to 12-well plates containing 1.5 mL Ringer-HEPES solution (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 5.5 mM D-glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) in the basolateral compartments. In apical chambers, culture medium was replaced by 500 μL Ringer-HEPES containing $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SF (MW = 376 Da) and $165 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EBA (Evans blue bound to 0.1% BSA; MW = 67 kDa). The inserts were transferred at 20, 40 and 60 min to a new well containing Ringer-Hepes solution. To minimize any unstirred water layers during permeability experiments, a horizontal shaker (Biosan, Riga, Latvia) was used at 100 r.p.m. The concentrations of the marker molecules in samples from the upper and lower compartments were determined with a microplate reader (EBA: absorbance at 620 nm; SF: excitation at 440 nm, emission at 525 nm; BMG Fluostar Optima; BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Flux across cell-free inserts was also measured.

Transport was expressed as μL of donor (luminal) compartment volume from which the tracer is completely cleared. Transendothelial permeability coefficient (P_e) was calculated as previously described (Deli *et al.*, 2005; Veszeka *et al.*, 2007). Cleared volume was calculated from the concentration (C) of the tracer in the abluminal and luminal compartments and the volume (V) of the abluminal compartment (0.5 mL) by the following equation:

$$\text{Cleared volume } (\mu\text{L}) = \frac{C_{\text{abluminal}} \times V_{\text{abluminal}}}{C_{\text{luminal}}}$$

The average cleared volume was plotted against time, and permeability surface area product value for endothelial monolayer (PS_e) was calculated by the following formula:

$$\frac{1}{PS_{\text{endothelial}}} = \frac{1}{PS_{\text{total}}} - \frac{1}{PS_{\text{insert}}}$$

PS_e divided by the surface area (1 cm^2 for Transwell-12) generated the endothelial permeability coefficient in $10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Mean P_e was $1.58 \pm 0.26 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for SF and $0.15 \pm 0.07 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for EBA ($n = 6$; two separate experiments).

Immunohistochemistry

Confluent BEC monolayers cultured on fibronectin- and collagen-coated inserts and treated with AGs and mannitol (1.4 M) were stained for claudin-5 (an integral membrane tight junction protein) and the adherens junction protein, β -catenin. The cultures were washed in PBS and fixed with ethanol (95 vol.%)–acetic acid (5 vol.%) for 10 min at -20°C . Cells were blocked with 3% (BSA)-PBS and incubated overnight with primary antibodies anti-claudin-5 (mouse monoclonal antibody; Zymed, South San Francisco, CA, USA) and anti- β -catenin (rabbit polyclonal antibody). Incubation with secondary antibodies Alexa Fluor-488-labelled anti-mouse IgG (Invitrogen), Cy3-labelled anti-rabbit IgG, and Hoechst dye 33342 to stain cell nuclei lasted for 1 h. Between incubations, cells were washed three times with PBS. Membranes were mounted in Gel Mount (Biomedica, Foster City, CA, USA) and staining was examined by a Nikon Eclipse TE2000 fluorescent microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and photographed by a Spot RT digital camera (Diagnostic Instruments, Campbell, CA, USA).

Freeze-fracture electron microscopy

BECs grown on the fibronectin- and collagen-coated cell culture insert membrane were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 30 min at 4°C . After washing with cacodylate buffer several times, the membranes of the culture inserts were removed from their support and processed as previously described (Wolburg *et al.*, 1994). In brief, small rectangles of the filters were incubated in 30% glycerol for 30 min, placed between two gold specimen holders, shock frozen in nitrogen slush (-210°C), and fractured at -150°C and 5×10^{-6} mbar (1 bar = 105 Pa) (freeze-fracturing apparatus BAF 400 D; BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein). Fracture faces were immediately shadowed with platinum/carbon (2 nm, 45°) and carbon (20 nm, 90°) for stabilization. Replicas were cleaned with 12 % sodium hypochlorite, washed several times in double-distilled water and mounted on Pioloform-coated copper grids (Wacker Chemie, München, Germany). Replicas were analysed using a Zeiss EM10 electron microscope; electron micrographs were digitized and processed using Adobe Photoshop.

Analysis of claudin-5 trans-interaction

HEK293 cells stably transfected with murine claudin-5-yellow fluorescent protein (YFP) have been described previously (Piontek *et al.*, 2008). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin, 1% L-alanyl-L-glutamine (Invitrogen) and 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ G418 (Calbiochem, Darmstadt, Germany). To avoid clonal variations, pools containing different claudin-5-YFPs expressing and non-expressing colonies were used. Cells were plated on coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich), 2 days later incubated with HG and the subcellular localization of claudin-5-YFPs in living cells was analysed by confocal microscopy. The integrity of the

plasma membrane of cells during the experiments was visualized by Trypan blue exclusion (Piontek *et al.*, 2008).

Data analysis

All data presented are means $\pm$ SEM. Data of WST-1 tests were calculated from triplicates, while data of cell death ELISA were calculated from six parallel wells and confirmed in three experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test revealed statistically significant differences ($P < 0.05$) between treatment groups and NaCl-treated group. TEER data are from three independent experiments with triplicate samples. Statistical analysis was performed using two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post tests. The values measured in groups treated with PG, HG or mannitol were compared with the control value at each time point. Data of permeability for SF and EBA are from three independent experiments with triplicate samples. Statistical analysis was by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls tests. The values measured after PG or HG treatment were compared with the permeability in control group.

Materials

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), unless otherwise indicated. The short-chain AGs, 2-O-HG and 1-O-PG, were obtained from Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA). Both HG and PG are distributed in molecularly disperse form in aqueous solutions and do not form micelles in the applied concentrations (H. Eibl, personal communication.). To prepare isotonic stock solutions of AGs, 0.9% (w/v) NaCl solution and distilled water were used. Physiological osmolality was determined.

Results

Cell viability assay

Toxicity of PG and HG on primary rat BECs was examined *in vitro* at different time points (Figure 1). To evaluate direct acute, as well as long-term, effects of 5 min incubation with different AG concentrations, on the viability of the cells, the WST-1 test was performed after 45 min, 24 h and 72 h and 72 h. Untreated cells were used as negative control and values from

Figure 1

The effect of short-time AG treatment on primary rat BECs. Increasing concentrations of PG and HG were used to study the cytotoxic effects on BECs. (A) WST-1 assay 45 min and 24 h after a 5 min AG treatment. Untreated cells served as negative control, cells treated with 1% Tx-100 for 6 h as positive control. For comparison, cells were treated with 0.7 and 1.4 M mannitol (M). All values presented are the means $\pm$ SEM, $n = 3$ for all groups. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test revealed statistically significant decrease (a) between treatment groups and NaCl-treated group. (B) Apoptosis ELISA 60 min after a 5 min AG treatment. Untreated cells served as negative control, DNA-histone complex served as positive control. All values presented are the means $\pm$ SEM, $n = 6$ for all groups. * $P < 0.05$, significantly different from NaCl-treated group; one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

this control group were set to unity. The viability of cells treated with the detergent Tx-100 was drastically reduced, as expected. No toxic effect for PG or HG was detected up to 30 mM (Figure 1A). With higher concentrations of AGs, significant changes were measured both at 45 min ($P < 0.0001$, d.f. = 10, $F = 16.09$) and 24 h ($P < 0.0001$, d.f. = 10, $F = 25.42$) after the treatments (Figure 1A). PG at 60 mM concentration reduced viability significantly ($P < 0.01$) to about 23% of the control cells after 45 min, but endothelial cells were able to recover from this treatment within 24 h. Treatment with 60 mM HG resulted in a significant reduction ($P < 0.05$) of viability to 44% of the untreated cells after 45 min, but no recovery was seen within the next 24 h. The 5 min treatment period of the cells with 1.4 M mannitol did not lead to reduced viability. After 48 and 72 h, no further changes were observed, compared with the 24 h measurement (data not shown).

Assay for the induction of apoptosis

The induction of apoptosis after treatment of the cells with AGs was tested by an ELISA detecting cell death (Figure 1B). In addition to a positive control provided with the kit, staurosporin was used to induce apoptosis. Untreated cells served as negative control. No apoptosis could be detected in BECs treated with AGs (Figure 1B), while the positive controls differed significantly ($P < 0.001$) from the saline-treated negative control ($P < 0.0001$, d.f. = 11, $F = 522.3$). Similarly, treatment with AGs did not cause apoptosis in BECs after 24 h (data not shown).

Evaluation of barrier integrity: TEER and permeability measurements

To simulate the situation *in vivo*, i.e., AG treatment by a single bolus injection, the following experiments were performed, now using primary rat BECs co-cultured with glial cells, a relevant *in vitro* BBB model (Veszelka *et al.*, 2011). First, the direct and short-time effect of AGs on the ion flux through endothelial cell monolayers was analysed by TEER measurements (Figure 2). Only concentrations found non-toxic in the

viability experiments were used. TEER was quantified in untreated cells (negative control) and set to 100% at the beginning of the experiment (time -5 min). Cells were then incubated with different AGs for 5 min and further measurements were performed directly after removal of the test substance (0 min), as well as 10, 20 and 30 min after recovery in complete culture medium. Cells treated with 1.4 M mannitol served as positive controls. Significant changes in TEER were seen during the observation period both in PG-treated (column factor 79.26, $P < 0.0001$, d.f. = 3, $F = 52.79$; see Figure 2A) and HG-treated (column factor 97.71, $P < 0.0001$, d.f. = 3, $F = 105.9$; see Figure 2B) groups compared with the values measured in control group. Using 30 mM PG, TEER of BEC monolayers was reduced by 90% directly after termination of AG treatment (Figure 2A). After 10 min, TEER was 48% compared with untreated control suggesting recovery of the cells and the reversibility of the treatment with PG. The TEER of monolayers was further increased after 20 min of recovery. A lower 10 mM concentration of PG led to a 50% decrease of TEER directly after treatment and TEER also recovered over time. The effect of HG was also significant but less pronounced (Figure 2B). HG treatment at 30 and 10 mM concentrations resulted in TEER decrease by 58 and 29% compared with untreated cells measured directly after treatment. A complete recovery of barrier function was seen for both concentrations after 30 min. In contrast to these findings, TEER measured after 1.4 M mannitol treatment dropped below 25% of the control and remained there during the time frame of 30 min.

To complement TEER data, permeability of brain endothelial monolayers was measured with two test molecules, SF and EBA (Figure 3). Exposure of primary rat BECs to 30 mM PG or HG causing reversible changes in TEER, also led to a significantly increased flux of SF ($P = 0.0003$, d.f. = 3, $F = 21.86$ in case of PG, and $P = 0.0014$, d.f. = 3, $F = 14.24$ in case of HG; Figure 3A and B). After a recovery period of 15 min, permeability, values returned to the level of the control group again. In contrast to the results with the low MW SF (MW 376 Da), no significant increase in albumin (MW 67 kDa) permeability was observed in cell monolayers after treatment with

Figure 2

Changes in TEER were evaluated in primary rat brain endothelial cell monolayers treated with 10 and 30 mM PG (A), 10 and 30 mM HG (B), and mannitol (1.4 M) for 5 min. TEER was measured before treatment, directly after removal of AGs and mannitol (0 min), and following 10, 20 and 30 min of recovery in complete culture medium. All values presented are means $\pm$ SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from control group, at each time point; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post test.

Figure 3

Changes in endothelial permeability (P_e) for the paracellular permeability marker SF (A, B) and the transendothelial permeability marker EBA (C, D) in primary rat brain endothelial cell monolayers treated with 30 mM of PG (A–C) or HG (B–D) for 5 min (acute effect). After removal of AGs, 15 and 30 min recovery was allowed in complete culture medium. P_e was calculated as described. Data are shown as percentage of control (means $\pm$ SEM; $n = 3$). * $P < 0.05$, significantly different from control group, † $P < 0.05$, significantly different from acute values; one-way ANOVA followed by Neuman–Keuls test.

30 mM HG ($P = 0.2070$, d.f. = 3, $F = 1.907$) or 30 mM PG ($P = 0.3235$, d.f. = 3, $F = 1.356$) (Figure 3C and D).

Immunohistochemistry for junctional proteins

Parallel to changes in barrier function, immunostaining for endothelium-specific integral fragmentation, cytoplasmic redistribution, and loss of both claudin-5 and β -catenin staining from the cell borders of primary rat BECs were visible directly after short-term PG, HG or mannitol treatment (Figure 4). After a recovery period of 15 or 30 min following HG or PG treatment, however, cells showed more prominent and clear immunostaining at the cell contacts compared with cells examined directly after treatment. In addition, a change in the shape of BECs after HG or mannitol exposure could be seen. Mannitol treatment caused monolayer disruption, holes became visible between BECs. In cells treated with hyperosmotic mannitol, perinuclear localization of β -catenin was also detectable.

Freeze-fracture electron microscopy of tight junction morphology

To investigate tight junction morphology and strand complexity, transmission electron microscopy was performed on

freeze-fracture replicas from rat BECs of *in vitro* experiments fixed directly after incubation with 30 mM HG or 30 mM PG for 5 min or after a recovery period of 30 min (Figure 5). Untreated cells served as a control. The P-face/E-face ratio of tight junction strands was tested, which describes the relationship between the association of tight junction strands with the protoplasmic (P-face) and the external fracture face (E-face). The P-face/E-face ratio of tight junction strands has been suggested to be an important parameter for the functional quality of the barrier (Wolburg *et al.*, 1994). Due to *cis*-interaction, claudin-5 monomers form oligomers in one membrane. *Trans*-interaction triggers the formation of polymeric discontinuous strands. During freeze fracturing, the claudin-5 oligomers slide out of the P-face and are seen on the exoplasmic E-face of the membrane as lines of particles. The number of P-face-associated tight junction particles was so low that it is difficult to recognize the tight junction network at the P-face (Figure 5). In contrast, at the E-face the tight junctions appear as pearl chain-like strands and are easily detectable. In our *in vitro* experiments, no changes in P-face/E-face association of the proteins in the fractures could be observed. In addition, no alterations of strand complexity between AG-treated and untreated control cells could be found (Figure 5).

β-catenin staining

Claudin-5 staining

Figure 4

Effect of AGs (30 mM) and mannitol (1.4 M) on immunostaining for claudin-5 and β-catenin junctional proteins in primary rat brain endothelial cells. Asterisks show holes formed between endothelial cells. Arrows indicate fragmentation, loss of junctional immunostaining, and cytoplasmic redistribution. Bar: 25 μm.

Analysis of claudin-5 trans-interaction

Finally, to further analyse the direct effect of AGs on claudin-5, which seals the intercellular cleft between adjacent cells by claudin-claudin *trans*-interaction, HEK293 cells stably transfected with YFP C-terminally tagged claudin-5 were treated with HG. In untreated cells, the claudins are mainly found in the plasma membrane between two transfected cells and the extracellular loops of the claudin molecules of the cell interact with those claudin loops of opposing cells by *trans*-interaction (Piontek *et al.*, 2008). This is reflected by a

strong enrichment of YFP at contacts between two claudin-5-YFP-expressing cells (Figure 6A). Treatment of these claudin-5-expressing HEK cells with 20 mM HG or 50 mM HG for 15 min had no visible effect on the YFP enrichment at cell-cell contacts, indicating no effect on claudin-5 *trans*-interaction (Figure 6B and C). Incubation with 100 mM HG for 15 min resulted in redistribution of claudin-5 (Figure 6D). The protein was not strongly enriched at contacts between two claudin-expressing cells but rather homogenously distributed throughout the plasma membrane. In addition,

Figure 5

Freeze-fracture analysis of the complexity and morphology of tight junction strands. Freeze-fracture replicas were prepared from cultured brain endothelial cells after PG or HG treatment. In all replicas tested, the tight junction strands were highly associated with the external fracture face (EF), only few particles were observed at the protoplasmic face (PF). Arrows point to EF or PF strands. Bar: 0.2 μm .

more claudin-5 was found in intracellular compartments (Figure 6D and E). However, this HG concentration caused leakage of the plasma membrane resulting in the entry of Trypan blue (red fluorescence in the cell cytoplasm; Figure 6D and E). It should be noted that the cellular response to HG was heterogeneous, as some cells with leakage of the plasma membrane and enrichment of claudin-5 were also found after incubation with high HG concentration (Figure 6E).

Discussion and conclusions

There are several different possible applications for AG-mediated BBB opening to increase the passage of drugs into the brain, including the treatment of primary brain tumours and the increasing number of cases with brain metastases. In this work, BBB opening and the reaction of BECs to AG exposure were studied in an *in vitro* model. *In vivo*,

PG and HG concentrations between 50 and 200 mM were used to open the BBB of rats and mice. The AGs were given as a single bolus injection into the internal carotid artery of rats and mice over 12–18 s, whereas the common carotid artery was clamped during the injection. In this system, opening of the BBB was dependent on the concentration of AG (Erdlenbruch *et al.*, 2000; 2003b), but it is not possible to predict the exact concentration and residence time of AG in brain capillaries. The primary cell co-culture BBB model (Veszelka *et al.*, 2007; 2011) was suitable to study the opening of the endothelial barrier with AGs *in vitro*. In contrast to the *in vivo* situation where the actual AG concentration needed for the barrier opening in an individual capillary is not known, in cultures every cell is exposed to the same AG concentration for the same time and detailed measurements under definite conditions can be performed. Compared with the initial *in vivo* conditions, the AG concentrations used *in vitro* were reduced from 50–100 mM to 10–30 mM, based on

Figure 6

Analysis of claudin-claudin *trans*-interactions in HEK293 cells stably transfected with claudin 5-YFP (shown in green) by confocal fluorescence microscopy. Untreated cells show claudin-5 *trans*-interaction indicated by a strong enrichment of YFP at contacts between two claudin-5-YFP-expressing cells (A). 15 min treatment with 20 mM or 50 mM HG has no effect on claudin-5 *trans*-interaction (B + C). After 15 min treatment with 100 mM HG some cell pairs show loss of claudin-5 *trans*-interaction indicated by loss of contact enrichment (D) while other cell pairs still show contact enrichment (E). This high concentration causes damage to the plasma membrane of the cells, visible through Trypan blue (red fluorescence) entering the cells (D + E). Bar: 5 μ m.

the results of the viability experiments and incubation time was increased from 18 s injection time to about 4.5 min. The permeability findings in this model are comparable to those of the *in vivo* experiments (Erdlenbruch *et al.*, 2005).

AG-mediated opening of the BBB was reflected by a decrease of TEER values. Comparable to the *in vivo* situation (Erdlenbruch *et al.*, 2003b), permeability of PG-treated BECs returned to control level after 15 min. PG treatment reduced

the TEER value of endothelial monolayers more effectively than HG treatment in the same concentration range. TEER decrease after treatment with AGs indicates that the paracellular diffusion barrier sealed by tight junctions was opened (Madara, 1998). The paracellular permeation is mainly restricted by integral membrane tight junction proteins, especially members of the claudin family (Krause *et al.*, 2008). They regulate the physiological paracellular permeability of ions and molecules smaller than 4 Å (Anderson and Van Itallie, 2009). In agreement with our present data, a decrease in TEER could also be observed after mannitol treatment in previous studies (Greenwood *et al.*, 1988; Farkas *et al.*, 2005).

Fluorescein is a small, water-soluble molecule; therefore, the increased passage of this dye across BEC monolayers after exposure of the cells to AGs indicates an opened paracellular pathway through tight junctions, similar to the changes in TEER. This is in agreement with the results from Erdlenbruch *et al.* (2003a). They incubated freshly isolated brain capillaries with AGs and fluorescein and observed fluorescein entering the lumen of the capillaries paracellularly. As observed for the TEER changes, the increased permeability for fluorescein was reversible.

In contrast to fluorescein, treatment with AGs did not result in statistically significant increase in albumin permeability in BECs despite a trend of elevation in albumin flux. Albumin passage is transcellular and is at a very low level at the BBB in physiological conditions *in vivo* (Abbott *et al.*, 2006). In pathological conditions, transport via this route is increased several fold, which can be independent from the opening of the paracellular pathway. A selective increase of vesicular albumin transport was demonstrated in cultured BECs during hypoxia (Plateel *et al.*, 1997). The paracellular pathway through intact tight junctions can also be opened for high MW compounds of the size of albumin (Artursson *et al.*, 1993; Knipp *et al.*, 1997). Changes in TEER, fluorescein and albumin flux all indicate that the major mechanism of the opening of the BBB by AGs could be a selective effect on the paracellular cleft and tight junctions between BECs. In addition to the observed functional alterations, immunostaining for claudin-5 and β -catenin in primary BECs also showed that junctions between the cells were affected after AG treatment. All these findings are in agreement with the data of Erdlenbruch *et al.* (2003a) who postulated that AGs increase mainly the paracellular route at the BBB.

The paracellular pathway can be altered by cytoskeletal disruption (Bruewer *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2005) and the tightness of tight junctions seems to be controlled by cytoskeletal dynamics (Lai *et al.*, 2005; Hartsock and Nelson, 2008). β -Catenin is an adherens junction protein, linking the integral membrane junctional proteins to the cytoskeleton (Noda *et al.*, 2010). The observed changes in the shape of BECs after AG exposure might be an indication for the involvement of actin-junctional anchoring in the mechanism of AGs.

Bearing this observation and possible cytoskeletal changes in mind, it was possible that AGs altered the morphology or complexity of tight junction strands leading to increased paracellular permeability. Tight junction strands are crucial in the regulation of the paracellular route in BECs (Wolburg *et al.*, 1994; Rubin and Staddon, 1999). Wolburg *et al.* (1994) described that a higher amount of P-face-

associated tight junction strands can be observed in BECs as compared with non-BECs, and 16–24 h of cultivation led to a massive loss of P-face association of these tight junction strands. This was interpreted as the ability of the brain microenvironment to induce and maintain a high P-face association of tight junction strands. In order to imitate the brain microenvironment, endothelial cells were treated with forskolin for 2 days, which resulted in an increase of P-face association and complexity of tight junctions (Wolburg *et al.*, 1994). In the present study, cell cultures were treated with AGs for only 5 min, but this very brief treatment caused a significant change in paracellular permeability measured by functional assays. In contrast, junction morphology, including both complexity and E/P-face association of the tight junctions, between control and AG-treated BECs, was not altered. In the control and in the treated samples, at the E-face, the tight junctions appeared as pearl chain-like strands. According to our results, the functional changes elicited by AGs were not accompanied by structural alterations on the electron microscopic level. Therefore, the frequently asked question whether or not functional changes of the barrier would always go in parallel with strand alterations must be answered, at least under *in vitro* conditions, with 'no'. This finding is supported by a recent observation that regulation of the barrier permeability can not only be achieved by structural rearrangement of the tight junction strands but it can occur without any morphologically visible changes (Piehl *et al.*, 2010). Tight junctions are able to change functionally very quickly through phosphorylation. Reduced permeability can be seen as soon as 10 min after cAMP treatment in cultured BECs (Deli *et al.*, 1995) and turnover of tight junction proteins is also rapid, for example, the membrane half-life of claudin-5 is 33 s (Piontek *et al.*, 2011).

Claudin-5 is a major tight junction protein in BECs, closing the intercellular cleft by interaction of its extracellular loops with the corresponding loops of claudins of the adjacent endothelial cell (see Krause *et al.*, 2009). HEK293 cells expressing fluorescent claudin-5 show homophilic claudin *trans*-interaction by cell-contact enrichment independent of ZO-1 or cytoskeleton anchorage (Piontek *et al.*, 2008). The direct influence of AGs on such claudin *trans*-interactions was tested on this model. We found that the *trans*-interaction of claudin-5 was unchanged by HG in non-toxic concentrations used for functional tests of paracellular permeability. Only the highest concentration of HG modified the membrane localization and *trans*-interaction of claudin-5 which at the same time led to membrane destruction and was also toxic in other tests. This indicates that the effects of AGs on the plasma membrane of cells may be greater than direct effects on claudin-5 *trans*-interaction. In BECs treated with AGs, the intensity of immunostaining for claudin-5 decreased at the cell borders but increased in the cytoplasm, indicating a redistribution of the tight junction protein. These data demonstrate that claudin interactions might not be affected directly by AGs, and some other mechanisms involving cytoskeleton anchorage of claudins could mediate the effect.

Biologically active lipids, like the arachidonic acid metabolite prostanoids and leukotrienes, influence BBB permeability. Recently, a prostanoid EP₁ receptor antagonist was shown to prevent BBB leakage after cerebral ischaemia (Fukumoto *et al.*, 2010). Although this field is experimentally

unexplored, the effect of short-chain AGs on the BBB via lipid receptors cannot be ruled out. Modification of lipid composition and/or fluidity of rafts containing integral membrane tight junction proteins (Dodelet-Devillers *et al.*, 2009) could be another way for AGs to selectively modify the tight junctions of brain endothelial cell monolayers. Further investigations are needed to elucidate which molecules are involved in the opening of the paracellular transport route by AGs.

Taken together, the results of our study demonstrated, for the first time, that a brief treatment of cultured BECs with short-chain AGs at non-toxic concentrations reversibly opens the paracellular barrier without long-lasting impairment. The increase in the penetration rate of water-soluble molecules across BECs was not accompanied by changes in tight junction strand complexity. These *in vitro* observations demonstrate that recovery of the monolayer integrity after AG treatment is possible and exposure to AGs does not lead to destruction of BBB functions and morphology. The study confirms the results of previous *in vivo* experiments on rats and mice and suggests that the properties of AGs may be suitable for opening the BBB to treat brain malignancies.

Acknowledgements

We thank Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) for providing 2-O-hexyldiglycerol and 1-O-pentylglycerol (Lipo-Bridge). This work was supported by a bilateral travel grant from the DFG (436 UNG 113/194/0-1) and the Hungarian National Research and Technology Office (TÉT DE-1/2007), and a grant from the DFG (HU1897/1-1).

Conflict of interest

There is no conflict of interest for any of the authors.

References

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53.
- Anderson JM, Van Itallie CM (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a002584.
- Artursson P, Ungell AL, Löfroth JE (1993). Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res* 10: 1123–1129.
- Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E *et al.* (2006). On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 505–514.
- Bruewer M, Hopkins AM, Hobert ME, Nusrat A, Madara JL (2004). RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C327–C335.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121: 2115–2122.
- Deli MA (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 1788: 892–910.
- Deli MA (2011). Drug transport and the blood-brain barrier. In: Tihanyi K, Vastag M (eds). *Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates*. Washington: Bentham Science Publ. Ltd., pp. 144–165.
- Deli MA, Dehouck MP, Ábrahám CS, Cecchelli R, Joó F (1995). Penetration of small molecular weight substances through cultured bovine brain capillary endothelial cell monolayers: the early effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Exp Physiol* 80: 675–678.
- Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M (2005). Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 25: 59–127.
- Demeule M, Regina A, Che C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R *et al.* (2008). Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 1064–1072.
- Dhanikula RS, Argaw A, Bouchard JF, Hildgen P (2008). Methotrexate loaded polyether-copolyester dendrimers for the treatment of gliomas: enhanced efficacy and intratumoral transport capability. *Mol Pharm* 5: 105–116.
- Dodelet-Devillers A, Cayrol R, van Horssen J, Haqqani AS, de Vries HE, Engelhardt B *et al.* (2009). Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J Mol Med (Berl)* 87: 765–774.
- Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, Siegal T, Jerome E, Osztie E *et al.* (2000). Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer* 88: 637–647.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Eibl H, Lakomek M (2000). Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. *Exp Brain Res* 135: 417–422.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Kugler W, Eibl H, Lakomek M (2002). Increased delivery of erucylphosphocholine to C6 gliomas by chemical opening of the blood-brain barrier using intracarotid pentyglycerol in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 50: 299–304.
- Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H *et al.* (2003a). Opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma bearing rats and isolated capillaries using intracarotid short chain alkylglycerols. *Br J Pharmacol* 140: 1201–1210.
- Erdlenbruch B, Schinkhof C, Kugler W, Heinemann DEH, Herms J, Eibl H *et al.* (2003b). Intraarterial short chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *Br J Pharmacol* 139: 685–694.
- Erdlenbruch B, Kugler W, Schinkhof C, Neurath H, Eibl H, Lakomek M (2005). Blood-brain barrier opening with alkylglycerols: biodistribution of 1-O-pentylglycerol after intravenous and intracarotid administration in rats. *J Drug Target* 13: 143–150.
- Farkas A, Szatmári E, Orbók A, Wilhelm I, Wejksza K, Nagyósi P *et al.* (2005). Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 80: 855–861.
- Fellner F, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhänel M, Spruß T *et al.* (2002). Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 110: 1309–1318.

- Fukumoto K, Takagi N, Yamamoto R, Moriyama Y, Takeo S, Tanonaka K (2010). Prostanoid EP1 receptor antagonist reduces blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 640: 82–86.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143: 391–401.
- Golden PL, Pollack GM (2003). Blood-brain barrier efflux transport. *J Pharm Sci* 92: 1739–1753.
- Greenwood J, Luthert PJ, Pratt OE, Lantos PL (1988). Hyperosmolar opening of the blood-brain barrier in the energy-depleted rat brain. Part 1. Permeability studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 9–15.
- Hartsock A, Nelson WJ (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778: 660–669.
- Hülper P, Dullin C, Kugler W, Lakomek M, Erdlenbruch B (2011). Monitoring proteins using in vivo near-infrared time-domain optical imaging after 2-O-hexyldiglycerol-mediated transfer to the brain. *Mol Imaging Biol* 13: 275–283.
- Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A, Parkos CA (2005). Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 16: 2636–2650.
- Kemper EM, Boogerd W, Thuis E, Beijnen JH, van Tellingen O (2004). Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumors. *Cancer Treat Rev* 30: 415–423.
- Knipp GT, Ho NF, Barsuhn CL, Borchardt RT (1997). Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci* 86: 1105–1110.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778: 631–645.
- Krause G, Winkler L, Piehl C, Blasig I, Piontek J, Müller SL (2009). Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann N Y Acad Sci* 1165: 34–43.
- Lai CH, Kuo KH, Leo JM (2005). Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Res Brain Res Rev* 50: 7–13.
- Madara JL (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60: 143–159.
- Neuwelt EA, Barnett PA, McCormick CI, Frenkel EP, Minna JD (1985). Osmotic blood-brain barrier modification: monoclonal antibody, albumin, and methotrexate delivery to cerebrospinal fluid and brain. *Neurosurgery* 17: 419–423.
- Noda K, Zhang J, Fukuhara S, Kunimoto S, Yoshimura M, Mochizuki N (2010). Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21: 584–596.
- O'Brien FE, Clarke G, Fitzgerald P, Dinan TG, Griffin BT, Cryan JF (2012). Inhibition of P-glycoprotein enhances transport of imipramine across the blood–brain barrier: microdialysis studies in conscious freely moving rats. *Br J Pharmacol* 166: 1333–1343.
- Pardridge WM (2002). Drug and gene targeting to brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1: 131–139.
- Perrière N, Demeuse PH, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP *et al.* (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem* 93: 279–289.
- Piehl C, Piontek J, Cording J, Wolburg H, Blasig IE (2010). Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell Mol Life Sci* 67: 2131–2140.
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C *et al.* (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 22: 146–158.
- Piontek J, Fritzsche S, Cording JD, Richter S, Hartwig J, Walter M *et al.* (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci* 68: 3903–3918.
- Plateel M, Teissier E, Cecchelli R (1997). Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* 68: 874–877.
- Rapoport SI (2000). Osmotic opening of the blood–brain barrier: principles, mechanisms, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol* 20: 217–230.
- Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD (2006). Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol* 24: 1253–1265.
- Reese TS, Karnovsky MJ (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34: 207–217.
- Rubin LL, Staddon JM (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22: 11–28.
- Siegal T, Rubinstein R, Bokstein F, Schwartz A, Lossos A, Shalom E *et al.* (2000). In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood – brain barrier disruption in humans. *J Neurosurg* 92: 599–605.
- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviaro F, Pirazzoli V *et al.* (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 10: 923–934.
- Unger C, Eibl H, von Heyden HW, Kirsch B, Nagel GA (1985). Blut-Hirn-Schranke und Penetration von Zytostatika. *Klin Wochenschr* 63: 565–571.
- Veszeka S, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Ngo TK, Niwa M *et al.* (2007). Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int* 50: 219–228.
- Veszeka S, Kittel A, Deli MA (2011). Tools of modelling blood-brain barrier penetrability. In: Tihanyi K, Vastag M (eds). *Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates*. Washington: Bentham Science Publ. Ltd., pp. 144–165.
- van Vliet EA, Zibell G, Pekcec A, Schlichtiger J, Edelbroek PM, Holtman L *et al.* (2010). COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology* 58: 404–412.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Öcalan M (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107: 1347–1357.

II. Publikáció

ORIGINAL
ARTICLETesmilifene modifies brain endothelial functions
and opens the blood–brain/blood–glioma barrier

Fruzsina R. Walter,* Szilvia Veszélka,* Mária Pásztói,*† Zoltán A. Péterfi,‡
András Tóth,§ Gábor Rákhely,§ László Cervenak,¶ Csongor S. Ábrahám*
and Mária A. Deli*

*Group of Biological Barriers, Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian
Academy of Sciences, Szeged, Hungary

†Experimental Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

‡Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary

§Faculty of Science and Informatics, Department of Biotechnology, University of Szeged, Szeged, Hungary

¶Research Laboratory, 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Abstract

Tesmilifene, a tamoxifen analog with antihistamine action, has chemopotentiating properties in experimental and clinical cancer studies. In our previous works, tesmilifene increased the permeability of the blood–brain barrier (BBB) in animal and culture models. Our aim was to investigate the effects of tesmilifene on brain microvessel permeability in the rat RG2 glioma model and to reveal its mode of action in brain endothelial cells. Tesmilifene significantly increased fluorescein extravasation in the glioma. Short-term treatment with tesmilifene reduced the resistance and increased the permeability for marker molecules in a rat triple co-culture BBB model. Tesmilifene also affected the barrier integrity in brain endothelial cells co-cultured with RG2 glioblastoma cells. Tesmilifene inhibited

the activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-1 efflux pumps and down-regulated the mRNA expression of tight junction proteins, efflux pumps, solute carriers, and metabolic enzymes important for BBB functions. Among the possible signaling pathways that regulate BBB permeability, tesmilifene activated the early nuclear translocation of NFκB. The MAPK/ERK and PI3K/Akt kinase pathways were also involved. We demonstrate for the first time that tesmilifene increases permeability marker molecule extravasation in glioma and inhibits efflux pump activity in brain endothelial cells, which may have therapeutic relevance.

Keywords: blood–brain barrier, brain endothelial cells, glioma, permeability, tesmilifene, tight junctions.

J. Neurochem. (2015) 10.1111/jnc.13207

The estrogen receptor antagonist tamoxifen has been successfully used for breast cancer treatment since the 1970s (Jordan 2014). While searching for novel agents in tumor therapy, Brandes *et al.* identified a new molecule, *N,N*-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)-phenoxy]ethanamine HCl (tesmilifene), specific to microsomal antiestrogen binding sites, but not to the estrogen receptor (Brandes and Hermonat 1984). Tesmilifene acts *via* several receptors and signaling pathways: its affinity and relation to estradiol receptor was proved *in vivo* (Brandes and Hogg 1990), it is a histamine antagonist (Kroeger and Brandes 1985; László *et al.* 2001), it prevents protein kinase C- and phorbol ester-induced platelet aggregation (Brandes *et al.* 1988), and most importantly it confers cytotoxic effects to tumor cells *in vitro* (Brandes and Hermonat 1984). Tesmilifene, in combination with chemotherapeutics, potentiates cytotoxicity to malignant cells (Brandes *et al.* 1991). It was found to be beneficial in several clinical studies including

Received April 22, 2015; revised manuscript received June 16, 2015; accepted June 17, 2015.

Address correspondence and reprint requests to Dr Mária A. Deli, Group of Biological Barriers, Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Temesvári krt. 62, H-6726 Szeged, Hungary. E-mail: deli.maria@brc.mta.hu

Abbreviations used: BBB, blood–brain barrier; Bcrp, breast cancer-resistant protein; CNS, central nervous system; DAF-FM diacetate, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; Ea, excitatory amino acid transporter; EBA, Evans blue-labeled albumin; FBS, fetal bovine serum; GS-B, glutathione bimeane; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; LPS, lipopolysaccharide; MAPK/ERK, mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway; Mrp, multidrug resistance associated protein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NFκB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NO, nitric oxide; Oatp, organic anion-transporting polypeptide; Pgp, P-glycoprotein; PI3K/Akt, phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway; SF, sodium fluorescein; TEER, transendothelial electrical resistance; ZO-1, zonula occludens protein-1.

the treatment of patients suffering from refractory cancer of various origins (Brandes *et al.* 1994), unresponsive prostate cancer (Raghavan *et al.* 2005), and metastatic breast cancer (Reyno *et al.* 2004). Although combined treatment with tesmilifene influenced short-term quality of life after administration, several studies suggested the significance of overall longer survival rate (Reyno *et al.* 2004; Liu *et al.* 2006).

During tesmilifene treatment in combination with anthracyclines, neurological side-effects were registered including mild visual/auditory hallucinations, nausea, vomiting, motion sickness, dizziness, and ataxia (Reyno *et al.* 2004; Raghavan *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006). Since brain tumor therapy involving the disruption of the blood-brain barrier (BBB) with hyperosmotic mannitol resulted in similar central nervous system (CNS) side-effects (Neuwelt *et al.* 1991; Doolittle *et al.* 2000), tesmilifene was hypothesized to have effects on the BBB. Indeed, our group described that tesmilifene increased BBB permeability in rats (Deli *et al.* 2000), and on a culture model of the BBB (Deli *et al.* 2003), but effects on other BBB functions and the mode of action were not yet studied.

The BBB is the main regulator of drug transport to the CNS. The majority of medicines and potential neuropharmaceuticals do not penetrate the BBB. Hydrophilic molecules, substances bigger than 400–500 Da, or ligands of efflux transporters do not cross the BBB (Abbott *et al.* 2010). Specific features of the BBB, especially low paracellular permeability due to tight junctions and efflux, and transport systems are responsible for the low brain transport of antineoplastic agents, resulting in a poor response rate even of chemosensitive brain tumors (On and Miller 2014). New methods and drugs to enhance the penetration of chemotherapeutics to brain tumors might have high therapeutic potential. At present, surgery and radiotherapy in combination with chemotherapy do not provide an effective treatment of gliomas. There is a need for new adjuvants which may increase the therapeutic efficacy of chemotherapeutics in this disease (Muldoon *et al.* 2007; Parrish *et al.* 2015).

Since tesmilifene is an effective adjuvant in peripheral tumor therapy and increases BBB permeability, our aim was to investigate its effect on brain microvessel permeability in a rat glioma model and its mode of action in cultured rat brain endothelial cells. Tesmilifene-induced changes on cellular toxicity, transendothelial electrical resistance, transendothelial permeability, and the functional activity of multidrug resistance proteins were determined and several hypothesized mechanisms of action were tested.

Methods

Animals

Animal studies were performed following the regulations of the 1998. XXVIII. Hungarian law and the EU Directive 2010/63/EU about animal protection and welfare. Approval for animal studies was obtained from the local animal health authority, the Governmental Office for Csongrád County, Directorate of Food Chain Safety and

Animal Health (Permit numbers: XVI./03835/001/2006, XVI./834/2012). For the *in vivo* experiments 3-month-old outbred Wistar rats of both sexes (Harlan Laboratories, United Kingdom, body weight: 361.34 ± 10.70 g; $n = 24$) were used. For *in vitro* primary cell isolations, brain tissues were obtained from 3-week-old and newborn Wistar rats of both sexes. Animals were fed on standard rodent chow and water *ad libitum* and kept under a 12 h light/dark cycle in the conventional animal house of the Biological Research Centre, Szeged. During the experiments, all efforts were made to minimize animal suffering and pain.

Materials

Drugs and chemicals used in the study were purchased from Sigma-Aldrich Ltd., Hungary, except for those specifically mentioned. Tesmilifene (HCl salt, mw: 319.9 Da) was synthesized as described previously (Brandes and Hermonat 1984).

Glioma implantation and dye extravasation measurements

Effects of tesmilifene on the microvessel permeability in healthy brain and glioma tissue were investigated in 3-month-old sham operated ($n = 12$) or glioma implanted ($n = 12$) Wistar rats. The implantation procedure of RG2 rat glioblastoma cells was performed based on a previous method (Aas *et al.* 1995). Rats were anesthetized (100 mg/kg ketamine and 8 mg/kg xylazine, ip.) and placed into a stereotaxic unit (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). After the disinfection of the operational site, a hole was drilled through the cranium 3 mm lateral and 1 mm anterior to the bregma on the right side of the skull (Erdlenbruch *et al.* 2003). For sham-operated animals, 5 μ L of saline solution, for glioma implantation 10^5 RG2 cells/5 μ L buffer was injected slowly 5 mm deep from the dura using a Hamilton glass syringe (Hamilton, CA, USA). After the operation, the rats were observed for general health conditions and well-being. Two weeks after the implantation extravasation of permeability markers, sodium fluorescein (SF, 376 Da), and Evans blue-labeled albumin (EBA, 67 kDa) was tested (Deli *et al.* 2000). Half of the sham operated ($n = 6$) and the glioma implanted ($n = 6$) groups received a slow intravenous injection of 5 mg/kg tesmilifene before the permeability experiments. Vehicle-treated animals (control group) received the same amount of saline. Two hours later, all animals were given a 2% solution of both marker dyes intravenously. After 30 min, following a brief cardiac perfusion with saline in deep anesthesia (sodium pentobarbital, 50 mg/kg), tissue samples from cerebellum, midbrain, left and right cortex, and implantation site on the right cortex were collected, weighed, and stored frozen at -20°C . For measurement of dye concentrations, the brain samples were homogenized in 15% trichloroacetic acid and centrifuged with 10 000 g for 10 min at 4°C . Concentration of the tracers from supernatants was measured using a PTI spectrofluorometer (Photon Technology International Inc., Edison, NJ, USA). The absorbency of EBA was determined at 620 nm, the emission of fluorescein was measured at 525 nm after excitation at 440 nm. Extravasation was calculated as ng tracer per mg brain tissue.

Cell culture

RG2 glioblastoma cell line

Glioblastoma tumor cell line RG2 was purchased from ATCC (American Tissue Culture Collection, Manassas, VA, USA). RG2

cells were kept in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and 50 µg/mL gentamycin. For brain endothelial barrier integrity tests RG2 cells were passaged to 12-well plates (Corning Costar, Corning, New York, NY, USA) and grown until confluency. In all culture conditions, plastic surfaces were coated with rat tail collagen.

Preparation of primary cultures

Primary rat brain endothelial cells, pericytes, and astroglia cells were isolated and cultured according to the method described in our previous studies (Nakagawa *et al.* 2009; Hülper *et al.* 2013). Brain endothelial cells were placed on surfaces coated with collagen type IV (100 µg/mL) and fibronectin (100 µg/mL). Endothelial cell culture medium consisted of DMEM/F12, plasma-derived bovine serum (15%; First Link, Wolverhampton, UK), heparin (100 µg/mL), insulin (5 µg/mL), transferrin (5 µg/mL), sodium selenite (5 ng/mL), basic fibroblast growth factor (1 ng/mL; Roche, Basel, Switzerland), and gentamycin (50 µg/mL). In the first 3 days, the cell culture medium contained puromycin (4 µg/mL) to eliminate contaminating cell types (Perrière *et al.* 2005). When endothelial cultures reached 90% confluency, cells were passaged using trypsin (0.05% wt/vol) – EDTA (0.02% wt/vol) for experiments. Primary rat brain pericytes were isolated by the same method, but pericytes were plated onto uncoated dishes after isolation, and their culture medium consisted of low-glucose DMEM (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with FBS (10%, Pan Biotech) and antibiotics without puromycin. Pericytes were used at passage number three. Primary cultures of rat glial cells were obtained from one-day-old Wistar rats (Hülper *et al.* 2013). Mechanically dissociated cell clusters were plated onto poly-L-lysine coated 12-well dishes in DME containing FBS (10%, Lonza, Basel, Switzerland) and gentamycin (50 µg/mL) and were cultured for 2 weeks before co-culture experiments.

Establishment of co-cultures

To induce BBB characteristics primary rat brain endothelial cells were co-cultured with primary brain pericytes and glial cells on 12-well tissue culture inserts (Transwell, polyester membrane, 0.4 µm pore size, Corning Costar) (for protocol, see: Nakagawa *et al.* 2009). After 2 days of co-culture, brain endothelial cells became confluent and 550 nM hydrocortisone was added to the culture medium to tighten junctions (Deli *et al.* 2005; Hülper *et al.* 2013).

Tesmilifene was also evaluated on brain endothelial monolayers in double co-cultures either with primary glial cells or with RG2 cells. The same type of Transwell inserts were used as for the triple culture model.

Treatments

All treatments on primary brain endothelial cells were performed in endothelial culture medium for a maximum of 24 h treatment period. Agents were used in the following concentrations: tesmilifene (0–200 µM), LY294002 (0.1–1 µM), U0126 (0.01–1 µM), β-estradiol (0.1–1 µM). In the toxicity assay, 1 mg/ml Triton X-100, in permeability assay 25 µM chlorophenylthio-cAMP and 1 µM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), a phosphodiesterase inhibitor, in the efflux pump activity measurement assay probenecid (100 nM), cyclosporine A (1.6 µM), verapamil (100 µM) and in the nuclear

factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) early nuclear translocation assay bacterial lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/mL) were applied. Stock solutions of tesmilifene, chlorophenylthio-cAMP and LPS were prepared in sterile distilled water. LY294002, U0126, β-estradiol, IBMX were dissolved in dimethyl sulfoxide. Probenecid stock solution was made in 1 M NaOH, and verapamil and cyclosporine A were dissolved in ethanol.

Cell viability assays

Impedance measurement

Kinetics of the viability of primary rat brain endothelial cells was monitored by a real-time impedance measurement (RTCA-SP, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). Impedance correlates linearly with cell number, adherence, growth and viability (Kiss *et al.* 2013). Brain endothelial cells (5×10^3 cells/well) were grown on golden electrodes of 96-well E-plates (ACEA Biosciences) in the CO₂ incubator at 37°C for 4 days and treated at the beginning of the plateau growth phase with 1–200 µM tesmilifene or with 100 µM concentration of tesmilifene in combination with LY294002 (0.1–1 µM), U0126 (0.01–1 µM), and β-estradiol (0.1–1 µM). Triton X-100 detergent was used to determine 100% toxicity. Effects of treatments were followed for 24 h.

MTT assay

To assess the metabolic activity, cellular reduction of the yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye to formazan crystals was used (Kiss *et al.* 2013). Confluent cultures of brain endothelial cells in 96-well plates (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) were treated with 1–200 µM tesmilifene or Triton X-100 for 24 h, then MTT solution (0.5 mg/mL) was added to the wells for 3 h at 37°C. Formazan produced by living cells was dissolved in dimethyl sulfoxide. Absorbance was detected by a multiwell plate reader at 570 nm (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Ortenberg, Germany).

Double nucleus staining

Nuclear staining indicating viability or cell death was performed using bis-benzimide (Hoechst dye 33342) labeling the nuclei of all cells and ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) labeling only dead cells (Kiss *et al.* 2013). Brain endothelial cells grown on collagen coated coverslips (VWR, USA) were treated with tesmilifene for 24 h, then incubated with the fluorescent dyes (10 µM) for 30 min in Ringer Hepes buffer (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5.5 mM D-glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min, washed three times, mounted using Gel Mount (Biomedex, Foster City, CA, USA), and analysed using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse TE2000, Tokyo, Japan).

Detection of ATP production

ATP production was determined by CellTiter-Glo Luminescent kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. After 1 h treatment with tesmilifene lysis reagent was added to each well. Luminescent signal was measured from the top with a multiwell plate reader (Fluostar Optima). The produced ATP was calculated with a calibration curve.

Evaluation of barrier integrity

Transendothelial electrical resistance measurement

Transendothelial electrical resistance (TEER) was measured by an EVOM voltohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) combined with STX-2 electrodes. Recorded resistance was expressed to the surface of the Transwell filters ($\Omega \times \text{cm}^2$) and TEER of cell-free inserts ($130 \Omega \times \text{cm}^2$) was subtracted from these values.

Permeability measurement

Permeability tests on triple co-culture BBB model were performed when high TEER values were recorded ($620.93 \pm 8.07 \Omega \times \text{cm}^2$, $n = 32$). After treatment with tesmilifene or cAMP for 1 h, the test was conducted as described previously (Hülper *et al.* 2013). Flux across coated, cell-free inserts was also measured. Endothelial permeability coefficients (Pe) were calculated from clearance values of tracers as described in detail in previous publications (Deli *et al.* 2005; Hülper *et al.* 2013). Permeability assays on double co-culture models with primary glial or RG2 cells were performed similarly.

Immunohistochemistry

Brain endothelial cells were stained for the integral membrane tight junction protein claudin-5 and for junctional associated proteins β -catenin and zonula occludens protein-1 (ZO-1). After a brief wash in Ringer-Hepes buffer, cells were fixed with ethanol – acetic acid 95 : 5 mixture for 20 min at -20°C , blocked with 3% bovine serum albumin-PBS and incubated overnight with primary antibodies: anti-claudin-5 (mouse monoclonal antibody, Invitrogen, Life Technologies), anti- β -catenin and anti-ZO-1 (rabbit polyclonal antibodies, Invitrogen, Life Technologies). Incubation with secondary antibodies Alexa Fluor-488-labeled anti-mouse (Life Technologies, Invitrogen) and Cy3-labeled anti-rabbit and Hoechst dye 33342 for nucleus staining lasted for 1 h. Cells were washed three times with PBS between incubations. Staining was examined by a NikonEclipse TE2000 fluorescent microscope.

Detection of cAMP production

An enzyme immuno assay (Biotrak, GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) was used to detect cAMP production in brain endothelial cells according to the manufacturer's description. After 5 min of pretreatment with IBMX, 5 min treatment with tesmilifene or 25 μM cAMP, cells were lysed. Supernatants were transferred to the ELISA plate and tetramethylbenzidine was given as substrate. Absorbance was measured at a wavelength of 450 nm (Fluostar Optima).

Evaluation of efflux pump activity

Assessment of efflux pump function

To determine efflux pump activity, rhodamine 123 (R123) accumulation in brain endothelial cells was measured with Ringer-Hepes buffer containing 10 μM R123 for 24 h at 37°C (Nakagawa *et al.* 2009). R123 is a ligand of both P-glycoprotein and breast cancer-resistant protein (Bcrp). Besides the effect of tesmilifene after 16 h treatment on pump activity, two pump inhibitors were also tested for 30 min treatment as positive controls: cyclosporine A (1.6 μM), inhibitor of Pgp and Bcrp and verapamil (100 μM), and inhibitor of the Pgp pump. After treatment and incubation with R123, the

supernatants were collected, the monolayers were washed three times with ice-cold PBS, and solubilized in 0.1 N NaOH. Fluorescence intensity in all samples was measured in a 96-well plate (Fluostar Optima; excitation: 485 nm, emission: 520 nm).

Functional study of multidrug resistance associated protein-1 (Mrp-1)

This method was carried out similar to the other efflux pump activity assay. The efflux of glutathione bimane (GS-B) was measured after treatment with tesmilifene and pump inhibitor probenecid (100 μM) followed by incubation with 20 μM monochlorobimane (Molecular Probes, USA) in cell culture medium for 20 min. After collection of supernatants and washing, the cells were solubilized. GS-B concentration was measured in all samples using the multiwell plate system (Fluostar Optima; excitation: 386 nm, emission 476 nm).

Detection of nitric oxide production

For fluorometric detection of intracellular nitric oxide (NO) production 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM diacetate, Molecular Probes, Life Technologies) was used (Kojima *et al.* 1998). Brain endothelial cells in 96-well black, clear-bottom plates (Corning) were pretreated with tesmilifene for 16 h, washed, and incubated with Ringer-Hepes buffer containing 2 mM DAF-FM diacetate for 1 h at 37°C . Sodium nitroprusside (100 μM) served as the NO donor. Fluorescence was measured by a multiwell plate reader (Fluostar Optima) at wavelengths of 485 nm (excitation) and 520 nm (emission).

NF κ B nuclear translocation

To measure NF κ B nuclear translocation brain endothelial cells were cultured in a 96-well plate and treated with 50–100 μM tesmilifene or 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 1 h. Cells were fixed with cold acetone-methanol 1 : 1 solution for 10 min at 21°C and stored in 1% FBS-PBS overnight. Then cells were incubated with anti-NF κ B antibody (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in TRIS buffer (10 mM TRIS, 0.9% NaCl, 1% fetal calf serum, pH 7.4) at 21°C on a rocking table for 90 min. Goat anti-rabbit Alexa 568 (Molecular Probes, Life Technologies) was used as secondary staining for 90 min combined with Hoechst 33342 nucleus staining. Between staining, steps cells were washed three times with TRIS buffer. Samples were mounted with 1 : 1 ratio mixture of glycerine and buffer containing 10 mM 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. Differences between cytoplasmic and nuclear intensity of staining was analysed by Olympus IX-81 fluorescence microscope and 'analysis' software (Olympus, Tokyo, Japan).

Quantitative real-time PCR

Gene expression analysis was performed as described in our recent paper (Tóth *et al.* 2014). Brain endothelial cells were cultured for 5 days in 10 cm dishes receiving 50% gial cell conditioned medium. When reaching confluency, cells were treated with tesmilifene (100 μM). After treatment cells were scraped and collected, cell pellets were used for total RNA isolation. (RNAqueous-4PCR Kit, Life Technologies, Ambion, Austin, TX, USA). cDNA synthesis was performed by High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). The expression of the selected rat BBB genes was analyzed by quantitative PCR using TaqMan Low Density Array 384-well microfluidic cards preloaded

with inventoried TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, Austin, TX, USA). The list of the genes and the TaqMan Gene Expression Assays are indicated in the supplementary material (Table S1). Expression of all genes was normalized to the 18S rRNA as endogenous control, highly expressed in eukaryotic cells. Expression values of studied genes were determined by the correlation of normalized expression of genes calculated by $2^{-\Delta C_t}$ formula to the lowest expression level which can be safely detected by this RT-PCR method.

Statistical analysis

For statistical analysis GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used. Data were tested for Gaussian distribution by the D'Agostino-Pearson normality test. *In vivo* data did not show Gaussian distribution, hence measurement

values in brain regions were compared using one-way ANOVA analysis followed by Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparison tests. Differences between the groups of the *in vivo* measurements were analysed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. Data of *in vivo* experiments are presented as median with interquartile range. For all other analyses, data were at Gaussian distribution and were analysed with unpaired *t*-test (Fig. 4) or with one-way analysis of variance followed by Dunnett post-test, and with two-way ANOVA combined with Bonferroni post-test. *In vitro* data are presented as means $\pm$ SEM. Changes were considered statistically significant at $p < 0.05$. All measurements were repeated at least three times, the number of parallel samples was at a minimum of three.

Results

Tesmiflifen increases the permeability of the blood–glioma barrier

Glioma implantation using RG2 glioblastoma cells was successful (Fig. 1a). All animals survived the 2-week long tumor growth period and the operation did not result in significant weight loss ($< 5\%$). The size of the RG2 tumor was $3.78 \times 2.88 \times 4.0$ mm (2 perpendicular diameters $\times$ depth) on average. A two-step analysis was performed on permeability data. First, marker concentrations in the brain tissue samples from the cortex (non-injection sites) were compared between the left and right hemispheres with or without intravenous tesmiflifen treatment (5 mg/kg). In the second analysis, only dye extravasation in the right hemisphere were compared: between tumor tissue and non-tumor tissue in the RG2 cell line implanted rats and between the injection site and the brain tissue in sham-operated rats.

Fig. 1 Blood-brain/blood-glioma barrier permeability measurements. (a) Photo of an RG2 glioma implanted brain after the permeability experiment (in the left, bar: 5 mm). Brain slice demonstrating the depth and anatomical position of the implanted glioma (in the right, bar: 1 mm). (b) Sodium fluorescein (SF) and albumin (EBA) extravasation in sham operated and RG2 injected animals in the cortex, in the non-implantation site. L: left side, R: right side. Statistically significant differences are: (a) $p < 0.05$, compared to the left hemisphere of sham operated animals; (b) $p < 0.05$, compared to the right hemisphere of sham operated animals; $^{\#}p < 0.05$, left hemisphere compared to right hemisphere. (c) Fluorescein and albumin penetration to tumor tissue (T) versus non-tumor tissue (NT) and implantation site (IS) in the right cortex. Statistically significant differences are: (a) $p < 0.05$, compared to brain tissue of sham operated animals in the non-injection site (BT); (b) $p < 0.05$, compared to sham operation injection site (IS); $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$, treated (Tesm +) groups compared to untreated (Tesm -) groups; $^{\#}p < 0.05$, tumor tissue (T) versus non-tumor tissue (NT) or brain tissue (BT) of sham operated animals in the non-injection site versus implantation site (IS). Tesm: tesmiflifen. Statistical analysis: one-way ANOVA analysis followed by Kruskal–Wallis test, Dunn's multiple comparison test and two-way ANOVA followed by Bonferroni tests. Values presented are means $\pm$ SEM, $n = 6-21$.

The extravasation of fluorescein and albumin to brain cortex was not changed by tesmilifene in sham-operated animals in either hemisphere. However, in the cerebellum and midbrain samples, a significant elevation of albumin penetration was measured after tesmilifene treatment (Figure S1). Flux of fluorescein, but not albumin was elevated in non-tumor brain tissue in glioma implanted animals in both hemispheres, which elevation was not changed by tesmilifene treatment. Similar effect was seen in the cerebellum and midbrain (Figure S1). There was a higher permeability for fluorescein and albumin in the right hemisphere, on the site of tumor implantation, compared to the left in almost all groups (Fig. 1b). No change in tracer permeability was found in the tumor tissue compared to the sham-operated injection site in the right hemisphere. Treatment with tesmilifene-induced a highly elevated, 2.7-fold increase in permeability for fluorescein in the tumor tissue (Fig. 1c).

The permeability of tumor tissue was higher for fluorescein than in non-tumorous brain tissue from the right cortex either with or without tesmilifene treatment. For albumin, tesmilifene treatment elevated the permeability at the injection site after tesmilifene administration, which was also significant compared to tesmilifene-treated non-tumor cortex tissue.

Cell viability assays

Tesmilifene at 1 and 10 μM concentrations caused no change in cell impedance for 24 h (Fig. 2a). A drop in impedance without recovery was measured for the highest treatment concentration (200 μM) indicating cell damage. As a comparison Triton X-100 detergent treatment killed all cells promptly. At the 100 μM tesmilifene treatment concentration an impedance drop was observed within 1 h, but this decrease was temporary and reversible and cells approached

Fig. 2 Cell viability assays on the effects of tesmilifene on brain endothelial cells. (a) Impedance measurement for 24 h. (b) The effects of tesmilifene on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye conversion after 24 h treatment. (c) Double cell nucleus staining after 24 h tesmilifene treatment. Blue: Bis-benzimide,

red: ethidium homodimer-1. Bar: 50 μM . (d) ATP production after 1 h tesmilifene treatment. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test, where $**p < 0.01$; $***p < 0.001$, compared to the untreated control, $n = 3-8$.

the viability level of the control. A reversible decrease in impedance with a full recovery was measured at 50 μM treatment concentration.

Incubation of monolayers with 1–50 μM concentrations of tesmilifene for 24 h showed no decrease in cell viability assessed by MTT conversion (Fig. 2b). At the two highest concentrations, significant decrease in formazan crystal formation indicating cell damage was detected, in accordance with impedance data.

In agreement with the results of other viability assays, significant cell damage indicated by ethidium homodimer-1 staining of cell nuclei was only visible at 200 μM treatment concentration, while at lower concentrations, no sign of cytotoxicity was detected (Fig. 2c).

In order to evaluate the short-term effect of tesmilifene on endothelial metabolism, ATP production was measured after 1 h treatment (Fig. 2d). A significant decrease in ATP production was only observed at the highest, 200 μM concentration. The 50 and 100 μM groups had no effect on the cells. Low concentrations (1 and 10 μM) significantly elevated ATP production compared to the control group. Based on the results of the four different assays, the 200 μM treatment concentration was toxic to primary rat brain endothelial cells, therefore 100 μM or lower concentrations were used in further experiments.

Effect of tesmilifene on brain endothelial barrier integrity and cAMP production

The P_e in the control group was 1.66×10^{-6} cm/s for fluorescein and 0.31×10^{-6} cm/s for EBA. These values are in concordance with previous studies and indicate that the BBB model was appropriate for transport studies (Deli *et al.* 2005; Nakagawa *et al.* 2009). Tesmilifene increased the flux of fluorescein and albumin across brain endothelial layers at 50 and 100 μM treatment concentrations, however, the lowest, 1 μM concentration of tesmilifene decreased the flux of both markers (Fig. 3a and b). Tesmilifene treatment caused a significant decrease in resistance at 100 μM , but not at lower concentrations (Fig. 3c).

Treatment with 25 μM cAMP also decreased the permeability for both marker molecules, but did not change the resistance of the monolayers.

Significantly elevated cAMP production was induced by 1 and 10 μM tesmilifene in endothelial cells compared to untreated control cells. Similar cellular cAMP levels were measured after treatment with 1 μM tesmilifene as after 25 μM exogenous cAMP treatment (Fig. 3d). However, higher concentrations of tesmilifene did not produce significant change in cAMP production compared to control.

Effect of tesmilifene on junctional morphology of cultured brain endothelial cells

Morphological changes in tesmilifene-treated brain endothelial cells were followed by immunostainings for claudin-5,

β -catenin and ZO-1 (Fig. 3e). Intact, strong junctional stainings localized to the cell borders were observed in untreated brain endothelial cells and the 10 μM tesmilifene treatment group. Cell-cell attachments were continuous without gaps. Tesmilifene at 50 μM concentration perturbed the interendothelial junctional stainings: small gaps appeared between the cells and instead of the smooth interendothelial borders zipper-like staining pattern was visible. These changes in immunostainings were further pronounced at 100 μM tesmilifene concentration.

Effect of tesmilifene on the barrier integrity of blood–brain and blood–glioma culture models

Figure 4a shows the experimental setups used for testing the barrier integrity of the models studied. For the double co-culture model, the basal TEER was lower than that of measured on the triple co-culture model. On the primary endothelial cell–glial cell combination the background resistance was $171 \pm 3 \Omega \times \text{cm}^2$. The co-culture of primary brain endothelial cells with RG2 glioblastoma reduced TEER to $90 \pm 4 \Omega \times \text{cm}^2$ (Fig. 4b). In the BBB model P_e for fluorescein was 7.41×10^{-6} cm/s and for EBA 0.57×10^{-6} cm/s (Fig. 4c and 4d). Glioma co-culture induced a 10–15-fold higher permeability for these markers (SF: 72.15×10^{-6} cm/s; EBA: 8.62×10^{-6} cm/s). Treatment with 100 μM tesmilifene resulted in a significant resistance drop (Fig. 4b) and a permeability elevation for marker molecules (Fig. 4c and d) in both blood–brain and blood–glioma models.

Effect of tesmilifene on efflux pump activity in brain endothelial cells

Efflux pump function

Cyclosporin A (1.6 μM), and verapamil (2 μM) effectively reduced the R123 efflux from primary endothelial cells indicating functional Pgp and Bcrp efflux pumps in the cultures (Fig. 5a). Tesmilifene treatment at a concentration of 100 μM increased the intracellular R123 content in brain endothelial cells, showing that tesmilifene significantly inhibited the activity of efflux pumps while low concentrations (1 and 10 μM) did not have any effect.

Multidrug resistance associated protein-1 function

Tesmilifene (100 μM) reduced the efflux of the Mrp-1 ligand GS-B from brain endothelial cells close to the value obtained for the Mrp-1 inhibitor probenecid (100 μM ; Fig. 5b). Lower concentrations did not change the activity of this efflux pump.

Tesmilifene treatment alters gene expression in brain endothelial cells

Tesmilifene (100 μM , 1 h) decreased the expression of several genes important in BBB function compared to

Fig. 3 Evaluation of barrier integrity on the triple co-culture blood–brain barrier (BBB) model and cAMP production in brain endothelial cells after treatment with tesmilifene. (a) Permeability of brain endothelial cells for sodium fluorescein (SF) after 1 h treatment with tesmilifene or cAMP (25 μ M). Data is expressed in the % of untreated control cells. (b) Flux of albumin (EBA) across brain endothelial cell layers after 1 h treatment with tesmilifene or cAMP. Data is expressed in the % of untreated control cells. (c) Transendothelial electrical resistance after treatment at the beginning of the permeability assay. Data are expressed in the % of untreated control cells. (d) cAMP production

after short-term, 5 min tesmilifene treatment. Data is expressed as fmol cAMP produced/well. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test, where $*p < 0.05$; $***p < 0.001$, compared to the untreated control, $n = 3-6$. (e) Effects of tesmilifene treatment (1 h) on claudin-5, β -catenin and ZO-1 immunostaining in rat brain endothelial cells. Arrowheads: fragmented junctional staining, gap between cells or cytoplasmic redistribution of the junctional protein. Green: immunostaining for claudin-5. Red: immunostaining for β -catenin and ZO-1. Blue: H33343 staining of cell nuclei. Bar = 25 μ m.

Fig. 4 Evaluation of barrier integrity on double co-culture models after tesmilifene treatment (100 μ M, 1 h). (a) Schematic drawing of the two setups: primary brain endothelial cells co-cultured with primary glial cells or RG2 glioblastoma cell line. Phase contrast images, bar: 50 μ m. (b) Transendothelial electrical resistance (TEER) after tesmilifene treatment on co-culture models. (c) Permeability of brain endothelial layers for fluorescein (SF) and (d) for albumin (EBA) after

tesmilifene treatment. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: unpaired *t*-test, where a and b indicate significant difference ($p < 0.05$) compared to control cells in the astroglia co-culture or to control cells in the RG2 glioblastoma co-culture, respectively; and two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, where $***p < 0.001$, compared to the untreated control, $n = 4$.

untreated endothelial cells. Changes in mRNA expression higher than 2-fold are shown in Fig. 6. Down-regulated genes were: (i) endothelial cell selective adhesion molecule

(Esam) and claudin-1, -3, -5, -11, -19 junctional proteins, (ii) breast cancer-resistant protein (Bcrp), multidrug resistance associated protein-4 (Mrp-4), organic anion transporter-1 and

Fig. 5 Effects of tesmilifene on the efflux pump activity in brain endothelial cells. (a) Assessment of efflux pump function after 24 h treatment with tesmilifene or with P-glycoprotein and Bcrp pump inhibitor cyclosporine A (1.6 μ M) and P-glycoprotein pump inhibitor verapamil (2 μ M). (b) Evaluation of Mrp-1 efflux pump activity following 24 h treatment with tesmilifene or Mrp pump inhibitor probenecid (100 μ M). Data is expressed in the % of untreated control cells. Prob: probenecid, CyA: cyclosporine A, Ver: verapamil, EC: extracellular, IC: intracellular amount of R123. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test, where * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001, compared to the untreated control, n = 4.

excitatory amino acid transporter-2, -3 (Eaat-2,-3) efflux pumps, (iii) solute carriers for amino acids (Sat-1, Snat-5), creatin (Crt), ascorbic acid (Asct2), glycine (Glyt1), taurine (Taut), thyroid hormones (Mct8), and (iv) sulfotransferase (Sult1A1), Cyp2D4 and γ -glutamyl transferases (Ggt-1, -5, -7) metabolic enzymes. Tesmilifene completely inhibited the expression of several genes, namely: claudin-2, glucose transporter-5, dopamine, noradrenalin and GABA transporters, Mrp-8 and Eaat-4. There was only one gene, Cyp3a23, which was not expressed in control brain endothelial cells, but was induced by tesmilifene (Table S1). The expression level of neither Abcc1 nor Abcb1b

coding for Mrp-1 and Pgp, respectively, was apparently affected by tesmilifene.

Effect of tesmilifene on brain endothelial NO production

Tesmilifene concentration-dependently decreased the basal NO production of brain endothelial cells compared to the untreated control (Fig. 7a). Treatment with tesmilifene at 10 μ M concentration decreased the level of NO production to 63%, while 50 and 100 μ M concentrations reduced NO production to 20% of control levels.

Effect of tesmilifene on NF κ B nuclear translocation in brain endothelial cells

In order to further analyze the potential effects of tesmilifene early NF κ B nuclear translocation was investigated in brain endothelial cells following short term (1 h) treatment. NF κ B nuclear translocation is indicated by high nucleus/cytoplasm intensity ratio. Tesmilifene (50 and 100 μ M) elevated the nuclear translocation of NF κ B in brain endothelial cells (Fig. 7b). Increased nuclear translocation was also measured after bacterial LPS treatment (1 mg/mL).

Inhibitors of various receptors and signaling pathways modify the effect of tesmilifene on brain endothelial cells

Two signaling pathway inhibitors and a receptor agonist were tested on tesmilifene-treated (100 μ M) brain endothelial cells (Fig. 7c). After 1 h of treatment LY294002 (1 μ M) PI3K/Akt, U0126 (10 nM) MAPK/ERK kinase pathway inhibitors and β -estradiol (10 nM) partially blocked the action of tesmilifene on brain endothelial impedance.

Discussion

Since no effective therapy exists to cure CNS tumors, there is an intense search for new therapeutic ways (Muldoon *et al.* 2007; Parrish *et al.* 2015). One of the possible strategies to improve the delivery of cytostatics to brain tumors is the opening of the BBB (Deli 2009). Osmotic BBB disruption with mannitol is the oldest method (Neuwelt *et al.* 1991), but it is only used in a few clinical centers (Doolittle *et al.* 2000). Intracarotid infusion of bradykinin was effective in animal experiments to open the BBB (Inamura and Black 1994), and its receptor agonist analog cereport was also tested in clinical studies (Packer *et al.* 2005); however, bradykinin may increase tumor size and promote metastases (Seifert and Sontheimer 2014). Selective opening of the blood-tumor barrier was also observed for an NO donor in rats (Weyerbrock *et al.* 2003). Reversible opening of the BBB with short-chain alkylglycerols was described in glioma-implanted rats (Erdlenbruch *et al.* 2003) and on cultured brain endothelial cells by our group (Hülper *et al.* 2013). Previous findings from our laboratory indicated that tesmilifene opens the BBB *in vivo* (Deli *et al.* 2000) and on a

Fig. 6 The effects of tesmilifene on gene expression of selected blood-brain barrier (BBB) genes in rat brain endothelial cells. The figure shows the ratio between gene expression of tight junction proteins (TJ, red square), SLC transporters (SLC, blue circle), efflux transporters (ET, green triangle) and selected metabolic enzymes (ME, yellow diamond) in untreated (C)/tesmilifene treated (T) brain endothelial cells. White part: down-regulated genes, grey part: no significant regulation. The graph, scaled on the y axis, also shows the gene expression values in the control sample (C) to demonstrate the level of expression of studied genes.

culture BBB model (Deli *et al.* 2003), which prompted us to test tesmilifene as a new molecule to open the BBB in a glioma model. This paper is the first to describe the effects of tesmilifene, a chemotherapeutic adjuvant on blood-glioma barrier in rats and to provide data on its possible mode of action on brain endothelial cells.

An important finding of the study is that tesmilifene elevated the penetration of fluorescein to RG2 glioma tissue in rats in a significantly higher level than to other brain regions. This permeability elevation was more pronounced for the paracellular permeability marker fluorescein than for albumin. An elevation in the extravasation of marker molecules was detected in both hemispheres in glioma implanted animals, which was more increased in the side of the glioma. An increased permeability of the vessels in gliomas and of the BBB in the surrounding tissue is a well-known phenomenon (Neuwelt *et al.* 2008).

The direct effects and the mode of action of tesmilifene were evaluated in detail on cultured brain endothelial cells. The endothelial toxicity of tesmilifene was measured by several assays including measurement of impedance, metabolic activity and morphology. In all four tests, tesmilifene had a concentration- and time-dependent effect on cell viability. In accordance with previous toxicity measurements on MCF-7 breast carcinoma cell line (Brandes and Hermonat 1984), the 200 μ M concentration was toxic on brain endothelial cells; therefore it was excluded from further experiments. In the case of lower concentrations of tesmilifene, no cell death or cell membrane damage was

observed and impedance values showed only a transitory effect.

Tesmilifene increased the permeability of both blood-brain and blood-glioma barrier culture models for paracellular and transcellular marker molecules in concordance with *in vivo* results from our present and previous studies (Deli *et al.* 2000, 2003). Permeability elevation was also reflected in morphology changes in junctional stainings of brain endothelial cells and in TEER decrease. RG2 glioblastoma cells weakened the barrier integrity of brain endothelial cells as compared to brain endothelial-astroglial co-culture. Our *in vivo* and *in vitro* results are in agreement with previous findings showing barrier fragility in gliomas and in the surrounding tumor tissue (Dubois *et al.* 2014). Interestingly, the lowest concentration of tesmilifene increased the barrier tightness of the BBB culture model, suggesting a hormetic effect. This concentration of tesmilifene also increased cAMP production, which can explain the tightening effect (Deli *et al.* 1995; Perrière *et al.* 2005). Tesmilifene at 100 μ M concentration did not change the level of cAMP and the mRNA expression for Protein kinase A protein subunits (Table S1), therefore we assume that high concentration of tesmilifene does not act via the cAMP-PKA pathway.

Treatment with tesmilifene inhibited the activity of important BBB efflux pumps, Pgp, Bcrp and Mrp-1. Multidrug resistance of CNS tumors is a reason for therapeutic failure to treat gliomas, its metastases and other brain tumors (Régina *et al.* 2001; Parrish *et al.* 2015). Efflux

Fig. 7 (a) The effects of tesmilifene (24 h) on the basal NO production of brain endothelial cells. Data are compared to the untreated control cells. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: one-way analysis of variance followed by Dunnet's multiple comparison test, where *** $p < 0.001$, compared to the untreated control, $n = 4$. (b) The effects of tesmilifene on the NFκB nuclear translocation of brain endothelial cells. NFκB early nuclear translocation plotted in nucleus/cytoplasm staining intensity ratio after short term (1 h) tesmilifene treatment. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: one-way analysis of variance followed by Dunnet's multiple comparison test, where *** $p < 0.001$, compared to the untreated control, $n = 40$. NFκB immunostaining on brain endothelial cells is also

shown. LPS: lipopolysaccharide (1 mg/mL). Bar: 25 μM. (c) Inhibitors of different receptors and signal pathways modify the effect of tesmilifene on brain endothelial cells. The effects of β-estrogen (β-estr) and signal pathway inhibitors LY294002 (LY) and U0126 were studied on the effects of tesmilifene (1 h) with real time cell electronic sensing measurement. Data are compared to the untreated control cells and to the 100 μM tesmilifene treatment. Values presented are means $\pm$ SEM. Statistical analysis: one-way analysis of variance followed by Dunnet's multiple comparison test, where a, $p < 0.05$, compared to untreated control cells and b, $p < 0.05$, compared to the tesmilifene treated group, $n = 3-8$.

pumps including those three investigated in this study are major factors of multidrug resistance (Bart *et al.* 2000). Tesmilifene inhibits Pgp (Xu *et al.* 2007; Georges *et al.* 2014), but the mechanism is not fully understood (Brandes 2008). Since tesmilifene blocked the activity of two other important BBB efflux pumps Bcrp and Mrp-1, the sensitization of tumor cells by tesmilifene and its beneficial adjuvant action on efflux pumps cannot be excluded.

Our study provides the first dataset on the effect of tesmilifene on gene expression changes in cultured brain endothelial cells. The expression of several members of the

claudin family, integral membrane tight junction proteins, were down-regulated at the gene level which is in agreement with the measured decrease in barrier integrity. In addition, genes important for other BBB functions were also changed. Efflux transporters in brain endothelial cells participate in both the protection of endothelial cells and the development of multidrug resistance in brain tumors. Tesmilifene treatment significantly reduced the mRNA expression of Bcrp, Mrp-4, Eaats and Oatp-1, but the transcript levels of Pgp and Mrp-1 were not influenced. Bcrp is the efflux pump with the highest expression at the human BBB (Uchida *et al.* 2011)

and its substrate specificity overlaps with Pgp and its down-regulation may contribute to the beneficial effects of tesmilifene as an adjuvant of chemotherapeutics. Several Slc transporters participating in the delivery of nutrients to the CNS (Abbott *et al.* 2010) were also influenced. Gene array experiments were performed on cells in monoculture receiving glial conditioned medium, which is a limitation of this study. Preliminary results from our team show that there is no significant difference between the mRNA expression level of Pgp (Abcb1a) and Mrp-1 (Abcc1) transporters in rat primary monoculture, double and triple co-culture BBB models (manuscript in preparation). Puromycin selectively increases Abcb1a expression in rat brain endothelial cell lines (Demeuse *et al.* 2004). Primary rat brain endothelial cells in this study were treated with puromycin during the first days of culture to increase endothelial purity, but this treatment may also be responsible for high mRNA levels of efflux pumps Pgp and Mrp-1.

Tesmiflifen acts *via* several receptors and signaling pathways (Brandes 2008). Some potentially important pathways regulating BBB permeability were selected among them. In the present study, tesmilifene decreased the basal NO production of cerebral endothelial cells. Elevated NO levels as well as inhibition of basal NO production impair BBB integrity in culture models (Deli *et al.* 2005). The role of the decreased NO production induced by tesmilifene in modulating the BBB tightness of our model cannot be excluded. After treatment with tesmilifene, an early nuclear translocation of NFκB was observed in brain endothelial cultures. NFκB as a transcriptional factor plays a role in several cellular gene networks, among them cell stress reaction and cell survival (Brasier 2006). Recently NFκB was identified as a major mediator for interleukin-15 production which increases permeability in brain endothelial cells (Stone *et al.* 2011). This observation is consistent with our findings. The effect of tesmilifene on brain endothelial cells was partly inhibited by β-estradiol. Estrogen exerts protective effects on brain endothelial cells (Guo *et al.* 2009) expressing estrogen receptors (Duckles and Krause 2007). Tesmilifene does not bind to the estrogen receptor, but is specific to the antiestrogen binding site (Brandes and Hermonat 1984). It partially antagonizes the effect of estradiol proving that there is an interaction between these molecules, although they possibly do not interact on the estrogen receptor (Brandes and Hogg 1990). Our results also indicate an interaction between tesmilifene and β-estradiol. The present data suggest the possible involvement of the MAPK signaling the mechanism of tesmilifene on endothelial cells, since U0126, a MAPK/ERK kinase inhibitor also partially blocked the effect of tesmilifene. When the MAPK signaling pathway is activated in brain endothelial cells, permeability elevation is observed (Fischer *et al.* 2005), which is reversible by the addition of U0126. An inhibitor

of the PI3K/Akt signaling pathway, LY294002 also antagonized the effects of tesmilifene. Several signaling molecules, including PI3K, influence the brain endothelial barrier integrity, namely the assembly or disassembly of junctional complexes (González-Mariscal *et al.* 2008). The vascular endothelial growth factor, which opens the BBB also acts via the PI3K/Akt pathway (Kilic *et al.* 2006), and LY294002 inhibits its permeability elevation in brain endothelial cells (Camire *et al.* 2014). Based on the inhibition profile, we hypothesize that the effects of tesmilifene on the BBB might also be mediated via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways.

The clinically proven effects of tesmilifene as a chemotherapeutic adjuvant in several types of peripheral cancers and lack of data on its action in the CNS motivated us to perform the present study. We could demonstrate for the first time that tesmilifene increased marker molecule extravasation in glioma which was more pronounced than in non-tumor brain tissue. Since tesmilifene also inhibited efflux pump activity in brain endothelial cells, these two effects combined could potentially contribute to increased delivery of antineoplastic drugs to CNS tumors. The action of tesmilifene might be mediated *via* several parallel signaling pathways which is known to regulate BBB permeability. Based on the presented findings, it would be of interest to test the effect of tesmilifene on CNS delivery of chemotherapeutic drugs and its efficacy as an adjuvant in glioma treatment.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

This work was supported by the National Office for Research and Technology grant GOP 1.1.1-11-2011-0003. Fruzsina Walter received a fellowship for young researchers from the Hungarian Academy of Sciences. Tesmilifene was a gift from Prof. Lorne J. Brandes, University of Manitoba, Winnipeg, Canada. Prof. András Falus is gratefully thanked for critical reading of the manuscript. The authors declare that they have no conflicts of interest.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Blood-brain/blood-glioma barrier permeability measurements.

Table S1. Expression values of selected BBB genes in untreated (C) and tesmilifene-treated (T) primary rat brain endothelial cells.

References

- Aas A. T., Brun A., Blennow C., Strömblad S. and Salford L. G. (1995) The RG2 rat glioma model. *J. Neurooncol.* **23**, 175–183.

- Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R. and Begley D. J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25.
- Bart J., Groen H. J., Hendrikse N. H., van der Graaf W. T., Vaalburg W. and de Vries E. G. (2000) The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat. Rev.* **26**, 449–462.
- Brandes L. J. (2008) N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy] ethanamine (DPPE; tesmilifene), a chemopotentiating agent with hormetic effects on DNA synthesis *in vitro*, may improve survival in patients with metastatic breast cancer. *Hum. Exp. Toxicol.* **27**, 143–147.
- Brandes L. J. and Hermonat M. W. (1984) A diphenylmethane derivative specific for the antiestrogen binding site found in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 724–728.
- Brandes L. J. and Hogg G. R. (1990) Study of the *in-vivo* antioestrogenic action of N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy]ethanamine HCl (DPPE), a novel intracellular histamine antagonist and antioestrogen binding site ligand. *J. Reprod. Fertil.* **89**, 59–67.
- Brandes L. J., Gerrard J. M., Bogdanovic R. P., Lint D. W., Reid R. E. and LaBella F. S. (1988) Correlation of the antiproliferative action of diphenylmethane-derivative antiestrogen binding site ligands with antagonism of histamine binding but not of protein kinase C-mediated Ω phosphorylation. *Cancer Res.* **48**, 3954–3958.
- Brandes L. J., LaBella F. S. and Warrington R. C. (1991) Increased therapeutic index of antineoplastic drugs in combination with intracellular histamine antagonists. *J. Natl Cancer Inst.* **83**, 1329–1336.
- Brandes L. J., Simons K. J., Bracken S. P. and Warrington R. C. (1994) Results of a clinical trial in humans with refractory cancer of the intracellular histamine antagonist, N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine-HCl, in combination with various single antineoplastic agents. *J. Clin. Oncol.* **12**, 1281–1290.
- Brasier A. R. (2006) The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* **6**, 111–130.
- Camire R. B., Beaulac H. J., Brule S. A., McGregor A. I., Lauria E. E. and Willis C. L. (2014) 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.* **351**, 654–662.
- Deli M. A. (2009) Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 892–910.
- Deli M. A., Dehouck M. P., Ábrahám C. S., Cecchelli R. and Joó F. (1995) Penetration of small molecular weight substances through cultured bovine brain capillary endothelial cell monolayers: the early effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Exp. Physiol.* **80**, 675–678.
- Deli M. A., Németh L., Falus A. and Ábrahám C. S. (2000) Effects of N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine on the blood-brain barrier permeability in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **387**, 63–72.
- Deli M. A., Ábrahám C. S., Niwa M. and Falus A. (2003) N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm. Res.* **52**(Suppl 1), S39–S40.
- Deli M. A., Ábrahám C. S., Kataoka Y. and Niwa M. (2005) Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 59–127.
- Demeuse P., Fragner P., Leroy-Noury C., Mercier C., Payen L., Fardel O., Couraud P. O. and Roux F. (2004) Puromycin selectively increases *mdr1a* expression in immortalized rat brain endothelial cell lines. *J. Neurochem.* **88**, 23–31.
- Doolittle N. D., Miner M. E., Hall W. A. *et al.* (2000) Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer* **88**, 637–647.
- Dubois L. G., Campanati L., Righy C. *et al.* (2014) Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 418.
- Duckles S. P. and Krause D. N. (2007) Cerebrovascular effects of oestrogen: multiplicity of action. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 801–808.
- Erdlenbruch B., Alipour M., Fricker G., Miller D. S., Kugler W., Eibl H. and Lakomek M. (2003) Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 1201–1210.
- Fischer S., Wiesnet M., Renz D. and Schaper W. (2005) H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 687–697.
- Georges E., Lian J. and Laberge R. (2014) A tamoxifen derivative, N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy] ethanamine, selectively targets P-glycoprotein-positive multidrug resistant Chinese hamster cells. *Biochem. Pharmacol.* **90**, 107–114.
- González-Mariscal L., Tapia R. and Chamorro D. (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 729–756.
- Guo Q., Wang G. and Namura S. (2009) Fenofibrate improves cerebral blood flow after middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 70–78.
- Hülper P., Veszelka S., Walter F. R., Wolburg H., Fallier-Becker P., Piontek J., Blasig I. E., Lakomek M., Kugler W. and Deli M. A. (2013) Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1561–1573.
- Inamura T. and Black K. L. (1994) Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 862–870.
- Jordan V. C. (2014) Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, R235–R246.
- Kilic E., Kilic U., Wang Y., Bassetti C. L., Marti H. H. and Hermann D. M. (2006) The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB. J.* **20**, 1185–1187.
- Kiss L., Walter F. R., Bocsik A., Veszelka S., Ózsvári B., Puskás L. G., Szabó-Révész P. and Deli M. A. (2013) Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J. Pharm. Sci.* **102**, 1173–1181.
- Kojima H., Sakurai K., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y. and Nagano T. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 373–375.
- Kroeger E. A. and Brandes L. J. (1985) Evidence that tamoxifen is a histamine antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 750–755.
- László V., Rothe G., Hegyesi H., Szeberényi J. B., Orsós E., Schmitz G. and Falus A. (2001) Increased histidine decarboxylase expression during *in vitro* monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflamm. Res.* **50**, 428–434.
- Liu J., Tu D., Dancey J., Reyno L., Pritchard K. I., Pater J. and Seymour L. K. (2006) Quality of life analyses in a clinical trial of DPPE (tesmilifene) plus doxorubicin versus doxorubicin in patients with

- advanced or metastatic breast cancer: NCIC CTG Trial MA.19. *Breast Cancer Res. Treat.* **100**, 263–271.
- Muldoon L. L., Soussain C., Jahnke K. *et al.* (2007) Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2295–2305.
- Nakagawa S., Deli M. A., Kawaguchi H., Shimizudani T., Shimono T., Kittel Á., Tanaka K. and Niwa M. (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* **54**, 253–263.
- Neuwelt E. A., Goldman D. L., Dahlborg S. A., Crossen J., Ramsey F., Roman-Goldstein S., Brazier R. and Dana B. (1991) Primary CNS lymphoma treated with osmotic blood-brain barrier disruption: prolonged survival and preservation of cognitive function. *J. Clin. Oncol.* **9**, 1580–1590.
- Neuwelt E., Abbott N. J., Abrey L. *et al.* (2008) Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet. Neurol.* **7**, 84–96.
- On N. H. and Miller D. W. (2014) Transporter-based delivery of anticancer drugs to the brain: improving brain penetration by minimizing drug efflux at the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 1499–1509.
- Packer R. J., Krailo M., Mehta M., Warren K., Allen J., Jakacki R., Villablanca J. G., Chiba A. and Reaman G. (2005) A Phase I study of concurrent RMP-7 and carboplatin with radiation therapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas. *Cancer* **104**, 1968–1974.
- Parrish K. E., Sarkaria J. N. and Elmquist W. F. (2015) Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: strategies to overcome the blood-brain barrier. *Clin. Pharmacol. Ther.* **97**, 336–346.
- Perrière N., Demeuse P., Garcia E. *et al.* (2005) Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.* **93**, 279–289.
- Raghavan D., Brandes L. J., Klapp K., Snyder T., Styles E., Tsao-Wei D., Lieskovsky G., Quinn D. I. and Ramsey E. W. (2005) Phase II trial of tesmilifene plus mitoxantrone and prednisone for hormone refractory prostate cancer: high subjective and objective response in patients with symptomatic metastases. *J. Urol.* **174**, 1808–1813; discussion 1813.
- Régina A., Demeule M., Laplante A., Jodoin J., Dagenais C., Berthelet F., Moghrabi A. and Béliveau R. (2001) Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev.* **20**, 13–25.
- Reyno L., Seymour L., Tu D. *et al.*, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA.19. (2004) 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.* **22**, 269–76.
- Seifert S. and Sontheimer H. (2014) Bradykinin enhances invasion of malignant glioma into the brain parenchyma by inducing cells to undergo amoeboid migration. *J. Physiol.* **592**, 5109–5127.
- Stone K. P., Kastin A. J. and Pan W. (2011) NFκB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 115–124.
- Tóth A. E., Tóth A., Walter F. R. *et al.* (2014) Compounds Blocking Methylglyoxal-induced Protein Modification and Brain Endothelial Injury. *Arch. Med. Res.* **45**, 753–764.
- Uchida Y., Ohtsuki S., Katsukura Y., Ikeda C., Suzuki T., Kamiie J. and Terasaki T. (2011) Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* **117**, 333–345.
- Weyerbrock A., Walbridge S., Pluta R. M., Saavedra J. E., Keefer L. K. and Oldfield E. H. (2003) Selective opening of the blood-tumor barrier by a nitric oxide donor and long-term survival in rats with C6 gliomas. *J. Neurosurg.* **99**, 728–737.
- Xu F. Y., Queen G., Brandes L. and Hatch G. M. (2007) The phospholipidosis-inducing potential of the chemopotentiating drug, N, N-Diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine (DPPE, tesmilifene) correlates with its stimulation of phosphatidylserine synthesis and exposure on the plasma membrane in MCF-7 breast cancer cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **50**, 61–63.