

Szegedi Tudományegyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

OXIDATÍV ÉS OZMOTIKUS STRESSZ INDUKÁLTA VÁLTOZÁSOK AGYI ENDOTÉLSEJTEKBEN

PhD értekezés tézisei

Farkas Elek Attila

Témavezető: Dr. Krizbai István

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet
Molekuláris Neurobiológiai Csoport

Szeged

2008

1. Bevezetés

A vér-agy gát elkülönített biokémiai környezetet biztosít a központi idegrendszer számára. Strukturális alapját az agyi kapillárisok belső falát burkoló endotélsejtek alkotják. A vér-agy gát működésének megértése kiemelkedően fontos számos idegrendszeri megbetegedés patomechanizmusának tisztázásához, illetve kezelési stratégiájának kialakításához. Kísérleteink során az oxidatív és az ozmotikus stressz hatását vizsgáltuk agyi endotélsejt tenyészeteken.

Az agyi iszkémia és hipoxia által kiváltott oxidatív stressz igen komoly idegrendszeri károsodást okozhat. A neuronok érintettsége mellett napjainkban számos tanulmány utal az agyi endotélsejtek sérülésére is. Szakirodalmi adatok alapján iszkémia illetőleg hipoxia/reoxigenáció során a vér-agy gát permeabilitása megnő, ami vazogén ödémához vezet. Ezen folyamat molekuláris részleteinek megismeréséhez járulnak hozzá kísérleteink, melyek során az oxidatív stressz hatására fellépő junkcionális változásokat és jeltovábbítási folyamatokat vizsgáltuk.

Más megközelítésből nyújt betekintést a vér-agy gát megnyílásának molekuláris mechanizmusába az ozmotikus stressz endotélsejtekre kifejtett hatásainak vizsgálata. Klinikai kísérletek igazolják, hogy hiperozmotikus mannitol segítségével reverzibilis módon megnyitható a vér-agy gát, ezáltal lehetővé téve különböző gyógyszereknek, kemoterapeutikumoknak a központi idegrendszerbe történő bejutását. Kísérleteink során elsősorban az ozmotikus hatásra történő permeabilitás növekedést kísérő tirozin-foszforilációs folyamatokat, valamint a junkcionális fehérjék kapcsolatainak változását vizsgáltuk.

Célkitűzések

A vér-agy gát működésének megismerése döntő fontosságú a központi idegrendszer megbetegedéseinek gyógyítása szempontjából. Ebben a tekintetben a vér-agy gát terápiás célú, szabályozott megnyitása, valamint a stroke, agyi trauma vagy neurodegeneratív elváltozások során fellépő permeabilitás növekedés meggátolása a vér-agy gát kutatás hosszú távú céljai közé tartozik.

Vizsgálataink legfőbb célja a hipoxia/reoxigenáció és hipoglikémia valamint a hiperozmotikus koncentrációjú mannitol által a vér-agy gát endotélsejtjeiben kiváltott molekuláris változások megismerése.

Részletesen:

- A fent említett stresszfaktorok befolyásolják-e a junkcionális fehérjék:
 - kifejeződését,
 - sejten belüli lokalizációját,
 - kölcsönhatásait?
- Mely jeltovábbítási útvonalak aktiválódnak az oxidatív vagy hiperozmotikus stressz hatására?
- Hogyan befolyásolják a fellépő változások a vér-agy gát integritását?

2. Anyagok és módszerek

Sejtenyészetek

Kísérleteink során egér agyi mikroerekből izolált, valamint immortalizált patkány agyi endotélsejt tenyészeteket (GP8) használtunk.

Az egér agyi endotélsejt tenyészet létrehozása steril körülmények között történt. Az agyhártya eltávolítása és az agyak kis darabokra vágása után kétlépéses enzimatis emésztés következett. A gradiens centrifugálással elválasztott mikroér fragmensekből kivándorolt endotélsejtek tenyésztése műanyag Petri-csészékben történt. A sejtkultúrákat 10 % FCS-t (fetal calf serum), 4 ng/ml ECGF alfát (endothelial cell growth factor) és 100 µg/ml heparint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tápfolyadékban tenyésztettük 37 °C-on, 5 % CO₂ tartalmú atmoszférában, 100 % páratartalom mellett.

A GP8 patkány agyi endotél sejtvonal tenyésztése 20 % PDS-t (plasma derived serum), 100 µg/ml heparint és 50 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium és Ham's F-12 Nutrient Mixture 1:1 arányú keveréke) tápfolyadékban történt 37 °C-on, 5 % CO₂ tartalmú atmoszférában, 100 % páratartalom mellett.

Az oxidatív stressz hatásainak vizsgálata

A hipoxiás körülmények kialakítása és a reoxigenáció 37 °C-on légmentes kamrában történt. A kamra légtere a 16 órás hipoxiás kezelés során 5 % CO₂-ot és 95 % N₂-t tartalmazott, amit 4 órás reoxigenáció követett 5 % CO₂-ot, 70 % N₂-t és 25 % O₂-t tartalmazó légtérben. Az oxidatív stressz hatásainak vizsgálatára 10 µM DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone) kezelést is alkalmaztunk. A kísérletek során a hipoglikémia járulékos hatásainak vizsgálatára glükózmentes tápoldatot; a MAP kináz jeltovábbítási útvonal gátlására U0126-ot használtunk.

Hiperozmotikus mannitol kezelés

A GP8 sejtek konfluens, egyrétegű tenyészetét 10, illetve 20 %-os mannitol oldattal kezeltük szérummentes körülmények között. A kezelések időtartama 10-30 perc között változott. A hiperozmotikus mannitol okozta változások reverzibilitásának vizsgálatára irányuló kísérletekben a kezelést 10-60 perces mannitolmentes inkubáció követte. A kísérletek során a következő gátlószereket alkalmaztuk: 10 μ M U0126 (MAP kináz gátló), 10 μ M Y27632 (Rho kináz inhibitor), 50 μ M Genistein (tirozin kináz gátló), 10 μ M verapamil (L-típusú Ca^{++} -csatorna blokkoló), 5 μ M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 10 μ M PP-1 (Src kináz gátló).

Sejtvitalitás

Az oxidatív stressz hatására esetlegesen fellépő sejtpusztulás vizsgálatára LDH (laktát dehidrogenáz) aktivitást mértünk a sejtkultúrák tápoldatából. Az LDH a sejtplazmában nagy mennyiségben megtalálható enzim, mely a sejtmembrán sérülésekor juthat ki a sejtől, ezért tápoldatbeli aktivitása arányos a sérült sejtek mennyiségével. További analízisre csak olyan tenyészeteket használtunk, melyekben nem volt jelentős sejtpusztulás.

Western blot

A sejteket PBS-el történő mosás után 0,3 ml lízis pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton-X-100, 0,5 % NP-40, 2 mM CaCl_2 , 5 mM NaF, 1 mM Na-orthovanadate és 1 mM Pefabloc) homogenizáltuk, majd 1 óra jégen történő inkubálás után lecentrifugáltuk (10000 g, 5 perc, 4 °C). Meghatároztuk a fehérje koncentrációt BCA módszerrel, majd a felülúszóhoz (ez a Triton szolubilis frakció) ötszörös koncentrációjú Laemmli puffert adtunk, az üledéket (Triton inszolubilis frakció) pedig felvettük Laemmli pufferben. A fehérjemintákat denaturáltuk 95 °C-on 3 percen át, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel méret szerint elválasztottuk és PVDF membránra blottoltuk. A membránokat 30 percig 5 % sovány tejport tartalmazó TBS-T pufferben blokkoltuk (illetve tej helyett 1 % BSA-val a foszfospecifikus antitestek esetén) 30 percen keresztül. Ezt követően a

membránokat 1,5 órát inkubáltuk primer antitestet tartalmazó TBS-T-ben. A következő antitesteket használtuk a feltüntetett hígításokban: anti-pan-cadherin: 1:2000, anti- α -catenin: 1:1000, anti- β -catenin: 1:2000, anti- β -actin: 1:5000, anti-VE-cadherin: 1:1000, anti-foszfotirozin (clone PY20): 1:1500, anti-occludin: 1:1000, anti-ERK: 1:1000, anti-phospho-ERK: 1:1000 és anti-phospho-p38: 1:1000. Ezt követően háromszor 10 perc mosás (TBS-T-ben), majd 30 perces inkubáció következett HRP (torma peroxidáz) kapcsolt szekunder antitesttel 1:5000 hígításban. Újabb mosást követően a membránokat ECL segítségével hívtuk elő, és a jeleket Agfa CP-BU röntgenfilmen rögzítettük.

Immunprecipitáció

A sejteket PBS-el történő mosás után 0,5 ml lízis pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton-X-100 0,5 % NP-40, 2 mM CaCl_2 , 5 mM NaF, 1 mM Na-orthovanadate és 1 mM Pefabloc) homogenizáltuk, majd 1 óra jégen történő inkubálás után lecentrifugáltuk (10000 g, 5 perc, 4 °C). A felülúszók koncentrációit kiegyenlítettük, majd 1 órát inkubáltuk protein G-sepharose-zal a nem specifikusan kötődő fehérjék eltávolítására (preclearing). A mintákat 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten az anti-foszfotirozin, illetve anti- β -catenin ellenanyaggal folyamatos keverés mellett. Ezt követte az immunkomplexek kicsapása protein G-sepharose-zal 4 °C-on, egész éjszakán át folyamatosan kevertetve. A sepharose gömbök négyszeri jéghideg TBS-T-vel való mosása után az immunkomplexeket egyszeres SDS mintapufferben 95 °C-on 3 percen át denaturáltuk. Az így előkészített mintákkal western blot analízist végeztünk.

Immunfluoreszcens festés és fluoreszcens mikroszkópia

A sejteket 1 cm átmérőjű kerek fedőlemezen növesztettük. A konfluens tenyészeteket 30 perces 20 %-os mannitol kezelés után háromszor 5 percig PBS-el mostuk, majd -20 °C-on fixáltuk etanol/ecetsav 95:5 arányú keverékével 10 percig. Újabb mosást követően 10 perces inkubálást végeztünk blokkoló pufferben (3 % BSA-t tartalmazó PBS). Ezt követően a sejteket nyúl anti- β -catenin primer antitesttel inkubáltuk blokkoló pufferben, 1:100 hígításban, 1 órán át. Háromszori mosást

követően 1 órás inkubáció következett a szekunder ellenanyaggal (Cy3 anti-nyúl) 1:500-as hígításban PBS-ben. Mosás után a fedőlemezeket víz alapú beágyazó géllel (Gel/Mount, Biomedica, M01) rögzítettük a tárgylemezeken.

A képeket 40x-es objektívvel, Nikon Eclipse TE2000 mikroszkóphoz kapcsolt SPOT RT digitális kamerával készítettük.

Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

A sejteket fibronectinnel bevont 0,4 μm pórusméretű Millicell-CM filtereken tenyésztettük. A transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérését EVOM voltóhm mérő készülékhez kapcsolt elektródkamrában végeztük. Ezzel a módszerrel 100 $\Omega \times \text{cm}^2$ feletti értékeket lehet elérni.

3. Eredmények

Oxidatív stressz

Sejtviabilitás

A hipoxia/reoxigenáció nem növelte jelentős mértékben a tápoldatok LDH aktivitását. Ez arra utal, hogy a sejtek membránja nem sérült, nem történt sejtpusztulás a fellépő oxidatív stressz hatására.

A junkcionális fehérjék expressziója és kölcsönhatásai

Western blot analízissel kimutattuk, hogy a 16 órás hipoxiás kezelés, majd 4 órás reoxigenáció következtében jelentősen csökkent az agyi endotélsejtek occludin expressziója. Az occludin kifejeződés csökkenése fokozottabban jelentkezett, ha a kísérletet glükózt tartalmazó tápoldat helyett glükózmentes oldatban végeztük. Hasonló eredményeket kaptunk, ha az oxidatív stresszt DMNQ kezeléssel váltottuk ki. Két órás 10 μ M DMNQ kezelés hatására csökkent a sejtek occludin szintje.

Kevésbé kifejezett változást figyeltünk meg az adherens kapcsolat transzmembrán fehérjéje, a cadherin esetében. Mind glükózt tartalmazó, mind glükózmentes tápoldatban tenyésztett agyi endotélsejtekben csökkent a cadherin mennyisége hipoxia/reoxigenáció következtében.

Immunprecipitációs eljárással kimutattuk, hogy a cadherin és β -catenin közötti kölcsönhatás mértéke csökkent oxidatív stressz hatására. Ez a csökkenés nagyobb mértékű, mint a cadherin mennyiségének csökkenése. A β -cateninrel való kölcsönhatáshoz hasonlóan sérült a cadherin/ α -catenin kölcsönhatás is.

Transzendoteliális elektromos ellenállás

A junkcionális fehérjék kifejeződésében és asszociációiban oxidatív stressz hatására megfigyelt változások a junkciók integritásának csökkenésére utalnak. Az ezzel járó permeabilitás változást TEER méréssel követtük. 10 μ M DMNQ kezelés hatására az agyi mikroér endotélsejteken mért TEER 10 perc alatt 50 %-ot csökkent.

A méréseket folytatva azt tapasztaltuk, hogy a csökkenés folytatódott majd egy órányi kezelés után közel 0-ra csökkent.

MAPK aktivitás

Az oxidatív stressz kiváltotta junkcionális működészavarhoz vezető jeltovábbítási folyamatok vizsgálatára western analízist végeztünk. A kísérletek során megfigyeltük, hogy a 2 órás 10 μ M DMNQ kezelés hatására az aktív, foszfo-ERK1/2 mennyisége megnő agyi kapilláris endotélben. Továbbá a sejteket glükózmentes tápoldatban tenyésztve nincs jelentős változás az ERK1/2 aktivációban, ezzel szemben a glükóz hiánnyal kombinált oxidatív stressz nagyon erőteljes aktivációhoz vezet. Az ERK aktivációt nagymértékben csökkentette az ERK gátló U0126.

Hiperozmotikus stressz

Tirozin foszforiláció

A hiperozmotikus környezet hatására aktiválódó szignalizációs jelenségek vizsgálatára agyi endotélsejt tenyészeteket kezeltünk 20 %-os (1,1 M) mannitol oldattal. Hasonló koncentrációjú oldatot alkalmaznak klinikai körülmények között a vér-agy gát megnyitásra. Western blot analízissel kimutattuk, hogy kontroll körülmények között a GP8 sejtekben egy 50-60 kDa és egy 110 kDa molekulasúlyú sávban figyelhető meg tirozin foszforiláció. Már 10 perces mannitol kezelés hatására több fehérje igen erőteljes tirozin foszforilációja mutatható ki az 50-200 kDa molekulasúly tartományban, amely 30 perc után tovább fokozódik. A tirozin foszforiláció a mannitol eltávolítása után 10 perccel jelentősen csökken, 60 perc után visszaáll a kontroll szintre.

A hiperozmotikus mannitol kiváltotta tirozin foszforilációhoz vezető lépések vizsgálatára több jelátviteli útvonal gátlószerét alkalmaztuk. 10 μ M U0126 ERK1/2 inhibítor, vagy 10 μ M Y27632 Rho kináz gátló nem befolyásolta a fellépő foszforilációt. Ezzel szemben 10 μ M PP1-et, az Src kináz gátló anyagát használva jelentősen csökkent a hiperozmotikus mannitol kiváltotta tirozin foszforiláció. A tirozin kináz gátló Genistein 50 μ M koncentrációban ugyancsak gátolta a tirozin

foszforiláció kialakulását. A kalcium szignalizáció szerepének vizsgálatára EDTA-t és verapamilt használtunk. Sem az L-típusú kalcium csatorna gátló verapamil, sem a többértékű kation kelátor EDTA nem gátolta a hiperozmotikus mannitol kiváltotta tirozin foszforilációt.

Kimutattuk továbbá, hogy a kezelés hatására fellépő tirozin foszforiláció jelentősen intenzívebb a Triton X-100 oldékony sejtfrakcióban a Triton X-100 oldhatatlan frakcióhoz képest.

MAPK aktivitás

A hiperozmotikus mannitolnak a MAP kináz útvonalra kifejtett lehetséges aktiváló hatását az aktív, foszforilált ERK1/2-t felismerő antitesttel végzett Western blot analízis segítségével vizsgáltuk. 30 perces 10 %-os mannitolkezelés után már megfigyelhető volt az ERK1/2 foszforilációja. 20 %-os mannitol hatására az aktiváció még kifejezettebbé vált. A tápoldat mannitolmentesre cserélése után 60 perccel jelentősen csökkent ERK1/2 aktivációt figyeltünk meg. Az aktiváció gátolható volt az ERK inhibítor U0126-tal, azonban az Src kináz gátló PP1 hatástalan volt. Kontroll körülmények között nem volt kimutatható mértékű ERK1/2 aktiváció, valamint a hiperozmotikus mannitol kezelés nem változtatta meg az ERK1/2 mennyiségét a sejtekben. A p38 kináz vizsgálata során nem mutattunk ki aktivációt.

A β -catenin foszforilációja

A β -catenin tirozin foszforilációja jelentősen befolyásolhatja a fehérje működését. Specifikus anti-foszfotirozin ellenanyaggal történt immunprecipitáció segítségével kimutattuk, hogy a mannitol hatására tirozin foszforilált fehérjék egyike maga a β -catenin. Mannitol hiányában nem mutatható ki számottevő tirozin foszforilálás a β -cateninen, míg 10 perces mannitol kezelés már erőteljesen indukálja a β -catenin tirozin foszforilációját. A mannitol hatás megszűnte után 10 perccel már defoszforilálódott a β -catenin. A hiperozmotikus mannitol kiváltotta β -catenin foszforilációt kivédte az Src kináz gátló PP1. A tirozin kináz gátló Genistein jelenlétében a β -catenin foszforiláció kismértékű volt. Az Erk inhibítor U0126 és a

Rho kináz gátló Y27632 hatástalan volt. Ugyancsak hatástalannak bizonyult a verapamil és az EDTA a β -catenin foszforilációjának kivédésére.

A β -catenin lokalizációja

A β -catenin lokalizációjának vizsgálatára a sejttenyészeteken immunfluoreszcens festést végeztünk. Kontroll körülmények között a β -catenin elsősorban a sejtmembránban helyezkedik el, ott folyamatos, erős festést ad. Mannitol hatására a folyamatos membránfestés felszakadozik, anélkül, hogy a festés intenzitása megváltozna. Tehát a β -catenin sejten belüli elhelyezkedése változott, míg mennyisége változatlan maradt.

Az adherens junkció fehérjéinek kölcsönhatásai

Mivel az adherens junkció fehérjéinek működését befolyásolja tirozin foszforilációs állapotuk, megvizsgáltuk milyen hatással van a hiperozmotikus mannitol kezelés e fehérjék kölcsönhatásaira. 30 perces 20 % mannitol kezelés hatására a β -catenin ellenanyaggal precipitált mintákban a VE-cadherin (vascular endothelial = érfal endotél) mennyisége lecsökken, vagyis az adherens kapcsolatok cadherin-catenin komplexumai mannitol hatására felbomlanak. Hasonlóképpen károsodik a β -catenin és α -catenin közötti kapcsolat is. A vizsgálatok során sem a VE-cadherin, sem az α -catenin mennyisége nem csökkent.

4. Összefoglalás

Megfigyeléseink szerint agyi endotél tenyészetben oxidatív stressz hatására csökken két fontos junkcionális fehérje, az occludin és a cadherin mennyisége. Ez a csökkenés még kifejezettebbé válik glükóz hiány esetén – mely körülmény gyakran előfordul az agyi keringés károsodása következtében. A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgálva ko-immunprecipitációs kísérletekkel kimutattuk, hogy csökken az összekapcsolódó cadherin – β -catenin illetve a β -catenin – alfa-catenin mennyisége. A junkcionális komplexum oxidatív hatásra történő sérüléséhez vezető szignalizáció vizsgálata során az ERK1/2 kinázok aktivációját figyeltük meg, mely glükóz hiányában erőteljesebbé vált.

Hiperozmotikus mannitol kezelés hatására a fehérjék erőteljes tirozin foszforilációját figyeltük meg 50-190 kDa tartományban. Immunprecipitáció segítségével kimutattuk, hogy a foszforiláció egyik célfehérjéje a β -catenin. A hiperozmotikus kezelést különböző inhibitorokkal kiegészítve meghatároztuk, hogy a β -catenin foszforilációja Src-kináz által mediált folyamat. A kezelés hatására megváltozott a β -catenin sejten belüli lokalizációja, valamint csökkent asszociációja az adherens kapcsolat másik két fontos tagjával, a cadherinnel és az alfa-cateninnel. A β -catenin a junkcionális komplex egyik kulcsfontosságú molekulája, így Src mediálta foszforilációja fontos szerepet játszhat a hiperozmotikus mannitol hatására bekövetkező vér-agy gát megnyílásban.

Megfigyeléseink szerint mind oxidatív, mind ozmotikus stressz hatására jelentős változások mennek végbe a junkcionális komplexumban. Ezen változások érintik a sejtközi kapcsolatok kialakításában résztvevő fehérjék expresszióját, szubcelluláris lokalizációját és a fehérjék közötti kölcsönhatásokat. A feltárt szerkezeti változásokon túl megismertük az azokat kísérő szignalizáció több fontos részletét is.

5. Köszönetnyilvánítás

Ez a tézis a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Biofizikai Intézetében készült a Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumban. Munkám során sok ember támogató segítségét élvezhettem, melyet ezúton köszönök.

Elsősorban témavezetőmnek, dr. Krizbai Istvánnak tartozom köszönettel. Végtelen türelme nagyban hozzájárult a dolgozat elkészültéhez. Diák és doktorandusz éveim során nagy hatással voltak rám a munkával, tudománnyal és hegyekkel kapcsolatos gondolatai. Gondos vezetése mellett tanultam meg a felhasznált kísérleti módszereket. A kutatási tervek és eredmények megvitatása bővítette ismereteimet és könnyebbé tette munkámat.

Köszönetemet fejezem ki dr. Párducz Árpádnak és dr. Siklós Lászlónak, akik a csoport vezetőiként lehetővé tették dolgozatom elkészítését.

Köszönet a csoport minden tagjának segítségükért és barátságukért. Név szerint szeretném említeni az Agyi Endotél Kutatócsoport jelenlegi és korábbi tagjait: Dr. Wilhelm Imola, Fazakas Csilla, Nagyőrszi Péter, Ngo Thi Kue Dung, Dr. Orbók Anna, Dr. Katarzina Wejksza és Dr. Pilaiwanwadee Hutamekalin.

Külön köszönettel tartozom családomnak és Juditnak szeretetükért és támogatásukért.

6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, **Farkas A**, Szatmári E, Traweger A, Wejksza K, Bauer HC: Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Feb;25(1):129-39. IF₂₀₀₅: 2,022
- II. **Farkas A**, Szatmári E, Orbók A, Wilhelm I, Wejksza K, Nagyőszzi P, Hutamekalin P, Bauer H, Bauer HC, Traweger A, Krizbai IA: Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res.* 2005 Jun 15;80(6):855-61. IF₂₀₀₅: 3,239

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények

- i. Wilhelm I, Nagyőszzi P, **Farkas EA**, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Fazakas C, Dung NKT, Bauer H, Bauer HC, and Krizbai IA. Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J Neurochem.* Oct;107(1):116-26. IF₂₀₀₇: 4,451
- ii. Hutamekalin P, Orbók A, Wilhelm I, **Farkas AE**, Nagyőszzi P, Veszélka S, Deli MA, Buzás K, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradszky KF, Meksuriyen D, Krizbai IA: Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol Int* 2008 Feb;32(2):198-209. IF₂₀₀₇: 1,547
- iii. Traweger A, Lehner C **Farkas A**, Krizbai IA, Tempfer H, Klement E, Guenther B, Bauer HC, Bauer H: Nuclear ZO-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells. *Differentiation* 2008 Jan;76(1):99-106. IF₂₀₀₇: 2,894

- iv. Wilhelm I, **Farkas AE**, Nagyőrszi P, Váró G, Bálint Z, Végh GA, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, and Krizbai IA: Regulation of Cerebral Endothelial Cell Morphology by Extracellular Calcium. *Phys Med Biol* 2007 Oct 21;52(20):6261-74. IF₂₀₀₇: 2,528
- v. Bálint Z, Krizbai IA, Wilhelm I, **Farkas AE**, Párducz A, Szegletes Z, Váro G: Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: an atomic force microscopic study. *Eur Biophys J.* 2007 Feb;36(2):113-20. IF₂₀₀₇: 2,238
- vi. Veszelka S, Pásztói M, **Farkas AE**, Krizbai I, Dung NT, Niwa M, Ábraham CS, Deli MA: Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int.* 2007 Jan;50(1):219-28. IF₂₀₀₇: 2,975
- vii. Krizbai IA, Lenzser G, Szatmári E, **Farkas AE**, Wilhelm I, Fekete Z, Erdős B, Bauer H, Bauer HC, Sándor P, Komjáti K: Blood-brain barrier changes during compensated and decompensated hemorrhagic shock. *Shock.* 2005 Nov;24(5):428-33. IF₂₀₀₅: 3,122
- viii. Szabó H, Novák Z, Bauer H, Szatmári E, **Farkas A**, Wejksza K, Orbók A, Wilhelm I, Krizbai IA: Regulation of proteolytic activity induced by inflammatory stimuli in lung epithelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005 Sep 2;51 Suppl:OL729-35. IF₂₀₀₅: 1,018