

**Gyógyszer- és természetes hatóanyagok védőhatásának vizsgálata
vér-agy gát károsodással szemben tenyészetes modellen**

Doktori (Ph. D.) értekezés

Barna Lilla

Témavezetők: **Prof. Deli Mária**, kutatóprofesszor
Dr. Harazin András, tudományos munkatárs

Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierék Kutatócsoport

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem

2023

Szeged

Tartalomjegyzék

Publikációs lista

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés	1
1.1. A vér-agy gát működése és változásai szisztémás és idegrendszeri betegségekben....	1
1.2. A vér-agy gát változásai szisztémás és idegrendszeri gyulladásokban.....	3
1.3. A glutamát szerepe idegrendszeri betegségekben.....	6
1.4. Az excitotoxinok hatása a vér-agy gátra	9
1.5. A citokinek és a glutamát szerepe a vér-agy gát megnyílásban betegségekben	10
1.6. Vér-agy gát protektív gyógyszerhatóanyagok	11
1.7. Vér-agy gát protektív természetes hatóanyagok	14
2. Célkitűzések	17
3. Anyagok és módszerek	18
3.1. Kísérleti állatok	18
3.2. Vegyszerek.....	18
3.3. Sejttenyésztés	18
3.3.1. A vér-agy gát <i>in vitro</i> modellezése	18
3.3.1.1. Agyi endotélsejtek tenyésztése.....	19
3.3.1.2. Agyi periciták tenyésztése.....	20
3.3.1.3. Gliasejtek tenyésztése.....	20
3.3.1.4. Háromsejtes vér-agy gát ko-kultúra modellek	21
3.4. Agykéreg és agyi mikroerek izolálása	21
3.5. A tenyészetek kezelése	22
3.6. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) és kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (qPCR)	23
3.7. Valósídejű sejtanalízis	24
3.8. A vér-agy gát modell funkcióinak vizsgálata	26
3.8.1. Transzendenteliális elektromos ellenállás mérése.....	26
3.8.2. Permeabilitási vizsgálat.....	26
3.9. Leptintranszport vizsgálatok.....	27
3.10. Reaktív oxigéngyökök képződésének vizsgálata.....	28
3.11. Nitrogén-monoxid felszabadulásának vizsgálata.....	28
3.12. Immunhisztokémia.....	29
3.12.1. Sejtkapcsoló fehérjék immunfestése	29
3.12.2. Leptin receptorok immunfestése	30

3.12.3. Az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagba történő bejutásának vizsgálata.....	30
3.13. Statisztikai kiértékelés	31
4. Eredmények	32
4.1 A kainát receptorok expressziójának vizsgálata agyszövetben, agyi mikroerekben és primer agyi endotélsejtekben.....	32
4.2. A kainsav hatása a vér-agy gát sejtjeinek életképességére: valósidejű sejtanalízis ...	32
4.3. A kainsav kezelés hatása az agyi endotélsejtek permeabilitására	33
4.4. A kainsav kezelés hatása az agyi endotélsejtek szabad oxigéngyök és nitrogén-monoxid termelésére	34
4.5. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon védőhatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek életképességére.....	35
4.6. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt vér-agy gát kultúra modell permeabilitására	36
4.7. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek reaktív oxigéngyök és nitrogén-monoxid termelésére	36
4.8. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek morfológiájára	37
4.9. A nitrogén-monoxid-szintáz gének kifejeződése agyi endotélsejtekben, és ennek változása kainsavval és dexametazonnal történő kezelés hatására	39
4.10. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modell szorosságára – barrier integritás vizsgálatok.....	40
4.11. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modellre – reaktív oxigéngyök és nitrogén-monoxid termelés	42
4.12. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modellre – az NF- κ B sejtmagi bejutása	43
4.13. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modellre – a leptin receptorok kifejeződése és a leptintranszport.....	43
5. Megbeszélés	45
5.1. A kainát agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásának kivédése gyógyszerhatóanyagokkal	45
5.2. A gyulladásos citokinek agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásának kivédése természetes hatóanyagokkal.....	48
5.3. Összegzés	52
6. Köszönetnyilvánítás.....	54
7. Irodalomjegyzék	55
8. Összefoglaló.....	66
9. Summary	70
10. Függelék.....	74

Publikációs lista:

MTMT azonosító: 10060987

Kumulatív hatástényező (IF): 66,246; Összes hivatkozások száma: 72; Hirsch index: 4

A tézis tárgyához tartozó publikációk

- I. **Barna L**, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V, Jósvay K, Zvara Á, Campos-Bedolla P, Deli MA.
Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage.
Fluids and Barriers of the CNS. 17(1):5 (2020)
IF: 7,662
- II. Ardid-Ruiz A, Harazin A, **Barna L**, Walter FR, Bladé C, Suárez M, Deli MA, Aragonès G.
The effects of *Vitis vinifera* L. phenolic compounds on a blood-brain barrier culture model: Expression of leptin receptors and protection against cytokine-induced damage.
Journal of Ethnopharmacology. 247:112253 (2020)
IF: 4,360

A tézis tárgyához közvetlenül nem tartozó publikációk

- I. Harazin A, Bocsik A, **Barna L**, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyés M.
Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone.
PeerJ. 6:e4774 (2018)
IF: 2,353
- II. Gróf I, Bocsik A, Harazin A, Santa-Maria AR, Vizsnyiczai G, **Barna L**, Kiss L, Fűr G, Rakonczay Z Jr, Ambrus R, Szabó-Révész P, Gosselet F, Jaikumpun P, Szabó H, Zsembéry Á, Deli MA.
The Effect of Sodium Bicarbonate, a Beneficial Adjuvant Molecule in Cystic Fibrosis, on Bronchial Epithelial Cells Expressing a Wild-Type or Mutant CFTR Channel.
International Journal of Molecular Sciences. 21(11):4024 (2020)
IF: 5,924
- III. Szczepkowska A, Harazin A, **Barna L**, Deli MA, Skipor J.
Identification of Reference Genes for Circadian Studies on Brain Microvessels and Choroid Plexus Samples Isolated from Rats.
Biomolecules. 11(8):1227 (2021)
IF: 6,064
- IV. Huber I, Pandur E, Sipos K, **Barna L**, Harazin A, Deli MA, Tyukodi L, Gulyás-Fekete G, Kulcsár G, Rozmer Z.
Novel cyclic C5-curcuminoids penetrating the blood-brain barrier: Design, synthesis and antiproliferative activity against astrocytoma and neuroblastoma cells.
European Journal of Pharmaceutical Sciences. 173:106184 (2022)
IF: 5,112

- V. Lee MH, Jan JS, Thomas JL, Shih YP, Li JA, Lin CY, Ooya T, **Barna L**, Mészáros M, Harazin A, Porkoláb G, Veszelka S, Deli MA, Lin HY.
Cellular Therapy Using Epitope-Imprinted Composite Nanoparticles to Remove α -Synuclein from an In Vitro Model.
Cells. 11(16):2584 (2022)
IF: 7,666
- VI. Váczi S, **Barna L**, Harazin A, Mészáros M, Porkoláb G, Zvara Á, Ónody R, Földesi I, Veszelka S, Penke B, Fülöp L, Deli MA, Mezei Z.
S1R agonist modulates rat platelet eicosanoid synthesis and aggregation.
Platelets. 33(5):709-718 (2022)
IF: 4,236
- VII. Váczi S, **Barna L**, Laczi K, Tömösi F, Rákhely G, Penke B, Fülöp L, Bogár F, Janáky T, Deli MA, Mezei Z.
Effects of sub-chronic, in vivo administration of sigma non-opioid intracellular receptor 1 ligands on platelet and aortic arachidonate cascade in rats.
European Journal of Pharmacology. 925:174983 (2022)
IF: 5,195
- VIII. Váczi S, **Barna L**, Laczi K, Tömösi F, Rákhely G, Penke B, Fülöp L, Bogár F, Janáky T, Deli MA, Mezei Z.
Effects of sub-chronic, in vivo administration of sigma-1 receptor ligands on platelet and aortic arachidonate cascade in streptozotocin-induced diabetic rats.
PLoS One. 17(11):e0265854 (2022)
IF: 3,752
- IX. Walter FR, Harazin A, Tóth AE, Veszelka S, Santa-Maria AR, **Barna L**, Kincses A, Biczó G, Balla Z, Kui B, Maléth J, Cervenak L, Tubak V, Kittel Á, Rakonczay Z Jr, Deli MA.
Blood-brain barrier dysfunction in L-ornithine induced acute pancreatitis in rats and the direct effect of L-ornithine on cultured brain endothelial cells.
Fluids and Barriers of the CNS. 19(1):16 (2022)
IF: 6,961
- X. Barabási B, **Barna L**, Walter FR, Santa-Maria AR, Harazin A, Molnár R, Kincses A, Vigh J, Dukay B, Sántha M, Tóth ME, Deli MA, Hoyk Z.
Role of interleukin-6 and interleukin-10 in morphological and functional changes of the blood-brain barrier in hypertriglyceridemia.
Fluids and Barriers of the CNS. Közlés alatt (2023)
IF: 6,961

Rövidítések jegyzéke

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav

BSA – borjú szérum albumin

CCL2/MCP1 – kemokin ligand-2/monocita kemoattraktáns fehérje-1

CO₂ – szén-dioxid

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

DMEM – Dulbecco módosította Eagle médium

FBS – főtális borjúsavó

GAPDH – gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GSPE – proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat

H₂DCFDA – 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát

H₂O₂ – hidrogén-peroxid

IL-1 β – interleukin-1 β

IL-6 – interleukin-6

KA – kainát/kainsav

NF- κ B – nukleáris faktor-kappa B

NMDA – N-metil-D-aszpartát

NO – nitrogén-monoxid

NOS1/nNOS – neuronális nitrogén-monoxid-szintáz

NOS2/iNOS – indukálható nitrogén-monoxid-szintáz

NOS3/eNOS – endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz

P_{app} – látszólagos permeabilitási együttható

PBS – foszfát pufferoldat

qPCR – kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció

RT-PCR – reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció

ROS – reaktív oxigényök

RSV – rezveratrol

SNP – nátrium-nitroprusszid

TEER – transzendoteliális elektromos ellenállás

TJ – szoros kapcsolat (tight junction)

TNF- α – tumor nekrozis faktor- α

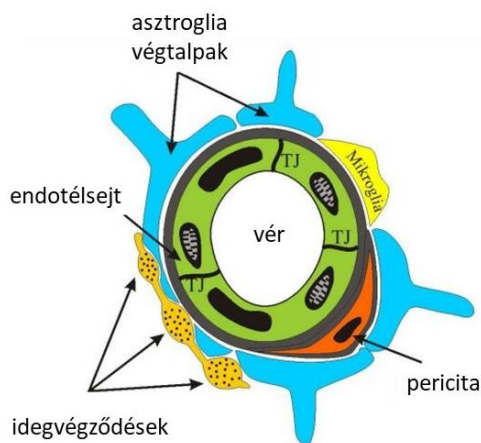
VEGF – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

ZO-1 – *zonula occludens*-1 fehérje

1. Bevezetés

1.1. A vér-agy gát működése és változásai szisztémás és idegrendszeri betegségekben

A vér-agy gát dinamikus határfelületet képez a központi idegrendszer és a vér között: segít az ionos homeosztázis fenntartásában és az idegsejtek tápanyaggal való ellátásában (Abbott és mtsai, 2006). Emellett kulcsfontosságú szerepe van a káros anyagok és bomlástermékek eltávolításában, valamint az idegrendszer és a periféria között az információ-áramlás biztosításában (Abbott és mtsai, 2010; Zlokovic, 2008). A gátrendszer anatómiai alapját az agyi hajszálereket felépítő endotélsejtek képezik (**1. ábra**). Egy felnőtt emberi agyban a hajszálerek felszíne 15-20 m², hossza pedig meghaladja a 600 km-t (Pardridge, 2002). Az agyi endotélsejtek közös bazális membránon osztoznak az agyi pericitákkal, ezeket pedig az asztroglia sejtek végtalpai burkolják be (Abbott és mtsai, 2010). Mindhárom sejtípus kölcsönhatásban áll az erek körüli mikroglia és a mikroereket beidegző idegsejtekkel (**1. ábra**). Az így létrejövő anatómiai és funkcionális egységet neurovaszkuláris egységnek hívjuk (Neuwelt és mtsai, 2011). A sejtek közötti kommunikáció kulcsfontosságú a vér-agy gát egészséges működésének fenntartásában. A különböző idegrendszert érintő kórállapotokban felborulnak ezek a sejtek közötti kölcsönhatások, ennek következtében károsodik a vér-agy gát szerkezete és működése (Zlokovic, 2008).

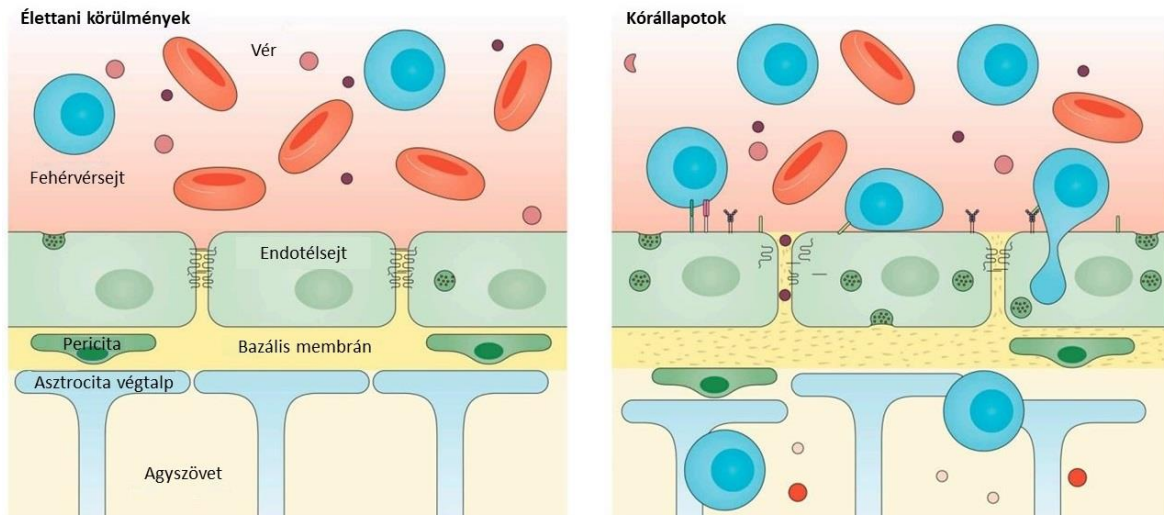


1. ábra. A vér-agy gát felépítése sematikus rajzon.

A vér-agy gát sokrétű működését az agyi endotélsejtek sajátos morfológiája teszi lehetővé, ezek a tulajdonságok az agyi mikroerekre jellemzőek, a perifériás erek endotélsejtjeinek jellemzőitől eltérnek. A vér-agy gát legfontosabb tulajdonsága és egyben a védőműködésének alapköve a sejtek közötti szoros kapcsolat (tight junction, TJ). Az endotélsejteket összekötő TJ-k korlátozzák a paracelluláris útvonalon keresztüli sejt- és

anyagáramlást, és ez hozza létre a vér-agy gátra jellemző polaritást. Az agyi endotélsejtek integráns membrán TJ fehérjéi közé tartozik a kladin-5, az okkludin, a tricellulin, a junkciós adhéziós molekulák (JAM) és az endoteliális sejtadhéziós molekula (ESAM). A membrán TJ fehérjét a citoskeletonnal kapcsolófehérjék kötik össze, ilyenek például a *zonula occludens* fehérjék (ZO-1 és -2). A szoros kapcsolatok mellett az agyi endotélsejteket adherens junkciós proteinek is összekötik (VE-kadherin; vérlemezke-endotélsejt adhéziós molekula, PECAM), melyek a citoplazmában elhelyezkedő katenin fehérjéken keresztül kapcsolódnak a sejtvázhoz (Deli, 2009). Az agyi endotélsejteket összekötő szoros kapcsolatok igen magas ellenállást alakítanak ki: patkányok agyi mikroereiben ~1500-2000 $\Omega \times \text{cm}^2$ elektromos ellenállást mértek, ami nagyságrendekkel kisebb ionátjutást eredményez a perifériás erekhez képest (Butt és mtsai, 1990). A vér-agy gát védműködéséhez hozzájárul az is, hogy a perifériás endotélsejtekkel szemben a lapos, orsó alakú agyi endotélsejtek nem fenesztráltak, és kevés pinocitotikus vezikulát tartalmaznak (Abbott és mtsai, 2006). Az agyi endotélsejtek lumenális, azaz vér felőli felszínén vastag, erősen negatív töltésű glikokalix réteg található, ami szintén védelmi feladatot lát el (Logsdon és mtsai, 2021; Walter és mtsai, 2021). A fizikai gát mellett kémiai védelmi rendszerei is vannak az agyi endotélsejteknek, ilyenek a nagy mennyiségben kifejeződő efflux pumpafehérjék (Banks, 2016). Ezek egyirányú anyagáramlást biztosítanak az agy felől a vérbe, megakadályozva ezzel a xenobiotikumok, mérgező növényi és mikrobiális vegyületek, valamint sok gyógyszerhatóanyag agyba jutását. A vér-agy gáton előforduló egyik legismertebb efflux transzporter a P-glikoprotein (ABCB1). Emellett az agyi endotélsejtekben metabolikus enzimek is termelődnek, melyek védelmet biztosítanak a bioaktív molekulák bejutásával szemben (Campos-Bedolla és mtsai, 2014).

Számos vér-agy gáton keresztüli szállító útvonal segít az idegrendszer sejtjeinek táplálásában (Deli, 2011). Kismolekulájú, zsírban oldódó anyagok (például alkohol, nikotin) passzívan, lipid-mediált diffúzióval jutnak be a központi idegrendszerbe. Mivel a nagyobb vízzoldékony molekulák, peptidek, fehérjék nem tudnak átjutni az agyi endotélsejtek paracelluláris útvonalán a szoros kapcsolatok miatt, ezért ezeknek az anyagoknak a szállításában transzporter fehérjék (pl. SLC fehérjecsalád) vesznek részt. Ez az útvonal létfontosságú a cukrok, aminosavak, lipidek, vitaminok és más tápanyagok idegrendszerbe juttatásának szempontjából (Campos-Bedolla és mtsai, 2014). Az agyi endotélsejtek TJ-k által létrehozott polaritása azt is jelenti, hogy a vér és az agy felőli sejtmembránokon eltérő tápanyagszállító fehérjék, receptorok, ioncsatornák, efflux pumpák és enzimek találhatóak (Abbott és mtsai, 2010).



2. ábra. A neurovaszkuláris egység működésének sematikus ábrázolása egészséges és kóros állapotban (Profaci és mtsai, 2020 alapján).

A vér-agy gát működésének zavara számos neurológiai betegség kapcsán megfigyelhető, mint például a traumás agysérülés, tumor, iszkémia, epilepszia, sztrók vagy az egyes neurodegeneratív betegségek (Zlokovic, 2008; Benarroch, 2012; Profaci és mtsai, 2020). A gátrendszer károsodása során morfológiai és működésbeli változások is végbemennek (**2. ábra**). A szoros és adherens sejt-kapcsolatokat kialakító fehérjék, illetve a transzporterek kifejeződése és mintázata megváltozik, a metabolikus enzimek termelődése és működése is módosul (Benarroch, 2012). A hajszálerek bazális membránja felszakadozik, emiatt az endotélsejtek, periciták és asztrociták közötti kapcsolat, anyag- és információáramlás is sérül. Ennek hatására kórállapotokban megnövekszik a vérfehérjék és más potenciálisan neurotoxikus molekulák sejten keresztüli átjutása (Profaci és mtsai, 2020). Az egészséges agyi endotélsejtek felszínén a perifériás endotélsejtekkel ellentétben alacsony a leukocita adhézions molekulák expressziója, ezért a fehérvérsejtek átjutása a vér-agy gáton keresztül korlátozott. Kóros állapotokban megemelkedik a sejtadhézions molekulák kifejeződése a luminális membránon, és ennél fogva a fehérvérsejtek bejutása a vérből a központi idegrendszerbe (**2. ábra**; Greenwood és mtsai, 2011; Profaci és mtsai, 2020).

1.2. A vér-agy gát változásai szisztémás és idegrendszeri gyulladásokban

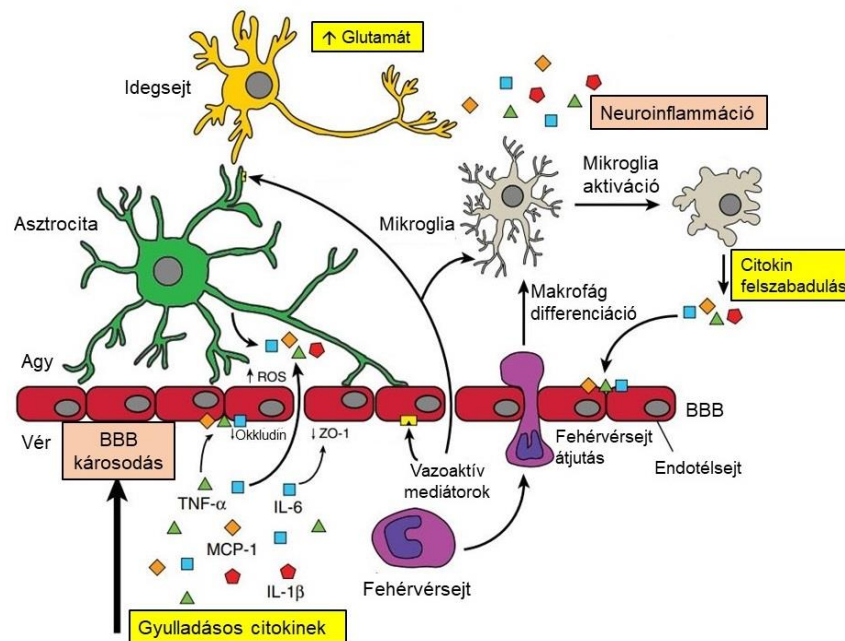
A dinamikus határfelületek biológiai működésük betöltéséhez folyamatos kölcsönhatásban állnak a külső és a belső terekkel a luminális és abluminális membránokon keresztül. A gátrendszerek homeosztázist fenntartó és védő funkciói, valamint azok vizsgálata nemcsak élettani körülmények között fontos, hanem betegségekben is. Egyrészt

a legtöbb kórtani állapotban megfigyelhetőek a helyi, és sokszor szisztémás gyulladási folyamatok, amelyek alapvetően befolyásolják a barrierék működését. Másrészt az agyi barrierék működésének romlása, illetve károsodása is hozzájárul a gyulladási folyamatok és betegségek kialakulásához (Neuwelt és mtsai, 2011; Erickson és Banks, 2018). Az idegrendszeri gyulladás összetett folyamat, amelyet a fokozottan termelődő citokinek, kemokinek és egyéb gyulladási mediátorok hoznak létre és tartanak fenn, de hozzájárul a reaktív asztrogliózis, a mikroglia sejtek aktiválódása, és a perifériás immunsejtek agyszövetbe való bejutása is. A szisztémás gyulladások során felszabaduló citokinek a keringés útján a belső gátrendszerek, így a központi idegrendszert védelmező vér-agy gát működésére is hatással vannak (Erickson és Banks, 2018). A gyulladási sejtekből felszabaduló citokinek hatására az agyi endotélsejtekben megemelkedik a kemokinek és sejtdhézis molekulák expressziója. Az endoteliális kemokinek a fehérvérsejteken lévő specifikus receptoraikhoz kötődnek, ezzel elősegítik a fehérvérsejtek kitapadását, a citoszkeleton átrendeződését, és a fehérvérsejtek átjutását a vér-agy gáton. Emellett az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak megnyílása, többek között a citokinek és mátrix-metalloproteázok hatására, lehetőséget ad a fehérvérsejtek paracelluláris transzportjára (Greenwood és mtsai, 2011). A gyulladási citokinek képesek átjutni az agyi endotél sejtrétegen (Banks és mtsai, 2018), és ez is hozzájárul a szisztémás gyulladások idegrendszeri hatásaihoz.

A központi idegrendszeri gyulladási folyamatokban számos proinflammatorikus citokin és kemokin vesz részt, ezek közül a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), az interleukin-1 β (IL-1 β), az IL-6 és a kemokin ligand-2/monocita kemoattraktáns fehérje-1 (CCL2/MCP1) a leginkább tanulmányozott (**3. ábra**; Liebner és mtsai, 2018; Setiadi és mtsai, 2018). Ezek a citokinek a szisztémás gyulladások következtében fellépő neuroinflammációban, többek között kóros elhízás során is fontosak (Marseglia és mtsai, 2014; Hoogland és mtsai, 2015). Az interleukin-6 (IL-6) citokin viselkedhet gyulladáskeltő vagy gyulladásgátló citokinként is (Garbuzova-Davis és mtsai, 2018). Az IL-6 az agyban elősegíti a mikroglia és az asztroglia sejtek aktiválódását, hozzájárul az idegsejtek és asztrociták apoptotikus pusztulásához (Sochocka és mtsai, 2017). Az IL-6 szekréciója élettani körülmények között periciták és asztrociták sejtekből történik, azonban gyulladást kiváltó kezelésre (pl. bakteriális lipopoliszacharid) az agyi endotélsejtek is termelnek IL-6 citokint.

A TNF- α fokozza a perifériás immunsejtek bejutását az agyba, elősegíti a neurodegenerációt, a gliasejtek és neuronok apoptózisát (**3. ábra**), azonban pozitív hatással is rendelkezik: hozzájárul a szöveti megújuláshoz (Sochocka és mtsai, 2017). A TNF- α

közvetlenül fokozza a vér-agy gát permeabilitását tenyészetes modelleken (Deli és mtsai, 1995), és ez a hatás állatkísérletekben is megfigyelhető volt (Ábrahám és mtsai, 1996). A TNF- α pericita, illetve asztroglia sejtekben termelődik, azonban megtalálható a gátrendszer lumenális oldalán is, tehát képes átjutni az endotélsejtek rétegén (Banks és mtsai, 2018).



3. ábra. A gyulladáskeltő citokinek és kemokinek vér-agy gátat károsító hatása. BBB: vér-agy gát, MCP1: monocyta kemoattraktáns fehérje-1, IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6, ROS: reaktív oxigéngyökök, TNF- α : tumor nekrozis faktor- α (Setiadi és mtsai, 2018 alapján).

Az IL-1 β és az MCP-1 barriert megnyitó hatását szintén kimutatták *in vitro* vér-agy gát modellen (összefoglaló közlemények: Deli és mtsai, 2005; Setiadi és mtsai, 2018). Mivel kórállapotokban több citokin együttesen termelődik és fejt ki hatását, a citokin kombinációk használata gyakori módja a betegségek modellezésének. Csoportunk korábbi munkájában a TNF- α és az IL-1 β citokinek együttes alkalmazása már alacsony koncentrációban is károsította a vér-agy gát modellt: csökkent az endotélsejt-rétegek impedanciája és elektromos ellenállása, megnőtt a jelzőanyagok átjutása, és megváltozott a kapcsolófehérjék mintázata (Harazin és mtsai, 2018). Ezek alapján kísérleteinkhez a TNF- α és IL-1 β citokinek kombinációját alkalmaztuk a gyulladással kiváltott károsodások kiváltására tenyészetes vér-agy gát modellen.

A vér-agy gát a gyulladással és a központi idegrendszeri betegségeken túl számos más, gyulladással érintettséggel bíró szisztémás betegségben is szerepet játszik (Erickson és Banks, 2018). Az elhízás egy krónikus gyulladással állapot, amiben a kardiovaszkuláris

rendszer is érintett, illetve kapcsolatban áll a cukorbetegséggel, magas vérnyomással és danatos megbetegedésekkel (Upadhyay és mtsai, 2018). A kórállapot során az agyi érhalózat változásain kívül a vér-agy gáton keresztüli leptintranszport is sérül, ez is oka lehet a leptin rezisztenciának (Rhea és mtsai, 2017). Az elhízás több módon válthat ki krónikus gyulladást: a zsírszövet által termelt gyulladáskeltő citokinek szintje megemelkedik, ennek hatására pedig szisztémás gyulladás, inzulin-rezisztencia és egyéb kórállapotok is kialakulhatnak (Bulló és mtsai, 2003; Marseglia és mtsai, 2014). A TNF- α és IL-1 β citokinek az elhízás során kialakuló gyulladásban is kulcsfontosságú szerepet játszanak (Marseglia és mtsai, 2014). A betegség során megemelkedik a leptin szintje a vérben. A leptin egy zsírsejtek által kiválasztott anorektikus hormon, ami a központi idegrendszerbe jutva csökkenti az étvágyat, nagy mennyiségben azonban leptin rezisztencia kialakulásához vezet (Andreoli és mtsai, 2019). A leptin rezisztencia kialakulása során a két fő folyamat a perifériás és hipotalamikus gyulladás (de Git és Adan, 2015), valamint a leptin akadályozott bejutása az agyba (Andreoli és mtsai, 2019). Ahhoz, hogy a perifériás sejtekben termelődő leptin kifejthesse a hatását az agyban, át kell jutnia a vér-agy gáton (Banks és mtsai, 1996; Bjørbaek és mtsai, 1998). A leptin rezisztencia és a leptin szabálytalan transzportja közötti összefüggést már rágcsló modellen és elhízott betegeken is leírták (Caro és mtsai, 1996; Banks, 2008).

1.3. A glutamát szerepe idegrendszeri betegségekben

A glutamát a központi idegrendszer egyik legfontosabb neurotranszmittere, melynek vérben mért koncentrációja élettani körülmények között az 50-100 μM tartományban mozog. Receptoraival együtt meghatározó szerepe van különböző neuroinflammációval járó kórállapotok kialakulásában (**3. ábra**), mint például az epilepszia és a sztrók (Simeone és mtsai, 2004). A metabotróp és ionotróp glutamát receptorok erős expressziót mutatnak a központi idegrendszerben, főleg az agykéregben, a limbikus területeken és a bazális ganglionokban (Hollmann és Heinemann, 1994; Simeone és mtsai, 2004). Glutamátkötés hatására konformáció-változás történik a receptorok csatornájában, így kationok áramlanak a sejtbe (Simeone és mtsai, 2004). Általánosságban a receptorok áteresztik a nátrium- és kálium-ionokat, azonban a kalciumiont csak egyes típusok (Ozawa és mtsai, 1998). A glutamát receptorok túlzott aktivitása során kontrollálatlan kalciumion-beáramlás történik, ami excitotoxicitáshoz, az idegsejtek pusztulásához és idegi károsodáshoz vezet (Simeone és mtsai, 2004).

A metabotróp glutamát receptorok G-proteinnel kapcsolt, számos szignáltranszdukciós útvonallal kapcsolatban álló receptorok. Aktiválódásuk lassabb, mint

az ionotróp receptorok esetében, de hosszantartó hatás alakul ki. Nyolc metabotróp glutamát receptort különíthetünk el (mGluR1-8), melyek egy kivétellel (mGluR6) megtalálhatóak az ideg- és gliasejtekben. Szerkezetüket tekintve hét transzmembrán doménből állnak (M1-7), ezen kívül rendelkeznek egy intracelluláris C-terminális, és egy extracelluláris N-terminális véggel, az utóbbin foglal helyet a glutamát kötőhely (Simeone és mtsai, 2004).

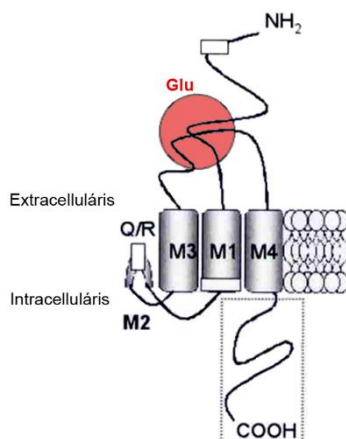
Az ionotróp glutamát receptorok ligand által szabályozott kation csatornák, melyek az idegsejtek depolarizációját okozzák (Dingledine és mtsai, 1999). Az agonistájuk szelektivitása alapján három csoportra osztjuk őket: N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA) receptorok és kainát receptorok. Minden receptor további altípusokra bontható, melyek szerkezete alapján véve megegyezik: három transzmembrán (M1, M3, M4) és egy hajtúszerű doménből (M2) épülnek fel. Tartalmaznak még egy extracelluláris N-terminális- és egy intracelluláris C-terminális régiót, valamint egy plusz extracelluláris hurkot, amely felszínt biztosít a ligand számára (Simeone és mtsai, 2004).

Az NMDA receptorok nátrium- és kalciumion-beáramlás, illetve káliumion-kiáramlás révén hosszantartó változásokat idéznek elő. Glutamát- és glicin-kötő részeket is tartalmaznak: a glutamát kötődése önmagában nem elegendő a receptor aktiválódásához, ehhez a glicin kötődésére is szükség van. Ezen kívül különböző poliaminok, cink és protonok kötőhelyeivel is rendelkeznek, melyek szintén modulálhatják a receptorokat (Sun és mtsai, 2002). Nyugalomban az NMDA receptorok pórusában magnéziumionok kötődnek, amik egy feszültségfüggő blokkot hoznak létre. Ha a sejt depolarizálódik (AMPA vagy kainát receptor által), akkor megszűnik a magnéziumion-blokk, és így az NMDA receptor is képes aktiválódni. Összességében tehát a receptor aktivációjához szükséges a glutamát, a glicin és a membrán depolarizációja is. Az NMDA receptorok glutamáthoz való affinitása ötszázszor magasabb, mint az AMPA receptoroké, mégis kevésbé járulnak hozzá az alap szinaptikus jelátvitelhez, amely a feszültségfüggő blokkal magyarázható (Simeone és mtsai, 2004).

Az AMPA receptorok legfontosabb szerepe a gyors, serkentő szinaptikus jelátvitelben van a központi idegrendszerben. Széleskörű expressziót mutatnak neuronokban, oligodendrocitákban és asztrocitákban is (Simeone és mtsai, 2004). Az AMPA receptorok hiányoznak az éretlen szinapszisokból, így a késleltetett expressziójuk fontos szerepet játszik a fejlődő agy plaszticitásának kialakulásában. Patkány iszkémiás modellen bebizonyították, hogy a hippokampusz CA1 régiójának piramidális sejtjeiben a sejthalált megelőzően megnövekedett az AMPA receptorok által irányított kalciumion-beáramlás, ezt később humán kísérletben is kimutatták. Ezzel igazolták, hogy az AMPA egy excitotoxikus vegyület

(Simeone és mtsai, 2004). Csoportunk korábban agyi endotélsejteken kimutatta a metabotróp, NMDA és AMPA glutamát receptorok altípusait (Krizbai és mtsai, 1998).

A kainát receptorok ötféle alegység (GluR5-7, KA-1-2) kombinációjából felépülő ionotróp receptorok (**4. ábra**). Előfordulhatnak pre- és poszt-szinaptikus végződéseken, ekkor a fő szerepük a szinaptikus jeltovábbítás szabályozása, illetve extraszinaptikusan, ekkor pedig az idegsejtek ingerlékenységét befolyásolják (Huettner, 2003). A hippocampális moharostok szinapszisaiban irányítani tudják az axonális filopódiumok mozgását, ami pedig arra utal, hogy szerepük van a szinapszisok érésében is (Tashiro és mtsai, 2003). A GluR6 és KA-2 alegységekből felépülő receptorok részt vesznek az ismétlődő rohamok kialakításában krónikus epilepszia során (Crépel és Mulle, 2015). Egy másik kísérlet kapcsán GluR6 génkiütött egerekben azt találták, hogy kevésbé hajlamosak a kainát által indukált rohamokra, tehát a GluR6 alegység közvetíti a kainát epilepsiás rohamot kiváltó hatását (Simeone és mtsai, 2004).



4. ábra A kainát receptorok szerkezete. Glu: glutaminsav kötőhely; M1-M4: transzmembrán domének. (Simeone és mtsai, 2004 alapján)

Minden kainát receptor alegység három transzmembrán doménből és egy hajtúszerű doménből áll (**4. ábra**). Az extracelluláris N-terminális domén tartalmazza a glutamát kötőhelyet, és hosszabb struktúrát alkot, mint a C-terminális domén. A GluR5 és 6 alegységek mRNS szerkesztésen eshetnek át a Q/R régióban a hajtúszerű doménon, ami csökkenti a receptor átjárhatóságát kétértékű kationokra. Azok a kainát receptorok, amik tartalmaznak KA-1 vagy KA-2 alegységet, érzékenyebbek a glutamatra és a kainátra (Crépel és Mulle, 2015). *Status epilepticus* állapotmodellben kimutatták a GluR5-6 és a KA1-2 receptorok expresszióját asztrocitákban, azonban ezek az alegységek nem fejeződtek ki a kontroll, kezeletlen állatokban (Crépel és Mulle, 2015).

1.4. Az excitotoxinok hatása a vér-agy gátra

A glutaminsavnak fontos szerepet tulajdonítanak számos idegi folyamatban és idegrendszeri megbetegedésben (pl. agyi hipoxia, epilepszia). Hatása az ionotróp és metabotróp glutamát receptorokon keresztül érvényesülhet. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy primer patkány agyi endotélsejteken expresszálódnak a metabotróp, NMDA, illetve AMPA receptorok (Krizbai és mtsai, 1998). Patológias körülmények között megemelkedik az extracelluláris glutamát koncentráció, ami a permeabilitás fokozódását eredményezi a vér-agy gáton (**5. ábra**). Ez a folyamat több útvonalon is megvalósulhat. A glutamát hatására aktiválódik az ornitin-dekarboxiláz, ennek hatására megnő a poliaminok szintje, valamint szignifikáns növekedést vált ki a kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II foszforilációjában. Ezek a folyamatok mind a vér-agy gát megnyílásához vezetnek, amit primer agyi endotélsejt tenyészetben igazoltunk (Krizbai és mtsai, 1998). Csoportunk azt is leírta, hogy a glutamát hatással van az agyi endotélsejtek szoros sejt kapcsolataira is (András és mtsai, 2007). Csökkenti az okkludin mennyiségét, illetve a fehérje átrendeződését eredményezi a sejthatárokon. Az ionotróp receptorok gátlása révén csökkenthető agyi endotélsejtekben az okkludin-átrendeződés, a megnövekedett permeabilitás, ezzel megakadályozható a vaszkuláris ödéma kialakulása (András és mtsai, 2007). Az iszkémia és sztrók kapcsán ismert, hogy az agyi erekben a csökkenő véráramlás hatására kevesebb oxigén és tápanyag jut el a sejtekhez, emiatt kiürülnek az ATP-raktárak, és könnyebben kijut a glutamát az idegsejtekből az extracelluláris térbe. A magas extracelluláris glutamát koncentráció megnyitja a vér-agy gátat, és emellett túlingerli a glutamát receptorokat, ami megnöveli az intracelluláris kalciumion-koncentrációt és az idegsejtek pusztulásához vezet (Dempsey és mtsai, 2000).

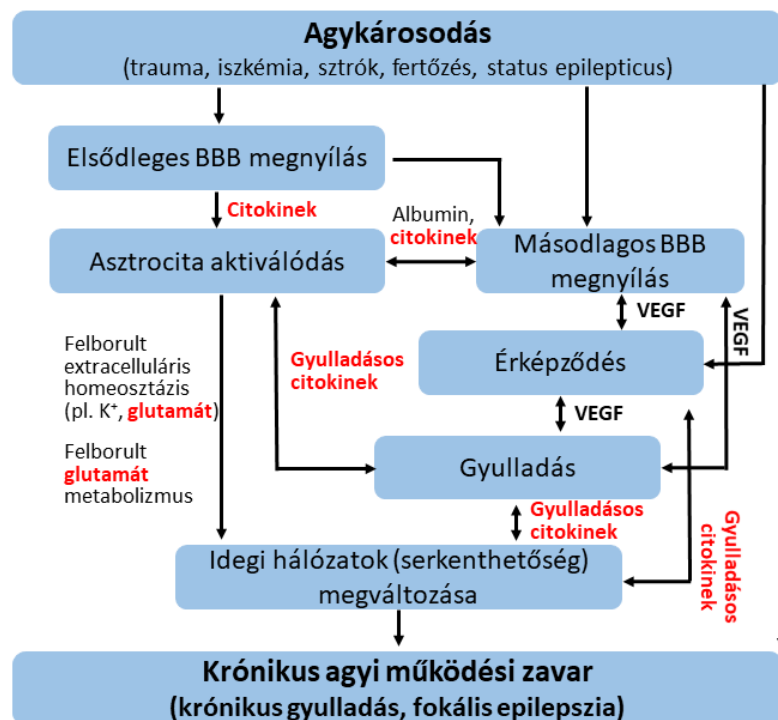
A kainát a glutamát szerkezeti analógja, amit a kainát receptorok nagy affinitással kötnek. Ezt az elterjedt farmakont először a *Digenea simplex* nevű vörös alga fajból izolálták. A kainsav mint excitotoxin hosszútávú morfológiai változásokat képes előidézni az idegsejteken. Emlős agyba injekciózva hasonló agyi károsodásokat indukál, mint amelyek temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegeknél figyelhetők meg, ezért kísérletesen epilepszia kiváltására alkalmazzák. Ennek során az excitotoxicitáson kívül az idegsejtek pusztulása, vér-agy gát károsodás és neurovaszkuláris változások is megfigyelhetők (Klement és mtsai, 2019).

Az epilepszia kémiai úton történő kiváltására már számos anyagot leírtak, mint a pilokarpin, a tetanusz toxin, a kinolinsav és a bikukullin, a legelterjedtebbnek mégis a

kainsav bizonyult. A károsító anyagot bejuttathatják szisztémásan vagy célzottan az agyba, ettől függően eltérő hatásokat válthat ki. Az amigdalába beinjekciózott kainsav patkányokban görcsrohamot indukál, ami a beadás helyétől folyamatosan szétterjed. A roham után későbbi időpontban szignifikáns idegi károsodás volt megfigyelhető a hippocampusz területén (Jefferys és mtsai, 2016). A hippocampusz területére bejuttatott kainsav szintén rohamokat idézett elő, ezen kívül jelentkezett még egyoldali hippocampális atrófia és neurodegeneráció is. Érdekesség, hogy amennyiben altatásban lévő állatokba juttatják be az anyagot, akkor a görcsroham az 5- 21. napon alakul ki, míg ha éber állatokba, akkor a roham sokkal korábban jelentkezik, már alig 20 óra elteltével (Jefferys és mtsai, 2016). A szisztémás, intraperitoneálisan bejuttatott kainsav patkány modellen idegsejtpusztulást és a moharostok terjedését idézi elő (Miyamoto és mtsai, 2008). Ezen kívül vazogén agyi ödéma kialakulását indukálja, főleg a talamuszban, valamint citotoxikus ödéma kialakulását a hippocampusz és a piriform kéreg területén (Sztriha és mtsai, 1986).

1.5. A citokinek és a glutamát szerepe a vér-agy gát megnyílásában betegségekben

A vér-agy gát elsődleges károsodását okozhatja trauma, gyulladás, fertőzés, és kialakulhat sztrók, agyi iszkémia, epilepszia hatására is (5. ábra).



5. ábra A citokinek, a glutamát és a vér-agy gát megnyílás központi szerepe a krónikus agyi működési zavarok kialakulásában (Friedman és Heinemann, 2012 alapján).

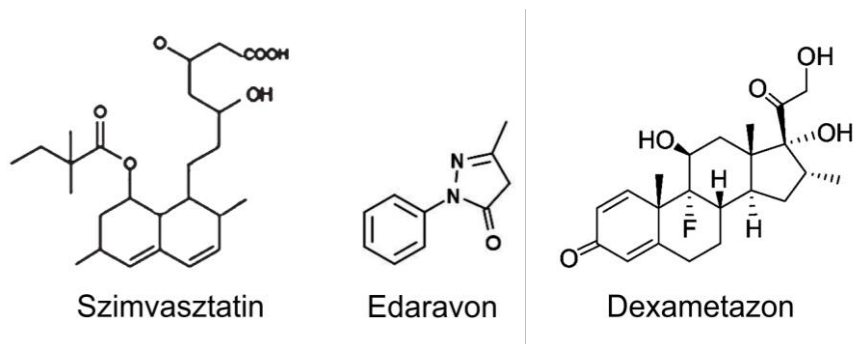
A szérum fehérjék (albumin, trombin) élettani körülmények között nem jutnak be a központi idegrendszerbe, patológiás körülmények között azonban megjelenésük az asztrociták aktiválódását eredményezi. Az aktivált asztrocitákból gyulladáscsökkentő citokinek szabadulnak fel, ezek pedig a szérum fehérjékkel együtt váltják ki a másodlagos vér-agy gát károsodást (**5. ábra**). A sérült agyszövetben a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) expressziója megemelkedik az idegsejtekben és az asztrocitákban, a VEGF receptor tirozin-kinázok kifejeződése pedig fokozódik az idegsejtekben és agyi endoteliáriumokban. A VEGF neovaszkularizációhoz, a vér-agy gát megnyílás fennmaradásához és a neuroinflammáció fokozódásához vezet a gyulladáscsökkentő citokinek további emelkedésén keresztül. A citokinek által fokozott asztrocita aktiválódás a megemelkedett extracelluláris glutamát szinten és a megváltozott glutamát metabolizmuson keresztül pedig növeli az idegi hálózatok serkenthetőségét, ami károsan hat a neurovaszkuláris egység működésére (**5. ábra**). Ezek a folyamatok egymást erősítve idegi működési zavarok, krónikus gyulladás, fokális epilepszia kialakulását eredményezik az agyban (Friedman és Heinemann, 2012).

1.6. Vér-agy gát protektív gyógyszerhatóanyagok

A vér-agy gát nélkülözhetetlen szerepet tölt be az agyi homeosztázis fenntartásában és a központi idegrendszer fiziológiájában, ezért működési zavara a korábban említett útvonalakon keresztül (**5. ábra**) jelentősen hozzájárul az idegrendszeri kórállapotok kialakulásához és súlyosbodásához (Zlokovic, 2008; Friedman és Heinemann, 2012). Mindezek alapján a vér-agy gát védelme terápiás célpontként szolgálhat számos idegrendszeri betegségben (Krizanac-Bengez és mtsai, 2004; Vangilder és mtsai, 2011). A vaszkuláris gyulladás és az oxidatív stressz meghatározó eleme számos központi idegrendszeri betegségnek, mint a sztrók, az amiotrófiás laterálszklerózis vagy az epilepszia, ezért a gyulladáscsökkentő és antioxidáns szerek használata szintén fontos ezekben a kórképekben (Marchi és mtsai, 2011; Watanabe és mtsai, 2018). Kísérleteink során három hatóanyagot vizsgáltunk az agyi endoteliáriumokon megfigyelt károsító változások kivédésére, a gyulladáscsökkentő dexametazont és szimvasztatint, valamint a szabadgyökfogó edaravont (**6. ábra**).

A sztatinek népszerű és hatékony lipidcsökkentő szerek a hiperkoleszterinémia kezelésére, illetve kardiovaszkuláris betegségek megelőzésére. Amellett, hogy a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A redukciót gátolják, és ezzel a vér koleszterin szintjét csökkentik, jótékony hatásukat számos területen kifejtik. Neuroprotektív hatást mutatnak sejteken és állatkísérletekben (Nagaraja és mtsai, 2006), és immunszuppressziós és antioxidáns hatással

is bírnak a szuperoxid-termelés és a lipid-peroxidáció csökkentése révén (Ramirez és mtsai, 2011). További pleiotróp tulajdonságokkal is rendelkeznek: gátolják a gyulladásos válasz kialakulását, javítják az endotélsejt funkciót, valamint antiapoptotikus, antitrombotikus és antikonvulzív hatásuk is van (Oesterle és mtsai, 2017).



6. ábra. A kísérletekben használt, irodalmi adatok alapján a vér-agy gáton védőhatásának bizonyult vegyületek szerkezete.

A pleiotróp hatásuk miatt a sztatinok előtérbe kerültek, mint lehetséges neuroprotektív hatóanyagok az Alzheimer-kór, az akut sztrók vagy az epilepszia kapcsán. A sztatinok védőhatását több összehasonlító munkában is tanulmányozták. Sierra és munkatársai 9 sztatinot vizsgáltak, melyek közül a félszintetikus, lipofil szimvasztatin (**6. ábra**) bizonyult a leghatásosabbnak az idegsejt károsodások elleni védelemben, és a koleszterinszint csökkentésében neuronokban. Kis mérete, kompakt szerkezete és jó zsírolékonysága miatt a szimvasztatin lehet képes a legjobban átjutni a vér-agy gáton, ami fokozhatja az *in vivo* hatékonyságát (Sierra és mtsai, 2011). A szimvasztatin nem csak az NMDA által kiváltott excitotoxikus sejthalál ellen védőhatású tenyésztett idegsejtekben, hanem az epilepszia állatmodelljeiben is a leghatékonyabbnak bizonyult a sztatinok között (Banach és mtsai, 2014). Kainát-indukált rohamok esetén a szimvasztatin és a lovasztatin csökkentette legnagyobb mértékben a rohamok súlyosságát, a gyulladást és a sejthalált a hippocampusz területén. Emellett klinikai vizsgálatok is alátámasztották a szimvasztatin jótékony hatását epilepsziás betegekben (Banach és mtsai, 2014). A szimvasztatin epilepszia állatmodellben normalizálta az agyi elektromos aktivitást, és fokozta az endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz (NOS3/eNOS) expresszióját agymintákban, ami az esetleges vér-agy gát hatására utal (Seker és mtsai, 2015). Ezek alapján választottuk a szimvasztatint, hogy a védőhatását vizsgáljuk kainát károsítással szemben tenyésztetes vér-agy gát modellen.

Az edaravon (**6. ábra**) egy japán gyógyszerhatóanyag, amit akut agyi iszkémia és agyi infarktus utáni felépülés elősegítésére, illetve amiotrófiás laterálszklerózis kezelésére

használnak (Watanabe és mtsai, 2018). Csoportunk egy korábbi munkája során már vizsgálta a szabadgyökfogó edaravon agyi endotélsejtekre kifejtett védőhatását (Tóth és mtsai, 2014). A tenyésztett humán agyi endotélsejtek (hCMEC/D3) károsodását metilglioxállal váltottuk ki, ami gyulladáshoz vezet és vaszkuláris károsodást okoz. A metilglioxál idő- és koncentráció-függő módon károsította az agyi endotélsejteket, csökkentette a sejtek életképességét és a barrier integritását, valamint növelte a ROS-felszabadulást és a permeabilitást. Az edaravon kivédte a metilglioxál toxikus hatásait. A hatóanyag önálló hatását is leírtuk, elősegítette a TJ képződést és fokozta a gát szorosságát humán agyi endotélsejteken (Tóth és mtsai, 2014). További kísérletek is felvetették az antioxidáns kezelést, mint új terápiás megközelítést a központi idegrendszeri károsodások kezelésére. Kainát-indukálta epilepszia modellben az edaravon szignifikánsan csökkentette a neuronális sejthalált és a moharostok növekedését, gátolta a hidroxil gyökök képződését és a lipid peroxidációt (Nomura és mtsai, 2014), valamint kivédte a kainsav-indukált glutation csökkenést és a 4-hidroxi-2-nonenal emelkedést (Miyamoto és mtsai, 2008). Az edaravon nem csak hatékony antioxidáns, hanem antinekrotikus, antiapoptotikus és citokin-ellenes hatással is rendelkezik, amit több betegség állatmodelljében is igazoltak (Kikuchi és mtsai, 2012).

A glükokortikoidok közé tartozó hidrokortizon a vér-agy gát barrier funkciót fokozza: csökkenti az agyi endotél egysejtréteg permeabilitását, és megemeli a transzendenteliális elektromos ellenállást (Hoheisel és mtsai, 1998). Primer patkány agyi endotélsejt és asztrocita ko-kultúra modellen is ugyanezt a hatást fejté ki (Perrière és mtsai, 2007). A hidrokortizon hatására erősödik az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolat, amit egér és sertés primer tenyészeteken is igazoltak (Schrot és mtsai, 2005). A dexametazon egy szintetikus glükokortikoid, amit széleskörűen használnak a gyógyászatban elsősorban erős gyulladáscsökkentő hatása miatt (**6. ábra**). Immortalizált agyi endotél sejtvonalon a dexametazon kezelés (1 μ M) csökkentette a sejtréteg paracelluláris átjárhatóságát többféle marker molekulára is (Romero és mtsai, 2003). Ennek hátterében az állhat, hogy a kezelés hatására megemelkedik az okkludin és a ZO-1 szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék mennyisége a sejtekben, a ZO-1 festődés folytonossága pedig erősebbé válik (Romero és mtsai, 2003). Ezt a hatást igazolták immortalizált egér agyi endotélsejt-vonalon is (Förster és mtsai, 2007). Primer agyi endotélsejteken azt is kimutatták, hogy a P-glikoprotein efflux transzporter kifejeződése szignifikánsan megemelkedett dexametazon kezelés hatására (Torres-Vergara és mtsai, 2018). Pilokarpin-indukált *status epilepticus* során a dexametazon csökkentette a rohamok súlyosságát, a mortalitást, valamint megvédte a vér-agy gátat a

károsodástól (Marchi és mtsai, 2011). A dexametazon protektív hatását kainát-indukált rohamok esetén is vizsgálták (Sztriha és mtsai, 1986). A dexametazonnal előkezelt patkányokban jelentősen csökkent a vazogén agyödéma kialakulása a csak kainsavval oltott csoporthoz képest. A dexametazon az agyi erek permeabilitását csökkentő hatását valószínűleg a foszfolipáz-A2 enzim gátlásán és védő proteinek, lipomodulin, makrokortin szintézise révén fejtette ki (Sztriha és mtsai, 1986). Az elmúlt éveket beárnyékoló COVID-19 koronavírus járvány, amit a SARS-CoV-2 vírus okoz, a légzési nehézségek és a tüdőgyulladás mellett a központi idegrendszert érintő tünetekkel is jár, mint a szag- és ízérzékelés elvesztése, fejfájás, látási zavarok és tudatzavar, emellett idegrendszeri betegségekkel (agyvérzés, iszkémia, agyvelőgyulladás) is kapcsolatba hozható (Fujimoto és mtsai, 2022). Több kísérlet is alátámasztja, hogy a SARV-Cov-2 vírus a vér-agy gáton keresztül bejut az agyba. Az agyi endotélsejtekben található β -szekretáz 1 egy aszparaginsav-proteáz, transzmembrán fehérje, ami hozzájárul a vér-agy gát integritásának elvesztéséhez. A SARS-CoV-2 vírus megnöveli a β -szekretáz 1 fehérje szintjét az agyi endotélsejtekben, ezáltal a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék kifejeződését csökkenti, így fokozza a vér-agy gát működési zavarát és a cerebrovaszkuláris betegségek kialakulását (Fujimoto és mtsai, 2022). A dexametazon pozitív hatásait kimutatták súlyos SARV-Cov-2 fertőzés esetében és az intenzív kezelés egyik alap gyógyszere lett. A nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B), a ciklooxygenáz-2 és a gyulladáscsökkentő citokinek gátlása révén csillapítja a fertőzés során kialakuló szisztémás sokszervi gyulladást, és csökkenti a központi idegrendszeri szövődmények kialakulását (Al-Harbi és mtsai, 2016; Elizagaray és mtsai, 2022), ami kapcsolatban állhat nem csak a gyulladást és immunaktiválódást csökkentő, hanem a vér-agy gát integritást fokozó hatásával is.

1.7. Vér-agy gát protektív természetes hatóanyagok

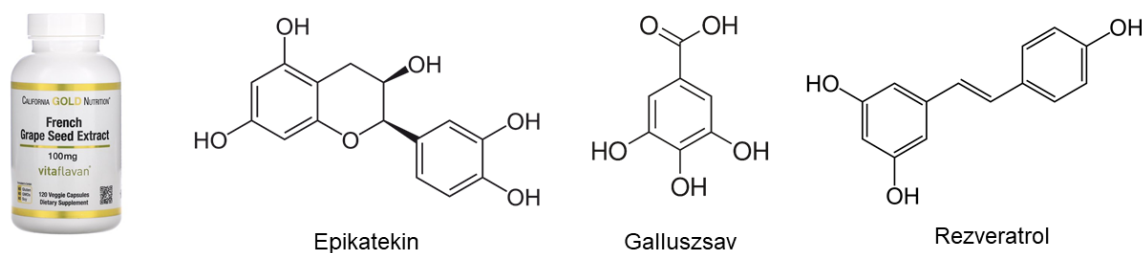
Az elmúlt évtizedben előtérbe kerültek a természetes vegyületek, mint terápiás szerek idegi gyulladások kezelésében, főképpen az antioxidáns, antiapoptotikus, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatásuk miatt (Khadka és mtsai, 2020; Makkar és mtsai, 2020; Gugliandolo és mtsai, 2020). Sok növényi hatóanyag képes nagy affinitással kötődni különböző agyban található receptorhoz, ezáltal specifikusan serkentenek vagy gátolnak számos jelátviteli útvonalat, és fejtik ki hatásukat az idegi gyulladással járó központi idegrendszeri betegségekben (Conte és mtsai, 2017; Silva és mtsai, 2019). A természetes protektív hatóanyagok másik előnyös tulajdonsága, hogy kevesebb mellékhatással rendelkeznek a szintetikus vegyületekhez képest (Khadka és mtsai, 2020; Silva és mtsai,

2019). A természetes vegyületek közül a fitokemikáliák (pl. flavonoid és nem-flavonoid polifenolok, fenolsavak, terpenoidok, alkaloidok) és egyéb, élelmiszerben is megtalálható vegyületek hatását széles körben kutatják idegi gyulladással járó központi idegrendszeri betegségek, mint az Alzheimer-kór, Parkinson-kór és agyvérzés lehetséges kezelésére (Makkar és mtsai, 2020; Khadka és mtsai, 2020). A flavonoid polifenolok közül a kamillából származó apigenin, a zöld teában is megtalálható epigallokatekin-3-gallát, és az antocianinok széles körben kutatott vegyületek, melyeknek már igazolták szabadgyökfogó, antiapoptotikus, gyulladáscsökkentő, vírusölő és neuroprotektív hatásait (Spencer és mtsai, 2012). A kurkuma az egyik legrégebben alkalmazott nem-flavonoid polifenol, amely jótékony tulajdonságú többek között a kardiovaszkuláris betegségek, a cukorbetegség, a daganatos megbetegedések és az idegrendszeri gyulladások esetében (Khadka és mtsai, 2020). Több növényi hatóanyag tart jelenleg is a klinikai vizsgálatok II-IV. fázisában: például az Alzheimer-kór során a mikroglia- és asztrocita-aktiválódás gátlására és az amiloid aggregáció csökkentésére vizsgálják többek között a kurkumint (Longvida®) és az epigallokatekin-3-gallátot (Khadka és mtsai, 2020).

A szőlő (*Vitis vinifera*) az egyik legrégebbi nemesített növény, melyet az értékes tápanyagaiért és gyógyhatásai miatt természetnek és fogyasztanak. A szőlőtermesztés története 6000 éves múltra tekint vissza, és már ókori írásos emlékek is rendelkezésre állnak a szőlő egészségre gyakorolt pozitív hatásairól (Kamrani Rad és mtsai, 2019). Az etnobotanika is számos betegség gyógyítására alkalmazza, mint például különböző bőr- és szemproblémák, hányinger, torokfájás, aranyér, vese- és májbetegségek (Akaberi és Hosseinzadeh, 2016), illetve kardiovaszkuláris megbetegedések (Paul és mtsai, 1999). A szőlővegyületek elhízás során mutatott előnyös tulajdonságait már kísérletes és klinikai vizsgálatokkal igazolták, azonban a molekuláris mechanizmusok még nem teljesen ismertek (Aragonès és mtsai, 2016a; Akaberi és Hosseinzadeh, 2016).

A fenolos vegyületek olyan másodlagos növényi metabolitok, amelyek megtalálhatóak egyes zöldségekben, gyümölcsökben és azokból készült italokban, mint például a szőlőben és a borban is (Del Rio és mtsai, 2013; Akaberi és Hosseinzadeh, 2016). A szőlő, és a szőlőből származó termékek számos bioaktív fenolos vegyületet tartalmaznak, ennek köszönhetik olyan jótékony tulajdonságaikat, mint a gyulladáscsökkentő, antioxidáns és kardioprotektív hatás (Georgiev és mtsai, 2014; Nassiri-Asl és Hosseinzadeh, 2016). Ezen kívül egyes szőlő polifenolok gátolják a gyulladást előidéző citokinek termelődését a zsírszövetben (da Costa és mtsai, 2017), és protektív hatást fejtenek ki a vér-agy gátra (Campos-Bedolla és mtsai, 2014). A szőlő egyik legfontosabb nem-flavonoid bioaktív fenolos vegyülete a

rezveratrol (RSV, **7. ábra**), ami főleg a kardiovaszkuláris betegségekben nyújtott protektív hatásairól ismert (Nassiri-Asl és Hosseinzadeh, 2016; Wiciński és mtsai, 2018). Korábbi kísérletek alapján az RSV gátolni tudja a leptin rezisztencia kialakulását is (Aragonès és mtsai, 2016a).



7. ábra. A kísérletekben használt szőlőmag kivonat típusa, és a fenolos vegyületek szerkezete.

A proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat (GSPE, **7. ábra**) különböző fenolos vegyületeket tartalmaz, van benne többek között epikatekin és galluszsav, de rezveratrol nincs. A GSPE a STAT3 útvonal fokozása révén csökkenti a gyulladást, befolyásolja bizonyos leptin receptorok kifejeződését, és fokozza a proopiomelanokortin hormon expresszióját, ami a testsúly szabályozásában fontos (Ibars és mtsai, 2017). A galluszsav egy fenolsav (**7. ábra**), ami számos növényben (alma, szőlő, eper), valamint a teában és a borban is megtalálható. Gyulladáscsökkentő, antioxidáns, tumorellenes, antivirális és neuroprotektív hatással is rendelkezik. Emellett gátolja a reaktív oxigéngyökök termelődését, és az idegsejtek pusztulását (Khadka és mtsai, 2020). A flavonoidok közé tartozó epikatekint (**7. ábra**) tartalmazza a kakaó, a szőlő és a zöld tea is. Az epikatekin védőhatását igazolták oxidált LDL-koleszterin okozta neuronális sejthalál ellen, és az LDL-koleszterin okozta fehérjevaltozások ellen is hatékony volt endotélsejtekben, így kivédte az endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz (NOS3/eNOS) csökkenését (Steffen és mtsai, 2007).

2. Célkitűzések

A teljes szervezetet érintő és idegrendszeri gyulladáshoz vezető folyamatok, az azokat kiváltó citokinek, valamint az excitotoxinok mind hozzájárulhatnak a vér-agy gát károsodásához betegségekben. Kísérletes állatmodelleken a kainsav által kiváltott vér-agy gát károsodásról már rendelkezésre állnak adatok, de a kainsav közvetlen hatását agyi endotélsejt tenyészeteken eddig nem vizsgálták. Mivel a vér-agy gát károsodás fontos eleme sok idegrendszeri betegség patomechanizmusának, ezért a vér-agy gát védelme fontos terápiás célpont lehet ezek gyógyításában. A gyulladáshoz vezető citokinek agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásairól már számos adat ismert, azonban ezek kivédése a vér-agy szintjén továbbra is fontos feladat.

Mindezek alapján célul tűztük ki, hogy elsőként:

- vizsgáljuk a kainsav receptorok kifejeződését a vér-agy gátat alkotó sejteken,
- tanulmányozzuk a kainsav közvetlen hatását
 - az agyi endotélsejtek életképességére, morfológiájára, szabadgyök és nitrogén-monoxid termelésére,
 - az agyi endotélsejtek nitrogén-monoxid-szintáz génjének kifejeződésére,
 - és a tenyészetes vér-agy gát modell permeabilitására;
- gyógyszerhatóanyagokat vizsgáljunk a kainsav hatásának kivédésére
 - az agyi endotélsejtek életképességére, morfológiájára, szabadgyök és nitrogén-monoxid termelésére,
 - a tenyészetes vér-agy gát modell permeabilitására;
- feltárjuk a szőlő fenolos vegyületek és a proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat hatását önállóan és citokin-károsítással szemben
 - az agyi endotélsejtek morfológiájára, szabadgyök és nitrogén-monoxid termelésére,
 - az agyi endotélsejtekben belül az NF- κ B sejtmagi transzlokációra,
 - a leptin receptorok agyi endotélsejtekben való kifejeződésére,
 - a tenyészetes vér-agy gát modell permeabilitására;
 - és a tenyészetes vér-agy gát modellen keresztüli leptintranszportra.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

A primer agyi endotél- és pericita sejtek, valamint az agykéreg és mikroér minták izolálásához 3 hetes Wistar patkányokat használtunk, hímeket és nőstényeket egyaránt. Az asztrogliázis izolálásához újszülött patkányokra volt szükségünk. Az állatok a Szegedi Biológiai Kutatóközpont konvencionális állatházából származtak, ahol a kísérletek előtt állandó, szabályozott körülmények között voltak tartva (12-12 óra fény/sötét ciklus, 21 °C, ivóvíz és rágcsálótáp igény szerint). Az Európai Unió által alkotott, az állati jólétről szóló és az állatvédelem alapjait meghatározó törvények (2010/63/EU) szerint a szervek felhasználása nem minősül állatkísérletnek, így nem volt szükségünk állatkísérletes engedélyre.

3.2. Vegyszerek

Minden laboráru, reagens és vegyszer beszerzése a Sigma-Aldrich Kft.-től (Merck Life Sciences) történt, hacsak másképpen nem jelöltük.

A proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat (GSPE) egy kereskedelemben elérhető termék (Vitaflavan®), amit a Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, Franciaország) cég bocsátott a rendelkezésünkre. A fehér és kék szőlő magjából származó anyagból extrakcióval eltávolítják a magas molekulatömegű oligomer proantocianidineket (tallinokat), az alacsony molekulatömegű bioaktív oligomer proantocianidineket pedig besűrítik. 100 kg szőlőmagból kb. 1 kg kivonat keletkezik. A GSPE fenolos vegyület tartalma magasabb, mint 96%. A kivonat $33,6 \pm 12,7$ mg/g epikatekint és $15,1 \pm 3,5$ mg/g galluszsavat tartalmaz, azonban rezveratrol nem található benne (Baselga-Escudero és mtsai, 2014). A rezveratrolt a Fabron Iberica (Barcelona, Spanyolország) cégtől szereztük be.

3.3. Sejttenyésztés

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

A kísérleteinket primer patkány agyi endotél egysejtrétegen, valamint a permeabilitási teszt és a sejtkapcsoló fehérjék immunfestése esetében három sejttypusból álló ko-kultúra modelleken végeztük, amelyekhez primer patkány agyi endotél-, pericita- és gliasejteket tenyésztettünk együtt. A különböző sejttypusok izolálását és a modellek összeállítását csoportunk már több közleményében is leírta (Nakagawa és mtsai, 2009; Walter és mtsai, 2015; Harazin és mtsai, 2018).

3.3.1.1. Agyi endotélsejtek tenyésztése

A Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biológiai Barrierek Kutatócsoportjában a primer agyi endotélsejtek tenyésztése hosszú múltra tekint vissza (Deli és mtsai, 1993 és 1996). Munkánk során a 2007-ben Veszelka és munkatársai által leírt agyi endotélsejt izolálásról szóló protokollt alkalmaztuk. A kísérletek során a 3 hetes Wistar patkányokat CO₂-dal történő túlaltatás után dekapitáltuk, felnyitottuk a koponyájukat és eltávolítottuk az agyukat, amelyeket jéghideg foszfát pufferbe (PBS) helyeztünk. Ezután steril szűrőpapíron eltávolítottuk a kisagyat, a fehérállományt, az agyhártyákat, és a *choroid plexust*. A hátramaradó szürkeállományt DMEM tápfolyadékba (Dulbecco módosította Eagle médium, Gibco, Life Technologies, USA) helyeztük, majd szikék segítségével feldaraboltuk. Ezt követően II-es típusú kollagenáz enzimmel (CLS2, 1 mg/ml, Roche, Svájc) kezeltük a szövetet DNáz (DNáz I, 15 µg/ml, Roche, Svájc) jelenlétében síkrázó készüléken 37 °C-on 55 percig. Borjú szérum albumin (BSA-DMEM) grádiens (20%) segítségével háromszori centrifugálással (1000 × g, 20 perc) elválasztottuk a mikroereket a mielintartalmú, kisebb sűrűségű, ideg- és gliasejteket tartalmazó rétegtől. A második enzimes emésztés során a sejteket kollagenáz-diszpáz (1 mg/ml, Roche, Svájc) és DNáz (15 µg/ml) enzimekkel kezeltük 37 °C-on 35 percig folyamatos enyhe rázatás mellett (100 fordulat/perc). Az enzimek segítenek az agyi mikroereket határoló bazális membrán egy részének eltávolításával az endotélsejtek elválasztásában a pericitáktól. Végül 33%-os Percoll grádiens alkalmazva (1000 × g, 10 perc) elválasztottuk a mikroérfrakciót a periciták és vörösvértestek nagy részétől, majd DMEM tápfolyadékkal mostuk a sejteket.

Az endotélsejteket IV. típusú kollagénnel (100 µl/ml) és fibronektinnel (100 µl/ml) bevont, 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe (Corning Costar, USA) szélesztettük, majd CO₂-inkubátorba helyeztük. A tápfolyadék, amiben a sejteket tenyésztettük, az alábbiakat tartalmazta: 85% DMEM/F12 tápfolyadék, 15% borjúplazmából készített savó (PDS, First Link Ltd., Egyesült Királyság), 100 µg/ml heparin, 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktor, 10 mM HEPES puffer, inzulin (5 µg/ml, Pan Biotech, Németország), transferrin (5 µg/ml, Pan Biotech, Németország), szelenit (5 ng/ml, Pan Biotech, Németország) és gentamicin (50 µg/ml).

A tenyészetek tisztaságának fokozására a csoport által korábban kidolgozott és leírt módszert alkalmaztuk (Perrière és mtsai, 2005). Az endotélsejt tenyészetben maradt pericita-, simaizom- és fibroblasztsejtek eltávolítása érdekében 3 µg/ml puromicin antibiotikumot adtunk a tápfolyadékhoz a tenyésztés első három napján. A sejtek toxikus koncentrációjú puromicin elleni védelméért a P-glikoprotein efflux transzporter felelős,

azonban ez csak az endotélsejtekben expresszáldik nagy mennyiségben, így a puromicin egy hatékony endotélsejt szelekciós vegyület. A harmadik-negyedik tenyésztési nap után a sejteket a megfelelő tenyésztőlemezekbe, illetve tenyésztőbetétekbe passzáltuk a további kísérletekhez.

3.3.1.2. Agyi periciták tenyésztése

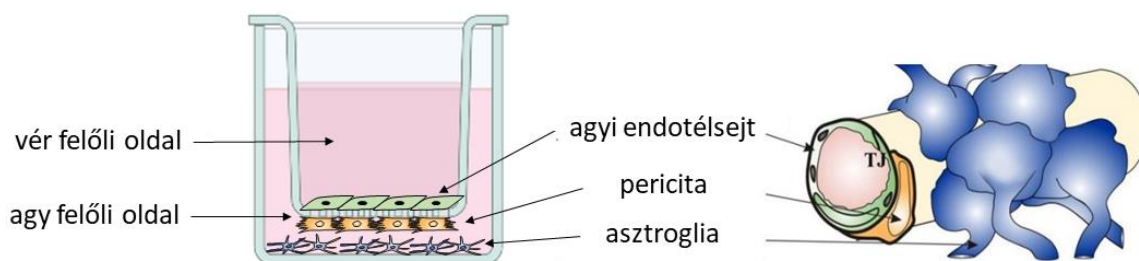
A pericita sejtek izolálását az endotélsejtekkel együtt végeztük a fentebb leírtak alapján. Az utolsó lépésnél a sejtuszpenzió egy részét kivettük, és IV. típusú kollagénnel (100 µl/ml) bevont, 6 cm átmérőjű Petri- csészébe (VWR International, USA) szélesztettük. A pericitákhoz használt tápfolyadék 90% alacsony glükóz tartalmú DMEM médiumot, 10% borjúsavót (FBS, Pan Biotech, Németország) és 50 µl/ml gentamicint tartalmazott. Ezeknél a sejteknél puromicin kezelést nem alkalmaztunk, mivel nem expresszálnak P-glikoprotein efflux transzportereket. A csoport által korábban közölt módszer alapján a harmadik passzálás után használtuk fel a sejteket (Nakagawa és mtsai, 2009).

3.3.1.3. Gliasejtek tenyésztése

A gliasejt-tenyésztéshez újszülött Wistar patkányokat használtunk (Veszeka és mtsai, 2007). Az állatok dekapitálását követően a sterilen eltávolított agyakat jéghideg PBS-be helyeztük, majd csipeszek segítségével a kisagyat és a fehérállományt leválasztottuk. Az agyhártyákat steril, benedvesített szűrőpapíron való görgetéssel távolítottuk el. Az agyszövetet tápfolyadékban (90% DMEM + 10% FBS) steril centrifugacsőbe tettük, majd egy steril fecskendő és 10 cm hosszú 20 G átmérőjű tű segítségével a sejteket mechanikusan disszociáltuk (Nakagawa és mtsai, 2009). A szuszpenziót 40 µm pórusméretű nejlonszűrőn (Millipore, USA) engedték át, hogy eltávolítsuk a nagyobb aggregátumokat. Az átszűrt sejteket bevonatlan, 75 cm² felületű flaskákba (TPP, Svájc) szélesztettük, és 10% borjúsavót, valamint 50 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM tápfolyadékban tenyésztettük egy hétig. Egy éjszakán át tartó rázatással (200 fordulat/perc síkrázó készüléken) távolítottuk el a mikrogliasejteket. Az asztrocitákat IV. típusú kollagénnel (100 µl/ml) bevont 12-lyukú tenyésztőedényekbe szélesztettük, majd két hét tenyésztés után használtuk a sejteket a vér-agy gát modell kialakításához. A gliasejtek több mint 90 %-a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) immunopozitivitást mutatott.

3.3.1.4. Háromsejtes vér-agy gát ko-kultúra modellek

A vér-agy gát ko-kultúra modelljének létrehozásához primer patkány agyi endotélsejteket, pericitákat és asztrogliaikat tenyésztettünk együtt (Nakagawa és mtsai, 2009). A modell kialakításához sejttenyésztő betéteket használtunk (Transwell clear, Corning Costar, USA; poliészter membrán, póruméret: 0,4 μm , felszín: 1,12 cm^2), melyek segítségével együtt tenyésztettük a vér-agy gátat alkotó három sejtípust (**8. ábra**).



8. ábra. A vér-agy gát modell sematikus ábrája.

A pericitákat a betétek permeábilis poliészter membránjának alsó, IV. típusú kollagénnel (100 $\mu\text{g/ml}$) bevont oldalára passzáztuk. A periciták letapadása után az agyi endotélsejteket a betétek membránjának felső oldalára szélesztettük, ami IV. típusú kollagénnel (100 $\mu\text{g/ml}$) és fibronektinnel (100 $\mu\text{g/ml}$) volt bevonva. Ezután a kétféle sejtet tartalmazó betéteket a gliasejteket tartalmazó 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyeztük, és további 5 napon keresztül együtt tenyésztettük őket. Mindkét kompartment endotélsejtekhez használt tenyésztőmédiomot kapott. Az endotélsejtek a pericita- és gliasejtek jelenlétében megőrzik a vér-agy gát tulajdonságaikat, az együtt tenyésztés során az endotélsejtek közötti kapcsolatok szorosabbá válnak, a paracelluláris barrier erősödik (Deli és mtsai, 2005). Ez a modell lehetővé teszi az endotél sejtréteg elektromos ellenállásának és permeabilitásának mérését.

3.4. Agykéreg és agyi mikroerek izolálása

A kainát receptorok génexpressziós vizsgálataihoz agykéreg- és agyi mikroér minták izolálására is szükség volt. Ezekhez felnőtt, 3 hetes Wistar patkányokat CO_2 -dal túlaltattunk, a fejüket levágtuk, ezután steril körülmények között kivettük az agyukat, és jéghideg PBS-be helyeztük. Miután az agyhártyákat és a fehérállományt eltávolítottuk, kicsíptünk egy darabot az agykéreg szürkeállományából. A fennmaradó szürkeállományt apróra daraboltuk, és Ringer-HEPES oldatot (150 mM NaCl, 2,2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 5,2 mM KCl,

6 mM NaHCO₃, 2,8 mM glükóz, 5 mM HEPES, pH 7,4) tartalmazó Potter-Elvehjem homogenizálóban még egyneműbbé tettük a mintát. Ezt követően a nagyobb sűrűségű mikroereket 17,5% dextrángrádiens segítségével választottuk el a mielintartalmú rétegtől, majd 1% BSA grádiens segítségével még tovább tisztítottuk a szuszpenziót. Ezután egy 100 µm pórusméretű nejlon szűrővel (pluriStainer, pluriSelect Life Science, Németország) eltávolítottuk a nagyobb szövetdarabokat, majd a mikroereket a szuszpenzióból egy 20 µm pórusméretű nejlon szűrővel (pluriStainer) szelektáltuk ki. Az így kapott mintát kétszer mostuk Ringer-HEPES oldattal. Végül az agykéreg- és mikroér mintákat TriFast reagensben (VWR International, USA) homogenizáltuk RNS-izolálás céljából.

3.5. A tenyészetek kezelése

A kísérleteink során a sejtenyészeteinket különböző koncentrációjú (10-100 µM) tápfolyadékban készített kainsav (213 Da, steril vízben beoldva) oldattal kezeltük 1 és 24 órán keresztül. A kainsav kezelési koncentrációkat szakirodalmi adatok alapján határoztuk meg (Mazzone és mtsai, 2010; Basuroy és mtsai, 2013; Bajrektarevic és Nistri, 2017). Három különböző lehetséges védőhatású gyógyszerként is használt hatóanyag, a szimvasztatin, az edaravon, és a dexametazon önálló, illetve kaináttal szembeni protektív hatását (1-1 µM) vizsgáltuk. A szimvasztatint és az edaravont dimetil-szulfoxidban oldottuk be, a dexametazont pedig steril vízben. A védőanyagok 1 µM kezelési koncentrációját csoportunk saját előzetes eredményei és szakirodalmi adatok alapján választottuk ki (Romero és mtsai, 2003; Deli és mtsai, 2005; Sierra és mtsai, 2011; Tóth és mtsai, 2014).

A citokinekkal károsított modell esetében a TNF-α és IL-1β gyulladós citokinek kombinációját alkalmaztuk, mindkettőt 10 ng/ml koncentrációban. (Harazin és mtsai, 2018). A szőlőmag proantocianidinben-gazdag kivonat (10 µg/ml), a rezveratrol (10 µM), az epikatekin (10 µM) és a galluszsav (1 µM) kezelési koncentrációját HepG2 humán hepatóma sejtvonalon végzett kísérletek alapján állapítottuk meg (Rojas és mtsai, 2014; Baselga-Escudero és mtsai, 2014; Aragonès és mtsai, 2016b). A törzsoldatok abszolút etanolban készültek, a kezelőoldatokat pedig tápfolyadékban hígítottuk, így az etanol végső koncentrációja 0,1% alatt volt.

Mindkét kísérletsorozat esetén a kontroll csoportba a nem kezelt, azonban minden más körülményben azonosan tenyésztett sejtek tartoztak. A reaktív oxigéngyökök képződésének vizsgálatakor referenciavegyületként 100 µM hidrogén-peroxid (H₂O₂, Molar Chemicals, Magyarország) oldatot alkalmaztunk, a nitrogén-monoxid termelés vizsgálatakor pedig 100 µM nátrium-nitroprusszidot (SNP).

3.6. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) és kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (qPCR)

Az öt kainát receptor és három nitrogén-monoxid-szintáz izoforma géneinek aktivitását polimeráz láncreakció (PCR) módszerekkel vizsgáltuk. A vizsgált génekre a szakirodalomban leírt specifikus oligonukleotid primerpárokat (**1. táblázat**) használtuk és módosítottuk (Bernard és mtsai, 1999; Hinoi és mtsai, 2001; Maric és mtsai, 2000; Yao és mtsai, 2010), melyek különböző exonokat, vagy exon/exon határokat fednek le. Referenciaként β -aktin és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) génekre specifikus primereket alkalmaztunk (**1. táblázat**).

1. táblázat. A reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióhoz használt patkány specifikus primerek (T_m: olvadási hőmérséklet, bp: bázispár).

Primer neve		Szekvencia	T _m (°C)	Amplikon-hossz (bp)	Génazonosító
Grik1	fw	GGTATAACCCCCACCCATGCAACC	58	314	NM_017241.2
	rv	GAAGGTCATCGTCGAGCCATCTCTG			
Grik2	fw	GGTATAACCCACACCCTTGCAACC	56	452	NM_019309.2
	rv	TGACTCCATTAAGAAAGCATAATCCGA			
Grik3	fw	CTTCTTCAAGAAATCCAAGATCTCCAC C	57	483	NM_181373.3
	rv	TGCTCCCGTTCCGCTGTCTTGC			
Grik4	fw	TACTCTCTGGGCAACAGCCT	56	289	NM_012572.1
	rv	AGGTCTGGTAGCGGGAATTT			
Grik5	fw	TCGCCCCGTGCCTCAACTCA	55	398	NM_031508.2
	rv	CACCGACACCTCCTCAGACTCCG			
nNOS/ NOS1	fw	TCTACGCCACAGAGACAGGCAAAT	51	92	NM_052799
	rv	CATGGACATTGCCTTGGCATCGAA			
iNOS/ NOS2	fw	AGCATCCCAAGTACGAGT	48	140	NM_012611
	rv	AATCTCGGTGCCCATGTA			
eNOS/ NOS3	fw	CGGAGAATGGAGAGAGCTTT	50	113	NM_021838
	rv	GGA GAC ACT GTT GAA TCG GA			
β-actin	fw	TACTCTGTGTGGATTGGTGGC	52	150	NM_031144.3
	rv	GGTGTA AAAACGCAGCTCAGTAA			
GAPDH	fw	GGTCATCAACGGGAAACCC	55	356	NM_017008.4
	rv	TCTGAGTGGCAGTGATGGCA			

Az agykéreg-, mikroér- és agyi endotélsejt mintákat TriFast reagensben (VWR International, USA) homogenizáltuk. Ezt követően a gyártó protokollja szerint az össz-RNS-t kloroformmal kivontuk, izopropanollal kicsaptuk, majd 80% etanollal mostuk. Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) műszerrel történő koncentrációmérést követően az össz-RNS-ek 1-1 µg-ját minden mintából és kezelési csoportból DNáz enzimmel (ThermoFisher, USA) kezeltük, majd Maxima First Strand cDNS-szintézis kit (ThermoFisher, USA) segítségével reverz transzkripciót végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően.

A polimeráz láncreakciókat Labcycler 48 Gradient (SensoQuest, Németország) műszerrel végeztünk FIREPol DNS polimeráz (Solis BioDyne, Észtország) segítségével. A kezdeti hőinaktiválást (95 °C, 3 perc) követően az alábbi, 35 alkalommal ismétlődő ciklust állítottuk be: denaturáció 95 °C-on 30 másodpercig, primertapadás a megfelelő T_m hőmérsékleteken (**1. táblázat**) 30 másodpercig, polimerizáció 70 °C-on 40 másodpercig. A 72 °C-os 5 percig tartó utópolimerizációt követően 2% agaróz gélen (VWR International, USA) azonosítottuk a kapott amplikonokat, majd az izolált PCR fragmenteket kapilláris szekvenálással igazoltuk. A NOS primerek esetében a gélfotók intenzitását ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health, USA) számszerűsítettük.

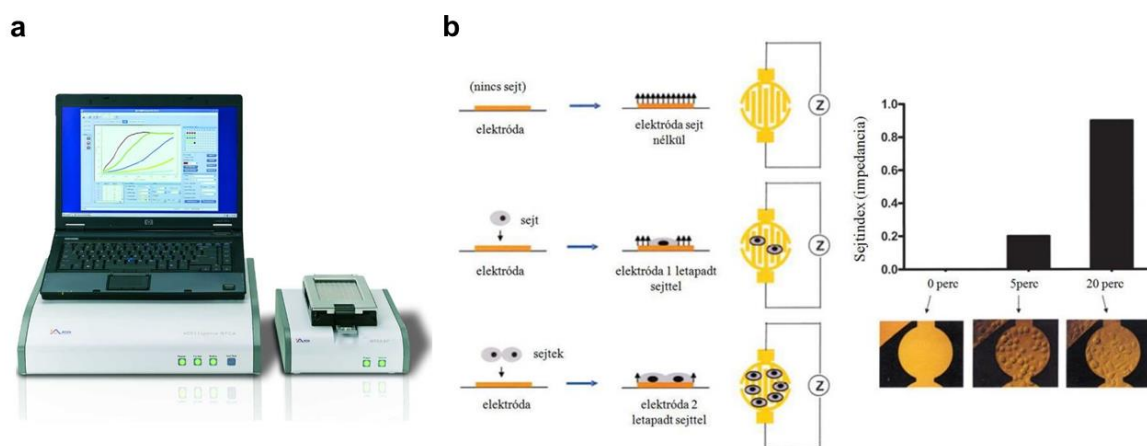
A NOS izoformák génaktivitásában bekövetkezett változásokat qPCR-rel is megvizsgáltuk. A polimeráz láncreakciót $2 \times$ Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) felhasználásával hajtottuk végre RotorGene 3000 műszer (Corbett Research, Ausztrália) segítségével. A kezdeti hőinaktiválást (95 °C, 2 perc) követően az alábbi, 40 alkalommal ismétlődő ciklust állítottuk be: denaturáció 95 °C-on 5 másodpercig, primertapadás és polimerizáció 60 °C-on 30 másodpercig. A fluoreszcens szignálok minden polimerizációs lépés után összegyűjtésre kerültek, majd a regisztráció végén olvadási görbe került felvételre 55 és 95 °C fok között. Minden gén kifejeződését a β -aktinhoz és a GAPDH-hoz, mint belső kontrollhoz normalizáltuk (ΔCt), mivel ezek a gének az endotélsejtekben nagymértékben expresszálódnak. A $\Delta\Delta Ct$ meghatározásához a célgének génexpresszióját a kezeletlen, kontroll csoport génexpressziójához viszonyítottuk. A relatív génexpressziós változást a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula segítségével határoztuk meg.

3.7. Valósídejű sejtanalízis

A sejtenyészetek biológiai állapotának nyomon követésére impedanciamérő rendszert (xCELLigence RTCA-SP, Agilent, USA) használtunk (**9. ábra**), amely a sejtek növekedéséről, letapadásáról és életképességéről ad információt (Kiss és mtsai, 2013). Az

impedanciamérés előnye, hogy jelzőanyag nélküli, valós idejű vizsgálatot tesz lehetővé akár hosszú időn keresztül is (Solly és mtsai, 2004).

A sejteket egy speciális, 96-lyukú tenyésztőlemezbe szélesztettük (E-plate, Agilent, USA), amely impedancia mérésére alkalmas arany elektródákat tartalmaz az alján. A sejtek letapadnak, növekednek, osztódnak, egyre jobban lefedik az elektródák felszínét (9. ábra). Ezzel arányosan emelkedik az impedancia, amit a sejttindexszel fejezünk ki. A rendszer ezt az értéket az $(R_n - R_b)/15$ képlet segítségével határozza meg, amelyben R_n a sejtek és az elektróda között mért impedanciát, R_b pedig a tápfolyadék háttér impedanciáját jelenti.



9. ábra. A valós idejű sejtanalízishez használt impedanciamérő rendszer (xCELLigence RTCA-SP, Agilent, USA) (a), és a rendszer működési elvének ábrázolása (b) (Solly és mtsai, 2004 alapján).

A 96-lyukú tenyésztőlemezeket IV. típusú kollagénnel (100 $\mu\text{g/ml}$) és fibronectinnel (100 $\mu\text{g/ml}$) vontuk be az agyi endotélsejtek számára, és I. típusú kollagénnel (150 $\mu\text{g/ml}$) a periciták és asztrogliák számára. A lemez lyukaiba 50 μl tápfolyadékot pipettáztunk, majd megmértük a háttér impedanciát. Ezt követően 50 μl sejtszuszpenziót (5×10^3 sejt/lyuk) tettünk minden egyes lyukba. A lemezt a kísérlet végéig 37 °C-os CO₂ inkubátorban tartottuk. Az agyi endotélsejtek a kirakást követő 3. napon benőtték a teljes felszínét, nem növekedett tovább a sejttindex. Ekkor a sejteket 10 vagy 100 μM koncentrációjú kainsavval kezeltük, illetve a védőanyag dexametazonnal, szimvasztatinnal és edaravonnal. A műszer a sejttindexet a kezelés után 10 percenként rögzítette 24 órán keresztül. Az impedancia értékeket a kezelés előtti utolsó időpont értékeihez normalizáltuk, így határoztuk meg a kezelési csoportok hatását.

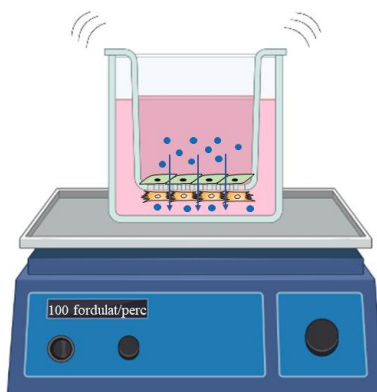
3.8. A vér-agy gát modell funkcióinak vizsgálata

3.8.1. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

Az agyi endotélsejtek között olyan szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék találhatók, amelyek korlátozzák a paracelluláris út átjárhatóságát. A transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) egy olyan érzékeny módszer, ami a gátrendszerek paracelluláris szorosságát tükrözi (Deli és mtsai, 2005). A TEER a szoros kapcsolatok nátriumionnal szembeni áteresztőképességét adja meg, hiszen a tápfolyadékokban a legnagyobb mennyiségben jelenlévő elem a nátriumion (150 mM), csak úgy, mint a fiziológiás testnedvekben (Benson és mtsai, 2013). A agyi endotélsejtek ellenállás értékeit Epithelial Volt/Ohm Meter (EVOM) rezisztencia-mérővel és STX-2 elektródákkal (World Precision Instruments, USA) mértük a hármas ko-kultúra modelleken a tápfolyadék cseréje előtt minden második nap. A TEER értékekből levontuk a sejtmentes tenyésztőbetéteken mért ellenállás értékek átlagát ($\sim 110 \Omega \times \text{cm}^2$), majd a tenyésztőmembrán felszínéhez viszonyítva ($\Omega \times \text{cm}^2$) átlagoltuk és ábrázoltuk a TEER értékeket.

3.8.2. Permeabilitási vizsgálat

Az endotél sejtrétegek permeabilitásának meghatározásához két olyan jelzőanyagot használtunk, amelyekre a sejtréteg áteresztőképessége élettani körülmények között alacsony (Abbott és mtsai, 2006), ezek a paracelluláris úton átjutó nátrium fluorescein (SF; 10 , 376 Da) és a transzcelluláris útvonalon átjutó szérum albumin, amit Evans-kék festékkel jelöltünk (EBA; 1% BSA+167,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Evans-kék, 67 kDa). Fiziológiás körülmények között a vér-agy gát áteresztőképessége igen alacsony mindkét anyagra (Deli és mtsai, 2005). Ezeknek a permeabilitási jelzőmolekuláknak az átjutását mind a kontroll, mind a kezelt csoportokon megmértük (10. ábra).



10. ábra. Permeabilitási vizsgálatok tenyészetes *in vitro* vér-agy gát modellen.

Az agyi endotélsejt rétegeket először önállóan kainsavval kezeltük 1, illetve 24 órán keresztül. A kainsav hatásának kivédésére a védőanyagokat (szimvasztatin, edaravon vagy dexametazon) együtt alkalmaztuk a károsító anyaggal 24 órán keresztül. A citokinekkal károsított modell esetében 30 percen át előkezeltük a sejteket a fenolos vegyületekkel, majd a TNF- α és IL-1 β gyulladáscsökkentő citokinek kombinációjával károsítottuk a sejtrétegeket 6 órán keresztül. A kezelést követő TEER mérés után a tenyésztőbetéteket 12-lyukú lemezekbe helyeztük, amelyek lyukanként 1,5 ml, 37 °C-os Ringer-HEPES oldatot tartalmaztak. A felső folyadéktérben a kezelőoldatokat 500 μ l Ringer-HEPES oldatra cseréltük, amely fluoreszcint és albumint tartalmazott. A tenyésztőedényeket 30 percen keresztül 37 °C-on CO₂ inkubátorban tartottuk síkrázó készüléken (100 fordulat/perc; OS10 síkrázó, BioSan, Lettország) (**10. ábra**). Az enyhe rázatással az oldatok folyamatos mozgását biztosítottuk, ami fontos körülmény a permeabilitás mérése során (Youdim és mtsai, 2003). A kísérlet végén összegyűjtöttük a folyadékokat az alsó kompartmentekből, majd meghatároztuk a jelzőanyagok koncentrációját fluoreszcens többlyukú lemezolvasóval (BMG Fluostar Optima, BMG Labtech, Németország). A fluoreszcen emisszióját 520 nm-en mértük 485 nm-en történő gerjesztést követően, az Evans-kék elnyelését pedig 584 nm-en történő gerjesztés után határoztuk meg 680 nm-en. A látszólagos permeabilitási együtthatót (P_{app}) a következő képlet segítségével határoztuk meg:

$$P_{app} = \frac{[C]_B \times V_B}{A \times [C]_A \times t}$$

ahol $[C]_B$ az alsó kompartment mintáiban mért jelzőanyag-koncentráció, $[C]_A$ a felső kompartmentbe mért kiindulási jelzőanyag-koncentráció, V_B az alsó kompartment térfogata (1,5 ml), A a membrán felszíne (1,12 cm²) és t a permeabilitás vizsgálat időbeni hossza (30 perc).

3.9. Leptintranszport vizsgálatok

A leptin átjutásának vizsgálatára a rezveratrolt és a szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonatot választottuk ki. Az anyagokat vagy önállóan teszteltük, vagy 30 perc előkezelést követő TNF- α és IL-1 β gyulladáscsökkentő citokinekkal történő 6 órás károsítás során. A kezelés utolsó 1 órájában a tenyésztőbetétek felső folyadéktérében lévő oldatokhoz adtuk a leptint (1 μ g/ml). A kísérlet során síkrázó készüléken tartottuk a tenyésztőlemezeket CO₂-inkubátorban. A kezelés végén összegyűjtöttük a folyadékokat mindkét folyadéktérből, majd

a minták leptin tartalmát ELISA kit (Merck, Németország) felhasználásával határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően.

3.10. Reaktív oxigéngyökök képződésének vizsgálata

Az oxidatív stressz mértékének megállapítása céljából kísérleteink során a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését is vizsgáltuk agyi endotélsejtekben (Veszélka és mtsai, 2013; Lénárt és mtsai, 2015). Ehhez a 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetátot (H₂DCFDA, Molecular Probes, USA) alkalmaztuk, ami egy nem fluoreszcens reagens. A molekula a sejtek membránján átjutva a citoplazmában kölcsönhatásba lép az észterázokkal, amik lehasítják róla az acetát- és észtercsoportokat. A festék ezáltal töltést kap, így nehezebben jut ki a sejtekből, ezért felhalmozódik. Amennyiben reaktív oxigéngyökök képződnek a sejtekben, azok fluoreszcenssé alakítják a molekulát. A fluoreszcencia intenzitását spektrofotométerrel rögzíthetjük. A kísérlethez az agyi endotélsejteket 96-lyukú, fekete falú, átlátszó, műanyag aljú tenyésztőlemezekben (Corning Costar, USA) növesztettük. Az önálló kaint kezelést 1 és 24 órán keresztül végeztük, a védőanyagok önálló és kainsavval szembeni hatását pedig 1 órán át vizsgáltuk. A fenolos vegyületek önálló és gyulladáscsökkentő citokinekkal szembeni hatását pedig 1 órán keresztül vizsgáltuk. Az agyi endotélsejteket 1 órán át 37 °C-on 2 µM H₂DCFDA-t tartalmazó Ringer-HEPES oldatban inkubáltuk, közben pedig fluoreszcens spektrofotométer (BMG Fluostar Optima) segítségével mértük a keletkező reaktív oxigéngyökök mennyiségét (gerjesztés 495 nm, emisszió 515 nm hullámhosszon). A festék sejtekbe való bejutásának megsegítésére pluronsavval is kezeltük a tenyészteteket (1,5 µM; Molecular Probes, USA). Referenciavegyületként 100 µM H₂O₂ oldatot alkalmaztunk.

3.11. Nitrogén-monoxid felszabadulásának vizsgálata

Az agyi endotélsejtek intracelluláris nitrogén-monoxid (NO) tartalmának meghatározásához a 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluorescein diacetátot (DAF-FM diacetát) használtuk (Kojima és mtsai, 1998; Lénárt és mtsai, 2015). A DAF-FM diacetát diffúzióval a sejtekbe jut, ahol észterázok deacetilálják. A sejtekben termelődő NO esetén a DAF-FM diacetát kölcsönhatásba lép a nitrozóniumionnal, így egy heterociklikus, fluoreszcens vegyület jön létre, ami nem tud kijutni a sejtéből, ezért megnő az intracelluláris koncentrációja. A kísérletekhez 96-lyukú, fekete falú, átlátszó, műanyag aljú tenyésztőlemezeket használtunk. A kezelési koncentrációk és idők a kainsavas és citokines

modellek esetében is megegyeztek a 3.10. fejezetben leírtakkal. Az agyi endotélsejteket 2 μM DAF-FM diacetátot tartalmazó Ringer-HEPES oldatban 1 órán át fluoreszcens spektrofotométerrel vizsgáltuk (BMG Fluostar Optima, gerjesztés: 485 nm, emisszió: 538 nm hullámhosszon), és ezzel mértük a sejtekben található NO mennyiségét. A próba sejtekbe való bejutásának megsegítésére pluronsavval is kezeltük a tenyészeteket (1,5 μM ; Molecular Probes), USA. NO donorként 100 μM SNP oldatot alkalmaztunk.

3.12. Immunhisztokémia

3.12.1. Sejtkapcsoló fehérjék immunfestése

Az immunhisztokémiai kísérlet során agyi endotélsejtekben a szoros kapcsolatok klaudin-5 integrális membrán fehérjéjét és a ZO-1 linker fehérjéjét mutattuk ki kainsav kezelést követően, a citokinekkal kiváltott gyulladási modellben pedig a klaudin-5 fehérje mellett a β -katenin linker molekulát vizualizáltuk. Elsődleges antitestként anti-klaudin-5 (nyúl poliklonális), anti-ZO-1 (nyúl poliklonális, Invitrogen, USA) és anti- β -katenin (nyúl poliklonális) ellenanyagokat használtunk. Másodlagos ellenanyagként Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot használtunk H33342 magfestékkel (Calbiochem, USA) kombinálva (2. táblázat).

2. táblázat. A kísérletek során használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok, és festékek.

Antitest, festék	Forgalmazó	Katalógusszám	Gazdaszervezet	Koncentráció	Antitest regisztrációs szám
anti-klaudin-5	Sigma	SAB4502981	nyúl	1,6 $\mu\text{g/ml}$	AB_10753223
anti-ZO-1	Invitrogen	61-7300	nyúl	0,625 $\mu\text{g/ml}$	AB_2533938
anti- β -katenin	Sigma	C2206	nyúl	1,6 $\mu\text{g/ml}$	AB_476831
anti-leptin receptor	Abcam	ab5593	nyúl	5 $\mu\text{g/ml}$	AB_304969
anti-p65	Santa Cruz Biotechnology	sc-372	nyúl	2,5 $\mu\text{g/m}$	AB_632037
anti-nyúl-IgG-Cy3	Sigma	C2306	bárány	1 $\mu\text{g/ml}$	AB_258792
anti-nyúl-IgG-A488	ThermoFisher	A11034	kecske	1 $\mu\text{g/ml}$	AB_2576217
H33342	Calbiochem	382065	-	1 $\mu\text{g/ml}$	-

A permeabilitási vizsgálatok után a tenyésztőbetéteken lévő agyi endotélsejteket Ringer-HEPES pufferrel mostuk. A 24 órás kaináttal és védőanyagokkal történő kezelés után a sejteket 1% paraformaldehiddel fixáltuk 20 percig 4 °C-on, majd 0,2% Triton-X100

oldattal (AppliChem, Németország) permeabilizáltuk 10 percig 4 °C-on. A 6 órás citokinkezelés és 30 perces fenolos vegyületekkel történő előkezelés után a mintákat jéghideg aceton:metanol 1:1 elegyével fixáltuk és permeabilizáltuk 5 percig -20 °C-on. Ezután minden mintát PBS-sel mostunk, majd 3% BSA-PBS oldatban blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket 1 órán át szobahőmérsékleten. A különböző primer antitestekkel egy éjszakán keresztül 4 °C-on, majd másnap a másodlagos antitesttel és a magfestékkel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Az inkubációs lépések között és után PBS-sel mostuk a sejteket. Legvégül lefedtük a mintákat (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA), és konfokális mikroszkóppal (Leica SP5, Németország) képeket készítettünk. A kaináttal kezelt csoportokban a szoros kapcsolatok festődési mintázatát MATLAB programmal (MathWorks, USA) elemeztük ki. A képek nem egyenletes hátterét a program segítségével meghatároztuk és kivontuk az eredetiből, majd a szürkeárnyalatos képeket binárisá alakítottuk. Az 5 pixelnél kisebb objektumokat kizártuk, ezáltal csökkentve a hamis struktúrák számát, majd az objektumok méreteit meghatároztuk a bináris képek pixelszámai alapján. Az objektumszám az egymástól különálló, azaz egymáshoz nem kapcsolódó struktúrák számát fejezi ki.

3.12.2. Leptin receptorok immunfestése

A gyulladáscitokinekkal és fenolos vegyületekkel kezelt minták esetében a leptin receptorok immunfestését is elvégeztük. Ebben az esetben IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronektinnel (100 µg/ml) bevont tenyésztőbetéteken növesztettük a sejteket. Elsődleges antitestként anti-leptin receptor (nyúl poliklonális, Abcam, Egyesült Királyság) ellenanyagot használtunk (**2. táblázat**). A festési protokoll többi lépése megegyezett a fentebb leírtakkal.

3.12.3. Az NF-κB transzkripciós faktor sejtmagba történő bejutásának vizsgálata

A gyulladáscitokinekkal és fenolos vegyületekkel kezelt minták esetében az NF-κB transzkripciós faktor sejtmagba történő bejutását is vizsgáltuk. Ehhez I. típusú kollagénnel (150 µg/ml) bevont fedőlemezekre (felszín: 1 cm², boroszilikát, VWR International, USA) passzáltuk a sejteket 2,5 × 10⁴ sejt/fedőlemez sűrűségben. A citokinekkal történő kezelés rövidebb volt, csupán 1 óra. Az NF-κB p65 alegységének jelölésére primer ellenanyagként anti-p65 antitestet (nyúl poliklonális, Santa Cruz Biotechnology, USA) használtunk, másodlagos antitestként pedig Alexa Fluor 488-gyal jelölt anti-nyúl ellenanyagot (ThermoFisher, USA) (**2. táblázat**). Az NF-κB festés vizualizálásához spinning disk

konfokális mikroszkópot (Yokogawa W1/Olympus IX83, Japán) használtunk. A citoplazmás és sejtmagi NF- κ B festődés intenzitásának vizsgálatát ImageJ szoftverrel végeztük. A protokoll többi eleme megegyezik a 3.12.1. részben leírtakkal.

3.13. Statisztikai kiértékelés

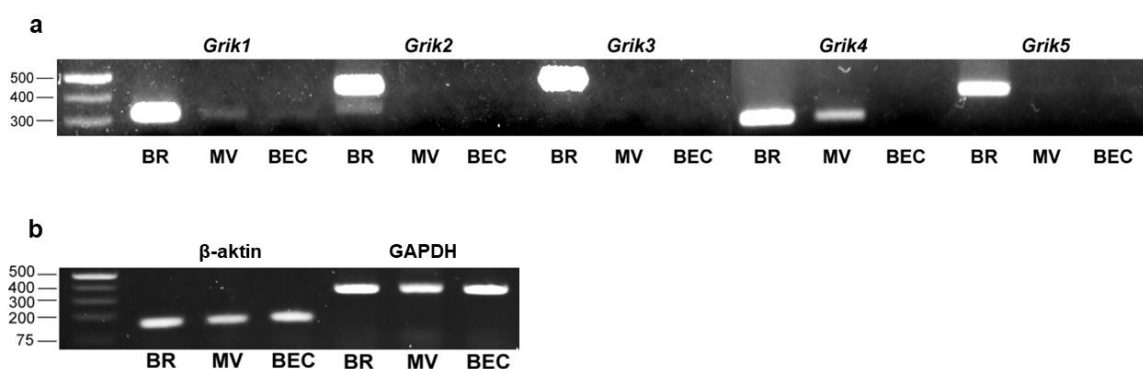
A dolgozatban szereplő adatokat átlag \pm SD (szórás) vagy SEM (az átlag standard hibája) értéként adtuk meg. A reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval vizsgált nitrogén-monoxid-szintázok intenzitás mérését, a leptin receptorok kifejeződését és a leptintranszportot ImageJ szoftverrel végeztük. A klaudin-5 és ZO-1 sejtkapcsoló fehérjék festődésének mintázatát MATLAB program (MathWorks, Natick, USA) segítségével értékeltük ki. Az adatok statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk.

A különböző kezelési csoportok közötti különbségeket t-teszttel vagy egyutas ANOVA-t követő Dunnett, illetve Bonferroni tesztekkel elemeztük. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Kísérletenként a párhuzamos minták száma legalább három volt. Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk külön izolált primer tenyészetekből.

4. Eredmények

4.1. A kainát receptorok expressziójának vizsgálata agyszövetben, agyi mikroerekben és primer agyi endotélsejtekben

Mivel a kainát receptorok kifejeződését agyi endotélsejteken korábban a szakirodalom alapján nem mutatták ki, ezért megvizsgáltuk a receptorok jelenlétét RT-PCR segítségével. Mind az öt kainát receptor gén, *Grik1* (GluK1/GluR5), *Grik2* (GluK2/GluR6), *Grik3* (GluK3/GluR7), *Grik4* (GluK4/KA-1) és *Grik5* (GluK5/KA-2) termékét kimutattuk patkány agykéreg mintában (**12a ábra**). Az izolált patkány agyi mikroerekben a *Grik1* és a *Grik4*, míg primer agyi endotélsejtekben csak a *Grik1* gén kifejeződését figyeltük meg (**12a ábra**).



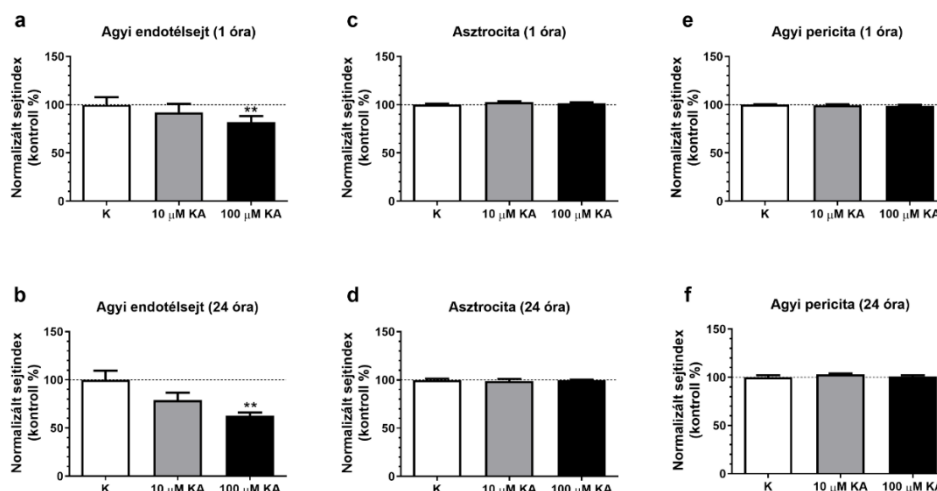
12. ábra. (a) A *Grik1-5* kainát receptor gének kifejeződésének vizsgálata RT-PCR módszerrel agykéreg, izolált patkány mikroér és primer agyi endotélsejt mintákban. **(b)** β -aktin és GAPDH referencia gének kifejeződése a mintákban. BEC: agyi endotélsejt, BR: agykéreg, GAPDH: glicerin aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, MV: mikroér. A fragmentumokat 2% agaróz gélen futtattuk meg.

A *Grik5* gén expressziója is nagyon kis mértékben detektálható volt a mikroér és az endotélsejt mintákban (**12a ábra**). A kapott eredményeket kapilláris DNS szekvenálással erősítettük meg. A β -aktin és GAPDH háztartási gének kifejeződése azonos volt az agykéreg, a mikroér és az endotélsejt mintákban (**12b ábra**), ezzel igazoltuk a templátok megfelelő minőségét.

4.2. A kainsav hatása a vér-agy gát sejtjeinek életképességére: valósídejű sejtanalízis

A kainsav megfelelő sejtkárosító koncentrációjának meghatározásához patkány agyi endotél-, pericita- és asztroglia sejteket kezeltünk két különböző koncentrációban. A kainsav sejtekre gyakorolt önálló hatását, a sejtrétegek biológiai állapotát, impedancia mérésen alapuló valósídejű sejtanalízissel követtük nyomon 10 és 100 μ M koncentrációjú kainsav kezelés után (**11. ábra**). A sejtek életképességét 24 órán keresztül mértük. Agyi

endotélsejtek esetében a 10 μM kainsav nem károsította a sejtréteget sem az 1 órás, sem a 24 órás vizsgált időpontban (**11a-b ábra**). A 100 μM kainsav már az 1 órás időpontban is szignifikánsan csökkentette az endotélsejtek életképességét (**11a ábra**), ugyanezt a hatást figyeltük meg a 24 órás időpontban is (**11b ábra**).



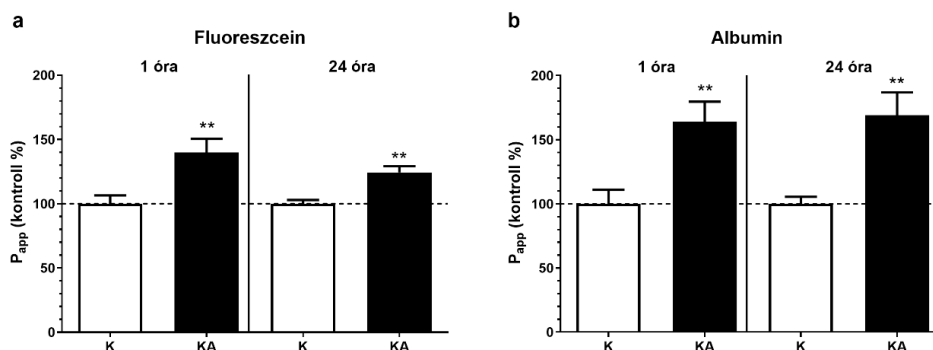
11. ábra. A kainsav (KA, 10 és 100 μM) hatása a vér-agy gát különböző sejtípusainak életképességére (impedancia mérés) 1 és 24 órás kezelést követően: (**a-b**) agyi endotélsejtek, (**c-d**) asztrociták, (**e-f**) agyi pericita sejtek (átlag \pm SEM, $n = 3-12$). Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt, ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest. K: kontroll csoport.

A kainsav kezelés egyik vizsgált koncentrációban sem befolyásolta az asztroglia- (**11c-d ábra**) és pericita sejtek impedanciával mért életképességét (**11e-f ábra**). Mivel az endotélsejtek esetében a 100 μM bizonyult hatékony károsító koncentrációnak, ezért a további kísérletekben ezzel dolgoztunk.

4.3. A kainsav kezelés hatása az agyi endotélsejtek permeabilitására

A hármas ko-kultúra modell átteresztőképességét 100 μM koncentrációjú kainsavval történt károsítás (1 és 24 óra) után vizsgáltuk a kis molekulásúlyú fluoreszcein (**13a ábra**) és a nagy molekulásúlyú albumin (**13b ábra**) jelzőanyagokra. A fluoreszcein permeabilitása $4,72 \times 10^{-6}$ cm/s volt, az albuminé $0,31 \times 10^{-6}$ cm/s, amely megegyezik a korábbi tanulmányainkban leírt barrier szorosságát jellemző adatokkal (Harazin és mtsai, 2018; Veszeka és mtsai, 2018), és azt mutatják, hogy az általunk három sejtípus együtt tenyésztésével létrehozott modell alkalmas volt a kísérletek elvégzésére. A kainsav kezelés szignifikánsan fokozta a permeabilitást, már az egyórás kezelés is megnövelte a jelzőanyagok átjutását az endotélsejt rétegeken. A fluoreszcein permeabilitását 40%-kal, az

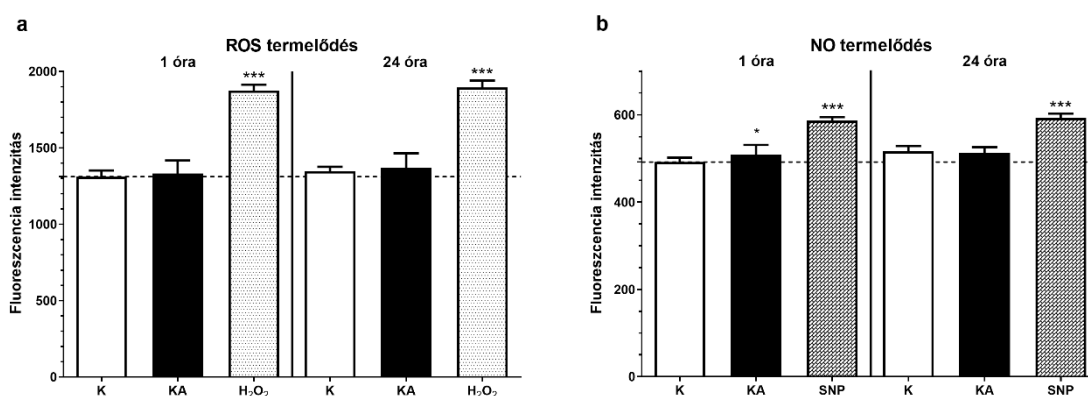
albuminét 64%-kal fokozta (**13a-b ábra**). Hasonló hatás volt megfigyelhető 24 óra elteltével is, a fluoreszcein átjutása ~25%-kal emelkedett, az albuminé pedig 70%-kal (**13a-b ábra**).



13. ábra. A kainsav hatása a tenyészetes vér-agy gát modell permeabilitására 1, illetve 24 órás 100 μ M kainsav kezelést követően. **(a)** Fluoreszcein permeabilitás (376 Da). **(b)** Evans-kékkel jelölt albumin permeabilitás (67 kDa). Átlag \pm SD, $n = 4-8$. Statisztikai próba: t-teszt, ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest. K: kontroll csoport, KA: kainsav, P_{app}: látszólagos permeabilitási együttható.

4.4. A kainsav kezelés hatása az agyi endotélsejtek szabad oxigéngyök és nitrogén-monoxid termelésére

A reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének vizsgálatához a H₂DCFDA reagenst használtuk, amelynek fluoreszcencia intenzitását spektrofotométerrel mértük. A szabad oxigéngyökök szintje nem változott agyi endotélsejtekben kainsav kezelés (100 μ M) hatására egyik időpontban sem (1 és 24 óra), szemben a referencia vegyületként alkalmazott hidrogén-peroxid kezelés (100 μ M) hatásával (**14a ábra**).

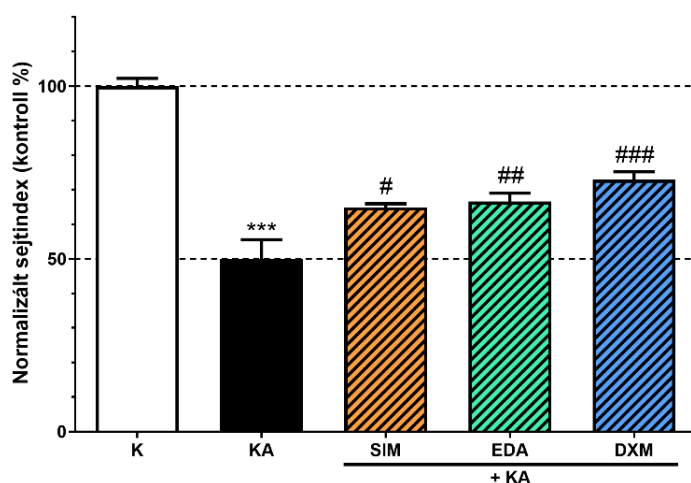


14. ábra. A kainsav (KA, 100 μ M) hatása az agyi endotélsejtek **(a)** szabad oxigéngyök (ROS) és **(b)** nitrogén-monoxid (NO) termelésére 1, illetve 24 órás kezelést követően. Referencia vegyület a ROS mérés során: hidrogén-peroxid (100 μ M), referencia vegyület az NO termelődés mérés során: nátrium-nitroprusszid (100 μ M). Átlag \pm SD, $n = 4-6$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Dunnett-teszt; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest. K: kontroll csoport, H₂O₂: hidrogén-peroxid, SNP: nátrium-nitroprusszid.

A nitrogén-monoxid termelés vizsgálata során szintén egy fluoreszcens próbát alkalmaztunk, a DAF-FM diacetát reagenst. NO-donorként nátrium-nitroprusszidot adtunk a sejtekhez. Egyórás kezelést követően a kainsav fokozta az agyi endotélsejtekben a NO termelését, azonban a 24 órás időpontban nem volt változás a kontroll csoporthoz képest (14b ábra).

4.5. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon védőhatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek életképességére

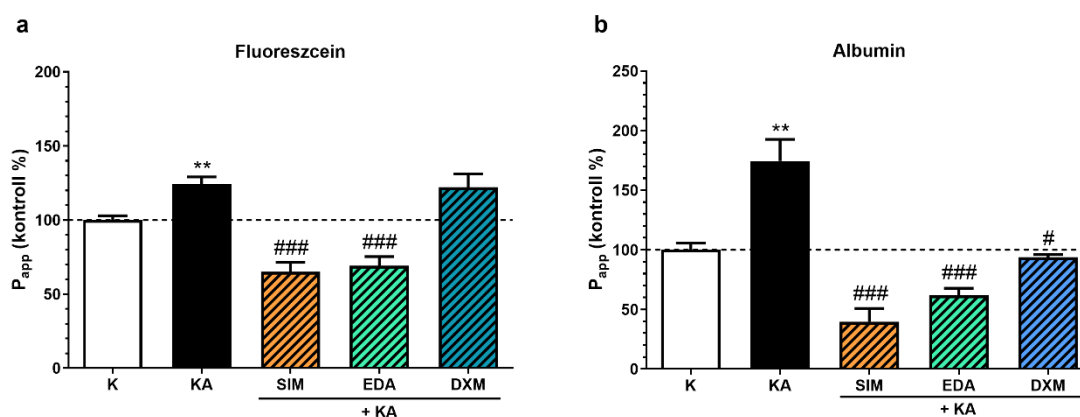
Az agyi endotélsejteken megfigyelt, fentebb leírt kainsav okozta károsítás kivédésére három gyógyszerhatóanyagot vizsgáltunk: a gyulladáscsökkentő dexametazont, a lipid- és gyulladáscsökkentő szimvasztatint és a szabadgyökfogó edaravont. A kainsav (100 μ M) okozta életképesség csökkenéssel szemben mind a három hatóanyag, az edaravon (1 μ M), a dexametazon (1 μ M) és a szimvasztatin (1 μ M) is szignifikáns védőhatást mutatott 24 órás kezelést követően (15. ábra). A dexametazon bizonyult a leghatásosabbnak, kainsav jelenlétében 46%-kal növelte a sejtek életképességét, míg az edaravon és a szimvasztatin 34 és 30%-kal a kainsav okozta impedancia csökkenéshez képest (15. ábra). A három különböző hatóanyaggal kezelt kísérleti csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség.



15. ábra. Szimvasztatin (SIM, 1 μ M), edaravon (EDA, 1 μ M) és dexametazon (DXM, 1 μ M) hatása a kainsavval (KA, 100 μ M) kezelt agyi endotélsejtek életképességére 24 órás időpontban. Átlag \pm SD, $n = 4-8$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ a kainsavval kezelt csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport.

4.6. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt vér-agy gát ko-kultúra modell permeabilitására

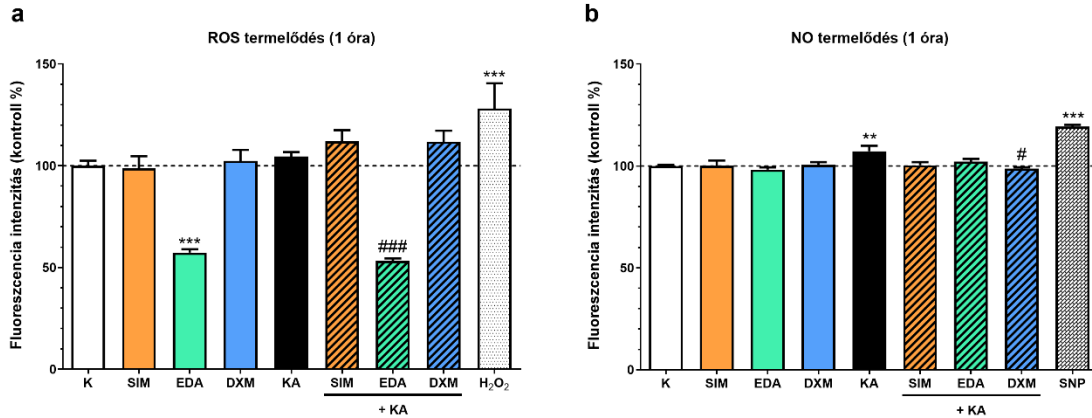
A kainsav önálló hatása mellett a három gyógyszerhatóanyagot tanulmányoztuk a tenyészetes vér-agy gát modell áteresztőképességére kaináttal szemben kis és nagy molekulatömegű jelzőanyagokra. A szimvasztatin (1 μM) és az edaravon (1 μM) szignifikánsan csökkentette a kainsav kezelés (100 μM) által megemelt jelzőanyag átjutást mindkét marker esetén 24 órás kezelést követően (**16a-b ábra**). A dexametazon (1 μM) védőhatást mutatott a nagy molekulatömegű albumin átjutásának fokozódásával szemben (**16b ábra**), azonban a fluoreszcein esetében ez a hatás nem volt statisztikailag szignifikáns (**16a ábra**).



16. ábra. Szimvasztatin (SIM, 1 μM), edaravon (EDA, 1 μM) és dexametazon (DXM, 1 μM) hatása a kainsavval (KA, 100 μM) kezelt vér-agy gát modell permeabilitására **(a)** nátrium-fluoreszcein és **(b)** Evans-kék albumin jelzőanyagokra 24 órás időpontban. Átlag \pm SEM, $n = 3-9$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ a kainsavval kezelt csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport, P_{app} : látszólagos permeabilitási együttható.

4.7. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek reaktív oxigéngyök és nitrogén-monoxid termelésére

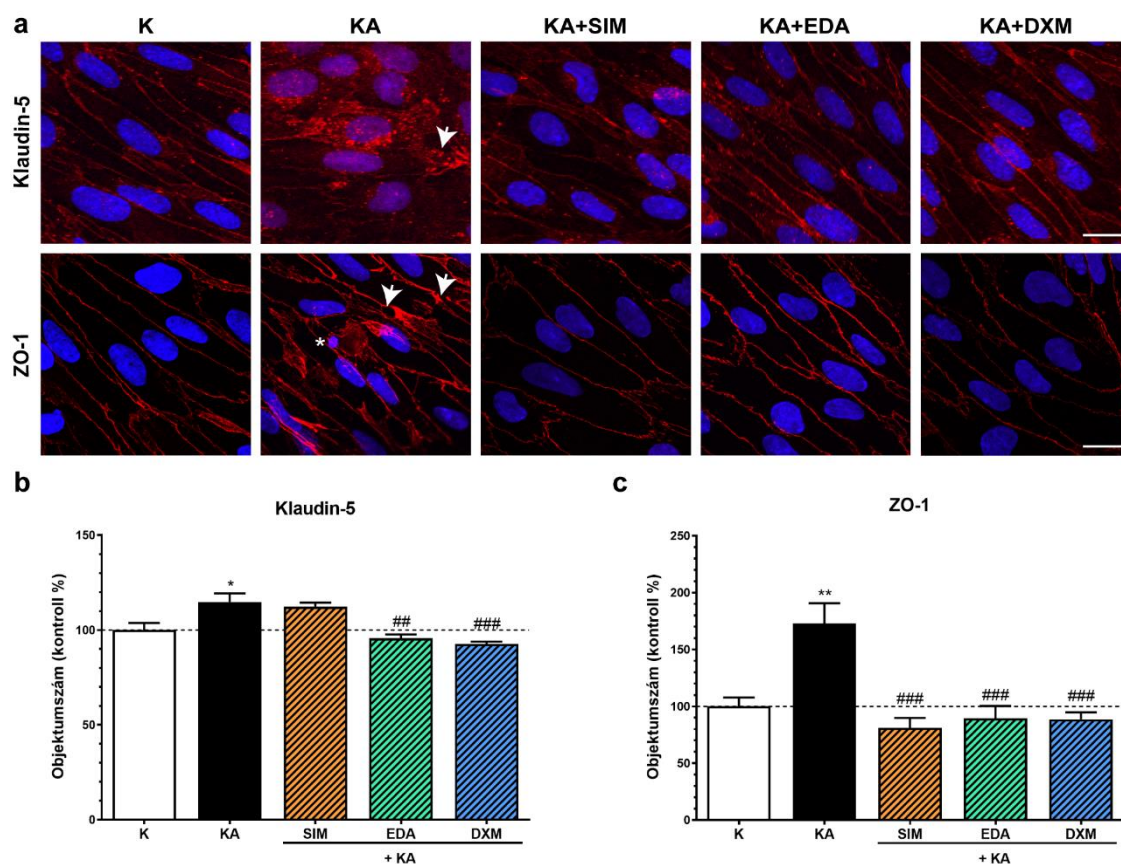
A kainsav kezelés (100 μM) ugyan nem változtatta meg agyi endotélsejtekben a szabad oxigéngyök termelést, ennek ellenére megvizsgáltuk a szimvasztatin, az edaravon és a dexametazon (1-1 μM) hatását is ebben a tesztben. Az edaravon erős gyökfogó hatást mutatott önállóan, és a kainsavval károsított csoportban egyaránt, míg a szimvasztatinnak és a dexametazonnak nem volt hatása a reaktív oxigéngyökök termelődésére agyi endotélsejtekben (**17a ábra**). Egyik hatóanyag sem volt hatással az agyi endotélsejtek NO termelésére, azonban a dexametazon szignifikánsan csökkentette az 1 órás kainsav kezelés által megemelt NO termelést (**17b ábra**).



17. ábra. Szimvasztatin (SIM, 1 μ M), edaravon (EDA, 1 μ M) és dexametazon (DXM, 1 μ M) hatása a kainsavval (KA, 100 μ M) kezelt agyi endotélsejtek **(a)** szabad oxigéngyök (ROS) és **(b)** nitrogén-monoxid (NO) termelésére. Referencia vegyület a ROS mérése során: hidrogén-peroxid (100 μ M), referencia vegyület a NO termelődés mérése során: nátrium-nitroprusszid (100 μ M). Átlag \pm SD, $n = 5-13$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ a kainsavval kezelt csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport, KA: kainsav, H₂O₂: hidrogén-peroxid, SNP: nátrium-nitroprusszid.

4.8. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek morfológiájára

Az életképességi, permeabilitási, ROS- és NO-termelődési kísérletek mellett megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van a kainsavnak és a különböző hatóanyagoknak a sejtkapcsoló fehérjék immunfestődésére. A vér-agy gát szoros sejt-közötti kapcsolatait kialakító fehérjék közül a két legfontosabb a klaudin-5 integráns membrán fehérje és a citoplazmás ZO-1 kapcsolófehérje, melyek folytonos, övszerű immunfestődést mutatnak élettani körülmények között (**18a ábra**). A kainsav-kezelt csoportban (100 μ M) a klaudin-5 és ZO-1 fehérjék festődési mintázata megváltozott, a sejthatárokon felszakadozottságot figyelhettünk meg, apoptotikus testek is megjelentek 24 órás kezelést követően. Mindhárom hatóanyag, a szimvasztatin (1 μ M), az edaravon (1 μ M) és a dexametazon (1 μ M) hatására a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék immunfestődése a kontroll csoporthoz hasonló mintázatot mutatott (**18a ábra**).

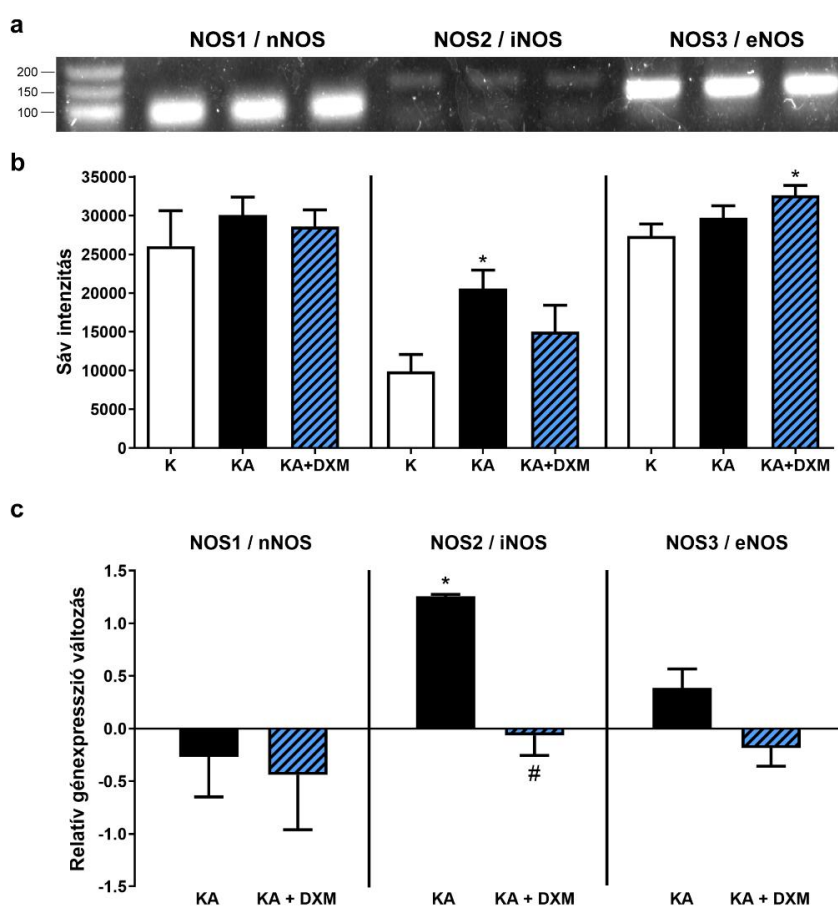


18. ábra. Szimvasztatin (SIM, 1 μ M), edaravon (EDA, 1 μ M) és dexametazon (DXM, 1 μ M) hatása a kainsavval (KA, 100 μ M) kezelt agyi endotélsejtek klaudin-5 és *zonula occludens*-1 sejtkapcsoló fehérjéinek immunfestődésére 24 órás időpontban. **(a)** Immuncitokémia, piros: sejtkapcsoló fehérjék; kék: sejtmag. Nyilak: a sejtkapcsoló fehérjék festődésének felszakadozása, megváltozása. Csillag: apoptotikus testek. Mércse: 10 μ m. Az objektumszámok elemzése **(b)** klaudin-5 és **(c)** *zonula occludens*-1 ellenanyagokkal jelölt immunfluoreszcens képeken MATLAB szoftverrel. Átlag \pm SEM, $n = 4-7$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ a kainsavval kezelt csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport, ZO1: *zonula occludens*-1 fehérje.

Az immunfestésben látott változásokat MATLAB program segítségével értékeltük ki mind a klaudin-5 (**18b ábra**), mind a ZO-1 (**18c ábra**) esetében. A kontroll csoporthoz képest a kainsavval károsított csoportban szignifikánsan megemelkedett az immunfestéssel jelölődő objektumok száma, ami jól jelzi a sejtkapcsoló fehérjék szemmel is látható szakadozott mintázatát. Az edaravon és a dexametazon szignifikánsan csökkentette a kainsav által megemelt objektumszámot mindkét fehérje esetében, míg a szimvasztatin csupán a ZO-1 fehérje felszakadozott mintázatát mérsékelte (**18b-c ábra**).

4.9. A nitrogén-monoxid-szintáz gének kifejeződése agyi endotélsejtekben, és ennek változása kainsavval és dexametazonnal történő kezelés hatására

Mindhárom NOS izoformát – a neuronálist, az indukálhatót és az endoteliálist – detektálni tudtuk primer agyi endotélsejtekben RT-PCR, illetve qPCR módszerek segítségével. Az endoteliális NOS3 és a neuronális NOS1 gének magas expressziót mutattak az agyi endotélsejtekben, míg az indukálható NOS2 csupán kis mértékben fejeződött ki (**19a-b ábra**). A 24 órás kainsav kezelés (100 μ M) szignifikánsan megemelte a NOS2/iNOS gén expresszióját, azonban nem volt hatással a NOS1/nNOS és a NOS3/eNOS gének kifejeződésére, ezt mindkét módszerrel igazolni tudtuk (**19b-c ábra**).

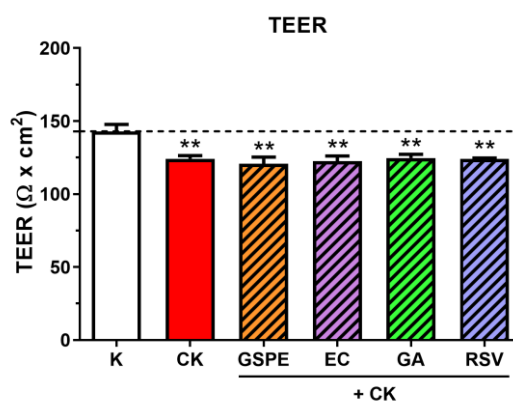


19. ábra. Nitrogén-monoxid-szintáz gének kifejeződése agyi endotélsejtekben. **(a-b)** A neuronális (NOS1/nNOS), az indukálható (NOS2/iNOS) és az endoteliális (NOS3/eNOS) nitrogén-monoxid-szintáz mRNS kifejeződése primer agyi endotélsejtekben 24 órás kainsav (KA, 100 μ M) és dexametazon (DXM, 1 μ M) kezelés hatására. Az RT-PCR után a fragmensek elválasztása 2% agaróz gélen történt, majd a gélképeket intenzitásméréssel elemeztük. **(c)** Nitrogén-monoxid-szintáz izoformák génexpressziós változásai qPCR-rel. A relatív génexpressziós változást úgy kaptuk meg, hogy a kezelési csoportok génexpresszióját a kontroll csoport génexpressziójához viszonyítottuk. A normalizáláshoz a β -aktint és a GAPDH háztartási géneket alkalmaztuk. Átlag \pm SEM, $n = 4$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$ a kainsavval kezelt csoporthoz viszonyítva.. K: kontroll csoport.

Mivel az agyi endotélisejtekben kainsav hatására megemelkedett NO termelődést csak a dexametazon tudta mérsékelni, ezért ezt a hatóanyagot vizsgáltuk a NOS izoformák kifejeződésére. A dexametazon kezelés (1 μM) csökkenteni tudta a kainsav által megnövelt NOS2/iNOS expressziót, de a másik két NOS gén kifejeződésére nem volt hatással. A NOS3/eNOS gén expressziója a kainsavval és dexametazonnal kezelt csoportban a RT-PCR vizsgálat alapján enyhén megemelkedett, azonban ez az eredmény nem volt igazolható a qPCR módszerrel (19b-c ábra).

4.10. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modell szorosságára – barrier integritás vizsgálatok

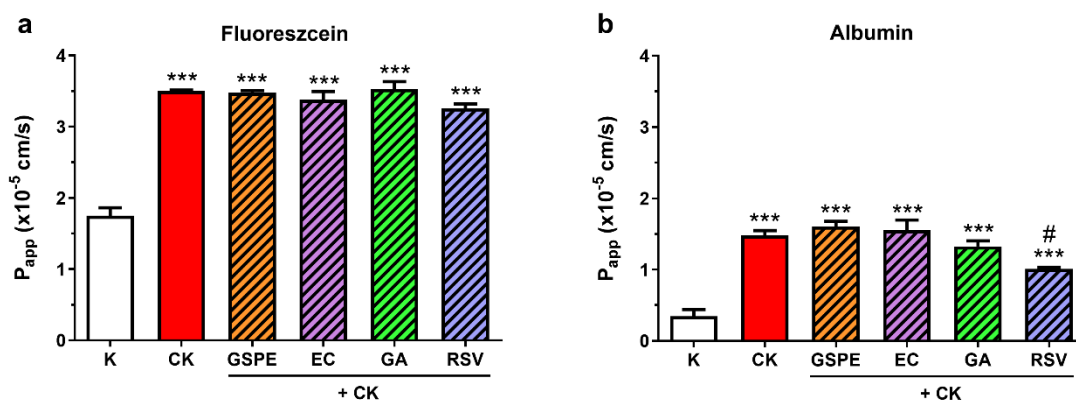
Arra vonatkozóan, hogy a szőlőből származó természetes vegyületek milyen hatással bírnak a citokinekkal károsított természetes vér-agy gát modell integritására, permeabilitási és morfológiai vizsgálatokat végeztünk. Az endotélisejtek károsításához a citokinek koncentrációját (TNF- α : 10 ng/ml, IL-1 β : 10 ng/ml) csoportunk egy korábbi munkájában határoztuk meg (Harazin és mtsai, 2018). A három sejttípusból álló vér-agy gát modell integritását a TEER értékkel és a látszólagos permeabilitási együtthatóval jellemeztük. A 6 órás citokin kezelés szignifikánsan lecsökkentette a modell elektromos ellenállását, ezt a hatást egyik tesztelt vegyület sem tudta kivédeni (20. ábra).



20. ábra. A proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat (GSPE) és a fenolos vegyületek hatása a citokinekkal (CK; TNF- α , IL-1 β) károsított vér-agy gát modell integritására. Transzendenteliális elektromos ellenállás. Átlag \pm SEM, $n = 4-8$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest. K: kontroll csoport, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezveratrol, TEER: transzendenteliális elektromos ellenállás.

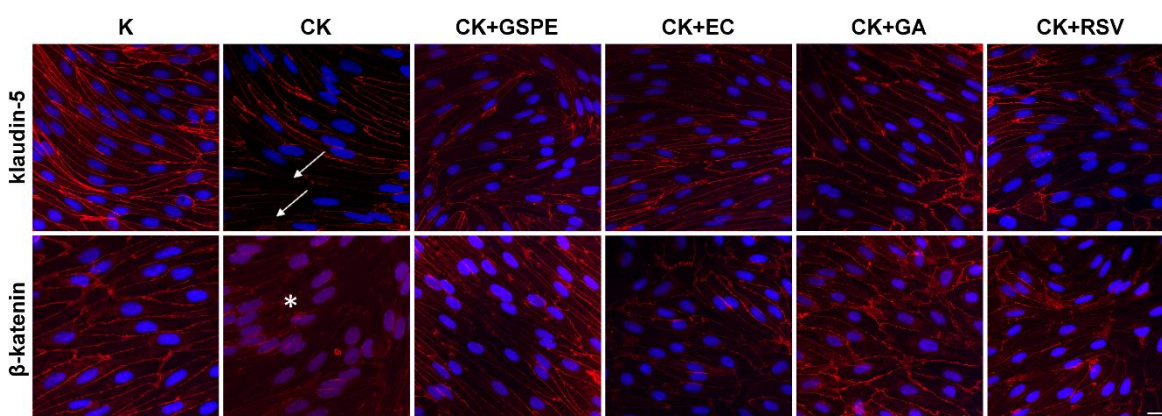
A kontroll csoport esetében alacsony jelzőanyag átjutást mértünk (21a-b ábra) fluoreszceinre ($1,75 \times 10^{-5}$ cm/s) és albuminra ($0,35 \times 10^{-5}$ cm/s). A 6 órás citokin kezelés szignifikánsan megnövelte mindkét jelzőanyag átjutását a sejtrétegeken, összhangban a TEER értékekkel (20. ábra). A szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonat (10 $\mu\text{g/ml}$), az

epikatekin (10 μM) és a galluszsav (1 μM) egyik marker esetében sem mutatott védőhatást. A rezvetratrol (10 μM) a fluoreszcein esetében nem, albumin esetében azonban hatásosnak bizonyult: szignifikánsan csökkentette a citokin kezelés által megnövelt jelzőanyag átjutást (21b ábra).



21. ábra. A proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat (GSPE) és a fenolos vegyületek hatása a citokinekkal (CK: TNF- α +IL-1 β) károsított vér-agy gát modell integritására. (a) Fluoreszcein permeabilitás. (b) Evans-kékkel jelölt albumin permeabilitás. Átlag \pm SEM, $n = 4-8$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$ a citokinekkal károsított csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezvetratrol, TEER: transzendenteliális elektromos ellenállás.

A vér-agy gát alapját képező endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok szerkezetét két fehérje immunfestésével vizsgáltuk: az integráns membránfehérje klaudin-5 és az adherens kapcsolatokat kialakító β -katenin folytonos, övszerű festődést mutatott az endotélsejtek határain a kontroll csoportban (22. ábra).

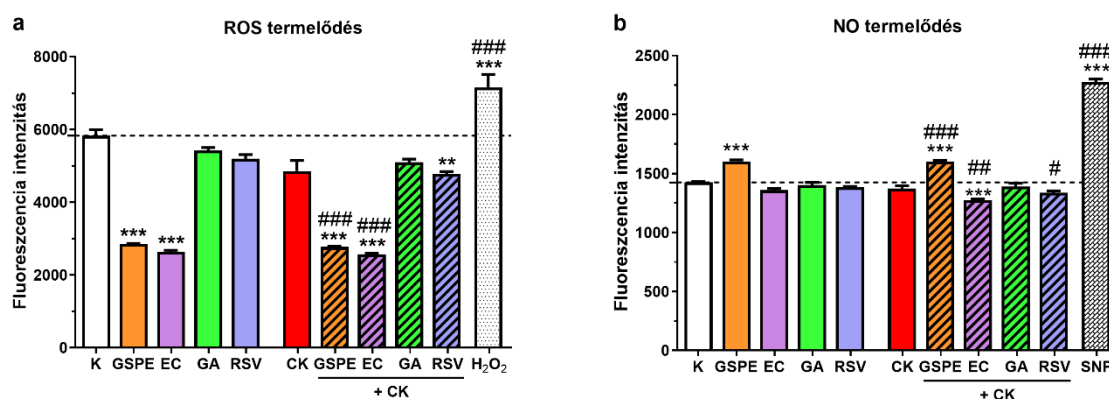


22. ábra. Az agyi endotélsejtek klaudin-5 és β -katenin sejtkapcsoló fehérjéinek morfológiai vizsgálata citokinekkal és szőlőből származó természetes vegyületekkel történő kezelés hatására. Piros: sejtkapcsoló fehérjék; kék: sejtmag. Nyilak: a sejtkapcsoló fehérjék festődésének felszakadozása, megváltozása. Csillag: citoplazmatikus átrendeződés. Mércse: 10 μm . K: kontroll csoport, CK: citokin-kezelt csoport; GSPE: proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezvetratrol.

Ez a mintázat citokin kezelés hatására megváltozott, a klaudin-5 fehérje festődése gyengébb és szakadozott lett, a β -katenin festés esetén pedig sejten belüli átrendeződés figyelhető meg: a sejthatárról a citoplazmába és a magba kerül át a fehérje. A természetes szőlőkivonatokkal történő 30 perces előkezelés hatására a sejtkapcsoló fehérjék immunfestődése a kontroll csoportéhoz volt hasonló (22. ábra).

4.11. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modellre – reaktív oxigén- és nitrogén-monoxid termelés

A gyulladáscsökkentő citokinekkal történő kezelés nem befolyásolta az endotélsejtek szabad oxigén- és NO termelését (23a-b ábra). Az agyi endotélsejtek ROS termelését a szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonat (10 μ g/ml) és az epikatekin (10 μ M) szignifikánsan csökkentették, erős gyökfogó hatást mutattak. A rezveratrol (10 μ M) önmagában nem változtatta meg a sejtek ROS termelését, azonban citokinekkal együtt alkalmazva csökkentette azt (23a ábra).



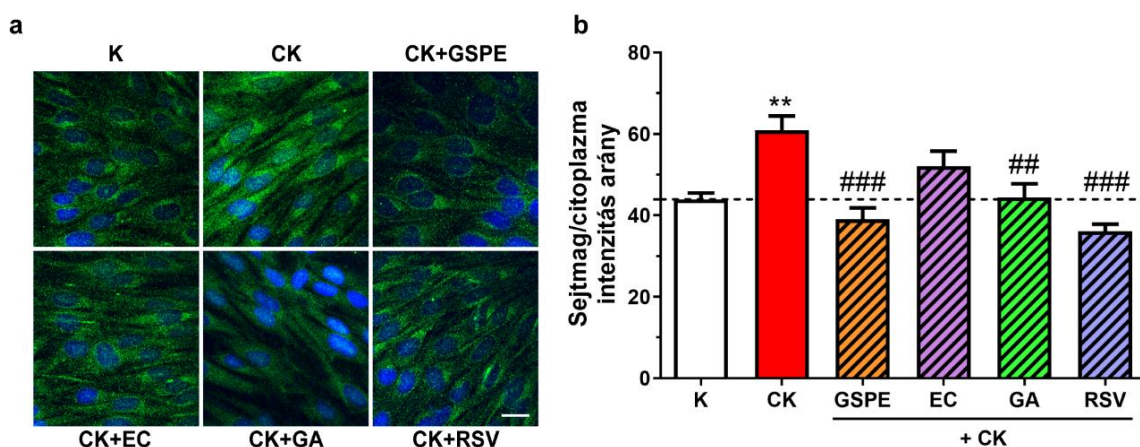
23. ábra. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a (a) reaktív oxigén- (ROS) és (b) nitrogén-monoxid (NO) termelésére citokinekkal károsított agyi endotélsejtekben. Referencia vegyület a ROS mérés során: hidrogén-peroxid (100 μ M), referencia vegyület az NO termelés mérés során: nátrium-nitroprusszid (100 μ M). Átlag \pm SEM, $n = 8$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ a citokinekkal károsított csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport, CK: citokin-kezelt csoport; GSPE: proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezveratrol, H₂O₂: hidrogén-peroxid, SNP: nátrium-nitroprusszid.

Az epikatekin és a rezveratrol citokinekkal együtt alkalmazva csökkentették az endotélsejtek NO termelését. Ezzel szemben a szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonat önállóan és citokinekkal közösen is szignifikánsan megnövelte az NO termelődést (23b ábra). A galluszsavnak egyik vizsgálatban sem volt hatása. A referencia vegyületként

alkalmazott hidrogén-peroxid és nátrium-nitroprusszid szignifikánsan megemelte a ROS, illetve NO termelést (**23. ábra**).

4.12. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér- agy gát modellre – az NF- κ B sejtmagi bejutása

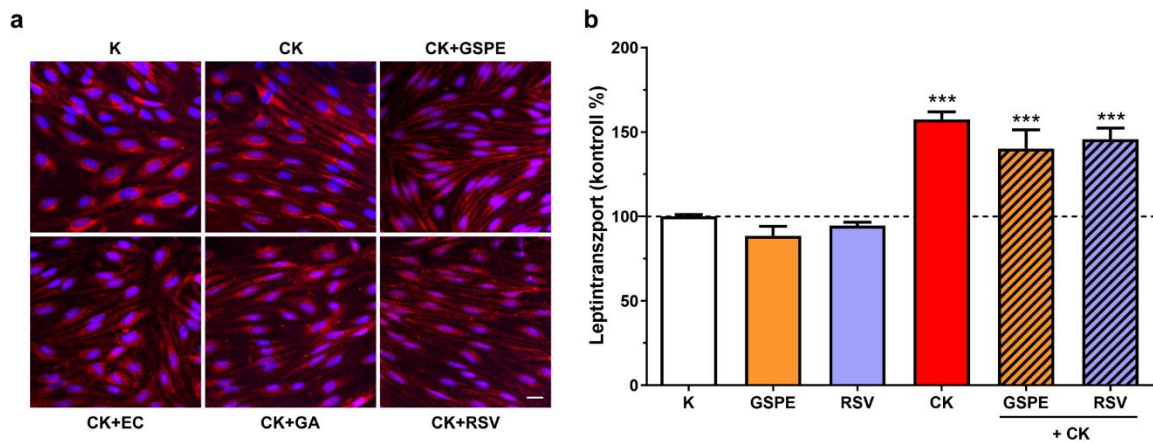
A citokinek által kiváltott sejt szintű gyulladási válasz kimutatásának megbízható módja az NF- κ B transzkripciós faktor p65 alegységének a citoplazmából a sejtmagba történő bejutásának vizsgálata. A kontroll csoportban az NF- κ B p65 alegysége főként a citoplazmában volt megfigyelhető (**24a ábra**). Ez citokin kezelés hatására megváltozott, megnőtt a sejtmag/citoplazma immunfestés fluoreszcens intenzitás hányadosa (**24b ábra**). A szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonat, a galluszsav és a rezveratrol szignifikánsan csökkentette ezt a hányadost, azaz gátolta az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagba jutását. Az epikatekin nem volt hatással a transzkripciós faktor p65 alegységének elhelyezkedésére (**24b ábra**).



24. ábra. A természetes vegyületek hatása a citokinekkal kezelt agyi endotélsejtekben az NF- κ B sejtmagba történő bejutására. **(a)** NF- κ B immunfestődése. Zöld: NF- κ B p65 alegysége; kék: sejtmag. Mércse: 10 μ m. **(b)** Az NF- κ B immunfestés kiértékelése fluoreszcencia intenzitás alapján (sejtmag/citoplazma). Átlag \pm SEM, $n = 8$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ a citokinekkal károsított csoporthoz viszonyítva. K: kontroll csoport, CK: citokin-kezelt csoport; GSPE: proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezveratrol.

4.13. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér- agy gát modellre – a leptin receptorok kifejeződése és a leptintranszport

A leptin receptorok jelenlétét agyi endotélsejtekben mindegyik kezelési csoportban igazoltuk immuncitokémiával egy olyan ellenanyaggal, ami minden izoformát felismer (**25a ábra**).



25. ábra. A természetes vegyületek hatása a leptin receptorok kifejeződésére agyi endotélsejtekben és a vér-agy gáton keresztüli leptintranszportra citokin-károsítással szemben. **(a)** A leptin receptorok immuncitokémiai festődése (piros) citokinekkal és természetes vegyületekkel kezelt agyi endotélsejtekben. Kék: sejtmag. Mércé: 10 μ m. **(b)** Leptintranszport a vér-agy gát modellen keresztül citokinekkal és természetes vegyületekkel történő kezelés hatására. Átlag \pm SEM, $n = 4$. Statisztikai próba: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt; *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest. K: kontroll csoport, CK: citokin-kezelt csoport; GSPE: proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat, RSV: rezveratrol.

A vér-agy gáton való leptin átjutás vizsgálatához védőanyagként a szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonatot és a rezveratrolt választottuk ki **(25b ábra)**. Önmagában egyik anyag sem változtatta meg a leptin vér-agy gát modellen keresztül transzportját, a citokin kezelés azonban szignifikánsan, 57%-kal megnövelte. Ezt a megemelt átjutást sem a szőlőmag proantocianidin-gazdag kivonat, sem a rezveratrol nem befolyásolta **(25b ábra)**.

5. Megbeszélés

5.1. A kainát agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásának kivédése gyógyszerhatóanyagokkal

Az excitotoxicitás, azaz a glutamát receptorok hiperaktivációja az egyik legfőbb károsító folyamat a központi idegrendszer érintő megbetegedések során, amely a neuronok pusztulásához és a vér-agy gát károsodásához vezethet (Friedman és Heinemann, 2012; Klement és mtsai, 2019). A vér-agy gát különböző tenyészetes modelljein már igazolták, hogy a glutamát növeli az agyi endotélsejtek áteresztőképességét, és csökkenti a szoros kapcsolatok integritását (András és mtsai, 2007; Kuhlmann és mtsai, 2008; Basuroy és mtsai, 2013). Az NMDA és AMPA ionotróp glutamát receptor agonistákról is leírták már, hogy sertés agyi endotélsejtekben csökkentik a sejtréteg ellenállását, valamint megemelik a permeabilitását (Basuroy és mtsai, 2013). Basuroy és munkatársai ugyanezen a vér-agy gát modellen azt is kimutatták, hogy a kainsav sejtkárosodást okoz, megnöveli a DNS fragmentációját, ezáltal a sejtek halálához vezet, azonban a kainát receptorok kifejeződését és a kainát közvetlen hatását nem vizsgálták.

A glutamát receptorok közül az NMDA, az AMPA és a metabotróp glutamát receptorok jelenlétét igazolták már agyi endotélsejtekben RNS, fehérje vagy funkcionális szinten (Krizbai és mtsai, 1998; Parfenova és mtsai, 2003; András és mtsai, 2007; Scott és mtsai, 2007; Kuhlmann és mtsai, 2008; Reijerkerk és mtsai, 2010). Saját eredményeink alátámasztják a *Grik1* és a *Grik4* kainát receptor gének kifejeződését izolált agyi mikroerekben, valamint a *Grik1* gén kifejeződését tenyésztett agyi endotélsejtekben. Az izolált mikroér frakciók az agyi endotélsejtek mellett pericitákat és asztrocita végtalpakat is tartalmaztak. Habár a glutamát képes megváltoztatni az agyi pericita sejtek működését (Hall és mtsai, 2014), a kainát receptorok kifejeződését még nem igazolták ezeken a sejteken. A *Grik4* gén kifejeződését már leírták asztrocita sejtekben tenyészetben (Cauley és mtsai, 1997) és *in vivo* is (Vargas és mtsai, 2013).

Kísérleteinkben impedancia alapú, valós idejű sejtanalízissel igazoltuk, hogy a kainsav csökkenti a patkány agyi endotélsejtek életképességét (**26. ábra**), azonban nem befolyásolta azt agyi pericita és asztrocita sejtrétegek impedanciáját. Habár számos kutatás alátámasztja az idegsejtek és az oligodendrociták kainsavval szembeni érzékenységét, az agyi periciták és asztrociták kainsav-indukálta károsodásáról nincsenek szakirodalmi adatok. Az általunk alkalmazott kainsav koncentráció magasnak mondható, azonban a különböző tenyészetes vér-agy gát modelleken végzett vizsgálatokban hasonlóan magas kainát és glutamát

koncentrációkat alkalmaztak (Krizbai és mtsai, 1998; András és mtsai, 2007; Basuroy és mtsai, 2013). Ezzel összefüggésben epilepsziás betegek hippocampuszában 50-75 μM extracelluláris glutamát koncentrációt is mértek, ami az excitotoxikus neurotranszmitterek nagyon magas koncentrációjára utal patológiás körülmények között (During és Spencer, 1993).

3. táblázat. Gyógyszerhatóanyagok védőhatásai az excitotoxin kainsav károsító hatásaival szemben a vér-agy gát tenyészetes modelljén.

	KA	SIM	EDA	DXM
Életképesség	↓	↑	↑	↑
Barrier integritása	↓	↑	↑	↑
ROS termelődés	-	-	↓	-
NO termelődés	↑	-	-	↓
NOS2/iNOS	↑	n.v.	n.v.	↓

Rövidítések: ↑: emeli; ↓: csökkenti; -: nincs hatása; n.v.: nem vizsgáltuk. KA: kainsav, SIM: szimvasztatin, EDA: edaravon, DXM: dexametazon, ROS: reaktív oxigéngyök, NO: nitrogén-monoxid, NOS2/iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz.

Eredményeink alapján a kainát megnövelte a vér-agy gát modell áteresztőképességét fluoreszcein és albumin jelzőanyagokra, és megváltoztatta az agyi endotélsejtekben a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék festődési mintázatát (**3. táblázat**). A kapott eredményeink összhangban vannak a kutatócsoport saját (András és mtsai, 2007), és más kutatócsoportok (Kuhlmann és mtsai, 2008; Basuroy és mtsai, 2013) korábban leírt adataival a glutamát vér-agy gát megnyílást okozó hatásáról.

Az oxidatív stressz és a reaktív oxigéngyökök termelődése hozzájárul az excitotoxicitáshoz. Habár sertés agyi endotélsejtekben kimutatták, hogy a kainsav fokozza a ROS-termelődést (Basuroy és mtsai, 2013), a mi kísérleteinkben tenyészetes patkány vér-agy gát modellen a kainát erre nem volt hatással (**3. táblázat**). Ennek a hátterében az eltérő kainát kezelési koncentráció és detektálási módszer állhat. Kísérleteink igazolták, hogy kainsav hatására megemelkedik az NO-termelődés, és fokozódik a NOS2/iNOS mRNS expressziója (**3. táblázat**). Élettani körülmények között az agyi endotélsejtek NOS2/iNOS szintje elhanyagolható, azonban különböző kórállapotok során megemelkedik (Naseem,

2005). Kísérleteinkben a NOS2/iNOS expresszió fokozódása a kainát károsító hatására utal. Kapott eredményeink összhangban vannak korábbi adatokkal, miszerint a patkány agykéregbe juttatott kainsav növeli a mikroerek NOS aktivitását (Lei és mtsai, 1996).

A vér-agy gát idegrendszeri betegségekben igazolt szerepe miatt egyre több kutatás irányul a védőhatású vegyületekre. Számos gyulladáscsökkentő és antioxidáns gyógyszerről és újonnan kifejlesztett hatóanyagról igazolták tenyészetes modelleken, hogy vér-agy gát protektív hatással is rendelkeznek (Deli és mtsai, 2005), és ezek közül már több szert is alkalmaznak a sztrók, az amiotrófiás laterálszklerózis, vagy az epilepszia kezelésére (Marchi és mtsai, 2011; Watanabe és mtsai, 2018; Hachinski és mtsai, 2019). Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a szimvasztatin megvédte az agyi endotélsejteket a kainát károsító hatásaival szemben életképességi és permeabilitási vizsgálatokban, valamint visszaállította a sejtkapcsolatok megváltozott immunfestését (**3. táblázat**). Az eredményeink összhangban állnak a fluvasztatin védőhatásával glutamáttal kiváltott *in vitro* vér-agy gát károsodás esetén (Kuhlmann és mtsai, 2008). A szimvasztatin NMDA-indukált excitotoxicitás esetén is védőhatásúnak bizonyult tenyésztett kortikális idegsejteken (Zacco és mtsai, 2003).

A sztatinek agyi bejutása az egyik kulcsfontosságú tényező a lehetséges terápiás hatékonyságukban különböző neurológiai kórképekben. A gyógyszerátjutás fontos szabályozói az agyi endotélsejtek szállítórendszerei. A sztatinek nem csak passzívan juthatnak be az agyba zsíroldékonyságuk alapján, hanem aktív módon szállítófehérjék (pl. OATP/SLCO fehérjecsalád) vihetik be az agyba és efflux transzporterek (pl. P-glikoprotein) gátolhatják meg a bejutásukat. Ezek a szállítófehérjék jelen van a vér-agy gáton, és befolyásolják a központi idegrendszerre ható szerek agyba való bejutását (Campos-Bedolla és mtsai, 2014; Veszelka és mtsai, 2018). Csoportunk korábban már igazolta egyéb sztatinek, a rozuvasztatin, a pravasztatin és az atorvasztatin hatékony átjutását a vér-agy gát tenyészetes modelljén (Veszelka és mtsai, 2018). Saját eredményeink és az irodalmi adatok alátámasztják a sztatinek lehetséges terápiás alkalmazását az epilepszia (Banach és mtsai, 2014), a sztrók és neurodegeneratív betegségek gyógyításában (Malfitano és mtsai, 2014).

Az edaravon szintén védőhatásúnak bizonyult a kainsav-indukálta károsodásokkal szemben, és csökkentette a reaktív oxigéngyökök termelődését agyi endotélsejtekben (**3. táblázat**), ami összhangban van korábbi eredményeinkkel (Tóth és mtsai, 2014). Vaszkuláris endotélsejtekben elősegítette a TJ-k kialakulását (Onodera és mtsai, 2013), és az NMDA-által kiváltott excitotoxicitás során antioxidáns hatást mutatott agysejteken (Nakano-Okuda és mtsai, 2006). Az edaravon védő hatását kaináttal kiváltott epilepszia modellekben is kimutatták patkányokban (Miyamoto és mtsai, 2008; Nomura és mtsai,

2014). Ezek a preklinikai adatok mind alátámasztják az edaravon vér-agy gát védelmében betöltött szerepét, így ez is hozzájárulhat az akut sztrók és az amiotrófiás laterálszklerózis klinikai kezelésében megfigyelt hatékonyságához (Watanabe és mtsai, 2018).

A dexametazon vér-agy gát szorosságát fokozó hatását már korábbi kísérletekben is igazolták tenyészetes modelleken (Deli és mtsai, 2005; Förster és mtsai, 2007). A dexametazon fokozza a klaudin-5 és ZO-1 TJ fehérjék kifejeződését károsított agyi endotélsejt tenyészetekben (Blecharz és mtsai, 2010; Hue és mtsai, 2015), ami megerősíti saját eredményeinket is. *In vitro* eredményeink összhangban állnak a kaináttal (Sztriha és mtsai, 1986) és pilokarpinnal (Marchi és mtsai, 2011) indukált epilepszia állatmodellekben megfigyelt adatokkal, ezekben a dexametazon vér-agy gátat védő hatást mutatott. Kísérleteinkben a dexametazon csökkentette az agyi endotélsejtekben a kainsav kezelés által megnövelt NO termelődést és a NOS2/iNOS gén kifejeződését (**3. táblázat**). Saját eredményeinkhez hasonlóan a dexametazon csökkentette a vér-agy gát átteresztőképességét és a NOS2/iNOS aktivitást lipopoliszachariddal kezelt egerekben is (Minami és mtsai, 1998). Habár a dexametazon terápiás hatékonysága epilepsziában még vitatott, jótékony hatást fejtett ki gyermekkori gyógyszer-rezisztens epilepsziában (Marchi és mtsai, 2011). Kísérleti eredményeink és a dexametazon klinikai alkalmazása az agyödéma csökkentésére támogatják a dexametazon alkalmazásának lehetőségét a vér-agy gát károsodás csökkentésére epilepsziában is.

5.2. A gyulladáshoz vezető citokinek agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásának kivédése természetes hatóanyagokkal

Kísérleteink során négy szőlőből származó kivonatot, illetve vegyületet vizsgáltunk. A GSPE különböző fenolos vegyületeket tartalmaz, amik főleg a flavonoid családhoz tartoznak (Baselga-Escudero és mtsai, 2014). Az epikatekin flavonoid, míg a rezveratrol és a galluszsav nem-flavonoid vegyületek. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a fenolos flavonoid és a nem-flavonoid természetes anyagok lehetséges védőhatását is a vér-agy gát modellen. A rezveratrol az egyik leginkább tanulmányozott bioaktív fenolos vegyület, számos jótékony tulajdonságát leírták, mint például a gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatást (Nassiri-Asl és Hosseinzadeh, 2016). Több kutatócsoport is vizsgálta már a rezveratrol hatását az elhízásra, és az ehhez kapcsolódó kórállapotokra (Aragonès és mtsai, 2016a; Akaberi és Hosseinzadeh, 2016). Habár már számos természetes anyag vér-agy gátra kifejtett hatását megvizsgálták (Campos-Bedolla és mtsai, 2014), mi tanulmányoztuk

elsőként a GSPE és a fenolos vegyületek agyi endotélsejtekre és leptintranszportra kifejtett hatását tenyészetes vér-agy gát modellen.

A kezelési koncentrációkat és az inkubációs időket szakirodalmi adatok és saját korábbi eredményeink alapján választottuk ki (Baselga-Escudero és mtsai, 2014; Rojas és mtsai, 2014; Aragonès és mtsai, 2016a; Harazin és mtsai, 2018). A GSPE-vel és a fenolos vegyületekkel történő kezelés nem befolyásolta az agyi endotélsejtek életképességét, kivéve a legmagasabb kezelési koncentrációban alkalmazott GSPE és rezveratrol csoportokat (Ardid-Ruiz és mtsai, 2020, 1. ábra), ami megerősíti ezeknek az élelmiszerekben is megtalálható vegyületeknek a biztonságos alkalmazását.

A krónikus szisztémás gyulladás, amit az adipocitákból felszabaduló gyulladásos citokinek és az aktivált immunsejtek váltanak ki, központi eleme az elhízás patomechanizmusának (Marseglia és mtsai, 2014). A keringő gyulladáskeltő citokinek közvetlenül hatnak az agyi endotélsejtekre és károsítják a vér-agy gátat: a megváltozott TJ fehérje kifejeződés és sejten belüli redisztribúció és a megemelkedett átteresztőképesség következtében sérül a vér-agy gát integritása, emellett az oxidatív stressz és a vér-agy gát gének kifejeződésének változásai is hozzájárulnak a gátfunkciók romlásához (Deli és mtsai, 2005; Lopez-Ramirez és mtsai, 2013; Liebner és mtsai, 2018; Harazin és mtsai, 2018). A vér-agy gát szisztémás gyulladás által okozott károsodása kötheti össze a metabolikus szindrómát/kóros elhízást és az ezekkel összefüggő idegrendszeri betegségek súlyosbodását (Rhea és mtsai, 2017; Van Dyken és Lacoste, 2018). Hasonlóan a szisztémás gyulladáshoz, a kóros elhízás során is megemelkedik a gyulladásos citokinek termelődése számos agyterületen, ami helyi gyulladáshoz vezet főleg a hipotalamusz területén (Rhea és mtsai, 2017). Az idegi gyulladás és a vér-agy gát károsodása között kétirányú kapcsolat van: mindkettő elindíthatja és/vagy fokozhatja a másik kórállapotot (Rhea és mtsai, 2017). Az elhízás, a gyulladás és a leptin megnövekedett szintje a vérben jól tanulmányozott folyamat (Bastard és mtsai, 2006; Marseglia és mtsai, 2014). Az agyi leptintranszport lecsökken az elhízás során, míg a vérben lévő leptin szintje megemelkedik, ezek a folyamatok pedig hozzájárul a leptinrezisztencia kialakulásához a betegség során (Caro és mtsai, 1996). A két leghatékonyabb gyulladáskeltő citokin, amik közvetlenül károsítják az agyi endotélsejteket, a TNF- α és az IL-1 β (Deli és mtsai, 2005; Harazin és mtsai, 2018). A gyulladásos folyamat tanulmányozására, ami kóros elhízás során és a vér-agy gát szintjén is megfigyelhető (Rhea és mtsai, 2017; Van Dyken és Lacoste, 2018), citokinekkal kezelt tenyészetes vér-agy gát modellt használtunk, hogy megvizsgáljuk a szőlőből származó fenolos vegyületek lehetséges védőhatását.

A citokinek károsították a vér-agy gát integritását, amire a lecsökkent elektromos ellenállási értékek és a megnövekedett áteresztőképesség is utal. Korábbi kísérleteinkben hasonló citokinek által kiváltott csökkenést figyeltünk meg az agyi endotélsejtek életképességében és a gátrendszer szorosságában (Harazin és mtsai, 2018). A citokinek fokozták az albumin átjutást, amit egyedül a rezveratrol tudott csökkenteni a vizsgált anyagok közül (**4. táblázat**). Ez összhangban van a rezveratrol vér-agy gát protektív hatásával sejtenyészetekben és állatmodellekben is (Clark és mtsai, 2012; Campos-Bedolla és mtsai, 2014; Kaisar és mtsai, 2015).

Az elhízáshoz kapcsolódó kórállapotok során (metabolikus szindróma, kardiovaszkuláris zavarok) a fenolos vegyületek az antioxidáns hatásuk révén tudják leginkább kifejteni jótékony tulajdonságaikat (Diaz-Gerevini et al., 2016; Wiciński et al., 2018). Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a GSPE, az epikatekin és a rezveratrol is csökkentette a reaktív oxigéngyökök termelődését citokinek jelenlétében (**4. táblázat**) a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan (Kaisar és mtsai, 2015; Panickar és mtsai, 2015).

A tesztelt vegyületek eltérő hatást fejtettek ki az agyi endotélsejtek NO termelésére: a GSPE önmagában és citokinekkal együtt alkalmazva is megnövelte az NO szintet, míg az epikatekin és a rezveratrol csökkentették azt citokinek jelenlétében (**4. táblázat**). A NOS mindhárom izoformája kifejeződik az agyi endotélsejtekben (Veszélka és mtsai, 2018). A GSPE a NOS3/eNOS izoformán keresztül hatékonyan tudja fokozni az NO termelődését (Fitzpatrick és mtsai, 2002), és csökkenteni a metabolikus szindrómához kapcsolódó magas vérnyomást (Pons és mtsai, 2016), ezáltal véd a magas vérnyomás okozta agyi vaszkuláris károsodástól (Hao és mtsai, 2018). Ezzel szemben a rezveratrol gátolja a NOS2/iNOS akvititását, és képes visszaállítani az agyi érhálózat állapotát diabéteszes patkányokban (Arrick és mtsai, 2011). Az epikatekin szintén jótékony hatást fejtett ki az oxidatív stressz okozta endoteliális zavarok során a NOS2/iNOS gátlása révén (Steffen és mtsai, 2007). Feltételezzük, hogy a GSPE, a rezveratrol és az epikatekin különböző NOS izoformákon kifejtett eltérő hatásai magyarázhatják az általunk agyi endotélsejteken kapott eredményeket.

A citokinek gyulladáskeltő hatását az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagi transzlokációja idézi elő, ami hozzájárul a vér-agy gát károsodásához (Harazin és mtsai, 2018). A GSPE, a galluszssav és a rezveratrol képes volt gátolni ezt a citokin-indukált folyamatot (**4. táblázat**). Adataink összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel: a GSPE (Sen és Bagchi, 2001), a galluszssav (Del Bo és mtsai, 2016) és a rezveratrol (Diaz-Gerevini és mtsai, 2016) hasonló hatását már kimutatták citokinnel kezelt endotélsejteken, vagy gyulladáshoz vezető körülmények között.

Kísérleteink során a galluszsavat és az epikatint abban a koncentrációban alkalmaztuk, mint amit a GSPE kivonat tartalmazott az általunk használt hígításban (Baselga-Escudero és mtsai, 2014). A galluszsav nem változtatta meg sem a reaktív oxigéngyökök, sem az NO szintjét. A GSPE és a galluszsav is gátolni tudta az NF- κ B transzkripció faktor citokinek által kiváltott sejtmagi transzportját, az epikatekin azonban ezt nem befolyásolta (4. táblázat). Az epikatekin önmagában nem fokozta az NO szintjét agyi endotélsejtekben, de citokinek jelenlétében csökkentette (4. táblázat). A GSPE-hez hasonlóan az epikatekin mérsékelte a reaktív oxigéngyökök termelődését (4. táblázat). Adataink arra utalnak, hogy a galluszsav és az epikatekin hozzájárulhatnak a GSPE kivonat hatásaihoz, de abban más vegyületek, például katekin, epikatekin-gallát, gallát dimer (Baselga-Escudero és mtsai, 2014) hatásai is érvényesülhetnek.

4. táblázat. A természetes hatóanyagok védőhatásai gyulladáscitokinekkel szemben a vér-agy gát tenyésztéses modelljén.

	CK	GSPE	EC	GA	RSV
Permeabilitás	↑	-	-	-	↓
TJ immunfestés	↓	↑	↑	↑	↑
ROS termelődés	-	↓	↓	-	↓
NO termelődés	-	↑	↓	-	↓
NF- κ B transzlokáció	↑	↓	-	↓	↓
Leptintranszport	↑	-	n.v.	n.v.	-

Rövidítések: ↑: emeli; ↓: csökkenti; -: nincs hatása; n.v.: nem vizsgáltuk. CK: citokinek, GSPE: proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonat, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezveratrol, TJ: szoros kapcsolat, ROS: reaktív oxigéngyök, NO: nitrogén-monoxid, NK- κ B: nukleáris faktor-kappa B.

A leptin három útvonalon keresztül juthat be az agyba: a vér-agy gátat alkotó endotélsejtek rétegén keresztül (Banks és mtsai, 1996), a vér-cerebrospinalis folyadék gátat alkotó choroid plexus epitélisejteken keresztül (Zlokovic és mtsai, 2000), és a mediobazális hipotalamuszt körbevevő tanicitákon keresztül, amik szoros kapcsolataik révén gátat alkotnak az *eminetia medialis* és a cerebrospinalis folyadék között (Balland és mtsai, 2014). A leptin aktív, endocitózis-függő transzportját már korábban leírták humán tenyésztett vér-

agy gát modellen (Gonzalez-Carter és mtsai, 2016). Kísérleteinkben a vér-agy gáton keresztüli leptin átjutást fokozták a citokinek, ezt viszont nem tudta befolyásolni sem a GSPE, sem a rezveratrol (**4. táblázat**).

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a természetes szőlő vegyületek megvédik a természetes vaszkuláris endotélsejteket a citokinek által keltett gyulladástól és oxidatív stressztől az NF- κ B útvonalon keresztül, ezzel alátámasztottuk a szőlő kivonatok etnofarmakológiai alkalmazását szív- és érrendszeri betegségekben (Paul és mtsai, 1999; Darshan és Doreswamy, 2004). Klinikai vizsgálatok szintén bizonyították a GSPE, és az önálló szőlő fenolos vegyületek hatékonyságát kardiovaszkuláris megbetegedések során (Weseler és Bast, 2017). A GSPE kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett jótékony hatását igazolták elhízott cukorbetegeken is (Kar és mtsai, 2009). További klinikai vizsgálatokban a GSPE és a rezveratrol csökkentették az oxidatív stresszt túlsúlyos betegekben (De Groote és mtsai, 2012). A szőlőből származó vegyületek egyéb jótékony hatásait *in vitro* és klinikai kísérletekkel is kimutatták elhízás során. A GSPE a táplálékbevitel csökkentésével és az energiafelhasználás növelésével gátolta a súlygyarapodást túlkoros patkányokban (Serrano és mtsai, 2017), valamint egészséges önkéntesekben is mérsékelte az energiabevitelt (Vogels és mtsai, 2004). A rezveratrol, az epikatekin és a galluszsav is a fitoösztrogének családjába tartozik, és affinitást mutat az ösztrogén receptorokhoz (Simoncini és mtsai, 2011; Hidalgo és mtsai, 2012). Nem zárható ki, hogy az ösztrogén receptorokon és az endoteliális NOS3 enzim aktivációján keresztül kifejtett hatás is hozzájárul az agyi endotélsejteken mért védőhatásukhoz.

Eredményeink összhangban állnak a szakirodalmi megfigyelésekkel, és alátámasztják, hogy a szőlőből származó természetes vegyületek jótékony hatást fejthetnek ki a vér-agy gátra elhízás során.

5.3. Összegzés

Számos betegséghez társul szisztémás és idegrendszeri gyulladás. Ezekben a felszabaduló citokinek és az excitotoxinok vér-agy gát károsodást hoznak létre, ami tovább súlyosbítja a neuroinflammációt. Ennek megakadályozása a gátrendszer védelmével fontos feladat ezeknek a gyulladással járó betegségeknek a gyógyításában. Mivel a gyulladással is járó központi idegrendszeri betegségek kezelése még nem megoldott, ezért a kiegészítő kezelések és új szerek feltárása fontos és aktuális kutatási terület. Vizsgálataink során az excitotoxikus kaint, valamint a TNF- α és az IL-1 β gyulladással járó citokinek által okozott

károsodások kivédésére gyógyszerhatóanyagok és természetes vegyületek agyi endotélsejtekre kifejtett hatását tanulmányoztuk.

Kísérleteinkben igazoltuk a kainát receptorok jelenlétét tenyésztett primer agyi endotélsejteken és izolált agyi mikroér frakcióban. Először mutattuk ki, hogy az excitotoxin kainát közvetlenül károsítja az agyi endotélsejteket. Kainsav kezelés hatására a TJ fehérjék festődési mintázata szakadozottá vált a sejthatárokon, ami a vér-agy gát megnyílására utalt. A kainát megnövelte a jelzőanyagok átjutását a barrieren, valamint az NO termelődését és a NOS2/iNOS mRNS expresszióját agyi endotélsejteken. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon védőhatást mutatott a kainsav által csökkentett életképesség, megnövelt jelzőanyag átjutás és a sejtek közötti kapcsolatok immunfestésében mért változások ellen tenyésztetes vér-agy gát modellen. Ezen felül a dexametazon kivédte a kainsav kezelés által fokozott NO termelődést és NOS2/iNOS expressziót.

Tenyésztetes agyi endotélsejteken és vér-agy gát modellen kapott eredményeinkkel alátámasztottuk a természetes szőlő hatóanyagok antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatását vaszkuláris endotélsejteken. Ezek az eredmények összhangban állnak a szőlő kivonatok hagyományos felhasználásával és a bioaktív szőlő vegyületekkel végzett klinikai vizsgálatokkal szív- és érrendszeri megbetegedésekben. Adataink alapján a GSPE és a szőlő fenolos vegyületek a vér-agy gátra kifejtett jótékony hatásuk révén fontos elemei lehetnek a krónikus elhízás kezelésének. A vizsgált természetes hatóanyagok részben gátolni tudták a citokinek által kiváltott gyulladást, ami fontos eleme az elhízás patológiájának. Agyi endotélsejt tenyésztetekon végzett kísérleteink rávilágítottak arra, hogy a szőlőből származó természetes vegyületek milyen mechanizmusok révén állhatnak kapcsolatban a leptin transzportjával. Eredményeink felhívják a figyelmet a természetes vegyületek lehetséges jótékony hatására élelmiszerek vagy táplálékkiegészítők összetevőjeként.

Mindezek az eredmények megerősítik a természetes vegyületek és a klinikumban már használt gyógyszerhatóanyagok a vér-agy gátra kifejtett protektív hatását.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Deli Máriának és Dr. Harazin Andrásnak a munkám során nyújtott lelkiismeretes szakmai irányításért. Külön köszönöm Prof. Deli Máriának szüntelen támogatását és példamutatását, valamint, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportjában kiemelkedő szakmai körülmények között és baráti környezetben dolgozhassak. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Harazin Andrásnak, hogy diákkoromban végtelen türelemmel megtanította nekem a kutatáshoz szükséges alapvető kísérletes technikákat. Mindig vidáman gondolok vissza az együtt elvégzett kísérletekre.

Ezúton szeretném megköszönni a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának – Dr. Veszelka Szilvia, Dr. Hoyk Zsófia, Dr. Walter Fruzsina, Dr. Bocsik Alexandra, Dr. Harazin András, Dr. Mészáros Mária, Dr. Gróf Ilona, Dr. Ana Raquel Pato Santa Maria, Vigh Judit, Porkoláb Gergő, Szecskó Anikó, Barabási Beáta, és a hallgatónk – a baráti légkört és a rengeteg szakmai támogatást, segítséget. Köszönöm, hogy mindig színt visztek a szürke hétköznapokba!

Köszönöm Prof. Ormos Pálnak és Prof. Nagy Ferencnek, az SZBK főigazgatóinak, Prof. Zimányi Lászlónak a Biofizikai Intézet igazgatójának és Dr. Siklós Lászlónak, a Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegysége vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat. Köszönöm a kutatóegység, a Biofizikai Intézet és az egész kutatóközpont minden munkatársának támogatását.

Szeretném megköszönni együttműködő partnereinknek – Dr. Andrea Ardid-Ruiz, Dr. Zvara Ágnes, Jósavay Katalin, Dr. Patricia Campos-Bedolla, Dr. Tubak Vilmos, Dr. Kincses András –, hogy lehetővé tették a közös cikkek létrejöttét.

Köszönöm barátaimnak, hogy az egyetemi és a doktori éveim alatt végig hittek bennem és rengeteg erőt adtak.

Végül pedig hálával tartozom Édesanyámnak szerető iránymutatásáért, valamint Édesapámnak, Bátyámnak és Kereszttestvéreimnek, hogy mindvégig bátorítottak és támogattak álmaim megvalósításában. Páromnak, Ádámnak külön köszönöm a töretlen támogatását, kitartását, és hogy a nehéz napokon is szeretettel és megértéssel fordult felém.

7. Irodalomjegyzék

- Abraham CS, Deli MA, Joo F, Megyeri P, Torpier G. Intracarotid tumor necrosis factor- α administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. *Neurosci Lett*. 1996 Apr 19;208(2):85-8.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010 Jan;37(1):13-25.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan;7(1):41-53.
- Akaberi M, Hosseinzadeh H. Grapes (*Vitis vinifera*) as a Potential Candidate for the Therapy of the Metabolic Syndrome. *Phytother Res*. 2016 Apr;30(4):540-56.
- Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Ansari MA, Zoheir KM, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Attia SM, Shabanah OA, Ahmad SF. Dexamethasone Attenuates LPS-induced Acute Lung Injury through Inhibition of NF- κ B, COX-2, and Pro-inflammatory Mediators. *Immunol Invest*. 2016 May;45(4):349-69.
- András IE, Deli MA, Veszélka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Aug;27(8):1431-43.
- Andreoli MF, Donato J, Cakir I, Perello M. Leptin resensitisation: a reversion of leptin-resistant states. *J Endocrinol*. 2019 Jun 1;241(3):R81-R96.
- Aragonès G, Ardid-Ruiz A, Ibars M, Suárez M, Bladé C. Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol Nutr Food Res*. 2016a Aug;60(8):1789-803.
- Aragonès G, Suárez M, Ardid-Ruiz A, Vinaixa M, Rodríguez MA, Correig X, Arola L, Bladé C. Dietary proanthocyanidins boost hepatic NAD(+) metabolism and SIRT1 expression and activity in a dose-dependent manner in healthy rats. *Sci Rep*. 2016b Apr 22;6:24977.
- Arrick DM, Sun H, Patel KP, Mayhan WG. Chronic resveratrol treatment restores vascular responsiveness of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Sep;301(3):H696-703.
- Bajrektarevic D, Nistri A. Ceftriaxone-mediated upregulation of the glutamate transporter GLT-1 contrasts neurotoxicity evoked by kainate in rat organotypic spinal cord cultures. *Neurotoxicology*. 2017;60:34-41.
- Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab*. 2014 Feb 4;19(2):293-301.
- Banach M, Czuczwar SJ, Borowicz KK. Statins - are they anticonvulsant? *Pharmacol Rep*. 2014 Aug;66(4):521-8.
- Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Apr;15(4):275-92.
- Banks WA. The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Curr Pharm Des*. 2008;14(16):1606-14.

- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17(2):305-11.
- Banks WA, Kovac A, Morofuji Y. Neurovascular unit crosstalk: Pericytes and astrocytes modify cytokine secretion patterns of brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Jun;38(6):1104-1118.
- Baselga-Escudero L, Blade C, Ribas-Latre A, Casanova E, Suárez M, Torres JL, Salvadó MJ, Arola L, Arola-Arnal A. Resveratrol and EGCG bind directly and distinctively to miR-33a and miR-122 and modulate divergently their levels in hepatic cells. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(2):882-92.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006 Mar;17(1):4-12.
- Basuroy S, Leffler CW, Parfenova H. CORM-A1 prevents blood-brain barrier dysfunction caused by ionotropic glutamate receptor-mediated endothelial oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Jun 1;304(11):C1105-15.
- Benarroch EE. Blood-brain barrier: recent developments and clinical correlations. *Neurology*. 2012 Apr 17;78(16):1268-76.
- Benson K, Cramer S, Galla HJ. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*. 2013 Jan 10;10(1):5.
- Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M. Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci*. 1999 Feb;11(2):604-16.
- Bjørbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*. 1998 Aug;139(8):3485-91.
- Blecharz KG, Haghikia A, Stasiolek M, Kruse N, Drenckhahn D, Gold R, Roewer N, Chan A, Förster CY. Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010 Mar;16(3):293-302.
- Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res*. 2003 Apr;11(4):525-31.
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*. 1990 Oct;429:47-62.
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszelka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res*. 2014 Nov;45(8):610-38.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 1996 Jul 20;348(9021):159-61.
- Cauley K, Kukekov V, Young D. Kainate/AMPA receptors expressed on human fetal astrocytes in long-term culture. *J Neurosci Res*. 1997 Feb 1;47(3):311-21.

- Clark D, Tuor UI, Thompson R, Institoris A, Kulynych A, Zhang X, Kinniburgh DW, Bari F, Busija DW, Barber PA. Protection against recurrent stroke with resveratrol: endothelial protection. *PLoS One*. 2012;7(10):e47792.
- Conte R, Marturano V, Peluso G, Calarco A, Cerruti P. Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Delivery of Anti-Inflammatory Phytocompounds. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 28;18(4):709.
- Crépel V, Mulle C. Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Feb;20:83-8.
- da Costa GF, Santos IB, de Bem GF, Cordeiro VSC, da Costa CA, de Carvalho LCRM, Ognibene DT, Resende AC, de Moura RS. The Beneficial Effect of Anthocyanidin-Rich *Vitis vinifera* L. Grape Skin Extract on Metabolic Changes Induced by High-Fat Diet in Mice Involves Antiinflammatory and Antioxidant Actions. *Phytother Res*. 2017 Oct;31(10):1621-1632.
- Darshan S, Doreswamy R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother Res*. 2004 May;18(5):343-57.
- de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev*. 2015 Mar;16(3):207-24.
- De Groote D, Van Belleghem K, Devière J, Van Brussel W, Mukaneza A, Amininejad L. Effect of the intake of resveratrol, resveratrol phosphate, and catechin-rich grape seed extract on markers of oxidative stress and gene expression in adult obese subjects. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(1):15-24.
- Del Bo' C, Roursgaard M, Porrini M, Loft S, Møller P, Riso P. Different effects of anthocyanins and phenolic acids from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) on monocytes adhesion to endothelial cells in a TNF- α stimulated proinflammatory environment. *Mol Nutr Food Res*. 2016 Nov;60(11):2355-2366.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May 10;18(14):1818-92.
- Deli MA. 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, 2011 Jan;pp. 144-165.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1788(4):892-910.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. 2005 Feb;25(1):59-127.
- Deli MA, Descamps L, Dehouck MP, Cecchelli R, Joó F, Abrahám CS, Torpier G. Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res*. 1995 Aug 15;41(6):717-26.
- Deli MA, Joó F. Cultured vascular endothelial cells of the brain. *Keio J Med*. 1996 Sep;45(3):183-98; discussion 198-9.

- Deli MA, Joó F, Krizbai I, Lengyel I, Nunzi MG, Wolff JR. Calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II is present in primary cultures of cerebral endothelial cells. *J Neurochem.* 1993 May;60(5):1960-3.
- Dempsey RJ, Başkaya MK, Doğan A. Attenuation of brain edema, blood-brain barrier breakdown, and injury volume by ifenprodil, a polyamine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, after experimental traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery.* 2000 Aug;47(2):399-404; discussion 404-6.
- Diaz-Gerevini GT, Repossì G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition.* 2016 Feb;32(2):174-8.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999 Mar;51(1):7-61.
- During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* 1993 Jun 26;341(8861):1607-10.
- Elizagaray ML, Mazitelli I, Pontoriero A, Baumeister E, Docena G, Raimondi C, Correger E, Rumbo M. Lidocaine reinforces the anti-inflammatory action of dexamethasone on myeloid and epithelial cells activated by inflammatory cytokines or SARS-CoV-2 infection. *Biomed J.* 2022 Aug 7:S2319-4170(22)00119-6.
- Erickson MA, Banks WA. Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. *Pharmacol Rev.* 2018 Apr;70(2):278-314.
- Fitzpatrick DF, Bing B, Maggi DA, Fleming RC, O'Malley RM. Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;957:78-89.
- Förster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol.* 2007 May 1;580(Pt.3):937-49.
- Friedman A, Heinemann U. Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- Fujimoto T, Erickson MA, Banks WA. Neurotropism and blood-brain barrier involvement in COVID-19. *Front. Drug Deliv.* 2022 Dec 14; Sec. CNS Drug Delivery.
- Garbuzova-Davis S, Ehrhart J, Sanberg PR, Borlongan CV. Potential Role of Humoral IL-6 Cytokine in Mediating Pro-Inflammatory Endothelial Cell Response in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 31;19(2):423.
- Georgiev V, Ananga A, Tsołova V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients.* 2014 Jan 21;6(1):391-415.
- Gonzalez-Carter D, Goode AE, Fiammengo R, Dunlop IE, Dexter DT, Porter AE. Inhibition of Leptin-ObR Interaction Does not Prevent Leptin Translocation Across a Human Blood-Brain Barrier Model. *J Neuroendocrinol.* 2016 Jun;28(6).
- Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011 Feb;37(1):24-39.

- Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Activation of Nrf2 by Natural Bioactive Compounds: A Promising Approach for Stroke? *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 10;21(14):4875.
- Hachinski V, Einhupl K, Ganten D, Alladi S, Brayne C, Stephan BCM, Sweeney MD, Zlokovic B, Iturria-Medina Y, Iadecola C, Nishimura N, Schaffer CB, Whitehead SN, Black SE, Østergaard L, Wardlaw J, Greenberg S, Friberg L, Norrving B, Rowe B, Joannette Y, Hacke W, Kuller L, Dichgans M, Endres M, Khachaturian ZS. Preventing dementia by preventing stroke: The Berlin Manifesto. *Alzheimers Dement.* 2019 Jul;15(7):961-984.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014 Apr 3;508(7494):55-60.
- Hao JP, Shi H, Zhang J, Zhang CM, Feng YM, Qie LY, Dong M, Ji X. Role of GSPE in improving early cerebral vascular damage by inhibition of Profilin-1 expression in a ouabain-induced hypertension model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Oct;22(20):6999-7012.
- Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Varadi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyes M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ.* 2018 May 15;6:e4774.
- Hidalgo M, Martin-Santamaria S, Recio I, Sanchez-Moreno C, de Pascual-Teresa B, Rimbach G, de Pascual-Teresa S. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr.* 2012 Apr;7(2):295-306.
- Hinoi E, Yoneda Y. Expression of GluR6/7 subunits of kainate receptors in rat adenohypophysis. *Neurochem Int.* 2001 May;38(6):539-47.
- Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, Galla HJ. Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Mar 6;244(1):312-6.
- Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:31-108.
- Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015 Jun 6;12:114.
- Hue CD, Cho FS, Cao S, Dale Bass CR, Meaney DF, Morrison B 3rd. Dexamethasone potentiates in vitro blood-brain barrier recovery after primary blast injury by glucocorticoid receptor-mediated upregulation of ZO-1 tight junction protein. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015 Jul;35(7):1191-8.
- Huettner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* 2003 Aug;70(5):387-407.
- Ibars M, Ardid-Ruiz A, Suarez M, Muguerza B, Blade C, Aragones G. Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond).* 2017 Jan;41(1):129-136.
- Jefferys J, Steinhuser C, Bedner P. Chemically-induced TLE models: Topical application. *J Neurosci Methods.* 2016 Feb 15;260:53-61.

- Kaisar MA, Prasad S, Cucullo L. Protecting the BBB endothelium against cigarette smoke-induced oxidative stress using popular antioxidants: Are they really beneficial? *Brain Res.* 2015 Nov 19;1627:90-100.
- Kamrani Rad SZ, Javadi B, Hayes AW, Karimi G. Potential angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from Iranian traditional plants described by Avicenna's Canon of Medicine. *Avicenna J Phytomed.* 2019 Jul-Aug;9(4):291-309.
- Kar P, Laight D, Rooprai HK, Shaw KM, Cummings M. Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet Med.* 2009 May;26(5):526-31.
- Khadka B, Lee JY, Park DH, Kim KT, Bae JS. The Role of Natural Compounds and their Nanocarriers in the Treatment of CNS Inflammation. *Biomolecules.* 2020 Oct 1;10(10):1401.
- Kikuchi K, Takeshige N, Miura N, Morimoto Y, Ito T, Tancharoen S, Miyata K, Kikuchi C, Iida N, Uchikado H, Miyagi N, Shiomi N, Kuramoto T, Maruyama I, Morioka M, Kawahara KI. Beyond free radical scavenging: Beneficial effects of edaravone (Radicut) in various diseases (Review). *Exp Ther Med.* 2012 Jan;3(1):3-8.
- Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszélka 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. *J Pharm Sci.* 2013 Apr;102(4):1173-81.
- Klement W, Blaquiére M, Zub E, deBock F, Boux F, Barbier E, Audinat E, Lerner-Natoli M, Marchi N. A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. *Epilepsia.* 2019 Jul;60(7):1399-1411.
- Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1998 Feb;46(2):373-5.
- Krizanac-Bengez L, Mayberg MR, Janigro D. The cerebral vasculature as a therapeutic target for neurological disorders and the role of shear stress in vascular homeostasis and pathophysiology. *Neurol Res.* 2004 Dec;26(8):846-53.
- Krizbai IA, Deli MA, Pestenác A, Siklós L, Szabó CA, András I, Joó F. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res.* 1998 Dec 15;54(6):814-9.
- Kuhlmann CR, Gerigk M, Bender B, Closhen D, Lessmann V, Luhmann HJ. Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci.* 2008 Jun 20;82(25-26):1281-7.
- Lei DL, Yang DL, Liu HM. Local injection of kainic acid causes widespread degeneration of NADPH-d neurons and induction of NADPH-d in neurons, endothelial cells and reactive astrocytes. *Brain Res.* 1996 Aug 19;730(1-2):199-206.
- Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vigh 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 Barriers CNS.* 2015 Jul 17;12:17.
- Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018 Mar;135(3):311-336.

- Logsdon AF, Rhea EM, Reed M, Banks WA, Erickson MA. The neurovascular extracellular matrix in health and disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2021 Apr;246(7):835-844.
- Lopez-Ramirez MA, Male DK, Wang C, Sharrack B, Wu D, Romero IA. Cytokine-induced changes in the gene expression profile of a human cerebral microvascular endothelial cell-line, hCMEC/D3. *Fluids Barriers CNS*. 2013 Sep 19;10(1):27.
- Makkar R, Behl T, Bungau S, Zengin G, Mehta V, Kumar A, Uddin MS, Ashraf GM, Abdel-Daim MM, Arora S, Oancea R. Nutraceuticals in Neurological Disorders. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 22;21(12):4424.
- Malfitano AM, Marasco G, Proto MC, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. Statins in neurological disorders: an overview and update. *Pharmacol Res*. 2014 Oct;88:74-83.
- Marchi N, Granata T, Freri E, Ciusani E, Ragona F, Puvenna V, Teng Q, Alexopolous A, Janigro D. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. *PLoS One*. 2011 Mar 28;6(3):e18200.
- Maric D, Liu QY, Grant GM, Andreadis JD, Hu Q, Chang YH, Barker JL, Joseph J, Stenger DA, Ma W. Functional ionotropic glutamate receptors emerge during terminal cell division and early neuronal differentiation of rat neuroepithelial cells. *J Neurosci Res*. 2000 Sep 15;61(6):652-62.
- Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 26;16(1):378-400.
- Mazzone GL, Margaryan G, Kuzhandaivel A, Nasrabad SE, Mladinic M, Nistri A. Kainate-induced delayed onset of excitotoxicity with functional loss unrelated to the extent of neuronal damage in the in vitro spinal cord. *Neuroscience*. 2010;168(2):451-62.
- Minami T, Okazaki J, Kawabata A, Kawaki H, Okazaki Y, Tohno Y. Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1998 Jan;5(1):35-41.
- Miyamoto R, Shimakawa S, Suzuki S, Ogihara T, Tamai H. Edaravone prevents kainic acid-induced neuronal death. *Brain Res*. 2008 May 13;1209:85-91.
- Nagaraja TN, Knight RA, Croxen RL, Konda KP, Fenstermacher JD. Acute neurovascular unit protection by simvastatin in transient cerebral ischemia. *Neurol Res*. 2006 Dec;28(8):826-30.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*. 2009 Mar-Apr;54(3-4):253-63.
- Nakano-Okuda Y, Hasegawa K, Hirai K, Kanai-Ochiai R, Morimoto M, Sugimoto T. Effects of edaravone on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated cytochrome c release and apoptosis in neonatal rat cerebrocortical slices. *Int J Dev Neurosci*. 2006 Oct;24(6):349-56.
- Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*. 2005 Feb-Apr;26(1-2):33-65.
- Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the Pharmacological Effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its Bioactive Constituents: An Update. *Phyther Res*. 2016 Sep;30(9):1392-403.

- 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. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Mar;12(3):169-82.
- Nomura S, Shimakawa S, Miyamoto R, Fukui M, Tamai H. 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one or N-acetylcysteine prevents hippocampal mossy fiber sprouting and rectifies subsequent convulsive susceptibility in a rat model of kainic acid-induced seizure ceased by pentobarbital. *Brain Res*. 2014 Nov 24;1590:65-74.
- Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017 Jan 6;120(1):229-243.
- Onodera H, Arito M, Sato T, Ito H, Hashimoto T, Tanaka Y, Kurokawa MS, Okamoto K, Suematsu N, Kato T. Novel effects of edaravone on human brain microvascular endothelial cells revealed by a proteomic approach. *Brain Res*. 2013 Oct 9;1534:87-94.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998 Apr;54(5):581-618.
- Panickar KS, Qin B, Anderson RA. Ischemia-induced endothelial cell swelling and mitochondrial dysfunction are attenuated by cinnamtannin D1, green tea extract, and resveratrol in vitro. *Nutr Neurosci*. 2015 Oct;18(7):297-306.
- Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Feb;1(2):131-9.
- Parfenova H, Fedinec A, Leffler CW. Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Feb;23(2):190-7.
- Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol*. 1999 Dec 15;68(1-3):71-6.
- Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Scherrmann JM, Tamsamani J, Couraud PO, Deli MA, Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005 Apr;93(2):279-89.
- Perrière N, Yousif S, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, Declèves X, Hori S, Terasaki T, Deli M, Scherrmann JM, Tamsamani J, Roux F, Couraud PO. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res*. 2007 May 30;1150:1-13.
- Pons Z, Margalef M, Bravo FI, Arola-Arnal A, Muguerza B. Acute administration of single oral dose of grape seed polyphenols restores blood pressure in a rat model of metabolic syndrome: role of nitric oxide and prostacyclin. *Eur J Nutr*. 2016 Mar;55(2):749-758.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med*. 2020 Apr 6;217(4):e20190062.
- Ramirez C, Tercero I, Pineda A, Burgos JS. Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(1):161-74.

- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem*. 2010 Apr;113(2):447-53.
- Rhea EM, Salameh TS, Logsdon AF, Hanson AJ, Erickson MA, Banks WA. Blood-Brain Barriers in Obesity. *AAPS J*. 2017 Jul;19(4):921-930.
- Rojas C, Pan-Castillo B, Valls C, Pujadas G, Garcia-Vallve S, Arola L, Mulero M. Resveratrol enhances palmitate-induced ER stress and apoptosis in cancer cells. *PLoS One*. 2014 Dec 1;9(12):e113929.
- Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, Adamson P. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett*. 2003 Jun 26;344(2):112-6.
- Schrot S, Weidenfeller C, Schäffer TE, Robenek H, Galla HJ. Influence of hydrocortisone on the mechanical properties of the cerebral endothelium in vitro. *Biophys J*. 2005 Dec;89(6):3904-10.
- Scott GS, Bowman SR, Smith T, Flower RJ, Bolton C. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jan 15;73(2):228-36.
- Seker FB, Kilic U, Caglayan B, Ethemoglu MS, Caglayan AB, Ekimci N, Demirci S, Dogan A, Oztezcan S, Sahin F, Yilmaz B, Kilic E. HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin improves abnormal brain electrical activity via mechanisms involving eNOS. *Neuroscience*. 2015 Jan 22;284:349-359.
- Sen CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem*. 2001 Jan;216(1-2):1-7.
- Serrano J, Casanova-Martí À, Gual A, Pérez-Vendrell AM, Blay MT, Terra X, Ardévol A, Pinent M. A specific dose of grape seed-derived proanthocyanidins to inhibit body weight gain limits food intake and increases energy expenditure in rats. *Eur J Nutr*. 2017 Jun;56(4):1629-1636.
- Setiadi A, Korim WS, Elsaafien K, Yao ST. The role of the blood-brain barrier in hypertension. *Exp Physiol*. 2018 Mar 1;103(3):337-342.
- Sierra S, Ramos MC, Molina P, Esteo C, Vázquez JA, Burgos JS. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(2):307-18.
- Silva AR, Grosso C, Delerue-Matos C, Rocha JM. Comprehensive review on the interaction between natural compounds and brain receptors: Benefits and toxicity. *Eur J Med Chem*. 2019 Jul 15;174:87-115.
- Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol*. 2004 May;19(5):343-60; discussion 361.
- Simoncini T, Lenzi E, Zöchling A, Gopal S, Goglia L, Russo E, Polak K, Casarosa E, Jungbauer A, Genazzani AD, Genazzani AR. Estrogen-like effects of wine extracts on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Maturitas*. 2011 Oct;70(2):169-75.

- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol.* 2017 Dec;54(10):8071-8089.
- Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, Zheng W. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol.* 2004 Aug;2(4):363-72.
- Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med.* 2012 Feb;33(1):83-97.
- Steffen Y, Jung T, Klotz LO, Schewe T, Grune T, Sies H. Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin. *Free Radic Biol Med.* 2007 Apr 1;42(7):955-70.
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E. Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature.* 2002 May 16;417(6886):245-53.
- Sztrihai L, Joó F, Szerdahelyi P, Eck E, Koltai M. Effects of dexamethasone on brain edema induced by kainic acid seizures. *Neuroscience.* 1986;17(1):107-14.
- Tashiro A, Dunaevsky A, Blazeski R, Mason CA, Yuste R. Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron.* 2003 Jun 5;38(5):773-84.
- Torres-Vergara P, Penny J. Pro-inflammatory and anti-inflammatory compounds exert similar effects on P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells. *J Pharm Pharmacol.* 2018 Jun;70(6):713-722.
- 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.* 2014 Jul 17;9(7):e100152.
- Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am.* 2018 Jan;102(1):13-33.
- Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Front Neurosci.* 2018 Dec 11;12:930.
- Vangilder RL, Rosen CL, Barr TL, Huber JD. Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacol Ther.* 2011 Jun;130(3):239-47.
- Vargas JR, Takahashi DK, Thomson KE, Wilcox KS. The expression of kainate receptor subunits in hippocampal astrocytes after experimentally induced status epilepticus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Oct;72(10):919-32.
- Veszelka S, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Ngo TK, Niwa M, Abrahám CS, Deli MA. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int.* 2007 Jan;50(1):219-28.
- 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. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(3):487-501.
- Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci.* 2018 May 22;11:166.

- Vogels N, Nijs IM, Westerterp-Plantenga MS. The effect of grape-seed extract on 24 h energy intake in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2004 Apr;58(4):667-73.
- Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszelka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers.* 2021 Jul 3;9(3):1904773.
- Walter FR, Veszelka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA. Tasmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *J Neurochem.* 2015 Sep;134(6):1040-54.
- Watanabe K, Tanaka M, Yuki S, Hirai M, Yamamoto Y. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? *J Clin Biochem Nutr.* 2018 Jan;62(1):20-38.
- Weseler AR, Bast A. Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits. *Nutr J.* 2017 Jan 19;16(1):5.
- Wiciński M, Socha M, Walczak M, Wódkiewicz E, Malinowski B, Rewerski S, Górski K, Pawlak-Osińska K. Beneficial Effects of Resveratrol Administration-Focus on Potential Biochemical Mechanisms in Cardiovascular Conditions. *Nutrients.* 2018 Nov 21;10(11):1813.
- Yao SY, Ljunggren-Rose A, Chandramohan N, Whetsell WO Jr, Sriram S. In vitro and in vivo induction and activation of nNOS by LPS in oligodendrocytes. *J Neuroimmunol.* 2010 Dec 15;229(1-2):146-56.
- Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today.* 2003 Nov 1;8(21):997-1003.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci.* 2003 Dec 3;23(35):11104-11.
- Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology.* 2000 Apr;141(4):1434-41.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008 Jan 24;57(2):178-201.

8. Összefoglaló

Gyógyszer- és természetes hatóanyagok védőhatásának vizsgálata vér-agy gát károsodással szemben tenyészetes modellen

A vér-agy gát dinamikus határfelületet képez a központi idegrendszer és a vér között, így segít az ionos homeosztázis fenntartásában. A gátrendszer homeosztázist fenntartó és védelmi rendszerei, valamint azok vizsgálata élettani körülmények között és betegségekben is fontos. A legtöbb kórállapotban megfigyelhetőek a helyi, és sokszor az egész szervezetet érintő gyulladással járó folyamatok, amelyek befolyásolják a barrierek működését is. A szisztémás gyulladások során felszabaduló citokinek a keringés útján a belső gátrendszerek, így a központi idegrendszert védővér-agy gát működésére is hatással vannak. A gyulladással járó citokinek képesek átjutni az agyi endotélium rétegén, hozzájárulva ezáltal a szisztémás gyulladással járó idegrendszeri hatásaihoz. Így az agyi gátrendszerek működésének károsodása hozzájárul az idegrendszeri gyulladással járó folyamatok és betegségek kialakulásához, ami egy öngerjesztő folyamat.

A vér-agy gát elsődleges károsodását okozhatja trauma, gyulladás, fertőzés, és kialakulhat agyvérzés, agyi iszkémia, vagy epilepszia hatására. A szérumban lévő fehérjék a károsodott vér-agy gáton keresztül bejutnak a központi idegrendszerbe, és aktiválják az asztrocita sejteket. Az aktivált asztrocitákból gyulladással járó citokinek szabadulnak fel, és a vaszkuláris endotéliális növekedési faktor termelődése megemelkedik az idegsejtekben és az asztrocitákból. A vaszkuláris endotéliális növekedési faktor szint növekedése neovaszkularizációhoz, a vér-agy gát megnyílás fennmaradásához és a neuroinflammáció fokozódásához vezet a gyulladással járó citokinek további emelésén keresztül. A citokinek tovább erősítik az asztrocita aktiválódást, ami a megemelkedett extracelluláris glutamát szinten és a megváltozott glutamát metabolizmuson keresztül növeli az idegi hálózatok serkenthetőségét. Az így létrejött patológiás körülmények között a megemelkedett extracelluláris glutamát szint tovább károsítja a vér-agy gát működését, emellett túlingerli a glutamát receptorokat, ezen keresztül megnöveli az intracelluláris kalciumion-koncentrációt és az idegsejtek pusztulásához vezet. A kainát a glutamát szerkezeti analógja, amit a kainát receptorok nagy affinitással kötnek. Elterjedt farmakon a kísérletes epilepszia modellek létrehozásában. A kainsav mint excitotoxin hosszútávú morfológiai változásokat képes előidézni az idegsejtekben. Ezek a folyamatok egymást erősítve idegi működési zavarok, krónikus gyulladás, és fokális epilepszia kialakulását eredményezik az agyban.

A teljes szervezetet érintő és az idegrendszeri gyulladási folyamatok, az azokat kiváltó citokinek, valamint az excitotoxinok mind hozzájárulhatnak a vér-agy gát károsodásához betegségekben. Kísérletes állatmodelleken a kainsav által kiváltott vér-agy gát változásokról már rendelkezésre állnak adatok, de a kainsav közvetlen hatását agyi endotélsejt tenyészeteken eddig nem vizsgálták. Mivel a vér-agy gát károsodás fontos eleme sok idegrendszeri betegség patomechanizmusának, ezért a vér-agy gát védelme fontos terápiás célpont lehet ezek gyógyításában. A gyulladási citokinek agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásairól már számos adat ismert, azonban ezek kivédése a vér-agy gát szintjén továbbra is fontos feladat.

Kísérleteinkben impedancia alapú, valósídejű sejtanalízissel igazoltuk, hogy a kainsav csökkenti a patkány agyi endotélsejtek életképességét, azonban nem befolyásolta azt agyi pericita és asztrogliá sejttrétegek impedanciáját. Eredményeink alapján a kainát megnövelte a vér-agy gát modell áteresztőképességét fluoreszcen és albumin jelzőanyagokra, és megváltoztatta az agyi endotélsejtekben a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék festődési mintázatát. Az oxidatív stressz, a reaktív oxigén- és nitrogényökök termelődése, hozzájárul az excitotoxicitáshoz. Kísérleteink igazolták, hogy kainsav hatására megemelkedik az nitrogén-monoxid-termelődés, és fokozódik az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz mRNS expressziója agyi endotélsejtekben, ami a kainát károsító hatására utal. A kapott eredményeink összhangban vannak a kutatócsoport saját és más kutatócsoportok korábban leírt adataival a glutamát vér-agy gát megnyílást és károsodást okozó hatásáról.

Számos gyulladáscsökkentő és antioxidáns gyógyszerről és újonnan kifejlesztett hatóanyagról igazolták tenyészetes modelleken, hogy vér-agy gát protektív hatással is rendelkeznek. Ezek közül már több szert is alkalmaznak az agyvérzés, az amiotrófiás laterálszklerózis, vagy az epilepszia kezelésére. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a szimvasztatin megvédte az agyi endotélsejteket a kainát károsító hatásaival szemben életképességi és permeabilitási vizsgálatokban, valamint visszaállította a sejtkeapcsolatok megváltozott immunfestését. Az eredményeink összhangban állnak a fluvasztatin védőhatásával glutamáttal kiváltott *in vitro* vér-agy gát károsodás esetén. Csoportunk korábban már igazolta a sztatinok hatékony átjutását a vér-agy gát tenyészetes modelljén, ami szintén alátámasztja lehetséges terápiás alkalmazásukat a vér-agy gát károsodással járó idegrendszeri betegségek gyógyításában.

Az edaravon szintén védőhatásának bizonyult a kainsav-indukálta vér-agy gát sérüléssel szemben, és csökkentette a reaktív oxigényökök termelődését agyi endotélsejtekben, ami egyezik más patológiás modellen kapott korábbi eredményeinkkel.

Az edaravon védőhatását kaináttal kiváltott epilepszia állatmodellekben is kimutatták. A preklinikai adatok igazolják az edaravon vér-agy gátra kifejtett védőszeret, így ez is hozzájárulhat az agyvérzés és az amiotrófiás laterálszklerózis klinikai kezelésében megfigyelt hatékonyságához.

A dexametazon szintén növelte a vér-agy gát szorosságát a kaináttal kezelt tenyészetes vér-agy gát modellen, és fokozta a szoros kapcsolatok fehérjének kifejeződését. Kísérleteinkben a dexametazon csökkentette az agyi endotélsejteken a kainsav kezelés által megnövelt nitrogén-monoxid-termelődést és az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz gén kifejeződését. *In vitro* eredményeink összhangban állnak a dexametazon vér-agy gátat védő hatásával kaináttal és pilokarpinnal indukált epilepszia állatmodellekben, és jótékony terápiás hatásával gyermekkori gyógyszer-rezisztens epilepsziában. Kísérleti eredményeink és a dexametazon klinikai használata az agyödéma terápiájában támogatják a dexametazon alkalmazásának lehetőségét a vér-agy gát károsodás csökkentésére epilepsziában is.

A tumor nekrozis faktor- α és az interleukin- 1β fontos és sokat tanulmányozott citokinek a központi idegrendszeri gyulladásos folyamatok kialakításában és fenntartásában. Ezek a citokinek a szisztémás gyulladások következtében fellépő neuroinflammációban, többek között kóros elhízás során is meghatározóak. A gyulladásos citokinek agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásairól már számos adat ismert, azonban ezek kivédése a vér-agy szintjén még nem megoldott. Kísérleteink során négy szőlőből származó kivonatot, illetve vegyületet vizsgáltunk. A szőlőmag kivonat különböző fenolos vegyületeket tartalmaz, többek között a flavonoid epikatekint, valamint a nem-flavonoid rezveratrolt és galluszsavat. A rezveratrol az egyik leginkább kutatott bioaktív fenolos vegyület, számos jótékony tulajdonságát leírták, mint például a gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatást. Több kutatócsoport is vizsgálta már a rezveratrol hatását az elhízásra, és az ehhez kapcsolódó kórállapotokra. Habár már számos természetes anyag vér-agy gátra kifejtett hatását megvizsgálták, mi tanulmányoztuk elsőként a szőlőmag kivonat és a fenolos vegyületek agyi endotélsejtekre és leptintranszportra kifejtett hatását tenyészetes vér-agy gát modellen.

A kóros elhízás során és a vér-agy gát szintjén is megfigyelhető a gyulladásos változások tanulmányozására citokinekkel kezelt tenyészetes vér-agy gát modellt használtunk, hogy megvizsgáljuk a szőlőből származó fenolos vegyületek lehetséges védőhatását. A citokinek károsították a vér-agy gát integritását, amit a lecsökkent elektromos ellenállási értékek és a megnövekedett áteresztőképesség jelzett. A citokinek fokozták az albumin átjutását, amit egyedül a rezveratrol tudott csökkenteni a vizsgált anyagok közül.

Ez a megfigyelés egyezik a rezveratrol sejttényészetekben és állatmodellekben korábban leírt vér-agy gát protektív hatásával. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a szőlőmag kivonat, az epikatekin és a rezveratrol is csökkentette a reaktív oxigéngyökök termelődését citokinek jelenlétében a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan. A tesztelt vegyületek eltérő hatást fejtettek ki az agyi endotélsejtek nitrogén-monoxid termelésére: a szőlőmag kivonat önmagában és citokinekkel együtt alkalmazva is megnövelte a nitrogén-monoxid szintet, míg az epikatekin és a rezveratrol csökkentették azt citokinek jelenlétében. Feltételezzük, hogy a szőlőmag kivonat, a rezveratrol és az epikatekin különböző nitrogén-monoxid-szintáz izoformákon kifejtett jótékony hatásai magyarázhatják az agyi endotélsejteken kapott eredményeinket. A citokinek gyulladáskeltő hatását az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagi transzlokációja idézi elő, ami hozzájárul a vér-agy gát károsodásához. A szőlőmag kivonat, a galluszsav és a rezveratrol képes volt gátolni ezt a citokin-indukálta folyamatot, az epikatekin azonban ezt nem befolyásolta. Az epikatekin önmagában nem fokozta a nitrogén-monoxid szintjét agyi endotélsejtekben, de citokinek jelenlétében csökkentette. Kísérleteinkben a galluszsav nem változtatta meg sem a reaktív oxigéngyökök, sem a nitrogén-monoxid szintjét. Eredményeink szerint a vér-agy gáton keresztüli leptin átjutást fokozták a citokinek, ezt azonban nem tudta befolyásolni sem a szőlőmag kivonat, sem a rezveratrol. Adataink arra utalnak, hogy a galluszsav és az epikatekin hozzájárulhatnak a szőlőmag kivonat hatásaihoz, de abban más vegyületek hatásai is érvényesülhetnek.

Kutatásunk eredményeit összefoglalva igazoltuk, hogy a természetes szőlő vegyületek megvédik a tenyészetes agyi endotélsejteket a citokinek által keltett gyulladástól és oxidatív stressztől az NF- κ B útvonalon keresztül, ezzel alátámasztottuk a szőlő kivonatok lehetséges alkalmazását szív- és érrendszeri betegségekben. Eredményeink összhangban állnak *in vitro* és klinikai megfigyelésekkel, amelyek szintén bizonyították a szőlőmag kivonat és az önálló szőlő fenolos vegyületek hatékonyságát kardiovaszkuláris megbetegedések és elhízás során. Mindezek alapján a szőlőből származó természetes vegyületek jótékony hatást fejthetnek ki a vér-agy gátra kóros elhízásban.

Kutatómunkánk során sikerült a gyógyászatban már használt hatóanyagok és a szőlő természetes vegyületeinek vér-agy gátra kifejtett védőhatását kimutatnunk, ami reményeink szerint hozzájárulhat a vér-agy gát károsodással járó betegségek jövőbeli kezeléséhez.

9. Summary

The protective effect of clinically used drugs and natural compounds against blood-brain barrier dysfunction

The blood-brain barrier forms a dynamic interface between the central nervous system and the circulation and maintains brain ionic homeostasis. The protective and homeostatic functions of the blood-brain barrier are important in health and disease and their investigation is a crucial topic in biomedical research. Local or systemic inflammation is a hallmark of many pathological conditions which affect biological barriers. Cytokines released in systemic inflammation have an impact on inner biological barriers including the blood-brain barrier which protects the central nervous system. Proinflammatory cytokines can cross brain endothelial cells lining brain microvessels and thus contribute to neuronal damage in systemic inflammation. The dysfunction of brain barriers further promotes neuroinflammation and brain pathologies thus forming a vicious circle.

Pathologies like trauma, inflammation, infection, stroke, ischemia or epilepsy can all lead to the primary damage and opening of the blood-brain barrier. Serum proteins enter the brain parenchyma through the impaired blood-brain barrier and activate astroglial cells. Activated astrocytes secrete inflammatory cytokines, and the level of vascular endothelial growth factor is elevated in neurons and astroglia. The upregulation of vascular endothelial growth factor leads to neovascularization, maintains the opening of the blood-brain barrier and increases neuroinflammation via cytokine overexpression. Cytokines further enhance the activation of astrocytes which increase the excitability of neuronal networks through elevated extracellular glutamate level and altered glutamate metabolism. High extracellular glutamate concentrations damage the blood-brain barrier, and lead to excitotoxicity and neuronal cell death. Kainic acid is a glutamate analog, which binds with high affinity to kainate receptors and is widely used to induce epilepsy in animal models. Kainic acid as an excitotoxin induces long-term morphological changes in neurons which can lead to the development of functional neurological disturbances, chronic neuroinflammation and focal epilepsy.

Systemic or neuronal inflammation, inflammatory cytokines and excitotoxins can all contribute to blood-brain barrier dysfunction and damage in diseases. Kainate-induced blood-brain barrier changes were already described in animal studies, but the direct effect of kainic acid on brain endothelial cells has not been investigated in detail yet. Since the

impairment of the blood-brain barrier is a key factor in the pathomechanism of several neuronal diseases, the protection of the blood-brain barrier is an important therapeutic target in the treatment of these diseases. The damaging effects of inflammatory cytokines on brain endothelial cells are well known, but finding protective molecules against these changes at the level of the blood-brain barrier is still an important task.

In our studies using real-time impedance measurement, we demonstrated that kainic acid decreased the viability of brain endothelial cells but not that of brain pericytes or astrocytes. Based on our results, kainate treatment increased the permeability of the blood-brain barrier model for fluorescein and albumin marker molecules, and changed the immunostaining pattern of tight junction proteins in brain endothelial cells. Oxidative stress, the production of reactive oxygen and nitrogen species, contributes to excitotoxicity. Our results confirm that kainate treatment elevates nitric oxide production and enhances inducible nitric oxide synthase mRNA expression in brain endothelial cells further supporting the damaging effect of kainic acid. These results are in concordance with previous data from our as well as other research groups demonstrating that glutamate induces blood-brain barrier opening and dysfunction.

Several drugs and newly developed molecules with anti-inflammatory and/or antioxidant properties were identified that showed blood-brain barrier protective effects on culture models. Many of these drugs are already used in the clinical treatment of stroke, amyotrophic lateral sclerosis or epilepsy. We revealed that simvastatin protected brain endothelial cells against the damaging effects of kainate in viability and permeability assays, and restored the changes in the immunostaining pattern of tight junction proteins. These results are in line with the protective effect of fluvastatin against glutamate-induced *in vitro* blood-brain barrier breakdown. The transport of statins across a culture model of the blood-brain barrier was previously described by our group that also supports the potential therapeutic use of statins in the treatment of central nervous system diseases with blood-brain barrier impairment.

Edaravone showed protective effects against kainate-induced blood-brain barrier damage and decreased the production of reactive oxygen species in brain endothelial cells in concordance with our previous results on other pathological models. Edaravone was also found to protect the blood-brain barrier in kainate-induced animal models of epilepsy. All these preclinical findings support the blood-brain barrier protecting effects of edaravone which can contribute to its efficacy in the clinical treatment of stroke and amyotrophic lateral sclerosis.

Dexamethasone increased the tightness and enhanced the expression of tight junction proteins in the blood-brain barrier culture model treated with kainate. Furthermore, dexamethasone inhibited the elevation of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in brain endothelial cells induced by kainate treatment. Our *in vitro* data are supported by papers on the blood-brain barrier protective effects of dexamethasone in kainate- or pilocarpine-induced animal models of epilepsy and on the beneficial therapeutic effects of the drug in pediatric drug-resistant epilepsy. Our experimental results and the clinical use of dexamethasone to treat brain edema support the potential application of dexamethasone to attenuate blood-brain barrier damage in epilepsy.

Tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β are important and well-studied cytokines that induce and maintain central nervous system inflammation. These cytokines have a pivotal role in neuroinflammation caused by systemic inflammation and in the pathophysiology of many diseases, including chronic obesity. The negative effects of inflammatory cytokines on blood-brain barrier functions and morphology are well documented, but the problem of finding effective molecules to protect against these changes is still not yet solved. In our studies we investigated four grape compounds. The grape seed extract contains different phenolic compounds, including the flavonoid epicatechin and the non-flavonoid resveratrol and gallic acid. Resveratrol is one of the most studied bioactive phenolic compounds with many beneficial properties including anti-inflammatory and antioxidant effects. The effects of resveratrol in obesity and related pathologies have already been investigated by other research groups. Although natural compounds were studied on blood-brain barrier models before, we were the first to examine the effects of a grape seed extract and phenolic compounds on brain endothelial cells and the transport of leptin using a culture model of the blood-brain barrier.

To investigate the inflammatory processes observed in chronic obesity and at the level of the blood-brain barrier, we used a culture model of the blood-brain barrier treated with cytokines. The potential protecting effect of natural grape phenolic compounds was investigated on this model. Cytokines disrupted the integrity of the barrier as reflected by the decreased electrical resistance and increased permeability values. Cytokine treatment elevated the permeability for albumin, which was only attenuated by resveratrol. These results are in agreement with the protective effects of resveratrol in other culture models and in animal studies. In our experiments grape seed extract, epicatechin and resveratrol reduced the production of reactive oxygen species in the presence of cytokines similarly to literature data. The tested compounds exerted different effects on the production of nitric oxide in

brain endothelial cells. Grape seed extract alone and in the presence of cytokines elevated the level of nitric oxide, while epicatechin and resveratrol decreased it when given together with cytokines. We hypothesize that grape seed extract, epicatechin and resveratrol may act on different nitric oxide synthase isoforms and that can explain our findings on nitric oxide production in brain endothelial cells. The proinflammatory effects of cytokines contributing to the damage of the blood-brain barrier are mediated by the nuclear translocation of the transcriptional factor NF- κ B. Grape seed extract, resveratrol and gallic acid but not epicatechin inhibited this cytokine-induced process. Epicatechin in itself did not influence the production of nitric oxide in brain endothelial cells, but reduced it in the presence of cytokines. Gallic acid did not change the level of reactive oxygen species or nitric oxide. In our experiments, cytokines enhanced the transport of leptin across the blood-brain barrier model, which was not affected by grape seed extract or resveratrol. Our data suggest that gallic acid and epicatechin contribute to the beneficial effects of grape seed extract, but we cannot exclude that the effects of other compounds are also involved.

To summarize our results, we demonstrated that grape phenolic compounds protect cultured brain endothelial cells against cytokine-induced inflammation and oxidative stress through the NF- κ B pathway. These data support the potential use of grape extracts and compounds in cardiovascular diseases. Our findings are in accordance with *in vitro* and clinical data which verified the effectiveness of grape seed extract and grape phenolic compounds in cardiovascular diseases and chronic obesity. In conclusion, grape natural products can exert beneficial effects on the blood-brain barrier in obesity.

We successfully described the protective effects of clinically used drugs and grape natural compounds at the level of the blood-brain barrier, which in the future may contribute to the treatment of diseases associated with blood-brain barrier damage.

10. Fűggelék






I. Publikáció

RESEARCH

Open Access



Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage

Lilla Barna^{1,2†}, Fruzsina R. Walter^{1†} , András Harazin^{1†} , Alexandra Bocsik¹, András Kincses¹, Vilmos Tubak³ , Katalin Jósavay⁴, Ágnes Zvara⁵, Patricia Campos-Bedolla⁶  and Mária A. Deli^{1,7*} 

Abstract

Background: Excitotoxicity is a central pathological pathway in many neurological diseases with blood–brain barrier (BBB) dysfunction. Kainate, an exogenous excitotoxin, induces epilepsy and BBB damage in animal models, but the direct effect of kainate on brain endothelial cells has not been studied in detail. Our aim was to examine the direct effects of kainate on cultured cells of the BBB and to test three anti-inflammatory and antioxidant drugs used in clinical practice, simvastatin, edaravone and dexamethasone, to protect against kainate-induced changes.

Methods: Primary rat brain endothelial cell, pericyte and astroglia cultures were used to study cell viability by impedance measurement. BBB permeability was measured on a model made from the co-culture of the three cell types. The production of nitrogen monoxide and reactive oxygen species was followed by fluorescent probes. The mRNA expression of kainate receptors and nitric oxide synthases were studied by PCR.

Results: Kainate damaged brain endothelial cells and made the immunostaining of junctional proteins claudin-5 and zonula occludens-1 discontinuous at the cell border indicating the opening of the barrier. The permeability of the BBB model for marker molecules fluorescein and albumin and the production of nitric oxide in brain endothelial cells were increased by kainate. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protected against the reduced cell viability, increased permeability and the morphological changes in cellular junctions caused by kainate. Dexamethasone attenuated the elevated nitric oxide production and decreased the inducible nitric oxide synthase (NOS2/iNOS) mRNA expression increased by kainate treatment.

Conclusion: Kainate directly damaged cultured brain endothelial cells. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protected the BBB model against kainate-induced changes. Our results confirmed the potential clinical usefulness of these drugs to attenuate BBB damage.

Keywords: Blood–brain barrier, Brain endothelial cells, Kainate, Simvastatin, Edaravone, Dexamethasone, Permeability, Reactive oxygen species, Nitric oxide synthase

Introduction

Excitotoxicity has a pivotal role in many neurological diseases, including stroke, traumatic brain injury, epilepsy and neurodegenerative disorders like multiple sclerosis, Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases [1–3]. Glutamate is one of the most important excitatory neurotransmitters of the CNS, and together with

*Correspondence: deli.maria@brc.hu

[†]Lilla Barna, Fruzsina R. Walter and András Harazin contributed equally to the manuscript

¹ Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Temesvári krt. 62, Szeged 6726, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article



endogenous or exogenous excitotoxins, like *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainate, act on specific receptor families. Receptors of glutamate (NMDA receptors: GluN1-3B; AMPA receptors: GluA1-4; kainate receptors: GluK1-5; metabotropic receptors: mGluR1-8) are highly expressed in different brain areas such as cortex, limbic system, basal ganglions, hippocampus and cerebellum [4]. Excitatory neurotransmitters are fundamental for physiological processes, but the excessive stimulation of these receptors causes excitotoxicity, the damage or death of the nerve cells [4]. Kainate is a natural glutamate analogue isolated from seaweed which can bind to glutamate receptors. In research kainate is used to induce epilepsy in animal experiments in which not only excitotoxicity and neuronal damage but also blood–brain barrier (BBB) leakage and neurovascular changes are observed [5]. Among the excitatory compounds the effect of glutamate and the presence of glutamate receptors on brain endothelial cells have been described previously by our group and others [6–11], but kainate effects and receptors are less investigated at the level of BBB.

Taking into account the central role of the BBB in central nervous system (CNS) physiology [12] and neuropathologies [13] the cerebral vasculature emerges as a therapeutic target for neurological diseases [14, 15]. Vascular inflammation and oxidative stress are central pathways in many CNS diseases such as stroke, amyotrophic lateral sclerosis and epilepsy, and anti-inflammatory or antioxidant drugs are also used to treat them [15–17]. For the present study we selected three clinically used drugs, the anti-inflammatory simvastatin and dexamethasone, and the free radical scavenger edaravone. Besides their lipid-lowering effect, statins also exhibit neuroprotective, immunosuppressive, anticonvulsant and antioxidant properties [18, 19]. The pleiotropic effects of statins include the inhibition of inflammatory responses and the improvement of endothelial functions [20]. Simvastatin is a lipophilic statin exerting neuroprotective effects [21], which also protects the BBB in an acute stroke model in rats [22]. Edaravone is an excellent free radical scavenger molecule, which is clinically used for treating acute stroke and amyotrophic lateral sclerosis [17]. Our group demonstrated the protective effect of edaravone on brain endothelial cells against methylglyoxal-induced barrier damage [23]. In a kainate-induced epilepsy model in rats edaravone significantly decreased neuronal cell death and hyperexcitability [24]. Dexamethasone, a synthetic corticosteroid, has a strong anti-inflammatory and immunosuppressant effects. It also enhances barrier properties in culture models of the BBB, including elevation of transendothelial electrical resistance, decrease in

paracellular permeability and upregulation of tight junction proteins [25, 26]. Dexamethasone was protective in animal models, too: it decreased the BBB permeability and edema in kainate-induced seizures in rats [27] and protected the BBB from damage and reduced the severity of seizures in pilocarpin-induced status epilepticus [16]. In addition, dexamethasone exerted beneficial effects in pediatric drug resistant epileptic patients [16].

Our aim was to investigate the direct effect of kainate on culture models of the three major cell types of the BBB, brain endothelial cells, pericytes and astrocytes, and to test clinically used therapeutic molecules simvastatin, edaravone and dexamethasone as potential protective agents against kainate-induced brain endothelial damage using a BBB co-culture model.

Materials and methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (subsidiary of Merck, Darmstadt, Germany), unless otherwise indicated. The source and catalogue number of the reagents are listed in Additional file 1: Table S1.

Cell cultures

The isolation of primary rat brain endothelial cells, glial cells and pericytes and the co-culture BBB model were done as described in our previous studies [28, 29] and in Additional file 1: Detailed protocol. Primary rat brain endothelial cells were isolated from 3-week-old outbred male and female Wistar rats (Harlan Laboratories, USA). Following isolation cells were seeded onto collagen type IV and fibronectin coated (100 μ g/ml each) Petri dishes (100 mm; Corning, USA). Cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 15% plasma-derived bovine serum (PDS; First Link, UK), 5 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin, 5 ng/ml sodium selenite (Pan Biotech, Germany), 10 mM HEPES, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor, 100 μ g/ml heparin and 50 μ g/ml gentamycin. During the first 3 days of culture the capillary endothelial cells were kept in culture medium containing 3 μ g/ml puromycin to eliminate P-glycoprotein negative cell types [30]. Cells were used at the first passage (P1) for experiments.

Primary rat brain pericytes were isolated by the same protocol, except that puromycin treatment was not applied. After isolation pericytes were seeded onto collagen type IV coated (100 μ g/ml) Petri dishes (60 mm; VWR International, USA) and cultured in DMEM medium (Gibco, Life Technologies, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Pan Biotech, Germany) and

gentamycin (50 µg/ml). Cells were used at the third passage (P3) for experiments.

Primary rat astrocytes were obtained from 1-day-old Wistar rats. Following mechanical dissociation of brain tissue and filtration, cell clusters were plated onto uncoated 75 cm² flasks (TPP, Switzerland) and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and gentamycin (50 µg/ml) until they reached 90% confluency. Cells were passaged (P1) to collagen type IV (100 µg/ml) coated 12-well plates (Corning, USA) at a cell number of 5×10^4 cells/well and cultured for 2 weeks before use in the co-culture model. Glia cultures included more than 90% GFAP immunopositive astrocytes (Additional file 1: Figure S1).

For the co-culture BBB model [31] first pericytes (1.5×10^4 cells/cm²) were passaged to the bottom side of the 12-well format culture inserts (Transwell clear, polyester membrane, 0.4 µm pore size, 1.12 cm² surface; Corning, USA) coated with collagen type IV (100 µg/ml), then brain endothelial cells (7.5×10^4 cells/cm²) were added to the upper side coated with collagen type IV and fibronectin (100 µg/ml each). The inserts were placed into 12-well plates containing confluent P1 astrocyte layers. Endothelial culture medium was added to both compartments. Cells were co-cultured for 4 days before experiments [30, 31]. For longer version of the cell culture protocol and immunostaining of pericytes (see Additional file 1: Detailed protocol, Figure S1).

Treatments

Rat brain endothelial cells, astrocytes and pericytes were treated with kainate (213 Da; 100 mM stock solution was prepared in sterile water by the addition of NaOH) at 10 µM and 100 µM concentrations in culture medium for 1 and 24 h, based on our preliminary experiment and in agreement with literature data [32]. Simvastatin, edaravone (for both 1 mM stock solution was prepared in dimethyl sulfoxide) and dexamethasone (cyclodextrin complex; 10 mM stock solution was prepared in sterile water) were applied at a concentration of 1 µM based on our preliminary study and literature data [21, 23, 25]. The control group received culture medium. Triton X-100 (TX-100) detergent was used at 1% concentration in viability assays as a reference compound to cause cell death (Additional file 1: Figure S2). As reference compounds hydrogen peroxide (H₂O₂; 100 µM) was used for the measurement of reactive oxygen species and sodium nitroprusside (SNP; 100 µM) during the nitric oxide production assay.

Real-time cell analysis

For dynamic monitoring of living brain endothelial cells impedance-based cell electronic sensing was used, which

is a non-invasive, label-free technique. This method has been established to follow not only cell attachment and growth, but cell viability as well. We have verified by end-point colorimetric tests and morphological methods that impedance changes can sensitively detect cell damage [23, 29, 33] and protection [23, 29]. The RTCA-SP system (ACEA Biosciences, CA, USA) registers the impedance of cells automatically every 10 min. For every time point cell index is defined as $(R_n - R_b)/15$, where R_n is the impedance of the wells containing cells and R_b means the background impedance of the wells containing medium but not cells. Cells were passaged to special 96-well microtiter plates with gold electrodes (E-plate, ACEA Biosciences, CA, USA) which were coated with collagen type IV and fibronectin (100 µg/ml each) for rat brain endothelial cells or with collagen type I (150 µg/ml) for rat astrocytes and pericytes. For measuring background impedance 50 µl culture medium was added to each well, then 50 µl cell suspension was seeded at a density of 6×10^3 cells/well. When the impedance of cells reached a plateau phase, they were treated with kainate and the selected drugs and were monitored for an additional 24 h. As a reference compound to induce cell death Triton X-100 (TX-100) detergent was used at 1% concentration (Additional file 1: Figure S2).

Total RNA isolation and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from rat brain cortex, microvessels and brain endothelial cells by using TriFast reagent (VWR International, USA), then 1 µg RNA from each sample was transcribed to complementary DNA by Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, USA). Previously designed specific oligonucleotide primer pairs, covering different exons or exon/exon boundaries, were used and modified for the five rat kainate receptor genes [34–36] and for the three nitric oxide synthase genes [37] (Additional file 1: Table S2). Primers for β-actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes were used as loading controls (Additional file 1: Table S2). PCR was performed with FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne, Estonia) in Labcycler 48 s Gradient (SensoQuest, Germany). After heat inactivation for 3 min at 95 °C, the cycling conditions were the following: denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 30 s at the appropriate annealing temperature (Additional file 1: Table S2), polymerization for 40 s at 72 °C (35 cycles), final extension for 5 min at 72 °C. Products were analysed on 2% agarose gel (VWR International, USA), then isolated fragments were sequence verified by capillary DNA sequencing. Band intensities on the gel photos were quantified by ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The qPCR was

performed with $2 \times$ Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) in a RotorGene 3000 instrument (Corbett Research, Australia). After heat activation at 95 °C for 2 min the cycling conditions were the following: denaturation for 5 s at 95 °C, annealing and polymerization for 30 s at 60 °C (40 cycles). Fluorescent signals were collected after each extension step and at the end the registration of the melting curve was performed between 55 and 95 °C. Relative gene expression levels were normalized to endogenous control genes (β -actin and GAPDH) (Δ Ct). Then $\Delta\Delta$ Ct was calculated in comparison to the relative expression of the target genes in untreated control groups. Fold changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta$ Ct} formula.

Measurement of permeability for marker molecules

Two marker molecules were used for the permeability measurement: Evans blue-labeled albumin (EBA; 1% BSA + 167.5 μ g/ml Evans blue; 67 kDa) and sodium fluorescein (SF; 10 μ g/ml; 376 Da). After treatment, inserts were placed into 12-well plates containing 1.5 ml Ringer–Hepes buffer (150 mM NaCl, 2.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM MgCl_2 , 5.2 mM KCl, 5 mM glucose, 6 mM NaHCO_3 and 10 mM Hepes; pH 7.4) supplemented with insulin, transferrin and sodium selenite and 0.1% BSA. The culture medium was changed in the upper compartment to 0.5 ml Ringer–Hepes buffer containing EBA and SF. For 30 min the plates were kept on a horizontal shaker (150 rpm) in a CO_2 incubator then samples were collected from both compartments. The concentrations of the marker molecules were measured by a fluorescence multiwell plate reader (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Germany) at 584 nm excitation and 680 nm emission wavelengths for EBA, and 485 nm excitation and 520 nm emission wavelengths for SF. The apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated as described in our earlier studies [29, 38].

Measurement of reactive oxygen species and nitric oxide production

Chloromethyl-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFDA, Molecular Probes, Life Technologies, USA) was used for ROS detection, and 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM, Molecular Probes, Life Technologies, USA) for NO detection as fluorescent probes, as described in our previous studies [39, 40]. Brain endothelial cells were cultured in 96-well plates with black walls and transparent plastic bottoms (Corning, NY, USA). After treatments for 1 or 24 h, cells were incubated in Ringer–Hepes buffer containing 2 μ M DCFDA or 2 μ M DAF-FM probes. Pluronic acid (Molecular Probes, Life Technologies, USA; 16 μ M) was used to help the probes crossing the cell membrane. Fluorescence

was detected by Fluostar Optima multiwell plate reader (BMG Labtechnologies, Germany) at 485 nm excitation and 538 nm emission wavelengths at every 3 min for 1 h.

Immunohistochemistry

For the immunostaining of junctional proteins claudin-5 and zonula occludens-1 (ZO-1) rat brain endothelial cells (2.5×10^4 cells/well) were grown on glass coverslips (1 cm^2 , borosilicate, VWR, USA) coated overnight at 4 °C with rat tail collagen (150 μ g/ml). Cells treated with kainate and protective drugs for 24 h were fixed with 1% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C, permeabilized with 0.2% Triton-X100 for 10 min at 4 °C, then blocked with 3% BSA-PBS for 1 h at room temperature. Samples were incubated with rabbit anti-claudin-5 polyclonal (SAB4502981, 1:800 dilution in 3% BSA-PBS, antibody registry ID: AB_10753223; Sigma-Aldrich, USA) or rabbit anti-ZO-1 polyclonal (61-7300, 1:400 dilution in 3% BSA-PBS, antibody registry ID: AB_2533147; Invitrogen, USA) primary antibodies overnight at 4 °C, then with anti-rabbit secondary antibody conjugated with Cy3 (C2306, 1:400 dilution in PBS, antibody registry ID: AB_258792; Sigma-Aldrich, USA) and H33342 nucleus stain (1 μ g/ml) for 1 h at room temperature [40]. Cells were washed with PBS between the incubations. Coverslips were mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) and visualized by Leica SP5 confocal laser scanning microscope. Tight junction staining patterns (4–7 images in each group) were analysed by MATLAB software (MathWorks, Natick, MA, USA). The backgrounds of each image were determined and subtracted to compensate the occasional non-uniform background. The grayscale images were converted to binary. The object number reveals the number of the separated structure elements of the images, indicating discontinuity in the staining pattern.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD or SEM. Intensity measurements for nitric oxide synthase (NOS) RT-PCR were analysed by ImageJ software (National Institutes of Health, USA). Statistical analysis was done by GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, USA). Significance between groups was determined using t-test or one-way ANOVA followed by Dunnett or Bonferroni posttests. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All experiments were repeated at least twice.

Results

Effect of kainate on cell viability of rat brain endothelial cells, astrocytes and pericytes

Viability and integrity of brain endothelial, astrocyte and pericyte cell layers were monitored with real-time

impedance measurement for 24 h after kainate treatment (10 and 100 μM) (Fig. 1a). Kainate at 100 μM concentration decreased endothelial cell viability compared to the control at both time points. Interestingly, kainate had no effect on cultured astrocytes and pericytes (Fig. 1b, c). Based on this result the 100 μM kainate treatment was selected for further experiments.

Expression of kainate receptors in rat brain cortex, rat brain microvessels and primary rat brain endothelial cells

In rat brain cortex all of the five kainate receptor genes were expressed (GluK1/GluR5, GluK2/GluR6, GluK3/GluR7, GluK4/KA-1 and GluK5/KA-2) as shown in Fig. 2. In isolated rat brain microvessels the expression of GluK1 and GluK4, while in primary rat brain endothelial cell cultures GluK1 expression was detected by RT-PCR. GluK5 gene expression was also slightly detectable in these samples (Fig. 2). These results were verified by capillary DNA sequencing. The expression of housekeeping genes β-actin and GAPDH were similar in rat brain

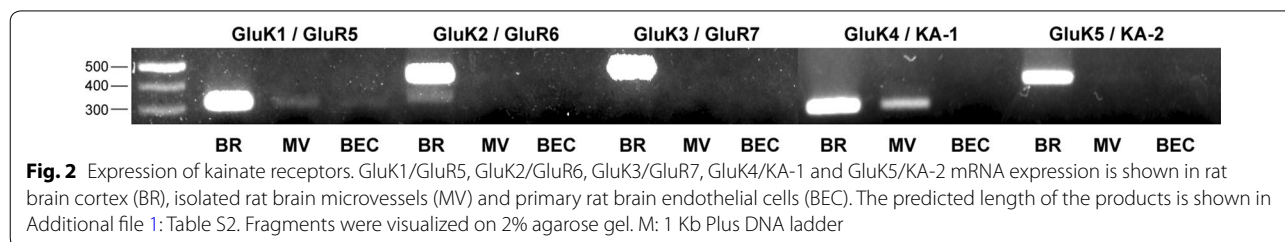
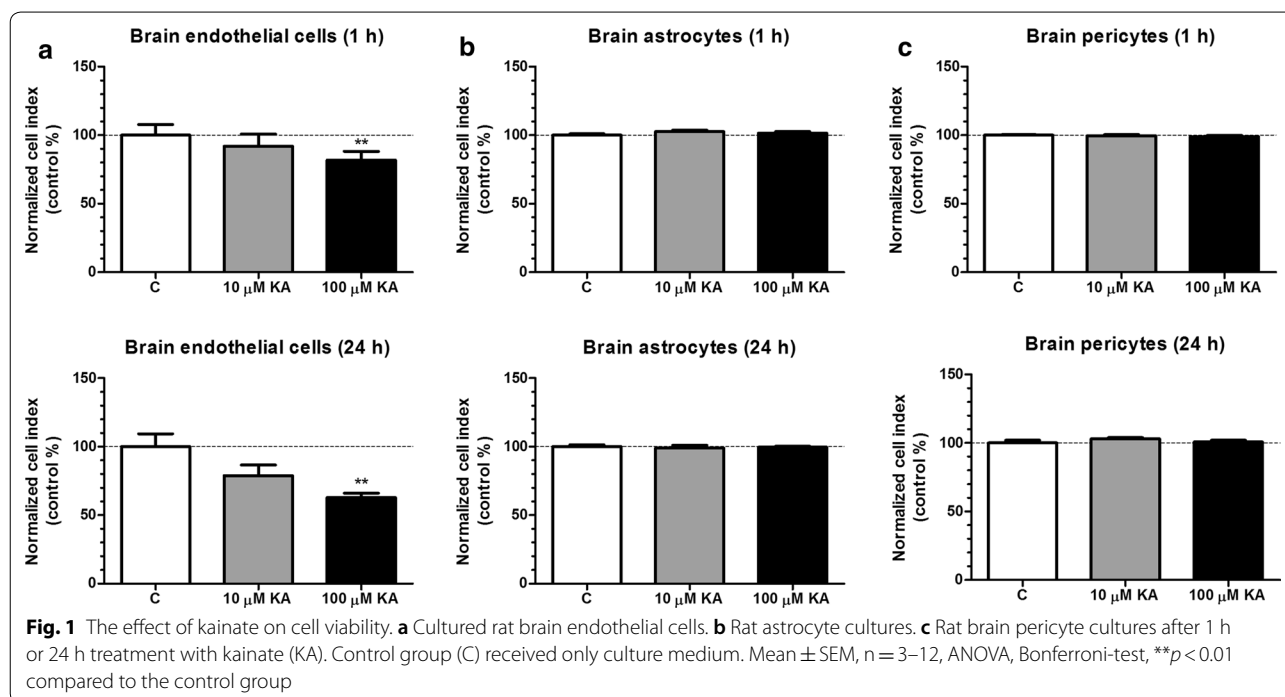
cortex, isolated rat brain microvessel and primary rat brain endothelial cell samples (Additional file 1: Figure S3).

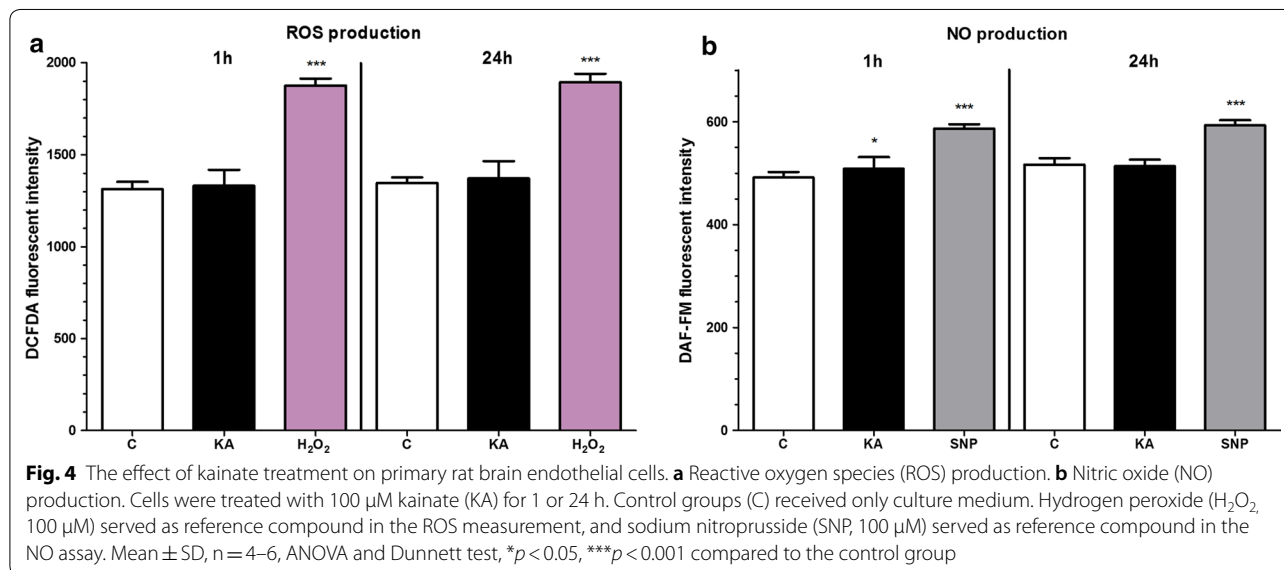
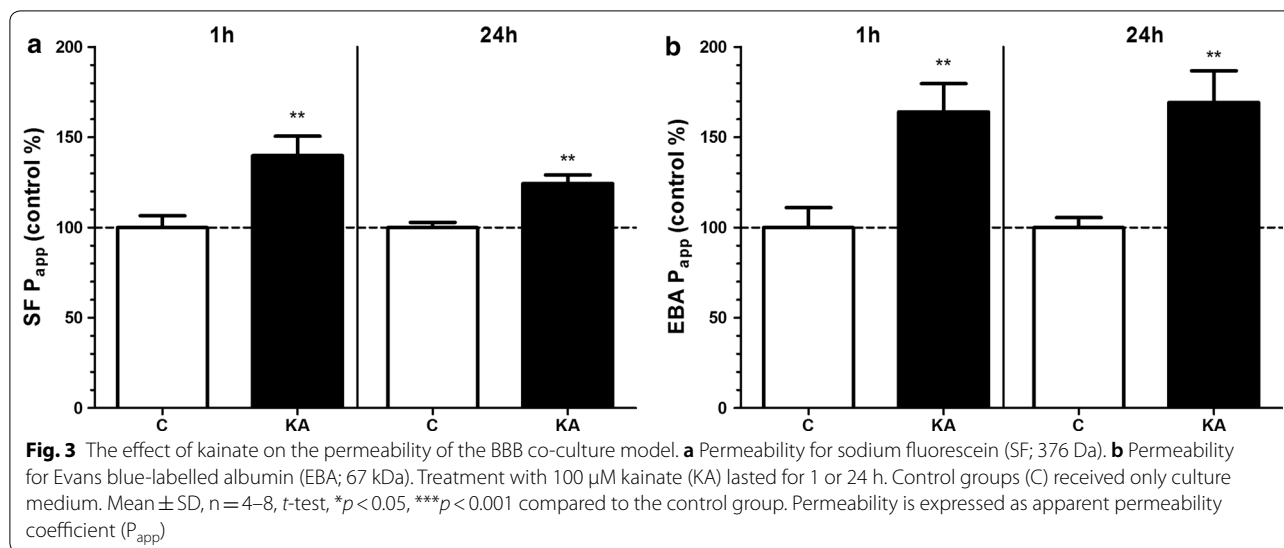
Effect of kainate on the permeability of the BBB co-culture model

The tightness of the BBB model was tested by the measurement of P_{app} for marker molecules fluorescein (4.72 × 10⁻⁶ cm/s) and albumin (0.31 × 10⁻⁶ cm/s) which were in the range we measured in previous studies [29, 41]. Kainate treatment (100 μM) significantly increased the permeability of the BBB model for both markers at the 1 and 24 h time points (Fig. 3).

Effect of kainate on reactive oxygen species and nitric oxide production

Kainate did not show any effect on the basal ROS production of brain endothelial cells after 1 or 24 h compared to the control group, but it elevated NO generation in brain endothelial cells after 1 h (Fig. 4). Hydrogen peroxide was





used as a reference inducer of ROS in the assay (Fig. 4), as in our previous study [29], while sodium nitroprusside was given to increase NO production [40].

Effect of simvastatin, edaravone and dexamethasone on the cell viability of kainate-treated brain endothelial cells

Simvastatin, edaravone or dexamethasone at 1 μ M concentration significantly increased cell viability measured by the impedance assay and compared to the kainate treatment group (100 μ M) as reflected by the elevated cell index of rat brain endothelial cells at 24 h timepoint (Fig. 5).

Effect of simvastatin, edaravone and dexamethasone on the permeability of kainate-treated BBB co-culture model

To test the protective molecules, the permeability measurements were performed similarly as described above. In this assay simvastatin and edaravone significantly attenuated the increased permeability for both markers caused by kainate treatment, while dexamethasone blocked the barrier opening effect only for the transcellular marker albumin (Fig. 6).

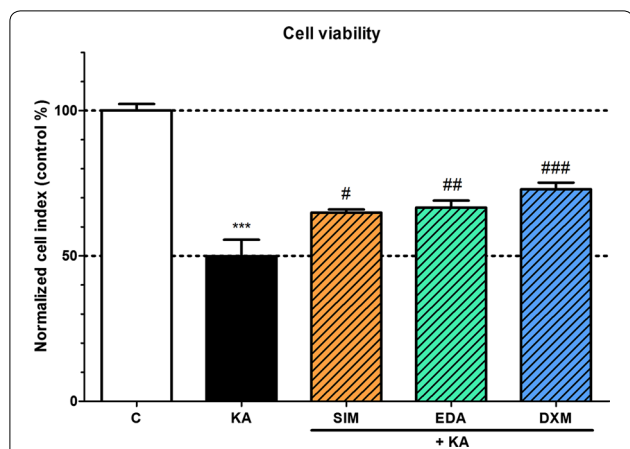


Fig. 5 The effect of kainate and protective compounds on cell viability of primary rat brain endothelial cells. Rat brain endothelial cells were treated with 100 μ M kainate (KA) without or with simvastatin (SIM, 1 μ M), edaravone (EDA, 1 μ M) or dexamethasone (DXM, 1 μ M) for 24 h. Control groups (C) received only culture medium. Mean \pm SD, n = 4–8, ANOVA, Bonferroni test, *** p < 0.001 compared to the control group, # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 compared to the kainate-treated group

Effect of simvastatin, edaravone and dexamethasone on the morphology of kainate-treated endothelial cells

The tight paracellular barrier formed by brain endothelial cells in the BBB model was visualized by the continuous, belt-like pericellular localization of integral membrane tight junction protein claudin-5 and linker protein ZO-1 (Fig. 7a). In the kainate treated group

junctional staining patterns of claudin-5 and ZO-1 were weaker and more fragmented at the cell border, as compared to the control group, while in cells treated with simvastatin, edaravone or dexamethasone the staining patterns of tight junction proteins were more similar to the control group (Fig. 7a). The object number on the immunostained pictures significantly increased due to kainate treatment as compared to the control group indicating a disturbance in the proper localization of the junctional proteins. Edaravone and dexamethasone significantly decreased the object number compared to the kainate-treated group for both immunostainings, while simvastatin was efficient to reduce the discontinuous pattern of ZO-1 immunostaining (Fig. 7b, c).

Effect of simvastatin, edaravone and dexamethasone on reactive oxygen species and nitric oxide production of kainate-treated brain endothelial cells

Although kainate did not influence the ROS production of brain endothelial cells we tested the effect of simvastatin, edaravone and dexamethasone in this experiment. Here edaravone showed a strong antioxidant effect on the basal ROS production alone or when it was given together with kainate (Fig. 8a). Simvastatin and dexamethasone had no effect on the generation of ROS in brain endothelial cells. More importantly, dexamethasone significantly reduced the elevated NO production induced by short-term kainate treatment (Fig. 8b).

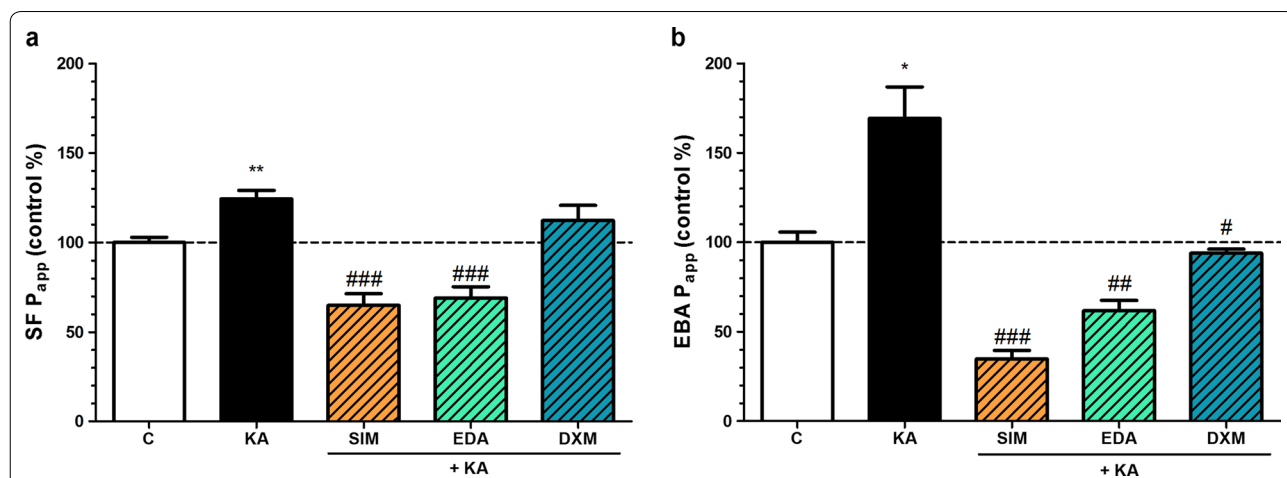
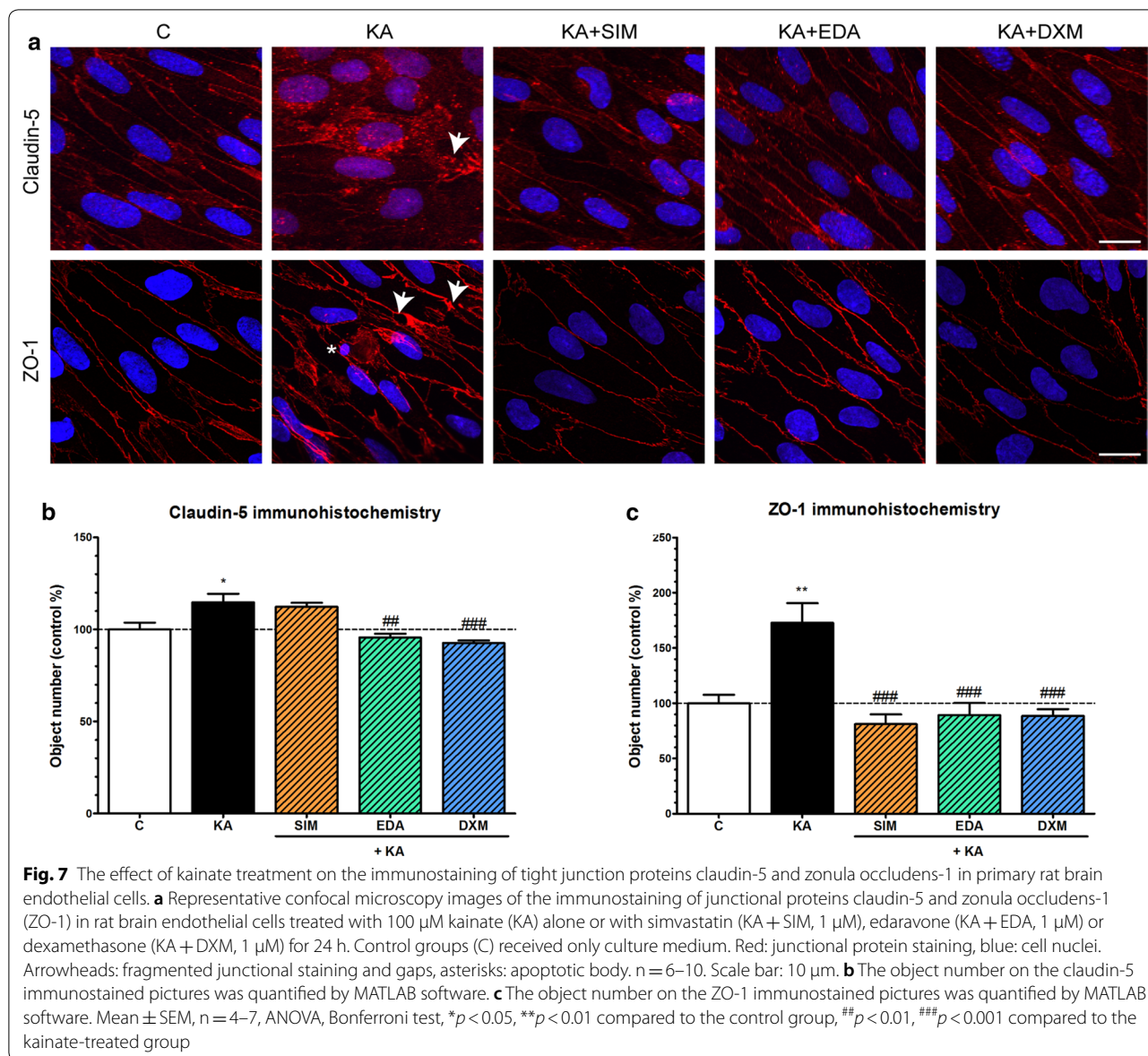


Fig. 6 The effect of kainate and protective compounds on the permeability of BBB co-culture model. **a** Permeability for sodium fluorescein (SF; 376 Da). **b** Permeability for Evans blue-labelled albumin (EBA; 67 kDa). Primary brain endothelial cells co-cultured with astrocytes and pericytes on inserts were treated with 100 μ M kainate (KA) without or with simvastatin (SIM, 1 μ M), edaravone (EDA, 1 μ M) or dexamethasone (DXM, 1 μ M) for 24 h. Control groups (C) received only culture medium. Mean \pm SEM, n = 3–9, ANOVA, Bonferroni-test, ** p < 0.01 compared to the control; # p < 0.05, ### p < 0.001 compared to the kainate-treated group. Permeability is expressed as apparent permeability coefficient (P_{app}) in the % of the control values



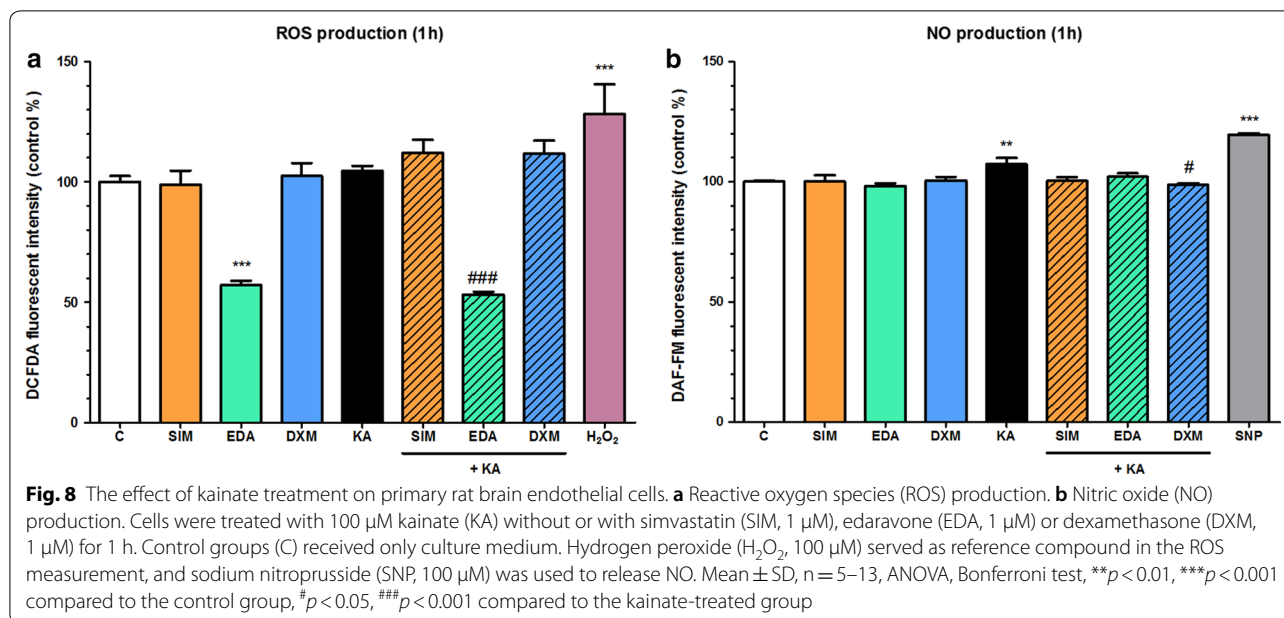
Expression of nitric oxide synthase genes in brain endothelial cells

The expression of all three nitric oxide synthase genes was detected in rat brain endothelial cell cultures with RT-PCR and qPCR (Fig. 9). The endothelial NOS3 and the neuronal NOS1 genes were highly expressed in rat brain endothelial cells while the inducible NOS2 showed a low expression level (Fig. 9a). Kainate treatment significantly elevated the NOS2/iNOS gene expression but had no effect on NOS1/nNOS and NOS3/eNOS mRNA expressions as detected by both methods. Dexamethasone attenuated the increased expression of NOS2/iNOS caused by kainate treatment while it did not modify the expression of NOS1/nNOS

(Fig. 9). The expression level of NOS3/eNOS mRNA was elevated in the kainate + dexamethasone group measured by RT-PCR, but this result was not confirmed by qPCR.

Discussion

Excitotoxicity is one of the main pathological pathways in CNS diseases leading to both neuronal injury and BBB dysfunction [5, 42]. Glutamate was shown to increase BBB permeability and reduce the integrity of tight junctions in culture models of the BBB [8, 32, 43]. Ionotropic glutamate receptor agonists NMDA and AMPA were also described to decrease resistance and increase permeability of porcine brain endothelial cells [32]. The same team



reported that kainate also induced cell damage, increased DNA fragmentation and cell death in this BBB model, but further direct effects or the presence of kainate receptors were not investigated.

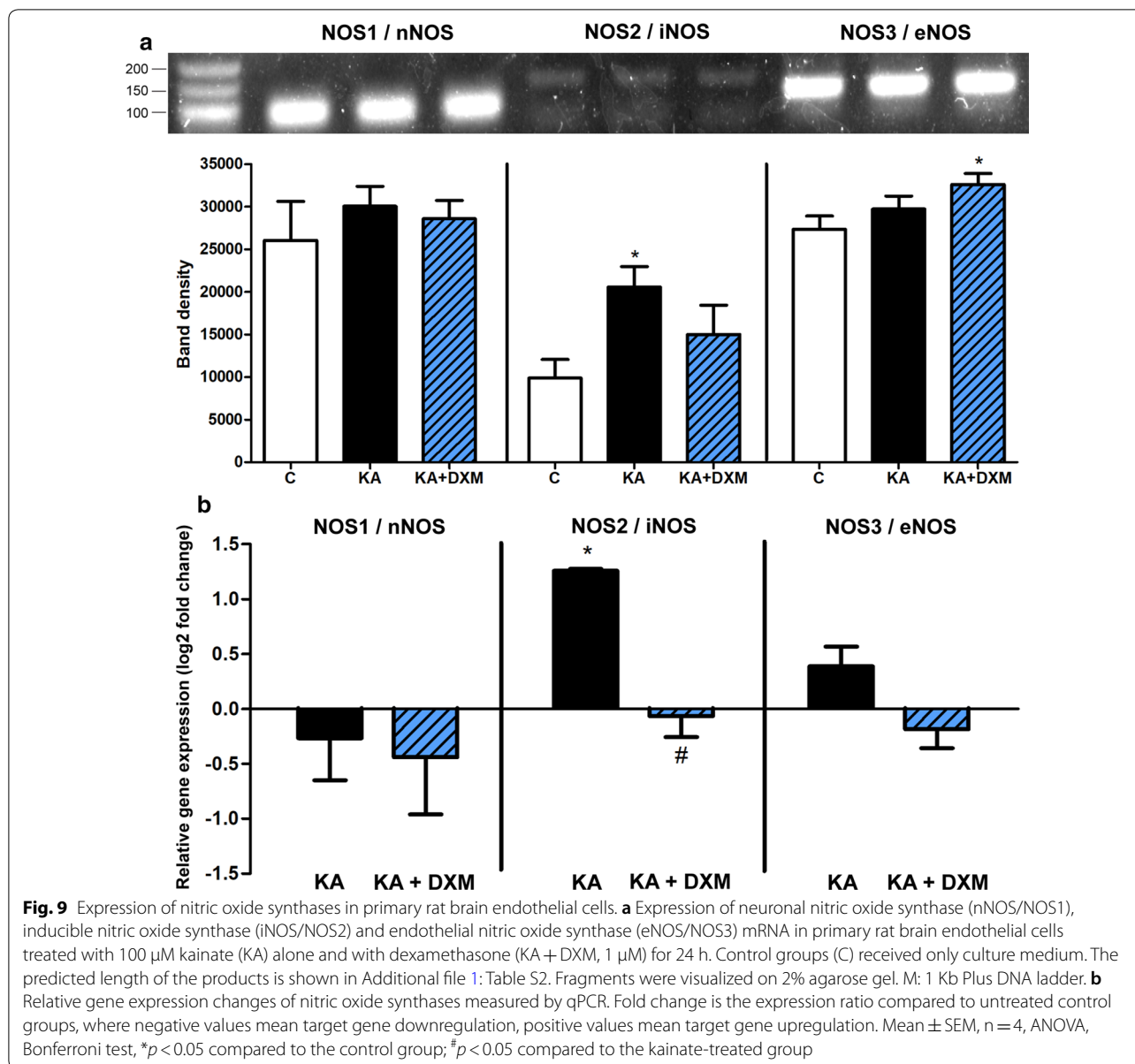
In the present study we demonstrated that kainate decreased cell viability measured by impedance in brain endothelial cells, but not in cultures of brain pericytes or glial cells. While several studies confirm the sensitivity of cultured neurons and oligodendrocytes for kainate toxicity, there are no data in the scientific literature regarding kainate-induced cell death in astrocyte or brain pericyte cultures. The kainate concentration used in our experiment is high, however, both for glutamate and kainate in culture models of the BBB similarly high concentrations were applied [6, 8, 32]. Extracellular glutamate concentrations as high as 50 and 75 μ M were measured in the hippocampus of human patients with epilepsy by microdialysis [44] indicating that in pathological conditions very high concentrations of excitotoxic neurotransmitters can be released.

Kainate also increased the permeability of marker molecules fluorescein and albumin across the BBB model and changed the staining pattern of tight junction proteins in brain endothelial cells. These data are in concordance with the barrier opening effect of glutamate in our previous study [8] and with data from other groups [32, 43]. Among the receptors mediating the effect of excitatory mediators several types of the AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptors were described in brain endothelial cells at RNA, protein or functional levels [6–10, 43]. In addition to these receptors, we also

found the mRNA expression of GluK1 and GluK4 in isolated brain microvessels and GluK1 in cultured brain endothelial cells. The brain microvessel fractions contain not only brain endothelial cells, but also pericytes and astrocytic endfeet. While brain pericytes are responsive to glutamate [45], there are no data on the presence of kainate receptors in brain pericytes. Astroglia cells express GluK4/KA1 both in vivo [46] and in culture [47].

Although oxidative stress and the production of excess ROS contribute to the damage in excitotoxicity, and kainate was described to increase ROS production in porcine brain endothelial cells [32] in the present experiments kainate had no effect on ROS production in our model. The higher concentration of kainate and the different detection method in the study of Basuroy et al. may explain the dissimilarity [32]. We found that kainate elevated NO production and the band intensity of iNOS mRNA. The level of iNOS is negligible in endothelial cells under physiological conditions, but it is increased in pathologies [48]. In our study the increased mRNA level of iNOS also indicates the damaging effect of kainate. Our observations are in accordance with previous results showing that kainate injection into cerebral cortex increased NOS activity in microvessels in rats [49].

The importance of the BBB as a therapeutic target is increasingly recognized and several anti-inflammatory or antioxidant drugs and novel molecules were identified as BBB protective on culture models [25] and introduced in the therapy of disease like stroke, amyotrophic lateral sclerosis and epilepsy [15–17]. We demonstrated that simvastatin protected brain endothelial cells in the



viability and permeability assays against kainate-induced changes and also restored cell morphology. These findings are in agreement with the protective effects of fluvastatin in BBB disruption induced by glutamate in vitro [43]. Simvastatin showed also neuroprotective effect against NMDA-induced excitotoxicity in a culture model [50]. Our data are in concordance with the potential therapeutic use of statins in epilepsy [19], stroke and neurodegenerative diseases [51]. Brain penetration is a key factor in the potential therapeutic efficacy of statins in neurological diseases. Statins can be ligands of solute carriers, like OATPs, and efflux transporters, such as P-glycoprotein, which were identified at the level of the

BBB and regulate CNS drug disposition [38, 41]. In a previous study we measured the permeability of rosuvastatin, pravastatin and atorvastatin on our BBB model and found good penetration for these molecules [41].

Edaravone was also protective against kainate induced damage and it reduced ROS levels and kainate-induced NO production in our experiments. These data confirm our previous results on the protective and antioxidant effects of edaravone on cultured brain endothelial cells [23]. Edaravone promoted tight junction formation in vascular endothelial cells [52] and exerted antioxidant effects during NMDA excitotoxicity on brain slices [53]. The protective effect of edaravone was also demonstrated

in kainate-induced epilepsy models in rats [24, 54]. All these preclinical data support the BBB protective effects of edaravone which may contribute to its efficacy in the clinical treatment of acute stroke and amyotrophic lateral sclerosis [17].

The barrier tightening effect of dexamethasone was described in several studies using culture models of the BBB [25, 26]. Dexamethasone upregulated claudin-5 and ZO-1 tight junction proteins in damaged brain endothelial cell cultures [55, 56] supporting our data. The observations of the present study confirm data demonstrating the BBB protective effects of dexamethasone obtained in animal models of epilepsy induced by kainate [27] and by pilocarpine [16]. In addition to its barrier protecting effect dexamethasone decreased NO production and the iNOS mRNA expression elevated by kainate in brain endothelial cells. In accordance with our results dexamethasone decreased both BBB permeability and iNOS activity in lipopolysaccharide-treated mice [57]. Although the therapeutic efficacy of dexamethasone in epilepsy is still controversial, it exerted beneficial effects in pediatric drug resistant epileptic patients [16].

Conclusion

In conclusion, we proved for the first time that the excitotoxin kainate directly damaged cultured brain endothelial cells. Kainate made the immunostaining of junctional proteins discontinuous at the cell border indicating the opening of the BBB model. Kainate increased the permeability of the BBB model for marker molecules, the production of nitric oxide (NO) and the mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (NOS2/iNOS) in brain endothelial cells. The presence of kainate receptors was also demonstrated on brain endothelial cells. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protected the BBB model against kainate-induced reduced cell viability, increased permeability and morphological changes in cellular junctions. Dexamethasone attenuated the elevated nitric oxide production and decreased the mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (NOS2/iNOS) increased by kainate treatment. Our results confirmed the potential clinical usefulness of these drugs to attenuate BBB damage.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0166-1>.

Additional file 1. Detailed protocol, additional figures and tables.

Abbreviations

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; BBB: blood-brain barrier; BEC: brain endothelial cells; BR: brain; BSA: bovine serum albumin; CNS: central nervous system; DAF-FM: 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DCFDA:

chloromethyl-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium; DXM: dexamethasone; EBA: Evans blue-labeled albumin; EDA: edaravone; eNOS/NOS3: endothelial nitric oxide synthase; FBS: fetal bovine serum; H₂O₂: hydrogen peroxide; iNOS/NOS2: inducible nitric oxide synthase; KA: kainate; MV: microvessel; NMDA: *N*-methyl-D-aspartate; nNOS/NOS1: neuronal nitric oxide synthase; NO: nitric oxide; P_{app}: apparent permeability coefficient; PBS: phosphate buffered saline; PDS: plasma-derived bovine serum; ROS: reactive oxygen species; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction; SF: sodium fluorescein; SIM: simvastatin; SNP: sodium nitroprusside; ZO-1: zonula occludens protein-1.

Authors' contributions

LB, FRW and AH performed the measurements, analysed the data, prepared the figures and tables, wrote the first version of the manuscript. AB performed experiments, analysed the data and edited the manuscript. AK and ÁZ performed experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, analysed the data, prepared the figures. KJ and VT contributed reagents and analysis tools and edited the manuscript. PCB designed the experiments and edited the manuscript. MD designed and supervised the experiments and the analysis of the data, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The work was supported by a bilateral grant from the Hungarian Academy of Sciences (SNK-51/2013, NKM-51/2014, NKM-61/1/2015) and CONACYT, Mexico (Bilateral Program CONACYT 193490-2012, project register at IMSS R-2012-785-062). FRW was supported by the János Bolyai Research Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences, the National Research, Development and Innovation Office, Hungary (OTKA PD-128480) and the ÚNKP-19-SZTE42 Bolyai + Scholarship New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology.

Availability of data and materials

The dataset used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The procedure of organ harvesting required to obtain primary cells from brain is exempt of animal experimentation permission based on the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Vilmos Tubak is employed by Creative Laboratory Ltd. The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Temesvári krt. 62, Szeged 6726, Hungary. ² Doctoral School in Biology, University of Szeged, Somogyi u. 4, Szeged 6720, Hungary. ³ Creative Laboratory Ltd., Temesvári krt. 62, Szeged 6726, Hungary. ⁴ Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Temesvári krt. 62, Szeged 6726, Hungary. ⁵ Institute of Genetics, Biological Research Centre, Temesvári krt. 62, Szeged 6726, Hungary. ⁶ Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 Ciudad de México, DF, México. ⁷ Department of Cell Biology and Molecular Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary.

Received: 15 October 2019 Accepted: 27 December 2019

Published online: 10 February 2020

References

- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014;115:157–88. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>.

2. Barker-Haliski M, White HS. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(8):a022863. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022863>.
3. Schratzenholz A, Soskic V. NMDA receptors are not alone: dynamic regulation of NMDA receptor structure and function by neuregulins and transient cholesterol-rich membrane domains leads to disease-specific nuances of glutamate-signalling. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(7):663–86. <https://doi.org/10.2174/156802606776894519>
4. Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol*. 2004;19(5):343–60. <https://doi.org/10.1177/088307380401900507>
5. Klement W, Blaquiere M, Zub E, deBock F, Boux F, Barbier E, et al. A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. *Epilepsia*. 2019;60(7):1399–411. <https://doi.org/10.1111/epi.16019>.
6. Krizbai IA, Deli MA, Pestenác A, Siklós L, Szabó CA, András I, et al. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res*. 1998;54(6):814–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19981215\)54:6%3C814::AID-JNR9%3E3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19981215)54:6%3C814::AID-JNR9%3E3.0.CO;2-3)
7. Parfenova H, Fedinec A, Leffler CW. Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(2):190–7. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.000004823561824.C4>
8. András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(8):1431–43. <https://doi.org/10.1038/sj.cbfm.9600445>
9. Scott GS, Bowman SR, Smith T, Flower RJ, Bolton C. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(2):228–36. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.021>
10. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, et al. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem*. 2010;113(2):447–53. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06598.x>.
11. Negri S, Faris P, Pellavio G, Botta L, Orgiu M, Forcaia G, et al. Group 1 metabotropic glutamate receptors trigger glutamate-induced intracellular Ca²⁺ signals and nitric oxide release in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03284-1>.
12. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
13. Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic BV. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1318–31. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0234-x>.
14. Krizanac-Bengez L, Mayberg MR, Janigro D. The cerebral vasculature as a therapeutic target for neurological disorders and the role of shear stress in vascular homeostasis and pathophysiology. *Neurol Res*. 2004;26(8):846–53. <https://doi.org/10.1179/016164104X3789>
15. Hachinski V, Einhäupl K, Ganten D, Alladi S, Brayne C, Stephan BCM, et al. Preventing dementia by preventing stroke: the Berlin Manifesto. *Alzheimers Dement*. 2019;15(7):961–84. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.001>.
16. Marchi N, Granata T, Freri E, Ciusani E, Ragona F, Puvenna V, et al. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e18200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018200>.
17. Watanabe K, Tanaka M, Yuki S, Hirai M, Yamamoto Y. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? *J Clin Biochem Nutr*. 2018;62(1):20–38. <https://doi.org/10.3164/jcbn.17-62>.
18. Ramirez C, Tercero I, Pineda A, Burgos JS. Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(1):161–74. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-11653>.
19. Banach M, Czuczwar SJ, Borowicz KK. Statins—are they anticonvulsant? *Pharmacol Rep*. 2014;66(4):521–8. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.02.026>.
20. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circ Res*. 2017;120(1):229–43. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308537>.
21. Sierra S, Ramos MC, Molina P, Esteo C, Vázquez JA, Burgos JS. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood–brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(2):307–18. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101179>.
22. Nagaraja TN, Knight RA, Croxen RL, Konda KP, Fenstermacher JD. Acute neurovascular unit protection by simvastatin in transient cerebral ischemia. *Neurol Res*. 2006;28(8):826–30. <https://doi.org/10.1179/174313206X153914>
23. Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, et al. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e100152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100152>.
24. Nomura S, Shimakawa S, Miyamoto R, Fukui M, Tamai H. 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one or N-acetylcysteine prevents hippocampal mossy fiber sprouting and rectifies subsequent convulsive susceptibility in a rat model of kainic acid-induced seizure ceased by pentobarbital. *Brain Res*. 2014;1590:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.017>.
25. Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood–brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25(1):59–127. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8>
26. Förster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol*. 2007;580(Pt.3):937–49. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.129007>
27. Sztrihla L, Joó F, Szerdahelyi P, Eck E, Koltai M. Effects of dexamethasone on brain edema induced by kainic acid seizures. *Neuroscience*. 1986;17(1):107–14. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90229-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90229-0)
28. Walter FR, Valkai S, Kincses A, Petneházi A, Czeller T, Veszelka S, et al. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sens Actuators B: Chem*. 2016;222:1209–19. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.110>.
29. Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F, et al. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ*. 2018;6:e4774. <https://doi.org/10.7717/peerj.4774>.
30. Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005;93(2):279–89. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x>
31. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, et al. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*. 2009;54(3–4):253–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002>.
32. Basuroy S, Leffler CW, Parfenova H. CORAM-A1 prevents blood–brain barrier dysfunction caused by ionotropic glutamate receptor-mediated endothelial oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(11):C1105–15. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00023.2013>.
33. Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszelka S, Ozsvári B, Puskás LG, et al. Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J Pharm Sci*. 2013;102(4):1173–81. <https://doi.org/10.1002/jps.23458>.
34. Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben-Ari Y, et al. Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci*. 1999;11(2):604–16. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00479.x>
35. Hinoi E, Yoneda Y. Expression of GluR6/7 subunits of kainate receptors in rat adenohypophysis. *Neurochem Int*. 2001;38(6):539–47. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(00\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00115-7)
36. Maric D, Liu QY, Grant GM, Andreadis JD, Hu Q, Chang YH, et al. Functional ionotropic glutamate receptors emerge during terminal cell division and early neuronal differentiation of rat neuroepithelial cells. *J Neurosci Res*. 2000;61(6):652–62. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000915\)61:6<652::AID-JNR9>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000915)61:6<652::AID-JNR9>3.0.CO;2-J)
37. Yao SY, Ljunggren-Rose A, Chandramohan N, Whetsell WO Jr, Sriram S. In vitro and in vivo induction and activation of nNOS by LPS in

- oligodendrocytes. *J Neuroimmunol.* 2010;229(1–2):146–56. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.07.023>.
38. Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszelka S, Deli MA. Role of the blood–brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 2014;45(8):610–38. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.018>.
 39. Veszelka S, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, et al. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(3):487–501. <https://doi.org/10.3233/JAD-120163>.
 40. Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, et al. Cultured cells of the blood–brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS.* 2015;12:17. <https://doi.org/10.1186/s12987-015-0013-y>.
 41. Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, et al. Comparison of a rat primary cell-based blood–brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: gene expression and drug transport. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:166. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00166>.
 42. Friedman A, Heinemann U. Role of blood–brain barrier dysfunction in Epileptogenesis. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's basic mechanisms of the Epilepsies* 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98210/>.
 43. Kuhlmann CR, Gerigk M, Bender B, Closhen D, Lessmann V, Luhmann HJ. Fluvastatin prevents glutamate-induced blood–brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci.* 2008;82(25–26):1281–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.04.017>.
 44. During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* 1993;341(8861):1607–10. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5).
 45. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014;508(7494):55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>.
 46. Vargas JR, Takahashi DK, Thomson KE, Wilcox KS. The expression of kainate receptor subunits in hippocampal astrocytes after experimentally induced status epilepticus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;72(10):919–32. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182a4b266>.
 47. Cauley K, Kukekov V, Young D. Kainate/AMPA receptors expressed on human fetal astrocytes in long-term culture. *J Neurosci Res.* 1997;47(3):311–21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970201\)47:3%3C311:AID-JNR9%3e3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970201)47:3%3C311:AID-JNR9%3e3.0.CO;2-L).
 48. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1–2):33–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>.
 49. Lei DL, Yang DL, Liu HM. Local injection of kainic acid causes widespread degeneration of NADPH-d neurons and induction of NADPH-d in neurons, endothelial cells and reactive astrocytes. *Brain Res.* 1996;730(1–2):199–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00447-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00447-7).
 50. Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci.* 2003;23(35):11104–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11104.2003>.
 51. Malfitano AM, Marasco G, Proto MC, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. Statins in neurological disorders: an overview and update. *Pharmacol Res.* 2014;88:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.06.007>.
 52. Onodera H, Arito M, Sato T, Ito H, Hashimoto T, Tanaka Y, et al. Novel effects of edaravone on human brain microvascular endothelial cells revealed by a proteomic approach. *Brain Res.* 2013;1534:87–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.019>.
 53. Nakano-Okuda Y, Hasegawa K, Hirai K, Kanai-Ochiai R, Morimoto M, Sugimoto T. Effects of edaravone on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated cytochrome c release and apoptosis in neonatal rat cerebrotical slices. *Int J Dev Neurosci.* 2006;24(6):349–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2006.08.001>.
 54. Miyamoto R, Shimakawa S, Suzuki S, Ogihara T, Tamai H. Edaravone prevents kainic acid-induced neuronal death. *Brain Res.* 2008;1209:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.064>.
 55. Blecharz KG, Haghikia A, Stasiolek M, Kruse N, Drenckhahn D, Gold R, et al. Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(3):293–302. <https://doi.org/10.1177/1352458509358189>.
 56. Hue CD, Cho FS, Cao S, Dale Bass CR, Meaney DF, Morrison B 3rd. Dexamethasone potentiates in vitro blood–brain barrier recovery after primary blast injury by glucocorticoid receptor-mediated upregulation of ZO-1 tight junction protein. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(7):1191–8. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.38>.
 57. Minami T, Okazaki J, Kawabata A, Kawaki H, Okazaki Y, Tohno Y. Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood–brain barrier caused by lipopolysaccharide. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1998;5(1):35–41. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(97\)10004-7](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(97)10004-7).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



SUPPLEMENTARY DATA

Simvastatin, edaravone and dexamethasone protects against kainate-induced brain endothelial cell damage

Lilla Barna, Fruzsina R. Walter, András Harazin, Alexandra Bocsik, András Kincses, Vilmos Tubak, Katalin Jósvay, Ágnes Zvara, Patricia Campos-Bedolla, Mária A Deli

Cell cultures, detailed protocol

Primary rat brain endothelial cells were isolated from three-week-old male and female Wistar rats (Harlan Laboratories, USA), as it is described in our previous papers [Walter et al., 2016; Harazin et al., 2018]. Animals were sacrificed with CO₂ then forebrains were collected in phosphate buffered saline (PBS) on ice. After removing meninges, the tissue was cut into 1 mm³ pieces and enzymatically digested by 1 mg/ml collagenase type II (Roche, Switzerland), and 15 µg/ml deoxyribonuclease type I (Roche, Switzerland) in Dulbecco's modified Eagle medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco, Life Technologies, USA) for 55 min at 37 °C. After the digestion the cells were mixed with 20% bovine serum albumin (BSA)-DMEM and centrifuged three times (1,000 × g, 20 min) to separate the brain microvessel fraction from the myelin rich brain tissue fraction. After each centrifugation step the cell pellets were collected and pooled. The collected microvessels were further digested by 1 mg/ml collagenase-dispase (Roche, Switzerland) in DMEM/F12 containing 15 µg/ml deoxyribonuclease type I (Roche, Switzerland) for 35 min at 37 °C. Brain microvascular endothelial cell clusters were separated on a 33 % Percoll gradient (1,000 × g, 10 min) then collected and washed twice in DMEM/F12. Cells were seeded onto collagen type IV and fibronectin coated (100 µg/ml each) Petri dishes (100 mm; Corning, USA). Cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 15 % plasma-derived bovine serum (PDS; First Link, UK), 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml sodium selenite (Pan Biotech, Germany), 10 mM Hepes, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor, 100 µg/ml heparin and 50 µg/ml gentamycin. During the first three days of culture the capillary endothelial cells were kept in culture medium containing 3 µg/ml puromycin to eliminate P-glycoprotein negative cell types [Perrière et al., 2005]. Cells were used at the first passage for experiments. Primary rat brain pericytes were isolated by the same protocol, except that puromycin treatment was not applied. After isolation pericytes were seeded onto collagen type IV coated

(100 µg/ml) Petri dishes (60 mm; VWR International, USA) and cultured in DMEM medium (Gibco, Life Technologies, USA) containing 10 % fetal bovine serum (FBS, Pan Biotech, Germany) and gentamycin (50 µg/ml). Cells were used at the third passage for experiments.

Primary rat astrocytes were obtained from 1-day-old Wistar rats. Meninges were removed then the brain tissue was mechanically dissociated with a long needle connected to a syringe. The homogenate was filtered through a nylon mesh (40 µm, Millipore, USA) to remove larger vessels and tissue debris. Cell clusters were plated onto uncoated 75 cm² flasks (TPP, Switzerland) and cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS and gentamycin (50 µg/ml) until they reached 90 % confluency. For the BBB co-culture model cells were cultured for 2 weeks (first passage) before use in appropriate collagen type IV (100 µg/ml) coated 12-well plates (Corning, USA) at a cell number of 5×10^4 cells/well. Confluent glia cultures included 90 % GFAP immunopositive astroglia and 10 % CD11b immunopositive microglia.

Brain endothelial cells were co-cultured with brain pericytes and astrocytes to induce the BBB characteristics [Nakagawa et al., 2009]. First pericytes (1.5×10^4 cells/cm²) were passaged to the bottom side of the 12-well format culture inserts (Transwell clear, polyester membrane, 0.4 µm pore size, 1.12 cm² surface; Corning, USA) coated with collagen type IV (100 µg/ml), then brain endothelial cells (7.5×10^4 cells/cm²) were added to the upper side coated with collagen type IV and fibronectin (100 µg/ml each). The inserts were placed into 12-well plates containing confluent astrocyte layers. Endothelial culture medium was added to both compartments. Cells were co-cultured for four days before experiments [Perrière et al., 2005].

Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F, et al. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ*. 2018;6:e4774. <https://doi.org/10.7717/peerj.4774>.

Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*. 2009;54(3-4):253-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002>.

Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005;93(2):279-89.

Walter FR, Valkai S, Kincses A, Petneházi A, Czeller T, Veszélka S, et al. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;222:1209-19. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.110>.

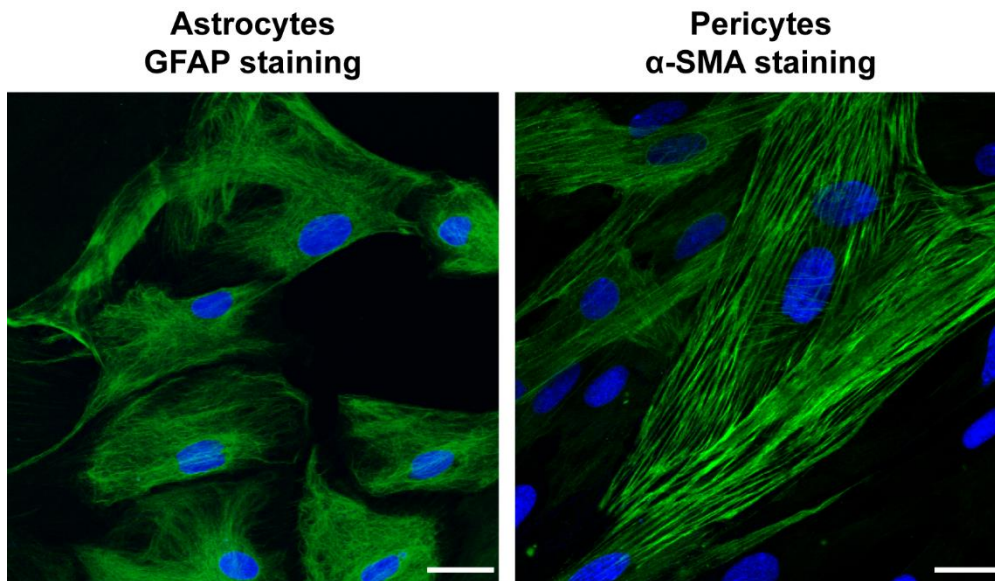


Figure S1. Characterization of primary rat astrocytes and pericytes. Cell morphology was characterized by glial fibrillary acidic protein (GFAP, astroglia) and α -smooth muscle actin (α -SMA, pericyte) immunostaining and visualized by confocal microscopy (Leica TCS SP5, confocal laser scanning microscope; Leica Microsystems, Germany). Cells were fixed with cold acetone-methanol solution (1:1) for 10 min, washed with phosphate buffered saline (PBS) and non-specific binding sites were blocked with 3% BSA-PBS for 1 h at room temperature. Incubation with mouse anti- α -SMA (Dako, USA) and mouse anti-GFAP primary antibodies lasted overnight at 4 °C. Cells were incubated with anti-rabbit secondary antibody labeled with Cy3 or anti-mouse secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488 (Life Technologies, USA) and H33343 dye to stain nuclei for 1 h at room temperature. Between incubations cells were washed three times with PBS. Scale bar = 25 μ m.

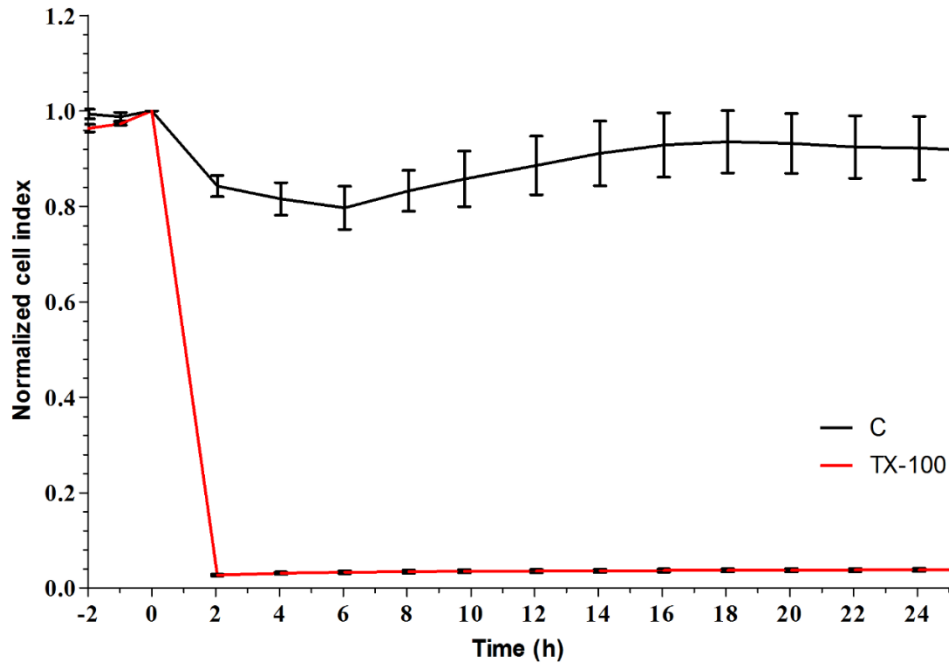


Figure S2. Effect of Triton X-100 (TX-100) on cell viability measured by impedance kinetics. Triton X-100 detergent was used at 1% concentration as a reference compound to cause cell death. The impedance of the control group (C) remained stable during the 24-h period.

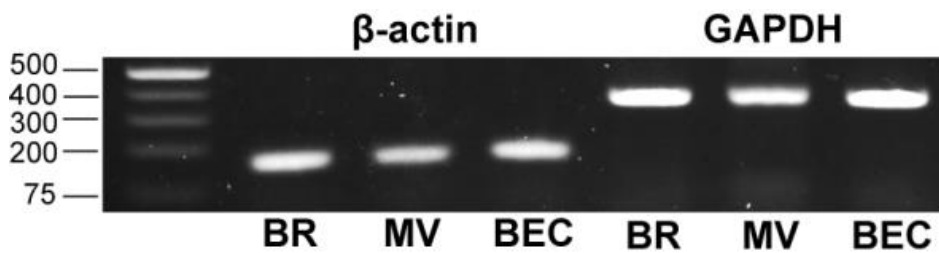


Figure S3. Expression of housekeeping genes (β -actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – GAPDH) in rat brain cortex (BR), isolated rat brain microvessels (MV) and primary rat brain endothelial cells (BEC). The predicted length of the products is shown in Table S2. Fragments were visualized on 2% agarose gel. M: 1 kb Plus DNA ladder.

Table S1. Origin and catalogue number of reagents used in this study

Product name	Company	Country	Catalogue number
collagenase type II	Roche	Switzerland	C6885
deoxyribonuclease type I	Roche	Switzerland	D4513
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Gibco, Life Technologies	USA	21885025
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	Gibco, Life Technologies	USA	31331028
bovine serum albumin (BSA)	Sigma, Merck	Germany	A7906
collagenase-dispase	Roche	Germany	11097 113001
Percoll	Sigma, Merck	Germany	P4937
collagen type IV	Sigma, Merck	Germany	C5533
fibronectin	Sigma, Merck	Germany	F1141
plasma-derived bovine serum (PDS)	First Link	UK	60-00-850
insulin	Pan Biotech	Germany	P07-03110
transferrin			
sodium selenite			
Hepes	Sigma, Merck	Germany	H4034
basic fibroblast growth factor	Sigma, Merck	Switzerland	F0291
heparin	Sigma, Merck	Germany	H3149
gentamycin	Sigma, Merck	Germany	G1397
puromycin	Sigma, Merck	Germany	P7255
fetal bovine serum (FBS)	Pan Biotech	Germany	P30-3702
kainic acid	Sigma, Merck	Germany	K-0250
simvastatin	Sigma, Merck	Germany	S-6196
edaravone	Sigma, Merck	Germany	M70800
dexamethasone	Sigma, Merck	Germany	D2915
hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Molar Chemicals	Hungary	03650
sodium nitroprusside (SNP)	Sigma, Merck	Germany	71778
collagen type I	isolated in our laboratory	-	-
TriFast reagent	VWR International	USA	30-2010
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher	USA	K1671
FIREPol DNA Polymerase	Solis BioDyne	Estonia	01-01-01000

agarose	VWR International	USA	443666A
Evans blue	Sigma-Aldrich	USA	E2129
sodium fluorescein	Sigma-Aldrich	USA	F6377
chloromethyl-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFDA)	Molecular Probes, Life Technologies	USA	C6827
4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM)	Molecular Probes, Life Technologies	USA	D23844
pluronic acid	Molecular Probes, Life Technologies	USA	P6867
paraformaldehyde	Sigma-Aldrich	USA	441244
Triton-X100	AppliChem	Germany	A4975
rabbit anti-claudin-5 polyclonal antibody	Sigma-Aldrich	USA	SAB4502981
rabbit anti-ZO-1 polyclonal antibody	Invitrogen	USA	61-7300
anti-rabbit secondary antibody conjugated with Cy3	Sigma-Aldrich	USA	C2306
H33342 nucleus stain	Calbiochem	USA	382065
Fluoromount-G	Southern Biotech	USA	0100-01

Table S2. Rat-specific primers used for RT-PCR.

Primer name		Sequence	Tm (°C)	Amplicon length (bp)	Gene ID
GluK1/ GluR5	fw	GGTATAACCCCCACCCATGCAACC	58	314	NM_017241.2
	rv	GAAGGTCATCGTCGAGCCATCTCTG			
GluK2/ GluR6	fw	GGTATAACCCACACCCTTGCAACC	56	452	NM_019309.2
	rv	TGACTCCATTAAGAAAGCATAATCCGA			
GluK3/ GluR7	fw	CTTCTTCAAGAAATCCAAGATCTCCACC	57	483	NM_181373.3
	rv	TGCTCCCGTTCCGCTGTCTTGC			
GluK4/ KA-1	fw	TACTCTCTGGGCAACAGCCT	56	289	NM_012572.1
	rv	AGGTCTGGTAGCGGGAATTT			
GluK5/ KA-2	fw	TCGCCCCGTGTCCTCAACTCA	55	398	NM_031508.2
	rv	CACCGACACCTCCTCAGACTCCG			
nNOS/ NOS1	fw	TCTACGCCACAGAGACAGGCAAAT	51	92	NM_052799
	rv	CATGGACATTGCCTTGGCATCGAA			
iNOS/ NOS2	fw	AGCATCCCAAGTACGAGT	48	140	NM_012611
	rv	AATCTCGGTGCCCATGTA			
eNOS/ NOS3	fw	CGGAGAATGGAGAGAGCTTT	50	113	NM_021838
β-actin	fw	TACTCTGTGTGGATTGGTGGC	52	150	NM_031144.3
	rv	GGTGTAACGCAGCTCAGTAA			
GAPDH	fw	GGTCATCAACGGGAAACCC	55	356	NM_017008.4
	rv	TCTGAGTGGCAGTGATGGCA			

II. Publikáció



The effects of *Vitis vinifera* L. phenolic compounds on a blood-brain barrier culture model: Expression of leptin receptors and protection against cytokine-induced damage



Andrea Ardid-Ruiz^{a,1}, András Harazin^{b,1}, Lilla Barna^b, Fruzsina R. Walter^b, Cinta Bladé^{a,2}, Manuel Suárez^{a,**}, Maria A. Deli^{b,c,*}, Gerard Aragonès^{a,1}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, Nutrigenomics Research Group, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

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

^c Department of Cell Biology and Molecular Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Blood-brain barrier
Brain endothelial cell
Cytokines
Epicatechin
Gallic acid
Grape-seed proanthocyanidin-rich extract
Leptin receptors
Resveratrol

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The medicinal properties of grapes (*Vitis vinifera* L.) are well known since ancient times. Ethnobotanical grape preparations, like the Ayurvedic Darakhasava are used as cardioprotective and for the treatment of cardiovascular diseases. Dried grape products are also applied in Iranian traditional medicine for memory problems, which are linked to the pathology of brain microvessels, a special part of the cardiovascular system. The anti-inflammatory and protective effects of these traditional preparations on the cardiovascular system are related to their bioactive phenolic compounds.

Aim of the study: The blood-brain barrier (BBB), formed by brain capillaries, is not only involved in inflammatory and other diseases of the central nervous system, but also in many systemic diseases with an inflammatory component. Dietary obesity is a systemic chronic inflammatory condition in which the peripheral and central vascular system is affected. Among the cerebrovascular changes in obesity defective leptin transport across the BBB related to central leptin resistance is observed. Our aim was to study the protective effects of grape phenolic compounds epicatechin (EC), gallic acid (GA) and resveratrol (RSV) and grape-seed proanthocyanidin-rich extract (GSPE) on a cytokine-induced vascular endothelial inflammation model. Using a culture model of the BBB we investigated cytokine-induced endothelial damage and changes in the expression of leptin receptors and leptin transfer.

Materials and methods: For the BBB model, primary cultures of rat brain endothelial cells, glial cells and pericytes were used in co-culture. Cells were treated by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) (10 ng/ml each) to induce damage. Cell toxicity was evaluated by the measurement of impedance. The expression of leptin receptors was assessed by RT-qPCR and western blot. The production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) were detected by fluorescent probes.

Results: GSPE (10 μ g/ml), EC (10 μ M), GA (1 μ M) or RSV (10 μ M) did not change the viability of brain endothelial cells. The gene expression of the short leptin receptor isoform, *Ob-Ra*, was up-regulated by GSPE, EC and RSV, while the mRNA levels of *Lrp2* and *clusterin*, *clu/ApoJ* were not affected. The tested compounds did not change the expression of the long leptin receptor isoform, *Ob-Rb*. RSV protected against the cytokine-induced increase in albumin permeability of the BBB model. GSPE and EC exerted an antioxidant effect and GSPE increased NO both alone and in the presence of cytokines. The cytokine-induced nuclear translocation of transcription factor NF- κ B was blocked by GSPE, GA and RSV. Cytokines increased the mRNA expression of *Lrp2* which was inhibited by EC. RSV increased *Ob-Ra* and *Clu* in the presence of cytokines. Cytokines elevated leptin transfer across the BBB model, which was not modified by GSPE or RSV. **Conclusion:** Our results obtained on cell culture models confirm that natural grape compounds protect vascular endothelial cells against inflammatory damage in accordance with the ethnopharmacological use of grape preparations in cardiovascular diseases. Furthermore, grape compounds and GSPE, by exerting a beneficial effect on the BBB, may also be considered in the treatment of obesity after validation in clinical trials.

* Corresponding author. Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Temesvári krt. 62, H-6726, Szeged, Hungary.

** Corresponding author. Department of Biochemistry and Biotechnology, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo 1, 43007, Tarragona, Spain.

E-mail addresses: manuel.suarez@urv.cat (M. Suárez), deli.maria@brc.hu (M.A. Deli).

¹ Equally contributed to this manuscript.

² Deceased.

Abbreviations

ANOVA	analysis of variance	kDa	kilodalton
ApoJ	apolipoprotein J	LRP2	low density lipoprotein-related protein 2
BBB	blood-brain barrier	NF- κ B	nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells transcription factor
BSA	bovine serum albumin	NO	nitric oxide
cDNA	complementary DNA	Ob-Ra	leptin receptor isoform a
Clu	clusterin	Ob-Rb	leptin receptor isoform b
Ct	cycle threshold	P _{app}	apparent permeability coefficient
CSF	cerebrospinal fluid	PBS	phosphate buffer solution
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate	PPIA	peptidylprolyl isomerase A
DCFDA	chloromethyl-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate	PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F-12	RT-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
EC	epicatechin	RBEC	rat brain endothelial cells
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	tjuvROS	reactive oxygen species
FBS	fetal bovine serum	RSV	resveratrol
GA	gallic acid	SDS	sodium dodecyl sulphate
GSPE	grape-seed proanthocyanidin-rich extract	SEM	standard error mean
HPLC-MS/MS	high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry	SOCS3	suppressor of cytokine signalling 3
IL-1 β	interleukin-1 β	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
		TEER	transendothelial electrical resistance
		TJ	tight junction
		TNF- α	tumor necrosis factor- α

1. Introduction

Grape (*Vitis vinifera* L.) is one of the oldest domesticated plants consumed both for its nutritional and medicinal values. The history of grape consumption goes back to at least 6000 years, to the time of ancient Egyptians and Greeks (Kamrani Rad et al., 2019). The Ebers Papyrus from 1550 BCE already mentions the beneficial effects of grape for medical problems (Inoue and Craker, 2014). Based on the Greek tradition Avicenna, the Persian physician and scientist, wrote in his “The Canon of Medicine” that grape improved oral health (Faridi et al., 2015). The ethnobotanical use of grape includes illnesses like skin and eye diseases, nausea, sore throats, haemorrhoids, kidney and liver diseases (Akaberi and Hosseinzadeh, 2016). The Ayurvedic Darakhasava, a grape preparation, is used as a cardiogenic and for the treatment of cardiovascular diseases (Paul et al., 1999). In addition to its application as a cardiac stimulant it is considered as a general health tonic for the promotion of good health. Traditional use of dried grapes was described for the treatment of cardiovascular conditions such as capillary bleeding, edema and inflammation (Darshan and Doreswamy, 2004). The Iranian traditional medicine has a special interest in the therapeutic potential of grape and dried grape for different ailments, including memory problems (Bakhtiyari et al., 2017). Memory problems, either from vascular or neurodegenerative origin, are linked to the pathology of brain microvessels (Sweeney et al., 2018), a special part of the cardiovascular system. The blood-brain barrier (BBB), formed by brain capillaries, is not only involved in inflammatory and other diseases of the central nervous system, but also in many systemic diseases with an inflammatory component (Erickson and Banks, 2018). Dietary obesity is a chronic inflammatory condition in which the cardiovascular system is also affected. Among the cerebrovascular changes in obesity defective leptin transport across the BBB related to central leptin resistance is observed (Rhea et al., 2017). The anti-obesity effects of grape compounds have been recently confirmed by experimental and clinical investigations, although the molecular mechanisms are not fully understood (Aragones et al., 2016a; Akaberi and Hosseinzadeh, 2016).

Obesity is considered one of the most important epidemics worldwide and is related to other pathologies such as cardiovascular disease, diabetes, cancer and hypertension, (Upadhyay et al., 2018). There is an association between obesity and a systemic chronic low-grade inflammation: excessive production of pro-inflammatory adipokines in

obese subjects induces systemic inflammation, insulin resistance and other related pathologies (Bulló et al., 2003; Marseglia et al., 2014). Pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) are central regulators of this systemic and neuronal inflammation in obesity (Marseglia et al., 2014) as well as inducers of blood-brain barrier (BBB) dysfunction (Deli et al., 2005; Liebner et al., 2018). Obesity causes an increase in the levels of circulating leptin, a hormone secreted by adipocytes that regulates food intake by acting on the central nervous system. However, this excess of leptin is not functional, resulting in a state known as leptin resistance (Andreoli et al., 2019). The two major mechanisms that contribute to leptin resistance are inflammation, in both the periphery and the hypothalamus during obesity (de Git and Adan, 2015), and the inability of leptin to enter the brain (Andreoli et al., 2019). Because leptin is produced in the periphery and its main function is exerted in the brain, it is transported across the BBB (Banks et al., 1996; Bjorbaek et al., 1998a). The association between leptin resistance and the deficient transfer of leptin across the BBB has been observed in both obese patients and rodent models of obesity (Caro et al., 1996).

Leptin receptors (Ob-R) belong to the gp130 family of cytokine receptors and are expressed in the brain as well as in some peripheral tissues such as the liver (Tartaglia, 1997; Aragones et al., 2016a). The longest isoform is Ob-Rb, which contains a cytoplasmic domain involved in the activation of the leptin signalling pathway (Lee et al., 1996) through janus kinase 2 (JAK2) and the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Aragones et al., 2016a). Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) and the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) are known inhibitors of the leptin cascade (Bjorbaek et al., 2000; Zabolotny et al., 2002). The Ob-Ra isoform lacks intracellular signalling domains and transports leptin from the blood to the cerebrospinal fluid (Bjorbaek et al., 1998a). Clusterin (Clu), also known as apolipoprotein J (ApoJ), is a protein that stimulates the anorexigenic effect of leptin by increasing the interaction of leptin with its receptor (Byun et al., 2014). The LDL receptor-related protein-2 (LRP2/megalin) is also important in the clusterin-induced increase in leptin receptor binding (Gil et al., 2013; Byun et al., 2014). Ob-Ra and LRP2 are expressed in both the endothelium of cerebral microvessels (Hileman et al., 2002; Bell et al., 2007; Gosselet et al., 2009) and choroid plexus (Dietrich et al., 2008) and are implicated in the transport of leptin to the brain.

Phenolic compounds are plant secondary metabolites found in fruits, vegetables and beverages, including grapes (Del Rio et al., 2013; Akaberi and Hosseinzadeh, 2016). The beneficial health effects of grape and grape products and the anti-inflammatory and protective effects of traditional grape preparations on the cardiovascular system are related to their bioactive phenolic compounds (Georgiev et al., 2014). The biological activities of grape phenolic compounds include among others anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective effects (Georgiev et al., 2014; Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2016). The grape phenolic compound resveratrol (RSV) is a major component in the ethnobotanical Darakhasava (Paul et al., 1999), and recent biomedical studies demonstrated its cardiovascular protective effects (Arrick et al., 2011; Clark et al., 2012; Georgiev et al., 2014; Diaz-Gerevini et al., 2016; Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2016; Wicinski et al., 2018). In addition, RSV can improve leptin resistance by acting at different levels of the leptin pathway (Aragones et al., 2016a). Grape polyphenols inhibit the production of pro-inflammatory adipokines (da Costa et al., 2017) and exert a protective effect on the BBB (Campos-Bedolla et al., 2014). Previous studies from our research group have shown that grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) enhanced the activation of STAT3 and increased the proopiomelanocortin mRNA levels in the hypothalamus of obese rats, while in the skeletal muscle it restored the expression of *Socs3* and *Ptp1b* (Ibars et al., 2017). Experimental data suggest that extracts and phenolic compounds from grape may also exert a protective effect on BBB dysfunction induced by inflammation and associated with obesity, but the effects of RSV or GSPE have not been investigated on leptin receptors or transfer at the level of brain endothelial cells.

Our aim was to study the protective effects of grape phenolic compounds epicatechin (EC), gallic acid (GA) and RSV and grape-seed proanthocyanidin-rich extract (GSPE) on a cytokine-induced vascular endothelial inflammation model. Using a culture model of the BBB we investigated cytokine-induced endothelial damage and changes in the expression of leptin receptors and leptin transfer.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and compounds

GSPE is a commercial product (Vitaflavan®) produced from white and red grape seeds which was kindly provided for our studies by the company Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, France). The extraction is made by hot water and a food grade solvent and at each step of the four-stage process high molecular weight oligomeric proanthocyanidins (tannins) are gradually eliminated, while low molecular weight bioactive oligomeric proanthocyanidins (dimers, trimers, tetramers and pentamers) are concentrated. The total content of the phenolic compounds in GSPE is higher than 96%. The yield of GSPE is about 1%, 1 kg extract is produced from 100 kg grape seed (Vitaflavan manufacturing process, n.d.). According to previous analysis performed in our group using HPLC-MS/MS (Baselga-Escudero et al., 2014), this proanthocyanidin-rich extract contained EC (33.6 ± 12.7 mg/g), GA (15.1 ± 3.5 mg/g), but not RSV (0.0 ± 0.0 mg/g) as shown in Table S1. GA (G7384) and EC (E4018) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). RSV was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain).

2.2. Cell culture and in vitro blood-brain barrier model

Primary rat brain endothelial cells (RBEC) were isolated from 3 week-old outbred Wistar rats (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) as described in our previous paper (Nakagawa et al., 2009). Forebrains were collected and meninges were removed, then the tissue was cut into 1 mm^3 pieces by scalpel and digested with enzymes (1 mg/ml collagenase type II, and 15 $\mu\text{g/ml}$ deoxyribonuclease type I (Roche, Basel, Switzerland) in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F12, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 55 min.

Microvessels were separated from the myelin rich brain tissue fraction by centrifugation in 20% BSA-DMEM gradient ($1000 \times g$, 20 min, 3 times). The collected vessels were further digested with enzymes (1 mg/ml collagenase-dispase, and 15 $\mu\text{g/ml}$ deoxyribonuclease type I; Roche, Basel Switzerland) in DMEM/F12 at 37 °C for 35 min. Brain microvascular endothelial cell clusters were separated on a 33% continuous Percoll gradient ($1000 \times g$, 10 min), collected, and washed twice in DMEM/F12. Cells were seeded onto Petri dishes (100 mm; Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) coated with collagen type IV and fibronectin (100 $\mu\text{g/ml}$ each). Cultures were maintained in DMEM/F12 supplemented with 15% plasma-derived bovine serum (First Link, Wolverhampton, UK), insulin-transferrin-sodium selenite mix (Pan Biotech, Aidenbach, Germany), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (Roche, Basel, Switzerland) 100 $\mu\text{g/ml}$ heparin and 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin. For the first 3 days of culture cells were grown in medium with 3 $\mu\text{g/ml}$ puromycin to eliminate P-glycoprotein negative contaminating cell types (Perriere et al., 2005). When endothelial cells reached 90% confluency, they were seeded to E-plate, culture inserts or coverslips coated with collagen type IV and fibronectin. For the permeability and leptin transfer study endothelial cells were seeded to the upper side of culture inserts (12-well format, Transwell clear, polyester membrane, 0.4 μm pore size, 1.12 cm^2 surface, Corning, NY, USA).

Primary rat brain pericytes were isolated by the same protocol as primary rat brain endothelial cells, except that the second enzymatic digestion was shorter (15 min), and no puromycin selection was used. Cells were seeded into uncoated dishes and cultured in DMEM (Gibco, CA, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, CA, USA) and gentamycin. Pericytes were used for the experiments at the third passage.

One-day-old Wistar rats were used for the isolation of primary rat astrocytes. Meninges were removed, and brain tissue was dissociated mechanically by a syringe attached to a long needle. The homogenate was filtered through a nylon mesh (40 μm , Millipore, MA, USA) to collect large, undissociated tissue pieces and blood vessels. Cells from the filtrate were pipetted into uncoated 75 cm^2 flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland) in DMEM containing 10% FBS (Gibco, CA, USA) and gentamycin (50 $\mu\text{g/ml}$). When cells reached 90% confluency, they were passaged for 12-well plates (Corning, NY, USA) at a cell number of 5×10^4 cells/well and cultured for two weeks. Confluent glia cultures contained around 90% astroglia (glial fibrillary acidic protein immunopositive cells) and 10% microglia (CD11b immunopositive cells).

To enhance the BBB properties of the model, primary endothelial cells were cultured together with astrocytes and pericytes (Nakagawa et al., 2009). Rat pericytes were subcultured to the bottom side of the culture membranes precoated with collagen type IV and brain endothelial cells to the upper side, precoated with collagen type IV and fibronectin. Culture inserts were then placed into 12-well plates containing confluent glia cell layers. Both fluid compartments received endothelial culture medium. After two days of co-culture, 550 nM hydrocortisone was added to the medium to tighten the intercellular junctions (Perriere et al., 2005; Nakagawa et al., 2009).

2.3. Treatments of cells

For the impedance-based viability assays RBECs were treated in the following concentration ranges: GSPE 1–50 $\mu\text{g/ml}$, RSV and EC 1–100 μM , and GA 0.3–10 μM . These concentration ranges were selected based on our previous studies using HepG2 human hepatoma cell line (Baselga-Escudero et al., 2014; Aragones et al., 2016b; Rojas et al., 2014). Stock solutions were prepared in ethanol. Treatment solutions were diluted in culture medium. The final concentration of ethanol was below 0.1% in the treatment solutions. We used a combination of two cytokines, TNF- α (10 ng/ml) and IL-1 β (10 ng/ml) to cause damage in the BBB model (Harazin et al., 2018) for all the experiments and assays where indicated. Culture medium was given for the control groups.

2.4. Real-time cell microelectronic sensing

Real-time cell electronic sensing is an impedance-based, label-free technique for dynamic monitoring of living adherent brain endothelial cells (Harazin et al., 2018). The RTCA-SP instrument (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) registers the impedance of cells in every 10 min and for each time point cell index is calculated as $(R_n - R_b)/15$, where R_n is the cell-electrode impedance of the well when it contains cells and R_b is the background impedance of the well with the medium alone. E-plates, special 96-well plates with built in gold electrodes, were coated with collagen type IV and fibronectin for RBECs at room temperature and dried for 20 min under sterile air-flow. For background measurements culture medium (60 μ l) was added to each well, then 50 μ l of RBEC suspension was distributed at a cell density of 5×10^3 cells/well. After cells reached a steady growth phase they were treated with different phenolic compounds and cytokines.

2.5. Total RNA isolation and gene expression analysis

The expression of key genes from the leptin signalling pathway was evaluated. For RNA isolation and to obtain the cDNA, TriFast (PeqLab, VWR International, Vienna, Austria) and Maxima First Strand cDNA Synthesis kit with dsDNase (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), were respectively used according to the manufacturer instructions. Finally, qPCR with iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Barcelona, Spain) was performed to analyse the gene expression of peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*), leptin receptor isoform b (*Ob-Rb*), leptin receptor isoform a (*Ob-Ra*), low density lipoprotein-related protein 2 (*Lrp2* or megalin), clusterin (*Clu*, or ApoJ), suppressor of cytokine signalling 3 (*Socs3*) and protein-tyrosine phosphatase 1B (*Ptp1b*). Table 1 shows the forward and reverse primers for the various genes used in this study. They were obtained from Biomers.net (Ulm, Germany). A cycle threshold (Ct) value was generated by setting the threshold during the geometric phase of the cDNA sample amplification. The fold change in expression of each mRNA was calculated with respect to the Control group using the $\Delta\Delta C_t$ method corrected for the primer efficiency and converted to relative expression ratio with *Ppia* as the reference gene (Plut et al., 2003).

2.6. Protein determination and western blot

Radioimmunoprecipitation assay buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail was used to extract the protein content from RBEC previously treated with phenolic compounds during 24 h. It was quantified by Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain). To perform the western blot, a total of 25 μ g

of protein was solubilized and boiled for 5 min in a loading buffer solution containing 0.5 M Tris HCl pH 6.8, glycerol, SDS, 2-Mercaptoethanol and 1% bromophenol blue. The total protein extracts were separated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the TGX FastCast acrylamide kit, 10% (Bio-Rad, Barcelona, Spain) and electrotransferred onto supported polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes using TransBlot Turbo RTA Transfer kit (Bio-Rad). After blocking, the membranes were incubated overnight in agitation at 4 °C with an antibody specific for detecting Ob-Rb (ab177469, Abcam, Cambridge, UK). The protein levels were detected by the chemiluminescent detection reagent ECL Select western blotting detection reagent (GE Healthcare, Barcelona, Spain) using GeneSys image acquisition software (G-Box series; Syngene, Barcelona, Spain). Finally, protein band quantification was performed using ImageJ (W.S Rasband, NIH, MD, USA). The studied protein levels were normalized respect to β -actin.

2.7. Evaluation of anti-inflammatory properties of the studied phenolic compounds

To determine the capacity of the selected phenolic compounds to revert the inflammation caused by cytokines in RBEC cells an in vitro assay was carried out. RBECs were pretreated with 10 μ M RSV or EC, 1 μ M GA or 10 μ g/ml GSPE for 30 min, then 10 ng/ml TNF- α + 10 ng/ml IL-1 β were added to the cells. The co-treatment with phenolic compounds was maintained during 24 h during which cell viability was continuously monitored by impedance measurement.

2.8. Measurement of barrier integrity and transfer of leptin

Transendothelial electrical resistance (TEER) is a sensitive method to measure the paracellular tightness of BBB culture models (Deli et al., 2005). We used Epithelial-Volt-Ohm meter (EVOM) and STX2 electrodes (World Precision Instruments, USA) to measure TEER, which was expressed relative to the surface area of the monolayers (Ω cm²) after subtraction of TEER in cell free inserts. TEER was measured every day (days 2–4) until brain endothelial cells reached confluency.

Cells were pre-treated with the phenolic compounds (10 μ M RSV, 10 μ M EC, 1 μ M GA or 10 μ g/ml GSPE) for 30 min, then treated with the combination of cytokines (TNF- α + IL-1 β , 10 ng/ml each) for 6 h. For the permeability measurement two marker molecules, fluorescein sodium (MW: 376 Da, 10 μ g/ml) and Evans blue labeled albumin (67 kDa; 1% albumin and 167.5 μ g/ml dye) were added to the upper, luminal compartment of inserts. Cell treatments and the permeability assays were performed in phenol red-free culture medium supplemented with 1% PDS, insulin-transferrin-sodium selenite and 10 mM

Table 1

A summary of the rat-specific primer sequences used for qRT-PCR analysis.

Primer name	Direction	Primer sequences (5'-3')	Primer length (nucleotides)	Tm (°C)	Amplicon length (nucleotides)
<i>Clu</i>	FW	gctctcagcaatcgggtgaa	20	55	153
	RV	atgccattgtcccaggtcag	20	54	
<i>Lrp2</i>	FW	ggagccagtcagtagccaag	20	51	136
	RV	cctgggaggacagccaattt	20	55	
<i>Ob-Ra</i>	FW	cactgttaatttcacaccagag	22	55	235
	RV	gtcattcaaacatagtttagg	22	53	
<i>Ob-Rb</i>	FW	ccagtaccagagccaaagt	20	59	122
	RV	ggatcgggcttcacaacaagc	21	62	
<i>Ppia</i>	FW	cttcgagctgtttgcagacaa	21	53	138
	RV	aagtcaccacctggcacatg	21	57	
<i>Ptp1b</i>	FW	cccttttgaccacagtcgga	20	55	119
	RV	ttggtaaaggccctgggtg	20	58	
<i>Socs3</i>	FW	ctggaccattcgggagttc	20	56	148
	RV	ctgggagctaccgaccattg	20	54	

Abbreviations: *Clu* (Clusterin), *Lrp2* (Low density lipoprotein-related protein 2), *Ob-Ra* (Leptin receptor isoform A), *Ob-Rb* (Leptin receptor isoform B), *Ppia* (Peptidylprolyl isomerase A), *Ptp1b* (Protein-tyrosine phosphatase 1B), *Socs3* (Suppressor of cytokine signalling 3).

HEPES. The inserts were kept for 30 min in the 12-well plates on a horizontal shaker, after that samples were collected from both compartments and the concentrations of the marker molecules were measured by spectrofluorometer (Fluorolog-3, Horiba Scientific, Japan; fluorescein: excitation wavelength 480 nm, emission wavelength 515 nm; Evans blue: excitation wavelength 584 nm, emission wavelength 680 nm). The apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated as described in our earlier studies (Campos-Bedolla et al., 2014; Harazin et al., 2018).

For the leptin transfer experiment RSV (10 μ M) and GSPE (10 μ g/ml) were chosen to be tested either alone or combined with cytokines. In the last 1 h of the experiment, leptin (1 μ g/ml) was added to the upper compartments of the inserts. The plates were kept on a horizontal shaker, after that samples were collected from both compartments and the leptin content of the samples were measured by an ELISA kit (Merck, Germany) according to the manufacturer's protocol.

2.9. Measurement of reactive oxygen species and nitric oxide production

Nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production was measured by fluorescent probes as described earlier (Veszelka et al., 2013; Lénárt et al., 2015). NO was detected by 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM, Molecular Probes, Life Technologies, USA) and ROS was detected by chloromethyl-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFDA, Molecular Probes, Life Technologies, USA). These probes cross the cell membrane by diffusion and then are activated by cytoplasmic esterases. After oxidation of DCFDA or reaction of NO with DAF-FM, fluorescent molecules are produced. The signal is proportional to the produced NO or ROS. Confluent brain endothelial cells were cultured in 96-well black plates with glass bottoms (Corning, NY, USA). Cells were treated the same way as in the permeability measurement for 1 h at 37 °C. Treatments were done in phenol red-free culture medium containing 2 μ M DAF-FM or 2 μ M DCFDA and 1.5 μ M pluronic acid (Molecular Probes, Life Technologies, USA) to help the probes penetrating the cell membrane. As a positive control sodium nitroprusside (60 μ M) was used for the NO production measurement and hydrogen peroxide (100 μ M) for the ROS assay. Fluorescence was detected by Fluostar Optima multiwell plate reader (BMG Labtechnologies, Germany) at 485 nm excitation and

520 nm emission wavelengths at every 5 min for 1 h. Fluorescent values were presented as a percentage of the control group.

2.10. Immunohistochemistry

Cells were grown on culture inserts coated with collagen type IV and fibronectin for junctional protein and leptin receptor immunostaining, or on coated glass coverslips (1 cm², borosilicate, VWR, USA) coated with collagen type I for NF- κ B staining. Cells treated with cytokine and/or phenolic compounds (6 h for junctional proteins and leptin receptor, 1 h for NF- κ B) were fixed and permeabilized with ice-cold acetone-methanol (1:1) for 5 min, washed with PBS, then blocked in 3% BSA-PBS for 1 h at room temperature. Incubation with rabbit anti- β -catenin polyclonal (C2206, Sigma-Aldrich, USA), rabbit anti-claudin-5 polyclonal (SAB4502981, Sigma-Aldrich, USA) or rabbit anti-leptin receptor polyclonal (ab5593, Abcam, UK) primary antibodies lasted overnight at 4 °C, then secondary labeling with anti-rabbit Cy3 (C2306, Sigma-Aldrich, USA) and nucleus stain (H33342, Sigma-Aldrich, USA) was kept on the cells for 1 h at room temperature. Rabbit anti-p65 polyclonal antibody (sc-372, Santa Cruz Biotechnology, USA) was used to stain NF- κ B p65 subunit for overnight, then samples were incubated with anti-rabbit secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488 (A11029, ThermoFisher Scientific, USA) and H33342 dye for 1 h at room temperature. Cells were washed with PBS between the incubations. Samples were mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech, USA). Tight junction protein and leptin receptor stainings were visualized with Leica SP5 confocal laser scanning microscope, NF- κ B staining with a spinning disc confocal microscope (Yokogawa W1/Olympus IX83, Japan). Images were analysed by ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

2.11. Statistical analysis

The data are expressed as the means \pm SEM. Multiple independent groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey, Dunnett or Bonferroni post hoc test when it necessary. Outliers were determined by Grubbs' test. The statistical analyses were performed using XLSTAT 2017: Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel (Addinsoft, Paris, France) and GraphPad Prism 5

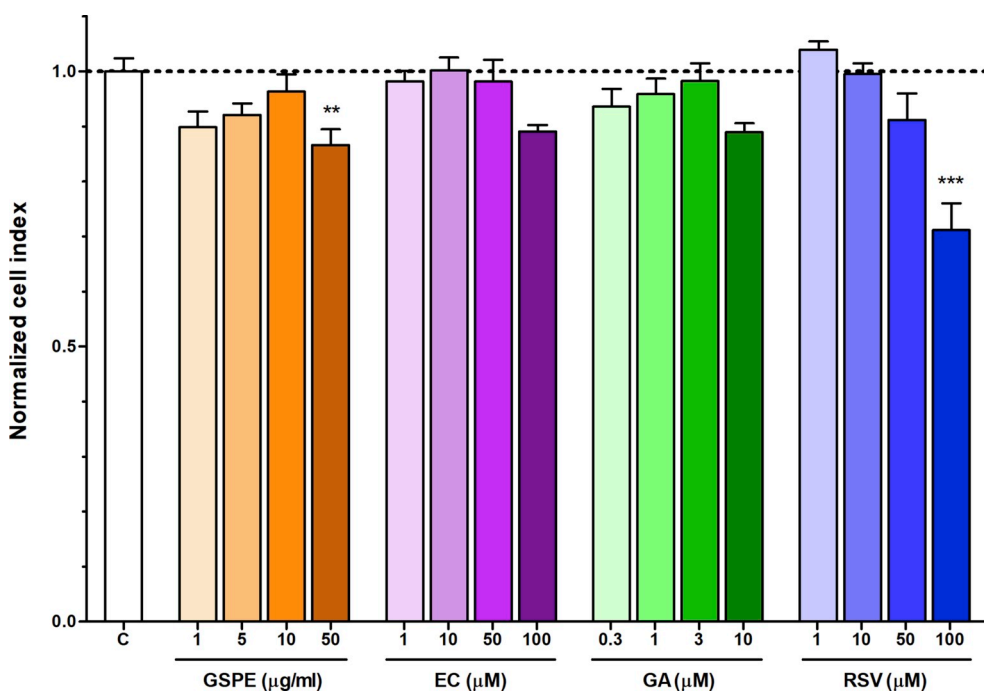


Fig. 1. The effect of different concentrations of grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds on the cell viability of rat brain endothelial cells. Cultured brain endothelial cells were treated for 24 h with grape seed proanthocyanidin-rich extract (GSPE; 1, 5, 10 and 50 μ g/ml), epicatechin (EC; 1, 10, 50 and 100 μ M), gallic acid (GA; 0.3, 1, 3 and 10 μ M) and resveratrol (RSV; 1, 10, 50 and 100 μ M). The control group (C) received culture medium. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, *** P < 0.001, ** P < 0.01; mean \pm SEM, n = 6.

(GraphPad Software, San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of phenolic compounds on brain endothelial cell viability

RBECs were treated with the selected phenolic compounds at different concentrations for 48 h and monitored continuously by impedance (Fig. S1). According to the results showed in Fig. 1 24-h was selected to continue with the studies. GSPE was tested at 1, 5, 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrations, and only the highest concentration produced a decrease in the cell viability (13.5%; $p < 0.01$) compared to the control (Fig. 1). EC also caused a small decrease (11%) in the cell viability of cells treated with the highest concentration with respect to the control (Fig. 1). On the other hand, GA did not significantly change the cell index at any evaluated concentration. The biggest decrease in the brain endothelial cell impedance (29%, $p < 0.01$) was seen at the highest concentration of RSV (100 μM) compared to the other conditions (Fig. 1). At 48-h incubation time-point GSPE at 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration further decreased cell impedance by 26% (Fig. S1). EC and GA, components of GSPE, were not toxic to RBECs at any concentration tested through the period evaluated. RSV, a well-examined polyphenol that is not present in GSPE, showed a concentration and time-dependent effect on cell viability. The two highest concentrations of RSV, 50 and 100 μM , caused a marked reduction (25% and 75% decrease) in the cell index when time increased (Fig. S1), thus reducing the integrity of the cell layer. For further experiments, we selected the following safely applicable concentrations which did not decrease endothelial cell viability: 10 $\mu\text{g/ml}$ for GSPE, 10 μM for RSV or EC, and 1 μM for GA.

3.2. Effect of phenolic compounds on cytokine treated BBB model: cell impedance and barrier integrity

The treatment concentrations of TNF- α and IL-1 β (10 + 10 ng/ml) to induce brain endothelial damage were determined in our previous study (Harazin et al., 2018). Cytokines decreased the cell index of rat brain endothelial cells below 50% at 6 h timepoint (Fig. 2A). GSPE and the grape phenolic compounds which alone had no effect on impedance showed a trend to modify this effect, but did not protect brain endothelial cells against the cytokine-induced viability decrease (Fig. 2A).

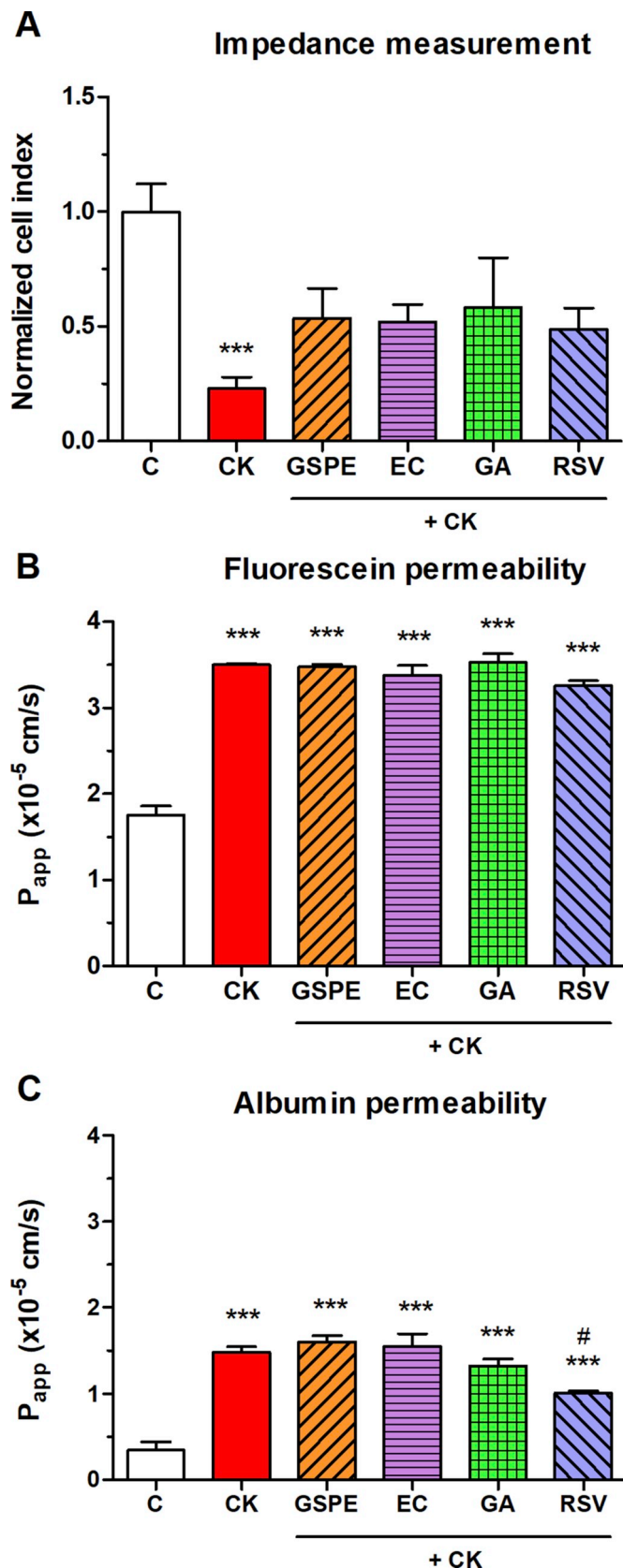
The integrity of the BBB model was tested by the measurement of TEER and permeability coefficients for well-known marker molecules fluorescein ($1.75 \pm 0.11 \times 10^{-5}$ cm/s) and albumin ($0.35 \pm 0.10 \times 10^{-5}$ cm/s). Cytokine treatment significantly decreased TEER (Fig. S2) and increased the permeability of the BBB model for both markers (Fig. 2B and C). No protective effect was seen for GSPE or for the tested molecules (Fig. S2 and Fig. 2B and C), except for 10 μM RSV, which significantly blocked the barrier opening effect of the cytokines for albumin (Fig. 2C).

The tight paracellular barrier formed by brain endothelial cells in the BBB model was visualized by the continuous, belt-like pericellular localization of integral membrane TJ protein claudin-5 and adherens junction protein β -catenin (Fig. 3). As compared to the control group, in the cytokine treated group junctional staining of claudin-5 was weaker and more fragmented at the cell border and cytoplasmic redistribution of β -catenin was observed, while in cells treated with both grape compounds and cytokines the staining pattern of TJ proteins was more similar to the control group (Fig. 3).

3.3. Effect of phenolic compounds on cytokine treated BBB model: nitric oxide and reactive oxygen species production

GSPE and EC showed a strong antioxidant effect on the basal ROS production of brain endothelial cells, which was maintained in the presence of cytokines (Fig. 4A). RSV alone had no effect, while it caused

a decreased generation of ROS in brain endothelial cells when it was given together with cytokines. EC and RSV together with cytokines also reduced the NO production (Fig. 4B). In contrast, GSPE elevated NO



(caption on next page)

Fig. 2. The effect of grape seed proanthocyanidin-rich extract (GSPE) and grape phenolic compounds on cytokine treated blood-brain barrier (BBB) model. A) Rat brain endothelial cells were treated with cytokines TNF- α and IL-1 β (CK) without or with proanthocyanidin-rich extract and phenolic compounds. B) and C) The BBB model was treated with cytokines without and with proanthocyanidin-rich extract and its compounds, then permeability was measured for fluorescein and albumin. The control group (C) received culture medium. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, *** $P < 0.001$, # $P < 0.05$. *: compared to C; #: compared to CK; mean \pm SEM, $n = 4-8$. EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol.

generation in brain endothelial cells both alone and in the presence of cytokines. GA had no effects. Hydrogen peroxide was used as a reference inducer of ROS in the assay (Harazin et al., 2018), while sodium nitroprusside was given to increase NO production, as in our previous study (Lénárt et al., 2015).

3.4. Effect of phenolic compounds on cytokine-induced NF- κ B nuclear translocation in brain endothelial cells

The inflammatory reaction induced by cytokines can be reliably measured by the translocation of the p65 subunit of NF- κ B transcriptional factor from the cell cytoplasm to the nucleus as shown in our previous study (Harazin et al., 2018). The localization of NF- κ B p65 is mostly cytoplasmic in the control group, which changes after treatment with inflammatory cytokines in rat brain endothelial cells (Fig. 5). This NF- κ B nuclear translocation was inhibited by GSPE, GA and RSV, while EC showed no effect.

3.5. The effect of phenolic compounds on leptin receptors in brain endothelial cells

Treatment for 24 h with GSPE, EC and RSV increased the expression of *Ob-Ra* (15-fold, 8-fold, 12-fold, respectively) as compared to the control (Fig. 6A). The relative gene expression of *Ob-Rb* and *Lrp2* was not changed by treatment with phenolic compounds (Fig. 6A). The gene expression of other important components of the leptin pathway, namely *Clu* (Fig. 6A), *Socs3* and *Ptp1B* (Fig. S3), was also unchanged as compared to control group. Cytokine treatment increased the relative gene expression of *Lrp2* (16-fold) in brain endothelial cells, while it had no effect on the other leptin receptors (Fig. 6B). EC, but not the other phenolic compounds tested, decreased this cytokine-induced elevation in *Lrp2* mRNA expression. GSPE when added together with cytokines reduced the gene expression of *Clu*. In contrast, RSV increased the expression of *Ob-Ra* (7-fold) and *Clu* (2-fold) mRNA as compared to the cytokine groups.

In brain endothelial cells the expression of Ob-Rb protein, the longest isoform of leptin receptors which activates the leptin cascade, did not present any significant change compared to control group after treatment with 10 μ g/ml GSPE, 10 μ M EC, 1 μ M GA or 10 μ M RSV for 24 h (Fig. 7 A and B). The presence of leptin receptor isoforms was also confirmed in brain endothelial cells by immunohistochemistry in all treatment groups (Fig. 7 C).

Leptin transfer across the BBB model was unchanged by GSPE and RSV but was increased by cytokines (157%) as compared to the control group ($P_{app} 8.7 \pm 0.1 10^{-6}$ cm/s). This effect of the cytokines on leptin transport was not modified by GSPE or RSV (Fig. 8).

4. Discussion

In the present study we tested four grape-derived extracts or components. GSPE is a complex mixture of different phenolic compounds, which mostly belong to the flavonoids family (Baselga-Escudero et al., 2014). EC is a flavonoid, whereas RSV, a stilbene, and GA, a phenolic acid, are non-flavonoids. GSPE contains EC and GA, but not RSV. The reason to select these four grape components was to get information on the potential BBB protective effects of the two main chemical groups in which phenolic compounds are divided. A further rationale to investigate RSV in our study was that it is the most studied bioactive grape compound with several therapeutic properties, such as anti-inflammatory and anti-oxidant effects (Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2016). RSV has also been investigated in obesity and obesity related pathologies among others by our research group (Akaberi and Hosseinzadeh, 2016; Aragonés et al., 2016a). While several nutrients have been already investigated for their BBB-related effects (Campos-Bedolla et al., 2014), our study is the first to examine GSPE on brain endothelial cells and phenolic compounds on leptin transport using a BBB model.

The tested concentration ranges and incubation times were based on previous experimental data from our groups (Baselga-Escudero et al., 2014; Aragonés et al., 2016a; Rojas et al., 2014; Harazin et al., 2018). The viability of brain endothelial cells was not changed by GSPE or the three grape phenolic compounds except for the highest concentrations of GSPE and RSV (Fig. 1), in agreement with the general safe applicability of these food components.

Chronic systemic inflammation, caused by pro-inflammatory cytokines released from peripheral adipocytes and activated immune cells, is a central component in the pathomechanism of obesity (Marseglia et al., 2014). Circulating proinflammatory cytokines reach and damage the BBB: the morphological and functional changes are well described and include impaired barrier integrity reflected by tight junction changes and increased permeability, oxidative stress and expression

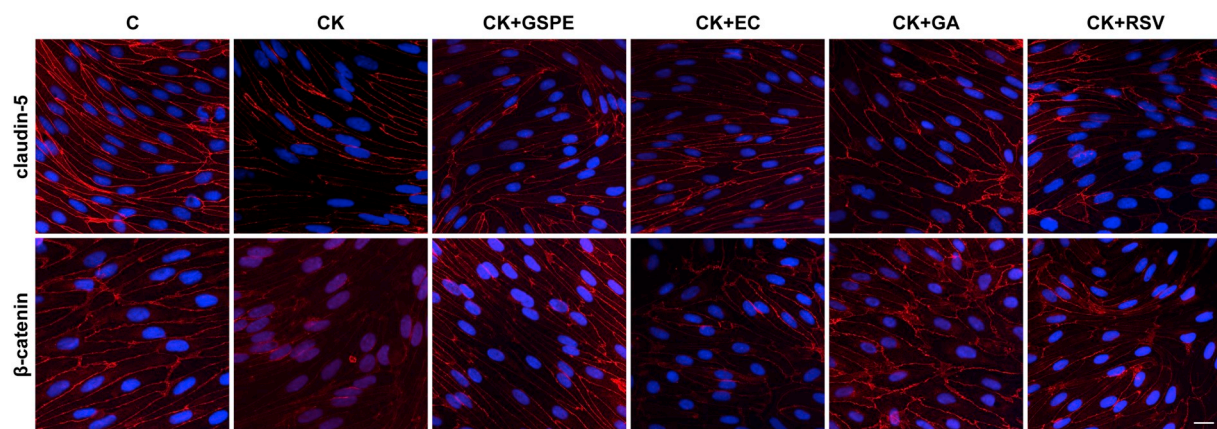


Fig. 3. Rat brain endothelial cells were treated with cytokines without or with grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds and stained for tight junction proteins claudin-5 and β -catenin. The control group received culture medium. Scale bar: 10 μ m. C, control group; CK, cytokine treated group; GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol.

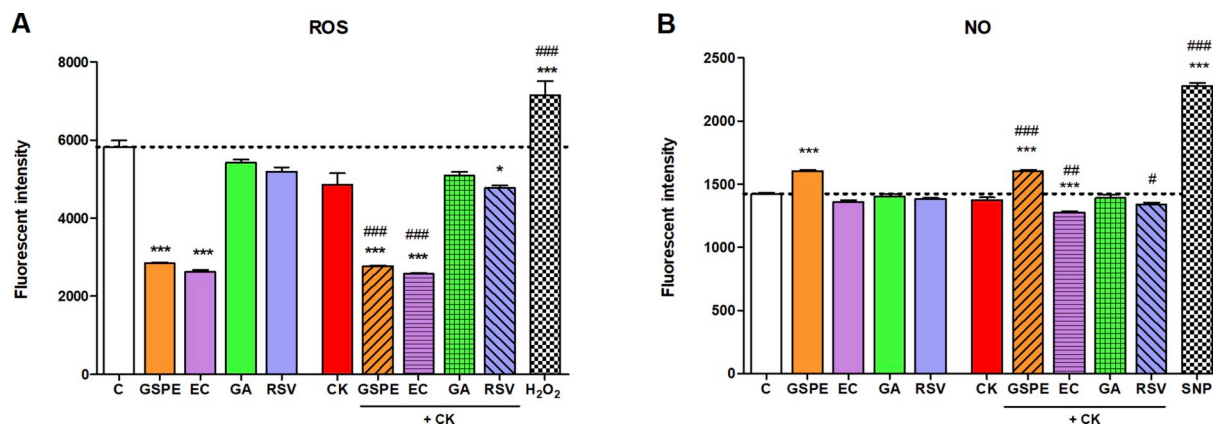


Fig. 4. The effect of grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds on the reactive oxygen species and nitric oxide production in cytokine treated rat brain endothelial cells. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $***P < 0.001$, $###P < 0.001$, $##P < 0.01$, $*P < 0.05$. *: compared to C; #: compared to CK. Mean \pm SEM, n = 8. C, control group; CK, cytokine treated group, GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol; H₂O₂, hydrogen peroxide, SNP, sodium nitroprusside.

changes in BBB-related genes (Deli et al., 2005; Liebner et al., 2018; Harazin et al., 2018; Lopez-Ramirez et al., 2013). The dysfunction and disruption of the BBB caused by systemic inflammation links metabolic syndrome and obesity to the neuropathologies observed in these conditions (Rhea et al., 2017; Van Dyken and Lacoste, 2018). Parallely to the systemic inflammation, obesity increases pro-inflammatory cytokine production in multiple brain regions leading to local inflammatory processes, especially in the hypothalamus (Rhea et al., 2017). There is a bidirectional relationship between neuroinflammation and BBB disruption: both can initiate and/or aggravate the other pathological process (Rhea et al., 2017). To study cellular inflammation, described in obesity and also observed at the level of BBB in this pathology (Rhea et al., 2017; Van Dyken and Lacoste, 2018), we used cytokine-treated culture models of the BBB as a simplified model system.

The relationship between obesity, inflammation and higher plasma leptin levels is well established (Bastard et al., 2006; Marseglia et al., 2014). Brain permeability to leptin is impaired during obesity and the plasma levels of this hormone are elevated compared to non-obese patients (Caro et al., 1996), thus, contributing to leptin resistance in obesity. The two most prominent pro-inflammatory cytokines which directly damage brain endothelial cells are TNF- α and IL-1 β (Deli et al., 2005; Harazin et al., 2018). Therefore, our aim was to test if grape phenolic compounds can protect brain endothelial cells from cytokine-induced changes. The cell viability of brain endothelial cells as well as the barrier integrity of the BBB model were reduced by treatment with TNF- α and IL-1 β , as reflected by the reduced impedance and resistance

values and increased permeability for marker molecules. Similar results on brain endothelial toxicity and barrier integrity damage were obtained in our previous study (Harazin et al., 2018). Although in the viability assay protective trends were seen with the grape compounds (Fig. 2A), only RSV could decrease the cytokine induced barrier damage of brain endothelial cells as reflected in the albumin permeability (Fig. 2C). This observation is in concordance with experimental data showing a BBB protective effect of RSV both in animal studies and in cultures (Clark et al., 2012; Campos-Bedolla et al., 2014; Kaisar et al., 2015). One of the mechanisms by which phenolic compounds/flavonoids exert their beneficial effects in obesity related pathologies including metabolic syndrome or cardiovascular conditions is their antioxidant effects (Diaz-Gerevini et al., 2016; Wiciński et al., 2018). We found that GSPE, EC and RSV decreased ROS production in brain endothelial cells in the presence of cytokines (Fig. 4A) in agreement with literature data (Kaisar et al., 2015; Panickar et al., 2015).

The effect of the tested extract and compounds on brain endothelial NO production was dissimilar: GSPE increased NO levels both alone and in the presence of cytokines, while EC and RSV decreased NO levels when given together with cytokines (Fig. 4B). All three isoforms of nitric oxide synthase (NOS) are expressed in brain endothelial cells and in our BBB culture model (Veszeka et al., 2018). GSPE is an efficient inducer of NO production by the endothelial isoform NOS3 (Fitzpatrick et al., 2002), and can decrease metabolic syndrome related high blood pressure (Pons et al., 2016) and protect against high blood pressure induced cerebral vascular damage by this mechanism (Hao et al.,

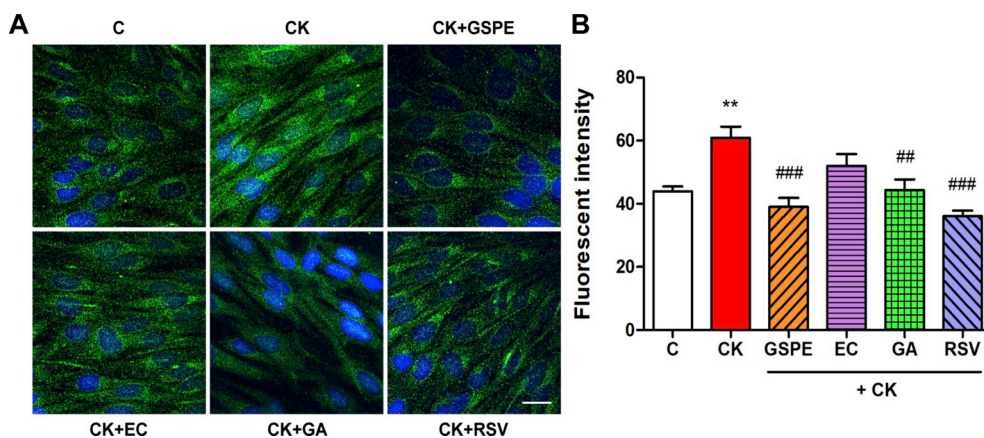


Fig. 5. Immunohistochemical staining and analysis of NF- κ B activation. A) Rat brain endothelial cells were treated with culture medium, cytokines, or cytokines and grape seed proanthocyanidin-rich extract or grape phenolic compounds. Nuclear localization of the NF- κ B p65 subunit was monitored by immunostaining (green). Cell nuclei were labeled with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 10 μ m. B) Fluorescent intensity of the NF- κ B immunostaining in cell nuclei and cytoplasm. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $***P < 0.001$, $###P < 0.001$, $##P < 0.01$, $*P < 0.05$. *: compared to C; #: compared to CK. Mean \pm SEM, n = 8. C, control group; CK, cytokine treated group, GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

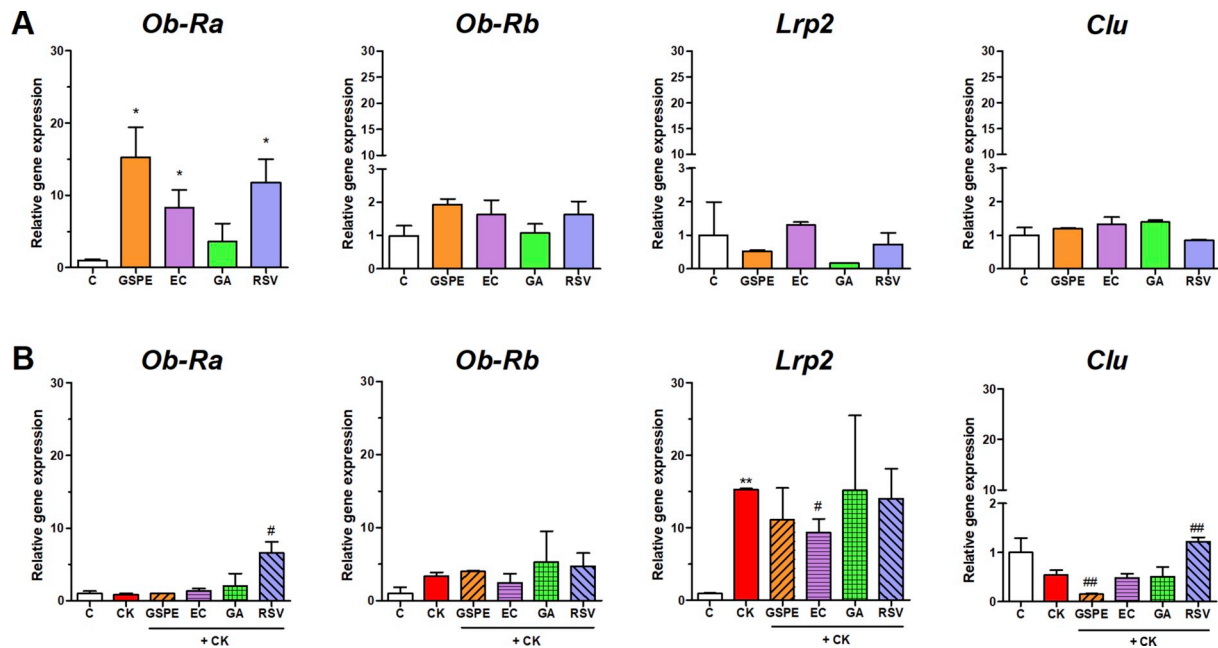


Fig. 6. Relative gene expression of leptin receptors and other components of the leptin cascade in rat brain endothelial cells. Peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*) gene was used as reference. A) Cells were treated with grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds for 24 h. B) Cells were treated with cytokines without and with grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds for 6 h. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Dunnett post-test, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ## $P < 0.05$, # $P < 0.05$. *: compared to C; #: compared to CK. Mean \pm SEM. C, control group; *Ob-Ra*, leptin receptor isoform a; *Ob-Rb*, leptin receptor isoform b; *Lrp2*, low density lipoprotein-related protein 2; *Clu*, clusterin; CK, cytokine treated group, GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol.

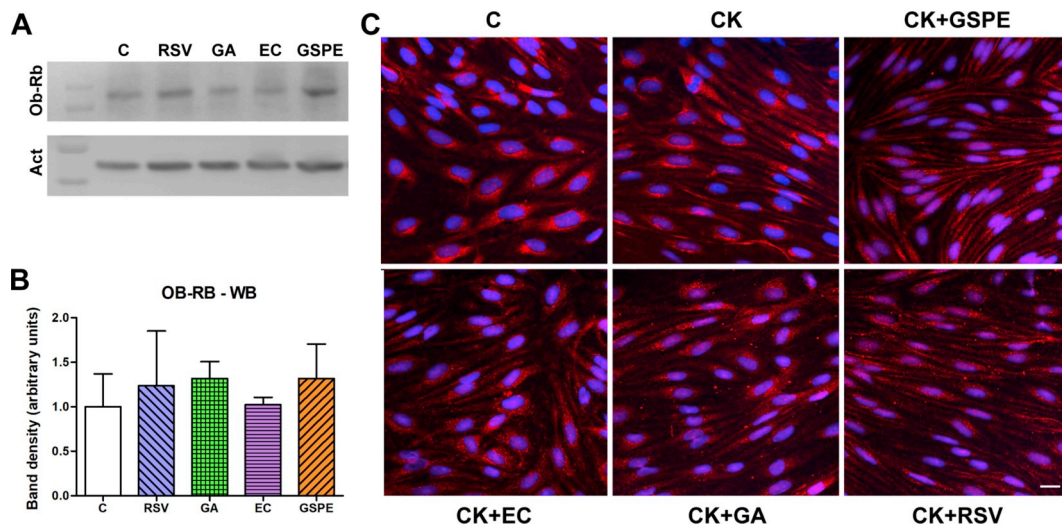


Fig. 7. (A–B) Expression of leptin receptor b (*Ob-Rb*) protein in rat brain endothelial cells. Cells were treated with grape seed proanthocyanidin-rich extract and phenolic compounds for 24 h. A) Representative image of the western blot. B) Quantification of the western blot image. C) Immunohistochemical staining of leptin receptor isoforms (red) in brain endothelial cells treated with cytokines without or with grape seed proanthocyanidin-rich extract and phenolic compounds for 6 h. Cell nuclei were labeled with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 10 μ m. Mean \pm SEM. C, control group; CK, cytokine treated group, GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2018). In contrast, RSV inhibited the inducible isoform NOS2 and restored the altered cerebrovascular response in diabetic rats (Arrick et al., 2011), while EC also exerted its beneficial effect on oxidative stress caused endothelial dysfunction by the inhibition of NOS2 (Steffen et al., 2007). We hypothesize that the different action of GSPE, RSV and EC on different NOS isoforms may explain the observed changes in brain endothelial cells. The pro-inflammatory effects of cytokines are triggered by the nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B, which contributed to barrier damage in our BBB model (Harazin et al., 2018). This cytokine-induced nuclear translocation was blocked by

GSPE, GA and RSV (Fig. 5). Similar effects were observed in cytokine treated endothelial cells or in inflammatory conditions for GSPE (Sen and Bagchi, 2001), GA (Del Bo et al., 2016) and RSV (Diaz-Gerevini et al., 2016).

The tested compounds did not change either the mRNA expression (Fig. 6) or protein levels (Fig. 7) of the long leptin receptor isoform, *Ob-Rb*, which is implicated in the leptin signalling pathway (Lee et al., 1996). The results obtained on *Ob-Ra*, described as the most important receptor isoform implicated in the leptin transfer across brain endothelial cells (Tartaglia, 1997), were remarkable. The gene expression

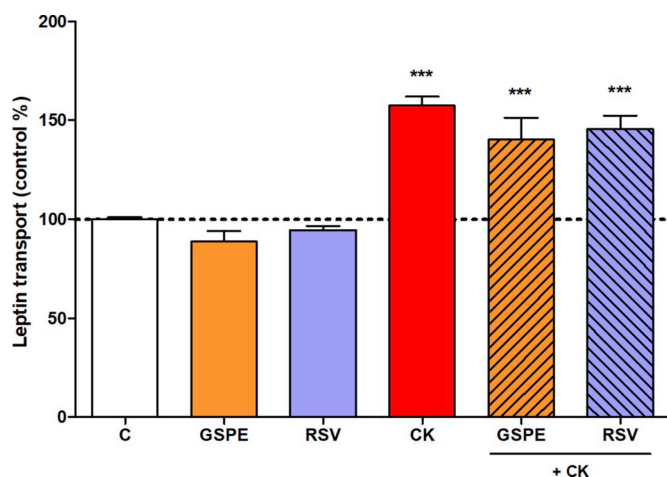


Fig. 8. The transfer of leptin across the blood-brain barrier model treated with cytokines without or with grape seed proanthocyanidin-rich extract (GSPE) and resveratrol (RSV) for 6 h. Mean \pm SEM, $n = 4$. C, control group; CK, cytokine treated group.

of the short leptin receptor isoform, *Ob-Ra*, was up-regulated by GSPE, EC and RSV, while the mRNA levels of *Lrp2* and *Clu/ApoJ* were not affected (Fig. 6A). Based on the gene expression results GSPE, EC and RSV may potentially help the transfer of leptin to the brain. Our results are novelty because recent investigations are focused on designing leptin analogues or Ob-R agonists to selectively improve leptin transport across the BBB without disturbing the integrity of the barrier (Roujeau et al., 2014). In this sense, GSPE had a more important impact on the overexpression of *Ob-Ra* pointing to a synergistic effect of the phenolic compounds when tested as a complex mixture. The exact content of each phenolic compound in the tested 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE was 1.16 μM (0.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for EC, 0.89 μM (0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for GA and 0 μM for RSV (Baselga-Escudero et al., 2014) indicating a synergistic action of EC in low amount with other compounds present in the extract. The third receptor implicated in the leptin action in the brain is the LRP2 (Byun et al., 2014; Gil et al., 2013). The results were similar to those obtained for *Ob-Rb*, demonstrating that the compounds do not modulate the *Lrp2* expression in brain endothelial cells.

Cytokines increased the mRNA expression of *Lrp2*, but not the other leptin transporters (Fig. 6). Although there are no data on the direct effect of cytokines on brain endothelial leptin receptors, the central role of endothelial LRP2 in obesity is established. Mice with endothelial-specific megalin deficiency develop obesity, show disrupted leptin signalling and neuroinflammation (Bartolome et al., 2017). From the tested compounds, two could modify the expression of leptin receptors in the presence of cytokines: the increased *Lrp2* expression was partially blocked by EC, while RSV increased *Ob-Ra* and *Clu*. In addition, cytokines elevated leptin transfer across the BBB model, which was not modified by the tested GSPE or RSV (Fig. 8). An active and endocytosis-dependent transport for leptin was demonstrated on a human culture model of the BBB (Gonzalez-Carter et al., 2016). In this work the major role of LRP2 in leptin transfer across the BBB was suggested.

To summarize the individual effects of the phenolic compounds of GSPE on brain endothelial cells we can state that GA, which was used in the same concentration as found in the GSPE treatment solution, did not reproduce GSPE's ROS reducing, NO increasing, *Ob-Ra* mRNA upregulating effects, or in the presence of cytokines the downregulation of *Clu* gene activity. GSPE and GA, but not EC decreased cytokine-induced NF- κB translocation in endothelial cells. As we observed in the case of GA, EC did not elevate NO production or modified *Clu* expression. In contrast to GA, EC reduced ROS production and upregulated *Ob-Ra* mRNA expression indicating that EC may contribute to GSPE's effects. GSPE and GA did not modify the cytokine-induced *Lrp2* mRNA expression,

but EC, used in a concentration 10 times higher than in the GSPE treatment solution, could reduce this effect of the cytokines.

There are three points of entry for leptin in the brain: (i) the endothelial cells of the BBB (Banks et al., 1996), (ii) the epithelial cells of the choroid plexus that form the blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier (Zlokovic et al., 2000) and (iii) the mediobasal hypothalamus surrounded by tanycytes which form a barrier between the median eminence and CSF by tight junctions (Balland et al., 2014). Ob-Rb is expressed in epithelial and brain endothelial cells as well as in tanycytes (Bjorbaek et al., 1998a; Boado et al., 1998; Hileman et al., 2000; Pan et al., 2008; Balland et al., 2014) whereas LRP2 is an alternative transporter at the BBB (Dietrich et al., 2014; Bartolome et al., 2017). However, brain endothelial and choroid plexus epithelial cells highly express Ob-Ra compared with Ob-Rb (Bjorbaek et al., 1998a). In addition, the K_m of the leptin transport at the BBB is about 1 nM (Banks et al., 2000), due to its good affinity to both Ob-Ra and Ob-Rb (Fong et al., 1998). However, in the case of LRP2, leptin presents a lower affinity and a dissociation constant of 200 nM (Hama et al., 2004), suggesting that Ob-R are most important binding sites for leptin. In the case of the expression of additional molecules which are involved in the leptin signalling pathway, *clusterin* (Byun et al., 2014), *Socs3* (Hama et al., 2004; Bjorbaek et al., 1998b) and *Ptp1b* (Zabolotny et al., 2002), we could not observe any change when cells were treated with polyphenols as compared to the control (Fig. S3). Our results that brain endothelial cells express higher *Ob-Ra* than *Ob-Rb* and *Lrp2* levels are in agreement with literature data (Bjorbaek et al., 1998a). Although our present data are in concordance with previous *in vivo* results from our groups and data from the literature, it is a limitation of the study that we used culture models of the BBB for the investigation.

We demonstrated that natural grape compounds protect cultured vascular endothelial cells against cytokine-induced inflammatory and oxidative damage via the NF- κB pathway. These data corroborate the ethnopharmacological use of grape preparations, among others the Ayurvedic Darakhasava, in heart and vascular diseases (Paul et al., 1999; Darshan and Doreswamy, 2004). Clinical studies also prove the efficacy of individual grape phenolic compounds, like RSV, and grape extracts, like GSPE, to improve cardiovascular health (Weseler and Bast, 2017). The beneficial effect of GSPE on cardiovascular parameters were also described in obese diabetic patients (Kar et al., 2009) and in another clinical study both RSV and GSPE decreased oxidative stress in obese subjects (De Groot et al., 2012). Grape compounds may have additional beneficial effects in obesity as demonstrated by both *in vivo* and clinical studies. GSPE inhibited body weight gain in aged rats by limiting food intake and increasing energy expenditure (Serrano et al., 2017) and also reduced energy intake in healthy volunteers (Vogel et al., 2004). Our data on leptin transporters are consistent with these observations and suggest that the effects of phenolic grape compounds at the level of BBB may be beneficial in obese conditions.

As a conclusion, our results obtained on cell culture models confirm that natural grape compounds have a protective – antioxidant and anti-inflammatory – effect on vascular endothelial cells in accordance with the traditional use of ethnobotanical grape preparations and clinical studies with bioactive grape extracts in cardiovascular diseases. Furthermore, grape compounds and GSPE, by exerting a beneficial effect on the BBB, may also be considered in the treatment of obesity after validation in clinical trials. Two grape phenolic compounds, namely EC and RSV, and the seed extract GSPE increased the gene expression of *Ob-Ra*, the main leptin transporter from blood to the brain across the BBB, in cultured brain endothelial cells. We also observed that natural grape compounds partially reverted the cytokine-induced inflammation process, which is associated with obesity. Therefore, our experiments performed on cell culture models shed light about the mechanisms by which grape phenolic compounds are involved in interacting with leptin transport, and consequently, highlight their potential to be used as possible ingredients in functional food.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2013-49500-EXP, AGL2016-77105-R and FPU14/01202). We are grateful to Marina Colom-Pellicer for her technical support. F.R.W. was supported by the János Bolyai Research Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences and by the National Research, Development and Innovation Office, Hungary (PD-128480).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112253>.

References

- Akaberli, M., Hosseinzadeh, H., 2016. Grapes (*Vitis vinifera*) as a potential candidate for the therapy of the metabolic syndrome. *Phytother Res.* 30, 540–556. <https://doi.org/10.1002/ptr.5570>.
- Andreoli, M.F., Donato, J., Cakir, I., Perello, M., 2019. Leptin resensitization: a reversion of leptin resistant states. *J. Endocrinol pii: JOE-18-0606.R1*. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0606>.
- Aragónes, G., Ardid-Ruiz, A., Ibars, M., Suárez, M., Bladé, C., 2016a. Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1789–1803. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500964>.
- Aragónes, G., Suárez, M., Ardid-Ruiz, A., Vinaixa, M., Rodríguez, M.A., Correig, X., Arola, L., Bladé, C., 2016b. Dietary proanthocyanidins boost hepatic NAD(+) metabolism and SIRT1 expression and activity in a dose-dependent manner in healthy rats. *Sci. Rep.* 6, 24977. <https://doi.org/10.1038/srep24977>.
- Arrick, D.M., Sun, H., Patel, K.P., Mayhan, W.G., 2011. Chronic resveratrol treatment restores vascular responsiveness of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H696–H703. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00312.2011>.
- Bakhtiyari, E., Ahmadian-Attari, M.M., Salehi, P., Khallaghi, B., Dargahi, L., Mohamed, Z., Kamalinejad, M., Ahmadiani, A., 2017. Non-polyphenolic compounds of a specific kind of dried grape (Maviz) inhibit memory impairments induced by beta-amyloid peptide. *Nutr. Neurosci.* 20, 469–477. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1183986>.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S.G., Prévot, V., 2014. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metabol.* 19, 293–301.
- Banks, W.A., Clever, C.M., Farrell, C.L., 2000. Partial saturation and regional variation in the blood-to-brain transport of leptin in normal weight mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E1158–E1165.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305–311.
- Bartolome, F., Antequera, D., Tavares, E., Pascual, C., Maldonado, R., Camins, A., Carro, E., 2017. Obesity and neuroinflammatory phenotype in mice lacking endothelial megalin. *J. Neuroinflammation* 14, 26.
- Baselga-Escudero, L., Blade, C., Ribas-Latre, A., Casanova, E., Suárez, M., Torres, J.L., Salvadó, M.J., Arola, L., Arola-Arnal, A., 2014. Resveratrol and EGCG bind directly and distinctively to miR-33a and miR-122 and modulate divergently their levels in hepatic cells. *Nucleic Acids Res.* 42, 882–892.
- Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., Feve, B., 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17, 4–12.
- Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman, A.E., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane, R., Zlokovic, B.V., 2007. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 909–918.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., van Bueren, A., McCall, A.L., Flier, J.S., 1998a. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139, 3485–3491.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., Flier, J.S., 1998b. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1, 619–625.
- Bjørbaek, C., Lavery, H.J., Bates, S.H., Olson, R.K., Davis, S.M., Flier, J.S., Myers Jr., M.G., 2000. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via tyr 985. *J. Biol. Chem.* 275, 40649–40657.
- Boado, R.J., Golden, P.L., Levin, N., Pardridge, W.M., 1998. Up-regulation of blood-brain barrier short-form leptin receptor gene products in rats fed a high fat diet. *J. Neurochem.* 71, 1761–1764.
- Bulló, M., Garcia-Lorda, P., Megias, I., Salas-Salvado, J., 2003. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes. Res.* 11, 525–531.
- Byun, K., Gil, S.Y., Namkoong, C., Youn, B.S., Huang, H., Shin, M.S., Kang, G.M., Kim, H.K., Lee, B., Kim, Y.B., Kim, M.S., 2014. Clusterin/ApoJ enhances central leptin signaling through Lrp2-mediated endocytosis. *EMBO Rep.* 15, 801–808. <https://doi.org/10.15252/embr.201338317>.
- Campos-Bedolla, P., Walter, F.R., Veszelka, S., Deli, M.A., 2014. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch. Med. Res.* 45, 610–638. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.018>.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., Considine, R.V., 1996. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159–161.
- Clark, D., Tuor, U.I., Thompson, R., Institoris, A., Kulynych, A., Zhang, X., Kinniburgh, D.W., Bari, F., Busija, D.W., Barber, P.A., 2012. Protection against recurrent stroke with resveratrol: endothelial protection. *PLoS One* 7, e47792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047792>.
- da Costa, G.F., Santos, I.B., de Bem, G.F., Cordeiro, V.S.C., da Costa, C.A., de Carvalho, L.C.R.M., Ognibene, D.T., Resende, A.C., de Moura, R.S., 2017. The beneficial effect of anthocyanidin-rich *Vitis vinifera* L. Grape skin extract on metabolic changes induced by high-fat diet in mice involves antiinflammatory and antioxidant actions. *Phytother Res.* 31, 1621–1632. <https://doi.org/10.1002/ptr.5898>.
- Darshan, S., Doreswamy, R., 2004. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother Res.* 18, 343–357.
- de Git, K.C., Adan, R.A., 2015. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes. Rev.* 16, 207–224. <https://doi.org/10.1111/obr.12243>.
- De Groote, D., Van Belleghem, K., Devière, J., Van Brussel, W., Mukaneza, A., Amininejad, L., 2012. Effect of the intake of resveratrol, resveratrol phosphate, and catechin-rich grape seed extract on markers of oxidative stress and gene expression in adult obese subjects. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 15–24. <https://doi.org/10.1159/000338634>.
- Del Rio, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants Redox Signal.* 18, 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.
- Del Bo, C., Roursgaard, M., Porrini, M., Loft, S., Møller, P., Riso, P., 2016. Different effects of anthocyanins and phenolic acids from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) on monocytes adhesion to endothelial cells in a TNF- α stimulated proinflammatory environment. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 2355–2366. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600178>.
- Deli, M.A., Abrahám, C.S., Kataoka, Y., Niwa, M., 2005. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 59–127.
- Diaz-Gerevini, G.T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M.C., Das, U.N., Eynard, A.R., 2016. Beneficial action of resveratrol: how and why? *Nutrition* 32, 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.08.017>.
- Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yébenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., Carro, E., 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol. Aging* 29, 902–912.
- Dietrich, M., Antequera, D., Pascual, C., Castro, N., Bolos, M., Carro, E., 2014. Alzheimer's disease-like impaired cognition in endothelial-specific megalin null mice. *J. Alzheimer's Dis.* 39, 711–717. <https://doi.org/10.3233/JAD-131604>.
- Erickson, M.A., Banks, W.A., 2018. Neuroimmune axes of the blood-brain barriers and blood-brain interfaces: bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions. *Pharmacol. Rev.* 70, 278–314. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014647>.
- Faridi, P., Moatamedi, M., Zarshenas, M.M., Abolhassanzadeh, Z., Mohagheghzadeh, A., 2015. Natural remedies in the Canon of Medicine for dentistry and oral biology. *Trends Pharmacol. Sci.* 1, 4–9.
- Fong, T.M., Huang, R.R., Tota, M.R., Mao, C., Smith, T., Varnerin, J., Karpitskiy, V.V., Krause, J.E., Van der Ploeg, L.H., 1998. Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol. Pharmacol.* 53, 234–240.
- Fitzpatrick, D.F., Bing, B., Maggi, D.A., Fleming, R.C., O'Malley, R.M., 2002. Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 78–89.
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsovala, V., 2014. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients* 6, 391–415. <https://doi.org/10.3390/nu6010391>.
- Gil, S.Y., Youn, B.S., Byun, K., Huang, H., Namkoong, C., Jang, P.G., Lee, J.Y., Jo, Y.H., Kang, G.M., Kim, H.K., Shin, M.S., Pietrzik, C.U., Lee, B., Kim, Y.B., Kim, M.S., 2013. Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway. *Nat. Commun.* 4, 1862–1869. <https://doi.org/10.1038/ncomms2896>.
- Gonzalez-Carter, D., Goode, A.E., Fiammengo, R., Dunlop, I.E., Dexter, D.T., Porter, A.E., 2016. Inhibition of leptin-ObR interaction does not prevent leptin translocation across a human blood-brain barrier model. *J. Neuroendocrinol.* 28. <https://doi.org/10.1111/jne.12392>.
- Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., Fenart, L., 2009. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an *in vitro* model. *Brain Res.* 1249, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.036>.
- Hama, H., Saito, A., Takeda, T., Tanuma, A., Xie, Y., Sato, K., Kazama, J.J., Gejyo, F., 2004. Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. *Endocrinology* 145, 3935–3940.
- Hao, J.P., Shi, H., Zhang, J., Zhang, C.M., Feng, Y.M., Qie, L.Y., Dong, M., Ji, X., 2018. Role of GSPE in improving early cerebral vascular damage by inhibition of Profilin-1 expression in a ouabain-induced hypertension model. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 6999–7012. <https://doi.org/10.26355/eurrev.201810.16171>.
- Harazin, A., Bocsik, A., Barna, L., Kincses, A., Váradi, J., Fenyvesi, F., Tubak, V., Deli, M.A., Vecsernyés, M., 2018. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ* 6, e4774. <https://doi.org/10.7717/peerj.4774>.
- Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Banks, W.A., Flier, J.S., 2002. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143, 775–783.
- Hileman, S.M., Tornøe, J., Flier, J.S., Bjørbaek, C., 2000. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform Ob-Ra in Madin-Darby Canine Kidney cells.

- Endocrinology 141, 1955–1961.
- Ibars, M., Ardid-Ruiz, A., Suárez, M., Muguerza, B., Bladé, C., Aragónes, G., 2017. Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *Int. J. Obes.* 41, 129–136. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.169>.
- Inoue, M., Craker, L.E., 2014. Medicinal and aromatic plants—uses and functions. *Horticulture: Plants for People and Places* 2, 645–669.
- Kaisar, M.A., Prasad, S., Cucullo, L., 2015. Protecting the BBB endothelium against cigarette smoke-induced oxidative stress using popular antioxidants: are they really beneficial? *Brain Res.* 1627, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.018>.
- Kamrani Rad, S.Z., Javadi, B., Hayes, A.W., Karim, I.G., 2019. Potential angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from Iranian traditional plants described by Avicenna's canon of medicine. *Avicenna J. Phytomed.* 9, 291–309.
- Kar, P., Laight, D., Rooprai, H.K., Shaw, K.M., Cummings, M., 2009. Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet. Med.* 26, 526–531. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02727.x>.
- Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., Friedman, J.M., 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in mice. *Nature* 379, 632–635.
- Lénárt, N., Walter, F.R., Bocsik, A., Sántha, P., Tóth, M.E., Harazin, A., Tóth, A.E., Vizler, C., Török, Z., Pilbat, A.M., Vígh, L., Puskás, L.G., Sántha, M., Deli, M.A., 2015. Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS* 12, 17. <https://doi.org/10.1186/s12987-015-0013-y>.
- Liebner, S., Dijkhuizen, R.M., Reiss, Y., Plate, K.H., Agalliu, D., Constantin, G., 2018. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 135, 311–336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>.
- Lopez-Ramirez, M.A., Male, D.K., Wang, C., Sharrack, B., Wu, D., Romero, I.A., 2013. Cytokine-induced changes in the gene expression profile of a human cerebral microvascular endothelial cell-line, hCMEC/D3. *Fluids Barriers CNS* 10, 27. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-27>.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., Arrigo, T., 2014. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 378–400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>.
- Nakagawa, S., Deli, M.A., 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, 253–263.
- Nassiri-Asl, M., Hosseinzadeh, H., 2016. Review of the pharmacological effects of Vitis vinifera (grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytother. Res.* 30, 1392–1403. <https://doi.org/10.1002/ptr.5644>.
- Pan, W., Hsueh, H., He, Y., Sakharkar, A., Cain, C., Yu, C., Kastin, A.J., 2008. Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. *Endocrinology* 149, 2798–2806.
- Panickar, K.S., Qin, B., Anderson, R.A., 2015. Ischemia-induced endothelial cell swelling and mitochondrial dysfunction are attenuated by cinnamtannin D1, green tea extract, and resveratrol in vitro. *Nutr. Neurosci.* 18, 297–306. <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000127>.
- Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., Charpentier, C., 1999. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine from India. *J. Ethnopharmacol.* 68, 71–76.
- Perrière, N., Demeuse, P., Garcia, E., Regina, A., Debray, M., Andreux, J.P., Couvreur, P., Scherrmann, J.M., Tamsamani, J., Couraud, P.O., Deli, M.A., Roux, F., 2005. Pyromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.* 93, 279–289.
- Plut, C., Ribière, C., Giudicelli, Y., Dausse, J.P., 2003. Hypothalamic leptin receptor and signaling molecule expressions in cafeteria diet-fed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 544–549.
- Pons, Z., Margalef, M., Bravo, F.I., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., 2016. Acute administration of single oral dose of grape seed polyphenols restores blood pressure in a rat model of metabolic syndrome: role of nitric oxide and prostacyclin. *Eur. J. Nutr.* 55, 749–758. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0895-0>.
- Rhea, E.M., Salameh, T.S., Logsdon, A.F., Hanson, A.J., Erickson, M.A., Banks, W.A., 2017. Blood-brain barriers in obesity. *AAPS J.* 19, 921–930. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0079-3>.
- Rojas, C., Pan-Castillo, B., Valls, C., Pujadas, G., Garcia-Vallve, S., Arola, L., Mulero, M.R., 2014. Resveratrol enhances palmitate-induced ER stress and apoptosis in cancer cells. *PLoS One* 9, e113929.
- Roujeau, C., Jockers, R., Dam, J., 2014. New pharmacological perspectives for the leptin receptor in the treatment of obesity. *Front. Endocrinol.* 5, 167.
- Sen, C.K., Bagchi, D., 2001. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol. Cell. Biochem.* 216, 1–7.
- Serrano, J., Casanova-Martí, À., Gual, A., Pérez-Vendrell, A.M., Blay, M.T., Terra, X., Ardévol, A., Pinet, M., 2017. A specific dose of grape seed-derived proanthocyanidins to inhibit body weight gain limits food intake and increases energy expenditure in rats. *Eur. J. Nutr.* 56, 1629–1636. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1209-x>.
- Steffen, Y., Jung, T., Klotz, L.O., Schewe, T., Grune, T., Sies, H., 2007. Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 955–970.
- Sweeney, M.D., Kisler, K., Montagne, A., Toga, A.W., Zlokovic, B.V., 2018 Oct. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* 21 (10), 1318–1331. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0234-x>.
- Tartaglia, L.A., 1997. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 6093–6096.
- Upadhyay, J., Farr, O., Perakakis, N., Ghaly, W., Mantzoros, C., 2018. Obesity as a disease. *Med. Clin. N. Am.* 102, 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.004>.
- Van Dyken, P., Lacoste, B., 2018. Impact of metabolic syndrome on neuroinflammation and the blood-brain barrier. *Front. Neurosci.* 12, 930. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00930>.
- Veszelka, S., Tóth, A.E., Walter, F.R., Datki, Z., Mózes, E., Fülöp, L., Bozsó, Z., Hellinger, E., Vastag, M., Orsolits, B., Környei, Z., Penke, B., Deli, M.A., 2013. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J. Alzheimer's Dis.* 36, 487–501. <https://doi.org/10.3233/JAD-120163>.
- Veszelka, S., Tóth, A., Walter, F.R., Tóth, A.E., Gróf, I., Mészáros, M., Bocsik, A., Hellinger, É., Vastag, M., Rákhely, G., Deli, M.A., 2018. Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: gene expression and drug transport. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 166. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00166>.
- Vitaflavan manufacturing process URL. <https://www.vitaflavan.com/manufacturing>, Accessed date: 12 August 2019.
- Vogels, N., Nijs, I.M., Westerterp-Plantenga, M.S., 2004. The effect of grape-seed extract on 24 h energy intake in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 667–673.
- Weseler, A.R., Bast, A., 2017. Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits. *Nutr. J.* 16, 5. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0218-1>.
- Wiciński, M., Socha, M., Walczak, M., Wódkiewicz, E., Malinowski, B., Rewerski, S., Górski, K., Pawlak-Osińska, K., 2018. Beneficial effects of resveratrol administration-focus on potential biochemical mechanisms in cardiovascular conditions. *Nutrients* 10 pii: E1813. <https://doi.org/10.3390/nu10111813>.
- Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Elmquist, J.K., Tartaglia, L.A., Kahn, B.B., Neel, B.G., 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* 2, 489–495.
- Zlokovic, B.V., Jovanovic, S., Miao, W., Samara, S., Verma, S., Farrell, C.L., 2000. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141, 1434–1441.

Supplementary material

The effects of grape seed proanthocyanidin rich extract and grape phenolic compounds on a blood-brain barrier culture model: expression of leptin receptors and protection against cytokine induced damage

Andrea Ardid-Ruiz, András Harazin, Lilla Barna, Fruzsina R. Walter, Cinta Bladé, Manuel Suárez, Maria A. Deli and Gerard Aragonès

Table S1. Identified phenolic compounds and derivatives from grape seed proanthocyanidin-rich extract (GSPE) determined by reversed-phase HPLC-MS/MS (Baselga-Escudero et al., 2014)

Phenolic compound	mg compound/g GSPE extract
GA	15.1 ± 3.5
Vanillic acid	0.2 ± 0.05
Procyanidin dimer	82.2 ± 13.1
Dimer B2	30.8 ± 8.3
Catechin	51.8 ± 14.9
EC	33.6 ± 12.7
Gallate dimer	23.9 ± 7.4
Epigallocatechin gallate	0.1 ± 0.0
Trimer C1	4.4 ± 1.0
EC gallate	10.3 ± 5.5
Quercetin	0.2 ± 0.0
RSV	0.0 ± 0.0

Abbreviations: EC ((-)-Epicatechin), GA (Gallic acid), RSV (Resveratrol).

Fig. S1. The effect of different concentrations of grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds on the cell viability of rat brain endothelial cells. Cells were treated for 48 h with A) grape seed proanthocyanidin-rich extract, B) epicatechin, C) gallic acid and D) resveratrol. Mean \pm SEM, n=6. EC, GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol.

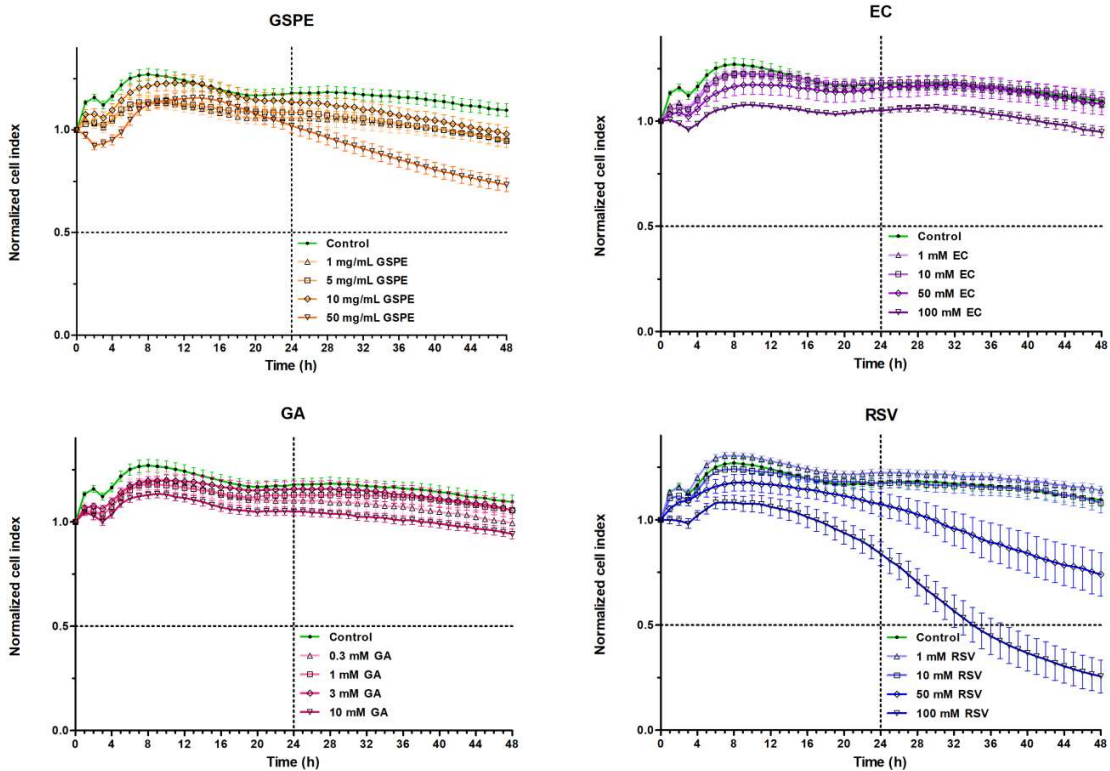


Fig. S2. The effect of grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds on the electrical resistance of cytokine treated *in vitro* rat blood-brain barrier model. Brain endothelial cells co-cultured with pericytes and astrocytes on culture inserts were treated with cytokines without and with grape seed proanthocyanidin-rich extract and grape phenolic compounds for 6 h. The control group (C) received culture medium. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Dunnett post-test, $**P < 0.01$, compared to C; mean \pm SEM, n=4-8. GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol.

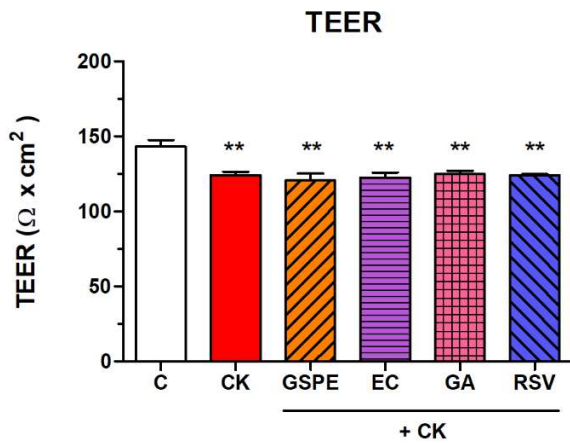


Fig. S3. Relative gene expression of components of the leptin cascade in rat brain endothelial cells. After treatment total RNA was extracted, reverse transcription and qPCR were performed for the selected genes. Peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*) gene was used as reference. Cells were treated with grape seed proanthocyanidin-rich extract and phenolic compounds for 24 h. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Dunnett post-test, mean \pm SEM. C, control group; *Socs3*, suppressor of cytokine signalling 3; *Ptp1b*, protein tyrosine phosphatase 1b; CK, cytokine treated group, GSPE, grape seed proanthocyanidin-rich extract; EC, epicatechin; GA, gallic acid; RSV, resveratrol.

