

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Barna Lilla

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

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet
Biológiai Barrierék Kutatócsoport

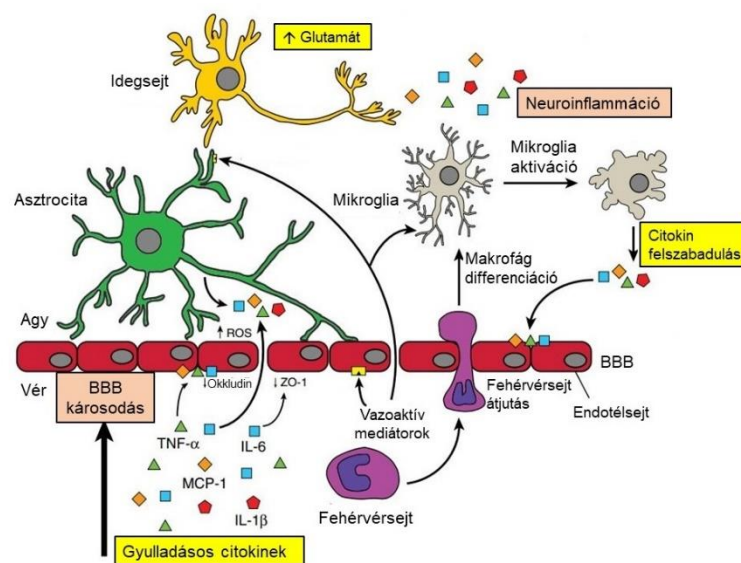


Szeged

2023

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

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 gyulladásos folyamatok, amelyek befolyásolják a barrierek működését is. A vér-agy gát elsődleges károsodását okozhatja trauma, gyulladás, fertőzés, és kialakulhat agyvérzés, agyi iszkémia, vagy epilepszia hatására is. Ezekben a folyamatokban a citokinek és a glutamát kiemelt szerepet játszanak (1. ábra).



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

A szérumban lévő fehérjék a károsodott vér-agy gáton keresztül bejutnak a központi idegrendszerbe, és aktiválják az asztrocita sejteket. Az aktivált asztrocitákból gyulladásos citokinek szabadulnak fel (1. ábra), amelyek a vér-agy gát megnyílás fennmaradásához és a neuroinflammáció fokozódásához vezetnek. 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. Ezek a folyamatok egymást erősítve idegi működési zavarok, krónikus gyulladás, és fokális epilepszia

kialakulását eredményezik az agyban. 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.

A kainsav által kiváltott vér-agy gát károsodásról már rendelkezésre állnak adatok kísérletes állatmodelleken, 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 gyulladáscsökkentő citokinek agyi endotélsejtekre kifejtett károsító hatásairól már számos adat ismert, azonban ezek kivédése a vér-agy gát szintjén továbbra is fontos feladat. Egyre nagyobb figyelmet kapnak a természetes vegyületek, mint terápiás szerek idegi gyulladások kezelésében, főképpen az antioxidáns, antiapoptotikus, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatásuk miatt. Sok növényi hatóanyagról feltételezik, hogy jótékony hatású lehet az idegi gyulladással járó központi idegrendszeri betegségekben. A szőlőben található bioaktív fenolos vegyületek számos sejtvédő tulajdonsággal rendelkeznek, mint a gyulladáscsökkentő, antioxidáns és kardioprotektív hatás.

Célunk ezért az volt, hogy megvizsgáljuk a kainsav közvetlen hatását tenyésztett agyi endotélsejteken, és hogy tanulmányozzuk a gyógyszerhatóanyagok potenciális védőhatását kainát okozta károsítással szemben, valamint megvizsgáljuk a szőlőből származó természetes vegyületek hatását a gyulladáscsökkentő citokinekkel károsított vér-agy gát modellen. Kísérleteink során három hatóanyagot vizsgáltunk az agyi endotélsejteken megfigyelt kainsav okozta változások kivédésére, a gyulladáscsökkentő dexametazont és szimvasztatint, valamint a szabadgyökfogó edaravont. A citokinekkel károsított vér-agy gát modell védelmére három fenolos vegyület, az epikatekin, a galluszsav és a rezveratrol, valamint a több fenolos vegyületet is tartalmazó szőlőmag kivonat hatását tanulmányoztuk.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Vegyszerek

Minden laboráru, reagens és vegyszer beszerzése a Sigma-Aldrich Kft.-től történt, hacsak másképpen nem jelöltük. A proantocianidin-gazdag szőlőmagkivonat (GSPE) egy kereskedelemben elérhető termék (Vitaflavan®), amit a Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, Franciaország) cég bocsátott a rendelkezésünkre. A kivonat epikatekint és galluszsavat tartalmaz, azonban rezveratrol nem található benne. A rezveratrolt a Fabron Iberica (Barcelona, Spanyolország) cégtől szereztük be.

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

A kísérleteinket primer patkány agyi endotél egycsejtrétegen, 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). A ko-kultúra modellhez a tenyésztőbetétek poliészter membránjának (0,4 μm pórusméret, 1,12 cm^2 felszín; Transwell, Corning Costar, USA) alsó, ún. abluminális felszínére pericitákat szélesztettünk, majd hagytuk a sejteket letapadni. Ezután a tenyésztőbetéteket a 12-lyukú lemezekben található asztroglia sejtek fölé helyeztük, és a membránok felső, ún. luminális oldalára agyi endotélsejteket pipettáztunk. A három sejttypust ezt követően 5 napig tenyésztettük együtt.

2.3. A tenyészetek kezelése

A kísérleteink során a sejtenyészteinket 10 és 100 μM koncentrációjú tápfolyadékban készített kainsav oldattal kezeltük 1 és 24 órán keresztül. A kainsav kezelési koncentrációkat szakirodalmi adatok alapján határoztuk meg. A három gyógyszerként is használt hatóanyag, a szimvasztatin, az edaravon, és a dexametazon önálló, illetve kaináttal szembeni protektív hatását 1 μM koncentrációban vizsgáltuk. A citokinekkal károsított modell esetében a TNF- α és IL-1 β gyulladáscitokinek kombinációját (10+10 ng/ml) alkalmaztuk (Harazin és mtsai, 2018). A szőlőmag kivonat (10 $\mu\text{g/ml}$), a rezveratrol (10 μM), az epikatekin (10 μM) és a galluszsav (1 μM) kezelési koncentrációját együttműködő partnereink korábbi HepG2 humán hepatóma sejtvonalon végzett kísérletei alapján állapítottuk meg. Mindkét kísérletsorozat esetén a kontroll csoportba a nem kezelt, azonban minden más körülményben azonosan tenyésztett sejtek tartoztak.

2.4. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) és kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció (qPCR)

Az öt kainát receptor és három nitrogén-monoxid-szintáz izoforma gének aktivitásának vizsgálatához agykérget és agyi mikroereket izoláltunk Wistar patkányokból, valamint patkány agyi endotélsejteket tenyésztettünk. A mintákat TriFast reagensben homogenizáltuk. Ezt követően a gyártó protokollja szerint az össz-RNS-t kloroformmal kivontuk, majd az össz-RNS-ek 1-1 μg -ját minden mintából és kezelési csoportból DNáz enzimmel kezeltük. Ezután a Maxima First Strand cDNS-szintézis kit segítségével reverz transzkripciót végeztünk. A

polimeráz láncreakciókat Labcycler 48 Gradient műszerrel végeztünk FIREPol DNS polimeráz segítségével. A kapott amplitonokat 2% agaróz gélen azonosítottuk, majd az izolált PCR fragmenteket kapilláris szekvenálással igazoltuk. A NOS izoformák génaktivitásában bekövetkezett változásokat qPCR-al is megvizsgáltuk. A polimeráz láncreakciót $2 \times$ Power SYBR Green PCR Master Mix felhasználásával hajtottuk végre RotorGene 3000 műszer segítségével. Minden gén kifejeződését a β -aktinhoz és a GAPDH-hoz, mint belső kontrollhoz normalizáltuk (ΔC_t). A $\Delta \Delta C_t$ meghatározásához a célgének génexpresszióját a kezeletlen, kontroll csoport génexpressziójához viszonyítottuk. A relatív génexpressziós változást a $2^{-\Delta \Delta C_t}$ formula segítségével határoztuk meg.

2.5. Valósídejű sejtanálízis

A sejtenyészetek biológiai állapotának nyomon követésére impedanciamérő rendszert (xCELLigence RTCA-SP, Agilent, USA) használtunk, amely a sejtek növekedéséről, letapadásáról és életképességéről ad információt. Az impedanciamérés előnye, hogy jelzőanyag nélküli, valósídejű vizsgálatot tesz lehetővé akár hosszú időn keresztül is. A sejteket egy speciális, 96-lyukú tenyésztőlemezbe szélesztettük, amely impedancia mérésére alkalmas arany elektródákat tartalmaz az alján. A sejtek a kirakást követő 3. napon benőtték a teljes felszínt, nem növekedett tovább a sejtenyész. Ekkor a sejteket kainsavval és védőanyagokkal kezeltük. A műszer a sejtenyész a kezelés után 10 percenként rögzítette 24 órán keresztül. Az impedancia értékeket a kezelés előtti utolsó időpont értékeihez normalizáltuk.

2.6. A vér-agy gát modell gátműködésének vizsgálata

Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék korlátozzák a paracelluláris út átjárhatóságát. A transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) egy olyan érzékeny módszer, ami a gátrendszerek paracelluláris szorosságát tükrözi. A agyi endotélsejtek ellenállás értékeit Epithelial Volt/Ohm Meter (EVOM) rezisztencia-mérővel és STX-2 elektródákkal mértük a hármass ko-kultúra modelleken. A TEER értékekből levontuk a sejtenyész 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.

Az endotél sejtréteg permeabilitásának meghatározásához két olyan jelzőanyagot használtunk, amelyekre a sejtréteg átteresztőképessége élettani körülmények között alacsony: ezek a paracelluláris úton átjutó fluoreszcein és a transzcelluláris útvonalon átjutó szérum albumin. Ezeknek a permeabilitási jelzőmolekuláknak az átjutását mind a kontroll, mind a

kezelt csoportokon megmértük. A kísérlet végén összegyűjtöttük a folyadékokat az alsó és felső folyadékterekből, majd meghatároztuk a jelzőanyagok koncentrációját fluoreszcens többlyukú lemezolvasóval. A kapott eredményeket a látszólagos permeabilitási együttható (P_{app}) segítségével fejeztük ki.

2.7. Leptintranszport vizsgálatok

A leptin átjutásának vizsgálatát TNF- α és IL-1 β gyulladáscsökkentő citokinekkal történő 6 órás károsítás után mértük. A rezveratrolt és a proantocianidin-gazdag szőlőmag kivonatot vagy önállóan teszteltük, vagy 30 perc előkezelést követően. A kezelés utolsó 1 órájában a tenyésztőbetétek felső folyadéktérében lévő oldatokhoz adtuk a leptint (1 $\mu\text{g/ml}$). A kezelés végén összegyűjtöttük a folyadékokat mindkét folyadéktérből, majd a minták leptin tartalmát ELISA kit (Merck, Németország) felhasználásával határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően.

2.8. Reaktív oxigéngyökök képződésének vizsgálata

Az oxidatív stressz mértékének megállapítása céljából kísérleteink során a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését is vizsgáltuk agyi endotélsejtekben. Ehhez a 2',7'-diklorodihidro-fluorescein diacetátot (DCFDA) alkalmaztuk. Az önálló károsítást 1 és 24 órán keresztül végeztük, a védőanyagok önálló és károsítóval szembeni hatását pedig 1 órán át vizsgáltuk. A fenolos vegyületek önálló és gyulladáscsökkentő citokinekkal szembeni hatását 1 órán keresztül követtük nyomon. A kezelőoldatokat 2 μM DCFDA-t tartalmazó Ringer-HEPES oldatra cseréltük és a sejteket újabb 1 órán át inkubáltuk, miközben 5 percenként fluoreszcencia intenzitást mértünk fluoreszcens leolvasó készülékkel. Referenciavegyületként hidrogénperoxid oldatot (100 μM) használtunk.

2.9. Nitrogén-monoxid felszabadulásának vizsgálata

Az agyi endotélsejtek intracelluláris nitrogén-monoxid (NO) tartalmának meghatározásához a 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátot (DAF-FM diacetát) használtuk. A kezelési koncentrációk és idők a károsító és citokines modellek esetében is megegyeztek a 2.8. pontban leírtakkal. A kezelőoldatokat 2 μM DAF-FM diacetátot tartalmazó Ringer-HEPES oldatra cseréltük és a sejteket újabb 1 órán át inkubáltuk, miközben 5 percenként fluoreszcencia intenzitást mértünk fluoreszcens leolvasó készülékkel. Referenciavegyületként nátrium-nitroprusszid oldatot (100 μM) használtunk.

2.10. Immunhisztokémia

Sejtkapcsoló fehérjék immunfestése: A klaudin-5 integráns membrán fehérjét és a ZO-1 linker fehérjét mutattuk ki az agyi endotélsejtek szoros kapcsolataiban kainsav kezelést követően. A citokinekkal kiváltott gyulladásos modellben a klaudin-5 fehérje mellett a β -katenin kapcsolófehérjét festettük. Elsődleges antitestként anti-klaudin-5, anti-ZO-1 és anti- β -katenin nyúl poliklonális ellenanyagokat használtunk. Másodlagos ellenanyagként Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot használtunk H33342 magfestéssel kombinálva. A mintákat konfokális mikroszkóppal (Leica SP5, Németország) vizsgáltuk.

Leptin receptorok immunfestése: A gyulladásos citokinekkal és fenolos vegyületekkel kezelt minták esetében a leptin receptorok immunfestéséhez elsődleges antitestként anti-leptin receptor (nyúl poliklonális) ellenanyagot használtunk, másodlagos ellenanyagként pedig Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot H33342 magfestéssel kombinálva. A mintákat konfokális mikroszkóppal (Leica SP5, Németország) vizsgáltuk.

Az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagba történő bejutásának vizsgálata: A gyulladásos citokinekkal és fenolos vegyületekkel kezelt minták esetében az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagba történő bejutását is vizsgáltuk. Az NF- κ B p65 alegységének jelölésére primer ellenanyagként anti-p65 antitestet (nyúl poliklonális) használtunk, másodlagos antitestként pedig Alexa Fluor 488-gyal jelölt anti-nyúl ellenanyagot. Az NF- κ B festés vizualizálásához spinning disk konfokális mikroszkópot (Yokogawa W1/Olympus IX83, Japán) alkalmaztunk.

2.11. 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, az NF- κ B festés intenzitásának hányadosát és a leptin receptorok kifejeződését ImageJ szoftverrel elemeztük. 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.

3. EREDMÉNYEK

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

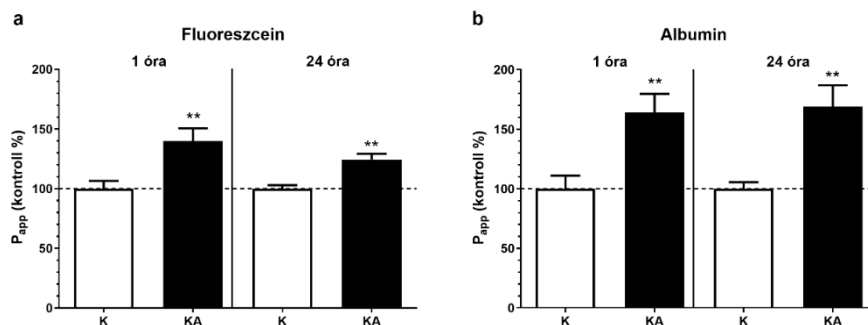
Mivel a kainát receptorok kifejeződését agyi endotélsejteken korábban a szakirodalom alapján nem mutatták ki, ezért megvizsgáltuk a receptorok jelenlétét RT-PCR segítségével. Mind az öt kainát receptor gén, *Grik1*, *Grik2*, *Grik3*, *Grik4* és *Grik5* termékét kimutattuk patkány agykéreg mintában. Az izolált patkány agyi mikroerekben a *Grik1* és a *Grik4*, míg primer agyi endotélsejtekben csak a *Grik1* gén kifejeződését figyeltük meg. A kapott eredményeket kapilláris DNS szekvenálással erősítettük meg.

3.2. A kainsav hatása a vér-agy gát sejtjeinek életképességére: valósidejű sejtanalízis

A kainsav megfelelő sejtkárosító koncentrációjának meghatározásához patkány agyi endotél-, pericita- és asztroglia sejteket kezeltünk 10 és 100 μM koncentrációban. Agyi endotélsejtek esetében a 10 μM kainsav nem károsította a sejtréteget sem az 1 óras, sem a 24 óras vizsgált időpontban. A 100 μM kainsav már az 1 óras időpontban is szignifikánsan csökkentette az endotélsejtek életképességét, ugyanezt a hatást figyeltük meg a 24 óras időpontban is. A kainsav kezelés egyik vizsgált koncentrációban sem befolyásolta az asztroglia- és pericita sejtek impedanciával mért életképességét. Mivel az endotélsejtek esetében a 100 μM bizonyult hatékony károsító koncentrációnak, ezért a további kísérletekben ezzel dolgoztunk.

3.3. 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 molekulású fluoreszcein és a nagy molekulású albumin jelzőanyagokra (2. ábra).



2. ábra. A kainsav hatása a tenyésztetes vér-agy gát modell permeabilitására 1, illetve 24 órás 100 μM 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.

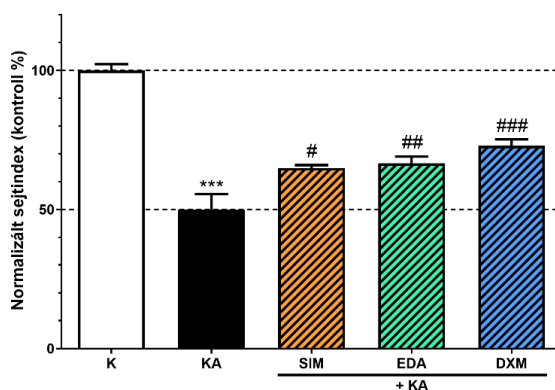
A kainsav kezelés szignifikánsan fokozta a permeabilitást, már az egyórás kezelés is megnövelte a jelzőanyagok átjutását (fluoreszcein 140%, albumin 164%) az endotélsejt rétegeken. Hasonló hatás volt megfigyelhető 24 óra elteltével is.

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

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. Egyórás kezelést követően a kainsav fokozta az agyi endotélsejtekben a NO termelődését, azonban a 24 órás időpontban nem volt változás a kontroll csoporthoz képest.

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

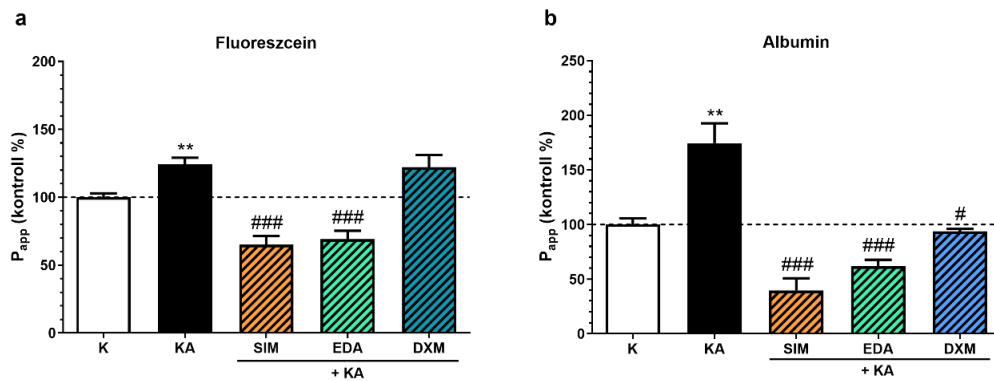
Az agyi endotélsejteken megfigyelt, fentebb leírt kainsav okozta károsítás kivédésére három gyógyszerhatóanyagot vizsgáltunk: a gyulladáscsökkentő dexametazont, a lipid- és gyulladáscsökkentő szimvasztatint és a szabadgyökfogó edaravont. A kainsav okozta életképesség csökkenéssel szemben az edaravon, a dexametazon és a szimvasztatin is szignifikáns védőhatást mutatott 24 órás kezelést követően (3. ábra). A dexametazon bizonyult a leghatásosabbnak, kainsav jelenlétében 46%-kal növelte a sejtek életképességét a kainsav okozta impedancia csökkenéshez képest (3. ábra).



3. 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.

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

A szimvasztatin és az edaravon szignifikánsan csökkentette a kainsav kezelés által megemelt jelzőanyag átjutást mindkét jelzőanyag esetén 24 órás kezelést követően (4a-b ábra). A dexametazon védőhatást mutatott a nagy molekulatömegű albumin átjutásának fokozódásával szemben (4a-b ábra), de a fluoreszcein esetében nem.



4. 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 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.

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

A kainsav kezelés ugyan nem változtatta meg agyi endotélsejtekben a szabad oxigéngyök termelést, ennek ellenére megvizsgáltuk a szimvasztatin, az edaravon és a dexametazon hatását is ebben a tesztben. Az edaravon erős gyökfogó hatást mutatott önállóan és a kainsavval károsított csoportban egyaránt a reaktív oxigéngyökök termelődésére agyi endotélsejtekben. Egyik hatóanyag sem volt önálló hatással az agyi endotélsejtek NO termelésére, azonban a dexametazon szignifikánsan csökkentette az egyórás kainsav kezelés által megemelt NO termelést.

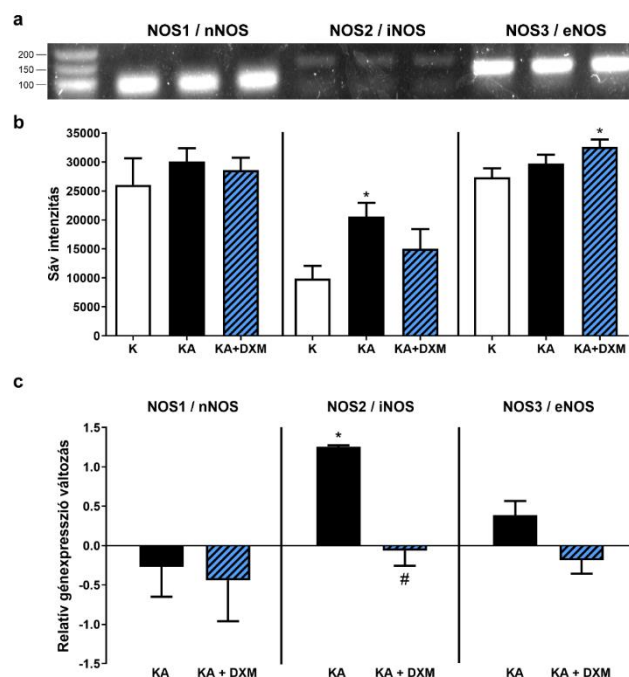
3.8. A szimvasztatin, edaravon és dexametazon hatása a kainsavval kezelt agyi endotélsejtek morfológiájára

A vér-agy gát szoros sejtközötti kapcsolatait kialakító fehérjéi közül a két legfontosabb a klaudin-5 integráns membrán fehérje és a citoplazmás ZO-1 kapcsolófehérje, melyek folytonos, övszerű immunfestődést mutatnak élettani körülmények között. A kainsav-kezelt csoportban a klaudin-5 és ZO-1 fehérjék festődési mintázata megváltozott, a sejthatárokon

felszakadozottságot figyeltünk meg. Mindhárom hatóanyag hatására a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék immunfestődése a kontroll csoporthoz hasonló mintázatot mutatott. Az immunfestésben látott változásokat MATLAB program segítségével értékeltük ki. A kontroll csoporthoz képest a kainsavval károsított csoportban szignifikánsan megemelkedett az immunfestéssel jelölődő objektumok száma, ami 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 a ZO-1 fehérje felszakadozott mintázatát mérsékelte.

3.9. 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 – detektáltuk primer agyi endotélsejtekben RT-PCR, illetve qPCR módszerek segítségével.



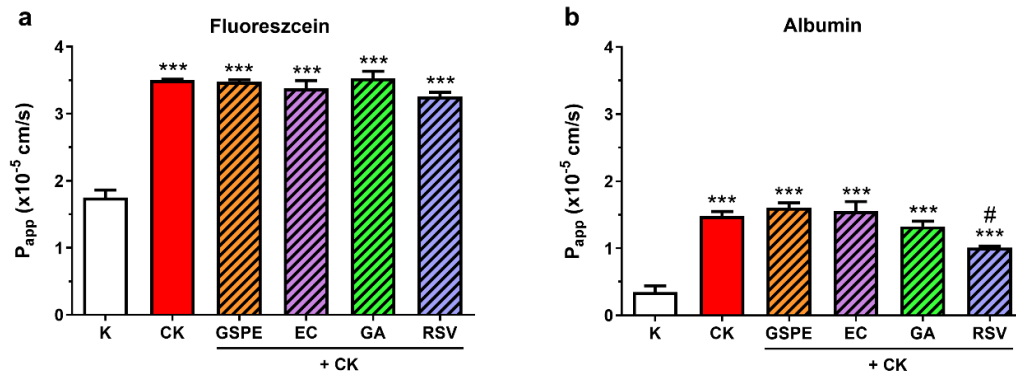
5. ábra. Nitrogén-monoxid-szintáz gének kifejeződése agyi endotélsejtekben. **(a-b)** A NOS1/nNOS, a NOS2/iNOS és a NOS3/eNOS mRNS kifejeződése RT-PCR-ral primer agyi endotélsejtekben 24 órás kainsav (KA, 100 μ M) és dexametazon (DXM, 1 μ M) kezelés hatására. **(c)** NOS izoformák génextpressziós változásai qPCR-ral. 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.

Az endoteliális NOS3 és a neuronális NOS1 gének magas expressziót mutattak az agyi endotélsejtekben, míg az indukálható NOS2 csupán kis mértékben fejeződött ki (5a-b ábra). A 24 órás kainsav kezelés szignifikánsan megemelte a NOS2/iNOS gén expresszióját, azonban

nem volt hatással a NOS1/nNOS és a NOS3/eNOS gének kifejeződésére (5b-c ábra). Mivel az agyi endotélsejtekben kainsav hatására megemelkedett NO termelődést csak a dexametazon tudta mérsékelni, ezért ezt a hatóanyagot vizsgáltuk a NOS izoformák kifejeződésére. A dexametazon kezelés csökkenteni tudta a kainsav által megnövelt NOS2/iNOS expressziót, de a másik két NOS gén kifejeződésére nem volt hatással (5c ábra).

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

A három sejttípusból álló vér-agy gát modell integritását a TEER értékkel, a látszólagos permeabilitási együtthatóval és immunfestéssel jellemeztük. A 6 órás citokin kezelés szignifikánsan csökkentette a modell elektromos ellenállását, ezt a hatást egyik tesztelt vegyület sem tudta kivédeni. A kontroll csoport esetében alacsony jelzőanyag átjutást mértünk fluoreszceinre és albuminra (6a-b ábra). A 6 órás citokin kezelés szignifikánsan megnövelte mindkét jelzőanyag átjutását a sejtrétegeken, összhangban a TEER értékekkel. A szőlőmagkivonat, az epikatekin és a galluszsav egyik marker esetében sem mutatott védőhatást. A rezvetratrol szignifikánsan csökkentette a citokin kezelés által megnövelt albumin jelzőanyag átjutást (6b ábra).



6. 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 szoros kapcsolat membránfehérje klaudin-5 és az adherens kapcsolatokat kialakító β -katenin folytonos, övszerű immunfestődést mutatott az agyi endotélsejtek határain a kontroll csoportban. Ez a mintázat citokin kezelés hatására megváltozott, a klaudin-5 fehérje festődése gyengébb és szakadozott lett, a β -katenin festés esetén pedig sejten belüli átrendeződést figyeltünk meg: a sejthatárról a citoplazmába és a magba kerül át a fehérje. A természetes

szőlőkivonatokkal történő kezelés hatására a sejtkapcsoló fehérjék immunfestődése a kontroll csoportéhoz volt hasonló.

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

A gyulladással citokinekkal történő kezelés nem befolyásolta az endotélsejtek szabad oxigéngyök- és NO termelését. Az agyi endotélsejtek ROS termelését a szőlőmagkivonat és az epikatekin szignifikánsan csökkentették, erős gyökfogó hatást mutattak. A rezveratrol önmagában nem változtatta meg a sejtek ROS termelését, azonban citokinekkal együtt alkalmazva csökkentette azt. Az epikatekin és a rezveratrol citokinekkal együtt alkalmazva csökkentették az endotélsejtek NO termelését. Ezzel szemben a szőlőmagkivonat önállóan és citokinekkal közösen is szignifikánsan megnövelte az NO termelődést.

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

A citokinek által kiváltott sejtszintű gyulladással válasz kimutatásának megbízható módja az NF- κ B transzkripció faktor p65 alegységének a citoplazmából a sejtmagba történő bejutásának vizsgálata. A kontroll csoportban az NF- κ B p65 alegysége főként a citoplazmában volt megfigyelhető. Ez citokin kezelés hatására megváltozott, megnőtt a sejtmag/citoplazma immunfestés fluoreszcens intenzitás hányadosa. A szőlőmagkivonat, a galluszsav és a rezveratrol szignifikánsan csökkentette ezt a hányadost, azaz gátolta az NF- κ B transzkripció faktor sejtmagba jutását.

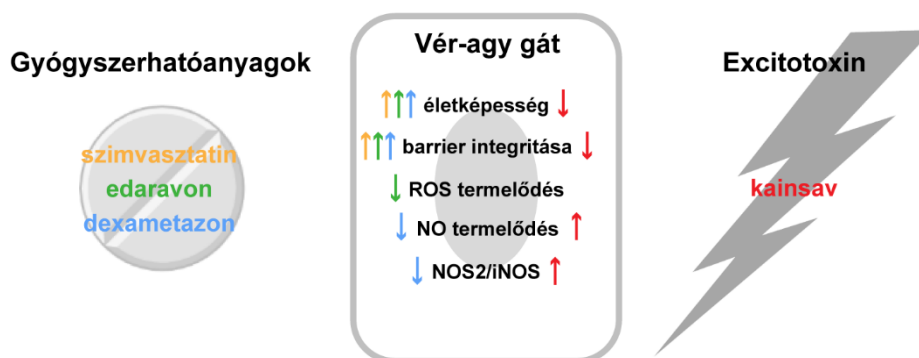
3.13. A szőlőből származó természetes vegyületek hatása a citokinekkal károsított vér-agy gát modellre – a leptin receptorok kifejeződése és a leptintranszport

A leptin receptorok jelenlétét agyi endotélsejtekben mindegyik kezelési csoportban igazoltuk immuncitokémiával. A vér-agy gáton való leptin átjutás vizsgálatához védőanyagként a szőlőmagkivonatot és a rezveratrolt választottuk ki. Önmagában egyik anyag sem változtatta meg a leptin vér-agy gát modellen keresztüli transzportját, a citokin kezelés azonban szignifikánsan megnövelte. Ezt a megemelt átjutást sem a szőlőmagkivonat, sem a rezveratrol nem befolyásolta.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

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 védelmén keresztül fontos feladat ezeknek a gyulladással járó központi idegrendszeri 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 kainát, 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.

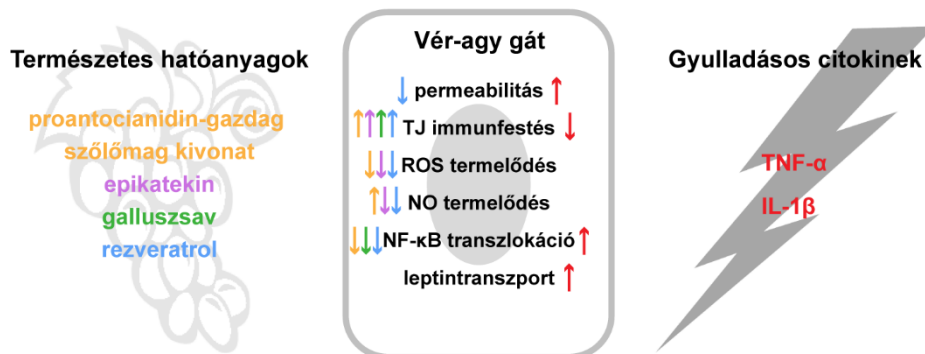
Kísérleteinkben igazoltuk a kainát receptorok jelenlétét tenyésztett primer agyi endotélsejteken és izolált agyi mikroér frakcióban. Kimutattuk, hogy az excitotoxin kainát közvetlenül károsítja az agyi endotélsejteket. Kainsav kezelés hatására a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék festődési mintázata 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 (7. ábra).



7. ábra. Gyógyszerhatóanyagok védőhatásai az excitotoxin kainsav károsító hatásaival szemben a vér-agy gát tenyésztetes modelljén. ↑: emeli; ↓: csökkenti. KA: kainsav, SIM: szimvasztatin, EDA: edaravon, DXM: dexametazon, ROS: reaktív oxigéngyök, NO: nitrogén-monoxid, NOS2/iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz.

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 (7. ábra).

Adataink alapján a szőlőmagkivonat és a szőlő fenolos vegyületek jótékony hatást fejtettek ki a vér-agy gátra citokin károsítást követően (8 ábra). A vizsgált természetes hatóanyagok részben gátolni tudták a citokinek által kiváltott gyulladást, főképpen a szoros sejtkapcsolatokra kifejtett károsító hatást és az NK- κ B sejtmagi bejutását, ami kulcseleme a gyulladásos sejtválasznak.



8. ábra. A természetes hatóanyagok védőhatásai gyulladásos citokinekkel szemben a vér-agy gát tenyészetes modelljén. ↑: emeli; ↓: csökkenti. CK: citokinek, GSPE: proantocianidin-gazdag szőlőmagkivonat, EC: epikatekin, GA: galluszsav, RSV: rezveratrol, TJ: szoros kapcsolat, ROS: reaktív oxigéngyök, NO: nitrogén-monoxid, NK- κ B: nukleáris faktor-kappa B.

Tenyészetes agyi endotélsejt rétegeken és vér-agy gát modellen kapott eredményeinkkel alátámasztottuk a korábbi munkákban a természetes szőlő hatóanyagok antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatását vaszkuláris endotélsejteken leíró adatokat. Eredményeink összhangban állnak a szőlő kivonatok hagyományos felhasználásával és a bioaktív szőlő vegyületekkel végzett klinikai vizsgálatokkal szív- és érrendszeri megbetegedésekben. Agyi endotélsejt tenyészeteken 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 vér-agy gátra kifejtett protektív hatását.

SUMMARY

Inflammation and blood-brain barrier (BBB) dysfunction are common features of different neuropathological conditions. Inflammatory cytokines and the excitotoxin glutamate contribute not only to neuronal damage, but to BBB opening in neurological diseases. The dysfunction of BBB further promotes neuroinflammation and brain pathologies thus forming a vicious circle. Our goal was to study BBB changes induced by kainate, a glutamate analog excitotoxin, and inflammatory cytokines on culture models of the BBB and investigate the protective effects of clinically used drugs, and natural compounds from grape. Kainate treatment directly damaged brain endothelial cells and significantly increased the permeability of the BBB model for marker molecules. The opening of the barrier was verified by the changed immunostaining pattern of tight junction proteins. Kainate stimulated the production of nitric oxide in brain endothelial cells. The antiinflammatory simvastatin and dexamethasone, and the antioxidant edaravone protected brain endothelial cells and preserved the barrier integrity. Dexamethasone attenuated the kainate-induced nitric oxide production by decreasing the iNOS/NOS2 mRNA expression. Natural phenolic compounds epicatechin, gallic acid and resveratrol, and the proanthocyanidin-rich grape seed extract were tested against cytokine-induced damages on a BBB model. We demonstrated that grape phenolic compounds protect cultured brain endothelial cells against tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β 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. We successfully described the protective effects of clinically used drugs and grape natural compounds at the level of the BBB, which in the future may contribute to the treatment of diseases associated with BBB damage.

5. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- I. **Barna L**, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V, Jósvey 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

EGYÉB 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, Zsembery 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, Veszélka 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. 20(1):15 (2023) IF: 6,961

7. 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. Veszeka 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 hallgatóink – a baráti légkört és a rengeteg szakmai támogatást, segítséget. Köszönöm, hogy mindig színt visztek a sűrű hétköznapiakba!

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, Jósvay 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.

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem **Barna Lilla** PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „**Gyógyszer- és természetes hatóanyagok védőhatásának vizsgálata vér-agy gát károsodással szemben tenyészetes modellen**” című disszertációját.

Felelős szerzőként kijelentem, hogy Barna Lilla jelentősen hozzájárult az alább felsorolt tudományos publikációk eredményéhez.

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

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

Igazolom, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2023. április 3.



Prof. Deli Mária
kutatóprofesszor
SZBK, Biofizikai Intézet