

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

**Humán vér-agy gát modell tulajdonságainak erősítése  
gyógyszerek és nanorészecskék vizsgálatához**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Porkoláb Gergő**

**Témavezetők: Prof. Deli Mária**, kutatóprofesszor  
**Dr. Veszeka Szilvia**, tudományos főmunkatárs

Biológiai Barrierék Kutatócsoport, Biofizikai Intézet  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

**HUN  
REN**



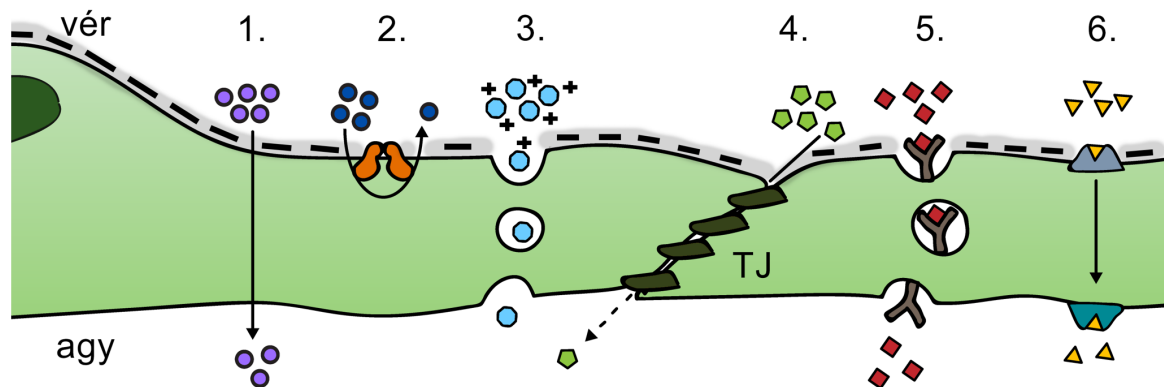
Szeged

2024



## 1. BEVEZETÉS

A vér-agy gát a vérkeringés és az agyszövet közötti dinamikus határfelület, melyet az agyi mikroerek speciális felépítésű és működésű endotélsejt rétege alkot. Az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok, az alacsony mértékű nem-specifikus vezikuláris transzport, a negatív töltésű glikokalix réteg, valamint az aktív efflux pumpák és influx szállítórendszerek (**1. ábra**) megteremtik az idegrendszer megfelelő működéséhez szükséges környezetet, megakadályozzák a kórokozók és káros anyagok idegszövetbe jutását, miközben szabályozott módon tápanyagokkal látják el az agyat.

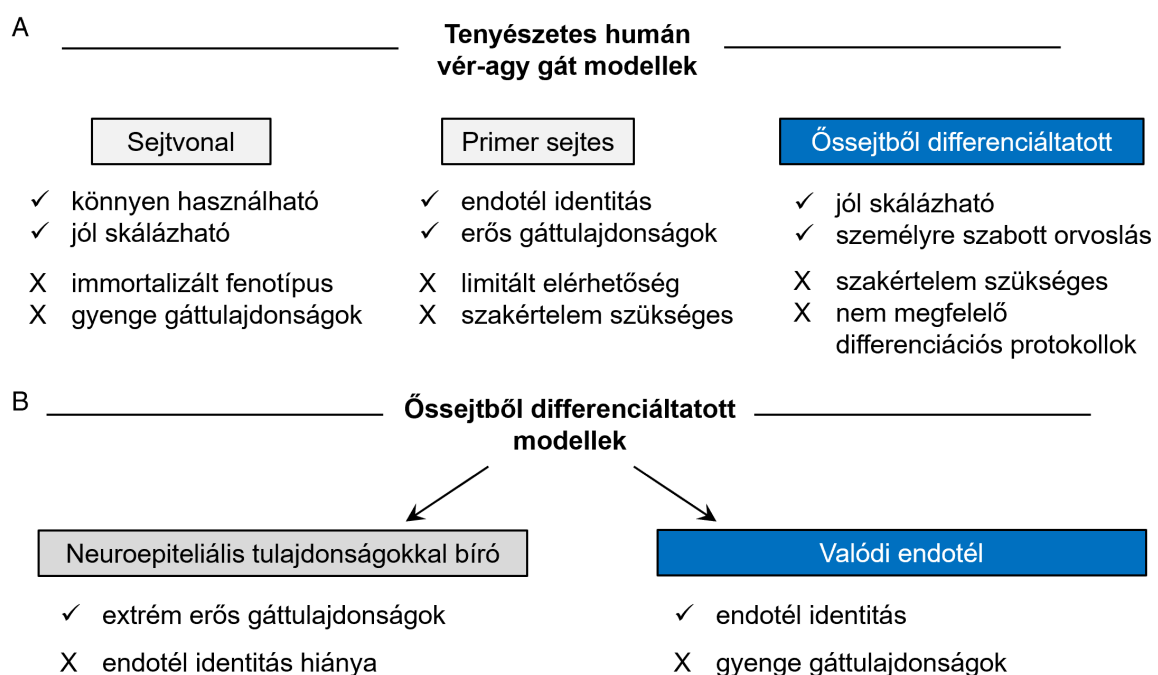


**1. ábra. Transzportútvonalak a vér-agy gáton.** 1: lipid-mediált diffúzió, 2: aktív efflux pumpák, 3: adszorbtív transzcitózis, 4: szoros kapcsolatokkal lezárt paracelluláris útvonal, 5: receptor-mediált transzcitózis, 6: tápanyagszállító fehérjék. A negatív töltésű sejt felszíni endoteliális glikokalixot szürke sáv jelzi. TJ: szoros sejtközötti kapcsolat. Abbott és mtsai, 2006 alapján.

Az agyi hajszálerek egyedi védőműködése azonban egy fontos problémához vezet: a gyógyszerek és gyógyszerjelölt hatóanyagok többsége sem jut át terápiás mennyiségben a vér-agy gáton. Ezért számos központi idegrendszeri megbetegedés gyógyszeres kezelése kihívást jelent, miközben a beteségeken maga a vér-agy gát is sérül.

Az utóbbi években aktívan kutatott módszer a gyógyszerek agyi bevitelének növelésére, hogy valamilyen hordozóhoz, például lipidekből vagy szerves polimerekből felépülő nanorészecskékhez kötjük őket. Mivel a keringésbe juttatott nanorészecskék több perifériás szervben – a májban, vesében, lépben – is csapdázódnak, a megfelelő agyi bejutásukhoz specifikus célzásra van szükség. Ígéretes és jelenleg klinikailag vizsgált lehetőség, hogy a részecskék felszínére antitesteket, peptidokat vagy aminosavakat kötünk, melyek célpontjai a vér-agy gáton nagymértékben kifejeződő receptorok és tápanyagszállító fehérjék. A célzott nanorészecskék ezáltal „molekuláris trójai falovakként” képesek lehetnek gyógyszereket az agyba juttatni, az agyi endotélsejtek transzportútvonalait kihasználva.

Az agyi gyógyszerbejutás problémájának további fontos tényezője, hogy a vér-agy gát jelentős faji különbségeket mutat, különösen a terápiás célpontként szolgáló sejtfelszíni receptorok és szállítófehérjék, a zsírolédkony gyógyszerek agyi bejutását gátló efflux pumpák, valamint az anionos gyógyszermolekulák számára elektrosztatikus akadályt képező glikokalix réteg esetében. Ennek megfelelően a kutatás korai szakaszában használt állati sejtes- és állatmodellek csak részben képezik le az emberi vér-agy gát működését. Ahhoz, hogy pontosabban megértsük ezeket a folyamatokat, és a preklinikai vizsgálatok hatékonyan jelezhessék előre egy terápia sikerességét, a humán vér-agy gát összetettségét jól megközelítő sejtenyészeti modellek használatára van szükség (2. ábra).



**2. ábra. Humán sejtes vér-agy gát modellek. A)** A vér-agy gát humán sejtes modelljeinek jelenlegi formái, előnyei és problémái. **B)** A humán össejtekből differenciáltott vér-agy gát modellek további két alapvető típusa.

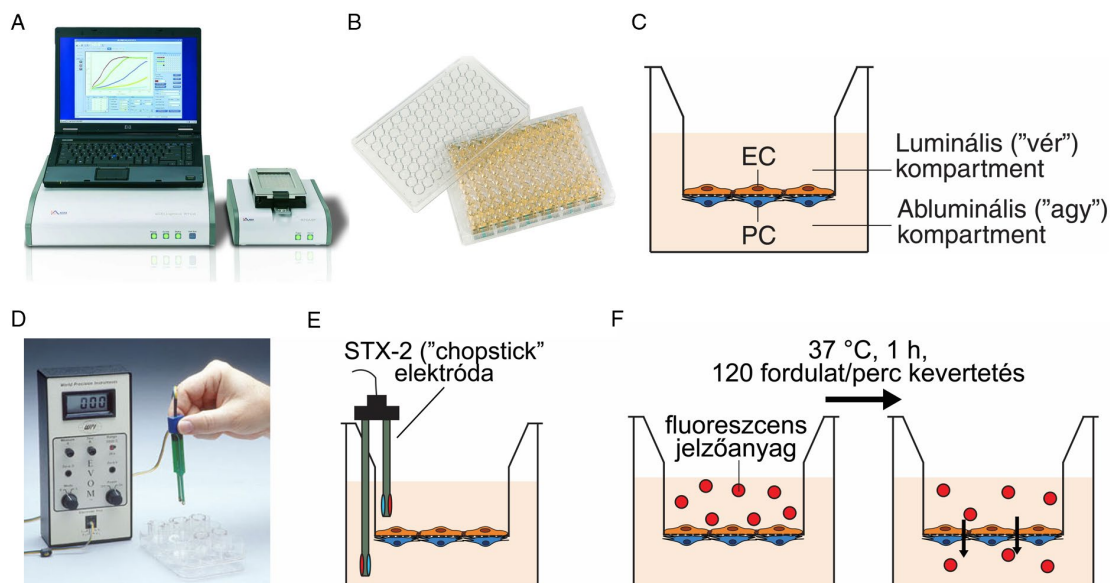
A humán vér-agy gát modellek legújabb generációját az össejtekből differenciáltott agyi endotélsejtek jelentik, melyek egy évtizedes múltra tekintenek vissza (2. A ábra). Az össejt-alapú modellek áttörést hozhatnak a szakterületen, hiszen jól skálázhatók és lehetővé teszik a betegekből nyert sejtek használatát, ezáltal megnyitják az utat a személyre szabott orvoslás előtt. Hátrányuk, hogy a jelenleg használt sejt differenciációs protokollokkal eddig nem sikerült valódi endotélsejt jellegekkel bíró, erős gáttulajdonságú modellt létrehozni, ami jelentősen szűkíti a felhasználhatóságukat (2. B ábra). Egy széles körben alkalmazható, az agyi gyógyszerbevitel vizsgálatát is lehetővé tevő humán vér-agy gát modell létrehozásához a gátfunkciók további erősítése szükséges valódi endotél tulajdonságokkal bíró sejteken.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatomat képező munkák átfogó célja olyan tenyészetes modellrendszerek létrehozása volt, amelyek lehetővé teszik gyógyszerek és célzott nanohordozók agyi bejutásának megbízható preklinikai vizsgálatát. Ehhez a következő részcélokat tűztük ki: i) humán őssejt-alapú vér-agy gát modell gáttulajdonságainak erősítése kismolekulák kombinációjával, ii) gyógyszerek és célzott nanorészecskék átjutásának vizsgálata a továbbfejlesztett vér-agy gát modellen, és iii) nanoméretű gyógyszerhordozók vér-agy gáton való átjutásának és agyszövetbe való bejutásának komplex sejtenyészetes modellezése.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A dolgozatomat képező munkákban humán köldökzsinórvér-őssejtekből differenciáltot endotélsejteket és agyi pericitákat tenyésztettünk együtt (Cecchelli és mtsai, 2014, **3. C ábra**). A vér-agy gát szorosságának változását valós idejű, impedanciamérésen alapuló sejtanálízissel (xCELLigence RTCA SP készülék és E-plate 96, **3. A,B ábra**) követtük nyomon, amit transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER, **3. D,E ábra**) és fluoreszcens jelzőanyagok permeabilitásának mérésével (**3. F ábra**) validáltunk.



**3. ábra. A barrier integritás mérésére használt legfőbb technikák a vér-agy gát tenyészetes modelljein. A)** xCELLigence RTCA SP (Agilent) készülék és a hozzá tartozó **B)** e-plate 96 integrált aranyelektrodákat tartalmazó sejtenyészítő lemez, melyekben valós idejű, impedanciamérésen alapuló sejtanálízis végezhető. A képek forrása: [www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-analysis/rtca-analyzers/xcelligence-rtca-sp-single-plate-741232](http://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-analysis/rtca-analyzers/xcelligence-rtca-sp-single-plate-741232). **C)** Endotélsejt-pericita (EC-PC) kóltúra modell sejtenyészítő betéteken. **D-E)** Transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérésére használt EVOM voltohmmeter (World Precision Instruments) és chopstick elektróda, illetve ennek pozíciója a mérés során. Forrás: a World Precision Instruments katalógusa. **F)** Vér-agy gát permeabilitás mérése fluoreszcens jelzőanyagokkal.

A sejtkapcsoló fehérjéket immuncitokémiai módszerrel, konfokális mikroszkópia segítségével tettük láthatóvá, az adatokat FIJI és MATLAB szoftverek segítségével elemeztük. A klaudin-5 fehérje szerepét a kezelésünk mechanizmusában genetikai úton, vad típusú és klaudin-5 heterozigóta egerek segítségével vizsgáltuk; ezekből az állatokból kutatócsoportunk korábbi protokolljai alapján (Nakagawa és mtsai, 2009, Veszélka és mtsai, 2018) primer agyi endotélsejt-pericitá-asztrocita vér-agy gát ko-kultúra modelleket állítottunk össze. A cARLA-kezelés mechanizmusának további vizsgálata bioinformatikai módszerekkel, illetve a Wnt/ $\beta$ -katenin jelátviteli út farmakológiai gátlásával történt.

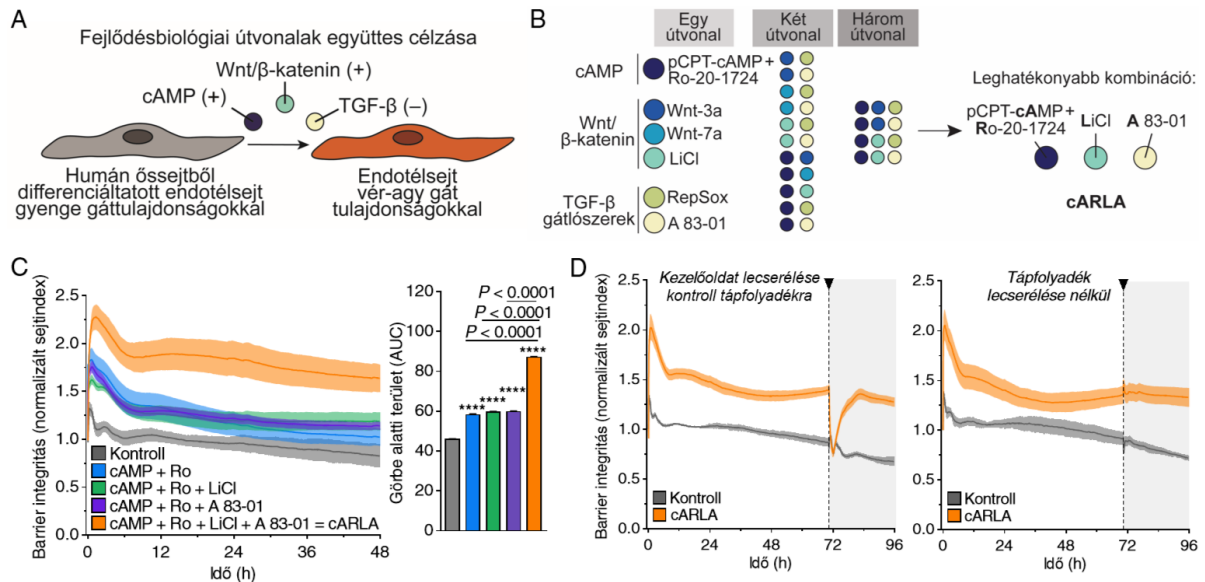
A cARLA-kezelés génexpresszióra gyakorolt hatását 3'RNS-szekvenálás (Massive Analysis of cDNA Ends, MACE-seq) segítségével vizsgáltuk. Az mRNA szintű eredményeket fehérje- és működésbeli szinten is megerősítettük további kiválasztott vér-agy gát tulajdonságokra. Az endotélsejtekre jellemző gyulladós válasz kialakítását TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$  gyulladós citokinek segítségével vizsgáltuk a csoportunk korábbi munkái alapján (Harazin és mtsai, Barna és mtsai, 2020). Az endotélsejtek vezikuláris transzportját fluoreszcensen jelölt albumin sejtfelvételével követtük nyomon, melyet fluoreszcens spektrofotometriával mértünk és konfokális mikroszkópiával tettünk láthatóvá. Az efflux pumpa funkciót a rodamin 123 fluoreszcens efflux pumpa segítségével, kétirányú transzport kísérletekben mértük. A negatív töltésű sejt felszíni glikokalix réteget búzacsíra agglutinin (WGA) lektin festéssel tettük láthatóvá, a sejt felszíni töltés változását pedig dinamikus fényszóráson alapuló módszerrel (Malvern Zetasizer Nano ZS készülék) mértük.

A gyógyszerek vér-agy gáton való átjutását kétirányú transzporttal jellemeztük, melyet tömegspektrometria-magas teljesítményű folyadékkromatográfia elrendezésben mértünk. Az adatokból látszólagos permeabilitási együtthatókat (Papp) és *in vitro* nem kötött agy-plazma megoszlási együtthatókat ( $K_{p,uu,brain}$ , Fridén és mtsai, 2009) számoltunk, amiket szakirodalmi értékekkel korreláltattuk. A nanorészecskék készítését és jellemzését korábbi tanulmányaink alapján végeztük (Mészáros és mtsai, 2018, Sheng és mtsai, 2018). A részecskékbe töltött fluoreszcens rodamin 6G, albumin vagy mCherry modellanyag sejt felvételét és vér-agy gáton való átjutását fluoreszcens spektrofotometriával mértük. A nanorészecskék és a neurovaszkuláris egység sejt típusainak kölcsönhatását sejt típusonként, illetve ko-kultúra modellekben egyaránt vizsgáltuk. A vér-agy gát modellen átjutott és a sejt tenyésztő lemezek alján lévő asztrocitákba és humán közepagi organoidokba bejutott nanorészecskéket konfokális mikroszkópiával tettük láthatóvá.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Vér-agy gát tulajdonságok erősítése kismolekulák kombinációjával

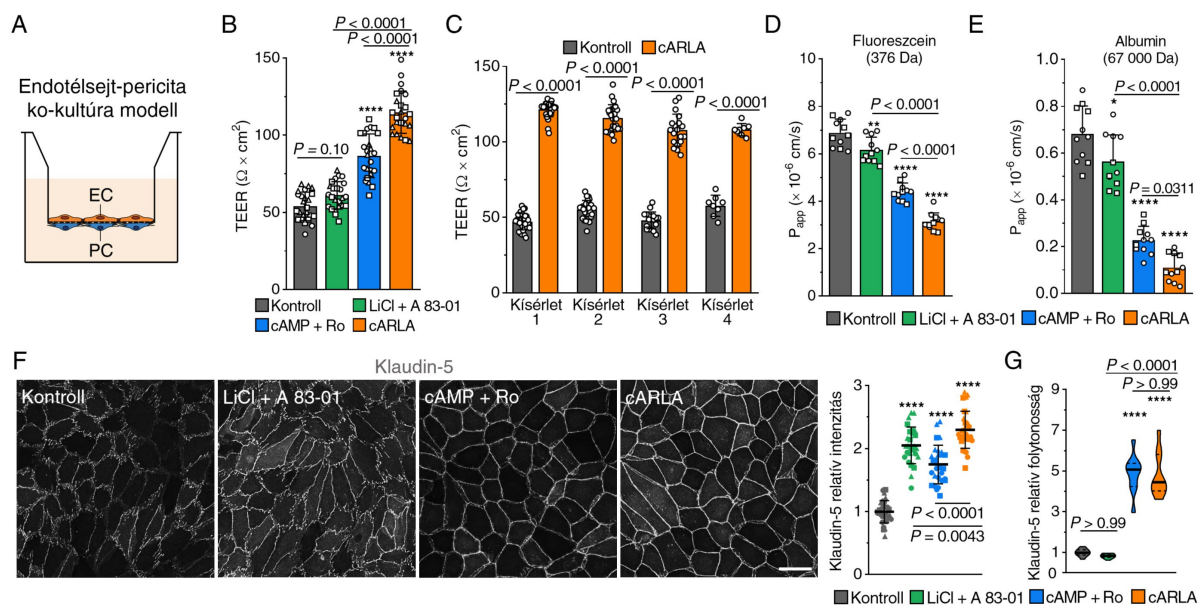
Első lépésként kismolekulák és rekombináns fehérjék impedancia-alapú szűrését végeztük el humán őssejtekből differenciáltatott endotélsejteken (**4. A ábra**).



**4. ábra. Vér-agy gát tulajdonságok erősítése kismolekulák kombinációjával.** **A)** A kísérleti felvetés sematikus rajza. **B)** A szűrés során használt kismolekulák és rekombináns fehérjék, illetve ezek tesztelt kombinációi. **C)** Barrier szorosság mérése valós idejű, impedanciamérésen alapuló sejtanálízissel. A magasabb normalizált sejtinдекс és nagyobb görbe alatti terület magasabb barrier integritást jelez. **D)** Barrier integritás mérése kontroll és cARLA-kezelt sejteken. A kezelőoldatot 72 h után lecseréltük (bal oldali ábra) vagy nem cseréltük le (jobb oldali ábra) kontroll tápfolyadékra. A cARLA-kezelt sejtek barrier integritása a kezelőoldat kontroll tápfolyadékra való cseréje után is képes volt visszaállni a csere előtti szintre, ami tartós génexpressziós változásokra utal. Átlag  $\pm$  SD, ANOVA és Bonferroni teszt,  $****P < 0,0001$  a kontroll csoporthoz képest,  $n=6$ .

Ez a megközelítés lehetővé tette, hogy a cAMP és a Wnt/β-katenin útvonalak serkentőszereit, valamint a TGF-β jelátvitel gátlószereit kombinatorikusan, 96-lyukú lemezekon, valós időben teszteljük (**4. B ábra**). A szűrés célja olyan molekulák vagy molekulakombinációk azonosítása volt, amelyek hatékonyan növelik az endotélsejtek által kialakított gát szorosságát. A szűrés segítségével azonosítottunk a cARLA névre keresztelt molekulakombinációt, amely szinergista módon növelte a gát szorosságát (**4. C ábra**), vagyis a cARLA hatása nagyobb volt, mint a részeinek összege. Fontos eredmény, hogy a cARLA-kezelés hatása a gátintegritásra hosszan tartó volt ( $>72$  h), és a kezelés kontroll tápfolyadékra történő cseréje után is visszaállt (**4. D ábra**). A szűrés során kapott eredményeinket a vér-agy gát ko-kultúra modelljén validáltuk, amelyben a humán őssejtből differenciáltatott endotélsejteket agyi pericitákkal tenyésztettük együtt (**5.A ábra**).





**5. ábra. Az eredmények validálása humán őssejtekből differenciált endotélsejt (EC)-agyi pericita (PC) ko-kultúra modellen. A)** A ko-kultúra modell sematikus rajza. **B)** Transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérés a ko-kultúra modellen 48 h kezelést követően. Átlag ± SD, ANOVA és Bonferroni teszt, \*\*\*\* $P < 0,0001$  a kontroll csoporthoz képest,  $n = 24$  (3 független kísérletből). **C)** A cARLA-kezelés TEER-re gyakorolt hatásának reprodukálhatósága a kísérletek között. Az egyes kísérletekben eltérő fagyasztásból származó sejteket használtunk és ezeket a laboratóriumunk különböző tagjai mérték. Átlag ± SD, ANOVA és Bonferroni teszt,  $n = 82$  (4 független kísérletből). **D)** Fluoreszcein és **E)** Evans kék-albumin komplex permeabilitása a vér-agy gát ko-kultúra modellen 48 h kezelést követően.  $P_{app}$ : látszólagos permeabilitási együttható. Átlag ± SD, ANOVA és Bonferroni teszt, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  a kontroll csoporthoz képest,  $n = 11$  (2 független kísérletből). **F)** Klaudin-5 immunfestés a ko-kultúra modellben endotélsejteken 48 h kezelést követően. Mércé: 50  $\mu\text{m}$ . Intenzitás: Átlag ± SD, **G)** folytonosság: medián ± kvartilisek, ANOVA és Bonferroni teszt, \*\*\*\* $P < 0,0001$  a kontroll csoporthoz képest,  $n = 27-30$  (3 független kísérletből).

A cARLA-kezelés szinergista módon növelte a transzendenteliális elektromos rezisztenciát (TEER, **5. B,C ábra**) és csökkentette a fluoreszcein és albumin jelzőanyagok átjutását (**5. D,E ábra**) a ko-kultúra modellben. Ezek az eredmények a vér-agy gát paracelluláris és transzcelluláris útvonalainak egyidejű szorosodására utalnak.

#### 4.2. A cARLA-kezelés hatásának közvetítője a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérje

A cARLA-kezelés hatásának közvetítőjeként a vér-agy gát sejt közötti szoros kapcsolatainak megerősödését azonosítottuk, különös tekintettel a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérje mennyiségére (**5. F ábra**) és a sejthatárokon való folytonosságára (**5. G ábra**). Azt, hogy a cARLA-kezelés hatása valóban a klaudin-5 transzmembrán sejtkapcsoló fehérjén keresztül történik, vad típusú (WT) és klaudin-5 heterozigóta (*Cldn5<sup>+/-</sup>*) egerekből izolált vér-agy gát ko-kultúra modellek segítségével igazoltuk.

### **4.3. A cARLA-kezelés szinergista hatásának mechanizmusa**

Bioinformatikai elemzések, immunfestések és a Wnt jelátvitel farmakológiai gátlásának segítségével elsőként írtuk le, hogy a három általunk célzott jelátviteli út a Wnt/ $\beta$ -katenin útvonalon egyesülve fejt ki a cARLA szinergista hatását a vér-agy gát integritására.

### **4.4. A cARLA-kezelés hatása az agyi endotélsejtek génexpressziós profiljára**

A cARLA-kezelés hatására bekövetkező rendszerintű génexpressziós változásokat 3' RNS-szekvenálás (MACE-seq) segítségével vizsgáltuk humán őssejtekből differenciáltatott agyi endotélsejteken. A cARLA-kezelés hatására megváltozott kifejeződésű gének között számos, a vér-agy gát működésében szerepet játszó gént azonosítottunk, melyek a vezikuláris transzportban, az immunsejt-adhézióban, az efflux pumpák működésében és a negatív töltésű glikokalix réteg létrehozásában vesznek részt. Útvonalanalízis segítségével az agyi endotélsejtek differenciálódásával, gátképzésével, valamint nyugalmi állapotával és érésével kapcsolatos gének felülreprezentáltságát figyeltük meg a cARLA-kezelés hatására.

Fontos, hogy az általunk használt vér-agy gát modellben a fő endoteliális gének kifejeződése nagyságrendekkel magasabb volt, mint az epiteliális géneké, ami igazolja a modell vaszkuláris endoteliális jellegét. Az általános endoteliális tulajdonságokon felül a cARLA-kezelés megnövelte számos vér-agy gát-specifikus gén kifejeződését, miközben csökkentette a perifériás endotélsejtekre jellemző gének kifejeződését. Adataink arra is utalnak, hogy a cARLA 14-16-szor nagyobb valószínűséggel fokozza a vér-agy gát-specifikus gének kifejeződését, mint más, véletlenszerűen kiválasztott génekét. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a cARLA-kezelés RNS szinten elősegíti a vér-agy gát érésével kapcsolatos és az agyi endotélsejtre jellemző tulajdonságok kialakulását.

### **4.5. A cARLA-kezelés funkcionális hatása: immunsejt-adhéziós molekulák és gyulladásoos válasz, vezikuláris transzport, efflux pumpa aktivitás és glikokalix sűrűség**

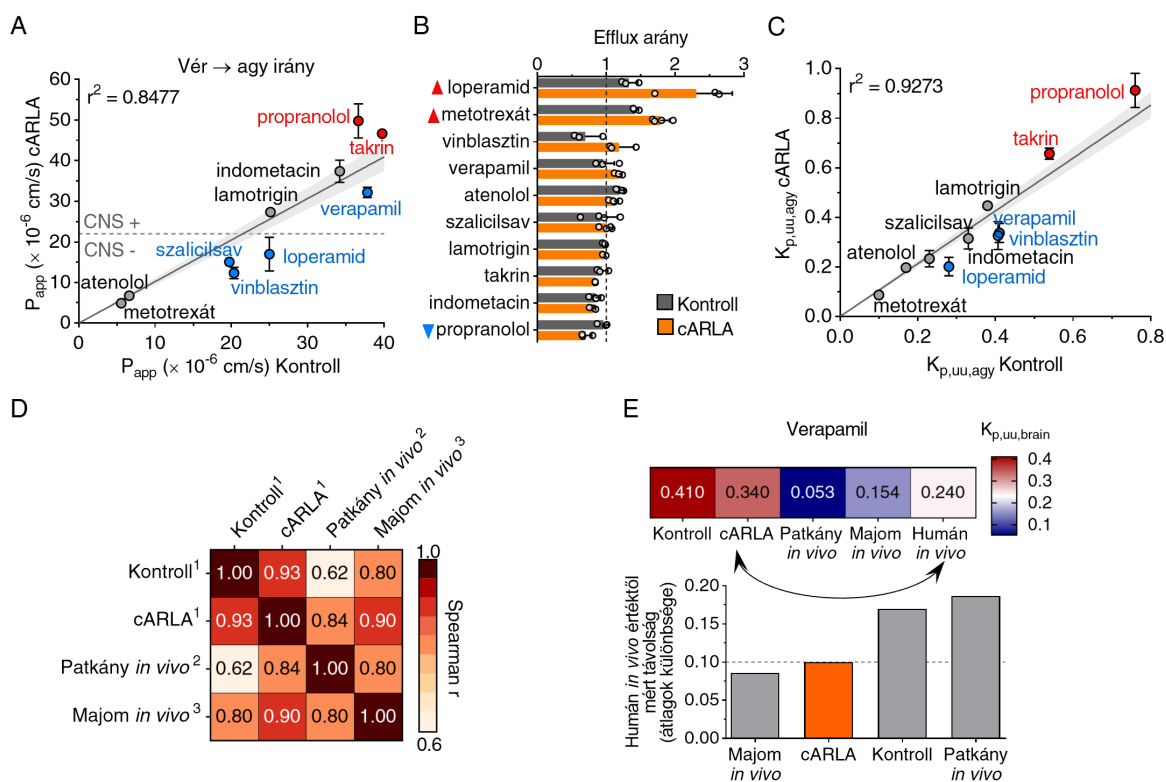
Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a fenti RNS szintű változások fehérje- és funkcionális szinten is megjelennek-e a cARLA-kezelés hatására. Ehhez az agyi endotélsejtek négy fő tulajdonságát vizsgáltuk: i) immunsejt-adhéziós molekulák és endoteliális gyulladásoos válasz, ii) vezikuláris transzport, iii) efflux pumpák és iv) glikokalix. A cARLA-kezelés megnövelte a negatív töltésű glikokalix réteg sűrűségét, valamint az efflux pumpák aktivitását és polarizáltságát, illetve csökkentette az endotélsejtek nem-specifikus vezikuláris transzportját, miközben a sejtek megtartották a gyulladásoos folyamatokra való válaszadási képességüket. Ezek kiemelkedően fontos eredmények, hiszen az endotélsejtek glikokalix rétege, valamint



efflux és influx transzportrendszerei kölcsönhatnak a terápiás szerekkel, sérülésük pedig jól dokumentált a központi idegrendszeri betegségekben.

#### 4.6. A cARLA-kezelés hatása kismolekulájú gyógyszerek vér-agy gát modellen való átjutására

Végül azt vizsgáltuk, alkalmas-e a cARLA-kezelés a humán vér-agy gát modell megbízhatóságának növelésére a gyakorlatban. Ehhez tíz klinikailag használt kismolekulájú gyógyszer átjutását teszteltük a vér-agy gát ko-kultúra modellen keresztül, vér-agy és agy-vér irányban egyaránt. A fenti eredményekkel összhangban cARLA-kezelés hatására az efflux pumpa szubsztrát gyógyszerek (vinblasztin, loperamid, szalicilsav és verapamil) vér-agy gát modellen való átjutása vér-agy irányban alacsonyabb, az influx transzportmechanizmusú vegyületek (propranolol, takrin) magasabb volt (6. A-C ábra).



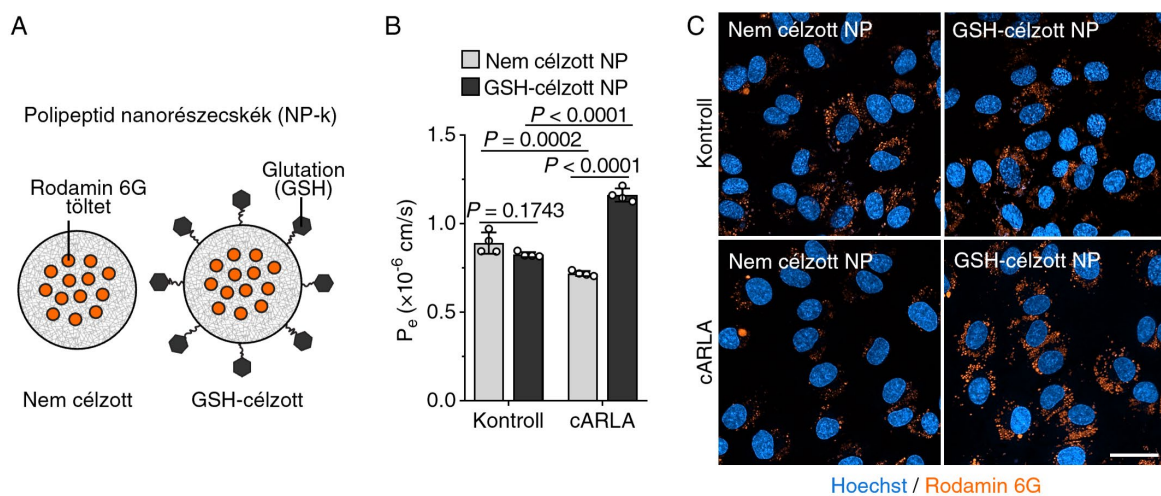
**6. ábra. A cARLA-kezelés hatása kismolekulájú gyógyszerek vér-agy gát modellen való átjutására.** **A)** Tíz klinikailag alkalmazott gyógyszer permeabilitása kontroll és cARLA-kezelt vér-agy gát ko-kultúra modellen. CNS: központi idegrendszer, a szaggatott vonal a CNS-be klinikailag hatékonyan bejutó (CNS+) és alig bejutó (CNS-) gyógyszerek közötti választóvonal. A piros és kék szín az adott gyógyszer szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) magasabb, illetve alacsonyabb permeabilitását jelzi cARLA-kezelés hatására. Szimbólumok: átlag  $\pm$  SD,  $n=3-4$ . Egyenes: egyszerű lineáris regresszió 95%-os konfidencia-intervallummal. **B)** A gyógyszerek efflux arányai (agy-vér/vér-agy permeabilitási arány) a ko-kultúra modellben. Átlag  $\pm$  SD, kétmintás t-próba Welch korrekcióval,  $n=3-4$ . A felfelé mutató piros és lefelé mutató kék háromszögek magasabb, illetve alacsonyabb efflux arányokat jeleznek ( $P < 0,05$ ). **C)** A gyógyszerek *in vitro* nem kötött agy-plazma megoszlási együtthatói ( $K_{p,uu,agy}$ ) kontroll és cARLA-kezelt vér-agy gát ko-kultúra modellen. A piros és kék szín az adott gyógyszer szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) magasabb, illetve alacsonyabb permeabilitását jelzi cARLA-kezelés hatására. Szimbólumok: átlag  $\pm$

SD, n=3-4. Egyenes: egyszerű lineáris regresszió 95%-os konfidencia-intervallummal. **D)** A tíz gyógyszer átjutásának egészére vonatkozó *in vitro*  $K_{p,uu,agy}$  értékek korrelációs hőtésképe patkányokból és főemlősökből származó *in vivo*  $K_{p,uu,agy}$  adatokkal. A mezőkben lévő számok Spearman korrelációs együtthatók. Az adatok a következő forrásokból származnak: 1: jelen munka, 2: Fridén és mtsai, 2009, 3: Sato és mtsai, 2021. **E)** Tenyésztéses modellek *in vitro*  $K_{p,uu,agy}$  értékeinek összehasonlítása humán *in vivo*  $K_{p,uu,agy}$  adatokkal a verapamil esetében. Felső panel: a  $K_{p,uu,agy}$  értékek hőtésképe. Alsó panel: A  $K_{p,uu,agy}$  értékek átlagos különbsége a humán *in vivo* adatokhoz képest. Az alacsonyabb különbségek jobb prediktív értéket jeleznek.

Fontos eredmény, hogy a cARLA-kezelés növelte a korrelációt a humán modellen mért *in vitro*  $K_{p,uu,agy}$  értékek és a patkányokból és főemlős állatokból származó *in vivo* agyi penetrációs adatok között (**6. D ábra**). A verapamil esetében, amely az egyetlen olyan hatóanyag a listánkon, amelyről humán klinikai  $K_{p,uu,agy}$  adatok állnak rendelkezésre, a cARLA-kezelt vér-agy gát modell jól közelítette a humán *in vivo* értéket (**6. E ábra**).

#### 4.7. A cARLA-kezelés hatása célzott polimer nanorészecskék vér-agy gát modellen való átjutására

A kismolekulájú gyógyszereken kívül célzott nanohordozók átjutását is vizsgáltuk a kontroll és cARLA-kezelt modellen, melyek alkalmasak lehetnek gyógyszerek és akár nagyobb fehérjék/biofarmakonok vér-agy gáton való átjuttatására (**7. A ábra**).



**7. ábra.** A cARLA-kezelés hatása célzott polimer nanorészecskék vér-agy gát modellen való átjutására. **A)** Nem célzott és glutationnal (GSH) célzott polipeptid nanorészecskék (NP-k) sematikus rajza. **B)** Az NP-k permeabilitása kontroll és cARLA-kezelt humán vér-agy gát ko-kultúra modellen.  $P_e$ : endoteliális permeabilitási együttható. Átlag  $\pm$  SD, kétutas ANOVA és Bonferroni teszt, n=4. **C)** A nem célzott és GSH-célzott NP-k sejtfelvételét (rodamin 6G töltet) élő sejt konfokális mikroszkópiával tettük láthatóvá. Mércé: 50  $\mu$ m.

Nanohordozóként ebben a kísérletsorozatban polipeptid NP-eket használtunk, melyeket a vér-agy gát specifikus liganddal, a glutationnal (GSH) céloztuk (**7. A ábra**). A cARLA-kezelés csökkentette a nem célzott NP-k permeabilitását a vér-agy gát modellen a kontroll csoporthoz képest (**7. B. ábra**). A cARLA-val kezelt modellen a vér-agy gát-specifikus GSH ligand fokozta

az NP átjutást, míg a kontroll modellen nem tapasztaltunk magasabb NP permeabilitást (**7. B ábra**). Ez a különbség nem csupán az átjutásban, de az NP-k sejtfelvételében is nyilvánvaló volt (**7. C ábra**).

#### **4.8. Célzott vezikuláris nanorészecskék sejtfelvétele: periciták, asztrociták, idegsejtek**

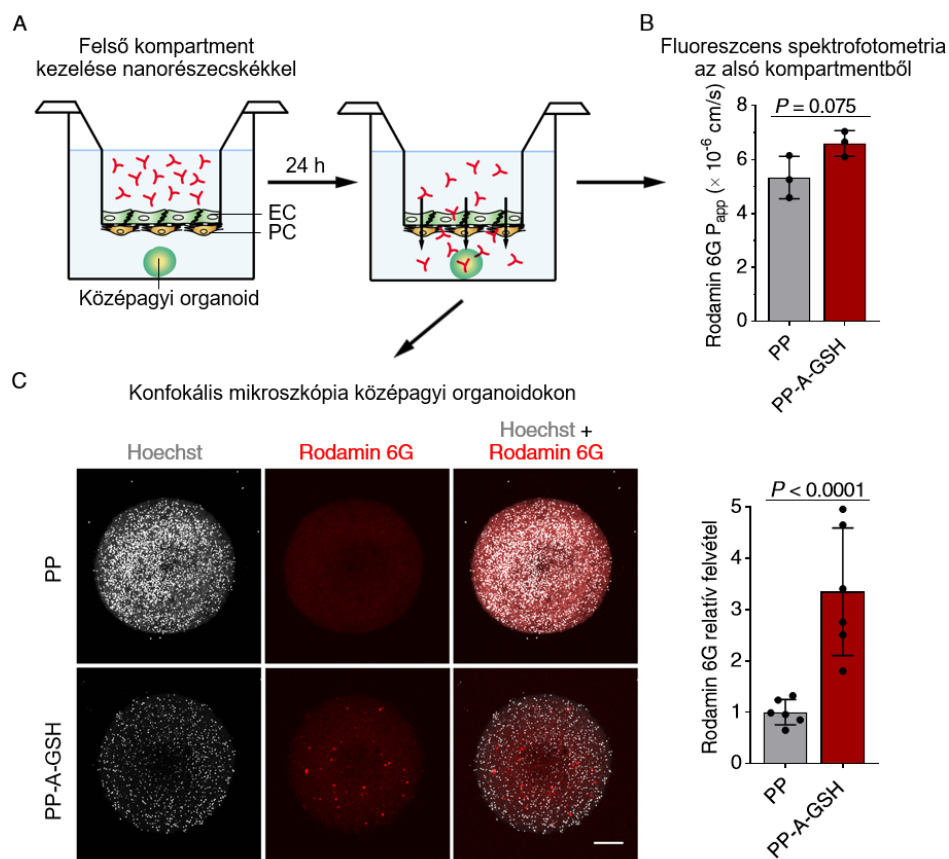
A nanohordozókkal történő agyi gyógyszerbevitel esetében egy másik fontos kérdés is felmerül. Mi történik a részecskékkel és ezek töltetével, miután átjutottak a vér-agy gát endotélsejteinek rétegén? Egy újabb kísérletsorozatban vezikuláris NP-ket állítottunk elő, melyek belsejébe fluoreszcensen jelölt albumin (67 kDa) vagy mCherry (28 kDa) modellanyagot töltöttünk. Igazoltuk, hogy az NP-k az endotélsejteken kívül bejutnak tenyésztett agyi pericitákba, asztrocitákba és neuronális sejtekbe. Az alanin-glutation kettős célzás mindhárom sejttypusban fokozta a sejtfelvételt a nem célzott NP-khez képest, különösen az agyi pericita és a neuronális sejtekben. A sejtfelvétel mechanizmusában gátlószerek és gátló körülmények segítségével az egyes sejttypusokra jellemző mintázatokat írtunk le.

#### **4.9. Célzott vezikuláris nanorészecskék vér-agy gát modellen való átjutása és asztrocitákba való bejutása**

Ezután azt vizsgáltuk, képesek-e az agyi mikroér endotélsejt és pericita rétegeken átjutott NP-k vagy ezek töltete bejutni a vér-agy gát ko-kultúra modell alsó folyadékterében található asztrogliá sejtekbe. Kimutattuk, hogy az N-A-GSH részecskék nemcsak hatékonyabban jutottak át a vér-agy gát modellen a nem célzott NP-khez képest, de az átjutott részecskék töltetét az asztrocita sejtekben 24 óra elteltével élő sejttes konfokális mikroszkópia segítségével láthatóvá is tettük.

#### **4.10. Célzott polimer nanorészecskék vér-agy gát modellen való átjutása és közepagi organoidokba való bejutása**

A harmadik kísérletsorozatunkban a fenti elrendezést fejlesztettük tovább, hogy még összetettebb módon tudjuk vizsgálni az NP-k kölcsönhatását a humán vér-agy gát és neurovaszkuláris egység sejttypusaival. Humán őssejtekből differenciált endotélsejt- pericita ko-kultúra modellen vizsgáltuk célzott többkarú polipeptid NP-k átjutását, majd ezek bejutását humán közepagi organoidokba (**8. A ábra**).



**8. ábra. Célzott többkarú polipeptid nanorészecskék vér-agy gát modellen való átjutása és középagyi organoidokba való bejutása. A)** A kísérleti elrendezés és vér-agy gát modell sematikus rajza. EC: humán őssejtekből differenciáltatott endotélsejt, PC: borjú agyi pericitá. **B)** Nem célzott és A-GSH-val célzott polimer NP-k permeabilitása a vér-agy gát ko-kultúra modellen.  $P_{app}$ : látszólagos permeabilitási együttható. Átlag  $\pm$  SD, kétmintás t-próba,  $n=3$ . **C)** Az NP-k rodamin 6G töltetének felvétele humán középagyi organoidokba. Átlag  $\pm$  SD, kétmintás t-próba,  $n=6$ .

A humán őssejtekből létrehozott (nem cARLA-kezelt) vér-agy gát modellen a célzott PP-A-GSH részecskék nem jutottak át hatékonyabban a nem célzott NP-knél (**8. B ábra**). A célzott NP-k töltete azonban jelentősen hatékonyabban jutott be a humán középagyi organoidokba, mint a nem célzott NP-k töltete (**8. C ábra**), amely arra utalhat, hogy maguk az NP-k is átjutnak a vér-agy gát modellen és a neurovaszkuláris egység többi sejtjűsával is aktívan kölcsönhatnak.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A vér-agy gát az agyi gyógyszerbevitel fontos tényezője: számos gyógyszer agyszövetbe való bejutását akadályozza, miközben betegségekben maga is károsodik. Ahhoz, hogy jobban megértsük ezeket a folyamatokat, az emberi vér-agy gát összetettségét jól leképező sejttenyészetes modellekre van szükség. A legmodernebb, őssejtekből differenciáltatott humán vér-agy gát modellek azonban fejletlen gáttulajdonságokkal rendelkeznek, ami csökkenti a felhasználhatóságukat.

Vizsgálataink során elsőként írtuk le, hogy cAMP és Wnt/ $\beta$ -katenin útvonalak együttes aktiválása és a TGF- $\beta$  jelátvitel gátlása szinergista módon növeli a vér-agy gát szorosságát humán őssejtekből differenciáltatott endotélsejtekben. A három útvonal együttes célzására kifejlesztettünk egy cARLA névre keresztelt molekulakombinációt, ami a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérjén keresztül fokozta a vér-agy gát modell transzendenteliális elektromos ellenállását és csökkentette a fluoreszcein és albumin jelzőanyagok permeabilitását. A cARLA-kezelés szinergista hatásának mechanizmusaként a három jelátviteli út Wnt/ $\beta$  katenin útvonalon való egyesülését azonosítottuk. RNS-szekvenálás és rendszerintű bioinformatikai elemzés segítségével igazoltuk, hogy a cARLA-kezelés elősegíti a vér-agy gát érését és az agyi endotélsejt-szerű tulajdonságok megjelenését mRNS szinten. Eredményeinket fehérje szinten és funkcionális tesztekben is megerősítettük. A cARLA-kezelés megnövelte a negatív töltésű glikokalix réteg sűrűségét, valamint az efflux pumpák aktivitását és polarizáltságát, illetve csökkentette az endotélsejtek nem-specifikus vezikuláris transzportját, miközben a sejtek megtartották a gyulladásos folyamatokra való válaszadási képességüket. Ennek megfelelően a cARLA-kezelés növelte tíz klinikailag használt gyógyszer vér-agy gát modellen való átjutásának korrelációját a rágcsálókban, főemlősökben és emberekben in vivo mért értékekkel, ezáltal a kontroll csoportnál és a jelenleg használt vér-agy gát modelleknél jobban jelezte előre a hatóanyagok átjutásának sebességét és mértékét. Eredményeink azt is alátámasztják, hogy a cARLA-kezelt vér-agy gát modell alkalmas nagyobb biofarmakonok, mint például antitest-komplexek, enzimek és célzott nanorészecskék (NP-k) vér-agy gáton való átjutásának tanulmányozására.

A dolgozatomhoz kapcsolódó két másik publikációban azt vizsgáltuk, mi történik a nanohordozókkal, miután átjutottak a vér-agy gát endotélsejteinek rétegén. Jellemeztük a tenyésztett agyi periciták, asztrociták és neuronális sejtek kölcsönhatását az alanin-glutacion ligandkombinációval célzott NP-kkel. A részecskék kettős célzása nemcsak a vér agy gát modellen való átjutást segítette, de megnövelte az átjutott NP-k felvételét a modell alsó

foliadékterében lévő asztroglia sejtekbe is. Ezt a kísérleti elrendezést a humán vér-agy gát modellre is átültettük, amelyben az agyi endotélsejteket és pericitákat az agyszövet háromdimenziós modelljével, humán közepagi organoidokkal vizsgáltuk együtt. Ez az új modell és megközelítés lehetővé tette az NP-k vér-agy gát modellen való átjutásának és agyi organoidokba való bejutásának követését egy kísérletben.

Reményeink szerint a cARLA igazolt hatékonyságának és könnyű használhatóságának köszönhetően alkalmas lehet a különböző fajokból származó és különböző komplexitású természetes vér-agy gát modellek gáttulajdonságainak fokozására a világ számos laboratóriumában. A szorosabb és jobb vér-agy gát tulajdonságokkal rendelkező modellek humán agyi organoidokkal együtt tenyésztve és vizsgálva ígéretes eszközök lehetnek annak tanulmányozására, hogyan hatnak kölcsön a gyógyszerek és terápiás nanohordozók a neurovaszkuláris egység sejtjeivel.

## **6. SUMMARY**

The blood-brain barrier (BBB) hinders drug delivery to the brain and is implicated in neurological diseases. To better understand these processes in humans, there is a need for culture models that mimic the complexity of the BBB. However, state-of-the-art human BBB models either suffer from a non-physiological, mixed epithelial-endothelial identity or have weak barrier tightness, which greatly limits their usability. We identified a molecule combination that synergistically enhances barrier tightness in several in vitro models and induces complex BBB properties in human stem cell-derived endothelial cells by targeting a novel link between three signaling pathways. The molecule combination has the potential to improve BBB culture models across laboratories to advance both basic research and drug development for the human brain.

## 7. PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10073568

Kumulatív hatástényező (IF): 58,8; Összes hivatkozások száma: 131; Hirsch index: 5

### A tézis tárgyához tartozó publikációk:

- I. **Porkoláb G**, Mészáros M, Szecskó A, Vigh JP, Walter FR, Figueiredo R, Kálomista I, Hoyk Z, Vizsnyiczai G, Gróf I, Jan JS, Gosselet F, Purity MK, Vastag M, Hudson N, Campbell M, Veszelka S, Deli MA.  
Synergistic induction of blood-brain barrier properties.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (megjelenés alatt, 2024)  
Preprint: *bioRxiv*. 2023.02.09.527899.  
IF: 11,1
- II. **Porkoláb G**, Mészáros M, Tóth A, Szecskó A, Harazin A, Szegletes Z, Ferenc G, Blastyák A, Mátés L, Rákhely G, Deli MA, Veszelka S.  
Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit.  
*Pharmaceutics*. 12(7):635. (2020)  
IF: 6,321
- III. Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, **Porkoláb G**, Kocsis A, Páli EK, Polgár TF, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, Veszelka S.  
Targeting Human Endothelial Cells with Glutathione and Alanine Increases the Crossing of a Polypeptide Nanocarrier through a Blood-Brain Barrier Model and Entry to Human Brain Organoids.  
*Cells*. 12(3):503. (2023)  
IF: 6,0

### A tézis tárgyához közvetlenül nem tartozó publikációk:

- I. Mészáros M, **Porkoláb G**, Kiss L, Pilbat AM, Kóta Z, Kupihár Z, Kéri A, Galbács G, Siklós L, Tóth A, Fülöp L, Csete M, Sipos Á, Hülper P, Sipos P, Páli T, Rákhely G, Szabó-Révész P, Deli MA, Veszelka S.  
Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier.  
*Eur J Pharm Sci*. 123:228-240. (2018)  
IF: 3,466
- II. Topal GR, Mészáros M, **Porkoláb G**, Szecskó A, Polgár TF, Siklós L, Deli MA, Veszelka S, Bozkir A.  
ApoE-Targeting Increases the Transfer of Solid Lipid Nanoparticles with Donepezil Cargo across a Culture Model of the Blood-Brain Barrier.  
*Pharmaceutics*. 13(1):38. (2021)  
IF: 6,525
- III. Veszelka S, Mészáros M, **Porkoláb G**, Szecskó A, Kondor N, Ferenc G, Polgár TF, Katona G, Kóta Z, Kelemen L, Páli T, Vigh JP, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA.  
A Triple Combination of Targeting Ligands Increases the Penetration of Nanoparticles across a Blood-Brain Barrier Culture Model.  
*Pharmaceutics*. 14(1):86. (2022)  
IF: 5,4



- IV. Váczai 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: 3,3
- 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  $\alpha$ -Synuclein from an In Vitro Model.  
*Cells*. 11(16):2584. (2022)  
IF: 6,0
- VI. Veszelka S, Mészáros M, **Porkoláb G**, Rusznyák Á, Réti-Nagy KS, Deli MA, Vecsernyés M, Bácskay I, Váradi J, Fenyvesi F.  
Effects of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on Cultured Brain Endothelial Cells.  
*Molecules*. 27(22):7738 (2022)  
IF: 4,6
- VII. Deli MA, **Porkoláb G**, Kincses A, Mészáros M, Szecskó A, Kocsis AE, Vigh JP, Valkai S, Veszelka S, Walter FR, Dér A.  
Lab-on-a-chip models of the blood–brain barrier: evolution, problems, perspectives  
*Lab on a Chip*. 24, 1030-1063 (2024)  
IF: 6,1

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Deli Máriának és Dr. Veszelka Szilviának a munkám során nyújtott szakmai irányításért, folyamatos támogatásukért és tanácsaikért.

Szeretném megköszönni a HUN-REN SZBK Biológiai Barrierék Kutatócsoport jelenlegi és egykori munkatársának – Dr. Hoyk Zsófiának, Dr. Walter Fruzsínának, Dr. Bocsik Alexandrának, Dr. Harazin Andrásnak, Dr. Mészáros Máriának, Dr. Ana Raquel Pato Santa Mariának, Dr. Gróf Ilonának, Dr. Barna Lillának, Barabási Beátának, Szecskó Anikónak és a csoport tudományos diákkörös hallgatóinak – a mindennapi nyitott, baráti légkört és a rengeteg szakmai támogatást, segítséget.

Köszönöm Prof. Nagy Ferencnek, a HUN-REN SZBK főigazgatójának, Prof. Zimányi Lászlónak, a HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet igazgatójának és Prof. Siklós Lászlónak, HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegység vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani együttműködő partnereinknek, akik lehetővé tették a közös munkák létrejöttét: Dr. Vizsnyiczai Gaszton, Dr. Szegletes Zsolt és Polgár Tamás (HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet), Kokavszky Katalin, Dr. Purity Melinda, Dr. Blastyák András és Dr. Mátés Lajos (HUN-REN SZBK Genetikai Intézet), Dr. Ferenc Györgyi (HUN-REN SZBK Növénybiológiai Intézet), Dr. Tóth András és Dr. Rákhely Gábor (SZTE Biotechnológiai Tanszék), Dr. Kálomista Ildikó és Dr. Vastag Mónika (Richter Gedeon Nyrt. *In Vitro* Metabolizmus Laboratórium), Thi Ha My Phan és Prof. Jeng-Shiung Jan (National Cheng Kung University, Tajvan), Dr. Silvia Bolognin és Prof. Jens Schwamborn (University of Luxembourg, Luxemburg), Prof. Fabien Gosselet (Université d'Artois, Franciaország), Dr. Natalie Hudson és Prof. Matthew Campbell (Trinity College Dublin, Írország).

Köszönöm a Nemzeti Tudósképző Akadémiának, az Új Nemzeti Kiválóság Programnak, a Stephen W. Kuffler Kutatási Alapítványnak és a Tempus Közalapítványnak az elmúlt négy évben nyújtott támogatást.

Végül szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak, hogy végig mellettem álltak és támogattak.

## TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Kijelentem, hogy ismerem **Porkoláb Gergő** PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „**Humán vér-agy gát modell tulajdonságainak erősítése gyógyszerek és nanorészecskék vizsgálatához**” című disszertációját.

Felelős szerzőként kijelentem, hogy Porkoláb Gergő jelentősen hozzájárult az alább felsorolt tudományos publikációk eredményéhez.

- I. **Porkoláb G**, Mészáros M, Szecskó A, Vigh JP, Walter FR, Figueiredo R, Kálomista I, Hoyk Z, Vizsnyiczai G, Gróf I, Jan JS, Gosselet F, Pirity MK, Vastag M, Hudson N, Campbell M, Veszelka S, Deli MA.  
Synergistic induction of blood-brain barrier properties.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (megjelenés alatt, 2024)  
Preprint: bioRxiv. 2023.02.09.527899.  
IF: 11,1
- II. **Porkoláb G**, Mészáros M, Tóth A, Szecskó A, Harazin A, Szegletes Z, Ferenc G, Blastyák A, Mátés L, Rákhely G, Deli MA, Veszelka S.  
Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit.  
*Pharmaceutics*. 12(7):635. (2020)  
IF: 6,321
- III. Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, **Porkoláb G**, Kocsis A, Páli EK, Polgár TF, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, Veszelka S.  
Targeting Human Endothelial Cells with Glutathione and Alanine Increases the Crossing of a Polypeptide Nanocarrier through a Blood-Brain Barrier Model and Entry to Human Brain Organoids.  
*Cells*. 12(3):503. (2023)  
IF: 6,0

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, 2024. április 9.



Prof. Deli Mária

kutatóprofesszor

HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet