



**A vér-agy gát morfológiai és funkcionális változásai  
hipertrigliceridémiában**

**Ph.D. értekezés**

**Barabási Beáta**

**Témavezetők:**

Prof. Deli Mária, kutatóprofesszor

Dr. Zsófia Hoyk, tudományos munkatárs

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizika Intézet

Biológiai Barrierék Kutatócsoport

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem



**Szeged**

**2024**

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Tézishez kapcsolódó közlemények:

**I. Barabási B**, Barna L, Santa-Maria AR, Harazin A, Molnár R, Kincses A, Vigh JP, Dukay B, Sántha M, Tóth ME, Walter FR, Deli MA, Hoyk Z. Role of interleukin-6 and interleukin-10 in morphological and functional changes of the blood-brain barrier in hypertriglyceridemia. *Fluids Barriers CNS*. 2023 Mar 7;20(1):15. doi: 10.1186/s12987-023-00418-3 (IF<sub>2022-2023</sub>: 7.3, folyóirat rangsor: D1)

**II.** Hoyk Z, Tóth ME, Lénárt N, Nagy D, Dukay B, Csefová A, Zvara Á, Seprényi G, Kincses A, Walter FR, Veszélka S, Vigh J, **Barabási B**, Harazin A, Kittel Á, Puskás LG, Penke B, Vigh L, Deli MA, Sántha M. Cerebrovascular Pathology in Hypertriglyceridemic APOB-100 Transgenic Mice. *Front Cell Neurosci*. 2018 Oct 25;12:380. doi: 10.3389/fncel.2018.00380. (IF<sub>2018</sub>: 3.9, folyóirat rangsor: Q1)

### Tézishez nem kapcsolódó közlemények:

**I. Barabási B**, Csondor A, Martín-Pozas T, Pulupa Sánchez AM, Antalffy G, Siklós L, Gómez-Pinedo U, Párducz Á, Hoyk Z. Effect of axotomy and 17 $\beta$ -estradiol on P2X7 receptor expression pattern in the hypoglossal nucleus of ovariectomized mice. *Neuroscience*. 2016 Apr 5;319:107-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.049. (IF<sub>2016</sub>: 3.277, folyóirat rangsor: Q1)

**II.** Dukay B, Walter FR, Vigh JP, **Barabási B**, Hajdu P, Balassa T, Migh E, Kincses A, Hoyk Z, Szögi T, Borbély E, Csoboz B, Horváth P, Fülöp L, Penke B, Vigh L, Deli MA, Sántha M, Tóth ME. Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury. *J Neuroinflammation*. 2021 Jan 10;18(1):22. doi: 10.1186/s12974-020-02070-2. (IF<sub>2021</sub>: 9.589, folyóirat rangsor: Q1)

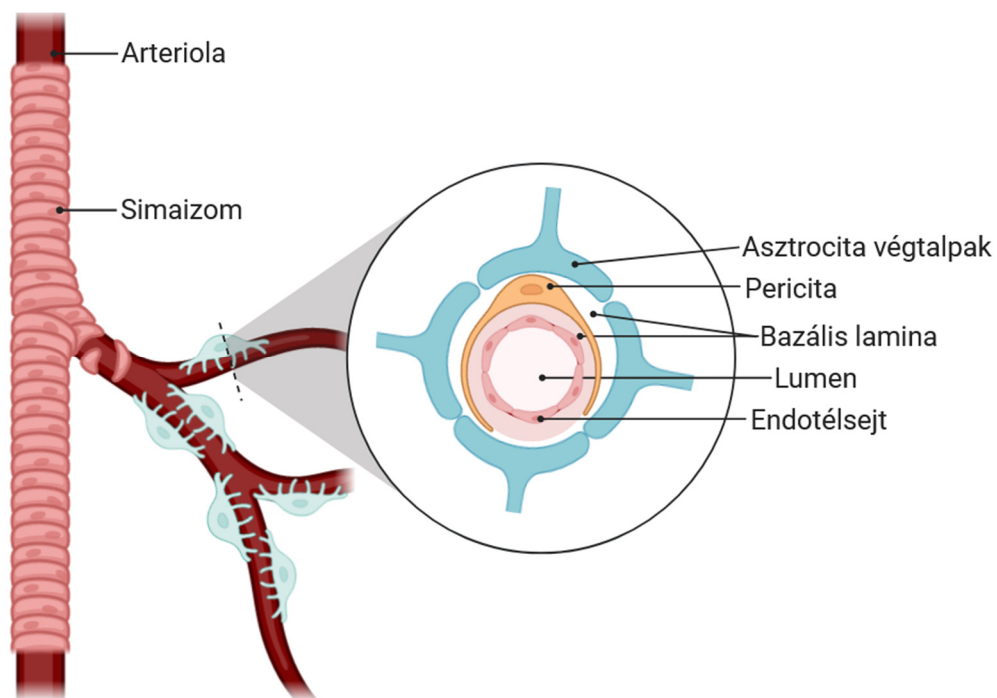
**Kumulatív impakt faktor:** 24.066

## 1. Bevezetés

A hiperlipidémia, mely a véráramban lévő zsírok emelkedett szintjével jellemezhető, szoros kapcsolatban áll számos szisztémás kórállapottal, különösen a szív- és érrendszeri betegségekkel, valamint jelentős szerepet játszik a neurodegeneratív kórképek kialakulásában is. A lipidek, beleértve a koleszterint és a triglicerideket, vízben való oldhatatlanságuk miatt a vérplazmában lipoprotein komplexekben szállítódnak. Ezek a komplexek egy hidrofób magot tartalmaznak, amely a lipideket foglalja magában. Körülöttük egy hidrofil külső héj található, ami foszfolipidekből és fehérjékből áll, ez biztosítja a vérben való oldódást. A komplexek fehérje összetevője, különösen az apolipoprotein B-100 (APOB-100), kulcsfontosságú a komplexek stabilitásában és a sejtekkel való kölcsönhatásban. Az APOB-100 elsősorban az alacsony sűrűségű lipoproteinnel (LDL) és a nagyon alacsony sűrűségű lipoproteinekkal (VLDL) társul, amelyek a koleszterin szállításában játszanak fontos szerepet. Az emelkedett LDL-szintek a vérben segítik az érlemezés kialakulását: az artériák falai megvastagodnak a lipidek és az immunsejtek felhalmozódása következtében, és ez plakkok képződéséhez vezet. Ezt a folyamatot súlyosbítja az LDL-részecskék oxidációja az erek falában, ami gyulladással válaszok sorozatát váltja ki. Ez a gyulladással a folyamat az endotélsejtek felszínén sejtheadhéziós molekulák kifejeződésével jár, amelyek segítik a monociták kitapadását. Az erek falában a monociták makrofágokká alakulnak, felveszik az oxidált LDL-t, ettől lipid-dús habsejteké válnak, és növelik a plakk stabilitását és méretét. A magas lipid szintek és az érlemezés kialakulása, valamint a kapcsolódó agyi érrendszeri változások rámutatnak, hogy a szisztémás lipid rendellenességek hogyan ronthatják az agyi funkciókat és segíthetik elő a neurodegeneratív elváltozásokat. Ez egyben azt is jelzi, hogy a metabolikus, érrendszeri és neurológiai egészség szorosan összekapcsolódik.

Az érlemezéses léziókban a makrofágok és simaizomsejtek termelik a gyulladást kiváltó interleukin-6 (IL-6) citokint, ami endotél diszfunkciót okoz. Az érsejtek a tumor nekrozis faktor (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 és IL-15 termelésével elősegítik gyulladással kapcsolatos folyamatokat, míg főleg a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  termelésével kifejezett gyulladáscsökkentő hatást gyakorolnak. Az IL-10 olyan citokin, ami az érlemezésben gyulladáscsökkentő szerepet játszik. Elsősorban makrofágok, T- és B-limfociták termelik, és nagyon kis mennyiségben az agyi kapilláris endotélsejtek is. A hiperlipidémia összefügg a szisztémás gyulladással még szív- és érrendszeri elváltozások nélkül is. A magas trigliceridszinttel rendelkező betegekben megnövekedett TNF- $\alpha$  és IL-6 szintet mértek. A szisztémás

gyulladás szintén befolyásolja az agyat és annak érrendszerét, károsítva azok működését. A hiperlipidémia által létrehozott patológiai változások tanulmányozásához Dr. Sántha Miklós csoportja a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban egy állatmodellt hozott létre 2005-ben. Ez az állatmodell egy transzgenikus egérvonal, amely különböző szöveteiben, mint a máj, a szív és az agy, túltermeli az emberi APOB-100 fehérjét. Az APOB-100 transzgenikus egerekben jelentősen megemelkedik a szérum triglicerid- és koleszterinszint normál és koleszterinben gazdag étrend mellett. Továbbá, az APOB-100 transzgenikus egerek agyában különböző neurodegeneratív folyamatokat lehetett kimutatni. Széles körű idegsejtpusztulás, és a kortikális és hippokampális neuronok apoptózisa figyelhető meg ebben a modellben. Az APOB-100 túltermelése összefüggést mutatott az emelkedett lipid-peroxidáció szintjével a kortikális és hippokampális agyterületeken, valamint a kognitív funkciók károsodásával. A hiperlipidémia okozta megfigyelt kóros agyi elváltozások az Alzheimer-kór jól ismert jellemzői. Több neurodegeneratív betegségben is (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, multiplex szklerózis) igazolták az agyi érrendszeri funkciók károsodását, beleértve az agyszövet és a keringő vér között dinamikus határfelületet alkotó vér-agy gát (BBB) működésének zavarát.



**1. ábra.** Az érett vér-agy gát sejtalkotói a szoros, összefüggő egysejtréteget alkotó endotélsejtek, az alapmembrán, valamint a környező periciták és az asztroglia végtalpak.

Az érett vér-agy gát szorosan kapcsolódó, egybefüggő sejtréteget alkotó endotélsejtekből, alapmembránból, és ezeket körbeölelő pericitákból és asztroglia végtalpából áll (1. ábra). Az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak (tight junction: TJ) két meghatározó transzmembrán fehérjéje a klaudin-5 és az okkludin, ezek szabályozzák a paracelluláris permeabilitást. Az anyagok átjutását a BBB-n keresztül különféle transzportrendszerek szabályozzák. A tápanyagok agyi bejutását főként az SLC (solute carrier) fehérjék végzik. A toxikus molekulák bejutását az aktív efflux pumpák akadályozzák meg. Ilyen például a P-glikoprotein (P-gp), amely a BBB kémiai védelmi működésében létfontosságú, de ismert, hogy gyulladáshoz és neurodegeneratív folyamatok károsíthatják a működését. A BBB integritása és működése az endotélsejtek, az asztrociták és a periciták közötti kölcsönhatásokon alapul. Az asztrociták perivaszkuláris végtalpain nagymértékben fejeződik ki a vízcsatorna aquaporin 4 (AQP4), ami fokozza az agy és a vér közötti vízcserét, ezért döntő fontosságú a központi idegrendszer homeosztázisában. A neuroinflammáció azonban csökkentheti az aquaporin 4 expresszióját, ami ronthatja a BBB működését.

Az idegi gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok komplex választ hoznak létre: a neurovaszkuláris egység különböző sejtjei gyulladáshoz fokozó és csökkentő citokineket termelhetnek. Az asztrocita és a pericita sejtek gyulladáshoz citokineket, például TNF- $\alpha$ -t és IL-6-ot állítanak elő. Ezek a citokinek olyan betegségek kialakulásában vesznek részt, mint az atheroszklerózis, és szintjük megemelkedik olyan betegségekben, mint az Alzheimer-kór és a szklerózis multiplex, ami arra utal, hogy szerepük van a neurodegeneráció létrejöttében. Az agyi erek közelében lévő mikroglia sejtjeit is befolyásolhatják a citokinek és azok is termelhetik őket, ezzel megváltoztatva az agyi véráramlást és a BBB működését. A proinflammatorikus citokinekkal szemben az IL-10-hez hasonló gyulladáscsökkentő citokinek enyhíthetnek bizonyos gyulladáshoz válaszokat. Mivel a különböző hatású citokinek és az azokat termelő neurovaszkuláris sejtek között komplex kölcsönhatás áll fenn, a vaszkuláris gyulladás, a BBB működése, és a neurodegeneráció közötti kapcsolat részletei továbbra is kevésbé ismertek.

## **2. Célkitűzések**

Célunk az volt, hogy tanulmányozzuk az APOB-100 transzgenikus egerekben a vér-agy gáttal kapcsolatos szerkezeti és működésbeli változásokat, amelyek felfedhetik a hipertrigliceridémia által kiváltott, neurodegenerációhoz vezető patológiai folyamatokat.

A molekuláris és sejtes mechanizmusokat illetően két citokin vizsgálatára koncentráltunk: az érlemeszesedésben is szerepet játszó proinflammatorikus IL-6 hatásait az agyi endotél- és gliasejtek jellemzőire vizsgáltuk, míg a gyulladáscsökkentő citokin IL-10 esetében a lehetséges védőhatást tanulmányoztuk. Kutatási munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

APOB-100 egerekben

- van-e változás kis és nagyméretű jelzőanyagok átjutásában a vér-agy gáton keresztül az agykéregben és a hippokampuszban?
- változik-e a kulcsfontosságú BBB gének és az IL-6 és IL-10 citokinek kifejeződése az agyi mikroerekben?
- van-e változás az okkludin, klaudin-5 és P-gp immunfestésében az agykéregben és a hippocampusban?

Van-e különbség az IL-6 és IL-10 hatása között

- vad típusú (WT) és APOB-100 egerek agyi endotélsejteinek növekedésére, életképességére és sejtsűrűségére?
- WT és APOB-100 egerekből származó tenyészetes ko-kultúra BBB modell permeabilitására és efflux pumpa aktivitására?
- WT és APOB-100 egerek agyi endotélsejtjeinek okkludin, klaudin-5 és P-gp immunfestésére?
- WT és APOB-100 egerek mikroglia és asztroglia tenyészetek sejtűrségére?

### **3. Módszerek**

Számos kísérleti technikát alkalmaztunk a vér-agy gát szerkezeti és működésbeli változásainak feltárására hipertrigliceridémias körülmények között.

#### ***In vivo* vizsgálatok**

A hipertrigliceridémias modell validálására meghatározott időközönként mértük az állatok szérum triglicerid és koleszterin szintjeit. A BBB gátműködését kis- és nagymolekulájú jelzőanyagok átjutásával mértük, amelyekkel a paracelluláris és transzcelluláris utakon történő változást egyaránt követni tudtuk. A funkcionális változások megerősítésére

morfológiai vizsgálatokat végeztünk immunhisztokémia segítségével, hogy a kiválasztott BBB fehérjék kifejeződését és lokalizációját láthatóvá tegyük.

### ***In vitro* vizsgálatok**

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a BBB strukturális integritását és működését befolyásoló sejtszintű mechanizmusokat és kölcsönhatásokat, agyi endotélsejteket, valamint asztrocitákat és mikroglia sejteket tartalmazó tenyészeteket készítettünk. Impedancia-méréssel követtük az agyi endotélsejtek növekedésének kinetikáját, és a 24 órás citokin kezelés hatását. A funkcionális BBB vizsgálatok során a transzendenteliális elektromos ellenállást (TEER) és a jelzőanyagok átjutását tenyészetes agyi endotélsejt és gliasejt kultúra BBB modellen mértük, míg a P-glikoprotein efflux pumpa aktivitását fluoreszcens marker segítségével követtük. A citokinek hatását asztrocitákat és mikroglia sejteket tartalmazó tenyészeteken is megvizsgáltuk. A funkcionális méréseket követően morfológiai vizsgálatokkal igazoltuk a BBB működésében kulcsfontosságú fehérjék kifejeződésének változását mind az endotélsejtekben, mind a gliasejtekben.

### ***Ex vivo* vizsgálatok**

A vér-agy gát funkcionális és morfológiai állapotának további vizsgálatára hipertrigliceridémiában agyi mikroereket izoláltunk, és a TJ fehérjék, az AQP4 és a P-gp immunfestésének mintázatát elemeztük. Emellett kvantitatív valós idejű PCR segítségével mértük a BBB szerkezeti felépítésében és működésében fontos néhány kiválasztott gén kifejeződését.

### **Kép- és statisztikai analízis**

Az immunfestési minták kvantifikálásához képanalízist alkalmaztunk (ImageJ, Matlab). Az eredmények statisztikai kiértékeléséhez kétutas variancia analízist és Bonferroni post hoc tesztet használtunk (GraphPad Prism 5.0). Azoknál az adatsoroknál, ahol nem találtunk Gauss-eloszlást, Kruskal–Wallis és Dunn többszörös összehasonlító teszteket alkalmaztunk.

## 4. Eredmények

### 4.1. Krónikus hipertrigliceridémia az APOB-100 transzgenikus egerekben

Az APOB-100 transzgenikus egerek szérum triglicerid szintje különböző életkorokban (7, 9 és 12 hónapos kor) következetesen magasabb volt a WT egerekhez képest. Ez a krónikus hipertrigliceridémia igazolta az emberi APOB-100 gén hatékony kifejeződését, ami lipid anyagcsere zavarokat hozott létre az egerekben.

### 4.2. A vér-agy gát integritásának károsodása: in vivo permeabilitás mérések

Az vér-agy gát funkcionális integritását két különböző méretű jelzőmolekula átjutásával mértük. A vízdékony kis molekula fluorescein a sejtek közötti, vagy paracelluláris úton jut át, míg a nagy molekula Evans kék-albumin komplex a sejteken keresztüli, úgy nevezett transzcelluláris útvonalon. Szignifikáns növekedést mértünk a vér-agy gát áteresztőképességében fluoresceinre ( $p < 0,05$ ) a transzgenikus egerek hippocampális régiójában, míg a szérumfehérje albumin átjutása az erekből az agyszövetbe nem változott. A transzgenikus egerek agykérgében a BBB áteresztőképessége egyik jelzőmolekulára sem változott a WT csoporthoz képest.

### 4.3. A vér-agy gát gének kifejeződésének változása

A kvantitatív PCR-analízis betekintést nyújtott a vér-agy gát változások molekuláris hátterébe a hipertrigliceridémiás egerekben. Szignifikáns mértékben csökkent a *Meox2* gén kifejeződése, amely kritikus szerepet játszik a vér-agy gát integritásának fenntartásában. Hasonlóképpen, jelentősen lecsökkent az *Mfsd2a* kifejeződése, amely egy kulcsfontosságú BBB lipid transzporter. Ezek a változások a vér-agy gát szerkezeti elemeit és lipid transzportját szabályozó folyamatok felborulását jelzik. Ezzel szemben megemelkedett a *Lox-1* gén szintje, ami az oxidált LDL-re adott oxidatív stresszválaszban játszik szerepet. Ez az expressziós változás adaptív válasz lehet a megnövekedett lipid peroxidációra a transzgenikus egereknél. A lipid transzporttal és TJ integritással kapcsolatos gének, mint az *Lrp1*, *Lrp2*, valamint a P-glikoproteint kódoló *Abcb1a* és *Abcb1b* gének megváltozott kifejeződése további megerősítése a korábbi eredményeknek, hogy a lipid-anyagcsere változása a vér-agy gát működési zavarához, sérüléséhez vezet.



#### **4.4. Az ateroszklerotikus folyamatokban részt vevő kulcsfontosságú citokineket kódoló gének expressziós szintjei**

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a hipertrigliceridémiától a vér-agy gát működési zavaráig vezető molekuláris mechanizmusokat, qPCR segítségével megmértük az IL-6, egy az érlemezés elősegítésében részt vevő citokin, valamint az IL-10, egy potenciálisan IL-6 antagonist citokin génexpresszióját izolált agyi mikroerekben és agyszövetben. Az *IL-6* jelentősen magasabb kifejeződést mutatott az agyi mikroerekben az agykéreghez képest transzgenikus APOB-100 egerekben. Az IL-10 gén kifejeződése minden mintában a kimutatási határ alatt maradt.

#### **4.5. A kulcsfontosságú vér-agy gát fehérjék immunhisztokémiai festésődése**

A BBB szorosságát befolyásoló legfontosabb fehérjék, a klaudin-5 és az okkludin kifejeződésének és lokalizációjának vizsgálatára a hippokampális és kortikális régiókban immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A génexpressziós változások ellenére a konfokális mikroszkópiával megfigyelt fehérjeexpressziós minták nem mutattak jelentős különbségeket a festés intenzitásában vagy a fehérjék lokalizációjában a transzgenikus és a WT egerek között. Ez a megfigyelés arra utal, hogy poszttranszlációs mechanizmusok vagy kompenzációs válaszok mérsékelhetik a transzkripciós változások hatását a fehérjeeloszlásra agyi mikroerekben.

#### **4.6. Sejttenyésztések és életképességi vizsgálatok**

A sejttenyésztési vizsgálatok a transzgenikus és a WT egerekből származó agyi endotélsejtek életképességére és funkcionális jellemzőire összpontosítottak. Kísérleteink hozzájárultak a citokinek közvetlenül az egyes sejt típusokra gyakorolt hatásának, illetve az IL-6 és az IL-10 hiperlipidémiás körülmények között az endoteliális sejt válaszok modulálásában betöltött szerepének azonosításához. Az IL-6 citokin kezelés a sejtek életképességének csökkenését eredményezte, amit az IL-10 hatékonyan gátolt, ezzel is igazolva gyulladási állapotokban betöltött védő szerepét.

#### **4.7. Agyi endotélsejtek működésének vizsgálata**

Az agy endotélsejtek kulcsfontosságú funkcióit, például a gát integritását TEER és permeabilitási tesztekkel, valamint P-gp aktivitási vizsgálatokkal értékeltük tenyésztéses BBB modellekben. Az APOB-100 transzgenikus állatokból származó agyi endotélsejtek és

gliasejtek együttes tenyésztésével létrehozott BBB modell gátműködése gyengébb volt, csökkent TEER értékeket mutatott a WT modellhez képest, citokin kezeléssel vagy anélkül. Az IL-6 jelentősen csökkentette a TEER-t a transzgenikus modellben. Az IL-10 önmagában nem változtatta meg a TEER értékeket, de nem mutatott védőhatást sem. A WT BBB modell esetében a citokinkezelések csökkentették a TEER-t. A fluoreszcein permeabilitása minden csoportban magasabb volt az APOB-100 modellben, mint a WT-ben. Az IL-6 növelte a paracelluláris permeabilitást a WT, de még inkább a transzgenikus modellben. Az IL-10 önmagában nem befolyásolta a transzgenikus modell permeabilitását, és nem mérsékelte az IL-6 hatásait. A WT sejtekben az IL-10 önmagában növelte a permeabilitást, és nem befolyásolta az IL-6 hatását. A P-gp aktivitása csökkent az APOB-100 sejtekben, amit a megnövekedett R123 felvétel jelez. WT agyi endotélsejtekben nem figyeltünk meg citokin hatást. A transzgenikus endotélsejtekben a citokinek a P-gp aktivitását megemelték.

#### **4.8. Az endotélsejtek morfológiájának elemzése**

A morfológiai vizsgálatok során a P-gp és a TJ fehérje klaudin-5, okkludin és ZO-1 immunfestését tanulmányoztuk primer agyi endotélsejt tenyészetekben. A P-gp csökkent immunfluoreszcencia intenzitást mutatott transzgenikus és WT sejtekben kontroll körülmények között, a citokin kezelések pedig megváltoztatták a P-gp intenzitását. Az IL-6 csökkentette, az IL-10 pedig növelte a P-gp festődést transzgenikus sejtekben, az IL-10 pedig az IL-6 hatásait is ellensúlyozta. A citokin kezelések változóan befolyásolták ezeknek a fehérjéknek a fluoreszcencia intenzitását, az IL-6 és IL-10 pedig genotípus-specifikus módon befolyásolta expressziójukat. Citokinkezelést követően mindkét genotípusban megnövekedett a ZO-1 festési intenzitása, és megemelkedett a ZO-1 lokalizációja is a sejtek citoplazmájában (2. ábra).

#### **4.9. Citokin hatása tenyésztett gliasejtekre**

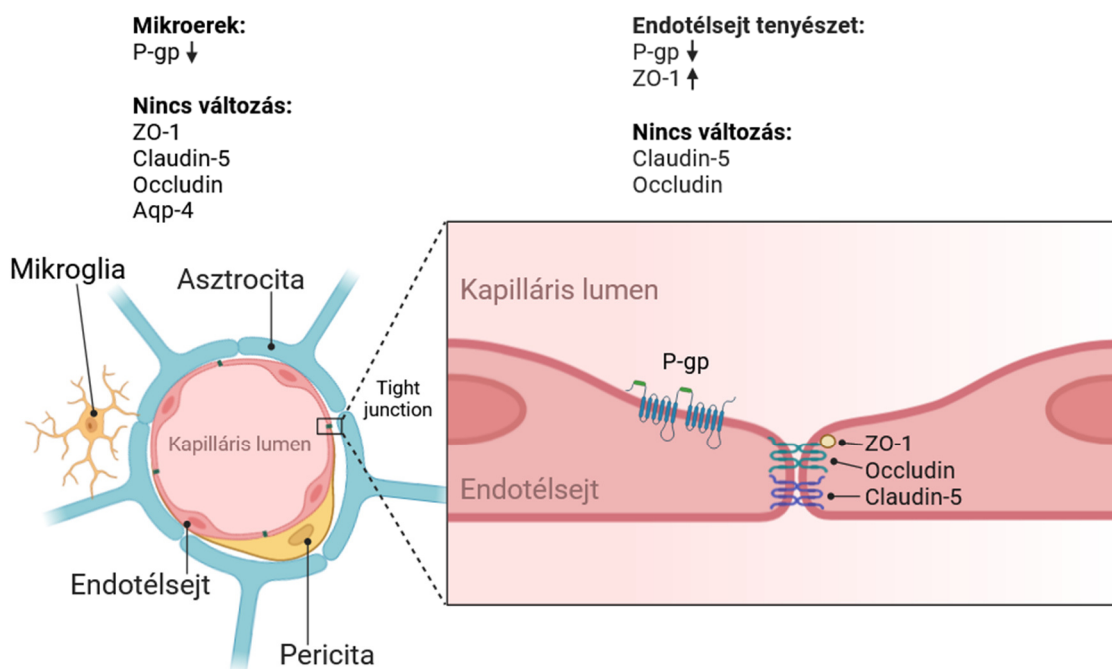
Az APOB-100 és WT egerekből származó asztrocita és mikroglia sejteket tartalmazó tenyészetekkel végzett kísérletekben nem mértünk változást az asztrocita sejtek sűrűségében. A mikroglia denzitást az IL-6 megnövelte, míg az IL-10 csökkentette a WT tenyészetekben. Az asztrocita/mikroglia sejtarány stabil volt a transzgenikus tenyészetekben, de IL-6 kezelés hatására csökkent a WT sejt kultúrákban. Az asztrocita végtalp-marker AQP4 nem mutatott genotípus-különbséget kontroll körülmények között, és a sejtes lokalizációja egybeesett az S100b fehérjéével. Az AQP4 immunfluoreszcencia

megnövekedett a transzgenikus asztrocitákban az IL-6 kezelést követően, ezt a hatást nem figyeltük meg a kombinált IL-6 és IL-10 kezelésnél.

#### 4.10. Agyi mikroerek morfológiai vizsgálata

Izolált agyi mikroerekben a P-gp, a klaudin-5, az okkludin és a ZO-1 immunfestése hasonló mintázatot és területi frakciókat mutatott a genotípusok között kontroll körülmények között. A citokin kezelések megváltoztatták a P-gp és az AQP4 expresszióját a WT mikroerekben, és az IL-10 befolyásolta az IL-6 hatásokat. A transzgenikus egerek mikroerei nem mutattak citokin által kiváltott változást az AQP4 területfrakciójában, még kombinált IL-6 és IL-10 kezelés mellett sem (2. ábra).

#### WT és APOB-100 mikroerek és tenyésztett endotélsejtek összehasonlítása citokin kezelés nélkül



**2. ábra** A vér-agy gát funkcionális és morfológiai változásainak összehasonlítása WT és APOB-100 egerekben.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. In vivo kísérletek és krónikus hipertrigliceridémia

A krónikus hipertrigliceridémia kimutatása APOB-100 transzgenikus egerekben alapot teremtett az emelkedett szisztémás lipidszintek agyi érrendszeri integritásra gyakorolt hatásainak feltárásához. A transzgenikus egerekben a WT csoporthoz képest folyamatosan

magasabb trigliceridszintek nemcsak a modellt igazolják, hanem kiemelik a trigliceridek szerepét az érrendszeri betegségek kiváltásában. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a hipertrigliceridémia a vér-agy gát tulajdonságait olyan mechanizmusokon keresztül változtathatja meg, mint a fokozott oxidatív stressz és a gyulladás, amelyek hozzájárulnak a metabolikus szindrómában gyakran megfigyelhető endotélsejt diszfunkcióhoz.

## **5.2. A vér-agy gát permeabilitása és integritása**

A kutatásunk eredményei a vér-agy gát átteresztőképességével kapcsolatban megerősítik azt az elképzelést, hogy a hipertrigliceridémia károsítja a gátfunkciót, elsősorban a szoros kapcsolatokon keresztül, amelyek a paracelluláris utat szabályozzák. A kis- és nagy molekulák különböző átjutása a vér-agy gáton feltehetően egy enyhe fokú károsodásra utal a szoros kapcsolatok működésében, ami nem okoz olyan fokú megnyílást, hogy a nagy szérumfehérjék szabadon bejussanak az agyba. Ez a szelektív károsodás segíthet annak megértésében, hogy a lipidek hogyan fokozzák a neurodegeneratív betegségek súlyosbodását, ahol a neurotoxikus anyagok agyi bejutását hasonló mechanizmusok okozhatják.

## **5.3. A vér-agy gát gének kifejeződése**

A munkánk során kapott génexpressziós változások molekuláris betekintést nyújtanak a vér-agy gát működési zavarát okozó kóroki folyamatokba hipertrigliceridémiában. A *Meox2* és az *Mfsd2a* gének kifejeződésének csökkenése központi jelentőségű, mert ezek a gének létfontosságúak a vér-agy gát felépítésének és működésének fenntartásához. A *Meox2* szabályozza az endotélsejtek osztódását és az érfejlődést, és csökkent kifejeződése az érrendszeri stabilitás és átrendeződés károsodásához vezethet. Hasonlóképpen, az esszenciális zsírsavak vér-agy gáton keresztüli szállításához nélkülözhetetlen *Mfsd2a* csökkent kifejeződése arra utal, hogy az agyi lipid homeosztázis súlyosan károsodik hiperlipidémiás állapotban. A magas lipid szintek hatására megnőtt *Lox-1* gén kifejeződés az endotélsejtek oxidatív stresszre adott adaptív válaszának tekinthető, ami azonban potenciálisan súlyosbíthatja a gyulladásos válaszokat. Az LDL receptorral kapcsolatos fehérjék (*Lrp1* és *Lrp2*) és a P-gp génjeinek változásai a vér-agy gát védelmi szerepének fenntartása érdekében történhetnek a lipid-indukálta stresszben.

#### 5.4. Következmények neurodegeneratív betegségekre nézve

A vér-agy gát integritásának és működésének zavara mélyreható következményekkel jár a neurodegeneratív betegségek, például az Alzheimer- és a Parkinson-kór patogenezisében. A vér-agy gát megváltozott permeabilitása, védelmi és transzport mechanizmusai elősegíthetik a neurotoxikus fehérjék, például a béta-amiloid felhalmozódását az agyszövetben. Emellett az emelkedett IL-6 citokin szinttel jellemzett gyulladásos környezet súlyosbíthatja a neurodegenerációt azáltal, hogy fokozza a gliasejtek aktiválódását és az ezt követő gyulladáskeltő mediátorok felszabadulását.

#### 5.5. Az IL-10 protektív szerepe

A citokinekkal kapcsolatos vizsgálatok feltárták az agyi endotélsejtek életképességében és működésében a gyulladáscsökkentő IL-10 védő hatását a gyulladáskeltő IL-6 károsító hatásaival szemben. Mivel az IL-10 képes ellensúlyozni az IL-6 hatásait, felmerül esetleges terápiás szerként való alkalmazása olyan állapotokban, amikor a gyulladás hozzájárul a betegség patológiájához. A gyulladásos válasz befolyásolásával az IL-10 nemcsak megvédi az agyi endotélsejtek integritását, hanem biztosítja a BBB megfelelő működését stressz körülmények között is.

### 6. Összefoglalás

A hipertrigliceridémia komoly kockázati tényező a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában, és hozzájárul az érlemeszesedés által okozott gyulladásos folyamatokhoz, a vér-agy gát (BBB) működési zavaraihoz és a neurodegeneráció kialakulásához. Kutatásunkban krónikus hipertrigliceridémiás APOB-100 transzgenikus egereket használtunk annak vizsgálatára, hogy milyen cerebrovaszkuláris változások, BBB funkciók és morfológiai jellemzők figyelhetők meg *in vivo*, *in vitro* és *ex vivo* körülmények között. Azt tanulmányoztuk, hogy az érlemeszesedést elősegítő IL-6 citokin milyen BBB változásokat hoz létre, és hogy a gyulladáscsökkentő IL-10 citokin ellensúlyozza-e ezeket a hatásokat.

Igazoltuk a krónikus hipertrigliceridémiát 7, 9 és 12 hónapos APOB-100 transzgenikus állatokban. Megállapítottuk, hogy a BBB átteresztőképessége megnövekedett a hippokampuszban, ami morfológiai változásokkal járt együtt. Az APOB-100 transzgenikus állatokból izolált agyi mikroerekből megnövekedett *Lox-1* és csökkent *Meox-2*, *Mfsd2a*, *Abcb1a*, *Lrp2*, *Glut-1* génexpressziót mértünk kvantitatív valós idejű PCR segítségével. Az

IL-6 mRNA szintje magasabb volt az izolált agyi mikroerekben, mint az agyszövetben. A csökkent *Abcb1a* génexpresszió a P-gp fehérjeszinten is megfigyelhető volt, amint azt transzgenikus agyi régiók immunhisztokémiai elemzése és konfokális mikroszkópia is igazolta, míg az okkludin és klaudin-5 TJ fehérjéknél nem tapasztaltunk változást az immunfestés mintázatában.

A következő kísérletsorozatunkban funkcionális és morfológiai különbségeket mutattunk ki a WT és az APOB-100 agyi endotélsejtek között kontroll körülmények között. A tenyészetes vér-agy gát modellekben a funkcionális jellemzők, mint az elektromos ellenállás, az áteresztőképesség és a P-gp aktivitás érzékenyek voltak az IL-6 és IL-10 citokin kezelésekre, de antagonisztikus hatást nem figyeltünk meg. Ezzel szemben az IL-6 kezelést követően az agyi endotélsejtek sűrűségének és P-gp immunfluoreszcencia intenzitásának csökkenését mindkét genotípusban az IL-10 ellensúlyozta. IL-6 kezelésre az APOB-100 agyi endotélsejtekben csökkent a klaudin-5, míg a WT glia tenyészetben az AQP4 fluoreszcencia intenzitásának növekedett, valamint az asztroglia/mikroglia sejtarány csökkent. Ezeket az IL-6 által létrehozott változásokat szintén ellensúlyozta az IL-10. Az izolált agyi mikroerek általában, és az APOB-100 mikroerek különösen, kevésbé reagáltak a citokin kezelésekre, mint a sejttenyészetek. Ebben az ex vivo rendszerben az IL-6 a P-gp, ZO-1 és AQP4 immunfestett területek arányának csökkenését eredményezte WT mikroerekben. Az AQP4 immunfestett terület arányának csökkenését kivédte az IL-10 kezelés. WT mikroerekben az IL-10 gyulladáscsökkentő citokinnel történő kezelést követően csökkenést figyeltünk meg a P-gp és ZO-1 immunfestett területek arányában, és az IL-6 és IL-10 citokinek között antagonisztikus hatást nem tapasztaltunk. Jelen eredményeink leírják azokat a BBB jellemzőket, amelyek érzékenyek az IL-6 vagy IL-10 hatásaira, és először mutatják ki, hogy az IL-10 legalább részben kivédheti az IL-6 által okozott BBB károsodást.

## **7. Konklúzió**

Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a krónikus hypertrigliceridemiás APOB-100 transzgenikus egerekben mind funkcionális, mind morfológiai cerebrovaszkuláris elváltozások megfigyelhetők. Ezért ez az állatkísérletes modell hasznos eszköz lehet a vaszkuláris eredetű neurodegeneratív betegségek és a cerebrovaszkuláris károsodás közötti összefüggések tanulmányozására, ami alapvető fontosságú hatékony gyógymódok kifejlesztéséhez.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném kifejezni hálámat a témavezetőimnek, Prof. Deli Máriának és Dr. Hoyk Zsófiának a támogatásért és segítségért, amit doktori tanulmányaim során nyújtottak. Kísérleteim elvégzése és a jelen tézis elkészítése nélkülük nem lett volna lehetséges.

Hálás vagyok Dr. Walter Fruzsina támogatásáért és útmutatásáért, a tudományos iránymutatásért és az együtt dolgozott órákért.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Sántha Miklósnak, Dr. Tóth Melindának és Dr. Dukay Brigittának a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetéből, a segítségükért és együttműködésükért.

Hálásan köszönöm a Biológiai Barrierék Kutatócsoport minden tagjának a közös munkát és támogatást. Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Harazin Andrásnak, Dr. Barna Lillának, Dr. Ana Raquel Santa Maria-nak, Dr. Molnár Rékának és Vigh Juditnak a hosszú együtt töltött munkaórákért.

Említést szeretnék tenni Hallgas Balázsról, Lomen Eszterről és Kárpáti Éváról, a Navolab Diagnostics csapat tagjairól, akiknek hálával tartozom a támogatásukért, amely lehetővé tette tanulmányaim befejezését.

Köszönetet szeretnék mondani minden embernek, aki segített és támogatott a munkám során, mindannyian hozzájárultak ahhoz, hogy ez megvalósuljon.

Különleges köszönetem és hálám szeretném kifejezni a családomnak és legközelebbi barátaimnak. Mindig mellettem álltak.

Hálámat szeretném kifejezni az Elméleti Orvostudományi Doktori Iskolának is támogatásukért és, hogy részt vehettem doktori programjukban.