

37. OTDK

BIOLÓGIA SZEKCIÓ

A vér-agy gát védelme, mint terápiás célpont az iszkémiás sztrók sejttenyésztes modelljében

Szerző:

Párdi Koppány

Biológia szakos hallgató

SZTE TTIK

Biológia BSc. III. évfolyam

Témavezető:

Dr. Veszeka Szilvia

tudományos főmunkatárs

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biofizikai Intézet,

Biológiai Barrierék Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika

habilitált egyetemi docens

SZTE TTIK

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

HUN-REN SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierék Kutatócsoport

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. Az agyi iszkémiás sztrók patomechanizmusa.....	3
1.2. A vér-agy gát	5
1.2.1. A vér-agy gát felépítése és funkciói	5
1.2.2. Anyagtranszport a vér-agy gáton keresztül.....	6
1.2.3. A vér-agy gát sérülése iszkémiás sztrók során	8
1.3. A Krüppel-like faktor 2 (KLF2) szerepe endotélsejtekben	9
1.4. A sztrók kezelése	11
2. CÉLKITŰZÉSEK	11
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
3.1. Vegyszerek	13
3.2. Sejtenyésztés.....	13
3.3. Életképesség vizsgálat impedanciaméréssel.....	13
3.4. Iszkémiás körülmények létrehozása humán vér-agy gát ko-kultúra modellen.....	14
3.5. Transzendotheliális elektromos ellenállás	16
3.6. Permeabilitás mérés.....	17
3.7. Immuncitokémia	18
3.8. Statisztikai kiértékelés.....	18
4. EREDMÉNYEK	19
4.1. OGD és OGD/R hatása az agyi endotélsejtek monokultúrájának életképességére	19
4.2. A kombináció-1 kezelés hatása a vér-agy gát ko-kultúra modell transzendotheliális elektromos ellenállására normoxiában és OGD/R esetén	19
4.3. A kombináció-1 kezelés hatása a vér-agy gát ko-kultúra modell permeabilitására normoxiában és OGD/R esetén	20
4.4. Immuncitokémiai vizsgálatok.....	22
5. MEGBESZÉLÉS	25
6. ÖSSZEFOGLALÁS	28
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	29
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Å	Ångström
AJ	adherens kapcsolat, <i>adherent junction</i>
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazol-propionsav
ATP	adenozin-trifoszfát
BCRP	mellrák rezisztencia protein
bPC	borjú pericita
BSA	borjú szérumbalbumin
BVES	<i>blood vessel epicardial substance</i>
CAT-1, -3	kationos aminosav transzporter -1, -3
CX37	konnexin 37
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
EBA	Evans kék albumin, <i>Evans blue albumin</i>
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
ECM	endotélsejt médium
FBS	magzati borjú szérumbalbumin
GLUT1	glükóz transzporter
hEC	humán endotélsejt
HIF-1 α	hipoxia-indukált faktor-1 α
ICAM-1	intercelluláris sejtadhéziós molekula-1
IL-1 β	interleukin-1 β
JAM	junkcionális adhéziós molekula
KA	kainsav
KLF2	<i>Krüppel-like factor 2</i>
LAT-1, -2	nagy semleges töltésű aminosav transzporter
LPS	lipopoliszacharid
MCT1	monokarboxilát transzporter
MMP	mátrix metalloproteináz
MRP	multidrog rezisztencia protein
NF- κ B	nukleáris faktor κ B
NMDA	N-metil-D-aszpartát
OGD	oxigén-glükóz depriváció
OGD/R	oxigén-glükóz depriváció és reoxigenáció
P _{app}	látszólagos permeabilitási együttható, <i>apparent permeability coefficient</i>
PAR-1	proteáz-aktivált receptor-1
PBS	foszfát pufferoldat
P-gp	P-glikoprotein
ROS	reaktív oxigénformák
rtPA	rekombináns szöveti plazminogén aktivátor
SF	Na-fluoreszcein, <i>sodium-fluorescein</i>
SGLT	Na-glükóz transzporter
SLC	<i>solute carrier</i>
SMVT	Na ⁺ -függő multivitamin transzporter
SNAT	Na ⁺ -kapcsolt semleges töltésű aminosav transzporter
SVCT	Na ⁺ -aszorbinsav kotranszporter
TEER	transzendotheliális elektromos ellenállás
TJ	szoros kapcsolat, <i>tight junction</i>
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
VCAM-1	vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1
VEGFR2	vaszkuláris endotélsejt növekedési faktor receptor 2
VE-kadherin	vaszkuláris endoteliális kadherin
ZO-1, -2, -3	<i>zonula occludens-1, -2, -3</i>

1. BEVEZETÉS

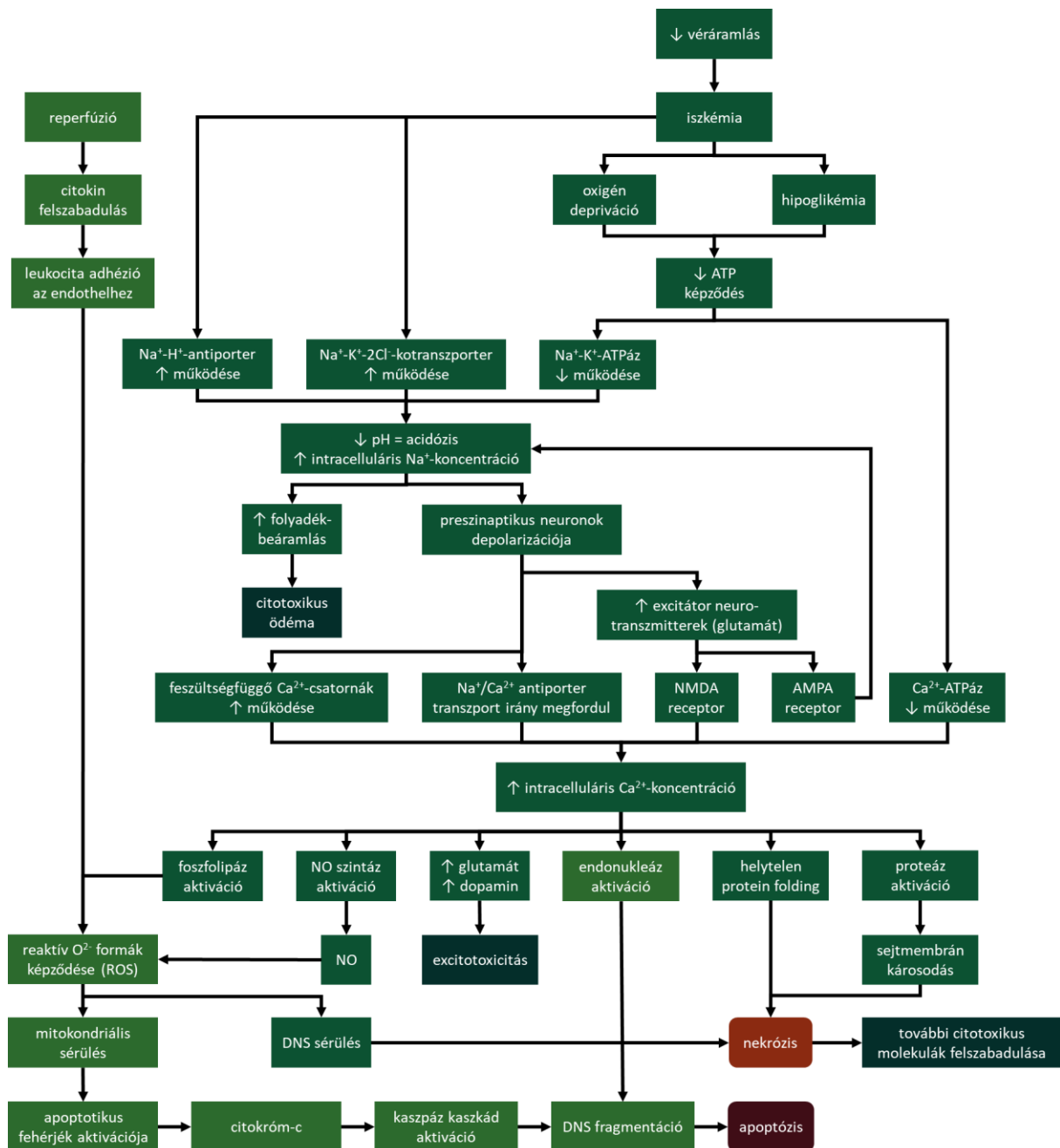
1.1. Az agyi iszkémiás sztrók patomechanizmusa

Az agyi érkatasztrófa vagy sztrók globálisan emberek millióit érintő betegség, amely gyakran súlyos kimenetelű, maradandó egészségkárosodáshoz vagy halálhoz vezethet. 2019-ben 12,2 millió sztrókos esetet, és 6,55 millió emiatt bekövetkező halálesetet regisztráltak világszerte (Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019). Tekintve, hogy ez a betegség a vezető halálokok listáján második helyen szerepel, nagy szükség van olyan terápiás megoldások fejlesztésére, melyek képesek hatékony módon kivédeni a sztrók okozta agyi sérüléseket.

Az akut sztrók az agy elégtelen vérellátása miatt lép fel, melynek két fő oka lehet. Iszkémiás sztrókról beszélünk, amennyiben egy trombus vagy embolus egy agyi érben akadályozza a megfelelő véráramlást. Az agyi erek sérülése, és az azt követő agyvérzés is okozhatja a vérellátás hiányát: ebben az esetben hemorrágiás sztrók alakul ki. A sztrókos esetek 87%-a iszkémiás, 10%-a intracerebrális hemorrágiás, és 3%-a szubdurális hemorrágiás kórkép (Tsao és mtsai., 2023).

A megfelelő vérellátás megszűnése az érintett agyi területen oxigén- és glükózhányos állapotot idéz elő, amely ATP depléciót von maga után. Az érkatasztrófával közvetlenül érintett agyi területen, a core régióban a sejtek percek alatt komoly, visszafordíthatatlan károsodást szenvednek. A core területen, többek között az ionhomeosztázis felborulása és ennek következményei miatt a nekrozissal elhalt sejtekből további citotoxikus anyagok szabadulnak fel, melyek a core területet hagymahéjszerűen körülölelő, úgynevezett penumbra területén károsítják a sejteket (Abdullahi és mtsai., 2018). Amennyiben nem történik reperfüzió, a penumbra területén lévő sejtek is pár óra alatt elpusztulnak (Wahlgren és Ahmed, 2004).

A vérellátás csökkenésével az iszkémia során kialakuló oxigén és glükóz depriváció az ATP képződésének csökkenését, és a Na^+/K^+ -pumpa működési zavarát eredményezi. Az ioneegyensúly felborulása a preszinaptikus idegsejtek depolarizációjához, majd erőteljes glutamát felszabaduláshoz vezet, mely az N-metil-D-aszpartát (NMDA), az α -amino-3-hidroxil-5-metil-isoxazol-propionsav (AMPA) és a kainsav (KA) receptorokon keresztül sejtkárosító események sorozatát (excitotoxicitás) indítja el. A glutamát- és a K^+ -szint emelkedése a core területből kiindulva depolarizációs hullámokat idéz elő.



1. ábra. Az ionhomeosztázis és egyéb celluláris folyamatok megváltozása iszkémiás sztrók és reperfúzió során, mely folyamatok alapvetően nekrotikus vagy apoptotikus sejthalálba konvergálnak (Wahlgren és Ahmed, 2004; Abdullahi és mtsai., 2018. munkái alapján).

Az intracelluláris ionkoncentráció megemelkedése az extracelluláris térből folyadék beáramlását eredményezi a sejtekbe, amely citotoxikus ödémához vezet. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése számos enzimrendszer aktivációjához vezet: foszfolipázok, proteázok és nitrogénmonoxid szintetáz enzimek hatására oxigén- és nitrogéntartalmú szabad gyökök (reactive oxygen species, ROS) termelődnek a sejtekben, amelyek membrán-

(lipolízis), mitokondrium- és DNS-károsodáshoz, végül nekrozishoz vezetnek. A reperfüzió során felszabaduló citokinek a mikroglia sejtek aktivációját és fehérvérsejtek kiáramlását okozzák, valamint további ROS képződésével súlyosbítják az iszkémia által érintett sejtek életfolyamatainak zavarát, ami végül a sejtek apoptotikus elhalásához vezet (1. ábra; Wahlgren és Ahmed, 2004; Abdullahi és mtsai., 2018).

Az iszkémiás sztrókban kialakuló oxigén-glükóz depriváció hatására elinduló kóros folyamatok nemcsak a neuronokat és gliasejteket károsítják, hanem a vér-agy gát sejtjeit is (Sweeney és mtsai., 2016; Sifat és mtsai., 2017).

1.2. A vér-agy gát

1.2.1. A vér-agy gát felépítése és funkciói

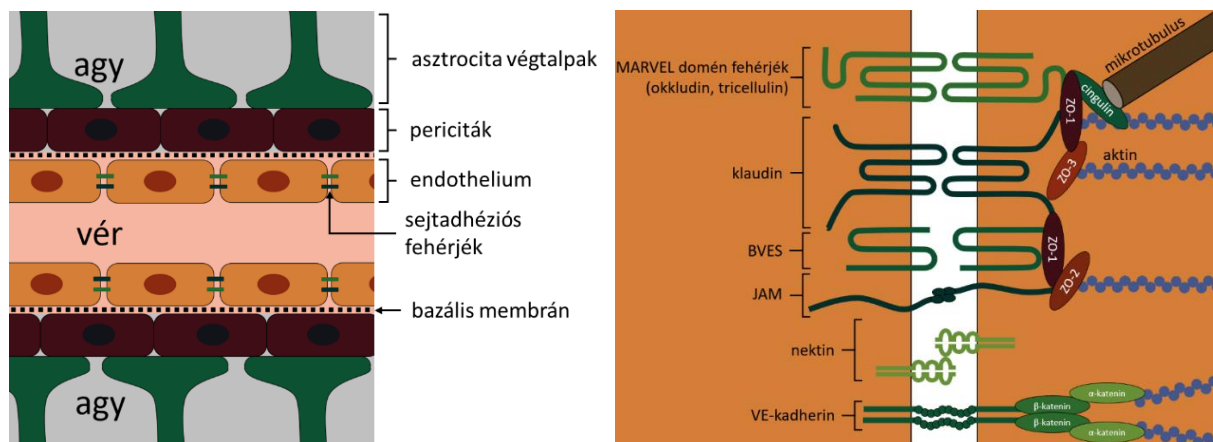
A vér-agy gát az agyszövetet a vérkeringéstől elválasztó, számos sejtes és molekuláris komponensből felépülő dinamikus határfelület, amely az agy táplálásáért, mikrokörnyezetének fenntartásáért, patogénnel és káros molekulákkal szembeni védelméért felelős.

A vér-agy gát anatómiai alapját az agyi endotélsejtek képezik, melyek a IV. kollagénből, fibronectinből, lamininből és heparán-szulfát proteoglikánokból álló közös bazális membránon osztoznak a pericitákkal, melyeket az agy felőli oldalon az asztrociták végtalpai burkolnak be (Abbott és mtsai., 2006). A vér-agy gátat alkotó e három fő sejtípussal funkcionális kapcsolatban állnak még a mikroglia sejtek és neuronok is; a sejtek így kialakuló szoros együttműködését neurovaszkuláris egységnek nevezzük (Abbott és mtsai., 2006).

A vér-agy gát gátfunkciójának alapját az agyi endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúrák, a szelektív ion- és tápanyagtranszporterek, illetve aktív efflux pumpák alkotják. Ezenfelül a fenesztráció hiánya, az endotélsejteket borító vastag, negatív töltésű glikokalix és az alacsony pinocitotikus aktivitás minimalizálja a kapillárisok endotélsejtjein történő nem-specifikus transzcelluláris anyagátjutást (Campos-Bedolla és mtsai., 2014, Sweeney és mtsai., 2016).

Az endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúrák (tight junction, TJ) fő alkotóelemei az okkludin, kladin-5 és JAM (junkcionális adhézis molekula) fehérjék, melyek két egymás mellett lévő endotélsejtet horgonyoznak össze transzmembrán doménjeik segítségével (2. ábra). Intracelluláris doménjeik pedig zonula occludens plakkfehérjéken (ZO-1, -2, -3) keresztül kapcsolatban állnak a mikrotubuláris és aktin citoszkeletonnal. A paracelluláris gátat tovább erősítő tényezők a sejtek bazolaterális oldalán elhelyezkedő adherens kapcsolatok (adherens

junction, AJ), melyek Ca^{2+} -függő kadherinekből és kateninekből épülnek fel (2. ábra) (Abbott és mtsai., 2006).



2. ábra. A vér-agy gát felépítése és az agyi endotélsejtek sejtkapcsoló struktúráit felépítő fehérjék.

1.2.2. Anyagtranszport a vér-agy gáton keresztül

A vér-agy gáton keresztül számos transzportútvonalt is ismerünk: paracelluláris transzport, lipid-mediált diffúzió, adszorptív-mediált transzcitózis, receptor-mediált transzcitózis, efflux pumpák és karrier-mediált transzport (3. ábra) (Veszélka és mtsai; 2015).

A vér-agy gáton való átjutáshoz a molekulák döntő többsége specifikus transzportfehérjét, csatornákat vagy receptorokat igényel. Ez alól csak olyan molekulák képeznek kivételt, melyek lipofilek, poláris felszínük nem haladja meg a $80 \text{ \AA}^2$ -öt, molekulatömegük $400\text{-}500 \text{ Da}$ -nál kisebb, 6-nál kevesebb hidrogénkötés kialakítására képesek, nincsenek forgó kötéseik, és alacsony az affinitásuk plazmaproteinekhez (Pardridge és mtsai., 2005; Abbott és mtsai., 2009). Az ilyen molekulák lipid-mediált szabad diffúzióval jutnak át a vér-agy gáton (pl. koffein, etanol). Passzív diffúzióval, koncentráció-grádiensük mentén mozognak a vérben szállított gázok (NO , O_2 , CO_2), melyek felvétele és leadása a véráramlástól függ (Abbott és mtsai., 2009).

A vér-agy gát agyi endotélsejtjei között kialakuló szoros kapcsolatoknak köszönhetően a legtöbb vízzoldékony kis és nagy molekula endotélsejtek közötti, paracelluláris szabad átjutása gátolt. Az agy számára nélkülözhetetlen tápanyagok specifikus transzporterek, úgynevezett karrierek (solute carriers, SLC) segítségével jutnak át a vér-agy gáton. Az SLC transzportfehérjék az endotélsejteknek mind a vér felőli (luminális), mind az agy felőli (abuminális) oldalán lokalizálódhatnak, így ezek elhelyezkedése hozzájárul az agyi kapilláris-endotélium polaritásának meghatározásához. Az agy számára létfontosságú glükóz szállításáért elsősorban az agyi endotélsejtekben nagymértékben expresszált GLUT1 (SLC2A1),

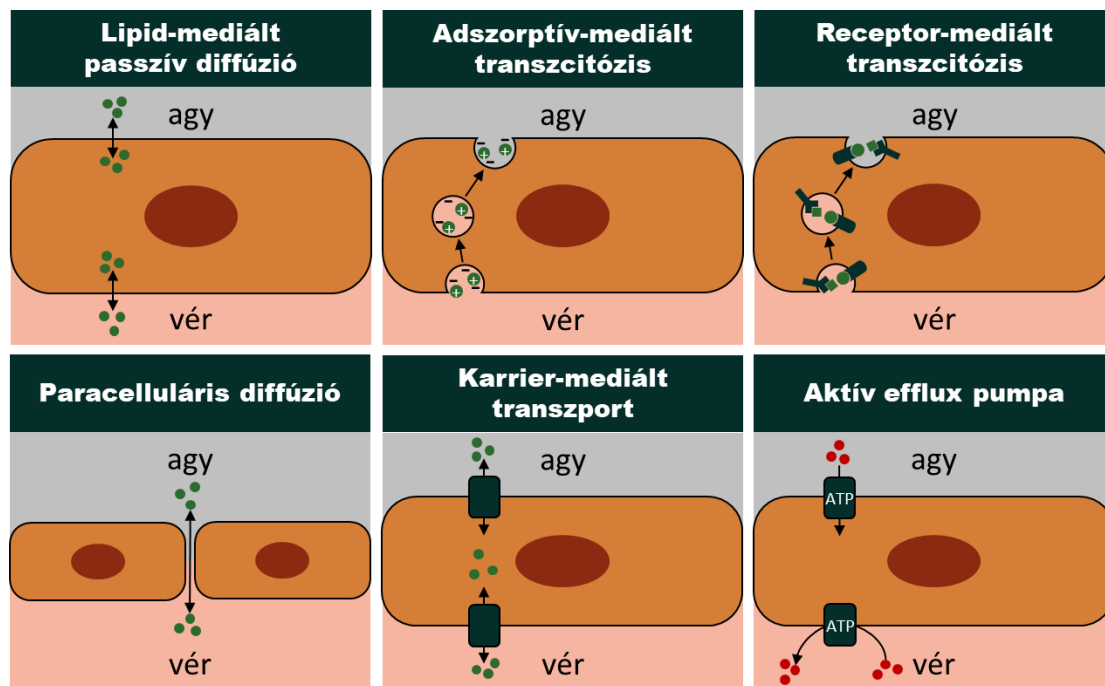
másodsorban a Na^+ /glükóz ko-transzporter (SGLT, SLC5A) felelős (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Az aminosavak szállítását méret és töltés alapján számos fehérje végezheti, például a LAT1 és LAT2 (nagy, neutrális L-aminosavak), a CAT1 és CAT3 (kationos L-aminosavak) illetve a SNAT2 (kisebb, neutrális aminosavak). Az MCT1 a laktát, piruvát és ketontestek szállításáért felel. Egyes vitaminok (pantoténsav, biotin, liponsav) transzportja Na^+ -függő multivitamin transzporter (SMVT), míg a C-vitamin szállításában részben a nátrium-aszkorbát ko-transzporter (SVCT), oxidált formája pedig a GLUT1 segítségével jut át a vér-agy gáton (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Ezeken kívül még a vér-agy gát számos egyéb fehérjéje felel a többi tápanyag, neurotranszmitter, hormon, ion és nyomelem szállításáért (Abbott és mtsai., 2009).

Receptor-mediált transzcitózis során az endotélsejtek lumenális felszínén lévő receptorok megkötik a vérben szállított specifikus ligandjaikat (peptidek, fehérjék, transferrin, lipoproteinek, inzulin), majd a receptor-ligand komplex endocitózissal bejut a sejtbe, végül az ablumenális oldalon transzcitózissal kijut a sejtből a szállított fehérje (Abbott és mtsai., 2009).

Az agyi endotélsejtekben az endocitotikus vezikulák száma alacsony, emiatt a nem specifikus adszorptív transzcitózis szintje a vér-agy gáton sokkal kisebb mértékű, mint a periférikus szervekben. Ennek következményeként a szérumfehérjék (például az albumin) agyi bejutása élettani körülmények között igen kicsi, fokozott bejutásuk a vér-agy gát sérülésére utalhat (Pardridge, 2002).

Az agyi kapillárisok endotélsejtjeinek lumenális felszínén a membránban található glikolipidek, glikoproteinek, illetve heparánszulfát-proteoglikánok oldalláncai negatív felszíni töltésű glikokalix réteget hoznak létre, amely elektrosztatikus gátként az erősen anionos molekulák vér-agy gáton való átjutását megakadályozza (Hervé és mtsai., 2008).

A vér-agy gát fontos védelmi rendszerét alkotják aktív efflux pumpák, mint például a multidrog rezisztencia-asszociált proteinek (MRP, ABCC), melyek az idegszövetben megjelenő endogén metabolitokat (pl. leukotrién C4, glutation) szállítják az agyból a vér felé (Abbott és mtsai., 2009). Az efflux pumpák többsége az ATP-binding cassette (ABC) transzporter családba tartozik, és működésük ATP hidrolíziséből származó energia segítségével valósul meg. Az efflux pumpák közül a legjelentősebb a P-glikoprotein (P-gp, ABCB1) és a mellrák rezisztencia-asszociált protein (BCRP, ABCG2), melyek elsősorban az endotélsejtek apikális oldalán expresszálódnak és a xenobiotikumokat képesek a vérbe visszapumpálni.



3. ábra. A vér-agy gát endotélsejtjeinek különböző transzportmechanizmusai (Abbott és mtsai., 2009).

Mindezek alapján elmondható, hogy a vér-agy gát számos specifikus tulajdonságának köszönhetően aktívan védi az idegszövetet a vérben lévő káros anyagoktól, ugyanakkor számos olyan neuroprotektív hatóanyag bejutását is blokkolja, melyek potenciálisan alkalmasak lennének agyi megbetegedések, mint például a sztrók kezelésére.

1.2.3. A vér-agy gát sérülése iszkémiás sztrók során

Az iszkémiás sztrók patológiájának egyik jellemzője a vér-agy gát károsodás, amelynek következménye a TJ-komplexek megváltozása, a transzportfehérjék és az endocitotikus transzport mechanizmusok módosulása következtében létrejövő permeabilitás növekedés, ami súlyos klinikai következményeknek, például a hemorrágiás transzformációnak az előfutára is lehet (Abdullahi és mtsai., 2018).

A TJ-fehérjék lebontásáért közvetlenül felelősek a mátrix metalloproteináz enzimek (MMP), melyek az alacsony oxigénszint hatására felszabaduló hipoxia-indukált faktor-1 α (HIF-1 α), illetve az iszkémiás eseményt követő 2-6 órában megjelenő gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-1 β) hatására teremlődnék (Abdullahi és mtsai., 2018; Yang és mtsai., 2011). Számos TJ fehérje, mint a kladin-5, okkludin és ZO-1 fehérjék expressziós szintje csökken, és/vagy lokalizációja megváltozik iszkémiás sztrókot követően, ami a gátfunkció károsodásával jár. Ezzel

párhuzamosan az adherens junkciók is sérülnek a VE-kadherineik mennyiségének csökkenése miatt (Abdullahi és mtsai., 2018).

Az integrinek szintén jelentős szerepet játszanak a vér-agy gát degradációjában sztrók esetén. Fiziológias körülmények között az integrinek kölcsönhatásba lépnek a bazális membrán alkotóelemeivel (pl. kollagén IV, fibronektin, laminin, perlekán), ezáltal szabályozzák a vér-agy gát permeabilitását. Iszkémiás sztrókban az integrinek gyorsan degradálódnak, ami ödémához, gyulladásához ezáltal a károsodások súlyosbodásához vezet (Abdullahi és mtsai., 2018).

Az iszkémiát követően felszabaduló gyulladásos faktorok (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6) hatására enzimek aktiválódnak, melyek számos vér-agy gát fehérje foszforilációját okozva jelentős károsodást okoznak. Az intercelluláris (ICAM-1) és a vaszkuláris sejtadhéziós molekulák (VCAM-1) kifejeződése is jelentős mértékben megnő, melyek a fehérvérsejtek felszíni ligandjaihoz kötődve elősegítik az aktivált leukociták átjutását a vér-agy gáton és bejutását a központi idegrendszerbe fokozva ezzel a neuroinflammációt (Abdullahi és mtsai., 2018).

Mivel az iszkémiás sztrók patológiájának egyik kulcstényezője a vér-agy gát sérülése, ezért az agyi endotélsejtek és a gátfunkciók megóvása kiemelt fontosságú az iszkémiás sztrók terápiás kezelésében (Sifat és mtsai., 2017; Sweeney és mtsai., 2016).

1.3. A Krüppel-like faktor 2 (KLF2) szerepe endotélsejtekben

A vaszkuláris endotélsejtek állandó fizikai kontaktusban vannak a folyamatosan áramló vérrel, így ki vannak téve az abban keringő endogén vegyületek kémiai, illetve az áramlás keltette biomechanikai hatásoknak. Ezek a hatások különböző jelátviteli utakon keresztül befolyásolják a génkifejeződést, ami pedig meghatározza az endotélsejtek morfológiai, adhézis, proliferációs, funkcióbeli fenotípusát (Novodvorsky és Chico., 2014).

A Krüppel-like factor 2 (KLF2) egy transzkripciós regulátor endotélsejtekben, melynek termelődését a véráramlás által kialakuló fizikai erők befolyásolják (Atkins és Jain, 2007). Ezeknek az erőknek két főbb típusa van: az egyik a vér áramlási irányával párhuzamosan kifejtett lamináris nyíróerő, a másik pedig a vér áramlási irányára merőleges, a vérnyomástól függő vazodilatációs hatású nyújtóerő (White és mtsai., 2007). A KLF2 expresszióját főként a lamináris véráramlás által az érfalra kifejtett fizikai erő indukálja. A lamináris nyíróerőnek több közvetlen szenzora is ismert. A zavartabb áramlásnak kitett endotélsejtek lumenális oldalán ciliáris fehérjék (polycystin-1 és polaris) érzékelik a nyírófeszültség változásait, amely az

intracelluláris NO- és Ca^{2+} -szint változásait eredményezi (Nauli és mtsai., 2008). A primer mechanoszenzoros komplex további képviselői a glikokalix, integrinek, G-protein kapcsolt receptorok, receptor tirozinkinázok (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 2, VEGFR2), ioncsatornák és kaveolák (Tarbell és mtsai., 2005; Ando és mtsai., 2009). A mechanoszenzoros komplex aktiválódásának következményeként az endotélsejtekben szignáltraszdukciós útvonal aktiválódik, amely elindítja a sejtmagban a KLF2 expresszióját (Paudel és mtsai., 2021; Kumar és mtsai., 2005). Meghatározó szabályozó szerepét jelzi, hogy a véráramlás által indukált több mint 700 gén 15%-a KLF2-függő módon expresszálódik (Fledderus és mtsai., 2008).

A KLF2 számos gyulladásos mediátorral és citokinekkal kölcsönhatva anti-inflammatórikus hatást fejt ki. Endotélsejtekben a KLF2 túltermelése gátolja az E-szelektin és VCAM-1 adhéziós molekulák IL-1 β , TNF- α és LPS (lipopoliszcharid) általi kifejeződését, ezáltal a fehérvérsejtek adhéziója gyengül (Parmar és mtsai., 2005).

A trombin és az NF- κ B transzkripció faktor által szabályozott útvonalak pro-inflammatórikus hatásait a KLF2 csökkenti (SenBanerjee és mtsai., 2004). A KLF2 a PAR-1 (proteáz-aktivált receptor-1) trombin receptor gátlásán keresztül mérsékeli a trombin okozta sejtmagi NF- κ B-felhalmozódást és DNS kötődést, így az nem képes proinflammatórikus fehérjék termelésének megindítására (Lin és mtsai., 2006).

A KLF2 serkenti az antioxidatív fehérjék, valamint a glikokalixot alkotó hialuronsav termelését is (Wang és mtsai., 2020), valamint csökkenti a glükózfelvételt, a mitokondriumok számát és metabolikus funkciót a perifériás endotélsejtekben (Doddaballapur és mtsai., 2015).

Az eddig említett perifériás endotélsejtekben látott hatások mellett a vér-agy gát esetében a nyugvó endotéliumban kifejeződő KLF2-nek is kiemelten fontos szerepe van a gáttulajdonságok kialakítása és az érrendszer homeosztázisának fenntartása mellett a vaszkuláris tónus és a vér-agy gát antioxidatív kapacitásának szabályozásában, illetve a gyulladás, hemosztázis, trombózis, vaszkulo- és angiogenezis, valamint az ateroszklerózis folyamataiban (Gimbrone és mtsai., 2000; Wu és Birukov, 2019).

A KLF2 képes a szoros sejtkapcsolatokat alkotó okkludin fehérjék expresszióját fokozni, valamint az endotheliális réskapcsolatok (gap junction) kialakításáért felelős egyik konnexin fehérje (CX37) termelését is indukálni (Saez és mtsai., 2003; Pfenniger és mtsai., 2012).

Mindezen adatok felvetik annak lehetőségét, hogy az endotélsejtekben kifejeződő KLF2 szintjének növelése protektív szereppel bír, és számos olyan szignalizációs utat és folyamatot befolyásol, melyek az iszkémia és reperfüzió során is érintettek.

1.4. A sztrók kezelése

A klinikumban jelenleg akut iszkémiás sztrók kezelése során csak a tünetek jelentkezését követő 4-6 órás terápiás ablakban van mód trombolízis biztonságos alkalmazására rekombináns szöveti plazminogén aktivátor (rtPA) intravénás beadásával. A rtPA-kezelés azonban csak bizonyos kockázati tényezőket figyelembevéve, jól szelektált betegeknél bizonyul hatásosnak, ezért mindössze a sztrókos betegek 1-3%-nál alkalmazható (Sweeney és mtsai., 2016). Az rtPA kezelés esetén súlyos szövődmények is kialakulhatnak, mint amilyen az intrakraniális vérzés. A terápiás ablakon túl a kezelési lehetőségek a sztrók kialakulása utáni 48 órán belül beadott acetilszalicilsavra és a korai antikoaguláns terápiára korlátozódnak (Adams és mtsai., 2007).

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a klinikumban a sztrók kezelésére irányuló jelenlegi terápiás lehetőségek, neuroprotektív és vér-agy gát védő hatóanyagok igen korlátozottak, és nagy szükség van új, hatékony gyógyszerjelöltek kutatására és fejlesztésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk nemrégiben kifejlesztett egy jelenleg szabadalmaztatási eljárás alatt álló molekulakombinációt, amelyről sejtenyészetes kísérleteink során bebizonyosodott, hogy alkalmas a vér-agy gát tulajdonságok jelentős indukálására és javítására fiziológias körülmények között. Ezt a hatását az agyi endotélsejtekben többek között a klaudin-5 fehérje expressziójának, az efflux pumpák aktivitásának és a glikokalix denzitásának növelésén keresztül éri el. Emellett igazoltuk azt is, hogy jelentősen megemeli a KLF2 faktor szintjét agyi endotélsejtekben. A szabadalmaztatási eljárás miatt dolgozatomban a molekulakombináció pontos összetételét nem ismertethetem, a továbbiakban pedig „kombináció-1” néven fogom említeni.

Kísérleteink során az alábbi kérdésköröket vizsgáljuk:

- 1) Milyen hatása van az oxigén-glükóz deprivációnak és reoxigenációnak az általunk alkalmazott humán vér-agy gát modell gátfunkcióira?
- 2) Ismert, hogy perifériás endotélsejtekben a KLF2 expressziójának növelése protektív számos betegség esetében. Hogyan változik a KLF2 szintje oxigén-glükóz depriváció/reoxigenáció hatására agyi endotélsejtekben?
- 3) A kombináció-1 kezelés fiziológias körülmények között megemelte a KLF2 transzkripciós faktor expressziós szintjét és számos vér-agy gát funkciót is erősített.

Lehet-e patológiás körülmények között, oxigén-glükóz depriváció/reoxigenációt követően is a kombináció-1 kezeléssel növelni a KLF2 expressziós szintjét és ezáltal iszkémiás sztrók sejtenyészetes modelljében a vér-agy sérülésekkel szemben védő hatást kifejteni?

A fenti kérdéskörök megválaszolására az alábbi kísérleteket végezzük el:

A kombináció-1 hatásának vizsgálata normál tenyésztési körülmények (normoxia), valamint oxigén-glükóz depriváció/reoxigenáció (OGD/R) során:

- 1) az agyi endotélsejtek életképességére;
- 2) a vér-agy gát modell transzendoteliális elektromos ellenállására (TEER);
- 3) a vér-agy gát modell permeabilitására, paracelluláris (SF) és transzcelluláris marker (EBA) molekulák segítségével;
- 4) a KLF2 transzkripciós faktor és a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérje szintjének változására, immuncitokémiai módszer segítségével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vegyszerek

Minden reagens beszerzési forrása, amennyiben nincs másképp feltüntetve, a Merck Life Science Kft, Magyarország.

3.2. Sejttenyésztés

A kísérleteinkhez ko-kultúrában tenyésztettünk humán köldökszínórvérből izolált őssejtekből differenciáltatott endotélsejteket (hEC) és borjú pericitákat (bPC). A sejteket francia együttműködő partnereinktől (Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique, University of Artois, Lens, Franciaország) kaptuk ajándékba, és az ő engedélyükkel használtuk fel a kísérleteinkhez.

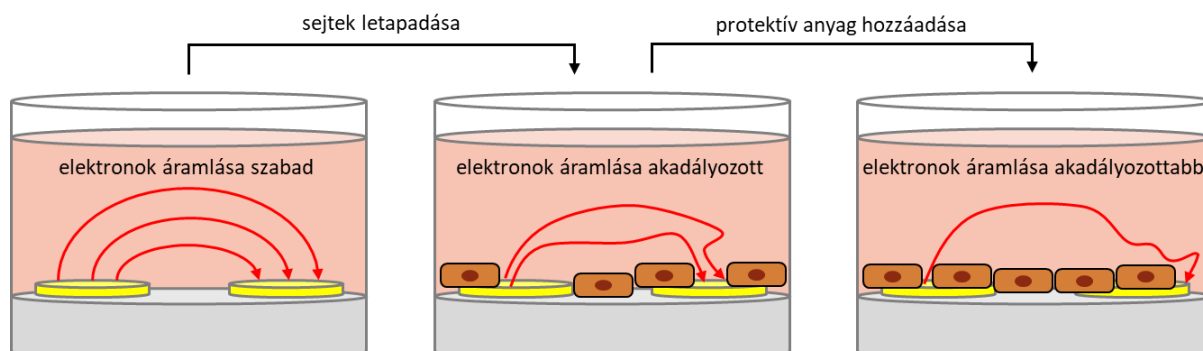
A hEC sejteket a ko-kultúra létrehozása előtt (P7 passzázs számig) IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronektinnel (25 µg/ml) bevont steril Petri-csészékben növesztettük 5% borjú szérummal (FBS, Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok), 1% endothelsejt növekedést segítő anyaggal (Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) és 0,5% gentamicinnel kiegészített tápfolyadékban (ECM, Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) 5% CO₂ mellett, 37 °C-os inkubátorban (Cecchelli és mtsai., 2014).

A bPC sejteket a ko-kultúra létrehozása előtt (P12 passzázs számig) IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) bevont steril Petri-csészékbe szélesztettük, és 20% FBS-sel, 1% glutamaxszal és 1% gentamicinnel kiegészített tápfolyadékban (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Amerikai Egyesült Államok) tenyésztettük 5% CO₂ mellett, 37 °C-os inkubátorban (Cecchelli és mtsai., 2014; Mossu és mtsai., 2019).

3.3. Életképesség vizsgálat impedanciaméréssel

Az impedanciaméréshez a sejteket egy sejtrétegben (monokultúra) tenyésztettük, az analízist pedig xCELLigence műszer (ACEA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük (4. ábra). Az endotélsejteket egy impedancia mérésre alkalmas, 96-lyukú, integrált arany mikroelektrodákat tartalmazó, steril tenyésztőlemezbe szélesztettük (E-plate, ACEA, Amerikai Egyesült Államok), 6×10^3 sejt/lyuk sűrűségben, melyet IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és

fibronektinnel (25 $\mu\text{g/ml}$) vontunk be. A sejtek 5% FBS-sel, 1% ECGS-sel és 0,5% gentamicinnel kiegészített endotélsejt tápfolyadékban (ECM, Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) növekedtek, 5% CO_2 -tartalmú, 37 °C hőmérsékletű inkubátorban.



4. ábra. Az impedanciaalapú sejtanalízis során a letapadó sejtek rétege és az arany mikroelektrodák között kialakuló impedancia mérhető. Minél szorosabb a letapadó sejtek közötti kapcsolat, annál magasabb az impedancia.

A sejteket először 24 óráig normoxiás körülmények között, kezelés nélkül növesztettük, majd ezt követően a sejteket glükózmentes médiumban (DMEM/F12, Biowest) és 1% O_2 -tartalmú, 37 °C-os inkubátorban 6 órán át tartottuk (OGD). Az OGD után a sejteket 24 órára visszahelyeztük normál oxigén-tartalmú inkubátorba (OGD/R), illetve a sejtek egy részét a 24 órás OGD/R alatt megkezeltük kombináció-1-gyel is. A sejtkárosító hatást a műszer sejtindex értékkel fejezi ki, amely tükrözi a sejtek számát és életképességét (4. ábra). A sejtindexet az $R_n - R_b$ képlet alapján kapjuk meg, ahol R_n az adott lyukban a sejtek és az elektrodák közti impedancia értéke, R_b pedig a sejtmentes tápfolyadék háttérimpedanciája.

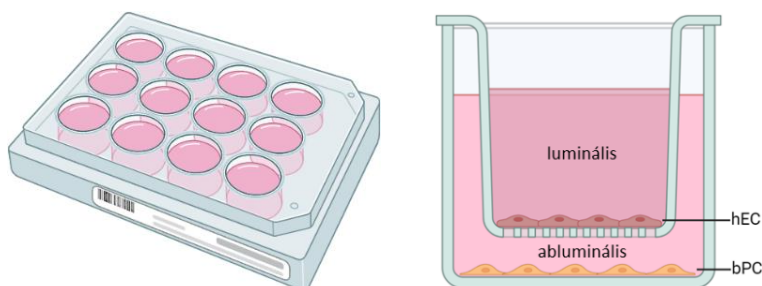
3.4. Iszkémiás körülmények létrehozása humán vér-agy gát ko-kultúra modellen

Az agyi iszkémiát és az azt követő reperfüziós állapotot modellezve a sejteket normál glükóz és oxigénellátottságnak (normoxia), valamint oxigén-glükóz megvonásnak (OGD) és reoxigenációs (OGD/R) körülményeknek tettük ki. A bPC sejteket IV. típusú kollagénnel (100 $\mu\text{g/ml}$) bevont, 12-lyukú sejtenyészítő lemezekben (Corning Costar) tenyésztettük, 12 000 sejt/lyuk mennyiségben. A hEC sejteket pedig a 12-lyukú sejtenyészítő lemezekbe illeszthető sejtenyészítő betétekben (PET membrán, 0,4 μm pórusméret, 1,12 cm^2 felület, Transwell, Corning Costar) 70 000 sejt/membrán mennyiségben tenyésztettük, a betétek porózus

membránját pedig IV. típusú kollagénnel (100 µg/ml) és fibronectinnel (25 µg/ml) vontuk be (5. ábra).

A kísérletekhez a hEC és bPC sejteket négy napig tenyésztettük együtt 5% FBS-sel, 1% ECGS-sel és 0,5% gentamicinnel kiegészített ECM tápfolyadékban. Az ötödik napon médiumcserét követően a sejteket négy csoportba soroltuk:

- 1) **Normoxia kontroll (N):** normál glükóz- és oxigénellátottságú körülmények között tartott sejtek.
- 2) **Normoxia + kombináció-1 (N+K):** normál glükóz- és oxigénellátottságú körülmények között tartott és 24 órán át kombináció-1 kezelt sejtek.
- 3) **OGD/R kontroll (OGD/R):** a sejteket glükózmentes médiumban és 1% O₂-tartalmú, 37 °C-os inkubátorban 6 órán át tartottuk (OGD), majd ezt követően a 24 órás reoxigenáció (OGD/R) során a sejteket ismét normál glükóztartalmú médiumba, és normál oxigéntartalmú 37 °C-os CO₂-inkubátorban tartottuk 24 órán át.
- 4) **OGD/R + kombináció-1 (OGD/R+K):** 6 órás OGD-t követően a 24 órás reoxigenáció alatt a sejtek végig kombináció-1 kezelést kaptak.



5. ábra. Vér-agy gát ko-kultúra modell sematikus ábrája. A 12-lyukú sejtenyésző lemez lyukaiba helyezhető sejtenyésző betétek vér felőli, azaz luminális oldalán humán endothelsejtek (hEC) nőnek, míg a tenyésztőlemez alján, az abluminális vagy agy felőli kompartmentben helyezkednek el a borjú pericita (bPC) sejtek. Az ábra a biorender.com segítségével készült.

3.5. Transzendotheliális elektromos ellenállás

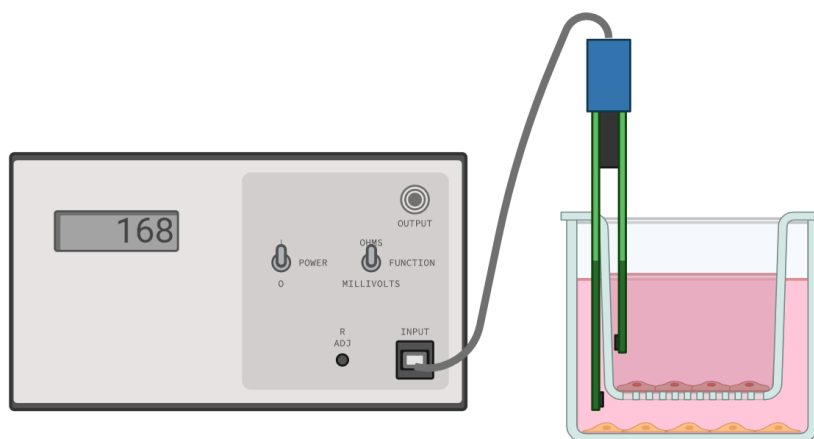
A vér-agy gát modell endotélsejtrétegének paracelluláris szorosságát mutató transzendotheliális elektromos ellenállást (TEER) EVOM rezisztenciamérő és STX-2 elektródapár (World Precision Instruments Inc., Amerikai Egyesült Államok) segítségével mértük (7. ábra).

A mért ellenállás értékek (Ω) és a tenyésztőbetétek felszíne (A; 1,12 cm²) alapján, a sejtmentes tenyésztőbetétekben mért hátterek átlagát (100 Ω) levonva az alábbi módon megkaptuk a sejtrétegek TEER értékeit (6. ábra):

$$TEER(\Omega \times cm^2) = (R_n - R_b) \times A$$

6. ábra. A transzendotheliális elektromos ellenállás (TEER, $\Omega \times cm^2$) számolásának egyenlete. R_n : elektromos ellenállás nyers adatok (Ω). R_b : elektromos ellenállás, háttér (Ω). A: tenyésztőbetét felszíne (cm²).

A TEER mérést a sejtek négy napos előtenyésztését követően az egyes csoportoknál normoxiában, OGD előtt, az OGD/R után és a kombináció-1 kezelést követően a kísérlet végén is elvégeztük.

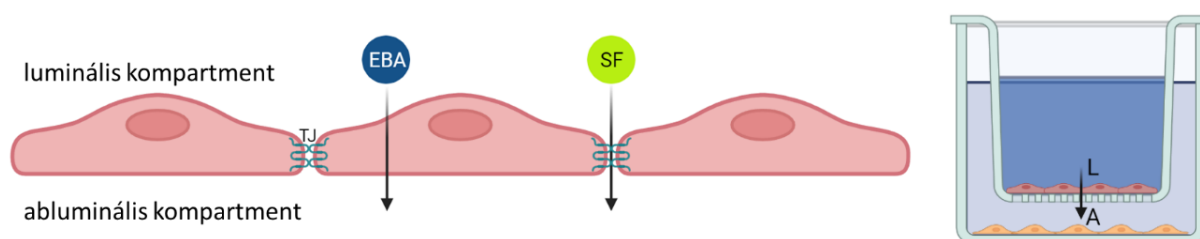


7. ábra. A TEER mérés sematikus ábrája. Az ábra a biorender.com segítségével készült.

3.6. Permeabilitás mérés

A vér-agy gát modell áteresztőképességét marker molekulákkal, Evans kék festékhez kapcsolt albumin (EBA; 67 kDa) és Na-fluoreszcein (SF; 376 Da) segítségével mértük (8. ábra). Előbbi a vér-agy gát modell transzcelluláris, utóbbi a paracelluláris permeabilitási marker molekulája.

Permeabilitási kísérleteinkhez puffer oldatot készítettünk fenolvörös-mentes médium (DMEM/F-12, Thermo Fisher Scientific, Amerikai Egyesült Államok) és 1% borjú szérum (FBS, Sciencell, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) felhasználásával. Ebből 1,5 ml/lyuk mennyiséget mértünk az abluminális kompartmentbe.



8. ábra. Az Evans kék albumin (EBA) transzcelluláris és a Na-fluoreszcein (SF) paracelluláris átjutása az endotélsejtek rétegén a luminálisból (L) az abluminális (A) kompartmentbe. Az ábra a biorender.com segítségével készült.

A luminális kompartmentbe 0,5 ml permeabilitási pufferben SF (10 µg/mL) és EBA marker molekulát (10 mg/mL BSA + 167.5 µg/mL Evans-kék) oldottunk. Síkrázón (100 fordulat/perc), egy óra inkubáció után, a luminálisból az abluminális folyadéktérbe jutott markerek koncentrációját spektrofluoriméteres mérés (Fluorolog 3, Horiba Jobin Yvon, Japán) segítségével mértük vissza (EBA: excitáció: 584 nm, emisszió: 663 nm; SF: excitáció: 485 nm, emisszió: 515 nm). A markerek vér-agy gát permeabilitási adataiból látszólagos permeabilitási együtthatót (P_{app}) számoltunk az alábbi egyenlet segítségével (9. ábra):

$$P_{app}(\text{cm/s}) = \frac{[C]_A \times V_A}{[C]_L \times A \times \Delta t}$$

9. ábra. A P_{app} , a látszólagos permeabilitási együttható (cm/s) számolásának egyenlete. $[C]_A$: marker abluminális koncentrációja, V_A : abluminális folyadéktér térfogata (cm^3), $[C]_L$: marker luminális koncentrációja, A : tenyésztőbetét felszíne (cm^2), Δt : a mérés során eltelt idő (s).

3.7. Immuncitokémia

A permeabilitási kísérletet követően a tenyésztőbetétek membránjára növesztett endotélsejtrétegeket fixáltuk: klaudin-5 festés esetén metanol és aceton 1:1 arányú keverékével 10 percig; KLF2 festés esetén PBS-ben oldott 3% PFA oldattal 2 percig. Fixálás után a mintákat kétszer mostuk Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes PBS-ben, majd permeabilizáltuk PBS-ben oldott 0,2% Triton-X 100 segítségével 10 percig. Ezt követően PBS-ben oldott 3% BSA oldattal blokkoltuk a nem-specifikus kötőhelyeket 1 órán át, majd a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk a blokkolóban oldott elsődleges antitestekkel (nyúl anti-KLF2, 1:100; egér anti-klaudin-5 1:200). Az inkubációt követően a mintákat kétszer mostuk, és PBS-ben oldott másodlagos antitestekkel (anti-nyúl Alexa Fluor 488, 1:400; anti-egér Alexa Fluor 555, 1:400) egy órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő utolsó tíz percében magfestéket (Hoechst, 1:1000) is adtunk a mintákhoz.

Végül a mintákat kétszer mostuk PBS-ben, majd egyszer desztillált vízben, és a membránokat kivágva, mounting folyadék segítségével tárgylemezekre rögzítettük. Az egyes minták különböző területeiről 10-10 képet készítettünk konfokális mikroszkóp (Leica Microsystems) segítségével, majd a képek fluoreszcens intenzitásának mérését ImageJ szoftver segítségével végeztük.

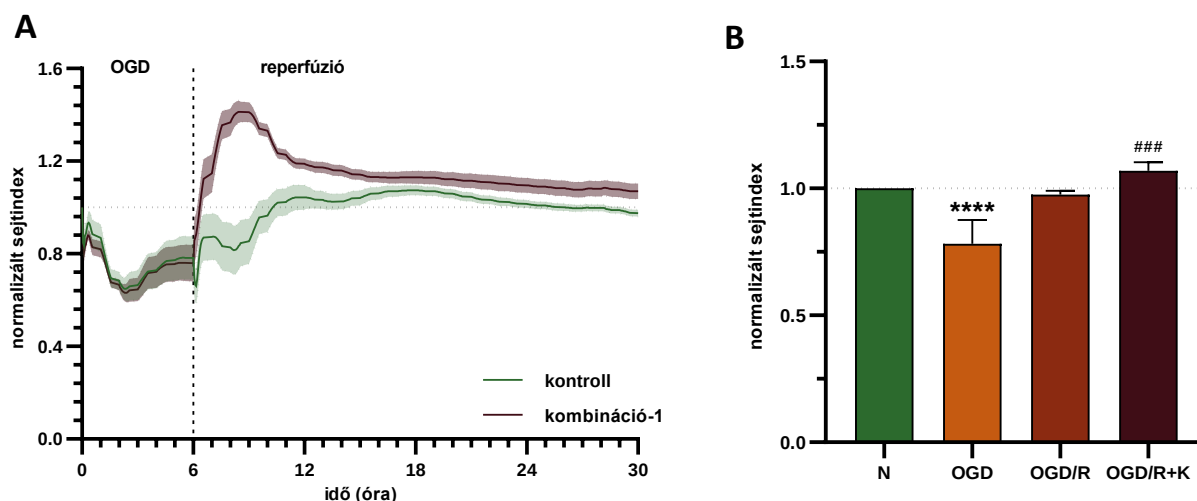
3.8. Statisztikai kiértékelés

Az elvégzett kísérletek kiértékelését Microsoft Excel, illetve GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., Amerikai Egyesült Államok) statisztikai és diagramszerkesztő program segítségével értékeltük ki. Az adatokat átlag $\pm$ szórás értékekben adtuk meg. Az adatsorokon egyutas ANOVA variancia-analízist követően Bonferroni poszttesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük. Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk, kísérletenként 3-18 párhuzamos mintával dolgoztunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. OGD és OGD/R hatása az agyi endotélsejtek monokultúrájának életképességére

A kontroll, normoxiás állapothoz képest a hatórás OGD a sejtinдекс szignifikáns csökkenését okozta, ami a sejtréteg jelentős károsodására utal. Ezt követően a 24 órás reoxigenáció során a normál glükóztartalmú médium visszaadása és a sejtek visszahelyezése a normál oxigéntartalmú 37 °C-os CO₂-inkubátorba fokozatosan emelte a sejtinдексet, amely a kísérlet végén a normoxiás állapothoz közelítő értéket vett fel (10/A ábra). A reoxigenáció alatti kombináció-1 kezelés azonnal és szignifikáns módon megemelte a sejtinдексet az OGD/R csoporthoz képest, ami protektív hatásra utal (10/A-B ábra).

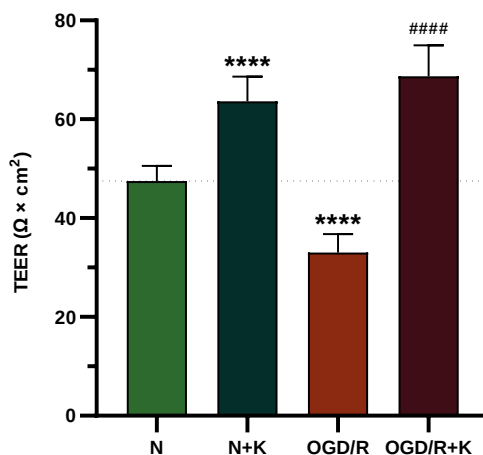


10. ábra. Az agyi endotélsejtek életképesség vizsgálatának kinetikája impedancia méréssel 6 órás OGD és az azt követő 24 órás reoxigenáció (OGD/R) és kombináció-1 kezelés (OGD/R+K) hatására (A). Normalizált sejtinдекс értékek a kontroll, normoxiás állapothoz (N) viszonyítva 6 óra (OGD), illetve 30 óra elteltével (OGD/R, OGD/R+K) a kísérlet végén (B). Statisztika: egyutas ANOVA, Bonferroni posztteszt. ****P<0,0001, az N csoporthoz viszonyítva; ###P<0,001, az OGD/R csoporthoz viszonyítva; n=6-12

4.2. A kombináció-1 kezelés hatása a vér-agy gát ko-kultúra modell transzendoteliális elektromos ellenállására normoxiában és OGD/R esetén

Normoxiás körülmények között a kombináció-1 kezelés szignifikáns módon, 34%-kal megemelte a sejtréteg elektromos ellenállását, ami a vér-agy gát modell szorosabbá válására utal (11. ábra). Az OGD/R hatására a sejtréteg TEER értéke drasztikus módon, 30%-kal lecsökkent, ami a paracelluláris útvonalak megnyílására és a vér-agy gát funkciók romlására

utal. A reoxigenációval párhuzamosan kombináció-1 kezelést kapott sejtrétegek elektromos ellenállása viszont 108%-kal megemelkedett az OGD/R kontrollhoz képest, mely érték még a normoxiához képest is magasabb volt. Ez arra utal, hogy a kombináció-1 kezelés hatására az agyi endotélsejtek rétegei szorosabbá váltak (11. ábra).

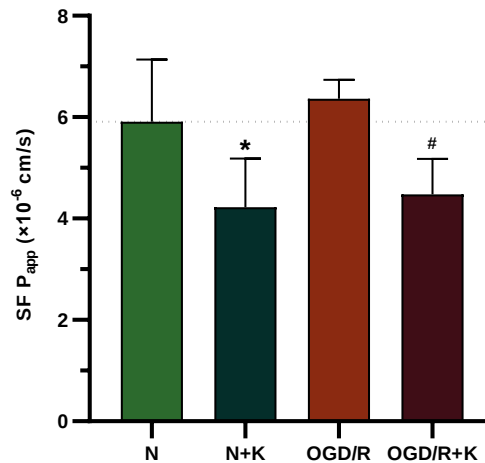


11. ábra. A kombináció-1 kezelés hatása (N+K; OGD/R+K) a vér-agy gát ko-kultúra modell transzendenteliális elektromos ellenállására (TEER) normoxiában (N) és OGD/R esetén. Statisztika: egyutas ANOVA teszt, Bonferroni posztteszt. **** $P < 0,0001$, az N csoporthoz viszonyítva; #### $P < 0,0001$, az OGD/R csoporthoz viszonyítva; $n=6$.

4.3. A kombináció-1 kezelés hatása a vér-agy gát ko-kultúra modell permeabilitására normoxiában és OGD/R esetén

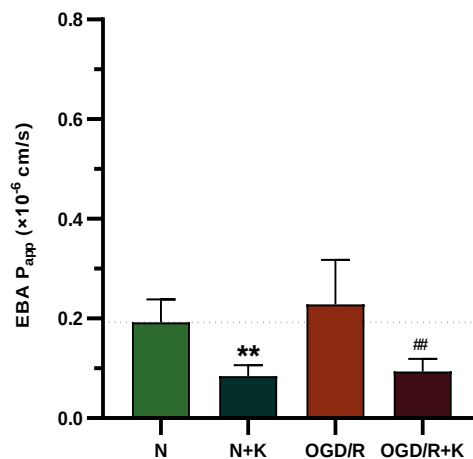
A kis molekulatömegű, paracelluláris vér-agy gát permeabilitási marker molekula, az SF a kontroll, normoxiás csoportban alacsony mértékben jutott át a modellen ($5,9 \times 10^{-6}$ cm/s), mely a vér-agy gát megfelelő mértékű szorosságára utal, és összhangban áll a korábbi eredményeinkkel (Mészáros és mtsai, 2023). A kombináció-1 kezelés ezt az alacsony permeabilitást még tovább csökkentette 29%-kal ($4,2 \times 10^{-6}$ cm/s), ami azt mutatja, hogy a kezelés hatására a modell paracelluláris szorossága megnőtt (12. ábra).

OGD/R hatására a sejtréteg áteresztőképessége megemelkedett az SF marker molekulára ($6,4 \times 10^{-6}$ cm/s), a normoxiához képest 8%-kal. Ezt a káros hatást a kombináció-1 kezelés képes volt kivédeni, és az SF permeabilitási szintjét a normoxiában kezelt csoport szintjére csökkenteni ($4,5 \times 10^{-6}$ cm/s) (12. ábra).



12. ábra. A kombináció-1 kezelés hatása (N+K; OGD/R+K) a vér-agy gát ko-kultúra modell nátrium-fluoreszcein (SF) permeabilitására normoxiában (N) és OGD/R esetén. Statisztika: egyutas ANOVA teszt, Bonferroni posztteszt. * $P < 0,05$, az N csoporthoz viszonyítva; # $P < 0,05$, az OGD/R csoporthoz viszonyítva; $n=6$. P_{app} : látszólagos permeabilitási állandó.

A nagy molekulatömegű, transzcelluláris vér-agy gát permeabilitási marker molekula, az EBA a kontroll, normoxiás csoportban szintén alacsony mértékben jutott át a modellen ($0,19 \times 10^{-6}$ cm/s), mely az agyi endotélsejtrétegek megfelelő mértékű szorosságára utal és összhangban áll a korábbi eredményeinkkel (Mészáros és mtsai, 2023). A kombináció-1 kezelés ezt az alacsony permeabilitást 56%-kal tovább csökkentette ($0,08 \times 10^{-6}$ cm/s), ami azt mutatja, hogy a kezelés hatására a modell transzcelluláris szorossága tovább nőtt (13. ábra).



13. ábra. A kombináció-1 kezelés hatása (N+K; OGD/R+K) a vér-agy gát ko-kultúra modell Evans kék-albumin (EBA) permeabilitására normoxiában (N) és OGD/R esetén. Statisztika: egyutas ANOVA teszt, Bonferroni posztteszt. ** $P < 0,01$, az N csoporthoz viszonyítva; ## $P < 0,01$, az OGD/R csoporthoz viszonyítva; $n=6$. P_{app} : látszólagos permeabilitási állandó.

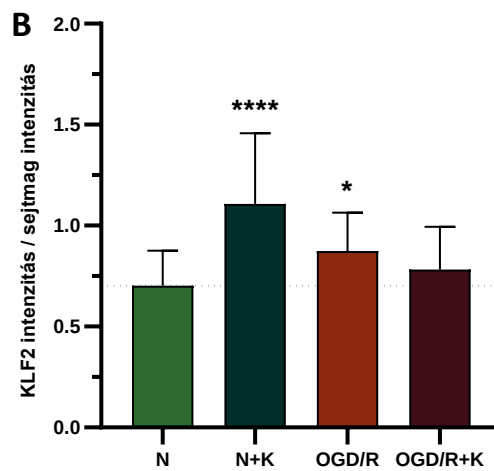
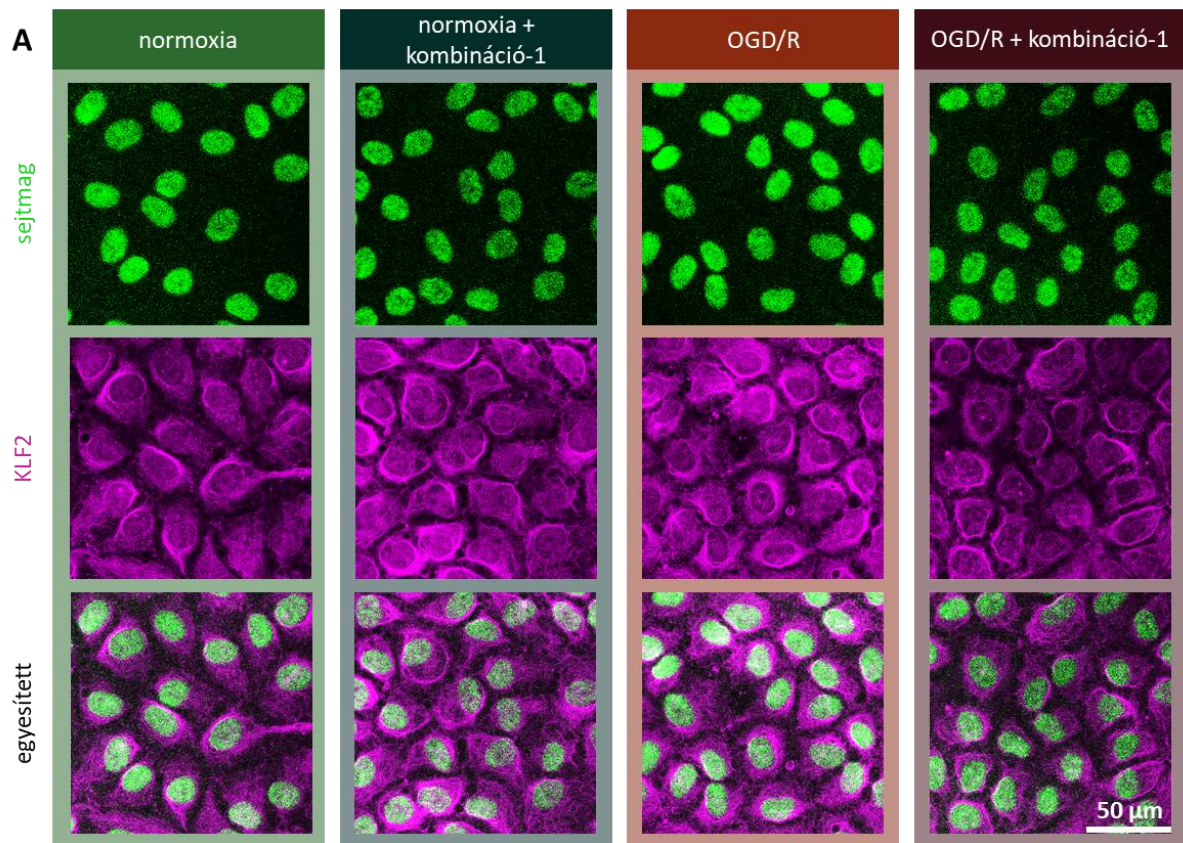
OGD/R hatására a vér-agy gát modellünk permeabilitása a normoxiához képest megemelkedett az EBA marker molekulára 19%-kal ($0,23 \times 10^{-6}$ cm/s). Ezzel a káros hatással szemben a kombináció-1 kezelés jelentős mértékben védeni tudott, és az OGD/R csoporthoz képest 59%-kal lecsökkentette az EBA szintjét ($0,09 \times 10^{-6}$ cm/s), amely érték a normoxiás kezelt csoportéhoz hasonló volt (13. ábra).

4.4. Immuncitokémiai vizsgálatok

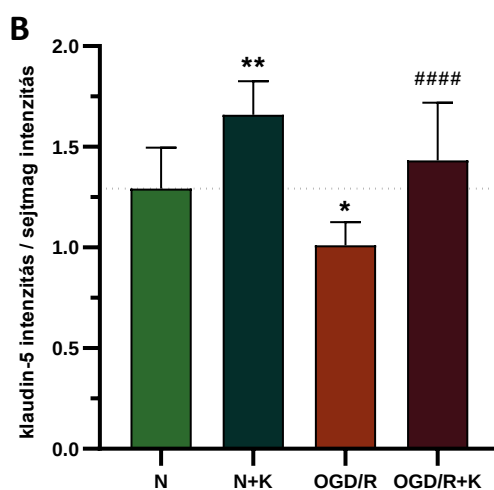
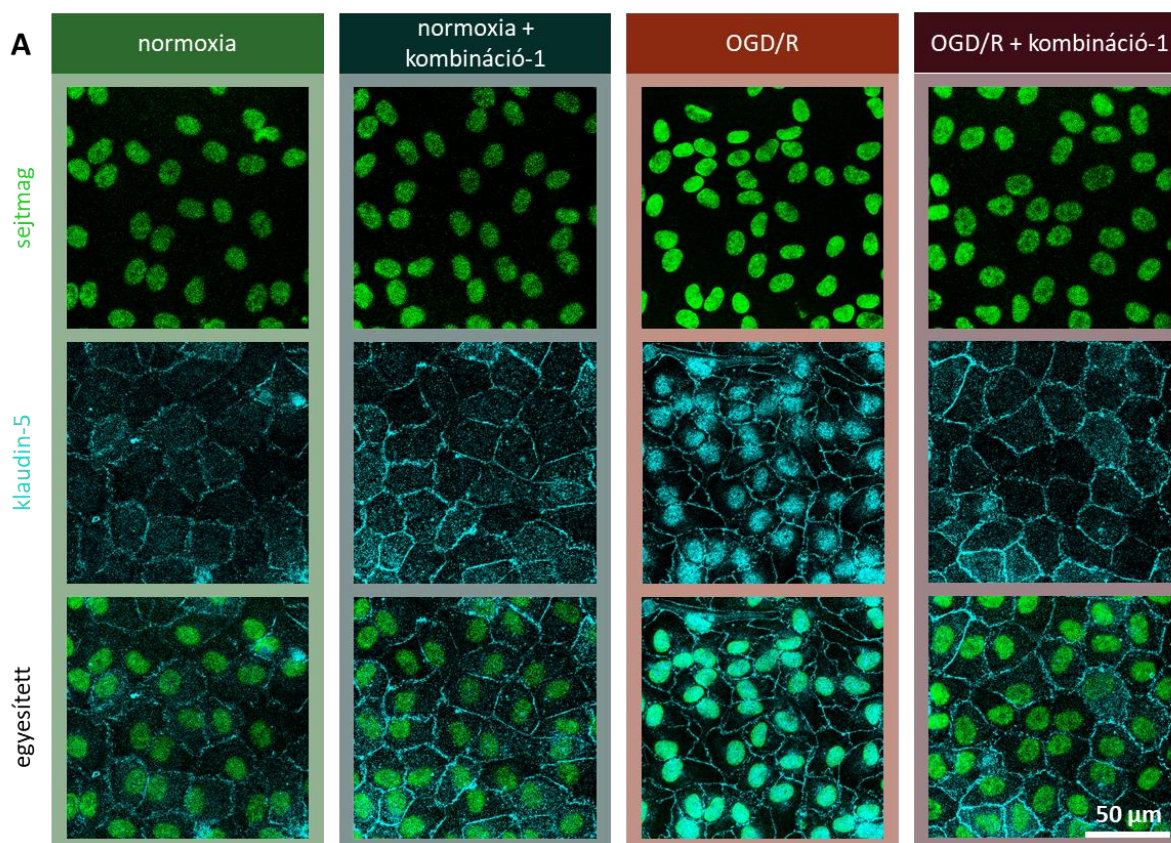
A vér-agy gát permeabilitási kísérleteket követően az agyi endotélsejtek rétegét fixáltuk és immuncitokémiai módszerrel megfestettük a sejtmagokat, valamint a vér-agy gát legfontosabb szoros sejtkapcsoló fehérjéjét, a klaudin-5 molekulát és a KLF2 transzkripció faktort. A festések eredményeképpen a mikroszkópos képeken egységes endotélsejtréteg látszik, a KLF2 transzkripció faktor festődése a sejtmagban és perinukleárisan a legintenzívebb (14/A ábra). A mikroszkópos felvételek fluoreszcens festési intenzitásainak kiértékelése alapján igazolódott, hogy normoxiában a kombináció-1 kezelés képes megemelni a KLF2 szintjét (14/B ábra). Azonban a sérülés hatására, OGD/R körülmények között is megemelkedik a transzkripció faktor szintje a normoxiához képest, valószínűleg a sejtek védekező mechanizmusának részeként, és ezt a változást a kombináció-1 kezelés már nem tudta befolyásolni (14/B ábra).

A klaudin-5 szoros sejtkapcsoló fehérje festődési mintázata a kontroll, normoxiás csoportban jellegzetes, funkciójának megfelelően a sejtek határán, a membránban megfigyelhető elhelyezkedést mutat (15/A ábra). Normoxiában a kombináció-1 kezelés hatására a klaudin-5 fehérje membránokban való megjelenése még kifejezettebb lett, festődési intenzitása is erősebbé vált, amit a fluoreszcens képek kiértékelése is igazolt (15/B ábra).

Az OGD/R károsodást követően a klaudin-5 festődési mintázata drasztikus módon megváltozott, a membrán festődés szakadozottá vált és sejten belüli lokalizációja is megváltozott, a membrán helyett a citoplazmában jelent meg (15/A ábra). A sérülést követően a festési intenzitása is szignifikáns mértékben lecsökkent (15/B ábra). Ez a szoros sejtkapcsolatok sérülésére utal, ami a vér-agy gát permeabilitásának növekedését okozza. A kombináció-1 kezelés hatására azonban a klaudin-5 festési mintázata a normoxiához hasonlóvá vált, és a képek fluoreszcencia intenzitásának analízise is igazolta, hogy OGD/R alatti kombináció-1 kezelés hatására a klaudin-5 fehérje expressziója szignifikáns módon megemelkedett a sejtenyészetben (15/A-B ábra).



14. ábra. A kombináció-1 kezelés hatása az agyi endotélsejtek KLF2 immuncitokémiai festődésére normoxiában és OGD/R esetén (A). A KLF2 immuncitokémiai festés intenzitásának kiértékelése normoxiában (N), OGD/R esetén és a kezelések hatására (N+K, OGD/R+K) (B). Statisztika: egyutas ANOVA teszt, Bonferroni posztteszt. * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$, az N csoporthoz viszonyítva; $n=10$



15. ábra. A kombináció-1 kezelés hatása az agyi endotélsejtek klaudin-5 immuncitokémiai festődésére normoxiában és OGD/R esetén. (A). A klaudin-5 immuncitokémiai festés intenzitásának kiértékelése normoxiában (N), OGD/R esetén és a kezelések hatására (N+K, OGD/R+K) (B). Statisztika: egyutas ANOVA teszt, Bonferroni posztteszt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, az N csoporthoz viszonyítva; #### $P < 0,0001$, az OGD/R csoporthoz viszonyítva; $n=10$

5. MEGBESZÉLÉS

A magas mortalitás és nagyarányú prevalencia ellenére a sztrók kezelésére irányuló terápiás lehetőségek igen korlátozottak (Adams és mtsai., 2007). Az egyetlen, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) által jelenleg elfogadott hatóanyag a trombolitikus hatású szöveti plazminogén aktivátor (tPA), mely kezelésben a rövid terápiás ablak és a nagy kockázati tényezők miatt csak kevés sztrók beteg részesülhet, és a kialakuló szövődmények is súlyos következményekkel járhatnak. Sürgető szükség van ezért olyan hatóanyagok fejlesztésére, melyek hatékonyan képesek az iszkémia során fellépő oxigén és glükóz depriváció, majd az azt követő reperfüzió hatására bekövetkező szöveti károsodásokat kivédeni, melyeknek első meghatározó jele a vér-agy gát sérülése (Abdullahi és mtsai., 2018; Sweeney és mtsai., 2016; Sifat és mtsai., 2017).

Kutatócsoportunk korábban kifejlesztett a vér-agy gát sejtjeire számos ponton jótékony hatással bíró kombináció-1 molekulakeveréket, mely jelenleg szabadalmaztatási eljárás alatt áll, és amely fiziológiás körülmények között az agyi endotélsejtek gátfunkcióit képes szignifikáns módon javítani *in vitro* kísérletekben. Jelen munkánk során a kombináció-1 molekulakeverék hatását tanulmányoztuk patológiás körülmények között, vizsgálva az iszkémiás sztrók sejtenyésztes modelljében a vér-agy gát sejtjeinek életképességét, a modell elektromos ellenállását és áteresztőképességét, valamint a KLF2 transzkripciós faktor és a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérje expresszióját.

Az impedanciamérés az endotélsejtréteg integritásának mérésére alkalmas, jelzőanyag nélküli, nem-invazív, valós idejű sejtanalitikai módszer, mely képet ad arról, hogy bizonyos tenyésztési körülmények vagy különböző kezelőanyagok hozzáadása, illetve azok hiánya milyen változást idéz elő az endotélsejtréteg életképességében. A sejtek letapadása után a sejtek és a tenyésztőlemez alján lévő mikroelektrodák között létrejövő váltakozó áramú elektromos ellenállás (impedancia) az elektródafelszín lefedettségének mértékével egyenesen arányosan nő. Amennyiben a sejtréteget károsodás éri, a sejtek felgömbölyödnek, életképességük és számuk csökken, így az impedancia is csökkenő tendenciát mutat, protektív anyaggal történő kezelés során pedig impedancianövekedést tapasztalunk. Impedanciaméréseink alapján a kiinduló ponthoz, a normoxiás állapothoz képest a hat órás oxigén-glükóz megvonás a sejtinдекс szignifikáns csökkenését okozta, vagyis az agyi endotélsejtek életképességére a hipoxia és hipoglikémia károsító hatással van. Az ezt követő reoxigenáció során a sejtinдекс értékek a normoxiás állapothoz lassú tendenciával közelítettek, a sejtek visszakerülve a normál glükóz és oxigénellátottság állapotába lassan regenerálódtak. Ez utóbbi felépülési folyamatot a

reoxigenáció alatti kombináció-1 kezelés szignifikáns módon javította. Kísérleteink ezáltal bizonyították, hogy a kombináció-1 kezelés nemcsak fiziológias körülmények között, hanem jelen esetben OGD/R sérülést követően is képes a sejtek életképességét növelni, és szignifikáns módon védeni a káros hatásokkal szemben.

Az agyi endotélsejtek közti szoros sejtkapcsolatok, melyek egyik legfontosabb alkotója a kladin-5 fehérje, szigorúan szabályozzák a vér-agy gátnak még az ionokkal szembeni áteresztőképességét is. A szoros kapcsolatok minőségének változása meghatározza az ionok paracelluláris áramlásának mértékét a vér-agy gát modell luminális és abluminális kompartmentje között, melyet a sejtréteg transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER) értékével mérhetünk (Deli és mtsai., 2005). Konfluens sejtréteg és jó paracelluláris gátfunkciók mellett a TEER értékek magasak, ezzel szemben toxikus hatások esetén a sejtréteg ellenállása csökken. A vér-agy gátat alkotó sejtrétegek áteresztőképességének mértékét permeabilitási marker molekulák (pl.: SF, EBA, mannitol) átjutásával teszteljük. A markerek átjutásának alacsony mértéke a modell jószágára utal, és az egyes markerek esetén irodalmi adatok által széles körben alátámasztott (Deli és mtsai., 2005).

Az iszkémiás körülményeknek a vér-agy gát egyes gátfüncióira (TEER, marker molekulák permeabilitása) kifejtett hatása nem teljesen tisztázott a szairodalomban. Az egyes irodalmi eredmények összehasonlítását nehezíti az alkalmazott OGD/R paraméterek eltérései is. Jelen kísérleteinkben 6 órás OGD-t és 24 órás reoxigenációt alkalmaztunk. Ezeket a kísérleti paramétereket japán együttműködő partnereinkkel közösen dolgoztuk ki, és bizonyítottuk, hogy OGD/R hatására a TEER csökken, az SF és EBA permeabilitása pedig megnő primer patkány ko-kultúra vér-agy gát modellen, és a gátfünciók romlása ko-kultúra esetén még kifejezettebb a monokultúrával összehasonlítva (Sato és mtsai., 2022). Ezzel összhangban állnak a jelen kísérleteinkben kapott eredményeink is, és igazolni tudtuk, hogy humán vér-agy gát modellen is csökken a TEER és megnő a modell áteresztőképessége marker molekulákra nézve OGD/R hatására.

Ezzel ellentétes változásokat figyeltek meg Tornabene és csoportja primer borjú agyi endotélsejtekből és patkány asztrocitákból álló ko-kultúrán végzett kísérleteik során, ahol a kezdeti TEER értékek 4 órás OGD-t követően alacsonyabbak lettek, de ezt 24, illetve 48 óra reoxigenáció majdnem a kezdeti szintre növelte (Tornabene és mtsai., 2019). Mannitol, valamint különböző molekulatömegű FITC-dextrán molekulák segítségével elvégzett passzív permeabilitási kísérleteikben pedig az OGD során jelentős permeabilitás növekedést tapasztaltak, ám az azt követő reoxigenáció során a permeabilitási értékek a kezdeti szintet vették fel és stabilan tartották azt (Tornabene és mtsai., 2019).

Ozgür és csoportja hipoxia primer borjú agyi kapilláris endotélsejtek növekedésére gyakorolt hatását vizsgálták. 24 és 48 órás hipoxia jelentősen emelte a sejtréteg TEER értékét és ezzel összhangban a kladin-5 expressziós szintjét is, míg a mannitol vér-agy gát permeabilitási marker molekula permeabilitása a hipoxia hatására nem változott (Ozgür és mtsai., 2022). A kísérleteikben azonban csak oxigén megvonást vizsgáltak, glükóz megvonást nem, de *in vivo* iszkémiás körülmények esetében mindkettő szintje jelentősen lecsökken és együttesen járul hozzá a szöveti károsodáshoz (Abdullahi és mtsai., 2018; Sweeney és mtsai., 2016).

A kombináció-1 kezelés kísérleteinkben mind normoxiában, mind OGD/R károsodás esetén jótékonyan befolyásolta a vér-agy gát gátfunkcióit. Normoxiában növelte a sejtréteg elektromos ellenállását, javítva ezzel a modell szorosságát, és csökkentette a vér-agy gát áteresztőképességét mindkét marker molekulára (SF, EBA), amely azt jelzi, hogy mind a sejtek közötti paracelluláris, mind pedig a sejteken keresztüli transzcelluláris transzportútvonalak átjárhatósága csökkent, ami egy sokkal robosztusabb, erősebb vér-agy gát modellt eredményez. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kombináció-1 kezelés nemcsak normoxiában, hanem OGD/R sérülést követően is képes volt a károsodott vér-agy gát funkciókat javítani, és a sérülést hatékonyan kivédeni: emelte az agyi endotélsejtréteg elektromos ellenállását (TEER) és a markerek permeabilitását csökkentette.

Az agyi endotélsejtekben expresszáldó KLF2 transzkripciós regulátor irodalmi adatok alapján számos protektív hatással bír, antitrombotikus, vazodilatáló, gyulladáscsökkentő hatása kardiovaszkuláris betegségek esetén már ismert (Turpaev, 2020), ám védő szerepe agyi iszkémia esetében még alig kutatott. Shi és csoportja a KLF2 hatását vizsgálva iszkémiás sztrókbán arra az eredményre jutott, hogy a KLF2-túltermelő transzgén egerekben az agyi iszkémiás sérülés jelentősen kisebb volt, mint a kontroll egerekben, míg KLF2-knockout egerekben a sérülés jóval kiterjedtebb volt (Shi és mtsai., 2013). Mivel a KLF2 számos jelátviteli útvonalat befolyásol, képes fehérjék közvetlen szabályozására és a véráramlási válaszok fontos transzkripciós regulátoraként működik, arra a kérdésre kerestük a választ, vajon megemelhető-e a KLF2 expressziós szintje a kombináció-1 kezeléssel OGD/R-ben is, és a KLF2 szintjének növekedése a sérüléssel szemben protektív hatással lesz-e az agyi endotélsejtekre.

Immuncitokémiai festéseink igazolták, hogy a kombináció-1 kezelés normoxiában növelni tudta a KLF2 kifejeződését, és erősítette is a vér-agy gát funkciókat. OGD/R körülmények esetén azonban maga a sérülés is megemelte a KLF2 szintjét a normoxiához képest, amit a kombináció-1 kezelés tovább már nem növelt. Ennek ellenére a kombináció-1 kezelés protektív

hatása minden vizsgált vér-agy gát funkcióra kimérhető volt, ami arra utal, hogy a kombináció-1 kezelés hatásmechanizmusa valószínűleg nem a KLF2 szintjének emelésével valósul meg.

Korábbi kutatási eredményeink már igazolták, hogy a kombináció-1 kezelés fiziológiás körülmények között elsősorban a kladin-5 fehérje mennyiségének növelésén keresztül javítja a vér-agy gát funkciókat, ezt a hatást most is kimutattuk a normoxiás kezelt csoportok (N+K) esetében. Mivel a kombináció-1 kezelés képes volt a vér-agy gát funkciókat OGD/R sérülést követően is javítani, ezért kíváncsiak voltunk, hogy ezt a hatását a kladin-5 expressziójának növelésével éri-e el.

Eredményeink kimutatták, hogy a kladin-5 szoros sejtkapcsoló fehérje sejten belüli elhelyezkedése OGD/R sérülést követően jelentősen megváltozik, a membránban való lokalizációja helyett citoplazmikus expressziót mutat. Tornabene és munkatársai szintén a kladin-5 molekula intracelluláris lokalizációját figyelték meg 4 órás OGD-t követően (Tornabene és mtsai., 2019). Korábbi kísérleteinkben a kladin-5 fehérje immunfestésének felszakadozottságát mutattuk ki OGD/R esetében patkány vér-agy gát modellben is (Sato és mtsai., 2022). Kísérleteinkben a kombináció-1 kezelés OGD/R esetében a normoxiás kontroll csoport szintje fölé emelte a kladin-5 festődési intenzitását, így valószínűsíthető, hogy a kezelésünk az endotélsejtek közötti szoros sejtkapcsoló fehérje, a kladin-5 szintjének növelésén, így a vér-agy gát paracelluláris integritásának javításán keresztül az OGD/R sérüléssel szemben protektívnek bizonyult.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink azt igazolják, hogy az általunk kifejlesztett új, szabadalmaztatás alatt álló molekulakombináció képes a vér-agy gát gátfunkcióinak erősítésén keresztül az agyi endotélsejtek károsodását kivédeni sejtenyészetes modellben és további vizsgálatokat követően ígéretes terápiás szer lehet iszkémiás sztrók kezelésében.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53. doi: 10.1038/nrn1824
- Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):C343-C356. doi: 10.1152/ajpcell.00095.2018
- Adams HP, del Zoppo G, Albers MJ, Deepak LB, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijedicks EFM. (2007) Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke, 2007 AHA/ASA Guidelines Update. *Circulation*, 115: 478-534
- Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J.* 2009 Nov;73(11):1983-92. doi: 10.1253/circj.cj-09-0583
- Atkins GB, Jain MK. Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res.* 2007 Jun 22;100(12):1686-95. doi: 10.1161/01.RES.0000267856.00713.0a
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszeka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 2014 Nov;45(8):610-38. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.11.018
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck MP, Ferreira L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 2014 Jun 17;9(6):e99733. doi: 10.1371/journal.pone.0099733
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Feb;25(1):59-127. doi: 10.1007/s10571-004-1377-8
- Doddaballapur A, Michalik KM, Manavski Y, Lucas T, Houtkooper RH, You X, Chen W, Zeiher AM, Potente M, Dimmeler S, Boon RA. Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Jan;35(1):137-45. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304277
- Fledderus JO, Boon RA, Volger OL, Hurttala H, Ylä-Herttuala S, Pannekoek H, Levonen AL, Horrevoets AJ. KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jul;28(7):1339-46. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.165811

GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol.* 2021 Oct;20(10):795-820. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0

Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 May;902:230-9; discussion 239-40. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06318.x

Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* 2008 Sep;10(3):455-72. doi: 10.1208/s12248-008-9055-2

Kumar A, Lin Z, SenBanerjee S, Jain MK. Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases. *Mol Cell Biol.* 2005 Jul;25(14):5893-903. doi: 10.1128/MCB.25.14.5893-5903.2005

Lin Z, Hamik A, Jain R, Kumar A, Jain MK. Kruppel-like factor 2 inhibits protease activated receptor-1 expression and thrombin-mediated endothelial activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 May;26(5):1185-9. doi: 10.1161/01.ATV.0000215638.53414.99

Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Páli EK, Polgár TF, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, Veszélka 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.* 2023 Feb 3;12(3):503. doi: 10.3390/cells12030503

Mossu A, Rosito M, Khire T, Li Chung H, Nishihara H, Gruber I, Luke E, Dehouck L, Sallusto F, Gosselet F, McGrath JL, Engelhardt B. A silicon nanomembrane platform for the visualization of immune cell trafficking across the human blood-brain barrier under flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Mar;39(3):395-410. doi: 10.1177/0271678X18820584

Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation.* 2008 Mar 4;117(9):1161-71. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710111

Novodvorsky P, Chico TJ. The role of the transcription factor KLF2 in vascular development and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;124:155-88. doi: 10.1016/B978-0-12-386930-2.00007-0.

Ozgür B, Helms HCC, Tornabene E, Brodin B. Hypoxia increases expression of selected blood-brain barrier transporters GLUT-1, P-gp, SLC7A5 and TFRC, while maintaining barrier integrity, in brain capillary endothelial monolayers. *Fluids Barriers CNS.* 2022 Jan 4;19(1):1. doi: 10.1186/s12987-021-00297-6

Pardridge WM. Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. *Arch Neurol.* 2002 Jan;59(1):35-40. doi: 10.1001/archneur.59.1.35

Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005 Jan;2(1):3-14. doi: 10.1602/neurorx.2.1.3

Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, Kratz JR, Lin Z, Jain MK, Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):49-58. doi: 10.1172/JCI24787

Paudel R, Fusi L, Schmidt M. The MEK5/ERK5 Pathway in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 15;22(14):7594. doi: 10.3390/ijms22147594

Pfenniger A, Wong C, Sutter E, Cuhlmann S, Dunoyer-Geindre S, Mach F, Horrevoets AJ, Evans PC, Krams R, Kwak BR. Shear stress modulates the expression of the atheroprotective protein Cx37 in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Aug;53(2):299-309. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.05.011

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 2003 Oct;83(4):1359-400. doi: 10.1152/physrev.00007.2003

Sato K, Nakagawa S, Morofuji Y, Matsunaga Y, Fujimoto T, Watanabe D, Izumo T, Niwa M, Walter FR, Vigh JP, Santa-Maria AR, Deli MA, Matsuo T. Effects of fasudil on blood-brain barrier integrity. *Fluids Barriers CNS*. 2022 Jun 3;19(1):43. doi: 10.1186/s12987-022-00336-w

SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Lusinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA Jr, García-Cardena G, Jain MK. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med*. 2004 May 17;199(10):1305-15. doi: 10.1084/jem.20031132

Shi H, Sheng B, Zhang F, Wu C, Zhang R, Zhu J, Xu K, Kuang Y, Jameson SC, Lin Z, Wang Y, Chen J, Jain MK, Atkins GB. Kruppel-like factor 2 protects against ischemic stroke by regulating endothelial blood brain barrier function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Mar 15;304(6):H796-805. doi: 10.1152/ajpheart.00712.2012

Sifat AE, Vaidya B, Abbruscato TJ. Blood-Brain Barrier Protection as a Therapeutic Strategy for Acute Ischemic Stroke. *AAPS J*. 2017 Jul;19(4):957-972. doi: 10.1208/s12248-017-0091-7

Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*. 2016 May 26;19(6):771-83. doi: 10.1038/nn.4288

Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*. 2005 Dec;33(12):1719-23. doi: 10.1007/s10439-005-8775-z

Tornabene E, Helms HCC, Pedersen SF, Brodin B. Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial

cells/astrocyte co-cultures. PLoS One. 2019 Aug 19;14(8):e0221103. doi: 10.1371/journal.pone.0221103

Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, Baker-Smith CM, Beaton AZ, Boehme AK, Buxton AE, Commodore-Mensah Y, Elkind MSV, Evenson KR, Eze-Nliam C, Fugar S, Generoso G, Heard DG, Hiremath S, Ho JE, Kalani R, Kazi DS, Ko D, Levine DA, Liu J, Ma J, Magnani JW, Michos ED, Mussolino ME, Navaneethan SD, Parikh NI, Poudel R, Rezk-Hanna M, Roth GA, Shah NS, St-Onge MP, Thacker EL, Virani SS, Voeks JH, Wang NY, Wong ND, Wong SS, Yaffe K, Martin SS; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2023 Feb 21;147(8):e93-e621. doi: 10.1161/CIR.0000000000001123

Turpaev KT. Transcription Factor KLF2 and Its Role in the Regulation of Inflammatory Processes. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 Jan;85(1):54-67. doi: 10.1134/S0006297920010058

Veszeka S, Bocsik A, Walter F, Hantosi D, Deli MA. Vér-agy gát társkultúra modellek nanorészecskék tanulmányozására. Penetráció: összpontosítás a társkultúra rendszerekre. *ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS* 59 : Suppl. 2. 157-168. , 12 p. (2015)

Wahlgren NG, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis*. 2004;17 Suppl 1:153-66. doi: 10.1159/000074808.

Wang G, Kostidis S, Tiemeier GL, Sol WMPJ, de Vries MR, Giera M, Carmeliet P, van den Berg BM, Rabelink TJ. Shear Stress Regulation of Endothelial Glycocalyx Structure Is Determined by Glucobiosynthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Feb;40(2):350-364. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313399

White CR, Frangos JA. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Aug 29;362(1484):1459-67. doi: 10.1098/rstb.2007.2128

Wu D, Birukov K. Endothelial Cell Mechano-Metabolomic Coupling to Disease States in the Lung Microvasculature. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 Jul 19;7:172. doi: 10.3389/fbioe.2019.00172

Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2011 Nov;42(11):3323-8. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.608257

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani

témavezetőmnek, Dr. Veszélka Szilviának, a HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet tudományos főmunkatársának a munkám során nyújtott folyamatos szakmai támogatásáért és segítségéért;

Szecske Anikó PhD hallgatónak a kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen szakmai és technikai iránymutatásáért;

Prof. Deli Máriának a HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet kutató professzorának, hogy lehetőséget adott csoportjában a tudományos labormunka elsajátítására;

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónikának, az SZTE TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék egyetemi adjunktusának, belső konzulensként nyújtott segítségéért.

Köszönetet szeretnék mondani a Biológiai Barrierék Kutatócsoport minden tagjának kiemelve Janet Adegbite-ot, hogy nyitott szemléletükkel és segítségükkel hozzájárultak munkám sikereihez.

Végül különös hálával tartozom családomnak és barátaimnak, akik folyamatosan támogattak TDK munkám elkészítése során és eddigi egyetemi éveim alatt.