

Intravénás és intranazális P-glikoprotein moduláció vér-agy gátra gyakorolt hatásának vizsgálata fiatal és idős patkányokon

PhD Disszertáció

Bors Luca Anna



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológia és Bionikai Kar

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Témavezető: Vidáné Dr. Erdő Franciska

Budapest, 2020

Tartalom

Rövidítés jegyzék.....	3
Bevezető	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
1.1. A vér-agy gát felépítése és funkciója.....	8
1.1.1. Endothél sejtek	8
1.1.1.1. A vér-agy gát transzporterei.....	9
1.1.1.2. Adherens és szoros kapcsolatok	11
1.1.1.3. Glikokalix.....	13
1.1.1.4. Bazális membrán	14
1.1.2. Asztrociták.....	15
1.1.3. Periciták.....	15
1.1.4. Mikroglia.....	16
1.1.5. Neuronok.....	16
1.2. A vér-agy gát szerkezeti és funkcionális károsodásának vizsgálati módszertana	17
1.2.1. Szerkezeti elváltozások	17
1.2.2. Funkcióbeli elváltozások.....	19
1.2.2.1. Immunhisztokémia.....	20
1.2.2.2. Mikrodialízis.....	20
1.2.2.3. SPECT Képzőanyag módszer.....	21
1.2.2.4. ELISA	21
1.3. Citokinek az agyban.....	22
1.4. Vér-agy gát kóros működése neurodegeneratív betegségekben	25
1.4.1. Cerebrális ischemia, stroke.....	25
1.4.2. Alzheimer- és Parkinson-kór	26
1.4.3. Sclerosis Multiplex	26
1.5. Gyógyszerek bejuttatása az agyba	26
1.5.1. Orr-agy útvonal.....	27
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	28
3. MÓDSZEREK.....	30
3.1. Kísérleti állatok.....	30
3.2. Mikrodialízis.....	30
3.2.1. Hatóanyag formulációk és egyéb kezelő anyagok.....	30
3.2.2. A mikrodialízis előkészítése.....	31
3.2.3. Intravénás kezelés	32
3.2.4. Intranazális kezelés	32

3.2.5.	SPECT képalkotás.....	33
3.3.	Agyhomogenizálás és citokinszint mérés	34
3.4.	Anatómiai és hisztológiai vizsgálatok	35
3.4.1.	Immunhisztokémia.....	35
3.4.2.	Orrüreg hisztológia.....	36
3.4.3.	MRI.....	36
3.4.4.	Viselkedés és memória vizsgálatok.....	37
3.5.	LC-MS/MS bioanalitika	37
4.	EREDMÉNYEK	39
4.1.	Vér-agy gát öregedésének vizsgálata	39
4.1.1.	A vér-agy gát funkciók változásai egészséges öregedés során.....	39
4.1.1.1.	Mikrodialízis.....	39
4.1.1.2.	SPECT képalkotás.....	40
4.1.2.	Fehérje analízis és citokin szint vizsgálat.....	41
4.1.3.	A vér-agy gát szerkezeti elváltozásai egészséges öregedés során	42
4.1.3.1.	MR képalkotás	42
4.1.3.2.	Agyszövet immunhisztokémiai festése	43
4.1.3.3.	Agyi erek elektronmikroszkópos vizsgálata.....	44
4.1.4.	Az egészséges öregedés hatásai a memóriára.....	45
4.1.4.1.	Morris-féle vízi útvesztő.....	45
4.1.4.2.	Új tárgy felismerés	46
4.2.	A P-gp modulációjának modellje.....	47
4.2.1.	Formuláció kidolgozása intranazális kinidinhez.....	47
4.2.1.1.	Orrüreg metszetek, hisztológia	47
4.2.1.1.1.	Formuláció halmazállapota.....	47
4.1.2.	Intranazális kinidin agyi penetrációja PSC-833 jelenlétében	48
4.1.3.	Intranazális kinidin agyi penetrációjának változása intranazális adrenalin jelenlétében.....	49
5.	MEGBESZÉLÉS.....	51
	Eredmények értékelése	51
	Köszönetnyilvánítás	56
	Tézisekhez kapcsolódó publikációk	57
	Egyéb publikációk.....	59
	Ábrajegyzék	60
	Táblázatjegyzék.....	62
	Irodalomjegyzék.....	63

Rövidítés jegyzék

3R	R eplacement, R eduction and R efinement (helyettesítés, csökkentés és tökéletesítés)
^{99m}Tc-MIBI	Technetium (^{99m} tc) sestamibi
AA	Amino acid
AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosine-diphosphate
ADR	Adrenalin
AJ	Adherent junction
AMPA	A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ApoE	Apolipoprotein E
AQP1	Aquaporin 1
ATP	Adenosin triphosphate
Aβ	Amyloid β
BCRP	Breast cancer protein (ABCG2)
CCL	C-C kemokin ligand
CXCL	C-X-C kemokin ligand
CYP	Citokróm P
CSF	Cerebrospinális folyadék
DI	Diszkriminációs index
EAAT	Excitatory amino acid transporter
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENT1	Ekvilibratív nukleozid transzporter 1
FGF-β	Fibroblaszt növekedési faktor (FGF-2)
FOV	Field of view
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLUT1	Glükóz transzporter 1
HRP	Horseradish peroxidase
i.v.	Intravénás
IFNγ	Interferon γ
IgA	Immunglobulin A
IL-15	Interleukin 15
IL-1α	Interleukin 1 α
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IP-10	Interferon γ - indukált protein 10 (CXCL10)
IR	Insulin receptor
JACOP	Junction-associated coiled-coil protein (paracingulin, cingulin-like protein 1)
JAM	Junction adhesion molecule
LAT1	L-type amino acid transporter 1
LRP-1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LSR	Lipolízis-stimulált lipoprotein receptor
MCP-1	Monocita chemoattractant protein 1 (CCL2)
MCT	Monocarboxylate transporter

MDR	Multi drug resistance
MFS	Major facilitator superfamily
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein 1 α (CCL3)
MMP	Mátrix metalloproteáz
MPP7	Membrane palmitoylated proteins 7
MRI	Magnetic resonance imaging
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NFκB	Nukleáris faktor κ b
NK	Natural killer
NMDA	N-metil-D-aszpartát
nNOS	Nitrogen-monoxid szintáz
NO	Nitrogen-monoxid
NOR	Novel object recognition
NPH	Normal pressure hydrocephaly
NVE	Neurovaszkuláris egység
OAT	Organikus anion transzporter
OATP	Organikus anion transzporter peptid
OCT	Organikus kation transzporterek
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFRβ	PDGF β receptor
PEG	Polyethylene glycol
Pi	Inorganic phosphate group
P-gp	P-glikoprotein (MDR1, ABCB1)
PPF	Perifériás perfúziós folyadék
PSC	PSC-833 (valsopodar)
QND	Quinidine (kinidin)
Rantes	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (CCL5)
ROS	Reactive oxygen species
SCF	Stem cell factor
SLC	Solute carrier
SPECT	Single photon emission computed tomography
TEER	Transendothelial electrical resistance
TFR	Transzferrin
TGFβ	Transzformáló (tumor) növekedési faktor
Th1	T helper cell
TJ	Tight junction
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor nekrosis faktor α
TR/TE	Repetition time / echo time
UN	United Nation
VE-Cadherin	Vascular endothelial caherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
Wnt	Wingless and Int-1
ZO	Zonula occludens

Bevezető

A vér-agy gát

Az élő szervezet homeosztázisát bonyolult, és kifinomult szabályzó rendszerek felügyelik; az optimális fizikai/kémiai/biokémiai környezet fenntartásában sejtek és molekulák sokasága vesz részt. Az agy megfelelő működéséhez különösen fontos a stabil környezet. A szervezet legkényesebb sejtjei közé tartoznak a neuronok, melyek az egyéb sejtek működése számára még megengedett kisebb változásokra (pl. glukóz-, ion- vagy oxigénszint) is már funkciózavarral reagálnak. Az evolúció során az idegrendszer megfelelő izolációját biztosító védelmi rendszer alakult ki, ennek legfontosabb eleme a vér-agy gát. Ehhez az agyi kötőszöveti sejtek és kapillárisok sajátos módon specializálódtak, így szabályozni képesek, mi és milyen mennyiségben juthat tovább a vérből az agyba. Még a legkisebb ionok és molekulák is csak speciális transzportmechanizmusok segítségével jutnak az agyba, ugyanis a vér-agy gáton át minimális a diffúzió (csak erősen lipiddoldékony, kis méretű molekulák számára átjárható). Az agyban felhalmozódó molekulák kiürítéséhez is különleges transzporter folyamatokra van szükség.

A vér-agy gát felépítésében fontos szerep jut az agy kötőszöveti sejtjeinek, az asztrogliaéknak, melyek támasztósejt funkció mellett a neuronok megfelelő tápanyag és oxigénellátásáért is felelősek, továbbá anyagfelvételükkel (neurotranszmitterek, ionok) biztosítják, hogy a szinapszisok mindig funkcióképes állapotban legyenek. A vér-agy gátat alkotó stuktúrák összességét neurovaszkuláris egységnek nevezzük. Ez a neurovaszkuláris egység egyes kórfolyamatokban, vagy akár az életkor előrehaladtával kisebb vagy nagyobb mértékben megváltozhat; barrier tulajdonsága fellazul, és/vagy funkcionális egységei leépülnek. Az ilyen változások nagyban hozzájárulnak számos öregkori demenciával járó betegséghez is, amilyen például az Alzheimer-kór [1]–[4] vagy a Parkinson-kór [4]–[6].

Transzporter fehérjék és gyógyszer interakciók

A vér-agy gát transzporter fehérjéinek egyik csoportja biztosítja a megfelelő iongradienst, valamint a tápanyag és az építőelemek felvételét a vérből az agy felé, a másik csoportba azok a transzporterek tartoznak, amelyek a nemkívánatos vegyületeket távolítják el a központi idegrendszerből. Az utóbbiak közé tartoznak az efflux transzporterek (köztük a P-gp), amelyek felelősek azért, hogy a szisztémás keringésen keresztül bizonyos hatóanyagok ne tudjanak (kontrollálatlan mértékben) bejutni a központi idegrendszerbe. Működésük elengedhetetlen az agy fiziológiai extracelluláris környezetének fenntartásában és funkciócsökkenésük súlyos károsodásokhoz, például neurodegenerációhoz vezethetnek. Az öregedéssel össze-

függő agyi elváltozások és ezen belül is a vér-agy gát károsodásai főként ezeket a transzportereket érintik [7].

A modern medicinában gyakori jelenség, hogy egy páciens több gyógyszert használ egy időben. Ilyenkor előfordul, hogy az egyik szer gátolja, vagy épp fokozza egy másik hatékonyságát. Ez többnyire annak köszönhető, hogy a két (vagy több) hatóanyag ugyanazon fehérjén fejt ki hatását, gátolva vagy épp aktiválva azt, esetleg leszorítva a másik molekulát a fehérje aktív centrumából (farmakodinámiai interakció) [8]. Egyes esetekben ez a mechanizmus előnyös lehet a kezelés szempontjából, így például a daganatterápiában [9]. Az egyik korai elképzelés az volt, hogy az interakció felhasználható lesz az úgynevezett multi-drog rezisztens fehérjék gátlására, így növelve a kemoterápiás kezelés hatékonyságát. Ilyen, úgynevezett revertáló ágensek kutatása-fejlesztése folyamatban van, bár egyelőre a gyógyszerhatóságok által még nem kerültek engedélyezésre. Vér-agy gát efflux transzportereinek ideiglenes gátlása [10], vagy megkerülése [11] a központi idegrendszeri betegségek kezelésére szintén opció, és bár sikerült kimutati, hogy P-gp gátlás szubsztrát gyógyszerek agyi expozíciójának növekedésével jár [12] a terület még aktív kutatás és diszkusszió tárgya [13]. Ezeket a különleges eseteket leszámítva, a gyógyszer kölcsönhatás többnyire veszélyforrást jelent az egy időben több gyógyszert is szedő betegek számára. Ha a különböző, egyszerre alkalmazott hatóanyagoknak nincs is közös célfehérjéje, a gyógyszereket elbontó enzimek (például a CYP enzimcsalád) túlterhelése lassíthatja egy hatóanyag kiürülését a szervezetből (farmakokinetikai interakció), mely koncentrációja toxikus szintre növekedhet, túladagolás tüneteit produkálhatja. Ez kiemelt probléma az idősebb betegek esetében, akiknek gyakran már csökkentek a vese- és májfunkciói [8].

Öregedés és demencia

Az öregedés biológiájával és patológiájával foglalkozó kutatások az elmúlt években a tudományos érdeklődés fókuszába kerültek. E kérdéssel kapcsolatos fokozott figyelem oka az, hogy az öregedés az egészségügyi rendszerekre ható rendkívüli teher mellett egyre fokozódó szociális, gazdasági nehézséget is jelent a társadalomnak. A WHO publikációi szerint 2015-ről 2050-re majdnem kétszeresére várható a 60 felettiek százalékos aránya a teljes népességhez mérve [14]. Az UN 2020-ban kiadott beszámolója alapján, 2019-ben, Európában és Észak Amerikában 30 nyugdíjas korú (65 év feletti) jut 100 aktív korúra (20-64 éves kor közöttiek). Ez az arány 2050-re közel 50%-ra fog emelkedni. [15].

Az életkor növekedésével exponenciálisan növekszik bizonyos betegségek előfordulási gyakorisága, így például a daganatoké, a szív-érrendszeri, és anyagcserebetegségeké, valamint az agyi érkatasztrófáké. Az időskor betegségeivel foglalkozó orvostudományi ág vált önálló területté: ez a geriátria. Ennek általánosan elfogadott tétele szerint az öregedés elkerül-

hetetlen biológiai folyamat, mely nagyrészt genetikai szinten meghatározott. Minden szervrendszerünkben sajátos módon zajlik ez a folyamat, és ez alól nem kivétel a központi idegrendszer öregedése sem, melynek leggyakoribb megnyilvánulási formája a demencia. Az elmúlt két évtizedben a PubMed adatbázisában található, demenciával foglalkozó tudományos publikációk száma meghaladta a 34 ezret (2000.01.01. után megjelent cikkek száma, „aging” + „dementia” kulcsszavakra, az adatbázis lekérdezésének ideje: 2020.11.11.), ennek ellenére a mai napig nagyon keveset tudunk a pathomechanizmusáról, így gyógyításának és megelőzésének lehetőségeiről. Számos mechanizmust tételeznek fel a demencia okaként, egyik ezek közül, hogy az öregedés során a vér-agy gát struktúrája károsodik, és/vagy funkcionális egységei tönkremennek.

Kutatásom céljai

A vér-agy gát kutatásoknak, és köztük a jelen munkának is távlati célja, hogy ennek a védelmi rendszernek a megismerésével képesek legyünk befolyásolni annak működését és ezáltal betegségek kezeléséhez találhassunk támpontokat. E kutatási területen belül fontos rész a vér-agy gát transzporter fehérjéi, köztük a P-glikoprotein (P-gp) kémiai modulációjának vizsgálata, valamint a vér-agy gát életkor előrehaladtával párhuzamos funkciózavarának elemzése.

Az előbbieken taglaltak alkotják kutatásom motivációját. Hasznosnak ítéltém megvizsgálni a vér-agy gát működését fiatal és idős patkány modellen, egy jól bevált P-gp transzporter szubsztrát anyag, a kinidin segítségével. Vizsgálataimban kitértem a szerkezeti elváltozások validálására, hogy a vizsgált állatokban bizonyítsam az öregedés jelét, mellette végeztem egy citokinszint mérést ELISA módszerrel, hogy felderítsem a vér-agy gát öregedése mögött fellelhető gyulladásozó folyamatokat, majd mikrodialízis technika alkalmazásával vizsgáltam a vér-agy gát P-gp transzporterjeinek funkcióját. Intravénás kinidin adagolást követően plazma és agyi kinidin koncentrációk összehasonlításával figyeltem meg, miként változik ennek a hatóanyagnak az eloszlása P-gp gátlószer, PSC-833 (valsopodar) előkezelés hatására, fiatal illetve idős állatokban.

Doktori munkám másik részét alkotta a vér-agy gát jelentőségének vizsgálata az intranazális gyógyszeradagolás esetén, mely kísérletek keretén belül a kinidin orrüregből az agyba történő disztribúcióját vizsgáltam, különböző P-gp modulációs módszerekkel. Elsőként a kinidin eloszlásában bekövetkező változásokat figyeltem meg lokális és szisztémás (intravénás) PSC-833, illetve lokális adrenalin jelenlétében.

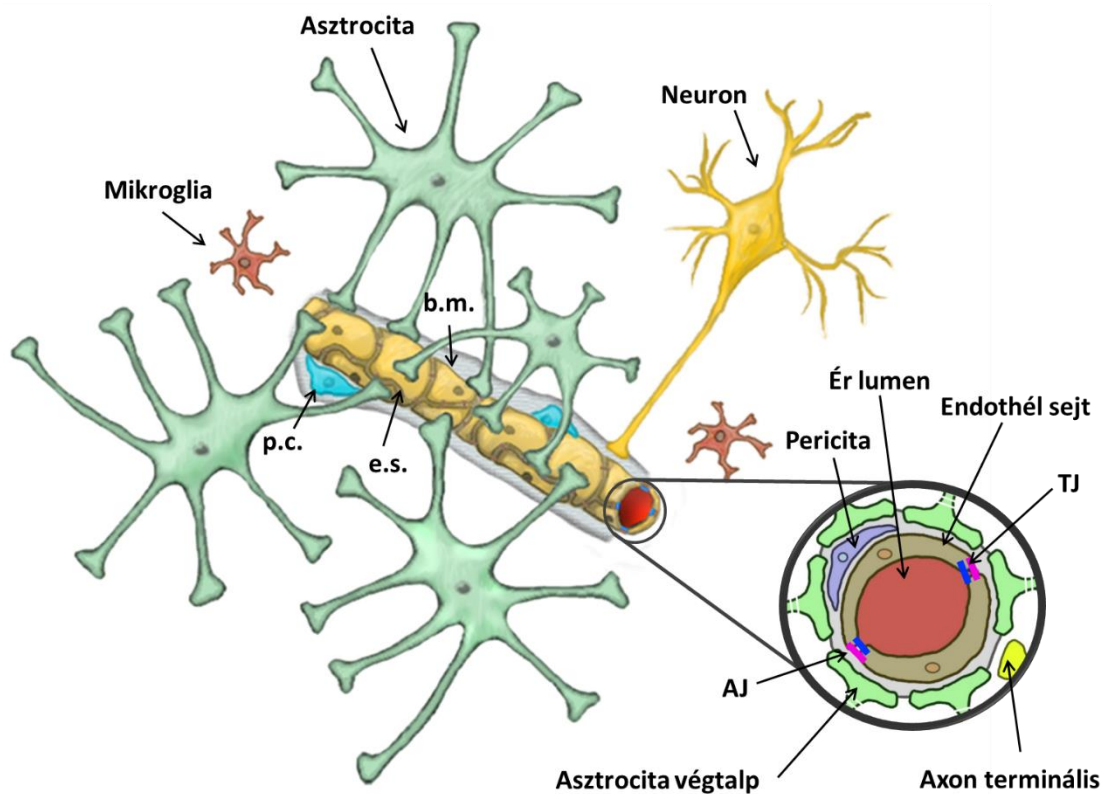
Vizsgálataim eredményei segítenek a vér-agy gát működésének jobb megértésében, hogy ez a tudás aztán alkalmazható legyen a gyógyszerkutatásban. Idősebb páciensek esetén fontos ügyelni a megváltozott metabolikus állapotukra, illetve, hogy a szervek nagyobb

veszélynek lehetnek kitéve, a lelassult eliminációs folyamatok okozta gyógyszerfelhalmozódás következtében. Az optimalizált hatóanyag-beviteli módszerek pedig segíthetnek abban, hogy a gyógyszer úgy eljusson a célszervbe (például az agyba), hogy a szisztémás jelenléte a lehető legkisebb legyen, így csökkentve az esetleges kellemetlen mellékhatások kialakulását.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A vér-agy gát felépítése és funkciója

A vér-agy gát számos különböző sejt együttműködése révén tartja meg az agy megfelelő működéséhez szükséges homeosztázist (*1.1 Ábra*).



1.1 Ábra - A vér-agy gát felépítése. Az agyat behálózó kapillárisokat különböző sejtek veszik körül, melyek hozzájárulnak az agy kémiai védelméhez: neuron axon terminálisok, asztrocita végtalpak, mikroglia, periciták (p.c.). A kapillárisokat speciális, szorongó, transzporterekben gazdag endothél sejtek (e.s.) alkotják. A keresztmetszeti illusztráción láthatóak a szoros és adherens (TJ, kék és AJ, lila) kapcsolatok, melyek korlátozzák a paracelluláris transzportfolyamatokat. Az endothél sejtek bazális oldalán található a bazális membrán (b.m.). (Az illusztrációt egy korábbi munkámból [16] dolgoztam át.)

1.1.1. Endothél sejtek

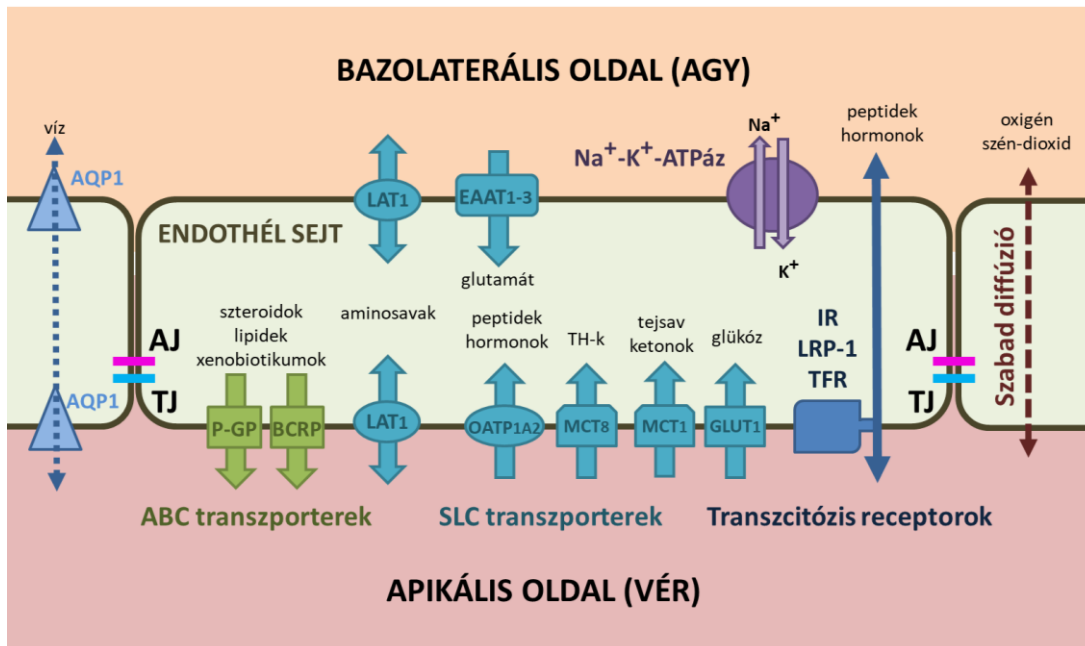
Az érrendszer alap építőeleme az endothél sejt. Az agyi kapillárisokat alkotó endothél sejtekre jellemző a polaritás, számos fehérje és egyéb makromolekula található a membrán-

jukon, más-más expressziós mintát mutatva a luminális (apikális) és az abluminális (bazolaterális) oldalukon [17]–[19].

1.1.1.1. A vér-agy gát transzporterei

A transzmembrán fehérjék között kiemelkedő szerepük van a transzportereknek, melyek **1)** egyensúlyban tartják az idegi működéshez elengedhetetlen iongradienst, **2)** biztosítják a tápanyag forgalmat és építőelemeket továbbítanak a vérből az agy felé, valamint **3)** nem kívánatos vegyületeket távolítanak el a központi idegrendszerből (**1.2 Ábra**). Az iongradiens fenntartásában vesz részt például a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ fehérje, mely az ATP-hidrolizációból nyert energiával nátrium ionokat szállít az endothél sejtekbe, miközben kálium ionokat távolít el. Az ionok részt vehetnek tápanyagok transzportjában is. Ezek a transzportfolyamatok közvetlenül nem igényelnek ATP-hidrolízisből nyert energiát, de kihasználják azt az iongradienst, melyet ATP bontással tart fent a sejt [20]. Az oldott anyag szállító (SLC) proteinek családja alkotja a vér-agy gát influx transzportereinek nagy részét. Ezek a fehérjék látják el tápanyagokkal, építőelemekkel az agyat, illetve juttatnak át jelmolekulákat, hormonokat a barrieren. Az SLC családba tartoznak az organikus anion transzporter fehérjék, transzporter peptidek (OAT és OATP), az organikus kation transzporterek (OCT), a monokarboxilát transzporterek (MCT), az L-típusú aminosav transzporter 1 (LAT1), a ekvibratív nukleozid transzporter 1 (ENT1) a nátrium független glükóz transzporter 1 (GLUT1) és az excitatórikus aminosav transzporterek (EAAT) pedig az idegi működés során extracelluláris térbe került glutamát eltávolítását végzik az agy parenchimából [17], [20]. A vizet speciális csatornák, az aquaporinok (a vér agy gát endothél sejtjeiben az AQP1) engedik át az idegrendszerbe [21]. Az influx transzporterekkel szemben az efflux transzporterek fő feladata, hogy megakadályozzák xenobiotikumok, szövet-idegen és potenciálisan neurotoxikus anyagok agyba való jutását. Működésük elengedhetetlen az agy fiziológiás extracelluláris környezetének fenntartásában és funkciócsökkenésük súlyos neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezethetnek [7]. Ebbe a csoportba tartoznak az ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter családba tartozó P-gp (más néven MDR1 vagy ABCB1), az emlőrák rezisztencia fehérje (BCRP, vagy ABCG2), és további multidrog rezisztencia asszociált (MRP) fehérjék. Az efflux transzporterek tehetőek felelőssé azért, hogy a szisztémás keringésen keresztül meglehetősen nehéz bizonyos hatóanyagokat eljuttatni a központi idegrendszerbe.

Az ABC fehérjék családjába tartozó két legfontosabb transzporter a P-gp és a BCRP. Mindkét transzporter megtalálható az agyi endothél sejtek apikális (luminális) membránjában [17], [20]. Ezek a transzporterek a koncentráció gradienssel szemben képesek hajtani szubsztrátjaikat ATP-hidrolízisből nyert energia felhasználásával (**1.3. Ábra**). A gyógyszer-



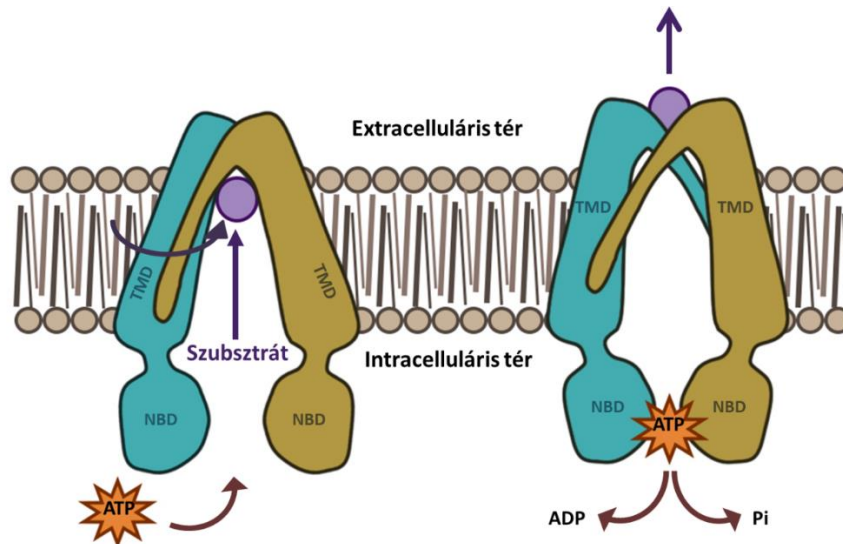
1.2. Ábra - Agyi kapillárisokat alkotó endothél sejtek fontosabb transzporterjei és transzport folyamatai. Az ABC transzporterek fő szerepe a potenciálisan neurotoxikus xenobiotikumok (idegen anyagok) eltávolítása az agyból. Ezek az efflux transzporterek leginkább az endothél sejtek apikális oldali membránjában találhatók meg. Fontos szerepe van a megfelelő idegműködéshez elengedhetetlen ion koncentrációk stabilizálásában, valamint a transzportfolyamatokhoz szükséges nátrium ion gradiens fenntartásában a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ nak. Az oldott anyag szállító (SLC) transzporterek, az aquaporin (AQP) és transzcitózis receptorok a hormonok, peptidek és a tápanyagok áramlását biztosítják a vér és agy között. Az oxigén és széndioxid gázok diffúzióval jutnak át a sejteken. (TH-k: pajzsmirigy hormonok; TFR: transferrin; IR: inzulin receptor; LRP-1: kis sűrűségű lipoprotein receptorhoz kapcsolt peptid 1; TJ: szoros kapcsolat; AJ: adherens kapcsolat) Az ábrát a következő publikációk alapján készítettem: [16], [20], [22].

kutatásban az MDR transzporterek jelentősége, azok működésének modulációjában rejlik, hisz gátlásukkal olyan hatóanyagok is bejuttathatók az agyba, melyeket fiziológiás esetben eltávolítanak onnan, megkönnyítve egyes neurológiai betegségek gyógyszeres terápiáját [23].

A vér-agy gát endothél sejtjei mellett, a P-gp és BCRP transzporterek fellelhetők a plexus choroideus epithél sejtjeinek bazális felszínén is, a vér és cerebrospinális folyadék (CSF) közötti gátban, ahol a CSF felé mozgatják szubsztrátjaikat [20], [24], [25].

Az agyi erek endothél sejtjei mellett találhatóak efflux transzporterek a légutak, beleértve az orrüreg nyálkahártyáját alkotó epithél sejtekben [26], a kiválasztó szervek, a vékony- és vastagbél sejtjeiben is [27]–[30]. Ezeknek a vér-agy gátban találhatóakhoz hasonlóan a kémiai védelem a feladatuk, például a belek és kiválasztó szervek sejtjeiben a xenobiotikumok és mérgegyanagok vérből való eltávolítását végzik.

Az előzőleg felsorolt transzporterek működéséhez az agyi endothél sejteknek nagy mennyiségű energiára van szükségük. Jellemző tehát rájuk, hogy citoplazmájuk térfogatának



1.3. Ábra - P-gp (ABC B1) transzporter működésének mechanizmusa. A fehérje két homológ félből (az ábrán ezeket jelöli a kék és barna elem) áll, melynek transzmembrán doménjei (TMD) által közrefogott részbe a szubsztrát beköthet a sejt intracelluláris teréből, vagy a sejtmembránból. A nukleotid-kötő domén (NBD) ATP megkötésével a transzporter konformáció változását eredményezi, melynek következtében az intracelluláris oldalon bezárja, az extracelluláris oldal felé megnyitja az utat a szubsztrát számára. Az ATP molekula hidrolízisét követően visszaáll a nyugalmi konformáció, a visszamaradt ADP és foszfát csoport leválnak a transzporterről. (ATP: adenozin-trifoszfát; ADP: adenozin-difoszfát; Pi: szervetlen foszfát csoport.) (Az illusztrációt Sharom publikációjában [31] leírtak alapján készítettem.)

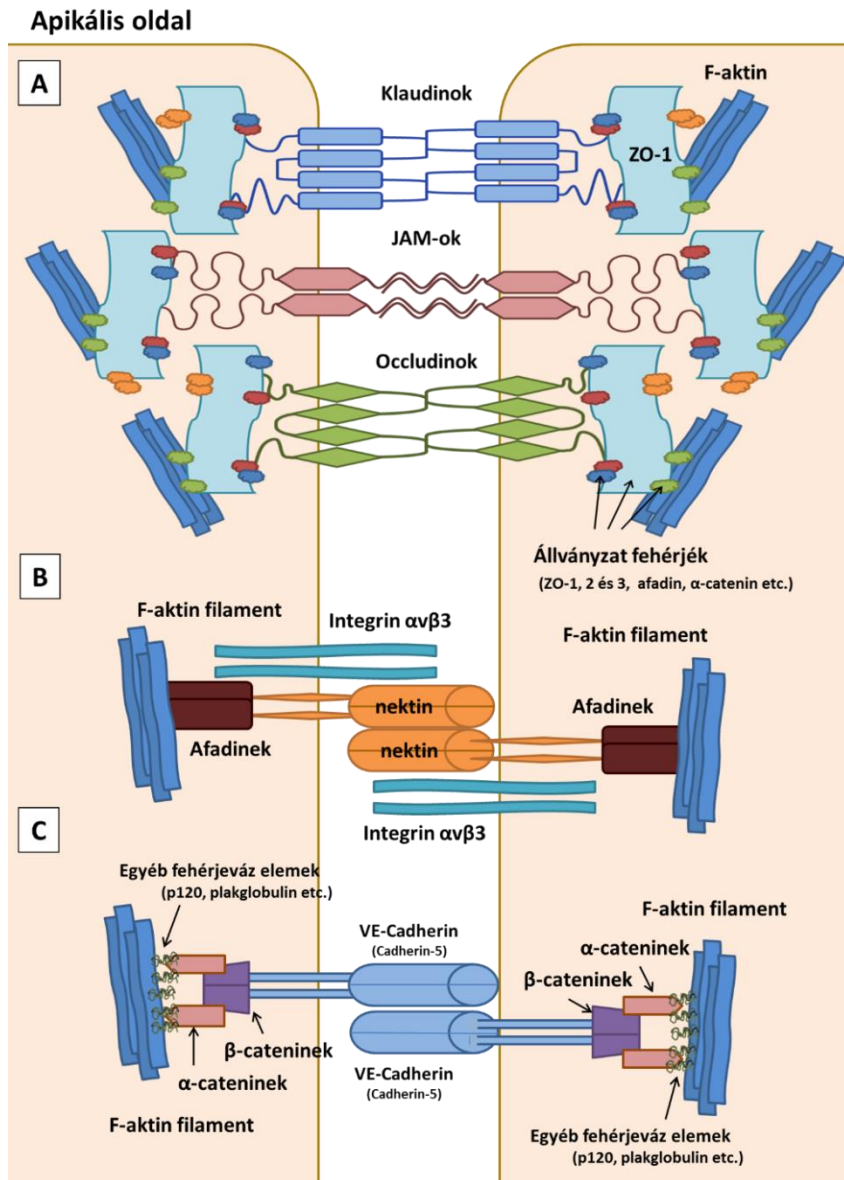
akár 8-10%-át mitokondriumok teszik ki, ami lényegesen több, mint más szervek kapillárisaiban [32]. Ez magyarázat lehet arra, hogy a mitokondriumokat érintő rendellenességek sokszor idegrendszeri tünetekkel jelentkeznek [33].

Az agy kapillárisaira nem jellemző a laza, úgynevezett fenesztrált struktúra [32], [34], [35], így fontos megemlíteni, hogy a központi idegrendszer anyagforgalma nagyban függ a transzporter fehérjék működésétől. A fenesztráltság hiányában ugyanis minimális a paracelluláris anyagforgalom, a diffúzió, a transz- és a pinocitózis.

1.1.1.2. Adherens és szoros kapcsolatok

A vér-agy gát endothél sejtjei között igen szoros kapcsolat található, szemben a szervezet más szerveinek fenesztrált kapillárisaival, ezzel biztosítva, hogy a sejtek közötti anyag transzfer, azaz a paracelluláris transzport korlátozva legyen a vér és a központi idegrendszer között. Ezt a struktúrát az úgynevezett szoros kapcsolatok (TJ) és adherens kapcsolatok (AJ) biztosítják, melyek különböző egységekből álló fehérje komplexek.

Az endothél sejteken a szoros kapcsolat az apikális oldalhoz legközelebb elhelyezkedő komplex. Az agyi erekben a kapcsolatot két sejt között három transzmembrán fehérjecsald alkotja: klaudinok (klaudin-5, 12 és 3) [36]–[38], az occludinok [39], és az immunglobulinok



1.4. Ábra - Az endothél sejtek szoros és adherens kapcsolatai. A sejt apikális felszínéhez legközelebbi fehérje komplex a szoros kapcsolat (A), mely a két endothél sejtet három transzmembrán fehérjén (claudin, JAM és occludin) keresztül tart össze. Az adherens kapcsolatoknak két fajtáját különböztetjük meg: nektines (B) és cadherines (C), melyek az intercelluláris kapcsolatot kialakító fehérjekomponensekről kapták nevüket. (Az illusztrációt az 1.1.1.2. Fejezetben tárgyaltak és az ott hivatkozott cikkek alapján készítettem.)

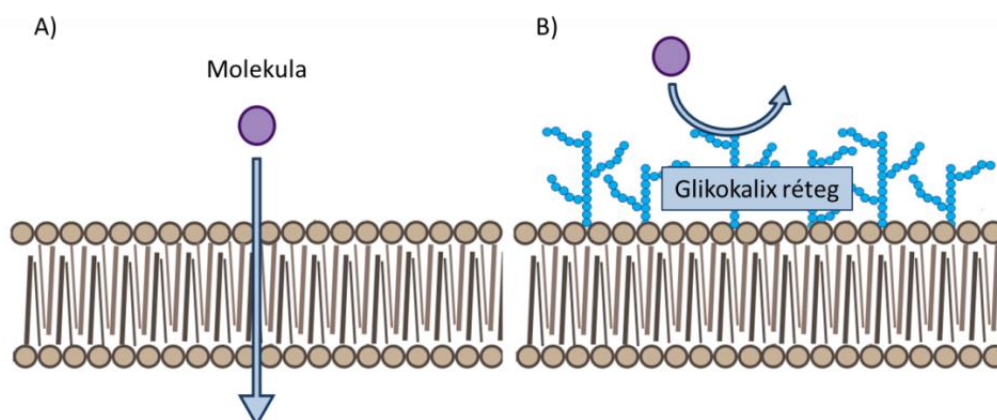
családjába tartozó junkció-addhéziós molekulák (JAM) [40]. Ezeket különböző fehérjék (például az afadin) rögzítik a zonula occludens (ZO) fehérjéken keresztül az aktin citoszkeletonhoz (1.4. Ábra A). Az adherens kapcsolat általában sűrűbben szövi át a sejteket, viszont nem célja teljesen összezárni a két sejt közötti teret. Lazább kapcsolatot biztosít,

stabilizálja az epithéliumot és elősegíti a szoros kapcsolatok létrejöttét [41]. Az adherens kapcsolatoknak egy gyengébb adhéziót kialakító típusát (1.4. *Ábra B*) nektinek és afadinok alkotják [42]. Másik típusuk a cadherines adherens kapcsolatok (1.4. *Ábra C*), melyeket a cadherin mellett actinin és catenin fehérjék alkotják. Az endothél sejteken található transzmembrán fehérjék túlnyomó részt VE-cadherink (cadherin-5-ként is említik) [43].

Az előbb felsorolt fehérjék azonban ugyanúgy megtalálhatóak az agyi és egyéb szervek kapillárisaiban is. Mi teszi hát ennyivel szorosabbá az agyi endothél sejtek kapcsolatát? Egyik fő molekuláris különbség, hogy bizonyos citoplazmás adapter fehérjék, mint a paracingulin (cingulinszerű fehérje 1 vagy JACOP) és a membrán palmitoilált protein 7 (MPP7), valamint a tricelluláris szoros kapcsolat molekulák, például a lipolízis-stimulált lipoprotein receptor (LSR) és a tricellulin expressziója magasabb az agyi vérereket alkotó sejtekben. Következésképpen ezeknek a fehérjéknek is fontos szerepük van a vér-agy gát felépítésében [38].

1.1.1.3. Glikokalix

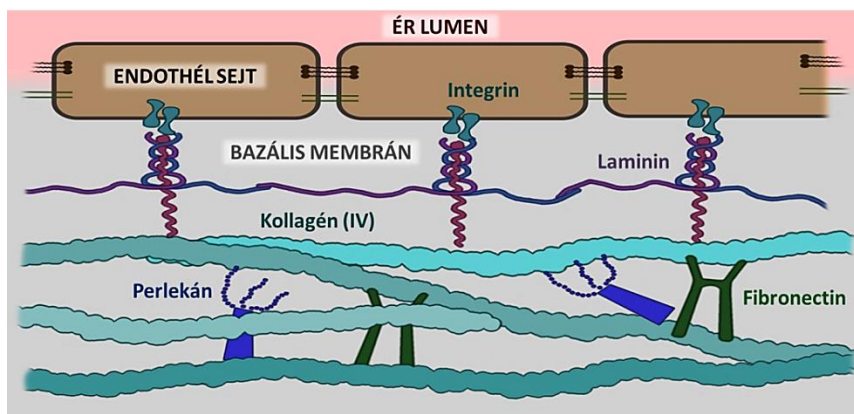
Az endothél sejtek paracelluláris transzportjának csökkentésében meghatározó szerepet játszik a glikokalix is. Ezek az elágazó szénhidrátláncok gazdagon borítják az endothél sejtek apikális felszínét, mintegy vértet alkotva azok elé. Ezáltal a sejtfelszín nehezen hozzáférhető, emellett negatív töltésükkel taszítják az azonos töltöttséggel rendelkező molekulákat (1.5 *Ábra*) [44]. A glikokalix réteg eltávolításával jelentősen megnő az endothél sejtek paracelluláris átteresztőképessége [45]. Ez akkor lehet hasznos, mikor egy hatóanyagot szeretnénk bejuttatni az agyba. A glikokalix réteg tartós hiánya azonban problémákat is okozhat. Számos kutatás számol be arról, hogy szisztémás gyulladás esetén felszaporodó TNF- α , thrombin, lipopoliszaharidok [46], heparanáz [47], reaktív oxigén szabadgyökök [48] és mátrix metalloproteázok [49] hatására megsérül ez a szénhidrát réteg, ami hosszabb távon, egy láncreakciót beindítva, a vér-agy gát megromlását okozza.



1.5. *Ábra* - **Glikokalix fizikai barrier funkciója.** A glikokalix réteg nélküli sejtmembránon (A) könnyedén átdiffundálhatnak a molekulák a sejtekbe, ellenben a glikokalixszal borított membránnál (B) a molekula nem éri el a sejtfelszínt, jelentősen csökkentve számára az áthatolás lehetőségét. (Az illusztrációt Santa-Maria publikációjában [44] leírtak alapján készítettem.)

1.1.1.4. Bazális membrán

Az agyi kapillárisokat alkotó endothél sejtek bazális membránját számos fehérje, proteoglikán és glikoprotein alkotja (1.6. Ábra). Az extracelluláris mátrix elengedhetetlen az agy és annak vaszkuláris rendszerének megfelelő fejlődéséhez és funkciójának szabályzásához, ugyanis elősegíti nem csak a szoros kapcsolatok kialakulását, de hozzájárul a neuronok és asztrociták közötti jelátvitelhez is [50].



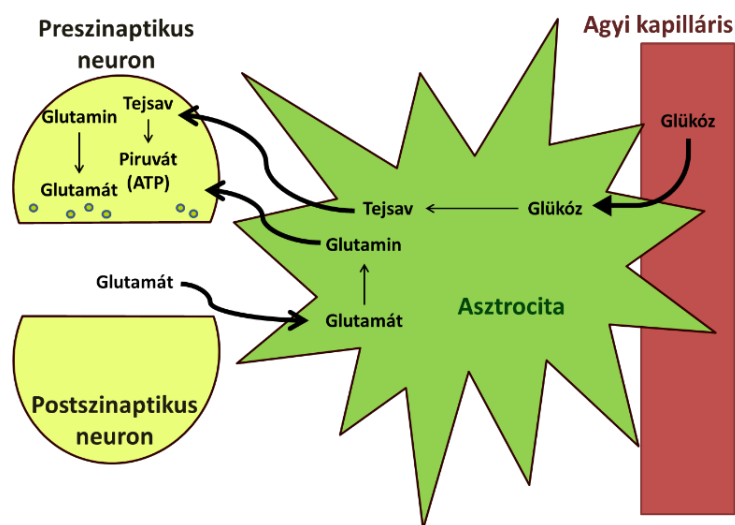
1.6. Ábra - Bazális membránt alkotó főbb elemek: az endothél sejteken található transzmembrán fehérje az integrin, mely kapcsolatot létesít a három láncból álló lamininnel. Ez kötődik a IV-es kollagénekhez. A kollagénhez perlekánok és fibronektinek kapcsolódnak. (Az illusztrációt az 1.1.1.4. Fejezetben tárgyaltak és az ott hivatkozott cikkek alapján készítettem.)

A sejtek (endothél sejtek és asztrociták) az extracelluláris tér alkotóelemeivel integrineken keresztül lépnek interakcióba, szabályozzák a sejtek vándorlását és differenciálódását különböző jelkaszádok és növekedési faktorok aktiválásával [51]–[53]. Az extracelluláris mátrixot alkotó legfontosabb fehérjék a laminin, fibronectin, perlekán és a kollagén IV [51], [53], [54]. A laminin egy heterotrimerből álló fehérje, az extracelluláris mátrix leggyakoribb fehérjéje [55]. Megtalálhatóak az endothél sejtekben és az asztrocitákban. A laminin-10 különösen fontos a vér-agy gát szempontjából, ugyanis részt vesz az occludin és ZO-1 expressziójának és lokalizációjának szabályzásában [56]. A fibronectin dimer formában található meg az extracelluláris térben [57]. A fibronectin a keringési rendszer kialakulásában vesz részt embrionális korban [51], [58], [59], de expressziója viszonylag alacsony a már kifejlődött, egészséges agyban. A perlekánok olyan proteoglikánok, melyeknek 5 központi fehérje variációja ismert. Ehhez a maghoz, a fehérje N-terminálisán keresztül kapcsolódik a heparán szulfát [60]. A perlekánok részt vesznek a sejt migráció, proliferáció és differenciálódás szabályzásában [61], [62]. A bazális membrán leggyakoribb kollagén típusa a kollagén IV. Tripla hélix szerkezete többnyire két α -1 és egy α -2 láncból áll. Az extracelluláris térben flexibilis térbeli hálót alkotnak [63], [64]. Számos más extracelluláris elemmel kötést létesít,

vázrendszerként funkcionál a bazális membránban, valamint MMP-k által történt lebomlásakor fragmensei (például a trumstatin) jelátviteli molekulaként is funkcionálhatnak [65].

1.1.2. Asztrociták

Az asztrociták speciális gliasejtek, melyek csillag alakú sejttestükről kapták nevüket. Funkciójuk között szerepel a neuronok táplálása, oxigénnel való ellátása, valamint a megfelelő idegi működéshez szükséges környezet kialakítása és fenntartása [66]–[68]. Ilyen feladatok például a szinapszisokban felszabadult glutamát felvétele (az endothél sejtekhez hasonlóan az EAAT transzporterek segítségével), majd glutamin formájában való visszaforgatása, az excitotoxicitás elkerülésére, vagy a laktát (tejsav) transzport (**1.7. Ábra**). Markerük a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) [69]. A neurovaszkuláris egységben található asztrociták végtalpai körülveszik az agyi kapillarisokat, majd hogyanem teljesen beborítva azok felszínét [70], [71]. Az asztrociták részt vesznek sejtek közötti interakcióban is, például a vér-agy gát kialakításában, működésének szabályzásában, valamint az agyi véráramlás szabályzásában [67], [72].



1.7. Ábra - Asztrociták és neuronok közötti anyagcsere folyamatok. A vér agy gát miatt a glükóz nem jut be az agyba, így a kapillarisokat behálózó asztrociták aktívan veszik fel a glükózt, melyet tejsavvá alakítva továbbítanak a neuronoknak, amit azok ATP szintézishez tudnak felhasználni. Hasonlóan kritikus anyagcsere folyamat, glutamaterg neuronok esetében, a nagy mennyiségben felszabaduló glutamát, melyet az asztrociták vesznek fel a szinaptikus részből. Ezzel elkerülik az excitotoxicitás jelenségét. Az asztrociták ezután átalakítják glutaminná, és visszaforgatják a preszinaptikus neuronoknak. (Az illusztráció Bélanger publikációjában [66] leírtak alapján készítettem.)

1.1.3. Periciták

A periciták az érfal mentén található mezodermális eredetű sejtek, melyek az endothél sejtekkel direkt kontaktussal és közös bazális membránnal rendelkeznek. Ezek a kapcsolatok számos anyagcsere és jelátviteli útvonalra adnak lehetőséget, köztük ion, metabolit,

másodlagos jelátviteli molekula és RNS cserére [73]. Az összetett sejt-kommunikáció teszi lehetővé, hogy a periciták elengedhetetlen szabályzói legyenek a vér-agy gátnak, például különböző mátrix fehérjék szekréciós szintjének regulációjával. Emellett az erek tágulását és az érképződést is befolyásolják, azaz a véráramlás szabályzásában is fontos szerepük van [74]. A periciták megtalálhatók a periféria véredényei mentén is, azonban nem olyan sűrűségben, mint az agyban található ereknél [75]. A periciták és az asztrociták is nagyban függenek egymástól: a periciták segítik az asztrocita végtalpak lokalizációját az endothél sejtek körül [73], az asztrociták pedig laminin szekrécióval stabilizálják a bazális membránt és a pericitákat [76].

1.1.4. Mikroglia

A mikroglia sejtek az agy természetes védelmét biztosító makrofág sejtek, melyek óvják a központi idegrendszert a potenciális veszélyt jelentő törmelékektől, sejtektől és patogénektől [75], [77], [78]. A mikroglia sejtek ugyan szabadon találhatóak az agy parenchimájában, nincsenek a neurovaszkuláris egységhez kötve, mégis szerepük van a vér-agy gát homeosztázisának fenntartásában a mikroglia-endothél sejt kommunikációs csatornákon keresztül [75]. A mikroglia két aktivált állapota ismert: a klasszikus úton történt aktivált státusz, mikor a sejt a patogének hatására proinflammatorikus citokineket szabadít fel, mint az IL-1 β , IL-6 és TNF- α . A másik az alternatív aktivációs út, melyet a szövetekben termelődő citokinek indítanak be és a szöveti gyógyulást segítik elő. Ez az útvonal az elhalt sejt-törmelék fagocitózisával, chemokinek és VEGF szekretálásával és neurotróf útvonalak aktiválásával jár [79]. Az klasszikus útvonalak általában gyulladáskeltő anyagok felszabadulásával járnak, mely túlzott esetben neurotoxikus is lehet, az alternatív aktiváció jellemzően neuroprotektív, anti-inflammatorikus hatással jár és segíti a szövetgyógyulást.

1.1.5. Neuronok

Az agyi aktivitás megnövekedésével, a neuronok energia- és oxigénigénye megnő. A megnövekedett glutamát felszabadulás hatására megindul egy jelátviteli folyamat: N-metil-D-aszpartát (NMDA) és 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptorok aktiválják a Ca²⁺ beáramlást a neuronokban, mely beindítja a nitrogén-monoxid (NO) termelést, a nitrogén-monoxid szintázok (nNOS) által. A NO a vérerek tágulását eredményezi, az agy vérellátása megnövekszik [80]–[82]. Az agyi mikrovaszkulátúra simaizom kontraktilitásának szabályzásában további neuronok is szerepet vállalnak: ezek a többnyire peptid transzmittereket: noradrenerg [83], kolinerg [84], szerotoninerg [85] valamint gamma-aminovajsavat (GABA) [86] termelő sejtek.

A noradrenerg rendszerek mikroereket idegeznek be [83], [87]. Az ereket alkotó simaizom és endothél sejteken található α - és β -adenoreceptorokon keresztül tudják hatásukat kifejteni [83], [88]–[90]. Kolinerg és szerotonerg neuronok, a perivaszkuláris asztrocitákkal szabályozzák az agykérgi véráramlást és a vér-agy gát megfelelő működését [84], [85], [91]. GABAerg neuronok a kéregben található kapillárisoknak továbbítanak jeleket, valamint befolyással lehetnek a környezetükben található nitrogén-monoxid szintetizáló kolinocéptív neuronokra is, melyek szintén vazodilatációs hatásokat válthatnak ki [86].

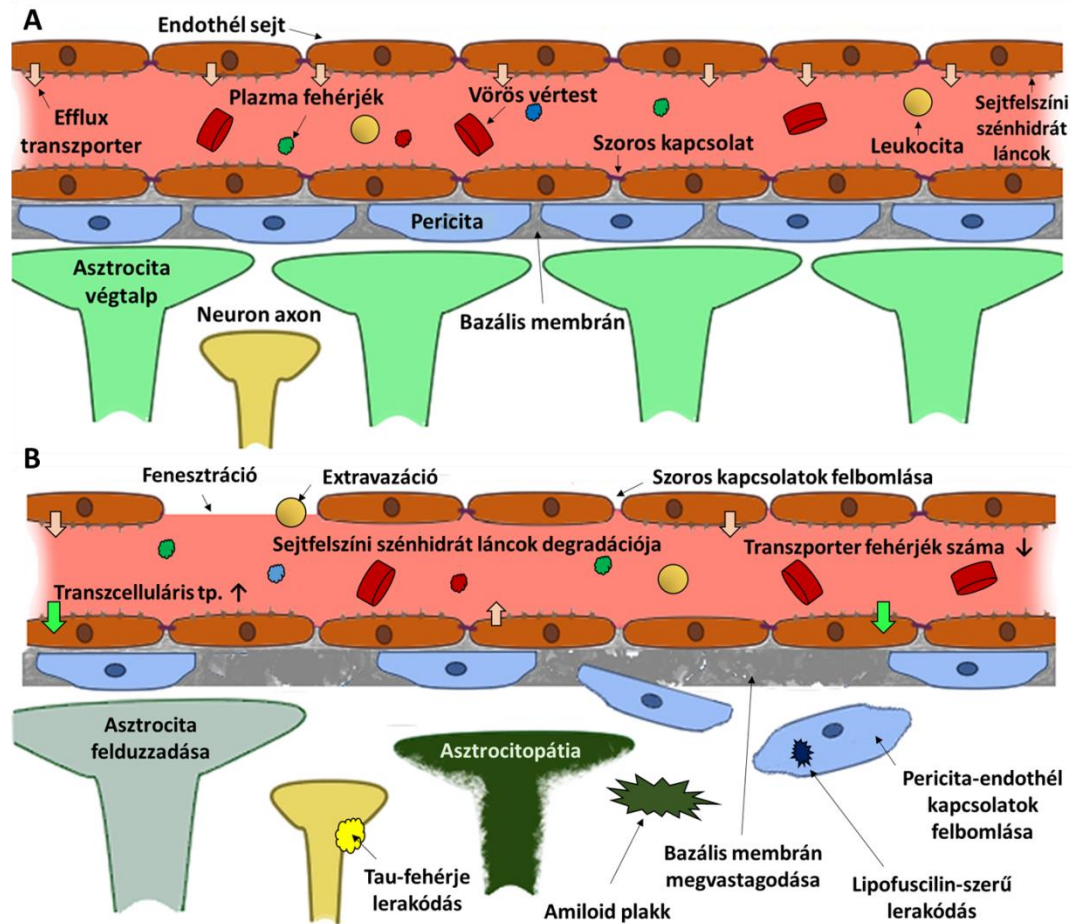
1.2. A vér-agy gát szerkezeti és funkcionális károsodásának vizsgálati módszertana

A vér-agy gát öregedésével összefüggő változásokat, a szövetek és sejtek szenescenciája mellett számos esemény gyorsíthatja. Ilyen például az agyi trauma, a stroke, a krónikus gyulladás, illetve a neurodegeneratív betegségekre való hajlam. Ezek a változások az agyi erek permeabilitásának növekedését okozzák, az idegsejtek stabil környezetét felborítják, akár neurotoxikus anyagok beáramlását is eredményezhetik. A vér-agy gát károsodásait két csoportba osztjuk: 1) a szerkezeti elváltozásokkal járó károsodások, melyek például mikroszkópos vizsgálatokkal deríthetők fel, valamint 2) a molekuláris szintű károsodások, melyek főként a funkcióbeli elváltozásokban észlelhetők. Ezek feltárásához számos módszer áll rendelkezésünkre.

1.2.1. Szerkezeti elváltozások

Szerkezeti elváltozások közé tartozik az a károsodás, mely hisztológiai szinten jelentkezik, illetve anatómiai elváltozással jár. Ilyen például a szoros kapcsolatok felbomlása, a fenesztráció megjelenése, a glikokalix degradációja, az endothél sejtek károsodása, a fokozott vezikuláris transzport, az asztrocitopátia vagy az asztrociták felduzzadása és a pericitákban lipofuscin-szerű granulák felhalmozódása (*1.8. Ábra*) [92].

A szoros kapcsolatok felbomlása mögött sokszor krónikus gyulladás áll, melyet a citokinekkal és egyéb gyulladásos faktorokkal való hosszas expozíció okozhat. Ilyen faktorok a például a nukleár faktor (NF)- κ B, a NO, a MMP-k és reaktív oxigéngyökök (ROS) [93]–[96]. A krónikus gyulladás a szoros kapcsolatot létrehozó molekulák alapköveit képező aktin filamentumok átrendeződését okozhatják [97], és csökkentik a szoros kapcsolat fehérjéinek, például az occludin és claudin-5 expresszióját [95], [98], [99]. Ezáltal az agyi kapillárisokon az endothél sejtei között a kapcsolat fellazulása, fenesztráció figyelhető meg. Szisztémás gyulladásos betegségek esetén a glikokalix fokozatosan degradálódik. A megnövekedett TNF- α ,



1.8. Ábra - Egészséges vér-agy gát alkotóelemei és struktúrája (A) összehasonlítva az öregedéssel járó vér-agy gát változásokkal (B). Az időskorra megjelenő változások vezetnek a barrier-funkció csökkenéséhez, mely vér-agy gát szivárgást eredményez, ezáltal csökken az agy védelme: Az endothél sejtek közötti szoros kapcsolat felbomlik, a felszíni glikokalix és az efflux transzporterek megritkulnak, utat engedve a transzcelluláris transzport folyamatoknak és a leukociták, valamint plazmafehérjék extravazációjának. A bazális membrán szerkezete megváltozik, megvastagszik. A pericita-endothél sejt kontaktus helyenként megszűnik, ami a periciták elvándorlását eredményezi, valamint a sejtestükben lipofuscin-szerű lerakódások képződnek. Az agyi kapillárisokat körülvevő asztrociták elhalnak vagy felduzzadnak, elveszítik kontaktusukat a kapillárisokkal. A barrier funkció csökkenésével és az efflux transzporterek megritkulásával amiloid plakkok és tau fonatok alakulnak ki, tovább gerjesztve a gyulladásos és destruktív folyamatokat. (Az illusztrációt Varatharaj [92] cikkében leírtak és a **1.2.1. Fejezetben** tárgyaltak alapján készítettem.)

trombin [46], heparanáz [47], ROS [48] és MMP [49] hatására fokozódik a glikokalix réteg felbomlása. Endothél sejtekben a fennálló szisztémás gyulladás hatására apoptózis, membrán anomáliák és mitokondriális károsodások történnek [100]. Emellett emelkedett szintű vezikuláris folyamatok is megfigyelhetők [101], melyek a strukturális károsodások mellett az mfsd2a (a szekunder aktív transzporterek fő segédcsaládjának, röviden MFS tagja) transzcitózis szuppresszor alulműködése miatt is bekövetkezhet [102]. Szisztémás gyulladás esetén asztrocitopátiára utaló jeleket is találtak. Citokinek hatására, az asztrocitákban módosul a génexpresszió, aktiválódnak a proinflammatorikus és citotoxikus útvonalak [103]: megnövekszik a IL-1 β , IL-6 TNF- α expressziója és prosztoglandinok termelése [104] Emellett az

asztrociták, a túlhajtott proliferáció és aktiváció következtében elpusztulnak [105], [106]. Az endothél sejteket körülvevő asztrocita végtalpak száma csökken, deformálódnak, ami a vér-agy gát további károsodásához vezet [107]. A pericitákban is több ultrastrukturális változás következhet be az öregedés során. A sejtekben létrejöhetnek vezikuláris és lipofuscin-szerű granulomok [108]–[111] illetve megnövekedhetnek a mitokondriumok [112]. Megfigyelések szerint, az öregedés során a periciták elveszíthetik az endothél sejtekkel való kapcsolatukat, feltételezhetően a vérlemezke eredetű növekedési faktor PDGF-PDGF receptor alapú kapcsolatot felbomlás következtében [4], [113], [114].

Mikronos nagyságrendbe eső szövettani elváltozások vizsgálatához a fény- és elektronmikroszkópia állnak rendelkezésre. Postmortem szöveti metszetekről készült mikroszkopikus felvételekkel megvizsgálhatóak például a vér-agy gátat alkotó sejtek közötti kapcsolatok, illetve magukban a sejtekben lezajlott strukturális változások. In vivo (azaz élő szervezeten belüli) makroszkopikus deformációk, nem-invazív módon, különböző képalkotó technikákkal figyelhetőek meg. A mágneses rezonancia képalkotó (MRI) módszer előnye, hogy nem kell a vizsgált állatot leölni a virtuális metszetek előállításához, nagyobb szöveti elváltozások megfigyelésére alkalmazható, mint például az agykamrák megnagyobbodása, a kalcifikáció vagy a mikrohemorrágia [115].

1.2.2. Funkcióbeli elváltozások

Funkcionális elváltozások azok a rendellenességek, melyek molekuláris szintű működéseket érintenek. Ide sorolhatóak a gyulladásozó faktorok, citokinek túltermelődése, receptorok és transzporterek túl- vagy alulműködése, az asztrocita funkciók modulációi és a patogén neuroinváziók [92].

Jelentős molekuláris változás a transzporterek expressziójának, illetve hatásfokának módosulása. Szisztémás gyulladásokban számos efflux transzporter expressziója és működése gátlás alá kerül [92], mely így a vér-agy gát működésének felborulásához vezet [4].

A P-gp kiemelt szerepet tölt be az agy védelmi rendszerében. Efflux transzportenként számos anyagot távolít el az agy parenchimából, mint például az amiloid- β (A β) plakk fehérjét [116]–[118]. Kísérleti adatok igazolták, hogy a P-gp expressziója csökken az öregedés során [119], és arra is találtak bizonyítékot, hogy maga az A β tovább súlyosbítja az efflux transzporter szám csökkenést [120], [121], így gyorsítva az amiloid plakkok képződését, és ezzel az Alzheimer-kór kialakulását. Ezenkívül számos más gyulladásozó faktor gátolja az efflux transzporterek megfelelő működését [92], ami fokozhatja az agy elöregedését.

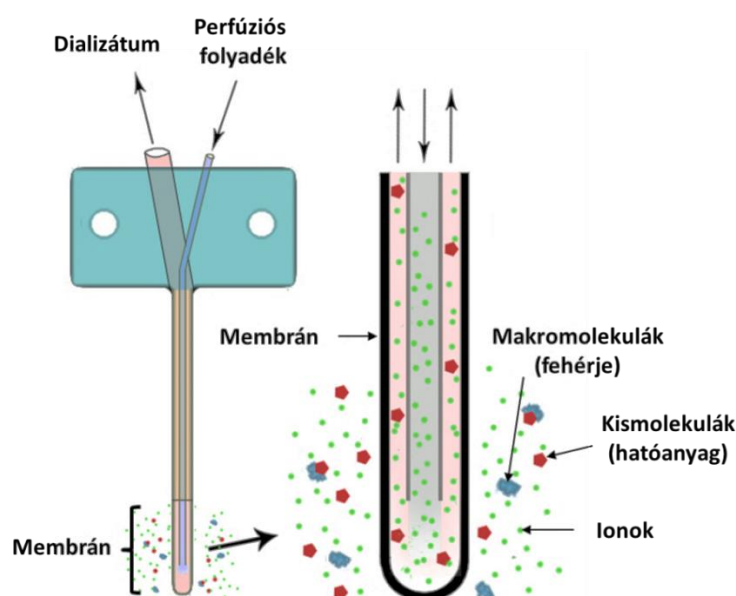
1.2.2.1. *Immunhisztokémia*

A hisztológiai vizsgálatok, különböző immunhisztokémiai festések a szerkezeti vizsgálatok mellett, például fehérje expressziós változások megfigyelésére is szolgálnak: a kérdéses fehérjére, egy rá specifikus, jelölt immunglobulinnal detektálhatóvá tehető. A vér-agy gát öregedésének vizsgálatakor ezzel a technikával például a P-gp [122] és az asztrocitákban található GFAP [123] expressziójának változása követhető nyomon.

1.2.2.2. *Mikrodialízis*

A mikrodialízis egy sokoldalú módszer, mely alkalmas számos szervből, in vitro és in vivo rendszerekből is, lokális mintavételezésre. Nagy előnye, hogy a farmakológiai hatásért felelős, szabad állapotban lévő (plazma fehérjékhez nem kötött) hatóanyagok kimutatására képes [124]. A módszer használhatóságát nagyban elősegíti, hogy egy állatból egy teljes koncentráció-idő görbe meghatározható (felszívódástól a kiürülésig), szemben azokkal a technikákkal, ahol a mintavétel vérből vagy szövetrészből történik, és amelyekből egy állattal, egy időpontnak megfelelő vizsgálati adata biztosítható. Ezzel az állatkísérletek 3R szabályának is eleget tesz, hisz csökkenti a kísérletben részvevő állatok számát.

Maga a technika lényege, hogy a vizsgált szövetbe beültetett szondán keresztül perfúziós folyadék kering és egy szemipermeábilis membránon keresztül felveszi az extracellul-



1.9. Ábra - Mikrodialízis szondával történő mintavétel illusztrációja. A szondán keresztül áramoltatott perfúziós folyadék diffúzióval felveszi az extracelluláris térben található kisméretű molekulákat. Az így kapott dializátum molekula összetétele közel azonos lesz a vizsgált szövetével, a makromolekulákat és a fehérjékhez kötött kismolekulákat leszámítva, mivel azok nem tudnak átjutni a szonda membránjának pórusain.

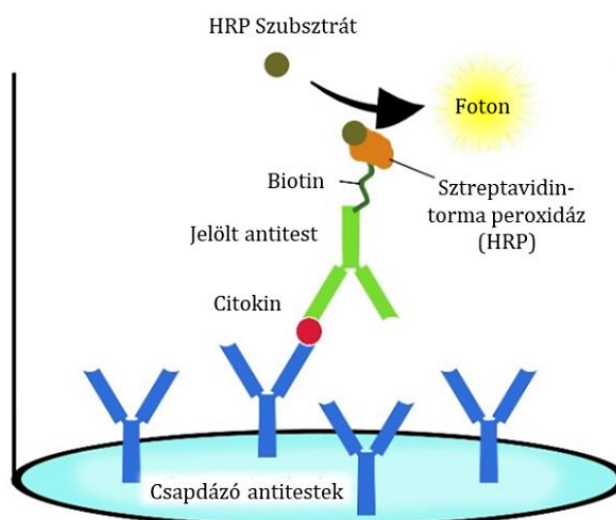
áris térben jelenlévő kis molekulaméretű anyagokat. A perfúziós folyadék többnyire a vizsgált szöveti környezetnek megfelelő fiziológiás oldat, agyi szonda esetén például mesterséges cerebrospinális folyadék. A membránon keresztül felvett anyagok koncentrációja arányos a szövetben találhatóival, hisz diffúzió során a két tér (a szonda és a szövet) koncentrációi kiegyenlítődnek. A membrán pórusain keresztül, ami a kis molekulák méréséhez általában 6-20 kDa tömeghatárral (cut-off értékkel) rendelkeznek, a makromolekulák, mint például a fehérjék nem jutnak át, így a levett minta általában előkészítés nélkül kész is a bioanalízisre.

1.2.2.3. SPECT Képképző módszer

A SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) képképzés egy nem-invazív módszer, mely jól használható élő szervezetek in vivo funkcionális vizsgálatára. Alacsony térbeli felbontása miatt gyakran kombinálják MR képképzéssel. P-gp vizsgálatokban, például gyógyszer rezisztens daganatok elemzéséhez, vagy a vér-agy gát kutatáshoz, kontrasztanyagként [99mTc]-Sestamibit (99mTc-MIBI) alkalmaznak, mely egy ismert P-gp szubsztrát molekula [125].

1.2.2.4. ELISA

Az ELISA módszer radioaktív izotópmentes fehérjevizsgálatot biztosít. Az eljárás során, (hasonlóan az immunhisztokémiai festéshez) antitestekkel lehet azonosítani különböző



1.10. Ábra - ELISA fehérjevizsgálat elméletét ábrázoló sematikus rajz. A citokinnek detektálása úgy történt, hogy a cellákban (gyárilag) citokinre specifikus antitestek vannak kötve, melyek csapdazzák az adott molekulát, majd a fajspecifikus és HRP kötött antitesttel detektálhatóvá tehető a „szendvics”. Így a hozzáadott HRP szubsztrát fényjelet generál, melynek intenzitása információt ad a relatív citokin koncentrációról. (Az ábra a Signosis gyári használati utasításában szereplő leírások és ábrák alapján készült.)

proteineket és az azokhoz kötött fluoreszcens vagy kemilumineszcens riporter enzimekkel felerősített jeleket, ami egy spektrométerrel mérhetővé válik [126]. Így egy adott biológiai mintából célzott fehérjék vizsgálhatók, például agyhomogenizálásból nyert aliquotokból különböző citokinek kvalitatív és kvantitatív meghatározása végezhető.

1.3. Citokinek az agyban

A citokinek olyan jelátviteli molekulák (fehérjék, peptidek, glikoproteinek), melyek fontos résztvevői a gyulladásos folyamatoknak. Immunmodulátorként működnek, a folyamatban résztvevő sejtek közötti kommunikációt biztosítják. Hatásukat tekintve megkülönböztetünk gyulladás keltő (proinflammatorikus), illetve gyulladás csökkentő (anti-inflammatorikus) citokinek. Ismert jelenség, hogy egy citokin különböző célsejteken eltérő hatást vált ki (pleiotróp hatás) [127]. A vizsgált citokinekkel kapcsolatos fontosabb tudnivalókat az **1.1. Táblázat** foglalja össze.

A citokineknek számos családja létezik, egyikük a legrégebb óta ismert tumor nekrozis faktor (TNF) család. Ezek a sejtbbe bejutó endotoxinra, a szervezet első válaszáként jelennek meg. Hasonlóan a külső betolakodók, főként a vírusok elleni védekezésben játszanak szerepet az interferonok (IFN).

A citokinek egy nagy csoportját alkotják az interleukinok. Ilyenek a Toll-like receptor (TLR) ligand IL-1 citokinek, melyeknek két fő formája ismert, az IL-1 α és IL-1 β . Ezek a molekulák limfocita aktiváló faktorok és fontos szerepük van a fertőzések hatására létrejövő gyulladás kiváltásában. Prekurzorként szekretálódnak, hasításukhoz szükségesek az aktivált kaszpáz-1 enzimek (apoptózis jelátvitel), bár az IL-1 α prekurzor formájában is bioaktív [127], [128]. Az IL-15 az IL-2R receptorokon ható citokinek csoportjába tartozik, többnyire aktivált monociták, fibroblasztok és epitelsejtek termelik. Ez az interleukin a természetes ölüsejteket, az ölü T-sejteket és a CD8+ memória T-sejteket aktiválja, valamint segít a patogének és tumoros sejtek elleni védekezésben [127], [129]. A B-sejtek stimuláló faktora az IL-6, melynek szekrécióját főként a patogének jelenlétében termelődő TNF-ek és IL-1-ek aktiválják (a három citokin jellemzően közel együtt jelenik meg egy gyulladásos folyamatban), az IL-5 pedig az eozinofil granulociták érési és növekedési faktora [127].

A citokinek egy másik nagy csoportját különböző receptor-kinázokhoz kötő molekulák alkotják. A c-Kit (egyfajta receptor-tirozin kináz) ligandjaként működik a csontvelői stróma őssejtfaktora (SCF), mely az agyban a neuronális progenitor sejtek migrációját és proliferációját serkenti egy esetleges központi idegrendszeri sérülésnél [127], [130]. További receptor-tirozin kináz ligandok a vaszkuláris endothél sejtek növekedési faktora (VEGF), valamint a fibroblaszt növekedési faktorok (FGF), mint az FGF- β (vagy FGF-2). Ezeknek a

1.1. Táblázat - Az ELISA vizsgálat segítségével mért 16 különböző gyulladásoos citokin főbb funkcióit és rendellenességeit összefoglaló táblázat.

	Fiziológiás funkciók és rendellenességek	Referencia
TNF-α	Nekrózishoz és apoptózishoz vezető jelátviteli folyamatok Fertőzések és daganatos sejtek elleni védekezés Különbözősejteken különböző hatást fejt ki (Pleiotróp citokin) Rendellenes működés: Megemelkedett szint amiloid aggregáció esetén AD súlyosbodása korrelál a TNF- α szint növekedésével	[131]–[133]
VEGF	Angiogenesis mediátor Neuronális migráció indukáló és neuroprotektív hatások Rendellenes működés: Intracelluláris határok roncsolása Fokozott szivárgás a plexus choroideuson keresztül Ödéma képződés, gyulladásoos folyamatok aktiválása Központi idegrendszer traumát követő fokozott működés	[134]
FGF-β (FGF-2)	Idegi fejlődés, szinapszis képződés, neuroprotekcio Felnőttkori neurogenesis (proliferáció és differenciáció) Neurogliás interakciók Gyulladás és amiloidózis elleni védekezés	[135]
IFNγ	Mitogén faktor Antivirális hatás Makrofág aktiváció, gyulladásoos folyamatok önszabályzása Rendellenes működés: Autoinflammatorikus hatás Autóimmun betegségek kialakulása	[136]
Leptin	Főleg zsírsejtekben termelődik Pleiotróp szerepe van az immunválaszban Proinflammatorikus hatás	[137]
MCP-1	Monociták és makrofágok migrációját és szöveti infiltrációját szabályozza (kemotaktikus faktor) Rendellenes működés: Megemelkedett szint amiloid aggregáció esetén	[138], [132]
SCF	Hematopoetikus citokin Sejt túlélés és proliferáció szabályzás, neuronális progenitor sejtek migrációjá és proliferációjá sérülés esetén c-Kit receptor ligandja c-Kit receptor és a SCF expressziójá megnövekedik stimuláció (kainát) hatására az interneuronok gátló szinapszisaiban Rendellenes működés: A c-Kit jelátviteli út túlműködése daganatos betegségek kialakulását okozhatják	[130]
MIP-1α (CCL3)	Kemoattraktáns citokin monociták, T- és, B-sejtek és eozinofilek toborzása Makrofág-eredetű gyulladásoos mediátor Össejt inhibitor Polimorfonukleáris leukociták toborzása és aktiválása (akkut gyulladásoos állapotban) Rendellenes működés: Megemelkedett szint amiloid, és tau aggregáció, valamint öregedéssel összefüggő gyulladásoos válasz esetén	[183], [191], [192]
IL-1α	Prekurzorként expresszálódik, Kaszpáz-1 hasításával aktiválódik Prekurzorként is bioaktív (ellentétben az IL-1 β -val) Gyors, főként intracelluláris hatás Piroptózis, sejthalál indukciója Rendellenes működés: Gyulladásoos és autoimmun betegségek kialakulásához köthető	[128]

	Fiziológiás funkciók és rendellenességek	Referencia
IL-1β	Prekuzorként expresszálódik, Kaszpáz-1 hasításával aktiválódik Immunválasz szabályozása Hematopoetikus sejtek indukálta gyulladási reakció nem-hematopoetikus sejtekben Rendellenes működés: Megnövekedett IL-1 β szintet összefüggésbe hozták több autoimmun betegséggel A hippocampusban a tartósan magas IL-1 β szint károsíthatja a memóriát	[128], [141]
IL-5	Eozinofil differenciációs és stimulációs faktor Aktiválja a B-sejtek plazmasejteké váló differenciációját, megnöveli az IgA termelődését Rendellenes működés: Allergiás reakciók	[142]
IL-6	Rendelkezik pro- és anti-inflammatorikus hatásokkal is B-sejt differenciáció és akkut fázis válasz szabályozás Hormon-szerű hatások (érrendszer, metabolizmus) termelését TNF-a és IL-1 β aktiválják Rendellenes működés: Megemelkedett szint amiloid aggregáció esetén	[183], [196]
IL-15	Természetes ölüsejtek (NK), T- és B-sejtek aktiválása és szabályozása Patogének és tumoros megbetegedés elleni védekezés	[129]
IP-10 (CXCL10)	Gyulladáskeltő és angiogenezis gátló kemokin Th1 sejtek és agyban a mikroglia toborzása és serkentése Túlermelődésének lehet oka számos rendellenesség: például Sclerosis multiplex, Alzheimer-kór, vírusos agyvelőgyulladás, bakteriális agyhártyagyulladás	[144]
Rantes (CCL5)	IFN- γ , TNF-a és IL-1 citokinek indukálják expresszióját T-sejt, eozinofil, bazofil, monocita és makrofág (mikroglia) toborzás Lokális immunválasz szabályozása Rendellenes működés: Alzheimer-kórban, oxidatív stressz hatására expressziója megnövekedik	[145][146]
TGFβ	Pleiotróp citokineként az immunitás és tolerancia egyensúlyát biztosítja Indukálja a gyulladási választ (monociták, sejt toborzás) Csendesíti a gyulladási citokineket (NF- κ B aktiváció gátlása) T-sejt proliferáció és makrofágok gátlása Sejtciklus szabályozásában is részt vesz: G1 fázisból való kilépést gátolja Neuroprotektív hatások	[146]–[149]

molekuláknak szerepük van a megfelelő agyi fejlődés szabályozásában, az egészséges agyi működés fenntartásában és neuroprotektívban [134], [150]. A pleiotróp transzformáló növekedési faktor β (TGF β), amely egy receptor-szerin/treoninkináz ligandja, fontos szerepe van a gyulladási folyamatok szabályozásában. Részt vesz a gyulladáscsökkentésben, a szöveti regenerációban (agyban neuroprotektív hatása van [147]), gátolja az immunrendszer sejtjeit, ugyanakkor serkenti az IgA ellenanyagok termelését [127].

A kemoattraktáns citokinek (kemokinek) főként az immunsejtek kemotaxisát indukálják, illetve a sejtadhéziót szabályozzák. Ide tartoznak az IP-10 (CXCL10), mely az agyban a mikroglia toborzásáért felelős [144], a MCP-1 (CCL2), ami monocitákat, és a makrofágokat, míg a MIP-1 α (CCL3) a T-sejteket, a B-sejteket és az eozinofileket vonzza a gyulladás helyére

[138]. A Rantes (CCL5), a T-sejtek, az eozinofilek, a bazofilek, a monociták és a makrofágok lokalizációjáért felelős [145][127].

A neuroendokrin- és immunrendszer közötti kapocs egyik képviselője a leptin, melyet anyagcsere szabályzó hormonnként azonosítottak először. Mint akut fázis citokin, fokozza a TNF α , IL-1 és IL-6 szekréciót [127]. A 2. Táblázatban egy részletesebb összefoglaló található a citokinek funkciójáról.

Számos kutatás számolt be arról, hogy az agyi citokin szintek szignifikánsan megváltozhatnak az öregedés során. *Campuzanno és csoportja* például azt figyelte meg, hogy az idősebb patkányok agyában megnőtt proinflammatorikus citokinek (mint a IL-1b és az IL-6) szintje, ezzel lelassult az excitotoxicitás elleni válasz [151]. *Lue és csoportja* az amiloid aggregációk kialakulása esetén emelkedett TNF-a, MCP-1, IL-1b és IL-6 szekréciót tapasztaltak [132]. Egyes citokinek krónikus túlermelődése onkogén hatású (például a TNF- α [152], SCF [130]), vagy autoimmunitást (IFN- γ [136], IL-1 α [128]), esetleg allergiát (IL-5 [142]) okozhatnak.

1.4. Vér-agy gát kóros működése neurodegeneratív betegségekben

A két leggyakoribb demenciához vezető betegség a stroke és az Alzheimer-kór, de előfordulhat az extrapiramidális mozgászavart okozó Parkinson-kórban és a krónikus agyi autoimmun gyulladással járó sclerosis multiplexben (SM) is.

1.4.1. Cerebrális ischemia, stroke

A két leggyakoribb népbetegség, a magas vérnyomás és cukorbetegség évtizedeken keresztül, fokozatosan, lappangva, krónikusan károsítja az ereket. Idős korban az agyi kisartériákon érszűkület (arteriosclerosis) alakul ki, mely a kéregalatti fehérállomány, és a törzsdüci magok ischémiás elhalását (vascularis encephalopathia), vagy vérzéses (hemorrhagia) betegségét okozza. Ugyanakkor a nagyerek falában fokozatosan kialakuló érszűkület végül érterületi agyi infarktushoz, agyelháláshoz vezet [153]. Az agyi érrendszer betegségei következtében kialakuló demenciát vaszkuláris demenciának (VD) nevezzük.

A stroke következtében főleg strukturális sérülések lépnek fel a vér-agy gátban. A vérerek integritásának sérülésével gyulladós reakció indul be, melyet a beáramló thrombin, hemoglobin és vas indukálnak [154]. Az agyvérzés során fellépő hipoxia a szoros kapcsolatok számát és ezáltal a transzendothéliális elektromos rezisztenciát (TEER) csökkenti [155]. A vér-agy gát integritásának romlásával szérum albumin extravazáció figyelhető meg [156]. A periciták és asztrociták szerepet játszanak a post-ischémiás regenerációban [73], [157]–[160], valamint lassítják a vér beáramlását, fékezve annak károsítását, ám ez a funkció az öreg-

edéssel egyre eredménytelenebb, növelve az esetleges stroke okozta következmények súlyosságát [161].

1.4.2. Alzheimer- és Parkinson-kór

A két legismertebb időskori neurodegeneratív betegség az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór. Az Alzheimer-kórban szenvedő pácienseknél jellemző a különböző pathomechanizmusok kombinációja, mint a vaszkuláris elégtelenségek [162], gyulladások [163], valamint különböző fehérjék, például Apolipoprotein E (ApoE), és különböző receptorok és transzporterek, mint LRP-1 (alacsony denzitású lipoprotein kapcsolt fehérje 1) és P-gp expressziójának és működésének megváltozása [164]. Parkinson-kór modellekben a kergestest (striatum) vér-agy gátjának roncsolódását figyelték meg, ami albumin extravazációval, gliózissal (gliák alkotta hegszövet képződés) és fokozott angiogenezissel járt együtt [165], [166]. Emellett a Parkinson-kórban szenvedő pácienseknél P-gp alulműködést tapasztaltak [167], valamint leírtak olyan P-gp polimorfizmust is, melyet összefüggésbe hoztak a Parkinson-kórra való hajlammal [168].

1.4.3. Sclerosis Multiplex

A vér-agy gát zavarát sikerült megfigyelni úgynevezett kísérleti autoimmun agy- és gerincvelő gyulladás (encephalomyelitis) segítségével, ahol a szövődmények súlyossága korrelált a vér-agy gát károsodásának mértékével [169]. A szoros kapcsolatok fehérjéinek száma csökkent [170], proinflammatorikus citokinek szabadultak fel, mely további neurodegeneratív károsodáshoz vezetett [171].

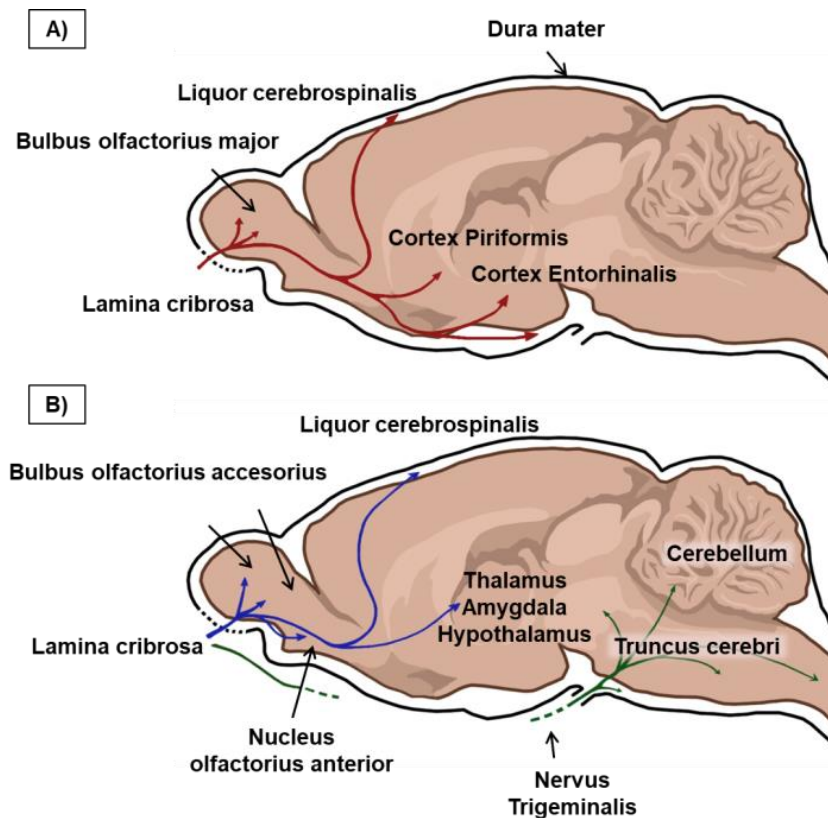
1.5. Gyógyszerek bejuttatása az agyba

Hatóanyagok bejuttatása az agyba nagy kihívást jelent. Ennek egyik feltétele, hogy a gyógyszer átjusson a vér agy gáton. Erre több megoldás született a gyógyszerfejlesztőktől. A központi idegrendszerben ható gyógyszerek egy része magas passzív diffúzióval rendelkezik [172], míg egy további csoport influx transzporterek szubsztrátja [173]. Végül vannak olyan megoldások is, melyek profarmakonokat alkalmaznak. Egyik közismert példa a dopamin agyba juttatása; a vér-agy gáton a dopamin közvetlenül nem tud átjutni, de prekursora (a levodopa) igen, mert szubsztrátja a 4F2hc/LAT1 transzporternek. Az L-DOPA aztán a központi idegrendszerbe jutva dopaminná alakul [174]. Hogy a szervezetben máshol ne jelentkezzen dopamin hatás, a dopa-dopamin átalakulást gátló carbidopával kombinálják, s mivel a carbidopa a vér-agy gáton nem tud átjutni, a központi idegrendszerben nem gátlódik a dopamin szintézis [11]. Újabban alkalmaznak különböző adjuváns formulációkat, például

nanohordozókat, nanorészecskéket, mikrobuborékokat és vektorokat [16]. Ezek a gyógyszerfelszabadító rendszerek problémamentesen bejuttathatóak a véráramba és csak a cél szövetben (agy, daganat) szabadítják fel a szállított hatóanyagot, így csökkentve a perifériás mellékhatásokat [16].

1.5.1. Orr-agy útvonal

Léteznek alternatív útvonalak az intravénás és orális adagolású gyógyszerek mellett, ilyen például az intranazális (orr nyálkahártyáján illetve a szaglőhámon keresztül való gyógyszerfelszívódás), vagy az invazív intratecalis (liquortérbe) és intracranialis (közvetlenül az agyba vagy agykamrába) történő injektálás. Az intranazális adagolás egyszerű és gyors módja a gyógyszerek bejuttatásának, például akut rohamokban görcsoldók alkalmazása epilepsiás



1.11. Ábra - Intranazálisan bejuttatott anyagok útvonala az agyba. A) Piros nyilak jelölik a szaglőidegeken keresztül felszívódó hatóanyagok útját a szaglógumóba (bulbus olfactorius major). Innen az idegpályákat követve juthatnak el a hatóanyagok a piriformis és entorhinalis kéregbe (cortex piriformis és cortex entorhinalis), vagy az agyvízbe (liquor cerebrospinalis) kerülve, akár további disztribúció történhet más agyi régiókba, illetve ezen az úton többnyire az agyból a perifériába való kijutása történhet. B) A hatóanyagok másik útja lehet a trigeminális, vagy V. agyideg (nervus trigeminalis) mentén (zöld nyilak) az agy hátsó régióiba, mint a kisagy (cerebellum), illetve az agytörzs (truncus cerebri) régióiba. Rágcsálók esetében beszélhetünk a vormeonazális szerven keresztül felszívódó hatóanyagok útvonaláról (kék nyilak), melyet a szaglő gumó hátsó régiójába (bulbus olfactorius accesorius) projektáló idegpályák alkotnak. Innen eljuthatnak a molekulák az nucleus olfactorius anterior magcsoporbá, az agyvízbe, illetve a thalamusba, amygdalába és a hypothalamusba. Az ábrát a [175], [176] cikkekben leírt útvonalak alapján készítettem.

betegek számára [177], az intracranialis adagolás még mindig a leghatásosabb módja a célzott agyi kezeléseknek, minimális perifériás terheléssel [16].

A szaglóiidegek, vormeonazális szerv (melynek ugyan a humán szervezetben való jelenléte még erősen vitatott [178], [179]) idegei illetve az trigeminális agyidegek intracelluláris úton biztosítanak közvetlen kapcsolatot az agyba. Az anyagokat endocitózissal veszik fel a sejtek, valamint paracellulárisan a neuronok támasztósejtjei között szívódhatnak fel a hatóanyagok [175], [180]–[182]. A neuronokba bejutott molekulák endoszóma transzlokációval a szaglógumóba, agytörzsbe és a nagyagy disztálisabb területeire jutnak el [175], [183], az **1.7. Ábrán** prezentált útvonalakon. A paracelluláris transzporttal a lamina propriába diffundált anyagok a perineurális térbe, onnan pedig a szubarachnoidális térbe juthatnak tovább, itt a CSF-en keresztül terjednek szét az agy különböző részeiben [175].

Ezt a gyógyszeradagolási lehetőséget számos hatóanyag esetében bizonyították, például dopamint [184], [185], progeszteront [186], [187], midazolamot [177] és inzulint [188]–[190] juttattak ily módon a központi idegrendszerbe. Számos intranazálisan adott P-gp szubsztráttal kísérleteztek már, köztük verapamil [191]–[193], talinolol [193] és imatinib [194] hatóanyagokkal, azonban ezek a hatóanyagok esetében azt tapasztalták, hogy a transzporterek működése miatt elégtelen volt a felszívódásuk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásom előzményeként Sziráki és csoportja kimutatta, hogy a kinidin alkalmas a vér-agy gát P-gp transzporter funkcióinak vizsgálatára, valamint a PSC-833 sikeresen gátolja annak működését patkányokban és egerekben [195], [196]. Arra is számos kutatás kereste már a választ, hogy az öregedés hatására miképpen változik a vér-agy gát transzporterjeinek száma és funkciója; patkány, kutya modellekben és humán vizsgálatokban már kimutatták, hogy csökken az efflux transzporterek expressziója a kórral [121], [197]–[199]. Arra viszont még nem találtam eredményt, hogy ez az időskorral járó expressziós szint és funkció csökkenés miként befolyásolhatja a gyógyszerinterakciókat, melyek ezeket a fehérjéket érinti.

Intranazálisan és szisztémásan adott gyógyszerek agyi eloszlásának vizsgálata önmagában nem újkeletű. Wang és csoportja a Bcrp szubsztrát dantrolene intranazális eloszlását hasonlították össze egy orálisan alkalmazott formulációval, egér modellben [200]. Egy P-gp gátlószerek szisztémás és intranazális adagolási formák agyi disztribúcióját vizsgáló publikációban vizsgálták a kinidin eloszlását is [201]. A hatóanyagokat itt száraz porként inhaláltatták az állatokkal, ahol a kinidint szulfát dihirát formában alkalmazták. A vizsgálat azonban nem tért ki a P-gp moduláció lehetőségeire. A lokálisan adott szimpatomimetikum alkalmazásának

ötletét Hada és munkatársai által, intranazális Imatinibbal végzett kutatások [194] alapján terveztem át, a kinidin agyi disztribúcióját vizsgálatához.

I. A vér-agy gát öregedésével kapcsolatos kérdéseim az alábbiak voltak:

Azt már tudjuk, hogyan változik a P-gp transzporterek expressziója és funkciója öregedés során. Ezeket az adatokat terveztem reprodukálni kísérleti állatokon, hogy validáljam téziseimet.

- A fokozott vér-agy gát szivárgás következtében olyan anyagok és sejtek juthatnak be az agy parenchymába, melyek szerepet játszanak neurodegeneratív folyamatok indukálásában. Kísérleteim során a vér-agy gát öregedésének és a P-gp transzporter szám változásának következményét vizsgáltam fiatal és idős patkányokban. Milyen farmakokinetikai jelenségek figyelhetők meg, melyek következményei lehetnek a vér-agy gát struktúrális változásának és a transzporter szám csökkenésének?
- Arról, hogy mennyire és hogyan befolyásolja a két gyógyszer közötti interakciót az életkor, magyarázatot adhat egy gyógyszerbiztonsági és hatásossági jelenségre, mely az idősebb populációt érintheti, ezért megvizsgáltam, miként változik meg az intravénásan adott P-gp szubsztrát modellként alkalmazott kinidin agyi és szisztémás keringésben való eloszlása intravénás, P-gp inhibitor, PSC-833 jelenlétében.
- Hogy képet kapjak az agyban jelenlévő gyulladási folyamatokról, ELISA módszerrel vizsgáltam 16 fontosabb citokin jelenlétét fiatal és idős patkányok agy homogenizátumában. Ezek az adatok megmagyarázhatják, hogy a vér-agy gát funkciócsökkenés milyen gyulladási folyamatokkal jár együtt.

II. A P-gp intranazális modulációjával kapcsolatban a következő kérdések merültek fel:

Intranazális kezeléskor a kezelőanyag térfogata és koncentrációja az orr befogadó kapacitása és a kinidin rossz oldhatósága miatt erősen korlátozott. Szükségesnek láttam, hogy a szubsztrátot ne folyadék formában, hanem egy hidrofób (jobb oldhatóság), viszkózus (elnyújtott felszívódás) gél formájában juttassam be az állatok orrüregébe, ezzel növelve a szubsztrát biohasznosulását.

- Elméletben az intranazálisan adott P-gp szubsztrát agyi eloszlását hatékonyabbá teheti, kiürülését lelassíthatja a P-gp transzporterek gátlása. Hogyan változik gyakorlatban, in vivo patkánymodellben az intranazálisan adott P-gp szubsztrát kinidin agyi eloszlása intranazális P-gp inhibitor PSC-833 jelenlétében? Milyen eltérés van, intravénásan adott gátlószert esetén?

- Érészhúzó hatású szimpatomimetikumok alkalmasak lehetnek az orrüreg-véráram gyógyszerútvonal csökkentésére. Adrenalinral gátolható-e az intranazálisan adott kinidin ornyálkahártyán keresztül a szisztémás keringésbe történő felszívódása és ezzel növelhető-e az agyi biohasznosulása? Mi az a dózis, ami mellett szignifikánsan megnő a kinidin agyi AUC értéke?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

A vizsgálatok fiatal hím (3-4 hónapos, 250-400 g közötti testsúly, Toxi-coop zrt., Budapest, Magyarország) és idős (16-21 hónapos) illetve 550-900 g közötti hím Wistar patkányokon történtek. Az állatok élelemhez és vízhez szabadon hozzájuthattak. A kísérletek az AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) elvárásainak megfelelően állatkísérletekhez szükséges bizonyítvánnyal (SEMÁB-B/032/2016) és az Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság által kiállított engedély szellemében történtek (PE/EA/4122-7/2016). Az állatokat a műtét és kísérlet során végig anesztézia alatt voltak, a kísérleti ülések eutanáziával végződtek, elkerülve ezzel a műtét és kezelések által okozott stresszt és fájdalmat.

3.2. Mikrodialízis

3.2.1. Hatóanyag formulációk és egyéb kezelő anyagok

A kinidin (QND) és valsopodar (PSC-833) P-gp transzporter szubsztrát illetve gátlószer tulajdonságát irodalmi adatok támasztják alá [195]. A kinidin (anhidrátként) és PSC-833 **intravénás** (i.v.) vivőanyaga 1,2% tömény etanolból, 8% poliszorbát 80 (tween 80) és 2,2% polietilén-glikol (PEG) 300 segédanyagokból és 88,6% autoklávozással sterilizált fiziológiás sóoldatból állt. Az i.v. kinidinből 5 mg/kg-ot, a PSC-833 előkezelésből 2 x (-20. és 0. percben) 2 mg/kg-ot adtam az állatoknak. Az orrcsepp összetétele 4% tömény etanol, 16% tween 80, 10% PEG 300 valamint 70% steril fiziológiás sóoldat volt. Az **intranazális** kezeléshez a kinidin koncentrációja az orrcseppben 5 mg/ml volt. Az intranazális gélt a M&P Pharma receptje alapján a düsseldorfi Heinrich Heine Egyetem, Viselkedés Idegtudományi Központ, Kísérleti Pszichológiai Intézet csoportjától kaptuk. A géles kezeléshez a kinidint 50 mg/ml koncentrációban alkalmaztam, az előkezeléshez 1 mg/ml PSC-833-at tartalmazott a

vivőanyag. A kinidin adrenalinnal való intranazális adagolásakor a kinidin koncentrációja mind két esetben 50 mg/ml volt, míg az alacsony dózisu adrenaliné 2,5 µg/ml, a magas dózisu adrenaliné 1 mg/ml. A hatóanyagokat a vivőanyagba való bemérése után ultrahangos keverőben homogenizáltam.

A mikrodialízis kísérlethez használt perfúziós folyadékok összetétele a következő volt: a vénás perfúzióhoz mesterséges perifériás perfúziós folyadék (a továbbiakban PPF) 147 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl és 2,3 mmol/l CaCl₂ sókat tartalmazó steril desztillált vízből állt. Az agyi perfúzióhoz használt mesterséges cerebrospinális folyadék (a továbbiakban CSF) esetében 147 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l CaCl₂ valamint 0,85 mmol/l MgCl₂ volt steril desztillált vízben feloldva.

A kísérletekhez felhasznált anyagokat: kinidin, Tween-80, PEG-300, PSC-833 (valsopodar), NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ a Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) a tömény etanol a Reanal (Budapest, Magyarország) cégektől rendeltük.

3.1. Táblázat - A mikrodialízis vizsgálatokban alkalmazott kezelőanyagok dózisa.

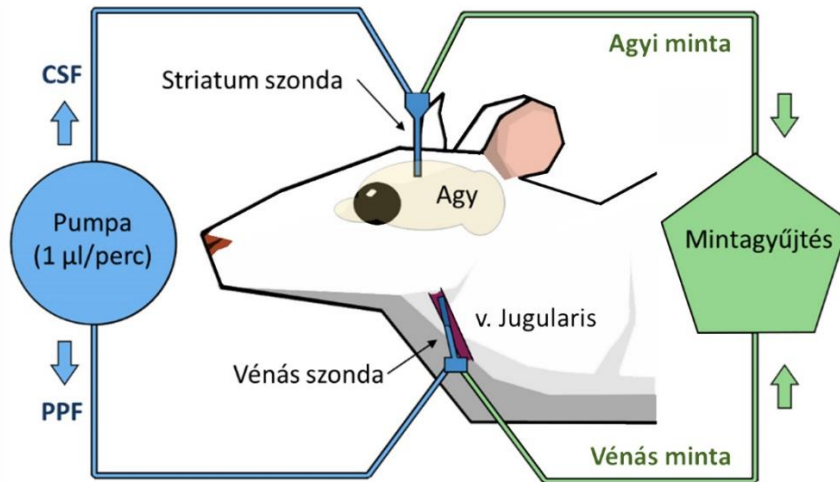
	KEZELŐ ANYAG	DÓZIS	I.N. TÉRFOGAT
INTRAVÉNÁS KÍSÉRLETEK	I.V. QND	5 mg/kg	-
	I.V. PSC-833	2 x 2 mg/kg	-
INTRANAZÁLIS KÍSÉRLETEK	I.N. csepp QND	0,25 mg /állat	50 µl
	I.N. gél QND	1 mg /állat	20 µl
	I.N. GÉL PSC-833	10 µg /állat	10 µl
	I.V. PSC-833	4 mg/kg	-
	I.N. QND + alacsony dózis ADR	1 mg + 50 ng /állat	20 µl
	I.N. QND + magas dózis ADR	1 mg + 20 µg /állat	20 µl

3.2.2. A mikrodialízis előkészítése

A mikrodialízishez a vénás és agyi mikrodialízis szondák perfúziójához 1 ml-es Hamilton fecskendőket PPF-fel illetve CSF-fel töltöttem fel, a folyadékokat mikrodialízis pumpával 1 µl/perc sebességgel áramoltattam a szondákon keresztül. Az állatok testtömegének mérését követően, intraperitoneális (i.p.) klorál-hidráttal (Sigma-Hungary Kft, Budapest, Magyarország) lettek bealtatva (400 mg/kg, 8%-os, fiziológiás sóoldatban oldva). A műteti felületek szőrtelenítése és a bőr letisztítása után, melegített felületre helyeztem a patkányokat. A vénás mikrodialízis szondát (CMA/20 elite, 4 mm-es membrán hossz) a jobb juguláris vénába ültettem be, sebészi cérnával rögzítve a pectoralis izomba, a szonda csövei a mellső láb mögött, a bőr alatt vezettem át, hogy annak végei hozzáférhetőek legyenek, mikor az állat a hasán fekszik. Ezután a patkányt behelyeztem a sztereotaxikus készülékbe, hogy beültessem az agyi szondát (CMA-12, 4 mm-es membrán hossz) a Bregmától számított MD:

+0,2 AP: -3,8 koordinátáknál fúrt lyukon keresztül, DV: -7,4 mélyre, a bal striatumba. Ezt követően indult a mintagyűjtés (-30. perc). A mintagyűjtés a -30. perctől +240. percig tartott, egy mintagyűjtő csőbe 30 percnyi dializátumot gyűjtöttem.

A mikrodialízis szondákat a CMA-tól (Torshamnsgatan, Svédország) rendeltük.



3.1. Ábra - Dupla-szondás mikrodialízis vizsgálat sematikus felépítése. A kísérleti állat agyába (striatumába) és vénájába (v. jugularis) ültetett szondán szövetspecifikus fiziológias folyadékok: perifériás perfúziós folyadék (PPF) és mesterséges cerebrospinalis folyadék (CSF) áramlanak keresztül. Az így gyűjtött minta szabad kismolekula tartalma az adott szövetek extracelluláris terére jellemző. Az így kapott minták bioanalízisével meghatározható, hogy a vizsgált anyag milyen mennyiségben található meg a vizsgált szövetekben.

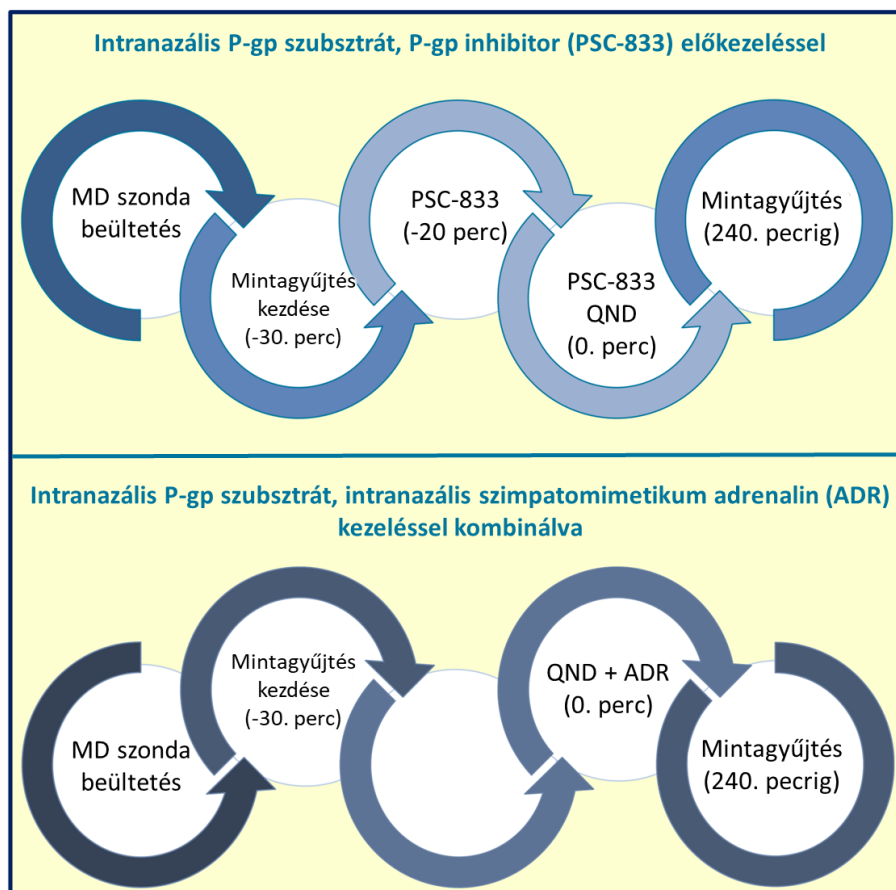
3.2.3. Intravénás kezelés

Intravénás kezelés, a bal oldali vena femoralison keresztül történt, egy Cavafix® MT B.Braun katéteren (20 G, 32 cm hossz) keresztül. A -20. percben injektáltam a vivőanyagot illetve inhibitoros oldatot, majd a 0. percben adtam be a kinidines kezelőoldatot. Mindkét adminisztrációt követően 100-100 µl fiziológias sóoldattal mostam be a kezelőanyagokat.

3.2.4. Intranazális kezelés

Az orrcseppel való kezelés, az agyi szonda beültetése előtt történt. Az altatott állatot a hátára fektettem és egy pipetta segítségével a bal orrlyukába cseppentettem a kezelőanyagot. Az üres vivőanyag, illetve a PSC-833-as előkezelés és a kinidines kezelőoldat beadása között 20 perc telt el. A szubsztratos kezelés után, két perc elteltével (hogy a csepp eloszoljon az orrüregben) helyeztem az állatot a sztereotaxikus készülékbe, az agyi szonda beültetéséhez (3.2.2 fejezetben leírtak szerint). A mintagyűjtés így csak a kezelést követő +30. percnél kezdtem meg. A mintagyűjtő csöveket 30 percnként cseréltem.

A géles vivőanyag használatakor, a műtét az intravénás kezelést megelőzőhöz hasonlóan, az intravénás katéter beültetése nélkül történt. A mintagyűjtés a -30. perctől indult. A vivőanyagos illetve inhibitoros kezelés az agyi szonda beültetését követően, a -20. percnél történt, majd a 0. percnél adtam be a kinidines gél (részletesebb leírás a kezelőoldatokról **3.2.1. fejezetben**). A géles kezelőanyagokat egy speciális dugattyús (úgynevezett positive-displacement) pipettával adagoltam a kísérleti állatok orrlyukába.



3.2. Ábra - Folyamatábra az intranazálisan adott P-gp szubsztrát agyi penetrációjának mikrodialízis vizsgálatáról. A kinidin disztribúciójának vizsgálata P-gp inhibitor (intranazális, illetve intravénás előkezeléssel), valamint intranazális szimpatomimetikum jelenlétében történtek. MD: mikrodialízis; QND: kinidin; ADR: adrenalin.

3.2.5. SPECT képalkotás

A SPECT (Single-Photon Emission Computed Tomography) felvételek a Semmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi Központ, Biofizika Intézetében, patkányokra specializált „multi-pinhole” (sok lyukas) apertúrával ellátott NanoSPECT/CT Silver Upgrade rendszerrel (Mediso, Budapest, Magyarország) készültek. A patkányok altatása 4%-os izoflurán és orvosi oxigén eleggyel, az anesztézia fenntartása 1,8%-os izofluránnal történt. Egy-egy fiatal és idős állat i.v. P-gp inhibitoros, valamint egy-egy fiatal és idős állat üres vivőanyagos bekezelés után, i.v. [^{99m}Technécium]-2-metox-isobutil-izonitril (^{99m}Tc-MIBI) P-gp szubsztrát

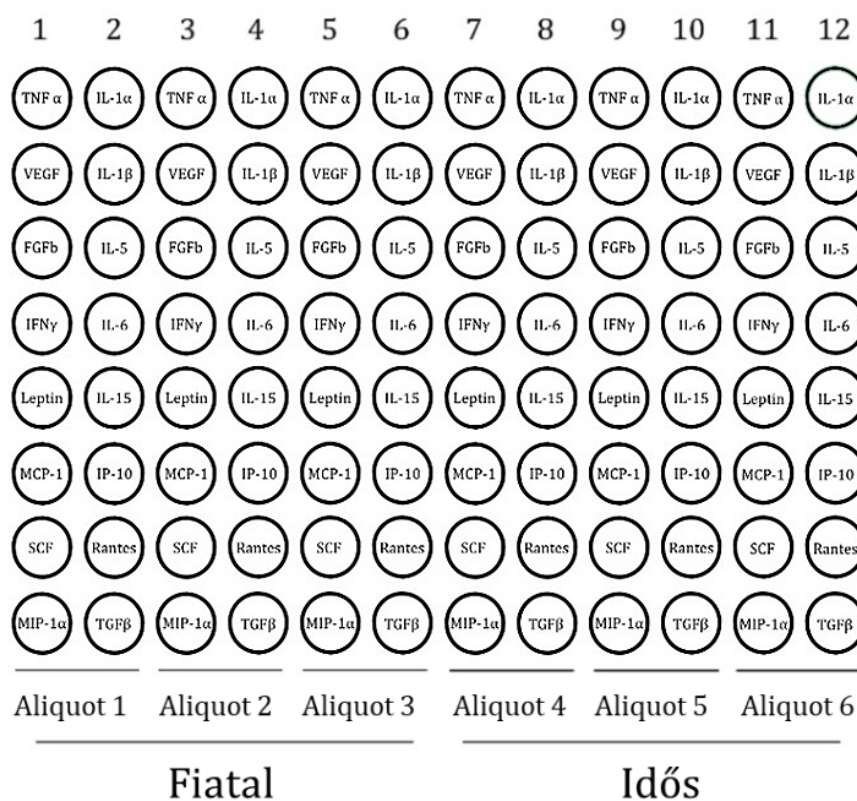
radioaktív anyagot kaptak. Ennek a radioaktív szubsztrátnak az átlag aktivitása 166.89 MBq, melyet Medi-MIBI készlet prekursorából (Medi-Radiopharma Ltd., Érd, Magyarország), ^{99m}Tc-generátor alkalmazásával (Elumatic III, CISbio International, Gif-sur-Yvette, Franciaország) ^{99m}Tc-pertechnetát rádiójelölésével állítottuk elő. A koponyákról a SPECT felvételek a kontraszt anyag injektálását követő 12., 24., 36., 48., 60., 72., 84., 96., 108. és 120. percben készültek. Minden egyes 3 dimenziós SPECT felvétel (30 nyers adatból áll) 10 percig tartott. A felvételek feldolgozása Mediso TeraTomo Monte-Carlo alapú iterációs rekonstrukciós algoritmussal történtek, a radioaktivitást MBq/mL-ben adtuk meg. A vizsgált terület (ROI: region of interest) a teljes agy volt, melynek az analízisét a VivoQuant programmal (inviCRO, Boston, MA, USA) végeztük el.

3.3. Agyhomogenizálás és citokinszint mérés

Az állatok bealtatását 400 mg/kg i.p. klorál-hidráttal végeztem, majd a patkányokat dekapitáltam, a striatumot kivettem jégakkival hűtött tálcán. A bal striatum izolációja után, a szövetek 100 mg-onként 1ml hideg 1X sejt lízis pufferrel (2x Cell Lysis Buffer for ELISA Catalog Number EA-0001, Signosis, Santa Clara, CA USA) kezeltem. A striatum homogenizációja jégbe merített edényben történt (Ultra-Turrax TP 18/10, Staufen, Németország). A lízis puffert keverés mellett, rövid ideig hatni hagytam, majd 5 percre, 4°C-on, 10.000 fordulaton per perc sebességen centrifugáltam. Az így keletkezett felülúszókat -70°C-os fagyasztóba tettem, a további feldolgozásig.

Az összfehérje vizsgálathoz albuminból hígítási sort készítettem. A homogenizátumból készített 1/10-ére hígított aliquotokon, PierceTM BCA Protein Assay Készlet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használatával végeztem a tesztet. A teszt lemezre a kalibrációs sor, egy üres mintát, illetve a hígított aliquot mintákat vittem fel. A mintákhoz hozzáadott a reagens elegyet frissen, közvetlenül a vizsgálat előtt állítottam elő. 30 másodperces, lassú keverést követően 30 percig 37 °C-on inkubáltam. Az inkubáció után, 562 nm-en történt az abszorbancia detektálása egy Tecan (Männedorf, Svájc) Spark 20-as készülékkel.

A homogenizátumok citokin koncentrációját kemilumineszcens ELISA módszerrel mértem meg. A vizsgálatot egy 96-lyukú Signosis Patkány citokin lemezen végeztem (Rat Cytokine ELISA Plate Array I Catalog Number EA-4004), a gyártó által előírtak alapján. A lemez 1-1 lyuka 16 különböző citokin egyikére tartalmaz csapdázó antitestet, így összesen 6 minta vizsgálatára alkalmas. A **3.3. Ábrán** látható módon lettek felvéve a lemezre a minták. Az összfehérje analízissel meghatározott koncentrációk alapján, úgy hígítottam az aliquotokat, hogy azok egy ml-jében 100 µg fehérjét tartalmazzanak. A festést sztreptavidin-tormaperoxidáz kötő antitestekkel történt, a HRP szubsztrát hozzáadásával fényreakció keletkezett, melyet egy Tecan Spark 20 készülékkel detektáltam.



3.3. Ábra - Aliquotok elhelyezkedése a Kemilumineszcens ELISA vizsgálathoz. A lemezen 16 különböző citokin detektálható. 3 azonos korú fiatal állat mintája lett felvéve, összehasonlítva három idősebb állatból nyert mintával.

3.4. Anatómiai és hisztológiai vizsgálatok

3.4.1. Immunhisztokémia

A hisztológiai festéseket a Természettudományi Kutatóközpont, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetében készítettük. Az altatást követően a patkányok perfúziója 3 percig fiziológiás sóoldattal, majd 30 percig fixálóval (4% paraformaldehid és 15% pikrin sav keverék 0,1 M koncentrációban, foszfát pufferben) transzkardiálisan történt. Az agyat eltávolítottuk, 60 μ m vastag koronális metszeteket készítettünk, ezeken történt az immunfestés, Volk és munkatársainak publikációjában leírtak alapján [122]. A szöveteket -20 °C-os 33% ecetsav és 66% etanol keverékkel kezeltük 10 percig, majd az endogén peroxidáz enzimeket 0,6%-os peroxiddal, a nem specifikus immunglobulinokat 3% BSA (szarvasmarha szérumalbumin) és 10% NHS (normál ló szérum) keverékkel gátoltuk. A GFAP immunfestés Grand és munkatársainak leírása alapján készült [123], az alábbi módosításokkal: Az agyszeleteket 1 %-os hidrogén-peroxiddal, majd 2%-os NGS (normál kecske szérum)-NHS eleggyel kezeltük. Az elsődleges antitestek GFAP (1:2000, EMD Millipore, Billerica, MA, USA MAB3402, GA5 klón) és P-gp (1 μ g/ml, EMD Millipore, Billerica, MA, USA

MAB517310, C219 klón) elleni monoklonális egér antitestek voltak. Kimutatást biotililált egér ellenanyag immunglobulin G (1:250) biztosította. Ezután adtuk a másodlagos szérumot az elegyhez, avidin-biotililált HRP (torma-peroxidáz) komplex formájában. A szeleteket 0,05%-os 3,30-diaminobenzidín-tetrahidroklorid kromogénben preinkubáltuk, majd 0,01%-os hidrogén-peroxidban előhívtuk. Az immunfestett P-gp-s agyszeletek xiolos dehidratálást követően kerültek a tárgylemezre, fedőanyagos kezeléssel (DePeX, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország) a fénymikroszkóp vizsgálatához. A GFAP festett szeleteket 0.5% ozmium-tetroxiddal kezeltük, majd etanolban dehidratáltuk.

A festéshez a Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) ló és kecske szérumait, valamint biotililált egér ellenanyagát alkalmaztuk. A festés intenzitását Adobe Photoshop CC program segítségével mértem meg.

3.4.2. Orrüreg hisztológia

A fiatal felnőtt patkányt 400 mg/kg i.p. klorál-hidrátal altattam. Hátára fektetve, hogy a feje kicsit felfelé nézzen, 50-50 µl 1%-os Evans kék oldatot kapott jobb és bal orrlyukába. 10 perc után, az állat túlaltatását követően végzett jéghidegre hűtött 10 %-os formaldehides transzkardiális perfúzió biztosította az agy fixálását a szövettani vizsgálatokhoz. A koponya 24 óráig 8%-os neutrális pufferelt formaldehidben ázott. A szövettanhoz 16 darab 4 µm vastag, paraffinba ágyazott szegmens készült, haematoxin-eozinos festéssel [202]. A metszetek készítése és festésük a Szent István Egyetem, Állatorvostudományi Kar, Patológiai Tanszékén történtek.

3.4.3. MRI

Az MRI felvételek a Pécsi Tudományi Egyetem, Általános Orvosi Kar, Orvosi Képképző Klinika, illetve a Richter Gedeon kft. MRI laborjában készültek. Az MRI felvételek 3T MRI szkennelrel készültek (MAGNETOM Trio a Tim System, Siemens AG, Erlangen, Németország). A rádiófrekvencia tekercs belső átmérője 40 mm (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Németország). T2-súlyozott képeket alkottunk axiális, szagittális és koronális orientációból, 2D turbo-spin echo szekvenciával (TR/TE=5270/99 ms; 26 darab metszet; metszetek vastagsága 1 mm; FOV=34×34 mm²; mátrix mérete 192×192-ről 384×384-ra interpolálva; sáv szélesség: 40 Hz/pixel; turbo faktor: 8; átlag: 2). A vizsgálatokban egy fiatal (3 hónapos) és négy idős (15, 16 és két 21 hónapos) állat vett részt.

3.4.4. Viselkedés és memória vizsgálatok

A viselkedésvizsgálatok a Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben történtek. A patkányoknak, 4 nap alatt, négy különböző indulási pontból kellett megtanulniuk (északi, nyugati, déli, keleti), egy vízzel telt arénában egy rejtett platform helyét (dél-keleti pozícióban), úgy hogy az arénán kívül rendelkezésre álltak további tájékoztató pontok. Az állatoknak egy nap során 3 tesztet kellett teljesíteniük, 30 perces szünetekkel. Az úszás (útkeresés) idejét Smart v3.0 (Panlab, Spanyolország) videó követő szoftverrel rögzítettük és az eredményeket többszörös összehasonlító ANOVA módszerrel értékeltük ki.

Az új tárgy felismerés (NOR) teszttel az állatok felismerési memóriáját vizsgáltuk. A kísérlet két fázisból állt. Az első fázis (F1), az első tárggyal való megismerkedést szolgálta. A második fázisban (F2) ismét az első, már ismert tárgyat kapta meg az állat (ismert), majd 5 óra késéssel bemutatásra került a számára addig ismeretlen objektum (új). Ekkor 3 perc kamerás megfigyelés során rögzítésre került, hogy melyik tárgyat mennyi ideig vizsgálta a patkány. A két tárgy közötti diszkriminációs index (DI):

$$DI = 100 * \frac{(t_{2\text{új}} - t_{2\text{ismert}})}{(t_{2\text{új}} + t_{2\text{ismert}})}$$

A null közeli érték a diszkriminációs képesség hiányát jelenti, míg a pozitív érték az új tárgy iránti fokozottabb érdeklődést mutatja. Fontos hogy a két tárgy azonos stimulációt váltson ki az állatokból, azaz ne legyen egyik sem jutalmazóbb vagy komplexebb a másikonál. A fiatal és idős csoportokat tovább osztottuk, úgy hogy egyik felének az „a” kódú objektum az ismert, míg a másik felének a „b”.

3.5. LC-MS/MS bioanalitika

A mikrodialízissel gyűjtött mintákban található QND koncentrációkat Szegedi Biológiai Kutatóközpontban (intravénás kinidin kísérletek), illetve a Természettudományi Kutatóközpont Műszercentrumában (intranazális kinidin kísérletek) HPLC-MS/MS módszerrel mérettük le. A módszerek paramétereit részletesebben a **3.2. Táblázat** mutatja be.

3.2. Táblázat - HPLC-MS/MS analitikák paramétereit.

	Intravénás QND	Intranazális QND
HPLC	Agilent 1100	Agilent 1100
MS	Thermo Scientific Q Exactive Plus orbitrap	Sciex 6500 Q Trap tandem
Oszlop	Phenomenex Kinetex XB-C18 részecske méret: 2.6 µm; pórus méret: 100 Å; hossz/átmérő: 50 mm / 2.1 mm	Phenomenex Synergi Fusion RP részecske méret: 4 µm; pórus méret: 80 Å; hossz/átmérő: 50mm / 2 mm;
Eluensek	A: MS víz 0,1% formilsavval B: acetonitril 0,1% formilsavval A/B arány: 92 / 8%	A: MS víz 0,1% formilsavval B: acetonitril 0,1% formilsavval Kiindulás: 90/10% A/B arány 1. Gradiens: 3 perc alatt 90/10% à 5/95% A/B átmenet Középső szakasz: 0.5 percig 5/95% A/B arány 2. Gradiens: 0,3 perc alatt 5/95% à 90/10% A/B átmenet Utolsó szakasz: 2.2 percig 90/10% A/B arány
Mérés ideje	2,5 perc	6 perc
MS módszer	Elektronspray ionizáció (3500 V) Pozitív ionizációs üzemmód Forrás kondíciók: Hőmérséklet: 300 °C Vaporizáló gáz: 55 (tetszőleges egység), vaporizáló gáz hőmérséklete: 400 °C Nebulizáló gáz: 15 (tetszőleges egység) Szárító gáz: 5 (tetszőleges egység)	Elektronspray ionizáció (5000 V) Pozitív ionizációs üzemmód Forrás kondíciók: Hőmérséklet: 450 °C Vaporizáló gáz: 45 (tetszőleges egység) Nebulizáló gáz: 40 (tetszőleges egység) Szárító gáz: 40 (tetszőleges egység)
Kvantifikáció	HCD fragmentálás: Anyaiion: m/z: 325.1910 Da Termékion: m/z: 79.0551 Da	MRM átmenet: 325.2/307.2 m/z (minőségi) Ütközési energia: 31 V 325.2/172 m/z (mennyiségi) Ütközési energia: 45 V Átmeneti idő: 300 msec
Kalibráció	0.25–5000 nM (81,105 ng/mL – 1622,100 mg/mL)	0.1-100 ng/mL

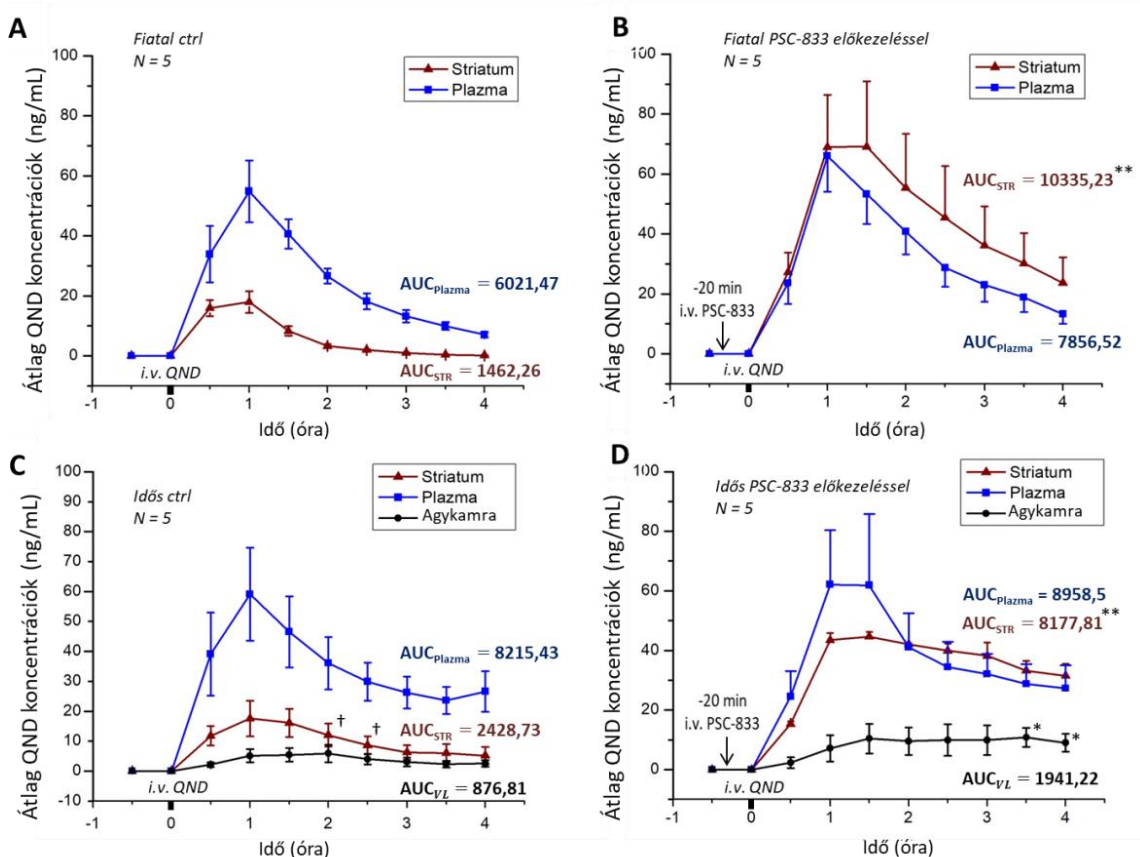
4. EREDMÉNYEK

4.1. Vér-agy gát öregedésének vizsgálata

4.1.1. A vér-agy gát funkciók változásai egészséges öregedés során

4.1.1.1. Mikro dialízis

A **4.1. Ábrán** látható a mikro dializátum minták, átlagolt kinidin koncentrációinak ábrázolása az idő függvényében. A fiatal patkányokban a striatumból és a vérből származtak a dializátumok, az idős állatoknál az oldalsó agykamrából is történt mintavétel. Az

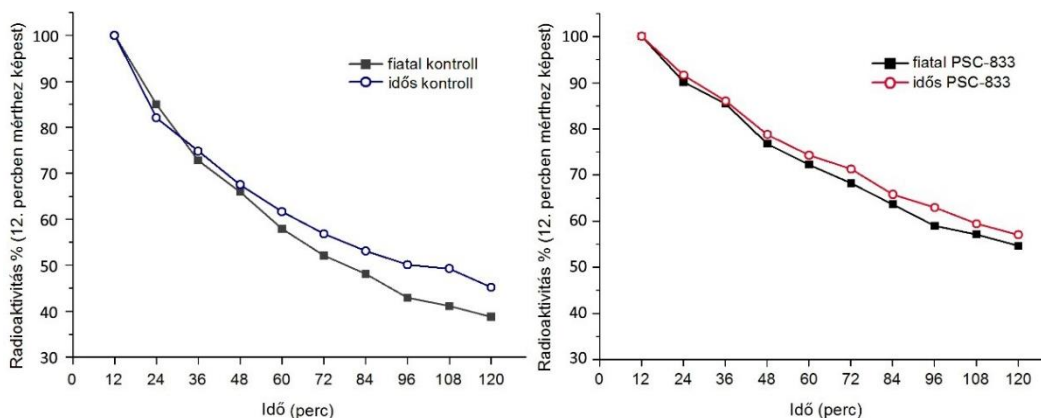


4.1. Ábra - Kinidin (QND) koncentráció-idő profilok a dializátum mintákban (dózis: 5 mg/kg i.v.) fiatal (A, B) és idősebb (C, D) Wistar patkányokban üres vivőanyaggal (A, C) illetve PSC-833-mal (2x2 mg/kg i.v) előkezelve (B, D). Az ábrázolt értékek csoportonként n=5 illetve n=3 egyedből számolt átlagok (+/- standard hiba). *: p<0.05, **: p<0.005 T-test vizsgálat (kontroll csoport vs. PSC-833 kezelt csoport), †: p<0.05 fiatal kontroll vs idősebb kontroll csoport. STR: striatum, VL: ventriculum lateralis (oldalsó agykamra), AUC: görbe alatti terület (area under the curve), QND: kinidin.

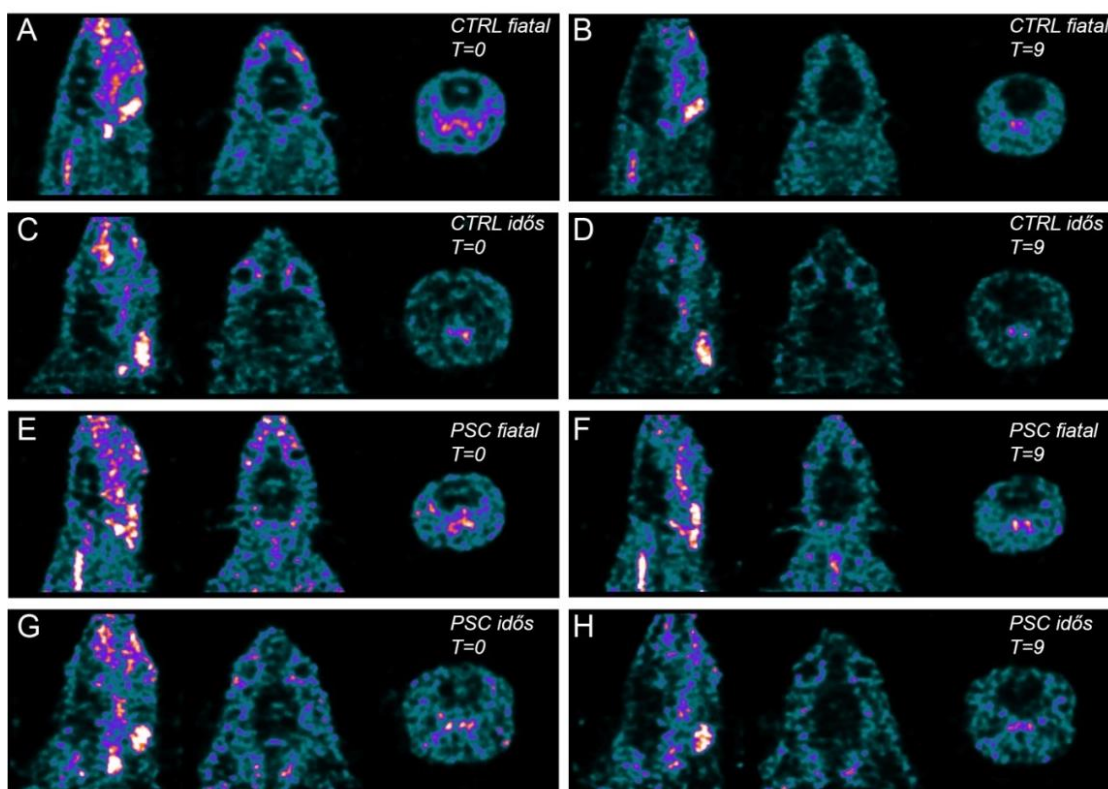
AUC_{STR}/AUC_{plazma} arány a kontroll fiatal állatoknál 0,242, az időseknél 0,296 volt. Az idősebb állatoknál magasabb agyi koncentrációk voltak megfigyelhetők, mint a fiatal állatokban (fiatal AUC_{STR} vs idős: 1462,26 vs 2428,73 ng/ml*perc). Szignifikáns különbség látható a kontroll fiatal és idős állatok eliminációs kinetikája között is, a 120. és 150. perc közötti időintervallumban ($p < 0,05$). A PSC előkezelés hatására (fiatal PSC AUC_{STR} vs idős: 10335,23 vs 8177,81 ng/ml*perc) az AUC_{STR}/AUC_{plazma} arány a fiataloknál 1,31 az idősebbeknél 0,91 lett. Az AUC_{STR} értékek a fiatal ($p < 0,05$) és idősebb korosztálynál ($p < 0,005$) is szignifikánsan megnő a P-gp inhibitor előkezelés hatására. Idősebb állatokon végzett tripla-szondás vizsgálatoknak az volt a célja, hogy betekintést nyerjünk az agykamrák transzporter folyamatainak változásába. A jobb oldalkamrába (ventriculum lateralis) ültetett harmadik szondából gyűjtött minták analízise alapján 2,03-szorosára nőtt a AUC_{LV}/AUC_{plazma} (kontroll vs kezelés: 0,107 vs 0,217) arány a PSC jelenlétében, míg AUC_{STR}/AUC_{plazma} (kontroll vs kezelés: 0,296 vs 0,913) arány 3,088-szorosára nőtt a kezelés hatására.

4.1.1.2. SPECT képképzés

A $^{99m}\text{TcMIBI}$ radioaktív P-gp szubsztrát anyag eloszlásának vizsgálatokor már fél órán belül kimutatható, hogy az idősebb állatban a szubsztrát nagyobb mennyiségben marad meg az agyban, mint a fiatalokéban és a különbség egyre nő az idő előrehaladtával. Ugyanakkor PSC-833 előkezelés esetén az agyban kimutatott radioaktivitás közel azonos fiatal és idős állat esetében.



4.2. Ábra - Az agyi $[^{99m}\text{TcMIBI}]$ -2-metoxi-izobutil-izonitril (MIBI) radioaktív jel arány (a 0-12. perc közötti mért radioaktivitáshoz mérve) ábrázolása az idő függvényében, A) kontroll fiatal és idősebb állatban, valamint B) i.v. PSC-833 előkezelésen átesett fiatal és idősebb patkányban. A P-gp gátlás nélkül az idősebb állat agyából lassabb az elimináció, a fiataléhoz hasonlítva, melynek háttérben a vér-agy gát szivárgása és a P-gp transzporterek alulműködése állhat. Azonban ez a különbség az inhibitor hatására megszűnik, erre magyarázat lehet az öregedéssel összefüggő P-gp expresszió csökkenés.



4.3. Ábra - SPECT felvételek az első ($T=0$; A,C,E,G) és utolsó ($T=9$; B,D,F,H) időpontban, fiatal kontroll (A és B), idős kontroll (C és D), fiatal PSC-833 előkezelt (E és F), valamint idős PSC-833 előkezelt (G és H) állatokról. A melegebb szín nagyobb sugárzást, nagyobb szubsztrát koncentrációt jelöl a szövetekben.

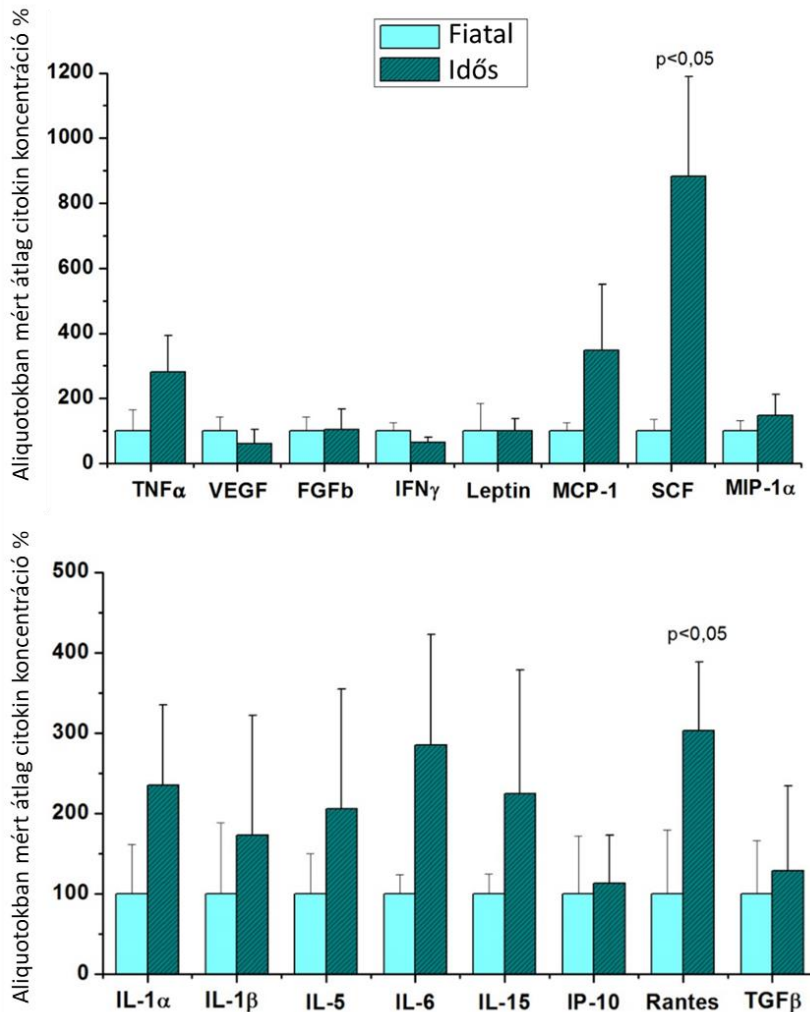
4.1.2. Fehérje analízis és citokin szint vizsgálat

Az agyi citokin szint vizsgálatokban részt vett állatok és a homogenizált bal oldali striatum adatait a 4.1. Táblázat foglalja össze. Az összfehérje koncentrációkat az aliquotokból Pierce BCA fehérje vizsgálattal határoztam meg.

4.1. Táblázat - Citokin vizsgálatokhoz felhasznált állatok, agyszövetek és aliquotok adatai.

Állat	Életkor (hónap)	Testsúly (g)	Homogenizált szövet súlya (mg)	Fehérje koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	ellenére, hogy a striatum
1	2-3	250	174.0	5474.60	
2	2-3	252	173.1	5441.53	
3	2-3	285	207.8	5091.17	
4	16	530	266.4	4949.05	
5	21	588	206.8	4927.24	
6	21	510	180.3	4869.90	

összfehérjekoncentrációja öregedés során szignifikánsan csökken ($p < 0,05$), aliquotokon végzett ELISA vizsgálat eredményei (4.4. Ábra) azt mutatták, hogy az idősebb egyedekben a citokinek szintje sok esetben megemelkedett, például TNFa: 10470,3 vs 3728,3; MCP-1: 18956 vs 5449,7; MIP-1a: 12250 vs 8296; IL-1a: 12417,3 vs 5017; IP-10: 12417,7 vs 10973,3;



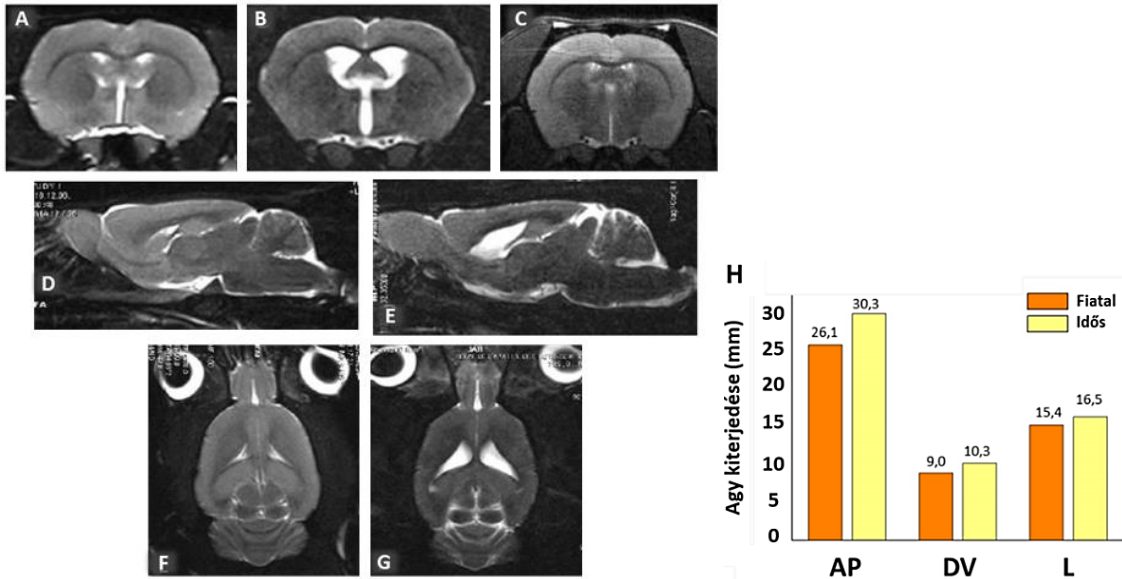
4.4. Ábra - Agyi citokinszintek összehasonlítása fiatal és idős patkányokban. A kemilumineszcencia intenzitások arányát véve (a fiatal állatok szintjét 100 %-nak tekintve) a legtöbb vizsgált citokin esetében tapasztalható változás az agyi koncentrációjukban. A szignifikancia küszöböt az összejt faktor és a Rantes mennyiség növekedése érte el, de jelentősen megemelkedett számos más gyulladáskeltő molekula szintje is, mint a TNF α -é és az interleukinoké.

TGF β : 20245,7 vs 15704, mértékegység: counts per second (detektált fotonok száma másodpercenként), olykor szignifikáns mértékben, mint az SCF: 37990,7 vs 4308,7; vagy a Rantes: 20279 vs 6688; $p < 0,05$, mértékegység: counts per second.

4.1.3. A vér-agy gát szerkezeti elváltozásai egészséges öregedés során

4.1.3.1. MR képalkotás

Axiális, koronális és szagittális felvételek készültek fiatal és idős patkányokról. A reprezentatív idős állat (15 hónapos) agy mérete anterior-posterior irányban 14,8 %-kal, laterálisan 7,1 %-kal, valamint dorso-ventrálisan 14,4 %-kal nagyobb volt a fiatal állatokéhoz

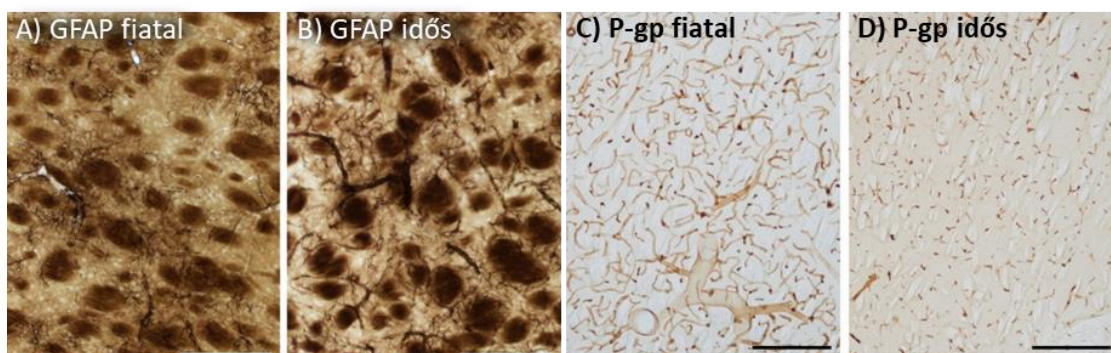


4.5. Ábra - MR felvételek koronális síkból (A-C) fiatal (A), kitágult agykamrás idős (B) és egészséges idős (C) patkányok agyáról, valamint szagittális síkban (D,E) fiatal (D) és kitágult agykamrás idős (E) állatokról, valamint axiális síkban (F,G) fiatal (F) és kitágult agykamrás idős állatokról. Az oszlopdiagram (H) az öregedéssel összefüggő térfogatváltozásokat foglalja össze: anterior-poszterior, dorzozentrális és laterális kiterjedésében is tapasztalható növekedés az idős állatok agyában.

képeket (4.5. Ábra H). Ezek a mérések elsősorban a mikrodialízis szonda behelyezéséhez szükséges agyi koordináták meghatározásához készültek. Emellett a felvételeken az agykamrák tágulása is megfigyelhető (4.5. Ábra B). További 3 idős (egy 16 és két 21 hónapos) állatról készült képeken nem tapasztalható lényeges elváltozás az agykamrákban (a reprezentatív idős állat képe 4.5. Ábra C felvételen látható).

4.1.3.2. Agyszövet immunhisztokémiai festése

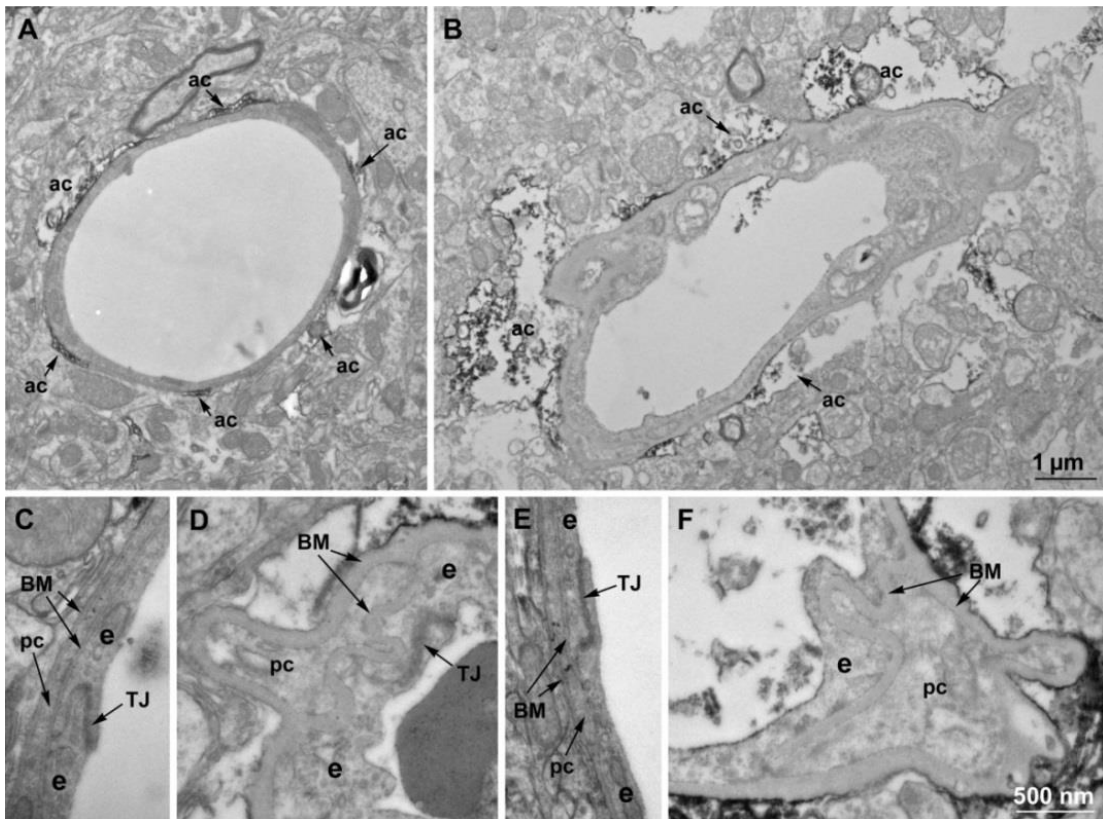
A P-gp-hez és az asztrocitákban kifejeződő GFAP kötő immunfestés a vér-agy gát transzporterek és az asztrociták öregedéshez köthető expressziós változásainak vizsgálatát szolgálta. A két festés eredményét fiatal és idős állatokban a 4.6. Ábra fénymikroszkópos képei mutatják. A reprezentatív idős patkányon történt P-gp festés (4.6. Ábra C és D) jól látható expresszió csökkenést mutat a fiatal állat striatumában megfigyelhetőhöz képest. A GFAP immunfestése (4.6. Ábra A és B) az életkor hatására intenzívebb lett: Adobe Photoshop CC programmal a szürkescálás hisztogramon, a 80-as határérték mellett (ez volt az az érték 0 azaz fekete és 255, avagy fehér között, ami alatt a festett képletek találhatóak) a lefedettség a fiatal állat felvételein 29,11%-os, míg az idősebb patkányén 32,38%-os volt.



4.6. Ábra - Fény mikroszkópos felvételek a fiatal és idős állatok striatumáról. GFAP festés jól mutatja a fehérje expressziójának megnövekedését az idősebb állat asztrocitáiban (B), a fiatal patkány agyszövetében megfigyelhetőhöz képest (A). A P-gp immunfestés (C, D) eredménye azt bizonyítja, hogy az öregedés hatására a P-gp transzporterek száma megfogyatkozik (D) a striatumban. (Méretarányok a képeken: A, B: 200 μm ; C, D: 250 μm .)

4.1.3.3. Agyi erek elektronmikroszkópos vizsgálata

A kapillárisok falán szignifikáns vastagodás figyelhető meg az idős állatokban: az érfal vastagságát a külső és belső átmérő arányából határoztuk meg, hogy az erek méretbeli különbsége ne befolyásolja a végeredményt. Így az 1 közeli értékek az ér vékonyságát jelentik, a kisebb számok vastagabb kapilláris falra utalnak. Az így kapott arányszámok fiatal állatoknál $0,88 \pm 0,05$ volt, míg az idősebb állatok esetén $0,57 \pm 0,14$ ($p=0,0058$). A kapillárisokat alkotó endothél sejtek között, a lumenhez közelebb eső felszínén azonosíthatóak voltak a szoros kapcsolatok (TJ), melyek száma ($0,35 \pm 0,29$ vs $0,1 \pm 0,2$; $p=0,0740$) és összkiterjedése kapillárisonként ($0,11 \pm 0,04$ vs $0,04 \pm 0,06$; $p=0,0740$, kapilláris fal területére normalizált érték) az idős állatokban csökkenő tendenciát mutatott a fiatal állatokéhoz képest, habár az eltérés nem volt szignifikáns. A murális periciták mennyiségében nem történt szemmel látható változás, méretükben is elhanyagolható növekedés volt csak megfigyelhető (fiatalokban $0,36 \pm 0,41 \mu\text{m}^2$, idősekben $0,54 \pm 0,44 \mu\text{m}^2$; $p=0,1012$, a kapilláris falának területével normalizálva $0,15 \pm 0,04$ vs $0,17 \pm 0,07$, $p=0,5698$). Ugyanakkor a bazális membrán jelentősen megvastagodott az öreg állatokban (fiatalokban $24,3 \pm 8,8$ nm, idősekben $93,9 \pm 34,1$ nm, $p=0,0001$). A kapillárisokat körülvevő (GFAP-immunopozitív) asztrocita végtalpak összterületében szignifikáns növekedés volt tapasztalható az öregedés összefüggésében ($3,54 \pm 3,42 \mu\text{m}^2$ vs $0,47 \pm 1,06 \mu\text{m}^2$; $p=0,0001$ a kapilláris falának területével normalizálva $1,58 \pm 1,14$ vs $0,48 \pm 0,65$; $p=0,0348$), míg számukban elhanyagolható különbség mutatkozott.

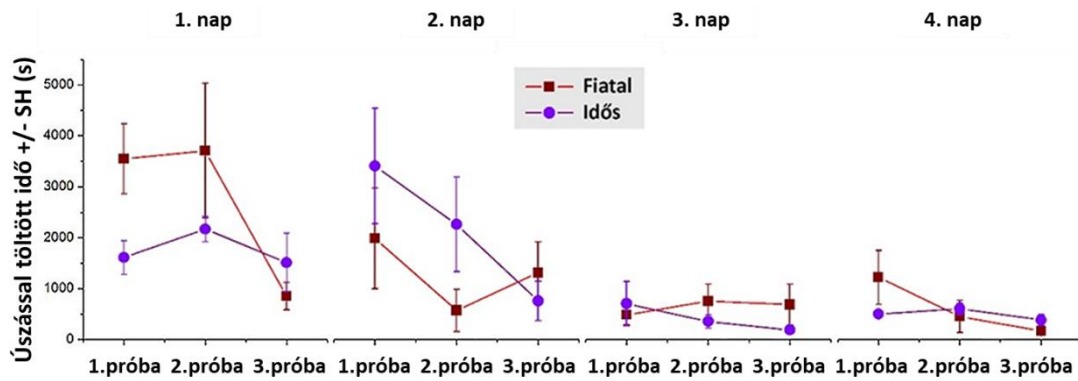


4.7. Ábra - Elektronmikroszkópos felvételek fiatal és idős patkányok agyi kapillárisairól kisebb (A,B) és nagyobb arányú (C-F) nagyítással. A) Fiatal állatok kapillárisaira vékony érfal jellemző, kívülről számos asztrocita végtalp (ac) veszi körbe. B) Idősebb állatoknál megvastagodott érfal látható, melyet duzzadt asztrocita végtalpak vesznek körbe. C) és E) részleteken 30.000-szeresére nagyított felvétel mutatja a fiatal állatok kapillárisainak falát alkotó elemeket: jól látható a kompakt érfal, mely szoros kapcsolatokban (TJ) bővelkedő endothél sejtek (e), periciták (pc) és vékony bazális membrán (BM) réteg alkotnak. D) és F) képeken szintén 30.000-szeres nagyításban látható az idős állatok kapillárisainak fala: a sejtek kis mértékben elvesztették eredeti alakjukat, az endothél sejtek közötti szoros kapcsolatok ritkább számban találhatóak meg, valamint a bazális membrán szignifikánsan megvastagodott (Méretarányok a képen: A,B: 1 µm; C-F: 500 nm).

4.1.4. Az egészséges öregedés hatásai a memóriára

4.1.4.1. Morris-féle vízi útvesztő

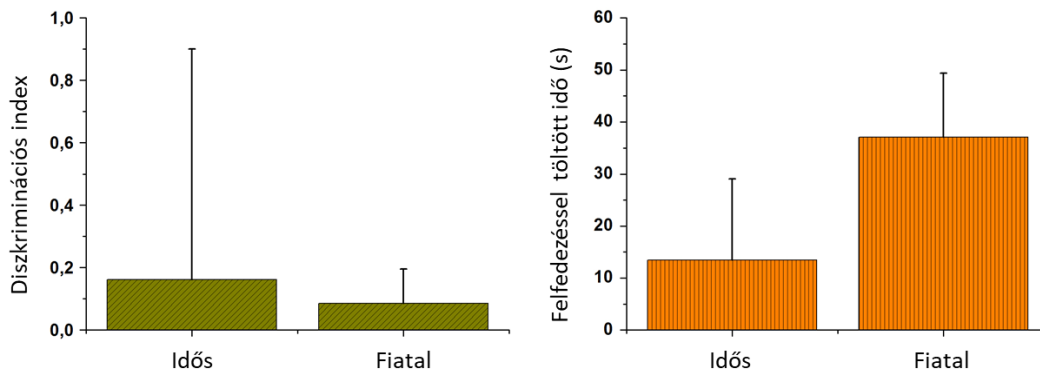
A Morris-féle útvesztő a navigációs képességek és térbeli memória vizsgálatára kifejlesztett teszt. A fiatal állatok a második napon már gyorsabban megtalálták a kiemelkedést, míg az idősebbek valamivel rosszabbul teljesítettek a második napon az elsőtől kezdve. A harmadik és negyedik napon már mind két korcsoport 20 percen belül megtalálta a víz alatti platformot (a részletes eredmény a 4.8. ábrán látható).



4.8. Ábra - Fiatal és idős állatok menekülési ideje a Morris-féle vízi útvesztő vizsgálat négy napján. A kezdeti nehézségek ellenére az idősök is megtanulták a víz alatti kiemelkedés helyét.

4.1.4.2. Új tárgy felismerés

Az új tárgy felismerési teszt során a fiatal csoport tagjai háromszor több időt töltöttek a tárgyakkal való ismerkedéssel, mint idősebb társaik (4.9. Ábra). A diszkriminációs indexek (4.2. Táblázat) különbsége a két korcsoport között nem volt szignifikáns.



4.9. Ábra - Az új tárgy felismerés vizsgálat eredményeinek összegzése. A) ábrán látható a két korcsoport diszkriminációs indexe, mely mindkét csoportban pozitív ugyan, de közel a 0 értékhez, azaz nem tesznek különbséget az ismert és új tárgy között az állatok. A B) ábrán látható a tárgyak felfedezésével töltött idő. A fiatal patkányok jóval több időt töltöttek kutakodással, mint az idősebb társaik, melynek oka lehet a korosabb állatok szorongása vagy apátiája.

4.2. Táblázat - Négy idős és négy fiatal patkány explorációs ideje és diszkriminációs indexe (DI) az új tárgy felismerés vizsgálat során.

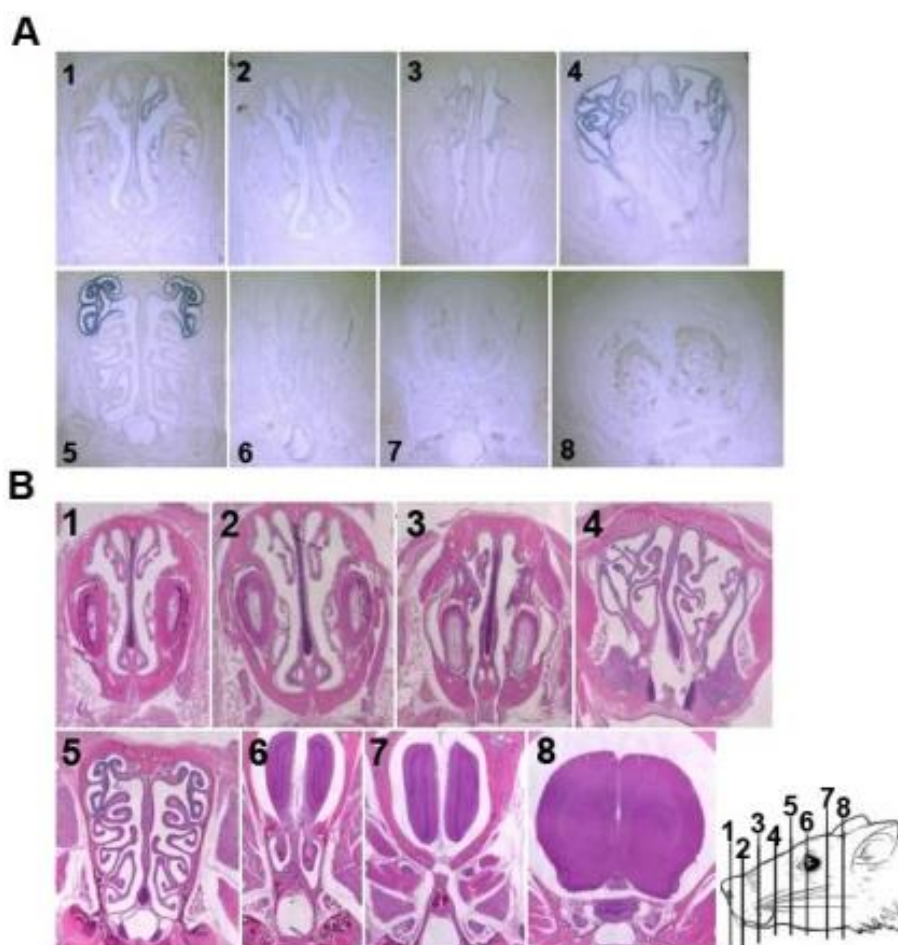
Állat	Csoport	Tárgy azonosító	Exploráció (s)	DI
1	idős	a	8,88	-0,79505
2	idős	a	36,41	0,299643
3	idős	b	1,75	0,142857
4	idős	b	6,87	1
5	fiatal	a	28,24	-0,04178
6	fiatal	a	25,45	0,226719
7	fiatal	b	43,08	0,090065
8	fiatal	b	51,42	0,067678

4.2. A P-gp modulációjának modellje

4.2.1. Formuláció kidolgozása intranazális kinidinhez

4.2.1.1. Orrüreg metszetek, hisztológia

Az Evans kék festékekkel kezelt állat orrüregéről és agyáról készült metszetek alapján, a nazális oldat megfelelő módon elérte az orrüreg hátulsó (caudalis) területét, ahol a szaglóhám található (4.10. Ábra).



4.10. Ábra - Orrcseppbe oldott Evans-kék festékekkel színezett orrüreg szövettani képei. A metszetek natívan (A) és hematoxin-eosinnal festve (B), a patkány orrüregéről (1-5), szaglógumóról (6-7) és agyának első feléről (8). A sematikus patkány fejen a számozott metszetek helye került jelölésre. A natív ábrákon jól látható az oldat útja, a folyadék sikeresen eljutott az orrüreg caudalis (4-es és 5-ös metszet) felszínéhez.

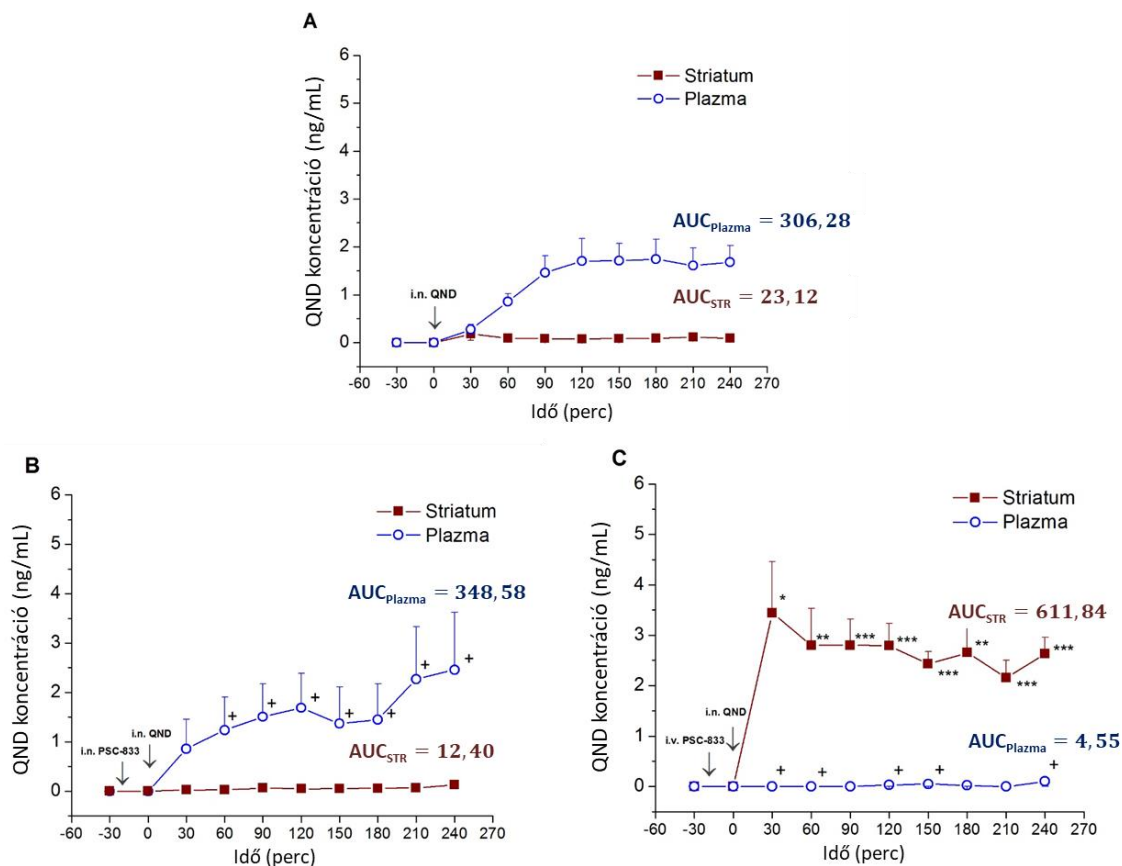
4.1.1.1. Formuláció halmazállapota

Az orrcsepp formulációjához az intravénás vivőanyag összetételéből indultunk ki. A segédanyagok mennyiségét meg kellett növelni, ezáltal viszkózusabb lett a kezelőoldat, valamint a hatóanyag töménységét is növelni lehetett. Erre szükség volt, ugyanis az orrüreg jóval kevesebb mennyiséget képes befogadni, mint amit intravénás kezelés során be lehet adni

az állatoknak. A folyékony halmazállapotú nazális oldat beadásához szükséges volt, hogy az állat a hátán feküdjön és feje kissé meg legyen emelve, hogy az anyag ne csorogjon vissza. Emiatt a sztereotaxikus készülékbe való behelyezés, és az agyi szonda beültetése csak az anyag beadása után történhetett meg, így a hatóanyag felszívódási fázisáról nem történt mintavétel. Emellett a hatóanyag folyékonyágából adódóan a szubsztrát rövid ideig maradt a kívánt abszorpciós felületen (szaglóhám), valamint könnyedén lecsorgott a gyomorba, vagy rosszabb esetben a tracheákon keresztül a tüdőbe, mely fulladáshoz vezetett. Így ez a fajta adagolási módszer magas mortalitással járt.

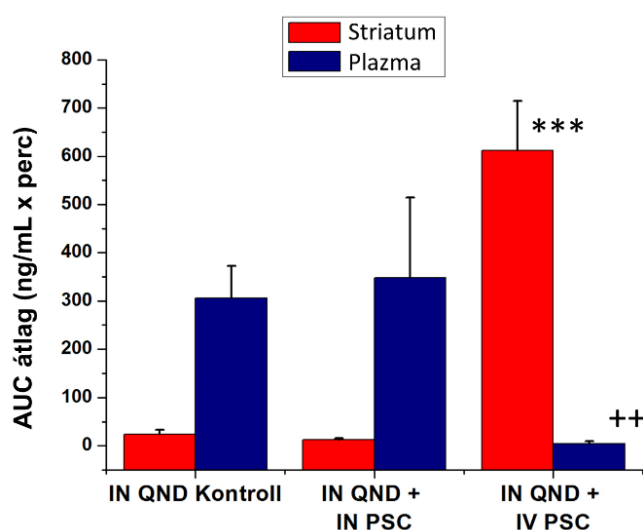
Ezzel szemben a géles formuláció nem csak hogy hidrofób tulajdonságának köszönhetően könnyebben oldatba vitte a kinidint, de viszkoelasztikus sajátosságából adódóan hosszán az orrüregben tartotta a hatóanyagot és megszüntette a kezelt állatok elhullását.

4.1.2. Intranazális kinidin agyi penetrációja PSC-833 jelenlétében



4.11. Ábra - Intranazálisan adott kinidin (1 mg/állat) koncentráció-idő profilja és annak változása PSC-833 előkezelés hatására. A kontroll (A), intranasális PSC-833 (10 µg/állat) (B) és i.v. PSC-833 (4 mg/kg) (C) előkezelés esetén. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.005$ vs kontroll csoportban mért striatum kinidin koncentráció; +: $p < 0.05$ vs kontroll plazma csoportban mért kinidin koncentráció. (Az adatok analízise két mintás t -próbával történt, a feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba; $N=5$ /csoport.)**

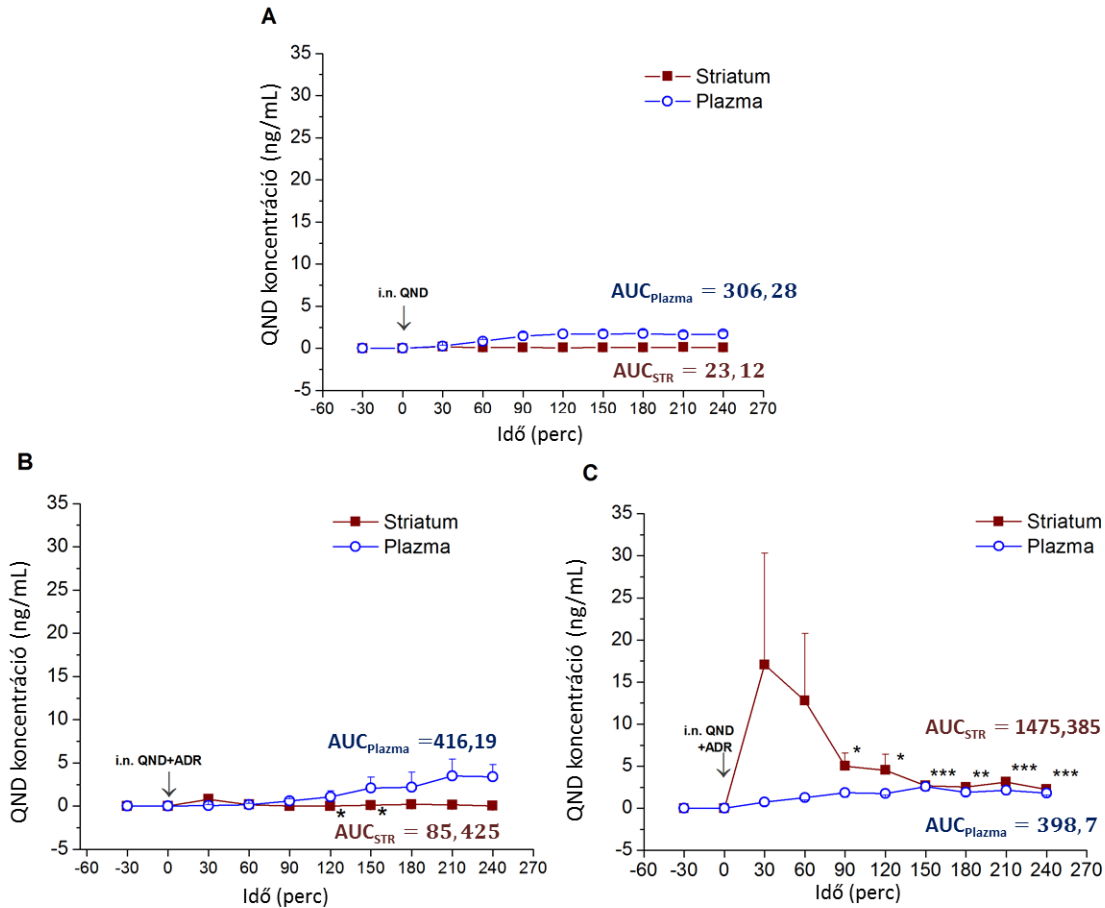
A vizsgált öt csoport: **1)** intranazális (IN) QND (1 mg), IN üres vivőanyag előkezeléssel, **2)** IN QND (1 mg), IN PSC-833 előkezeléssel (10 µg), **3)** IN QND (1 mg), i.v. PSC-833 előkezeléssel (4 mg/kg), **4)** IN QND+ADR (1 mg és 50 ng) és **5)** IN QND+ADR (1 mg és 20 µg). Az eredményeket összegző ábrákat a **4.11.ábra** szemlélteti. A kontroll csoport (**4.11.ábra A**) mikrodialízis eredményei alapján az $AUC_{\text{striatum}}/AUC_{\text{plazma}}$ arány 0.075 volt. Az intranazális P-gp inhibitoros előkezelés hatására (**11.ábra B**) a kinidin plazma szintje kis mértékben nőtt, míg az agyi penetráció csökkent vagy változatlan maradt ($AUC_{\text{striatum}}/AUC_{\text{plazma}} = 0.036$). Az i.v. adott PSC-833 előkezelés a QND agyi disztribúcióját segítette elő ($AUC_{\text{striatum}}/AUC_{\text{plazma}} = 134.5$, **4.11.ábra C**), míg a mért plazmakoncentrációk közel nullára csökkentek.



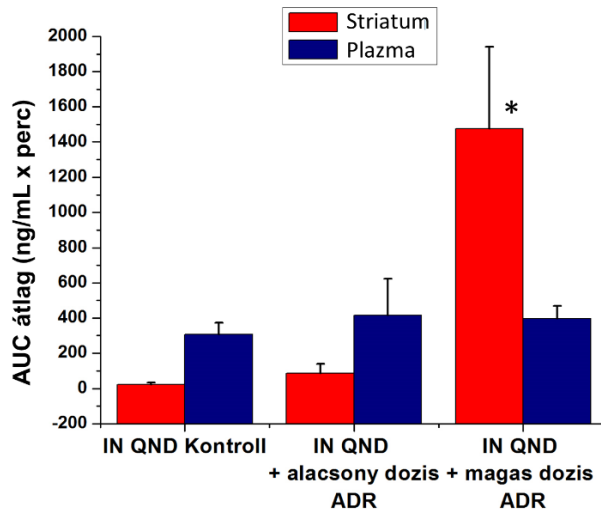
4.12. Ábra – Koncentráció-idő görbe alatti területek (AUC) összehasonlítása. Lokálisan adagolt gátlószer hatására (IN QND + IN PSC) nem tapasztalható lényeges változás a kinidin biohasznosulásában, a kontrollhoz (IN QND Kontroll) képest, míg a szisztémás kezelés szignifikáns modulációt okozott a kinidin disztribúciójában. ***: $p < 0.005$ vs kontroll csoport AUC_{STR} ; ++: $p < 0.01$ vs kontroll csoport AUC_{plazma} . (Az adatok analízise két mintás t-próbával történt, a feltüntetett adatok: átlag +/- standard hiba; $N=5$ /csoport.)

4.1.3. Intranazális kinidin agyi penetrációjának változása intranazális adrenalin jelenlétében

Az intranazális kinidin disztribúció vizsgálatának második felében, a nyálkahártyán keresztül történő felszívódás modulációja került középpontba. Az alacsony dózisban (50 ng) adott lokális adrenalin kezelés hatására csak a 30. percben vett mintában emelkedett meg az agyi kinidin koncentráció, míg a vérplazma kinidin tartalma a 60. perctől fokozatosan nőtt. (**4.13. ábra B**). Az emelt dózissal (20 µg) adrenalin mellett az agyi kinidin elérte az $AUC_{\text{striatum}} = 1475,385$ értéket, a kontroll 23,12 és az alacsony dózissal adrenalin kezelés 85,425 AUC_{striatum} értékéhez képest (**4.13. ábra C**). A vérplazmában itt is lassú, de fokozatos kinidin



4.13. Ábra - Intranazálisan adott kinidin (1 mg/állat) koncentráció-idő profiljának változása lokális adrenalin kezelés hatására. A kontroll (A), alacsony dózisu (50 ng) adrenalin (B) és magas dózisu (20 µg) adrenalin (C) együtt adása esetén. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ vs kontroll csoportban mért striatum kinidin koncentráció. (Az adatok analízise két mintás t-próbával történt, a feltüntetett adatok: átlag +/- standard hiba; N=5/csoport.)



4.14. Ábra – Koncentráció-idő görbe alatti területek (AUC) összehasonlítása. Alacsony dózisu adrenalin ko-adminisztráció hatására elhanyagolható az átlag görbe alatti területek változása, magas dózisu adrenalin esetén viszont az agyi kinidin koncentráció szignifikáns növekedést mutat a kontrollhoz képest, míg a vérplazmában közel azonos marad a szubsztrát mennyiség. ***: $p < 0.005$ vs kontroll csoport AUC_{STR} ; ++: $p < 0.01$ vs kontroll csoport AUC_{plazma} . (Az adatok analízise két mintás t-próbával történt, a feltüntetett adatok: átlag +/- standard hiba; N=5/csoport.)

szintemelkedés volt látható. A tapasztaltak alapján tehát az adrenalin 90-120 percig tartó hatása szignifikánsan megemeli a kinidin agyi eloszlását, de utána is a kontroll csoportban mérteknél magasabb szintek mutathatóak ki. Az alacsony dózisú adrenalin mellett a kinidin $AUC_{\text{striatum}}/AUC_{\text{plazma}}$ aránya 0,205, emelt dózis mellett ugyanez 3,7 volt.

5. MEGBESZÉLÉS

I. A disszertáció célkitűzései közül az első kérdés a természetes öregedés vér-agy gát funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata volt, kiegészítve a szerkezeti és a viselkedésre ható változások elemzésével. A vizsgálat fókuszában P-gp transzporter vér-agy gát funkcióra kifejtett változásai álltak, egy intravénásan adott P-gp szubsztrátnak, a kinidinnel az agyi és szisztémás keringésben való eloszlásának mérésével, mikrodialízis módszert alkalmazva. Emellett sor került a striatumban található gyulladáscitokin szint változások ELISA módszerrel való mérésére is, mellyel szintén az agyi öregedés jeleit kerestem. **[J1, J2, J3]; [P1-P4]; [C1-C3]**

II. A kutatásommal a P-gp transzporter modulációjának vizsgálatát is célul tűztem ki. A vizsgálatok intranazálisan adott kinidin alkalmazásával történtek. A moduláció intranazálisan, illetve intravénásan adott P-gp inhibitorral, illetve két különböző dózisban adott intranazális szimpatomimetikummal végeztem. **[J2, J4]; [P5, P6]; [C4]**

Eredmények értékelése

A természetes öregedés hatásai a vér-agy gátra

A kísérletek fiatal (2-4 hónapos) és koros (16-21 hónapos) hím Wistar patkányokon történtek. A mikrodialízis kísérletek során négy csoport vizsgálatára került sor: egy fiatal egyedekből álló PSC-833 kezelt csoport, egy idősebb állatokból álló PSC-833 kezelt csoport és mindkét korosztályból egy-egy kontroll csoport.

A kontroll csoportok összehasonlításából látható volt, hogy az idősebb állatokban magasabb volt a kinidin agyi koncentrációja és az eliminációs kinetika is lassabb volt. Az idősebb állatok lassabb metabolizmusa mutatkozott meg az AUC_{plazma} értékek közötti különbségben is, mely szintén hozzájárul az emelkedett kinidin-expozícióhoz. SPECT képalkotással végzett ^{99m}Tc -MIBI disztribúció vizsgálatának eredményei alátámasztották a mikrodialízis kísérletek eredményeit. Kimutatható, hogy az idősebb állat eliminációja lassabb / vér-agy gát átjárhatósága a központi idegrendszer felé nagyobb, mint a fiatalé, mely különbség a korrallal nő. Ez megerősíti a kinidin estén is tapasztalt, az öregedés során végbemenő P-gp

expresszió csökkenést és vér-agy gát átjárhatóság növekedést. Ez az eredmény biztosítja, hogy a vizsgált korcsoportok között értékelhető különbségek mérhetőek, annak ellenére, hogy az idős állatok között viszonylag széles korkülönbség van. Ennek oka, hogy bár a patkányok várható élettartama fogságban 2 év, egyes adatok szerint ez akár 30 hónap is lehet [203], a Wistar törzs egyedei közül pár idő előtt elpusztult, vagy állapota olyan súlyos volt, hogy el kellett altatni (daganat), vagy a kezelést nem élte túl.

A PSC-833 előkezeléskor az AUC_{STR} értékek alapján elmondható, hogy mind a fiatal ($p < 0.05$) mind pedig az idősebb korcsoportnál ($p < 0.005$) a kinidin agyi penetrációja szignifikánsan megnőtt. A P-gp inhibitor hatására ez az agyi koncentrációk közötti különbség a két korcsoportban közel kiegyenlítődött, a molekula agyi és perifériás eliminációjának kinetikája lelassult. Az előkezelés érdekes jelenségre mutatott rá: a PSC jelenlétében a fiatal patkányok agyában 7-szeresére nőtt a P-gp szubsztrát koncentráció a kontroll csoportéban mérthez képest, míg időseknél lényegesen kisebb (3,36x) emelkedés volt tapasztalható. Idősebb állatokon végzett tripla-szondás vizsgálatokkal lehetségessé vált az agykamrákban bekövetkező P-gp szubsztrát változását követni inhibitor jelenlétében és hiányában. Ez a vér-CSF gát vizsgálatát is lehetővé tette, ahol a P-gp transzporterek a vérből a CSF felé hajtják a szubsztrátjaikat [24], [25]. A jobb oldalkamrába ültetett harmadik szondából gyűjtött minták analízise alapján 2,03-szorosára nőtt az AUC_{LV}/AUC_{plazma} arány a PSC jelenlétében, míg AUC_{STR}/AUC_{plazma} arány 3,08-szorosára nőtt a kezelés hatására. Ez az eredmény megerősíti, hogy a központi idegrendszerben léteznek más mechanizmusok is, melyek képesek a kinidin transzportját elvégezni a P-gp gátlásakor is.

Az öregedés egyik általános jele a gyulladáshoz vezető markerek szisztémás felszaporodása, mely alól az agy sem kivétel. Kemilumineszcens ELISA citokin szint vizsgálatokkal ezt is sikerült bizonyítani. Az egyik statisztikailag szignifikáns szintemelkedés az SCF esetében tapasztalható, mely fiziológiásan a sérülések gyógyulását segíti elő, kóros esetben viszont, c-Kit ligand lévén, tumor kialakulásához vezető folyamatokra utalhat. Ez lehet egy magyarázat a mért eredményekre, de ennek kivizsgálásához boncolásra, utólag sajnos már nem volt lehetőségem, de a Wistar patkány törzsről ismert, hogy hajlamosak a neoplasiára [203]. A megnövekedett SCF szintre egyértelmű magyarázatot nem találtam. A másik szignifikáns szintemelkedés a Rantes esetében volt megfigyelhető. A Rantes szignifikáns expresszió-növekedését megfigyelték oxidatív stressz hatására normál mikroerekben (kontroll normál erekhez képest), valamint Alzheimer-kóros mikrovaszkulátúra tenyészetekben is (kontroll, öreg, de nem Alzheimer-kóros szövetekhez képest), melyet összefüggésbe hoztak neuroprotektív folyamatokkal is [204]. Emellett az idősebb állatok agyában megemelkedett $TNF\alpha$ és különböző proinflammatorikus interleukinek (1α , 1β és 6) szintje is, mely egy krónikusan fennálló gyulladásra engednek következtetni, ami idővel a vér-agy gát progresszív károsodását idézi elő.

A kiegészítő kísérletek segítettek alátámasztani az irodalomban is megtalálható strukturális változásokat vizsgált egyedeinkben [109], [111], [205], [206]. Az immunhisztokémiai vizsgálatok a P-gp expresszióban csökkenést mutattak az idősebb patkányokban, mely magyarázat lehet a vér-agy gát csökkent funkciójára a korosabb állatokban. A GFAP immunfestése a korosabb állatokban intenzívebb lett, melynek oka az asztrogliá sejt GFAP expressziójának megemelkedése és a sejtek nyúlványainak gyarapodása, ahogy ez az irodalmi adatokban is megtalálható [121], [206], [207]. Az elektronmikroszkópos felvételek nagymértékű, az öregedés folyamatához köthető ultrastrukturális elváltozásokat mutattak az agyi kapillárisokban, jól azonosíthatók a **1.2.1. Fejezetben** is áttekintett alkotó elemek és azok öregedés során történő elváltozásai. Az agy makroszkópikus elváltozásait MR képalkotással vizsgáltuk, amire elsősorban az idős állatok agyi koordinátáinak azonosítására volt szükség. Ezen vizsgálatok során az egyik idős állatnál jelentős agykamra tágulat volt megfigyelhető, mely normál nyomású hidrokefáliára jellemző [82]. A többi idős állatnál nem jelentkeztek hasonló tágulatok, az agy össztérfogata viszont kis mértékben nagyobb volt, mint a fiatalabb egyedekben, így a koordinátákat ennek megfelelően módosítottuk a striatális mikrodialízis szonda beültetésekor.

Vizsgálataim során kíváncsi voltam arra is, hogy a vér-agy gát öregedésével párhuzamosan az állatok viselkedésében, azaz kognitív funkcióiban milyen változások figyelhetők meg. Ehhez kétféle memória tesztet használtam. A térbeli memória vizsgálat Morris vízi útvesztő felhasználásával történt. Itt a fiatal és idős állatok hasonlóan teljesítettek, eltérés a két korcsoport között a rövidtávú tanulás minőségében volt, bár a különbség nem volt szignifikáns. A második teszt az új tárgy felismerési képesség vizsgálata volt. A tesztek eredménye alapján az idős és a fiatal állatok átlagosan arányaiban azonos időt töltöttek el az új és megszokott tárgy vizsgálatával, azaz nincs preferencia sem a megszokott, sem az új tárgy iránt. A jelentős különbség a két korcsoport között az explorációval töltött időben volt tapasztalható: az idősebb csoport három tagja a vizsgálati idő nagy részében mozdulatlan maradt (freezing), mely viselkedési mintát legtöbbször a szorongással hozzák összefüggésbe, de idős állatok esetében felmerülhet az apátia is, mint a demencia jele, azonban a kicsi állatszámából adódóan, biztos statisztikai értékelés nem állt rendelkezésemre. Érdeemes megjegyezni, hogy habár a Wistar törzs nem a legalkalmasabb a viselkedés vizsgálatokra, az összehasonlíthatóság érdekében ugyanazt a törzset kellett ehhez használni, mint amit a többi kísérlethez is.

Intranazális P-gp szubsztrát agyi penetrációjának modulációja

Az első nazális kísérletekben alkalmazott oldat ugyan eljutott az orrüreg caudalis területeire, ahogy azt az Evans-kék festés is mutatta, azonban a vizsgálat kivitelezésében számos probléma merült fel: 1) az oldat alacsony viszkozitása miatt fontos volt, hogy az állat a beadásakor a fejét kissé megemelve a hátán feküdjön, ugyanis így vált lehetővé, hogy az oldat az orrüreg hátsó felébe, a szaglóhámhoz jusson. Ezt követően kellett az állatot a sztereotaxikus készülékbe befogni, majd az agyi szondát beültetni, mely művelet 20-30 percet vett igénybe. 2) Az oldat volumene (a patkányok orrüregének mérete miatt) és 3) (a kinidin oldhatósága miatt) elérni kívánt koncentrációja erősen behatárolta a módszer alkalmazhatóságát. Kevesebb oldat beadásakor a P-gp szubsztrát alig érte el a tömegspektrometria mérésküszöbét, több oldat beadásakor a folyadék könnyen a légutakba került, mely mortalitáshoz vezetett.

A gél formulációval a felmerült problémák kiküszöbölhetővé váltak: viszkozitásából adódóan a kezelés hason fekvő (sztereotaxikus eszközbe helyezett) állaton is elvégezhető, a beadott anyag a nyálkahártya, illetve szaglóhám felszínén marad, csökkentve ezzel az anyag tüdőbe jutását, valamint elnyújtott felszívódást tesz lehetővé. A gél hidrofób anyagokat is képes oldani, így nem okozott gondot a megfelelő mennyiségű kinidin oldatba vitele.

A kontroll csoportmikrodialízis eredményei gyenge agyi és vénás disztribúciót mutattak, mely paramétereket az intranazális (lokális) P-gp inhibitor (PSC-833) előkezelés sem javított, sőt az $AUC_{\text{striatum}}/AUC_{\text{plazma}}$ arány a lokális gátlás esetén felére csökkent. A magyarázat ezekre az eredményekre az lehet, hogy alapesetben (amit a kontroll vizsgálatokon is láthatjuk) a P-gp transzporterek korlátozzák szubsztrátjaik szaglóhámon keresztül történő felszívódását. Lokális (epithél sejtek) P-gp gátlással a kinidin felszívódása a plazmába és agyba is megnövekszik [194]), ezeket azonban a vér-agy gát P-gp transzporterei eltávolítják az agyszövetből, mivel az intranazális inhibitorból nem jut el kellő mennyiségben ezekhez a fehérvérsejtekhez. Szisztémás P-gp inhibitor jelenlétében, a vér-agy gát P-gp transzporter működése is csökken, így az intranazális kinidin kellő mennyiségben szívódik fel a szaglóhámon keresztül, ráadásul az agyba bejutott szubsztrátot a vér-agy gát sem távolítja el a parenchimából. A szubsztrát vérplazma koncentrációja jelentősen lecsökkent, mely arra enged következtetni, hogy a gátlás hatással lehet a nyálkahártyán keresztül történő felszívódásra is. Az orrüreg epithél sejtek P-gp gátlása is okozhatja ezt az eredményt, valamint irodalmi adatok alapján elképzelhető a kiválasztó szervekben (vese és máj) való az akkumuláció is [208], [209].

A géles kezelőoldatba a kinidin mellé oldott adrenalin ($\alpha 1$ receptorokon hatva) összehúzza a légút nyálkahártyájának ereit, növelve a perifériás vaszkuláris rezisztenciát, ezáltal csökkenti a vérbe jutó kinidin mennyiségét és várhatóan több szubsztrát szívódik fel a szaglóhámon keresztül az agyba. Ezt a kapott eredmények igazolták is: az alacsony dózisban adott lokális adrenalin kezelés hatására rövid időre megemelkedett az agyi kinidin koncentráció, míg a vérplazma kinidin tartalma csak a későbbi időpontokban kezdett

emelkedni. Az emelt dózisu adrenalin mellett 400-szorosa lett a striatumban mért kinidin koncentráció az alacsony dózisu adrenalinnal kezelt csoporthoz képest, kiürülésének ideje meghaladta a 2 órát is. A vérplazma kinidin koncentrációja fokozatosan emelkedett, szintén a vér-agy gát transzporterjeinek folyamatos munkája által, de közvetlenül a nyálkahártyáról történő felszívódást az adrenalin sikeresen megakadályozta.

Új tudományos eredmények összegzése

I. Tézis

I.a. A kontroll csoportok összehasonlításából kimutattam, hogy a magasabb agyi kinidin koncentráció, nem csupán a megnövekedett vér-agy gát szivárgás, alacsonyabb P-gp működés, de az idősebb állatokban a lassabb eliminációs kinetika is közrejátszik.

I.b. A PSC jelenlétében a fiatal patkányok agyában 7-szeresére nőtt a P-gp szubsztrát koncentráció a kontroll csoportban mérthez képest, míg időseknél lényegesen kisebb (3,36x) emelkedést tapasztaltam.

I.c. Kemilumineszcens ELISA vizsgálatokkal sikerült bizonyítanom bizonyos gyulladáso markerek, főként az őssejt faktor (SCF) és a Rantes felszaporodását, idősebb patkányok striatumában.

II. Tézis

II.a. Szisztémás P-gp inhibitor alkalmazásával jelentősen sikerült megemelnem az intranazális kinidin agyi eloszlását, a kontroll csoportokban mérthez képest. A lokális gátlás ezzel szemben jelentős változást nem hozott. Ebből arra következtetésre jutottam, hogy alapesetben a szaglóhám epithél sejtjeinek P-gp transzporterei korlátozzák szubsztrátjaik szaglóhámön keresztül történő felszívódását, gátlásukkal viszont megemelhető a hatóanyag agyi eloszlása.

II.b. Lokális, magas dózisu (20 µg) adrenalin kezeléssel sikerült elérnem, hogy az intranazálisan bejuttatott hatóanyag ne a nyálkahártyán keresztül a véráramba, hanem a szaglóhám neuronjain keresztül a központi idegrendszerbe szívódjon fel. Ezzel megnöveltem az intranazális kinidin agyi eloszlásának effektivitását.

Eredmények hasznosíthatósága

A vér-agy gát kutatásának távlati célja, hogy megismerjük annak pontos működési mechanizmusát, és ezáltal képesek legyünk a barrier-rendszer rendellenességeit kezelni, illetve

a vér-agy gát modulációjával hatékonyabbá tegyük a központi idegrendszert célzó gyógyszereket.

Az első tézisben felsorolt eredmények a vér-agy gát, azon belül is fókuszban a P-gp transzporterek öregedésére adtak választ. A kapott adatok arra hívják fel a figyelmet, hogy míg az idősök agyi kapillárisainak barrier funkciója csökken (így nemkívánatos P-gp szubsztrát anyagok nagyobb mennyiségben juthatnak át a vér-agy gáton), a fiataloknál drasztikusabb hatást okozhat egy P-gp transzportereken történő gyógyszer interakció. A P-gp kémiai gátlásának azonban megvan az előnye is: a P-gp transzporter számos hatóanyag agyi penetrációját akadályozza meg, így a fehérje gátlásával növelhetjük a P-gp szubsztrát molekulák agyi disztribúcióját.

A második tézisben az intranazálisan adott P-gp szubsztrát segítségével fel tudtam térképezni különböző P-gp modulációs lehetőséget: amennyiben arra van szükség, hogy egy hatóanyagot a központi idegrendszerbe juttassunk, a nem kívánatos perifériás mellékhatások minimalizálásával, az intranazális útvonal egy jó gyógyszerbeviteli lehetőség. Az agy-vér arány javítható szisztémás P-gp gátlással, de a lokális inhibitorral nem. A lokális szimpatomimetikus kezelés szintén sikeres volt az intranazálisan adott hatóanyagok agyi disztribúciójának megemelésében. Az intranazális adrenalin lecsökkentette az ornyálkahártya kapillárisain keresztül történő felszívódást, ezáltal gyors és hatékony agyi disztribúciót biztosított az intranazális úton bevitt hatóanyagoknak.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Vidáné dr. Erdő Franciskának a lehetőségeket, melyeket munkám és tanulmányom során biztosított számomra, hogy gyarapíthassam tudásomat és tapasztalataimat ezen a tudományterületen, valamint kollégáimnak dr. Bajza Ágnesnek, kinek segítségével számos gyakorlati és technikai furfangot sajátíthattam el és Varga-Medveczky Zsófiának, az utolsó évben nyújtott segítségével. Továbbiakban szeretnék köszönetet mondani Kottra Péternek és Varga Barbarának a Természettudományi Kutatóközpont, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet állatházában nyújtott számolatlan segítségért.

Különösen nagy köszönettel tartozok minden együttműködőknek: dr. Szigeti Krisztiánnak, dr. Máthé Domokosnak (SPECT felvételek), Csorba Attilának, dr. Szabó Pálnak, dr. Imre Tímeának (HPLC-MS/MS bioanalízis), dr. Tóth Kingának, Tóth Estilla Zsófiának (elektronmikroszkópos és immunhisztokémiai felvételek), dr. Orsi Gergelynek, dr. Perlaki Gábornak és Hlatky Dávidnak (MRI felvételek), dr. Mándoki Mírának és Pop Renátának (hisztológiai metszeteket és festés), dr. Gyertyán Istvánnak és csoportjának (viselkedésvizsgálatok).

Köszönöm dr. Klemm Annának (ATRC Aurigon Kft.), hogy időt szánt rám a fehérje vizsgálatok megtanítására. Szeretném megköszönni a Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológia és Bionikai Karának Fehérjeszerkezeti és Proteomikai Kutatócsoportjának, hogy biztosították számomra a lemez leolvasó műszerek használatát.

Hálás vagyok külföldi együttműködőinknek: prof. Sveinbjörn Gizurarsonnak, az Izlandi Egyetem, Gyógyszertudományi Kar professzorának, hogy bemutatta az intranazális gyógyszeradagolás alapjait, dr. Claudia Matternnek (vezető kutató, M et P® Pharma, Emmetten, Svájc) a gél formulációt és prof. Joe Hustonnak és csoportjának, Benedetta Fazarinak és Cvetana Dechevanak (Heinrich Heine Egyetem Düsseldorf, Viselkedés Idegtudományi Központ, Kísérleti Pszichológia Intézet, Németország) az intranazális géles kezelés bemutatását és megtanítását.

Hatalmas köszönettel tartozok a Doktori és Habilitációs Iroda vezetőjének, dr. Vida Tivadarnének kimeríthetetlen türelméért és segítségéért, valamint a Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola volt és jelenlegi vezetőinek, dr. Szolgay Péternek és dr. Szederkényi Gábornak, hogy doktori tanulmányaimnak lehetőséget adtak. Szeretném megköszönni dr. Kellermayer Miklósnak (Simmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi Központ, Biofizika Intézet igazgatója), hogy alapképzésem során elindított a kutatás útján. Szeretném kifejezni köszönetemet minden olyan személynek, akik valamilyen formában segítségemre voltak eredményeim elérésében, akár az egyetemen, akár a TTK-n, vagy más kooperációs helyszínen.

Végül legnagyobb hálammal tartozok családomnak és barátaimnak mind a nehéz időszakok során nyújtott támaszért, mind pedig érdeklődő és biztató szavaikért, még ha olykor nem is fejeztem ki mennyit is érnek számomra.

Tézisekhez kapcsolódó publikációk

Folyóirat publikációk:

- [J1] L. A. Bors, K. Tóth, E. Zs. Tóth, Á. Bajza, A. Csorba, K. Szigeti, D. Máthé, G. Perlaki, G. Orsi, G. K. Tóth, F. Erdő, „Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats”, *Brain Research Bulletin*, 139 pp. 269-277., (2018)
- [J2] L. A. Bors, F. Erdő, “Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery” *Scientia Pharmaceutica* 87 : 1 p. 6 (2019)
- [J3] L. A. Bors, K. Tóth, E. Zs. Tóth, Á. Bajza, A. Csorba, K. Szigeti, D. Máthé, G. Perlaki, G. Orsi, G. K. Tóth, F. Erdő, „Corrigendum to "Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats", *Brain Research Bulletin* 155 pp. 211-212., (2020)
- [J4] L. A. Bors, Á. Bajza, M. Mándoki, B. J. Tasi, Gy. Cserey, T. Imre, P. Szabó, F. Erdő, „Modulation of nose-to-brain delivery of a P-glycoprotein (MDR1) substrate model drug (quinidine) in rats”, *Brain Research Bulletin* 160 pp. 65-73., (2020)

Konferencia posterek:

- [P1] L. A. Bors, Á. Bajza, B. Hutka, L. Dénes, K. Szigeti, N. Hegedűs, D. Szöllősi, D. Máthé, A. Csorba and F. Erdő

Investigation of the impact of aging on blood-brain barrier function in rats – Does P-glycoprotein (P-gp) have any role in changing BBB permeability?

10th SFB35 - Transmembrane Transporters in Health and Disease,

Bécs, Ausztria, 2017

- [P2] *Á. Bajza, L. A. Bors, B. Hutka, A. Csorba, D. Máthé, G. Orsi, G. Perlaki, K. Tóth and F. Erdő*
Investigation of the effect of aging on blood-brain barrier morphology and function in wistar rats

FENS Regional Meeting, Pécs, Magyarország, 2017

- [P3] *L. A. Bors, K. Tóth, Á. Bajza, E. Tóth, A. Csorba, D. Máthé, K. Szigeti, G. Perlaki, G. Orsi and F. Erdő*

Age-related changes in P-glycoprotein function at the blood-brain barrier - A comparative preclinical study

Meet the Experts Transporter Conference Budapest, Magyarország, 2018

- [P4] *L. A. Bors, Á. Bajza, K. Tóth, A. Csorba, K. Szigeti, D. Máthé, I. Gyertyán and Erdő F.*

In vivo model of the aging blood-brain barrier: observations of the functional and structural changes with multiple methods

FENS Regional meeting, Belgrád, Szerbia, 2019

- [P5] *L. A. Bors, F. Erdő*

How to deliver a p-gp substrate into the central nervous system? - Intranasal formulations of quinidin

4th Hungarian Neuroscience Meeting for Undergraduate Students, Graduate Students, and Junior Post-Docs (HuNDoC), Szeged, Magyarország, 2020

- [P6] *L. A. Bors, Á. Bajza, T. Imre, P. Szabó and F. Erdő*

Method development for investigation the blood-brain barrier permeability with intranasally administrated p-gp substrate

IBRO Workshop, Szeged, Magyarország, 2020

Konferencia publikációk:

- [C1] *L. A. Bors*

Investigation of age-related functional changes and membrane transporter interactions at the blood-brain barrier in rodents.

in **PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University** – 2017. G. Prószéky, P. Szolgay Eds. Budapest: Pázmány University ePress, 2017, pp 12

- [C2] *L. A. Bors*

Altered protection against xenobiotics in the aged brain? - Functional changes of P-glycoprotein at the blood brain barrier.

in **PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University** – 2018. G. Prószéky, P. Szolgay Eds. Budapest: Pázmány University ePress, 2018, pp 9

- [C3] *F. Erdő, K. Tóth, Á. Bajza, E. Tóth, A. Csorba, L. A. Bors, D. Máthé, G. Perlaki, G. Orsi, J. Molnár, I. Wilhelm, I. Gyertyán*, „Effect of healthy aging on blood-brain barrier morphology and function. Does it have any impact on the memory and the protein expression? A comparative study in aged and young rats.”
Annual Meeting of SFN, San Diego, USA, 2018

- [C4] *L. A. Bors*
Overcoming the blood-brain barrier by different intranasal formulations of quinidine, a P-gp model substrate.
in **PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University** – 2019. G. Prószéky, P. Szolgay Eds. Budapest: Pázmány University ePress, 2019, pp 11

Egyéb publikációk

1. F. Farner, L. A. Bors, Á. Bajza, G. Karvaly, I. Antal, F. Erdő, “Validation of an in vitro-in vivo assay system for evaluation of transdermal delivery of caffeine”, *Drug Delivery Letters* 9 : 1 pp. 15-20. , 6 p. (2019)
2. L. A. Bors, Á. Bajza, D. Kocsis, F. Erdő, Koffein: hagyományos és új terápiás indikációk, valamint felhasználás dermatológiai modellvegyületként, *Orvosi Hetilap* 159 : 10 pp. 384-390. , 7 p. (2018) [magyar]

Ábrajegyzék

Bevezetés

- 1.1 **Ábra** - A vér-agy gát felépítése.
- 1.2. **Ábra** - Agyi kapillárisokat alkotó endothél sejtek fontosabb transzporterjei és transzport folyamatai.
- 1.3. **Ábra** - P-gp (ABCB1) transzporter működésének mechanizmusa.
- 1.4. **Ábra** - Az endothél sejtek szoros és adherens kapcsolatai.
- 1.5. **Ábra** - Glikolalix fizikai barrier funkciója.
- 1.6. **Ábra** - Bazális membránt alkotó főbb elemek.
- 1.7. **Ábra** - Asztrociták és neuronok közötti anyagcsere folyamatok.
- 1.8. **Ábra** - Egészséges vér-agy gát alkotóelemei és struktúrája összehasonlítva az öregedéssel járó vér-agy gát változásokkal.
- 1.9. **Ábra** - Mikrodialízis szondával történő mintavétel illusztrációja.
- 1.10. **Ábra** - ELISA fehérjevizsgálat elméletét ábrázoló sematikus rajz.
- 1.11. **Ábra** - Intranazálisan bejuttatott anyagok útvonala az agyba.

Módszerek

- 3.1. **Ábra** - Dupla-szondás mikrodialízis vizsgálat sematikus felépítése.
- 3.2. **Ábra** - Folyamatábra az intranazálisan adott P-gp szubsztrát agyi penetrációjának mikrodialízis vizsgálatáról.
- 3.3. **Ábra** - Aliquotok elhelyezkedése a Kemilumineszcens ELISA vizsgálatához.

Eredmények

- 4.1. **Ábra** - Kinidin (QND) koncentráció-idő profilok a dializátum mintákban.
- 4.2. **Ábra** - Az agyi [99mTechnécium]-2-metoxi-izobutil-izonitril (MIBI) radioaktív jel arány (a 0-12. perc közötti mért radioaktivitáshoz mérve) ábrázolása az idő függvényében,
- 4.3. **Ábra** - SPECT felvételek az első és utolsó időpontban, fiatal kontroll, idős kontroll, fiatal PSC-833 előkezelt, valamint idős PSC-833 előkezelt állatokról.
- 4.4. **Ábra** - Agyi citokinszintek összehasonlítása fiatal és idős patkányokban.

- 4.5. Ábra** - MR felvételek koronális síkból fiatal, kitágult agykamrás idős és egészséges idős patkányok agyáról, valamint szagittális síkban fiatal és kitágult agykamrás idős állatokról, valamint axiális síkban fiatal és kitágult agykamrás idős állatokról.
- 4.6. Ábra** - Fény mikroszkópos felvételek a fiatal és idős állatok striatumáról.
- 4.7. Ábra** - Elektronmikroszkópos felvételek fiatal és idős patkányok agyi kapillárisairól kisebb és nagyobb arányú nagyítással.
- 4.8. Ábra** - Fiatal és idős állatok menekülési ideje a Morris-féle vizi útvesztő vizsgálat négy napján.
- 4.9. Ábra** - Az új tárgy felismerés vizsgálat eredményeinek összegzése.
- 4.10. Ábra** - Orrcseppbe oldott Evans-kék festékkel színezett orrüreg szövettani képei.
- 4.11. Ábra** - Intranazálisan adott kinidin koncentráció-idő profilja és annak változása PSC-833 előkezelés hatására.
- 4.12. Ábra** - Koncentráció-idő görbe alatti területek (AUC) összehasonlítása.
- 4.13. Ábra** - Intranazálisan adott kinidin koncentráció-idő profiljának változása lokális adrenalin kezelés hatására
- 4.14. Ábra** - Koncentráció-idő görbe alatti területek (AUC) összehasonlítása.

Táblázatjegyzék

Bevezetés

1.1. Táblázat - Az ELISA vizsgálat segítségével mért 16 különböző gyulladáshoz kapcsolódó citokin főbb funkcióit és rendellenességeit összefoglaló táblázat.

Módszerek

3.1. Táblázat - A mikrodialízis vizsgálatokban alkalmazott kezelőanyagok dózisa.

3.2. Táblázat - HPLC-MS/MS analitikák paraméterei.

Eredmények

4.1. Táblázat - Citokin vizsgálatokhoz felhasznált állatok, agyszövetek és aliquotok adatai.

4.2. Táblázat - Négy idős és négy fiatal patkány explorációs ideje és diszkriminációs indexe (DI) az új tárgy felismerés vizsgálat során.

Irodalomjegyzék

- [1] Y. Yamazaki and T. Kanekiyo, "Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of alzheimer's disease," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 9, 2017.
- [2] A. Montagne, Z. Zhao, and B. V. Zlokovic, "Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction?," *J. Exp. Med.*, vol. 214, no. 11, pp. 3151–3169, 2017.
- [3] A. R. Nelson, M. D. Sweeney, A. P. Sagare, and B. V. Zlokovic, "Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, no. 5, pp. 887–900, 2016.
- [4] F. Erdő, L. Denes, and E. De Lange, "Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 37, no. 1, pp. 4–24, 2017.
- [5] R. Cabezas *et al.*, "Astrocytic modulation of blood brain barrier: Perspectives on Parkinson's disease," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, no. AUG, 2014.
- [6] M. T. Gray and J. M. Woulfe, "Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 35, no. 5, pp. 747–750, 2015.
- [7] F. Erdo and P. Krajcsi, "Age-related functional and expressional changes in efflux pathways at the blood-brain barrier," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 11, pp. 1–8, 2019.
- [8] E. Pintér and L. Barthó, "A szervezet és a gyógyszerek kölcsönhatásait módosító tényezők," in *A farmakológia alapjai*, K. Gyires and Z. Fürst, Eds. Medicina, 2011.
- [9] S. A. F. Morad *et al.*, "Role of P-glycoprotein inhibitors in ceramide-based therapeutics for treatment of cancer," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 130, pp. 21–33, 2017.
- [10] A. Klukovits and P. Krajcsi, "Mechanisms and therapeutic potential of inhibiting drug efflux transporters," *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 11, no. 6, pp. 907–920, 2015.
- [11] F. Haddad, M. Sawalha, Y. Khawaja, A. Najjar, and R. Karaman, "Dopamine and levodopa prodrugs for the treatment of Parkinson's disease," *Molecules*, vol. 23, no. 1, 2018.
- [12] T. Wanek, S. Mairinger, and O. Langer, "Radioligands targeting P-glycoprotein and other drug efflux proteins at the blood-brain barrier," *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2013.
- [13] J. C. Kalvass *et al.*, "Why clinical modulation of efflux transport at the human blood-brain barrier is unlikely: The ITC evidence-based position," *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2013.
- [14] WHO, "World Report on Aging and Health," 2015.
- [15] United Nation, "World Population Ageing 2019 Highlights," United Nations, New York, 2019.
- [16] L. A. Bors and F. Erdő, "Overcoming the blood-brain barrier. Challenges and tricks for CNS drug delivery," *Sci. Pharm.*, vol. 87, pp. 1–28, 2019.
- [17] T. Worzfeld and M. Schwaninger, "Apicobasal polarity of brain endothelial cells," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 36, no. 2, pp. 340–362, 2016.
- [18] A. L. Betz, J. A. Firth, and G. W. Goldstein, "Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells," *Brain Res.*, vol. 192, no. 1, pp. 17–28, 1980.
- [19] A. W. Vorbrodt and D. H. Dobrogowska, "Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: Electron microscopist's view," *Brain Res. Rev.*, vol. 42, no. 3, pp. 221–242, 2003.
- [20] M. E. Morris, V. Rodriguez-Cruz, and M. A. Felmler, "SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers," *AAPS J.*, vol. 19, no. 5, pp. 1317–1331, 2017.
- [21] J. Badaut, F. Lasbennes, P. J. Magistretti, and L. Regli, "Aquaporins in brain: Distribution, physiology, and pathophysiology," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 22, no. 4, pp. 367–378, 2002.
- [22] V. M. Pulgar, "Transcytosis to cross the blood brain barrier, new advancements and challenges," *Front. Neurosci.*, vol. 13, no. JAN, 2019.
- [23] H. Potschka, "Modulating P-glycoprotein regulation: Future perspectives for pharmacoresistant epilepsies?," *Epilepsia*, vol. 51, no. 8, pp. 1333–1347, 2010.
- [24] J. Shen *et al.*, "Compartment-specific roles of ATP-binding cassette transporters define differential topotecan distribution in brain parenchyma and cerebrospinal fluid," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 14, pp. 5885–5892, 2009.
- [25] P. Krajcsi *et al.*, "Efflux transporters in the bloodbrain interfaces in vitro and in vivo methods and correlations," *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 8, no. 4, pp. 419–431, 2012.
- [26] K. K. Kandimalla and M. D. Donovan, "Carrier mediated transport of chlorpheniramine and chlorcyclizine across bovine olfactory mucosa: Implications on nose-to-brain transport," *J.*

- Pharm. Sci.*, vol. 94, no. 3, pp. 613–624, 2005.
- [27] M. M. Miyake, A. Nocera, and M. M. Miyake, “P-glycoprotein and chronic rhinosinusitis,” *World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 4, no. 3, pp. 169–174, 2018.
- [28] G. L. Scheffer *et al.*, “Multidrug resistance related molecules in human and murine lung,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 55, no. 5, pp. 332–339, 2002.
- [29] M. Al-Ghabeish, T. Scheetz, M. Assem, and M. D. Donovan, “Microarray Determination of the Expression of Drug Transporters in Humans and Animal Species Used for the Investigation of Nasal Absorption,” *Mol. Pharm.*, vol. 12, no. 8, pp. 2742–2754, 2015.
- [30] Y. Tanigawara, “Role of P-glycoprotein in drug disposition,” *Ther. Drug Monit.*, vol. 22, no. 1, pp. 137–140, 2000.
- [31] F. J. Sharom, “Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: Its role in modulating protein function,” *Front. Oncol.*, 2014.
- [32] W. H. Oldendorf, M. E. Cornford, and W. J. Brown, “The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat,” *Ann. Neurol.*, vol. 1, no. 5, pp. 409–417, 1977.
- [33] P. Grammas, J. Martinez, and B. Miller, “Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases,” *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 13, 2011.
- [34] Y. Takakura, K. L. Audus, and R. T. Borchardt, “Blood—Brain Barrier: Transport Studies in Isolated Brain Capillaries and in Cultured Brain Endothelial Cells,” *Adv. Pharmacol.*, vol. 22, pp. 137–165, 1991.
- [35] J. Fenstermacher, P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, S. Pettersen, and K. Gruber, “Structural and Functional Variations in Capillary Systems within the Brain,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 529, pp. 21–30, 1988.
- [36] K. Morita, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita, “Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells,” *J. Cell Biol.*, vol. 147, no. 1, pp. 185–194, 1999.
- [37] T. Nitta *et al.*, “Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice,” *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 3, pp. 653–660, 2003.
- [38] R. Daneman, L. Zhou, D. Agalliu, J. D. Cahoy, A. Kaushal, and B. A. Barres, “The mouse blood-brain barrier transcriptome: A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells,” *PLoS One*, vol. 5, no. 10, 2010.
- [39] M. Saitou *et al.*, “Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 12, pp. 4131–4142, 2000.
- [40] M. Furuse, “Molecular basis of the core structure of tight junctions,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 1, 2010.
- [41] J. Miyoshi and Y. Takai, “Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, no. 3, pp. 670–691, 2008.
- [42] K. Mandai *et al.*, “Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction,” *J. Cell Biol.*, vol. 139, no. 2, pp. 517–528, 1997.
- [43] Y. Luo and G. L. Radice, “N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis,” *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 1, pp. 29–34, 2005.
- [44] A. R. Santa-Maria *et al.*, “Lidocaine turns the surface charge of biological membranes more positive and changes the permeability of blood-brain barrier culture models,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1861, no. 9, pp. 1579–1591, 2019.
- [45] T. E. Woodcock and T. M. Woodcock, “Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: An improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy,” *Br. J. Anaesth.*, 2012.
- [46] A. Wiesinger *et al.*, “Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, 2013.
- [47] D. Chappell *et al.*, “Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx,” *Biol. Chem.*, vol. 389, no. 1, pp. 79–82, 2008.
- [48] R. Moseley, R. J. Waddington, and G. Embery, “Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1362, no. 2–3, pp. 221–231, 1997.
- [49] H. H. Lipowsky and A. Lescanic, “The effect of doxycycline on shedding of the glycocalyx due to reactive oxygen species,” *Microvasc. Res.*, vol. 90, pp. 80–85, 2013.
- [50] C. S. Barros, S. J. Franco, and U. Müller, “Extracellular Matrix: Functions in the nervous system,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–24, 2011.
- [51] D. N. Edwards and G. J. Bix, “Roles of blood-brain barrier integrins and extracellular matrix in

- stroke,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 316, no. 2, pp. C252–C263, 2019.
- [52] J. K. Kular, S. Basu, and R. I. Sharma, “The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering,” *J. Tissue Eng.*, vol. 5, 2014.
- [53] M. D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne, A. R. Nelson, and B. V. Zlokovic, “Blood-brain barrier: From physiology to disease and back,” *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 1, pp. 21–78, 2019.
- [54] U. Novak and A. H. Kaye, “Extracellular matrix and the brain: Components and function,” *J. Clin. Neurosci.*, vol. 7, no. 4, pp. 280–290, 2000.
- [55] R. Milner and I. L. Campbell, “Increased expression of the β 4 and α 5 integrin subunits in cerebral blood vessels of transgenic mice chronically producing the pro-inflammatory cytokines IL-6 or IFN- α in the central nervous system,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 33, no. 4, pp. 429–440, 2006.
- [56] K. Kangwantas, E. Pinteaux, and J. Penny, “The extracellular matrix protein laminin-10 promotes blood-brain barrier repair after hypoxia and inflammation in vitro,” *J. Neuroinflammation*, vol. 13, no. 1, 2016.
- [57] R. Pankov and K. M. Yamada, “Fibronectin at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. 20, pp. 3861–3863, 2002.
- [58] M. Mongiat, E. Andreuzzi, G. Tarticchio, and A. Paulitti, “Extracellular matrix, a hard player in angiogenesis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 11, 2016.
- [59] E. L. George, E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, and R. O. Hynes, “Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin,” *Development*, vol. 119, no. 4, pp. 1079–1091, 1993.
- [60] S. M. Knox and J. M. Whitelock, “Perlecan: How does one molecule do so many things?,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 21, pp. 2435–2445, 2006.
- [61] J. M. Whitelock, J. Melrose, and R. V. Iozzo, “Diverse cell signaling events modulated by Perlecan,” *Biochemistry*, vol. 47, no. 43, pp. 11174–11183, 2008.
- [62] Z. Zhou *et al.*, “Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in Perlecan heparan sulfate-deficient mice,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 14, pp. 4699–4702, 2004.
- [63] E. Vuorio and B. De Crombrughe, “The Family of Collagen Genes,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 59, no. 1, pp. 837–872, 1990.
- [64] M. G. Patino, M. E. Neiders, S. Andreana, B. Noble, and R. E. Cohen, “Collagen: An Overview,” *Implant Dent.*, vol. 11, no. 3, pp. 280–285, 2002.
- [65] J. M. B. Sand, F. Genovese, and M. A. Karsdal, “Type IV Collagen,” in *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers*, 2016, pp. 31–41.
- [66] M. Bélanger, I. Allaman, and P. J. Magistretti, “Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738, 2011.
- [67] C. Howarth, “The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow,” *Front. Neurosci.*, no. 8 MAY, 2014.
- [68] R. C. Roberts, J. K. Roche, and R. E. McCullumsmith, “Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: A light and electron microscopic study,” *Neuroscience*, vol. 277, pp. 522–540, 2014.
- [69] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, “Astrocytes: Biology and pathology,” *Acta Neuropathol.*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, 2010.
- [70] C. Y. Liu, Y. Yang, W. N. Ju, X. Wang, and H. L. Zhang, “Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of alzheimer’s disease,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, 2018.
- [71] T. M. Mathiisen, K. P. Lehre, N. C. Danbolt, and O. P. Ottersen, “The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction,” *Glia*, vol. 58, no. 9, pp. 1094–1103, 2010.
- [72] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, “Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, 2006.
- [73] A. Armulik *et al.*, “Pericytes regulate the blood-brain barrier,” *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 557–561, 2010.
- [74] M. D. Sweeney, S. Ayyadurai, and B. V. Zlokovic, “Pericytes of the neurovascular unit: Key functions and signaling pathways,” *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 6, pp. 771–783, 2016.
- [75] J. Keane and M. Campbell, “The dynamic blood-brain barrier,” *FEBS J.*, vol. 282, no. 21, pp. 4067–4079, 2015.
- [76] Y. Yao, Z. L. Chen, E. H. Norris, and S. Strickland, “Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity,” *Nat. Commun.*, vol. 5, 2014.
- [77] N. Dudvarski Stankovic, M. Teodorczyk, R. Ploen, F. Zipp, and M. H. H. Schmidt, “Microglia–

- blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies,” *Acta Neuropathol.*, vol. 131, no. 3, pp. 347–363, 2016.
- [78] F. Ginhoux *et al.*, “Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages,” *Science (80-.)*, vol. 330, no. 6005, pp. 841–845, 2010.
- [79] A. Aguzzi, B. A. Barres, and M. L. Bennett, “Microglia: Scapegoat, saboteur, or something else?,” *Science (80-.)*, vol. 339, no. 6116, pp. 156–161, 2013.
- [80] K. Cosby *et al.*, “Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation,” *Nat. Med.*, vol. 9, no. 12, pp. 1498–1505, 2003.
- [81] H. H. Dietrich, M. L. Ellsworth, R. S. Sprague, and R. G. Dacey, “Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate,” *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 278, no. 4 47-4, 2000.
- [82] J. Hamar, “Az idegrendszer vérkeringésének szabályozása és kölcsönhatások.” in *Emberi életfolyamatok idegi szabályozása – a neurontól a viselkedésig. Interdiszciplináris tananyag az idegtudományok felépítéséről, működéséről és klinikuma témáiban orvostanhallgatók, egészség- és élettudományi képzésben résztvevők számára Magyarországon*, V. Csernus, J. Kállai, S. Komoly, and H. Ábrahám, Eds. Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016, pp. 1518–1527.
- [83] Z. Cohen, G. Molinatti, and E. Hamel, “Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 17, no. 8, pp. 894–904, 1997.
- [84] E. Vaucher and E. Hamel, “Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: Electron microscopic study with anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry,” *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 11, pp. 7427–7441, 1995.
- [85] Z. V. I. Cohen, G. Bonvento, P. Lacombe, and E. Hamel, “Serotonin in the regulation of brain microcirculation,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 50, no. 4, pp. 335–362, 1996.
- [86] E. Vaucher, X. K. Tong, N. Cholet, S. Lantin, and E. Hamel, “GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: A means for direct regulation of local cerebral blood flow,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 421, no. 2, pp. 161–171, 2000.
- [87] L. W. Swanson, M. A. Connelly, and B. K. Hartman, “Ultrastructural evidence for central monoaminergic innervation of blood vessels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus,” *Brain Res.*, vol. 136, no. 1, pp. 166–173, 1977.
- [88] F. Bacic, R. M. McCarron, S. Uematsu, and M. Spatz, “Adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human cerebromicrovascular endothelium,” *Metab. Brain Dis.*, vol. 7, no. 3, pp. 125–137, 1992.
- [89] B. Wroblewska, M. Spatz, N. Merkel, and J. Bembry, “Cerebrovascular smooth muscle culture II. Characterization of adrenergic receptors linked to adenylate cyclase,” *Life Sci.*, vol. 34, no. 8, pp. 783–791, 1984.
- [90] J. A. Nathanson and G. H. Glaser, “Identification of β -Adrenergic-Sensitive adenylate cyclase in intracranial blood vessels,” *Nature*, vol. 278, no. 5704, pp. 567–569, 1979.
- [91] A. Chédotal, D. Umbriaco, L. Descaries, B. K. Hartman, and E. Hamel, “Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the neurovascular relationships of choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide nerve terminals in the rat cerebral cortex,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 343, no. 1, pp. 57–71, 1994.
- [92] A. Varatharaj and I. Galea, “The blood-brain barrier in systemic inflammation,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 60, pp. 1–12, 2017.
- [93] H. E. De Vries, M. C. M. Blom-Roosemalen, A. G. De Boer, T. J. C. Van Berkel, D. D. Breimer, and J. Kuiper, “Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 277, no. 3, pp. 1418–1423, 1996.
- [94] D. Wong, K. Dorovini-Zis, and S. R. Vincent, “Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier,” *Exp. Neurol.*, vol. 190, no. 2, pp. 446–455, 2004.
- [95] L. H. Qin, W. Huang, X. A. Mo, Y. L. Chen, and X. H. Wu, “LPS induces occludin dysregulation in cerebral microvascular endothelial cells via MAPK signaling and augmenting mmp-2 levels,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, 2015.
- [96] H. Y. Yu, Y. B. Cai, and Z. Liu, “Activation of AMPK improves lipopolysaccharide-induced dysfunction of the blood-brain barrier in mice,” *Brain Inj.*, vol. 29, no. 6, pp. 777–784, 2015.
- [97] F. He *et al.*, “RhoA and NF- κ B are involved in lipopolysaccharide-induced brain microvascular cell line hyperpermeability,” *Neuroscience*, vol. 188, pp. 35–47, 2011.
- [98] T. Zhou *et al.*, “Blood-brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapsone,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 453, no. 3, pp. 419–424, 2014.

- [99] D. Han *et al.*, “Clematichinenoside protects blood brain barrier against ischemic stroke superimposed on systemic inflammatory challenges through up-regulating A20,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 51, pp. 56–69, 2016.
- [100] F. L. Cardoso *et al.*, “Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, 2012.
- [101] L. Claudio, Y. Kress, W. T. Norton, and C. F. Brosnan, “Increased vesicular transport and decreased mitochondrial content in blood-brain barrier endothelial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Am. J. Pathol.*, vol. 135, no. 6, pp. 1157–1168, 1989.
- [102] A. Ben-Zvi *et al.*, “Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier,” *Nature*, vol. 509, no. 7501, pp. 507–511, 2014.
- [103] J. L. Zamanian *et al.*, “Genomic analysis of reactive astrogliosis,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 18, pp. 6391–6410, 2012.
- [104] M. V. Sofroniew, “Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 16, no. 5, pp. 249–263, 2015.
- [105] S. Biesmans *et al.*, “Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, 2013.
- [106] F. L. Cardoso *et al.*, “Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects,” *J. Neuroinflammation*, vol. 12, no. 1, 2015.
- [107] L. Fan, T. Wang, L. Chang, Y. Song, Y. Wu, and D. Ma, “Systemic inflammation induces a profound long term brain cell injury in rats,” *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*, vol. 74, no. 3, pp. 298–306, 2014.
- [108] C. A. Knox, R. D. Yates, I. li Chen, and P. M. Klara, “Effects of aging on the structural and permeability characteristics of cerebrovasculature in normotensive and hypertensive strains of rats,” *Acta Neuropathol.*, vol. 51, no. 1, pp. 1–13, 1980.
- [109] M. A. Peinado *et al.*, “Quantitative and ultrastructural changes in gila and pericytes in the parietal cortex of the aging rat,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 43, no. 1, pp. 34–42, 1998.
- [110] A. Peters, K. Josephson, and S. L. Vincent, “Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex,” *Anat. Rec.*, vol. 229, no. 3, pp. 384–398, 1991.
- [111] J. Tigges, J. G. Herndon, and D. L. Rosene, “Mild age-related changes in the dentate gyrus of adult rhesus monkeys,” *Cells Tissues Organs*, vol. 153, no. 1, pp. 39–48, 1995.
- [112] P. Hicks, C. Rolsten, D. Brizzee, and T. Samorajski, “Age-related changes in rat brain capillaries,” *Neurobiol. Aging*, vol. 4, no. 1, pp. 69–75, 1983.
- [113] P. Lindahl, B. R. Johansson, P. Levéen, and C. Betsholtz, “Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice,” *Science (80-.)*, vol. 277, no. 5323, pp. 242–245, 1997.
- [114] L. E. Benjamin, I. Hemo, and E. Keshet, “A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF,” *Development*, vol. 125, no. 9, pp. 1591–1598, 1998.
- [115] H. Guo *et al.*, “MRI assessment of whole-brain structural changes in aging,” *Clin. Interv. Aging*, vol. 12, pp. 1251–1270, 2017.
- [116] R. D. Bell and B. V. Zlokovic, “Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer’s disease,” *Acta Neuropathol.*, vol. 118, no. 1, pp. 103–113, 2009.
- [117] H. S. Sharma, R. J. Castellani, M. A. Smith, and A. Sharma, “The Blood-Brain Barrier in Alzheimer’s Disease. Novel Therapeutic Targets and Nanodrug delivery.,” in *International Review of Neurobiology*, vol. 102, 2012, pp. 47–90.
- [118] S. Vogelgesang, G. Jedlitschky, A. Brenn, and L. C. Walker, “The Role of the ATP-Binding Cassette Transporter P-Glycoprotein in the Transport of β -Amyloid Across the Blood-Brain Barrier,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 17, no. 26, pp. 2778–2786, 2012.
- [119] R. Toornvliet *et al.*, “Effect of age on functional P-glycoprotein in the blood-brain barrier measured by use of (R)-[11C]verapamil and positron emission tomography,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 79, no. 6, pp. 540–548, 2006.
- [120] D. Kuhnke *et al.*, “MDR1-P-glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer’s amyloid- β peptides - Implications for the mechanisms of A β clearance at the blood-brain barrier,” *Brain Pathol.*, vol. 17, no. 4, pp. 347–353, 2007.
- [121] G. D. Silverberg *et al.*, “Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 69, no. 10, pp. 1034–1043, 2010.
- [122] H. Volk, H. Potschka, and W. Löscher, “Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 53, no. 4, pp. 517–531, 2005.
- [123] L. Grand *et al.*, “Short and long term biocompatibility of NeuroProbes silicon probes,” *J.*

- Neurosci. Methods*, vol. 189, no. 2, pp. 216–229, 2010.
- [124] M. Hammarlund-Udenaes, E. C. M. de Lange, and R. G. Thorne, *Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*, vol. 10, 2014.
- [125] P. Kannan *et al.*, “Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: Pharmacokinetics and in vivo applications,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 86, no. 4, pp. 368–377, 2009.
- [126] S. X. Leng, J. E. McElhaney, J. D. Walston, D. Xie, N. S. Fedarko, and G. A. Kuchel, “ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research,” *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 63, no. 8, pp. 879–884, 2008.
- [127] A. Erdei, G. Sármay, and J. Prechl, *Immunológia*. 2012.
- [128] A. Malik and T. D. Kanneganti, “Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer,” *Immunol. Rev.*, vol. 281, no. 1, pp. 124–137, 2018.
- [129] A. Mishra, L. Sullivan, and M. A. Caligiuri, “Molecular pathways: Interleukin-15 signaling in health and in cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 2044–2050, 2014.
- [130] J. Lennartsson and L. Rönnstrand, “Stem cell factor receptor/c-Kit: From basic Science to clinical implications,” *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 4, pp. 1619–1649, 2012.
- [131] H. T. Idriss and J. H. Naismith, “TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s),” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 50, no. 3, pp. 184–195, 2000.
- [132] L. F. Lue *et al.*, “Inflammatory repertoire of Alzheimer’s disease and nondemented elderly microglia in vitro,” *Glia*, vol. 35, no. 1, pp. 72–79, 2001.
- [133] R. Paganelli *et al.*, “Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: Levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer’s disease patients,” *Exp. Gerontol.*, vol. 37, no. 2–3, pp. 257–263, 2002.
- [134] J. W. Shim and J. R. Madsen, “VEGF signaling in neurological disorders,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1, 2018.
- [135] M. E. Woodbury and T. Ikezu, “Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration,” *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2014.
- [136] J. Zhang, “Yin and yang interplay of IFN- γ in inflammation and autoimmune disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 4, pp. 871–873, 2007.
- [137] G. M. Lord, “Leptin as a proinflammatory cytokine,” *Contrib. Nephrol.*, vol. 151, pp. 151–164, 2006.
- [138] S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya, “Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview,” *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 29, no. 6, pp. 313–325, 2009.
- [139] T. Baba and N. Mukaida, “Role of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α /CCL3 in leukemogenesis,” *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 1, no. 1, 2014.
- [140] S. S. Kang *et al.*, “Microglial translational profiling reveals a convergent APOE pathway from aging, amyloid, and tau,” *J. Exp. Med.*, vol. 215, no. 9, pp. 2235–2245, 2018.
- [141] R. M. Barrientos *et al.*, “Time course of hippocampal IL-1 β and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 23, no. 1, pp. 46–54, 2009.
- [142] D. E. Griffin, “Cytokines and Chemokines,” in *Encyclopedia of Virology*, 2008, pp. 620–624.
- [143] C. A. Hunter and S. A. Jones, “IL-6 as a keystone cytokine in health and disease,” *Nature Immunology*. 2015.
- [144] D. Michlmayr and C. S. McKimmie, “Role of CXCL10 in central nervous system inflammation,” *Int. J. Interf. Cytokine Mediat. Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–18, 2014.
- [145] R. L. Rabin, “CC, C, and CX3C Chemokines,” in *Encyclopedia of Hormones*, H. L. Henry and A. W. Norman, Eds. 2003, pp. 255–263.
- [146] L. E. Smythies *et al.*, “Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity,” *J. Clin. Invest.*, 2005.
- [147] Y. P. Ma *et al.*, “Intranasally delivered TGF- β 1 enters brain and regulates gene expressions of its receptors in rats,” *Brain Res. Bull.*, vol. 74, no. 4, pp. 271–277, 2007.
- [148] L. Kubiczikova, L. Sedlarikova, R. Hajek, and S. Sevcikova, “TGF- β - an excellent servant but a bad master,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 10, no. 1, 2012.
- [149] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [150] M. E. Woodbury and T. Ikezu, “Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration,” *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 9, no. 2, pp. 92–101, 2014.
- [151] O. Campuzano, M. M. Castillo-Ruiz, L. Acarin, B. Castellano, and B. Gonzalez, “Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 87, no. 11, pp. 2484–2497, 2009.
- [152] X. Wang and Y. Lin, “Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?,” *Acta Pharmacol.*

- Sin.*, vol. 29, no. 11, pp. 1275–1288, 2008.
- [153] S. Komoly, *Gyakorlati neurológia és neuroanatómia: egyetemi tankönyv*. Pécs: Medicina, 2018.
- [154] R. F. Keep, N. Zhou, J. Xiang, A. V. Andjelkovic, Y. Hua, and G. Xi, “Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 11, no. 1, 2014.
- [155] L. Hao *et al.*, “Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates blood-brain barrier damage induced by hypoxia through modulation of tight junction proteins in an in vitro model,” *Croat. Med. J.*, vol. 57, no. 1, pp. 51–57, 2016.
- [156] M. Krueger, W. Härtig, A. Reichenbach, I. Bechmann, and D. Michalski, “Blood-Brain Barrier Breakdown after Embolic Stroke in Rats Occurs without Ultrastructural Evidence for Disrupting Tight Junctions,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013.
- [157] T. Nakagomi *et al.*, “Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells,” *Stem Cells*, vol. 33, no. 6, pp. 1962–1974, 2015.
- [158] R. D. Bell *et al.*, “Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging,” *Neuron*, vol. 68, no. 3, pp. 409–427, 2010.
- [159] C. N. Hall *et al.*, “Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease,” *Nature*, vol. 508, no. 7494, pp. 55–60, 2014.
- [160] J. Xiang, Y. Tang, C. Li, E. J. Su, D. A. Lawrence, and R. F. Keep, “Mechanisms underlying astrocyte endfeet swelling in stroke,” in *Acta Neurochirurgica, Supplementum*, vol. 121, 2016, pp. 19–22.
- [161] N. C. Chisholm and F. Sohrabji, “Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 85, pp. 245–253, 2016.
- [162] A. Kapasi and J. A. Schneider, “Vascular contributions to cognitive impairment, clinical Alzheimer’s disease, and dementia in older persons,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, no. 5, pp. 878–886, 2016.
- [163] Z. Kang *et al.*, “Article of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis,” *Immunity*, vol. 1, pp. 1–12, 2010.
- [164] E. Zenaro, G. Piacentino, and G. Constantin, “The blood-brain barrier in Alzheimer’s disease,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 107, pp. 41–56, 2017.
- [165] V. Brochard *et al.*, “Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 1, pp. 182–192, 2009.
- [166] P. M. Carvey *et al.*, “6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 22, no. 5, pp. 1158–1168, 2005.
- [167] R. Kortekaas *et al.*, “Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo,” *Ann. Neurol.*, vol. 57, no. 2, pp. 176–179, 2005.
- [168] C. Funke, A. S. Soehn, J. Tomiuk, O. Riess, and D. Berg, “Genetic analysis of coding SNPs in blood-brain barrier transporter MDR1 in European Parkinson’s disease patients,” *J. Neural Transm.*, vol. 116, no. 4, pp. 443–450, 2009.
- [169] M. J. Fabis, G. S. Scott, R. B. Kean, H. Koprowski, and D. C. Hooper, “Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 13, pp. 5656–5661, 2007.
- [170] H. Wolburg *et al.*, “Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme,” *Acta Neuropathol.*, vol. 105, no. 6, pp. 586–92, 2003.
- [171] A. A. Boyko, N. I. Troyanova, E. I. Kovalenko, and A. M. Sapozhnikov, “Similarity and differences in inflammation-related characteristics of the peripheral immune system of patients with Parkinson’s and Alzheimer’s diseases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 12, 2017.
- [172] K. M. Mahar Doan *et al.*, “Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 303, no. 3, pp. 1029–1037, 2002.
- [173] E. I. Williams, R. D. Betterton, T. P. Davis, and P. T. Ronaldson, “Transporter-mediated delivery of small molecule drugs to the brain: A critical mechanism that can advance therapeutic development for ischemic stroke,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 2, 2020.
- [174] J. Rautio, M. Gynther, and K. Laine, “LAT1-mediated prodrug uptake: A way to breach the blood-brain barrier?,” *Ther. Deliv.*, vol. 4, no. 3, pp. 281–284, 2013.
- [175] T. P. Crowe, M. H. W. Greenlee, A. G. Kanthasamy, and W. H. Hsu, “Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain,” *Life Sci.*, vol. 195, pp. 44–52, 2018.

- [176] R. G. Thorne, G. J. Pronk, V. Padmanabhan, and W. H. Frey, "Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration," *Neuroscience*, vol. 127, no. 2, pp. 481–496, 2004.
- [177] R. Kälviäinen, "Intranasal therapies for acute seizures," *Epilepsy Behav.*, vol. 49, pp. 303–306, 2015.
- [178] V. M. Gebhart, A. Rodewald, E. Wollbaum, K. Hertel, T. Bitter, and G. F. Jirikowski, "Evidence for accessory chemosensory cells in the adult human nasal cavity," *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 104, 2020.
- [179] S. Takami, "Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 58, no. 3, pp. 228–250, 2002.
- [180] L. Illum, "Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions," *J. Control. Release*, vol. 87, no. 1–3, pp. 187–198, 2003.
- [181] L. Illum, "Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–18, 2000.
- [182] S. V. Dhuria, L. R. Hanson, and W. H. Frey, "Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations," *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 4, pp. 1654–1673, 2010.
- [183] M. Dahlin, B. Jansson, and E. Björk, "Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 75–80, 2001.
- [184] A. L. Wang *et al.*, "Intra-nasal dopamine alleviates cognitive deficits in tgDISC1 rats which overexpress the human DISC1 gene," *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 146, pp. 12–20, 2017.
- [185] M. C. de Carvalho *et al.*, "Intranasal dopamine attenuates fear responses induced by electric shock to the foot and by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter," *J. Psychopharmacol.*, vol. 33, no. 12, pp. 1524–1532, 2019.
- [186] R. Guennoun *et al.*, "Intranasal administration of progesterone: A potential efficient route of delivery for cerebroprotection after acute brain injuries," *Neuropharmacology*, vol. 145, pp. 283–291, 2019.
- [187] P. Schüssler *et al.*, "Sleep after intranasal progesterone vs. zolpidem and placebo in postmenopausal women – A randomized, double-blind cross over study," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 92, pp. 81–86, 2018.
- [188] K. U. Simon *et al.*, "Intranasal insulin treatment modulates the neurotropic, inflammatory, and oxidant mechanisms in the cortex and hippocampus in a low-grade inflammation model," *Peptides*, vol. 123, p. 170175, 2020.
- [189] K. Long, T. L. Williams, and B. Urbanc, "Insulin inhibits A β 42 aggregation and prevents A β 42-Induced membrane disruption," *Biochemistry*, vol. 58, no. 45, pp. 4519–4529, 2019.
- [190] S. Gizurarson and E. Bechgaard, "Intranasal administration of insulin to humans," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 12, no. 2, pp. 71–84, 1991.
- [191] C. L. Graff and G. M. Pollack, "Functional evidence for P-glycoprotein at the nose-brain barrier," *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 86–93, 2005.
- [192] C. L. Graff and G. M. Pollack, "P-glycoprotein attenuates brain uptake of substrates after nasal instillation," *Pharm. Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 1225–1230, 2003.
- [193] T. Shingaki *et al.*, "Nasal delivery of P-gp substrates to the brain through the nosebrain pathway," *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 26, no. 3, pp. 248–255, 2011.
- [194] N. Hada, W. J. Netzer, F. Belhassan, L. P. Wennogle, and S. Gizurarson, "Nose-to-brain transport of imatinib mesylate: A pharmacokinetic evaluation," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 102, pp. 46–54, 2017.
- [195] I. Sziráki *et al.*, "The use of microdialysis techniques in mice to study P-gp function at the blood-brain barrier," *J. Biomol. Screen.*, vol. 18, no. 4, pp. 430–440, 2013.
- [196] I. Sziráki *et al.*, "Quinidine as an abcB1 probe for testing drug interactions at the blood-brain barrier: An in vitro in vivo correlation study," *J. Biomol. Screen.*, vol. 16, no. 8, pp. 886–894, 2011.
- [197] A. L. Bartels *et al.*, "Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: A possible role in progressive neurodegeneration," *Neurobiol. Aging*, vol. 30, no. 11, pp. 1818–1824, 2009.
- [198] M. Bauer *et al.*, "Age dependency of cerebral P-gp function measured with (R)-[¹¹C]verapamil and PET," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 65, no. 9, pp. 941–946, 2009.
- [199] A. Pekcec, E. L. Schneider, W. Baumgärtner, V. M. Stein, A. Tipold, and H. Potschka, "Age-dependent decline of blood-brain barrier P-glycoprotein expression in the canine brain," *Neurobiol. Aging*, vol. 32, no. 8, pp. 1477–1485, 2011.
- [200] J. Wang *et al.*, "Intranasal administration of dantrolene increased brain concentration and

- duration,” *PLoS One*, vol. 15, no. 3, 2020.
- [201] J. M. Padowski and G. M. Pollack, “Examination of the ability of the nasal administration route to confer a brain exposure advantage for three chemical inhibitors of P-glycoprotein,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 7, pp. 3226–3233, 2010.
- [202] A. Stevens, “The Hematoxylin,” in *Theory and Practice of Histological Techniques*, 4th ed., J. D. Bancroft and A. Stevens, Eds. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2007, pp. 107–118.
- [203] F. Deerberg, K. Rapp, S. Rehm, and W. Pittermann, “Genetic and environmental influences on lifespan and diseases in Han:Wistar rats,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 14, no. 3–4, pp. 333–343, 1980.
- [204] D. Tripathy, L. Thirumangalakudi, and P. Grammas, “RANTES upregulation in the Alzheimer’s disease brain: A possible neuroprotective role,” *Neurobiol. Aging*, vol. 31, no. 1, pp. 8–16, 2010.
- [205] O. Hunziker, S. Abdel’Al, H. Frey, M. J. Veteau, and W. Meier-Ruge, “Quantitative studies in the cerebral cortex of aging humans,” *Gerontology*, vol. 24, no. 1, pp. 27–31, 1978.
- [206] K. Kacem, P. Lacombe, J. Seylaz, and G. Bonvento, “Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: A confocal microscopy study,” *Glia*, vol. 23, no. 1, pp. 1–10, 1998.
- [207] J. Middeldorp and E. M. Hol, “GFAP in health and disease,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, no. 3, pp. 421–443, 2011.
- [208] U. Brinkmann, “Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1,” *Pharmacogenomics J.*, vol. 1, no. 1, pp. 59–64, 2001.
- [209] J. W. Smit, A. H. Schinkel, M. Müller, B. Weert, and D. K. F. Meijer, “Contribution of the murine *mdr1a* P-glycoprotein to hepatobiliary and intestinal elimination of cationic drugs as measured in mice with an *mdr1a* gene disruption,” *Hepatology*, vol. 27, no. 4, pp. 1056–1063, 1998.