

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



Bors Luca Anna
A PhD Disszertáció tézisei

Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar
Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

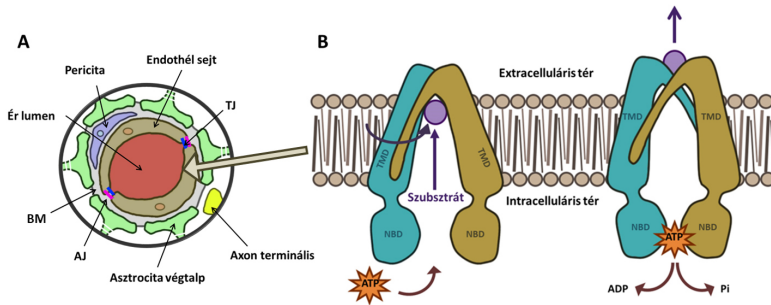
Témavezető:

Vidáné Dr. Erdő Franciska

Budapest, 2020

1. Bevezetés

A vér-agy gát nem csak fizikai gátat szab a szabad molekulamozgásnak a vér és a központi idegrendszer között, de az agyi kapillárisok endothél sejtjein számos membrán transzporter is megtalálható, vannak amelyek az agy fiziológiás extracelluláris környezetének fenntartásáért felelősek (ionok, tápanyagok, építőelemek), valamint vannak, melyek távol tartják az idegrendszertől a potenciális neurotoxinokat [1], [2]. Ez utóbbiak az efflux transzporterek, mint például az ABC fehérjecsaládba tartozó MDR1, vagy P-glikoprotein.

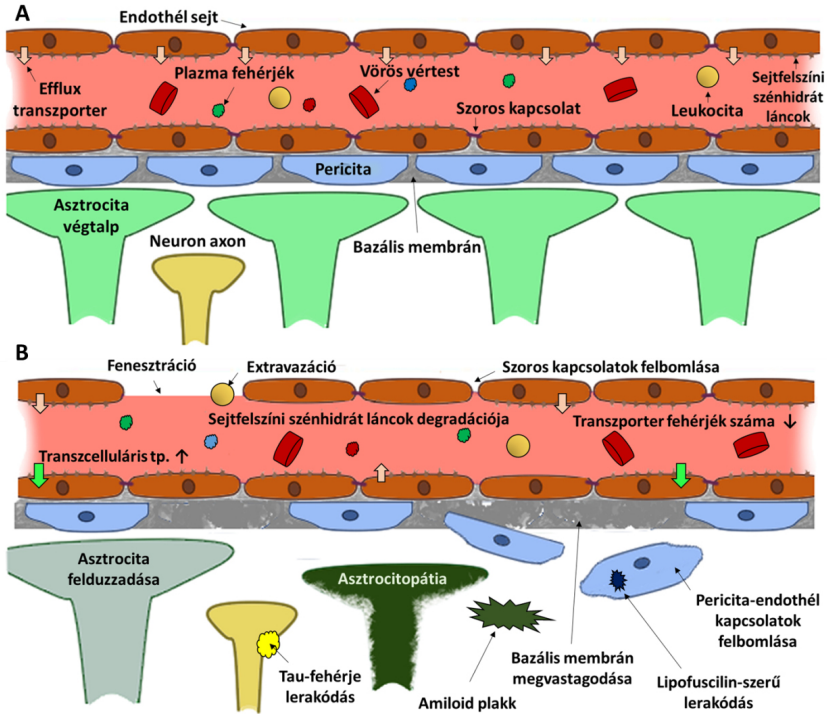


1. Ábra - A vér-agy gát felépítése (A) és az efflux transzporterek működésének mechanizmusa (B). A) Az agyat behálózó kapillárisokat különböző sejtek veszik körül, melyek hozzájárulnak az agy kémiai védelméhez: neuron axon terminálisok, asztrocita végtalpak, mikrogliaák, periciták. A kapillárisokat speciális, transzporterekben gazdag endothél sejtek alkotják, melyek szorosan egymás mellett helyezkednek el, kötöttük szoros és adherens (TJ, lila és AJ, kék) kapcsolatok korlátozzák a paracelluláris transzportfolyamatokat. Az endothél sejtek bazális oldalán található a bazális membrán (BM). B) A P-gp (ABC B1) 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 nukleotidkötő 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.)

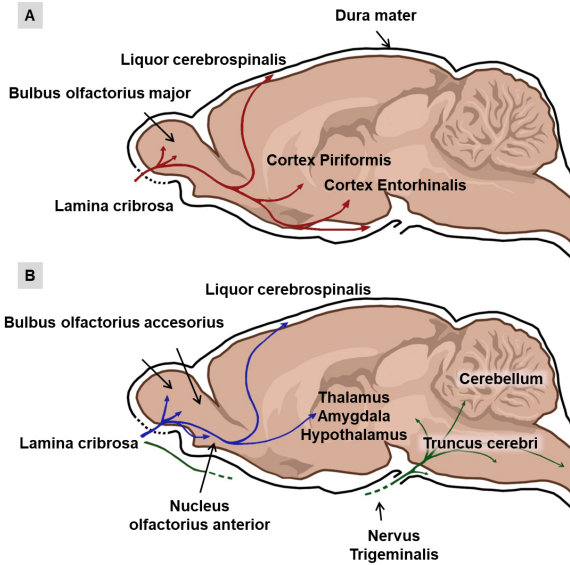
Az öregedés biológiájával kapcsolatos kutatások egyik iránya az idős korban jelentkező vér-agy gát működési zavar vizsgálata. Megállapítást nyert,

hogy az öregedés során a vér-agy gát funkciója is károsodik; molekulák, ionok és sejtek szivároghatnak be a vérből, felborítva ezzel az agyi parenchíma homeosztázisát [3]. A megváltozott extracelluláris környezet, valamint az extravazációval az agyba kerülő immunsejtek gyulladásozó citokinek felgyülemledését válthatják ki. Ezek a jelenségek tovább fokozhatják a vér-agy gát felbomlását és növelik számos neurodegenerációval járó megbetegedés kockázatát. Ez a „vér-agy gát szivárgás” részben annak tudható be, hogy a kor előrehaladtával megváltozik a fehérjék aránya [3]. Fontos strukturális fehérjék, mint a szoros és adherens kapcsolatokat alkotó elemek rendellenes működése a sejtek közötti kohézió csökkenését, megszűnését okozhatja, továbbá a transzmembrán transzporterek expressziója is redukálódik [4].

Az egy időben alkalmazott hatóanyagok használata esetén előfordulhat, hogy az egyik szer gátolja, vagy épp fokozza egy másik hatását a szervezetben. Ez az a jelenség például, mikor két (vagy több) hatóanyag ugyanazon fehérjén fejt ki hatását, úgynevezett farmakodinámiai interakcióba lépnek egymással [5]. Ez a lehetőség ki használható, például a központi idegrendszer gyógyszeres kezelésében is [6]. Nem kívánt esetekben akár veszélyforrást is jelenthet, kiemelten az idősebb pácienseknél, akik gyakran a vese- és májfunkció deficitben szenvednek [5], így a hatóanyag könnyebben akumulálódhat a szervezetben. A központi idegrendszer gyógyszerelésben egyre nagyobb teret hódítanak az intranazális adagolás. Nagy előnye a hagyományos intravénás és orális adagolási módokkal szembe, hogy közvetlen agyba mutató gyógyszerútvonalat biztosít, minimális perifériás terheléssel [7]. Gyors maximum koncentráció érhető el így az agyban, a gyógyszer beadása nem invazív, könnyen adagolható. Nem véletlen, hogy az intranazálisan adható gyógyszerek (köztük antikonvulzív szerek [8], vagy akár hormonális kezelések [9], [10]) egyre nagyobb teret hódítanak.



2. 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 transzcéluláris transzportfolyamatoknak, a leukociták és 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 kapillarisokat körülvevő asztrociták elhalnak vagy felduzzadnak, elveszítik kontaktusukat a kapillarisokkal. A barrier funkció csökkenésével és az efflux transzporterek megritkulásával amiloid plakkok és tau fonatok alakulnak ki, tovább gerjesztve a gyulladós és destruktív folyamatokat.



3. Ábra - Intranasálisan bejuttatott anyagok útvonala az agyba. A) Piros nyilak jelölik a szaglóidegeken 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 szervén keresztül felszívódó hatóanyagok útvonaláról (kék nyilak), melyet a szaglógumó hátsó régiójába (bulbus olfactorius accesorius) projektáló idegpályák alkotnak. Innen eljuthatnak a molekulák az nucleus olfactorius anterior magcsoportba, az agyvízbe, illetve a thalamusba, amygdalába és a hypothalamusba. Az ábra a [11] és [12] cikkekben leírt útvonalak alapján készítettem.

2. Célkitűzések

Kutatásaim egyik célja, hogy a humán öregedés egy állati modelljén feltérképezzem, miként változik meg a vér-agy gát permeabilitása a korral, valamint hogy változik a P-gp gátlás hatásossága idős Wistar patkányokban.

Választ kerestem arra is, hogy miként befolyásolják különböző hatóanyagok (P-gp gátlószer, szimpatomimetikum) az intranazálisan adott P-gp szubszt-rát eloszlását az agyba. A vér-agy gát átjárhatóságának tanulmányozására megfelelő módszer az in vivo dupla és tripla-szondás mikrodialízis.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

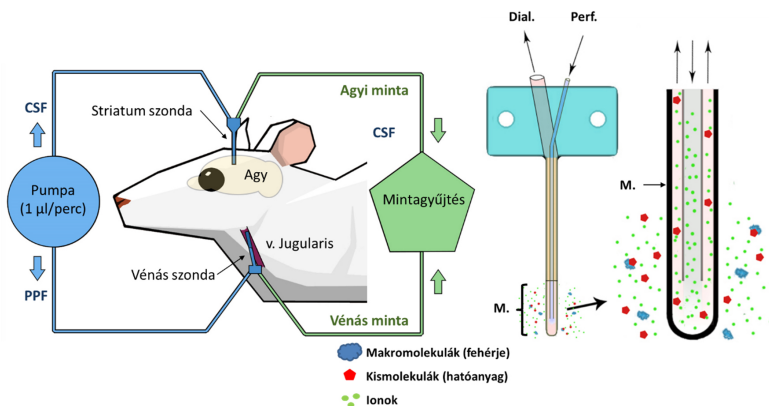
A vizsgálatok fiatal hím (3-4 hónapos, 250-400 g közötti testsúly) valamint középkorú és idős (13-21 hónapos, 550-900 g testsúly közötti) hím Wistar patkányokon történtek. Az állatok a műtétek és kísérletek során végig anesztézia (i.p. klorál-hidrát) alatt voltak, a kísérleti ülések eutanáziával végeződtek, elkerülve a műtét és kezelések által okozott stresszt és fájdalmat. 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).

3.2. Mikrodialízis

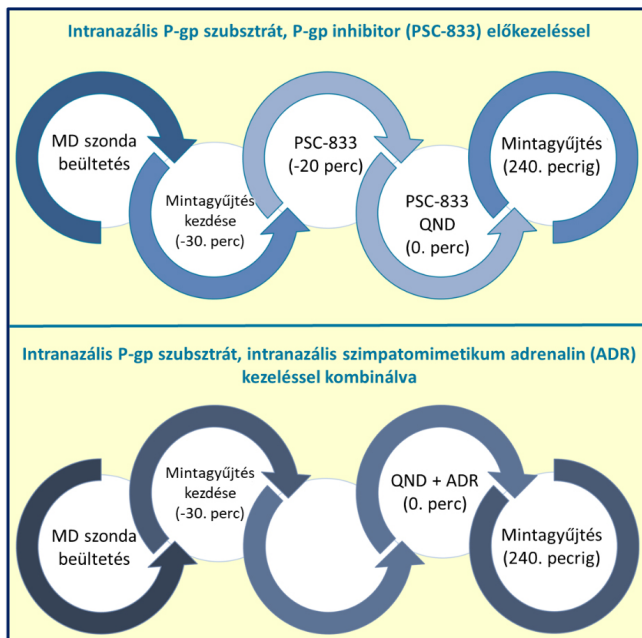
A kísérletek során P-gp szubsztrátként kinidint (QND) alkalmaztam, gátlószerként valsopodart (PSC-833) használtam [13]. A kísérletek in vivo, altatott patkányokon történtek. A vénás mikrodialízis szondát (CMA/20 elite) a jobb jugularis vénába ültettem, az agyi szonda (CMA-12) a bal féltek striatumába került behelyezésre. A mintagyűjtés ideje a kinidinnel való kezelés előtti -30. perctől +240. percig tartott, fél órás gyűjtési intervallumokkal.

Intravénásan adott kezeléshez az állatok femoralis vénáját preparáltam ki, melybe egy Braun kanült vezettem be. Az orrcseppel való kezelésnél, az agyi szonda beültetése előtt, háton fektetett pozícióban egy pipetta segítségével cseppenttem az állatok bal orrlyukába, így viszont fontos információtól estem el kaptam a szubsztrát eloszlásának első fél óráját illetően. Az intranazális gél beadása, gél pipettával, szintén a bal orrlyukba történt, már az agyi szonda beültetését követően történt.

A gyűjtött minták bioanalitikája HPLC-MS/MS módszerrel történtek. A mikrodialízis módszer mellett SPECT képalkotás segítségével vizsgáltuk a P-gp transzporterek öregedéshez köthető funkcionális megváltozásait. A kísérletekhez használt radioaktív jelölt P-gp szubsztrát a [99m Technécium]-2-metoxi-izobutil-izonitril volt. A gátlószer itt is a PSC-833 volt.



4. Ábra - A mikrodialízis szonda és a dupla-szondás mikrodialízis vizsgálat sematikus felépítése. A kísérleti állat agyába (striatumába) és vénájába (v. jugularis) ültetett szondán szövetspecifikus fiziológiás folyadékok: perifériás perfúziós folyadék (PPF) és mesterséges cerebrospinális folyadék (CSF) áramlanak keresztül (perf.). Az így kapott dializátum (dial.) molekula összetétele közel azonos lesz a vizsgált szövetével, a makromolekulákat és a fehérjékhez kötött kismolekulákat leszámítva, mivel azok nem tudnak átjutni a szonda membránjának (m.) pórusain. Az így kapott minták bioanalízisével meghatározható, hogy a vizsgált anyag milyen mennyiségben található meg a vizsgált szövetekben.



5. 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.

3.3. Anatómiai és hisztológiai vizsgálatok

A vizsgált állatokban a vér-agy gátban bekövetkező, expressziós és strukturális változásokat immunhisztokémiai festéses, elektronmikroszkópos és MRI (mágneses rezonancia képalkotás) felvételek alapján vizsgáltam. A MRI-t használtam az idős állatok striatum koordinátáinak meghatározásához is. Az intranazális cseppek útját az orrüregben hisztológiai vizsgálatokkal ellenőriztem. Ehhez Evans-kék festéket oldottam az intranazális csepp vehiculumába és adtam be egy reprezentatív állat orrába. Az állatok perfúziója az immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz fiziológias sóoldattal, majd 4% paraformaldehid és 15% pikrinsav 0,1 M-os foszfát puffer eleggyel, az intranazális disztribúció vizsgálatához 10%-os formalinnal történt.

3.4. Viselkedés és memória vizsgálatok

A vér-agy gát öregedésének kognitív funkciókat érintő hatásainak vizsgálata Morris-féle vízi labirintus új tárgy felismerés (NOR) tesztekkel történtek. Ezekkel a tesztekkel az állatok térbeli és felismerési memóriája vizsgálható. A vízi útvesztő eredményei többszörös összehasonlítási ANOVA módszerrel lettek kiértékelve, az új tárgy felismerés szintjét a két tárgy (egy ismert és egy újszerű) közötti diszkriminációs index (DI) adta meg:

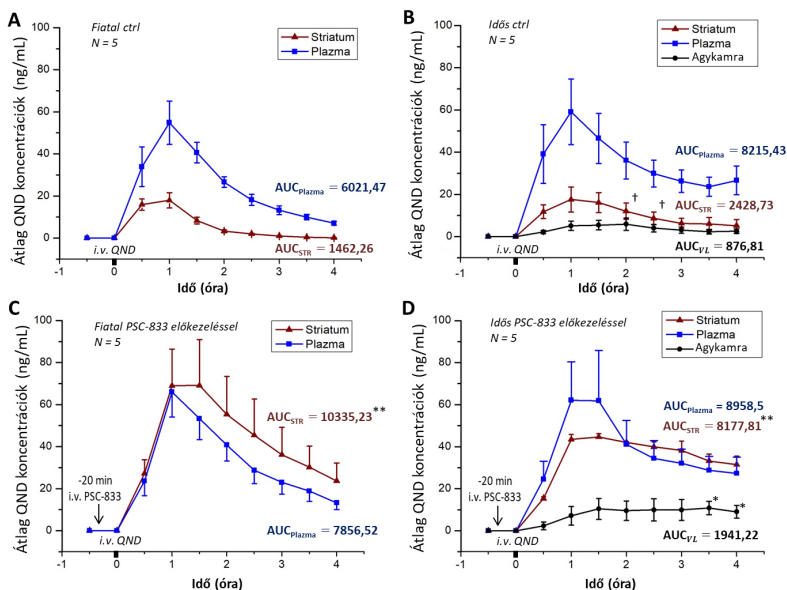
$$DI = 100 * \frac{t_{2új} - t_{2ismert}}{t_{2új} + t_{2ismert}}, \quad (1)$$

mely megmutatja, hogy az állat mely tárgy vizsgálatával töltött több időt (t_2). A két korcsoport kapott DI értékeit t-teszttel hasonlítottam össze.

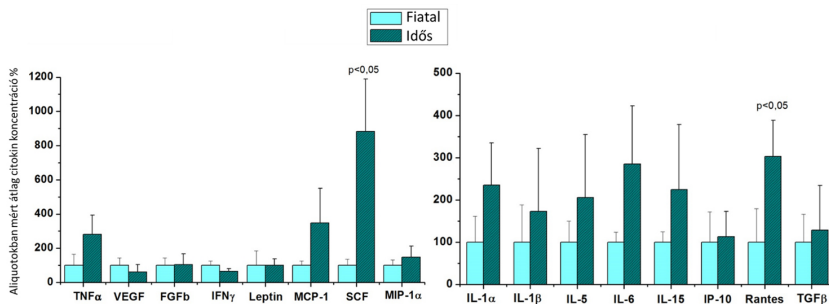
3.5. Agyhomogenizálás és citokin szint mérés

A citokin szint vizsgálatokhoz 3 fiatal és 3 idős állat striatumából állítottam elő, sejt lízis pufferrel aliquotokat. Az összfehérje vizsgálatához Pierce™ BCA Protein teszt készletet használtam. A homogenizátumok citokin koncentrációját kemilumineszcens ELISA (Signosis által előre gyártott lemez) módszerrel hasonlítottam össze.

- A Kemilumineszcens ELISA citokin szint vizsgálatok során, szembetűnő szintemelkedést az idős állatok mintáiban a SCF (őssejt faktor) és a Rantes esetében mértem, valamint megemelkedett a TNF és az interleukinek koncentrációja is. A kapott eredmények krónikusan fennálló gyulladásoz folyamatokra engednek következtetni.



7. Ábra - Kinidin (QND) koncentráció-idő profilok a dializátum mintákban (dózis: 5 mg/kg i.v.) fiatal (A, B) és idősebb (C, D) Wistar patkányokban vehiculummal (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.

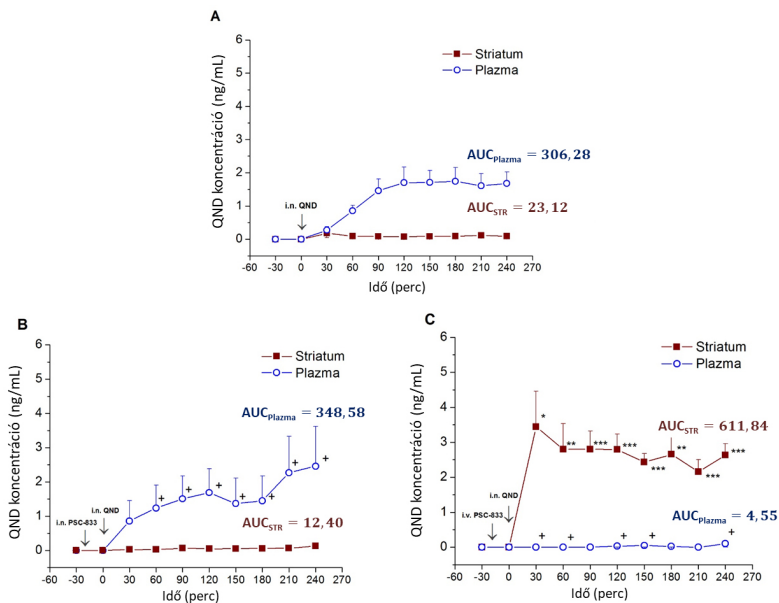


8. Ábra - Agyi citokinszintek összehasonlítása fiatal és idős patkányokban. A kemilumineszcencia intenzitások arányát véve (a fiatal állatok szintjét 100 %-nak tekintve) a legtöbb vizsgált citokin esetében tapasztalható változás az agyi koncentrációjukban. A szignifikancia küszöböt az őssejt faktor és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

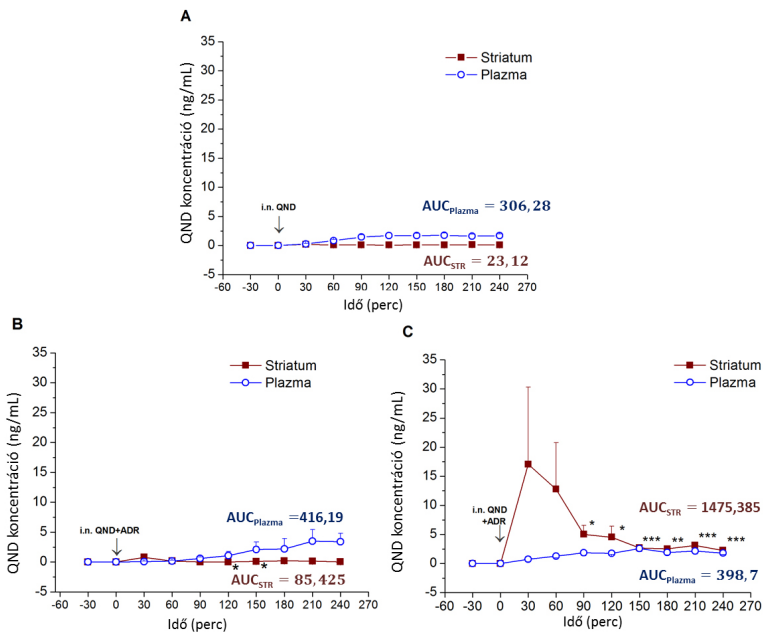
4.2. Intranazális P-gp szubsztrát agyi penetrációjának modulációja

- A kezdetekben alkalmazott nazális oldat ugyan sikeresen eljutott az orrüreg caudalis területeire, azonban számos hátránnyal rendelkezett. A géles formuláció megoldást kínált a nazális oldat problémáira.
- A kontroll csoport mikrodialízis eredményei gyenge agyi és plazma disztribúciót mutatnak .
- Az intranazális (lokális) P-gp inhibitor (PSC-833) előkezelés nem javított a P-gp szubsztrát agyi disztribúcióján.
- Az intravénásan adott P-gp inhibitor hatására az intranazális kinidin vérplazma koncentrációja jelentősen lecsökkent, míg az agyi penetrációja jelentős megnőtt. Az inhibitor szisztémás jelenléte, a vér-agy gát P-gp gátlás mellett jótékony hatással lehet a nyálkahártyán keresztül történő felszívódásra is.
- A géles kezelőoldatba a kinidin mellé oldott adrenalin jelenlétében több szubsztrát szívódott fel a szaglóhámán keresztül az agyba, mint annak hiányában.

- A nyálkahártyáról történő felszívódást az adrenalin sikeresen megakadályozta.



9. Ábra - Intranazálisan adott kinidin (1 mg/állat) koncentráció-idő profilja és annak változása PSC-833 előkezelés hatására. A kontroll (A), intranazális 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 min-tás t-próbával történt, a feltüntetett adatok: átlag +/- standard hiba; N=5/csoport.)



10. Ábra - Intranazálisan adott kinidin (1 mg/állat) koncentráció-idő profiljának változása lokális adrenalin kezelés hatására. A kontroll (A), alacsony dózissú (50 ng) adrenalinós (B) és magas dózissú (20 µg) adrenalinós (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 -próbbával történt, a feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba; $N=5$ /csoport.)**

Új tudományos eredmények

A disszertáció célkitűzései közül az első kérdés a természetes öregedés vér-agy gát funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálta 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 kinidinnek az agyi és szisztémás keringésben való eloszlásának mérésével, mikrodialízis módszert alkalmazva. Emellett sor került a striatumban található gyulladásos citokin szint változások ELISA módszerrel való mérésére is, mellyel szintén az agyi öregedés jeleit kerestem. [J1, J2, J4]; [P1-P4]; [C1-C3]

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 csoportéban mérthez képest, míg idősek-nél lényegesen kisebb (3,36x) emelkedést tapasztaltam.

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

Kutatásom második felében a P-gp transzporter modulációjának vizsgálatát tűztem ki célul. 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, J3, J5]; [P5, P6]; [C4]

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 epithélsejteinek P-gp transzporterei korlátozzák szubsztrátjaik szaglóhámra történő felszívódását, gátlásukkal viszont megemelhető a hatóanyag agyi eloszlása.

II.b. Lokális 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.

4.3. Kiegészítő vizsgálatok eredményei

Kiegészítő kísérletek segítségével sikerült azonosítani a vizsgált egyedekben, az irodalmi adatokban leírt öregedési folyamatokat:

- Az öregedés során GFAP expresszió emelkedés és P-gp expresszió csökkenés tapasztalható.

- GFAP expressziója megnövekedett az idősebb állat asztrocitáiban, a fiatal patkány agyszövetében megfigyelhetőhöz képest. A P-gp immunfestés eredménye azt bizonyítja, hogy az öregedés hatására a P-gp transzporterek száma megfogyatkozik a striatumban.
- Az elektronmikroszkópos felvételek alátámasztották az irodalomban is leírt strukturális változásokat. A fiatal állatok kapillárisaira vékony érfal jellemző, kívülről normálméretű asztrocita végtalpak veszi körül. Idősebb állatokban megvastagodott az érfal, a környező asztrociták megduzzadtak, de számuk nem változott. Az idős állatok kapillárisainak falában a sejtek kis mértékben elvesztették eredeti alakjukat, az endothél sejtek közötti szoros kapcsolatok kevesebb számban találhatóak meg, valamint a bazális membrán szignifikánsan megvastagodott.
- A viselkedés vizsgálatok során a térbeli memória és felismerési memória vizsgálatával szignifikáns eltérés nem volt kimutatható fiatal és idős állatok között. A jelentős különbség a két korcsoport között csak az új tárgy felismerés tesztben az explorációval töltött időben található: az idősebb csoport három tagja a vizsgálati idő nagy részében mozdulatlan maradt (freezing), mely lehet a szorongás, vagy apátia jele, azonban a kicsi állatszámából adódóan, biztos statisztikai értékelés nem állt rendelkezésemre.

5. Alkalmazási területek

A vér-agy gát kutatásának távlati célja, hogy megismerjük annak pontos működési mechanizmusát, ezáltal képesek legyünk a barrier-rendszer rendelkezéseit 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 idősek 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. A 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 orrnyálkahártya 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, ki-nek segítségével számos gyakorlati és technikai felfogást sajátíthattam el és Varga-Medveczky Zsófiának, az utolsó évben nyújtott segítségével. További-akban 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 géh vehikulumot és prof. Joe Hustonnak és csoportjának, Benedetta Faza-

rinak 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 (Semmelweis 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 hálállal 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*, vol.139, pp. 269-2775, 2018.

[J2] **L. A. Bors**, F. Erdő „Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery,” *Scientia Pharmaceutica* , vol. 87, no. 1, 2019.

[J3] Franciska Erdő, **Luca Anna Bors**, Dániel Farkas, Ágnes Bajza, Sveinbjörn Gizurarson , „Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting,” *Brain Res Bull.*, vol.143, pp. 155-170, 2018.

[J4] **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 Bull.*, vol.155, pp. 211-212, 2020.

[J5] **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 Bull.*, vol.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 administered 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

Szerző egyéb publikációi

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* vol. 9, no.1 pp. 15-20, (2019)
2. **L. A. Bors**, Á. Bajza, D. Kocsis, F. Erdő, "Koffein: hagyományos és új terápiás indikációk, valamint felhasználás dermatológiai modellvegyületeként," *Orvosi Hetilap* vol. 159, no. 10 pp. 384-390, (2018)

Irodalomjegyzék

- [1] 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.
- [2] T. Worzfeld and M. Schwaninger, “Apicobasal polarity of brain endothelial cells,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 36, no. 2, pp. 340–362, 2016.

- [3] A. Varatharaj and I. Galea, "The blood-brain barrier in systemic inflammation," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 60, pp. 1–12, 2017.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] L. A. Bors and F. Erdö, "Overcoming the blood-brain barrier. Challenges and tricks for CNS drug delivery," *Sci. Pharm.*, vol. 87, pp. 1–28, 2019.
- [8] R. Kälviäinen, "Intranasal therapies for acute seizures," *Epilepsy Behav.*, vol. 49, pp. 303–306, 2015.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.