

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM



Élettani és Biokémiai Tanszék

Az asztrogliá sejtek neuroinflammációs szerepének vizsgálata hepaticus encephalopathia során

Examination of the neuroinflammatory role of astroglia cells in hepatic encephalopathy

Készítette:

Fetter Viktória

VI. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Bárány Zoltán

tanszéki munkatárs

ÁTE Élettani és Biokémiai Tanszék

Jócsák Gergely

tudományos segédmunkatárs

ÁTE Élettani és Biokémiai Tanszék

**Budapest
2017**

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	2
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A hepatikus encephalopathiáról általában	5
2.2. Patogenezis:	7
2.2.1. A hiperammonnémia	8
2.2.2. Oxidatív stressz és neuroinflammáció.....	9
2.2.3. Bakteriális transzlokáció	12
2.2.4. Mangán.....	12
2.3. Kutatásunk hipotézise.....	13
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	14
3.1. Asztrogliá sejt kultúra létrehozása.....	14
3.2. Asztrogliá sejt kultúra passzálása	17
3.3. Mikroglia-eltávolítás a sejt kultúrából.....	17
3.4. Vizsgált ágensek optimális koncentrációjának beállítása.....	19
3.5. Asztrogliá tenyészet citokin termelésének vizsgálata	23
4. EREDMÉNYEK	25
4.1. A mikroglia-eltávolítás sikerességének ellenőrzése	25
4.2. Alkalmazandó H ₂ O ₂ koncentráció beállítása.....	25
4.3. Asztrogliá tenyészet citokin termelésének meghatározása.....	27
5. MEGBESZÉLÉS.....	30
5.1. Az eredmények értékelése	30
5.2. Konklúzió	32
6. ÖSSZEFOGLALÁS	33
7. SUMMARY	34
8. IRODALOMJEGYZÉK	35
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40

Rövidítések jegyzéke

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propion sav
Ara-C	Citozin β -d-arabinofuranozid
ATP	Adenozin-5'-trifoszfát
cGMP	Ciklikus guanozin-monofoszfát
CM-DCFH-DA	5-6-klorometil 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein-diacetát
CO ₂	Szén-dioxid
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenil-indol
DNáz	Dezoxiribonukleáz
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
FCS	Fetal calf serum
GABA	Gamma-amino-vajsav
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
HE	Hepatitis encephalopathia
IgA	Immunglobulin A
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
LME	L-Leucin-metilésztert
LPS	Lipopoliszacharid
MAPK	Mitogén aktivált protein-kinázok
MMP-9	Mátrix metalloproteináz-9
Mn	Mangán
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
Na-K-ATP-áz	Nátrium-kálium-ATPáz
NF- κ B	Nuclear factor- κ B

NH ₄ Cl	Ammónium-klorid
NKCC-1	Na-K-Cl kotranszporter-1
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NO	Nitrogén-monoxid
OD	Optikai denzitás
PBS	Phosphate-buffered saline (foszfát puffer)
PI	Propidium jodid
PLA2	Fosfolipáz-2
PSS	Portoszisztémás sönt
RNS	Reaktív nitrogén származékok
ROS	Reaktív oxigén származékok
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TGF β1	Transzformáló növekedési faktor β1
TLR4	Toll like receptor 4
TNF-α	Tumor nekrozis faktor-alfa

1. BEVEZETÉS

A hepaticus encephalopathia (HE), egy olyan orvosi- és állatorvosi-jelentőséggel bíró neuropszichiátriai kórkép, amelynek multifaktoriális jellege az ezzel kapcsolatos intenzív kutatások alapját adja.

Amellett, hogy a HE kifejezett humán-egészségügyi jelentőséggel bír, a kórkép állatorvosi vonatkozásban sem elhanyagolható, hiszen, számos állatfajban, többek között lóban, szarvasmarhában, kecskében, kutyában, valamint macskában is leírták már a betegséget.

A kórkép lefolyása alapján beszélhetünk krónikus és akut HE-ről. A téma jelentősége abban is rejlik, hogy akut HE gyakori szövődménye az agyödéma, mely az agykoponya tágulékonyaságra való képtelensége miatt az intrakranialis nyomás fokozódásához és agyi beékelődéshez vezet, ennek pedig fatális következményei lehetnek. Egyes irodalmi adatok szerint emberekben az akut májelégtelenségben tapasztalt mortalitási arány akár a 80%-ot is elérheti. A betegség krónikus formája sem elhanyagolható, úgymint pl. az ún. *minimal HE* esetében sem, amely bár szubklinikai megnyilvánulású, mégis jelentősen rontja az életminőséget.

A HE számos cerebrális kórfolyamata már tisztázódott, viszont a köztük levő ok-okozati kapcsolat máig sem teljesen ismert. Ezek közül kiemelendő az oxidatív stressz és a neuroinflammáció, melynek fontossága részben terápiás vonatkozásában rejlik. A két előbb említett kórfolyamat közötti kapcsolat bizonyított, vagyis, hogy az oxidatív stressz képes gyulladásoz választ indukálni, azonban ezért a gyulladásoz válaszóért elsősorban a mikroglia sejteteket teszík felelőssé, amellett, hogy szakirodalmi adatok alapján ismert az asztroglíák citokin-termelő képessége is. A HE patogenezisének felderítésére irányuló kutatások csak az utóbbi években kezdték vizsgálni a gyulladásoz faktorok és a neuroinflammáció jelentőségét a betegség és a tünetek kialakulása során.

Kísérleteink célja az asztroglia sejtetek citokin-termelésének vizsgálata volt különböző, HE-ban fontos szerepet játszó tényező - köztük az oxidatív stressz - hatására, ezáltal nyitva teret az asztroglíák gyulladásoz folyamatokban betöltött szerepének jobb megértéséhez.

A tervezett kísérleteket *in vitro* modellben, primer patkány agyi asztroglia sejtetkultúrában végeztük el. A sejtetkultúrákon az oxidatív stressz mellett egyéb, igazoltan etiológiai tényezőként szerepet játszó ágensek hatásának vizsgálatára is sor került, úgymint ammónia, mangán valamint bakteriális endotoxinok (lipopoliszacharidok).

Dolgozatomat az Állatorvostudományi Egyetem- Élettani és Biokémiai Tanszékén készítettem, kísérleteink új ismereteket nyújthatnak arra nézve, hogy az asztroglíák milyen módon járulnak hozzá a HE-ban jelentkező cerebrális kórfolyamatok kialakulásához.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A hepatikus encephalopathiáról általában

A hepatikus encephalopathia (HE) úgy definiálható, mint a máj működésbeli zavarának következtében kialakuló neurológiai tünetegyüttes, melynek következményeképp abnormális mentális státusz jön létre. A HE leggyakrabban portoszisztémás sönt (PSS) és / vagy akut illetve krónikus májelégtelenség következménye. A kórkép patogenezise nem teljesen tisztázott, annyi azonban bizonyos, hogy multifaktoriális jellegű, és leginkább csak teóriák vannak a betegség pontos kialakulásával kapcsolatban. A neurológiai tünetegyüttest lényegében az okozza, hogy a máj méregtelenítő funkciójának az említett okokból történő kiesése miatt a toxikus anyagcsere termékek nagyobb mértékben jutnak be a liquorba és akkumulálódnak az agyban (Salgado and Cortes, 2013). A kórkép nem csak humán orvosi vonatkozásban jelentős, hiszen azt számos állatfajban, többek közt szarvasmarhában (Marçal et al., 2008), kecskében (Kinde et al., 2014), lóban, (Rech and Barros, 2015), kutyában, valamint macskában is leírták (Torisu et al., 2005). A betegség során fennálló egyik májbeli vagy idegrendszeri abnormális metabolizmus sem magyarázza teljesen a HE összes tünetét és teljes patogenezisét önmagában, de a vér és liquorbeli ammónia koncentráció növekedése bizonyosan kulcsszereppel bír a kórkép kialakulásában (Salgado and Cortes, 2013).

A HE, a máj diszfunkciójának eredete és a klinikai tünetek alapján különböző csoportokba sorolható (Salgado and Cortes, 2013). Klinikai tünetek alapján általában négy csoportra szokás osztani a HE-t. Az első stádiumban észlelhető tünetek megjelenése jelzi a bélből érkező toxinok kezdeti károsító hatását a központi idegrendszerre. A betegség progrediálása során a második, később a harmadik, majd a negyedik stádiumbeli tünetek válnak jellemzővé. Kutyákban ritkán előfordul, hogy nem idegrendszeri tünetek jelentkeznek a betegség során, hanem például véres vizelet, hányás-hasmenés, alulfejlettség. A csoportosítást az **1. táblázat** szemlélteti (Salgado and Cortes, 2013).

A hepatikus encefalopátia stádiumai			
Első stádium	Második stádium	Harmadik stádium	Negyedik stádium
Enyhe zavarodottság	Levertség	Koordinációs zavarok	Elfekvés
Étvágytalanság	Ataxia	Zavarodottság	Általános reakciócsökkenés vagy hiány
Elbutulás	Látványos elbutulás	Zsibbadás	Kóma
Ingerlékenység	Személyiségváltozás	Fokozott nyálzás	Halál
	Vakság	Rohamok	
	Dezorientáció	Agresszió	

1. Táblázat A hepatikus encefalopátia stádiumai

A humán orvostudomány 3 fő típusba sorolja a HE-t a máj diszfunkciójának *eredete* alapján és bár ezt a csoportosítást az állatorvoslás részben átvette, nem alkalmazható minden esetben egyértelműen.

- Az „A” típusú HE, a betegség akut májelégtelenséghez kapcsolódó megnyilvánulási formája. Kutyaik esetében, mivel rendkívül nagy a máj tartalékkapacitása, nagymértékű nekrozis szükséges ahhoz, hogy akut májelégtelenség kialakuljon, ezért ez a típus ritka kutyaikban. Macskában kisebb a máj tartalékkapacitása és az esszenciális aminosav igénye nagy, ezért akár egy májelzsírosodás is vezethet HE kialakulásához. Így míg macskában ez a leggyakoribb formája a HE-nak, kutyaikban csak 8-10%-ban fordul elő ez a típus.
- A „B” típus PSS jelenlétével van összefüggésben, azonban hepatocelluláris károsodással nem társul. Kutyaikban általában veleszületett portoszisztémás sönt következtében kialakuló májfunkciókiesés, vagy a májfejlődési zavara áll ennek a típusú HE-nak a hátterében.
- A különböző májparenchima elégtelenséggel és portális vérnyomás emelkedéssel kapcsolatos „C” típus gyakran társul szerzett PSS-el. Humán esetekben ez, míg állatokban a „B” típusú HE fordul elő leggyakrabban (Salgado and Cortes, 2013).

Fontos megemlíteni, hogy az előbb leírt felosztás helyett a tudományos munkák többsége inkább a „heveny HE” és az „idült HE” terminusokat használja.

2.2. Patogenezis:

A HE-ban lezajló cerebrális kórfolyamatok rendkívül sokrétűek, ugyanakkor egymással szorosan össze is függenek, ezért elkülönítetten történő tárgyalásuk csupán didaktikai okok alapján lehetséges. Az alábbiakban a cerebrális kórfolyamatok többsége csak érintőlegesen kerül bemutatásra, a mi kísérleti hipotéziseink szempontjából releváns tényezők pedig részletesebben, önálló alfejezetekben lesznek ismertetve.

A kórkép patogenezisében elvitathatatlan szerepe van az ammónia agybeli felhalmozódásának (ld. később), de emellett számos más tényező is nagyban hozzájárul a HE kialakulásához. Így fontos megemlíteni az agyi energia metabolizmus egyes részfolyamatainak (glikolízis, laktát-metabolizmus, citromsavciklus, oxidatív foszforiláció) és ezzel összefüggésben a cerebrális ATP-szintnek a változását (Rama Rao and Norenberg, 2012; Schousboe and Sonnewald, 2016), egy ion-transzporter membránprotein, a Na-K-Cl kotranszporter (NKCC) - 1 kotranszporter (Hertz et al., 2015) aktivitásának növekedését, (Jayakumar et al., 2011, 2008), valamint a vér-agy gát károsodását (Yamamoto and Nguyen, 2006). Ez utóbbi elsősorban akut májelégtelenségben jelentkezik és bár a jelenség molekuláris háttere még számos részletében nem tisztázott, a közelmúltban számos új eredmény vált ismertté (Chen et al., 2011). (Chen et al., 2013), (McMillin et al., 2015). Ezek közül kiemelendő egy citokin, a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), amelyet számos sejt képes termelni (immunsejtek, endothelium, stb.) és fontos szerepet tölt be az immunválasz szabályozásában (Jakab, 2015), valamint a fibrózis kialakulásában is. Akut májelégtelenségben a májból fokozott mennyiségben jut TGF $\beta 1$ a vérkeringésbe, mely az agyi endothel sejtekben egy endopeptidáz, az MMP-9 upregulációjához és ezáltal agyödéma kialakulásához vezet (McMillin et al., 2015). Az MMP-9 az extracelluláris mátrix egyes fehérjéit, többek között az agyi endothel sejtek közötti tight junction kapcsolat egyik fehérjéjét, az occludint enzimatikus úton bontja (Stawarski et al., 2014) ezáltal járulva hozzá a vér-agy gát permeabilitás fokozódásához és így az akut HE-ban fellépő agyödéma kialakulásához (McMillin et al., 2015).

A HE patogenezisében mindemellett szerepet kap a különféle neurotranszmitter rendszerek megváltozása is, melyek közül kiemelendő a glutamáterg neurotranszmisszió, mely eltérő módon változik meg akut illetve krónikus hiperammonémiában (Llansola et al., 2007), a GABA-erg rendszer (Salgado and Cortes, 2013), (Palomero-Gallagher and Zilles, 2013),

melynek a HE-beli alakulásával kapcsolatban ellentmondásosak a szakirodalmi eredmények (Sergeeva, 2013), valamint a dopaminerg és szerotoninergerg neurotranszmisszió, melyek krónikus HE-ban igazoltan változnak (Dhanda and Sandhir, 2015). A glutamáterg neurotranszmisszió HE-beli zavarának hátterében részben az ún. glutamát-glutamin ciklus megváltozása áll. Fiziológias körülmények között ez a folyamat felelős a glutamát szinaptikus részből történő eliminálásáért, újrahasznosításáért és az ammónia detoxifikálásáért is, ugyanis a glutamát-glutamin ciklus során az asztroglia fölveszik a neurotranszmisszió során az extracelluláris térbe kerülő glutamátot. A fölvevett glutamát, ammónia segítségével glutaminná alakul, így tehát az asztroglia nemcsak megakadályozza a glutamát szinaptikus fölhalmozódását, hanem az ammóniát detoxifikálja is (Zielińska et al., 2014). Hiperammonémia esetén (főként akut formában) fokozódik a glutamin termelés, ezáltal az fölhalmozódik az asztroglia sejtekben amely végül az asztroglia duzzadásához és ezáltal pedig agyi ödéma kialakulásához vezet, amely fatális következménnyel járhat (Bernal et al., 2007).

Az említett folyamat molekuláris háttere nem teljesen tisztázott, a magyarázatára két elmélet született. Az egyik teória szerint az asztroglia sejtekben fölhalmozódó glutamin ozmotikusan vizet vonz a sejtbe, így okozva ezzel a sejtek duzzadását (Schousboe and Sonnewald, 2016), míg az ún. *Trójai faló* elmélet (Albrecht and Norenberg, 2006) azon a feltevésen nyugszik, hogy az intracellulárisan képződő glutamin a sejt mitokondriumaiba kerül így mintegy „becsempészi” az ammóniát a mitokondriumokba, ahol enzimatis működés eredményeképpen ismét ammónia keletkezik. A mitokondrium ammóniaszint emelkedése reaktív nitrogén (RNS) és oxigén gyökök (ROS) kialakulásához vezet. Ez az oxidatív stressz meggátolja az asztroglia hatékony intracelluláris térfogatszabályozásban, tovább súlyosbítva ezzel is a cytotoxikus agyi ödémát (Zielińska et al., 2014).

A továbbiakban azok a HE patogenezisében szerepet játszó tényezők kerülnek bemutatásra, amelyek kísérleteink tárgyát is képezték.

2.2.1. A hiperammonémia

A kórképet kialakító számos tényező közül kiemelendő a megemelkedett vérammónia szint, amely nagymértékben hozzájárul az agyban zajló kóros folyamatok kialakulásához, így a klinikai tünetekhez is. Fiziológias pH-n az ammónia kation formában van jelen a vérben és a vér-agy gáton transzcellulárisan jut át, de emellett még szerepe lehet a nem ionizált ammónia pericelluláris penetrációjának is (Skowrońska and Albrecht, 2012). Az ammónia egy olyan agyagcsere termék, mely fiziológias körülmények között egyrészt a vastagbélben - és kisebb mértékben a gyomorban és a vékonybélben – zajló mikrobiális tevékenység eredményeképp,

másrészről pedig a bélhámsejtek glutamináz aktivitása révén képződik, és a portális keringésen keresztül a májba kerül, ahol a karbamid ciklus révén detoxifikálódik (Lidbury et al., 2016).

A különböző eredetű májelégtelenségek következtében csökken az ammónia detoxifikáció, illetve PSS során az ammóniában gazdag vér a máj megkerülésével közvetlenül a szisztémás keringésbe jut, így okozva megemelkedett ammóniaszintet (Holecek, 2015). A korábbi felfogás szerint az ammónia legnagyobb hányadban az exogén (a táplálékkal a szervezetbe jutó) eredetű fehérjéből származik, így a HE terápiájának lényeges elemét képezte a csökkentett fehérje bevitel alkalmazása. Ma már ez a nézet túlhaladott, hiszen kiderült, hogy a bélhámsejtekben képződő ammónia fontosabb szereppel bír (Rose, 2012).

Hiperammonémia során az egyes extrahepatikus szövetekben (agy, vázizomzat) fokozódik az ammónia eliminációja glutamin szintézis által. A keletkezett glutamin többek között az bélhámsejt a glutamináz reakció során ammóniává és glutamáttá bomlik, tovább súlyosbítva ezzel a hiperammonémia mértékét. A glutamin szintézishez szükséges glutamin szintetáz enzim, szinte kizárólag az asztrogliaokban van jelen (Suárez et al., 2002), ez lehet az egyik oka, hogy HE során ezek a sejtek károsodnak leginkább.

Krónikus esetben sokféle klinikai kép kialakulhat, ezek közül kiemelendő a HE szubklinikai formája, az úgynevezett *minimal HE* (Rovira et al., 2008). Ilyen esetekben az ún. Alzheimer II.-es típusú asztrocitózis a leginkább megfigyelhető kórszövettani elváltozás, melynek során megnagyobbodott hólyagszerű sejtmag, és szélen elhelyezkedő kromatin állomány a jellemző kép (Butterworth et al., 1987).

2.2.2. Oxidatív stressz és neuroinflammáció

A fent leírt glutamát-glutamin ciklus-, és ezzel együtt a glutamáterg neurotranszmisszió megváltozásával, továbbá a későbbiekben tárgyalt mangán szint emelkedésével szoros kapcsolatban áll az oxidatív stressz kialakulása. NADPH-oxidáz és NO-szintáz enzimek működése során reaktív oxigén- és nitrogén gyökök keletkeznek, ezek pedig bonyolult molekuláris folyamatok során az asztroglia duzzadását okozzák. A folyamatot tovább súlyosbítja, hogy, az asztroglia-duzzadás is hozzájárul az oxidatív / nitrozatív stressz kialakulásához, tehát a két folyamat egymással szoros kapcsolatban van (Lachmann et al., 2013). Számottevő bizonyíték van rá, hogy az oxidatív stressz jelentős szerepet játszik a HE patogenezisében. Ammóniával kezelt asztroglia sejttenyészeteken gyors sejtduzzadás kialakulását és reaktív oxigéngyökök képződését figyelték meg.

Egyes kutatók szerint a sejtduzzadás kialakulása túl gyors ahhoz, hogy kizárólag a glutamin ozmotikus hatásával magyarázható legyen, ez pedig arra enged következtetni, hogy az oxidatív stressznek szerepet kell játszania az ödéma kialakulásában (Görg et al., 2013).

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a gyulladás fontos szerepet játszik a HE kórfejlődésében. Azt a tényt, hogy a gyulladásos folyamatok részt vesznek HE-ban, már 1971-ben Gans és munkatársai felvetették, és azóta számos kutatás során bizonyítást nyert, hogy mind akut, mind krónikus HE során egyes gyulladásos faktorok szintje megemelkedik úgy mint, szérum tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α), az interleukin-1 β (IL-1 β) és az interleukin-6 (IL-6) (Jayakumar et al., 2015). A neuroinflammáció akut HE-ban való részvételét bizonyítja továbbá, hogy portocavalis anastomosissal rendelkező patkányokon alkalmazott gyulladáscsökkentő szer, az indometacin (a ciklooxygenáz-2 potenciális inhibitora) védő hatását bizonyították az agyi ödéma kifejlődése során (Chung et al., 2001).

Dokumentálták továbbá azt is, hogy egy a tetraciklinek családjába tartozó antibiotikum, a minociklin enyhítette az HE tüneteit és megakadályozta az agyi ödéma kialakulását kísérletesen indukált heveny májelégtelenségben. Megjegyzendő azonban az, hogy maga a minociklin májkárosodást okoz, ami kizárja annak lehetséges terápiás alkalmazását akut HE kezelése során (Jiang et al., 2009).

Bár HE-ban az asztroglia duzzadás kialakulásáért felelős pontos patofiziológiai mechanizmusok nem teljesen tisztázottak fontos megemlíteni a mikroglia szerepét. A mikroglia a központi idegrendszer elsődleges immunsejtjei, így az itt játszódó immunfolyamatokban töltenek be kulcsfontosságú szerepet. A mikroglia számos tényezővel aktiválható, beleértve a glutamátot, a citokineket, az LPS-t (ezek endotoxémia során kerülnek a szisztémás keringésbe), valamint az extracelluláris káliumot. Az aktivált mikroglia pedig felelőssé tehető gyulladásos citokinek (IL-1 α , IL-1 β és TNF- α) termeléséért, amelyek mindegyike döntő szerepet játszik a neurodegenerációban (Jayakumar et al., 2015).

Vizsgálták továbbá a mikroglia potenciális szerepét az ammónia által kiváltott asztroglia-duzzadás mechanizmusában. Ennek megfelelően az ammóniával kezelt mikroglia tenyészetéről származó médiumot, asztrogliahoz adták, ez pedig szignifikáns (32%-os) sejtduzzadást eredményezett. (Rao et al., 2013).

Míg számos bizonyíték utal arra, hogy akut HE-ban a gyulladásnak fontos szerepe lehet az agyi ödéma kialakulásában, viszonylag kevés tanulmány vizsgálta a gyulladásos folyamatok lehetséges szerepét a krónikus HE-ban megjelenő neurológiai rendellenességek során.

Újabb eredmények azonban arról számoltak be, hogy a krónikus hiperammonémia vagy epevezető lekötés mikroglia-aktiválódást eredményezett, továbbá fokozódott az indukálható nitrogén-oxid szintáz aktivitás, valamint az agyban az interleukin-1 β , és a prosztaglandin E2 szintje nőtt. Bizonyítást nyert az is, hogy ezek a változások összefüggésben voltak a kognitív és motoros funkciók változásával (Jayakumar et al., 2015). Vizsgálták azt is, hogy az ibuprofen (egy nem-szteroid gyulladáscsökkentő) mérsékelte a mikroglia-aktiválódást és helyreállította kognitív és motoros funkciókat hiperammonémiás és epevezető lekötött patkányoknál (Rodrigo et al., 2010). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a gyulladás krónikus HE során is hozzájárul a neurológiai tünetek kialakulásához (Jayakumar et al., 2015).

Amint az a fentebb említettekben kiderül, az asztroglia duzzadása (citotoxikus agyödéma) képezi az akut HE egyik legjelentősebb neuropathológiai elváltozását. Egyes tanulmányok azonosították asztroglia tenyészetekben az ammónia közvetlen hatását gyulladáshoz vezető faktorok aktiválására, így például a konstitutív nitrogén-oxid szintáz (cNOS) és a NADPH-oxidáz, valamint a reaktív oxigén- és nitrogénradikálok (RONS), foszfolipáz-2 (PLA2) és mitogén aktivált protein-kinázok (MAPK-k) aktiválódtak ammóniával kezelt asztroglia tenyészetekben. Továbbá ezen faktorok gátlása csökkentette az ammónia által kiváltott asztroglia duzzadást a tenyészetekben.

Összességében ezek a megállapítások arra engednek következtetni, hogy az ammónia képes az asztroglia duzzadást indukálni, bármely más idegsejt hatásától, vagy egyéb extracelluláris ingertől függetlenül, és hogy ezek a hatások hozzájárulhatnak akut HE-ban a citotoxikus agyödéma kialakulásához (Jayakumar et al., 2015).

Fontos azt is megemlíteni, hogy az oxidatív stressz kialakulásához és az ezzel összefüggésben lévő asztroglia duzzadáshoz az agyi endothelsejtek is hozzájárulnak, amelyek az idegrendszeri elemek közül elsőként kerülnek kapcsolatba a szisztémás eredetű ammóniával és más olyan tényezőkkel, melyek a HE kialakulásának kóroktanában szerepet játszhatnak. Az ammónia fokozza szabadgyök-termelést és NF κ B (nuclear factor- κ B, egy transzkripció faktor, amely a DNS-hez kapcsolódva, számos gén átírását aktiválja) termelést az agyi endothelsejtekben, ez pedig az asztroglia duzzadáshoz vezet. Ebben a folyamatban az ammónia mellett más tényezők is szerepet játszanak, mint például a lipopoliszacharidok, és különböző citokinek. Ezen faktorok növelik az agyi endothel sejteken megtalálható toll like receptor 4 (TLR4) fehérje expresszióját, amely hozzájárul az agyödéma kialakulásához akut HE-ban (Jayakumar et al., 2014).

2.2.3. Bakteriális transzlokáció

A bakteriális transzlokáció alatt azt a folyamatot értjük, mely során baktériumok vagy bakteriális komponensek, úgymint például endotoxinok (más néven lipopoliszacharidok, a Gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotóelemei) illetve a bakteriális DNS átjut a bél lumenéből a mezenteriális nyirokcsomókba vagy egyéb extraintesztinális szervekbe (Bellot et al., 2013; Wiest and Garcia-Tsao, 2005). Ennek során bakteriális fertőzés alakulhat ki, amely a májcirrhosis egyik gyakori szövődményét, és az egyik fő mortalitási okot jelenti (Jalan et al., 2014).

A bakteriális transzlokáció okai sokrétűek, de ezek közül fontos kiemelni a bél nyálkahártya – mint barrier – strukturális változását (Wiest and Garcia-Tsao, 2005), a bélbaktériumok túlszaporodását, valamint különféle, az epiteliális felületre szekretálódó anyagok (IgA, antimikrobiális peptidok, stb.) csökkenését (Jalan et al., 2014). A bakteriális fertőzés a HE egyik fontos kiváltó tényezőjét jelenti (Bellot et al., 2013; Jalan et al., 2014), amelyet jól demonstrál az az eredmény, miszerint a májcirrhosishoz társuló HE-ban szignifikánsan nagyobb fokú endotoxémia mérhető, mint a HE nélküli betegekben (Bajaj et al., 2012).

A bakteriális transzlokáció ezen felül szisztémás gyulladást is képes indukálni, mely az akut és krónikus májelégtelenség velejárája is lehet. A szisztémás gyulladás (SIRS: systemic inflammatory response syndrome) súlyosbíthatja a HE klinikumát és ronthatja a prognózist (Aldridge et al., 2015). Több tanulmány is foglalkozott azzal, hogy HE-ban a plazmabeli gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek (Jover et al., 2006; Tivers et al., 2014), illetve az ún. SIRS score (SIRS mérésére szolgáló paraméter) (Tivers et al., 2014), hogyan változnak.

2.2.4. Mangán

Krónikus májelégtelenségben a mangán (Mn) epével történő kiválasztása csökkenhet, amely ezáltal fokozott mértékben jelenhet meg a vérkeringésben. Májcirrhosisban szenvedő emberek esetében igazolt, hogy a mangánnak nemcsak a szérumbeli (Kobtan et al., 2016), hanem a cerebrális szintje is nő (Rose et al., 1999), továbbá a mangán vérszérumbeli szintje szignifikánsan magasabb a májcirrhosishoz társuló HE-ban, mint a HE nélküli esetekben (Kobtan et al., 2016).

Az emelkedett mangánszint jelentőségének hátterében, annak lehetséges agyödémát okozó hatása állhat, melyet *in vitro* eredmények támasztanak alá. Igazolt ugyanis, hogy a mangán asztrogliát duzzadássá képes előidézni oxidatív stressz és mitokondriális átjárhatóság növekedés révén (Rao et al., 2007).

Továbbá jelentős befolyással bír a glutamátfüggő neurotranszmisszióra, a glutaminszintetáz expressziójának és aktivitásának csökkenése valamint a glutamát és glutamin transzporterek leszabályozása révén (Sidoryk-Wegrzynowicz and Aschner, 2013).

2.3. Kutatásunk hipotézise

Néhány, a HE patogenezisében fontos szerepet játszó kóroki tényező, úgymint az ammónia, a mangán, az oxidatív stressz és az endotoxinok képesek az asztroglia sejtekben proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-1 β) termelését előidézni, ezáltal feltételezhető, hogy a HE-ban fellépő neuroinflammációért nem csupán a mikroglia sejtek, hanem az asztroglia is felelősek.

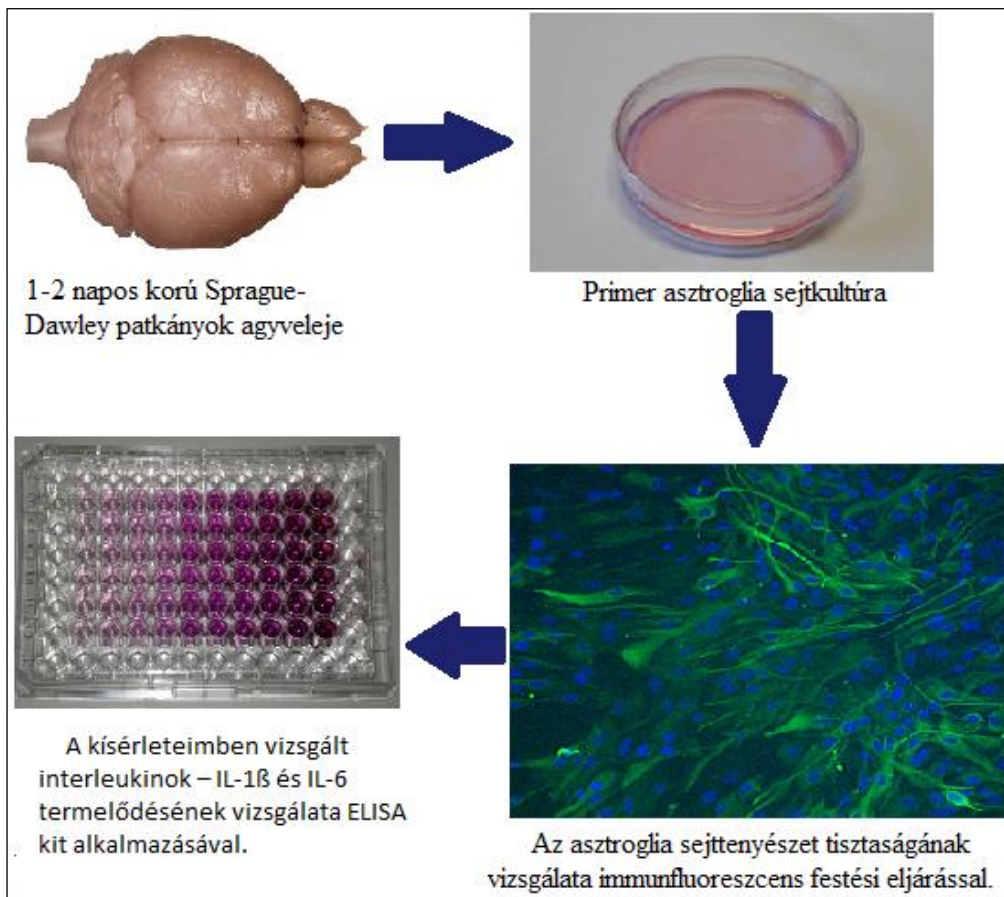
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinkhez Sprague-Dawley patkányokat használtunk, tartásuk standard körülmények között, 12 óra sötét és 12 óra világos periódust biztosító mesterséges megvilágítás mellett, a hatályos jogszabályok figyelembevételével (engedélyszám: PE/EA/1252-6/2016) történt, a száraz táp és az ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésükre.

3.1. Asztroglia sejt kultúra létrehozása

Tervezett kutatásaink célja az asztrogliák kóros szerepének vizsgálata a HE-ban fellépő neuroinflammáció tekintetében, így a kísérletek elvégzéséhez szükséges volt egy megfelelően alkalmazható *in vitro* modell létrehozása.

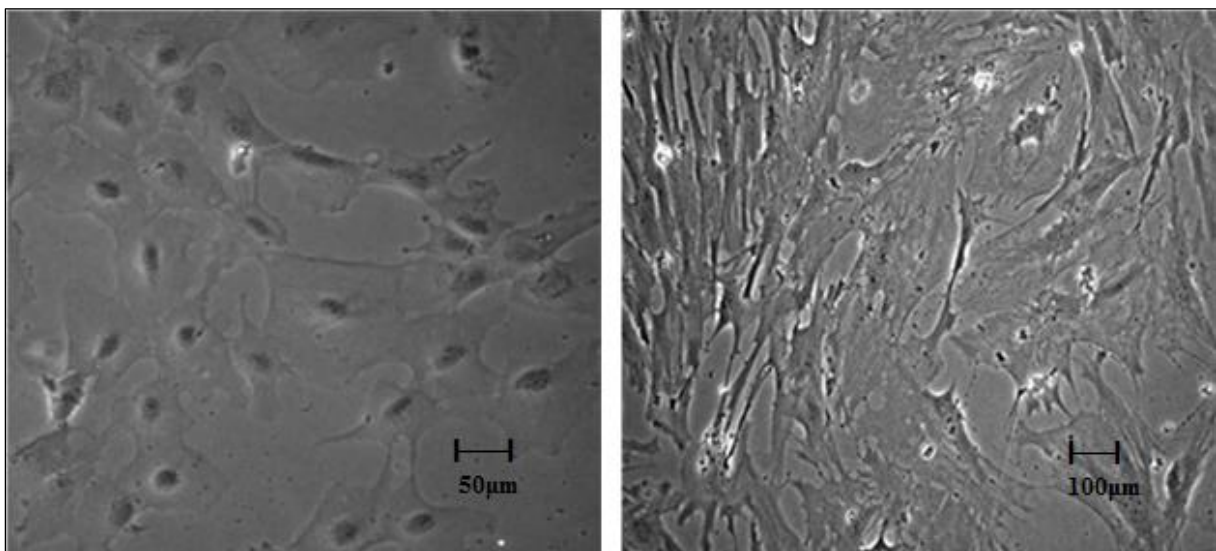
A tanszéken a korábbi munkák során kidolgozásra került az asztroglia sejtek izolálásának és tenyésztésének módszere. Ehhez, a fialás napját 0. napnak tekintve, 1-2 napos korú Sprague-Dawley patkányok teljes agyszövetét használjuk föl (1. ábra).



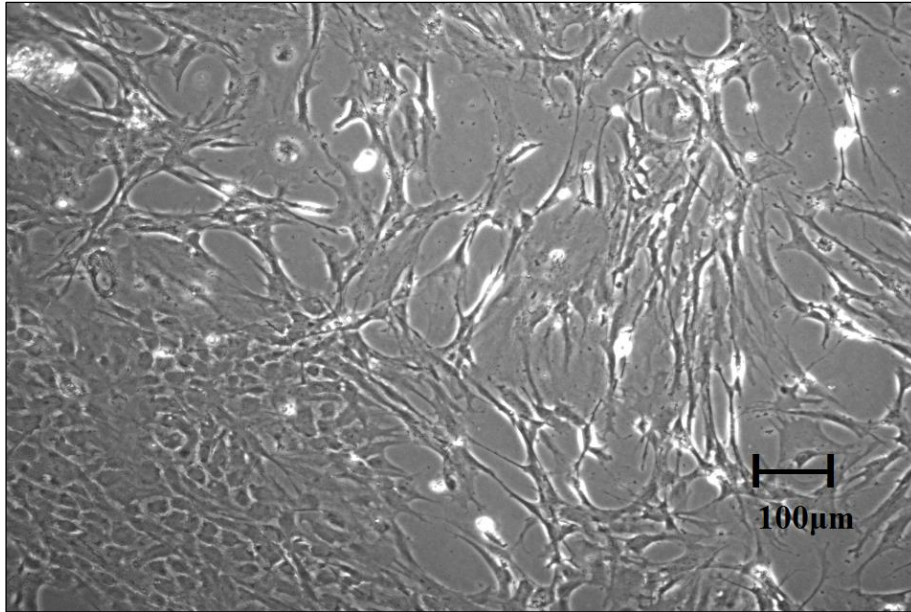
1. ábra: Primer patkány asztroglia sejt kultúra létrehozása, és ezen sejtenyészet IL-6 és IL-1 β termelésének mérése különböző ágensek hatására

Az állatok gyors dekapitálása után eltávolítjuk a teljes agyvelőt, majd az agyakat amfotericin B-t tartalmazó foszfát pufferbe (Phosphate-buffered saline; PBS) helyezzük. Következő lépésként sztereomikroszkóp alatt nagy gondossággal eltávolítjuk az agyhártyákat, majd az agyak kalciummentes PBS oldatba kerülnek. Ennek a műveletnek az a célja, hogy az erekktől megtisztítsuk az agyat, megelőzve ezzel a kiültetendő neuronális sejtek vérsejtekkel történő szennyeződését. Ezt követően az agyhártyáktól megfosztott agyagról pipettával leszívjuk a PBS oldatot, majd apró darabokra szeleteljük az agyszövetet, melyet 10 percig enzimatiskus emésztésnek vetünk alá. Ehhez EDTA-mentes tripszinhez, 0,5 ml/állat mennyiségben 5 mg/ml DNáz-t mérünk. Az emésztést előmelegített tápoldattal (5 ml/állat) állítjuk le, majd a homogenizátumot a megfelelő számú lizinezett Petri-csészébe szétosztjuk, hozzájuk adva még a kívánt mennyiségű tápoldatot (5 ml/Petri-csésze). Végül a Petri-csészéket 37°C-os hőmérsékletű és 5%CO₂-t tartalmazó inkubátorba helyezzük 12-24 órára.

Az asztroglia kultúra létrehozásának kulcsfontosságú lépése a kiültetett sejtek szövettörmelékektől való megtisztítása, annak érdekében, hogy az elhalt sejtekből kiszabadult anyagcsere termékek ne gátolják az asztroglia osztódását és fejlődését. Ehhez az előzőekben ismertetett sejtkiültetés után 12-24 órával eltávolítjuk a médiumot és friss, előmelegített médiummal határozottan, de nem túl erősen lemoszuk a sejtörmelégeket a megtapadt sejtekről. A tenyésztőmédiumot a mosást követő első napon, a továbbiakban pedig hetente kétszer cseréljük. Tapasztalataink szerint a kiültetéstől számított 2-3 hét múlva konfluens sejttenyészetet kapunk, melyet a **2. és 3. ábra** szemléltet.

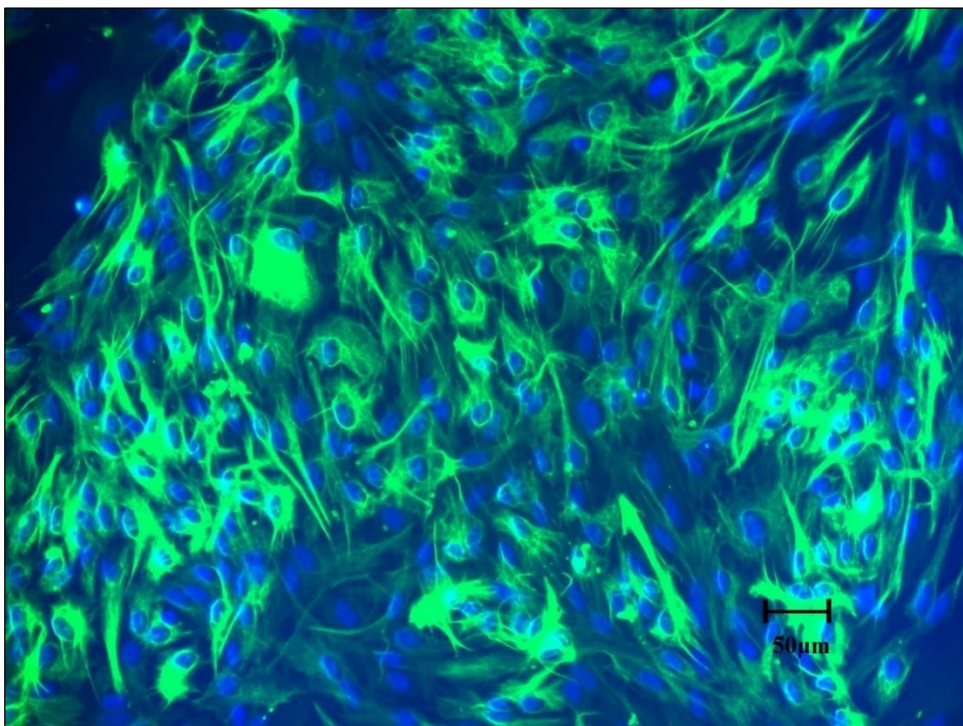


2. ábra: Primer patkány asztroglia kultúráról készült fénymikroszkópos felvétel. Bal: 1 hetes kultúra; jobb: 2 hetes kultúra



3. ábra: 2 hetes primer patkány asztroglia kultúráról készült fénymikroszkópos felvétel. Bal alsó sarok: macskakőre emlékeztető sejtalakok a nagy sejtsűrűség miatt; Jobb felső sarok: nyúlványos sejtek az alacsony sejtsűrűség következtében.

A sejt kultúra túlnyomórészt asztroglia sejtekből állt, melyet immunfluoreszcenciával (Zeiss Axio Vert.A1 típusú inverz fluoreszcens mikroszkóp) igazoltunk (glial fibrillary acidic protein: GFAP; 4', 6-diamidino-2-fenil-indol: DAPI). A GFAP és DAPI markerek alapján megállapított asztroglia-arány elérte a 85-90%-ot, (**4.ábra**)



4. ábra: Primer patkány agyi asztroglia kultúra immunfluoreszcens felvétele (GFAP és DAPI festés)

3.2. Asztrogliá sejt-kultúra passzálása

Miután az izolált sejtekből konfluens, primer asztrogliá monolayer alakul ki a tenyésztőedényben, következhet a sejttenyészet passzálása. Ha a kultúrákat a fenntartás első hetében felhasználjuk, relatíve nagy tisztaságú asztrogliá kultúrával dolgozhatunk a továbbiakban. A Petri-csészében növekvő primer gliasejteket a következőképpen passzáljuk:

- A passzáláshoz szükséges oldatokat előmelegítjük termosztátban
- A csészéről óvatosan leszívjuk a tápfolyadékot
- A konfluens gliá monolayert PBS-sel átmoszuk, ezzel semlegesítve a maradék médiumot.
- Következő lépésként leszívjuk a PBS-t a sejtekről, majd tripszinnel inkubáljuk (4ml PBS + 1ml 0,25% tripszin), amely enzimatikusan bontja a sejtek kitapadását okozó fibrin szálakat
- Inkubáció termosztátban, miközben a sejtek felválását, mely a kísérleteink során rendszerint mintegy 15 perc alatt következett be, mikroszkóp alatt ellenőrizhetjük
- Ezt követően főtális borjú savó (fetal calf serum: FCS; 10%) tartalmú tápoldattal leállítjuk az emésztést és a még letapadt sejteket is finoman felmoszuk a csésze aljáról
- A sejtszuszpenziót lecentrifugáljuk (10 perc, 1000 rpm, szobahőmérséklet), majd a sejteket friss médiumban föl vesszük
- A Bürker-kamrával elvégzett sejtszámolás után kiültetjük a sejteket Poly-L-Lysinnel kezelt plate-ekre (24-es plate esetén 100-150000 sejt / lyuk, 96-os plate esetén 20-75000 sejt / lyuk)
- A plate lyukaiba juttatott sejt+tápoldatot kiegészítjük adott mennyiségű médiummal

3.3. Mikroglia-eltávolítás a sejt-kultúrából

Az intenzív kutatások eredményeként ma már ismert, hogy az asztrogliák neurobiológiai szerepe sokkal összetettebb, mint ahogy azt korábban feltételeztük. Ezeknek a vizsgálatoknak az *in vitro* modelljét gyakran primer patkány-agyi asztrogliá sejt-kultúrák képezik. A sejt-kultúra kidolgozására az 1970-es években leírt eredeti módszer óta számos módosítás történt, ráadásul szinte minden laboratórium kidolgozza a számára legmegfelelőbb protokollt. Fontos tény azonban, hogy egy módszer sem eredményez 100%-ban asztrogliákból álló kultúrát.

A fő probléma a mikroglia jelenlétével az, hogy már kis mennyiségük is felelős lehet a megfigyelt hatások nagy részért még akkor is, ha a tenyészetben az asztroglia a dominánsan jelenlévő sejtek, így a mikroglia megzavarhatja az asztroglia specifikus válaszainak felderítését célzó tanulmányok eredményeit (Saura, 2007).

Az asztroglia tenyészet mikroglia mentesítésére többféle módszer létezik, kísérleteink során mi egy mitózis inhibitor, a citozin β -D-arabinofuranozidot (Ara-C), majd egy lizozomotrop ágens, a leucin-metilésztert (LME) alkalmaztuk a konfluens asztroglia kultúrán. Ez a módszer úgy távolítja el a mikroglia a sejt tenyészetből, hogy közben egy életképes, működő és konfluens asztroglia -monolayer marad vissza (Uliasz et al., 2012).

A fent említett protokoll szerint 10 μ M-os Ara-C-vel 3 napig, majd 75 mM-os LME-vel 1 óráig kell kezelni a tenyészetet, azonban saját kísérleti körülményeink között ez a protokoll nem működött megfelelően, mivel ez a sejtek szabad szemmel is megfigyelhető halálát okozta (a sejtek szabad szemmel is látható módon összezsugorodtak). Az említett sejthalál pontos okának kiderítése céljából a következő AraC illetve LME kezelések történtek:

- kizárólag AraC-kezelés
- AraC + LME-kezelés médiumcsere nélkül
- AraC + LME-kezelés médiumcserével
- kizárólag LME-vel történő inkubáció

Eredményül azt kaptuk, hogy ugyan a kizárólag AraC-vel történt kezelés nem idézett elő sejthalált, az összes többi kezelési csoportban ismét szabad szemmel is látható összezsugorodást lehetett megfigyelni. Ebből kifolyólag valamint a szakirodalomban alkalmazott LME-koncentrációk nagyfokú heterogenitása miatt alacsonyabb (75 mM-nál kisebb) koncentrációjú LME-vel elvégzett inkubációk kerültek kipróbálásra, melyek a következő idő+koncentráció kezelési kombinációkat jelentették:

- 5 mM LME, 8 órán át
- 15 mM LME 1 valamint 2 órán át
- 25 mM LME 1 órán át

A kísérleteink egyik koncentrációnál sem eredményeztek szignifikáns, propidium jodid (PI)-festéssel kimutatható sejthalált, így a további vizsgálatainkat, -tehát az interleukin-méréseket (IL-6, IL-1 β)- már a 25 mM-os LME-vel kezelt sejt kultúrákon végeztük el.

Hogy kiderítsük, sikeres volt-e a mikroglia mentesítés, a sejteket először 4', 6-diamidino-2-fenil-indollal (DAPI) festettük meg. Ez egy fluoreszcens festék, amely erősen kötődik az A-T gazdag régiókhoz a DNS-ben.

Mivel a DAPI képes áthatolni az ép sejtmembránon, felhasználható mind az élő, mind az elhalt sejtek megfigyelésére, így az összes sejtszám meghatározására. Következő lépésként GFAP marker alkalmazásával tudtuk elkülöníteni az asztrogliaikat a mikrogliaiktól, hiszen a GFAP filament-fehérjét a glia sejtek közül csak az érett asztrogliaik termelik.

3.4. Vizsgált ágensek optimális koncentrációjának beállítása

A nagy tisztaságú primer patkány asztroglia kultúra sikeres létrehozását követően célunk egy olyan optimális H_2O_2 koncentráció megtalálása volt, amellyel kezelve a sejteket kiváltható az oxidatív stressz állapota anélkül, hogy az számottevő sejthalálhoz vezetne. Az oxidatív stressz, az oxidánsok (szabadgyökök) és az antitoxidánsok közötti egyensúlyhiány az oxidánsok javára, mely a redox jelátvitel és szabályozás- illetve molekuláris károsodáshoz vezet (Sies, 2015). Bár a korábbi felfogás szerint a reaktív oxigéngyökök (ROS) az élő szervezetre kizárólag káros hatással bírnak, ma már ismert, hogy az oxidatív stressz kiváltása mellett szerepük van a celluláris homeosztázis megvalósításában is (Lushchak, 2014).

A H_2O_2 egy olyan reaktív oxigén gyök, mely oxidatív folyamatokat indít be a sejtekben, tehát felborítja a redox státuszt a sejten belül azáltal, hogy további szabad gyökök keletkeznek. A H_2O_2 citotoxikus hatása mind nagyfokú ROS termeléshez-, mind az apoptotikus sejthalálra jellemző morfológiai elváltozásokhoz vezetett (Hamdi et al., 2011). A hidrogén peroxid használata egy általánosan elfogadott módszer a ROS termelés kiváltására, így gyakran alkalmazzák más kísérleti körülmények között is (Bi et al., 2008; Liu et al., 2015; Souza et al., 2013).

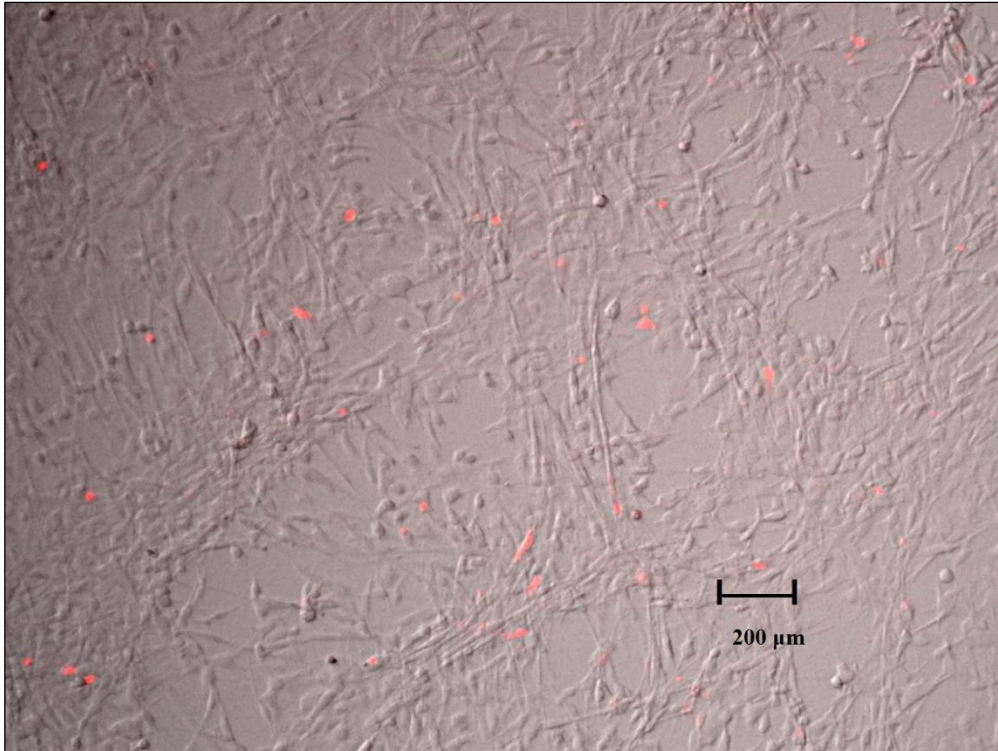
Az optimális koncentráció kiválasztásához a fent leírtak szerint elkészült asztroglia kultúrát növekvő töménységű H_2O_2 -val kezeltük 1 órán át, majd egyrészt a termelődött ROS koncentrációt mértük meg, másrészt a sejtek elhalásának mértékét vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott H_2O_2 koncentrációk a következők voltak: 0 μM (kontroll), 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 300 μM és 400 μM . A termelődött ROS koncentráció méréséhez az 5-6-chloromethyl 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetátot (CM-DCFH-DA, Thermo Fisher) használtuk, amely molekula indikátora a sejten képződő reaktív oxigén gyököknek. Az indikátor diffúzióval a sejtekbe jut, majd az intracelluláris észteráz bontja egy olyan molekulává, amely nem tud kijutni a sejtekből. Ez a nem fluoreszcens molekula felhalmozódik a sejten belül és itt oxidálódik, így fluoreszcens DCF képződik (Eruslanov and Kusmartsev, 2010), melyet fluoreszcens spektrofotométerrel (Perkin Elmer, Victor X2) mértük meg.

A CM-DCFH-DA alkalmazásával történő ROS-mérést szakirodalmi adatok (Hamdi et al., 2011) valamint a cikk egyik szerzője Olfa Masmoudi személyes javaslatai alapján végeztük el:

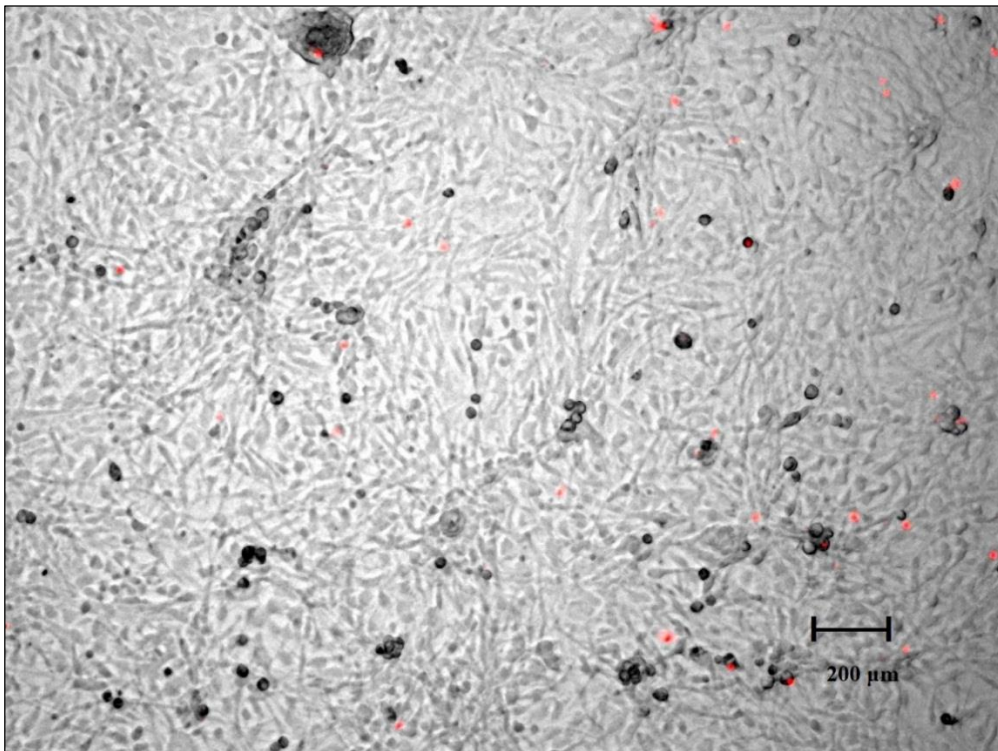
- asztroglia sejteket 24 lyukú plate-re passzáltuk
- 10 μM CM-DCFH2-DA-val és szérum-mentes médiummal 30 percig, 37°C-on inkubáltuk
- PBS-sel 2× átmostuk
- adott koncentrációjú H_2O_2 -vel kezeltük, majd inkobáltuk
- rögtön az inkubáció után következik az eredmény leolvasása fluoreszcens microplate olvasóval - excitáció: 485 nm, emisszió: 538 nm - anélkül, hogy mosnánk vagy lizálnánk a sejteket.

A sejtek elhalásának mértékét PI festéssel vizsgáltuk, Ez egy kisméretű fluoreszcens molekula, amely kötődik a sejt DNS-hez, azonban nem képes passzívan bejutni olyan sejtekbe, amelyek intakt plazmamembránnal rendelkeznek. Így a sejtek általi PI felvétel felhasználható az elpusztult és az élő sejtek megkülönböztetésére, mivel a molekula csak az elhalt sejtekbe jut be, függetlenül a sejt halálának mechanizmusától. A PI-t a 400 és 600 nm közötti hullámhosszok gerjesztik, és 600 és 700 nm közötti hullámhosszon fényt bocsát ki, ezért kompatibilis az flow cytometriás eljárásokban általánosan alkalmazott lézerekkel és fotodetektorokkal (Crowley et al., 2016). A PI-vel történő kezelés behatási ideje 4-5 perc, ezután médiumcsere következik, melyet PBS-el is lehet helyettesíteni.

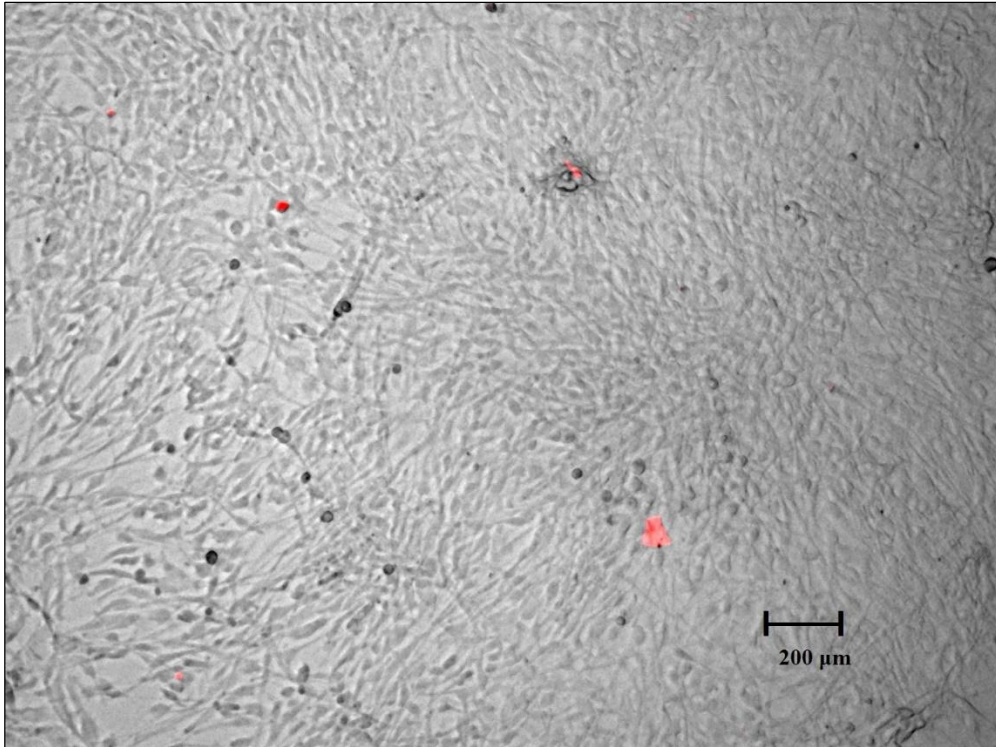
Az optimális H_2O_2 - koncentráció kiválasztása után a többi vizsgált faktorra vonatkozóan is végeztünk sejtelétkéesség vizsgálatokat. Minden ágens esetében (LPS, Mn, NH_4Cl) elmondható, hogy a legmagasabb alkalmazott koncentráció-idő kombináció esetében sem volt számottevő mértékű sejthalál. Az **5. ábrán** a LPS-dal, a **6. ábrán** a Mn-al, a **7. ábrán** az NH_4Cl -dal történő legmagasabb koncentráció-idő kombinációjú kezelés utáni PI-os sejtelétkéesség vizsgálata látható. Elmondható, hogy a sejtes kontrol vizsgálatához képest a sejtelhalás mértéke (**8. ábra**) sem volt kifejezett egyik faktor esetében sem.



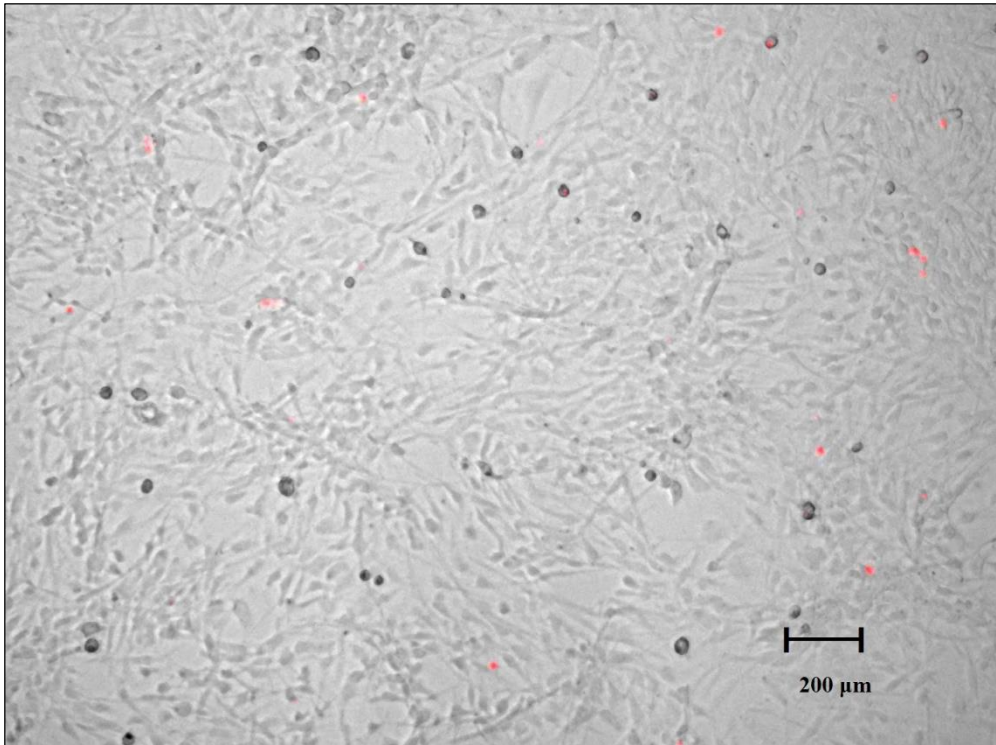
5. ábra: 2 hetes primer patkány asztroglia kultúrán végzett sejthalál vizsgálat 1000ng-os LPS-al 18 órán át tartó inkubációt követően. Az elhalt sejtek a piros színnel fluoreszkáló propidium jodiddal festődnek.



6. ábra: 2 hetes primer patkány asztroglia kultúrán végzett sejthalál vizsgálat 100 μM -os Mn-al 18 órán át tartó inkubációt követően. Az elhalt sejtek a piros színnel fluoreszkáló propidium jodiddal festődnek.



7. ábra: 2 hetes primer patkány asztroglia kultúrán végzett sejthalál vizsgálat 20 mM -os NH_4Cl -al 18 órán át tartó inkubációt követően. Az elhalt sejtek a piros színnel fluoreszkáló propidium jodiddal festődnek.



8. ábra: 2 hetes primer patkány asztroglia kultúrán végzett sejthalál vizsgálat kontrol sejtenyészetben. Az elhalt sejtek a piros színnel fluoreszkáló propidium jodiddal festődnek.

3.5. Asztroglia tenyészet citokin termelésének vizsgálata

Kísérletünk befejező szakaszában azt vizsgáltuk, hogy az asztroglia egyes HE-ban jelenlévő anyagok hatására milyen mértékben termelnek citokineket vagyis mennyiben játszanak szerepet a neuroinflammáció kialakulásában. Ehhez az asztroglia különböző, a HE-ban igazoltan etiológiai tényezőként szerepet játszó ágensekkel kezeltük, úgymint az oxidatív stresszt előidéző reaktív oxigén gyökök, ammónia, mangán valamint bakteriális endotoxinok (lipopoliszacharidok).

Az asztroglia citokin termelése lipopoliszacharidok (LPS) hatására igazolt számos tanulmány által (Forshammar et al., 2011; Hutchison et al., 2013; van Neerven et al., 2010). Az LPS a HE-ban kialakuló bakteriális transzlokáció eredményeként kialakult endotoxémia során kerülnek a szisztémás keringésbe és különböző citokinekkal együtt növelik az agyi endothelialis sejteken megtalálható toll like receptor 4 fehérje expresszióját, amely az asztroglia duzzadásához és patkányokon agyödéma kialakulásához vezet akut HE során (Jayakumar et al., 2014).

A HE pathogenezisében bizonyítottan kulcsszereppel bíró ammónia, illetve az oxidatív stresszt okozó H_2O_2 mellett kiemelendő a mangán szerepe, amelynek szintje májcirrhosisban szenvedő emberekben, nemcsak a vérben hanem az agy bizonyos területein is megemelkedik, ráadásul a vérszérum mangánszintje pozitív korrelációt mutat a kialakult HE súlyosságával (Kobtan et al., 2016a; Krieger et al., 1995).

Kísérletünkben az asztroglia sejt kultúrát 6 illetve 18 órán át kezeltük:

- 100ng és 1000 ng LPS-el
- 20 μ M, és 100 μ M Mn-al,
- 5 mM és 20 mM NH_4CL -el,

Továbbá 1 illetve 6 órán át inkubáltuk:

- 50 μ M és 100 μ M H_2O_2 -vel

A kezelések idejét és plate tervét a 2. táblázat szemlélteti:

	6 óra		18 óra		csoportok
LPS	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	1
LPS	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	2
Mn	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M	3
Mn	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	4
NH ₄ Cl	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5
NH ₄ Cl	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	6
	1 óra		6 óra		
H ₂ O ₂	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M	7
H ₂ O ₂	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	8
	1	2	3	4	

2. Táblázat A primer patkány asztroglia kultúrák kezelési terve a HE-ban szerepet játszó faktorok vizsgálata céljából

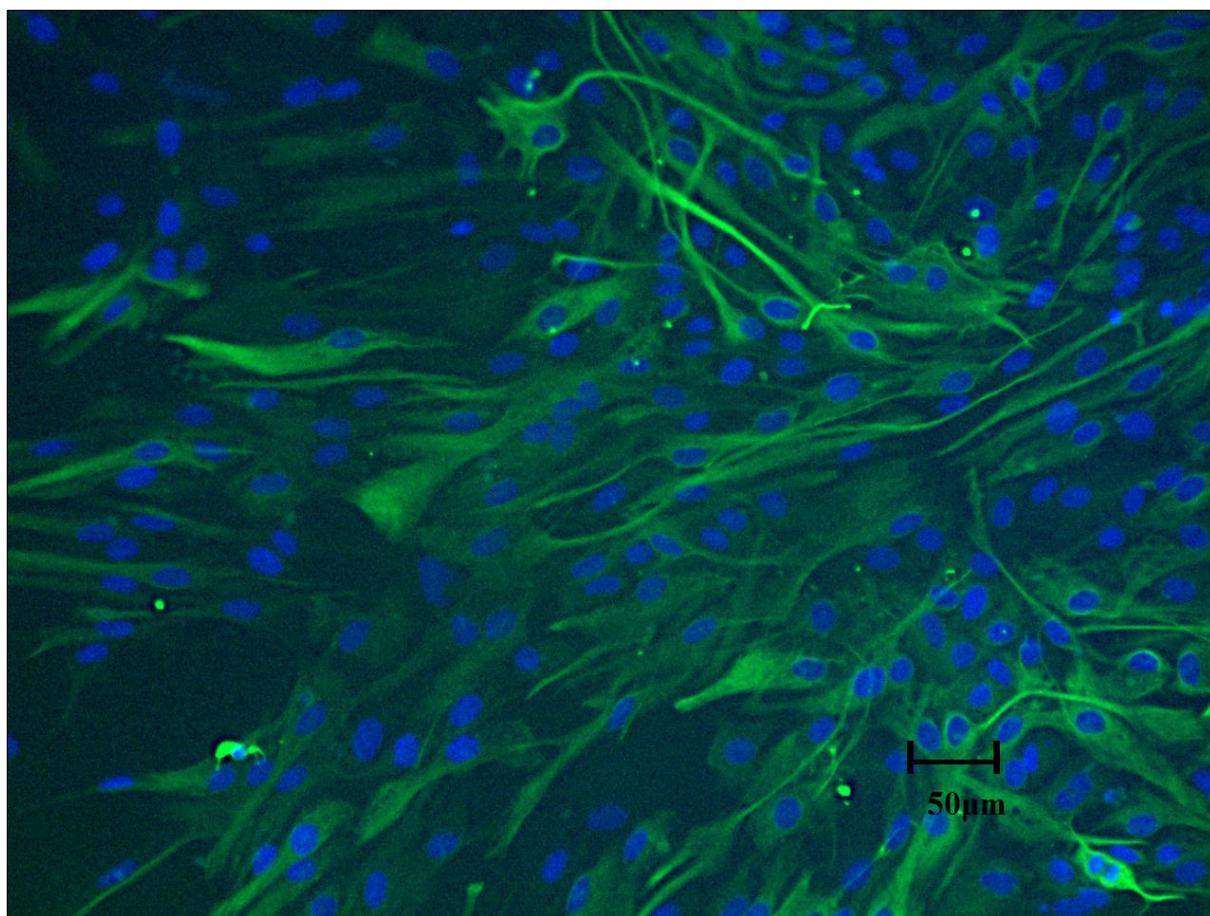
A kezelések elvégzése után az IL-1 β és IL-6 termelődését vizsgáltuk IL-1 β ELISA kit és IL-6 ELISA kiteken (Sigma-Aldrich), ELISA reader (Multiscan GO W/O Cuvette incl dDROP Plate) alkalmazásával. Minden kezelés esetében három mérést végeztünk, és a kapott eredmények átlagával dolgoztunk tovább. Ezen citokinek minimálisan detektálható mennyisége 80 pg/ml. A mérés kivitelezése után azonnal le kell olvasni az eredményt 450 nm hullámhosszúságú fényben. Az IL-mérések eredményét optikai denzitásban (OD) kapjuk meg, ezt az adott IL ismert koncentrációjú hígítási sorának segítségével tudtuk koncentrációba átszámolni. (ld. eredmények).

Az eredmények kiértékelés Microsoft Excel, a szignifikancia vizsgálatok ($p < 0,05$) pedig az R statisztikai program segítségével történtek.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A mikroglia-eltávolítás sikerességének ellenőrzése

A konfluens asztroglia tenyészetet Ara-C-vel, majd LME-vel történő kezelése után, a mikroglia mentesítés eredményességét immunfluoreszcenciával ellenőriztük. Az alkalmazott DAPI festéssel az összes sejtszám-, GFAP marker alkalmazásával pedig az asztrogliaszám meghatározását végeztük el. Az immunfestést követően sejtszámolással igazoltuk, hogy a mikroglia-mentesített tenyészetekben az asztrogliaák száma az összes sejtszámhoz viszonyítva nagyobb mint 90% (9. ábra).

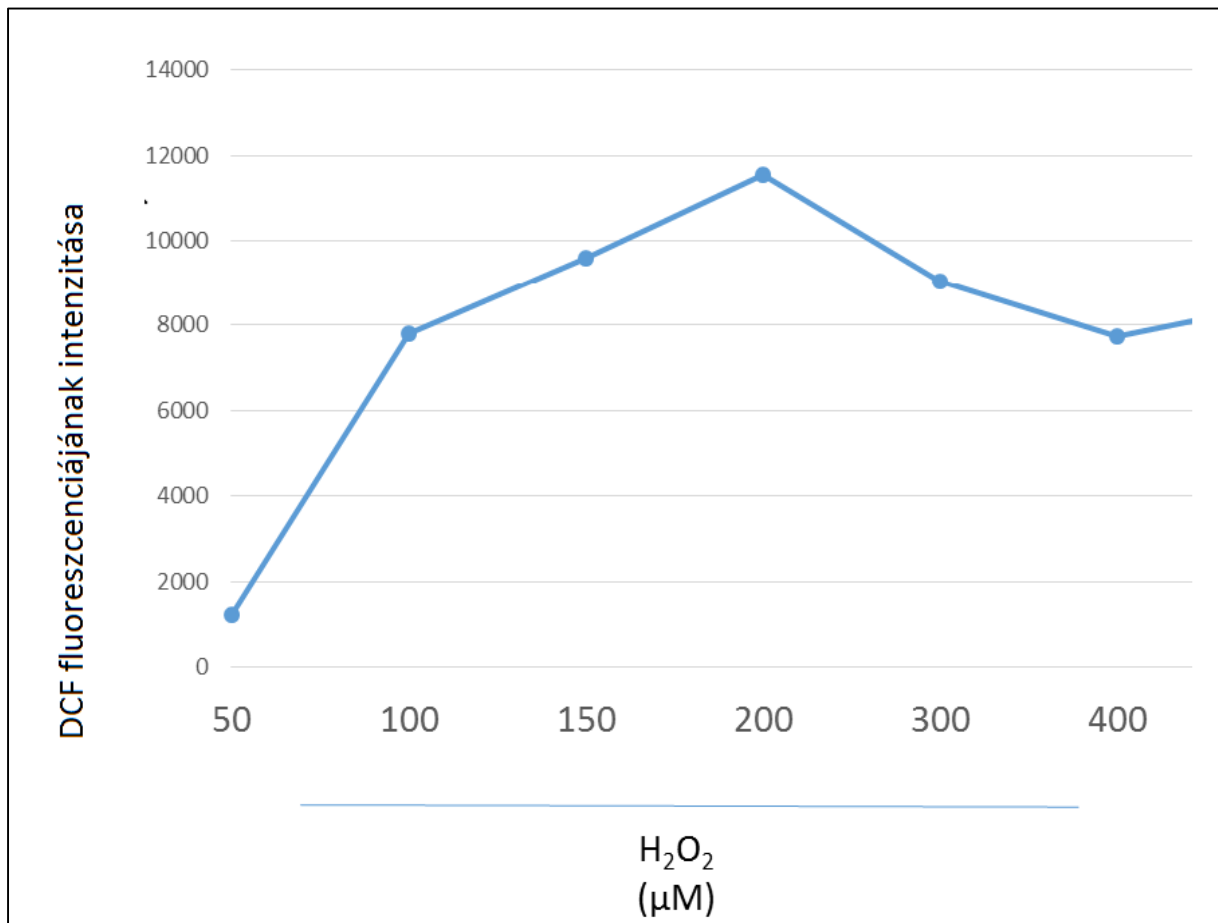


9. ábra: Immunfluoreszcens festési eljárás. Az asztrogliaákban található GFAP filament-fehérjét az alkalmazott marker zöld színűre, a sejtekben található nukleinsavat a DAPI kék színűre festi. A képen szabad szemmel is jól látható, az asztrogliaák túlsúlya a mikrogliaakkal szemben.

4.2. Alkalmazandó H₂O₂ koncentráció beállítása

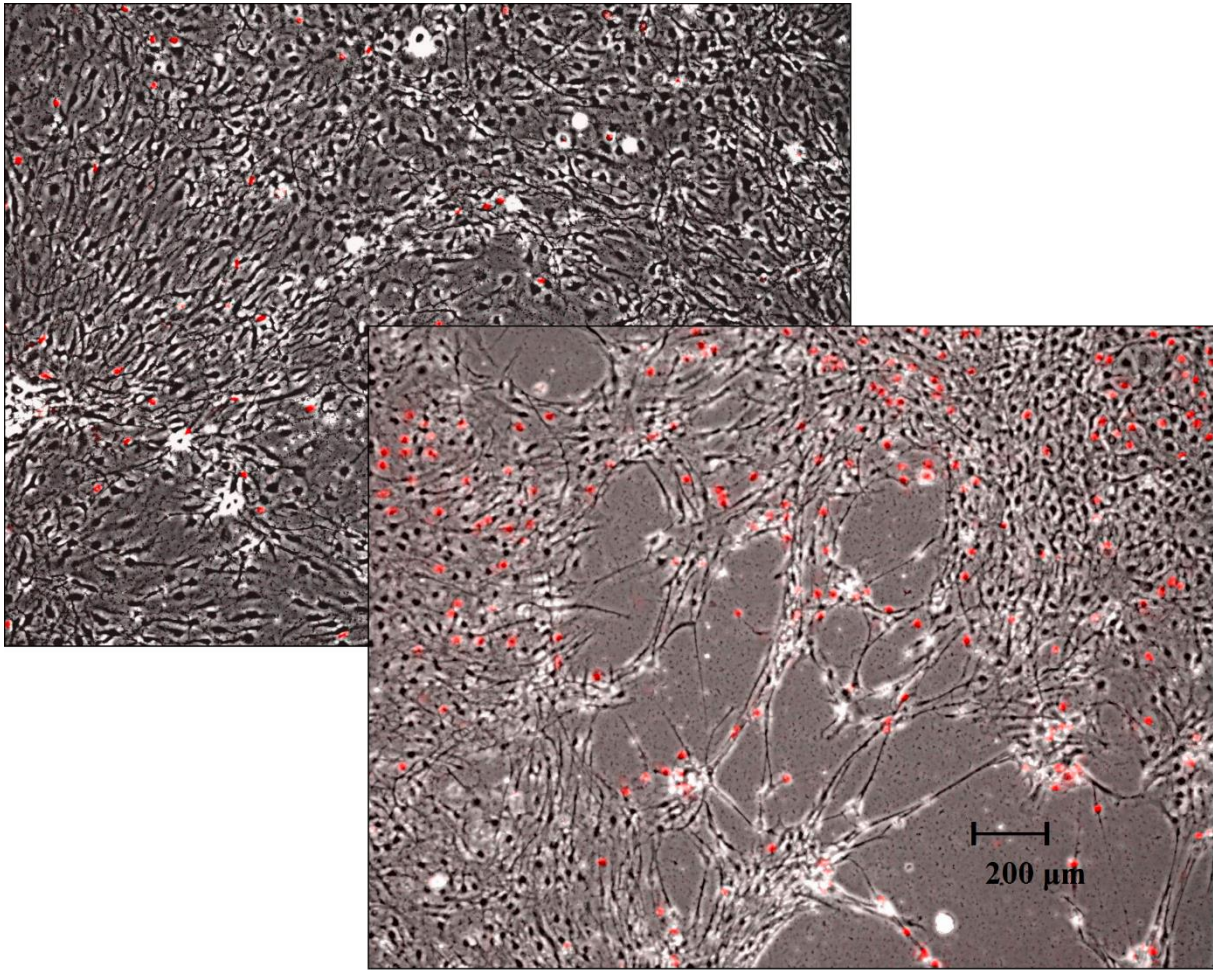
Az optimális H₂O₂ koncentráció kiválasztásához egyrészt az asztroglia sejtek által termelt ROS koncentrációt mértük meg, másrészt a sejthalál mértékét vizsgáltuk.

A sejteken belül termelődött ROS-mérést CM-DCFH-DA segítségével végeztük növekvő koncentrációjú H_2O_2 kezelések során (**10. ábra**).



10. ábra: a H_2O_2 hatására termelődött ROS mérése fluoreszcencián alapuló eljárással CM-DCFH-DA alkalmazásával. Az y-tengelyen a DCF fluoreszcenciájának intenzitása, az x-tengelyen az alkalmazott H_2O_2 koncentrációk kerültek ábrázolásra.

A sejthalál mértékét PI alkalmazásával vizsgáltuk, mely egy, az elhalt sejtek jelölésére alkalmas fluoreszcens festési eljárás (**11. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy a 100 μM -nál nagyobb koncentrációjú H_2O_2 , már számottevő mennyiségű sejt elhalását okozza.



11. ábra: 2 hetes primer patkány asztroglia kultúrán végzett sejthalál vizsgálata növekvő koncentrációjú (50,100,200,400 μM) H_2O_2 kezeléseket követően. A fenti képeken a 100 μM -os (háttérben) és a 200 μM -os (előtérben) kezelések láthatóak. Az elhalt sejtek a piros színnel fluoreszkáló propidium jodiddal festődnek.

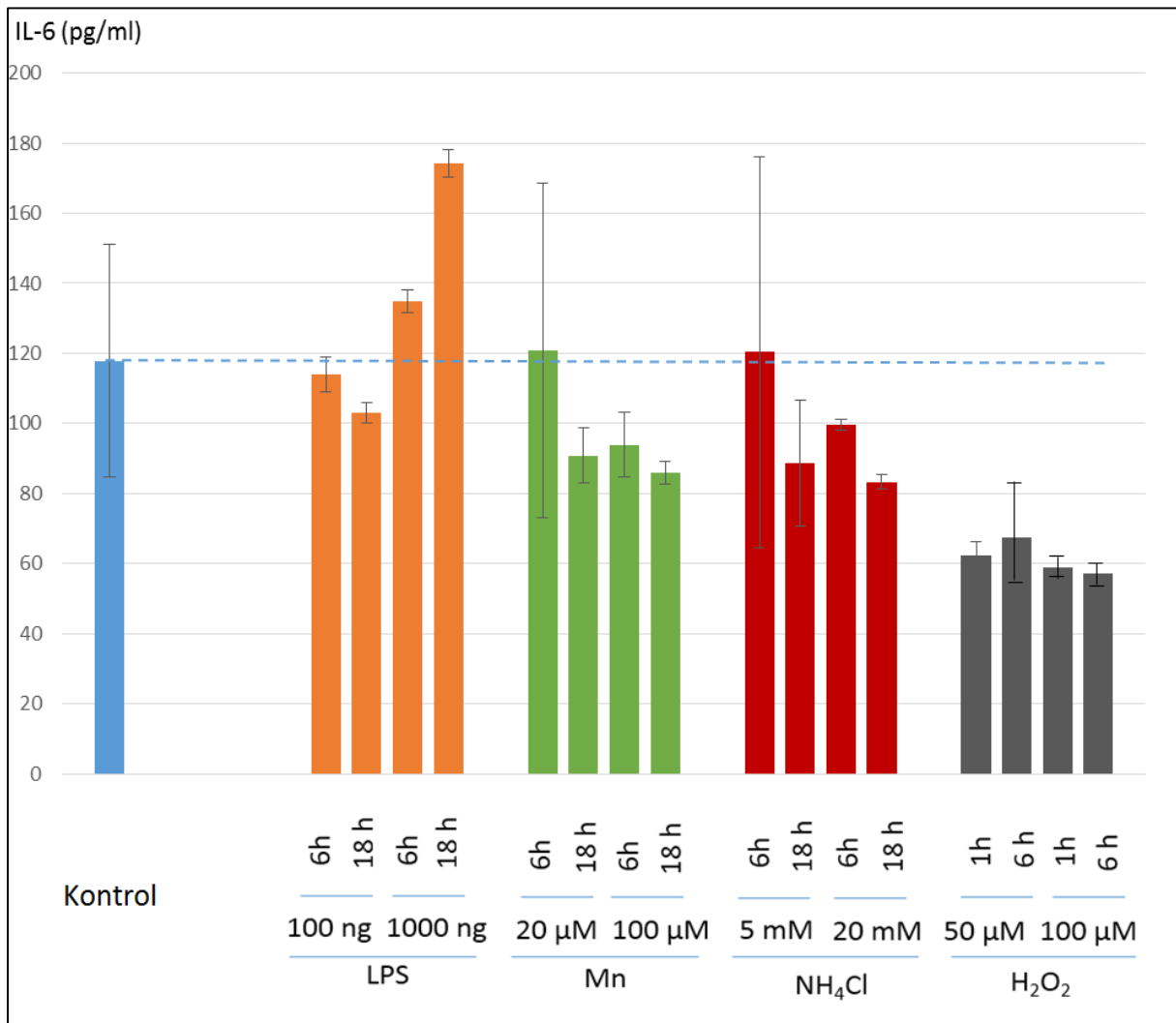
Miután meghatároztuk a H_2O_2 hatására termelődött ROS mennyiségét CM-DCFH-DA módszerrel, és a sejthalál mértékét PI-al, arra a következtetésre jutottunk, hogy további kísérleteink elvégzésére az 50 μM és 100 μM -os koncentrációjú H_2O_2 alkalmas, mert ez a mennyiség már mérhető oxidatív stresszt idéz elő a sejtekben, de még nem öli el nagymértékben azokat.

4.3. Asztroglia tenyészet citokin termelésének meghatározása

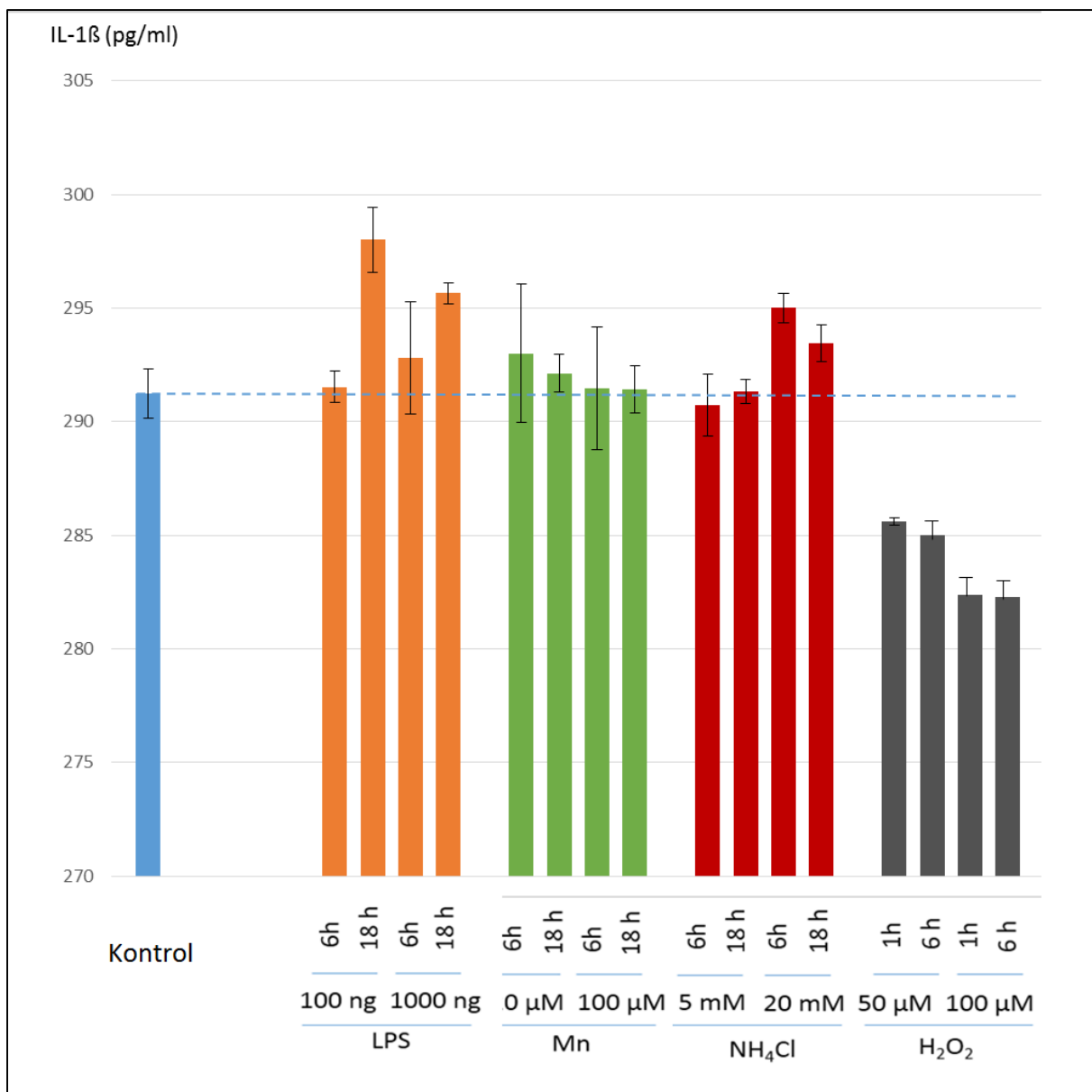
Az interleukin-méréseket ELISA reader segítségével, 450 nm-en végeztük el. Ennek során az adott interleukinből egy standard hígítási sort készítettünk, majd lemértük ezeknek az oldatoknak az optikai denzitását (OD).

Az ebből nyert pontdiagrammra egy exponenciális görbét illesztettünk, majd ennek a függvénynek az egyenlete segítségével meghatároztuk, hogy az egyes minták lemért, átlagos abszorbancia-értékei pontosan mekkora koncentrációértékeknek felelnek meg.

A különböző ágensek hatására az asztroglia által termelt IL-6 koncentrációkat a **12. ábra**, az IL-1 β koncentrációkat az **13. ábra** szemlélteti.



12. ábra: Nagy tisztaságú asztroglia tenyészet IL-6 termelése, LPS, mangán, ammónium-klorid és H₂O₂ hatására. Az x-tengelyen az egyes kezelési csoportok, az y-tengelyen pedig a mért koncentráció-értékek (pg/ml) és a hozzájuk tartozó szórások kerültek ábrázolásra. szaggatott vonal: kontrol n=5



13. ábra Nagy tisztaságú asztroglia tenyészet IL-1 β termelése, LPS, mangán, ammónium-klorid és H₂O₂ hatására. Az *x-tengelyen* az egyes kezelési csoportok, az *y-tengelyen* pedig a mért koncentráció-értékek (pg/ml) és a hozzájuk tartozó szórások kerültek ábrázolásra. szaggatott vonal: kontrol n=5

A kísérleteink eredményeiként elmondható, hogy a primer patkány asztroglia sejtek képesek fiziológiás körülmények között, detektálható mennyiségű IL-1 β és IL-6 termelésre. Emellett a vizsgált faktorok – melyek szakirodalmi adatok alapján mind szerepet játszanak a HE patogenezisében – nem okoztak szignifikáns növekedés az IL-1 β és IL-6 termelésben. Érdekes megemlíteni, hogy H₂O₂ hatására csökkent az IL termelés mértéke, bár ez a csökkenés sem szignifikáns értékű.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az eredmények értékelése

A konfluens asztroglia sejt kultúra létrehozása és mikroglia mentesítése az immunfluoreszcencián alapuló vizsgálataink szerint (DAPI festés és GFAP marker alkalmazása) sikeresnek bizonyult. A nagy tisztaságú tenyészet létrehozása kulcsfontosságú tényező a mérések kivitelezése szempontjából, hiszen szakirodalmi adatok szerint már kis mennyiségű mikroglia-szennyeződés is felelős lehet a megfigyelt hatások nagy részért, és megzavarhatja az asztroglia specifikus válaszainak felderítését célzó tanulmányok eredményeit (Andersson et al., 2005).

Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy az asztroglia különböző stimulusok, úgymint IL-1 β (Sharma et al., 2007), LPS (Hutchison et al., 2013; Souza et al., 2013; van Neerven et al., 2010), H₂O₂ (Souza et al., 2013), és laktát (Andersson et al., 2005) hatására képesek citokinek és kemokinek termelésére, de a kutatások többségében vagy más kísérleti körülmények között vizsgálták az adott citokinek asztroglialis termelését, mint a mi általunk alkalmazott kísérleti elrendezés vagy pedig egyáltalán nem áll rendelkezésre adat az adott stimulus IL-6 vagy IL-1 β termelődésre kifejtett hatásáról.

A különböző ágensekkel (LPS, Mn, NH₄Cl, H₂O₂) történő kezelés eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a sejtes kontroll csoporthoz képest egyik tényező sem növelte szignifikáns mértékben az IL-termelést.

A kísérleti körülményeink között az LPS egyetlen koncentráció-idő kombinációban sem okozott szignifikáns interleukin-termelést, habár a 18 órán át alkalmazott 1000 ng-s koncentráció jelentős mértékű (de nem szignifikáns) IL-6-termelést okozott. Ezzel szemben van Neerven és mtsai (van Neerven et al., 2010) alacsonyabb LPS-koncentrációt alkalmazva is már szignifikáns IL-6 és IL-1 β termelődést tapasztaltak a mi általunk alkalmazott sejt kultúrával megegyező tisztaságú asztroglia kultúrában, azzal a különbséggel, hogy az említett kutatók egér asztroglia kultúráján végezték a vizsgálatokat. Egy másik tanulmány az LPS hatására szintén szignifikáns növekedést talált IL-1 β fehérje expresszió tekintetében már rövidebb idejű inkubációt követően is, viszont az LPS esetén alkalmazott koncentrációról ez esetben nem áll rendelkezésre adat (Liang et al., 2012).

Az LPS-hez hasonlóan a mangán sem idézett elő az IL-6 / IL-1 β -termelésben szignifikáns változást.

Ismereteink alapján nincs szakirodalmi adat arra vonatkozóan, hogy a asztroglia termelnek-e citokineket mangán hatására, így az eredményünk más irodalmi eredmények alapján történő értékelése nem lehetséges. Mindemellett igazolt, hogy a mikroglia csak a már citotoxikus koncentráció-szintet elérő mangán hatására képesek szignifikánsan több IL-6-ot expresszálni, amely bizonyos mértékben alátámasztja az általunk végzett kísérlet eredményeit (Filipov et al., 2005). Ugyanez a tanulmány beszámolt arról is, hogy a mangán potenciózza az LPS által kiváltott IL-6-termelést a mikroglia sejtekben, amely indokolttá teheti az általunk használt ágensek kombinálását a jövőbeni kísérleteinkben.

Az ammónia bizonyítottan központi szerepet játszik a HE patogenezisében számos kórfolyamat előidézése révén (ld. korábban), de a neuroinflammációban betöltött szerepéről kevés adat áll rendelkezésre. Ennek ellenére szakirodalmi adatok alapján feltételezhető lenne, hogy az ammónia képes citokin-termelés kiváltására, ugyanis ammóniával kezelt asztroglia kultúrákban a nuclear factor κ B (NF κ B) aktivációja következik be (Sinke et al., 2008), amely egy olyan transzkripció faktor, amely számos citokin és kemokin génjének transzkripcióját képes aktiválni (Schetter et al., 2010). Egy *in vitro* kísérlet 5% valamint 10% mikroglia arány mellett vizsgálta az asztroglia ammónia hatására bekövetkező TNF- α , IL-6 és IL-1 β termelését, de az eredményei szerint egyik sejt kultúrában sem volt mérhető szignifikáns változás (Andersson et al., 2005). Ennek ismeretében a mi kísérleti elrendezésünkben az előbb említett kutatásban alkalmazott ammónia dózisához képest magasabb koncentráció is megvizsgálásra került, de így sem volt mérhető statisztikailag releváns különbség a citokin-termelésben. Egy asztroglia kultúrán végzett kísérlet eredménye igazolta, hogy 24 órás ammónia-kezelés hatására aktiválódik a p38 MAPK útvonal (Pan et al., 2010), amely viszont a mikroglia sejtekben szerepet játszik az ATP által indukált IL-6 termelésben (Shigemoto-Mogami et al., 2001), tehát ezek alapján feltételezhető, hogy ha a későbbiekben az inkubációs időt a kísérleteinkben megnöveljük, már szignifikáns különbség lesz mérhető az IL-6 termelésben.

A H₂O₂ egy szakmailag megalapozott és általánosan elfogadott ágens az oxidatív stressz kiváltására (Bi et al., 2008; Hamdi et al., 2011; Quincozes-Santos et al., 2009), de ennek alkalmazása során szükséges a H₂O₂ azon koncentrációjának kiválasztása, amely úgy idéz elő szignifikáns mértékű oxidatív stresszt a sejtekben, hogy emellett jelentős mértékű sejthalált nem okoz. Emellett a kísérleteinkben ROS-mérésként alkalmazott CM-DCFH-DA használati-protokollját csak kisebb változtatásokat követően lehetett adaptálni az asztroglia sejteken történő vizsgálatokra.

A H₂O₂-vel történő inkubáció, a többi vizsált ágenshez hasonlóan, nem okozott szignifikáns növekedést a sejtkultúrák citokin-termelésében, melynek értelmezése a hiányzó szakirodalmi adatok tükrében nehézkes. Ismereteink szerint ezidáig mindösszesen egy tanulmány vizsgálta a H₂O₂ által bekövetkező citokin-termelést asztroglia sejtekben, de ebben az esetben a TNF- α fehérje expressziójának mérését végezték el felnőtt asztroglia sejteken (Souza et al., 2013).

Kiemelendő, a H₂O₂ asztrogliaakra gyakorolt hatása, hiszen ezen ágens hatására, még ha nem is szignifikáns módon, de csökkent a termelt IL-mennyisége a kontroll sejtenyészethez képest. Ezen eredmény egyik lehetséges okaként szolgálhat, hogy bár az előzetes kísérletekben beállítottuk az optimális H₂O₂-koncentrációt, méréseink során mégis jelentős mértékű sejtelhalás következett be, mely származhat a H₂O₂ tulajdonságaiból valamint a ROS-mérés érzékenységéből adódóan. Bár nem végeztünk további vizsgálatokat erre vonatkozóan, szakirodalmi adatok alapján is tudni lehet, hogy a peroxiddal való munka nagyon nehézkes, a reagensek érzékenysége és labilitása miatt.

Ezen eredmények tanulmányozására és pontosabb megértésére további vizsgálatok elvégzésére lenne szükség, melyeket idő hiányában nem tudtunk elvégezni. Feltételezzük, hogy a kísérleti körülmények pontosabb kidolgozása és a laboratóriumi körülményeinkhez való optimalizálása számos olyan tényező kiküszöbölésére megoldást jelentene, mely a vizsgálatokat megzavarhatja és az eredményekből levont következtetéseket félrevezetheti.

5.2. Konklúzió

Eredményeink azt mutatták, hogy bár az asztrogliaák képesek detektálható mennyiségű IL-1 β és IL-6 termelésére, a vizsált faktorok nem okoztak szignifikáns növekedést a proinflammatorikus citokinek mennyiségében. A kísérletek nem konzekvens eredményei további vizsgálatok elvégzését teszik indokolttá.

A multifaktoriális kóroktanú HE számos idegrendszeri érintő kórfolyamata közül a neuroinflammáció kialakulásának és jelentőségének felderítése több vonatkozásában is fontos lehet. Elsősorban a gyulladásos folyamatok terápiás vonatkozása teszi vitathatatlaná a téma aktualitását, hiszen egyre inkább bizonyítást nyer, hogy számos betegségben jelen van a neuroinflammáció, mint lényeges kóroki tényező (Alzheimer, Parkinsons, krónikus fájdalom).

Távlati céljaink közé tartozik a kísérleti körülmények optimalizálása, illetve további mérések elvégzése, az asztroglia kóroki szerepének jobb megértéséhez a HE-ban fellépő neuroinflammáció során.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A hepaticus encephalopathia (HE) egy olyan orvosi- és állatorvosi-jelentőséggel bíró neuropszichiátriai kórkép, mely leggyakrabban portoszisztémás sőnt és / vagy májelégtelenség következtében alakul ki. A HE számos kórfolyamata közül kiemelendő a neuroinflammáció, mely a HE patogenezisében kiemelt szerepet tölt be, azonban a folyamat még sok részletében tisztázatlan. Bár a betegség során fellépő gyulladásos válaszáért elsősorban a mikroglia sejteket teszik felelőssé, szakirodalmi adatok alapján ismert az asztroglia citokin-termelő képessége is. Tervezett kutatásaink célja az asztroglia kóroki szerepének vizsgálata a HE-ban fellépő neuroinflammáció folyamatában. Munkánk során, primer patkány asztroglia sejt kultúrában vizsgáltuk a különböző HE-ban releváns tényező hatását az IL-6 és IL-1 β termelésre.

Kísérleteinkhez szükséges volt egy megfelelően alkalmazható *in vitro* modell létrehozása, ehhez 1-2 napos korú Sprague-Dawley patkányok agyszövetét használtuk föl. A primer asztroglia monolayert mentesítettük a mikroglia sejtektől, melyhez egy mitózis inhibitor, a citozin β -D-arabinofuranozidot (Ara-C), majd egy lizoszotrop ágenszt, a leucin-metilésztert (LME) alkalmaztuk és a kezelések eredményességét immunfluoreszcenciával ellenőriztük. A nagy tisztaságú primer patkány asztroglia kultúra létrehozását követően, egyes – a HE patogenezisében bizonyítottan szerepet játszó – ágensek, irodalmi adatok alapján beállított dózisaival kezeltük a sejt kultúrákat és az ezek hatására bekövetkező IL-6 és IL-1 β termelést ELISA módszer segítségével mértük. A felhasznált ágensek a bakteriális lipopoliszacharid, a mangán, az ammónia és a hidrogén peroxid (H₂O₂) voltak, utóbbi az oxidatív stressz kiváltására szolgált. A kísérleteinkben alkalmazott H₂O₂ optimális dózisa – amellyel kezelve a sejteket kiváltható az oxidatív stressz állapota anélkül, hogy az jelentősebb mértékű sejt károsodáshoz vezetne – szakirodalom alapján, valamint korábbi saját vizsgálataink eredményeire alapozva került megállapításra. Ehhez az asztroglia kultúrát növekvő töménységű H₂O₂-val kezeltük, majd egyrészt a sejteken belül termelődött reaktív oxigén gyököket (ROS) mértük meg, 5-6-chloromethyl 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetát (CM-DCFH-DA) segítségével, másrészt a sejtek elhalásának mértékét vizsgáltuk fluoreszcens festési eljárással (propidium-jodid).

Eredményeink azt mutatták, hogy bár az asztroglia képesek detektálható mennyiségű IL-1 β és IL-6 termelésére, a vizsgált, HE patogenezisében is szerepet játszó faktorok nem okoztak szignifikáns növekedést az IL-1 β és IL-6 termelésben. A nem konzekvens eredmények további kísérletek elvégzését teszik indokolttá az asztroglia gyulladásos folyamatokban betöltött szerepének jobb megértéséhez.

7. SUMMARY

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome that has importance in both human and veterinary medicine and is most commonly the consequence of portosystemic shunt and / or hepatic failure. Among the several pathomechanisms of HE, neuroinflammation is of paramount importance and plays a significant role in the pathogenesis of HE, still many details of this process is unknown. Although the inflammatory response present in the disease is believed to be primarily caused by microglia cells, data from scientific literature proves that the astrocyte cells also have the ability to produce cytokines and thus induce inflammation. The aim of our work is to examine the pathologic role of astrocytes in neuroinflammation in HE. During our study, we examined the effects of different relevant factors in HE on the IL-6 and IL-1 β production of primary rat astrocyte cultures.

Generation of an applicable *in vitro* model was necessary for our research, the brain tissue of 1-2-day old Sprague-Dawley rats were used for this purpose. The primary astrocyte monolayer was decontaminated of microglia cells with a mitotic inhibitor, cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C), then a lysosomotrop agent, leucin-methylesther (LME). The success of the treatment was checked by immunofluorescence. After creating the pure primary rat astrocyte cultures, they were treated with agents proven to have a role in the pathogenesis of HE in doses that were based on data from the literature, and we measured the subsequent IL-6 and IL-1 β production by ELISA method. The utilised agents were bacterial lipopolysaccharide, manganese, ammonia and hydrogen-peroxide (H₂O₂), the latter was used to trigger oxidative stress. The optimal dose of H₂O₂ used in our experiment was determined by data from the literature and results from our previous studies. During these studies, we managed to determine the H₂O₂ concentration that could provoke the state of oxidative stress without causing a significant extent of cell death. For this we treated the astrocyte culture with an increasing concentration of H₂O₂, then we measured the reactive oxygen species (ROS) formed within the cells using an indicator molecule, the 5-6-chloromethyl 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (CM-DCFH-DA), and we examined the extent of cell death using a fluorescent staining method (propidium-iodide).

Our results have shown that although the astrocytes are able to produce a detectable amount of IL-1 β and IL-6, the studied factors, which all contribute to the pathogenesis of HE, do not cause a significant increase in IL-1 β and IL-6 production. These controversial findings imply that further examination of the role of astrocyte cells in inflammatory processes is required.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Albrecht, J., Norenberg, M.D., 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*. Baltimore, Md 44, 788–794. doi:10.1002/hep.21357
- Aldridge, D.R., Tranah, E.J., Shawcross, D.L., 2015. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5, S7–S20. doi:10.1016/j.jceh.2014.06.004
- Andersson, A.K., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2005. Lactate induces tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 β release in microglial- and astroglial-enriched primary cultures. *J. Neurochem.* 93, 1327–1333. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03132.x
- Bajaj, J.S., Ridlon, J.M., Hylemon, P.B., Thacker, L.R., Heuman, D.M., Smith, S., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., 2012. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G168-175. doi:10.1152/ajpgi.00190.2011
- Bellot, P., Francés, R., Such, J., 2013. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 33, 31–39. doi:10.1111/liv.12021
- Bernal, W., Hall, C., Karvellas, C.J., Auzinger, G., Sizer, E., Wendon, J., 2007. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology*. Baltimore, Md 46, 1844–1852. doi:10.1002/hep.21838
- Bi, J., Jiang, B., Liu, J.H., Lei, C., Zhang, X.L., An, L.-J., 2008. Protective effects of catalpol against H₂O₂-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. *Neurosci. Lett.* 442, 224–227. doi:10.1016/j.neulet.2008.07.029
- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Michaud, J., Lavoie, J., Layrargues, G.P., 1987. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 1–12.
- Chen, F., Hori, T., Ohashi, N., Baine, A.-M., Eckman, C.B., Nguyen, J.H., 2011. Occludin is regulated by epidermal growth factor receptor activation in brain endothelial cells and brains of mice with acute liver failure. *Hepatology*. Baltimore, Md 53, 1294–1305. doi:10.1002/hep.24161
- Chen, F., Radisky, E.S., Das, P., Batra, J., Hata, T., Hori, T., Baine, A.-M.T., Gardner, L., Yue, M.Y., Bu, G., del Zoppo, G., Patel, T.C., Nguyen, J.H., 2013. TIMP-1 attenuates blood–brain barrier permeability in mice with acute liver failure. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1041–1049. doi:10.1038/jcbfm.2013.45
- Chung, C., Gottstein, J., Blei, A.T., 2001. Indomethacin prevents the development of experimental ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 34, 249–254. doi:10.1053/jhep.2001.26383
- Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., Waterhouse, N.J., 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb.prot087163. doi:10.1101/pdb.prot087163
- Dhanda, S., Sandhir, R., 2015. Role of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in behavioral alterations observed in rodent model of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.* 286, 222–235. doi:10.1016/j.bbr.2015.01.042
- Eruslanov, E., Kusmartsev, S., 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 594, 57–72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Filipov, N.M., Seegal, R.F., Lawrence, D.A., 2005. Manganese potentiates in vitro production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 84, 139–148. doi:10.1093/toxsci/kfi055

- Forshammar, J., Block, L., Lundborg, C., Biber, B., Hansson, E., 2011. Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 31586–31597. doi:10.1074/jbc.M111.247767
- Görg, B., Schliess, F., Häussinger, D., 2013. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 158–163. doi:10.1016/j.abb.2013.03.010
- Hamdi, Y., Masmoudi-Kouki, O., Kaddour, H., Belhadj, F., Gandolfo, P., Vaudry, D., Mokni, M., Leprince, J., Hachem, R., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., 2011. Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 118, 416–428. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07315.x
- Hertz, L., Peng, L., Song, D., 2015. Ammonia, like K(+), stimulates the Na(+), K(+), 2 Cl(-) cotransporter NKCC1 and the Na(+),K(+)-ATPase and interacts with endogenous ouabain in astrocytes. *Neurochem. Res.* 40, 241–257. doi:10.1007/s11064-014-1352-9
- Holecek, M., 2015. Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: Effects of variables leading to hepatic encephalopathy. *Nutrition* 31, 14–20. doi:10.1016/j.nut.2014.03.016
- Hutchison, E.R., Kawamoto, E.M., Taub, D.D., Lal, A., Abdelmohsen, K., Zhang, Y., Wood, W.H., Lehrmann, E., Camandola, S., Becker, K.G., Gorospe, M., Mattson, M.P., 2013. Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes. *Glia* 61, 1018–1028. doi:10.1002/glia.22483
- Jakab, L., 2015. The liver and the immune system. *Orv. Hetil.* 156, 1203–1213. doi:10.1556/650.2015.30190
- Jalan, R., Fernandez, J., Wiest, R., Schnabl, B., Moreau, R., Angeli, P., Stadlbauer, V., Gustot, T., Bernardi, M., Canton, R., Albillos, A., Lammert, F., Wilmer, A., Mookerjee, R., Vila, J., Garcia-Martinez, R., Wendon, J., Such, J., Cordoba, J., Sanyal, A., Garcia-Tsao, G., Arroyo, V., Burroughs, A., Ginès, P., 2014. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J. Hepatol.* 60, 1310–1324. doi:10.1016/j.jhep.2014.01.024
- Jayakumar, A.R., Liu, M., Moriyama, M., Ramakrishnan, R., Forbush, B., Reddy, P.V.B., Norenberg, M.D., 2008. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the Mechanism of Ammonia-induced Astrocyte Swelling. *J. Biol. Chem.* 283, 33874–33882. doi:10.1074/jbc.M804016200
- Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Norenberg, M.D., 2015. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5, S21-28. doi:10.1016/j.jceh.2014.07.006
- Jayakumar, A.R., Tong, X.Y., Curtis, K.M., Ruiz-Cordero, R., Abreu, M.T., Norenberg, M.D., 2014. Increased toll-like receptor 4 in cerebral endothelial cells contributes to the astrocyte swelling and brain edema in acute hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 128, 890–903. doi:10.1111/jnc.12516
- Jayakumar, A.R., Valdes, V., Norenberg, M.D., 2011. The Na-K-Cl cotransporter in the brain edema of acute liver failure. *J. Hepatol.* 54, 272–278. doi:10.1016/j.jhep.2010.06.041
- Jiang, W., Desjardins, P., Butterworth, R., 2009. Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: Protective effect of hypothermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 944–52. doi:10.1038/jcbfm.2009.18
- Jover, R., Rodrigo, R., Felipe, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., Cauli, O., Ausó, E., Rodríguez, E., Gutiérrez, A., Girona, E., Erceg, S., Berbel, P., Pérez-Mateo, M., 2006. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* 43, 1257–1266. doi:10.1002/hep.21180

- Kinde, H., Pesavento, P.A., Loretto, A.P., Adaska, J.M., Barr, B.C., Moore, J.D., Anderson, M.L., Rimoldi, G., Hill, A.E., Jones, M.E.B., 2014. Congenital portosystemic shunts and hepatic encephalopathy in goat kids in California: 11 cases (1999–2012). *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 173–177. doi:10.1177/1040638713518050
- Kobtan, A.A., El-Kalla, F.S., Soliman, H.H., Zakaria, S.S., Goda, M.A., 2016a. Higher Grades and Repeated Recurrence of Hepatic Encephalopathy May Be Related to High Serum Manganese Levels. *Biol. Trace Elem. Res.* 169, 153–158. doi:10.1007/s12011-015-0405-5
- Kobtan, A.A., El-Kalla, F.S., Soliman, H.H., Zakaria, S.S., Goda, M.A., 2016b. Higher Grades and Repeated Recurrence of Hepatic Encephalopathy May Be Related to High Serum Manganese Levels. *Biol. Trace Elem. Res.* 169, 153–158. doi:10.1007/s12011-015-0405-5
- Krieger, D., Krieger, S., Jansen, O., Gass, P., Theilmann, L., Lichtnecker, H., 1995. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet Lond. Engl.* 346, 270–274.
- Lachmann, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Keitel, V., Häussinger, D., 2013. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 143–151. doi:10.1016/j.abb.2013.05.004
- Liang, Y., Jiang, W., Zhang, Z., Yu, J., Tao, L., Zhao, S., 2012. Behavioral and Morphological Evidence for the Involvement of Glial Cells in the Antinociceptive Effect of Najanalgesin in a Rat Neuropathic Pain Model. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 850–4. doi:10.1248/bpb.35.850
- Lidbury, J.A., Cook, A.K., Steiner, J.M., 2016. Hepatic encephalopathy in dogs and cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 26, 471–487. doi:10.1111/vec.12473
- Liu, Y., Zeng, X., Hui, Y., Zhu, C., Wu, J., Taylor, D.H., Ji, J., Fan, W., Huang, Z., Hu, J., 2015. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 91, 87–96. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.028
- Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O., Piedrafita, B., El Mili, N., Felipo, V., 2007. NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 22, 321–335. doi:10.1007/s11011-007-9067-0
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Marçal, V.C., Oevermann, A., Bley, T., Pfister, P., Miçlard, J., 2008. Hepatic encephalomyelopathy in a calf with congenital portosystemic shunt (CPSS). *J. Vet. Sci.* 9, 113–115. doi:10.4142/jvs.2008.9.1.113
- McMillin, M.A., Frampton, G.A., Seiwel, A.P., Patel, N.S., Jacobs, A.N., DeMorrow, S., 2015. TGF β 1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 95, 903–913. doi:10.1038/labinvest.2015.70
- Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., 2013. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 109–121. doi:10.1016/j.abb.2013.02.010
- Pan, C.-F., Zhu, S.-M., Zheng, Y.-Y., 2010. Ammonia induces upregulation of aquaporin-4 in neocortical astrocytes of rats through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123, 1888–1892.
- Quincozes-Santos, A., Nardin, P., de Souza, D.F., Gelain, D.P., Moreira, J.C., Latini, A., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C., 2009. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox. Res.* 16, 30–41. doi:10.1007/s12640-009-9042-0
- Rama Rao, K.V., Norenberg, M.D., 2012. BRAIN ENERGY METABOLISM AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN ACUTE AND CHRONIC HEPATIC ENCEPHALOPATHY. *Neurochem. Int.* 60, 697–706. doi:10.1016/j.neuint.2011.09.007

- Rao, K.V.R., Brahmabhatt, M., Norenberg, M.D., 2013. Microglia contribute to ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *Metab. Brain Dis.* 28, 139–143. doi:10.1007/s11011-012-9339-1
- Rao, K.V.R., Reddy, P.V.B., Hazell, A.S., Norenberg, M.D., 2007. Manganese induces cell swelling in cultured astrocytes. *NeuroToxicology* 28, 807–812. doi:10.1016/j.neuro.2007.03.001
- Rech, R., Barros, C., 2015. Neurologic Diseases in Horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 31, 281–306. doi:10.1016/j.cveq.2015.04.010
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J.-M., Felipo, V., 2010. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139, 675–684. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.040
- Rose, C., Butterworth, R.F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P.M., Pomier-Layrargues, G., 1999. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117, 640–644.
- Rose, C.F., 2012. Ammonia-lowering strategies for the treatment of hepatic encephalopathy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 321–331. doi:10.1038/clpt.2012.112
- Rovira, A., Alonso, J., Córdoba, J., 2008. MR Imaging Findings in Hepatic Encephalopathy. *Am. J. Neuroradiol.* 29, 1612–1621. doi:10.3174/ajnr.A1139
- Salgado, M., Cortes, Y., 2013. Hepatic encephalopathy: etiology, pathogenesis, and clinical signs. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 35, E1–8; quiz E9.
- Saura, J., 2007. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J. Neuroinflammation* 4, 26. doi:10.1186/1742-2094-4-26
- Schetter, A.J., Heegaard, N.H.H., Harris, C.C., 2010. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 31, 37–49. doi:10.1093/carcin/bgp272
- Schousboe, A., Sonnewald, U., 2016. *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis*. Springer.
- Sergeeva, O.A., 2013. GABAergic transmission in hepatic encephalopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 122–130. doi:10.1016/j.abb.2013.04.005
- Sharma, V., Mishra, M., Ghosh, S., Tewari, R., Basu, A., Seth, P., Sen, E., 2007. Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res. Bull.* 73, 55–63. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.01.016
- Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tsuda, M., Ohsawa, K., Kohsaka, S., Inoue, K., 2001. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J. Neurochem.* 78, 1339–1349.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Aschner, M., 2013. Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate- γ -aminobutyric acid cycle. *J. Intern. Med.* 273, 466–477. doi:10.1111/joim.12040
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
- Sinke, A.P., Jayakumar, A.R., Panickar, K.S., Moriyama, M., Reddy, P.V.B., Norenberg, M.D., 2008. NF κ B in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling in Culture. *J. Neurochem.* 106, 2302–2311. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05549.x
- Skowrońska, M., Albrecht, J., 2012. Alterations of Blood Brain Barrier Function in Hyperammonemia: An Overview. *Neurotox. Res.* 21, 236–244. doi:10.1007/s12640-011-9269-4

- Souza, D.G., Bellaver, B., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2013. Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PLoS One* 8, e60282. doi:10.1371/journal.pone.0060282
- Stawarski, M., Stefaniuk, M., Włodarczyk, J., 2014. Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Front. Neuroanat.* 8. doi:10.3389/fnana.2014.00068
- Suárez, I., Bodega, G., Fernández, B., 2002. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem. Int.* 41, 123–142.
- Tivers, M.S., Handel, I., Gow, A.G., Lipscomb, V.J., Jalan, R., Mellanby, R.J., 2014. Hyperammonemia and systemic inflammatory response syndrome predicts presence of hepatic encephalopathy in dogs with congenital portosystemic shunts. *PLoS One* 9, e82303. doi:10.1371/journal.pone.0082303
- Toritsu, S., Washizu, M., Hasegawa, D., Orima, H., 2005. Brain Magnetic Resonance Imaging Characteristics in Dogs and Cats with Congenital Portosystemic Shunts. *Vet. Radiol. Ultrasound* 46, 447–451. doi:10.1111/j.1740-8261.2005.00082.x
- Uliasz, T.F., Hamby, M.E., Jackman, N.A., Hewett, J.A., Hewett, S.J., 2012. Generation of primary astrocyte cultures devoid of contaminating microglia. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 814, 61–79. doi:10.1007/978-1-61779-452-0_5
- van Neerven, S., Nemes, A., Imholz, P., Regen, T., Denecke, B., Johann, S., Beyer, C., Hanisch, U.-K., Mey, J., 2010. Inflammatory cytokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid. *J. Neuroimmunol.* 229, 169–179. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.005
- Wiest, R., Garcia-Tsao, G., 2005. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 41, 422–433. doi:10.1002/hep.20632
- Yamamoto, S., Nguyen, J.H., 2006. TIMP-1/MMP-9 Imbalance in Brain Edema in Rats With Fulminant Hepatic Failure. *J. Surg. Res.* 134, 307–314. doi:10.1016/j.jss.2005.11.588
- Zielińska, M., Poppek, M., Albrecht, J., 2014. Roles of Changes in Active Glutamine Transport in Brain Edema Development During Hepatic Encephalopathy: An Emerging Concept. *Neurochem. Res.* 39, 599–604. doi:10.1007/s11064-013-1141-x

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: **Dr. Bárány Zoltánnak** a sok közös munkáért, továbbá, hogy mindig kész volt segíteni nekem, ha elakadtam a dolgozat készítése során; és **Jócsák Gergelynek** a kérdéseimre adott készséges válaszaiért.

Köszönöm Dr. Kiss Dávid Sándornak, hogy tudásával és tapasztalataival hozzájárult TDK munkám elkészítéséhez. Szintén köszönetet szeretnék mondani Kinálné Szikora Zsuzsannának, hogy hozzáértő munkájával gördülékennyé tette a kísérletek előkészületeit és elvégzését. Emellett köszönettel tartozom a Belgyógyászati Tanszék és Klinikáról Dr. Sterczer Ágnesnek, aki számtalan klinikai vonatkozású szakmai tanáccsal látott el a TDK dolgozatom írása közben, valamint a Biomatematikai És Számítástechnikai Tanszék munkatársainak, különös tekintettel Dr. Reiczigel Jenőnek, Abonyi-Tóth Zsoltnak, Bajcsayné Fábrián Ibolyának és Dr. Harnos Andreának a statisztikai kiértékelésekben nyújtott önzetlen segítségükért. Egyes méréseket a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken végeztünk el, így külön köszönettel tartozom a Tanszék munkatársainak, különösképpen Farkas Orsolyának. Végül, de nem utolsó sorban szeretném kiemelni Dr. Környei Zsuzsanna segítségét, aki az MTA KOKI munkatársaként az asztrogliá kultúra létrehozásához és fenntartásához kapcsolódó protokollokban nagy segítségünkre szolgált.

Végül hálával tartozom családomnak, legfőképpen édesapámnak, hogy végig figyelemmel kísérte a munkám menetét és persze köszönöm a barátaimnak, akik vidámságukkal és lelkesedésükkel tették gördülékenyebbé a dolgozat elkészítését.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017 év11.....hó20.....nap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

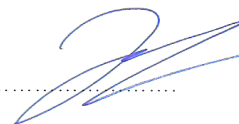
- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

Alulírott JÓCSAK GERGELY..... Igazolom, hogy

FETER VIKTORIA..... (a hallgató neve)

AZ ASZTROGLIA BETÉK NEUROINFLAMMÁCIÓS SCHEMÉNEK
VIZSGÁLATA HEPATICUS ENCEPHALOPATHIA SZELÁN
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 11. 20.

Jócsák Gergely 

a témavezető neve és aláírása

ÉLETTANI ÉS BIOKÉMIAI.....

TANSZÉK.....


tanszék

Alulírott DR. BARÁNY ZOLTÁN..... Igazolom, hogy

FETEK VIKTÓRIA..... (a hallgató neve)

AR. ASTROGLIA SEJTEK NEUROINFLAMMÁCIÓS SZEREPEINEK
VIZSGÁLATA HEPATICUS ENCEPHALOPATHIA SORÁN
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 11. 20.

DR. BARÁNY ZOLTÁN 

a témavezető neve és aláírása

ÉLETTANI ÉS BIOCÉMIKAI
TANSZÉK

tanszék

NYILATKOZAT

Alulírott FETER VIKTORIA nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe AZ ASZTROGLIA SEJTEK NEUROINFLAMMÁCIÓS
SZEREPEINEK VIZSGÁLATA HEPATICUS ENCEPHALOPATHIA SORÁN
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2017
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017. 11. 20.

Feter Viktoria Feter Viktoria

a hallgató neve és aláírása