

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövetani Tanszék

**ISCHÉMIA ÉS OXIDATÍV STRESSZ KIVÁLTOTTA VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA
EGY ÚJ VÉR-AGY GÁT MODELLEN**

Készítette: Gazdag Zsófia

Témavezető: Dr. Kittel Ágnes
Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Intézet

Tanszéki témavezető: Dr. Halasy Katalin
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövetani Tanszék

Budapest
2010

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS.....	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
2.1 A VÉR-AGY GÁT TÖRTÉNETE	2
2.2 A VÉR-AGY GÁT ANATÓMIÁJA ÉS MŰKÖDÉSE.....	3
2.2.1 <i>Endotélsejtek</i>	3
2.2.2 <i>Periciták</i>	4
2.2.3 <i>Asztrociták</i>	5
2.3 A VÉR-AGY GÁT BETEGSÉGEKBEN.....	5
2.3.1 <i>A vér-agy gát funkció zavara néhány betegségben:</i>	5
2.3.1.1 <i>Stroke</i>	5
2.3.1.2 <i>Trauma</i>	6
2.3.1.3 <i>Fertőző vagy gyulladásozó folyamatok</i>	6
2.3.1.4 <i>Sclerosis multiplex</i>	6
2.3.1.5 <i>HIV</i>	6
2.3.1.6 <i>Alzheimer betegség</i>	7
2.3.1.7 <i>Parkinson betegség</i>	7
2.3.1.8 <i>Epilepszia</i>	7
2.3.1.9 <i>Agytumrok</i>	7
2.3.1.10 <i>Fájdalom</i>	8
2.3.2 <i>Központi idegrendszeri betegségek kezelése ép vér-agy gáton keresztül</i>	8
2.3.2.1 <i>Gyógyszerbeadási módok, melyekkel gyógyszer lehet juttatni a központi idegrendszerbe:</i>	8
2.4 VÉR-AGY GÁT MODELLEK	9
2.4.1 <i>Nem sejt alapú in vitro modellek</i>	10
2.4.1.1 <i>In silico modellek:</i>	10
2.4.1.2 <i>Az immobilizált mesterséges membrán próba (IAM)</i>	10
2.4.1.3 <i>PAMPA</i>	10
2.4.2 <i>Sejt alapú in vitro modellek</i>	10
2.4.2.1 <i>Dinamikus modellek</i>	10
2.4.2.2 <i>Sejtvonal alapú vér-agy gát modellek</i>	11
2.4.2.3 <i>Elsődleges kultúrán alapuló vér-agy gát modellek</i>	11
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	11
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12
4.1 ANYAGOK	12
4.2 AZ ELSŐDLEGES SEJTKULTÚRÁK ELŐÁLLÍTÁSA	12
4.3 OXIGÉN-GLÜKÓZ MEGVONÁS (OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION =OGD) KEZELÉS.....	14
4.4 LAKTÁT-DEHIDROGENÁZ (LDH) FELSZABADULÁS MEGHATÁROZÁSA.....	15
4.5 EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS LOKALIZÁCIÓJA ÉS FÉL-KVANTITATÍV MÉRÉSE.....	15
4.6 AZ EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS KIMUTATÁSA ELEKTRON MIKROSKÓPOS MÓDSZERREL	16
4.7 SEJTKÁROSÍTÓ HATÁS VIZSGÁLATA EGÉR VÉR-AGY GÁT MODELLEN	16
4.8 A PREPARÁTUM BEÁGYAZÁSA	16
4.9 METSZETKÉSZÍTÉS ÉS ELEKTRONMIKROSKÓPIA	17
5. EREDMÉNYEK	17
5.1 LAKTÁT-DEHIDROGENÁZ (LDH) FELSZABADULÁS MEGHATÁROZÁSA.....	17
5.2 EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS LOKALIZÁCIÓJA ÉS FÉL-KVANTITATÍV MÉRÉSE.....	18
5.3 AZ EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS VIZSGÁLATA ELEKTRONMIKROSKÓPPAL.....	20
5.4 SEJTKÁROSÍTÓ HATÁS VIZSGÁLATA EGÉR VÉR-AGY GÁT MODELLEN	23
6. MEGBESZÉLÉS.....	25
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	28
8. SUMMARY	29
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	30
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	31

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α – szignifikancia

AC – asztrocita

AQP4 – aquaporin 4 csatorna

ATP – adenzin trifoszfát

AVP– arginin vazopresszin

CMPV– cowpea mosaic virus

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

EC – endotélsejt

ekto-ATPáz – ekto-adenozin-trifoszfátáz

GABA – γ -amino vajsav

GJ – rés kapcsolat (gap junction)

GD – glükóz megvonás

GLUT-1 – glükóz transzporter 1

H₂O₂ – hidrogén-peroxid

IAM – immobilizált mesterséges membrán próba

IL-6 – interleukin -6

IL-1 β – interleukin-1 β

LDH– Laktát-dehidrogenáz

LPS– lipopoliszaharid

M – átlag

MRI – mágneses rezonancia vizsgálat

mRNS – messenger ribonukleinsav

N– mintaszám

NTPDáz1 ill. 2– nukleozid trifoszfát difoszfohidroláz-1 és -2

OGD – oxigén-glükóz megvonás

P – szignifikancia

PAMPA – párhuzamos mesterséges membrán permeabilitás próba.

PC– pericita

S – standard deviáció, szórás

SED – az átlag szórása

TJ – szoros kapcsolat (tight junction)

1. BEVEZETÉS

A gyógyszergyárak a központi idegrendszerre ható, ill. a központi idegrendszer betegségeinek gyógyítását célzó új készítményeik tesztelésekor rendszeresen kell alkalmazzanak különböző vér-agy gát modelleket. Nem mindegy azonban, hogy milyen rendszeren való megfelelés után juthat a kísérleti szer a fejlesztés újabb fázisába. Ahhoz, hogy a teszteredmények minél jobban közelítsék az in vivo állapotban kapott eredményeket, a modellrendszernek a lehető legjobban kell közelítenie a célszervet, azaz felhasználás előtt feltétlenül szükség van a modell minél több tulajdonságának megismerésére.

Szaktervezési munkámmal egy olyan magyar-olasz kormányközi egyezmény támogatásával létrejött kutatási témába kapcsolódtam, ahol egy új vér-agy gát modell jóságát, az in vivo állapothoz való hasonlóságát vizsgáltuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 *A vér-agy gát története*

A vér-agy gátat felfedezése a XIX. század fordulóján Lewandowsky, Ehrlich és Goldmann vitális festékekkel végzett kísérleteihez fűződik, mikor is észlelték, hogy a vérerekbe juttatott berlini kék vagy tripánkék az egész testet megfesti ugyan, de az agyba nem jut el. Amikor azonban Goldmann a tripánkék festéket a cerebrospinális folyadékba juttatta, az agy megfestődött. Goldmann ebből arra következtetett, hogy létezik valamilyen gát, amely elválasztja a perifériás vérkeringést az agy szövetétől (Mott 1913). A korai kutatások leginkább azt akarták megfejtetni, mi és hogyan választja el a vért, az agyszövetet és a cerebrospinális folyadékot, és leginkább egy vér és cerebrospinális folyadék közötti gát létét feltételezték (Davson H. 1987). Lina Stern orosz biokémikus 1921-ben írta le azt a központi idegrendszerben lévő különleges működési egységet, amit ő hemato-encephalikus gátnak nevezett el (Vein 2006). A vér-agy gát modern koncepciója Crone és munkatársai nevéhez fűződik (Crone 1965). Bár ők az akkor általánosan elfogadott nézet szerint a vér-agy gáton keresztül csak passzív transzporttal jutnak át az anyagok, ők munkájukban aktív transzportfolyamatok szabályozásáról írtak. Reese és Karnovsky (Reese and Karnovsky 1967) megállapította, hogy az agyi ereket belülről borító endotélsejtek a vér-agy gát része, s tíz év sem telt el, hogy bizonyítékot találjanak arra, a vér és az idegrendszer közötti határfelületet a vér-agy gát szabályozza (Rapaport 1976), és áteresztőképességét is mérni tudták (Crone 1965; Ohno, Pettigrew et al. 1978).

2.2 A vér-agy gát anatómiája és működése

A központi idegrendszer tökéletes működéséhez elengedhetetlen állandó belső környezet fenntartásában döntő jelentősége van a vér-agy gátnak. Nemcsak elkülöníti a vérszövetet és a benne található sejtes elemeket az agy idegszövetétől és a gerincvelőtől, de tökéletes működése esetén biztosítja a tápanyagok, hormonok, anyagcsere-termékek, endogén és exogén vegyületek koncentrációjának megfelelő szinten tartását is (Bernacki, Dobrowolska et al. 2008). A vér-agy gát az idegi jelátvitelben is szerepet játszik azzal, hogy fenntartja a jelátvitelhez szükséges, finoman hangolt mikrokörnyezetet (Braun, Cornford et al. 1980; Abe, Kakyó et al. 1998; Haseloff, Blasig et al. 2005; Hawkins, O'Kane et al. 2006). A gerincesek altörzsében a vér-agy gátat az agyi ereket alkotó endotélisejtek alkotják (Abbott 2002), míg a cápák és rájak alosztályában (Elasmobranchii) ez az asztrogliá sejtekben lokalizálódik (Bundgaard and Cserr 1981). A vér-agy gát, mint funkcionális rendszer, az agyi endotélisejtekből, az őket körülölelő pericitákból és az alaphártyára támaszkodó asztrociták végtalpaiból épül fel (Bernacki, Dobrowolska et al. 2008). Az endotélisejtek, csakúgy mint a periciták, alaphártyával vannak befedve, ami egy 30-40 nm vastag, IV típusú kollagénből, heparin-szulfátból, proteoglikánokból, lamininből, fibronektinből és egyéb extracelluláris mátrix fehérjékből alkotott membrán. Ez az alaphártya az asztrociták végtalpának plazma membránjában folytatódik, ami beborítja az agyi kapillárisokat (Ballabh, Braun et al. 2004; Hawkins and Davis 2005; Persidsky, Ramirez et al. 2006). Barrier funkciójának ellátásában kiemelkedő szerepe van az agyi endotélisejteknek, illetve az ezek között lévő szoros kapcsolatoknak (tight junction, TJ). Az agyi kapillárisokban az endotélisejtek között lévő szoros kapcsolatok jelentősen korlátozzák, gyakorlatilag megakadályozzák a hidrofil vegyületek paracelluláris áramlását, míg a perifériás kapillárisokban az ennél megengedőbb zonula adherens típusú kapcsolat található. A kis lipofil molekulák azonban, valamint az oxigén, szén-dioxid, etanol, szabadon diffundálnak át az endotélium lipidmembránján. A kis hidrofil molekulák transzcelluláris átjutását a luminális és abluminális membránon lévő transzportrendszerek szabályozzák, s ez az átjutás történhet receptor közvetítette transzcitózissal vagy kevésbé specifikus adszorpció közvetítette transzcitózissal is. Kiemelendő, hogy az agyi endotéliumban kisebb mértékű az endocitózis/transzcitózis aktivitás, mint a perifériás endotéliumban. (Abbott, Ronnback et al. 2006).

2.2.1 Endotélisejtek

Az agyi endotélisejtek specializált epitélisejtek, amelyek az agyban lévő erek legbelső rétegét alkotják (Joó 1996). Az agyi endotélisejteket szoros kapcsolatok kötik össze, ez létrehoz egy

fizikális gátat, mely korlátozza a sejtek és molekulák szabad áramlását a perifériás keringés és az agy között (Deli 2009; Abbott, Patabendige et al. 2010). A sejtek között lévő szoros kapcsolatok morfológiáját és molekuláris összetételét pedig az agyi mikrokörnyezet szabályozza (Hawkins and Davis 2005). Az agyi endotélsejtek a perifériás keringésben lévőekkel ellentétben szoros kapcsolatokkal kapcsolódnak, nyugalmi állapotban igen alacsony a bennük található pinocitotikus vakuólumok száma. Citoplazmájában sok mitokondrium található, melyből intenzív energia metabolizmusukra következtethetünk. Plazmamembránjuk nem fenestrált és szelektíven átvesztők a megfelelő méretű és lipofilitású molekulák számára (de Vries, Kuiper et al. 1997; Chaudhuri 2000; Ballabh, Braun et al. 2004; Abbott 2005).

2.2.2 Periciták

A periciták kis érfalakkal kapcsolatban lévő, a mesenchymális sejtektől különböző, mesodermális eredetű sejtek (Katychev, Wang et al. 2003). Az endotélsejtektől az alaphártya (bazális membrán) választja el őket, de réskapcsolatokon (gap junction, GJ) keresztül kapcsolatban állnak egymással, és megfigyelhető köztük az interdigitáció jelensége is (Cuevas, Gutierrez-Diaz et al. 1984). Kevés in vivo adat áll rendelkezésre a periciták vér-agy gátban játszott szerepéről. Ennek ellenére elhelyeződésük és az agyi kapillárisokat stabilizáló alapvető szerepük alapján feltételezik fontos szerepüket a vér-agy gát fejlődésében, fenntartásában és szabályozásában. Az asztrocitákhoz hasonlóan szorosabbá teszik a paracelluláris barriert agyi endotél sejt tenyészetekben (Hayashi, Nakao et al. 2004; Dohgu, Takata et al. 2005). Patkány agyban a periciták a kapilláris külső felületének körülbelül $\frac{1}{4}$ -t fedik be (Sims 1991). Két fajta pericitát különböztetünk meg. Az egyiket a kapillárisok egyenes részén írták le, a másikat pedig az elágazásoknál, ahol nyúlványaikkal körbefonják a kapillárisokat (Peppiatt, Howarth et al. 2006). Ko-kultúrákon végzett kísérletekben észlelték, hogy asztrociták jelenlétében a kapillárisokkal való kapcsolódás megváltoztatta a periciták fenotípusát, multilaterálisból orsó alakúvá váltak (Ramsauer, Krause et al. 2002). Az agyban a periciták többek között az endotélsejtek aktivitásának szabályozásáért felelősek, közvetítik a gyulladási folyamatokat, kontrollálják a kapilláris szerű struktúrák kialakulását és a kapilláris átmérőt (Bandopadhyay, Orte et al. 2001; Ramsauer, Krause et al. 2002; Nag 2003; Peppiatt, Howarth et al. 2006). Az összejt-tulajdonságokkal is rendelkező pericitáknak fontos és összetett szerepe van a vér-agy gát működésében, az agy homeosztázisának fenntartásában.

2.2.3 Asztrociták

A központi idegrendszerben az asztrociták fordulnak elő legnagyobb számban, régebben úgy gondolták, hogy mennyiségük az emberi agyban a neuronok számának többszöröse (Bignami 1991). Ez szó szerint azonban csak az agykéregre igaz. Az asztrociták sokoldalú szerepéről egyre többet tudunk. Kommunikálnak az endotélsejtekkel, neuronokkal, oligodendrocitákkal, mikrogliaival és az endimasejtekkel is, azaz a központi idegrendszer minden sejtj típusával. Nélkülözhetetlenek az endotélsejtek vér-agy gátként való működéséhez (Janzer and Raff 1987; Ballabh, Braun et al. 2004), feltételezik szerepüket az extracelluláris Na⁺ homeosztázis szabályozásában (Noda 2007). Az asztrociták indukálják és szabályozzák az idegi szinapszisokat is (Ullian, Sapperstein et al. 2001; Christopherson, Ullian et al. 2005) és még a vérkeringés szabályozásában is szerepet játszanak (Zonta, Angulo et al. 2003; Takano, Tian et al. 2006), és részt vesznek a glutamát, GABA és glicin neurotranszmitterek újrahasznosításában is (Boulland, Osen et al. 2002). Az asztrociták réskapcsolatok által syncytiumot alkothatnak, és Ca²⁺ hullámok terjedése által kommunikálnak (Stout, Costantin et al. 2002; Parys, Cote et al. 2010). Még azt is feltételezték, hogy az asztrociták képesek neurogenézist indukálni idegi őssejtekből (Song, Stevens et al. 2002) illetve, hogy maguk is neurális őssejteként tudnak működni (Laywell, Rakic et al. 2000; Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001).

2.3 A vér-agy gát betegségekben

A központi idegrendszer számos kóros állapota kapcsolható a vér-agy gát működésének zavarához, és sok esetben ez elsősorban az asztrocita-endotélsejt együttműködésének zavarát jelenti. A vér-agy gát sérülése következhet be például trauma, oxigén megvonás, autoimmun betegségek, agydaganat, magas vérnyomás vagy túl sok ozmotikus infúzió beadása esetében is (ez utóbbinak épp az a célja, hogy átmenetileg megnyissa a vér-agy gátat.) (Bennett 2007)

2.3.1 A vér-agy gát funkció zavara néhány betegségben:

2.3.1.1 Stroke

Az agyban a víz homeosztázisát az arginin vazopresszin (AVP) szabályozza, ischémiás stroke után pedig sokszor az agyban kialakuló ödéma vezet az agy károsodásához. Vakili és munkatársai kísérletükben megállapították, hogy 60 perces a. cerebri media elzárással imitált ischémiás stroke után, az agykamrába injektált AVP V1 receptor antagonistája csökkentette az agyi ödéma keletkezésének mértékét és csökkentette a vér-agy gát károsodását (Vakili,

Kataoka et al. 2005). Stroke esetében megfigyelték az erek alaphártyájának proteolízisét. Ott, ahol a vér-agy gát szöveti szerkezete károsodott, Aquaporin 4 (AQP4) mRNS és fehérje keletkezését írták le (Tomas-Camardiel, Venero et al. 2005).

2.3.1.2 *Trauma*

Trauma esetén a bradikinin nevű gyulladási mediátor termelődése stimulálja az interleukin-6 (IL-6) termelést és felszabadulását az asztrocitákból, ami végül a vér-agy gát megnyílásához vezet (Schwaninger, Sallmann et al. 1999).

2.3.1.3 *Fertőző vagy gyulladási folyamatok*

A bakteriális fehérje lipopoliszaharid (LPS) megnövelte a szoros kapcsolatban a vér-agy gát átteresztőképességét. Az LPS kiváltotta gyulladási folyamatok során szabadgyökök, IL-6 és IL-1 β keletkeznek (Gaillard, de Boer et al. 2003) s ezek a gát szerkezeti károsodását okozzák. Veldhuis et al. kísérletei szerint az interferon- β csökkentheti, hogy gyulladási folyamatok alatt a vér-agy gát szöveti szerkezete károsodjon (Veldhuis, Floris et al. 2003).

2.3.1.4 *Sclerosis multiplex*

Sclerosis multiplex esetén a vér-agy gát, mint szerkezeti egység felbomlik, működése zavart szenved (Minagar and Alexander 2003). Az alaphártyában található laminin mennyisége csökken, s ez összefüggésben lehet a perifériás vérben keringő limfociták laminin bontó képességének növekedésével (Oki, Takahashi et al. 2004). A vér-agy gát szerkezetében beálló egyik változásra utal, hogy kísérletesen létrehozott autoimmun encephalomyelitisben nem tudták immunfestéssel kimutatni a szoros kapcsolat egyik fő szerkezeti fehérjéjét, a claudin-3 molekulát. Mivel gyulladási folyamatok alatt romlik a vér-agy gát határfunkciója, feltételezhető, hogy a claudin-3-nak in vivo is elsődleges szerepe van a vér-agy gát integritásának létrehozásában és fenntartásában (Wolburg, Wolburg-Buchholz et al. 2003).

2.3.1.5 *HIV*

A HIV betegségben szintén megfigyelhető a vér-agy gát sejtei közti szoros kapcsolatok fellazulása (Dallasta, Pizarov et al. 1999; Berger and Avison 2004).

2.3.1.6 *Alzheimer betegség*

Ebben a súlyos neurodegenerációs betegségben, melynek jellegzetessége az amyloid- β felhalmozódás, az amyloid plakkok kialakulása az agyban, megfigyelték a GLUT-1 glükóz transzporterek számának megnövekedését, a fokozott a glükóz szállítást is. Az oldatban lévő agrin szintje 30%-kal nő, több AQP-4 receptor fejeződik ki (Kalaria 1999; Berzin, Zipser et al. 2000), csökken viszont a P-glikoprotein transzporter kifejeződése (Lee and Bendayan 2004). A vér-agy gátat alkotó sejtek közötti kapcsolatok megváltoznak, kóros angiogenezis észlelhető, a vér-agy gáton keresztüli amyloid- β peptid eltávolításának mértéke azonban csökken (Zlokovic 2005). Cirrito és munkatársai szerint, hogy a betegségben jellemző amyloid- β plakk képződés összefüggésben lehet a vér-agy gáton expresszálandó P-glikoprotein mennyiségével (Cirrito, Deane et al. 2005)

A P-glikoprotein egy olyan ATP-t felhasználó transzportfehérje, amelynek segítségével a sejt bizonyos molekulákat el tud távolítani. Ez a transzporter a vér-agy gát endotélsejtjeiben is jelen van, ennek köszönhető, hogy a xenobiotikumok az endotélsejtekből eltávoznak.

2.3.1.7 *Parkinson betegség*

Ennél a betegségnél a P-glikoprotein csökkent hatékonysága váltja ki a vér-agy gát működésének zavarát (Kortekaas, Leenders et al. 2005).

2.3.1.8 *Epilepszia*

Az epilepsziás roham alatt az epilepsziás góciókban a vér-agy gát átmenetileg megnyílik, de az ereket körülvevő gliasejtékben mintegy „második védelmi vonalként”, megnő a P-glikoprotein mennyisége (Abbott, Khan et al. 2002; Marroni, Marchi et al. 2003).

2.3.1.9 *Agytumorok*

A tumoros folyamatok során a vér-agy gát endotélsejtjei közötti szoros kapcsolatok fellazulnak, emiatt az agyban ödéma keletkezik (Papadopoulos, Saadoun et al. 2001; Davies 2002). A fellazulás a szoros kapcsolat fehérjék, elsősorban a claudin-5 és az occludin mennyiségének csökkenése miatt következik be, míg a claudin-1 fehérjét nem tudták kimutatni. Az asztrociták felületén az AQP4 csatornák újrarendeződnek, és eltérően élettani körülmények közötti helyzettől, már nemcsak csak a sejtek végtalpainak membránján található (Liebner, Fischmann et al. 2000; Warth, Kroger et al. 2004).

2.3.1.10 Fájdalom

A gyulladás okozta fájdalom során szintén megváltozhat a vér-agy gát szoros kapcsolatainak fehérjekifejeződése és a vér-agy gát áteresztőképessége is (Huber, Witt et al. 2001).

2.3.2 Központi idegrendszeri betegségek kezelése ép vér-agy gáton keresztül

A központi idegrendszerben lokalizálódó megbetegedések kezelésekor szembesülünk az ép vér-agy gát kihívásával. Vagy valamilyen módszert kell találnunk a hatóanyag bejuttatására, mintegy kijátszva ezt a védelmi rendszert, vagy ezt a védelmi vonalat meg kell kerülnünk.

A tumorok kezelésére szolgáló citotoxikus szerek azon vegyületek közé tartoznak, melyek nem jutnak át az ép vér-agy gáton. (Treat, McDannold et al. 2007), de a központi idegrendszer daganatos betegségei a vér-agy gát működésének károsodásával is járnak, az áteresztő képesség nő (Abbott, Ronnback et al. 2006). Előfordulhat tehát, hogy az a vegyület mellyel kezelni szeretnénk a betegséget és ép vér-agy gát esetén nem jutna be a központi idegrendszerbe, a károsodott vér-agy gáton keresztül jut és mennyisége elérheti a terápiás koncentrációt (Angelov, Doolittle et al. 2009).

Ép vér-agy gát funkció esetében több módszert is kipróbáltak már hatóanyag bejuttatására. Treatnek és munkatársainak patkány agyon végzett kísérletben MRI vezérelte fókuszált ultrahang hullámokkal bontotta meg a vér-agy gát integritását, és így az agyban szisztémásan beadott doxorubicin 5,366 +/- 659 ng/g szöveti koncentrációt ért el. (Treat, McDannold et al. 2007). Kutatások folynak nanorészecskék alkalmazásával kapcsolatban is. Amellett, hogy ezek a részecskék gyógyszermolekulákat juttathatnak a központi idegrendszerbe, képalkotó diagnosztikai eljárásokban is segítségünkre lehetnek (Yang 2010). Gyógyszeres kezeléshez liposzómákat, dendrimereket, polimer micellákat, lineáris polimereket tesztelnek, képalkotó eljárásokhoz pedig kvantum pöttyökkel, Fe₃O₄ nanorészecskékkel végeznek kísérletet (Yang 2010). Gyulladásos és fertőzőes megbetegedésekben cowpea mosaic virus (CPMV) alkalmazásával próbálkoztak, és hatóanyaggal töltött nanorészecske szállító rendszereként tervezik felhasználni (Shriver, Koudelka et al. 2009).

2.3.2.1 Gyógyszerbeadási módok, melyekkel gyógyszer lehet juttatni a központi idegrendszerbe:

- a vér-agy gát megnyitása kémiai vagy ozmotikus úton (Rapoport 1991),
- intracerebrális implantátum vagy injekció (Broaddus, Liu et al. 1999).
- intravénás injekció (Song, Vinters et al. 2002),

- intranazális beadás (Lerner, van Zanten et al. 2004).

A gyógyszerbeadási stratégiákat lokális és szisztémás kategóriákba sorolhatjuk. A lokális beadással megfelelő gyógyszer koncentráció érhető el a kívánt helyen, de hátránya, hogy ez invazív megoldás.

Amint a vér-agy gát szerepének fontossága nyilvánvaló lett, jobb megismerése és gyógyszerek tesztelése céljából is szükségessé vált *in vitro* vér-agy gát rendszerek létrehozása, melyekkel az *in vivo* állapotot modellezni lehetett.

2.4 *Vér-agy gát modellek*

Az első *in vitro* vér-agy gát modellt 1973-ben hozták létre az agyi mikroerek sikeres izolációjával (Joó and Karnushina 1973), és azóta több, tenyésztett sejtekből kifejlesztett modellt is alkottak (Deli, 2007). Mióta megállapították, hogy tenyészetben az endotélsejtek könnyen elvesztik szövetbeli tulajdonságaikat, az endotélsejtek monokultúrái helyett ko-kultúrákat alkalmaznak. Arra is fény derült, hogy a neurovaszkuláris egység alkotói milyen fontos szerepet játszanak a vér-agy gát kialakításában (Abbott, Ronnback et al. 2006; Cecchelli, Berezowski et al. 2007). Az agyban lévő kapilláris endotélsejtek dinamikus kapcsolatban vannak a többi szomszédos sejttel, pericitákkal, asztrogliaikkal, perivaszkuláris mikrogliaikkal és neuronokkal. Ez az együttműködés hozzájárul különleges tulajdonságaik kialakulásához, melyek mind endoteliális és epiteliális jelleget mutatnak (Joó 1996; Abbott 2005; Cecchelli, Berezowski et al. 2007). A sejtek közötti oda-vissza történő kommunikáció kulcsfontosságú a vér-agy gát kialakulása és fenntartása szempontjából (Abbott, Ronnback et al. 2006; Zlokovic 2008). A vér-agy gátat alkotó sejtek közül az asztrocitákról ismerték fel elsőként, hogy az endotélsejtek tulajdonságainak és működésének szabályozói (Abbott 2005; Haseloff, Blasig et al. 2005; Abbott, Ronnback et al. 2006). Mivel az asztrociták szükségesek az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok kialakulásához (Tao-Cheng, Nagy et al. 1987), sok jelenleg használt *in vitro* vér-agy gát modell agyi endotélsejtekből és asztrocitákból álló ko-kultúra (Deli, Abraham et al. 2005; Cecchelli, Berezowski et al. 2007; Deli 2007).

Nakagawa és munkatársai 7 vér-agy gát modellt hasonlítottak össze, melyek patkány agyi mikroérhálózatból nyert endotélsejtekből, pericitákból és asztrocitákból kialakított elsődleges tenyészetekből készültek (Nakagawa, Deli et al. 2007). A rendszerek transzendoteliális elektromos ellenállását és permeabilitását, mint a vér-agy gát modellek ezen fontos paramétereit megmérve, meg tudták becsülni a paracelluláris transzportot és a szoros kapcsolatok épségét (Deli, Abraham et al. 2005). Bebizonyosult, hogy a periciták valóban képesek megerősíteni a barrier integritását az agyi endotélsejtek monolayerében. A három

sejttípusból álló ko-kultúrában mért érték magasabb volt, mint a többi tesztelt vér-agy gát modellben mért. Az általunk is alkalmazott modellben, az anatómiai elhelyeződésnek megfelelően, egy porózus membrán két oldalára endotélsejteket és pericitákat helyeztek, míg a membránnak a pericitával fedett oldala felé, az edény aljára kerültek az asztrocitasejtek.

2.4.1 Nem sejt alapú in vitro modellek

2.4.1.1 In silico modellek: A számítógépes modellek a korábbi in vivo és in vitro kísérletek adatain alapulnak és újonnan létrehozott vegyületek penetráló képességét lehet velük megbecsülni. Az in silico modellezés a molekulák fizikai-kémiai tulajdonságain alapul, így ennek a széles körben elterjedt modellnek erősségei és korlátai vannak (Abbott 2004; Goodwin 2005; Garg et al. 2008; Vastag-Keserű 2009; Mensch et al. 2009). Kevésbé drágák, mint az in vitro és in vivo vér-agy gát modellek.

2.4.1.2 Az immobilizált mesterséges membrán próba (IAM) esetében lipid monolayert kapcsolnak kovalensen egy szilárd alaphoz.

2.4.1.3 PAMPA: Párhuzamos mesterséges membrán permeabilitás próba.

2.4.2 Sejt alapú in vitro modellek

Az *in vitro* modellek alkalmasak vér-agy gátat érintő betegségekben, hipoxia és reoxigenizáció vizsgálatára, fertőzések, neurodegeneratív megbetegedések kutatására. Ugyancsak alkalmasak tesztkísérletekre, amikor a cél pl. a gyógyszerek agyba való juttatásának ellenőrzése, a vér-agy gát permeabilitásának módosítása, a vér-agy gát funkciók módosítása, módosított gyógyszer-molekulák bejutásának-hatásának ellenőrzése, vagy a kóros tényezők kiküszöbölése a vér-agy gát permeabilitás növekedésének megakadályozása, ill. áteresztőképesség mérése céljából. Ezek a ko-kultúrák készülhetnek gliasejtekkel, neuronokkal, pericitákkal.

2.4.2.1 Dinamikus modellek

Cucullo és munkatársai kifejlesztettek egy olyan vér-agy gát modellt, amely egy új agyi endotélsejt vonalon (HCMEC/D3) alapul. Ezeket az endotélsejteket mikropórusokkal rendelkező rost belső üregébe ültették, ennek a kapilláris-hoz hasonló rendszernek belső lumenében az élettanihoz hasonló, pulzáló folyadékáramlást hoztak létre. A kísérlet eredményei a vér-agy gát modell áteresztőképességét, ozmotikus sokkra adott válaszát

illetően kedvezőnek bizonyultak, mert közel állnak az in vivo kísérletekben megfigyeltekhez (Cucullo, Couraud et al. 2008).

2.4.2.2 Sejtvonal alapú vér-agy gát modellek

A sejtvonalakat in vitro körülmények között, halhatatlanná tett sejtekből hozzák létre és több tulajdonságukban jelentősen eltérhetnek a kiindulási sejtektől. A vér-agy gát működését imitáló, szarvasmarha, emberi, egér vagy patkány sejtvonalakból összeállított modellek egyes kérdések vizsgálatára hasznosak lehetnek, de felhasználhatóságuk korlátairól soha nem szabad megfeledkezni.

2.4.2.3 Elsődleges kultúrán alapuló vér-agy gát modellek

Az *elsődleges sejt kultúrákból összeállított* modellek megbízhatóbb adatokat szolgáltatnak, a sejtvonal alapúaknál sokkal jobban megközelítik az in vivo állapotot, de hátrányuk, hogy teljesítményük alacsonyabb, igen munkaigényesek, nagy a műszer és anyagigényük.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteinket a vér-agy gát mindhárom sejt típusát felhasználó, Nakagawa és munkatársai által létrehozott vér-agy gát modellen végeztük (Nakagawa, Deli et al. 2009). A patkány, ill. egér agykéregből származó endotélsejtek, periciták és asztrociták ko-kultúráján végzett munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, az ischémiát legjobban imitáló oxigén-glükóz megvonás, ill. egy erősen sejt károsító ágens, a H₂O₂ alkalmazásának hatására milyen változások figyelhetők meg. A morfológiai jellemzők leírásán kívül a sejtek károsodásának mértékét laktát-dehidrogenáz méréssel hasonlítottuk össze. Enzimhisztokémiai vizsgálatot is alkalmaztunk, mivel irodalmi ismereteink alapján tudtuk, hogy az endotélsejteken, pericitákon és asztrocitán egyaránt kifejeződő, ischémiára, gyulladáshoz vezető folyamatokra érzékenyen és gyorsan reagáló ekto-nukleotidáz enzimcsalád ektonukleozid-trifoszfát-difoszfahidroláz (NTPDáz) csoportjához tartozó integráns membránfehérjék (NTPDáz1 ill. 2) ekto-ATPáz aktivitása és lokalizációja is megváltozik. Ezek az előzetes adatok lehetővé tették, hogy összevegyessük a modellben és az in vivo kapott eredményeket, vagyis ilyen módon is ellenőrizzük a modell patológiás körülmények bemutatására való alkalmazhatóságát.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

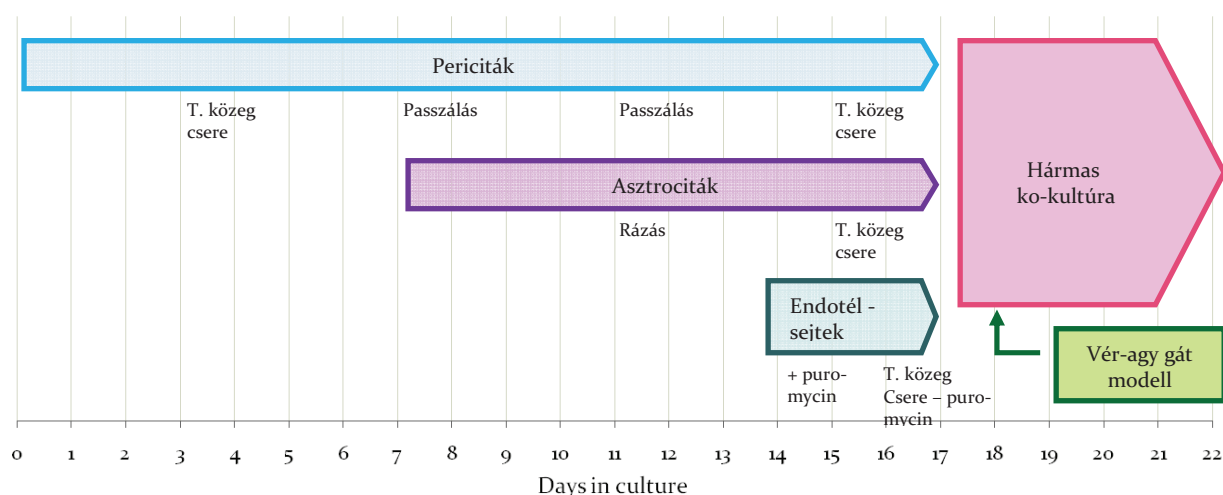
4.1 *Anyagok*

CeCl₃, Pb(NO₃)₂, KCl, ouabain, α - β metilénADP, ATP, suramin, (NH₄)₂S vegyületeket Sigma-Aldrichtól vásároltuk, a CaCl₂-t, MgCl₂-t, levamizolt, maleinsavat Flukatól, TRIS –t pedig a Bioradtól szereztük be. Hoechst 33258 festék Invitrogen terméke, a fluoreszcens beágyazó közeget a Dakotól vásároltuk. A Citotoxicitás Detektáló Készletet pedig a Roche S.p.A., (Milanó, Olaszország) gyártotta.

4.2 *Az elsődleges sejt kultúrák előállítása*

A patkány vér-agy gát modell Olaszországban prof. M.P. Abbracchio milánói laboratóriumában állították elő Deli Mária előírása szerint. (Laboratory of Molecular and Cellular Pharmacology of Purinergic Transmission, Milánói Egyetem)

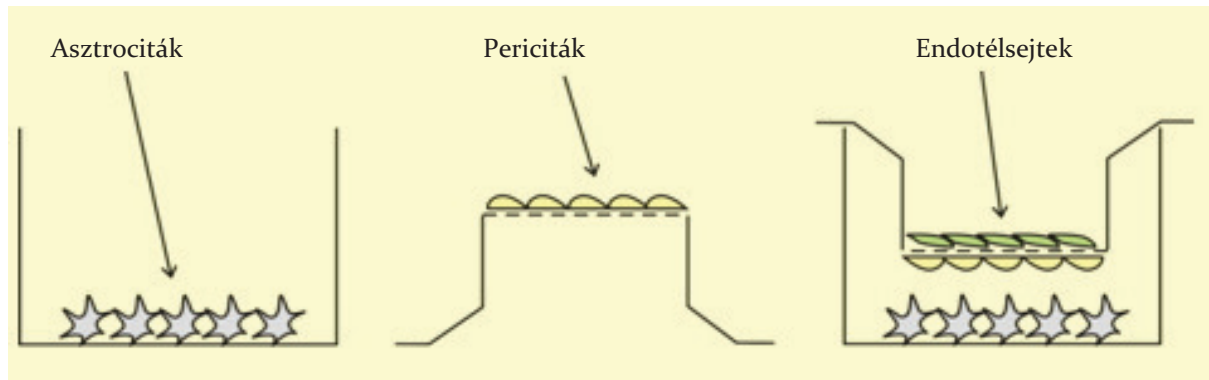
A patkány agy kapilláris endotélsejtből előállított elsődleges sejt kultúra 2 hetes Sprague-Dawley patkányokból készült a korábban részletesen publikált protokoll szerint (Veszeka et al. 2007). A patkány agyi pericitákat 2 hétig tartó folyamat során, izolált agyi mikroér darabból tenyésztették, ami endotélsejteket és pericitákat tartalmazott. A periciták túlélését és proliferációját a szelektív tenyésztési körülményekkel biztosították. A tenyésztő közeget 3 naponként lecserélték. A sejteket a második passzálásból használták fel. (Nakagawa, Deli et al. 2009). Az elsődleges asztrocita tenyészetet újszülött patkányok agykérgéből állították elő Fumagalli et al. által leírt protokoll szerint (Fumagalli, Brambilla et al. 2003).



1. Ábra Az patkány elsődleges ko-kultúra előállításának vázlatja

A hármas sejt ko-kultúrát Transwell edényekbe (polikarbonát, 0,4 μ m pórusátmérő, a sejt kultúra felülete 1,2 cm²) helyezték. Az agyi endotélsejteket a membrán felső felületére

ültették, a pericitákat a membrán alsó oldalára, ami az asztrociták felé néz, melyeket az edény aljában helyeztek el.



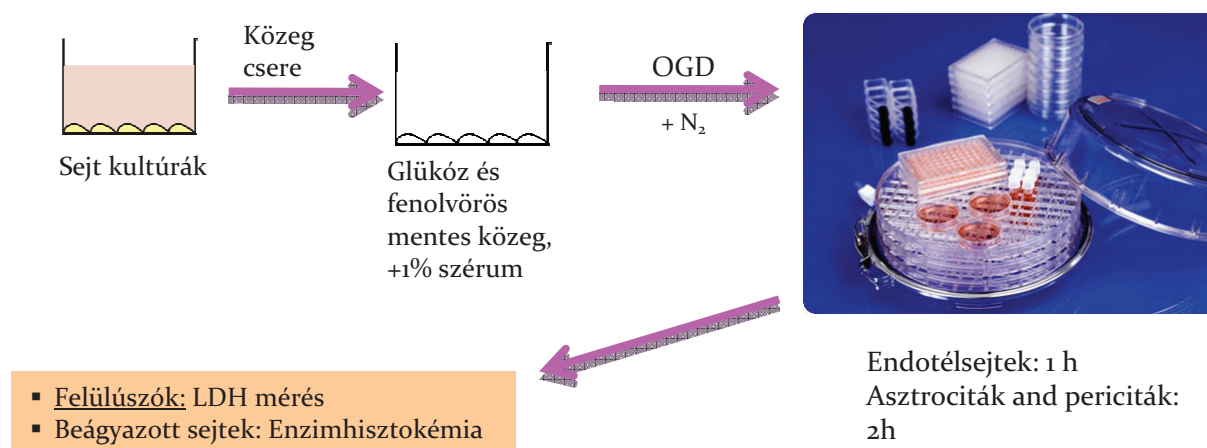
2. Ábra: a vér-agy gát modell sejtjei a tenyésztő edényben

Az elsődleges egér vér-agy gát modell ugyanezen módszer szerint készült a Szegedi Tudományegyetemen, dr. Deli Mária laboratóriumában, Veszélka Szilvia végezte el az egér modelleken a hidrogén-peroxid kezeléseket.

4.3 Oxigén-glükóz megvonás (oxygen-glucose deprivation =OGD) kezelés

Az oxigén-glükóz megvonás az ischémia in vitro kísérleti modelljeként alkalmazható. A kezelést mind az egyes sejt kultúrákon, mind a vér-agy gát modellen is elvégezték Milánóban, majd a sejteket fixálás után elküldték számunkra.

Az OGD kezelés kontrolljaként nem alkalmazhattuk a teljes tápoldatban lévő sejteket, mivel a kezelés hatását kimutató LDH (laktát-dehidrogenáz) mérést nem lehet a szérum pH-ját jelző, épp ezért állandó adalék fenolvörös mellett, sőt, 1%-nál magasabb szérumkoncentráció mellett sem elvégezni. Ezért szerepelnek kontrollként glükóz megvonásnak kitett sejtek (glucose deprivation= GD). Itt a sejtek tápoldatát lecserélték 1% szérummal kiegészített glükóz- és fenolvörös-mentes médiumra. A tápoldat csere után a sejteket hipoxiás kamrába helyezték egy Anaerob Atmoszféra Generáló Rendszerrel (Anaerogen™) együtt, és az oxigént 10 perces N₂ beáramoltatással (2,5 liter/min) lecserélték N₂-re. A kísérlet szobahőmérsékleten történt, a kontroll GD sejteket a kamrán kívül helyezték el. Az oxigén-glükóz megvonásnak kitett endotélsejteket 1 óráig, a pericita és asztrocita tenyészeteket 2 óráig hagyták a hipoxiás kamrában. A kezelési idők letelte után a sejtek felülúszóit összegyűjtötték laktát-dehidrogenáz mérésre.



3. Ábra Az oxigén és glükóz megvonás (OGD) kezelés folyamata

A sejteket 4% paraformaldehid és 4% szukróz tartalmú foszfát pufferben fixálták, és enzimhisztokémiai reakciót végeztek ekto-ATPáz aktivitás kimutatására, fény-ill. elektronmikroszkópos célra (közös kísérlet olasz munkatársainkkal).

4.4 *Laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulás meghatározása*

Az LDH enzim aktivitás mérését a sejtenyészetek felülúszóiból Citotoxicitás Detektáló Készlettel (Roche S.p.A., Milánó, Olaszország) mérték meg egy mikrotálca olvasóval 490/492 nm hullámhosszon. A tesztet a gyártó előírásai szerint végezték. Az eredmények összefüggésbe hozhatók a sejt tenyészetekben károsodott sejtek számával. Ezt az eljárást Laura Colombo PhD hallgató végezte el, aki Maria Pia Abbracchio laboratóriumából érkezett Magyarországra. Az adatokat független kétmintás t-próbával vizsgálták, melyek 3 független kísérletből származnak. Laura az adatok elemzéséhez (GraphPad Prism 5 szoftvert használt), Az adatokat átlag ± az átlag szórása formátumban adta meg, a szignifikancia értékeket ($p < 0.01$, 0.05 vagy 0.001) jelezte az egyes esetekben.

4.5 *Ekto-ATPáz aktivitás lokalizációja és fél-quantitatív mérése*

Az ekto-ATPáz aktivitás fél-quantitatív mérését és az elektronmikroszkópos módszerrel való kimutatását, Laura Colombo PhD hallgatóval közösen végeztük.

Az ekto-adenozin-trifoszfátáz aktivitást ólom precipitációs módszerrel mutattuk ki (Kittel, Garrido et al. 2002) az asztrocitákon, a pericitákon és az agyi endotélsejteken. Fixálás és többszöri Tris-maleát pufferes (pH 7,4) öblítés után a preparátumokat olyan közegben inkubáltuk 30 percig, mely 1 mM ATP-t (szubsztrát), 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -t (a felszabaduló foszfát kimutatására), 1 mM levamizolt (alkalikus-foszfátáz inhibitor), ouabaint (Na^+ , K^+ -ATPáz inhibitor), 50 mM $\alpha\beta$ -metilén-ADP-t (5'-nukleotidáz inhibitor) és mM KCl-t tartalmazott 70 mM Tris-maleát pufferben (pH 7,4). A precipitátumot 1%-os $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ oldattal ólom-szulfiddá (PbS) alakítottuk, 1 perces inkubációs idő alatt, sejtmagfestést pedig Hoechst-33258 (1:10000) immunfestéssel végeztük és 20 percig inkubáltuk a preparátumokat.

A sejt kultúrákat Zeiss 200M inverz fluoreszcens mikroszkóppal (vizsgáltuk, mely CCD kamerával (AxioCam HRm; Zeiss) van felszerelve és Axiovision szoftverrel működik. Az ólom precipitátum mennyiség fél-quantitatív mérését ImageJ szoftverrel végeztük. Összehasonlítottuk az oxigén-glükóz megvonással kezelt sejtek és a kontroll sejtek denzitását, a kontroll sejteket 100%-nak véve. Az enzimaktivitást bemutató képeket a kontroll, a glükóz megvonással és oxigén-glükóz megvonással kezelt sejtekről Adobe Photoshop CS3 programmal és ImageJ szoftverrel szerkesztettük.

4.6 *Az ekto-ATPáz aktivitás kimutatása elektron mikroszkópos módszerrel*

(Kittel, Sperlagh et al. 2007)

A membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten 70 mM Tris–maleát pufferben (pH7,4), mely 1 mM ATP-t, (mint szubsztrát) 3 mM CaCl₂-t, 2 mM CeCl₃-t (a reakció során felszabaduló foszfát molekulákkal képez precipitátumot), 5 mM MnCl₂ és 5 mM levamizolt (alkalikus-foszfátáz inhibitor), 1 mM ouabaint (Na⁺,K⁺-ATPáz inhibitor), 50 mM αβ-metilén ADP (5'-nucleotidáz inhibitor) és 5 mM KCl –t tartalmazott. Az inkubációt követően háromszori TRIS-maleátos öblítés után utófixáltuk a mintát. A kontroll reakciókat ATP hozzáadása nélkül végeztük.

4.7 *Sejtkárosító hatás vizsgálata egér vér-agy gát modellen*

Ugyanazon módszer szerint egérből előállított sejteken vizsgáltam meg a hidrogén-peroxid (H₂O₂) sejtkárosító hatását a vér-agy gát modellen, melyeket Dr. Deli Mária és Veszelka Szilvia bocsátott rendelkezésünkre. (MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizika Intézet, Molekuláris Neurobiológiai Csoport)

A kísérlet során a kontroll sejteket normál tápoldatban tartottuk, míg a kezelt sejteknél a tápoldathoz 1 térfogat% -ban 1%-os H₂O₂ oldatot is adtunk. A sejteket egy órán át inkubáltuk ebben a tápoldatban. Elektronmikroszkóp segítségével kerestük meg a membránon a vizsgálni kívánt sejteket, majd CCD kamerával képeket készítettünk statisztikai elemzés céljából. A képeket ImageJ szoftver segítségével dolgoztam fel. A sejteken megmértem a szoros kapcsolatok hosszát, ezen belül az érintkezési pontok hosszát és számát, a kaveolák számát. Ezekből az adatokat független kétmintás t-próbával vizsgáltam.

4.8 *A preparátum beágyazása*

A mintát 1%-os ozmium-tetroxid oldattal 30 percen keresztül fénytől védett helyen utófixáltuk, majd pufferrel és desztillált vízzel leöblítettük. Mivel az ozmium-tetroxid festés a plazmamembránokban lévő lipidek “fejéhez” kötődik, és az ozmium nehézfém lévén az elektronsugarat visszaveri, így a mintát nemcsak fixáljuk, de minden membránnal burkolt sejtalkotót láthatóvá is teszünk az elektron mikroszkópos vizsgálatok számára.

A víztelenítés első lépése egyben kontrasztfestésként is szolgált: szigorúan fénytől védetten, 30 percen át 50%-os alkoholban oldott 1%-os uranil-acetátot alkalmaztunk. Felszálló alkohol- sorsal kivontuk belőle a vizet (70%, 90%, 96 % egyenként 5 percig) a víztelenítését abszolút alkoholos kezeléssel (3x5 perc) fejeztük be, mely után a membránokat, két

oldalukon az endotél- és pericitasejtekkel, elektronmikroszkópos célra kialakított beágyazó szilikongumi mintatartóba helyeztük, ahol mindkét oldalát gyanta fedte. A gyantát 60°C-on, egy éjszakán át polimerizáltattuk. Másnap a mintatartóból a kis gyantakorongokat, melyek közepén a sejteket tartalmazó membrán helyezkedett el, kiemeltük, és lombfűrészsel az ultramikrotóm blokkbefogójába helyezhető, néhány mm vastag blokkokat fűrészeltünk belőlük.

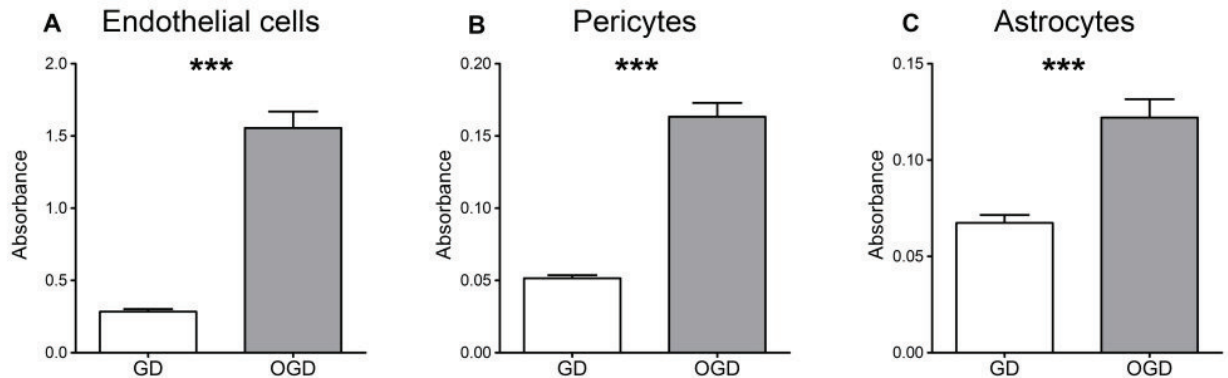
4.9 Metszetkészítés és elektronmikroszkópia

A membránon levő sejteket hosszirányban mutató, ultravékony metszeteket készítettünk Leica EM UC6 ultramikrotómon (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország). A metszeteket Formvar hártával fedett egylyukú rácstra vettük fel és Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Hitachi; Tokió, Japán). A CCD kamerával (MegaView II, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Németország) képeket készítettünk, melyeket ImageJ szoftverrel értékeltem ki.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulás meghatározása

Az LDH egy citoplazmában található enzim, amely akkor szabadul fel, ha a sejt plazma membránja károsodik. A sejt kultúrákban a felülúszóban kimutatható megnövekedett mennyiségű LDH a sejtek károsodására, citotoxikus hatásokra utal. A glükóz megvonás és oxigén-glükóz megvonás hatásait összehasonlítottuk. Az OGD kezelés után mindhárom sejt típusban jelentősen megemelkedett az LDH szint. A legnagyobb változást GD és OGD kezelés után az agyi endotélsejteken mértünk, a legkisebb különbséget pedig az asztrociták sejt kultúrájában figyeltük meg.



4. Ábra LDH enzim mérés

4. Ábra A hisztogramok az átlag LDH enzim szinteket \pm az átlag szórása (SEM) mutatják a felülűszóban a három sejttípusban GD és OGD kezelés után. Az endotélsejteket 1 órán keresztül kezelték GD vagy OGD-vel, (A) a pericitákat (B) és az asztrocitákat (C) 2 órán keresztül. *** $P < 0.001$ GD értékekre korrigálva, Független kétmintás t-próbával vizsgálták az eredményeket.

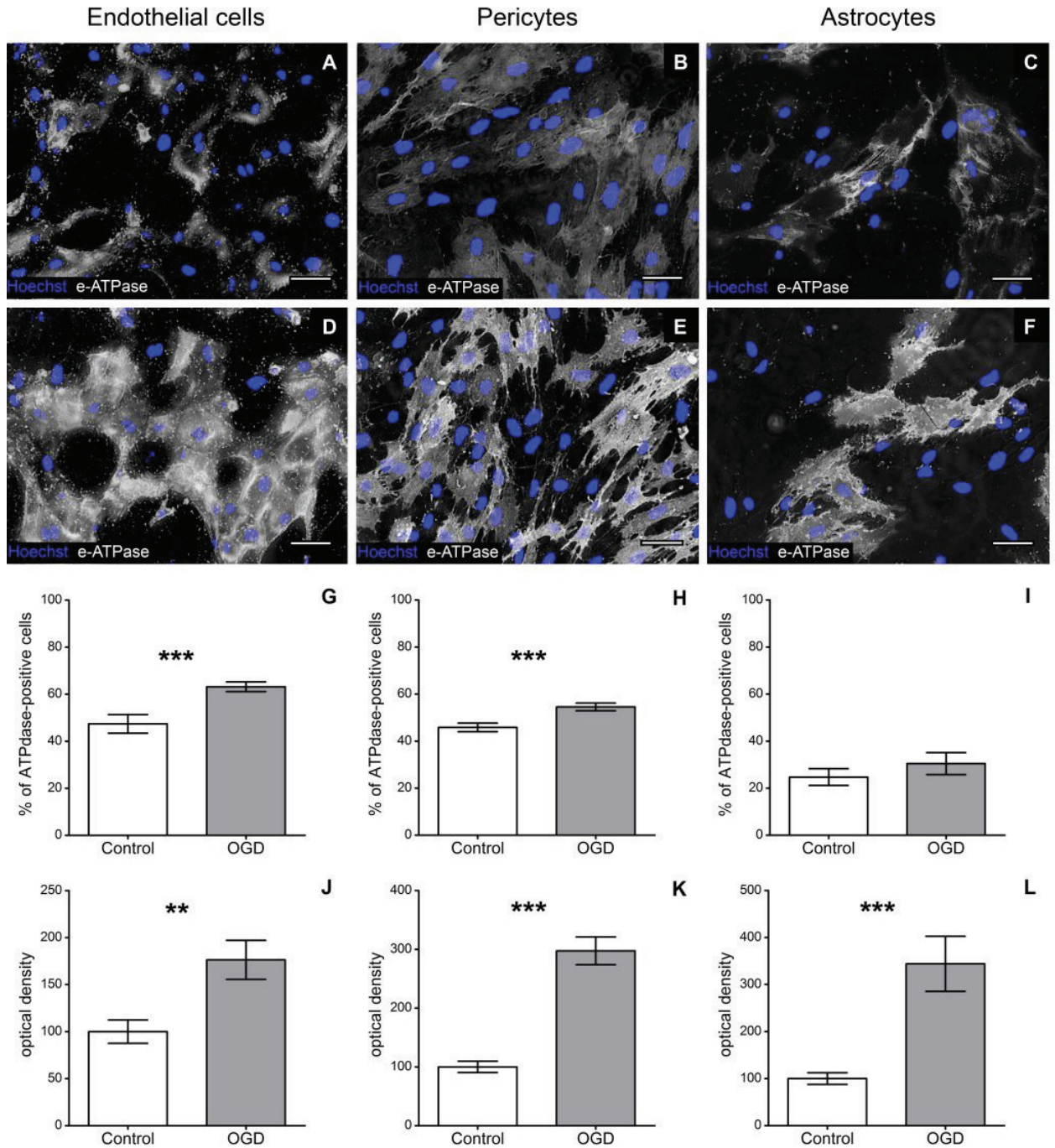
Endotélsejtek: GD: 0.2843 ± 0.01748 N=4, OGD 1.555 ± 0.1143 N=4.

Periciták: GD: 0.05155 ± 0.002064 N=11, OGD: 0.1633 ± 0.009548 N=12.

Asztrociták: GD: 0.06733 ± 0.004173 N=12, OGD: 0.1220 ± 0.009527 N=12.

5.2 Ekto-ATPáz aktivitás lokalizációja és fél-quantitatív mérése

Amennyiben inverz képet készítünk az ImageJ segítségével, az ekto-ATPáz enzimaktivitás fekete csapadék helyett fehérén látható, és ugyanazon képen a fluoreszcens (kék színű) magfestés segítségével a sejteket is meg tudjuk számolni. Az enzimaktivitás mindhárom sejttípuson látható ugyan, de nem mindegyik sejtnak van ekto-ATPáz aktivitása. Összehasonlítottuk a vér-agy gát sejteinek a kontroll és az 1 órás OGD kezelés hatására létrejött állapotát. A morfológiai változások mellett az agyi endotélsejtek és a periciták mérsékelt, de jelentős ekto-ATPáz aktivitás növekedést mutattak, az asztrocitákban nem volt jelentős a változás. A kontroll mintákat 100%-nak véve, az OGD kezelés után mindhárom sejt típuson jelentős ekto-ATPáz aktivitás volt kimutatható.



5. Ábra az ekto-ATPáz/NTPDáz aktivitás lokalizációja és fél-kvantitatív mérése.

5. Ábra A fehér csapadék (ólom-szulfid) az aktív ekto-ATPáz enzim lokalizációját mutatja az elsődleges kontroll sejt kultúrákon, az endotélsejteken (A), pericitákon (B) és az asztrocitákon (C). 1 órás OGD kezelés után több csapadékot látunk a sejtek felszínén és változásokat figyelhetünk meg a sejtek morfológiájában is az enzim hisztokémiai festés által (D-F). A képeket fáziskontraszt nélkül készítettük, így az ólom-szulfid csapadék láthatóvá válik, majd a képeket ezután negatívvá alakítottuk. DAPI sejt mag festés kék. Mérőcsík: 50

µm. Az aktív NTPDáz enzimet kifejező sejtek aránya a kontroll kultúrákban és OGD kezelés után 1 órával (G-I). A hisztogram 3 (EC) és 4 (PC, AC) független kísérlet eredményét mutatja. Az ekto-ATPáz aktivitás denzitometriás analízise az összes vizsgált sejt számára korrigálva (J-L). A kontroll mintákat 100%-nak véve, ehhez viszonyítottuk a többi mintát. A szignifikancia * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ és *** $P < 0.001$ a kontrollnak megfelelően, független kétmintás t-próbával vizsgálták a mintákat.

Endotélsejtek (G): kontroll: $47.40\% \pm 3.988\%$ N=1118 sejt, OGD: $63.19\% \pm 2.091\%$ N=2255 sejt, összesen 6 tárgylemezen, 3 független kísérletből

Periciták (H): kontroll: $45.83\% \pm 1.808\%$ N=2742 sejt, OGD: $54.55\% \pm 1.661\%$ N=2880 sejt, összesen 8 tárgylemezen, 4 független kísérletből.

Asztrociták (I): kontroll: $24.71\% \pm 3.579\%$ N=1323 sejt, OGD: $30.44\% \pm 4.681\%$ N=1409 sejt, összesen 5 tárgylemezen, 3 független kísérletből.

Endotélsejtek sejt (J): kontroll: $100.0\% \pm 12.41\%$ N=28 látótér, OGD: $176.3\% \pm 20.74\%$ N=44 látótér, összesen 6 tárgylemezen, 3 független kísérletből

Periciták (K): kontroll: $100.0\% \pm 9.648\%$ N=71 látótér, OGD: $297.5\% \pm 23.68\%$ N=60 látótér, összesen 8 tárgylemezen, 4 független kísérletből.

Asztrociták (L): kontroll: $100.0\% \pm 12.29\%$ N=19 látótér, OGD: $344.0\% \pm 58.61\%$ N=23 látótér, összesen 5 tárgylemezen, 3 független kísérletből.

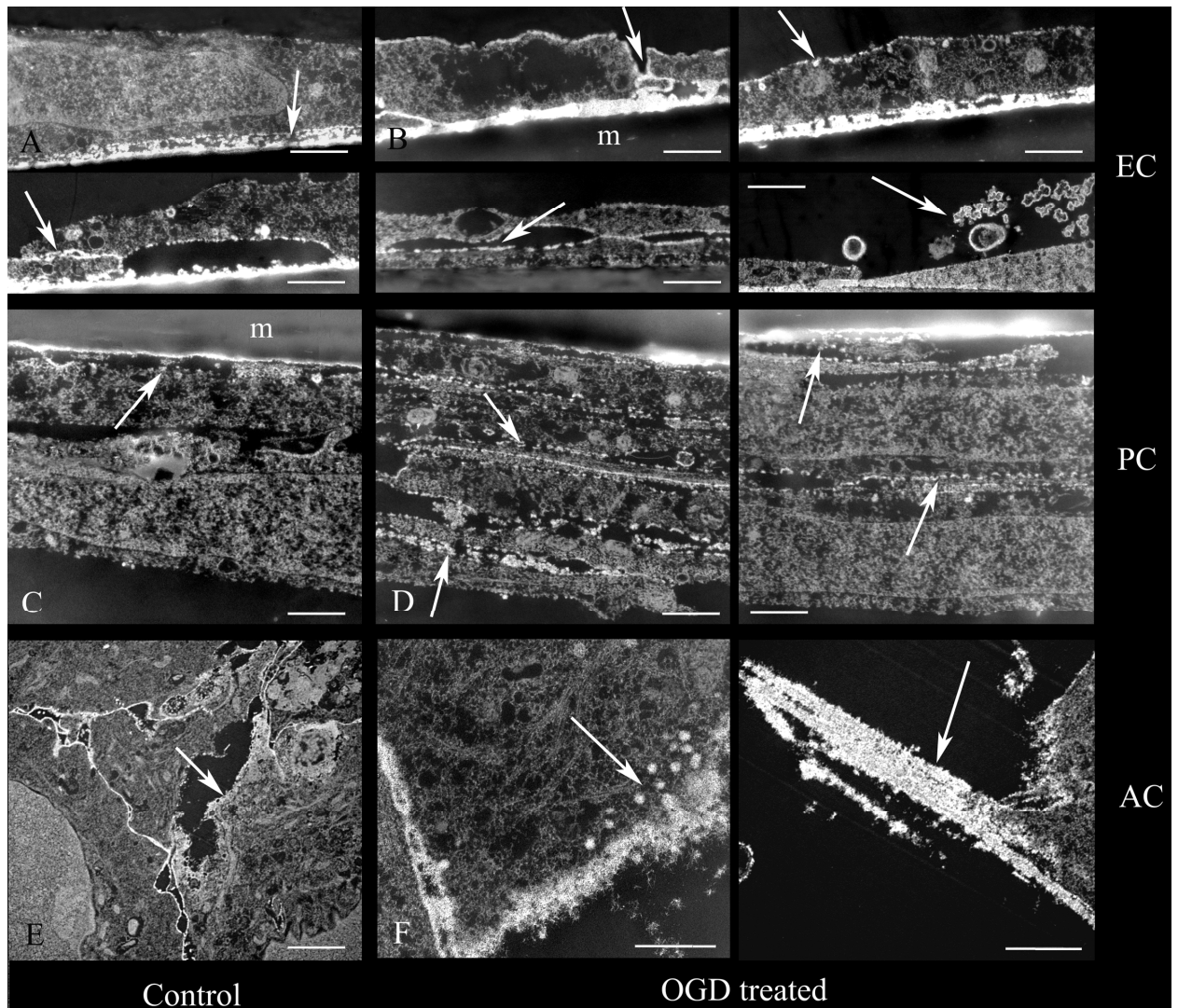
5.3 Az ekto-ATPáz aktivitás vizsgálata elektronmikroszkóppal

Elektronmikroszkópos technika nagyságrendekkel jobb felbontása lehetővé teszi, hogy az OGD kezelés hatására kialakuló morfológiai változások legfinomabb részleteit is megfigyeljük a sejtekben. A kontroll endotélsejtek ekto-ATPáz aktivitását jelző cérium-foszfát csapadék elsősorban a bazális oldalon volt megfigyelhető, s az átfedő interendoteliális kapcsolatoknál az enzimaktivitás mértéke igen hasonló volt az in vivo leírtakhoz (Kittel, Sperlagh et al. 2007). A fény mikroszkópos vizsgálat korábban felfedte, hogy az OGD kezelés hatására megváltozott az ekto-ATPáz aktivitás, és az agyi endotélsejtek szerkezete is. Enzimaktivásra utaló csapadékot figyelhettünk meg a sejtek luminális oldalán. A sejtkapcsolatok fellazultak és szabálytalanabbá váltak, mely jele annak, hogy meglazultak az interendoteliális kapcsolatok. A képeken megfigyelhetők a sejtekből távozó nagy membrán

vezikulák melyekben kimutattunk ekto-ATPáz aktivitást és megszorodott az ekto-ATPáz aktivitással bíró kaveolák száma is.

Az endotélsejtekkel ellentétben a membrán másik oldalán lévő periciták két-három sejtrétegben helyezkedtek el. A jellemzően mérsékelt ekto-ATPáz aktivitásuk, mely nem mutat a sejteken belül tipikus mintázatot, az OGD kezelés után megemelkedett. Számos sejten megfigyelhettük az OGD kezelés hatására kialakuló súlyos sejtkárosodást. A pericitákon nem jött létre észrevehető morfológiai változás és az enzimaktivitás is szerényebb mértékben emelkedett.

Az asztrocitákon NTPDáz 2 enzim található és élettani körülmények között is erős enzimaktivitás figyelhető meg rajtuk. Az OGD kezelés után az asztrociták morfológiájában is történt változás, a citoplazmájukban kaveolák jelentek meg, közel a sejt membránhoz csoportokat formálva. A másik kontroll körülményekhez képest szembeűnő változás a hosszú nyúlványaik megjelenésében észleltük. Vastag kötegeket formáló aktin filamentumokat csapadék fedte be, enzimaktivitást jelezve a nyúlványokon is.

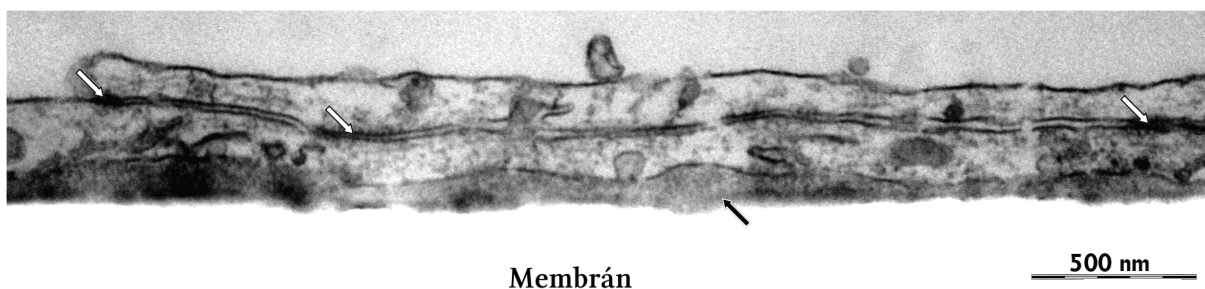


6. Ábra Ekto-ATPáz aktivitás a kontroll és OGD kezelt sejteken, elektronmikroszkóppal vizsgálva

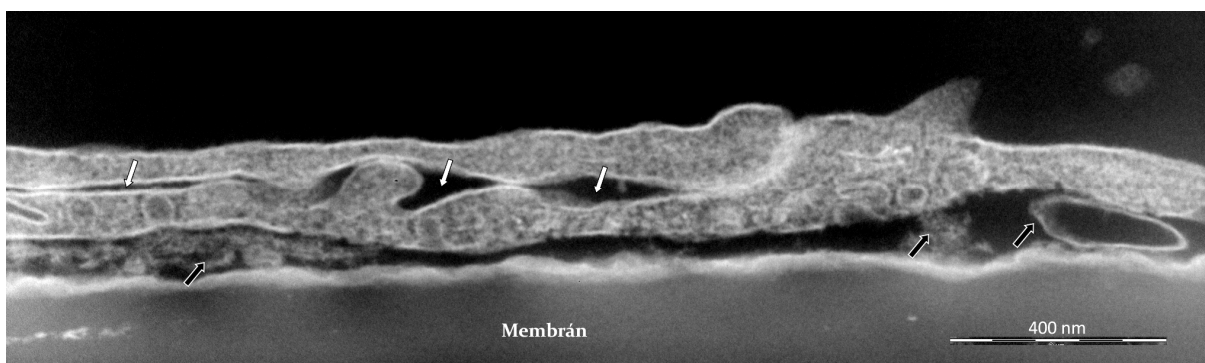
6. Ábra Az ekto-ATPáz enzimaktivitás kimutatásául szolgáló cérium-foszfát csapadék főként a kontroll endotélsejtek alaphártyáján lokalizálódik. (nyíl, felső **A** kép). Az endotélsejtek érintkező, átfedésben levő területein erős lerakódást láthatunk (nyíl, alsó **A** kép). Az erősen károsodott endotélsejteken, melyeknek sejtkapcsolatai megváltoztak, fellazultak, de megnőtt az ekto-ATPáz aktivitásuk, a csapadék a lumenális oldalon is látható (**B** bal oldali kép, nyíl). Kaveolák sorban (**B** felső jobb kép, nyíl) és kiszabaduló membrán vezikulák láthatóak (**B** alsó jobb kép, nyíl), csapadékkal, mely enzimaktivításra utal. A periciták két rétegben helyezkednek (**C**), mérsékelt ekto-ATPáz aktivitást mutatnak bazális oldalukon. A több rétegben elhelyezkedő pericitákon a súlyos sejt károsodás látható (kiürült sejtestek) az OGD kezelés után, és magas enzimaktivitás figyelhető meg (**D** bal kép, nyíl). A megnövekedett enzimaktivításra utaló csapadék az ép sejteken is lerakódott (**D** jobb kép, nyíl). Az elsődleges asztrocita kultúrák intenzív ekto-ATPáz aktivitást mutatnak (**E** nyíl).

Cérium-foszfát csapadékkal teli kaveolák csoportja jelent meg (**F** bal kép, nyíl), a rájuk jellemző kinézetet mutatták az OGD kezelés után. A csapadék sűrűn befedte az aktin filamentumok vastag kötegeit, melyek az asztrocita újonnan képződött nyúlványában tűntek fel (**F** jobb kép, nyíl).

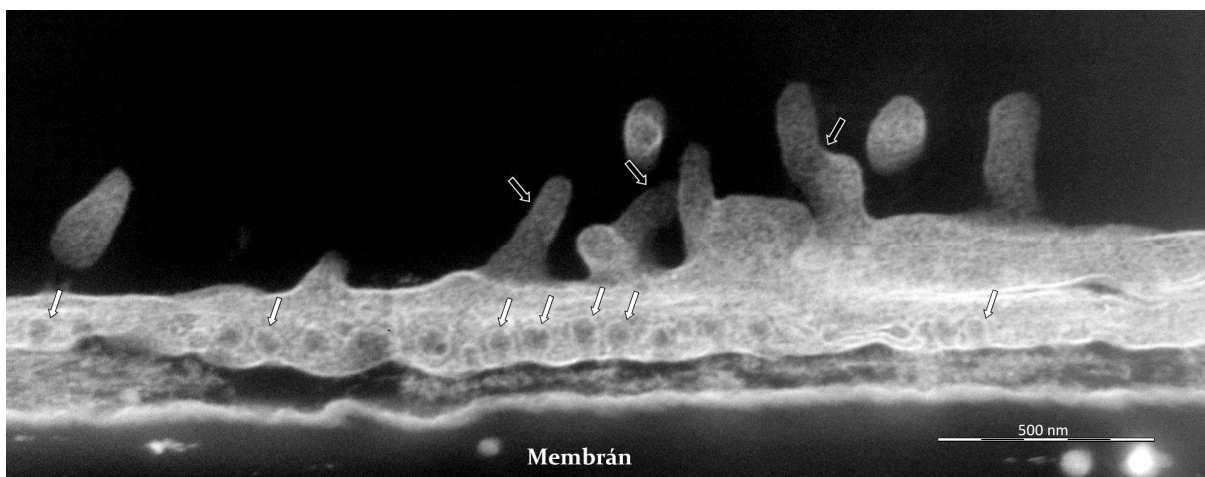
5.4 *Sejtkárosító hatás vizsgálata egér vér-agy gát modellen*



7. Ábra Sejtkárosító hatás vizsgálata, kontroll endotélsejtek



8. Ábra Sejtkárosító hatás vizsgálata, H₂O₂-dal kezelt endotélsejtek



9. Ábra Sejtkárosító hatás vizsgálata, H₂O₂-dal kezelt endotélsejtek

7. Ábra A kontroll endotélsejtek nyúlványait láthatjuk a képen, melyek hosszant elnyúlva egymáson fekszenek és szoros kapcsolat figyelhető meg közöttük. A szoros kapcsolatban lévő az érintkezési pontokat elektrondenz struktúrákként tűntek fel (fehér nyilak). Az

endotélsejtek alatt az alaphártya látható (fekete nyíl), az alaphártya a tenyésztő edényekben a polikarbonát membránhoz rögzül, de ez esetben az ultramikrotómos metszés során elváltak egymástól.

8. Ábra Ezen a képen, mely a H_2O_2 -dal kezelt endotélsejteket ábrázolja, szintén két egymáson fekvő sejtnyúlványt látunk, de itt a szoros kapcsolatok fellazultak, az érintkezési pontok közötti területen a sejtnyúlványok eltávolodtak egymástól (fekete nyilak). A membrán ezúttal látható a képen, de az alaphártya feltöredezett és csak maradványait figyelhetjük meg (fehér nyilak) az endotélsejtek és a membrán közötti területen.

9. Ábra Az oxidatív stressz hatására (H_2O_2) számos kaveola jelent meg a sejt bazális oldalán (fekete nyilak). A sejtek luminális oldalán exocitózis jelei figyelhetők meg (fehér nyilak).

A kontroll és hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) kezelt endotélsejtek elektronmikroszkópos képein jól megfigyelhetők olyan morfológiailag könnyen azonosítható jellemzőik, mint a szoros kapcsolatok, ill. egyéb sejtkapcsolatok és a kaveolák. Ezeknek hosszát, ill. számát hasonlítottam össze a kontroll és a hidrogén-peroxiddal kezelt sejtekben és az adatokat független kétmintás t-próbával értékeltem SPSS 17.0 statisztikai program segítségével.

A t-próba statisztikailag jelentős különbséget állapított meg a kontroll és a hidrogén-peroxiddal kezelt sejtek kaveoláinak számában és a szoros kapcsolatokon belül lévő érintkezési pontok arányában.

KAVEOLÁK SZÁMA

Kontroll csoportban ($N = 10$, $M = 1,30$, $s = 0,483$, $SED = 0,1530$), H_2O_2 csoportban ($N = 15$, $M = 2,93$, $s = 1,688$, $SED = 0,431$), $t(17,319) = -3,575$, $p = 0,002$, $\alpha = 0,05$

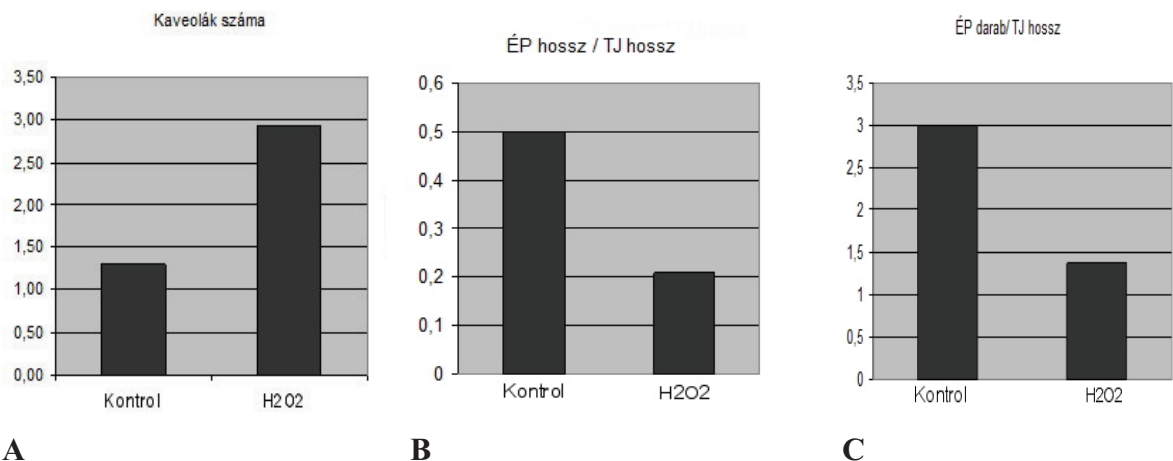
N - minta darabszám, M - átlag, s - standard deviáció (szórás), SED - az átlag szórása

ÉRINTKEZÉSI PONTOK HOSSZÚSÁGA A SZOROS KAPCSOLATOK HOSSZÁHOZ VISZONYÍTVA

Kontroll csoportban ($N = 14$, $M = 0,4991$, $s = 0,4029$, $SED = 0,1077$), H_2O_2 csoportban ($N = 11$, $M = 0,2076$, $s = 0,1210$, $SED = 0,0365$), $t(15,884) = 2,564$, $p = 0,021$, $\alpha = 0,05$.

ÉRINTKEZÉSI PONTOK SZÁMA A SZOROS KAPCSOLATOK HOSSZÁHOZ VISZONYÍTVA

Kontroll csoportban ($N = 14$, $M = 2,9955$, $s = 3,0303$, $SED = 0,8098$), H_2O_2 csoportban ($N = 11$, $M = 1,3758$, $s = 0,6902$, $SED = 0,2081$), $t(14,690) = 1,937$, $p = 0,072$, $\alpha = 0,05$.



10. Ábra A sejtkárosító hatás statisztikai eredményeinek hisztogramon való megjelenítése

Az **A** jelzésű képen a kaveolák számába történt növekedést látjuk az 1 órás hidrogén- peroxid kezelés hatására. A **B** képen szoros kapcsolatokon belüli érintkezési pontok hosszából és az adott szoros kapcsolat hosszából számított arányok átlagait látjuk. A **C** képen pedig a szoros kapcsolatokon belül előforduló érintkezési pontok arányának átlagai láthatók.

6. MEGBESZÉLÉS

A vér-agy gátat kialakító három fő sejt típus az agyi endotélsejtek, a periciták és az asztrociták (Zlokovic 2008; Abbott, Patabendige et al. 2010). Ennek az újonnan kifejlesztett vér-agy gát modellnek a segítségével (Nakagawa, Deli et al. 2009) lehetőség nyílik arra, hogy e három sejtféleségnek vér-agy gáton belüli szerepét feltárjuk, a neurovaszkuláris egységen belüli összetett szerepüket megismerjük. A reaktív oxigén molekulák (reactive oxygen species, ROS) az ischémiás agykárosodások kialakulásának fontos tényezői. A fiziológias körülmények között is folyamatosan, kis mennyiségben képződő szabadgyökök közé tartozik többek között a szuperoxid- és a hidroxilgyök, valamint a hidrogén-peroxid. Jelentős mennyiségű szabadgyök termelődik a mikroglában és az agyi érendotéliumban is. A reaktív oxigén molekulák képződése a mitokondriumban és egyéb sejtstruktúrákban zajló enzimatikus átalakulásokhoz köthető (Bari 2002). Elektronmikroszkópos vizsgálataink jól mutatták a hidrogén-peroxid károsító hatásait az egér vér-agy gát ko-kultúra endotélsejtjein. Fellazultak a szoros kapcsolatok, eltávolodnak egymástól, torzult a kapcsolódó sejtnyúlványok alakja, sok helyen kibocsátott vezikulákat figyeltünk. Megnövekedett a kaveolák száma is, leginkább a bazális oldalon vagy a citoplazmában voltak láthatók. A bazális membrán megvastagodott, több helyen integritását veszítette. Ezek a tapasztalatok jól egyeznek az in vivo kísérletesen előidézett oxidatív stressz létrehozta változásokkal. Lochhead és munkatársai kísérlete kimutatta, hogy az in vivo létrehozott oxidatív stressz

növeli a vér-agy gát permeabilitását, ami kapcsolatban van a szoros kapcsolat egyik fontos fehérjéje, az occludin mennyiségének és lokalizációjának módosulásával (McCaffrey, Willis et al. 2009; Lochhead, McCaffrey et al. 2010). Az occludin expressziójának változása miatt a vér-agy gát átteresztőképességének növekedését már korábban is leírták (Huber, Witt et al. 2001). Az a megfigyelésünk tehát, hogy a szoros kapcsolatok szerkezete módosul, fellazul, minden bizonnyal az occludinok lokalizációjának változására is utal, és igen hasonló az in vivo is megfigyelt jelenséghez.

Nemcsak az oxidatív stressz, de a gyulladásos folyamatok során is felszabadulnak szabadgyökök (Abbott, Ronnback et al. 2006). A baktériumok által termelt endotoxin lipopoliszaharid (LPS), melyet előszeretettel alkalmaznak gyulladásos folyamatok kísérleti modellezésére, szabadgyökök képződését is előidézti és hatására megnő a vér-agy gát átteresztőképessége (Gaillard, de Boer et al. 2003). Arra is található irodalmi adat, hogy intraperitoneális LPS kezelés hatására kaveolák jelentek meg a patkányok agyi endotélsejtjeinek bazális részén (Kittel 1999a). A mi kísérletünkben a hidrogén-peroxid hatására megjelenő kaveolák szintén nagyrészt bazális helyeződést mutattak az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint, azaz ezeknek a sokféle jelátviteli folyamatban is szerepet játszó membrán képződményeknek a jelenléte és helyzetváltozása is egybehangzó az in vivo kísérletek eredményeivel, ami az alkalmazott modell jóságát, az in vivo állapotot jól megközelítő voltát igazolja.

Az ép és a kezelt sejtek morfológiájában történő változás hatását megpróbáltuk számszerűsíteni is a szoros kapcsolatok átlagos hosszának, az érintkezésben levő nyúlványszakaszok közti érintkezési pontoknak, ill. a kezelés hatására láthatóan nagyobb számban megjelenő kaveoláknak számolásával. A független kétmintás t-próba felfedte, hogy a kaveolák száma a hidrogén-peroxid kezelés hatására 225%-kal nőtt, ezek az újonnan megjelent kaveolák főleg az endotélsejtek bazális plazmamembránnál voltak láthatóak, esetleg a citoplazmában. Emellett megvizsgáltam a szoros kapcsolatok hosszát, ezeken belül fellelhető érintkezési pontok (kissing points) hosszát és számát, mert úgy véltük ezek az adatok jellemezhetik a szoros kapcsolatok működését, mint a vér-agy gát integritását és funkcióját meghatározó egyik fő tényező. A hidrogén-peroxid kezelés hatására a szoros kapcsolatokon belüli érintkezési pontok hossza az eredeti átlag 41,59%-ra csökkent, az érintkezési pontok száma pedig 45,92 %-ra csökkent le. Ezek az értékek azt mutatják, hogy a hidrogén-peroxid kezelésnek jelentős hatása volt ezen a vér-agy gát modellen, tehát a sejtkárosító hatásokat, mint az oxidatív stressz, lehet vizsgálni rajta.

Próbálkozásunk nem járt teljes sikerrel, mert ahhoz, hogy valóban hiteles statisztikát tudjunk készíteni, sokkal több sejtet kellett volna megvizsgálnunk, ezt pedig maga az alkalmazott, önmagában is munka- és időigényes elektronmikroszkópos módszer teszi, ha nem is lehetetlenné, de igen nehezzé. A kb. 1cm²-es területről nem tudunk túl sok vizsgálható blokkot nyerni, azaz a vizsgálható sejtek száma mindenkeppen korlátozott. Ha a szoros kapcsolatok számának-hosszának változása jó jelzője is lenne a kiváltott károsodás mértékének, de az OGD esetében alkalmazott LDH mérés vagy az áteresztőképesség mérése gyakorlatban sokkal könnyebben megvalósítható. Az elektronmikroszkópos mérés így inkább az előbbi mérések magyarázata, ill. bizonyításaként értékes, és kiváló szemléltetője a károsodások mibenlétének.

In vivo kísérletben, patkány hippocampusban lipopoliszaharid endotoxin által kiváltott agyra szorító gyulladást vizsgáltak. Átmeneti változások voltak megfigyelhetők az ektokukleotidázok mintázatában, valamint morfológiai változásokat írtak le az endotélsejtek és a pericitákon. Ez egyik ilyen változás a pericitákban újonnan kialakult magas ekto-ATPáz aktivitással bíró kaveolák megjelenése volt (Kittel, Sperlagh et al. 2007). A jelenlegi kísérletünkben az in vivo citotoxikus hatást imitáló oxigén-glükóz megvonás (OGD) kezelésben részesült pericitákban ekto-ATPáz aktivitást mutató kaveolák alakultak ki. Az OGD kezelés az egy sejt típusból álló kultúrák és a hármas ko-kultúrák sejtjein is kifejezett változásokat okozott, ezen morfológiai változások fény- és elektronmikroszkópos szinten is jelentkeztek, relatív rövid idő elteltével, 1 vagy 2 óra OGD kezelés hatására. Az agyi endotélsejtek elvesztették orsó alakjukat és sokszögletű formát vettek fel, a közöttük lévő sejtkapcsolatok alakja eltorzult és lazábbá váltak. Lehetséges, hogy az endotélsejtekkel szomszédos periciták és asztrociták is hozzájárultak az OGD kezelés hatására kialakuló morfológiai változásokhoz a szoros kapcsolatokban. Korábban közzé tett eredmények szerint az asztrocitáknak kiemelkedő szerepe van abban, hogy az agyi endotélsejtek létre hozzák egymás között a szoros kapcsolatokat (Haseloff, Blasig et al. 2005; Perriere, Demeuse et al. 2005; Abbott, Ronnback et al. 2006) és az asztrociták befolyásának hiánya a szoros kapcsolatok gátként való működésének megszűnéséhez vezethet. A legszembetűnőbb változás, melyet fény- és elektronmikroszkóppal is megfigyelhettünk, az asztrociták morfológiájában következett be, az aktin filamentum hálózatuk újrarendeződött és hosszú nyúlványaik alakultak ki. Emellett ez az enzimhisztokémiai módszer felfedte az újonnan kialakult kaveolákat mindhárom sejt típusban, az aktív NTPDáz enzimeket és az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok alakbeli deformitásait. Azt tapasztalhattuk, hogy az endotélsejtek érzékenyebbek erre a kezelésre és hamarabb pusztulnak el, mint a másik két

sejt típus, a sejtkárosodás jeleit észlelhettük, például vakuólum képződést és lyukak kialakulását a citoplazmában. A laktát-dehidrogenáz aktivitás kimutatása megerősítette, hogy a vér-agy gát mindhárom sejtípusa reagált az OGD kezelésre, a statisztikai adatok is megerősítik, hogy az endotélsejteket érintette legjelentősebben a sejtkárosító hatás, mely sejtek találkoznak legelőször a központi idegrendszeret érő stimulusokkal in vivo.

A fél-quantitatív ekto-ATPáz aktivitás mérés felfedte, hogy a hármas ko-kultúrákon és a mono-kultúrákon is megnőtt az ekto-ATPáz aktivitás az OGD kezelés hatására. Az asztrocita-kultúrákban nem változott számottevően az enzimet kifejező sejtek száma, de ez magyarázható azzal, hogy ezekben a sejtekben nyugalmi körülmények között is magas az ekto-ATPáz aktivitás alapszintje. Arra is van magyarázat, hogy növekedett azon periciták száma, melyet az enzimaktivásra utaló csapadék befedett, mert ezeken a sejteken az NTPDáz enzim kifejeződése az őket érő hatásoktól függ. Az agyi endotélsejtek, melyekkel kapcsolatban azt tapasztaltuk, hogy érzékenyebbek az OGD kezelésre másképp reagáltak, mint az asztrociták, szintén emelkedett bennük a vizsgált enzimaktivitás. Patkány agykéregből származó endotélsejteken végzett kísérletben megállapították, hogy a lipopoliszaharid kezelés megváltoztatta az endotélsejtekben az ekto-ATPáz enzimek lokalizációját (Kittel 1999a). Az NTPDáz enzimaktivitás elektronmikroszkópos módszerrel is vizsgáltuk, ezek a képek felfedték a sejt morfológiában bekövetkezett változásokat és az enzimaktivitás lokalizációjáról is pontosabb információt nyertünk.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az új vér-agy gát modellt alkalmazva (Nakagawa, Deli et al. 2007; Veszélka, Pasztoi et al. 2007; Nakagawa, Deli et al. 2009) ki tudtuk mutatni a három sejtípuson az NTPDázok lokalizációjának, ill. aktivitásának változását az oxigén-glükóz megvonás kezelés után, amely az in vivo helyzethez hasonlóan imitálja a szervezetben létrejövő ischémiát. Morfológiai változásokat tapasztaltunk az oxigén-glükóz megvonás és a hidrogén-peroxid kezelés hatására, melyek összhangban vannak korábbi kísérletek eredményeivel (Kittel 1999a; Kittel, Sperlagh et al. 2007). Az oxidatív stresszként használt hidrogén-peroxid kezelés hatására a szoros kapcsolatok fellazulását és a kaveolák számának növekedését tapasztaltuk, csak úgy, mint in vivo kísérletekben (Huber, Witt et al. 2001; Lochhead, McCaffrey et al. 2010). Feltételezzük, hogy a modell tulajdonságait a sejtek együttműködésére nézve az asztrociták (Deli, Abraham et al. 2005; Haseloff, Blasig et al. 2005) s periciták (Nakagawa, Deli et al. 2007) jelenléte befolyásolja kedvező irányba. Következtetésként megállapíthatjuk, hogy ez a modell alkalmas lehet farmakológiai kísérletekben való alkalmazásra, mert sokkal jobban

utánozza az in vivo körülményeket, mint a többi in vitro vér-agy gát modellt, mely csak egy vagy két sejt kultúrából készül.

8. SUMMARY

Ischemic and oxidative stress induced changes in a new blood-brain barrier model

The blood-brain barrier (BBB) is composed of endothelial cells, pericytes and astrocytes, and serves as interface between the blood flow and the central nervous system (CNS). Since BBB deregulation plays important role in the pathogenesis of several CNS diseases spanning from brain tumors to stroke, understanding the molecular mechanisms controlling BBB functions might help unveiling new therapeutic targets to brain pathologies. Cell-culture-based models have greatly contributed to our knowledge on the physiology, pathology and pharmacology of the blood–brain barrier (BBB). In this present study we were focusing on a novel blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. To mimic ischemic events, which occur in the CNS in vivo, we applied oxygen-glucose deprivation (OGD) on BBB cells in triple co-culture and separately on the EC, PC and AC cell cultures as well. Endothelial cells appeared to be highly susceptible to cell death, whereas astrocytes and pericytes were more resistant. The results of the OGD treatment were investigated by enzyme-histochemical methods on light and electron microscopic levels, LDH release assay was performed in order to measure cell damage. A semi-quantitative assay highlighted increased ecto-ATPase activity following exposure to OGD in the three types of cell, both when grown separately and in triple co-culture. On endothelial cell cultures we also investigated cytotoxicity by hydrogen peroxide treatment, results were evaluated by statistical analysis. Taking into account our findings that are consistent with earlier in vivo experiment results, we conclude that this new in vitro model is useful for demonstrating the changes in the BBB during ischemic events and could serve as a tool for pharmacological experiments.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Kittel Ágnesnek, amiért megtisztelt vele, hogy pártfogásába vett, türelmesen irányított és oktatott, inspirált a szakdolgozatommal és az élet más aspektusaival kapcsolatban.

Köszönet illeti dr. Halasy Katalint, amiért elvállalta, hogy tanítványává fogad egyetemi témavezetőmként.

Szeretném megköszönni és nagyon hálás vagyok, hogy Dr. Deli Máriának és Veszeka Szilviának a Szegedi Tudományegyetemen, hogy rendelkezésünkre bocsátották az egérből készült sejt kultúrákat.

Köszönettel tartozom prof. Maria Pia Abbracchionak és laboratóriumában dolgozó munkatársainak, hogy részt vehettem ebben a megtisztelő munkában, mely a Milánói Egyetem és a KOKI együttműködésével jött létre.

És nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek és barátaimnak a biztatást és megértő türelmüket.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott, N. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." J Anat **200**(5): 527.
- Abbott, N. J. (2005). "Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation." Cell Mol Neurobiol **25**(1): 5-23.
- Abbott, N. J., E. U. Khan, et al. (2002). "Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier." Novartis Found Symp **243**: 38-47; discussion 47-53, 180-5.
- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiol Dis **37**(1): 13-25.
- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Abe, T., M. Kakyo, et al. (1998). "Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2." J Biol Chem **273**(35): 22395-401.
- Angelov, L., N. D. Doolittle, et al. (2009). "Blood-brain barrier disruption and intra-arterial methotrexate-based therapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma: a multi-institutional experience." J Clin Oncol **27**(21): 3503-9.
- Ballabh, P., A. Braun, et al. (2004). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." Neurobiol Dis **16**(1): 1-13.
- Bandopadhyay, R., C. Orte, et al. (2001). "Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers." J Neurocytol **30**(1): 35-44.
- Bari, F. (2002). "A reaktív oxigéngyökök szerepe a reperfüziós károsodás kialakításában." Agyérbetegségek(2002;8(3):10-4).
- Bennett, D. G. (2007). Osmotic- and Stroke-Induced Blood-Brain Barrier Disruption Detected by Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging
Department of Biomedical Engineering, Worcester Polytechnic Institute: 259.
- Berger, J. R. and M. Avison (2004). "The blood brain barrier in HIV infection." Front Biosci **9**: 2680-5.
- Bernacki, J., A. Dobrowolska, et al. (2008). "Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier." Pharmacol Rep **60**(5): 600-22.
- Berzin, T. M., B. D. Zipser, et al. (2000). "Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **21**(2): 349-55.
- Bignami, A. (1991). Glial cells in the central nervous system. Amsterdam, Elsevier.
- Boulland, J. L., K. K. Osen, et al. (2002). "Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle." Eur J Neurosci **15**(10): 1615-31.
- Braun, L. D., E. M. Cornford, et al. (1980). "Newborn rabbit blood-brain barrier is selectively permeable and differs substantially from the adult." J Neurochem **34**(1): 147-52.
- Broaddus, W. C., Y. Liu, et al. (1999). "Enhanced radiosensitivity of malignant glioma cells after adenoviral p53 transduction." J Neurosurg **91**(6): 997-1004.
- Bundgaard, M. and H. Cserr (1981). "A glial blood-brain barrier in elasmobranchs." Brain Res **226**(1-2): 61-73.
- Cecchelli, R., V. Berezowski, et al. (2007). "Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development." Nat Rev Drug Discov **6**(8): 650-61.
- Chaudhuri, J. D. (2000). "Blood brain barrier and infection." Med Sci Monit **6**(6): 1213-22.

- Christopherson, K. S., E. M. Ullian, et al. (2005). "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis." Cell **120**(3): 421-33.
- Cirrito, J. R., R. Deane, et al. (2005). "P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model." J Clin Invest **115**(11): 3285-90.
- Crone, C. (1965). "Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue." J Physiol **181**(1): 103-13.
- Cucullo, L., P. O. Couraud, et al. (2008). "Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies." J Cereb Blood Flow Metab **28**(2): 312-28.
- Cuevas, P., J. A. Gutierrez-Diaz, et al. (1984). "Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries." Anat Embryol (Berl) **170**(2): 155-9.
- Dallasta, L. M., L. A. Pizarov, et al. (1999). "Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis." Am J Pathol **155**(6): 1915-27.
- Davies, D. C. (2002). "Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours." J Anat **200**(6): 639-46.
- Davson H., W. K., Segal M. (1987). The Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid. New York, Churchill Livingstone.
- de Vries, H. E., J. Kuiper, et al. (1997). "The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases." Pharmacol Rev **49**(2): 143-55.
- Deli, M. A. (2007). Berlin Heidelberg, Springer Verlag.
- Deli, M. A. (2009). "Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery." Biochim Biophys Acta **1788**(4): 892-910.
- Deli, M. A., C. S. Abraham, et al. (2005). "Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology." Cell Mol Neurobiol **25**(1): 59-127.
- Dohgu, S., F. Takata, et al. (2005). "Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production." Brain Res **1038**(2): 208-15.
- Fumagalli, M., R. Brambilla, et al. (2003). "Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors." Glia **43**(3): 218-03.
- Gaillard, P. J., A. B. de Boer, et al. (2003). "Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro." Microvasc Res **65**(1): 24-31.
- Haseloff, R. F., I. E. Blasig, et al. (2005). "In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro." Cell Mol Neurobiol **25**(1): 25-39.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev **57**(2): 173-85.
- Hawkins, R. A., R. L. O'Kane, et al. (2006). "Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids." J Nutr **136**(1 Suppl): 218S-26S.
- Hayashi, K., S. Nakao, et al. (2004). "Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier." Regul Pept **123**(1-3): 77-83.
- Huber, J. D., K. A. Witt, et al. (2001). "Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1241-8.
- Janzer, R. C. and M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." Nature **325**(6101): 253-7.

- Joó, F. (1996). "Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences." Prog Neurobiol **48**(3): 255-73.
- Joó, F. and I. Karnushina (1973). "A procedure for the isolation of capillaries from rat brain." Cytobios **8**(29): 41-8.
- Kalaria, R. N. (1999). "The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **893**: 113-25.
- Katychev, A., X. Wang, et al. (2003). "Glucocorticoid-induced apoptosis in CNS microvascular pericytes." Dev Neurosci **25**(6): 436-46.
- Kittel, A. (1999a). "Lipopolysaccharide treatment modifies pH- and cation-dependent ecto-ATPase activity of endothelial cells." J Histochem Cytochem **47**: 393-400.
- Kittel, A., M. Garrido, et al. (2002). "Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas." J Histochem Cytochem **50**(4): 549-56.
- Kittel, A., B. Sperlagh, et al. (2007). "Transient changes in the localization and activity of ecto-nucleotidases in rat hippocampus following lipopolysaccharide treatment." Int J Dev Neurosci **25**(5): 275-82.
- Kortekaas, R., K. L. Leenders, et al. (2005). "Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo." Ann Neurol **57**(2): 176-9.
- Laywell, E. D., P. Rakic, et al. (2000). "Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13883-8.
- Lee, G. and R. Bendayan (2004). "Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders." Pharm Res **21**(8): 1313-30.
- Lerner, E. N., E. H. van Zanten, et al. (2004). "Enhanced delivery of octreotide to the brain via transnasal iontophoretic administration." J Drug Target **12**(5): 273-80.
- Liebner, S., A. Fischmann, et al. (2000). "Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme." Acta Neuropathol **100**(3): 323-31.
- Lochhead, J. J., G. McCaffrey, et al. (2010). "Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation." J Cereb Blood Flow Metab.
- Marroni, M., N. Marchi, et al. (2003). "Vascular and parenchymal mechanisms in multiple drug resistance: a lesson from human epilepsy." Curr Drug Targets **4**(4): 297-304.
- McCaffrey, G., C. L. Willis, et al. (2009). "Occludin oligomeric assemblies at tight junctions of the blood-brain barrier are altered by hypoxia and reoxygenation stress." J Neurochem **110**(1): 58-71.
- Minagar, A. and J. S. Alexander (2003). "Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis." Mult Scler **9**(6): 540-9.
- Mott, F. W. (1913). "The late professor Edwin Goldmann's investigations on the central nervous system by vital staining." The British Medical Journal.
- Nag, S. (2003). "Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels." Methods Mol Med **89**: 3-36.
- Nakagawa, S., M. A. Deli, et al. (2009). "A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes." Neurochem Int **54**(3-4): 253-63.
- Nakagawa, S., M. A. Deli, et al. (2007). "Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells." Cell Mol Neurobiol **27**(6): 687-94.
- Noda, M. (2007). "Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain." Exp Physiol **92**(3): 513-22.
- Ohno, K., K. D. Pettigrew, et al. (1978). "Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat." Am J Physiol **235**(3): H299-307.

- Oki, T., S. Takahashi, et al. (2004). "Increased ability of peripheral blood lymphocytes to degrade laminin in multiple sclerosis." *J Neurol Sci* **222**(1-2): 7-11.
- Papadopoulos, M. C., S. Saadoun, et al. (2001). "Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema." *Br J Neurosurg* **15**(2): 101-8.
- Parys, B., A. Cote, et al. (2010). "Intercellular calcium signaling between astrocytes and oligodendrocytes via gap junctions in culture." *Neuroscience* **167**(4): 1032-43.
- Peppiatt, C. M., C. Howarth, et al. (2006). "Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes." *Nature* **443**(7112): 700-4.
- Perriere, N., P. Demeuse, et al. (2005). "Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties." *J Neurochem* **93**(2): 279-89.
- Persidsky, Y., S. H. Ramirez, et al. (2006). "Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions." *J Neuroimmune Pharmacol* **1**(3): 223-36.
- Ramsauer, M., D. Krause, et al. (2002). "Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes." *FASEB J* **16**(10): 1274-6.
- Rapaport, S. I. (1976). *Blood-Brain Barrier in Physiology and Medicine*. New York, Raven Press.
- Rapoport, S. I. (1991). "Microinfarction: osmotic BBB opening or microcrystals in infusate?" *J Neurosurg* **74**(4): 685.
- Reese, T. S. and M. J. Karnovsky (1967). "Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase." *J Cell Biol* **34**(1): 207-17.
- Schwaninger, M., S. Sallmann, et al. (1999). "Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB." *J Neurochem* **73**(4): 1461-6.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." *J Neurosci* **21**(18): 7153-60.
- Shriver, L. P., K. J. Koudelka, et al. (2009). "Viral nanoparticles associate with regions of inflammation and blood brain barrier disruption during CNS infection." *J Neuroimmunol* **211**(1-2): 66-72.
- Sims, D. E. (1991). "Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease." *Can J Cardiol* **7**(10): 431-43.
- Song, B. W., H. V. Vinters, et al. (2002). "Enhanced neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor in regional brain ischemia after conjugation to a blood-brain barrier delivery vector." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(2): 605-10.
- Song, H., C. F. Stevens, et al. (2002). "Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells." *Nature* **417**(6884): 39-44.
- Stout, C. E., J. L. Costantin, et al. (2002). "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." *J Biol Chem* **277**(12): 10482-8.
- Takano, T., G. F. Tian, et al. (2006). "Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow." *Nat Neurosci* **9**(2): 260-7.
- Tao-Cheng, J. H., Z. Nagy, et al. (1987). "Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia." *J Neurosci* **7**(10): 3293-9.
- Tomas-Camardiel, M., J. L. Venero, et al. (2005). "Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals." *J Neurosci Res* **80**(2): 235-46.
- Treat, L. H., N. McDannold, et al. (2007). "Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound." *Int J Cancer* **121**(4): 901-7.

- Ullian, E. M., S. K. Sapperstein, et al. (2001). "Control of synapse number by glia." Science **291**(5504): 657-61.
- Vakili, A., H. Kataoka, et al. (2005). "Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **25**(8): 1012-9.
- Vein, A. A. (2006). Lina Stern: Science and fate. 11th Annual Meeting of the International Society for the History of the Neurosciences (ISHN). Pavia, Italy.
- Veldhuis, W. B., S. Floris, et al. (2003). "Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption." J Cereb Blood Flow Metab **23**(9): 1060-9.
- Veszelka, S., M. Pasztoi, et al. (2007). "Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages." Neurochem Int **50**(1): 219-28.
- Warth, A., S. Kroger, et al. (2004). "Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae." Acta Neuropathol **107**(4): 311-8.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, et al. (2003). "Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme." Acta Neuropathol **105**(6): 586-92.
- Yang, H. (2010). "Nanoparticle-Mediated Brain-Specific Drug Delivery, Imaging, and Diagnosis." Pharm Res.
- Zlokovic, B. V. (2005). "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration." Trends Neurosci **28**(4): 202-8.
- Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." Neuron **57**(2): 178-201.
- Zonta, M., M. C. Angulo, et al. (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." Nat Neurosci **6**(1): 43-50.