

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Élettani és Biokémiai Tanszék



**Az asztroglia tumor nekrosis faktor (TNF) – α termelésének vizsgálata a
hepaticus encephalopathia (HE) *in vitro* körülményei között**

*Production of tumor necrosis factor (TNF)- α by astroglia cells exposed to
hepatic encephalopathy (HE) in vitro*

Készítette:

Balajthy Bálint

VI. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Bárány Zoltán

tanszéki munkatárs

ÁTE Élettani és Biokémiai Tanszék

Dr. Kiss Dávid Sándor

Egyetemi adjunktus

ÁTE Élettani és Biokémiai Tanszék

Budapest

2018

1. TARTALOM

1. TARTALOM.....	1
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
3. BEVEZETÉS	4
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
4.1 A hepatikus encephalopathiáról általában	5
4.2 Patogenezis	6
4.3 Neurotoxinok	6
4.4 Mangán	7
4.5 Neurotranszmisszió és az energiaháztartás	8
4.6 Szisztémás gyulladás – HE	9
4.7 Az agyi véráramlás	10
4.8 Oxidatív és nitrozatív stressz	10
4.9 Neuroinflammáció	11
4.10 Az asztroglia tenyészet mikroglia mentesítése	11
4.11 Kutatásunk hipotézise	13
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	15
5.1 Asztroglia sejt kultúra létrehozása	15
5.2 Asztroglia sejt kultúra passzálása	17
5.3 Mikroglia-eltávolítás a sejt kultúrából	18
5.3.1 Ara-C és LME kezelés.....	18
5.3.2 Rázatás.....	19
5.4 Ibal festés lépései	20
5.5 Az oxidatív stressz vizsgálata nagy tisztaságú asztroglia kultúrán.....	21
5.6 Asztroglia tenyészet TNF- α termelésének vizsgálata.....	22
6. EREDMÉNYEK	24
6.1 A mikroglia-eltávolítás sikerességének ellenőrzése	24
6.2 Az asztroglia sejtenyészet ROS termelése.....	24
6.3 Asztroglia tenyészet TNF- α termelésének meghatározása	25
7. MEGBESZÉLÉS.....	28
7.1 Az eredmények értékelése	28
7.2 Konklúzió.....	30
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	31
9. SUMMARY	32
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	33
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	40

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AASLD	Amerikai Májkutató Társaság (American Association for the Study of Liver Diseases)
ALF	Akut májelégtelenség (Acute liver failure)
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propion sav
Ara-C	Citozin β -d-arabinofuranozid
ATP	Adenozin-5'-trifoszfát
Ca	Kalcium
CBF	Agyi véráramlás (Cerebral blood flow)
cGMP	Ciklikus guanozin-monofoszfát
CM-DCFH-DA	5-6-klorometil 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein-diacetát
CNS	Központi idegrendszer (Central nervous system)
CO ₂	Szén-dioxid
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenil-indol
EASL	Európai Májkutató Társaság (European Association for the Study of the Liver)
EFOP	Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Programja
EGFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Enhanced Green Fluorescent Protein)
ELISA	Enzim-kötött immunoszorbens próba (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	Fluoreszcens sejtszortírozás (Fluorescence-activated cell sorting)
GABA	Gamma-amino-vajsav
GFAP	Gliális fibrilláris savas fehérje (Glial fibrillary acidic protein)
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
HE	Hepatitis encephalopathia
IBA-1	Ionizált Ca-kötő adaptor molekula 1 (Ionized Calcium-binding Adapter Molecule 1)
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
LME	L-Leucin-metilészter
LPS	Lipopoliszacharid
MAP	Mitogén aktivált protein (Mitogen-activated protein)
Mn	Mangán

MPT	Mitokondriális permeabilitás tranzíció (Mitochondrialpermeability transition)
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NGS	Normál kecske szérum (Normal goat serum)
NH ₄ Cl	Ammónium-klorid
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NO	Nitrogén-monoxid
OD	Optikai denzitás
PAG	Foszfát aktiválta glutamináz enzim
PBS	Foszfát pufferes sóoldat (Phosphate-buffered saline)
PI	Propidium-jodid
PSS	Portoszisztémás sönt
RNS	Reaktív nitrogén származékok (Reactive nitrogen species)
ROS	Reaktívoxigén származékok (Reactive oxygen species)
TNF- α	Tumor nekrozis faktor-alfa
NF- κ B	Nuclear factor- κ B

3. BEVEZETÉS

A hepaticus encephalopathia (HE) egy olyan orvosi és állatorvosi jelentőséggel bíró multifaktoriális kórkép, amely leggyakrabban májelégtelenséggel és/vagy portoszisztémás sőnttel hozható összefüggésbe. A HE-t a klinikai tünetek alapján négy stádiumra, a máj diszfunkciójának eredete alapján pedig három csoportba szokás osztani.

A kutatókat az 1890-es évek óta foglalkoztatja a betegség megismerése, azonban a pontos patogenezis még ma sem tisztázott. Az elmúlt évtized kutatási eredményei bebizonyították, hogy a májcirrózis vezető és egyben legfontosabb szövődménye a HE. A humán eseteken túl az állatorvosi jelentősége sem elhanyagolható, ugyanis több háziállatfajban leírták már a betegséget.

A legtöbb tanulmány az ammónia szerepét emeli ki, mint elsődleges neurotoxin, amely hatására az asztroglia sejtekben kóros duzzadás lép fel. Az ammónia mellett a mangán (Mn) is részt vesz a HE patogenezisében gátolva a mitokondriumok normál működését és a szinaptikus átvitelt. Számos *in situ* vizsgálat bizonyítja, hogy HE esetén a GABA-koncentráció is növekszik a vérben, amely hozzájárulhat kognitív zavarok kialakulásához. Emellett bizonyított tény, hogy a szisztémás gyulladásnak, illetve az oxidatív és nitrozatív stressznek is kiemelkedő szerepe van a HE patogenezise szempontjából.

Az Élettani és Biokémiai tanszéken korábban már vizsgálták *in vitro* kísérleti körülmények között a HE patogenezisének egyes aspektusait, mely során az asztroglia sejtek proinflammatorikus citokin termelő képességét mérték primer sejttenyészeteken, olyan ágensek hatására, amelyek igazoltan szerepet játszanak a kórkép kialakulásában. Azonban az asztroglia *in vitro* kísérleti körülmények között mért proinflammatorikus citokin termelése tekintetében nem volt egyértelműen megállapítható e sejtek valódi szerepe, amely további vizsgálatok elvégzését tette indokolttá. Kísérletünk során két különböző módszerrel létrehozott nagy tisztaságú asztroglia kultúrán vizsgáltuk a sejtek TNF- α és ROS termelését H₂O₂, NH₄Cl és bakteriális LPS ágensekkel végzett kezeléseket követően.

Dolgozatom az Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszékén az Európai Unió, az Európai Szociális Alap (ESZA) EFOP 3.6.2 hallgatói kutatói ösztöndíj támogatásával készítettem. Kísérleteink új ismereteket nyújthatnak arra nézve, hogy a HE során fellépő cerebrális kórfolyamatokban az asztroglia sejtek milyen módon járulnak hozzá a proinflammatorikus citokinek, illetve a reaktív oxigéngyökök (ROS) termeléséhez.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 A hepatikus encephalopathiáról általában

A hepatikus encephalopathia (HE) az American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) és a European Association for the Study of the Liver (EASL) közös definíciója szerint az agyműködés olyan diszfunkciója, amely májelégtelenség vagy portoszisztémás sönt (PSS) következményeként alakul ki (Vilstrup et al., 2014). Bár a kutatókat régóta foglalkoztatja a szindróma megismerése, a pontos patogenezis mai napig sem ismert (Salgado and Cortes, 2013). Az első tudományos közlés 1893-ban született a témában (Shawcross et al., 2005). Pavlov 60 kutyán portocavális söntöt hozott létre Eck, orosz származású sebész által 1877-ben kidolgozott műtéti eljárással, a portális véna élettanának tanulmányozása céljából. A műtét után 10 nappal a kutyákon ataxiát, görcsrohamokat, ingerlékenységet, komatózus állapotot tapasztalt. Amennyiben a kutyákkal húst etetett, állapotuk jelentősen romlott, ezzel szemben, ha tejet vagy kenyeret kaptak, a tünetek kevésbé jelentkeztek (Hahn et al., 1893). A humán gyógyászatban megismert esetek alapján Salgado and Cortes (2013) a HE-t a klinikai tünetek alapján négy stádiumra osztotta. Az első stádiumú betegekre enyhe zavarodottság, ingerlékenység és étvágytalanság jellemző. A második stádiumban a levertség, ataxia és orientációs zavarok, a harmadikban pedig zsibbadás, rohamok és nyálzás a legfőbb tünetek. Az utolsó stádium elfekvéssel, komatózus állapottal és végül halállal jár. Ferenci és mtsai. (2002) a máj diszfunkciójának eredete alapján csoportosították a szindrómát. Az „A” csoportba az akut májelégtelenség (ALF) következményeként kialakuló, a „B” csoportba a PSS-el összefüggésbe hozható, a „C” csoportba pedig a májcirrózis és portális hipertenzió eredményeként létrejövő HE-t sorolták. Az elmúlt évtized kutatási eredményei megmutatták, hogy a májcirrózis vezető és egyben legfontosabb szövődménye a HE (Bajaj et al., 2016; Ferenci et al., 2002). A kutatások eredményéből következően az AASLD és EASL közösen kidolgozott egy új nomenklatúrát, hogy sikeresebbé tegye a szindróma kezelését a gyakorlatban. A betegség többdimenziós volta miatt az új útmutató nemcsak különböző típusokba és fázisokba sorolja, hanem négy tengelyben foglalja össze a betegség lefolyását (**1.táblázat**). Az új megközelítés előnye, hogy a korábbi irányelveket is magába foglalva egy pontosabb rendszert állít fel a HE klasszifikálására (Bajaj et al., 2017).

1.táblázat: A betegség lefolyása az AASLD és EASL közösen kidolgozott új útmutatója szerint.

Típus	Súlyosság		Lefolyás	Kialakulása
A	minimal	Szubklinikai tünetek	Epizódikus	Spontán
	I.			
B	II.	Klinikai tünetek	Visszatérő	Precipitáló tényezők általi
	III.			
C	IV.		Perzisztens	

4.2 Patogenezis

Annak ellenére, hogy több mint 100 éve foglalkoznak a kórkép patogenezisével, ma is hiányosak ismereteink a HE-t illetően. A legfontosabb limitáló tényező, hogy az agyat érintő betegségek *in vivo* vizsgálata meglehetősen nehéz. A legtöbb irodalmi adat *in situ* vagy *in vitro* modellek használatával született, ezek azonban nem alkalmasak arra, hogy a HE-t a maga komplexitásában megértsük. A kórkép patogenezisében fontos szerephez jutnak egyes neurotoxinok, megváltozott neurotranszmisszió, károsodott ingerületátvitel, megváltozott agyi energiametabolizmus, szisztémás gyulladás, valamint a vér-agy gát károsodása (Ferenci et al., 2017, Aldridge et al., 2015).

4.3 Neurotoxinok

A legtöbb tanulmány az ammónia, mint elsődleges neurotoxin szerepét emeli ki a kórkép patogenezisében. Az ammónia legfontosabb forrása a béltraktus, azon belül az enterociták és a bélflóra egyes mikroorganizmusai (Ferenci, 2017). Az ammónia szerepét elsőként Nencki és mtsai. (1896) vizsgálták portokavális sönttel rendelkező kutyákon. Amennyiben a kutyákkal fehérjében dús táplálékot etettek, az állatok állapota súlyosan romlani kezdett, ezért a szindrómát hús intoxikációnak nevezték el. A kezelések hatására az állatok először komatózus állapotba kerültek, majd elpusztultak. Matthews (1922) szerint a hús intoxikáció legfőbb okozója az ammónia. Gabuzda és mtsai. (1952) a májcirrózisban szenvedő humán betegek asciteses tüneteit olyan kation cserélő gyantával próbálták enyhíteni, amely a gyomor-béltraktusból nem szívódik fel és megköti a béltraktusban keletkező bikarbonátot, helyette pedig ammóniumiont ad le. A kezelés eredményeként a betegek a HE jellemző neurológiai tüneteit mutatták. Phear és mtsai. (1955) szerint a májbetegek komatózus állapota a vérben megemelkedett ammónia koncentráció eredménye. Mai tudásunk szerint az egészséges máj a karbamid ciklus révén detoxifikálja a vérben található ammónia teljes mennyiségét. A ciklus során az ammóniából karbamidot képez,

amellyel védi a szervezetet az ammónia toxikus hatásaitól. A májbetegek vérében az ammónia koncentráció növekedése a máj diszfunkciójának eredménye (Ferenci, 2017). Az agy azonban alternatív szerepet játszhat a detoxikációban. Az agyban az asztrogliá sejtek felelősek az ammónia eliminálásáért, a szinte kizárólag ebben a sejt típusban megtalálható glutamin-szintetáz enzim révén, mely a glutamin szintézisét katalizálja ammónia és glutamát felhasználásával. Így a hiperammónémia a glutamin felhalmozódását eredményezi az asztrogliá sejtekben (Haussinger et al., 2000; Suárez et al., 2002;). A növekvő glutamin szint miatt nő az intracelluláris ozmolaritás, amelynek eredményeként az asztrogliá sejtekbe folyadék áramlik. Ezen sejtek duzzadása agyi ödéma kialakulásához vezet, amely fatális következményekkel járhat (Görg et al., 2013; Bernal et al., 2007). Egy másik elmélet szerint az asztrociták azért duzzadnak meg, mert a glutamin egy hisztidin érzékeny hordozón keresztül bejut a mitokondriumba (Albrecht et al., 2000). A mitokondrium belső membránján a foszfát aktiválta glutamináz enzim (PAG) katalizálja a glutamin hidrolízisét ammóniára és glutamátra (Laake et al., 1998). Az így kialakuló extrém magas ammónia szint mitokondriális permeabilitás tranzíciót (MPT) és reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését indukálja. A ROS és az MPT aktiválják a mitogén által aktivált protein (MAP) kinázt, amely végül az asztrogliá sejtek intracelluláris térfogatszabályozásának hibáját eredményezi (Jayakumar et al., 2006). Hasonló folyamat játszódik le PSS esetén is, azonban ebben az esetben az ammóniában dús vér a máj megkerülésével jut a szisztémás vérkeringésbe (Holecek, 2015).

4.4 Mangán

Az ammónia mellett a mangán (Mn) is részt vesz a HE patogenezisében (Krieger et al., 1995; Spahr et al., 1996). Mind a hepatociták, mind az asztrociták specifikus Mn transzport rendszerrel rendelkeznek (Aschner et al., 1992; Schramm et al., 1986). A Mn fontos kofaktora a szuperoxid-dizmutáz és glutamin-szintetáz enzimeknek a központi idegrendszerben (Wedler et al., 1984), azonban ALF esetén megnő a mennyisége a szisztémás vérkeringésben (Zieve et al., 1989). A Mn gátolhatja a mitokondriumok anyagcseréjét és normál működését, valamint befolyásolhatja a gliasejtek gyulladással aktivitását. Továbbá megzavarja a szinaptikus átvitelt és a glia-neuron interakciót (Perazzo et al., 2012; Takeda, 2003; Takeda et al., 2002). A mangán az első fém, amelyről felismerték, hogy apoptózist indukálhat a központi idegrendszerben (Perazzo et al., 2012).

4.5 Neurotranszmisszió és az energiaháztartás

Számos neurotranszmitter rendszert vizsgáltak már különböző kísérleti modellekkel. A legtöbb publikáció alapján HE esetén változás történik a gamma-aminovajsav (GABA)-erg (Schafer et al., 1982), dopaminerg (Fischer et al. 1982), serotoninerg és a glutamáterg neurotranszmitter rendszerekben (Ferenci, 2017). Jól ismert tény, hogy a GABA az egyik fő gátló neurotranszmitter az emlősök agyában. Schafer és mstai. (1982) HE kísérleti modellükben megnövekedett GABA koncentrációt tapasztaltak a vérplazmában és a cerebrospinális folyadékban. Kísérletükkel bebizonyították, hogy a bélflóra által termelt GABA átjuthat a vér-agy gáton és így hozzájárulhat a HE során létrejövő neurális gátláshoz. A glutamát excitátoros neurotranszmitter az emlősök központi idegrendszerében metabotróp és ionotróp receptorokhoz kötődhet (Mayer and Westbrook, 1987; Fischer et al., 1971). Az ionotróp receptoroknak három típusa van, az NMDA, AMPA és kainát receptorok. Az ALF az NMDA receptorokat aktiválja, így az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedik (Hermenegildo et al., 2000). A Ca^{2+} kötődik a calmodulinhoz, amelynek segítségével számos enzimet aktiválhat, például a neurális NO-szintetáz, mely az extracelluláris cGMP szint emelkedését okozza. Akut hiperammonémia esetén az aktivált NMDA receptorok hatására az ATP raktárak kimerülnek az agyban, megváltozik az agy metabolizmusa, növekszik a laktát, piruvát és mitokondriális $[NAD^+]/[NADH]$, illetve csökken a cytosol $[NAD^+]/[NADH]$ tartalma (Hindfelt and Siesjo 1971; Hawkins et al., 1973; Hindfelt et al., 1977; Kosenko et al., 1993). A következő lépésben csökken az ATP szintje is (Schenker et al., 1967; Hindfelt et al., 1977; Kosenko et al., 1993, 1994). A megváltozott metabolizmus és az ATP szint csökkenése lehet az oka az ammónia indukálta kómának és halálnak (Kosenko et al., 1994). Az aktivált NMDA receptorok hatására emelkedik a NO képződése. Ennek eredményeként csökken a glutamát-szintetáz enzim aktivitása, amely az ammónia eliminációjának csökkenésével jár (Kosenko et al., 1995, 1998). Az akut és krónikus hiperammonémia különböző módon befolyásolja az NMDA receptorhoz kapcsolódó jelátvitelt. A fenti eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy az ALF a vérben magas ammónia koncentrációval az NMDA receptorok túlzott aktiválódásához vezet, amely számos agyi elváltozásért és az állatok haláláért felelős (Llansola, 2007). A krónikus hiperammonémia gátolja a glutamát-NO-cGMP útvonalat (Felipo et al., 1988; Azorín et al., 1989). A legfrissebb kutatások alátámasztották, hogy a glutamát-NO-cGMP útvonal és a cGMP modulálják a tanulás és a memória egyes formáit (Danysz et al., 1995; Yamada et al., 1996; Bernabeu et al., 1996, 1997; Chen et al., 1997; Prickaerts et al., 1997, 2002; Meyer et

al., 1998; Smith et al., 2000). Ebből következtetve valószínű, hogy a glutamát-NO-cGMP útvonal működésének károsodása krónikus májelégtelenségben hozzájárulhat kognitív zavarok kialakulásához (Llansola et al., 2007).

4.6 Szisztémás gyulladás – HE

Májkárosodás esetén gyakoriak a fertőzések és/vagy a hepatocita sejtek pusztulásából származó szisztémás gyulladás (Licinio et al., 1997). A szisztémás gyulladás fontos szerepet játszik a HE patogenezisében (Pedersen et al. 2007; Wright and Jalan 2007), amelyet számos *in situ* (Tanaka et al., 2006; Marini and Broussard 2006; Cauli et al., 2007; Jover et al., 2006; Wright et al., 2007) és *in vivo* kísérlet bizonyít (Shawcross et al., 2004; Shawcross et al., 2007; Shawcross et al. 2011; Montoliu et al., 2011). A szisztémás gyulladás során felszabaduló citokinek három úton kerülnek kapcsolatba a központi idegrendszerrel (Licinio and Wong, 1997):

- A szisztémás gyulladás során termelődött citokinek és a központi idegrendszer kapcsolatában kulcsfontosságú tényező a vér-agy gát integritása. Mint szabályzó felület, a vér-agy gát szelektív módon képes az IL-1 α , IL-1 β (Banks et al., 1989, 1991, 1993, 1994), IL-1 receptor antagonist (Gutierrez et al., 1994), IL-6 (Banks et al., 1994b) és tumor necrosis factor- α (Gutierrez et al., 1993; Pan et al., 1996, 2003, 2006; Osburg et al., 2002) transzportjára. A szállított citokinek fontos szerepet játszanak a neurodegeneráció folyamataiban (Banks et al., 1988, 1996; Pan et al., 2001). Azonban a legfrissebb irodalmi adatok alapján az asztrociták és a mikroglia is képesek gyulladásra és sérülésre adott válaszként IL-1 β , IL-6 és TNF- α termelésére (Hutchison et al., 2013;).
- Az agyban lévő mikrovaszkuláris endotél sejtek a vér-agy gát anatómiai alapját képezik. Az endotél sejtek közvetlen kapcsolatot létesítenek az asztrocitákkal. A szisztémásan képződő IL-1 β , TNF- α és felszabaduló LPS-ok hatására a mikrovaszkuláris endotél sejtekben NO-szintetáz enzim expresszálódik, amely NO termelést eredményez (Iwahashi et al., 1999; Okuda et al., 1995; Oleszak et al., 1997; Tran et al., 1997; Van Dam et al., 1995; Zhang et al., 1997). NO hatására megváltozik az endotél sejtek permeabilitása (Al-Naemi and Baldwin, 1999; Al-Naemi and Baldwin, 2000; Johnston et al., 1999; Schutte et al., 2001), amely lehetőséget ad az ammónia megnövekedett diffúziójára. (Didier et al., 2003). Ez megváltoztatja a glutamáterg neurotranszmissziót és megnöveli a perifériás típusú benzodiazepin receptorok számát az agyban (Itzhak et al., 1994), amely folyamat hozzájárul a

celluláris ozmotikus egyensúly felborulásához (Vries et al., 1996; Falsig et al., 2004). Azt is megfigyelték, hogy tartós citokin hatásra növekszik az agyi perfúzió, ennek pontos oka azonban még nem ismert (Jalan et al., 2004).

- Az autonóm idegrendszer által beidegzett szervek képesek közvetlen módon jelet küldeni a központi idegrendszernek (Szelényi, 2001). Például az IL-1 receptorok megtalálhatóak végig a nervus vagus lefutási területén, valószínűleg a dentritic-like sejteken helyezkednek el az idegparenchymában, valamint a paraganglionális sejtekben a n. vagus körül (Goehler et al., 1997).

4.7 Az agyi véráramlás

Az agyi véráramlás (CBF) jelentős mértékben függ az artériás vér széndioxid (CO₂) tartalmától, azonban az artériás középnyomás változása csak kismértékben befolyásolja az agyi vérellátást, ugyanis az artériás vérnyomás esése esetén agyi erek dilatációja csökkenti az ellenállást, így a vérellátás állandó maradhat (Paulson et al., 1990). Olyan betegeknél, akik májcirrózisban, és egyidejűleg a HE szubklinikai formájában szenvednek (ún. minimal HE), az agyi keringés autoregulációjának zavarát írták le (Almdal et al., 1989; Rodriguez et al., 1987). A CBF csökkenésének pontos patofiziológiai okai még nem ismertek, de feltehetően a májban felszabaduló toxikus anyagok állnak az elváltozás hátterében (Larsen, 1996). ALF fennállásakor a CBF kezdeti csökkenése tapasztalható, ami hasonló mechanizmusokat tükrözhet. Azonban ismert, hogy agyödéma esetén a CBF növekszik (Bihari et al., 1986). Wendon és mtsai. (1994) harminc ALF-ben szenvedő beteg nagyrésznél a CBF csökkenését tapasztalták, azonban egy későbbi vizsgálat az ALF-ben szenvedő betegek 24%-a CBF növekedést mutatott egyidejű agyödémával és magasabb mortalitási aránnyal (Aggarwal et al., 1994).

4.8 Oxidatív és nitrozatív stressz

Az ammónia, hyponatraemia, benzodiazepinek és gyulladásozó citokinek hatására az asztrocitákban megnő a reaktív nitrogénygyökök (RNS) és ROS produkciója. Az ammónia által stimulált NMDA receptorok csökkentik az antioxidáns enzimek aktivitását és növelik a szuperoxid-anionok termelését (Hilgier et al., 2003; Norenberget al., 2004). Ráadásul a neutrofil anyagcsere, mint potenciális ROS forrás, egy szisztémás vagy lokális gyulladásozó állapotot is fenntart, illetve az ammóniából képződő glutamát szintén fokozza az asztrociták aktivitását. A RNS és a ROS fehérjeszintézist károsító hatásaikkal hozzájárulhatnak a HE-ra jellemző kognitív zavarok kialakulásához (Albrecht and Norenberg, 2006; Häussinger et al., 2008).

4.9 Neuroinflammáció

A közelmúlt kutatási eredményei alapján fény derült arra, hogy a neuroinflammáció, azaz az idegszövet gyulladása számos központi idegrendszeri érintettségű kórkép patomechanizmusában szerepet kap, úgymint a Parkinson-kór, Alzheimer-kór vagy épp az epilepszia (Wang et al., 2015; Heneka et al., 2015; Aronica et al., 2017) Mindemellett egyre több kutatás számol be a (kór)folyamat HE-ben betöltött relevanciájáról és e tekintetben betöltött terápiás lehetőségeiről (Rodrigo et al., 2010; Bémour et al., 2010; Chastre et al., 2012). A neuroinflammáció legfontosabb sejtes szereplői a mikroglia, azonban az asztroglia szerepe sem elhanyagolható citokin-termelő képességük révén (Forshammar et al., 2011; Choi et al., 2014). Asztroglia kultúrákon többféle ágens hatására citokinek termelését tudták mérni. Többek között LPS és IL-1 β hatására is gyulladáshoz vezetett választ detektáltak primer asztroglia kultúrákban (Sharma et al., 2007; Lieberman et al., 1989). Az asztroglia neuroinflammációs szerepének vizsgálata során alkalmazott *in vitro* modellek mindig tartalmaznak csekély számú mikroglia, így nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy az esetleges gyulladáshoz vezetett válasz ezen sejtektől ered. Ezt támasztja alá Andersson és mtsai. (2005) kutatása melyben a laktát hatására eltérő gyulladáshoz vezetett citokin választ kaptak attól függően, hogy az asztroglia kultúra hány százalék mikroglia-t tartalmazott. Hasonló eredményekről számoltak be az LPS hatására is (Barbierato et al., 2013; Welser et al., 2013). Ezek alapján megállapítható, hogy az asztroglia neuroinflammációban betöltött szerepe máig nem teljesen tisztázott.

4.10 Az asztroglia tenyésztés mikroglia mentesítése

Cytosin arabinosid (Ara-C)

Az Ara-C antimitotikus tulajdonságú hatóanyag, melyet akut myelocytás leukémia kezelésére is használnak a humán orvoslásban (Yates et al., 1982). A tenyésztet akkori érdemes a hatóanyaggal kezelni, amikor az konfluenssé válik. Ezen a ponton az asztrociták proliferációja a kontakt inhibíció miatt rohamosan lecsökken, a mikroglia pedig gyors osztódásba kezdenek. A legtöbb protokoll 5–10 μ M -os koncentrációt használ 2-5 napig tartó inkubációval (Saura, 2007). Hewett és mtsai. (1993) 8 μ M-os Ara-C oldattal kezelték konfluens sejtenyészeteiket. A kétnapos inkubációt követően immunhisztokémiai és morfológiai vizsgálatokkal több mint 97%-os asztroglia tartalmat mértek.

L-leucin-metil-észter (LME)

Az L-leucin-metil-észter (LME) lizoszotróp szer, amelyet eredetileg a makrofágok szelektív pusztítására használtak (Thiele et al., 1983), de alkalmas a mikroglia (Giulian et al., 1993; Guillemain et al., 1997) és oligodendroglia-sejtek (Hewett et al., 1999) számának csökkentésére asztrocita kultúrákban. Az eljárás során 1–10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ koncentrációjú oldattal kell kezelni a konfluens sejtenyészetet 6-12 óra inkubációval (Bowman et al., 2003; Simmons and Murphy, 1992). Hamby és mtsai. (2005) magasabb koncentrációjú (50–75 μM) LME oldatot használtak, rövidebb ideig tartó inkubációval (60-90 perc), azonban az így nyert sejtenyészet még mindig nagy számban tartalmazhat mikroglia sejteket.

Clodronát

A clodronát a biszfoszfónatok családjába tartozó hatóanyag, amelyet széles körben alkalmaznak osteolitikus betegségek kezelésére az osteoclast gátló hatása miatt (Russel and Rogers, 1999). Jól ismert, hogy a clodronát apoptózist indukál makrofágokban (Monkkonen et al., 1994), így azok eliminálására használható *in vivo* körülmények között (Popovich et al., 1999). Molekulája hidrofil tulajdonságú, ennek köszönhetően nehezen jut át a foszfolipid membránokon (Russel and Rogers, 1999), ezért egy liposzóma által közvetített intracelluláris clodronát leadást fejlesztettek ki (Monkkonen and Heath, 1993). Kumamaru és mtsai. (2012) alacsony dózisú liposzómális clodronáttal (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,) kezeltek primer asztrocita sejt kultúrákat. A 12 órás inkubációt megelőzően $13.1 \pm 0.8\%$ -ban, azt követően pedig $0.7 \pm 0.2\%$ -ban tartalmazott mikroglia sejteket a tenyészet. Az irodalmi adatok alapján a clodronát kezelés megbízhatóan működik, azonban az Ara-C és LME szélesebb körben használt. (Marek et al., 2007; Jauneau et al., 2006; Marek et al., 2008).

Ráztatás

Az eljárás alapja, hogy az asztrocita sejtek lényegesen nagyobb erővel kapcsolódnak a sejtenyészeti flaska falához, mint a többi gliasejt típus (Ponomarev et al., 2005). A kiültetésüktől számított 7-8. napon, amikor a tenyészet konfluenssé válik, a mikroglia és az egyéb sejtfeleségek az asztrocita kultúra fölé rétegződnek (Giulian and Baker, 1986). A mikroglia eltávolításához kezdetben a sejtenyészeti flakát 30 percen keresztül 180 rpm-tel kell rázni, majd a felülúszót le kell önteni (Siao and Tsirka, 2002; Armstrong, 2002). A mintát ilyenkor érdemes visszapótolni friss médiummal, majd 240 rpm-tel 6 órán keresztül újra ráztatni (Armstrong, 2002). Schildge és mtsai. (2013) ezzel az eljárással 98%-ban asztrocita sejteket tartalmazó tenyészetet tudtak létrehozni.

Mágneses sejtszortírozás

Az eljárás lényege, hogy a szeparálni kívánt sejttípusok adott sejtspecifikus fehérjéje ellen termelt ellenanyagokat mágneses gyöngyökhöz kötik, így a gyöngyökhöz kötött ellenanyag segítségével kiválogatható egy adott sejttípus. Amennyiben a jelölt és jelöletlen sejteket tartalmazó folyadékot mágneses térbe helyezett szeparáló oszlopon keresztül áramoltatják, a jelölt sejtek az oszlopban maradnak. A mágneses tér megszüntetésével a jelölt sejtekben dús folyadék az oszlop alján összegyűjthető. Annak alapján, hogy a jelölt vagy a jelöletlen sejttípusból szeretnénk tiszta populációt előállítani, elkülönítünk negatív és pozitív mágneses szelekciót (Miltenyi et al., 1990). Ezt az eljárást a humán orvoslásban a limfociták (Semple et al., 1993), dendritikus sejtek (Schmitz et al., 1993), granulociták (Hansel et al., 1991), és megakariociták (Schmitz et al., 1994) szeparálására is használták. Marek és mtsai. (2008) a mikroglia sejtfelszíni markerei ellen termelt ellenanyagokat jelölték meg mágneses részecskékkel. A szeparálással 95-97%-ban asztroglia sejtekből álló kultúrát tudtak létrehozni, mely gliasejteket egyáltalán nem tartalmazott.

Fluoreszcens sejtszortírozás (FACS)

Az eljárás lehetővé teszi a szabadon úszó fluoreszcensen jelölt sejtek szeparálását töltésük alapján. A berendezésben a sejtszuspenziót egy olyan vékony csőben áramoltatják, amelyben a sejtek csak egyesével képesek haladni. Mielőtt a szuszpenzió elhagyja a fűvóka hegyét, egy rázóberendezés a szuszpenziót apró cseppekre osztja, úgy, hogy egy cseppbe egy sejt jusson. Ezután a fűvókát elhagyó cseppek elektromos töltést kapnak aszerint, hogy tartalmazznak-e fluoreszcensen festődő sejtet. A cseppek elektromos térbe vezetve töltésük alapján szeparálhatók (Leonard et al., 2002). John és mtsai. (2008) transzgenetikus egerekből izoláltak asztrocitákat, melyek zöld fluoreszcens fehérjét (EGFP⁺) expresszálnak. Az eljárással 99%-ban asztrocitákat tartalmazó sejtszuspenziót hoztak létre.

4.11 Kutatásunk hipotézise

A Élettani és Biokémiai Tanszéken korábban elvégzett kísérletek nem konzekvens eredményei újabb kutatások elvégzését tették indokolttá. A közelmúltban az asztroglia sejtek HE-ban betöltött szerepének megismerésére irányuló tanszéki vizsgálatok során az irodalmi adatokkal szemben, a nagy tisztaságú asztroglia kultúrából álló *in vitro* modellünkben nem tapasztaltunk proinflammatorikus citokin termelés növekedést a kórképben igazoltan kóros szereppel bíró ágensek hatására. Feltehetően az asztrogliaknak tulajdonított citokin termelés hátterében a sejt kultúrákban elhanyagolhatóan tűnő mikroglia szerepe áll. Kutatásunk hipotézise, hogy az asztroglia sejtek önmagukban nem képesek proinflammatorikus

citokinek termelésére. A nemzetközi publikációkban leírt asztroglialis citokin termelés pedig a különböző mikroglia gyérítési módszerek ellenére is fennmaradó csekély mennyiségű mikroglíanak tulajdonítható, vagy egy idáig kevésbé ismert mikroglia-asztroglia kölcsönhatás eredményének.

5. 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: XIV-I-001/2202-4/20/12 és PEI/001/665-8/2015) történt, a száraz táp és az ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésükre.

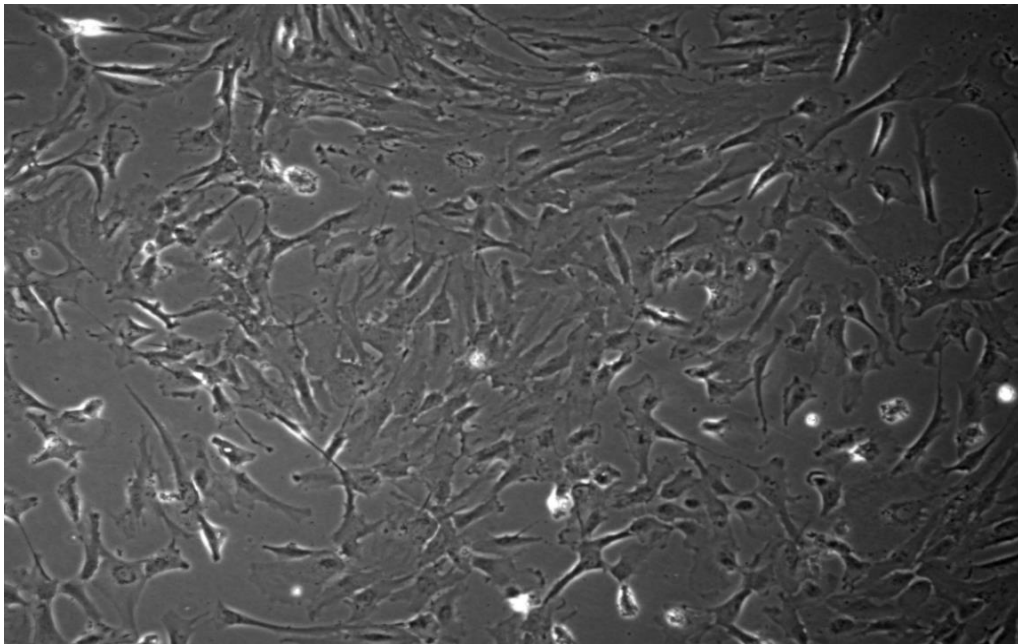
5.1 Asztroglia sejtkultúra létrehozása

A nemzetközi publikációk alapján jól ismert, hogy az asztrociták és gliasejtek egyaránt képesek proinflammatorikus citokinek termelésére, ezért az asztroglia sejtek kóroki szerepének tisztázásához nélkülözhetetlen feladat az asztroglia sejtek izolálása és tenyésztése. A tanszék korábbi kutatásaihoz hasonlóan, a sejttenyészetek létrehozásához 1-2 napos Sprague-Dawley patkányok teljes agyszövetét használtuk.

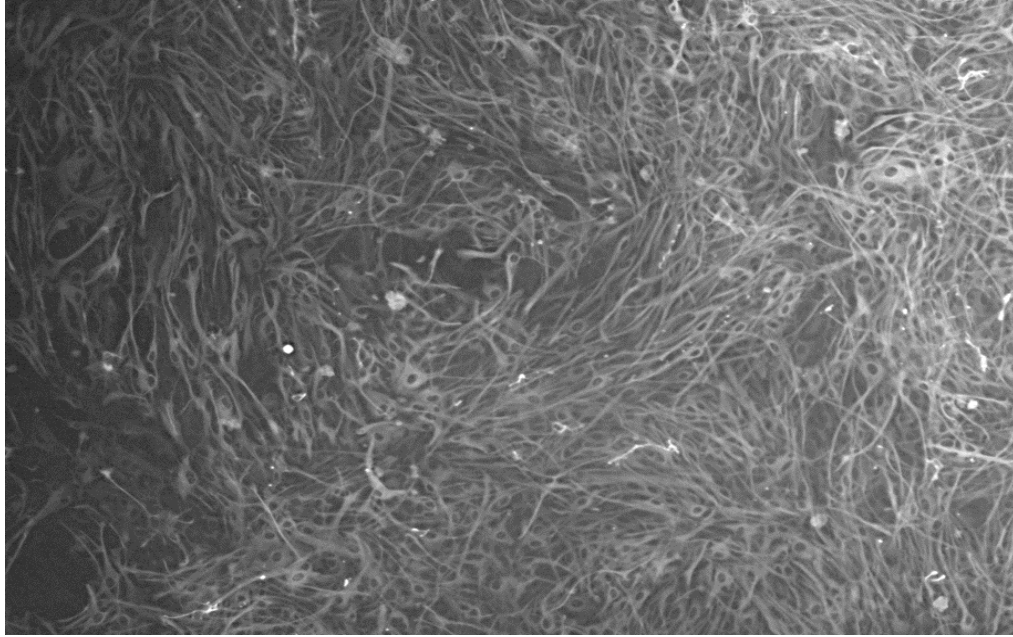
A sebészeti eljárást megelőzően előhűtöttünk 30 ml amfotericin B-t tartalmazó foszfát puffert az eltávolított agyak fogadására. A gyors dekapitálást követően a bőr, majd a koponyacsont eltávolítása következik, melyekhez a kontamináció elkerülése érdekében külön eszközöket használtunk. Ezután a teljes agyszövet kiemelésre került sor, amelyet az amfotericin B-t tartalmazó foszfát pufferbe helyeztünk. A sejttenyészetünk vérsejtekkel való kontaminációjának elkerülése céljából sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk az agyhártyákat, majd a preparátumokat kalciummentes PBS oldatba helyeztük. Ezt követően pipettával leszívtuk a PBS oldatot az agyhártyáktól megtisztított szervekről. A sejttenyészet létrehozásának kulcsfontosságú lépése a sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok felbontása, ezért az agyszövetet apró darabokra szeleteltük és 10 percen keresztül 2,5%-os tripszin, valamint 5 mg/ml DNáz oldatok elegyében, 37 °C-on inkubáltuk. Az így létrehozott homogenizátum enzimátikus emésztését előmelegített tápoldattal (5 ml/agy) állítottuk le. Az előbb említett tápoldat előkészítéséhez 263 ml Minimal Essential Medium Eagle-t, 25 ml 10%-os főtális borjúsavót (FCS) és 6 ml 4 mM-os Glutamint használtunk. A bakteriális kontamináció megelőzése érdekében 3 ml 2,5 ug/ml-koncentrációjú Amfotericin B-t, 40 NE Penicillin-t, valamint 40 µg Streptomicint (3 ml) kevertünk a médiumhoz. A sejtkültetés fázisában az így nyert sejtszuspenziót Petri-csészékbe helyeztük, melyekhez további 5 ml tápoldatot mértünk. Az így elkészített Petri-csészéket utolsó lépésként 5% CO₂-ot tartalmazó, 37°C-os hőmérsékletű inkubátorban tároltuk 12-24 órán keresztül.

Az elhalt sejtekből felszabaduló anyagcseretermékek gátolják az asztroglia osztódását és fejlődését, ezért fontos lépés a kiültetett sejtek szövettörmelékektől való megtisztítása. A Petri-csészék aljára kitapadt asztrogliaokról a sejtkiültetést követően 12-24 óra inkubáció után eltávolítottuk a tenyésztőmédiumot, majd 37 °C-os friss médiummal öblítettük át a sejteket. A mosási eljárást 24 órával később megismételtük. Az élő asztroglia sejtek felhasználják a rendelkezésükre álló tápanyagokat és ezzel egyidőben anyagcseretermékeket bocsátanak környezetükbe, ezért a sejttenyésztő médiumot 2-3 naponta szükséges cserélnünk. A tanszék korábbi kísérletei alapján 2-3 hét alatt alakul ki konfluens sejttenyészet, melyet a **1. és 2. ábra** szemléltet.

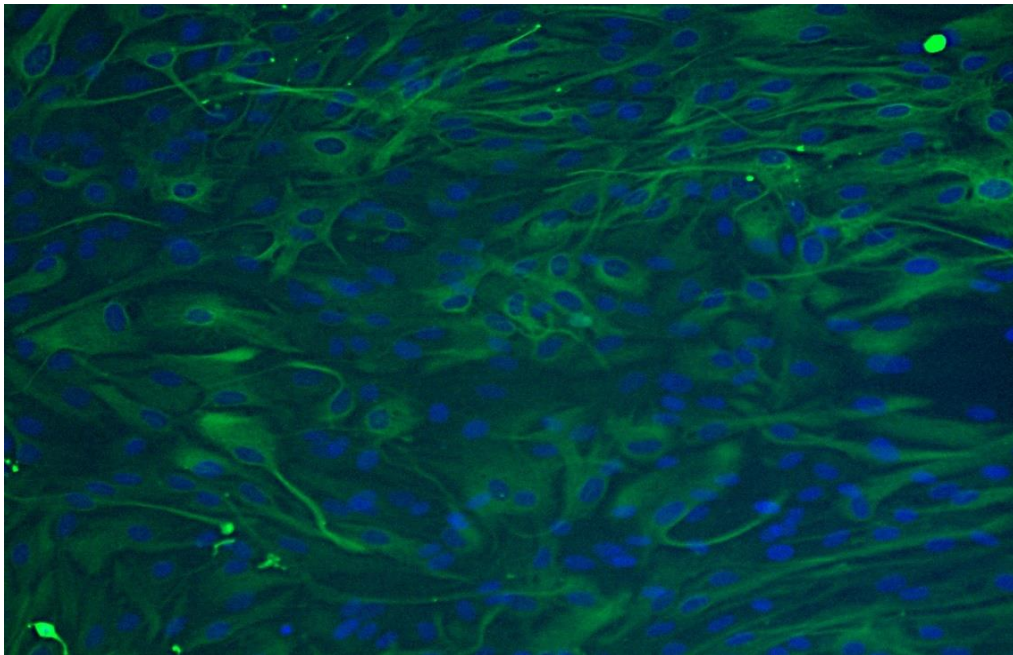
Az asztroglia sejtek arányát inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axio Vert.A1) ellenőriztük a tenyészetekben. Vizsgálataink során GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje) és DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) markerek alapján 85-90%-os asztroglia arányt állapítottunk meg (**3. ábra**).



1. ábra: A 10 napos primer asztroglia kultúra fénymikroszkópos felvétele. A kiültetést követően 10 nappal az asztrocita sejtek még nem fedik le a



2. ábra: 3 hetes konfluens primer patkány asztroglia kultúra fénymikroszkópos felvétele. Az alacsony sejtsűrűség következtében kifejezetten nyúlványos asztrocitákat láthatunk a felvételen.



3. ábra: A GFAP és DAPI festés. Kék színnel látható a DAPI markerek alapján megfestett összes sejtmag. Az asztroglia sejtek nyúlványaiban előforduló GFAP strukturális fehérjék az alkalmazott immunfluoreszcens eljárással zöld színűre festődnek.

5.2 Asztroglia sejtkultúra passzálása

Az izolált sejtekből 3 hét alatt konfluens primer sejttenyészet alakul ki a Petri-csészékben. A tenyésztőedényben növekvő primer asztroglia sejteket a következőképpen passzáljuk:

- A csészékről óvatosan leszívjuk a tápfolyadékot.

- A konfluens glia tenyészetet PBS-sel átmoszuk, ezzel semlegesítve a maradék tápoldatot.
- Következő lépésként leszívjuk a PBS-t a sejtekről, majd tripszinnel inkubáljuk (4 ml PBS + 1 ml 0,25% tripszin), amely enzimatikusan bontja a sejtek kitapadását elősegítő fibrinszálakat.
- Inkubáció termosztátban, miközben a sejtek felválását mikroszkóp alatt ellenőrizhetjük.
- Ezt követően főtális borjúsavó (FCS, 10%) tartalmú médiummal leállítjuk az emésztést.
- A sejtszuspenziót lecentrifugáljuk (10 perc, 1000 rpm, szobahőmérséklet), majd a sejteket friss médiumba föl vesszük.
- A Bürker-kamrával elvégzett sejtszámolás után kiültetjük a sejteket Poli-L-Lizinnel kezelt lemezekre (24-es lemez esetén 100-150 000 sejt/lyuk, 96-os plate esetén 20-75 000 sejt/lyuk).
- A plate welljeibe juttatott sejt + tápoldatot kiegészítjük adott mennyiségű médiummal.

5.3 Mikroglia-eltávolítás a sejt kultúrából

A HE *in vitro* vizsgálatának nélkülözhetetlen lépése a tiszta asztrocita sejt kultúra létrehozása. Az első módszer 1971-ben Fischer és mtsai. által került kidolgozásra. Azóta számos módosítás történt az eljárásban, szinte minden laboratórium kidolgozza a számára legmegfelelőbb protokollt. Az asztrogliá sejttenyészetek mindig tartalmaznak idegsejteket, endimasejteket, fibroblasztokat, endotélsejteket és mikrogliaakat is. Amennyiben a sejttenyészetben a mikroglia sejtek jelenlététől eltekintünk, tévesen tulajdoníthatunk valójában mikroglia eredetű hatásokat az asztrocitáknak. Ezért a mikroglia jelenléte már elenyésző mennyiségben is megzavarhatja az asztrociták szerepének megismerésére irányuló vizsgálatok eredményét. Kutatásunk során párhuzamosan két eljárással végeztük el a mikroglia gyérítést:

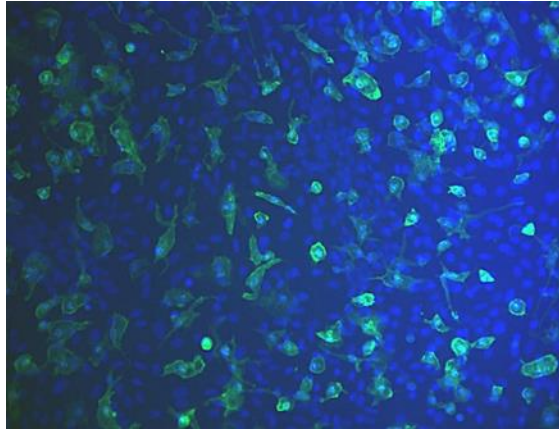
5.3.1 Ara-C és LME kezelés

A tanszék korábbi kutatásai során kidolgozásra került egy Ara-C és LME kezeléssel álló mikroglia gyérítési protokoll. Az Ara-C mitózis inhibitor, míg az LME lizoszomotróp hatóanyag. A passzálást követően a konfluens sejttenyészetet 10 μ M -os Ara-C-vel három napig kezeltük, majd lecseréltük a sejttenyésztő médiumot. Egy nappal később 25 mM LME-vel 1 órán át inkubáltuk a sejt kultúrát.

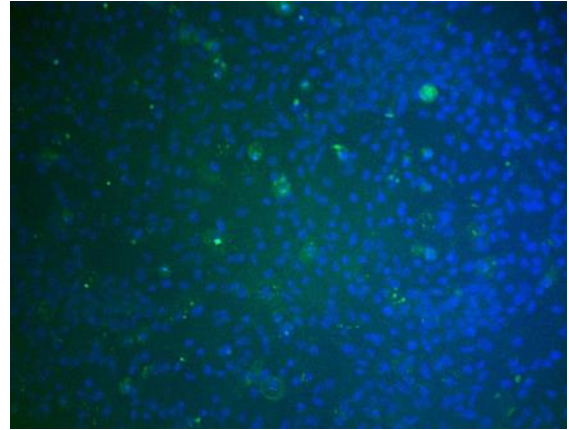
5.3.2 Rázatás

Az eljárás alapja, hogy az asztrocita sejtek sokkal erősebben kötődnek a sejttenyésztő flaska aljához, mint a többi sejtfeleség, ezért megfelelő intenzitású rázással az egyes sejt típusok elkülöníthetők az asztrogliaiktól. A passzálást megelőzően a sejtuszpenziót sejttenyésztő flakába ültettük ki, amelyben a tenyészet 10 nap alatt konfluenssé vált. A konfluens sejttenyészetet orbital shakerrel 30 percen keresztül 180 rpm-tel és 37°C-on ráztuk, majd lecseréltük a tenyészetet a tápoldatot. Következő lépésként 6 órán keresztül, 240 rpm-tel, 37°C-on ráztuk a tenyészetet és ismét lecseréltük a médiumot (Schildge et al., 2013). Az így nyert tenyészetet a korábban részletezett eljárás szerint passzáltuk.

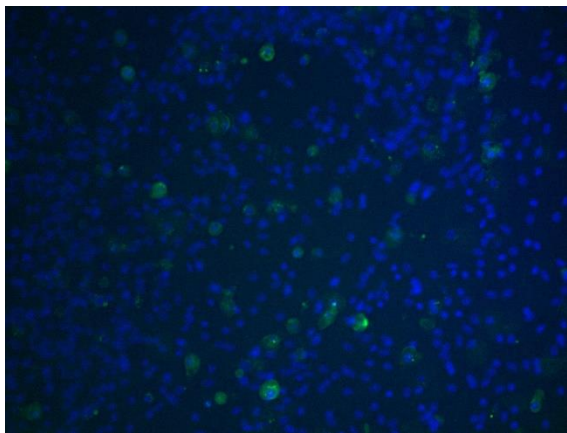
A mikroglia-gyérítés eredményességét ionizált Ca-kötő adaptor molekula 1 (Iba1) festéssel ellenőriztük le mindkét eljárás esetén. Az Iba1 makrofág/mikroglia specifikus kalciumkötő fehérje, amelynek fontos szerepe van az aktivált mikroglia fagocitózisában és a membránok károsításában (Ahmed et al., 2007). Az Iba1 fehérje kiválóan alkalmas a mikroglia kimutatására immunhisztokémiai eljárások segítségével. A festést elvégeztük kizárólag 10 μ M Ara-C vel (**4. ábra**), illetve 10 μ M Ara-C és 25 mM (**5. ábra**), 50 mM (**6. ábra**) és 75 mM LME (**7. ábra**) kezelések kombinációját követően. Az LME csökkentette a mikroglia számát, de a 25-50-75 mM-os kezelések között nem tapasztaltunk különbséget a hatékonyságukban, ezért a 25 mM-os koncentrációt alkalmaztunk a TNF- α és ROS méréseknél is. A rázatást követő Iba1 és DAPI festést a **8. ábra** szemlélteti.



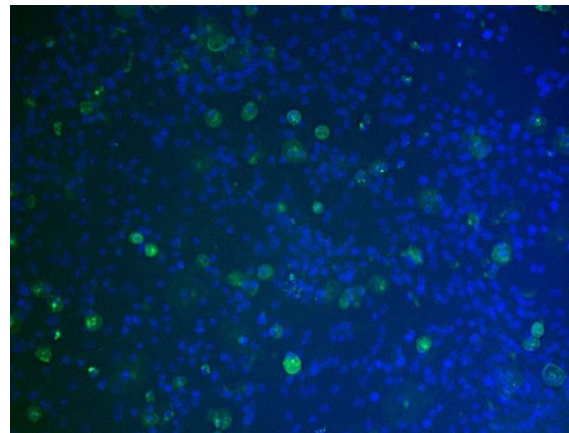
4. ábra: 10 μ M Ara-C-vel kezelt kultúra Iba1 és DAPI festéssel. A sejtmagok kékkel, a mikroglia pedig zöld színnel festődnek.



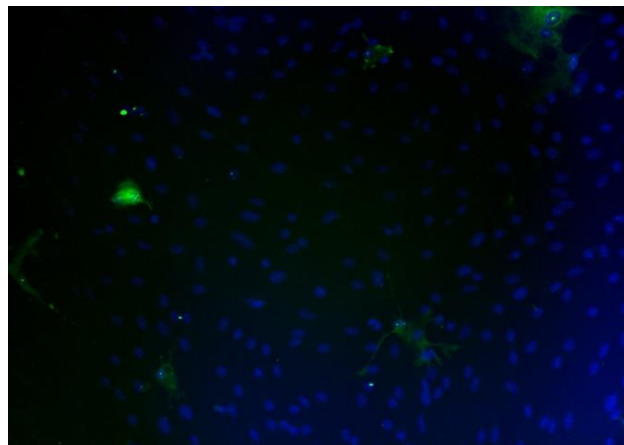
5. ábra: 10 μ M Ara-C-vel és 25 mM LME-vel kezelt kultúra Iba1 és DAPI festése.



6. ábra: 10 μ M Ara-C-vel és 50 mM LME-vel kezelt kultúra Iba1 és DAPI festése.



7. ábra: 10 μ M Ara-C-vel és 75 mM LME-vel kezelt kultúra Iba1 és DAPI



8. ábra: A rázatással mikroglia gyéritett kultúra Iba1 és DAPI festése. Látható, hogy a zölddel festődő mikroglia aránya elenyésző az összsejtszámhoz viszonyítva.

5.4 Iba1 festés lépései

- A sejtekről leszívjuk a tápfolyadékot
- 0,1 M (300 μ M/platelyuk) PBS oldattal átmoszuk a sejttenyésztő plate-t

- Rápipettázunk 300 μM /platelyuk, -20°C -os, 100%-os metanolt és 15 percen keresztül -20°C -on inkubáljuk
- Leszívjuk a metanolt
- Háromszor átmoszuk a plate-t (300 μM /platelyuk) 0,1 M PBS pufferrel
- Rámérjük a 20%-os normál szérumot (NGS) és 40 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk
- PBS oldattal háromszor átmoszuk a plate-t (300 μM /platelyuk)
- Rámérjük a primer antibodyt (anti rabbit, Alexa 488), hígítjuk PBS oldattal 1:500 arányban, 3 órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten és sötétben
- Sötétben háromszor átmoszuk PBS oldattal a plate-t, az utolsót (2 ml) rajta hagyjuk a sejteken (300 μM /platelyuk)
- Leszívjuk a mosófolyadékot

5.5 Az oxidatív stressz vizsgálata nagy tisztaságú asztroglia kultúrán

Az Élettani és Biokémiai Tanszéken korábban elvégzett kísérletek során több, HE-ben releváns faktor (mangán, ammónia, LPS) hatását is vizsgálták az asztroglia citokin termelésére nézve. Az eredmények azonban nem támasztották alá azt a feltételezést, miszerint a vizsgált ágensek gyulladásoz válaszra képesek indukálni a nagy tisztaságú asztroglia kultúrákban. Ennek alapján jelen kísérleteink részben arra irányultak, hogy az asztroglia citokin-termelés tekintetében mutatott válaszképtelenségük hátterében milyen tényezők állhatnak. Ily módon vizsgálatunk kitért arra, hogy vajon az említett faktorok bírnak-e ROS-termelődést előidéző hatással, hiszen szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy az oxidatív stressz gyulladásoz válaszhoz vezethet. Kutatócsoportunk korábban elvégzett sejtelképpesség vizsgálatai alapján a **2. táblázatban** feltüntetett koncentrációkat alkalmazva végeztük el kísérletünket. A kezelések hatására termelődött ROS szint méréséhez 5-6-chloromethyl 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein-diacetátot (CM-DCFH-DA Thermo Fisher) használtunk. A ROS indikátoraként használható molekula passzív diffúzióval jut a sejtekbe, ahol az acetátcsoportjait intracelluláris észterázok hasítják. A létrejövő klór-metilcsoport reagál az intracelluláris glutationokkal, amely egy spektrofotométerrel kimutatható fluoreszcens adduktot eredményez (DCF).

2. táblázat: ROS mérés (DCFDA) 96 lyukú plate-en, AraC + LME kezelés után.

		1. mérés	2. mérés	3. mérés	4. mérés	Átlag
H_2O_2	50 μM	21481	19448	28811	26158	23975
	100 μM	28123	21819	19981	20090	22503

	150 μ M		26607	21661	19861	23024	22788
	200 μ M		39672	19020	28588	24197	27869
	300 μ M		19408	18108	20264	30093	21968
	400 μ M		20597	30410	29355	27628	26998
LPS	100 ng	1 óra	8591	7096	8325	9724	8434
	1000 ng	1 óra	7566	8089	7767	11308	8683
	100 ng	3 óra	10621	10187	9648	6628	9271
	100 ng	6 óra	19056	16405	20476	23234	19793
	1000 ng		20216	22020	21793	22723	21688
Mn	20 μ M	1 óra	11700	11142	12319	15746	12727
	100 μ M		17260	12842	18727	21517	17587
	20 μ M	3 óra	55374	38638	58597	40923	48383
	20 μ M	6 óra	94060	111093	82010	86266	93357
	100 μ M		127133	252032	160150	216463	188945
NH₄Cl	5 mM	1 óra	10071	10631	12181	11354	11059
		3 óra	12097	11718	9326	13372	11628
		6 óra	26705	27090	24690	27068	26388
Sejtes kontrol			16657	14472	13989	13493	14125

5.6 Asztroglia tenyészet TNF- α termelésének vizsgálata

Irodalmi adatok alapján az asztroglia és a mikroglia is képesek proinflammatorikus citokinek termelésére. Kutatásunk utolsó részében az volt a célunk, hogy megmérjük a két különböző eljárással létrehozott nagy tisztaságú asztroglia kultúra citokin-termelését, olyan ágensek hatására, amelyek igazoltan kóroki szereppel bírnak a HE patogenezisében, úgymint az oxidatív stresszt előidéző hidrogén-peroxid, ammónia, mangán valamint bakteriális endotoxinok (Forshammar et al., 2011; Kobtan et al., 2016; Krieger et al., 1995; Bi et al., 2008; Suárez et al., 2002). Kísérletünkben a TNF- α extracelluláris szintjét mértük TNF- α ELISA kiten (Sigma-Aldrich), ELISA reader (Multiscan GO W/O Cuvette incl dDROP Plate) alkalmazásával. A sejt kultúrák kezelésére használt hatóanyagok koncentrációját a kutatócsoportunk által korábban elvégzett sejtéletképesség vizsgálatok alapján állítottuk be (**3. és 4. táblázat**). Minden egyes kezelést követően háromszor végeztük el a TNF- α koncentráció mérését, majd a három értékből átlagot számoltunk. A TNF- α mérés eredményét optikai denzitásban (OD) kaptuk meg, amelyet 450 nm hullámhosszúságú fényben olvastunk le. Az OD értéket ismert TNF- α koncentrációjú oldat hígítási sorával tudtuk átszámolni koncentrációba.

3. táblázat: Rázatással mikroglia-gyérített primer patkány asztroglia kultúra TNF α termelése különböző ágensek hatására.

			1. mérés	2. mérés	3. mérés	Átlag	Szórás	Átlag
LPS	100 ng	18	0,2078	0,1581	0,2250	0,2250	0,0347	560,71
	1000 ng		0,2916	0,2338	0,3329	0,3329	0,0498	1907,54
	100 ng	48 óra	0,2043	0,1813	0,2195	0,2195	0,0192	598,38
	1000 ng		0,1886	0,2943	0,3372	0,3372	0,0765	1601,45
Mn	20 μ M	24 óra	0,2289	0,2348	0,2445	0,2445	0,0079	959,39
		48 óra	0,2172	0,2168	0,1920	0,1920	0,0144	658,48
	100 μ M	24 óra	0,2533	0,2340	0,2996	0,2996	0,0337	1375,6
		48 óra	0,1750	0,2154	0,2373	0,2373	0,0316	663,62
NH₄Cl	5 μ M	24 óra	0,2169	0,2012	0,2774	0,2774	0,0402	905,19
		48 óra	0,1364	0,1583	0,1958	0,1958	0,0300	354,07
H₂O₂	100 μ M	1 óra	0,1433	0,2444	0,2575	0,2575	0,0625	718,98
	150 μ M		0,1320	0,2142	0,2835	0,2835	0,0758	669,73
sejtes kontrol		48 óra	0,1981	0,6125	0,1516	0,1516	0,2537	3069,6

4. táblázat: Az Ara-C és LME kezeléssel mikroglia-gyérített primer patkány asztroglia kultúra TNF α termelése különböző ágensek hatására.

			1. mérés	2. mérés	3. mérés	Átlag	Szórás	Koncentrációk (pg/ml)
LPS	100 ng	18 óra	0,117	0,0885	0,1011	0,09935	0,012979599	118,83
	1000 ng		0,0811	0,075	0,0778	0,07845	0,002673948	49,17
	100 ng	24 óra	0,1204	0,1228	0,1315	0,13025	0,011714521	221,83
	1000 ng		0,0616	0,0821	0,0745	0,07365	0,008658137	33,17
Mn	20 μ M	18 óra	0,116	0,1193	0,0975	0,112275	0,009962053	161,92
		24 óra	0,1442	0,1348	0,1492	0,1428	0,005971041	263,67
	100 μ M	18 óra	0,1089	0,1344	0,1149	0,1096	0,022463804	152,92
		24 óra	0,1029	0,0975	0,1286	0,1111	0,01387813	158,08
NH₄Cl	5 mM	18 óra	0,1440	0,1239	0,1347	0,1285	0,014010086	216,08
		24 óra	0,1167	0,0994	0,1307	0,1188	0,014290177	183,58
H₂O₂	150 μ M	1 óra	0,1244	0,1121	0,1047	0,1152	0,012979599	118,83
	100 μ M		0,1234	0,1117	0,1277	0,1251	0,002673948	49,17
sejtes kontrol		24óra	0,1368	0,1282	0,1434	0,1380	0,008604844	171,50
		18 óra	0,1391	0,1130	0,1301	0,1250	0,010653481	204,50

6. EREDMÉNYEK

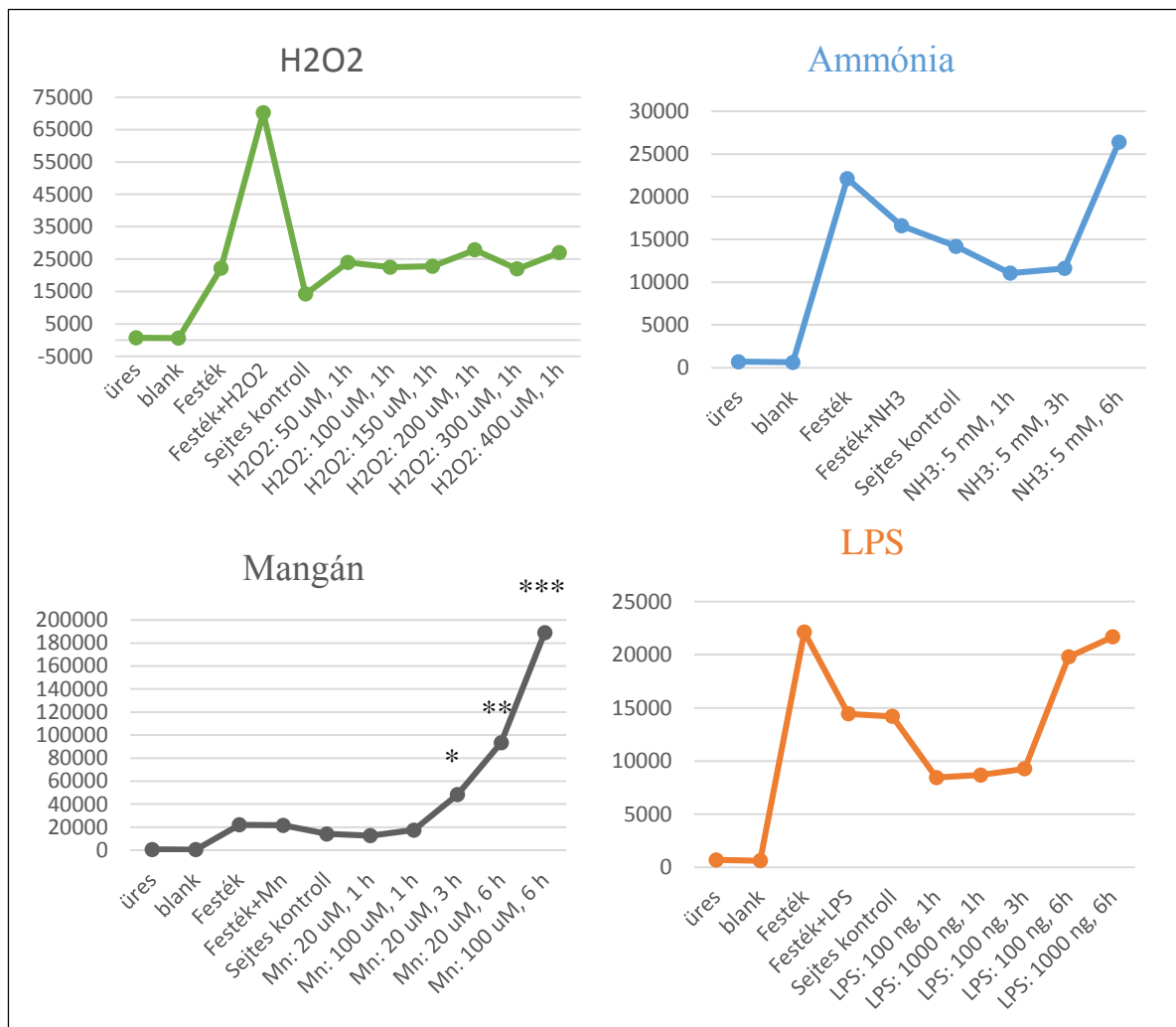
Az eredmények statisztikai kiértékelését az R-program segítségével, ANOVA-val és Dunnett-próbával végeztük el. Az egyes csoportok közötti különbségeket 5%-os szignifikancia szinten vizsgáltuk.

6.1 A mikroglia-eltávolítás sikerességének ellenőrzése

A konfluens asztroglia sejttenyészet mikroglia-gyérítését párhuzamosan egy Ara-C és LME kezelés kombinációjával, illetve egy rázatáson alapuló módszerrel végeztük el. Az így nyert sejttenyészetek összes sejt számát DAPI festéssel, a mikroglia számát pedig Iba1 festéssel határoztuk meg. A DAPI és Iba1 markerekkel meghatározott asztroglia/mikroglia arány mindkét eljárás esetén magasabb volt, mint 98%. Ez alapján megállapítható, hogy mindkét eljárással nagymértékben csökkenthető a mikroglia aránya, azonban tökéletesen nem mentesíthetők a tenyészetek. Számos nemzetközi publikáció számol be arról, hogy HE-ban az asztroglia sejtekhez köthető cerebrális kórfolyamatok *in vitro* vizsgálata során a mikroglia jelenléte már elenyésző mennyiségben is olyan változásokat eredményezhet, amelyek miatt tévesen tulajdonítunk mikroglia eredetű hatásokat az asztrogliaknak

6.2 Az asztroglia sejttenyészet ROS termelése

Az úgynevezett „Trojan horse” elmélet szerint az asztrociták duzzadásáért elsősorban az intracellulárisan felhalmozódó ROS által kiváltott oxidatív stressz a felelős (Albrecht and Norenberg, 2006). Kísérleti modellünkben az oxidatív stressz kiváltására H₂O₂ tartalmú médiummal kezeltük az asztroglia sejt kultúrákat. A sejtek által termelt ROS koncentrációk mérését CM-DCFH-DA használatával, valamint fluoreszcens spektrofotométerrel (Perkin Elmer, Victor X2) végeztük el. A H₂O₂ hatására nem számottevő ROS-termelés növekedést tapasztaltunk. **(9. ábra)** Kísérletünk során azt is megvizsgáltuk, hogy az igazoltan kóroki szereppel bíró többi ágensnek lehet-e hatása a ROS termelésre. Eredményül azt kaptuk, hogy a növekvő koncentrációban alkalmazott LPS, NH₄Cl, és Mn kezelések közül a Mn leghosszabb ideig és a legnagyobb koncentrációban (100 µM, 6 óra), valamint a 20 µM-os koncentrációban 3 és 6 órán keresztül alkalmazva szignifikánsan emelte a ROS termelődést a kontroll csoporthoz képest (rende: p<0,001, p=0,00281, p<0,01). A többi kezelés nem fokozta szignifikánsan a ROS képződését a kezeletlen csoporthoz képest **(9. ábra)**. Emellett megemlítendő, hogy a mangán 20 µM-os koncentrációban alkalmazva az inkubációs idő növelésével (1, 2 és 6 óra) szignifikánsan fokozta a ROS szintet (p<0,05 az 1 és 3 órás kezelés között, p<0,01 az 1 és 6, valamint a 3 és 6 órás kezelés között).

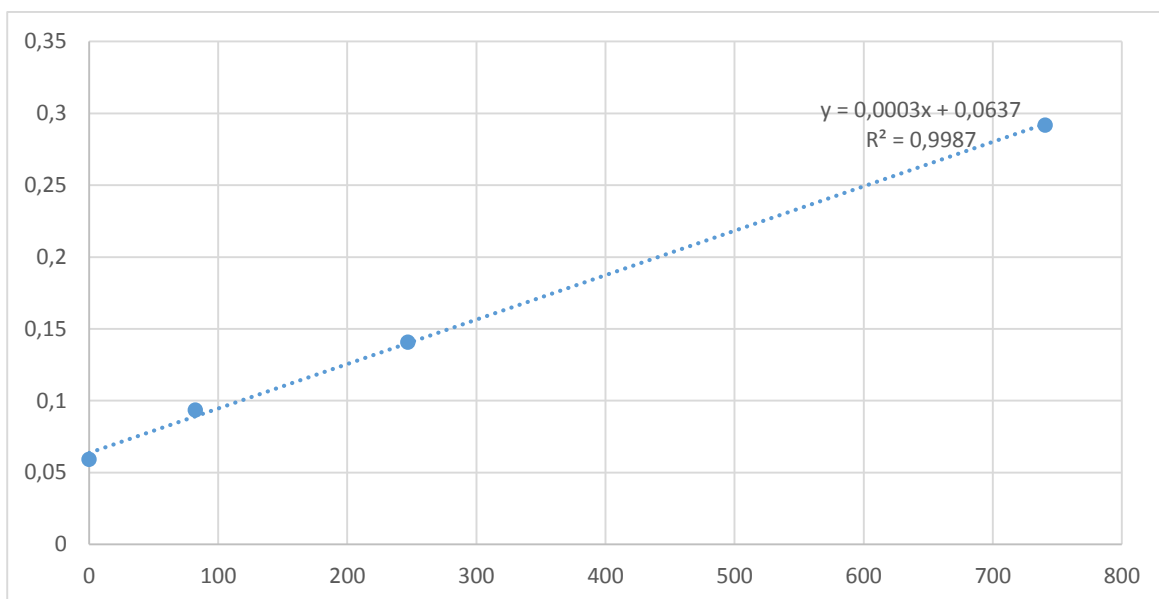


9. ábra: A vizsgált hatóanyagok ROS termelése a DCF fluoreszcenciája alapján. X-tengely: kezelések; Y-tengely: DCF fluoreszcencia (**p<0,001, **p=0,00281, *p<0,01)

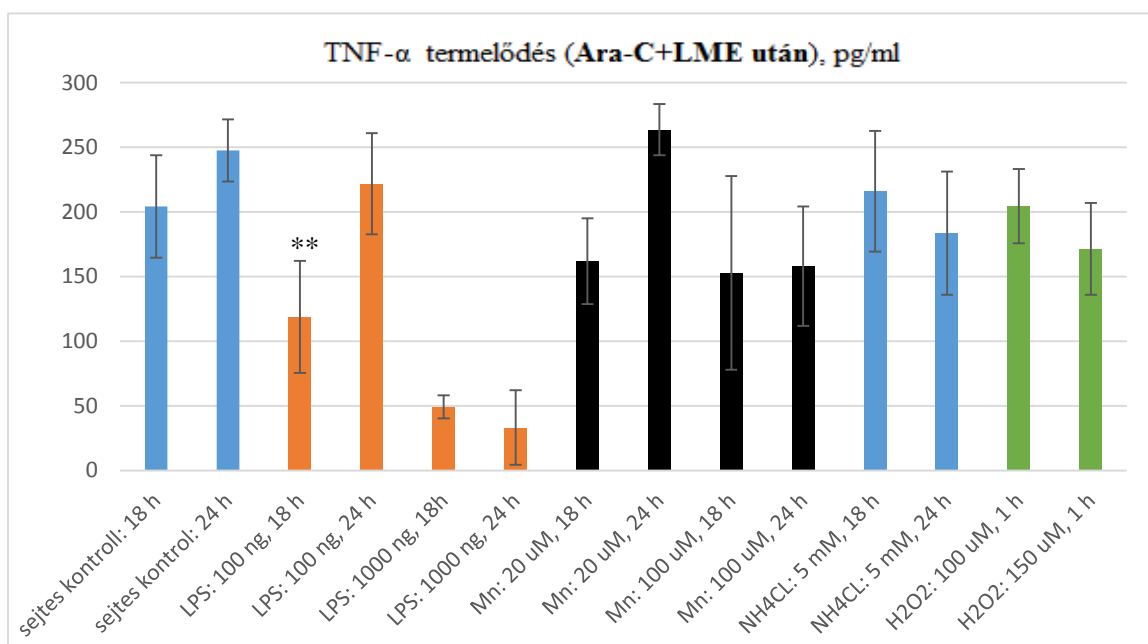
6.3 Asztroglia tenyésztet TNF- α termelésének meghatározása

A TNF- α méréseket ELISA reader segítségével, 450 nm-en végeztük el. Ennek során a TNF- α -ból egy standard hígítási sort készítettünk, majd lemértük az oldat optikai denzitását (OD). Az ebből nyert pontdiagrammra egy egyenest illesztettünk, majd ennek a függvénynek az egyenlete segítségével meghatároztuk, hogy az egyes minták lemért, átlagos abszorbancia-értékei pontosan mekkora koncentráció-értékeknek felelnek meg (10. ábra). A különböző ágensek hatására az asztroglia által termelt TNF- α koncentrációkat a 11. és 12. ábra szemlélteti. Eredményeink szerint mindkét módszerrel kialakított sejtkultúra képes fiziológiás körülmények között TNF- α termelésre, azonban az AraC + LME kezelésen átesett asztroglia kultúrákban az LPS 100 ng-os koncentrációban, 18 órán át alkalmazva, valamint 1000 ng-os koncentrációban 18 és 24 órás inkubációt követően szignifikánsan csökkentette a TNF- α termelődést (rendre p=0,00151, p<0,001). A többi kezelés viszont nem

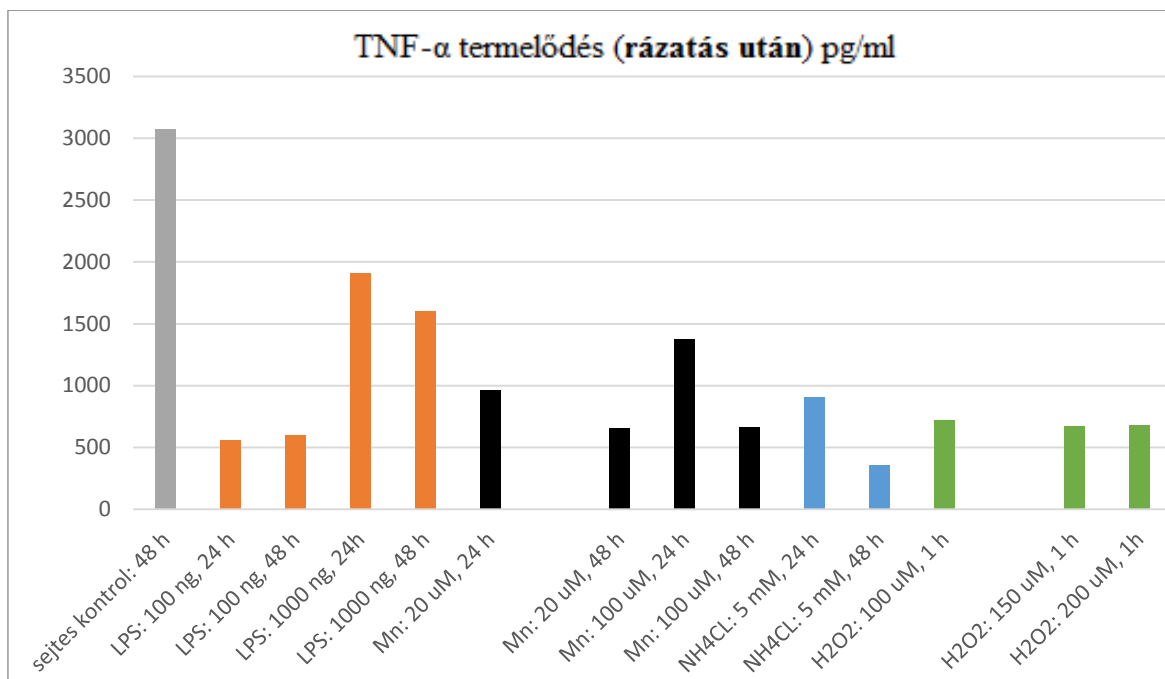
okozott statisztikailag is igazolható különbséget. Ezzel szemben a rázatással mikroglia-gyértített asztroglia kultúrákban egyik kezelés sem okozott szignifikáns változást a TNF- α termelésben.



10. ábra: A standard TNF- α -ból készített hígítási sor OD értékeiből nyert pontdiagrammra illesztett egyenes egyenletéből meghatároztuk, hogy az egyes minták lemért, átlagos abszorbancia-értékei pontosan mekkora koncentráció-értékeknek felelnek meg.



11. ábra: Az Ara-C + LME kezelésekkel mikroglia mentesített kultúrákon különböző ágensek hatására bekövetkező TNF- α koncentráció-változások. (**p=0,00151, ***p<0,001)



12. ábra: A rázatással mikroglia-gyérített kultúrán egyik ágens hatására sem mértünk szignifikáns TNF- α szint növekedést.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1 Az eredmények értékelése

In vitro modellünk létrehozásához az 1-2 napos Sprague-Dawley patkányok agyszövetéből sikeresen izoláltuk az asztroglia sejteket. 3 hét alatt konfluens sejttenyészetet kaptunk, amelyben inverz fluoreszcens mikroszkóppal GFAP és DAPI markerek alapján állapítottuk meg az asztroglia arányát. A HE patogenezisében az asztroglia sejtekhez köthető cerebrális kórfolyamatok megismerésének kulcsfontosságú lépése a nagy tisztaságú asztroglia kultúra létrehozása, ugyanis a sejttenyészetet kontamináló mikroglia jelenléte már kis mennyiségben is megzavarhatja az asztrociták szerepének megismerésére irányuló vizsgálatok eredményét (Andersson et al., 2005). A mikroglia számának csökkentése sikeresnek bizonyult, amelyet Ara-C és LME kezelések kombinációjával, illetve egy rázatáson alapuló módszerrel végeztük el. A két eljárás határfokát immunfestésekkel (Iba1 és DAPI) ellenőriztük le.

Az irodalmi adatok alapján jól ismert, hogy a HE patogenezisében fontos szerepe van az oxidatív stressznek (Albrecht and Norenberg, 2006). A HE *in vitro* körülményei között az oxidatív stressz kiváltásának általánosan elfogadott módszere a sejt kultúrák H₂O₂-os kezelése (Bi et al., 2008; Hamdi et al., 2011; Quincozes-Santos et al., 2009), kísérletünkben azonban több ágenssel is elvégeztük a méréseket.

Milatovic és mtsai. (2007) 500 μ M és 1 mM-os MnCl₂ oldattal 30 percen, 2 és 6 órán keresztül kezeltek primer patkány asztroglia kultúrát, amely eredményeként szignifikáns ROS-termelődést detektáltak. Kísérletünkben a mangán a leghosszabb ideig és a legnagyobb koncentrációban, valamint a 20 μ M-os koncentrációban 3 és 6 órán keresztül alkalmazva szignifikánsan emelte a ROS-termelődést a kontroll csoporthoz képest.

Az úgynevezett „Trojan horse” elmélet szerint az ammónia is hozzájárulhat az oxidatív stressz kiváltásához. A hipotézis szerint az asztrocita sejtek duzzadása annak köszönhető, hogy a glutamin egy transzporter molekula segítségével bejut a mitokondrium belsejébe (Albrecht et al., 2000), ahol a molekula ammóniára és glutamátra hidrolizál (Laake et al., 1998). Az extrém magas ammónia szint az MPT és a ROS képződését indukálja, amelyek aktiválják a MAP-kinázt. A MAP-kináz végül az asztroglia sejtek intracelluláris térfogatszabályozásának zavarát eredményezi, amely a sejtek duzzadásával jár (Jayakumar et al., 2006). Egy másik tanulmányban primer egér asztrocita kultúrán vizsgálták az ammónium-klorid hatását. Kísérletünkben 20, 40 percen, illetve 2, 4, 8, 12 és 24 órán keresztül kezelték 3 mM-os oldattal a kultúrát, amely során szignifikáns ROS-termelést

mérték. Vizsgálataink során ettől magasabb koncentrációval (5 mM) 1, 3, 6 óra kezelést követően sem detektáltunk szignifikáns ROS koncentráció-növekedést.

A nemzetközi szakirodalomban a ROS szint növekedés tekintetében a LPS-sel összefüggésben nem találtunk adatot. Kísérleti eredményeink alapján megállapítható, hogy az LPS nem képes az asztroglia sejtekben szignifikáns ROS-termelést indukálni.

In vitro kísérleti körülményeink között vizsgáltuk Ara-C és LME kombinációjával, illetve a rázatással mikroglia gyérített sejt kultúrák TNF- α termelését LPS, Mn, NH₄Cl és H₂O₂ stimulust követően. A nemzetközi publikációk alapján ismert, hogy az asztroglia sejtek laktát (Andersson et al., 2005) LPS (Hutchison et al., 2013; Souza et al., 2013; van Neerven et al., 2010), H₂O₂ (Souza et al., 2013) kezelése hatására proinflammatorikus citokinek termelésével válaszolnak. Az ammónia és a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek kapcsolatáról kevés adat áll rendelkezésre, azonban ismert, hogy az NH₄Cl-dal kezelt asztroglia sejtekben a nuclear factor κ B (NF- κ B) expressziója következik be (Sinke et al., 2008), amely képes aktiválni a sejtek számos gyulladáshoz kapcsolódó citokin termeléséért felelős génjének transzkripcióját (Schetter et al., 2010).

In vitro kísérleti modellünkben fiziológiai körülmények között, mindkét módszerrel kialakított sejt kultúrával tapasztaltunk TNF- α termelést, azonban az LPS 100 ng-os koncentrációban, 18 órán át alkalmazva, valamint 1000 ng-os koncentrációban 18 és 24 órás inkubációt követően szignifikánsan csökkentette a TNF- α termelődést. Chung és mtsai. (1990) kísérletükben nem tapasztaltak figyelemreméltó TNF- α képződést. Ezzel szemben Lieberman és mtsai (1989) LPS kezelés hatására szignifikáns TNF- α termelést mértek. Megemlítendő, hogy kísérletükben csak 95%-ban GFAP pozitív asztroglia kultúrát használtak.

A Mn TNF- α termelésre gyakorolt hatásáról jelenlegi ismereteink szerint nincs szakirodalmi adat, ezért eredményünket nem tudjuk összehasonlítani más publikált eredménnyel. A Mn hatására Ara-C és LME-vel mikroglia-gyérített asztroglia kultúrán 24 órás 20 μ M-os kezelés hatására nem jelentős TNF- α termelés növekedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest. A többi koncentráció-idő kombinációban TNF- α csökkenést tapasztaltunk.

Andersson és mtsai. (2005) 5 mM-os NH₄Cl kezeléssel nem tapasztaltak meghatározó TNF- α termelést, ezért Fetter (2017) 20 mM-os kezeléssel és azonos koncentrációval végezte el a kísérletet, azonban így sem tapasztalt szignifikáns citokin termelés növekedést. Kutatómunkánk során ezért az 5 mM-os kezelést választottuk, hosszabb inkubációs idővel

(24, 48 óra), amely azonban így sem eredményezett gyulladásoos citokin koncentráció-emelkedést.

Az Ara-C és LME-vel mikroglia-mentesített asztroglia kultúrán a 100 mM-os H₂O₂ kezelés hatására kismértékű citokin-szint emelkedést mértünk, azonban a többi esetben TNF- α termelés csökkenést tapasztaltunk. Souza és mtsai. (2013) felnőtt asztroglia sejteken TNF- α expressziójának növekedését tapasztalták 50 μ M-os H₂O₂-vel történő stimulálást követően.

7.2 Konklúzió

Eredményeink azt mutatják, hogy az oxidatív stressz kiváltására irányuló kezeléseink közül csak a Mn hatására reagálnak szignifkáns mértékű ROS-termelés fokozódással az asztroglia sejtek. Kutatásunk másik felében a vizsgált tényezők hatására a legtöbb esetben a TNF- α -termelés nem változott, néhány kezelés esetében pedig szignifkáns csökkenést tapasztaltunk.

Mivel az általunk használt asztroglia kultúra csak elenyésző mértékben volt szennyezett mikrogliaikkal, az eredményeink arra utalnak, hogy az asztroglia oxidatív státuszának megváltozása és TNF- α termelése nem játszik jelentős szerepet a HE-ben releváns faktorok által kialakított cerebrális kórfolyamatokban.

Szakirodalmi adatok szerint az ammónia az elsődleges oxidatív stresszt kiváltó faktor HE-ben, de emellett kutatási eredményeink a mangán szerepét is alátámasztják. Az asztroglia gyulladásoos szerepének vizsgálata során kapott eredményeink arra engednek következtetni, hogy a TNF- α termeléséért csupán a sejt kultúrákat szennyező mikroglia, vagy a mikroglia és asztroglia közötti, pontosan nem ismert kölcsönhatás tehető felelőssé.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A hepaticus encephalopathia (HE) egy olyan multifaktoriális eredetű kórkép, amely leggyakrabban portoszisztémás sönt és/vagy májelégtelenség következményeként alakul ki. A betegség patogenezise részleteiben még nem tisztázott, azonban az jól ismert, hogy a cerebrális kórfolyamatok jelentős része az asztroglia sejtekhez köthető. A tanszéken korábban már vizsgálták *in vitro* kísérleti körülmények között a HE patogenezisének egyes aspektusait, mely során az asztroglia sejtek proinflammatorikus citokin termelő képességét mérték primer sejttenyészeteken, olyan ágensek hatására, amelyek igazoltan szerepet játszanak a kórkép kialakulásában. Azonban az asztroglia *in vitro* kísérleti körülmények között mért proinflammatorikus citokin termelése tekintetében nem volt egyértelműen megállapítható e sejtek valódi szerepe, amely további vizsgálatok elvégzését tette indokolttá. Kutatásunk során a tumor nekrosis faktor (TNF- α) extracelluláris koncentrációját határoztuk meg ELISA módszerrel, a tanszéken korábban már alkalmazott *in vitro* modell segítségével, melyhez 1-2 napos Sprague-Dawley patkányok agyszövetéből izolált és citozin β -D-arabinofuranoziddal (Ara-C), illetve leucin-metilészterrel (LME) mikroglia-gyérített asztroglia sejt kultúrát használtunk. Emellett létrehoztunk egy új kísérleti modellt, melyben a primer patkány asztroglia kultúrák mikroglia-gyérítését egy rázatáson alapuló módszerrel végeztük el és ennek eredményességét, azaz a mikroglia szám csökkenését immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk. Ezt követően vizsgáltuk az oxidatív stresszt modellező hidrogén-peroxid, az ammónia, mangán, valamint a bakteriális lipopoliszacharid hatását a nagy tisztaságú asztroglia kultúrák TNF- α és reaktív oxigéngyökök (ROS) termelésére nézve. A kapott eredmények tükrében megvizsgáltuk az előbb említett ágensek asztroglia-életképességre gyakorolt hatását is. Eredményeink szerint mindkét módszerrel kialakított sejt-kultúra képes fiziológiás körülmények között TNF- α termelésre, azonban a vizsgált faktorok hatására csökkent a TNF- α termelés. A ROS termelés ezzel szemben a vizsgált ágensek közül a Mn hatására növekedést mutatott. A további vizsgálati eredményeink alapján nem volt egyértelműen igazolható, hogy a tapasztalt TNF- α -termelés csökkenés hátterében a kezelések hatására bekövetkező sejthalál állt.

9. SUMMARY

Hepatic encephalopathy is a neuropsychiatric syndrome caused by portosystemic shunt and/or liver failure. The pathogenesis of the disease has not yet been accurately detailed, though it is well known that cerebral pathogenesis is linked with astrocytes. Certain aspects of the pathogenesis of HE has previously been examined at our department *in vitro*, using primary cell cultures where the capacity of proinflammatory cytokine production by astrocytes was measured with the application of agents proved to take part in the pathogenesis of HE. The results were not consistent and required further investigations.

In this study, the previously mentioned *in vitro* model was adopted to measure the extracellular concentration of tumor necrosis factor (TNF)- α by ELISA. For one of the astroglia cell cultures, brain tissues from Sprague-Dawley rats aged 1-2 days were isolated, then prepared with *cytosine β -d-arabinofuranoside* (Ara-C) and *L-leucine-methylester* (LME) to reduce the number of microglia cells. In addition, a new model was set up to by shaking the astrocyte cultures in order to reduce the number of microglia. To assess the effectiveness of shaking, immunocytochemical techniques were used to measure the decrease in number of microglia. Investigations were carried out to determine the effect on the production of TNF- α of hydrogen peroxide, ammonia, manganese and bacterial lipopolisaccharides as causative agents of oxidative stress in pure rat primary astrocyte cultures. The results made necessary the examination of the cell viability using the above mentioned agents. Our results have shown that both of the cell cultures were able to produce TNF- α in physiological conditions, however TNF- α levels were reduced by the application of the examined factors. In addition, the reduction in the production of TNF- α was not obviously explained by the results of cell viability examinations.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Aggarwal, S., Kramer, D., Yonas, H., Obrist, W., Kang, Y., Martin, M., Policare, R., 1994: Cerebral hemodynamic and metabolic changes in fulminant hepatic failure: a retrospective study. *Hepatology*, 19. 1. p. 80-87.
- Ahmed, Z., Shaw, G., Sharma, V. P., Yang, C., McGowan, E., Dickson, D. W., 2007: Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 55. 7. p. 687-700.
- Albrecht, J., Dolińska, M., Hilgier, W., Lipkowski, A. W., Nowacki, J., 2000: Modulation of glutamine uptake and phosphate-activated glutaminase activity in rat brain mitochondria by amino acids and their synthetic analogues. *Neurochemistry international*, 36. 5 p. 341-347.
- Albrecht, J., Norenberg, M. D., 2006: Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*, 44. 4. p. 788-794.
- Aldridge, D. R., Tranah, E. J., Shawcross, D. L., 2015: Pathogenesis of hepatic encephalopathy: role of ammonia and systemic inflammation. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 5. 1. p. S7-S20.
- Almdal, T., Schroeder, T., Ranek, L., 1989: Cerebral blood flow and liver function in patients with encephalopathy due to acute and chronic liver diseases. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 24. 3. p. 299-303.
- 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. *Journal of neurochemistry*, 93. 5. p. 1327-1333.
- Aronica, E., Bauer, S., Bozzi, Y., Caleo, M., Dingledine, R., Gorter, J. A., Louboutin, J. P. 2017., Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. *Epilepsia*, 58. 1. p. 27-38.
- Arroyo, V., Jimenez, W., 2000: Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *Journal of hepatology*, 32. p. 157-170.
- Aschner, M., Gannon, M., Kimelberg, H. K., 1992: Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 58. 2. p. 730-735.
- Azorín, I., Miñana, M. D., Felipo, V., Grisolia, S., 1989: A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology*, 10. 3. p. 311-314.
- Bajaj, J. S., 2017: Introduction and setting the scene: New nomenclature of hepatic encephalopathy and American Association for the Study of Liver Diseases/European Association for the Study of the Liver guidelines. *Clinical Liver Disease*, 9. 2. p. 48-51.
- Bajaj, J. S., Reddy, K. R., Tandon, P., Wong, F., Kamath, P. S., Garcia-Tsao, G., Subramanian, R. M., 2016: The 3-month readmission rate remains unacceptably high in a large North American cohort of patients with cirrhosis. *Hepatology*, 64. 1. p. 200-208.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., 1998: Interactions between the blood-brain barrier and endogenous peptides: emerging clinical implications. *The American journal of the medical sciences*, 295. 5 p. 459-465.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Durham, D. A., 1989. Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain research bulletin*, 23. 6. p. 433-437.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Ehrensing, C. A., 1994: Blood-borne interleukin-1 alpha is transported across the endothelial blood-spinal cord barrier of mice. *The Journal of physiology*, 479. 2. p. 257-264.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Gutierrez, E. G., 1993: Interleukin-1 α in blood has direct access to cortical brain cells. *Neuroscience letters*, 163. 1. p. 41-44.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Gutierrez, E. G., 1994: Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience letters*, 179. 1-2. p. 53-56.
- Banks, W. A., Ortiz, L., Plotkin, S. R., Kastin, A. J., 1991: Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259. 3. p. 988-996.
- Banks, William A., and Abba J. Kastin., 1996: Passage of peptides across the blood-brain barrier: pathophysiological perspectives. *Life sciences*, 59. 23 p. 1923-1943.
- Barbierato, M., Facci, L., Argentini, C., Marinelli, C., D Skaper, S. Giusti, P., 2013: Astrocyte-microglia cooperation in the expression of a pro-inflammatory phenotype. *CNS Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 12. 5. p. 608-618.
- Bémeur, C., Qu, H., Desjardins, P., Butterworth, R. F., 2010: IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochemistry international*, 56. 2. p. 213-215.
- Benveniste, E. N., 1992: Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 263. 1 p. C1-C16.

Benveniste, E. N., Kwon, J., Chung, W. J., Sampson, J., Pandya, K., Tang, L. P., 1994., Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF-beta. *The Journal of Immunology*, 153. 11. p. 5210-5221.

Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M. P., Izquierdo, I., Medina, J. H., 1996: Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7. 2. p. 585-588.

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*, 46. 6. p. 1844-1852.

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. *Neuroscience letters*, 442. 3. p. 224-227.

Bihari, D., Smithies, M., Gimson, A., Tinker, J., 1987: The effects of vasodilation with prostacyclin on oxygen delivery and uptake in critically ill patients. *New England Journal of Medicine*, 317. 7. p. 397-403.

Booher, J. 1972: Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology*, 2. p. 97-105.

Bowman, C. C., Rasley, A., Tranguich, S. L., Marriott, I., 2003: Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, 43. 3. p. 281-291.

Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Thompson, W. J., 2008: A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, 28. 1. p. 264-211178.

Castel, H., Diallo, M., Chatenet, D., Leprince, J., Desrues, L., Schouft, M. T., Malagon, M., 2006: Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 99. 2. p. 582-595.

Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., Felipo, V., 2007: Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*, 46. 2. p. 514-519.

Chastre, A., Bélanger, M., Beauchesne, E., Nguyen, B. N., Desjardins, P., Butterworth, R. F., 2012: Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications. *PLoS One*, 7. 11. p. e49670.

Chen, J., Zhang, S., Zuo, P., Tang, L., 1997: Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain. *Neuroreport*, 8. 7. p. 1771-1774.

Chen, P. S., Peng, G. S., Li, G., Yang, S., Wu, X., Wang, C. C., Hong, J. S., 2006: Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Molecular psychiatry*, 11. 12. p. 1116.

Choi, S. S., Lee, H. J., Lim, I., Satoh, J. I., Kim, S. U., 2014: Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PloS one*, 9. 4. p. e92325.

Chung, I. Y., Benveniste, E. N., 1990: Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*, 144. 8. p. 2999-3007.

Dai, H., Song, D., Xu, J., Li, B., Hertz, L., Peng, L., 2013: Ammonia-induced Na, K-ATPase/ouabain-mediated EGF receptor transactivation, MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling and ROS formation cause astrocyte swelling. *Neurochemistry international*, 63. 6. p. 610-625.

Danysz, W., Zajackowski, W., Parsons, C. G., 1995: Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behavioural Pharmacology*, 6. 5. p. 455-474.

de Vries, H. E., Blom-Roosemalen, M. C., van Oosten, M., de Boer, A. G., van Berkel, T. J., Breimer, D. D., Kuiper, J., 1996: The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *Journal of neuroimmunology*, 64. 1. p. 37-43.

Didier, N., Romero, I. A., Créminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J., Mabondzo, A., 2003: Secretion of interleukin-1 β by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor- α effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *Journal of neurochemistry*, 86. 1. p. 246-254.

Eck, N., 1877: K voprosu o perevyazkie vorotnois veni: Predvaritelnoye soobschjentye. *Voen Med J*, 130. p. 1-2.

Falsig, J., Latta, M., Leist, M., 2004: Defined inflammatory states in astrocyte cultures: correlation with susceptibility towards CD95-driven apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 88. 1. p. 181-193.

Felipo, V., Miñana, M. D., Grisolia, S., 1988: Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *European journal of biochemistry*, 176. 3. p. 567-571.

Ferenci, P., 2017: Hepatic encephalopathy. *Gastroenterology report*, 5. 2. p. 138-147.

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., Blei, A. T., 2002: Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35. 3. p. 716-721.

Fetter V., 2017: Az asztrogliá sejtek neuroinflammációs szerepének vizsgálata hepaticus encephalopathia során. Szakdolgozat. Budapest, Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszék. p. 24.

URL:http://www.huveta.hu/bitstream/handle/10832/1922/Fetter%20Vikt%C3%B3ria_szakdolgozat_2017_1_1_24.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Fischer, J., Baldessarini, R., 1971: False neurotransmitters and hepatic failure. *The Lancet*, 298. 7715. p. 75-80.

Forshammar, J., Block, L., Lundborg, C., Biber, B., Hansson, E., 2011: Naloxone and ouabain in ultra-low concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M111.

Gabuzda Jr, G. J., Phillips, G. B., Davidson, C. S., 1952: Reversible toxic manifestations in patients with cirrhosis of the liver given cation-exchange resins. *New England Journal of Medicine*, 246. 4. p. 124-130.

Giulian, D., Baker, T. J., 1986: Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, 6. 8. p. 2163-2178.

Giulian, D., Vaca, K., Corpuz, M., 1993: Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *Journal of Neuroscience*, 13. 1. p. 29-37.

Goehler, L. E., Relton, J. K., Dripps, D., Kiechle, R., Tartaglia, N., Maier, S. F., Watkins, L. R., 1997: Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain research bulletin*, 43. 3. p. 357-364.

Görg, B., Schliess, F., Häussinger, D., 2013: Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 536. 2. p. 158-163.

Groszmann, R. J., 1994: Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology*, 20. 5. p. 1359-1363.

Guevara, M., Bru, C., Ginès, P., Fernández-Esparrach, G., Sort, P., Bataller, R., Rodés, J., 1998: Increased cerebrovascular resistance in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology*, 28. 1. p. 39-44.

Guillemin, G., Boussin, F. D., Croitoru, J., Franck-Duchenne, M., Le Grand, R., Lazarini, F., Dormont, D., 1997: Obtention and characterization of primary astrocyte and microglial cultures from adult monkey brains. *Journal of neuroscience research*, 49. 5. p. 576-591.

Gutierrez, E. G., Banks, W. A., Kastin, A. J., 1994: Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. *Journal of neuroimmunology*, 55. 2. p. 153-160.

H. Kumamaru, H. Saiwai, K. Kobayakawa, K. Kubota, N. van Rooijen, K. Inoue, Y. Iwamoto, S. Okada, 2012: Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures, *J. Neuroinflammation*, 9. 2012. p. 116.

Hahn, M., Massen, O., Nencki, M., Pawlow, J., 1893: Die Eck'sche Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen für den Organismus. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 32. 3. p. 161-210.

Hamby, M. E., Uliasz, T. F., Hewett, S. J., Hewett, J. A., 2006: Characterization of an improved procedure for the removal of microglia from confluent monolayers of primary astrocytes. *Journal of neuroscience methods*, 150. 1. p. 128-137.

Hamdi, Y., Masmoudi-Kouki, O., Kaddour, H., Belhadj, F., Gandolfo, P., Vaudry, D., Tonon, M. C., 2011: Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 118. 3. P. 416-428.

Harrison, P. M., Wendon, J. A., Gimson, A. E., Alexander, G. J., Williams, R., 1991: Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *New England Journal of Medicine*, 324. 26. p. 1852-1857.

Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F., vom Dahl, S., 2000: Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?. *Journal of hepatology*, 32. 6. p. 1035-1038.

Häussinger, D., Schliess, F., 2008: Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut*, 57. 8. p. 1156-1165.

Hawkins, R. A., Miller, A. L., Nielsen, R. C., Veech, R. L., 1973: The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochemical Journal*, 134. 4. p. 1001-1008.

Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Herrup, K., 2015: Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14. 4. p. 388-405.

Hermenegildo, C., Monfort, P., Felipo, V., 2000: Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology*, 31. 3. p. 709-715.

Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, L. A., 2002: The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*, 48. 10. P. 1819-1827.

Hewett, S. J., Corbett, J. A., McDaniel, M. L., Choi, D. W., 1993: Interferon- γ and interleukin-1 β induce nitric oxide formation from primary mouse astrocytes. *Neuroscience letters*, 164. 1-2. p. 229-232.

Hilgier, W., Anderzhanova, E., Oja, S. S., Saransaari, P., Albrecht, J., 2003: Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *European journal of pharmacology*, 468. 1. p. 21-25.

Hindfelt, B. E. N. G. T., Plum, F. R. E. D., Duffy, T. E., 1977: Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *The Journal of clinical investigation*, 59. 3. p. 386-396.

Hindfelt, B., Siesjo, B. K., 1971: Cerebral effects of acute ammonia intoxication II. The effect upon energy metabolism. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 28. 3. p. 365-374.

Holecsek, M., 2015: Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: effects of variables leading to hepatic encephalopathy. *Nutrition*, 31. 1. p. 14-20.

Hua, L. L., Kim, M. O., Brosnan, C. F., Lee, S. C., 2002: Modulation of astrocyte inducible nitric oxide synthase and cytokine expression by interferon β is associated with induction and inhibition of interferon γ -activated sequence binding activity. *Journal of neurochemistry*, 83. 5. p. 1120-1128.

Hutchison, E. R., Kawamoto, E. M., Taub, D. D., Lal, A., Abdelmohsen, K., Zhang, Y., Gorospe, M., 2013: Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes. *Glia*, 61.7. p. 1018-1028.

Itzhak, Y., Norenberg, M. D., 1994: Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [3H] PK 11195. *Neuroscience letters*, 177. 1 p. 35-38.

Jalan, R., Damink, S. W. O., Hayes, P. C., Deutz, N. E., Lee, A., 2004: Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *Journal of hepatology*, 41. 4. p. 613-620.

Jauneau, A. C., Ischenko, A., Chatagner, A., Benard, M., Chan, P., Schouft, M. T., Fontaine, M., 2006: Interleukin-1 β and anaphylatoxins exert a synergistic effect on NGF expression by astrocytes. *Journal of neuroinflammation*, 3. 1 p. 8.

Jayakumar, A. R., Panickar, K. S., Murthy, C. R., Norenberg, M. D., 2006: Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 26. 18. p. 4774-4784.

Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M. S., Cauli, O., 2006: Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 3. 6. p. 1257-1266.

Kastin, A. J. Pan, W., 2008: Blood-brain barrier and feeding: regulatory roles of saturable transport systems for ingestive peptides. *Current pharmaceutical design*, 14. 16. p. 1615-1619.

Kimelberg, H. K., Schools, G. P., Cai, Z., Zhou, M., 2000: Freshly isolated astrocyte (FIA) preparations: a useful single cell system for studying astrocyte properties. *Journal of neuroscience research*, 61. 6. p. 577-587.

Kobtan, A. A., El-Kalla, F. S., Soliman, H. H., Zakaria, S. S., Goda, M. A., 2016: Higher grades and repeated recurrence of hepatic encephalopathy may be related to high serum manganese levels. *Biological trace element research*, 169. 2. p.153-158.

Kosenko, E., Kaminsky, Y. G., Felipo, V., Miñana, M. D., Grisolia, S., 1993: Chronic hyperammonemia prevents changes in brain energy and ammonia metabolites induced by acute ammonium intoxication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1180. 3. p. 321-326.

Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Grisolia, S., Felipo, V., 1995: Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochemical research*, 20. 4. p. 451-456.

Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Marcaida, G., Grisolia, S., Felipo, V., 1994: Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺, K⁺-ATPase. *Journal of neurochemistry*, 63. 6. p. 2172-2178.

Kosenko, E., Kaminsky, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Kaminsky, A., Hermenegildo, C., Felipo, V., 1998: Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant enzymes induced by ammonia intoxication. *Metabolic brain disease*, 13. 1. p. 29-41.

Krieger, D., Krieger, S., Theilmann, L., Jansen, O., Gass, P., Lichtnecker, H., 1995: Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *The Lancet*, 346. 8970. p. 270-274.

Laake, J. H., Takumi, Y., Eidet, J., Torgner, I. A., Roberg, B., Kvamme, E., Ottersen, O. P., 1999: Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience*, 88. 4. p. 1137-1151.

Licinio, J., Wong, M. L., 1997: Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*, 100. 12. p. 2941-2947.

Lieberman, A. P., Pitha, P. M., Shin, H. S., Shin, M. L., 1989: Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86. 16. p. 6348-6352.

Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O., Felipo, V., 2007: NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 22. 3. p. 321-335.

Marek, R., Caruso, M., Rostami, A., Grinspan, J. B., Sarma, J. D., 2008: Magnetic cell sorting: a fast and effective method of concurrent isolation of high purity viable astrocytes and microglia from neonatal mouse brain tissue. *Journal of neuroscience methods*, 175. 1 p. 108-118.

Marini, J. C., Broussard, S. R., 2006: Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. *Molecular genetics and metabolism*, 88. 2. p. 131-137.

Matthews, S. A., 1922: Ammonia, a causative factor in meat poisoning in Eck fistula dogs. *Am J Physiol*, 59. 1. p. 459-460.

Mayer, M. L., Westbrook, G. L., 1987: The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in neurobiology*, 28. 3. p. 197-276.

MCNaught, K. S. P., Jenner, P., 1999: Altered glial function causes neuronal death and increases neuronal susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium-and 6-hydroxydopamine-induced toxicity in astrocytic/ventral mesencephalic co-cultures. *Journal of neurochemistry*, 73. 6. p. 2469-2476.

Meyer, R. C., Knox, J., Purwin, D. A., Spangler, E. L., Ingram, D. K., 1998: Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology*, 135. 3. p. 290-295.

Milatovic, D., Yin, Z., Gupta, R. C., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, J. L., Aschner, M., 2007: Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicological sciences*, 98. 1. p. 198-205.

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A., 1990: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 11. 2. p. 231-238.

Montoliu, C., Cauli, O., Urios, A., ElMlili, N., Serra, M. A., Giner-Duran, R., Felipo, V., 2011): 3-nitro-tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*, 106. 9. p. 1629.

Mönkkö, J., Heath, T. D., 1993: The effects of liposome-encapsulated and free clodronate on the growth of macrophage-like cells in vitro: The role of calcium and iron. *Calcified tissue international*, 53. 2 p. 139-146.

Mönkkönen, J., Taskinen, M., Auriola, S. O., Urtti, A., 1994: Growth inhibition of macrophage-like and other cell types by liposome-encapsulated, calcium-bound, and free bisphosphonates in vitro. *Journal of drug targeting*, 2. 4. p. 299-308.

Nencki, M., Pawlow, J. P., Zaleski, J., 1895: Ueber den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe und die Harnstoffbildung bei den Säugethieren. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 37. 1. p. 26-51.

Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., Godbout, J. P., 2016: Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64. 2. p. 300-316.

Norenberg, M. D., A. R. Jayakumar, Rama Rao KV., 2004: Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 19. 34. p. 313-329.

Osburg, B., Peiser, C., Domling, D., Schomburg, L., Ko, Y. T., Voigt, K., Bickel, U., 2002: Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF- α at the blood-brain barrier of the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283. 5. p. E899-E908.

Pan W, Kastin AJ. In: In Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease. Shanker H, Westman J, editors. Elsevier, Academic Press; San Diego, CA: 2003. p. 395-407.

Pan, W., Kastin, A. J., 2001: Changing the chemokine gradient: CINC1 crosses the blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmunology*, 115. 1-2. p. 64-70.

Paulson, O. B., Strandgaard, S., Edvinsson, L., 1990: Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*, 2. 2. p. 161-192.

Pedersen, H. R., Ring-Larsen, H., Olsen, N. V., Larsen, F. S., 2007: Hyperammonemia acts synergistically with lipopolysaccharide in inducing change in cerebral hemodynamics in rats anaesthetised with pentobarbital. *Journal of hepatology*, 47. 2. p. 245-252.

Perazzo, J. C., Tallis, S., Delfante, A., Souto, P. A., Lemberg, A., Eizayaga, F. X., Romay, S., 2012: Hepatic encephalopathy: An approach to its multiple pathophysiological features. *World journal of hepatology*, 4. 3. p. 50.

Phear, E., Sherlock, S., Summerskill, W. H. J., 1955: Blood-ammonium levels in liver disease and " hepatic coma". *The Lancet*, 265. 6869. p. 836-840.

Ponomarev, E. D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L. P., Dittel, B. N., 2005: Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *Journal of immunological methods*, 300. 2. p. 32-46.

Popovich, P. G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., van Rooijen, N., Stokes, B. T., 1999: Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Experimental neurology*, 158. 2. p. 351-365.

Pousset, F., Fournier, J., Legoux, P., Keane, P., Shire, D., Soubrie, P., 1996: Effect of serotonin on cytokine mRNA expression in rat hippocampal astrocytes. *Molecular brain research*, 38. 1. p. 54-62.

Prickaerts, J., de Vente, J., Honig, W., Steinbusch, H. W., Blokland, A., 2002: cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *European journal of pharmacology*, 436. 1-2. p. 83-87.

Prickaerts, J., Steinbusch, H. W., Smits, J. F., de Vente, J., 1997: Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *European journal of pharmacology*, 337. 2-3. p. 125-136.

Quincozes-Santos, A., Nardin, P., De Souza, D. F., Gelain, D. P., Moreira, J. C., Latini, A., Gottfried, C., 2009: The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotoxicity research*, 16. 1. p. 30-41.

Rao, K. V. R., Jayakumar, A. R., Norenberg, M. D., 2012: Glutamine in the pathogenesis of acute hepatic encephalopathy. *Neurochemistry international*, 61. 4. p. 575-580.

Reyes-Gordillo, K., Shah, R., Muriel, P., 2017: Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Current and future therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. p. 2.

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. 2. p. 675-684.

Rodriguez, G., Testa, R., Celle, G., Gris, A., Marengo, S., Nobili, F., Rosadini, G., 1987: Reduction of cerebral blood flow in subclinical hepatic encephalopathy and its correlation with plasma-free tryptophan. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 7. 6. p. 768-772.

Russell, R. G. G., Rogers, M. J., 1999: Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, 25. 1. p. 97-106.

Salgado, M., Cortes, Y., 2013: Hepatic encephalopathy: etiology, pathogenesis, and clinical signs. *Compend Contin Educ Vet*, 35. 6.

Saura, J., 2007: Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *Journal of neuroinflammation*, 4. 1. p. 26.

Schafer, D., Jones, E. A., 1982: Hepatic encephalopathy and the γ -aminobutyric-acid neurotransmitter system. *The Lancet*, 319. 8262. p. 18-20.

Schenker, S., McCandless, D. W., Brophy, E., Lewis, M. S., 1967: Studies on the intracerebral toxicity of ammonia. *The Journal of clinical investigation*, 46. 5. p. 838-848.

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. p. 49.

Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., Schachtrup, C., 2013: Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 71. e50079. P. 2-7.

Schmitz, B., Thiele, J., Kaufmann, R., Witte, O., Wickenhauser, C., Kuhn-Regnier, F., Fischer, R., 1995: Megakaryocytes and fibroblasts—Interactions as determined in normal human bone marrow specimens. *Leukemia research*, 19. 9. p. 629-637.

Schmitz, J., Assenmacher, M., Radbruch, A., 1993: Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *European journal of immunology*, 23. 1. p. 191-199.

Schramm, V. L., Brandt, M., 1986: The manganese (II) economy of rat hepatocytes. In *Federation proceedings*, 45. 12, p. 2817-2820.

Semple, J. W., Allen, D., Chang, W., Castaldi, P., Freedman, J., 1993: Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte populations from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorter (MACS). *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 14. 8. p. 955-960.

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 research bulletin*, 73. 1. p. 55-63.

Shawcross, D. L., Damink, S. O., Butterworth, R. F., Jalan, R., 2005: Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metabolic brain disease*, 20. 3. p. 169-179.

Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R., Jalan, R., 2004: Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of hepatology*, 40. 2. p. 247-254.

Shawcross, D. L., Wright, G., Damink, S. O., Jalan, R., 2007: Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 22. 1. p. 125-138.

Siao, C. J., Tsirka, S. E., 2002: Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *Journal of Neuroscience*, 22. 9. p. 3352-3358.

Simmons, M. L., Murphy, S., 1992: Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *Journal of neurochemistry*, 59. 3. p. 897-905.

Sinke, A. P., Jayakumar, A. R., Panickar, K. S., Moriyama, M., Reddy, P. V., Norenberg, M. D., 2008: NF κ B in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *Journal of neurochemistry*, 106. 6. p. 2302-2311.

Smith, S., Dringenberg, H. C., Bennett, B. M., Thatcher, G. R., Reynolds, J. N., 2000: A novel nitrate ester reverses the cognitive impairment caused by scopolamine in the Morris water maze. *Neuroreport*, 11. 17. p. 3883-3886.

Souza, D. G., Bellaver, B., Souza, D. O., Quincozes-Santos, A., 2013: Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PloS one*, 8. 3. p. e60282.

Spahr, L., Butterworth, R. F., Fontaine, S., Bui, L., Therrien, G., Milette, P. C., Pomier-Layrargues, G., 1996: Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology*, 24. 5. p. 1116-1120.

Stepanova, M., Mishra, A., Venkatesan, C., Younossi, Z. M., 2012: In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 10. 9. p. 1034-1041.

Suárez, E. C., Lewis, J. G., Kuhn, C., 2002: The relation of aggression, hostility, and anger to lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor (TNF)- α by blood monocytes from normal men. *Brain, behavior, and immunity*, 16. 6. p. 675-684.

Szelényi, J., 2001: Cytokines and the central nervous system. *Brain research bulletin*, 54. 4. p. 329-338.

Takeda, A., 2003: Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, 41. 1. p. 79-87.

Takeda, A., Sotogaku, N., Oku, N., 2002: Manganese influences the levels of neurotransmitters in synapses in rat brain. *Neuroscience*, 114. 3. p. 669-674.

Tanaka, S., Ide, M., Shibutani, T., Ohtaki, H., Numazawa, S., Shioda, S., Yoshida, T., 2006: Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *Journal of neuroscience research*, 83. 4. p. 557-566.

Theis, M., Speidel, D., Willecke, K., 2004: Astrocyte cultures from conditional connexin43-deficient mice. *Glia*, 46. 2. p. 130-141.

Thiele, D. L., Kurosaka, M., Lipsky, P. E., 1983: Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *The Journal of Immunology*, 131. 5. p. 2282-2290.

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. p. 169-179.

Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., Wong, P., 2014: Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*, 60. 2. p. 715-735.

Wang, Q., Liu, Y., Zhou, J., 2015: Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*, 4. 1. p. 19.

Wedler, F. C., Denman, R. B., 1984: Glutamine synthetase: the major Mn (II) enzyme in mammalian brain. In *Current topics in cellular regulation* Academic Press, 24. p. 153-154.

Welser-Alves, J. V., Milner, R., 2013: Microglia are the major source of TNF- α and TGF- β 1 in postnatal glial cultures; regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochemistry international*, 63. 1. p. 47-53.

Wendon, J. A., Harrison, P. M., Keays, R., Williams, R., 1994: Cerebral blood flow and metabolism in fulminant liver failure. *Hepatology*, 19. 6. p. 1407-1413.

Wijdicks, E. F., 2016: Hepatic encephalopathy. *New England Journal of Medicine*, 375. 17. p. 1660-1670.

Wright, G., Davies, N. A., Shawcross, D. L., Hodges, S. J., Zwingmann, C., Brooks, H. F., Williams, R., 2007: Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology*, 45. 6. p. 1517-1526.

Wright, G., Jalan, R., 2007: Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Pandora's box?. *Hepatology*, 46. 2. p. 291-294.

Yamada, K., Hiramatsu, M., Noda, Y., Mamiya, T., Murai, M., Kameyama, T., Nabeshima, T., 1996: Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience*, 74. 2. p. 365-374.

Yates, J., Glidewell, O., Wiernik, P., Cooper, M. R., Steinberg, D., Dosik, H., Cornell, C., 1982: Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study. *Blood*, 60. 2. p. 454-462.

Zieve, L., 1989: Role of toxins and synergism in hepatic encephalopathy. In *Hepatic Encephalopathy*. Humana Press, p. 141-156.

11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Bárány Zoltánnak és Kiss Dávid Sándornak** a sok közös munkáért, továbbá, hogy mindig készek voltak segíteni nekem, ha elakadtam a dolgozat készítése során. Köszönet illeti továbbá az Élettani és Biokémiai Tanszék munkatársait, külön kiemelve Kinálné Szikora Zsuzsannát és Ósz Zsófiát a labormunkákban tanúsított segítőkészségükért és türelmükért. Emellett szeretném megköszönni a Biomatematikai és Számítástechnikai Tanszék munkatársainak, azon belül is kiemelve Reiczigel Jenő Professzor Urat, Bajcsayné Fábián Ibolyát és Abonyi-Tóth Zsoltot az eredmények statisztikai kiértékelésében nyújtott nagyfokú segítségükért.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy lelkesedésükkel és biztatásukkal gördülékenyebbé tették dolgozatom elkészítését és hálával tartozom barátnőmnek, hogy végig kitartóan segítette dolgozatom megírását.