

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A HEPATICUS ENCEPHALOPATHIA  
PATOGENEZISÉBEN RÉSZTVEVŐ  
FAKTOROK, VALAMINT NÉHÁNY  
FOSZFODIÉSZTERÁZ-GÁTLÓ HATÁSA A  
NEUROINFLAMMÁCIÓVAL  
KAPCSOLATOS ESEMÉNYEKRE  
PATKÁNY PRIMER ASZTROGLIA  
KULTÚRÁBAN**

**dr. BÁRÁNY ZOLTÁN**

**TÉMAVEZETŐK:**

**DR. KISS DÁVID SÁNDOR**

**DR. STERCZER ÁGNES**



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM**

**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Budapest, 2021.**

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A HEPATICUS ENCEPHALOPATHIA  
PATOGENEZISÉBEN RÉSZTVEVŐ  
FAKTOROK, VALAMINT NÉHÁNY  
FOSZFODIÉSZTERÁZ-GÁTLÓ HATÁSA A  
NEUROINFLAMMÁCIÓVAL  
KAPCSOLATOS ESEMÉNYEKRE  
PATKÁNY PRIMER ASZTROGLIA  
KULTÚRÁBAN**

**dr. BÁRÁNY ZOLTÁN**

**TÉMAVEZETŐK:**

**DR. KISS DÁVID SÁNDOR**

**DR. STERCZER ÁGNES**



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM**

**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Budapest, 2021.**

Témavezetők:

.....

Kiss Dávid Sándor, Ph.D.

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék

.....

Sterczer Ágnes, Ph.D.

Állatorvostudományi Egyetem, Belgyógyászati Tanszék és  
Klinika

.....

Bárány Zoltán

# Tartalomjegyzék

1. Előzmények.....	5
2. Célkitűzések.....	8
3. Anyag és módszer.....	10
4. Új tudományos eredmények.....	12
5. Tudományos publikációk.....	14
6. Konferencia prezentációk.....	15

# 1. Előzmények

Az asztrogliaikról szerzett ismeretek gyorsan bővülnek és a hagyományos nézet, miszerint az asztrogliaák kizárólagos szerepe egyfajta állványzat, támaszték biztosítása a többi sejt számára, mára megváltozott. Az asztrogliaák számos élettani funkcióval bírnak, úgymint a glutamát eltávolítása az extracelluláris térből, a szinaptikus transzmisszió modulálása különféle gliotranszmitterek révén, a vér-agy gát kialakításában való részvétel, az agyszövet víz homeosztázisának fenntartása az aquaporin csatornák segítségével vagy épp a véráramlás szabályozása. Mindemellett, egyre több szakirodalmi adat utal arra, hogy az asztrogliaáknak nem csak élettani viszonyok fenntartásában, hanem számos kórképben is kitüntetett szerepe van, úgymint Alzheimer-és Parkinson-kórban, epilepsziában, depresszióban és hepaticus encephalopathiában (HE).

A HE egy neurokognitív rendellenesség, amely során az agyi működés károsodik akut vagy krónikus májelégtelenség, illetve portoszisztémás sőt következtében.

A HE pontos patogenezise máig sem tisztázott, de az ammónia ( $\text{NH}_4^+$ ) vérplazmabeli és agyi szintjének megemelkedése tekinthető a fő kóroki tényezőnek. Emellett az emelkedett cerebrális mangán ( $\text{Mn}^{3+}$ ) koncentráció, az oxidatív stressz, valamint egyes baktériumok, illetve bakteriális komponensek béltraktusból szisztémás keringésbe jutása is lényeges elemei a HE patogenezisének. Mivel a vér-agy gát bizonyítottan károsodik akut májelégtelenség során, feltételezhető, hogy az előbb említett etiológiai faktorok ily módon képesek a keringésből a központi idegrendszerbe jutni. Akut HE során gyakran letális kimenetelű agyödéma és következményes agyi beékelődés alakulhat ki, melynek egyik leglényegesebb háttérmechanizmusa az asztrogliák megduzzadása. Ennek fő oka bizonyítottan a glutamin asztrogliákban történő felhalmozódása, valamint a glutamináz enzim általi lebontása glutamáttá és ammóniává, mely utóbbi a mitokondriumok károsítása révén a sejtek térfogatának növekedéséhez vezet.

Krónikus HE során csakugyan az asztroglia a leginkább érintett sejtípus, melyet az úgynevezett Alzheimer II típusú astrocytosis fémjelez, jellegzetes szubcelluláris változásokkal.

A neuroinflammáció a HE egyik központi cerebrális eseménye, melyben az asztrogliáknak kitüntetett szerep jut, habár hagyományosan a mikroglia tekinthető az elsődleges fontosságú szereplőknek. A neuroinflammáció során az említett sejtek morfológiai változásokon mennek keresztül és számos citokint termelnek.

Az asztroglia gyulladási szerepének vizsgálata ugyan számos kutatás fókuszában áll, az alkalmazott *in vitro* modellek nagyfokú heterogenitása megnehezíti az eredmények megfelelő interpretálását. A mikroglia számának csökkentése elérhető a citozin  $\beta$ -D-arabinofuranozid és L-leucin metilészter egymás utáni kezelésével (kémiai mikroglia gyérítés), valamint rázattal (mechanikai mikroglia gyérítés), mely módszerek többféle módon is kivitelezhetőek.

Így az asztroglia sejt kultúrák mikrogliaakkal való szennyezettsége vagy épp a mikroglia-mentesítéshez alkalmazott módszerek sokfélesége akadályt gördít a kapott eredmények összehasonlítása elé, illetve nem teszi lehetővé a kizárólag asztrogliaakra vonatkozó következtetések levonását.

A közelmúlt kutatási eredményei szerint a glutamináz enzim nemcsak az asztroglia duzzadásában, hanem a neuroinflammáció folyamatának kialakításában is szerepet játszik. Jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony terápia a neuroinflammáció szuppresszálására, illetve a gluamináz enzim gátlására, habár egyre több ismeretünk van arra nézve, hogy néhány foszfodiészteráz (PDE)-gátló vegyület alkalmas lehet az említett célok elérésére.

## 2. Célkitűzések

A kutatásom céljai a következők voltak:

1. a patkány primer asztroglia kultúrákon alkalmazott két mikroglia-gyérítési módszer eredményességének összehasonlítása



2. a HE patogenezisében szerepet játszó fontosabb tényezők citotoxikus hatásának három különböző módszerrel történő vizsgálata asztroglia-mikroglia vegyes kultúrában, valamint rázatásos módszerrel mikroglia-gyérített asztroglia kultúrákban
3. ugyanezen faktorok hatásának vizsgálata az intracellularis reaktív oxigén gyökök (ROS) termelődésére vonatkozóan asztroglia-mikroglia vegyes kultúrában, valamint kétféle módon mikroglia-gyérítésen átesett asztroglia kultúrákon
4. egyes pro-és antiinflammatorikus citokinek termelődésének detektálása mikroglia-gyérített asztroglia kultúrákban
5. a PDE-gátló teofillin és zaprinast lehetséges glutamináz-gátló hatásának vizsgálata rázatásos módszerrel mikroglia-gyérített asztroglia kultúrákban

### 3. Anyag és módszer

A primer patkány asztroglia sejt kultúrák kétnapos Sprague-Dawley patkányok teljes agyszövetéből lettek létrehozva. Ennek során az agyvelők mechanikai aprításon, majd enzimatis emésztésen estek át. Ezt követően a sejteket Petri csészékbe osztottuk szét, majd a sejt kultúrák konfluenssé válása után 96 lyukú plate-re történt a passzálás. A további vizsgálatokhoz a sejt kultúrákban a mikroglia-szám csökkentése AraC és LME egymásutáni kezelésével vagy pedig rázatásos módszerrel valósult meg. Emellett egyes kultúrákon a mikroglia-gyérítési módszerek elhagyásával asztroglia-mikroglia vegyes kultúrák is kialakításra kerültek. A sejt kultúrák tisztasága, azaz az asztroglia marker, gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP), valamint a mikroglia marker, ionizált kalcium kötő adapter molekula-1 (Iba-1) immunfluoreszcens jelölésével valósult meg.

A sejt kultúrák különböző koncentrációjú hidrogénperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-, lipopoliszacharid (LPS)-, mangán ( $\text{Mn}^{3+}$ )- és ammónia ( $\text{NH}_4^+$ )-kezelésen estek át többféle inkubációs időt alkalmazva. A sejtéletképességet három eltérő módszerrel vizsgáltuk, úgymint propidium-jodid és neutrál vörös felvétel, valamint laktát dehidrogenáz (LDH)-aktivitás mérésével. Az intracelluláris ROS képződés a 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát klorometil származékának (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) felhasználásával let detektálva, míg a sejt kultúrák gyulladási válasza az interleukin (IL)-6, IL-10, IL-1 $\beta$  és tumor nekrosis faktor (TNF)- $\alpha$  fehérje expressziójának ELISA-alapú mérésével. Az IL-6, IL-10 és TNF- $\alpha$  szekréció a sejt kultúrák tápfolyadékából, míg az IL-1 $\beta$  sejt lizátumból került megmérésre. A glutamát és glutamin esszéket mind az intra- mind pedig az extracelluláris kompartmentben elvégeztük annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a teofillin és zaprinast lehetséges glutamináz-gátló hatásáról. Az említett kolorimetriás méréseket az extracelluláris tér esetén tápfolyadékból, míg az intracelluláris tér esetén a sejt lizátumból végeztük el.

## 4. Új tudományos eredmények

1. A rázatásos módszerrel történő mikroglia-gyérítés nagyobb tisztaságú asztroglia kultúrákat eredményez, mint a kémiai kezelés.
2. A neutrál vörös felvételen alapuló sejtéletképesség-vizsgálat alkalmasabb módszer az  $\text{NH}_4^+$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$  citotoxicitásának megállapítására, mint az LDH aktivitás és a propidium-jodid felvétel mérése.
3. Az asztroglia-mikroglia vegyes kultúrák érzékenyebbek a  $\text{H}_2\text{O}_2$  által kiváltott oxidatív stresszre, mint a mikroglia-gyérített asztroglia kultúrák
4. A  $\text{TNF-}\alpha$  és IL-6 termelődés eltérő a kétféle módon tisztított sejt kultúrában: a kémiai kezeléssel átesett kultúrákban közel 10-szeres mennyiségű  $\text{TNF-}\alpha$ -és IL-6-szekréció detektálható a mechanikailag tisztított sejt kultúrákhoz képest

5. Az LPS által előidézett citokin-termelés függ a sejt kultúrákon alkalmazott mikroglia-gyérítési módszertől: szemben a kémiai kezeléssel átesett kultúrákkal, az LPS növeli az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  termelést a rázatásos módszerrel tisztított kultúrákban, míg az IL-10 fehérje expresszió növekedés kizárólag a kémiai kezelésű kultúrákban detektálható
6. Az NH<sub>4</sub><sup>+</sup> és Mn<sup>3+</sup> is fokozza a rázatással tisztított sejt kultúrák IL-1 $\beta$  termelését
7. Mind a teofillin, mind pedig a zaprinast növeli az extracelluláris glutamát-szintet

## 5. Tudományos publikációk

Bárány, Z. B., Sterczer, Á., Jócsák, G., Frenyó, V. L., & Kiss, D. S. (2017). A hepaticus encephalopathia kóroktana, kórfejlődésének újabb szempontjai. Irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, 139(3), 157-168.

Kiss, D. S., Ioja, E., Toth, I., Barany, Z., Jocsak, G., Bartha, T., ... & Zsarnovszky, A. (2018). Comparative analysis of zearalenone effects on thyroid receptor alpha (TR $\alpha$ ) and beta (TR $\beta$ ) expression in rat primary cerebellar cell cultures. International journal of molecular sciences, 19(5), 1440.

Jocsak, G., Ioja, E., Kiss, D. S., Toth, I., Barany, Z., Bartha, T., ... & Zsarnovszky, A. (2019). Endocrine Disruptors Induced Distinct Expression of Thyroid and Estrogen Receptors in Rat versus Mouse Primary Cerebellar Cell Cultures. Brain sciences, 9(12), 359.

Kerek Á., Bárány Z., Sterczer Á. & Jócsák G. (2020). A neuroinflammáció kórfolyamata és egyes terápiás vonatkozásai. Irodalmi összefoglaló. Magyar Álltorvosok Lapja, 142(12), 755-767.

Differential production of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in primary rat astrocyte cultures using two distinct methods of microglia elimination (*Elfogadás alatt, Clinical & Experimental Neuroimmunology*)

## 6. Konferencia prezentációk

Barany Z., Jocsak G., Kiss DS., Sterczer A.: Az alfa-ketoglutaramát, mint lehetséges biomarker hepaticus encephalopathia esetén: Akadémiai beszámoló (2017).

Bárány ZB., Kiss DS, Tóth I., Jócsák G., Bartha T., Frenyó VL., Sterczer Á.: Primer patkány asztrogliá sejtek citokin termelése oxidatív stressz hatására, P1.1.3, In: Joint Conference of the Hungarian Physiological Society and the Hungarian Pharmacology, Microcirculation and Physiological Societies/ A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Kísérletes és klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése, Debrecen, Hungary, 2017.

Bárány Z., Kiss DS., Tóth I., Jócsák G., Bartha T., Frenyó VL., Sterczer Á.: Cytokine production induced by oxidative stress in primary rat astrocytes, P1-338, In: Meeting of the Hungarian Neuroscience Society & Federation of European Neuroscience Societies Regional Meeting, Pécs, Hungary, 2017.

Bárány Z, Kiss DS, Sterczer A: Az asztrogliák neuroinflammációs szerepének vizsgálata hepaticus encephalopathiában. Akadémiai Beszámoló. 2018. január 22-25.

Bárány Z, Kiss DS, Tóth I, Jócsák G, Frenyó VL, Bartha T, Zsarnovszky A, Sterczer A: Az oxidatív stressz és a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ )-termelés vizsgálata hepaticus encephalopathiában. Akadémiai Beszámoló (2019).

Barany Z., Kiss DS., Toth I., Jocsak G., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A., Sterczer A: Examination of the oxidative stress and the tumor necrosis factor- $\alpha$  production in hepatic encephalopathy. GLIA 67:S1 pp. E549-E550. Paper: P1-25 (2019).