

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT  
Biofizika Intézet

## SZAKDOLGOZAT

Sejtfelszíni elektromos töltés vizsgálata  
tenyésztett agyi endotélsejteken

Measurement of electric surface charge  
on cultured brain endothelial cells

Horányi Nóra  
molekuláris bionika BSc szakos hallgató

Témavezető: Dr. Deli Mária  
tudományos főmunkatárs  
MTA SZBK Biofizikai Intézet  
Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Rákhely Gábor  
tanszékvezető egyetemi docens  
SZTE TTIK  
Biotechnológiai Tanszék

2015

## TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Az agyi endotélsejtek felszínén található glikokalix része a vér-agy gát védelmi rendszerének és befolyásolja az agyi anyagbejutást. A glikokalix összetételére, szerepére és betegségekben való megváltozására vonatkozó kutatások az elmúlt tíz évben előtérbe kerültek. Azonban nem állnak rendelkezésre olyan adatok, amelyek az érendotél, és különösképpen az agyi mikroerek glikokalix mennyiségének és a sejtek felszíni töltésének változását közvetlen mérésekkel vizsgálták volna. Munkánk célja ezért agyi endotélsejtek felszíni töltésének közvetlen mérése volt, illetve annak vizsgálata, hogyan változik a felszíni töltés és az endotélsejtrétegek permeabilitása a glikokalix enzimés emésztése után.

Kísérleteink során D3 humán agyi endotélsejtvonalat és primer patkány agyi endotélsejt tenyészeteket használtunk. A glikokalix mennyiségét neuraminidáz, hialuronidáz és tripszin enzimekkel csökkentettük, amit cukorcsoportokra specifikus fluoreszcensen jelölt búzacóra lektin kötődéssel vizsgáltunk. A jelölt lektin kötődéséről konfokális mikroszkóppal képeket készítettünk, amelyek fluoreszcens intenzitását ImageJ programmal értékeltük ki. Az agyi endotélsejtek felszíni töltését Malvern Zetasizer Nano ZS műszerrel mértük. A gátműködést tenyésztő betéteken létrehozott agyi endotélsejtrétegeken fluoreszcens jelzőmolekulák, dextrán és Evans kék-albumin komplex átjutásával vizsgáltuk.

Sikerült megmérni az agyi endotélsejtek felszíni töltését, és mindkét sejttypusban a zéta potenciál az irodalmi adatokkal összhangban erősen negatív. Mindhárom enzim emésztette a glikokalixot, és csökkentette a lektin kötődést. Ezzel párhuzamosan a felszíni negatív töltés abszolút értéke jelentősen csökkent mind a sejtvonalon, mind a primer agyi endotélsejteken. Ugyanakkor, a neuraminidáz és a hialuronidáz kezelés nem befolyásolta a jelzőanyagok átjutását. A permeabilitás csak a tripszin esetében nőtt, azonban ez az enzim a sejtközzti kapcsolatokat is hasítja, ami a morfológiai képeken is látható volt.

Sikerült humán és patkány agyi endotélsejteken megmérni a felszíni negatív töltést, amely nagy mértékben a glikokalixból származik, hiszen enzimés emésztés után a sejtek zéta potenciálja pozitívabbá vált. A glikokalix mennyiségének csökkenése ugyanakkor nem befolyásolta a semleges töltésű jelzőanyagok átjutását. További terveink között szerepel a felszíni glikokalix töltésének pozitív töltésű anyagokkal való módosítása, illetve különböző töltésű jelzőanyagok permeabilitásának vizsgálata.

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. Bevezető</b>	4
1.1. A vér-agy gát glikokalix rétege	6
1.2. A glikokalix vizsgálata vér-agy gát modellen	10
1.3. Célkitűzések	11
<b>2. Anyagok és módszerek</b>	12
2.1. Vegyszerek	12
2.2. Sejttenyészetek	12
2.2.1. Sejtek passzálása és fagyasztott sejtek felvétele kísérletekhez	12
2.2.2. Tenyésztő felszín bevonása kollagénnel	12
2.2.3. A hCMEC/D3 humán agyi endotél sejt vonal tenyésztése	13
2.2.4. A vér-agy gát tenyészetes modellje	14
2.2.4.1. Primer patkány agyi endotélsejtek tenyésztése	14
2.2.4.2. Primer patkány agyi mikroér pericitá sejtek tenyésztése	15
2.2.4.3. Primer patkány gliasejtek tenyésztése	15
2.2.4.4. A vér-agy gát háromsejtes ko-kultúra modellje	16
2.3. A tenyészetek kezelése	16
2.4. Sejtfelszíni töltés – zéta potenciál – meghatározása	16
2.5. Lektin festés és a festési intenzitás kiértékelése	18
2.6. A sejtkapcsoló fehérjék immunfestése	19
2.7. Permeabilitás-vizsgálat	19
2.8. Statisztikai kiértékelés	20
<b>3. Eredmények</b>	21
3.1. Glikokalix emésztése neuraminidáz enzimmel agyi endotélsejteken: hatása a sejtek felszíni töltésére, lektinkötésre és a sejtrétegek permeabilitására	21
3.2. Glikokalix emésztése hialuronidáz enzimmel agyi endotélsejteken: hatása a sejtek felszíni töltésére, lektinkötésre és a sejtrétegek permeabilitására	23
3.3. Glikokalix emésztése tripszin enzimmel agyi endotélsejteken: hatása a sejtek felszíni töltésére, lektinkötésre és a sejtrétegek permeabilitására	25
<b>4. Megbeszélés</b>	28
4.1. Enzimátikus emésztés hatása az endotélsejtek felszínén található glikokalix denzitására	28
4.2. A glikokalixból adódó felszíni töltés megváltozása neuraminidáz, hialuronidáz illetve tripszin enzimmel történő emésztés esetén és ennek hatása a permeabilitásra..	29
<b>5. Összefoglalás</b>	30
<b>6. Irodalomjegyzék</b>	31
<b>7. Köszönetnyilvánítás</b>	35
<b>8. Tételes szakmai hozzájárulás</b>	36
<b>9. Nyilatkozat</b>	37

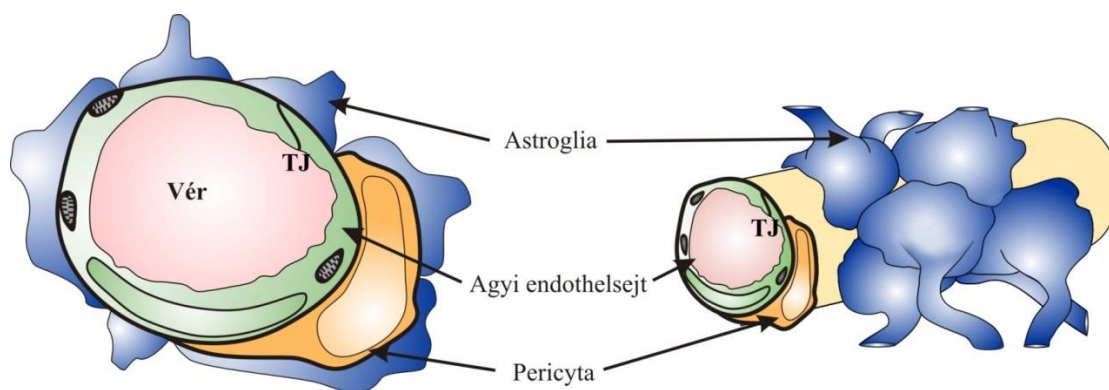
## Rövidítések

bFGF	fibroblaszt növekedési faktor
BSA	borjú szérum albumin
[C] <sub>A</sub>	abluminális koncentráció
[C] <sub>L</sub>	luminális koncentráció
Da	dalton
DNáz	dezoxiribonukleáz enzim
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
EBA	Evans-kék albumin komplex
FITC-dextrán	fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt dextrán
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje
Ms	mólsúly
PBS	foszfát puffer
PECAM-1	vérlemezke endotélsejt adhesziós molekula
TJ	tight junction, szoros sejtközötti kapcsolat
V <sub>A</sub>	abluminális térfogat
V <sub>L</sub>	luminális térfogat
ZO	zonula occludens fehérje
WGA	búzacsíra agglutinin (Wheat Germ Agglutinin Conjugates)

## 1. Bevezetés

A biológiai barrierék sejtenyészetes modelljei, így az *in vitro* vér-agy gát modellek fontosak az ezeken a gátakon lezajló transzportfolyamatok, gyógyszerbejuttatás és betegségek vizsgálatában (Deli és mtsai., 2005). A vér-agy gát dinamikus határfelületet képez, amely elválasztja az idegrendszert a szisztémás vérkeringéstől (Deli és mtsai., 2008). Fontos feladata az agy káros anyagoktól való védelme. A vér-agy gát segíti elő továbbá az idegrendszer állandó, belső homeosztázisának fenntartását is. Ez az állandóság alapvető az idegrendszer számára, mivel megfelelő működéséhez az agyi intersticiális folyadékban megtalálható ionok és tápanyagok közel állandó szintje szükséges. Mivel a hormonok, aminosavak gyakran ingerületátvivőkként viselkednek, az ionok koncentrációja pedig befolyásolja az idegsejtek ingerküszöbét, ezeknek a molekuláknak az agyi szintjét a vér-agy gát szállítófehérjei szabályozzák (Byrne és mtsai., 2004).

Az agyi endotélsejtek vér-agy gát működésének kialakulását és fenntartását a neurovaszkuláris egység sejtjei közötti kölcsönhatás segíti elő. A neurovaszkuláris egység tagjai az agyi endotélsejteken kívül a periciták, amelyek közös bazális membránon osztoznak az endotélsejtekkel, a gliasejtek és az idegsejtek (1. ábra; Abbott és mtsai., 2006).



1. ábra. A vér-agy gát szerkezetének sematikus rajza. (Deli, 2011)

Paul Ehrlich és munkatársai írták le először 1885-ben, hogy a központi idegrendszer és a test többi szövete eltérő módon festődik vénásan beadott anilin vegyületekkel. Edwin E. Goldmann kísérleteiben közvetlenül a cerebrospinalis folyadékba fecskendezett tripánkék festéket, ami az agyat megfestette, míg a többi szerv festetlen maradt. Ez a két kísérlet arra

utalt, hogy a központi idegrendszer és a vérkeringés között egy „gát” akadályozza a festékek áramlását. Ezek a megfigyelések későbbi elektronmikroszkópos eredményekkel együtt a vér és a központi idegrendszer között egy gátrendszer jelenlétét igazolták az agyi hajszálerek endotélsejtjeinek szintjén (Saunders és mtsai., 2014).

A vér-agy gátat alkotó agyi endotélsejtek, vagy más néven belhámsejtek folytonos, szoros illeszkedésű egyséjtrétegben helyezkednek el. Az endotéliumot és a pericitákat bazális membrán, valamint asztrocita végtalpak veszik körül (1. ábra). Elektronmikroszkópos megfigyelések azt mutatják, hogy az agyi mikroerek falát alkotó endotélsejtek szerkezeti felépítése eltér a szervezetben található egyéb kapillárisokétól (1. táblázat). A legfőbb szerkezeti különbség az endotélsejteket összekapcsoló szoros kapcsolatok (tight junction, TJ) jelenléte. A szoros kapcsolatokat integráns membránfehérjék, mint az okkludin és a klaudinok alakítják ki. Ezeket a sejtvázhoz linker vagy adaptor proteinek kapcsolják, például a zonula occludens (ZO) fehérjék. Az agyi endotélsejtek sejtközötti kapcsolatai olyan szorosak, hogy még a kisméretű hidrofíli molekulák, a víz, vagy kis átmérőjű ionok számára sem nyitott a paracelluláris transzportút (Deli és mtsai, 2008). Ezt tükrözi az agyi mikroereken *in vivo* mért igen magas, mintegy 2000  $\Omega$  elektromos ellenállás is. A sejtek közötti kapcsolatok hozzájárulnak az agyi endotélsejtek polaritását, ami azt jelenti, hogy a sejtek luminális (vér felőli) és abluminális (agy felőli) oldalán eltérő az ioncsatornák, transzporterek és receptorok kifejeződése (Abbott és mtsai., 2006).

**1. táblázat.** A vér-agy gát gátműködését kialakító anatómiai sajátosságok. (Deli, 2011)

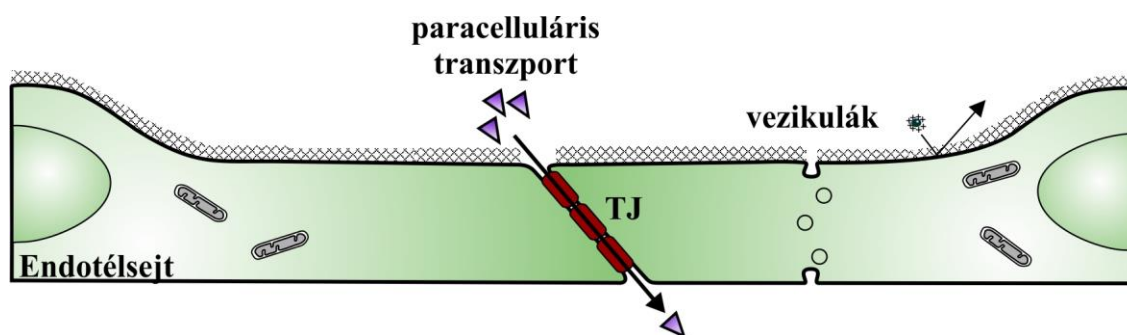
Finomszerkezeti tulajdonság	Vér-agy gát funkció
Szoros sejtközötti kapcsolatok	A vér és a központi idegrendszer közötti szabad sejt- és anyagáramlás korlátozása
Kevés pinocitotikus vezikula	
Sejtfelszíni glikokalix	

Az agyi endotélsejtek a perifériás erek endotéliumához képest alacsonyabb számú vezikulával, és magasabb számú mitokondriummal rendelkeznek, valamint hiányoznak a fenesztrációk (Joó és mtsai., 1996; Deli és mtsai., 2011). A fent leírtakból adódóan a vér-agy gát még a legkisebb molekula átmérőjű ionok számára is mechanikai akadályt jelent, melyhez

a lumenális sejtfelszínen található erős negatív töltésű glikokalix is hozzájárul (Wolburg és mtsai., 2009).

### 1.1. A vér-agy gát glikokalix rétege

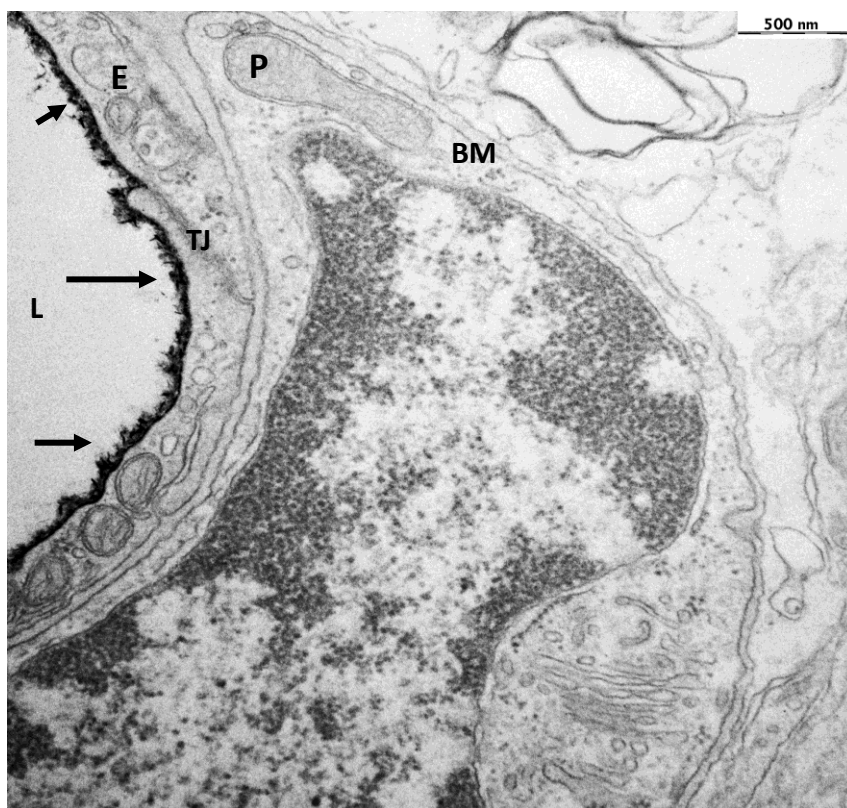
Az agyi endotélsejtek lumenális és ablumenális oldalán egyaránt megtalálható szénhidrátban gazdag makromolekulákból álló réteg, a glikokalix (2. ábra) tanulmányozása az utóbbi években egyre intenzívebb (Drake-Holland és mtsai., 2012; Bai és mtsai., 2012). A réteg negatív töltésének szerepét és fontosságát a mikroerek gát tulajdonságaiban Noble és munkatársai már 1996-ban leírták.



**2. ábra.** A vér-agy gáton keresztüli anyagátjutást korlátozó anatómiai sajátosságok: szoros kapcsolatok (TJ), vezikulák, glikokalix.

A vér áramlása által létrehozott mechanikai erők, a nyíró feszültség és a nyomásváltozás folyamatosan hatnak az agyi kapillárisokat alkotó belhámsejtekre (Fu és mtsai., 2015). Az endotélsejtek felelősek a keringésrendszeri homeosztázis fenntartásáért, így adaptációs készségük a változó körülményekhez, a biokémiai és a hemodinamikai mechanikus stimulusokhoz rendkívül fontos (Bai és mtsai., 2012; Fu és mtsai., 2015). Az endotél sejtfelszínt két fő erő alakítja, érinti. Az egyik a keringési rendszer által keltett hidrodinamikai erő, melyet a szív generál. Ez a nyomásérték nem egyforma a vérerekben, egészséges felnőtt esetén nyugalmi állapotban, ennek értéke 120 és közelítőleg nulla Hgmm között ingadozik. Emellett a nyíró feszültség is hat a lumenális felszínre, melynek értéke ( $10 - 40 \text{ dyn/cm}^2$ ) szintén az érfal típusától függően változik. Ha az erek elvesztik alkalmazkodó képességüket ezekhez a stimulusokhoz, kórfolyamatok alakulnak ki, mint a magas vérnyomás, érlemezésedés, vérrögképződés, kóros értágulat (Ingber, 2003). Az endotélsejtek felszínén

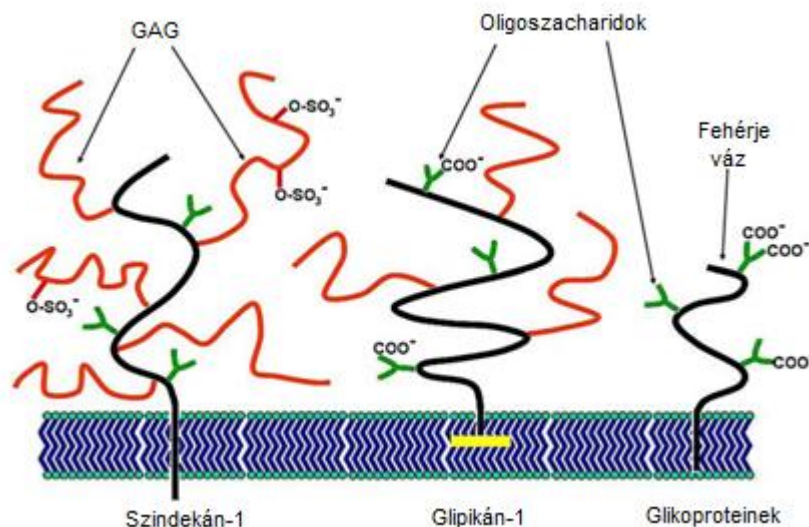
már több fehérjét azonosítottak, amelyek mechanoszenzorként működnek, például a sejt-közötti kapcsolatokat adhézióért felelős PECAM fehérjét. A mechanoszenzor és transzducer elemek közé tartozik a jelenleg igen intenzíven tanulmányozott és általunk is vizsgált endotélsejt felszíni glikokalix réteg is (Fu és mtsai., 2015).



**3. ábra.** Elektronmikroszkópos felvétel agyi hajszálerek glikokalix rétegről Alciánkék festés után. Mércé: 500nm. (BM: bazális membrán, E: endotélsejt, L: ér lumen, P: pericita, TJ: szoros kapcsolat) (Deli MA, Kittel Á és mtsai.)

Az érendotélsejtek glikokalix rétegének vastagsága 0,1 és 1  $\mu\text{m}$  között változik (Alphonsus és mtsai., 2014; Fu és mtsai., 2015). Ez a réteg majdnem teljesen lefedi az endotélsejtek felszínét, képes kapcsolatot kialakítani a szomszédos endotélsejtek szenzoraival illetve transzducereivel, ezért központi szerepe van a mechanikai változások gyors észlelésében (Fu és mtsai., 2015).





**4. ábra.** Glikokalix alkotó elemeit szemléltető ábra. (Hervé és mtsai., 2012)

A glikokalix vázát a membránkött proteoglikánok és glikoproteinek alkotják (4. ábra; Hervé és mtsai., 2012), melyek nélkül a glikokalix váza összeomlik. A membránkött proteoglikánokhoz és glikoproteinekhez kapcsolódnak a glükózaminoglikánok, melyek leggyakoribb fajtái a heparán szulfát, a kondroitin szulfát, a hialuronsav, a dermatán szulfát és a keratán szulfát (2. táblázat, Weinbaum és mtsai., 2007). Ahhoz, hogy a glikokalix érzékeli és továbbítani tudja a vér áramlása által keltett erőket a sejtfelszínről az endotélsejtek sejttestébe, illetve magjába a glikokalix makromolekuláris komplexeknek (magfehérjék+ glükózaminoglikánok) strukturális egységet kell alkotniuk.

**2. táblázat.** Az endoteliális glikokalix alkotóelemei.

Főbb csoportok	Glikokalix makromolekulák
Glikoproteinek	Adhéziós molekulák (ICAM-1, VCAM-1, szelektinek)
Proteoglikánok	Szindekán
	Glipikán
Glükózaminoglikánok	Heparán szulfát
	Kondroitin szulfát
	Hialuronsav
	Dermatán szulfát
	Keratán szulfát

A glikokalix oldható komponensei és az áramló vér között dinamikus egyensúly áll fenn, ennek következtében a glikokalix összetétele és vastagsága állandóan változik. Ezen felül a glikokalix szerkezetét a véráramban található enzimek, illetve a nyíró feszültség is folyamatosan alakítja (Bai és mtsai., 2012). Az endotélsejtek felszíne tehát dinamikusan változik és a membránköthet molekulák folyamatosan áthelyeződnek (Zeng és mtsai., 2012). A folyamatosan változó, bonyolult kölcsönhatások miatt nehéz a glikokalix geometriai definiálása (Becker és mtsai., 2010).

A vaszkuláris patofiziológia területén a glikokalix tanulmányozása mellőzött, habár szerepe kulcsfontosságú az érbetegségek kórfolyamataiban (Lipowsky, 2012). Cukorbetegségben, ahol az érrendszer súlyos károsodása jól ismert, az endotélsejtek glikokalix rétege akár felére is csökkenhet (Broekhuizen és mtsai., 2010, Nieuwdorp és mtsai., 2006). A glikokalix réteg károsodása kórfolyamatokban csökkenti az erek gátműködését (Becker és mtsai., 2010). Gyulladásos folyamatok vizsgálata során kiderült, hogy a tumor nekrosis faktor- $\alpha$  fokozza a makromolekulák bejutását endotélsejtek lumenális glikokalix rétegébe izomszövetben (Henry és mtsai., 2000). A gyulladást kiváltó citokinek lebontják a glikokalix szerkezetét, így megnő a sejtrétegen keresztül való permeabilitás (Henry és mtsai., 2000), tehát a glikokalix károsodása nagyobb átjárhatóságot eredményez (Broekhuizen és mtsai., 2010). A glikokalix réteg védelme, valamint a sérült réteg regenerációja ígéretes terápiás célpont lehet akut és krónikus érbetegségek esetén egyaránt, mivel a vaszkuláris integritás így megőrizhető lenne.

A vérerek glikokalix rétegének tanulmányozására többféle módszer alkalmazható, ezek zöme mikroszkópos eljárás (Reitsma és mtsai., 2007; Van den Berg, 2006). Az egyik eljárás során a glikokalixot kétféle jelölőanyaggal vizsgáljuk egy időben. Az egyik jelölő, például a szulfatált 40kDa tömegű fluoreszcensen jelzett dexrán nem képes átjutni a negatív rétegen, míg a másik permeabilis a glikokalixra, például a semleges töltésű 40kDa dexrán vagy a Texas vörös festék (Van den Berg és mtsai., 2006). A glikokalix réteg vastagságát a két fluoreszcens kép különbsége adja meg. Működő vérerek glikokalix réteg vastagságának vizsgálatára már jelölő anyagok nélkül is van lehetőség kísérleti állatokban és embereknél az úgynevezett ortogonális polarizációs spektrális képalkotási technikával (Nieuwdorp és mtsai., 2008). Szöveti metszetekben, vagy sejtenyészetekben cukormolekulákra specifikus fluoreszcensen jelzett lektinek, például búzacsíra agglutinin használatával mind az intra- mind

az extracelluláris glikokonjugátumok láthatóvá tehető (Farnum és mtsai., 1988). A búzacsíra lektin a glikokalixon található N-acetil-D-glükóزامint és a szialsavat jelöli meg (Bai és mtsai., 2012). Kísérleteinkben ezt a módszert használtuk tenyésztett agyi endotélsejtek vizsgálatára.

## **1.2. A glikokalix vizsgálata vér-agy gát modellen**

A vér-agy gát sejtenyészetes modelljeit széleskörűen használják a gyógyszerbejuttatás, anyagtranszport és patológias folyamatok vizsgálatában és tesztelésében (Deli és mtsai., 2005). A vér-agy gát tenyészetes modelljeit az 1980-as évektől használják. A kereskedelmi forgalomban kapható, porózus membránt tartalmazó sejtenyésző betétek a legelterjedtebbek a permeabilitási kísérleteknél (Campos-Bedolla és mtsai., 2015). A tenyészetek alkalmasak a sejtréteg morfológiájának mikroszkópos megfigyelésére is. Az endoteliális glikokalix analíziséhez fluoreszcensen jelölt lektinek állnak rendelkezésre (Bai és mtsai., 2012). A sejtek felszíni töltését, amely nagyrészt a glikokalixból fakad, zéta potenciál méréssel határozhatjuk meg (Ribeiro és mtsai., 2012). A gát tulajdonságok jellemzésére pedig a sejtréteg permeabilitását vizsgálhatjuk különböző méretű jelzőmolekulákra (Deli és mtsai., 2005).

Az egyik lehetséges módszer a glikokalix szerepének vizsgálatára a vér-agy gát permeabilitásban az enzimatis emésztés (Henry és mtsai., 1999). A használt enzim hasítási tulajdonságai (3. táblázat) és a kezelés során bekövetkező változások alapján következtetni lehet a glikokalix egyes alkotóelemeinek funkciójára. Kísérleteink során az agyi endotélsejtek lumenális glikokalix rétegének eltávolítását, és ezzel a sejtfelszíni töltésének megváltozását enzimekkel való emésztéssel érték el. Az általunk használt enzimeket a 3. táblázat foglalja össze. Az enzimek különböző kezelési körülményeit a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján optimalizáltuk.

**3. táblázat.** A kísérletekben használt glikokalixot bontó enzimek.

Típus	Koncentráció	Lehasított molekula / Hasítóhely	Hatás
Neuraminidáz	0,1-0,3-1 U/ml	neuraminsav glükozid kötés	a glikokalix nagy részét eltávolítja
Hialuronidáz	0,1-0,3-1-10- 100 U/ml	hialuronsav, heparánszulfát	lehasítja a glükózamino- glikánokat, amelyek ezután a véráramba kerülnek
Tripszin	0,025 %	arginin és lizin aminosavak közötti karboxil csoport	hasítja a glikokalix, a szoros kapcsolatok és a sejtdhézió fehérjéit

A glikokalixot alkotó komponensek bármelyikének enzimatisz eltávolítása a réteg tulajdonságainak drámai megváltozását okozhatja (Singh és mtsai., 2007), amely alátámasztja, hogy a glikokalixot, mint egységet fontos vizsgálni. Az agyi mikroér endotélsejtek glikokalix rétegének tanulmányozása és jobb megismerése fontos az új terápiás lehetőségek feltárásához betegségekben.

### 1.3. Célkitűzések

Az agyi endotélsejtek glikokalix rétegének és a felszíni töltésnek a szerepét a vér-agy gát permeabilitásban eddig keveset vizsgálták. Célunk tehát az agyi endotélsejtek felszínén található glikokalix réteg, és az ebből fakadó negatív töltés jellemzése volt. További célunk volt, hogy összehasonlítsuk a vér-agy gát két tenyészetes modelljét, a primer patkány agyi endotélsejteket és az immortalizált hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonalat, amelyek eltérő barrier tulajdonsággal rendelkeznek. Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan változtatja meg a neuraminidáz, a hialuronidáz és a tripszin kezelés az agyi endotélsejtek glikokalix rétegéből adódó felszíni töltést?
2. Hogyan befolyásolja az enzimés emésztés agyi endotélsejtekben a jelzett búzacsíra lektin kötődését, ami a glikokalix N-acetil-D-glükózamin és a szíálsav tartalmát mutatja?
3. Milyen hatása van a glikokalix enzimekkel történő emésztésének, ezáltal a felszíni töltés változásának agyi endotélsejt rétegek áteresztő képességére?

## **2. Anyagok és módszerek**

### **2.1. Vegyszerek**

Minden reagens beszerzési forrása, hacsak másképpen nem jelöltük, a Sigma-Aldrich Kft., Magyarország.

### **2.2. Sejttenyészetek**

A agyi endotélsejtek glikokalixának vizsgálatát hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonalon (Weksler és mtsai., 2005) és a vér-agy gát három sejttypusból - primer patkány agyi endotélsejt, gliasejt és pericita - álló ko-kultúra modelljén végeztük (Nakagawa és mtsai., 2009).

#### **2.2.1. Sejtek passzálása és fagyasztott sejtek felvétele kísérletekhez**

Sejttenyésztés során, ha a sejtek 80-90 %-ban benőtték a tenyésztő felszín, további kísérletekre vagy növesztés céljából tovább passzáltuk őket. Passzálás előtt a sejteket egyszer mostuk foszfát puffer (PBS) oldattal, hogy eltávolítsuk a sejttermelékét és a maradék szérumot. Ezután 0,05 %-os tripszin - 0,02 % EDTA oldatot pipettáztunk a sejtekre és az inkubátorba, 37 °C-ra raktuk őket, mivel a tripszin ezen a hőmérsékleten aktív. A kezelés időtartama sejttypustól függ, ezért a sejteket fáziskontraszt mikroszkóppal folyamatosan figyeltük. Ha túl sokáig marad az enzim a tenyészetben, a sejtek elpusztulhatnak. Ezután a sejteket borjú savót tartalmazó tápfolyadékba gyűjtöttük össze, majd lecentrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, a sejteket az üledékben friss tápfolyadékban szuszpendáltuk, és Bürker-kamra segítségével megszámoltuk. A szükséges sejtmennyiséget felhasználtuk a kísérletekhez, a maradék sejteket pedig vagy tenyésztő edénybe tettük, vagy lefagyasztottuk. A sejteken másnap minden esetben tápfolyadékot cseréltünk.

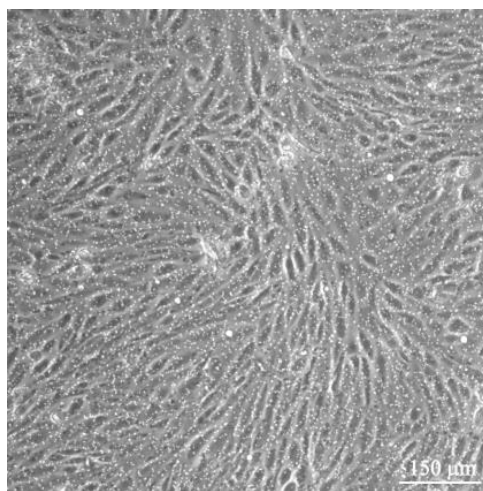
#### **2.2.2. Tenyésztő felszín bevonása kollagénnel**

A tenyésztéshez a steril műanyag edények, betétek, vagy üveg fedőlemezek felszínét a sejtszélésztés előtt kollagénnel vontuk be. Az elkészített oldatot (patkányfarok-kollagén és steril desztillált víz 1:20 arányú elegye) a felszínre pipettázzuk, majd eloszlatjuk, hogy a kollagén oldat a felületet mindenhol befedje. Ezután a felesleget eltávolítottuk, majd a

fülkében UV fény alatt egy óráig szárítottuk. Az üveg fedőlemezeket a kollagén kezelés után lezárt edényben fél óráig formaldehid gázban (33 %) tartottuk, hogy a kollagént az üveg felszínéhez kössük.

### 2.2.3. A hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonaltenyésztése

A vér-agy gát egyszerűsített modelljeként használt hCMEC/D3 humán immortalizált agyi agyi kapilláris endotél sejtvonalt a 35. passzálig használtuk (Weksler és mtsai., 2005). A sejteket az agyi belhámra jellemző hosszúkás sejthalak, a szoros kapcsolódás és az egy egysejtrétegben való növekedés jellemzi (5. ábra).



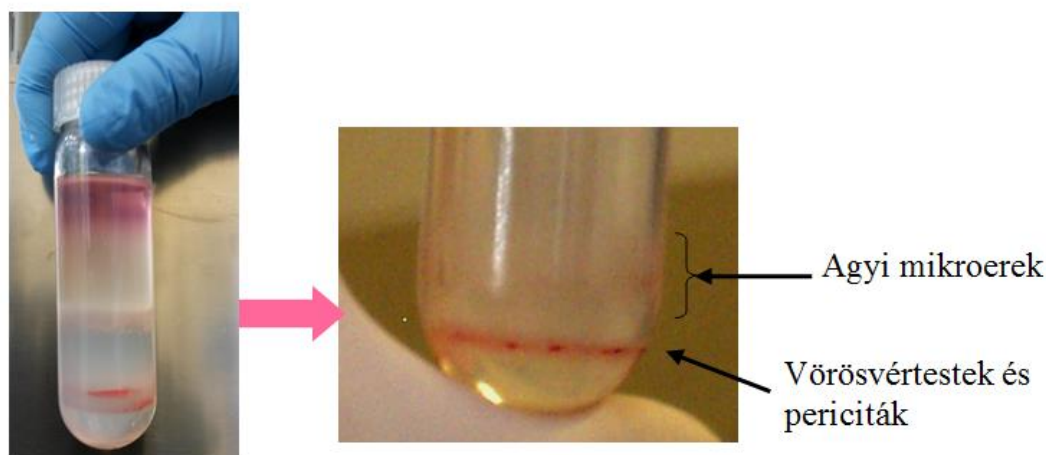
**5. ábra.** Fáziskontraszt mikroszkóppal készült felvétel a hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonaltól. Mére: 150μm.

A sejteket egy héten kétszer passzáltuk, A sejtvonalt tenyésztéséhez használt tápfolyadék a következő összetevőkből állt: MCDB131 bazális médium endotélsejt tenyésztéshez (Pan Biotech, Németország), 0,1 % gentamicin, 5 % borjú szérum, 1,4 μM hidrokortizon, 1 % lipid koncentrátum (Life Technologies, USA), 1 ng/ml fibroblaszt növekedési faktor (bFGF, Roche) 5 μg/ml aszkorbinsav, 1 % inzulin-transzferrin-szelenit oldat (Pan Biotech, Németország), 0,1 % heparin és 10 mM Hepes (Life Technologies). A kísérletekhez a fedőlemezekre  $2,5 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup>, a sejttenyésztő betétekre pedig  $4 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűséggel szélesztettük a sejteket, majd 4-5 napig növesztettük.

## 2.2.4. A vér-agy gát tenyészetes modellje

### 2.2.4.1. Primer patkány agyi endotélsejtek tenyésztése

A csoportunk által korábban leírt (Veszélka és mtsai., 2007; Walter és mtsai., 2015) protokoll alapján a primer agyi endotélsejteket négyhetes Wistar patkányokból izoláltuk. Túltatást követően az agyakat eltávolítottuk és jéghideg PBS oldatba helyeztük. A lágy agyhártyát és a fehérállomány egy részét, valamint a *plexus choroideus*t steril szűrőpapíron görgetéssel távolítottuk el. A szürkeállományt  $1\text{ mm}^3$  méretűre daraboltuk, és  $1\text{ mg/ml}$  kollagenáz-2, valamint  $15\text{ }\mu\text{g/ml}$  DNáz I (Roche) enzimet tartalmazó tápfolyadékban  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on (Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM) 50 percen keresztül emésztettük. Az inkubáció után 20 %-os borjú szérum albumin (BSA) grádiensen centrifugálással elválasztottuk a nagyobb sűrűségű mikroereket a mielin gazdag rétegtől, amely ideg-, és gliasejteket tartalmazott. Ezt a lépést háromszor ismételtük. Az összegyűjtött üledékben lévő mikroereket tovább emésztettük  $1\text{ mg/ml}$ -es kollagenáz-diszpáz és  $15\text{ }\mu\text{g/ml}$  DNáz I oldatban 30 percen keresztül,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Ezt követően az emésztett mikroér frakciót 33 %-os Percoll grádiens segítségével elválasztottuk a vörösvértestektől és a pericitáktól (6. ábra) majd kétszer mostuk DMEM tápfolyadékban.



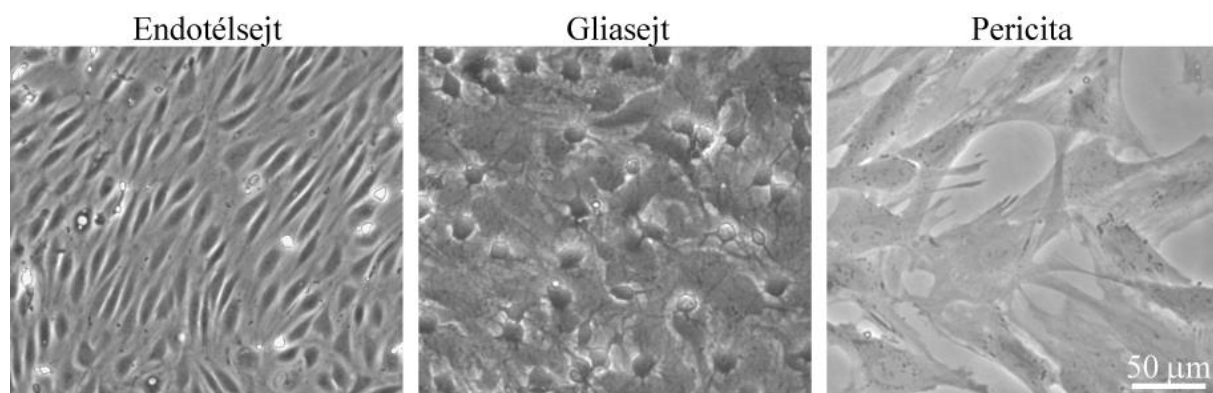
**6. ábra.** Agyi mikroér frakció elhelyezkedése a Percoll grádiensen.

A frissen izolált sejteket sejtenyésztő tápfolyadékban vettük fel, melynek összetétele: DMEM/F12, 15 % borjúplazmából készített savó (First Link Ltd., UK),  $1\text{ ng/ml}$  bFGF,  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  heparin, 1 % inzulin-transzferrin-szelenit oldat. A tenyésztés első négy napjában  $3\text{ }\mu\text{g/ml}$  puromicint adtunk a tápfolyadékhoz, hogy növeljük az endotélsejt tenyészet

tisztaságát (Perrière és mtsai., 2005). Az izolált agyi endotélsejteket IV. típusú kollagénnel és fibronektinnel bevont steril 100 mm átmérőjű műanyag Petri csészékbe szélesztettük (Corning, USA), és CO<sub>2</sub> inkubátorban tenyésztettük. A tenyésztés 5. napján, amikor a felszín 90 %-át benőtték, a primer endotélsejteket tenyésztő betétekre és üveg fedőlemezekre passzáltuk. Kísérleteinkhez egybefüggő endotélsejt rétegeket használtunk (7. ábra), amelyet a passzálás utáni 5. napon kaptunk.

#### **2.2.4.2. Primer patkány agyi mikroér pericita sejtek tenyésztése**

A primer agyi periciták izolálása az agyi endotélsejtekéhez hasonlóan zajlott. A protokoll végén az agyi mikroér frakciót 10 % borjúsavót tartalmazó DMEM tápfolyadékba tettük, és a második passzálásig tenyésztettük őket bevonás nélküli csészékben (7. ábra), mielőtt a ko-kultúra modellhez használtuk.



**7. ábra.** Primer patkány agyi endotélsejtek, glia és pericita sejtek tenyésztésének fáziskontraszt mikroszkópos képe. Mércé: 50µm.

#### **2.2.4.3. Primer patkány gliasejtek tenyésztése**

A vegyes glia tenyészetéhez kétnapos Wistar patkányokat használtunk. Az agyhártya eltávolítása után a szürkeállományt 15 ml-es steril centrifugacsőbe tettük. A mechanikus sejtdisszociáláshoz 10 ml-es steril fecskendőt és 10 cm hosszú 20 G átmérőjű tűt használtunk. A szuszpenziót 40 µm-es nyilonszűrőn engedték át, majd az átszűrt sejteket IV-es típusú kollagénnel bevont 12-lyukú tenyésztőedényekbe osztottuk és 10 % borjúsavót tartalmazó DMEM tápfolyadékban tenyésztettük 3 hétig mielőtt ko-kultúrához használtuk. A sejtek több mint 90 %-a GFAP immunopozitivitást mutatott.



#### **2.2.4.4. A vér-agy gát háromsejtes ko-kultúra modellje**

A vér-agy gát ko-kultúra modelljéhez sejttenyésztő betéteket használtunk (Transwell, Corning Costar, USA; poliészter membrán, póruméret:  $0,4\ \mu\text{m}$ , felszín:  $1,12\ \text{cm}^2$ ) amelyek segítségével primer agyi endotélsejteket, pericitákat és glia sejteket tenyésztünk együtt (7. ábra). A pericitákat a betétek permeábilis poliészter membránjának alsó oldalára passzáltuk. Az agyi endotélsejteket a betétek membránjának felső oldalára szélesztettük, majd a kétféle sejtet tartalmazó betéteket a gliasejteket tartalmazó 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyeztük, és további 5 napon keresztül együtt tenyésztettük őket. Az endotélsejtek a pericita és glia sejtek jelenlétében megőrzik a vér-agy gát tulajdonságaikat, az együtt tenyésztés során az endotélsejtek közötti kapcsolatok szorosabbá válnak, a paracelluláris barrier erősödik (Deli és mtsai., 2005). Ez a modell lehetővé teszi az endotél egysejtrétegek elektromos ellenállásának és permeabilitásának mérését.

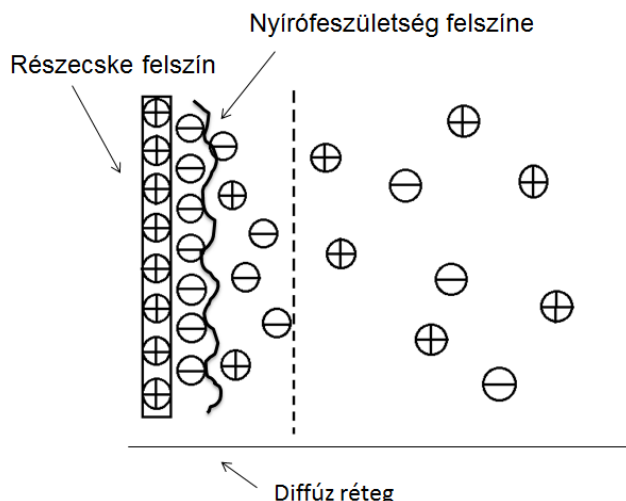
#### **2.3. A tenyészetek kezelése**

A kísérleteink során különböző enzimkezeléseket alkalmaztunk az agyi endotélsejtek felszínén található glikokalix réteg eltávolítására. A kísérleteket szérummentes tápfolyadékban végeztük, hogy elkerüljük az enzimek inaktiválását. Mivel az endotélsejtek szérummentes közegben károsodás nélkül csak korlátozott ideig tarthatók, a kezelések időtartama nem haladta meg a négy órát. A kiválasztott három enzim különböző helyeken emészt a glikokalixot, illetve a sejtek érzékenysége az enzimekre eltérő, ezért a kezelés időtartama az egyes enzimeknél különbözött. Az enzimeket az alábbi koncentrációban és időtartamban alkalmaztuk: neuraminidáz  $0,1-1\ \text{U/ml}$  és  $1\ \text{óra}$ ; hialuronidáz  $10-100\ \text{U/ml}$  és  $10\ \text{perc} - 4\ \text{óra}$ ; tripszin  $0,025\%$  és  $2\ \text{perc}$ . kezeléseket alkalmaztunk D3 agyi endotél sejt vonalon és a primer patkány agyi endotélsejteken. A kezelések egységesen  $37\ ^\circ\text{C}$  hőmérsékleten, az enzimek működési optimumánál történtek.

#### **2.4. Sejtfelszíni töltés – zéta potenciál - meghatározása**

A zéta potenciál meghatározása a mikro-elektroforézis és a dinamikus fényszórás elve alapján valósul meg. A kialakult elektromos erőter miatt a felszíni töltéssel rendelkező sejtek az elektródák felé mozognak, gyorsaságuk pedig a télerősségtől és a zéta potenciáljuktól függ

(8. ábra). Ha ismerjük a használt feszültséget, akkor a sejtek felszíni töltését a mozgásuk sebességéből meghatározhatjuk.



**8. ábra.** A sejt felszínén található töltések elhelyezkedésének ábrázolása. A folyadék áramlás hatására felszíni átrendeződés megy végbe. A zéta potenciál az a feszültség különbség, mely a nyírófeszültség és a részecske közvetlen felszínén található töltések között jön létre.

A sejtek zéta potenciálját Malvern Zetasizer Nano ZS műszer (Malvern Instruments, UK; 9. ábra) segítségével mértük (Ribeiro és mtsai., 2012). A 40 V feszültségen történő mérésekhez speciális mérőcellákat használtunk, amelyek arany bevonatú platina elektródákat tartalmaztak (9. ábra). A mérés előtt a cellákat abszolút alkohollal aktiváltuk, majd bő vízzel kiöblítettük a sejtek megóvása érdekében. A cellák vezetőképességét standard zéta potenciállal rendelkező latex mikrogöngyöket tartalmazó kalibráló oldattal (Malvern Instruments, UK) ellenőriztük. A mérőprogram mindig az adott cella optikai tulajdonságaihoz kalibrált. A sejteket a kísérlet során PBS oldatban szállítottuk és tároltuk. A mérés megkezdése előtt minden esetben 15 percig inkubáltuk a mintákat a műszerbe helyezett cellában, hogy a mérés során használt hőmérséklet kiegyenlítődjön. Egy mérés 15 körből állt, minden körben legalább 30 regisztrációt végzett a műszer. A mérési körök között 60 másodperc szünet volt beiktatva.



**9. ábra.** Malvern Zetasizer Nano ZS műszer (Malvern, UK; a kép forrása: Zetasizer NANO series prospektusa) és az általunk használt DTS1070-es cella ábrázolása. (forrás: <http://www.materials-talks.com/blog/2015/11/24/diffusion-barrier-method-the-practical-details/>).

Egy méréshez  $10^5$  sejtet 1ml puffer oldatban használtunk (cella kapacitása). Mindig ügyeltünk a cella feltöltésekor, hogy elkerüljük a buborékok csapódását, ami legfőképp az elektróda környékén okozhat zavart a mérésben. A sejtek összezapzódására a program által meghatározott „count rate” értékből következtethettünk. Ha ez az érték túl alacsonynak bizonyult, a cellát gyorsan és óvatosan megforgattuk. A zéta potenciált mV értékben kaptuk meg.

## **2.5. Lektin festés és a festési intenzitás kiértékelése**

A lektinek szénhidrátokhoz specifikusan kötő fehérjék, amelyek az agyi endotélsejtek felszínén található glikokalixot jól jelzik. Kísérleteinkhez az Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel jelölt búzacsíra agglutinin (Wheat Germ Agglutinin Conjugate, WGA) használtunk, mely szelektíven kötődik a glikokalixban található N-acetil-D-glükózamin és szíálsav csoportokhoz. Vizsgálatainkhoz üveg fedőlemezekre 3 napig tenyésztett agyi endotélsejteket használtunk, amelyeket neuraminidázzal, hialuronidázzal és tripszinnel kezeltünk, ezt követően 4 %-os paraformaldehid oldattal fixáltunk. Az 5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú WGA-PBS oldatot 10 percig hagytuk a mintánkon, szobahőmérsékleten, fénytől védve.

A fluoreszcens jelölés intenzitásából következtettünk a glikokalix mennyiségére. A lektinnel jelölt sejtkeről az SZBK Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumában Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH, Németország) konfokális mikroszkóppal  $63\times$  nagyítású

olajimmerziós objektívvel képeket készítettünk. Minden sorozatot a festés után egy héten belül egyszerre mikroszkópoztunk. A fluoreszcens festések intenzitásának össze-hasonlításához a digitális képek ( $512 \times 512$  pixel,  $n = 12-16$ ) azonos beállítások mellett készültek, random kiválasztott nem átfedő területekről. A képeken a lektinfestések intenzitásának meghatározása az ImageJ (National Institutes of Health, USA) program segítségével történt. A kontroll csoportok festési intenzitását 100 %-nak tekintettük és a különböző kezelési csoportokat ehhez viszonyítottuk.

## **2.6. A sejtkapcsoló fehérjék immunfestése**

A lektin festéseket követően az agyi endotélsejtrégeken immunhisztokémiai festést végeztünk a sejtközötti kapcsolatok  $\beta$ -katenin és zonula occludens-1 (ZO-1) citoplazmás linker fehérjéire. A sejtrégeket háromszor mostuk Ringer-Hepes pufferrel, hogy eltávolítsuk a maradék fluoreszcensen jelölt lektint. A sejteket 0,2 %-os Triton X-100-PBS oldattal permeabilizáltuk, majd a nem specifikus kötőhelyeket 3 %-os BSA-PBS oldattal 30 percig szobahőmérsékleten blokkoltuk. Ezután nyúl-anti- $\beta$ -katenin és nyúl-anti-ZO-1 elsődleges antitestekkel egy éjszakán át  $4^{\circ}\text{C}$ -on, míg másnap a Cy3-kapcsolt anti-nyúl másodlagos antitesttel és Hoechst 33342 magfestéssel 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltunk. Az elsődleges antitestet a blokkoló oldatban, míg a másodlagos antitestet PBS-ben hígítottuk. A két antitesttel való kezelés között a sejteket többször mostuk PBS-sel. Az utolsó lépés után a mintákat lefedtük (Fluoromount, Southern Biotech, USA) és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Leica Microsystems GmbH, Németország).

## **2.7. Permeabilitás-vizsgálat**

Az agyi endotélsejtrégek permeabilitását két, *in vivo* igen alacsony permeabilitási értékkel rendelkező jelzőanyaggal vizsgáltuk: fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextránnal (FITC-dextrán; Ms: 4,4 kDa) és albuminhoz kötött Evans kék festéssel (Ms: 67 kDa) (Veszélka és mtsai, 2013; Walter és mtsai, 2016). A permeabilitási mérésekhez a D3 agyi endotélsejteket Transwell tenyésztő betéteken növesztettük 5 napon keresztül. A hármás vér-agy gát ko-kultúra modellt primer patkány sejtekből a fent leírtak szerint hoztuk létre. A permeabilitási kísérlethez a sejtenyésztő betétek felső kompartmentjében lévő tápfolyadékot lecseréltük 500  $\mu\text{l}$  Ringer-Hepes oldatra, amely a jelzőanyagokat az alábbi koncentrációkban

tartalmazta: 170 µg/ml Evans kék 1 mg/ml BSA-hoz kötve (EBA) és 100 µg/ml FITC-dextrán. Az abluminális kompartmentbe - 12 lyukú lemezek lyukaiba - 1500 µl Ringer-Hepes oldatot tettünk. A kísérletet egy időpontban, 30 perces anyagátjutással végeztük el. A lemezeket a mérés alatt 37 °C-on CO<sub>2</sub> inkubátorban, síkrázó készüléken tartottuk (100 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország), hogy biztosítsuk az oldatok folyamatos, enyhe mozgását, ami a permeabilitás-méréshez szükséges. Az átjutott jelzőanyagot tartalmazó összegyűjtött puffert 96 lyukú lemezbe mértük (100 µl/well), majd a FITC-dextrán emisszióját 485 nm-en történt gerjesztés után 520 nm-en, az EBA emisszióját 584 nm-en történő gerjesztés után 680 nm hullámhosszon határoztuk meg többlyukú lemez leolvasóval (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies). Az egyes anyagok sejtrétegen való átjutását permeabilitási együtthatóval ( $P_{app}$ , látszólagos permeabilitási koefficiens) jellemeztük, amit Fick törvénye alapján a vese clearance analógiájára határoztunk meg (1. egyenlet, (Hellinger és mtsai., 2012).

$$P_{app}(cm/s) = \frac{[C]_A V_A}{[C]_L A} \frac{1}{\Delta t}$$

**1. egyenlet.** Az endotélsejtrétegen keresztüli transzport jellemzésére alkalmazott permeabilitási együttható számolásához használt matematikai képlet.  $[C]_A$ , jelzőanyag abluminális koncentrációja;  $V_A$ , abluminális térfogat;  $A$ , membrán felszíne;  $[C]_L$ , jelzőanyag luminális koncentrációja.

A mért koncentrációk és az ismert adatok (térfogatok, luminális koncentrációk) ismeretében számoljuk ki a  $P_{app}$  értékeket ( $cm\ s^{-1}$ ). Minél kisebb a  $P_{app}$  érték a permeabilitási jelzőmolekulákra, annál szorosabbak a sejtközzötti kapcsolatok, annál jobb az egysejtrétegek barrier funkciója.

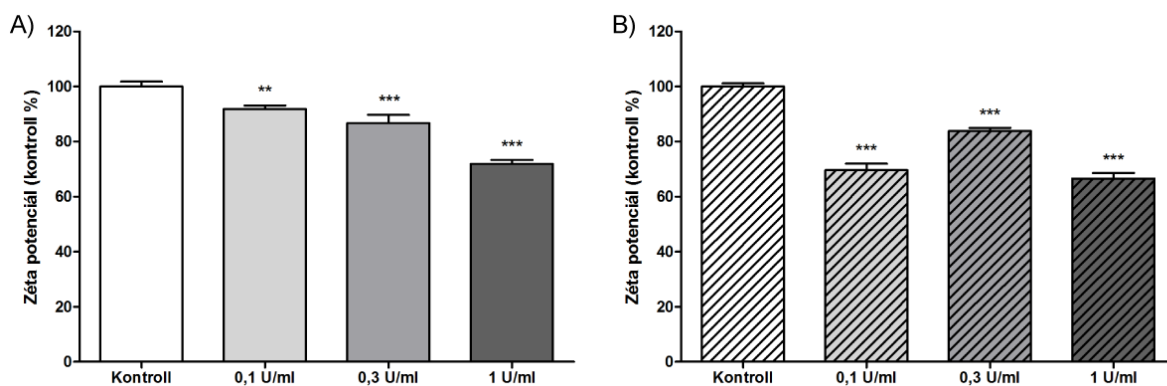
## 2.8. Statisztikai kiértékelés

Minden adatot átlag  $\pm$  S.E.M. értéként adtuk meg, kivéve a permeabilitási adatokat, ahol átlag  $\pm$  S.D. szerepel. A különböző adatsorokon páratlan t-tesztet vagy egyutas variancia analízist követően Dunnett-tesztet végeztünk Graphpad Prism 5.0 program (GraphPad Software Inc., USA) segítségével. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Minden kísérletet legalább kétszer megismételtünk, és a párhuzamos minták száma legalább 3 volt kísérletenként.

### 3. Eredmények

#### 3.1. Glikokalix emésztése neuraminidáz enzimmal agyi endotélsejteken: hatása a sejtek felszíni töltésére, lektinkötésre és a sejtrétegek permeabilitására

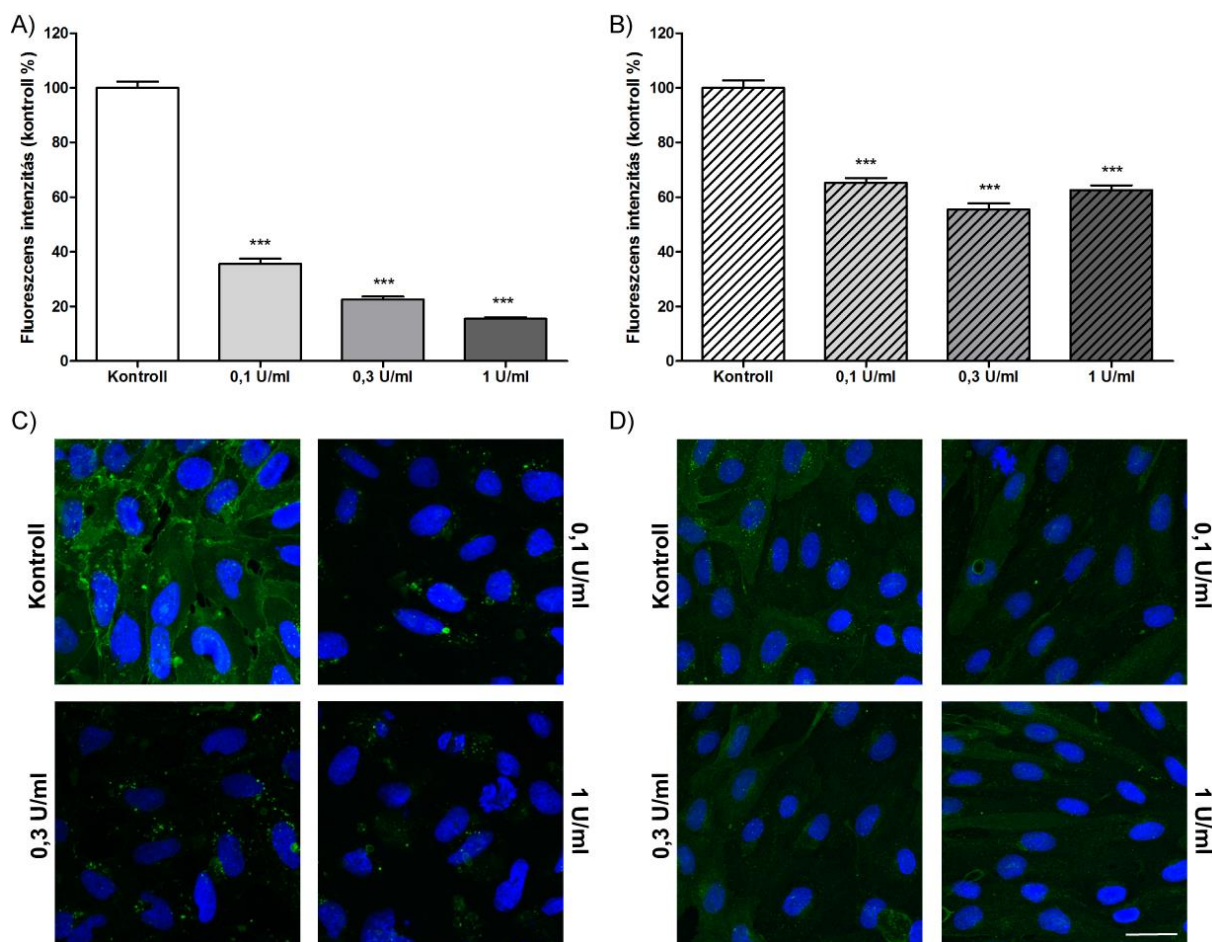
A kezeletlen D3 agyi endotélsejtek átlagos felszíni töltése  $-14,1$  mV, a primer patkány agyi endotélsejteké  $-16,8$  mV volt. A neuraminidáz enzim hatékonynak bizonyult  $0,1$ - $0,3$ - $1$  U/ml koncentrációban egyórás kezelési idővel mindkét endotélsejt típus esetében, és a sejtfelszíni töltés abszolút értékét csökkentette (10. ábra). A hatás koncentrációfüggést mutatott az agyi endotélsejt vonalon, az  $1$  U/ml neuraminidáz kezelés nagyobb mértékben változtatta a felszíni töltést, mint a  $0,1$  U/ml koncentráció. Az enzimkezelés hatékonysága a legnagyobb koncentrációnál hasonló volt mindkét agyi endotélsejt tenyészetben, a sejtfelszíni töltés abszolút értéke  $27$ , illetve  $30$  %-kal csökkent.



**10. ábra.** Neuraminidáz enzim hatása agyi endotélsejtek felszíni töltésére. A) D3 agyi endotélsejtvonal; B) patkány primer agyi endotélsejtek.  $n=15-30$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  a kontrollhoz képest.

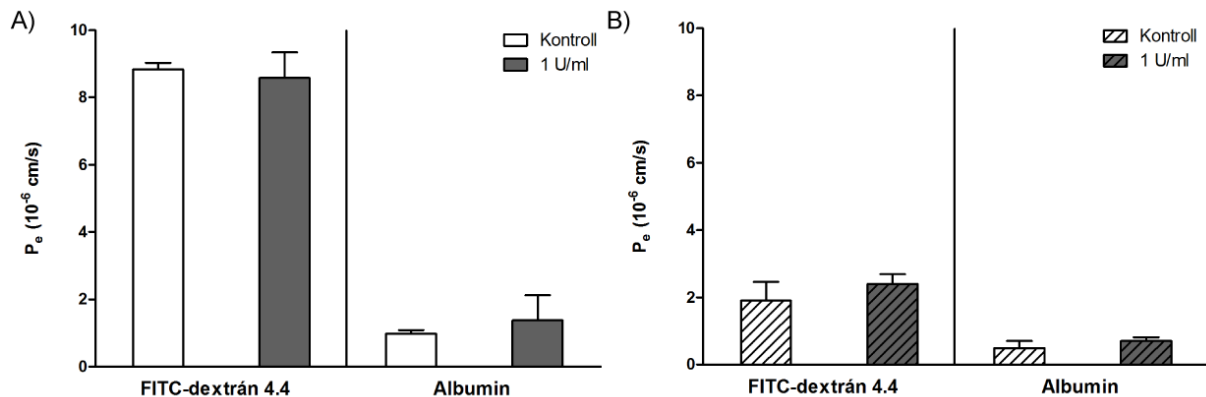
A kontroll csoportokban az endotélsejtek felszínén a glikokalix réteget a fluoreszcens WGA lektin jól jelölte (11. ábra). Mindkét agyi endotélsejt típusnál sejteken belüli és sejtek közötti festődési heterogenitás figyelhető meg. A neuraminidáz kezelés hatására a lektinkötés az endotélsejtek felszínén csökkent, ami a glikokalix leemésztődését, és az N-acetil-D-glükózamin és a szialsav csoportok mennyiségének csökkenését jelzi. A lektin kötődés, azaz a fluoreszcens intenzitás ImageJ programmal kiértékelt változása a D3 sejtek esetében koncentráció függést mutatott (11. A. ábra), ami a primer sejteknél nem volt megfigyelhető. A

lektinkötődés csökkenése a D3 sejt esetében kifejezettebb volt, a fluoreszcens intenzitás az enzim legnagyobb koncentrációjánál a kontroll érték 20 %-a alá csökkent.



**11. ábra.** Neuraminidáz enzim hatása fluoreszcensen jelölt lektin sejtfelszíni kötődésére. A) és C) D3 agyi endotélsejtvonal; B) és D) patkány primer agyi endotélsejtek. n=12-16; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  a kontrollhoz képest. Mércse: 25  $\mu\text{m}$ .

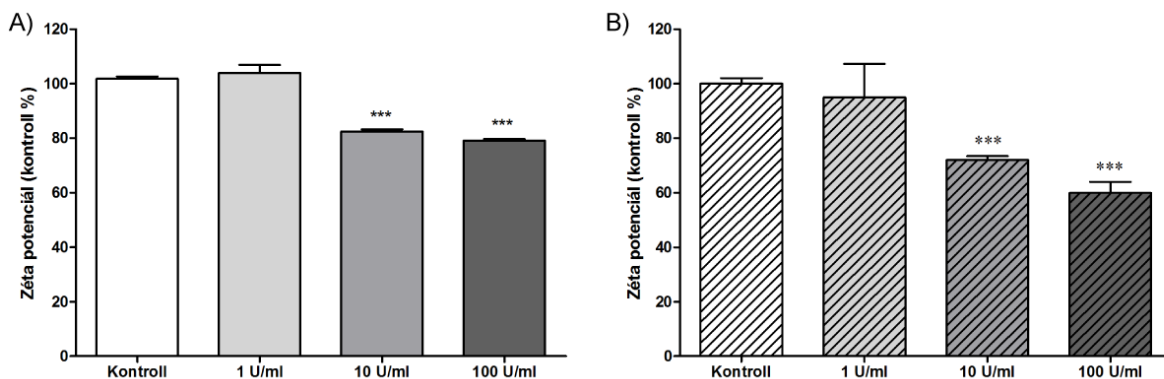
A glikokalix és sejtfelszíni töltés hatását az agyi endotélsejtek gát funkciójára permeabilitás méréssel vizsgáltuk, amelynek során két, igen alacsony átjutású jelzőanyag, a 4,4 kDa FITC-dextrán és az EBA-t sejtrétegen keresztüli átjutását mértük. A sejtek kezelése 1 U/ml neuraminidáz enzimmel 1 órán keresztül nem változtatta meg sem a dextrán, sem az albumin permeabilitását egyik endotélsejt típuson sem (12. ábra).



**12. ábra.** Neuraminidáz enzim hatása agyi endotélsejtek permeabilitására. A) D3 agyi endotélsejtvonal; B) patkány primer agyi endotélsejtek. n=3.

### 3.2. Glikokalix emésztése hialuronidáz enzimmal agyi endotélsejteken: hatása a sejtek felszíni töltésére, lektinkötésre és a sejtrétegek permeabilitására

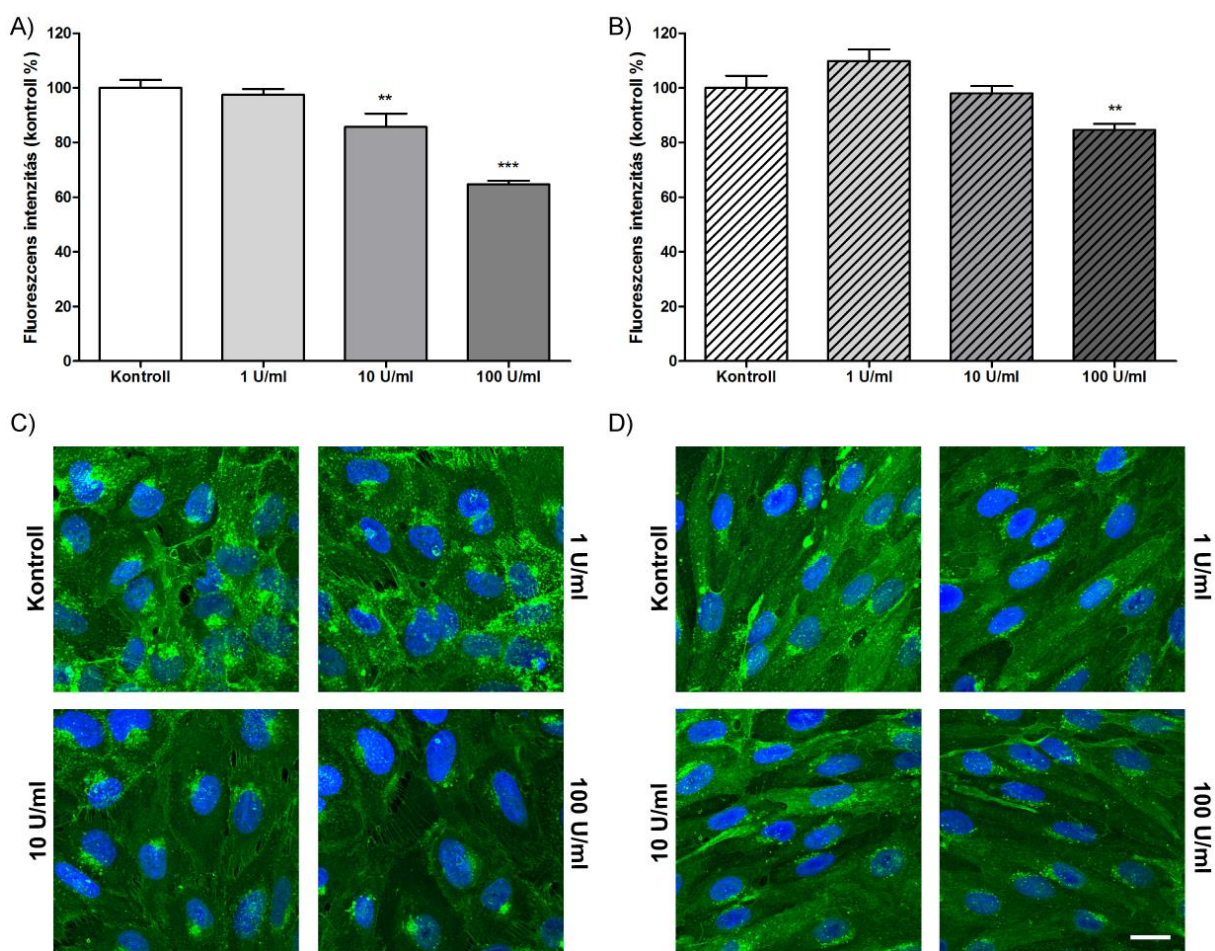
Előkísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a neuraminidáz kezeléshez hasonló koncentrációk alkalmazása esetén a hialuronidáz emésztés nem befolyásolta szignifikánsan a felszíni töltést (13. ábra), ezért 10 és 100 U/ml-es koncentrációkat is használtunk további kísérleteinkben. A 10 és 100 U/ml hialuronidáz koncentrációkkal 10 percig tartó kezelést követően az agyi endotélsejtek sejtfelszíni töltésének abszolút értéke jelentősen csökkent a kontrollhoz képest mindkét sejttípusnál. Az enzimkezelés hatékonysága a zéta potenciál megváltoztatásában a legnagyobb koncentrációnál kifejezettebb volt a primer sejteknél, ahol a sejtfelszíni töltés abszolút értéke 38 %-kal csökkent, míg a D3 sejteknél a változás 26 % volt.



**13. ábra.** Hialuronidáz enzim hatása agyi endotélsejtek felszíni töltésére. A) D3 agyi endotélsejtvonal; B) patkány primer agyi endotélsejtek. n=15-30; \*\*\*,  $p < 0,001$  a kontrollhoz képest.

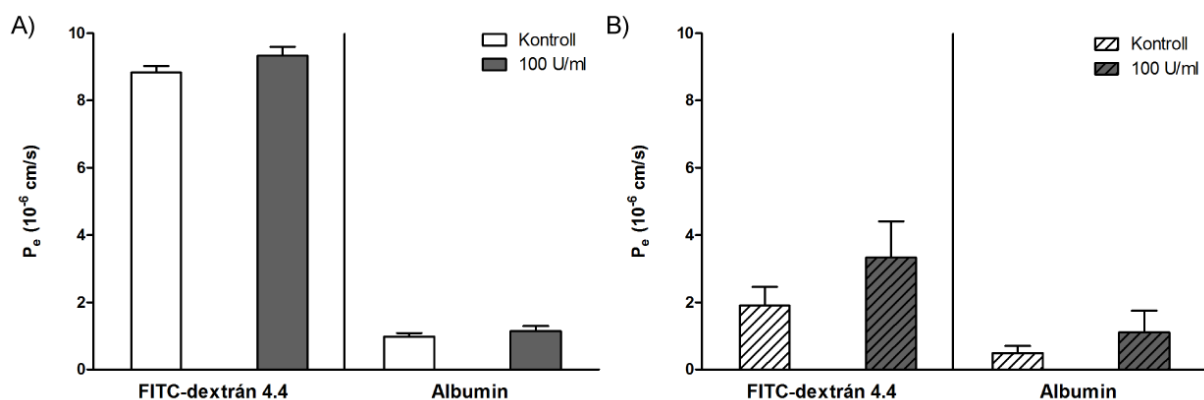


A sejtfelszíni töltés változását a WGA festés is alátámasztotta, a hialuronidáz (4 h, 37 °C) hatékonyan csökkentette a festési intenzitást mindkét sejtípus esetén a legnagyobb koncentrációban (14. ábra). A D3 sejtek a neuraminidázhoz hasonlóan érzékenyebben reagáltak az enzim kezelésre, itt már a 10 U/ml hialuronidáz koncentráció is csökkentette a festési intenzitást, míg primer agyi endotélsejtek esetén ez a koncentráció még nem okozott változást.



**14. ábra.** Hialuronidáz enzim hatása fluoreszcensen jelölt lektin kötődésére. A) és C) D3 agyi endotélsejtvonal; B) és D) patkány primer agyi endotélsejtek. n=12-16; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 a kontrollhoz képest. Mércé: 25  $\mu$ M.

A hialuronidáz kezelés (100 U/ml 1 h, 37 °C) a neuraminidázhoz hasonlóan nem változtatta meg az agyi endotélsejtek permeabilitását a két fluoreszcens jelzőanyagra a kontrollhoz képest (15. ábra).

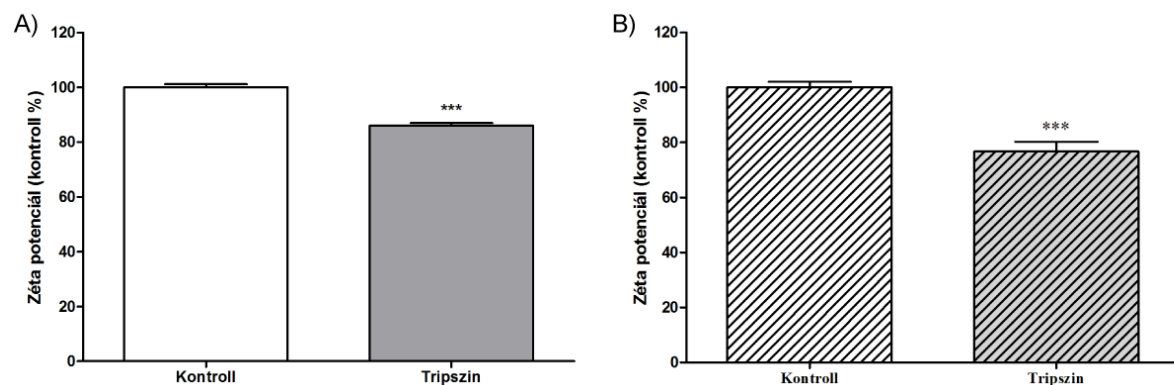


**15. ábra.** Hialuronidáz enzim hatása agyi endothélsejtek permeabilitására. A) D3 agyi endothélsejtvonal; B) patkány primer agyi endothélsejtek.  $n=3$ .

### 3.3. Glikokalix emésztése tripszin enzimmal agyi endothélsejteken: hatása a sejtek felszíni töltésére, lektinkötésre és a sejtrétegek permeabilitására

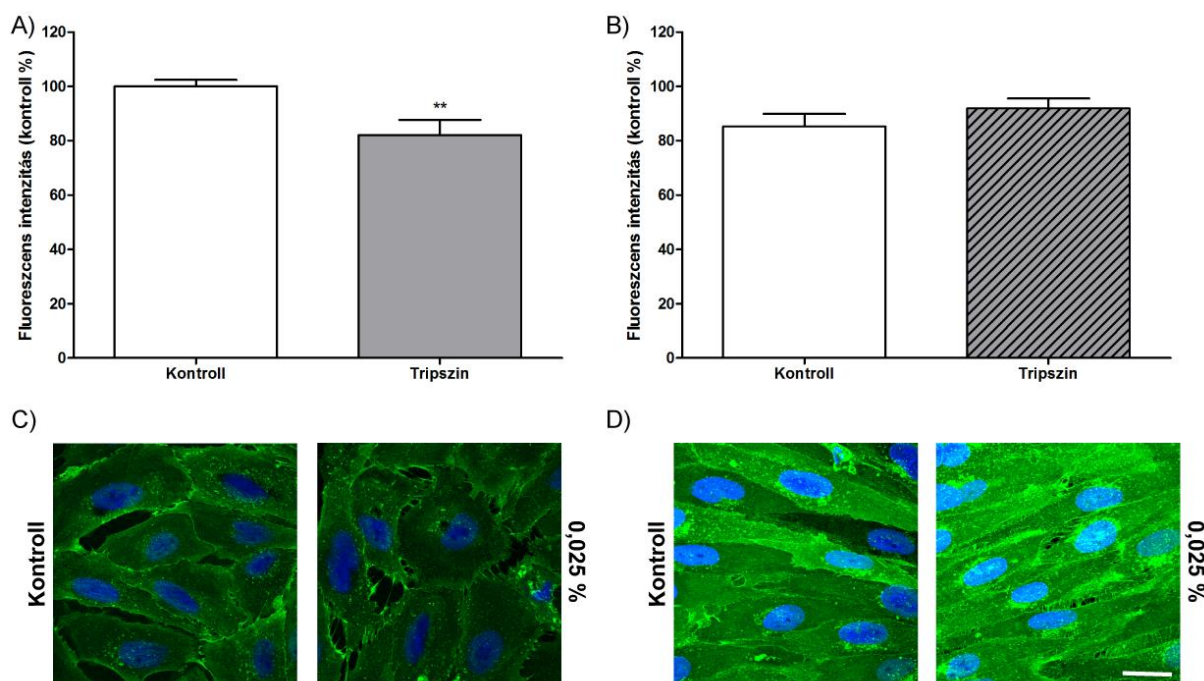
A tripszin (0,025 %) kezelést minden esetben 2 percig végeztük,  $37^\circ$  C-on. Ennél tovább történő tripszines emésztés során a sejtek közötti kapcsolatok felszakadnak és a sejtréteg felválk a tenyésztő felszínről, ezért már nem a glikokalixra való hatását látjuk, hanem a passzálás során is kihasznált, a sejteket egymástól elkülönítő hatást.

A tripszin mindkét agyi endothélsejt esetén csökkentette a sejtfelszíni töltés abszolút értékét a másik két enzimhez hasonlóan (16. ábra). A változás azonban kisebb volt, megközelítőleg 20 % mind a primer sejtek, mind a sejtvonal esetében.



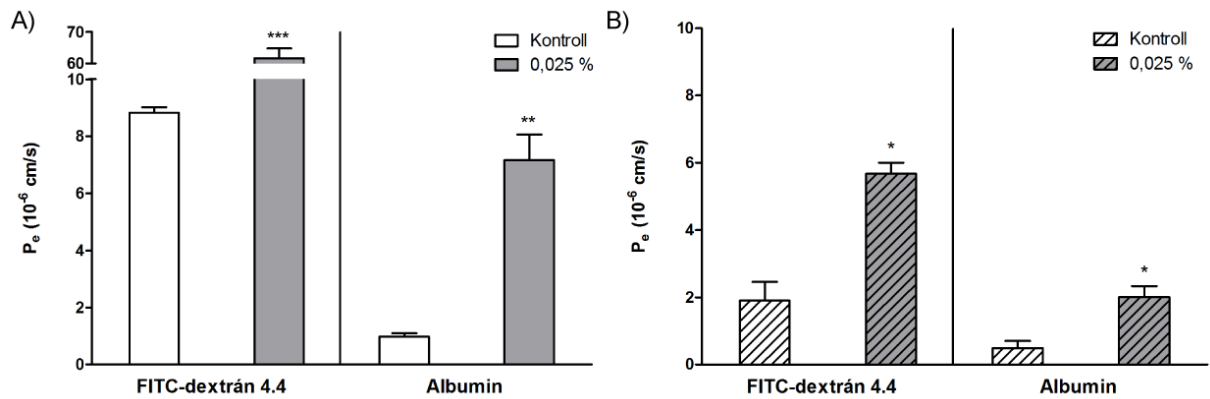
**16. ábra.** Tripszin enzim hatása agyi endothélsejtek felszíni töltésére. A) D3 agyi endothélsejtvonal; B) patkány primer agyi endothélsejtek.  $n=15-30$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  a kontrollhoz képest.

A D3 sejteken a sejtfelszíni glikokalix jelölődése WGA lektinnel tripszin hatására szignifikánsan csökkent a kontrolléhoz képest, míg a primer agyi endotélsejtek esetén ez nem változott meg (17. ábra). A D3 sejteken nagyobb változást mutattunk tripszines kezelésre, mint a primer endotélsejteken, hasonlóan a másik két enzim kezeléshez.



**17. ábra.** Tripszin enzim hatása fluoreszcensen jelölt lektin kötődésére. A) és C) D3 agyi endotélsejtvonal; B) és D) patkány primer agyi endotélsejtek. n=12-16; \*\*,  $p < 0,01$  a kontrollhoz képest. Mércé: 25  $\mu\text{M}$ .

Tripszin kezelést követően a permeabilitási vizsgálatokban a D3 és a primer agyi endotélsejtek átjárhatósága többszörösére nőtt a kontrollhoz képest mindkét jelzőanyagra (18. ábra). A fáziskontraszt képek alapján a sejtek nem váltak fel a tenyésztő felszínről, tehát a tripszin kezelés nem a sejtréteg eltávolítása miatt okozta a gátműködés romlását.



**18. ábra.** Tripszin enzim hatása agyi endotélsejtek permeabilitására. A) D3 agyi endotélsejtvonal; B) patkány primer agyi endotélsejtek.  $n=3$ ; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; a kontrollhoz képest.

#### **4. Megbeszélés**

Az ereket bélelő endotélsejtek felszínén található glikokalix fontos szerepet játszik a véráramlás élettani hatásának kialakításában, mint mechanoszenzor és transzducer (Fu és Tarbell, 2013). Emellett az erősen negatív töltésű glikokalix réteg része az endotélium védelmi rendszerének, és befolyásolja az anyagátjutást, ami különösen fontos a vér-agy gátat alkotó agyi mikroereknél (Li és mtsai., 2010). Egyre több a bizonyíték, hogy a belhámsejtek felszínén a glikokalix összetételének és mennyiségének megváltozása és a vaszkuláris betegségek kialakulása között összefüggés áll fenn (Van den Berg és mtsai., 2006). Annak a folyamatnak a lépései, amely során a glikokalix károsodása az agyi endotélsejtek homeosztázisának és az agyi mikroerek permeabilitásának megváltozásához és betegségek kialakulásához vezet egyelőre nem ismertek. A tenyészetes vér-agy gát modellek használata leegyszerűsíti és felgyorsítja a vér-agy gát kutatást, így például a központi idegrendszeri gyógyszerjelöltek fejlesztését (Veszélka és mtsai., 2011), kísérleteinkben ezért agyi endotélsejtvonalat és primer tenyészeteket használtunk a glikokalix tanulmányozására.

Kísérletes munkánk során arra kerestük a választ, hogy az általunk vizsgált különböző enzimekkel végzett emésztések hogyan változtatják meg a glikokalixból adódó sejtfelszíni töltést, és ezzel az agyi endotélsejtek permeabilitását.

##### **4.1. Enzimatis emésztés hatása az endotélsejtek felszínén található glikokalix denzitására**

A glikokalix enzimatis emésztését más kutatócsoportok is vizsgálták korábban (Henry és mtsai., 1999; Landsverk és mtsai., 2012). Bai és csoportja a denzitásbeli változást hozzánk hasonlóan jelölt WGA lektinfestéssel és intenzitás kiértékeléssel végezte. Közlött eredményeiből látható, hogy például a neuraminidáz enzimmel történő emésztést követően az intenzitás csökkent a glikokalix réteg eltávolításának következtében (Bai és mtsai., 2012). A kísérleteinkben kapott eredmények egybevágóak ezeknek a kutatócsoportoknak mérési eredményeivel. Az általunk használt három enzim, a neuraminidáz, a hialuronidáz és a tripszin hatékonyan emésztette a glikokalix réteget, amit a lektinkötés intenzitásával határoztunk meg. Az enzimatis kezelések mind a sejtvonalnál, mind a primer agyi endotélsejteknél koncentráció függő módon csökkentették a lektinkötődést. A humán agyi endotélsejtvonal érzékenyebbnek bizonyult a glikokalix emésztésre a lektinkötés alapján, mint a patkány primer agyi

endotélsejtek. Ennek mechanizmusát nem ismerjük, lehetséges, hogy a sejtvonalon kevésbé vastag a glikokalix réteg, de fajok közötti különbség is elképzelhető a glikokalix összetételében, ami befolyásolhatja az enzimes emésztést és a lektin kötődését is.

#### **4.2. A glikokalixból adódó felszíni töltés megváltozása neuraminidáz, hialuronidáz illetve tripszin enzimmel történő emésztés esetén és ennek hatása a permeabilitásra**

Az elmúlt években egyre nagyobb hangsúly kerül a glikokalix kutatásra, azonban ennek a vér-agy gáton is elhelyezkedő sejtfelszíni rétegnek a funkciójáról kevés irodalmi adatunk van. Vannak adatok az enzimes emésztés hatásáról a glikokalix denzitására, azonban a kezelés hatását a zéta potenciál megváltozására még nem vizsgálták az általunk használt töltés vizsgálati módszerrel (Ribeiro és mtsai., 2012). Elsőként mértük meg a humán D3 agyi endotélsejtek és patkány primer agyi endotélsejtek felszíni töltését, és erősen negatívnak találtuk. A primer sejtek töltése a sejtvonalénál negatívabb volt. Ez a megfigyelés összhangban áll a korábbi irodalmi adatokkal miszerint a primer borjú agyi endotélsejtek a köldökzsínórvéna endotélsejtekhez képest szignifikánsan negatívabb felszíni töltéssel rendelkeznek a felszíni glikokalixból eredően (Ribeiro és mtsai., 2012).

Az enzimkezelések mind a D3 mind pedig a primer patkány agyi endotélsejtek esetén csökkentették a glikokalix denzitását, és ebből adódóan a felszíni töltés abszolút értékét. Ugyanakkor a sejtek permeabilitása a neuraminidáz és hialuronidáz emésztést követően nem változott szignifikánsan a semleges töltésű jelölő anyagokra. Egyedül a tripszin esetében mértünk többszörösére nőtt permeabilitást, melyet azzal magyarázhatunk, hogy a tripszin enzim működése során nem csak a glikokalixot emésztette, hanem a szoros kapcsolatokra is hatást gyakorolt, megnyitotta azokat. A Singh és munkatársai (2007) által végzett kísérletek összefüggéseket mutattak ki a glikokalix egysége és a permeabilitás között humán vese endotélsejteken. A neuraminidáz enzim a glikokalix réteg nagy részét eltávolította, mellyel egy időben a rezisztencia csökkent és az albumin átjutás megnövekedett. Ezen megfigyelések alátámasztják eredményeinket, amelyek alapján állíthatjuk, hogy a glikokalix rétegnek és az abból adódó negatív sejtfelszíni töltésnek fontos szerepe van a vér-agy gát barrier tulajdonság kialakulásában és fenntartásában.

## 5. Összefoglalás

Elsőként vizsgáltuk humán és patkány agyi endotélsejteken a glikokalix réteg hatását a sejtek felszíni töltésére és permeabilitására. Enzimes emésztés hatására csökkent a glikokalix réteg, és ezzel összefüggésben a negatív sejtfelszíni töltés mértéke is. Ugyanakkor a közepes és nagy molekulájú semleges jelzőanyagok átjutása a vér-agy gát modelleken nem változott. Kísérleteink alátámasztják, hogy az endoteliális glikokalix a vér-agy gát védelmi rendszerének fontos eleme, és az agyi endotélsejtek glikokalix rétegének állapota hatással lehet az agyi érbetegségek és más vér-agy gát károsodással összefüggő idegrendszeri kórképek kialakulására. A vér-agy gáton való új gyógyszer átjuttatási stratégiák kidolgozásánál is figyelembe kell venni a glikokalix szerepét. További terveink között szerepel agyi endotélsejtek felszíni glikokalix töltésének pozitív töltésű anyagokkal való módosítása, különböző töltésű jelzőanyagok permeabilitásának vizsgálata, és a glikokalix réteg szerkezetének és szerepének tanulmányozása kórállapotokban.

## Irodalomjegyzék

- Abbott, Rönnbäck L, Hansson E Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier  
Nat. Rev. Neurosci. - 2006. - 7. kötet. - old.: 41-53.
- Alphonsus, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier.  
Anaesthesia. 2014 Jul;69(7):777-84.
- Bai, Wang W. Spatio-temporal development of the endothelial glycocalyx layer and its  
mechanical property in vitro. J R Soc Interface. 2012 Sep 7;9(74):2290-8.
- Becker, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the  
endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. Cardiovasc Res. 2010 Jul  
15;87(2):300-10.
- Broekhuizen, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, Schlingemann  
RO, Nieuwdorp M, Stroes ES, Vink H. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx  
and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetologia. 2010  
Dec;53(12):2646-55.
- Byrne, Roberts From Molecules to Networks- An Introduction to Cellular and Molecular  
Neuroscience Elsevier, 2004.
- Campos-Bedolla, Walter FR, Veszeka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the  
nutrition of the central nervous system. Arch Med Res. 2014 Nov;45(8):610-38.
- Deli, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier  
models: physiology, pathology, and pharmacology. Cell Mol Neurobiol. 2005  
Feb;25(1):59-127.
- Deli, Kálmán M Vér-agy gát: kölcsönhatás gliasejtek és az agyi endothelsejtek között Glia. -  
Budapest : Akadémiai kiadó, 2008.
- Deli. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier Solubility, Delivery and ADME Problems  
of Drugs and Drug Candidates. - 2011.
- Drake-Holland, Noble MI. Update on the important new drug target in cardiovascular medicine  
- the vascular glycocalyx. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2012 Sep;12(1):76-  
81.



- Farnum, Wilsman NJ. Lectin-binding histochemistry of intracellular and extracellular glycoconjugates of the reserve cell zone of growth plate cartilage. *J Orthop Res.* 1988;6(2):166-79.
- Fu, Tarbell JM. Mechano-sensing and transduction by endothelial surface glycocalyx: composition, structure, and function. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2013 May-Jun;5(3):381-90.
- Hellinger, Veszelka S, Tóth AE, Walter F, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Háda V, Nakagawa S, Duy TD, Niwa M, Deli MA, Vastag M. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012 Oct;82(2):340-51.
- Henry, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 2):H508-14.
- Henry, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Dec;279(6)
- Hervé, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* 2008 Sep;10(3):455-72.
- Ingber. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Ann Med.* 2003;35(8):564-77.
- Joó. Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences. *Prog Neurobiol.* 1996 Feb;48(3):255-73.
- Landsverk, Tsai AG, Cabrales P, Intaglietta M. Impact of enzymatic degradation of the endothelial glycocalyx on vascular permeability in an awake hamster model. *Crit Care Res Pract.* 2012;2012:842545.
- Li, Yuan W, Fu BM. A model for the blood-brain barrier permeability to water and small solutes. *J Biomech.* 2010 Aug 10;43(11):2133-40.
- Lipowsky. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng.* 2012 Apr;40(4):840-8.
- Nieuwdorp, Meuwese MC, Mooij HL, Ince C, Broekhuizen LN, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol (1985).* 2008 Mar;104(3):845-52

- Nieuwdorp, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):1127-32.
- Noble, Mautes AE, Hall JJ Characterization of the microvascular glycocalyx *J. Comp. Neurol.* - 1996. - old.: 542-56.
- Perrière, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Scherrmann JM, Temsamani J, Couraud PO, Deli MA, Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005 Apr;93(2):279-89.
- Reese, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 1967 Jul;34(1):207-17.
- Reitsma, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. 2007 Jun;454(3):345-59.
- Ribeiro, Domingues MM, Freire JM, Santos NC, Castanho MA. Translocating the blood-brain barrier using electrostatics. *Front Cell Neurosci*. 2012 Oct 11;6:44.
- Saunders, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K, Bauer HC (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci*. 8:404.
- Singh, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW. Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Nov;18(11):2885-93.
- Van den Berg, Nieuwdorp M, Stroes ES, Vink H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacol Rep*. 2006;58 Suppl:75-80.
- Veszeka, Kittel Á, Deli MA. Tools for Modelling Blood-Brain Barrier Penetrability Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates. - 2011. - old.: 166-188.
- Veszeka, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Ngo TK, Niwa M, Abrahám CS, Deli MA. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int*. 2007 Jan;50(1):219-28.

- Veszelka, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- $\beta$  induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(3):487-501.
- Walter, Valkai S, Kincses A, Petneházi A, Czeller T, Veszelka, Ormos, Deli MA, Dér A. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers - *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 222, January 2016, Pages 1209–1219.
- Walter, Veszelka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA. Tesmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *J Neurochem.* 2015 Sep;134(6):1040-54.
- Weinbaum, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:121-67.
- Weksler, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS.* 2013 Mar 26;10(1):16.
- Weksler, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005 Nov;19(13):1872-4.
- Wolburg, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan;335(1):75-96.
- Zeng, Ebong EE, Fu BM, Tarbell JM. The structural stability of the endothelial glycocalyx after enzymatic removal of glycosaminoglycans. *PLoS One.* 2012;7(8):e43168.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm

Dr. Deli Máriának, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierek Kutatócsoport tudományos tanácsadójának, témavezetőmnek, munkám során nyújtott folyamatos segítségét, tanácsait, támogatását, és hogy megismertette velem a tudományos munka alapvető módszereit és szépségeit;

Dr. Rákhely Gábornak, az SZTE TTIK, Biotechnológiai Tanszék tanszékvezetőjének, belső konzulensemnek támogatását;

Dr. Dér Andrásnak, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Biomolekuláris Elektronika Kutatócsoport tudományos tanácsadójának segítségét és támogatását;

Dr. Fülöp Líviának, az MTA SZTE Szupramolekuláris és Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoport tudományos tanácsadójának segítségét és hogy kísérleteim elvégzéséhez használt Malvern Zetasizer Nano ZS műszert rendelkezésemre bocsájtotta;

Dr. Walter Fruzsínának, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierek Kutatócsoport tudományos segédmunkatársának gyakorlati munkámhoz nyújtott folyamatos segítségét, türelmét, hasznos tanácsait és támogatását.

Köszönetet szeretnék mondani szeretett szüleimnek és kishúgomnak, hogy az elmúlt években minden elképzelésemet támogatták, mellettem álltak és hogy biztos, szeretetteljes családi háttérrel biztosítottak a tanulmányaim és munkám sikeres elvégzéséhez.

## 8. Tételes szakmai hozzájárulás

Alulírott, Horányi Nóra a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül az alábbiakat végeztem el önállóan, vagy vettem részt benne:

- a zéta potenciál mérésére és lektinfestésre használt D3 agyi endotél sejtvonal és primer patkány agyi endotélsejtek tenyésztését,
- Malvern Zetasizer Nano ZS műszer beállításának optimalizálását a sejtes mérésekre, és a sejtek zéta potenciáljának önálló mérését enzimes emésztés után,
- a sejtfelszíni glikokalix fluoreszcensen jelölt WGA lektinnel történő festését,
- a festések konfokális mikroszkóppal történő fotózását és intenzitásának kiértékelését,
- a permeabilitási vizsgálatokban való segédkezést

Szeged, 2015. december 6.

.....

Horányi Nóra

## 9. Nyilatkozat

Alulírott Horányi Nóra, molekuláris bionika BSc szakos hallgató kijelentem, hogy szakdolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karának, a Biotechnológia Tanszékén készítettem diplomám megszerzése érdekében.

Kijelentem, hogy a dolgozatot más szakon korábban nem védtem meg, saját munkám eredménye, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem könyvtárában, a kölcsönözhető könyvek között helyezik el.

Szeged, 2015. december 6.

.....  
Horányi Nóra

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar