

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

HUN-REN SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
Biofizikai Intézet

A vér-agy gát változásainak vizsgálata
akut hasnyálmirigy-gyulladásos beteg szérumok tanulmányozásával

Kucsápszky Nóra
molekuláris biológia MSc.
II. évfolyam

Témavezetők: **Dr. Deli Mária**, kutatóprofesszor
Dr. Walter Fruzsina, tudományos főmunkatárs
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biofizikai Intézet

Belső konzulens: **Dr. Perei Katalin**
egyetemi adjunktus
SZTE TTIK, Biológiai Intézet
Biotechnológiai Tanszék

37. OTDK Biológia Szekció
2025

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
2. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR	3
2.1. A hasnyálmirigy és az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) jellemzése	3
2.2. A pankreatikus enkefalopátia jellemzése.....	5
2.3. A vér-agy gát (BBB) szerkezete és fiziológiás, valamint patológiás működése	7
2.4. A BBB sérülésének kimutatására szolgáló agyi eredetű szérumbiomarkerek.....	9
3. CÉLKITÚZÉSEK	11
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	12
4.1. Reagensok, vegyszerek	12
4.2. Akut pankreatitiszben szenvedő betegekből származó vérérum minták.....	12
4.3. A vér-agy gát sérülés jelzőanyagainak kimutatása enzimhez kötött immunszorbens (ELISA) vizsgálatokkal.....	13
4.4. A hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonal tenyésztése és kezelése	13
4.5. Transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése	15
4.6. Permeabilitási vizsgálat	15
4.7. Oxidatív stressz vizsgálata.....	17
4.7.1. Reaktív oxigéngyökök (ROS) képződés mérése.....	17
4.7.2. Nitrogén-monoxid (NO) felszabadulás mérése.....	18
4.8. Immunhisztokémia és képanalízis	18
4.9. Statisztikai kiértékelés	19
5. EREDMÉNYEK.....	20
5.1. Az ELISA vizsgálatok eredményei a vér-agy gát sérülését jelző molekulák kimutatására	20
5.1.1. NSE mennyiségének vizsgálata a humán vérérumokban	20
5.1.2. S100 β mennyiségének vizsgálata a humán vérérumokban.....	21
5.2. A vérérumokkal történő kezelés hatása tenyésztett agyi endotélsejtekre.....	22
5.2.1. Barrier tulajdonságok: rezisztencia.....	22
5.2.2. Barrier tulajdonságok: permeabilitási vizsgálatok	23
5.3. Az oxidatív stressz jellemzése a vérérummal való kezelés hatására.....	24
5.3.1. A ROS mérés eredményei	24
5.3.2. A NO mérés eredményei és kiértékelésük	24
5.4. A szoros kapcsolatok morfológiájának jellemzése a kezelés hatására	25
6. MEGBESZÉLÉS.....	27
6.1. A BBB sérülés biológiai markereinek jelenléte a betegek vérérumában	28
6.2. A vérérumokkal történő kezelés hatása tenyésztett humán agyi endotél sejtekre	29
7. ÖSSZEGZÉS ÉS TOVÁBBI CÉLJAINK	30
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	31
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36
10. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁSI NYILATKOZAT	37

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP: akut hasnyálmirigy-gyulladás

BBB: vér-agy gát

bFGF: fibroblaszt növekedési faktor

BSA: szarvasmarha szérum albumin

DAF-FM diacetát: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein diacetát

DCF: diklorofluoreszcein

EBA: albuminhoz kötött Evans-kék festék

ELISA: enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálatot

FBS: magzati szarvasmarha szérum

FITC-dextrán: fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextrán

GFAP: gliális-fibrilláris savas fehérje

H₂DCF-DA: 2'-7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát

HC: hidrokortizon

IFN- γ : interferon- γ

IL-1 β , -6, -8, -9, -17: interleukin-1 β , -6, -8, -9, -17

ITS: inzulin-transzferrin-szelenit

LiCl: lítium-klorid

NO: nitrogén-monoxid

NSE: neuron specifikus enoláz

PBS: foszfát puffer oldat

PDGFR- β : vérlemezke-eredetű növekedési faktor- β

P_e: permeabilitási együttható

PECAM: vérlemezke-endotél sejt adhézios molekula

P-gp: P-glikoprotein

PLA2: foszfolipáz A2

PS: permeability surface product

ROS: reaktív oxigéngyökök

S100 β : S100 kalcium-kötő fehérje- β

SNP: nátrium-nitroprusszid

tBHP: tert-butyl-hidroperoxid

TEER: transzendoteliális elektromos ellenállás

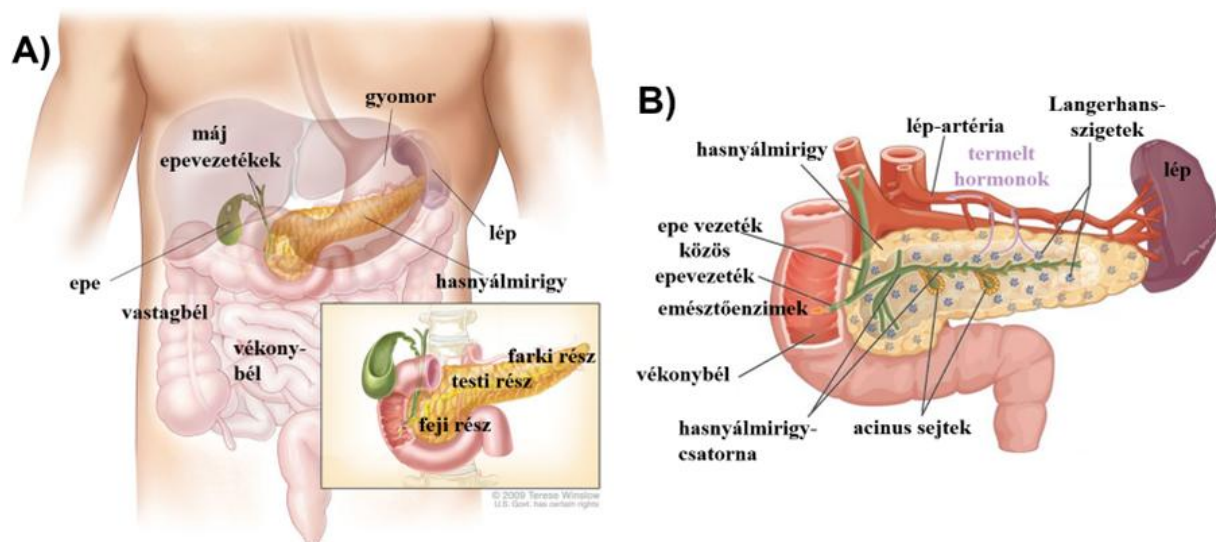
TNF- α : tumornekrozis-faktor- α

ZO: zonula occludens

2. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

2.1. A hasnyálmirigy és az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) jellemzése

A hasnyálmirigy egy körülbelül 15-25 cm hosszú, átlagosan 100-150 g súlyú szivacsos állagú, hosszúkás és mirigyes szerv. A hasüreg felső részében a retroperitoneumban helyezkedik el a gyomor és a gerinc között, az L1-L2 csigolyák magasságában. Felépítése szerint három régióra bontható: feji, testi és farki részre (1.A ábra). Anatómiailag kapcsolatban áll a léppel, a gyomorral, az epével, valamint a patkó -és vastagbéllel. Naponta körülbelül egy kilogramnyi hasnyálat ürít a patkóbélbe. Funkcionalitás szempontjából a hasnyálmirigy „két szerv egyben”, ugyanis egy exokrin és egy endokrin részből áll. A külső elválasztású (exokrin) egység elsődleges feladata a normál emésztésért és az elfogyasztott élelmiszerek felszívódásáért felelős emésztőenzimek kiválasztása. Az exokrin mirigyek acinus sejtekből és csatornasejtekből állnak; előbbi emésztőenzimeket (azok aktiválatlan formáit, pl. a tripszin), utóbbi pedig nátrium-hidrogén-karbonátot termel (1.B ábra). A belső elválasztású mirigyek elsődleges feladata ezzel szemben a glükóz homeosztázis fenntartása. Ennek ellátására a hasnyálmirigy peptidhormonokat termel, amelyhez 5 féle szekréciós szigetsejt összehangolt munkája szükséges (Leung, 2010; Talathi és mtsai., 2023). Az α - és β -sejtek szabályozzák a glükóz felhasználását a glükagon, illetve az inzulin termelésén keresztül. A PP- és δ -sejtekben termelődő hasnyálmirigy-polipeptid (PP) és szomatosztatin módosítja a többi hasnyálmirigy-sejttípus szekréciós tulajdonságait (Leung, 2010).



1. ábra. A) hasnyálmirigy a testen belüli elhelyezkedése, főbb egységei és felépítésének sematikus ábrája. [Források: A: Terese Winslow, [link](#), 2009, letöltve: 2024.10.31. (módosítva); **B)** Betts és mtsai., 2013, letöltve: 2024.10.31. (módosítva).

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) az egyik leggyakoribb sürgős kórházi ellátást igénylő emésztőrendszeri gyulladásos rendellenesség, amely során a szervben termelődő emésztőenzimek előalakjai, különösen a tripszin nem megfelelő ürülése és rendellenes aktivációja miatt autoemésztés következik be. Ez a folyamat károsítja a pankreász szövetét, illetve a mirigyek, valamint a távoli szervek és szervrendszerek működési zavarához vezethet (Petrov és Yadav, 2019; Boxhoorn és mtsai., 2020). A hirtelen kialakuló megbetegedést erős, gyomor környéki vagy diffúz hasi fájdalom, hányinger és hányás, láz, emelkedett pulzus, valamint a fehérvérsejtek és a hasnyálmirigy által termelt enzimek (pl. amiláz, lipáz, tripszin) emelkedett szintje jellemzik. Súlyosságtól függően gyakran kísérheti még egy- vagy többszervi diszfunkció, valamint a hasnyálmirigy és a körülötte lévő szövetek nekrozisa (Boxhoorn és mtsai., 2020). Habár a betegek ötöde esetén a kiváltó ok ismeretlen (idiopátiás), az AP hátterében gyakran a közös epevezeték elzáródása, túlzott alkoholfogyasztás állhat (Szatmary és mtsai., 2022). Előbbi az esetek körülbelül 45%-áért, utóbbi pedig 20%-áért felelős. A rendellenességnek számos ritkább rizikófaktora is ismert, mint például a nem kiegyensúlyozott táplálkozás, metabolikus problémák (pl. hipertrigliceridémia, hiperkalcémia), genetikai hajlam, fertőzések, autoimmun betegség, bizonyos hatóanyagú (pl. azatioprin, tiazid, mezalamin, furoszemid, azotioprin, lozartán) gyógyszerek szedése vagy a pankreatikus csatorna elzáródása (Whitcomb, 2006; Lee és mtsai., 2019; Boxhoorn és mtsai., 2020).

A betegség patogenezise során az exokrin elválasztású mirigyeket érintő sejten belüli és sejteken kívüli változások eredményeként a szövet megduzzad, a sejtek vakuolizálódnak és lokális ödéma alakul ki. Az emiatt kiszabaduló enzimek megtámadják a hasnyálmirigy egyéb sejtjeit, és sejthalált indukálnak (Lee és Papachristou, 2019). Súlyos AP esetén a nagymértékű szöveti nekrosis olyan komoly gyulladásos környezetet hozhat létre, ami később a gasztrointesztinális rendszer többi szervére is áttérjedhet és hosszútávú szisztémás hatásai is lehetnek (Whitcomb, 2006). Ha a páciens állapota rohamosan romlik, és az AP végzetes lesz két héten belül, akkor ezt leggyakrabban a hirtelen, nagy mennyiségű gyulladást kiváltó citokin (tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), interleukin-1 β , -6 és -8 (IL-1 β , IL-6 és IL-8)) felszabadulása okozza (Garg és Singh, 2019).

A betegséget súlyosság alapján többféle módon rendszerezik. Munkánk során a legelterjedtebben használt csoportosítást használtuk, az Atlanta Osztályozást. Eszerint három csoportot különböztetünk meg a lokalitás, a szervi elégtelenség és/vagy a szisztémás szövődmények megléte alapján (1. táblázat).

Atlanta Osztályozás

- **enyhe AP:** nincs helyi (a hasnyálmirigy vagy a peripankreatikus folyadékgyülem, lép és portális véna trombózis, bél ischaemia és gyomorkivezetési zavarok) vagy szisztémás (a már meglévő társbetegségek súlyosbodása) szövődmény és szervi elégtelenség
- **középsúlyos AP:** lokális vagy szisztémás szövődmények (esetleg mindkettő) és átmeneti szervi elégtelenség (< 48 óra)
- **súlyos AP:** lokális vagy szisztémás szövődmények (esetleg mindkettő) és tartós egy- vagy többszervi elégtelenség (> 48 óra)

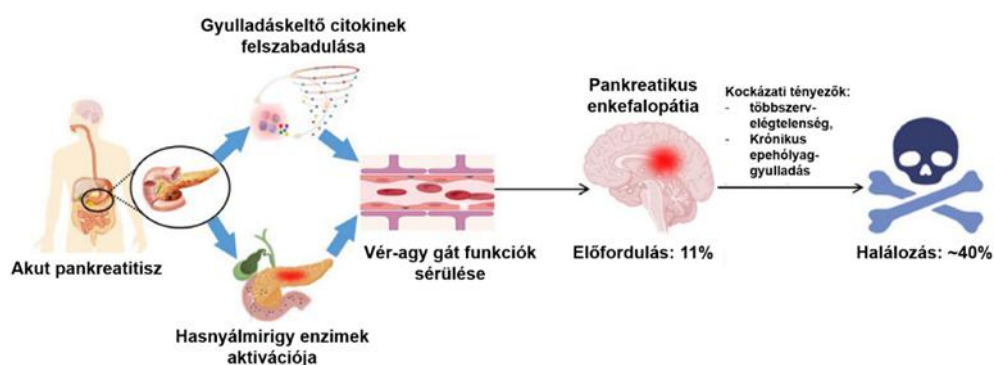
1. táblázat – az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) Atlanta Osztályozási Rendszere és a kritériumok (Boxhoorn és mtsai., 2020 alapján)

Az AP tanulmányozása egyre fontosabbá vált az elmúlt évtizedekben, ugyanis átlagosan 100 000 emberből 30-40 főt érint világszerte. (Roberts és mtsai., 2017; Szatmary és mtsai., 2022). Továbbá kimutatták, hogy az AP incidenciája világszerte növekszik, főleg a jobb anyagi helyzetű országokban (Iannuzzi és mtsai., 2022). A betegek 80%-a az enyhe AP osztályba sorolható, náluk megfelelő gyógyszeres kezelés mellett egy hét alatti felépülés várható komolyabb komplikációk nélkül. A halálozás az enyhe és középsúlyos AP esetén elenyésző, mindössze 1%. Azonban főként a betegség súlyos formájában szenvedők esetén a kórházba kerülők 20%-ánál szövődmények alakulnak ki. Náluk a nekrotizáló sejtek okozta gyulladás és a szervi diszfunkció a környező szervekre, szövetekre is kiterjedhet. A mortalitás a betegség súlyos formájában ~30%-os. (Lee és Papachristou, 2019; Hágendorn és mtsai., 2020; Szatmary és mtsai., 2022). Az orvosi ismeretek exponenciális növekedésével és a hatékonyabb kezelések megjelenésével az AP kezelése egy multidiszciplináris, egyénre szabott terápia, amelynek kidolgozása nagy szakértelmet igényel (Boxhoorn és mtsai., 2020). Egyre több bizonyíték mutat arra is, hogy azon betegek esetén, akik egyszer már szenvedtek AP-ben jelentősen megnő a kockázata a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás vagy a diabetes mellitus kialakulásának (Xiao és mtsai., 2016). Az AP pontos, részletes kórfolyamata tehát még mindig feltárássra vár (Boxhoorn és mtsai., 2020).

2.2. A pankreatikus enkefalopátia jellemzése

Az AP-ban szenvedő betegek közel 4%-ánál alakul ki tudatzavar (Hágendorn és mtsai., 2020), valamint a súlyos lefolyású esetek 10-11%-ánál láthatunk komoly neurológiai érintettséget is, amely pankreatikus enkefalopátiaként jelentkezik (2. ábra). Klinikai megnyilvánulása igen változatos, többnyire olyan neuropszichiátriai tünetek alapján

diagnosztizálják, mint a térbeli dezorientáció, memóriazavar, zavartság, delírium, hallucinációk, hiper -vagy hipoaktivitás, nystagmus, apátia, depresszió, valamint egyes esetekben akár kóma (Hágendorn és mtsai., 2020; Meng és mtsai., 2023). A pankreatikus enkefalopátia az AP komoly, jelentős halálozási aránnyal (~40%) és kedvezőtlen prognózissal jellemezhető szövődménye. A betegség bármely szakaszában kialakulhat, azonban a jellemzően a súlyos AP korai szakaszában jelentkezik és rövid időn belül lényegesen romlik. Habár a már meglévő többszervi diszfunkció és egyéb szövődmények együttes eredménye is lehet a magas halálozási arány, azonban az idegrendszeri szövődmény megjelenése jelentősen rontja a prognózist. A pankreatikus enkefalopátia pontos kórfolyamata, klinikai kritériumai és vizsgálati menete máig nem tisztázott. Ennek oka a jelenség azonosításának nehézsége és annak igen változatos klinikai megnyilvánulása (Zhang és Tian, 2007; Meng és mtsai., 2023).



2. ábra. Akut pankreatitisz során kialakuló pankreatikus enkefalopátia előzményei és klinikai okai, halálozási ráta (Meng és mtsai., 2023, módosítva).

Az AP korai szakaszában (<14 nap) kialakuló pankreatikus enkefalopátia szoros összefüggésben áll a vér-agy gát (BBB) permeabilitásának megváltozásával és a hasnyálmirigyből a szisztémás keringésbe jutó enzimek hatásával (tripszin, amiláz, elasztin, lipáz és foszfolipáz A₂ (PLA₂)). A betegség korai szakaszában jellemző a gyulladásos citokinek és egyéb mediátorok megemelkedett termelődése, amelyek az agyba kerülve fokozhatják a BBB áteresztőképességét. Ilyen a TNF α , az IL-6, az IL-8 és az IL-1 β is, a mediátorok közül pedig a vérlemezke aktiváló faktorok. A BBB fokozott átjárhatósága miatt pedig a hasnyálmirigyből a véráramba kerülő enzimek átjuthatnak a BBB-n és komoly károsodásokat okozhatnak a központi idegrendszerben, mint például agyödéma vagy diffúz agyidegi demielinizáció (Zhang és Tian, 2007; Garg és Singh, 2019; Meng és mtsai., 2023).

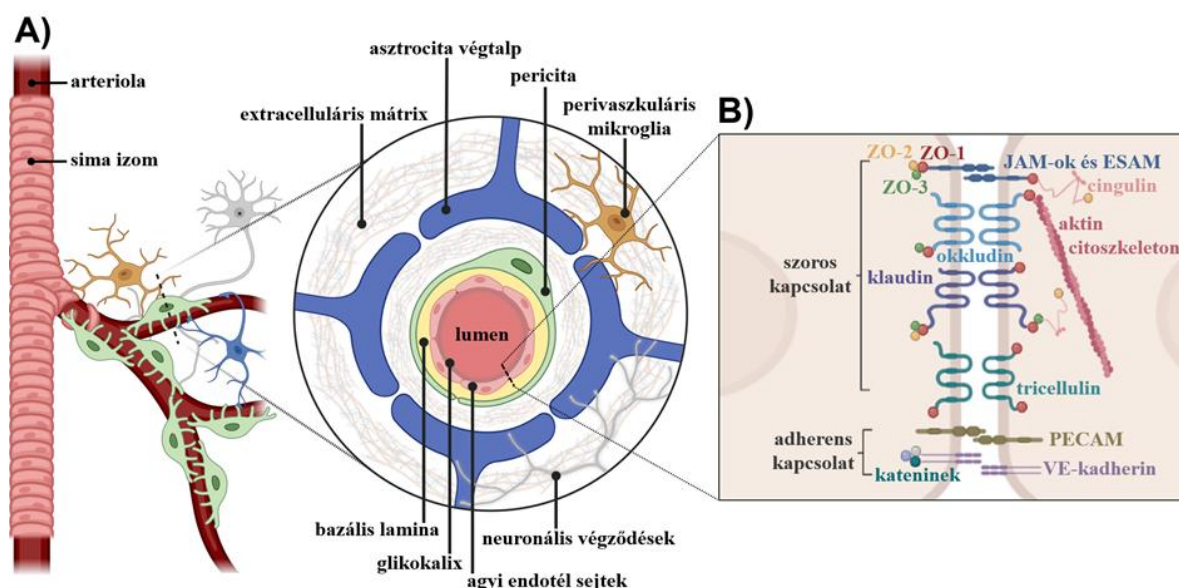
Az AP későbbi szakaszában (14 nap után) jelentkező pankreatikus encefalopátia jellemzően a tartós hányással és hosszan tartó tápanyagbevitel-csökkenéssel van szorosabb összefüggésben. Különösképpen a tiamin (B1-vitamin) hiányával, ugyanis ez a vitamin számos a trikarbonsav-ciklusban részt vevő kulcsenzim aktivitását befolyásolja. Ennek hiánya megzavarja az agyi sejtek energiaháztartását, ami működési zavarokhoz vezethet az agyban (Meng és mtsai., 2023). Az állapot javítására legtöbb esetben tüneti kezelést alkalmaznak, amely során tiamint, intrakraniális nyomáscsökkentőket és antipszichotikus szereket (benzodiazepinek) adnak a pacienseknek (Meng és mtsai., 2023).

2.3. A vér-agy gát (BBB) szerkezete és fiziológiás, valamint patológiás működése

A BBB dinamikus határfelületet képez a vér és a központi idegrendszer között, illetve döntő szerepet játszik annak védelmében és homeosztázisának fenntartásában (3. ábra, Abbott és mtsai., 2010; Kadry és mtsai., 2020). A BBB funkcionális alapját az agyi mikroereket felépítő agyi endotélsejtek, és a közöttük húzódó interendoteliális szoros és adherens kapcsolatok teremtik meg (3.B ábra). A szoros kapcsolatok még a kisméretű, vízdékony molekulák számára sem átjárhatók. Olyan integráns membránfehérjék alkotják őket, mint az okkludin, a tricellulin, az endoteliális sejtheadhéziós molekulák, a klaudinok és a funkcionális adhézións molekulák (Deli, 2009). Az integráns membránfehérjék olyan kapcsoló és szabályozó fehérjék segítségével csatlakoznak az aktin sejtvázhoz, mint a zonula occludens (ZO) fehérjecsald (ZO-1, -2, -3). A sejtközötti kapcsolatok szorosságáért és a gátfunkció ellátásáért az adherens junkciók is felelősek, amelyeket többek közt a vérlemezke-endotélsejt adhézións molekula (PECAM-1), valamint a kadherine és adapterek a kateninek (α -, β -, γ -katenin) hoznak létre (Deli, 2009). Emellett fizikai védelmi vonalat alkot az agyi endotélsejtek lumenális és ablumenális felszínén egyaránt húzódó, erős negatív töltéssel rendelkező cukor-fehérje hálózat, a glikokalix. Speciális elhelyezkedése és szerkezete révén befolyásolja a töltéssel rendelkező biomolekulák bejutását az agyba. A glikokalix főként proteoglikánokból, glikoproteinekből és glükózaminoglikánokból áll (Walter és mtsai., 2021).

Az agyi endotélsejteket kívülről a periciták, az asztrocita végtalpak, perivaszkuláris mikrogliák és az idegsejtek veszik körül, amelyek együtt alkotják a neurovaszkuláris egységet (3.A ábra, Abbot és mtsai., 2010; Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Az endotélsejtek közös bazális membránban helyezkednek el a pericitákkal, amelyek fontos szerepet töltenek be az erek stabilitásában és növekedésük szabályozásában (vaszkulo- és angiogenezis). Továbbá összehúzódnak és elernyedésükkel képesek szabályozni a mikroerekben történő véráramlást. Az endotél- és pericita sejteket az asztrociták végtalpai ölelik körül, amelyek a

transzport-, anyagcsere és kommunikációs folyamatokat segítik mind a sejtek közt, mind pedig a vér és az idegszövet közt (Abbott és mtsai., 2006).



3. ábra. A vér-agy gát elhelyezkedésének, szerkezetének és építőelemeinek sematikus ábrája; (ZO: zonula occludens; JAM: junkciós adhéziós molekula; ESAM: endoteliális adhéziós molekula; PECAM: vérlemezke-endotél sejt adhéziós molekula; VE-kadherin: vaszkuláris endoteliális kadherin); [Források: Andjelkovic és mtsai., 2023 alapján; Deli, 2009 alapján]

A BBB elsődleges funkciója a központi idegrendszer megfelelő működéséhez elengedhetetlen belső homeosztázis fenntartása és szabályozása. Emellett védelmezi is az idegszövetet az arra káros vagy toxikus vegyületektől és patogénektől, valamint lehetővé teszi a kommunikációt az agy és a periféria közt (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Az állandó környezet kialakításában és fenntartásában az agyi endotélsejteknek kiemelten fontos szerepe van. Speciális transzporter fehérjék szabályozzák a BBB-on keresztüli anyagmozgást, mint a tápanyagok bejuttatása, az idegrendszerre káros anyagok kizárása, és az anyagcsere termékek kijuttatása. Ez számos transzport útvonalon történhet, mint a membránon keresztüli passzív diffúzió, a receptor-mediált és adszorptív transzcitózis, a speciális szállítófehérjék által mediált- és az efflux transzport (Abbott és mtsai., 2010; Campos-Bedolla és mtsai., 2014).

Fiziológiai körülmények között a szoros kapcsolatok, a fénestráltság hiánya és az alacsony pinocitotikus vezikuláris transzport gátolja az agyszövet számára káros szérumfehérjék központi idegrendszerbe jutását. Azonban a BBB védelmi funkciói mind a központi idegrendszert érintő, mind perifériás kórfolyamatokban sérülhetnek, ami hozzájárulhat idegrendszeri tünetek kialakulásához vagy az idegrendszeri betegségek súlyosbodásához. Számos tanulmány kimutatta, hogy a különböző perifériás gyulladások

(autoimmun betegségek, fertőzések) károsíthatják a BBB-at különböző útvonalakon keresztül (Profaci és mtsai., 2020). Ezért az idegrendszeri érintettségű kórfolyamatokban kulcsfontosságú a BBB-on végbemenő változásokat is követni és tanulmányozni.

2.4. A BBB sérülésének kimutatására szolgáló agyi eredetű szérumbiomarkerek

Patológias állapotokban számos vazóaktív anyag, citokin és kémiai mediátor szabadul fel, amelyek növelik a BBB permeabilitását, ezzel lehetővé téve az agyszövetre specifikus markerek vérkeringésbe való átjutását (Kadry és mtsai., 2020; Janigro és mtsai., 2021). A szisztémás keringésben megtalálható neurovaszkuláris egység károsodására utaló biomarkereket a klinikumban és a kutatásban is használják a neurológiai betegségek, sérülések és a károsodás súlyosságának jellemzésére, diagnosztizálására (Dadas és mtsai., 2016). A leggyakrabban alkalmazott biomarkerek a gliális-fibrilláris savas fehérje (GFAP), az S100 β kalcium-kötő fehérje (S100 β), a neuron-specifikus enoláz (NSE), a mielin bázikus fehérje, a neurofilamentum könnyű lánc, az ubiquitin karboxil-terminális hidroláz izoenzim és az egyes neurodegeneratív betegségekben megfigyelhető, akkumulálódó fehérjék, mint például a tau. (Mir és Chalak, 2014; Welch és mtsai., 2016; Dadas és mtsai., 2018; Janigro és mtsai., 2021). A klinikai diagnózis során a biomarkerekből nyert adatok értelmezését megnehezíti, hogy kimutatott fehérjék mennyisége a betegség és a sérülés állapotára és súlyosságára utal, de más változóktól is függ. Ilyen tényezők többek között az adott marker felezési ideje a vérben, molekuláris tömege, marker-specifikus biofizikai tulajdonságai és a vese általi kiválasztás mértéke (Dadas és mtsai., 2016). A 2. táblázatban foglaltuk össze, hogy az egyes kórfolyamatok során kimutatott markerek milyen neurológiai folyamatokra utalhatnak.

biomarker megnevezése	méret (kDa)	jelzett neurológiai folyamat	becsült felezési ideje vérben
GFAP	50	asztrociták sérülése/károsodása, asztrogliózis	48 óra
NFL	68	axon sérülés, idegsejtpusztulás	3 hét
NSE	47	idegsejtek károsodása	30 óra
S100 β	100	BBB károsodása, asztrociták sérülése, asztrogliózis	2-6 óra
UCH-L1	24	idegsejtek károsodása	7-9 óra

2. táblázat. A szisztémás keringésben jelenlevő biomarkerek és az általuk jelzett neurológiai folyamatok, színekkel a kísérleteinkben alkalmazottakat jelöltük (Janigro és mtsai., 2020 alapján, módosítva). GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje; NFL: neurofilamentum könnyű lánc; NSE: neuron specifikus enoláz; S100 β : kalcium-kötő fehérje S100 β , UCH-L1: ubiquitin karboxil-terminális hidroláz izoenzim L1.

Eredetileg az olyan molekulákról, mint az NSE és az S100 β azt gondolták, hogy közvetlenül az agy traumás sérülésével vannak összefüggésben. Csak évekkel később mutatták ki, hogy ezek az agyi eredetű perifériás biomarkerek a BBB integritásáról adhatnak információt agyi sérülés hiányában is (Dadas és mtsai., 2018). Az NSE neuronális eredetű faktor, vérérumban mérhető koncentrációja fiziológias körülmények között átlagosan 10-15 ng/ml nemtől és kortól függetlenül (Babkina és mtsai., 2024). Az NSE szintjének növekedését tapasztalták számos olyan patológias állapotban, amelyek a BBB károsodásával járnak. Ilyenek többek között traumás agysérülések, enkefalopátiák, agyvérzés, különböző neurodegeneratív betegségek, idegrendszeri és neuroendokrin tumorok és az epilepszia. (Dadas és mtsai., 2018; Polyakova és mtsai., 2022; Yun és mtsai., 2022). Az S100 β fehérjét asztrocita és oligodendrocita sejtek termelik. Különösen ígéretes markerfehérjének tekintik, ugyanis kimutatták, hogy a BBB károsodás hatására a vérérumban is gyorsan megemelkedik a szintje és mérhető koncentrációja jobban korrelál a BBB integritásával, mint az idegszöveti sérüléssel (Janigro és mtsai., 2021). Az S100 β fehérje megemelkedett koncentrációja a perifériás vérben számos központi idegrendszeri rendellenességgel hozható összefüggésbe. Ide soroljuk többek között a traumás fej- és agy sérüléseket, a neurodegeneratív betegségeket, az enkefalopátiákat, a sztrókot, az epilepsziát és a pszichiátriai rendellenességeket (Yun és mtsai., 2022; Polyakova és mtsai., 2022). Kísérleteinkhez a szakirodalomban elérhető adatok alapján a két leginkább tanulmányozott fehérjét, az NSE és az S100 β biomarkereket választottuk a humán vérérumokból történő BBB károsodás jellemzésére.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az AP hirtelen fellépő, súlyos gyulladásos emésztőrendszeri megbetegedés, amely a különböző szisztémás hatások mellett enkefalopátia kialakulásában is szerepet játszhat. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a BBB sérül és átteresztőképessége megnövekszik az AP patkány modelljében (Walter és mtsai., 2022). Hipotézisünk szerint az AP-ben szenvedő páciensek esetén megfigyelhető tudatzavar, és a súlyos esetekben megjelenő enkefalopátia a BBB károsodására utalhat hasonlóan más szisztémás és idegrendszeri betegségekhez. Jelenlegi kutatásunk célja a BBB-on történő változások kimutatása enyhe, középsúlyos és súlyos AP-ben szenvedő betegek vérérszrum mintáinak elemzésével.

Ehhez munkánk során a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. Megtalálhatók-e a vér-agy gát sérülésére utaló markerek (NSE, S100 β) akut hasnyálmirigy gyulladásban szenvedő páciensek vérérszrum mintáiban?
2. Milyen közvetlen hatást fejt ki az enyhe, középsúlyos és súlyos AP-es betegekből származó szérumokkal történő kezelés tenyésztett humán agyi endotélsejteken? Milyen változásokat figyelhetünk meg a gát funkciókban, morfológiában, reaktív oxigén gyök és nitrogén-monoxid termelésben?

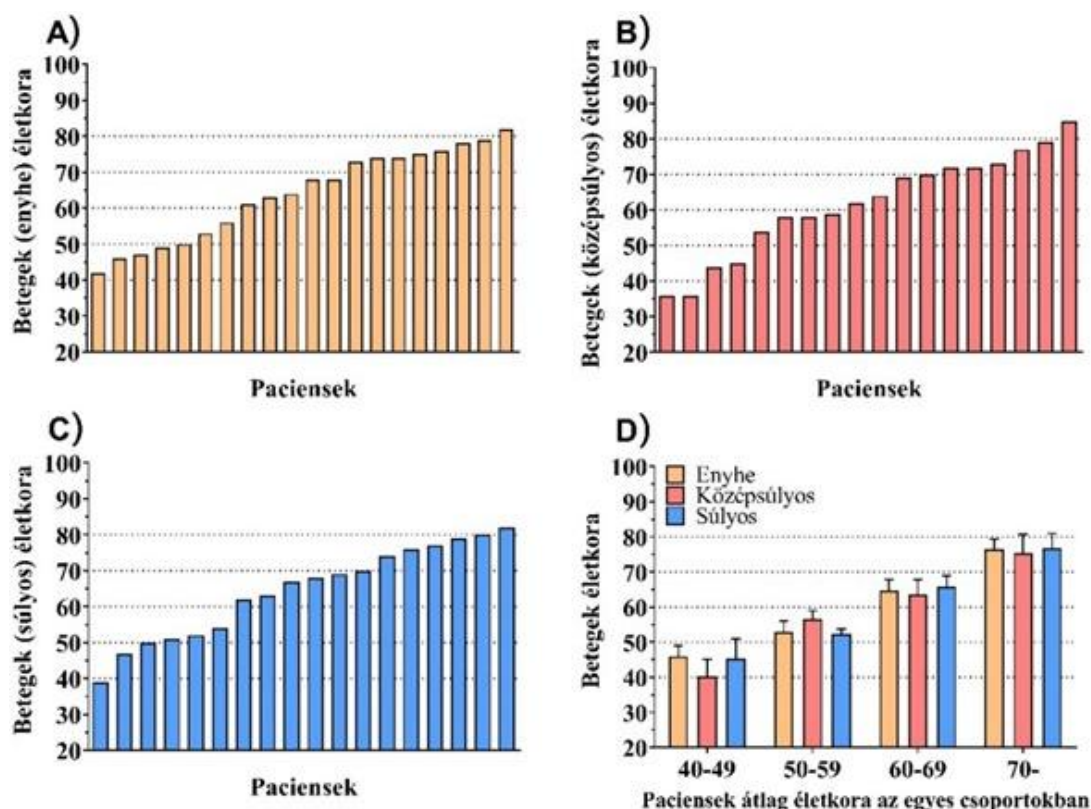
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Reagensok, vegyszerek

Minden vegyszer beszerzése a Sigma-Aldrich Kft.-től (Merck Life Sciences) történt, hacsak másképpen nem jelöltük.

4.2. Akut pankreatitiszben szenvedő betegekből származó vészérum minták

Munkánk során a Szegedi Tudományegyetem Kórélettani Intézetével és az MTA-SZTE Lendület Gasztroenterológiai Multidiszciplináris Kutatócsoportjával együttműködésben humán beteganyagból származó vészérumokat teszteltünk. Együttműködő partnereink etikai engedély birtokában és minden kapcsolódó szabályt betartva vért gyűjtöttek különböző súlyosságú AP-ben szenvedő betegekből (enyhe, közép súlyos és súlyos). A vészvétel a bekerülést követő 1-3. és/vagy 4-7. napokon történt, a vérmintákból vészérumot izoláltak. A szérumokat -80 °C-on tároltuk felhasználásig. Minden szérum mintát csak egyszer lehetséges kiolvasztani és felhasználni, ezért a kísérleteket mindig egymással összefüggésben, komoly tervezés után tudtuk elvégezni. Felhasználás előtt a mintákat osztályoztuk és a kísérleteknek megfelelően szortíroztuk a következő szempontok alapján: életkor és a betegség súlyossági foka.



4. ábra. Az akut pankreatitiszben szenvedő betegek kora a betegség súlyossága szerinti csoportokban és összesítve. **A:** enyhe lefolyású AP páciensek életkora; **B:** közép súlyos lefolyású AP páciensek életkora; **C:** súlyos lefolyású AP páciensek életkora; **D:** a különböző súlyosságú AP páciensek szérumainak korcsoportokra való bontása és összevonása a sejtenyészetes kísérletekhez: n = 3-8. Az *in vitro* vizsgálatokhoz csak az első vészvételből származó mintákat használtuk.

A kísérletekhez használt minták között minden súlyossági- és korcsoport képviselve volt: összesen 20 enyhe, 18 középsúlyos és 18 súlyos AP-ben szenvedő beteg mintáit vizsgáltuk (4. ábra, A-C). A sejtenyészeten történő kísérleteink során a páciensek vérésejűmait korcsoport és súlyosság szerint összevontuk (4.D ábra). Az *in vitro* vizsgálatokban csak az első vérvételekből származó minták szerepelnek, mivel a középsúlyos AP betegek esetében nem történt második vérvétel.

4.3. A vér-agy gát sérülés jelzőanyagainak kimutatása enzimhez kötött immunszorbens (ELISA) vizsgálatokkal

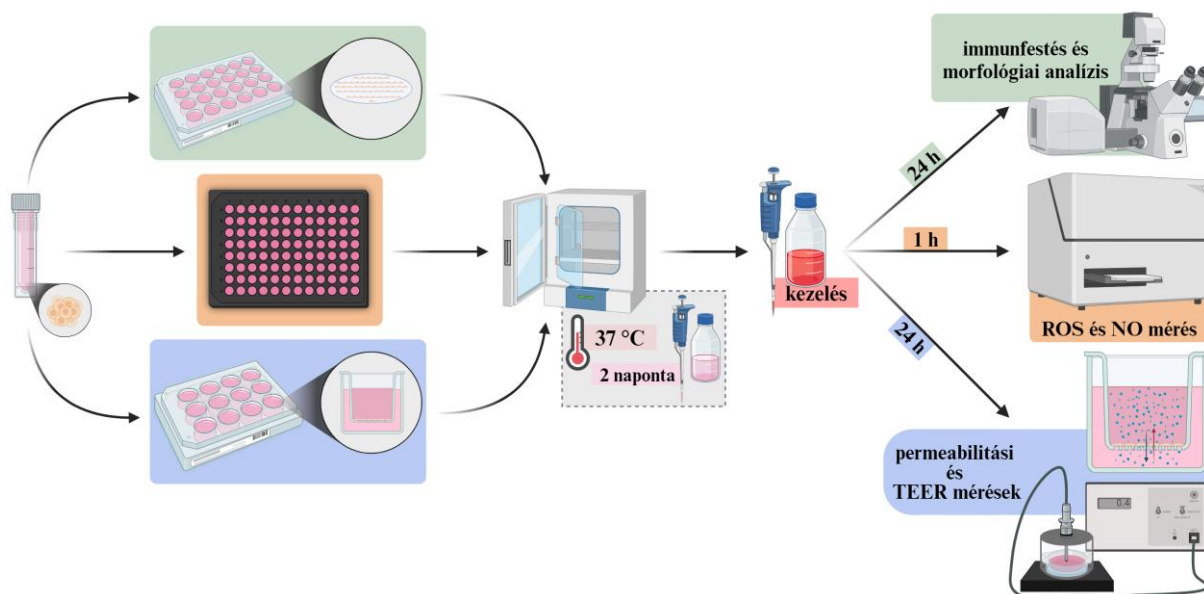
A tartalmi bevezetőben leírtak alapján az AP során az agyi endotélsejtek gát tulajdonságainak csökkenését és az agyi markerek a szisztémás keringésbe történő kerülését a vérésejűm mintákban NSE és S100 β fehérjék kimutatásával szeretttük volna feltárni. Ehhez enzimhez kötött immunszorbens vizsgálatot hajtottunk végre (sandwich ELISA kitek, Elabscience, USA). Ehhez először megterveztük a kitekhez tartozó 96-lyukú lemezek beosztását a gyártó leírásának megfelelően. A lemezekre a standard oldatok mellett a vérésejűm minták kerültek az összes súlyossági csoportból. A mintákat nem kellett kihígítani, azok fehérjetartalmának megfelelő detekciós határral rendelkező kitekét vásároltunk. A méréseket a gyártó protokollja alapján végeztük el, 2. szintű biológiai biztonsági körülmények között.

4.4. A hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonal tenyésztése és kezelése

A BBB sejtenyészetes kísérletekhez a humán immortalizált agyi kapilláris endotél sejtvonalat választottuk (hCMEC/D3; Weksler és mtsai., 2013). A sejteket 35. passzálsig használtuk, mivel efelett elveszítik az agyi endotélsejtekre jellemző tulajdonságaikat.

Az agyi endotélsejteket patkányfarok kollagénnel (100 μ g/ml) bevont sejtenyészttő betétekbe (Corning Costar, 24-well PET, 0,4 μ m pórusméretű membrán, Corning, USA) szélesztettük 4 $\times$ 10⁴ sejt/cm² sűrűségben a transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) és permeabilitás mérésekhez, valamint a morfológiai vizsgálatokhoz. A reaktív oxigéngyökök (ROS) és nitrogén-monoxid (NO) szint méréshez pedig 5 $\times$ 10³ sejt/cm² sűrűségben fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezbe (Corning Costar) kerültek a sejtek. Emellett hasonlóan bevont, 24-lyukú lemezekbe helyezett kerek, üveg fedőlemezekre is szélesztettünk sejteket 1,5 $\times$ 10⁴ sejt/cm² sűrűségben a morfológiai vizsgálatokhoz. Az agyi endotélsejteket 37 °C-on inkubáltuk és kétnaponta cseréltünk médiumot a konfluencia eléréséig. A tápfolyadék összetétele a következő volt: MDCB131 bazális médium (Pan Biotech, Németország), 50 μ g/ml gentamicin, 5% magzati szarvasmarha sérum (FBS), 10 mM GlutaMAX (100x, Life

Technologies, USA), 10 mM lipid kiegészítő (Life Technologies, USA), 1,4 μ M hidrokortizon (HC), 100 μ g/ml heparin, 5 μ g/ml aszkorbinsav, 1 ng/ml fibroblaszt növekedési faktor (bFGF, Roche, USA), 5 μ g/ml inzulin-transzferrin-szelenit kiegészítő (ITS, 100x, Pan Biotech) és 10 mM Hepes (Life Technologies, USA). 24 órával a kísérletek megkezdése előtt 10 mM koncentrációjú lítium-kloridot (LiCl) adtunk a sejtekhez, amely az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok megerősítéséhez járul hozzá (Weksler és mtsai, 2013).



5. ábra. A sejtenyésztési kísérletek folyamatábrája. A munka elején a hCMEC/D3 humán agyi endotélsejt vonalat különböző tenyésztő felszínekre szélesztettük, majd konfluenciáig növesztettük őket. A 20%-os szérumban tartalmazó kezelést követően a reaktív oxigéngyök (ROS) és nitrogén-monoxid (NO) felszabadulást mértük, valamint transzendentális elektromos ellenállás (TEER) és permeabilitási vizsgálatokat végeztünk, morfológiai jellemzés mellett. h: óra.

Az *in vitro* kísérletek során a kezelő médiumban 20% volt a szérumban koncentrációja. A kontroll csoportok tápfolyadékába FBS-t raktunk, a kezelt csoportok fölé pedig a 20%-os humán vörösvérsejt tartalmazó médium került (5. ábra). A vizsgálatok során az alapvető összetevők közül a sejtek nem kaptak lipidet, bFGF-et és HC-t, mivel ezek a potenciális, a humán szérumban gyulladáshoz vezetnek. A ROS és NO méréshez a sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on a kezelő médiumban. Majd a kezelőoldatot leszívtuk a sejtekről és hozzáadtuk a szükséges reagenseket, majd azonos hőmérsékleten történő inkubáció közben mértük a keletkező ROS és NO szintjét spektrofotométerrel. A többi esetben a kezelő médium 24 órán keresztül volt a sejteken 37 °C-on inkubátorban és a méréseket ezután hajtottuk végre (5. ábra).

4.5. Transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése

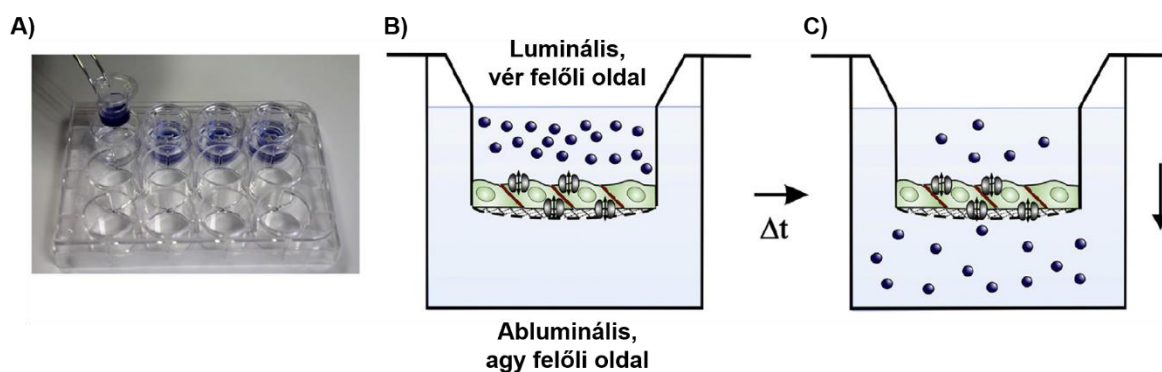
Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok gátolják a paracelluláris, sejtek közötti anyagátjutást. Kísérletes körülmények között a szoros kapcsolatok erősségének számszerűsítésére TEER mérés használható. A rezisztencia értéke az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak nátrium-ionnal szembeni áteresztőképességét jelenti. Mind fiziológias körülmények közt, mind a sejtenyészítő puffer- és tápoldatokban a kationok közül a nátrium-ion van jelen a legnagyobb koncentrációban az extracelluláris térben (150 mM). Annál erősebbek a sejtközi kapcsolatok, minél magasabb a mért TEER érték (Vigh és mtsai., 2021). A hCMEC/D3 egysejtrétegen történő méréseinkhez kamraelektrodát használtunk EVOM-2 készülékhez kötve (WPI, USA). A kísérleteink során az endotélsejt réteg szorosságát folyamatosan követtük. A mérések alatt a sejtenyészítő lemezeket fűtőpadra helyeztük, hogy a hőmérséklet ingadozása ne befolyásolja a mért eredményt. Az enyhe, közép súlyos és súlyos AP-ben szenvedő betegekből származó szérumokkal 24 órán át kezeltük a sejteket, majd regisztráltuk a rezisztenciát. Kiértékeléskor a kapott ellenállás értékekből (mértékegysége: Ohm, Ω) kivontuk az üres, sejteket nem tartalmazó tenyésztőbetéteken mért eredmények átlagát. A kapott Ohm értéket a tenyésztőbetétek felszínére normalizáltuk ($\Omega \times \text{cm}^2$) (Vigh és mtsai., 2021; Santa-Maria és mtsai., 2022).

4.6. Permeabilitási vizsgálat

Az agyi endotélsejtek barrier integritásának vizsgálatára a rezisztencia mérések mellett permeabilitási vizsgálatok is alkalmasak. Munkánk során 10 kDa méretű fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextránt (FITC-dextrán 10 kDa, FD10, 100 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich, USA) és szérum albuminhoz (1% BSA) kötött Evans-kék festéket (EBA, 170 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich, USA) használtunk Ringer-Hepes permeabilitási pufferben hígítva (Ringer-Hepes összetétele: 118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgSO_4 , 5,5 mM D-glükóz, 10 mM Hepes, 1% ITS, pH 7,4). Az FD10 semleges töltésű, a paracelluláris transzport változásainak mérésére alkalmas. Az EBA egy 67 kDa nagyságú, erősen negatív töltésű molekula, amely a transzcelluláris, vezikuláris transzport vizsgálatára használható. Fontos megjegyezni, hogy mindkét marker agyi endotélsejteken keresztüli átjutása fiziológias körülmények között alacsony (Deli és mtsai., 2005; Hülpér és mtsai., 2013).

Az enyhe, közép súlyos és súlyos AP-ben szenvedő betegekből származó szérumokkal 24 órán át kezeltük a sejteket, majd a rezisztencia mérést követően elvégeztük az FD10 és EBA permeabilitási vizsgálatokat az agyi endotélsejtek paracelluláris és transzcelluláris gát funkcióinak jellemzésére. Ehhez a TEER mérést követően a tenyésztő betéteket áthelyeztük új

lemezekbe, amelyek lyukanként 900 μl jelzőanyag nélküli permeabilitási puffert tartalmaztak (alsó-, abluminális folyadéktér). A tenyésztőbetétekben a kezelőoldatot lecseréltük 200 μl , jelzőanyagot tartalmazó permeabilitási pufferre (felső-, luminális folyadéktér). A kísérlet egésze alatt a lemezeket CO_2 inkubátorban, 37°C -on tartottuk síkrázó készüléken (150 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország). A 60 percen keresztül tartó vizsgálat során a tenyésztőbetéteket 20 percenként (20., 40. és 60. perces minták) áthelyeztük új, jelzőanyag nélküli permeabilitási puffert tartalmazó lyukakba. A kísérlet végén mintát vettünk az abluminális folyadékterekből, amelyekből megmértük a jelzőmolekulák átjutását az agyi endotélsejt rétegen keresztül. Az átjutott festékanyag mennyiségének meghatározásához spektrofotométert használtunk (Horiba Fluorolog 3, Japán) az FD10 FITC-dextrán esetében 490 nm gerjesztési és 516 nm emissziós hullámhosszokon, az EBA esetében pedig 582 nm gerjesztési és 662 nm emissziós hullámhosszokon. (Veszélka és mtsai., 2007; Barna és mtsai., 2020). A sejteket nem tartalmazó sejttenyésztő betéteken is elvégeztük a mérést.



6. ábra. Agyi endotélsejteken keresztüli permeabilitási vizsgálatok. **A)** A festékanyagot a luminális, vér felőli oldalra helyezve megmérhetjük az agyi endotélsejt réteg barrier tulajdonságait. A tenyésztőbetétek áthelyezhetők csipesz segítségével. **B)** Kísérlet kezdete: a fluoreszcens festékoldatot a luminális oldalra helyeztük (kék pöttyök), az agyi endotélsejt fölé (zöld sejtek). **C)** A kísérlet vége: a jelzőanyagaink átjutottak az abluminális, agy felőli oldalra. Innen mintát gyűjtve meghatározhatjuk a réteg integritását. (Campos-Bedolla és mtsai., 2014, módosítva)

A jelzőanyagok endotélsejt rétegen keresztüli átjutásának jellemzésére az endoteliális permeabilitási együtthatót (P_e) használjuk (3. táblázat). Az agyi endotélsejt réteg gát funkciói annál jobbak, minél alacsonyabb ez az érték (Deli és mtsai., 2005; Hülper és mtsai., 2013). Meghatározásához elsőként a clearance értéket számítjuk ki. A clearance az a luminális folyadék térfogat μl -ben, amelyből a jelzőanyag egységnyi idő alatt teljesen átjut az abluminális folyadéktérbe. Ezt követően az összesített clearance értékeket ábrázoljuk az idő függvényében, amiből kiszámítjuk az egyenes meredekségét. Ez a permeability surface product (PS), amely egyenlő az adott felszínre vonatkoztatott clearance sebességével (mértékegysége $\mu\text{l}/\text{min}$).

Ezután a teljes PS értékből az üres filterre vonatkozó PS értéket kivonva megkapjuk az endoteliális permeabilitási együtthatót. A végső értéket a sejtenyészőbetét membránjának felszínére is normalizáljuk (végső mértékegység: cm/s) (Deli és mtsai., 2005; Hülper és mtsai., 2013).

$Clearance(\mu l) = \frac{c_A \times V_A}{c_L}$	c_A : az abluminális folyadéktérbe jutott jelzőmolekula koncentrációja; V_A : az abluminális folyadéktér térfogata c_L : a luminális folyadéktérbe adott jelzőmolekula koncentrációja
$\frac{1}{PS_e} = \frac{1}{PS_t} - \frac{1}{PS_i}$	PS: az adott felszínre vonatkozó clearance sebessége PS_e : az endotél sejtréteg PS-e ~ az endotél sejtréteg permeabilitása PS_t : összes PS (tenyészőbetét + sejtréteg) PS_i : sejtnélküli tenyészőbetétek PS-e
$P_e = \frac{PS_e}{A}$	P_e : endoteliális permeabilitási együttható PS_e : az endotél sejtréteg permeabilitása A: a sejtenyészőbetét membránjának felszíne

3. táblázat. Az endoteliális permeabilitási együttható kiszámításához szükséges egyenletek és jelmagyarázatuk (Deli és mtsai., 2005 alapján)

4.7. Oxidatív stressz vizsgálata

A szérum kezelést követően kimértük agyi endotélsejtekben az összes ROS felszabadulását és a képződött NO mértékét is. A használt indikátorok az agyi endotél sejtekbe diffúzióval jutnak be, ahol a citoplazmában megtalálható észterázok által aktiválódnak. Az észterázok a ROS kimutatására használt indikátorokon megtalálható acetyl csoportokat hasítják le. Az immáron töltéssel rendelkező molekulák a sejtből nehezebben tudnak kijutni, felhalmozódnak és reakcióba lépnek a kimutatni kívánt oxigén gyökökkel. A reagensek önmagukban nem fluoreszcensek, de a kívánt célmolekulákkal kölcsönhatva elnyerik fluoreszcens formájukat, amelynek intenzitása a mennyiséggel arányos (Lénárt és mtsai., 2015). Az egyes próbákat Ringer-Hepes oldatban hígítva használtuk. A sejtekre helyezett puffer 16 μ M pluronsavat is tartalmazott, amely elősegítette a ROS kimutatására alkalmas reagensek sejtekbe való bejutását.

4.7.1. Reaktív oxigéngyök (ROS) képződés mérése

A ROS felszabadulásának méréshez 2'-7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetátot használtunk (H₂DCF-DA, Molecular Probes, Life Technologies). Ez a molekula a sejten belül kölcsönhatásba lép reaktív oxigéngyökökkel és diklorofluoreszceinné (DCF) alakul, amely fluoreszcenciát bocsát ki megfelelő hullámhosszú gerjesztés hatására (Barna és mtsai., 2020). Az előzetesen 1 órán át, 37 °C-on 20% humán szérummal kezelt hCMEC/D3 sejteket azonos hőmérsékleten 2 μ M H₂DCF-DA-t tartalmazó Ringer-Hepes oldatban inkubáltuk 1 órán

keresztül. Az inkubáció közben fluoreszcens spektrofotométer (BMG Fluostar Optima Multiwell Plate Reader, Németország) segítségével mértük a keletkező reaktív oxigéngyökök mennyiségét 485 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhosszokon 3 percenként. Pozitív kontrollként 250 μ M terc-butil-hidroperoxid (tBHP) kezelést használtunk, a háttér pedig sejtmentes lyukba pipettázott festékpóráát tartalmazó Ringer-Hepes oldat volt.

4.7.2. Nitrogén-monoxid (NO) felszabadulás mérése

Az intracelluláris NO szint agyi endotélsejtekben való meghatározásához 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátot (DAF-FM diacetát) használtunk. A molekula észterázok által aktivált formája képes kölcsönhatni az NO-dal, valamint a termelődése során jelenlevő nitrozóniumionnal, ami hozzájárul a fluoreszcens forma létrejöttéhez (Lénárt és mtsai., 2015).

Az előzetesen 1 órán át, 37 °C-on 20% humán szérummal kezelt hCMEC/D3 sejteket azonos hőmérsékleten 2 μ M DAF-FM diacetátot tartalmazó Ringer-Hepes oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül. Az inkubáció közben fluoreszcens spektrofotométer (BMG Fluostar Optima Multiwell Plate Reader) segítségével mértük a keletkező NO mennyiségét 485 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhosszokon 3 percenként. Pozitív kontrollként 100 μ M nátrium-nitroprusszid (SNP) kezelést használtunk, a háttér pedig sejtmentes lyukba pipettázott festékpóráát tartalmazó Ringer-Hepes oldat volt (Lénárt és mtsai., 2015; Barna és mtsai., 2020).

4.8. Immunhisztokémia és képanalízis

Az enyhe, közép súlyos és súlyos lefolyású AP-ben szenvedő paciensek vérszérumával kezelt agyi endotélsejtek sejközötti kapcsolatainak morfológiáját immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk. Ehhez az intercelluláris kapcsolatokban szerepet játszó alkotóelemek közül a PECAM-1 adherens kapcsolatokat alkotó transzmembrán fehérjét jelöltük fluoreszcensen. Valamint Hoechst 33342 magfestéssel a sejtmagokat. A kerek üveg fedőlemezekre tenyésztett hCMEC/D3 agyi endotél sejtvonalat a kezeléseket követően, a kísérletek végén 2 percig - 20 °C-os acetón-metanol 1:1 arányú elegyével fixáltuk. A sejteket ezt követően az immunhisztokémiai festésig 1% FBS-foszfat puffer oldatban (PBS) tároltuk. A jelölés elején a nonspecifikus kötőhelyeket 1% BSA-PBS oldattal blokkoltuk szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. A poliklonális nyúl anti-PECAM-1 antitestet (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1:200 arányban hígítottuk ki a blokkoló pufferben, majd ezekkel 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk a sejtrégeket. Másnap PBS mosást követően PBS-ben hígított Cy3-jelölt anti-nyúl másodlagos antitesttel (1:400) és Hoechst 33342 magfestéssel (1:1000) 1 órán keresztül

szobahőmérsékleten inkubáltunk. Végül PBS és desztillált vizes mosást követően a sejtréteget lefedtük (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA). Az sejtközzti kapcsolatok morfológiai analízisét konfokális mikroszkóppal végeztük (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH, Németország).

4.9. Statisztikai kiértékelés

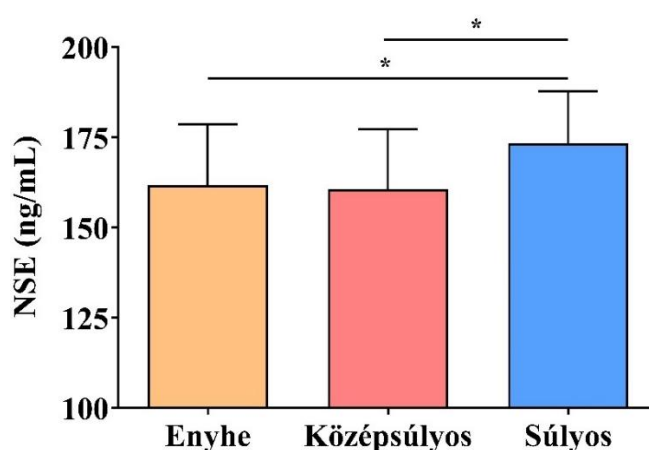
A statisztikai kiértékelésekhez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk. A kísérleti eredményeket átlag $\pm$ S.D. formában adtuk meg. Az ELISA mérések kiértékelésénél az összevont adatok esetében egyutas ANOVA-t és Dunnett poszt-tesztet, a korcsoportok közötti összehasonlítás kiértékelésénél pedig kétutas ANOVA-t és Bonferroni poszt-tesztet alkalmaztunk. A rezisztencia, a ROS termelés és a NO termelés mérések, valamint a permeabilitási vizsgálatok esetén egyutas ANOVA-t és Bonferroni poszt-tesztet használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értékeket tekintettük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az ELISA vizsgálatok eredményei a vér-agy gát sérülését jelző molekulák kimutatására

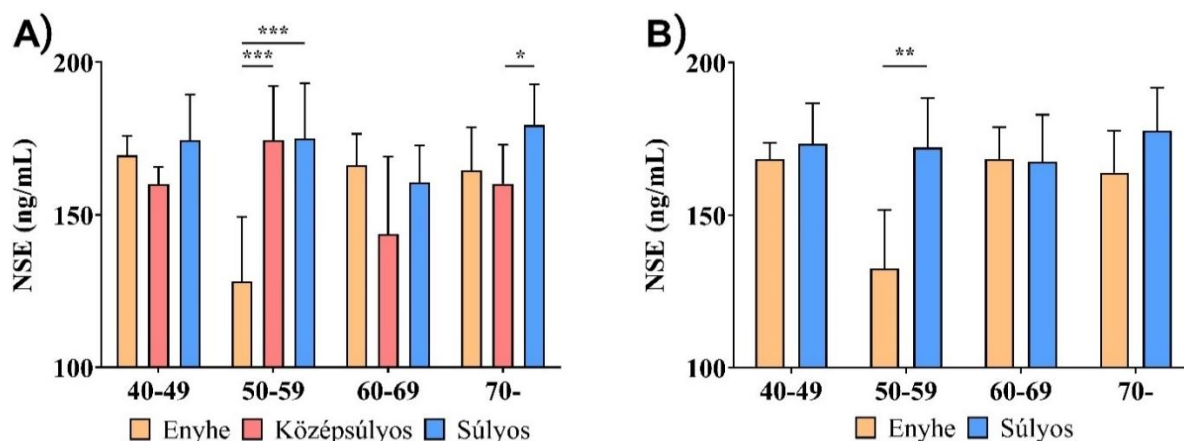
5.1.1. NSE mennyiségének vizsgálata a humán vészérumokban

Az együttműködő partnereink által gyűjtött AP-ben szenvedő páciensek vészérumaiban minden súlyossági csoportban kimutattuk az NSE jelenlétét (7. ábra, alsó detekciós limit 2,3 ng/ml). Szignifikánsan több NSE-t tartalmazott a súlyos AP-ben szenvedő páciensek vészéruma a közép súlyos -és enyhe lefolyású betegségben szenvedőkhöz képest (7. ábra).



7. ábra. A neuron specifikus enoláz (NSE) mennyiségének kimutatása a páciensek vészérumában ELISA kittel, súlyosság szerinti összehasonlításban; $n = 20-30$; átlag $\pm$ SD; egyutas ANOVA, Dunnett poszt-tesztel; * $p < 0.05$. Ezen az ábrán az összes korcsoport/súlyossági fok és az első és második vérvétel is közösen van ábrázolva.

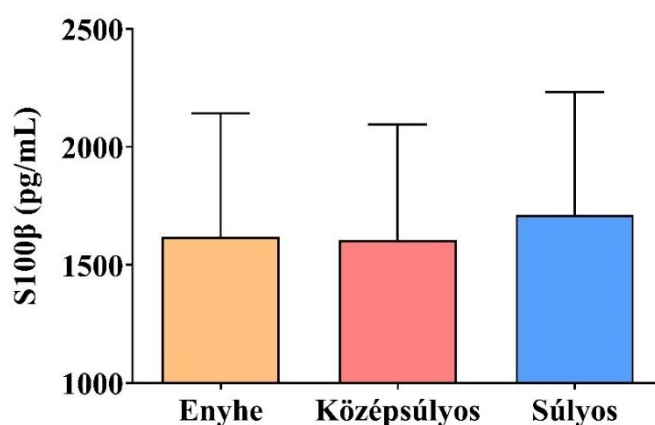
Ezeket az adatokat tovább elemeztük korcsoportokra lebontva, és külön vizsgálva csak az első (8.A ábra) vagy az első és a második (8.B ábra) vérvételt egyben. Erre azért volt szükség, mert a közép súlyos csoportban második vérvételre nem került sor. Csak az első vérvétel eredményeit vizsgálva az 50-es korcsoportban az enyhe pankreatitiszben szenvedő betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt az NSE szint a közép súlyos és a súlyos AP-es betegekhez képest. A 70 évnél idősebb pácienseknél a betegség súlyos formájában szignifikánsan magasabb NSE szinteket detektáltunk. A 8.B ábra az első és második vérvételekből származó mintákat együtt ábrázolja, ezért csak az enyhe és a súlyos AP csoportokat hasonlítottuk össze. Az első vérmintákat külön vizsgálva az NSE ugyanazt a trendet mutatta: az 50-es korosztályban magasabb szinteket mértünk a súlyos csoportban (8.B ábra).



8. ábra. A neuron specifikus enoláz (NSE) jelenléte enyhe, közép súlyos és súlyos akut pankreatitiszben szenvedő betegek vérében. Az eredményeket korcsoportok szerint hasonlítottuk össze. **A)** Az elemzés csak az 1. vérvétel mintáit tartalmazza, $n = 4-12$; átlag $\pm$ SD; kétutas ANOVA, Bonferroni poszt-tesztel; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **B)** Az elemzés az 1. és 2. vérvétel mintáit is tartalmazza, $n = 3-10$; átlag $\pm$ SD; kétutas ANOVA Bonferroni poszt-tesztel; ** $p < 0.01$.

5.1.2. S100 β mennyiségének vizsgálata a humán vérszérumokban

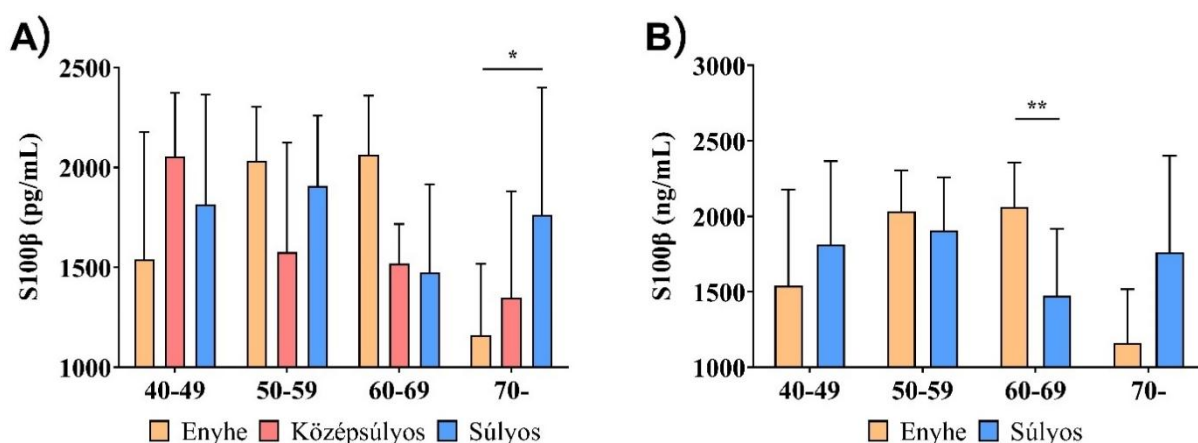
Az NSE marker fehérjéhez hasonlóan az S100 β jelenlétét is kimutattuk az együttműködő partnereink által gyűjtött AP-ben szenvedő páciensek vérszérumaiban minden súlyossági csoportban (9. ábra, detekciós limit: 31.3 pg/ml). Meglepő módon az S100 β szintje a betegség enyhe, közép súlyos és súlyos formájában mindenhol jelen van a szisztémás keringésben, nincs szignifikáns különbség a csoportok között (9. ábra).



9. ábra. Az S100 β kalcium-kötő fehérje mennyiségének kimutatása a páciensek vérszérumában ELISA kittel, súlyosság szerinti összehasonlításban; $n = 20-30$; átlag $\pm$ SD; egyutas ANOVA, Dunnett poszt-tesztel. Ezen az ábrán az összes korcsoport/súlyossági fok és az első és második vérvétel is közösen van ábrázolva.

Az S100 β szintje a különböző korosztályokban és súlyossági csoportokban változatos volt, mind csak az első (10.A ábra), mind az első és második (10.B ábra) vérmintákat elemezve. Az

első vérvételből származó vérszérumok eredményeit kiértékelve szignifikáns eltérés csak a legidősebb korosztály esetén volt a fehérje szintjében a szisztémás keringésben. A 70 év feletti korosztályban a súlyos AP-ben szenvedő betegek szérumaiban szignifikánsan több S100 β volt jelen, mint a betegség enyhe formájában. Az első és második vérvétel mintáit elemezve a 60-69 éves korosztályban a betegség enyhe formájában szignifikánsan több S100 β volt detektálható a vérszérumokban, mint a súlyos lefolyás esetén. Ez ellenkező trendet mutat a 70 éves és ennél idősebb korosztályhoz képest.

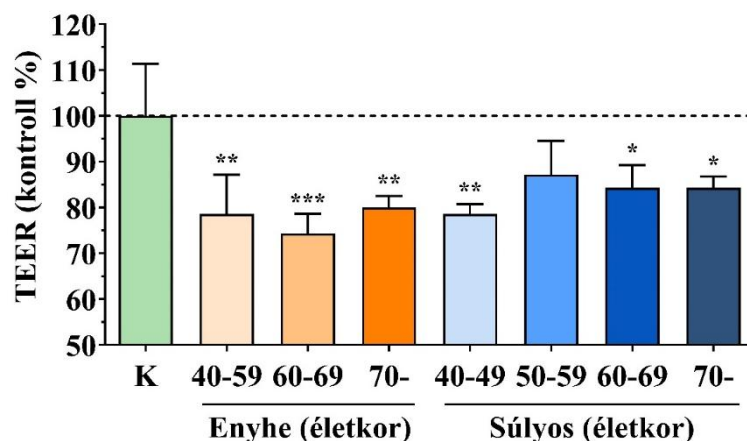


10. ábra. Az S100 β kalcium-kötő fehérje jelenléte enyhe, középsúlyos és súlyos akut pankreatitiszben szenvedő betegek vérében. Az eredményeket korcsoportok szerint hasonlítottuk össze. **A)** Az elemzés csak az 1. vérvétel mintáit tartalmazza, $n = 4-12$; átlag $\pm$ SD; kétutas ANOVA, Bonferroni poszt-tesztel; * $p < 0.05$; **B)** Az elemzés az 1. és 2. vérvétel mintáit is tartalmazza, $n = 3-10$; átlag $\pm$ SD; kétutas ANOVA Bonferroni poszt-tesztel; ** $p < 0.01$.

5.2. A vérszérumokkal történő kezelés hatása tenyésztett agyi endotélsejtekre

5.2.1. Barrier tulajdonságok: rezisztencia

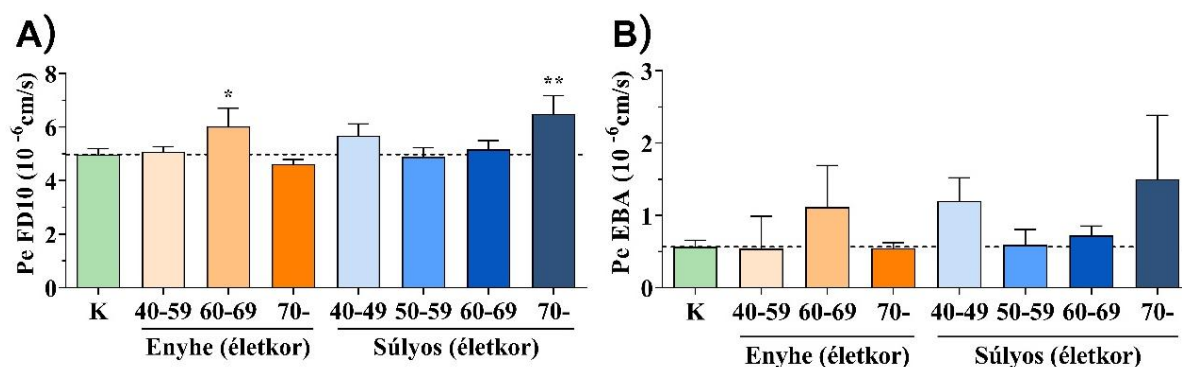
A konfluens hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtréteg rezisztenciája átlagosan $24.6 \pm 1.4 \Omega \times \text{cm}^2$ (átlag $\pm$ SD, $n = 24$) volt a kísérletek előtt. A 20%-os vérszérummal történő, 24 órás kezelést követően majdnem minden kor -és súlyossági csoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a mért és kiértékelt TEER értékekben a kontrollhoz képest (11. ábra).



11. ábra. Transzendoteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérés 20%-os kontroll és enyhe vagy súlyos AP-es betegekből származó vrszrummal történő kezelést követően hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteken; n(szrum) = 3-8; n(sejttenyésztő betét) = 3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, a kontrollhoz képest, átlag $\pm$ SD; egyutas ANOVA, Bonfferroni poszt-tesztel. (K: kontroll csoport)

5.2.2. Barrier tulajdonságok: permeabilitási vizsgálatok

A transzendoteliális ellenállás mérések után FD10 és EBA fluoreszcens markerekkel vizsgáltuk a hCMEC/D3 humán agyi endotél sejttenyészetben a sejtek közötti és a sejteken keresztüli permeabilitás változásait 20%-os enyhe és súlyos AP-es betegekből származó vrszrumokkal történő kezelést követően. A 12.A ábrán a FD10 P_e értékében megfigyelt változások szerepelnek. A paracelluláris permeabilitás szignifikáns növekedését a kontrollhoz képest csak két esetben figyeltünk meg. Az enyhe lefolyású AP páciensek közül a 60-as éveikben járó korosztály, valamint a súlyos AP-ben szenvedő betegek közül a 70 éves és ennél idősebb korosztály mintáival kezelt egysejtrétegnél. Eredményeink nem mutattak szignifikáns változást az EBA agyi endotél sejttrétegen való átjutásában a kontrollhoz képest (12.B ábra).

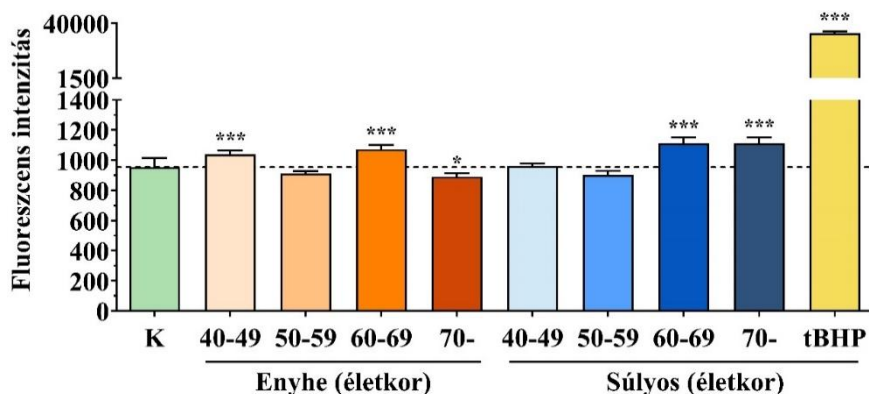


12. ábra. Permeabilitás mérés 20%-os kontroll és enyhe vagy súlyos AP-es betegekből származó vrszrummal történő kezelést követően hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteken; n(szrum) = 3-8; n(sejttenyésztő betét) = 3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; átlag $\pm$ SD; egyutas ANOVA, Bonfferroni poszt-tesztel; (P_e : endoteliális permeabilitási együttható, FD10: 10 kDa-os FITC-dextrán, EBA: Evans-kék jelölt albumin, K: kontroll csoport)

5.3. Az oxidatív stressz jellemzése a vérérummal való kezelés hatására

5.3.1. A ROS mérés eredményei

Az agyi endotélsejtekben a ROS felszabadulást H₂DCFDA reagenssel vizsgáltuk 20%-os humán vérérummal történő, 1 órán át tartó kezelést követően (13. ábra). A reagens fluoreszcens intenzitását spektrofotométerrel mértük. A termelt szabad oxigéngyökök szintjében az enyhe AP-ben szenvedő páciensek mintáival kezelt sejtrétegek közül a 40-es és a 60-as korosztályokból származó szérumokkal történő inkubációt követően szignifikáns növekedés volt tapasztalható a kontrollhoz képest (13. ábra). Ugyanezen súlyossági csoportban a 70 éves és annál idősebb korú enyhe AP-ben szenvedő betegek mintáival kezelt sejtrétegek ROS termelésében kismértékű csökkenés volt megfigyelhető (13. ábra).



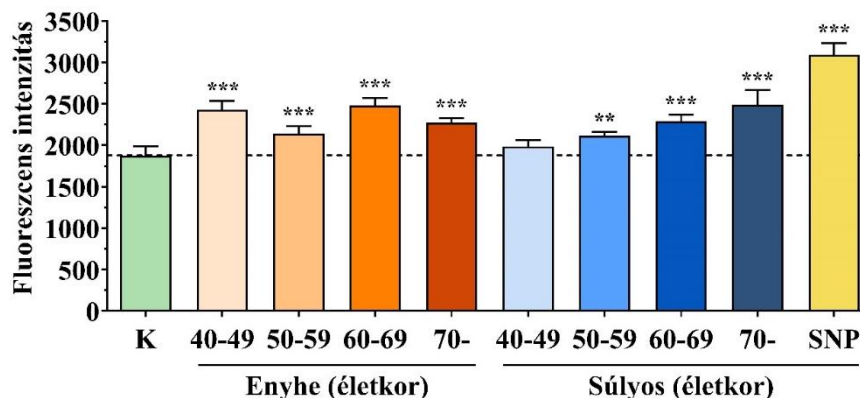
13. ábra. Reaktív oxigén gyök felszabadulás mérés 20%-os kontroll és enyhe vagy súlyos AP-es betegekből származó vérérummal történő kezelést követően hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteken; n(szérum) = 3-8; n(soklyukú lemez lyuk) = 5-8; * p < 0.05, *** p < 0.001; átlag ± SD; egyutas ANOVA Bonfferroni poszt-tesztel; (K: kontroll csoport, tBHP: tert-butil-hidroperoxid).

A betegség súlyos formájából származó vérérumokkal kezelt sejtrétegek közül a 60-as és a 70-es vagy annál idősebb korosztályok mintáival történt inkubáció esetén figyeltünk meg szignifikáns emelkedést a ROS termelésben a kontrollhoz képest. A referencia vegyületként használt tBHP kezelés hatására a ROS szintje kiugróan megemelkedett, ami bizonyítja a reagens hatékonyságát (13. ábra).

5.3.2. A NO mérés eredményei és kiértékelésük

Az agyi endotélsejtekben a NO felszabadulást DAF-FM reagenssel vizsgáltuk 20%-os humán vérérummal történő, 1 órán át tartó kezelést követően. A reagens fluoreszcens intenzitását spektrofotométerrel mértük. A NO termelésében szignifikáns növekedést tapasztaltunk a 2 súlyossági csoport majdnem minden korosztályának mintáival kezelt

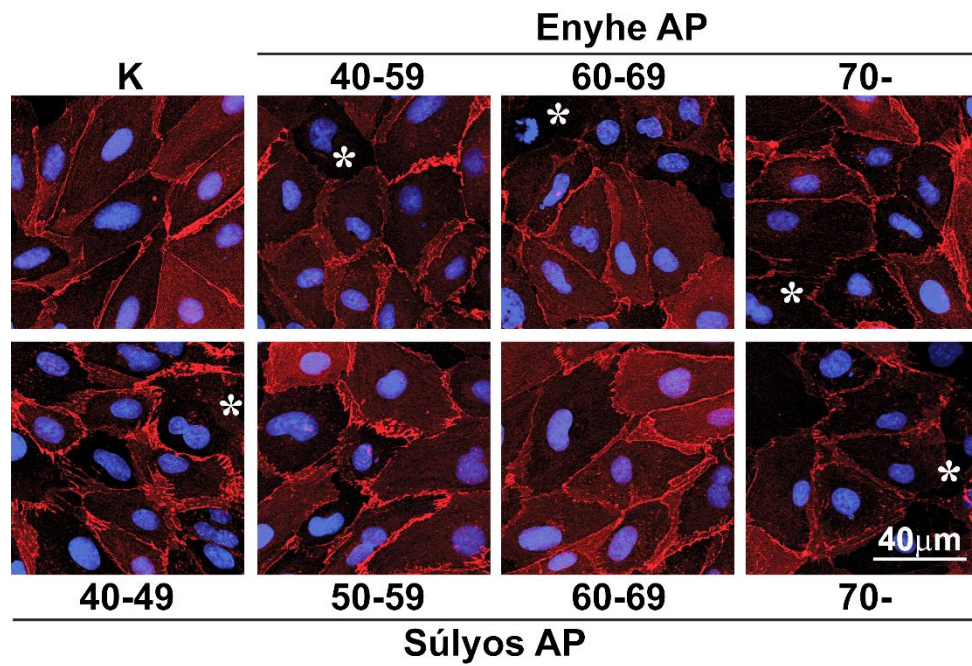
sejtrétegek esetében. A referencia vegyületként használt SNP kezelés hatására bekövetkező NO termelés szintjének megemelkedése is szignifikáns volt, ami bizonyította, hogy a reagens működik és a sejtek reagálnak a kezelésre (14. ábra).



14. ábra. Nitrogén-monoxid felszabadulás mérése 20%-os kontroll és enyhe vagy súlyos AP-es betegekből származó vérérummal történő kezelést követően hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteken; n(szérum) = 3-8; n(soklyukú lemez lyuk) = 5-8; ** p < 0.01, *** p < 0.001; átlag ± SD; egyutas ANOVA Bonfferroni poszt-tesztel; (K: kontroll csoport, SNP: nátrium nitroprusszid).

5.4. A szoros kapcsolatok morfológiájának jellemzése a kezelés hatására

A funkcionális mérések – permeabilitás és TEER – mellett megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van az enyhe és súlyos AP-ben szenvedő páciensek vérérumával történő kezelés a humán agyi endotélsejtek sejtközötti kapcsolatainak morfológiájára. A hCMEC/D3 sejteken az adherens junkciókat létrehozó PECAM-1-et jelöltük immunhisztokémiával. Látható, hogy a kontroll sejtek között egyértelmű sejthatárok látszanak. A PECAM folytonosságának elemzéséhez komplex képanalízisre van szükség (Matlab), de az első reprezentatív képek alapján sok esetben gyengül a sejtek közötti festés folytonossága vagy teljesen el is tűnik (15. ábra, csillaggal jelölve). Néhány esetben megváltozik a sejtek alakja (15. ábra).



15. ábra. Morfológiai analízis 20%-os kontroll és enyhe vagy súlyos AP-es betegekből származó vérérummal történő kezelést követően hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteken. A sejtek közötti adherens kapcsolatot alkotó PECAM-1 (vérlemezke-endotélsejt adhéziós molekula 1) immunhisztokémiai festését végeztük el. Csillag: sejt-közötti kapcsolatok gyengülése.

6. MEGBESZÉLÉS

Az AP az egyik leggyakoribb, hirtelen fellépő, sürgős kórházi ellátást igénylő emésztőrendszeri rendellenesség, amelynek kutatása és terápiájának folyamatos tökéletesítése egyre fontosabbá vált az elmúlt évtizedekben. Átlagosan 100 000 emberből 30-40 főt érint világszerte és incidenciája növekszik, főleg a jobb anyagi helyzetű országokban (Iannuzzi és mtsai., 2022). Főként a súlyos AP-ben szenvedő betegeknél szövődmények alakulnak ki magas mortalitással, ugyanis a kórfolyamatban a nekrotizáló sejtek okozta gyulladás és szervi diszfunkció a többi szervre is kiterjedhet (Wang és mtsai., 2009; Lee és Papachristou, 2019; Hågendorn és mtsai., 2020). Az orvosi ismeretek exponenciális növekedése és a hatékonyabb kezelések megjelenése ellenére a hasnyálmirigy-betegségek pontos kórfolyamata továbbra sem ismert teljeskörűen. A betegek terápiája költséges és bonyolult, zömében tüneti kezelés zajlik (Boxhoorn és mtsai., 2021). Ezért szükség van a pathomechanizmus részletesebb feltárására, és a különböző, az AP következtében fellépő szervi, szöveti károsodások azonosítására.

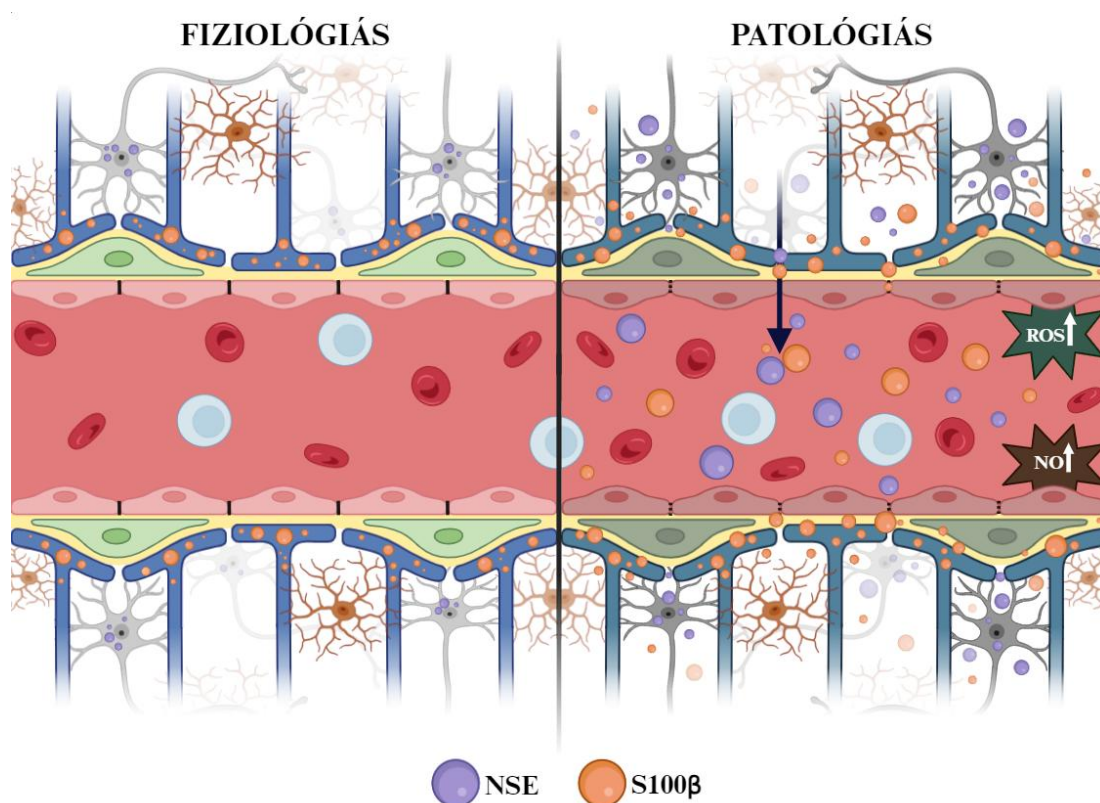
A súlyos AP-ben szenvedő betegek 10-11%-ánál jelentkezik komoly neurológiai érintettség, amely pankreatikus enkefalopátiaként nyilvánul meg. A klinikai tünetegyüttes igen változatos, a pontos kórfolyamat nem ismert, így a diagnózis sokszor nehéz, a kezelés tüneti. Az idegrendszeri érintettség megjelenése jelentősen ronthatja a betegek túlélési esélyeit, ugyanis a pankreatikus enkefalopátiával diagnosztizáltak mintegy fele életét veszti (Zhang és Tian, 2007; Hågendorn és mtsai., 2020; Meng és mtsai., 2023). Kialakulásához számos mechanizmus vezethet a jelenlegi hipotézisek alapján (Zhang és Tian, 2007; Meng és mtsai., 2023). Az AP korai szakaszában fellépő pankreatikus enkefalopátiánál a betegség hátterében a kórfolyamat során termelődő, nagy mennyiségű gyulladásos citokin és a hasnyálmirigyből a véráramba jutó enzimek állnak, amelyek fokozhatják a BBB átteresztőképességét (Zhang és Tian, 2007; Garg és Singh, 2019; Meng és mtsai., 2023). Az AP-ben felszabaduló enzimek közül különösen jelentős a PLA₂ hatása, amely károsítja a BBB-at alkotó agyi endotélsejtek foszfolipid membránját és a mitokondriumokat. A PLA₂ az agyba kerülve az ott megtalálható enkefalint és lecitint hemolitikus formákká alakítja és hozzájárul a demielinizációhoz. Az AP-ben vérbe kerülő többi pankreatikus enzim – tripszin, amiláz, elasztin és lipáz – pedig hozzájárulhat az agyi ödéma kialakulásához (Zhang és Tian, 2007).

Csoportunk korábban két különböző *in vivo* AP modellben kimutatta a BBB érintettségét a kórfolyamat során (Farkas és mtsai., 1998; Walter és mtsai., 2022). A szisztémás keringésbe kerülő gyulladásos citokinek hozzájárulhatnak a megemelkedett BBB permeabilitáshoz különböző agyi régiókban (Farkai és mtsai., 1998). Nem invazív AP patkány modellen leírtuk a BBB átjárhatóságának növekedését és a sejtfelszíni glikokalix sérülését, ami a barrier

funkciók csökkenését idézte elő (Walter és mtsai., 2022). A pankreatikus encefalopátia során is úgy, mint más központi idegrendszeri patológiás folyamatban sérülhet a BBB átjárhatósága és egyéb funkciói (Profaci és mtsai., 2020). Ezért célul tűztük ki enyhe, közepsúlyos és súlyos AP betegekből származó vérszérumok analizisét a BBB megnyílására utaló markerekre, és a szérumok közvetlen hatásának vizsgálatát az agyi endotélsejtekre.

6.1. A BBB sérülés biológiai markereinek jelenléte a betegek vérszérumában

Kísérleteink során a BBB sérülésének kimutatására két olyan markerfehérjét választottunk, amelyeket a szakirodalomban leginkább tanulmányoztak (Lindblad és mtsai., 2020). A főként neuronális eredetű NSE és a főként asztrocita eredetű S100 β koncentrációját a különböző súlyosságú AP-ben szenvedő paciensek vérszérumában ELISA eljárással vizsgáltuk, a szakirodalomban elsőként. Eredményeink alapján a humán vérszérumokban, mind az NSE, mind az S100 β koncentrációja jelentősen magasabb a fiziológiás értékeknél, amely az áttekintett irodalom alapján a BBB károsodására utalhat AP-ben (16. ábra).



16. ábra. A vér-agy gát változásai akut hasnyálmirigy-gyulladás során. Bal oldalon az egészséges, fiziológiás állapot látható, jobb oldalon pedig az AP-ben megfigyelt változásokat tüntettük fel. ROS: reaktív oxigéngyökök, NO: nitrogén-monoxid, NSE: neuron-specifikus enoláz; S100 β : S100 β kalcium-kötő fehérje.

Az NSE koncentrációja a vérszérumban egészséges felnőttek esetében 10-15 ng/mL körüli érték, életkortól és nemtől függetlenül. Patológiás esetekben azonban 18-45 ng/mL a jellemzőbb, de számoltak be már a 100 ng/mL-t meghaladó értékekről is (Vajtr és mtsai., 2009; Dadas és mtsai., 2018; Lindblad és mtsai., 2020; Polyakova és mtsai., 2022; Yun és mtsai., 2022; Babkina és mtsai., 2024). Az általunk vizsgált humán vérszérumokban 150-170 ng/mL koncentrációban volt megtalálható az enzim, a betegség súlyosságával összefüggésben, tehát a súlyos AP-ben szenvedő betegeknél magasabb szintet mértünk az enyhe csoporthoz képest. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal, miszerint az NSE szintje az életkorral korral nincs összefüggésben, azonban a betegség súlyosságával igen. Az NSE megemelkedett szintje a vérben a BBB és a neuronok sérülésére utalhat.

Az S100 β koncentrációja a vérszérumban egészséges felnőttek esetében maximum 90 pg/mL közti érték, szintje függhet az életkortól (Welch és mtsai., 2016; Janigro és mtsai., 2021). A fehérje megemelkedett koncentrációja a szisztémás keringésben számos központi idegrendszeri rendellenességgel hozható összefüggésbe, különös tekintettel a BBB megnyílással járó állapotokra (Chmielewska és mtsai., 2009). Patológiás esetekben 140 és 710 pg/mL közti érték a jellemzőbb (Vajtr és mtsai., 2009; Welch és mtsai., 2016), azonban súlyos traumás agysérülést követően szintje elérheti akár a 2000-3000 pg/mL-t is (Vajtr és mtsai., 2009; Wu és mtsai., 2020). Az általunk vizsgált humán vérszérumokban 1500–2000 pg/mL koncentrációban volt megtalálható a fehérje, amely az eddig a szakirodalomban leírt értékekkel korrelál és a BBB sérülésére, megnyílására utalhat. Esetünkben a betegség súlyosságával nem változott a markerszint. Érdekes összefüggés, hogy a magas S100 β szint és feltételezett BBB károsodás már az enyhe AP-ben szenvedő paciensek esetében is jelen van, azonban pankreatikus encefalopátia jellemzően a súlyos esetekben alakul csak ki. Jövőbeli terveink között szerepel a szérumok ismételt analízise, ahol a vizsgálatba egészséges donorokból származó véreket is be tervezünk vonni.

6.2. A vérszérumokkal történő kezelés hatása tenyésztett humán agyi endotélsejtekre

A kísérleteink második felében az enyhe, közép súlyos és súlyos AP-ben szenvedő betegek vérszérumainak közvetlen hatását teszteltük tenyésztett agyi endotélsejteken. A barrier integritási vizsgálatok során a rezisztencia méréseknél a kontroll csoporthoz képest majdnem minden esetben tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a különböző súlyosságú AP-ben szenvedő paciensek szérumaival való kezelés hatására. A permeabilitási vizsgálatok során az FD10 markerrel kimért paracelluláris permeabilitás két esetben mutatott szignifikáns növekedést a kontrollhoz képest. Az enyhe lefolyású AP-ban szenvedő, 60-as éveiben járó korcsoportnál,

valamint a betegség súlyos formája esetében a legidősebb korosztály esetében. Emellett a transzcelluláris permeabilitásban nem figyeltünk meg szignifikáns változást csak egy trendet: emelkedést a súlyos AP-ben szenvedő 70 éves és ennél idősebb paciensek szérumával kezelt sejtek esetén. A betegek szérumai által kiváltott oxidatív stressz vizsgálatok kimutatták, hogy a szérumokkal kezelt tenyésztett humán agyi endotélsejtek ROS és NO termelése is szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoportokhoz képest a legtöbb súlyossági és korcsoportban. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az AP betegek szisztémás keringésében olyan faktorok keringhetnek, mint gyulladásos citokinek, hasnyálmirigy enzimek, amelyek közvetlenül érintkezve az agyi endotélsejtekkel stresszt váltanak ki: hozzájárulnak az agyi endotélsejtek barrier integritásának csökkenéséhez, megemelik a bazális NO termelést és kiváltják oxidatív gyökök felszabadulását is. Ezek a gyulladásos citokinek és enzimek csökkentik a gát szorosságát, valamint funkcionális változásokat idézhetnek elő (de Vries és mtsai., 1996; Farkas és mtsai., 1998).

Kutatócsoportunk korábban elsőként mutatta ki AP patkánymodelljeiben a BBB áteresztőképességének szignifikáns növekedését (Farkas és mtsai., 1998; Walter és mtsai., 2022). A vérszérumokban jelenlevő gyulladásos citokinek és hasnyálmirigy enzimek káros hatással lehetnek az agyi endotélsejtekre és következésképpen a BBB-ra. Fiziológiai körülmények között a két vizsgált markerfehérje az őket termelő sejtek citoplazmájában van jelen túlnyomó részt. Azonban kórfolyamatokban a szisztémás gyulladás miatt a BBB integritása is sérülhet, aminek következtében az eredetileg neuronális és gliális markerek a vérkeringésbe juthatnak (16. ábra). Jelenlegi vizsgálataink úttörőek, mivel elsőként vizsgáltuk AP kórfolyamatában a BBB sérülésére utaló marker fehérjék – mint az NSE és az S100 β – jelenlétét betegek vérszérumaiban, valamint teszteltük a szérumok hatását agyi endotélsejteken.

7. ÖSSZEGZÉS ÉS TOVÁBBI CÉLJAINK

Eredményeink felhívják a figyelmet az AP súlyos neurológiai mellékhatásaira és ezek mélyrehatóbb tanulmányozásának fontosságára. Adatainkkal hozzájárulhatunk a vér-agy gátat a hasnyálmirigy-gyulladás során érintő változások összetettebb megértéséhez és a kórfolyamat részletesebb leírásához, valamint további alapot adhatunk a pankreatikus encefalopátiában szenvedő betegek hatékonyabb kezeléséhez. További céljaink közé tartozik az együttműködő partnereinktől kapott vérszérumok elemzése más BBB megnyílására utaló biomarkerekre (klaudin-5, GFAP). Tervezünk egy humán őssejt-eredetű BBB modellt felhasználni a sejtenyészetes vizsgálatokhoz. Célunk jellemezni a sejtfelszíni glikokalix összetételét és változásait a szérumokkal való kezelés hatására.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(1):41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(1):13-25.
- Andjelkovic AV, Situ M, Citalan-Madrid AF, Stamatovic SM, Xiang J, Keep RF. Blood-Brain Barrier Dysfunction in Normal Aging and Neurodegeneration: Mechanisms, Impact, and Treatments. *Stroke.* 2023;54(3):661-672.
- Babkina AS, Lyubomudrov MA, Golubev MA, Pisarev MV, Golubev AM. Neuron-Specific Enolase-What Are We Measuring? *Int J Mol Sci.* 2024;25(9):5040.
- Barna L, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V, Jósavay K, Zvara Á, Campos-Bedolla P, Deli MA. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(1):5.
- Boxhoorn L, Voermans RP, Bouwense SA, Bruno MJ, Verdonk RC, Boermeester MA, van Santvoort HC, Besselink MG. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2020; 396(10252):726-734.; Erratum in: *Lancet.* 2021; 398(10312):1686.
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszeka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 2014; 45(8):610-38.
- Chmielewska N, Szyndler J, Makowska K, Wojtyna D, Maciejak P, Płażnik A. Looking for novel, brain-derived, peripheral biomarkers of neurological disorders. *Neurol Neurochir Pol.* 2018;52(3):318-325.
- Dadas A, Washington J, Diaz-Arrastia R, Janigro D. Biomarkers in traumatic brain injury (TBI): a review. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018;14:2989-3000.
- Dadas A, Washington J, Marchi N, Janigro D. Improving the clinical management of traumatic brain injury through the pharmacokinetic modeling of peripheral blood biomarkers. *Fluids Barriers CNS.* 2016;13(1):21.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):59-127.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(4):892-910.
- Deli, Mária A. "Drug transport and the blood-brain barrier." *Solubility, Delivery, and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates.* Washington: Bentham Science Publishers Ltd (2011): 144-165.

- de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol.* 1996; 64(1):37-43.
- Farkas G, Márton J, Nagy Z, Mándi Y, Takács T, Deli MA, Abrahám CS. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin 6. *Neurosci Lett.* 1998; 242(3):147-50.
- Garg PK, Singh VP. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2019; 156(7):2008-2023.
- Hágendorn R, Vincze Á, Izbéki F, Gajdán L, Gódi S, Illés A, Sarlós P, Farkas N, Erőss B, Lillik V, Illés D, Varjú P, Márta K, Török I, Papp M, Vitális Z, Bod B, Hamvas J, Szepes Z, Takács T, Czakó L, Márton Z, Szentesi A, Párnitzky A, Hegyi P, Mikó A. Development of disturbance of consciousness is associated with increased severity in acute pancreatitis. *Pancreatology.* 2020; 20(5):806-812.
- Hülper P, Veszélka S, Walter FR, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2013;169(7):1561-73.
- Iannuzzi JP, King JA, Leong JH, Quan J, Windsor JW, Tanyingoh D, Coward S, Forbes N, Heitman SJ, Shaheen AA, Swain M, Buie M, Underwood FE, Kaplan GG. Global Incidence of Acute Pancreatitis Is Increasing Over Time: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2022;162(1):122-134.
- J. Gordon Betts, Kelly A. Young, James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix. (2013). 17.9 The Endocrine Pancreas. In *Anatomy and Physiology* (p. 693). Houston, Texas: OpenStax.
- Janigro D, Bailey DM, Lehmann S, Badaut J, O'Flynn R, Hirtz C, Marchi N. Peripheral Blood and Salivary Biomarkers of Blood-Brain Barrier Permeability and Neuronal Damage: Clinical and Applied Concepts. *Front Neurol.* 2021;11:577312.
- Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(1):69.
- Lee PJ, Papachristou GI. New insights into acute pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(8):479-496.
- Leung PS. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 690:3-12.

- Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vigh L, Puskás LG, Sántha M, Deli MA. Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS*. 2015;12:17.
- Lindblad C, Nelson DW, Zeiler FA, Ercole A, Ghatan PH, von Horn H, Risling M, Svensson M, Agoston DV, Bellander BM, Thelin EP. Influence of Blood-Brain Barrier Integrity on Brain Protein Biomarker Clearance in Severe Traumatic Brain Injury: A Longitudinal Prospective Study. *J Neurotrauma*. 2020;37(12):1381-1391.
- Meng Y, Zheng X, Gao F, Chen L, Qiu J, Li H, Qi X. Incidence and outcomes of pancreatic encephalopathy in patients with acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Intern Emerg Med*. 2023;18(4):1203-1212.
- Mir IN, Chalak LF. Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit. *Early Hum Dev*. 2014;90(10):707-11.
- Petrov MS, Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16(3):175-184.
- Polyakova M, Mueller K, Arelin K, Lampe L, Rodriguez FS, Luck T, Kratzsch J, Hoffmann KT, Riedel-Heller S, Villringer A, Schoenknecht P, Schroeter ML. Increased Serum NSE and S100B Indicate Neuronal and Glial Alterations in Subjects Under 71 Years With Mild Neurocognitive Disorder/Mild Cognitive Impairment. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:788150.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med*. 2020; 217(4):e20190062.
- Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology*. 2017;17(2):155-165.
- Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, Culot M, Gosselet F, Deli MA, Neuhaus W. Transport Studies Using Blood-Brain Barrier In Vitro Models: A Critical Review and Guidelines. *Handb Exp Pharmacol*. 2022; 273:187-204.
- Szatmary P, Gramatikopoulos T, Cai W, Huang W, Mukherjee R, Halloran C, Beyer G, Sutton R. Acute Pancreatitis: Diagnosis and Treatment. *Drugs*. 2022; 82(12):1251-1276.
- Talathi SS, Zimmerman R, Young M. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. 2023. In: StatPearls; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; April 5, 2023.

- Vajtr D, Benada O, Kukacka J, Průša R, Houstava L, ěoupalík P, Kizek R. Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol Res*. 2009;58(2):263-268.
- Veszeka S, Pásztoi 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;50(1):219-28.
- Vigh JP, Kincses A, Ozgür B, Walter FR, Santa-Maria AR, Valkai S, Vastag M, Neuhaus W, Brodin B, Dér A, Deli MA. Transendothelial Electrical Resistance Measurement across the Blood-Brain Barrier: A Critical Review of Methods. *Micromachines (Basel)*. 2021; 12(6):685.
- Walter FR, Harazin A, Tóth AE, Veszeka S, Santa-Maria AR, Barna L, Kincses A, Biczó G, Balla Z, Kui B, Maléth J, Cervenak L, Tubak V, Kittel Á, Rakonczay Z Jr, Deli MA. Blood-brain barrier dysfunction in L-ornithine induced acute pancreatitis in rats and the direct effect of L-ornithine on cultured brain endothelial cells. *Fluids Barriers CNS*. 2022;19(1):16.
- Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszeka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers*. 2021;9(3):1904773.
- Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(12):1427-30.
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10(1):16.
- Welch RD, Ayaz SI, Lewis LM, Uden J, Chen JY, Mika VH, Saville B, Tyndall JA, Nash M, Buki A, Barzo P, Hack D, Tortella FC, Schmid K, Hayes RL, Vossough A, Sweriduk ST, Bazarian JJ. Ability of Serum Glial Fibrillary Acidic Protein, Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1, and S100B To Differentiate Normal and Abnormal Head Computed Tomography Findings in Patients with Suspected Mild or Moderate Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2016; 33(2):203-14.
- Whitcomb DC. Clinical practice. Acute pancreatitis. *N Engl J Med*. 2006;354(20):2142-50.
- Wu L, Feng Q, Ai ML, Deng SY, Liu ZY, Huang L, Ai YH, Zhang L. The dynamic change of serum S100B levels from day 1 to day 3 is more associated with sepsis-associated encephalopathy. *Sci Rep*. 2020; 10(1):7718.

- Xiao AY, Tan ML, Wu LM, Asrani VM, Windsor JA, Yadav D, Petrov MS. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(1):45-55.
- Yun GS, In YN, Kang C, Park JS, You Y, Min JH, Ahn HJ, Yoo I, Kim SW, Oh SK, Lee IH, Kim DM. Development of a strategy for assessing blood-brain barrier disruption using serum S100 calcium-binding protein B and neuron-specific enolase in early stage of neuroemergencies: A preliminary study. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(28):e29644.
- Zhang XP, Tian H. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007; 6(2):134-40.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Deli Máriának és Dr. Walter Fruzsínának, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet kutatóprofesszorának és tudományos munkatársának, munkám során nyújtott folyamatos támogatásukért és tanácsaikért.

Köszönöm Vigh Juditnak és Kocsis Annának, a Biológiai Barrierék Kutatócsoport PhD és MSc hallgatójának az elméleti és gyakorlati munkámban nyújtott rengeteg segítségét.

Köszönöm a Biológiai Barrierék Kutatócsoport minden egyes tagjának, különösen Dr. Hoyk Zsófiának, Dr. Veszélka Szilviának, Dr. Gróf Ilonának, Dr. Mészáros Máriának, Szecskó Anikónak, Cser Nárcisznak, Cui Zuhaonak, Lemaitre Luciennek, Szántó Milánnak és Párdi Koppányinak és a csoport korábbi tagjainak, Dr. Barna Lillának, Dr. Porkoláb Gergőnek, a sok segítséget, szakmai támogatást és a kedves, baráti légkört. Valamint köszönöm Dr. Ana Raquel Pato Santa Marianak, csoportunk egykori tagjának a kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Perei Katalinnak, az SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék egyetemi adjunktusának, hogy elvállalta a belső konzulensi tevékenységet.

Végezetül köszönöm az SZBK Biofizika Intézet munkatársainak és volt és jelenlegi vezetőjének, Dr. Zimányi Lászlónak és Prof. Deli Máriának, hogy helyet kaphattam szakdolgozóként az intézet tudományos életében.